



## 第九章 微生物檢定方法與技術

### 實驗五十 水質的微生物檢驗

#### 一、目的

- (一) 學習利用塗抹法檢驗水中生菌數。
- (二) 學習利用混合稀釋法檢驗水中生菌數。

#### 二、原理

用以檢驗能在胰化蛋白胨葡萄糖培養基或在培養皿計數培養基中生長並形成菌落之水中好氧及兼性厭氧異營菌。

#### 三、材料與設備

- (一) 材料：
  1. 量筒
  2. 吸管
  3. 培養皿
  4. 稀釋瓶
  5. 採樣容器
  6. 菌落計數器
  7. 彎曲玻棒
- (二) 試劑：
  1. 培養基：可二擇一供作培養細菌用



(1) 胰化蛋白胨葡萄糖培養基

(2) 培養皿計數培養基

2. 稀釋液：

(1) 磷酸二氫鉀溶液：

取 3.4 克磷酸二氫鉀溶於 50 mL 之蒸餾水中，待完全溶解後，以 1.0 M 氫氧化鈉溶液調整其 pH 值為  $7.2\pm 0.5$ 。然後加蒸餾水至全量為 100 mL，儲存於冰箱中做為原液備用。

(2) 氯化鎂溶液：

取 8.1 克氯化鎂，先溶於少量蒸餾水中，待完全溶解後，再加蒸餾水至全量為 100 mL，儲存於冰箱中做為原液備用。

分別取 10 mL 氯化鎂溶液和 2.5 mL 磷酸二氫鉀溶液再加入蒸餾水至全量為 2000 mL，混搖均勻後，分裝於稀釋瓶中，經  $121^{\circ}\text{C}$  滅菌 15 分鐘以上，做為稀釋液備用。

(一) 設備

1. 冰箱
2. 水浴槽
3. 培養箱
4. 乾熱滅菌器
5. 高壓滅菌釜

#### 四、方法與步驟

塗抹法

(一) 採樣：



1. 使用清潔並經滅菌之容器或無菌袋。
2. 水樣若含有餘氯時，在採樣時應加入適量之硫代硫酸鈉（120 mL）的採樣容器加入 0.1 mL 10% 的硫代硫酸鈉可還原 15 mg/L 的餘氯）。
3. 所採取之樣品應具有代表性，且在檢驗之前不再被污染。
4. 水樣之量須以能做完所需檢驗為原則，但不得少於 100 mL。

(二) 保存：

1. 水樣之運送及保存須在 0 至 5 °C 的條件下進行。
2. 水樣必須在 24 小時內進行檢驗（建議在採樣後 6 小時內進行檢驗）。

(三) 步驟：

1. 水樣取回後，先進行水樣稀釋步驟，分別使用滅菌之吸管依序做成一系列適當之 10 倍、100 倍、1000 倍及 10000 倍等稀釋水樣並混搖均勻（圖 50-1）。
2. 事先將約 15 mL 已滅菌之培養基倒入培養皿並靜置至凝固。
3. 將上述培養皿倒置於培養箱內，使其失去 2 至 3 克之水分。培養箱溫度、失水克數及所需時間關係表如下：

	培養基失水克數			
	1 g	2 g	3 g	4 g
24°C	32 hr	64 hr	95 hr	125 hr
37°C	17 hr	35 hr	51 hr	67 hr
50°C	6 hr	12 hr	18 hr	24 hr
60°C	4 hr	8 hr	12 hr	16 hr



4. 吸取 0.2 mL 的原水及各稀釋度水樣滴在培養基上，每一稀釋濃度至少做兩個培養皿（圖 50-2）。
5. 將已滅菌之彎曲玻棒放在培養基上再用手或旋轉桌旋轉培養皿至水樣均勻分佈於培養基表面（圖 50-3）。
6. 放置一盤水於培養箱底部。
7. 倒置培養皿於培養箱內，在  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  下培養  $48\pm 3$  小時。若形成的菌落不明顯，則繼續培養 24 小時。
8. 取含 30 至 300 個菌落的培養基在菌落數器中計數。同一培養皿至少應計數兩次，取其平均值。
9. 計算生菌數。
  - 1) 取含 30 至 300 個菌落之同一稀釋倍數的兩個培養皿來計算其生菌數，生菌數以 CFU/mL (Colony Forming Units/mL) 表示之。計算公式如下：  
生菌數 =  $X+Y/2\times D\times 1.0/0.2$   
X、Y：同一稀釋倍數兩個培養皿之菌落數。  
D：稀釋倍數。
  - 2) 若培養皿之菌落數不在 30 至 300 個之間，則依菌落數實際數目以下列方式處理：
    - a. 若各稀釋倍數中僅有一個稀釋倍數之一個培養皿的菌落數在 30 至 300 個之間，則以上列公式計算之，並註明為估計生菌數。
    - b. 若各培養皿均無菌落生長，則生菌數以小於 1 乘以最低稀釋倍數表示之，並註明為估計生菌數。
    - c. 菌落數之同一稀釋倍數兩個培養皿來計數，以上列公式計算。並註明為估計生菌數。



- d. 若僅原水有菌落產生且少於 30 個亦應計數，並註明為估計生菌數。
- e. 若各稀釋倍數中有兩個稀釋倍數之培養皿之菌落數在 30 至 300 個之間，則以下列公式計算之。並註明為估計生菌數。

$$\text{生菌數} = (X1+Y1) \times D1 + (X2+Y2) \times D2 / 4 \times 1.0 / 0.2$$

D1、D2：菌落數在 30 至 300 個之稀釋倍數。

X1、Y1：D1 稀釋倍數兩個培養皿之菌落數。

X2、Y2：D2 稀釋倍數兩個培養皿之菌落數。

- 3) 菌落數若大於 100 個以上時，個位數四捨五入，只取兩位有效數字。例如菌落數為 142 時以 140 表示之，菌落數為 155 時以 160 表示之。
- 4) 報告必須註明水樣保存時間、培養溫度、培養時間及使用之培養基。

### 混合稀釋法

#### (一) 採樣：

1. 使用清潔並經滅菌之容器或無菌袋。
2. 水樣若含有餘氯時，在採樣時應加入適量之硫代硫酸鈉（120 mL 的採樣容器加入 0.1 mL 10% 的硫代硫酸鈉可還原 15 mg/L 的餘氯）。
3. 所採取之樣品應具有代表性，且在檢驗之前不再被污染。
4. 水樣之量須以能做完所需檢驗為原則，但不得少於 100 mL。

#### (二) 保存：

1. 水樣之運送及保存須在 0 至 5 °C 的條件下進行。
2. 水樣必須在 24 小時內進行檢驗（建議在採樣後 6 小時內進行檢驗）。

#### (三) 步驟：

1. 將已滅菌之培養基放入水浴槽內，溫度保持在 45±1 °C 間。



2. 水樣取回後，先進行水樣稀釋步驟，分別使用滅菌之吸管依序做成一系列適當之 10 倍、100 倍、1000 倍及 10000 倍等稀釋水樣並混搖均勻(圖 50-1)。
3. 吸取 1 mL 的原水及各稀釋度水樣滴在培養皿內，每一稀釋濃度至少做兩個培養皿(圖 50-4)。
4. 將約 15 mL 之培養基倒入含原水及稀釋濃度水樣的培養皿中，混搖均勻後靜置至凝固(圖 50-5)。
5. 放置一盤水於培養箱底部。
6. 倒置培養皿於培養箱內，在  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  下培養  $48\pm 3$  小時。若形成的菌落不明顯，則繼續培養 24 小時。
7. 取含 30 至 300 個菌落的培養基在菌落數器中計數。同一培養皿至少應計數兩次，取其平均值。
8. 計算生菌數。
  - 1) 取含 30 至 300 個菌落之同一稀釋倍數的兩個培養皿來計算其生菌數，生菌數以 CFU/mL (Colony Forming Units/mL) 表示之。計算公式如下：  
生菌數 =  $(X+Y)/2 \times D$   
X、Y：同一稀釋倍數兩個培養皿之菌落數。  
D：稀釋倍數。
  - 2) 若培養皿之菌落數不在 30 至 300 個之間，則依菌落數實際數目以下列方式處理：
    - a. 若各稀釋倍數中僅有一個稀釋倍數之一個培養皿的菌落數在 30 至 300 個之間，則以上列公式計算之，並註明為估計生菌數。
    - b. 若各培養皿均無菌落生長，則生菌數以小於 1 乘以最低稀釋倍數表示之，並註明為估計生菌數。



- c. 若各培養皿之菌落數均不在 30 至 300 個之間，則以最接近 300 個菌落數之同一稀釋倍數兩個培養皿來計數。以上列公式計算，並註明為估計生菌數。
- d. 若僅原水有菌落產生且少於 30 個亦應計數，並註明為估計生菌數。
- e. 若各稀釋倍數中有兩個稀釋倍數之培養皿之菌落數在 30 至 300 個之間，則以下列公式計算之。並註明為估計生菌數。

$$\text{生菌數} = (X1+Y1) \times D1 + (X2+Y2) \times D2/4$$

D1、D2：菌落數在 30 至 300 個之稀釋倍數。

X1、Y1：D1 稀釋倍數兩個培養皿之菌落數。

X2、Y2：D2 稀釋倍數兩個培養皿之菌落數。

- 3) 菌落數若大於 100 個以上時，個位數四捨五入，只取兩位有效數字。例如菌落數為 142 時以 140 表示之，菌落數為 155 時以 160 表示之。
- 4) 報告必須註明水樣保存時間、培養溫度、培養時間及使用之培養基。



圖 50-1



圖 50-2



圖 50-3



圖 50-4

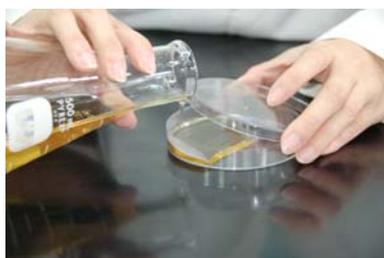


圖 50-5



### 實驗五十 水質的微生物檢驗

班級：\_\_\_\_\_

組別：\_\_\_\_\_

姓名：\_\_\_\_\_

學號：\_\_\_\_\_

#### 五、結果

#### 六、問題與討論

#### 七、參考文獻

張怡塘。2002。環境微生物實驗。高立圖書有限公司。台北縣。



## 實驗五十一 餐具的微生物檢驗

### 一、目的

學習如何檢查餐具衛生的情況。

### 二、原理

餐具的衛生影響食用者之飲食衛生安全，其檢查項目包含食物殘留、毒素殘留及微生物檢驗等。本實驗主要利用塗抹法 (swab) 檢驗餐具上微生物的情況。

### 三、材料與設備

#### (一) 材料

1. 有蓋試管
2. 無菌棉棒
3. 0.1% peptone water
4. 培養皿
5. 培養基(PCA, Plate-Count-Agar)
6. 吸管
7. 待測餐具(碗、盤子、湯匙等)

#### (二) 設備

1. 電磁加熱攪拌器
2. 高壓滅菌釜
3. 恆溫培養箱



#### 四、方法與步驟

1. 於有蓋試管中加入已滅菌之 10 ml 0.1% peptone water。
2. 將滅菌棉棒沾取 peptone water，於餐具表面塗抹數次(圖 51-1)，因餐具的不同，使用棉棒採樣檢驗的方式略有差異，方法如下：
  - 1) 盤子：盤面上劃直徑
  - 2) 碗：劃上緣與碗內底部圓周
  - 3) 叉子：尖齒表層
  - 4) 湯匙：內外表層
  - 5) 茶杯：由杯上往下 1 公分的內外圓周
3. 將手碰到之棉棒折斷後，棉棒浸泡於 peptone water 中，充分混合均勻(圖 51-2)。
4. 分別取 0.1% peptone water 混合液 1 ml 及 0.1 ml 加入培養皿的一端。
5. 加入滅菌培養基於另一端(圖 51-3)。
6. 將混合液與培養基充分混合(圖 51-4)，待凝固後將培養皿倒置放入在 37°C 培養 48 小時。
7. 取出培養基觀察微生物生長情況。



圖 51-1 於餐具表面塗抹數次



圖 51-2 將手碰到之棉棒折斷



圖 51-3 加入滅菌培養基於另一端圖



圖 51-4 將培養皿疊成一疊混合均勻



### 實驗五十一 餐具的微生物檢驗

班級：\_\_\_\_\_ 組別：\_\_\_\_\_

姓名：\_\_\_\_\_ 學號：\_\_\_\_\_

#### 五、結果

1. 請觀察並繪出不同餐具培養 48 小時後微生物生長情況。

#### 六、問題與討論

1. 比較不同餐具的微生物生長情況，並討論哪一個餐具最不容易清洗乾淨？
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
2. 請說明餐具微生物檢查與食品衛生之相關性？
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
3. 請說明正確之餐具清洗方法。



## 實驗五十二 手部微生物檢驗

### 一、目的

本實驗目的為使用不同採樣法（直接接觸法與塗抹法）來測定手部微生物存在之情況，並比較洗手前後微生物存在之情形。

### 二、原理

食物製備人員身體的衛生情況是影響食品衛生安全的重要因素之一，手部微生物菌叢包括表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、鏈球菌、酵母菌及黴菌等，不潔之手部可能會污染食物，甚至危害飲食者之健康。本實驗為使用直接接觸法與塗抹法，測定手部微生物存在之情況。

### 三、材料與設備

#### (一) 材料

1. Plate Count Agar (PCA)
2. 洗手乳
3. 0.1% peptone water
4. 無菌棉棒
5. 試管

#### (二) 設備

1. 培養皿
2. 酒精燈
3. 10 cm<sup>2</sup> 採樣板



4. 電子天平
5. 37°C 恆溫培養箱
6. 高溫高壓滅菌釜
7. 電磁加熱攪拌器
8. 無菌操作台
9. 菌落計數器

#### 四、方法與步驟

##### (一) 直接接觸法

1. 準備 2 個含已滅菌凝固之 PCA 培養皿。
2. 將手按壓於培養基表面(圖 52-1)。
3. 使用洗手乳清洗手部(圖 52-2)後，再將清洗過後手按壓於培養基表面(圖 52-3)。
4. 將培養基倒置，進行 37 °C 恆溫培養 48 小時。
5. 觀察結果並劃出菌落生長狀況。

##### (二) 塗抹 (swab) 法

1. 於有蓋試管中加入 10 ml 0.1% peptone water，滅菌之。
2. 將無菌棉棒沾取 peptone water，於覆蓋採樣板之手部表面來回塗抹數次(圖 52-4)。
3. 將棉棒折斷後，浸泡於 peptone water 中，並充分混合均勻(圖 52-5)。
4. 將樣本液以 peptone water 作  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$  及  $10^{-3}$  的連續稀釋。
5. 每一稀釋倍數各吸 1 ml 至培養皿。



6. 以洗手乳清潔手部後，重複步驟 1~5。
7. 分別加入已滅菌溶融態(45-50°C)之 PCA 混合均勻，放置冷卻凝固。
8. 將培養皿倒置放入在 37°C 恆溫培養箱培養 48 小時。
9. 取出並計算每一培養皿之菌落數。同一樣品培養皿之菌落數介於 30-300 個者計算平均值，取平均值乘上稀釋倍數即為該樣品之菌數。



圖 52-1 將手按壓於培養基表面



圖 52-2 使用洗手乳清洗手部



圖 52-3 清洗過後手按壓於培養基表面。



圖 52-4 以無菌棉棒沾取 peptone water 於採樣板之範圍內來回塗抹數次。



圖 52-5 將棉棒折斷。



## 實驗五十二 手部微生物檢驗

班級：\_\_\_\_\_

組別：\_\_\_\_\_

姓名：\_\_\_\_\_

學號：\_\_\_\_\_

### 五、結果

1. 觀察培養皿，描述並繪圖比較以直接接觸法採樣洗手前及洗手後之手部微生物存在情形。
2. 計算以塗抹法採樣之手部洗手前與洗手後之微生物菌數。

### 六、問題與討論

1. 請說明可否使用培養後之培養皿判斷哪些菌落屬於致病菌？為什麼？
2. 請說明兩種測定方法有何差異性？
3. 請說明手部清潔對食品衛生有何實質上的影響？
4. 請說明正確清潔手部之方法為何？



## 實驗五十三 總生菌數測定

### 一、目的

主要為學習如何測定食品中總生菌數含量。

### 二、原理

理論上，每一個活的細菌會在培養基上形成一個菌落，由菌落數目可以得知樣品的微生物品質。總生菌數常用為測定食物、水質衛生指標菌；菌量多寡與食品之製造環境細菌污染狀況具有相關性，可作為評估食品安全性、保存性及衛生狀況之有效方法，以及是否合乎衛生安全之指標。

### 三、材料與設備

#### (一) 材料：

1. 檢體 (冷藏豬肉)
2. 試管
3. 培養皿
4. 滅菌吸管
5. PCA 培養基(Plate Count Agar)

#### (二) 設備：

1. 乾熱滅菌器
2. 高壓滅菌釜
3. 0~7 °C 冷藏冰箱
4. 培養箱



5. 水浴槽
6. 攪拌均質器

#### 四、方法與步驟

1. 樣品均質

於以滅菌之均質機內，切碎樣本混和均質後，取 25 g 檢體加入 225 ml 已滅菌之 peptone water 中，以鐵胃攪拌 2 分鐘(圖 53-1)，即為 10 倍稀釋檢液。

2. 連續稀釋

分別使用滅菌之吸管，依序做成一系列適當之 100 倍、1,000 倍、1,0000 倍等稀釋倍數(圖 53-2)。

3. 以倒平盤法 (pour plate) 接菌(圖 53-3)。
4. 移入培養箱中，37°C 培養 48 小時。
5. 計數菌落。



圖 53-1 鐵胃



圖 53-2 連續稀釋



圖 53-3 倒入培養基



### 實驗五十三 總生菌數測定

班級：\_\_\_\_\_

組別：\_\_\_\_\_

姓名：\_\_\_\_\_

學號：\_\_\_\_\_

#### 五、結果

1. 察並計算微生物菌數。

#### 六、問題與討論

1. 本實驗以冷藏豬肉為檢體，其總生菌數約為多少？是否符合 CAS 標準？
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
2. 依據 CAS 標準，冷藏豬肉及冷凍豬肉之總生菌數數值差異約為多少？有何意義？



## 實驗五十四 衛生檢驗－大腸桿菌群之檢驗

### 一、目的

大腸桿菌群 (coliform) 為食品衛生檢驗菌之一，檢驗食品中大腸桿菌群的存在，可用來推斷該食品遭受糞便污染的證據及可能含有其他病原性腸道菌的疑慮。

### 二、原理

大腸桿菌群為革蘭氏陰性不產芽胞桿菌，於 35°C 下培養 24 小時，可發酵醣類產酸及產氣。檢測食品中大腸桿菌群之存在，其步驟包括三種基本試驗：推定試驗 (presumptive test)、確定試驗 (confirmed test) 及完成試驗 (completed test)。大腸桿菌群培養時，易發酵碳水化合物產生氣體，檢驗時，先將樣品接種於硫酸月桂酸胰化蛋白胨培養液(LST)，置於 35°C 培養 24 小時，觀察發酵管集氣的狀況，如發生產氣，則判定含疑似大腸桿菌群。確定步驟則將疑似大腸桿菌群的菌落接種於煌綠乳糖膽汁培養液(BLGL)，置於 35°C 培養 46 小時後，有產氣者，判定為大腸桿菌群陽性。最後再以最確數 (MPN) 的方法估算大腸桿菌群的數目。

### 三、材料與設備

#### (一) 設備

1. 冰箱
2. 高壓滅菌釜
3. 乾燥滅菌器
4. 培養箱
5. 水浴槽
6. 攪拌均質器 (blender)
7. 稀釋瓶 (450 ml、225 ml、99 ml)
8. 10 ml、1 ml 吸管
9. 試管 (15×150 mm)
10. 白金耳
11. 發酵管 (內徑 7×20 mm)



## (二) 試藥

1. 氯化鈉(NaCl)
2. 磷酸氫二鉀(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

## (三) 培養基

## 1. 硫酸月桂胰化蛋白胨培養液 (Lauryl sulfate tryptose broth, LST)

1) 培養基材料	胰化蛋白胨 (tryptose)	20 g
	乳糖 (lactose)	5.0 g
	磷酸氫二鉀 (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2.75 g
	氯化鈉(NaCl)	5.0 g
	硫酸月桂酸鈉 (sodium lauryl sulfate)	0.1 g
	蒸餾水	1000 ml

- 2) 流程 秤取各成分溶於蒸餾水內，攪拌並輕微加熱至溶解，調整 pH 至 6.8±0.2 各取 10 ml 注入裝有發酵管之試管內(九支) 121°C 滅菌 15 分鐘。

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

1) 培養基材料	蛋白胨 (peptone)	10.0 g
	乳糖 (lactose)	10.0 g
	牛膽粉 (Oxgall powder)	20.0 g
	煌綠色試劑 (Brilliant Green)	0.0133 g
	蒸餾水	1000 ml

- 2) 流程 秤取各成分溶於蒸餾水內，攪拌並輕微加熱至溶解，調整 pH 至 6.8±0.2 各取 10 ml 注入裝有發酵管之試管內(九支) 121°C 滅菌 15 分鐘。



#### (四) 樣品稀釋液

##### 1. 生理食鹽水

- |       |            |         |
|-------|------------|---------|
| 1) 材料 | 氯化鈉 (NaCl) | 8.5 g   |
|       | 蒸餾水        | 1000 ml |
|       | 稀釋瓶        |         |
- 2) 流程 取 8.5 g 氯化鈉溶於 1000 ml 蒸餾水，分裝於稀釋瓶內，以 121°C 滅菌 15 分鐘調整 pH 值為 7.0±0.1。

### 四、方法與步驟

#### (一) 檢體之處理

##### 1. 檢體處理

- 1) 將檢體上下振搖使之充分混合。
- 2) 吸取 50 ml 置入 450 ml 已滅菌之稀釋液，製成 10 倍稀釋液。

註 1：若檢體不足 50 g (ml) 時，取 225 g (ml) 以適當稀釋液作成 10 倍稀釋檢液。

##### 2. 檢液製備

- 1) 將 10 倍稀釋液依序作成一系列之稀釋液。

#### (二) 推定試驗

1. 將稀釋檢液及原液搖勻。
2. 每稀釋檢液各吸取 1 ml 接種於三支已裝有 9 ml 硫酸月桂酸胰化蛋白胨肉羹試管中 (三階三支)，應於 15 分鐘內完成。
3. 置於 35 °C 培養箱內培養 24 小時。



4. 觀察是否產氣。
5. 未產氣者再培養 24 小時。
6. 仍未產氣者，為大腸桿菌群陰性，產氣者，為可疑大腸桿菌群陽性。

### (三) 確定試驗

1. 將推定試驗中，每一產氣的試管皆取一白金耳量 (loop)，接種於另一支煌綠乳糖膽汁培養液 (BGLB)。
2. 於 35 °C 培養箱培養 18~22 小時。
3. 觀察是否產氣。
4. 未產氣者再培養 24 小時。
5. 仍未產氣者，判定為大腸桿菌群陰性。
6. 產氣者，判定為大腸桿菌群陽性。

### (四) 最確數 (most probable number ; MPN)

由確定試驗中，確定為大腸桿菌群陽性者，推算推定實驗中各階大腸桿菌群陽性之試管數，利用附表中的最確數表推算出大腸桿菌群之最確數 (MPN/g 或 ml)。

$$\text{計算公式：} \frac{\text{表中之MPN數}}{100} \times \text{中間試管之稀釋倍數} = \text{MPN/g 或 mL}$$



例：

連續三階	稀釋倍數	$10^2-10^3-10^4$
	正反應試管數	3---1---0
	表中之 MPN 數	42.7

代入計算公式，求得每 g 或每 ml 檢體中之最確數為

$$\frac{42.7}{100} \times 10^3 = 427 \text{ MPN/g 或 mL}$$



### 實驗五十四 衛生檢驗－大腸桿菌群之檢驗

班級：\_\_\_\_\_

組別：\_\_\_\_\_

姓名：\_\_\_\_\_

學號：\_\_\_\_\_

#### 五、實驗結果

##### 1. 大腸桿菌群檢驗結果

培養基	稀釋倍數		
	10 倍	100 倍	1000 倍
硫酸月桂胰化蛋白胨培養液 (LST)			
煌綠乳糖膽汁培養液 (BGLB)			

##### 2. 最確數計算

稀釋倍數	正反應之試管數	MPN 數
10 倍		
100 倍		
1000 倍		
檢體之 MPN 數		

#### 六、問題與討論

1. 試描述檢驗大腸桿菌群時所使用的發酵管之功能與操作方式。
2. 試解釋為何確認大腸桿菌群時需將樣品培養於煌綠乳糖膽汁培養液？



## 實驗五十五 衛生檢驗－大腸桿菌之檢驗

### 一、目的

大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 為食品衛生檢驗菌之一，檢驗食品中大腸桿菌的存在，可用來推斷該食品遭受糞便污染的證據及可能含有其他病原性腸道菌的疑慮。

### 二、原理

大腸桿菌為一食品衛生指標菌，亦為大腸桿菌群之一員，革蘭氏陰性不產芽胞桿菌，於 35°C 下培養 24 小時，可發酵醣類產酸及產氣。檢測食品中大腸桿菌群之存在，其步驟包括三種基本試驗，先依照大腸桿菌群的推定試驗 (presumptive test) 與確定試驗 (confirmed test) 判斷為大腸桿菌群陽性後，再以 IMViC 試驗進行大腸桿菌的判定。

### 三、材料與設備

#### (一) 設備

1. 冰箱
2. 高壓滅菌釜
3. 乾燥滅菌器
4. 培養箱
5. 水浴槽
6. 攪拌均質器 (blender)
7. 稀釋瓶 (450 ml、225 ml、99 ml)
8. 10 ml、1 ml 吸管
9. 試管 (15×150 mm)
10. 白金耳
11. 發酵管 (內徑 7×20 mm)



## (二) 試藥與試劑

### 1. 試藥

- |                                       |   |
|---------------------------------------|---|
| 1) 氯化鈉 (NaCl)                         | 9) 碳化鉀  |
| 2) 磷酸二氫甲 ( $K_2HPO_4$ )               | 10) 碘   |
| 3) 氫氧化鈉 (NaOH)                        | 11) 沙黃 (Safranin)                               |
| 4) 結晶紫 (Crystal violet)               | 12) 對-二胺基苯甲<br>(p-Dimethylaminobenzaldehyde)    |
| 5) 草酸銨 (Ammonium oxalate)             | 13) 甲基紅 (Methyl red)                            |
| 6) $\alpha$ -萘酚 ( $\alpha$ -Naphthol) | 14) 戊醇或異戊醇 (Amyl alcohol or<br>isoamyl alcohol) |
| 7) 肌酸 (Creatine)                      | 15) 氫氧化鉀 (KOH)                                  |
| 8) 乙醇 (alcohol)                       | 16) 鹽酸 (HCl)                                    |

### 2. 試劑

- |                            |                       |
|----------------------------|-----------------------|
| 1) 科瓦克氏試劑 (Kovacs reagent) | 3) 歐普氏試劑 (VP reagent) |
| 2) 甲基紅指示劑                  |                       |

## (三) 培養基

### 1. 硫酸月桂酸胰化蛋白胨肉羹 (LST-Lauryl Sulfate Tryptose Broth)

- |          |                      |        |
|----------|----------------------|--------|
| 1) 培養基材料 | 胰化蛋白胨 (tryptose)     | 20 g   |
|          | 乳糖 (lactose)         | 5.0 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)	5.0 g
硫酸月桂酸鈉 ( sodium lauryl sulfate )	0.1 g
蒸餾水	1000 ml

- 2) 流程 秤取各成分溶於蒸餾水內,加熱至溶解,調整 pH 至  $8\pm 0.2$   
各取 9 ml 注入裝有發酵管之試管內(九支),以  $121^\circ\text{C}$  滅菌 15 分鐘。

### 2. 大腸桿菌肉羹 ( *Escherichia coli* Broth , 簡稱 EC Broth )

1) 培養基材料	胰化蛋白胨 ( Tryptone )	20 g
	乳糖 ( Lactose )	5 g
	膽汁鹽 ( Bacto bile salt #3 )	1.5 g
	磷酸氫二鉀 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	4 g
	磷酸二氫鉀 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1.5 g
	氯化鈉(NaCl)	5 g
	蒸餾水	1000 ml

- 2) 流程 秤取各成分溶於蒸餾水內,調整 pH 至  $6.9\pm 0.1$ ,各取 5 ml  
注入裝有發酵管之試管內,以  $121^\circ\text{C}$  滅菌 15 分鐘。

### 3. 伊紅亞甲藍瓊脂培養基 ( EMB-Eosin Methylene Blue Agar ( Levine ) )

1) 培養基材料	蛋白胨 ( Peptone )	10 g
	乳糖 ( Lactose )	10 g



磷酸氫二鉀 (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2 g
洋菜 (Agar)	15 g
伊紅 (Eosin Y)	0.4 g
亞甲藍(Methylene blue)	0.065 g
蒸餾水	1000 ml

- 2) 流程 秤取各成分加熱溶於蒸餾水內，調整 pH 至 7.1±0.1，分裝於試管內，以 121°C 滅菌 15 分鐘。
- 每一培養皿約倒入 15~21 ml，注入前需搖勻，避免產生氣泡。

#### 4. 胰化蛋白動肉羹 (Tryptone of tryptophane Broth)

- |          |                  |         |
|----------|------------------|---------|
| 1) 培養基材料 | 胰化蛋白腴 (Tryptone) | 10 g    |
|          | 蒸餾水              | 1000 ml |
- 2) 流程 秤取各成分溶於蒸餾水內，調整 pH 至 6.9±0.2，各取 5 ml 注入試管內，以 121 °C 滅菌 15 分鐘。

#### 5. 甲基紅－歐普氏培養基 (MR-VP Medium)

- |          |  |         |
|----------|--|---------|
| 1) 培養基材料 | 蛋白腴 (Peptone)                            | 7 g     |
|          | 葡萄糖 (Dextrose)                           | 5 g     |
|          | 磷酸氫二鉀 (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) | 4 g     |
|          | 氯化鈉(NaCl)                                | 5 g     |
|          | 蒸餾水                                      | 1000 ml |



- 2) 流程 秤取各成分溶於蒸餾水內，調整 pH 至  $6.9 \pm 0.2$ ，各取 5 ml 注入裝有發酵管之試管內，以  $121^\circ\text{C}$  滅菌 15 分鐘。

#### 6. 柯塞爾氏檸檬酸鹽肉羹 (Koser's citrate broth)

1) 培養基材料	磷酸氫胺鈉 ( $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	1.5 g
	磷酸氫二鉀 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	1 g
	硫酸鎂 ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.2 g
	檸檬酸鈉 ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	3 g
	蒸餾水	1000 ml

- 2) 流程 秤取各成分溶於蒸餾水內，調整 pH 至  $6.7 \pm 0.2$ ，分取 10 ml 注入試管內，以  $121^\circ\text{C}$  滅菌 15 分鐘。

#### 7. 煌綠乳糖膽汁肉羹 (BGLB-Brilliant Green Lactose Bile Broth)

1) 培養基材料	胰化蛋白胨 (Tryptone)	10 g
	乳糖 (Lactose)	10 g
	牛膽粉 (Oxgall powder)	20 g
	煌綠色試劑 (Brilliant green)	0.0133 g
	蒸餾水	1000 ml

- 2) 流程 秤取各成分溶於蒸餾水內，調整 pH 至  $7.2 \pm 0.1$ ，各取 10 ml 注入裝有發酵管之試管內，以  $121^\circ\text{C}$  滅菌 15 分鐘。



#### (四) 樣品稀釋液

##### 1. 生理食鹽水

- |       |            |         |
|-------|------------|---------|
| 1) 材料 | 氯化鈉 (NaCl) | 8.5 g   |
|       | 蒸餾水        | 1000 ml |
|       | 稀釋瓶        |         |
- 2) 流程 取 8.5 g 氯化鈉溶於 1000 ml 蒸餾水，分裝於稀釋瓶內，以 121 °C 滅菌 15 分鐘調整 pH 值為 7.0±0.1。

#### (五) 革蘭氏染色液 (Gram's stain solution)

- |                        |                |
|------------------------|----------------|
| 1) Hucker's 結晶紫液 (初染劑) | 3) 革蘭氏碘液 (媒染劑) |
| 2) Hucker's 複染液 (複染劑)  |                |

### 四、方法與步驟

#### (一) 檢體之處理

##### 1. 檢體處理

- 1) 將檢體上下振搖使之充分混合。
- 2) 吸取 50 ml 置入 450 ml 已滅菌之稀釋液，製成 10 倍稀釋液。

##### 2. 檢液製備

- 1) 將 10 倍稀釋液依序作成一系列之稀釋液。

#### (二) 推定試驗

1. 將稀釋檢液及原液搖勻。
2. 每稀釋檢液各吸取 1 ml 接種於三支已裝有 9 ml 硫酸月桂酸胰化蛋白胨肉羹



試管中 (三階三支), 應於 15 分鐘內完成。

3. 置於 35 °C 培養箱內培養 24 小時。
4. 觀察是否產氣。
5. 未產氣者再培養 24 小時。
6. 仍未產氣者, 為大腸桿菌陰性
7. 產氣者, 為可疑大腸桿菌陽性。

### (三) 確定試驗

#### 1. 大腸桿菌肉羹

- 1) 將推定試驗中, 每一產氣的試管皆取一白金耳量 (loop), 接種於另一支大腸桿菌肉羹中。
- 2) 於 45.5 °C 有蓋水浴箱培養 24±2 小時。
- 3) 觀察是否產氣。
- 4) 未產氣者再培養 24 小時。
- 5) 仍未產氣者, 為大腸桿菌群陰性。
- 6) 產氣者, 為可疑大腸桿菌陽性。(可疑大腸桿菌在繼續做下列試驗)

#### 2. 伊紅亞甲藍瓊脂培養基

- 1) 將大腸桿菌肉羹中, 每一產氣的試管皆取一白金耳量 (loop), 於伊紅亞甲藍瓊脂培養基表面作劃線培養。
- 2) 於 35 °C 培養箱中培養 18~24 小時。
- 3) 觀察菌落生長狀態, 並取直徑 2~4 mm, 頂部凸狀, 中央黑紫色, 具有金屬光澤之菌落, 移植於營養瓊脂。
- 4) 於 35 °C 培養箱中培養 18~22 小時。



- 5) 做革蘭氏染色。
  - 6) 若為革蘭氏染色陰性，無芽孢桿菌者，繼續進行 IMViC 試驗。
3. IMViC 試驗

實驗步驟，請參照實驗四十 IMViC 試驗。

(四) 最確數 (most probable number : MPN)

由確定試驗中，判定為大腸桿菌陽性者之各階大腸桿菌肉羹產氣之試管數，利用附表中的最確數表推算出大腸桿菌之最確數 (MPN/g 或 ml)。



### 實驗五十五 衛生檢驗－大腸桿菌之檢驗

班級：\_\_\_\_\_ 組別：\_\_\_\_\_

姓名：\_\_\_\_\_ 學號：\_\_\_\_\_

#### 五、實驗結果

##### 1. 大腸桿菌檢驗結果

培養基	稀釋倍數		
	10 倍	100 倍	1000 倍
硫酸月桂胰化蛋白胨培養液 (LST)			
煌綠乳糖膽汁培養液 (BGLB)			

##### 2. 革蘭氏染色、芽孢桿菌檢驗結果

##### 3. IMViC 試驗

檢驗項目	吲哚試驗	歐普氏試驗	甲基紅試驗	檸檬酸鹽 利用試驗
試驗結果				

##### 4. 最確數計算

檢體之稀釋倍數	10 倍	100 倍	1000 倍
正反應之試管數			
檢體之 MPN 數			





附表、最確數表

正反應試管數			MPN/g 或 mL	95%信賴界限	
0.1mL	0.01mL	0.001mL		下限	上限
0	0	0	<3		
0	0	1	3	<0.5	9
0	1	0	3	<0.5	13
0	2	0	—		
1	0	0	4	<0.5	20
1	0	0	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
2	3	0	—		



3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1,100	150	4,800
3	3	3	>1,100	>150	>



## 實驗五十六 金黃色葡萄球菌之檢驗

### 一、目的

金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 為食品衛生檢驗菌之一，具有潛在的病原性，金黃色葡萄球菌不耐高溫，但其產生之毒素縱使煮沸 30 分鐘亦不被破壞，會引起嚴重的食物中毒，因此被檢驗出金黃色葡萄球菌陽性的食品，均不得食用。金黃色葡萄球菌引起的食物中毒佔我國食物中毒案件的第二位，值得特別注意。

### 二、原理

金黃色葡萄球菌為革蘭氏陽性兼性厭氣菌，檢驗步驟中，推定試驗是先在 BP 及 TSA 上培養檢體，依照菌落的型態觀察判斷疑似金黃色葡萄球菌；其次，進行生化試驗，檢測微生物產生凝固酶的特性；第三為輔助試驗，分別進行觸酶試驗、溶菌酶試驗、厭氧下葡萄糖之利用、厭氧下甘露醇之利用、熱安定型核酸分解酶試驗；最後，再估算金黃色葡萄球菌的數目。

### 三、材料與設備：

#### (一) 設備

1. 冰箱
2. 高壓滅菌釜
3. 乾熱滅菌器
4. 培養箱
5. 水浴槽
6. 攪拌均質器 (blender)
7. 稀釋瓶 (1000 ml 廣口瓶、100 ml 稀釋瓶)
8. 10 ml、1 ml 吸管
9. 培養皿 (內徑 9 cm，深度 1.5~1.8 cm)
10. 塗抹曲玻棒 (Glass spreader)
11. 白金耳、白金針



## (二) 試藥與試劑

### 1. 試藥

- |   |  |
|---|--|
| 1) 氯化鈉(NaCl)  | 8) 乙二胺四醋酸 ( Ethylenedia-<br>minetetraacetic acid, EDTA ) |
| 2) 磷酸二氫鈉 ( NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O ) | 9) 沙黃 O ( Safranin O )                                   |
| 3) 無水磷酸二氫鈉 ( NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )                 | 10) 碘  |
| 4) 氯化汞  | 11) 碘化鉀 ( KI )   |
| 5) 過氧化氫 ( H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )                       | 12) 液態石蠟或礦物油   |
| 6) 草酸銨 ( Ammonium oxalate )                                     | 13) 溶菌素 ( Lysostaphin )                                  |
| 7) 結晶紫 ( Cystal violet )  | 14) 乙醇 ( alcohol )                                       |

### 2. 試劑

- |             |                            |
|-------------|----------------------------|
| 1) 3%過氧化氫溶液 | 3) 含 1%氯化鈉之 0.02 M 磷酸鹽緩衝溶液 |
| 2) 溶菌素溶液    |                            |

### 3. 血漿製備

以滅菌針筒抽取兔血，加入已盛有無菌 0.5%乙二胺四醋酸溶液之試管中使其體積為 4 : 1，以 3000 rpm 離心 20 分鐘，取上清液儲存冰箱中備用，其現不超過一星期，亦可用凍結乾燥成品複水後使用。

## (三) 培養基

### 1. 巴德派克培養基 ( Baird-Parker Medium, 簡稱 BP Medium )

#### 1) 培養基材料

基礎培養基	胰化蛋白胨 ( tryptose )	10 g
	牛肉抽出物 ( Beef extract )	5 g



酵母抽出物 (Yeast extract)	1 g
丙酮酸鈉 (Sodium pyruvate)	10 g
甘胺酸 (Glycine)	12 g
氯化鋰 6 H <sub>2</sub> O (LiCl·6 H <sub>2</sub> O)	5 g
洋菜 (Agar)	20 g
蒸餾水	950 ml

- 2) 流程 加熱至沸騰溶解後，調整 pH 至 7.0±0.2，以 121℃ 滅菌 15 分鐘。

#### 蛋黃亞碲酸鹽強化培養基 (Egg Yolk Tellurite Enrichment, 簡稱 EYT)

蛋洗淨後，浸入 0.1% 氯化汞溶液中 1 小時，再浸入 70% 乙醇溶液中 30 分鐘，取出蛋黃加入無菌生理食鹽水，以體積 3 : 7 之比例混合攪拌均勻後，取 50 ml 加入 10 ml 經 0.45 μm 孔徑濾膜過濾之 1% 亞碲酸鉀 (Potassium tellurite) 溶液，混合均勻置於冰箱備用。

#### 完全培養基 (Complete medium)

將基礎培養基冷卻至 45~50 時加入 EYT，以體積 95 : 5 之比例混合均勻。

## 2. 腦心浸出物培養液 (Brain Heart infusion Broth, 簡稱 BHI Broth)

- |          |                             |       |
|----------|-----------------------------|-------|
| 1) 培養基材料 | 牛腦浸出物 (Calf brain infusion) | 200 g |
|          | 牛心浸出物 (Beef heart infusion) | 250 g |



胰蛋白胨 (Preteose peptone)	10 g
氯化鈉 (NaCl)	5 g
磷酸氫二鈉 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	2.5 g
葡萄糖 (Dextrose)	5 g
蒸餾水	1000 ml

- 2) 流程 秤取各成分加熱溶於蒸餾水內，調整 pH 至  $7.4 \pm 0.2$ ，分裝於試管內，以  $121^\circ\text{C}$  滅菌 15 分鐘。

### 3. 胰化酪蛋白大豆 (洋菜) 培養基 (Trypticase soy Agar 簡稱 TSA)

1) 培養基材料	胰化酪蛋白胨 (Trypticase peptone)	15 g
	大豆蛋白胨 (Phytone peptone)	5 g
	磷酸氫二鉀 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	2 g
	氯化鈉 (NaCl)	5 g
	洋菜 (Agar)	15 g
	蒸餾水	1000 ml

- 2) 流程 秤取各成分加熱沸騰溶於蒸餾水內，調整 pH 至  $7.3 \pm 0.2$ ，分裝於試管內，以  $121^\circ\text{C}$  滅菌 15 分鐘，作成斜面培養基。

### 4. 酚紅碳水化合物培養液 (Phenol Red carbohydrate Broth)

1) 培養基材料	胰化酪蛋白胨 (Trypticase peptone)	10 g
	牛肉抽出物 (Beef extract)	1 g
	酚紅 (Phenol red, 0.25% 取 7.2 ml)	0.018 g



氯化鈉(NaCl)	5 g
蒸餾水	1000 ml

- 2) 流程 秤取 5 g 葡萄糖或甘露醇加入上述材料，加熱溶於蒸餾水內，調整 pH 至  $7.4 \pm 0.2$ ，分裝於試管內，以  $118^\circ\text{C}$  滅菌 10 分鐘。

5. 甲苯胺藍去氧核糖核酸（洋菜）培養基（Toluidine Blue Deoxyribonucleic Acid Agar 簡稱 TDNA）

1) 培養基材料	去氧核糖核酸（Deoxyribonucleic Acid）	0.3 g
	氯化鈣（CaCl <sub>2</sub> , Anhydrous）	1.1 g
	氯化鈉(NaCl)	10 g
	甲苯胺藍（Toluidine Blue O）	0.083 g
	三甲醇胺基甲烷（Tris（hydroxymethyl）aminomethane）	6.1 g
	洋菜（Agar）	10 g
	蒸餾水	1000 ml

- 2) 流程 先將三甲醇胺基甲烷溶於 1000 ml 蒸餾水內，調整 pH 至 9.0 後，加入其他成分（甲苯胺藍除外），加熱使之完全溶化，再加入甲苯胺藍，混合均勻分裝於試管內，儲存於冰箱。

使用前，先加熱溶解，取 3 ml 滴於載玻片上，凝固後做成數個 2 mm 直徑之凹洞備用。



6. 含 10% 氯化鈉胰化酪蛋白大豆培養液 ( Trypticase Soy broth Containing 10% NaCl 簡稱 TSB )

- |          |                               |         |
|----------|-------------------------------|---------|
| 1) 培養基材料 | 胰化酪蛋白朊 ( Trypticase peptone ) | 17 g    |
|          | 大豆蛋白朊 ( Phytone peptone )     | 3 g     |
|          | 氯化鈉 ( NaCl )                  | 100 g   |
|          | 磷酸氫二鉀 ( $K_2HPO_4$ )          | 2.5 g   |
|          | 葡萄糖 ( Dextrose )              | 2.5 g   |
|          | 蒸餾水                           | 1000 ml |
- 2) 流程 秤取各成分加熱溶於蒸餾水內，調整 pH 至  $7.3 \pm 0.2$ ，分取 10 ml 注入試管內，以  $121^\circ C$  滅菌 15 分鐘。

(四) 樣品稀釋液

1. 生理食鹽水

- |       |              |         |
|-------|--------------|---------|
| 1) 材料 | 氯化鈉 ( NaCl ) | 8.5 g   |
|       | 蒸餾水          | 1000 ml |
|       | 稀釋瓶          |         |
- 2) 流程 取 8.5 g 氯化鈉溶於 1000 ml 蒸餾水，分裝於稀釋瓶內，以  $121^\circ C$  滅菌 15 分鐘調整 pH 值為  $7.0 \pm 0.1$ 。

(五) 革蘭氏染色液 ( Gram's stain solution )

- |                          |                  |
|--------------------------|------------------|
| 1) Hucker's 結晶紫液 ( 初染劑 ) | 3) 革蘭氏碘液 ( 媒染劑 ) |
| 2) Hucker's 複染液 ( 複染劑 )  |                  |



#### (六) 血漿之製備

以滅菌之針筒抽取兔血加入已盛有無菌 0.5% 乙二胺四醋酸溶液之試管中使其體積為 4:1 輕微搖動使均勻混合後靜置，若未完全分層，以 3000 rpm 離心 20 分鐘，取上層澄清液，儲存冰箱中備用。

### 四、方法與步驟

#### (一) 檢體之處理

##### 1. 檢體處理

- 1) 將檢體上下振搖使之充分混合。
- 2) 吸取 50 ml 置入 450 ml 已滅菌之稀釋液，製成 10 倍稀釋液。

##### 2. 檢液製備

3. 將 10 倍稀釋液依序作成一系列之稀釋液。

#### (二) 推定試驗

1. 將稀釋檢液及原液搖勻
2. 每一稀釋檢液吸取 0.2 ml、0.3 ml、0.4 ml 分別置入以裝有 BP 培養基之培養皿內（至少作二重複）
3. 置於 35 °C 培養箱內培養 24 小時
4. 觀察形成菌落。菌落為圓形，直徑 2~3 mm，表面凸起、平滑具乳酪膠狀，成灰黑色或黑色，周邊色淡，菌落外圍依序由內而外，有不透明環及透明環環繞，則為可疑之金黃色葡萄球菌。
5. 勾取可疑菌落接種 TSA 及四支 BHI 培養液中，置於 35 °C 培養箱中培養 18~24 小時。



6. 由 TSA 斜面上鉤菌，做革蘭氏染色後鏡檢，其結果若為革蘭氏陽性菌，無芽孢之球菌，且直徑約  $0.5\sim 1.5\mu\text{m}$ ，菌體呈單一成對或不規則之簇狀排列者，應進行生化試驗。

### (三) 生化試驗

#### 1. 凝固酶實驗

- 1) 各取 0.5 ml 的血漿分別滴入推定實驗及最確數試驗中兩支各含 0.2~0.3 ml 之 BHI 培養液中。
- 2) 至於  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  培養箱培養 6 小時,每格一小時觀察有無凝塊形成，若未生凝塊時應繼續培養至 24 小時觀察之。
- 3) 將試管緩緩傾斜或倒置，凝塊仍留在原處時，凝固程度為 4+，判定為金黃色葡萄球菌陽性，若有可疑或其凝固程度為 3+,2+,1+時，則應繼續進行輔助試驗。
- 4) 未產氣者再培養 24 小時。

### (四) 輔助實驗 ( Ancillary tests )

#### 1. 觸酶試驗 ( Catalase test )

- 1) 自推定實驗中 TSA 斜面上鉤菌，塗抹於載玻片上。
- 2) 滴入 1~2 滴 3% 過氧化氫溶液觀察是否產生氣泡。
- 3) 有產氣者為正反應不產氣者為負反應金黃色葡萄球菌應為正反應。

#### 2. 溶菌素敏感性試驗 ( Lysostaphin sensitivity test )

- 1) 自推定試驗中的 TSA 斜面上鉤菌，接種至含有 0.4 ml 磷酸鹽緩衝溶液



試管中，做成懸浮液（試管 A）成渾濁狀。

- 2) 從試管 A 中取懸浮液 0.2 ml，置入另一試管（試管 B），試管 A 加入 0.2ml 溶菌素溶液（實驗組），試管 B 加入 0.2 ml 磷酸鹽緩衝溶液（對照組）。
- 3) 置於 35 °C 培養箱培養 2 小時，隨時觀察。正反應：A 試管變澄清。負反應：A 試管渾濁。金黃色葡萄球菌應為正反應。

### 3. 厭氧下葡萄糖之利用（Anaerobic utilization of glucose）

- 1) 自推定實驗中之 TSA 斜面上鉤菌，接種於酚紅葡萄糖培養液中。
- 2) 徐徐加入以滅菌之石蠟或礦物油至高度 2.5 cm。
- 3) 置於 37 °C 培養箱中培養 5 天。正反應：培養液轉變為黃色。負反應：培養液仍為紅色。金黃色葡萄球菌應為正反應。

### 4. 厭氧下甘露醇之利用（Anaerobic utilization of mannitol）

- 1) 自推定實驗中之 TSA 斜面上鉤菌，接種於酚紅甘露醇培養液。
- 2) 徐徐加入以滅菌之液態石蠟或礦物油至高度約 2.5 cm。
- 3) 置於 37 °C 培養箱中培養 5 天。正反應：培養液轉變為黃色。負反應：培養液仍為紅色。金黃色葡萄球菌應為正反應。

### 5. 熱安定型核酸分解酶試驗（Thermostable nuclease test）

- 1) 將推定試驗及最確數另外兩支 BHI 培養液置於沸水中加熱 15 分鐘後，冷卻。
- 2) 吸取培養一曰 0.01 ml 滴入 TDNA 之凹洞內後，置於含潮溼海綿之培養皿內。



- 3) 置於 35 °C 培養箱中培養四小時，隨時觀察之顏色，變化情形。
- 4) 正反應：凹洞旁之培養基由藍色變成紅色，環之寬度在 1 mm 以上者。反之為負反應。金黃色葡萄球菌為正反應。

#### (五) 菌數計算

1. 當預期每 g ( ml ) 檢體中金黃色葡萄球菌菌數超過 100 時使用直接平板法。
2. 選取含 20~200 個經革藍氏染色及生化試驗確定為金黃色葡萄球菌之可疑菌落同一稀釋倍數之六個 BP 培養皿予以計數，若具不同之可疑菌落，應分別予以計數。
3. 若各稀釋倍數中僅有一稀釋倍數培養皿之菌落數為 20~200 個，則應以該稀釋倍數之六個培養皿之菌落數總和除 2 乘其稀釋倍數，即得其生菌數。
4. 若有兩種稀釋倍數之培養皿之菌落數在 20~200 個之間時，則應以下列公式計算：

生菌生菌數(CFU/g 或CFU/ml) =

$$\frac{1}{2} \left[ \frac{A}{2} (Aa_1 + Aa_2 + Aa_3 + Ab_1 + Ab_2 + Ab_3) + \frac{B}{2} (Ba_1 + Ba_2 + Ba_3 + Bb_1 + Bb_2 + Bb_3) \right]$$

A、B 稀釋倍數。

Aa<sub>1</sub>、Aa<sub>2</sub>、Aa<sub>3</sub>、Ab<sub>1</sub>、Ab<sub>2</sub>、Ab<sub>3</sub>：A 稀釋倍數接種 0.3 ml、0.3 ml、0.4 ml 之各培養皿内生菌菌落數。

Ba<sub>1</sub>、Ba<sub>2</sub>、Ba<sub>3</sub>、Bb<sub>1</sub>、Bb<sub>2</sub>、Bb<sub>3</sub>：B 稀釋倍數接種 0.3 ml、0.3 ml、0.4 ml 之各培養皿内生菌菌落數。

#### (六) 最確數 ( most probable number ; MPN )

適用於預期每 g ( ml ) 檢體中金黃色葡萄球菌菌數少於 100 時使用。



1. 將稀釋檢液搖勻後，分別吸取 1 ml 接種於已裝有 10 ml 之含 10% 氯化鈉 TSB 試管內，做三階三支。
2. 置於 35 °C 培養箱中培養 48±2 小時。(最高稀釋倍數需是負反應才可用於計數)。
3. 從有生長現象的試管中各取一白金耳量 (1 loop) 劃線於已裝有 BP 培養基之培養皿內。於 35 °C 培養 30~48 小時。
4. 將 BP 培養皿中每一種可疑菌落，至少各取一個接種於 TSA 及 BHI，經革蘭氏染色、生化試驗及輔助試驗確定為金黃色葡萄球菌。
5. 利用附表中的最確數表。推算出金黃色葡萄球菌之最確數 (MPN/g 或 MPN/ml)。



## 實驗五十六 金黃色葡萄球菌之檢驗

班級：\_\_\_\_\_

組別：\_\_\_\_\_

姓名：\_\_\_\_\_

學號：\_\_\_\_\_

### 五、實驗結果

#### 1. 金黃色葡萄球菌檢驗結果

##### 1) 推定試驗

a. BP 培養菌落觀察結果

b. TSA 培養菌落觀察結果

c. 革蘭氏染色結果

##### 2) 輔助試驗

試驗項目	正反應 (+)	負反應 (-)	金黃色葡萄 球菌之反應
凝固酶適應	有凝塊形成	無凝塊形成	
觸酶試驗	有氣泡產生	無氣泡產生	
厭氧下葡萄糖利用試驗	黃色	紅色	
厭氧下甘露醇利用試驗	黃色	紅色	



---

溶菌素敏感性試驗	澄清	渾濁
熱安定型核酸分解酶試驗	產生粉紅色環其 寬度在 1 mm 以上	原色

---

## 2. 最確數計算

---

稀釋倍數	10 倍	100 倍	1000 倍
正反應之試管數			
檢體之 MPN 數			

---

## 六、問題與討論

1. 試述金黃色葡萄球菌檢驗過程中，輔助試驗步驟的觸酶試驗、溶菌酶試驗、厭氧下葡萄糖之利用、厭氧下甘露醇之利用、熱安定型核酸分解酶試驗分別代表何種意義及其原理為何？
  
2. 試述金黃色葡萄球菌檢驗對食品加工的重要性。如果食品中被檢驗出金黃色葡萄球菌陽性，此結果代表何種意義？



## 實驗五十七 沙門氏桿菌之檢驗

### 一、目的

沙門氏桿菌 (*Salmonella*) 為食品衛生檢驗菌之一，為人畜共通潛在的病原菌，動物性食品極易被沙門氏桿菌污染而造成人類的食物中毒，沙門氏桿菌引起的食物中毒佔我國食物中毒案件的第三位，值得特別注意。

### 二、原理

沙門氏桿菌為革蘭氏陰性無芽孢好氣性桿菌，檢驗步驟中，推定試驗是先在 BP 及 TSA 上培養檢體，依照菌落的型態與革蘭氏染色觀察判斷疑似沙門氏桿菌；其次，進行生化試驗，檢測微生物產生凝固的特性；第三為輔助試驗，分別進行觸酶試驗、溶菌酶試驗、厭氧下葡萄糖之利用、厭氧下甘露醇之利用、熱安定型核酸分解酶試驗；最後，再估算沙門氏桿菌的數目。沙門氏桿菌對低滲透壓的環境十分敏感，因此檢體處理與使用稀釋溶液時，均需運用生理食鹽水，以免沙門氏桿菌死亡，無法檢出。

### 三、材料與設備

#### 1. 設備

- |          |  |
|----------|--|
| 1) 冰箱    | 12) 500 ml 廣口瓶、500 ml 三角瓶、250 ml 燒杯              |
| 2) 高壓滅菌釜 | 13) 10 ml、5 ml、1 ml 吸管                           |
| 3) 乾熱滅菌器 | 14) 試管 16*150 mm 20*150 mm 10*75 mm<br>13*100 mm |
| 4) 培養箱   | 15) 塗抹曲玻棒 (Glass spreader)                       |



- |                     |   |
|---------------------|---|
| 5) 水浴槽              | 16) 漏斗                                    |
| 6) 攪拌均質器 (blender)  | 17) 培養皿 (內徑 9 cm, 深度 1.5~1.8 cm)          |
| 7) 旋渦混合器            | 18) 發酵管 (Durham fermentation tube)        |
| 8) 燈箱 (日光燈源)        | 19) 無菌塑膠袋 (可重複黏貼)                         |
| 9) pH meter         | 20) 無菌濾膜 (孔徑 0.45 $\mu\text{m}$ 親水性醋酸纖維膜) |
| 10) 振盪器             | 21) 白金耳、白金針                               |
| 11) 剪刀、藥勺、小刀及<br>鑷子 | 22) pH 試紙 (試用 pH 6~pH 8)                  |

## (二) 試藥與試劑

### 1. 試藥

試藥級：

- |  |  |
|--|--|
| 1) 碘 (Iodine)                                | 17) 碘化鉀 (Potassium iodine)             |
| 2) 煌綠染料 (Brilliant green dye)                | 18) 氰化鉀                                |
| 3) 甜醇  | 19) 乳糖                                 |
| 4) 蔗糖  | 20) 甲基紅 (Methyl red)                   |
| 5) 肌酸 (Creatine)                             | 21) 溴甲酚紫                               |
| 6) 酚紅  | 22) 氫氧化鈉                               |
| 7) 氯化鈉                                       | 23) $\alpha$ -萘酚 ( $\alpha$ -Naphthol) |
| 8) 對二甲胺基苯甲醛<br>(p-dimethylaminobenzaldehyde) | 24) 氫氧化鉀 (Potassium hydroxide)         |
| 9) 甲醛 (Formaldehyde)                         | 25) 乙醇 (Ethanol)                       |



- 10) 無水乙醇 ( Absolute ethanol )
- 11) 戊醇 ( Amyl alcohol )
- 12) 濃鹽酸
- 13) 微生物級 :
- 14) 明膠酶 ( Gelatinase )
- 15) 乳化劑 :
- 16) Triton X-100
- 26) 十二基磺酸鈉  
( Sodium dodecyl sulfate SDS )
- 27) 亞硫酸鉀粉末  
( Potassium sulfite powder )
- 28) 纖維素酶 ( Cellulase )
- 29) Tergitol anionic  
( Union Carbide, Sigma )

## 2. 試劑

- 1) 明膠酶溶液 ( Gelatinase solution )
- 2) 1%纖維素酶溶液
- 3) 0.25%酚紅溶液 ( 0.25%Phenol red solution )
- 4) 70%酒精溶液 ( 70% Ethanol solution )
- 5) 40%氫氧化鉀溶液 ( 40%Potassium Hydroxide solution )
- 6) 1 N 氫氧化鈉溶液 ( 1 N Sodium Hydroxide solution )
- 7) 1 N 鹽酸 ( 1 N Hydrochloric Acid )
- 8) 1%煌綠溶液 ( 1%Brilliant Green Dye Solution )
- 9) 0.002%煌綠溶液
- 10) 0.2%溴甲酚紫溶液 ( 0.2% Bromocresol purple Dye solution )
- 11) 0.85%無菌生理食鹽水 ( 0.85% Sterile Physiological saline solution )





蛋白朊 (Peptone)	5 g
乳糖 (Lactose)	5 g
蒸餾水	

2) 流程 加熱溶解後，調整 pH 至  $6.9 \pm 0.2$ ，以  $121^\circ\text{C}$  滅菌 15 分鐘。

## 2. 無脂奶粉培養液 (Nonfat Dry Milk)

1) 培養基材料	無脂乳粉 (Nonfat Dry Milk)	100 g
	蒸餾水	1000 ml

2) 流程 加熱溶於蒸餾水內，以  $121^\circ\text{C}$  滅菌 15 分鐘。

## 3. 亞硒酸氫鹽胱胺酸培養液 (Selenite Cystine Broth, 簡稱 SC)

1) 培養基材料	聚蛋白朊 (Polypeptone)	5 g
	乳糖 (Lactose)	4 g
	磷酸氫二鉀 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	10 g
	亞硒酸氫二鈉 ( $\text{NaHSeO}_3$ )	4 g
	胱胺酸 (L-Cystine)	0.01 g
	蒸餾水	1000 ml

2) 流程 秤取各成分加熱溶於蒸餾水內，調整 pH 至  $7.0 \pm 0.2$ ，取 10 ml 或 225 ml 分裝於試管或三角瓶內，再於沸騰水浴上加熱 10 分鐘(加熱時應經常搖動，但不可高壓殺菌)。應當天使用。



#### 4. 四硫代硫酸鹽培養液 (Tetrathionate Broth, TT)

##### 1) 培養基材料

TT 基本培養液	聚蛋白胨 (Polypeptone)	5 g
	膽鹽 (Bile Salts)	1 g
	碳酸鈣 (CaCO <sub>3</sub> )	10 g
	硫代硫酸鈉 (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> · 5H <sub>2</sub> O)	30 g
	蒸餾水	1000 ml

##### 2) 流程

秤取各成份加熱煮沸溶於蒸餾水內，調整 pH 至 8.4±0.2，取 10 ml 分裝於試管內，儲藏於冰箱備用。  
使用前加入碘-碘化鉀溶液 0.2 g 及 0.1% 煌綠液 0.1 ml。

#### 5. Rappaport - Vassiliadis (RV)

##### 1) 培養基材料

RV 基礎培養液	胰化蛋白胨 (Tryptone)	5 g
	氯化鈉 (NaCl)	8 g
	磷酸二氫鉀 (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.6 g
	蒸餾水	1000 ml
氯化鎂溶液	氯化鎂 (MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O)	40 g
	蒸餾水	1000 ml
孔雀綠草酸鹽溶液	孔雀綠草酸鹽	0.4 g
	蒸餾水	1000 ml



- 2) 流程 分取基礎培養液 1000 ml，氯化鎂容易 100 ml 及孔雀綠草酸鹽溶液 10 ml 混合均勻後，調整 pH 至  $5.5 \pm 0.2$ ，分取 10 ml 注入試管，以  $115^\circ\text{C}$  高壓滅菌 15 分鐘。

#### 6. 木糖離胺酸去氧膽酸鹽培養基 (Xylose Lysine Deoxycholate agar 簡稱 XLD)

1) 培養基材料	酵母抽出物 (Yeast extract)	3 g
	L-離胺酸 (L-Lysine)	5 g
	木糖 (Xylose)	3.75 g
	乳糖 (Lactose)	7.5 g
	蔗糖 (Sucrose)	7.5 g
	去氧膽酸鈉 (Sodium deoxycholate)	2.5 g
	檸檬酸銨鐵 (Ferric ammonium Citrate)	0.8 g
	硫代硫酸鈉 ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )	6.8 g
	氯化鈉 (NaCl)	5 g
	洋菜 (Agar)	15 g
	酚紅 (Phenol red)	0.08 g
	蒸餾水	1000 ml

- 2) 流程 秤取各成分加熱沸騰溶於蒸餾水內 (不可加熱過)，於  $50^\circ\text{C}$  水浴中冷卻，調整 pH 至  $7.4 \pm 0.2$  每培養皿注入約 20 ml。需當天使用。



### 7. 海克頓腸內菌培養基 (Hektoen Enteric Agar, HE)

1) 培養基材料	蛋白胨 (Peptone)	12 g
	酵母抽出物 (Yeast extract)	3 g
	膽鹽 No.3 (Bile salts No.3)	9 g
	乳糖 (Lactose)	2 g
	蔗糖 (Sucrose)	12 g
	水洋甘 (Salicin)	2 g
	氯化鈉 (NaCl)	5 g
	硫代硫酸鈉 ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )	5 g
	檸檬酸銨鐵 (Ferric ammonium Citrate)	1.5 g
	溴麝香草藍 (Bromothymol blue)	0.065 g
	酸性復紅 (Acid fuchsin)	0.1 g
	洋菜 (Agar)	14.0 g
	蒸餾水	1000 ml
2) 流程	秤取各成分加熱沸騰溶於蒸餾水內 (不可加熱過度), 於 50 °C 水浴中冷卻, 調整 pH 至 $7.5 \pm 0.2$ 每培養皿注入約 20 ml。需當天使用。	

### 8. 亞硫酸必培養基

1) 培養基材料	聚蛋白胨 (Polypeptone)	10 g
	牛肉抽出物 (Beef extract)	5 g
	葡萄糖 (Dextrose)	5 g



無水磷酸氫二鈉 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; anhydrous )	4 g
無水硫酸亞鐵 ( $\text{FeSO}_4$ ; anhydrous )	0.3 g
亞硫酸鈷 ( $\text{Bi}_2 (\text{SO}_3)_3$ )	8 g
煌綠 ( Brilliant green )	0.025 g
洋菜 ( Agar )	20 g
蒸餾水	1000 ml

- 2) 流程 秤取各成分加熱沸騰溶於蒸餾水內，調整 pH 至  $7.7 \pm 0.2$ ，搖勻後再注入培養皿。配置後不可超過 48 小時使用。儲存於暗處。

### 9. 三糖鐵培養基 ( Triple Sugar Iron Agar, TSI )

1) 培養基材料	聚蛋白胨 ( Polypeptone )	20 g
	氯化鈉 ( NaCl )	5 g
	乳糖 ( Lactose )	10 g
	葡萄糖 ( glucose )	1 g
	硫酸銨亞鐵 ( $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0.2 g
	硫代硫酸鈉 ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )	0.2 g
	酚紅 ( Phenol red )	0.025 g
	洋菜 ( Agar )	13 g
	蒸餾水	1000 ml

- 2) 流程 秤取各成分加熱沸騰溶於蒸餾水內，調整 pH 至  $7.3 \pm 0.2$ ，分取 5 ml 注入試管中。以  $118^\circ\text{C}$  滅菌 15 分鐘，置成斜面培養基。





#### 四、方法與步驟

##### (一) 檢體之處理

###### 1. 檢體處理

- 1) 將檢體上下振搖使之充分混合。
- 2) 吸取 50 ml 置入 450 ml 已滅菌之稀釋液，製成 10 倍稀釋液。

##### (二) 檢液製備

- 1) 將 10 倍稀釋液依序作成一系列之稀釋液。

##### (二) 推定試驗

1. 將稀釋檢液及原液搖勻。
2. 每一稀釋檢液吸取 0.2 ml、0.3 ml、0.4 ml 分別置入以裝有 BP 培養基之培養皿內（至少作二重複）。
3. 置於 35 °C 培養箱內培養 24 小時。
4. 觀察形成菌落。菌落為圓形，直徑 2~3 mm，表面凸起、平滑具乳酪膠狀，成灰黑色或黑色，周邊色淡，菌落外圍依序由內而外，有不透明環及透明環環繞，則為可疑之沙門氏桿菌。
5. 勾取可疑菌落接種 TSA 及四支 BHI 培養液中，置於 35°C 培養箱中培養 18~24 小時。
6. 由 TSA 斜面上鉤菌，做革蘭氏染色後鏡檢，其結果若為革蘭氏陽性菌，無芽孢之球菌，且直徑約 0.5~1.5  $\mu\text{m}$ ，菌體呈單一成對或不規則之簇狀排列者，應進行生化試驗。

##### (三) 生化試驗

###### 1. 凝固酶實驗

- 1) 各取 0.5 ml 的血漿分別滴入推定實驗及最確數試驗中兩支各含 0.2~0.3 ml



之 BHI 培養液中。

- 2) 至於 35 °C 培養箱培養 6 小時,每格一小時觀察有無凝塊形成,若未發生凝塊時應繼續培養至 24 小時觀察之。
- 3) 將試管緩緩傾斜或倒置,凝塊仍留在原處時,凝固程度為 4+,判定為沙門氏桿菌陽性,若有可疑或其凝固程度為 3+,2+,1+時,則應繼續進行輔助試驗。
- 4) 未產氣者再培養 24 小時。

#### (四) 輔助實驗 ( Ancillary tests )

##### 1. 觸酶試驗 ( Catalase test )

- 1) 自推定實驗中 TSA 斜面上鉤菌,塗抹於載玻片上。
- 2) 滴入 1~2 滴 3%過氧化氫溶液。觀察是否產生氣泡。
- 3) 有產氣者為正反應不產氣者為負反應沙門氏桿菌應為正反應。

##### 2. 溶菌素敏感性試驗 ( Lysostaphin sensitivity test )

- 1) 自推定試驗中的 TSA 斜面上鉤菌,接種至含有 0.4 ml 磷酸鹽緩衝液試管中,做成懸浮液 ( 試管 A ) 成渾濁狀。
- 2) 從試管 A 中取懸浮液 0.2 ml,置入另一試管 ( 試管 B ),試管 A 加入 0.2ml 溶菌素溶液 ( 實驗組 ),試管 B 加入 0.2 ml 磷酸鹽緩衝液 ( 對照組 )。
- 3) 置於 35 °C 培養箱培養 2 小時,隨時觀察。正反應: A 試管變澄清。負反應: A 試管渾濁。沙門氏桿菌應為正反應。

##### 3. 厭氧下葡萄糖之利用 ( Anaerobic utilization of glucose )

- 1) 自推定實驗中之 TSA 斜面上鉤菌,接種於分紅葡萄糖培養液中。
- 2) 徐徐加入以滅菌之石蠟或礦物油至高度 2.5 cm。



- 3) 置於 37 °C 培養箱中培養 5 天。正反應：培養液轉變為黃色。負反應：培養液仍為紅色。沙門氏桿菌應為正反應。
4. 厭氧下甘露醇之利用 ( Anaerobic utilization of mannitol )
  - 1) 自推定實驗中之 TSA 斜面上鉤菌，接種於酚紅甘露醇培養液。
  - 2) 徐徐加入以滅菌之液態石蠟或礦物油至高度約 2.5 cm。
  - 3) 置於 37 °C 培養箱中培養 5 天。正反應：培養液轉變為黃色。負反應：培養液仍為紅色。沙門氏桿菌應為正反應。
5. 熱安定型核酸分解酶試驗 ( Thermostable nuclease test )
  - 1) 將推定試驗及最確數另外兩支 BHI 培養液置於沸水中加熱 15 分鐘後，冷卻。
  - 2) 吸取培養一日 0.01 ml 滴入 TDNA 之凹洞內後，置於含潮溼海綿之培養皿內。
  - 3) 置於 35 °C 培養箱中培養四小時，隨時觀察之顏色，變化情形。
  - 4) 正反應：凹洞旁之培養基由藍色變成紅色，環之寬度在 1 mm 以上者。反之為負反應。沙門氏桿菌為正反應。
6. 菌數計算
  - 1) 當預期每 g ( ml ) 檢體中沙門氏桿菌菌數超過 100 時使用直接平板法。
  - 2) 選取含 20~200 個經革藍氏染色及生化試驗確定為沙門氏桿菌之可疑菌落同一稀釋倍數之六個 BP 培養皿予以計數，若具不同之可疑菌落，應分別予以計數。
  - 3) 若各稀釋倍數中僅有一稀釋倍數培養皿之菌落數為 20~200 個，則應以該稀釋倍數之六個培養皿之菌落數總和除 2 乘其稀釋倍數。
  - 4) 即得其生菌數。



- 5) 若有兩種稀釋倍數之培養皿之菌落數在 20~200 個之間時，則應以下列公式計算

生菌生菌數(CFU/g 或 CFU/ml)

$$\frac{1}{2} \left[ \frac{A}{2} (Aa_1 + Aa_2 + Aa_3 + Ab_1 + Ab_2 + Ab_3) + \frac{B}{2} (Ba_1 + Ba_2 + Ba_3 + Bb_1 + Bb_2 + Bb_3) \right]$$

A、B 稀釋倍數。

Aa<sub>1</sub>、Aa<sub>2</sub>、Aa<sub>3</sub>、Ab<sub>1</sub>、Ab<sub>2</sub>、Ab<sub>3</sub>：A 稀釋倍數接種 0.3ml、0.3ml、0.4ml 之各培養皿内生菌菌落數。

Ba<sub>1</sub>、Ba<sub>2</sub>、Ba<sub>3</sub>、Bb<sub>1</sub>、Bb<sub>2</sub>、Bb<sub>3</sub>：B 稀釋倍數接種 0.3ml、0.3ml、0.4ml 之各培養皿内生菌菌落數。

#### (五) 最確數 (most probable number ; MPN)

適用於預期每 g ( ml ) 檢體中沙門氏桿菌菌數少於 100 時使用

- 1) 將稀釋檢液搖勻後，分別吸取 1ml 接種於已裝有 10ml 之含 10%氯化鈉 TSB 試管內，做三階三支。
- 2) 置於 35°C 培養箱中培養 48±2 小時 ( 最高稀釋倍數需是負反應才可用於計數 )。
- 3) 從有生長現象的試管中各取一白金耳量 ( 1 loop ) 劃線於已裝有 BP 培養基之培養皿內。於 35 °C 培養 30~48 小時。
- 4) 將 BP 培養皿中每一種可疑菌落，至少各取一個接種於 TSA 及 BHI，經革蘭氏染色、生化試驗及輔助試驗確定為沙門氏桿菌。
- 5) 利用附表中的最確數表。推算出沙門氏桿菌之最確數( MPN/g 或 MPN/ml )。



## 實驗五十七 沙門氏桿菌之檢驗

班級：\_\_\_\_\_

組別：\_\_\_\_\_

姓名：\_\_\_\_\_

學號：\_\_\_\_\_

### 五、實驗結果

#### 1. 沙門氏桿菌檢驗結果

##### 1) 推定試驗

a. BP 培養菌落觀察結果

b. TSA 培養菌落觀察結果

c. 革蘭氏染色結果

##### 2) 輔助試驗

試驗項目	正反應 (+)	負反應 (-)	沙門氏桿菌之反應
凝固酶適應	有凝塊形成	無凝塊形成	
觸酶試驗	有氣泡產生	無氣泡產生	
厭氧下葡萄糖利用試驗	黃色	紅色	



厭氧下甘露醇利用試驗	黃色	紅色
溶菌素敏感性試驗	澄清	渾濁
熱安定型核酸分解酶試驗	產生粉紅色環其 寬度在 1 mm 以上	原色

---

## 2. 最確數計算

---

稀釋倍數	10 倍	100 倍	1000 倍
正反應之試管數			
檢體之 MPN 數			

---

## 六、問題與討論：

1. 試舉三例容易被沙門氏桿菌污染的食品，並說明其原因。
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
2. 試述沙門氏桿菌檢驗對食品加工的重要性。如果食品中被檢驗出沙門氏桿菌陽性，此結果代表何種意義？



附表、最確數表

正反應試管數			MPN/g 或 mL	95%信賴界限	
0.1mL	0.01mL	0.001mL		下限	上限
0	0	0	<3		
0	0	1	3	<0.5	9
0	1	0	3	<0.5	13
0	2	0	-		
1	0	0	4	0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
2	3	0	-		



正反應試管數			MPN/g 或 mL	95%信賴界限	
0.1mL	0.01mL	0.001mL		下限	上限
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	3	1100	150	4800
3	3	3	>100	>150	>800



## 實驗五十八 腸炎弧菌之檢驗

### 一、目的

腸炎弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是食品界與衛生界最重視的食品中毒菌之一，在台灣地區也是歷年來中毒頻率最高的菌種，海水或鹹淡水是各式弧菌正常的生息所在，因此海產極容易被弧菌污染，而造成人類食物中毒，因此腸炎弧菌在本土具有很高的食品衛生意義。

### 二、原理

腸炎弧菌為革蘭氏陰性，具好鹽性，為兼性厭氣性菌。檢驗步驟中，先將檢體接種在 GSTB 中培養；將培養混濁的 GSTB 溶液接種在 TCBS 平板上，判斷疑似腸炎弧菌；TCBS 平板上疑似腸炎弧菌，則分別做各種生化試驗，包括：TSI 試驗、TSB(3%NaCl)、TSA(3%NaCl)及運動性試驗，以及葡萄糖氧化與發酵試驗、細胞色素氧化酶、精胺酸二水解酶試驗、鳥胺酸脫羧酶試驗、嗜鹽性試驗、42 °C 培養生長試驗、歐普氏試驗、發酵試驗、Kanagawa 試驗；最後進行血清試驗，包括：細菌體抗原抗血清、多價莢膜抗血清試驗、單價莢膜性抗血清試驗。腸炎弧菌對低滲透壓的環境較敏感，因此檢體處理與使用稀釋溶液時，最好運用生理食鹽水，以免腸炎弧菌死亡，無法檢出。

### 三、材料與設備

#### (一) 設備

1. 乾熱滅菌器
2. 高壓滅菌釜



3. 冰箱
4. 吸管
5. 培養皿
6. 稀釋用容器
7. 培養箱
8. 水浴
9. 攪拌均質器
10. 接種用白金針或白金耳

## (二) 試藥與試劑

1. 試藥
  - 1) 氯化鈉
  - 2) 磷酸氫二鉀
  - 3) 結晶紫
  - 4) 草酸銨
  - 5) 碘化鉀
  - 6) 沙黃 O
  - 7)  $\alpha$ -萘酚
  - 8) 氫氧化鉀
  - 9) 肌酸
  - 10) 乙醇
  - 11) 鹽酸
  - 12) 四甲基對位苯二胺鹽酸鹽



## 2. 試劑

- 1) 氧化酶試驗試劑
- 2) 歐普氏試劑
- 3) 革蘭氏染色液
- 4) 哈克氏結晶紫
- 5) 革蘭氏碘液
- 6) 哈克氏複染劑

## 3. 抗血清

- 1) 腸炎弧菌菌體性抗血清
- 2) 腸炎弧菌莢膜性抗血清

## 4. 稀釋液

### (三) 培養基

#### 1. 葡萄糖鹽梯普爾培養液(Glucose Salt Teepol Broth, 簡稱 GSTB)

- |          |       |         |
|----------|-------|---------|
| 1) 培養基材料 | 牛肉抽出物 | 3 g     |
|          | 蛋白胨   | 10 g    |
|          | 氯化鈉   | 30 g    |
|          | 葡萄糖   | 5 g     |
|          | 甲基紫   | 0.002 g |
|          | 梯普爾   | 4 ml    |
|          | 蒸餾水   | 1000 ml |



- 2) 流程 加熱溶解後分取 10 ml 支單配 GSTB 或雙倍 GSTB 注入試管內及 225 ml 之單倍 GSTB 注入廣口瓶內以 121 °C 滅菌 15 分鐘最後 pH 值為 7.4±0.2。

2. 硫代硫酸鹽-檸檬酸鹽-膽鹽-蔗糖培養基(Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose Agar, 簡稱 TCBS)

- 1) 培養基材料
- |       |         |
|-------|---------|
| 酵母抽出物 | 5 g     |
| 蛋白胨   | 10 g    |
| 蔗糖    | 20 g    |
| 硫代硫酸鈉 | 10 g    |
| 膽酸鈉   | 3 g     |
| 檸檬酸鈉  | 10 g    |
| 牛膽汁   | 5 g     |
| 氯化鈉   | 10 g    |
| 檸檬酸鐵  | 1 g     |
| 溴麝香草藍 | 0.04 g  |
| 麝香草藍  | 0.04 g  |
| 洋菜    | 15 g    |
| 蒸餾水   | 1000 ml |
- 2) 流程 溶解煮沸 1~2 分鐘, 不須高壓滅菌, 最後 pH 值為 8.6。



### 3. 三糖鐵培養基(Triple Sugar Iron Agar, 簡稱 TSI)

- 1) 培養基材料
- |       |         |
|-------|---------|
| 聚蛋白胨  | 20 g    |
| 氯化鈉   | 30 g    |
| 乳糖    | 10 g    |
| 蔗糖    | 10 g    |
| 葡萄糖   | 1 g     |
| 硫酸銨亞鐵 | 0.2 g   |
| 硫代硫酸鈉 | 0.2 g   |
| 酚紅    | 0.025 g |
| 洋菜    | 13 g    |
| 蒸餾水   | 1000 ml |
- 2) 流程
- 加熱沸騰溶解後，分取 5 ml 注入 15×150 mm 試管中，以 118 °C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 7.3±0.2。滅菌後做成斜面培養基，此斜面長度約 4~5 cm，斜面底部之深度約 2~3 cm。

### 4. 胰化酪蛋白大豆培養基

- 1) 培養基材料
- |        |         |
|--------|---------|
| 大豆蛋白胨  | 5 g     |
| 胰化酪蛋白胨 | 15 g    |
| 磷酸氫二鉀  | 30 g    |
| 氯化鈉    | 15 g    |
| 葡萄糖    | 2.5 g   |
| 蒸餾水    | 1000 ml |



- 2) 流程 加熱沸騰 1~2 分鐘溶解後，分取適量注入試管及三角瓶中，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 7.3±0.2。

### 5. 運動性試驗培養基

- 1) 培養基材料
- |       |         |
|-------|---------|
| 牛肉抽出物 | 3 g     |
| 蛋白胨   | 10 g    |
| 氯化鈉   | 30 g    |
| 洋菜    | 4 g     |
| 蒸餾水   | 1000 ml |
- 2) 流程 加熱並時時攪拌，溶解後分取 8 ml 注入附有螺旋蓋試管中，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 7.4±0.2。

### 6. Hugh-Liefson 葡萄糖培養液

- 1) 培養基材料
- |       |         |
|-------|---------|
| 蛋白胨   | 2 g     |
| 酵母抽出物 | 0.5 g   |
| 氯化鈉   | 30 g    |
| 葡萄糖   | 10 g    |
| 溴甲酚紫  | 0.015 g |
| 洋菜    | 3 g     |
| 蒸餾水   | 1000 ml |
- 2) 流程 溶解後調整 pH 為 7.4±0.2，分裝試管中以 121 °C 滅菌 15 分鐘。



## 7. 脫羧酶基礎培養基

1) 培養基材料	蛋白胨	2 g
	酵母抽出物	0.5 g
	氯化鈉	30 g
	葡萄糖	10 g
	溴甲酚紫	0.015 g
	洋菜	3 g
	蒸餾水	1000 ml

- 2) 流程 加熱溶解後，將上列之基礎培養液分為四份，第一份加入 0.5%L-精胺酸(L-Arginine)，第二份加入 0.5%之L-離胺酸(L-Lysine)，第三份加入 0.5%L-鳴胺酸(L-Ornithine)，第四份做對照用。分別取 3 ml 注入附有螺旋蓋 15×150 mm 之試管內，以 121 °C 滅菌 15 分鐘最後 pH 為 6.5±0.2。

## 8. 氯化鈉胰化酪蛋白培養液

1) 培養基材料	胰化酪蛋白	10 g
	酵母抽出物	3 g
	蒸餾水	1000 ml

- 2) 流程 加氯化鈉於此培養基內，配成 0%、6%、8%、10% 之不同濃度，以 121°C 滅菌 15 分鐘最後 pH 值為±0.2。



### 9. 胰化蛋白胨培養液

- |          |             |         |
|----------|-------------|---------|
| 1) 培養基材料 | 胰化蛋白胨或胰化酪蛋白 | 10 g    |
|          | 氯化鈉         | 30 g    |
|          | 蒸餾水         | 1000 ml |
- 2) 流程 溶解後分裝 5 ml 培養液於試管中，以 121 °C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 6.9±0.2。

### 10. 葡萄糖培養液

- |          |       |      |
|----------|-------|------|
| 1) 培養基材料 | 緩衝蛋白胨 | 7 g  |
|          | 葡萄糖   | 5 g  |
|          | 磷酸氫二鉀 | 5 g  |
|          | 氯化鈉   | 30 g |
- 2) 流程 先以 800 ml 蒸餾水，加熱溶解過濾後，冷卻至 20°C 時，稀釋成 1000 ml，分取 10 ml 注入試管內，以 121°C 滅菌 12~15 分鐘，最後 pH 值為 6.9±0.2。

### 11. 溴甲酚紫培養液

- |          |       |         |
|----------|-------|---------|
| 1) 培養基材料 | 蛋白胨   | 10 g    |
|          | 牛肉抽出物 | 3 g     |
|          | 氯化鈉   | 30 g    |
|          | 溴甲酚紫  | 0.04 g  |
|          | 蒸餾水   | 1000 ml |



- 2) 流程 溶解後分成五等分，各分別加入 1 g 乳糖(lactose)，1 g 甘露糖醇(mannitol)，1 g 蔗糖(sucrose)及 1 g 阿拉伯糖(arabinose)至各等量培養液中；分取 8 ml 至 15×150 mm 試管內，以 121℃ 滅菌 10 分鐘，最後 pH 值為 7.0±0.2。

## 12. Wagatsuma 培養基

- 1) 培養基材料
- |       |         |
|-------|---------|
| 酵母抽出物 | 3 g     |
| 蛋白胨   | 10 g    |
| 氯化鈉   | 70 g    |
| 磷酸氫二鉀 | 5 g     |
| 甘露糖醇  | 10 g    |
| 結晶紫   | 0.001 g |
| 洋菜    | 15 g    |
| 蒸餾水   | 1000 ml |
- 2) 流程 加熱攪拌融解，調 pH 至 8.0±0.2，再以蒸汽加熱 30 分鐘(不須高壓滅菌)，冷卻至 50 °C 時，加入 5%(v/v) 已經生理食鹽水洗滌三次者之人或兔之紅血球注入培養皿培養皿使用前須加以乾燥。培養基注入培養皿前應搖動混合，使絮狀沉澱物分散均勻，搖動應避免產生氣泡，每一培養皿約倒入 15~20 ml，培養基應於配製當天使用。



#### 四、方法與步驟

##### (一) 檢液之調製

###### 1. 檢體之處理

稱取 50 g 下列檢體於攪拌均質器內，加入 450 ml 稀釋液，攪拌均勻使成為 10 倍稀釋液。

- 1) 水產類檢體，魚類應包括魚體表面組織、內臟及鰓。貝類應包括殼內全部內臟組織，甲殼類應包括整個動物體或動物體中間部分之鰓及內臟組織。

- 2) 其他類檢體：應包括檢體表面組織及內部組織。

###### a. 檢液之處理

分別使用滅菌之吸管，吸取 10 ml 步驟 1 之 10 倍稀釋液加入 90 ml 稀釋液中，依序做成系列適當之 100 倍，1000 倍，10000 倍……等稀釋檢液。

##### (二) 鑑別試驗

###### 1. 最確數(Most Probable Number，簡稱 MPN)

- 1) 將調製好的稀釋液或原液充分搖勻後，吸取 3 次 10 ml 雙倍濃度之 GSTB 內，再分別吸取 1 ml 之 10 倍稀釋液接種於單倍濃度之 10 ml GSTB 中。
- 2) 取連續三種稀釋液，每稀釋液各接種 3 支(稱三階三支)，並置 35 °C 培養箱中，培養 18~24 小時觀察是否混濁。未呈混濁即可視為該試管屬於腸炎弧菌陰性；呈混濁者則繼續進行以下試驗。

###### 2. 分離試驗

- 1) 呈現混濁 GSTB 試管中，分取一白金耳量在畫線接種在 TCBS 培養基表面，於 35 °C 培養箱中，培養 18 小時。



- 2) 觀察所形成菌落之生長狀態若為可疑腸炎弧菌者，其菌落為圓形直徑 2~3 mm，呈綠色或藍色勾取可疑菌落進行生化試驗。

### 3. 生化試驗

#### 1) 初步試驗

##### a. TSI 培養基：

自 TCBS 培養基上鉤菌，利用斜面劃線及穿刺法接種於 TSI 培養基中，在 35 °C 培養箱中，培養 16~18 小時觀察反應，情形若為可疑腸炎弧菌者其斜面呈紅色(鹼性)，底部成黃色(鹼性)無氣體及硫化氫產生。

##### b. TSB(3%NaCl)及 TSA(3%NaCl)：

自 TCBS 培養基上鉤菌接種於 TSB 及 TSA 中，於 35 °C 培養箱中，培養 18 小時，作為其他試驗之用，用 TSA (3%NaC) 上鉤菌做革蘭氏染色後做鏡檢，其結果為革蘭氏然色陰性菌體，呈彎曲或直短棒狀為單極鞭毛者，則應進行生化試驗及血清學試驗。

##### c. 運動性試驗：

詳見實驗十三 微生物之運動性結果。

#### 2) 二步試驗

##### a. 葡萄糖氧化與發酵試驗

自 TSA 斜面上鉤菌，穿刺接種於二支 HLGB 中，其中一隻徐徐注入以滅菌之液態石蠟或礦物油至高約 2.5 cm，於 35 °C 培養箱中培養二天後，觀察其反應情形。腸炎弧菌對葡萄糖發酵但不產氣。

意義	未加液態石蠟試管	添加液態石蠟試管
氧化	黃色	紫色



發酵	黃色	黃色
不分解	紫色	紫色

b. 細胞色素氧化酶

自 TSA 斜面上鉤菌，接種於另一支 TSA 斜面上，於 35 °C 培養箱中，培養 24 小時後，滴加 2 至 3 滴氧化酶試驗試劑於斜面之菌落上，於 2 分鐘內菌落上成暗藍色為正反應。腸炎弧菌為正反應。

c. 精胺酸二水解酶試驗

自 TSA 斜面上鉤菌，分別接種於精胺酸二水解酶培養液及脫羧酶基礎培養基中，接種後分別徐徐注入已滅菌之液態石蠟或礦物油至高度約 10 mm，鬆蓋並在 35°C 培養箱中，培養 4 天，每 24 小時觀察一次，若精胺酸二水解酶培養液呈紫色並脫羧酶基礎培養基呈黃色為正反應。腸炎弧菌為負反應。

d. 鳥胺酸脫羧酶試驗

自 TSA(3%NaC)斜面上鉤菌，分別接種於鳥胺酸脫羧酶培養液及脫羧酶基礎培養基中，接種後徐徐注入已滅菌之液態石蠟或礦物油至高度約 10 mm，鬆蓋並在 35°C 培養箱中，培養 4 天，每 24 小時觀察一次，若鳥胺酸脫羧酶培養液呈紫色並脫羧酶基礎培養基呈黃色為正反應。腸炎弧菌為正反應。

e. 嗜鹽性試驗

自 TSA 斜面上鉤菌，分別接種於 4 支含 0%、6%、8%及 10%氯化鈉之 STB 中，於 35°C 培養箱培養 24 小時後，觀察之。腸炎弧菌可在 6% 及 8%氯化鈉濃度下，生長良好；但在 0%氯化鈉濃度下不能生長，10%氯化鈉濃度下生長緩慢或不能生長。



f. 42°C 培養生長試驗

自培養 24 小時之 TSB(含 3%氯化鈉)中，鉤菌接種於含 2%氯化鈉之 TSB 後，置於 42 °C 水浴中培養 24 小時。若培養液呈混濁狀者為正反應。腸炎弧菌為正反應。

g. 歐普氏試驗

自 TSA 斜面上鉤菌接種於葡萄糖培養液中，並置於 35°C 培養箱中培養 48±2 小時後，取 1 ml 培養液至另一已滅菌試管中，加入 0.6 ml 歐普氏試劑之溶液 A 及 0.2 ml 歐普氏試劑之溶液 B 後，再加入後少許肌酸，輕輕搖勻，經 2-4 小時後觀察結果，若呈現粉紅色，則為正反應，否則為負反應，腸炎弧菌為負反應。

h. 發酵試驗

自 TSA 斜面上鉤菌，接種於含各種糖類之溴甲酚紫培養液中，並置於 35 °C 培養箱培養 4-5 天。若顏色由紫色轉變為黃色，則為正反應，否則為負反應。腸炎弧菌對甘露糖醇及阿拉伯糖為正反應，對蔗糖及乳糖為負反應。

i. Kanagawa 試驗

自己培養 18 小時之 TSB(含 3%氯化鈉)中，取 1 白金耳量劃線於表面已經完全乾燥之 Wagatsuma 培養基上，並置於 35°C 培養箱中培養。於第 24 小時觀察結果(不得超過 24 小時)。正反應之菌落周圍有非常明顯之透明環(B 型溶血)，其直徑通常大於 6 mm，反則為負反應。分離自食品之腸炎弧菌，通常為負反應；分離至糞便之腸炎弧菌，通常為正反應。

4. 血清學試驗



於已培養 18 小時之 TSA 斜面上，加入 2 ml 之 3% 氯化鈉溶液，充分振盪後，將懸浮液等量移入兩支已滅菌試管中，其中一支試管於 121°C 滅菌 1 小時後，進行細菌體性抗原抗血清凝集試驗，另一支試管內之懸浮菌液直接進行莢膜性抗血清與抗原之凝集試驗其步驟如下：

1) 細菌體抗原抗血清

利用蠟筆在載玻片上劃成 12 個格位，各取 1 滴經 121°C 滅菌，1 小時之懸浮菌液，於格位之下方位置，然後於格位之上方各滴入 1 滴 11 種不同之體抗原抗血清，而於第 12 格位則滴入 1 滴 3% 氯化鈉溶液(作對照組之用)，反覆傾斜 1 分鐘，使充分混合均勻，並於聚光箱下觀察結果，若正反應者應成凝絮現象，但對照組則無；負反應者，則兩組均無凝絮現象。

2) 多價莢膜抗血清試驗

利用蠟筆在載玻片上劃成 10 個格位，各取 1 滴懸浮菌液於格位之下方位置，然後於格位之上方各滴入 1 滴 9 種不同之多價莢膜抗血清，而於第 10 格位則滴入 1 滴 3% 氯化鈉溶液(作對照組之用)，反覆傾斜 1 分鐘，使充分混合均勻，並於聚光箱下觀察，若正反應者應成凝絮現象，但對照組則無；負反應者則兩組均無凝絮現象。

3) 單價莢膜性抗血清試驗

取多價莢膜試驗之懸浮液，利用各單價莢膜性抗血清代替多價莢膜性抗血清。依多價莢膜試驗進行試驗及觀察，若正反應者應成凝絮現象，但對照組則無；負反應者則兩組均無凝絮現象。



### 實驗五十八 腸炎弧菌之檢驗

班級：\_\_\_\_\_

組別：\_\_\_\_\_

姓名：\_\_\_\_\_

學號：\_\_\_\_\_

#### 五、結果

1. GSTB 培養基試驗結果：

2. 腸炎弧菌之生化及血清反應應符合下列表格的結果：

試驗項目或基質		正反應	負反應	腸炎弧菌 反應 <sup>a</sup>	試驗 結果
三 糖 鐵 瓊 脂 培 養	斜面	黃色	紅色	-	
	底部	黃色	紅色	+	
	產氣	培養基斷裂或裂縫	培養基完整	-	
	硫化氫	黑色	非黑色	-	
運動性試驗		沿穿刺線放射狀線 或培養基呈混濁狀	沿穿刺線無放 射狀線或培養 基透明	+	
葡萄糖氧化與發酵 試驗		黃色	紫色	+	
細胞色素氧化酶試 驗		暗藍色	非藍色	+	



精胺酸二氫酶試驗		紫色	黃色	-	
離胺酸脫羧酶試驗		紫色	黃色	+	
鳥胺酸脫羧酶試驗		紫色	黃色	+	
嗜鹽試驗	0%及 10% 氯化鈉	可生長	不生長或生長 極緩慢	-	
	6%及 8% 氯化鈉	可生長	不生長或生長 極緩慢	+	
42°C 培養生長試驗		混濁	澄清	+	
歐普氏試驗		紅色	原色	-	
發酵試驗	蔗糖	黃色	紫色	-	
	乳糖	黃色	紫色	-	
	阿拉伯糖	黃色	紫色	+	
	甘露糖醇	黃色	紫色	+	
Kanagawa 試驗		透明環	無透明環	+或 <sup>b</sup>	
細菌體抗原抗血清 凝集試驗		凝集	無凝集	+	
多價莢膜及單價莢 膜抗血清凝集試驗		凝集	無凝集	+	

<sup>a</sup>. 「+」表示 90%以上在 1 到 2 天內均為正反應，「-」表示 90%以上在 1 到 2 天內均為負反應。

<sup>b</sup>. 分離自食品之腸炎弧菌通常為負反應；分離自糞便之腸炎弧菌，則通常為正反應。



## 六、問題與討論

1. 試述腸炎弧菌檢驗對食品加工的重要性。如果食品中被檢驗出腸炎弧菌陽性，此結果代表何種意義？
  
2. 試述腸炎弧菌檢驗過程中，生化試驗步驟的 TSI 試驗、TSB(3%NaCl)、TSA(3%NaCl)及運動性試驗，以及葡萄糖氧化與發酵試驗、細胞色素氧化酶、精胺酸水解酶試驗、鳥胺酸脫羧酶試驗、嗜鹽性試驗、42°C 培養生長試驗、歐普氏試驗、發酵試驗、Kanagawa 試驗；最後進行血清試驗，包括：細菌體抗原抗血清、多價莢膜抗血清試驗、單價莢膜性抗血清試驗分別代表何種意義及其原理為何？



## 實驗五十九 細菌快速鑑定方法

### 一、目的

應用迷你多項生化檢測系統（miniaturized multi-test systems）快速鑑定細菌。本試驗以 API 20E 簡易鑑定套組為例，鑑定腸道桿菌科細菌及其他革蘭氏陰性菌。

### 二、原理

API 20E 套組有 20 個小管，內含特定的乾燥基質，可進行 23 種生化試驗之判讀。各項生化試驗依判讀標準表判讀及記錄，再計算出 7-9 個數字之菌碼（profile number），最後應用菌碼索引（analytic profile index）查出該菌碼所對應之細菌菌名，即為待測細菌之菌種名稱。

### 三、材料與設備

#### （一）材料

1. 培養 18-24 小時之純化 *Klebsiella pneumoniae*
2. API 20E 細菌快速鑑定套組。

#### （二）設備

1. 培養箱

### 四、方法與步驟

1. 將待測細菌進行氧化酶（oxidase）試驗，確定為陰性反應後再進行以下試驗。
2. 加 5 ml 水至培養托盤內之孔洞中，以保持盒內之濕度，並在盤上進行標示。



3. 取出 API 20E 快速鑑定套組並置入培養托盤內。
4. 加 5 ml 之無菌蒸餾水至無菌試管內。
5. 挑取 1-2 個純化之菌落並懸浮至無菌蒸餾水中。
6. 於各試驗孔之管中 (tube) 加滿菌液。
7. 在 CIT, VP 及 GEL 試驗孔之管頭 (cupule) 加滿菌液。
8. 在 ADH、LDC、ODC、H<sub>2</sub>S、URE 試驗孔上加入無菌礦物油。
9. 蓋上培養蓋，於 37°C 培養 18~24 小時後進行判讀。
10. 先將不需加加入試劑即可判讀之各項試驗進行判讀 (參考判讀表) 並記錄。
  - 1) 若 GLU 呈陽性及／或 3 個以上試驗呈現陽性則在以下試驗孔加入試劑後判讀：
    - TDA 試驗 -- 在 TDA 試驗孔加入一滴 TDA 試劑後即可判讀；
    - IND 試驗 -- 在 IND 試驗孔加入一滴 James 試劑後判讀；
    - VP 試驗 -- VP 試驗孔加入 VP1 及 VP2 試劑各一滴，10 分鐘後判讀；
    - NO<sub>2</sub> 還原試驗 -- 在 GLU 試驗孔加入 NIT1 及 NIT2 試劑各一滴，2~3 分鐘後判讀。若為陰性反應 (黃色) 則加入 2-3 mg 鋅粉，5 分鐘後若仍呈黃色則為陽性反應，若呈紅色則為陰性反應。
  - 2) 若 GLU 為陰性且其他反應呈陽性者少於 2 個，則將 API 套組再培養 24 小時後如同上述加入各種試劑並進行判讀。



## 實驗五十九 細菌快速鑑定方法

班級：\_\_\_\_\_

組別：\_\_\_\_\_

姓名：\_\_\_\_\_

學號：\_\_\_\_\_

## 五、結果

1. 依 API-20E 試驗結果判讀表進行判讀。

API-20E 試驗結果判讀表

試驗項目	結果判讀		備註
	陰性反應	陽性反應	
ONPG	無色	黃	
<u>ADH</u>	黃	紅/橘紅	
<u>LDC</u>	黃	紅/橘紅	
<u>ODC</u>	黃	紅/橘紅	
CIT	淺綠/黃	藍綠/綠	
<u>H<sub>2</sub>S</u>	無色/灰色	黑色沉澱	
<u>URE</u>	黃	紅/橘紅	
TDA	黃	深棕	加入 TDA 試劑後判讀
IND	無色/淡黃綠	粉紅	加 JAMES 試劑後判讀
VP	無色	粉紅/紅	加 VP1 及 VP2 後 10 分鐘判讀
GEL	黑色素不擴散	黑色素擴散	
GLU	藍/藍綠	黃	
MAN	藍/藍綠	黃	
INO	藍/藍綠	黃	
SOR	藍/藍綠	黃	
RHA	藍/藍綠	黃	
SAC	藍/藍綠	黃	



MEL	藍/藍綠	黃	
AMY	藍/藍綠	黃	
ARA	藍/藍綠	黃	
OX	無色	紫色	
GLU tube NO3-NO2	黃	紅	加入 NIT1 及 NIT2 試劑 2~3 分鐘後判讀
	紅	黃	加入鋅粉 5 分鐘後判讀

2. 將結果記錄於報告紙上並計換算出菌碼。
3. 利用菌碼表索引手冊或 API Lab Plus 軟體查出菌名及其正確之百分比 (%)。

## 六、問題與討論

1. 簡易鑑定套組有何優點及缺點？



## 實驗六十 畜產相關微生物－牧草之檢驗

### 一、目的

學習乾牧草中微生物檢查之採樣與檢測方法。

### 二、原理

乾牧草中含有多量之微生物，不當儲存時，可能導致乾牧草產生發黴現象。本實驗擬利用PDA檢測黴菌及酵母菌，以觀察兩類微生物於乾牧草中分布情形。

### 三、材料與設備

#### (一) 材料

1. 乾牧草
2. potato dextrose agar (PDA)
3. 培養皿
4. 酒精燈
5. 滅菌剪刀
6. 滅菌夾
7. 0.1% peptone water
8. 鐵胃袋

#### (二) 設備

1. 電子天平
2. 恆溫培養箱
3. 高溫高壓滅菌釜



4. 電磁加熱攪拌器
5. 無菌操作台
6. 菌落計數器
7. 鐵胃

#### 四、方法與步驟

1. 以剪刀剪取5 g乾牧草樣品於無菌袋(圖60-1)。
2. 加45 ml的已滅菌之0.1% peptone water以鐵胃高速、1分鐘將其混合(圖60-2)。
3. 取1 ml樣品液加入9 ml 0.1% peptone water，稀釋成 $10^{-2}$  及 $10^{-3}$ (圖60-3)。
4. 各取1 ml稀釋液加入3個培養皿中(圖60-4)。
5. 加入滅菌後呈融溶狀之PDA(45-50 °C)，混合均勻(圖60-4)。
6. 凝固後倒置於37 °C 培養箱，於培養第2日及第5日觀察。
7. 生長於培養基表面者為黴菌，生長於培養基底部者為酵母菌。分別計算二者之菌落數，取菌落數在30-300個之培養皿計算平均值，乘以稀釋倍數，即得總菌數。



圖60-1 剪刀剪取乾草樣品於無菌鐵胃袋中



圖60-2 加入無菌peptone water以鐵胃混合。



圖60-3 取稀釋液加入培養皿中。



圖60-4 加入PDA。



### 實驗六十 畜產相關微生物－牧草之檢驗

班級：\_\_\_\_\_

組別：\_\_\_\_\_

姓名：\_\_\_\_\_

學號：\_\_\_\_\_

#### 五、結果

1. 請繪出培養2及5日後微生物生長情況。
2. 請計算出樣品之黴菌及酵母菌。

#### 六、問題與討論

1. 請說明於第2及第5日觀察黴菌及酵母菌之生長情形有何差異性？
2. 請說明黴菌及酵母菌之型態有何差異？



---

3. 請說明本實驗中使用PDA之主要目的為何？其特性為何？

4. 請說明如何正確地貯存乾牧草以防止發黴現象。

