

寵物食品中微生物之檢驗方法－沙門氏菌之檢驗

Methods of Test for Pet Foods Microorganisms - Test of *Salmonella*

1. 適用範圍：本方法適用於寵物食品中沙門氏菌之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經增菌培養後，以選擇性培養基培養，進行定性分析。
 - 2.1 工作環境：工作平台須寬敞、潔淨、光線良好，操作平台光度100呎燭光以上，密閉室內換氣良好，儘可能沒有灰塵及流動空氣。每15分鐘落菌數不得超過15 CFU/培養皿。
 - 2.2 試藥：碘、碘化鉀、煌綠(brilliant green)、氯化鎂($MgCl_2$)、氰化鉀(potassium cyanide)、半乳糖醇(dulcitol)、乳糖(lactose)、蔗糖(sucrose)、葡萄糖(glucose)、甲基紅(methyl red)、肌酸(creatine)、溴甲酚紫(bromocresol purple)、酚紅(phenol red)、氫氧化鈉、氯化鈉($NaCl$)、 α -萘酚(α -naphthol)、對-二甲氨基苯甲醛(p-dimethylaminobenzaldehyde)、氫氧化鉀、95%乙醇、漂白水(約5.25%次氯酸鈉溶液)、無水乙醇、正戊醇(normal amyl alcohol)、鹽酸、磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)、磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)、磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)、磷酸二氫銨($NH_4H_2PO_4$)、硫酸銨[(NH_4) $_2$ SO $_4$]、膽鹽(bile salts)、膽鹽 No.3(bile salts No.3)、碳酸鈣($CaCO_3$)、硫代硫酸鈉($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$)、無水硫代硫酸鈉($Na_2S_2O_3$; anhydrous)、無水磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4 ; anhydrous)、L-離胺酸(L-lysine)、離胺酸鹽酸鹽(L-lysinehydrochloride)、木糖(xylose)、去氧膽酸鈉(sodium deoxycholate)、檸檬酸銨鐵(ferric ammonium citrate)、水楊苷(salicin)、溴麝香草藍(bromthymol blue)、酸性復紅(acid fuchsin)、無水硫酸亞鐵($FeSO_4$; anhydrous)、硫酸亞鐵($FeSO_4$)、檸檬酸鈉($Na_3C_6H_5O_7$)、硫酸鎂($MgSO_4$)、尿素(urea)、丙二酸鈉(sodiummalonate)、中性紅(neutral red)、結晶紫(crystal violet)、丙酮酸鈉(sodium pyruvate)、亞硫酸鉍[Bi $_2$ (SO $_3$) $_3$]、Tween 80 界面活性劑採用試藥級；牛肉抽出物(beef extract)、酵母抽出物(yeast extract)、蛋白胨(peptone)、胨蛋白胨(proteose peptone)、洋菜(agar)、植物蛋白胨(phytone peptone)、胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)、胰化酪蛋白大豆培養液粉末(trypticase soy broth; dehydrated)、胰化蛋白培養液粉末(tryptose broth; dehydrated)、聚蛋白胨(polypeptone)、胰化蛋白胨(tryptone)、蛋白胨緩衝液粉末(buffered peptone water powder)、小牛腦浸出物(calf brain infusion)、牛心浸出物(beef heartinfusion)、胨蛋白胨 No.3 (proteose peptone No.3)均採用微生物級。

2.3 器具及材料

- 2.3.1 生物安全操作櫃 (Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(classII)(含)以上者。
- 2.3.2 高壓滅菌釜：培養基及稀釋液等不能以乾熱滅菌之材料及用具等之滅菌用，此滅菌溫度可達 121°C (約 15 lb/in^2 或 1 kg/cm^2)，並能維持 15 分鐘以上。
- 2.3.3 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。
- 2.3.4 冰箱：能維持 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 者。
- 2.3.5 培養箱：能維持內部溫度溫差在 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 以內者。
- 2.3.6 水浴：能維持水溫溫差在 $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 以內者。
- 2.3.7 攪拌均質器(Blender)或鐵胃(Stomacher)：能適用於無菌操作者。
- 2.3.8 增菌用容器：500 mL 含蓋之可滅菌廣口瓶，或無菌塑膠(鐵胃)袋。
- 2.3.9 血清瓶：500 mL 及 250 mL。
- 2.3.10 燒杯：500 mL。
- 2.3.11 加熱板 (Hot plate)：具有磁性攪拌功能。
- 2.3.12 天平：可稱量到 2000g 者，靈敏度為 0.1g；可稱量到 120g 者，靈敏度為 1 mg。
- 2.3.13 培養皿：已滅菌，內徑約 90 mm，深度約 15 mm，底皿之內外面應平坦，無氣泡、刮痕或其他缺點。
- 2.3.14 吸管輔助器 (Pipette aid) 或微量分注器。
- 2.3.15 吸管或吸管尖：已滅菌，1 mL 吸管應有 0.01 mL 之刻度；5 及 10 mL 吸管應有 0.1 mL 刻度。
- 2.3.16 接種針及接種環(直徑約 3mm)：鎳鉻合金，鉑鉍或鉻線材質，或可拋棄式者。
- 2.3.17 試管：16 × 150 mm、20 × 150 mm、10 × 75 mm 及 13 × 100 mm 或其它適用者。
- 2.3.18 旋渦混合器(Vortex mixer)。
- 2.3.19 玻璃棒、剪刀、藥勺、小刀及鑷子：可滅菌。
- 2.3.20 燈箱：一般日光燈源，30 瓦。
- 2.3.21 pH 試紙：pH 值適用範圍為 6~8。
- 2.3.22 酸鹼度測定儀(pH meter)。

2.3.23 振盪器(Shaker)。

2.3.24 無菌濾膜：孔徑 0.45 μ m 或以下之親水性醋酸纖維膜。

2.3.25 杜蘭發酵管(Durham fermentation tube)：外徑 6 × 50 mm 或其他適用者。

2.4 試劑

2.4.1 0.25% 酚紅溶液：取酚紅 0.25 g 溶於蒸餾水使成 100 mL。

2.4.2 1N 氫氧化鈉溶液：取氫氧化鈉 40 g，溶於蒸餾水使成 1000 mL。

2.4.3 1N 鹽酸溶液：取鹽酸 89 mL，溶於蒸餾水使成 1000 mL。

2.4.4 1% 煌綠溶液：取煌綠染料 1 g，溶於水使成 100 mL，以無菌濾膜過濾。

2.4.5 0.1% 煌綠溶液：取煌綠染料 0.1 g，溶於無菌蒸餾水使成 100 mL。

2.4.6 0.2% 溴甲酚紫溶液：取溴甲酚紫 0.2 g，溶於無菌蒸餾水使成 100 mL。

2.4.7 0.85% 無菌生理食鹽水(0.85% sterile physiological saline solution)：取氯化鈉 8.5 g，溶於蒸餾水使成 1000 mL 分裝於試管，以 121°C 滅菌 15 分鐘。

2.4.8 柯瓦克氏試劑 (Kovacs' reagent)：取對-二甲胺基苯甲醛 5 g，溶於正戊醇 75 mL 中，再徐徐加入鹽酸 25 mL，混合均勻後應呈黃色並須保存於 4°C 冰箱中。

2.4.9 歐普氏試劑 (Voges-Proskauer reagents, VP reagents)：

溶液 A：取 α -萘酚 5 g，以無水乙醇溶解使成 100 mL。

溶液 B：取氫氧化鉀 40 g，以蒸餾水溶解使成 100 mL。

2.4.10 甲基紅指示劑 (Methyl red indicator)：取甲基紅 0.1 g，溶於 95% 乙醇 300 mL，再加蒸餾水使成 500 mL。

2.4.11 碘-碘化鉀溶：取碘化鉀 5 g，溶於 5 mL 無菌水，加入碘 6 g 攪拌至溶解，再加無菌水稀釋至 20 mL，避光儲存。本操作務必在抽氣櫃內進行。

2.4.12 0.5% 氰化鉀溶液：取氰化鉀 0.5 g，溶於無菌蒸餾水使成 100 mL。氰化鉀為劇毒物質，本操作務必在抽氣櫃內進行。

2.4.13 氯化鎂溶液：取氯化鎂 400 g，溶於蒸餾水使成 1000 mL。

2.4.14 孔雀綠草酸鹽溶液：取孔雀綠草酸鹽 0.4 g，溶於蒸餾水使成 100 mL。

2.5 沙門氏菌本體(O)抗血清：Salmonella O Antiserum Poly A-I & Vi。

2.6 培養基

2.6.1 乳糖培養液(Lactose broth)

牛肉抽出物(beef extract)	3 g
蛋白胨(peptone)	5 g
乳糖(lactose)	5 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為6.9±0.2。

2.6.2 蛋白胨緩衝液(Buffered peptone water)

蛋白胨(peptone)	10 g
氯化鈉(NaCl)	5 g
磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)	3.5 g
磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)	1.5 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.2±0.2。

2.6.3 四硫代硫酸鹽培養液(Tetrathionate broth, TT)

TT基礎培養液(TT broth base)

聚蛋白胨(polypeptone)	5 g
膽鹽(bile salts)	1 g
碳酸鈣(CaCO_3)	10 g
硫代硫酸鈉($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	30 g
蒸餾水	1000 mL

將基礎培養液於沸騰水浴加熱10分鐘(不可高壓殺菌，加熱時應經常搖動)，最終pH值為8.4±0.2。冷卻至45°C以下，分取10 mL，注入試管中，儲藏於冰箱備用。使用前加入碘-碘化鉀溶液0.2 mL及0.1%煌綠溶液0.1 mL。

2.6.4 Rappaport - Vassiliadis 培養液(RV)

RV基礎培養液(RV broth base)

胰化蛋白胨(tryptone)	5 g
氯化鈉(NaCl)	8 g
磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)	1.6 g
蒸餾水	1000 mL

量取RV基礎培養液1000 mL、氯化鎂溶液100 mL及孔雀綠草酸鹽溶液10 mL，混合均勻，分取10 mL，注入試管，以115°C滅菌15分鐘，最終pH值為5.5±0.2。RV基礎培養液必須於配製當天與氯化鎂溶液及孔雀綠

草酸鹽溶液混合成為RV培養液。氯化鎂溶液儲存於棕色瓶中，於室溫下可保存1年；孔雀綠草酸鹽溶液儲存於棕色瓶中，於室溫下可保存6個月。配製完成之RV培養液儲存於冰箱中勿超過1個月。不建議使用市售乾燥培養基配製本培養液。

2.6.5 木糖離胺酸去氧膽酸鹽培養基(Xylose lysine deoxycholate agar, XLD)

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($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	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

攪拌加熱至沸騰溶解，注意不可加熱過度。於50°C水浴中冷卻，最終pH值為7.4±0.2。每培養皿注入約20mL，凝固後打開皿蓋約1/2～1/4，使培養基表面乾燥。配製後勿儲存超過一天。

2.6.6 海克頓腸內菌培養基(Hektoen enteric agar, HE)

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)	12 g
蔗糖(sucrose)	12 g
水楊苷(salicin)	2 g
氯化鈉(NaCl)	5 g
硫代硫酸鈉($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	5 g
檸檬酸銨鐵(ferric ammonium citrate)	1.5 g
溴麝香草藍(bromthymol blue)	0.065 g
酸性復紅(acid fuchsin)	0.1 g

洋菜(agar) 14 g

蒸餾水 1000 mL

攪拌加熱至沸騰溶解，沸騰勿超過1分鐘。於50°C水浴中冷卻，最終pH值為7.5±0.2。每培養皿注入約20mL，打開皿蓋約1/2～1/4，靜置約2小時，使培養基表面乾燥。配製後勿儲存超過一天。

2.6.7 亞硫酸鉍培養基(Bismuth sulfite agar, BS)

聚蛋白胨(polypeptone)或蛋白胨(peptone) 10 g

牛肉抽出物(beef extract) 5 g

葡萄糖(glucose) 5 g

無水磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4 ; anhydrous) 4 g

無水硫酸亞鐵(FeSO_4 ; anhydrous) 0.3 g

亞硫酸鉍[$\text{Bi}_2(\text{SO}_3)_3$] 8 g

煌綠(brilliant green) 0.025 g

洋菜(agar) 20 g

蒸餾水 1000 mL

攪拌加熱至沸騰溶解約1分鐘，不須高壓滅菌。冷卻至45～50°C，最終pH值為7.7±0.2。每培養皿注入約20mL，打開皿蓋約1/2～1/4，靜置約2小時，使培養基表面乾燥。培養基注入培養皿前，應搖動混合，使絮狀沈澱物分散均勻，搖動時應避免產生氣泡。培養基以當天使用最佳，最多不得超過48小時，且應貯存於暗處。

2.6.8 三糖鐵培養基(Triple sugar iron agar, TSI)

牛肉抽出物(beef extract) 3 g

酵母抽出物(yeast extract) 3 g

蛋白胨(peptone) 15 g

蛋白胨(proteose peptone) 5 g

葡萄糖(glucose) 1 g

乳糖(lactose) 10 g

蔗糖(sucrose) 10 g

硫酸亞鐵(FeSO_4) 0.2 g

氯化鈉(NaCl) 5 g

硫代硫酸鈉($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.3 g

酚紅(phenol red) 0.024 g

洋菜(agar) 12 g

蒸餾水 1000 mL

加熱溶解後，分取約5mL，注入試管，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.4±0.2。滅菌後作成斜面培養基，斜面長度約4~5cm，斜面底部之深度約2~3cm。

2.6.9 胰化蛋白胨培養液(Tryptone broth)

胰化蛋白胨(tryptone) 10 g

蒸餾水 1000 mL

加熱溶解後，分取約5mL，注入試管內，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為6.9±0.2。

2.6.10 胰化酪蛋白大豆胰化蛋白培養液(Trypticase soy-tryptose broth)

胰化酪蛋白大豆培養液粉末(trypticase soy broth ; dehydrated) 15 g

胰化蛋白培養液粉末(tryptose broth ; dehydrated) 13.5 g

酵母抽出物(yeast extract) 3 g

蒸餾水 1000 mL

加熱溶解後，分取約5mL，注入試管內，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.2±0.2。

2.6.11 MR-VP 培養液(MR-VP broth)

蛋白胨緩衝液粉末(buffered peptone-water powder) 7 g

葡萄糖(glucose) 5 g

磷酸氫二鉀(K₂HPO₄) 5 g

蒸餾水 1000 mL

溶解後，分取約5mL，注入試管中，以121°C滅菌12~15分鐘，最終pH值為6.9±0.2。

2.6.12 辛蒙斯檸檬酸鹽培養基(Simmons citrate agar)

氯化鈉(NaCl) 5 g

檸檬酸鈉(Na₃C₆H₅O₇) 2 g

磷酸氫二鉀(K₂HPO₄) 1 g

磷酸二氫銨(NH₄H₂PO₄) 1 g

硫酸鎂(MgSO₄) 0.2 g

溴麝香草藍(bromthymol blue) 0.08 g

洋菜(agar)	15 g
----------	------

蒸餾水	1000 mL
-----	---------

加熱溶解後，分取約5mL，注入試管中，以121℃滅菌15分鐘，最終pH值為6.8±0.2。滅菌後作成斜面培養基，此斜面長度約4~5cm，斜面底部深度約2~3cm。

2.6.13 尿素培養液(Urea broth)

尿素(urea)	20 g
----------	------

酵母抽出物(yeast extract)	0.1 g
----------------------	-------

磷酸氫二鉀(K ₂ HPO ₄)	9.1 g
---	-------

磷酸氫二鈉(Na ₂ HPO ₄)	9.5 g
--	-------

酚紅(phenol red)	0.01 g
----------------	--------

蒸餾水	1000 mL
-----	---------

溶解後，以無菌濾膜過濾，分取1.5~3.0mL 濾液，注入已滅菌之試管中，最終pH值為6.8±0.2。

2.6.14 尿素培養液 (Urea broth) (rapid)

尿素(urea)	20 g
----------	------

酵母抽出物(yeast extract)	0.1 g
----------------------	-------

磷酸氫二鈉(Na ₂ HPO ₄)	0.095 g
--	---------

磷酸二氫鉀(KH ₂ PO ₄)	0.091 g
---	---------

酚紅(phenol red)	0.01 g
----------------	--------

蒸餾水	1000 mL
-----	---------

溶解後，以無菌濾膜過濾，分取1.5~3.0mL濾液，注入已滅菌之試管中，最終pH值為6.8±0.2。

2.6.15 丙二酸鹽培養液(Malonate broth)

酵母抽出物(yeast extract)	1 g
----------------------	-----

硫酸銨[(NH ₄) ₂ SO ₄]	2 g
---	-----

磷酸氫二鉀(K ₂ HPO ₄)	0.6 g
---	-------

磷酸二氫鉀(KH ₂ PO ₄)	0.4 g
---	-------

氯化鈉(NaCl)	2 g
-----------	-----

丙二酸鈉(sodium malonate)	3 g
-----------------------	-----

葡萄糖(glucose)	0.25 g
--------------	--------

溴麝香草藍(bromthymol blue)	0.025 g
------------------------	---------

蒸餾水 1000 mL

加熱溶解後，分取約3mL，注入試管中，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為6.7±0.2。

2.6.16 離胺酸鐵培養基(Lysine iron agar, LIA)

蛋白胨(peptone) 5 g

酵母抽出物(yeast extract) 3 g

葡萄糖(glucose) 1 g

離胺酸鹽酸鹽(L-lysine hydrochloride) 10 g

檸檬酸銨鐵(ferric ammonium citrate) 0.5 g

無水硫代硫酸鈉($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; anhydrous) 0.04 g

溴甲酚紫(bromcresol purple) 0.02 g

洋菜(agar) 15 g

蒸餾水 1000 mL

加熱溶解後，分取約4mL，注入試管中，以121°C滅菌12分鐘，最終pH值為6.7±0.2。滅菌後作成斜面培養基，此斜面長度約2.5cm，斜面底部之深度約4cm。

2.6.17 離胺酸脫羧酶培養液(Lysine decarboxylase broth)

蛋白胨(peptone) 5 g

酵母抽出物(yeast extract) 3 g

葡萄糖(glucose) 1 g

離胺酸(L-lysine) 5 g

溴甲酚紫(bromcresol purple) 0.02 g

蒸餾水 1000 mL

加熱溶解後，分取約5 mL，注入附有螺旋蓋試管中，以121°C滅菌 15分鐘，最終pH值為6.5~6.8。

2.6.18 氰化鉀培養液[Potassium cyanide (KCN) broth]

聚蛋白胨(polypeptone) 3 g

氯化鈉(NaCl) 5 g

磷酸二氫鉀(KH_2PO_4) 0.225 g

磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4) 5.64 g

蒸餾水 1000 mL

加熱溶解後，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.6±0.2。冷卻後於抽氣

櫃內以吸管輔助器配合無菌操作，加入0.5%氰化鉀溶液15mL，混合均勻，分取1~1.5mL注入已滅菌之試管，貯存於冰箱備用，貯存期限不超過兩週。

2.6.19 酚紅碳水化合物培養液(Phenol red carbohydrate broth)

胨蛋白胨 No.3(proteose peptone No.3)	10 g
氯化鈉(NaCl)	5 g
牛肉抽出物(beef extract)	1 g
酚紅(phenol red) (或取0.25%酚紅溶液7.2 mL)	0.018 g
蒸餾水	1000 mL

取半乳糖醇5g，溶解於上述之培養液後，分取約2.5mL，注入裝有發酵管之試管內，以118°C滅菌10分鐘，最終pH值為7.4±0.2。含乳糖或蔗糖10 g之酚紅碳水化合物培養液配製方法亦同。

2.6.20 紫色碳水化合物培養液(Purple carbohydrate broth)

胨蛋白胨No.3(proteose peptone No.3)	10 g
牛肉抽出物(beef extract)	1 g
氯化鈉(NaCl)	5 g
溴甲酚紫(bromcresol purple)	0.02 g
蒸餾水	1000 mL

操作步驟與2.6.19節相同，最終pH值為6.8±0.2。

2.6.21 麥康奇培養基(MacConkey agar)

胨蛋白胨(proteose peptone)	3 g
蛋白胨(peptone)	17 g
乳糖(lactose)	10 g
膽鹽No.3(bile salts No.3)	1.5 g
氯化鈉(NaCl)	5 g
中性紅(neutral red)	0.03 g
結晶紫(crystal violet)	0.001 g
洋菜(agar)	13.5 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，分裝於血清瓶內，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.1±0.2。

2.6.22 營養培養液(Nutrient broth)

牛肉抽出物(beef extract)	3 g
蛋白胨(peptone)	5 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，分取約10mL，注入試管，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為6.8±0.2。

2.6.23 腦心浸出物培養液(Brain heart infusion broth)

小牛腦浸出物(calf brain infusion)	200 g
牛心浸出物(beef heart infusion)	250 g
胨蛋白胨(proteose peptone)	10 g
氯化鈉(NaCl)	5 g
磷酸氫二鈉(Na ₂ HPO ₄)	2.5 g
葡萄糖(glucose)	2 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，分裝於試管中，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.4±0.2。

2.7 檢液之調製^(註 1)

以無菌操作稱取檢體 25 g，置於無菌鐵胃袋或已滅菌均質杯內。加乳糖培養液 225 mL，均質 2 分鐘。將已均質化之檢體混合液於室溫靜置 60±5 分鐘後，以試紙測試 pH 值。必要時，將 pH 值調至 6.8±0.2。供作檢液。

註 1：處理含油脂量多、不易勻散及易起泡沫之檢體時，應加入適量已滅菌之乳化劑(如 Tween 80，使其於檢液中濃度為 1 %)，並充分振搖，使之乳化。

2.8 增菌培養

2.8.1 將 2.7 節之之檢液於 35°C培養 24±2 小時。

2.8.2 選擇性增菌培養：檢液混合均勻後，吸取檢液 0.1mL 至 RV 培養液 10mL 中，另吸取檢液 1mL 至 TT 培養液 10 mL 中，混合均勻。將 RV 培養液置於 42°C水浴培養 24±2 小時。另將 TT 培養液置於 43°C水浴培養 24±2 小時。

2.9 分離培養

分別自2.8.2節之RV及TT增菌培養液中取一接種環量，在HE、XLD及BS培養基表面作劃線後，HE及XLD置於35°C培養24±2小時，BS培養基於35°C培養48±2小時。觀察所形成菌落型態。

2.9.1 在各培養基中，典型沙門氏菌菌落之性狀如下：

2.9.1.1 HE 培養基：呈藍綠或藍色菌落，有（或無）黑色中心。很多典型菌落有大而具光澤之黑色中心或黑色菌落。部分非典型菌落會形成黃色菌落，有（或無）黑色中心。

2.9.1.2 XLD 培養基：呈粉紅色菌落，有（或無）黑色中心。很多典型菌落有大而具光澤黑色中心或呈黑色菌落。部分非典型菌落會形成黃色菌落，有（或無）黑色中心。

2.9.1.3 BS 培養基：典型菌落為褐色、灰色或黑色，有時會產生金屬光澤。菌落周圍之培養基顏色，起初為褐色，隨著培養時間加長而轉為黑色並產生光環效應。部份非典型菌落會形成綠色菌落，周圍培養基色澤稍微變深或不變色。

2.9.2 自 HE、BS 及 XLD 培養基中各挑 2 個或 2 個以上之典型菌落，每一菌落同時接種於 TSI 及 LIA 斜面培養基，並同時進行斜面劃線及穿刺接種。以無菌接種針輕觸菌落的中心並接種於 TSI 斜面及底部，穿刺於 LIA 底部兩次並於斜面劃線〔離胺酸脫羧反應為專性厭氧性 (strictly anaerobic)，故 LIA 培養基斜面底部之深度約 4 cm〕。於 35°C 培養 24±2 小時，培養時，將試管蓋旋鬆。

2.9.3 典型沙門氏菌在 TSI 培養基斜面呈紅色反應(鹼性)，底部呈黃色(或無色)反應(酸性)，有培養基顏色變黑或無硫化氫產生；在 LIA 培養基之底部呈紫色反應(鹼性)，大多數沙門氏菌在 LIA 培養基會產生硫化氫而呈黑色。凡是在 LIA 斜面培養基底部產生鹼性的菌株須保留作生化及血清學試驗；在 LIA 培養基底部產生酸性且在 TSI 斜面培養基產生鹼性斜面及酸性底部者亦須保留菌株作生化及血清學試驗。在 LIA 斜面培養基底部產生酸性且在 TSI 斜面培養基產生酸性斜面及酸性底部之菌株則可以丟棄。

2.9.4 混合菌株 (Mixed culture) 之純化：將 TSI 斜面培養基上未純化菌株劃線培養於麥康奇、HE 或 XLD 培養基，於 35°C 培養 24±2 小時。觀察是否有疑似沙門氏菌菌落：

(1) 麥康奇培養基：典型菌落為透明無色，有時會有黑色中心。

(2) HE 培養基：如 2.9.1.1 節。

(3) XLD 培養基：如 2.9.1.2 節。

至少接種 2 株疑似沙門氏菌菌落於 TSI 及 LIA 斜面培養基，步驟如 2.9.2 節及 2.9.3 節。

2.10 鑑定試驗

2.10.1 尿素酶試驗

2.10.1.1 傳統方法：以無菌接種針挑取 TSI 斜面培養基上可疑菌株，接種於尿素培養液內，於 35°C 培養 24±2 小時。由於未接種之尿素培養液偶爾會轉變為紫紅色，故試驗時應包括未接種之培養液作為對照用。培養液由橘紅色轉變為紫紅色者為正反應，顏色不變者為負反應，沙門氏菌為負反應。

2.10.1.2 快速法：自含可疑菌株之 TSI 斜面培養基上鉤取二接種環量菌種至供快速測試用之尿素培養液內，於 37±0.5°C 水浴培養 2 小時。培養液由橘紅色轉變為紫紅色者為正反應，顏色不變者為負反應，沙門氏菌為負反應。尿素酶試驗為負反應者，應自負反應之 TSI 培養基中鉤菌作以下之血清及生化試驗。

2.10.2 血清學試驗

將玻片或塑膠培養皿劃出約 1×2 cm 之二區。自經培養 24~48 小時之 TSI 培養基斜面鉤取一接種環菌量至 0.85% 生理食鹽水 2 mL，混合均勻。分別取菌株懸浮液各 1 滴，滴入玻片上二區部位。滴 1 滴生理食鹽水在玻片之一區，滴 1 滴本體抗血清 Poly A-I & Vi 在玻片另一區。以無菌接種環或接種針將玻片上菌液與 0.85% 生理食鹽水(或本體抗血清)混合均勻。將玻片前後搖動約 1 分鐘後在光源上觀察結果：

正反應：菌液與本體抗血清產生凝集，且菌液與 0.85% 生理食鹽水無凝集者。

負反應：菌液與本體抗血清，以及菌液與 0.85% 生理食鹽水均無凝集者。

非特異型反應：兩者均產生凝集。

2.10.3 生化試驗：自尿素酶負反應之 TSI 培養基鉤菌，作以下試驗。

2.10.3.1 離胺酸脫羧酶試驗(Lysine decarboxylase test)：於 LIA 培養基之試驗結果符合典型沙門氏菌之反應者，不需重複此試驗。鉤菌接種於離胺酸脫羧酶培養液，旋緊試管蓋後，於 35°C 培養 48±2 小時，每隔 24 小時觀察一次。培養液維持紫色者為正反應，由紫色變為黃色者為負反應，沙門氏菌應為正反應。培養液變為非紫非黃色時，則加數滴 0.2% 溴甲酚紫溶液後再行觀察。

2.10.3.2 半乳糖醇利用試驗(Dulcitol utilization test)：鉤菌接種於酚紅半乳糖醇培養液或紫色半乳糖醇培養液並將試管旋鬆，於 35°C 培養 24 小

時後開始觀察，直至 48 ± 2 小時。培養液變為黃色並 (或) 產生氣體者為正反應，否則為負反應，大部分沙門氏菌為正反應(大部分的 *S. arizonae* 為負反應)。

- 2.10.3.3 氰化鉀試驗(KCN test)：鉤菌接種於氰化鉀培養液中，以橡皮塞封緊試管口，於 35°C 培養 24 小時後開始觀察直至 48 ± 2 小時。培養液由清澈變為混濁者為正反應，否則為負反應。大部分沙門氏菌為負反應。氰化鉀為劇毒物質，操作時須小心。
- 2.10.3.4 丙二酸鹽試驗(Malonate test)：鉤菌接種於丙二酸鹽培養液，於 35°C 培養 24 小時後開始觀察直至 48 ± 2 小時。培養液由綠色變為藍色者為正反應，維持綠色者為負反應，大部分沙門氏菌為負反應(大部分的 *S. arizonae* 為正反應)。
- 2.10.3.5 吲哚試驗(Indole test)：取胰化蛋白胨培養液 2 mL 置入空試管，加柯瓦克氏試劑 0.2~0.3 mL，上層呈深紅色或紫色者為正反應。大部分沙門氏菌為負反應。將中間色如橘色或粉紅色者記錄為 $\pm$ 。
- 2.10.3.6 乳糖發酵試驗(Lactose fermentation test)：將菌株接種於酚紅乳糖培養液或紫色乳糖培養液，於 35°C 培養 24 小時後開始觀察直至 48 ± 2 小時，產酸 (顏色變黃) 並有氣體產生者為正反應；只有產酸者亦視為正反應。大部份的沙門氏菌為負反應(大部分的 *S. arizonae* 為正反應)。
- 2.10.3.7 蔗糖發酵試驗(Sucrose fermentation test)：將菌株接種於酚紅蔗糖培養液或紫色蔗糖培養液，於 35°C 培養 24 小時後開始觀察直至 48 ± 2 小時，產酸 (顏色變黃) 並有氣體產生者為正反應；只有產酸者亦視為正反應。大部份的沙門氏菌為負反應。
- 2.10.3.8 歐普氏試驗(VP test)：鉤菌接種於 MR-VP 培養液，於 35°C 培養 48 ± 2 小時。取培養 48 小時菌液 1 mL 至另一試管中(剩餘之 MR-VP 培養液於 35°C 再培養 48 ± 2 小時)，加入歐普氏試劑之溶液 A 約 0.6 mL 振搖均勻。再加歐普氏試劑之溶液 B 約 0.2 mL，振搖均勻，加入少許肌酸以加速反應。4 小時後觀察結果，呈現粉紅至鮮紅色者為正反應，大部份沙門氏菌為負反應。
- 2.10.3.9 甲基紅試驗(MR test)：取已培養 96 小時菌液 5 mL 至試管中，加入甲基紅指示劑 5 至 6 滴，立即觀察反應結果，培養液呈紅色者為正反應，呈黃色者為負反應。大部份沙門氏菌為正反應。

2.10.3.10 檸檬酸鹽利用試驗 (Citrate utilization test)：鈎菌接種於辛蒙斯檸檬酸鹽培養基，須在斜面上作劃線及穿刺培養，於 35°C 培養 96±2 小時。斜面上有菌體生長且培養基顏色由綠色變為藍色者為正反應，大部份沙門氏菌為正反應。

2.11 判定：沙門氏菌陽性者，應符合表一所列之結果。與表二之結果相同者，則被歸類為非沙門氏菌。

備註：如使用經確效認可之市售培養基、生化檢測套組或生化試驗鑑定系統，其檢驗結果有爭議時，以本檢驗方法為準。

參考文獻

1. 食品微生物之檢驗方法-沙門氏桿菌之檢驗。102 年 12 月 23 日部授食字第 1021951187 號公告修正。
2. Ewing, W.H. 1986. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, 4th ed. Elsevier, New York.
3. Andrews, W. H., Wang, H., Jacobson, A., Ge, B., Zhang, G. and Hammack, T. 2024. Chapter 5 *Salmonella*. Bacteriological Analytical Manual. [https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-5-salmonella]

表一、沙門氏菌之生化及血清反應

試驗	正反應 (+)	負反應 (-)	沙門氏菌之反應 ^a
葡萄糖(TSI)	黃色底部	紅色底部	+
離胺酸脫羧酶試驗(LIA)	紫色底部	黃色底部	+
硫化氫(TSI 和 LIA)	變黑	無變黑	+
尿素酶試驗	紫紅色	顏色不變	—
血清學試驗	凝集	無凝集	+
離胺酸脫羧酶試驗	紫色	黃色	+
半乳糖醇利用試驗	黃色，產氣	顏色不變 不產氣	+ ^b
氰化鉀試驗	混濁 (生長)	澄清 (不生長)	—
丙二酸鹽試驗	藍色	顏色不變	— ^c
吲哚試驗	表面呈深紅色 或紫色	表面呈黃色	—
乳糖發酵試驗	黃色，產氣	顏色不變 不產氣	— ^c
蔗糖發酵試驗	黃色，產氣	顏色不變 不產氣	—
歐普氏試驗	粉紅或紅色	顏色不變	—
甲基紅試驗	紅色	黃色	+
檸檬酸鹽利用試驗	生長，藍色	不生長 顏色不變	V

a、“+”表示 90% 以上在1~2天內均為正反應，“—”表示 90% 以上在1~2天內均為負反應；“V”表示不一定。

b、大部分的 *S. arizonae* 為負反應。

c、大部分的 *S. arizonae* 為正反應。

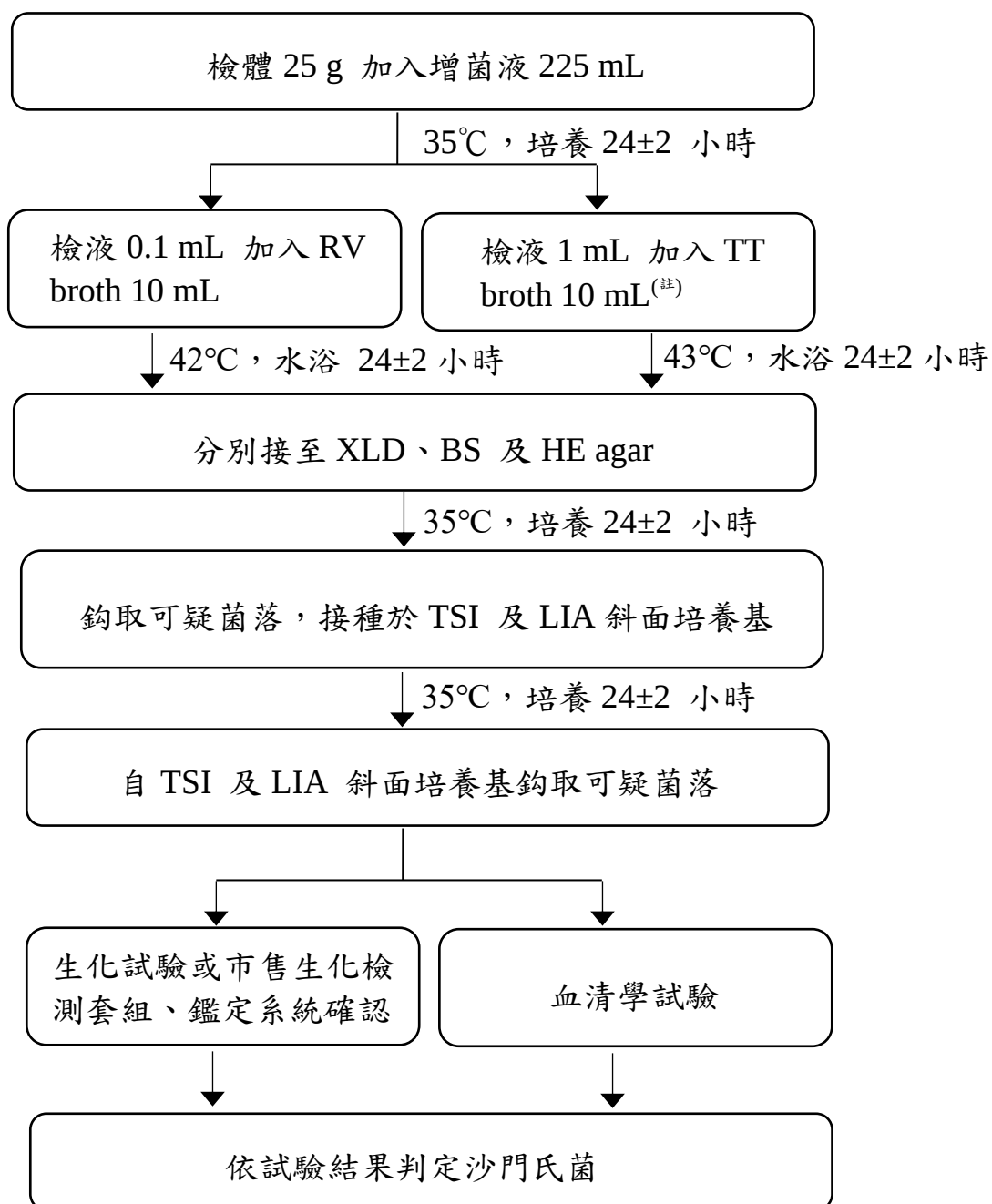
表二、非沙門氏菌菌株之判定標準

試驗	結 果
1. 尿素酶	正反應(紫紅色~紅色)
2. 吲哚試驗及 血清學試驗	正反應(表面呈深紅色或紫色) 負反應(無凝集)
3. 離胺酸脫羧試驗及 氰化鉀試驗	負反應(黃色) 正反應(混濁)
4. 乳糖發酵試驗	正反應(黃色，產氣) ^{a,b}
5. 蔗糖發酵試驗	正反應(黃色，產氣) ^b
6. 氰化鉀試驗 歐普氏試驗及 甲基紅試驗	正反應(混濁) 正反應(粉紅至紅色) 負反應(黃色)

a. 測試丙二酸鹽試驗為陽性之菌株須再試驗是否為 *S. arizonae*。

b. 如LIA為正反應之菌株不應丟棄，應繼續測試看是否為沙門氏菌。

檢驗流程圖



註：TT broth 在使用前需先加入碘-碘化鉀溶液 0.2 mL 及 0.1% 煌綠溶液 0.1 mL。