

食品微生物檢驗方法—沙門氏桿菌之檢驗

Methods of Test for Food Microbiology — Test of *Salmonella*

1. 適用範圍：本檢驗法適用於食品中沙門氏桿菌之檢驗。

2. 檢驗方法：

2.1. 器具及材料：

2.1.1. 乾熱滅菌器：玻璃用具等之滅菌用，其內部中心溫度能達 170°C 以上，並維持該溫度 1 小時以上者。

2.1.2. 高壓滅菌釜：培養基及稀釋液等不能乾熱滅菌之材料及用具等之滅菌用，常以 121°C (約 15 lb/in^2 , 1 kg/cm^2 或一大氣壓) 滅菌 15 分鐘以上。

2.1.3. 冰箱：保持 0°C 至 5°C 。

2.1.4. 吸管：通常使用者為 10 ml 及 1 ml，應有 0.1 ml 之刻度。

2.1.5. 培養皿：內徑約 9 cm，深度 1.5 ~ 1.8 cm，底皿之內外面應平坦，無氣泡、刮傷或其他缺點。

2.1.6. 增菌用容器：附蓋 (栓) 之 500 ml 廣口瓶或 $15 \times 150\text{ mm}$ 試管。

2.1.7. 培養箱：能維持內部溫度溫差在 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 以內者。

2.1.8. 水浴 (Water bath)：能維持水溫溫差在 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 以內者。

2.1.9. 攪拌均質器 (Blender)：能適用於無菌操作者。

2.1.10. 發酵管 (Durham fermentation tube)：外徑 $9 \times 22\text{ mm}$ ，使用時倒置於 $15 \times 150\text{ mm}$ 之試管內。

2.1.11. 接種用白金針或白金耳。

2.1.12. 培養基：

2.1.12.1. 乳糖肉羹 (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，分取 225 ml 注入增菌用廣口瓶內，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 6.9 ± 0.2 。

2.1.12.2. 亞硒酸鹽胱氨酸肉羹 (Selenite Cystine Broth)

聚蛋白胨 (Polypeptone)	5 g
乳糖 (Lactose)	4 g
磷酸氫二鈉 (Na_2HPO_4)	10 g
亞硒酸鈉 (NaHSeO_3)	4 g
胱氨酸 (Cystine)	0.01 g
蒸餾水	1000 ml

加熱溶解後，分取 10 ml 或 225 ml 注入增菌用試管或廣口瓶內後，再以流動蒸汽加熱

10 分鐘 (加熱時應經常搖動，但不可高壓殺菌)，最後 pH 值為 7.0 ± 0.2 。配製後，應當天使用。

2.1.12.3. 無脂乳粉培養基 (Nonfat Dried Milk)

無脂乳粉 (Nonfat dried milk)	100 g
蒸餾水	1000 ml

加熱沸騰溶解後，分取 225 ml 注入增菌用廣口瓶內，以 121°C 滅菌 15 分鐘。

2.1.12.4. 四硫代硫酸鹽肉羹 (Tetrathionate Broth)

基礎培養基：

聚蛋白腴 (Polypeptone)	5 g
胆汁鹽 (Bile salt)	1 g
碳酸鈣 (CaCO_3)	10 g
硫代硫酸鈉 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	30 g
蒸餾水	1000 ml

將基礎培養基加熱沸騰溶解後，分取 10 ml 注入增菌用試管中，儲藏於冰箱備用。

碘液：取 6 g 精製碘及 5 g 碘化鉀置於研鉢中，經研磨 5~10 秒鐘後，加 1 ml 無菌水研磨，次加 5 ml 無菌水研磨，再加 10 ml 無菌水，研磨至碘化鉀和精製碘完全溶於水中，將此溶液注入褐色瓶中，再以適量無菌水洗滌研鉢及杵後，以此洗液併入，使溶液達 20 ml。

煌綠液 (Brilliant green Solution)：取 0.1 g 煌綠染料 (Brilliant green dye) 溶於 100 ml 無菌水中。

使用前加入 0.2 ml 碘液及 0.1 ml 煌綠液於基礎培養基中。

2.1.12.5. 煌綠瓊脂培養基 (Brilliant Green Agar)。

酵母抽出物 (Yeast extract)	3 g
胨蛋白腴 (Proteose peptone #3)	10 g
氯化鈉 (NaCl)	5 g
乳糖 (Lactose)	10 g
蔗糖 (Sucrose)	10 g
酚紅 (Phenol red)	0.08 g
煌綠 (Brilliant green, 0.25 % 煌綠溶液取 5 ml)	0.0125 g
洋菜 (Agar)	20 g
蒸餾水	1000 ml

加熱沸騰溶解後，分裝於試管或三角瓶內，以 121°C 滅菌 12 分鐘，最後 pH 值為 6.9 ± 0.2 。

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，每一培養皿約倒入 15~20 ml，凝固後打開皿蓋約 $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{1}{4}$ ，使培養基之表面乾燥。已注入培養皿之培養基以當天使用最佳，在冰箱中貯存者應於使用前先檢查有無雜菌之污染。

2.1.12.6. 沙門氏桿菌——赤痢菌瓊脂培養基 (Salmonella-Shigella Agar 簡稱 SS Agar)。

牛肉抽出物 (Beef extract)	5 g
胨蛋白腴 (Proteose peptone)	5 g
乳糖 (Lactose)	10 g
膽汁鹽混合物 (Bile salts mixture)	8.5 g

沙門氏桿菌之檢驗

檸檬酸鈉 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	8.5 g
硫代硫酸鈉 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	8.5 g
檸檬酸鐵 ($\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$)	1 g
洋菜 (Agar)	13.5 g
煌綠 (Brilliant green, 0.1 % 煌綠溶液取 0.33 ml)	0.33 g
中性紅 (Neutral red, 1 % 溶液取 2.5 ml)	25 mg
蒸餾水	1000 ml

加熱沸騰溶解後，不須高壓滅菌，最後 pH 值為 7.0 ± 0.2 。以下步驟與 2.1.12.5.節同。

2.1.12.7. 亞硫酸鉍瓊脂培養基 (Bismuth Sulfite Agar)

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 (Na_2HPO_4)	4 g
無水硫酸亞鐵 (FeSO_4)	0.3 g
亞硫酸鉍 [$\text{Bi}_2(\text{SO}_3)_3$]	8 g
洋菜 (Agar)	20 g
煌綠 (Brilliant green)	0.025 g
蒸餾水	1000 ml

加熱沸騰溶解後，不須高壓滅菌，最後 pH 值為 7.6 ± 0.2 。以下步驟與 2.1.12.5.節同。

2.1.12.8. 三糖鐵瓊脂培養基 (Triple Sugar Iron Agar, 簡稱 TSI Agar)

聚蛋白胨 (Polypeptone)	20 g
氯化鈉 (NaCl)	5 g
乳糖 (Lactose)	10 g
蔗糖 (Sucrose)	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

加熱沸騰溶解後，分取 5 ml 注入 13×120 mm 試管中，以 118°C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 7.3 ± 0.2 。滅菌後作成斜面培養基，此斜面長度約 4 ~ 5 cm，斜面底部之深度約 2 ~ 3 cm。

2.1.12.9. 離氨酸鐵瓊脂培養基 (Lysine Iron Agar, 簡稱 LIA)

蛋白胨 (Peptone)	5 g
酵母抽出物 (Yeast extract)	3 g
葡萄糖 (Glucose)	1 g
離氨酸 (L-Lysine)	10 g
檸檬酸銨鐵 (Ferric ammonium citrate)	0.5 g
無水硫代硫酸鈉 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	0.04 g

溴甲酚紫 (Bromocresol purple)	0.02 g
洋菜 (Agar)	15 g
蒸餾水	1000 ml

加熱沸騰溶解後，分取 4 ml 注入 13 × 120 mm 試管中，以 121 °C 滅菌 12 分鐘，最後 pH 值為 6.7 ± 0.2 。滅菌後作成斜面培養基，此斜面長度約 3 cm，斜面底部之深度約 1.5 ~ 3 cm。

2.1.12.10. MacConkey 瓊脂培養基 (MacConkey Agar)

胰蛋白胨 (Proteose peptone)	3 g
蛋白胨 (Peptone)	17 g
乳糖 (Lactose)	10 g
膽汁鹽 (Bile salts #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 ml
蒸餾水	1000 ml

加熱沸騰溶解後，分裝於試管或三角瓶內，以 121 °C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 7.1 ± 0.2 。

以下步驟與 2.1.12.5. 節同。

2.1.12.11. 尿素肉羹 (Urea Broth)

尿素 (Urea)	20 g
酵母抽出物 (Yeast extract)	0.1 g
磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4)	9.1 g
磷酸氫二鈉 (Na_2HPO_4)	9.5 g
酚紅 (Phenol red)	0.01 g
蒸餾水	1000 ml

溶解後，經具有 0.45 μm 孔徑濾膜之微孔濾器作無菌過濾後，分取 1.5 ~ 3 ml 濾液，注入已滅菌之試管中，最後 pH 值為 6.8 ± 0.2 。

2.1.12.12. 胰化酪蛋白大豆肉羹 (Trypticase Soy Broth)

大豆蛋白胨 (Phytone peptone)	3 g
胰化酪蛋白胨 (Trypticase peptone)	17 g
磷酸氫二鉀 (K_2HPO_4)	2.5 g
氯化鈉 (NaCl)	5.0 g
葡萄糖 (Dextrose)	2.5 g
蒸餾水	1000 ml

加熱溶解後，分取 225 ml 注入增菌用廣口瓶內，以 121 °C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 7.3 ± 0.2 。

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

胰化蛋白胨 (Tryptose)	20 g
乳糖 (Lactose)	5 g
磷酸氫二鉀 (K_2HPO_4)	2.75 g

沙門氏桿菌之檢驗

磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4)	2.75 g
氯化鈉 (NaCl)	5 g
硫酸月桂酸鈉 (Sodium lauryl sulfate)	0.1 g
蒸餾水	1000 ml

加熱溶解後，分取 10 ml 注入增菌用試管內，以 121℃滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 6.8 ± 0.2 。

2.1.12.14. 離氨酸脫羧酶肉羹 (Lysine Decarboxylase Broth)

蛋白胨 (Peptone)	5 g
酵母抽出物 (Yeast extract)	3 g
葡萄糖 (Glucose)	1 g
離氨酸 (L-Lysine)	5 g
溴甲酚紫 (Bromocresol purple)	0.02 g
蒸餾水	1000 ml

加熱溶解後，分取 5 ml 注入附有螺旋蓋試管中，以 121℃滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 6.5 ~ 6.8。

2.1.12.15. 氰化鉀肉羹 (Potassium Cyanide Broth)

基礎培養液：

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，取 1000 ml 裝於三角瓶內，以 121℃滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 7.6 ± 0.2 。

0.5 % 氰化鉀溶液：取 0.5 g 氰化鉀溶於 100 ml 無菌水中。

應以安全吸球吸取 15 ml 氰化鉀溶液加入 1000 ml 之基礎培養液中，混合均勻後分取 1 ~ 1.5 ml 注入已滅菌之試管中。(注意：KCN 劇毒)

2.1.12.16. 丙二酸鹽肉羹 (Malonate Broth)

酵母抽出物 (Yeast extract)	1 g
硫酸銨 [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]	2 g
磷酸氫二鉀 (K_2HPO_4)	0.6 g
磷酸二氫鉀 (KH_2PO_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 (Bromothymol blue)	0.025 g
蒸餾水	1000 ml

加熱溶解後，分取 3 ml 注入試管中，以 121℃滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 6.7 ± 0.2 。

2.1.12.17. 酚紅碳水化合物肉羹 (Phenol Red Carbohydrate Broth)

胰蛋白胨 (Proteos peptone #3)	10 g
-----------------------------	------

氯化鈉 (NaCl)	5 g
牛肉抽出物 (Beef extract)	1 g
酚紅 (Phenol red, 0.25 % 溶液取 7.2 ml)	0.018 g
蒸餾水	1000 ml

取 5 g 甜醇 (Dulcitol) 或 10 g 乳糖或 10 g 蔗糖加入上述之肉羹中，經溶解後分取 5 ml 注入裝有發酵管之試管內，以 118 °C 滅菌 10 分鐘，最後 pH 值為 7.3 ± 0.2。

2.1.12.18. 胰化蛋白陳肉羹 (Tryptone or Tryptophane Broth)

胰化蛋白陳 (Tryptone)	10 g
蒸餾水	1000 ml

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

2.1.12.19. 葡萄糖肉羹 [Glucose Broth (MR - VP Broth)]

胰蛋白陳 (Proteose peptone)	7 g
葡萄糖 (Glucose)	5 g
磷酸氫二鉀 (K_2HPO_4)	5 g
蒸餾水	1000 ml

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

2.1.12.20. 辛蒙斯氏檸檬酸鹽瓊脂培養基 (Simmon's Citrate Agar)

氯化鈉 (NaCl)	5 g
檸檬酸鈉 ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$)	2 g
磷酸氫二鉀 (K_2HPO_4)	1 g
磷酸二氫鉍 ($NH_4H_2PO_4$)	1 g
硫酸鎂 ($MgSO_4$)	0.2 g
溴麝香草藍 (Bromothymol blue)	0.08 g
洋菜 (Agar)	15 g
蒸餾水	1000 ml

加熱沸騰溶解後，分取 5 ml 注入 13 × 120 mm 試管中，以 121 °C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 6.9 ± 0.2。滅菌後作成斜面培養基，此斜面長度約 4 ~ 5 cm，斜面底部深度約 2 ~ 3 cm。

2.1.13. 試藥：碘、碘化鉀、煌綠、氰化鉀、甜醇、乳糖、蔗糖、對 - 二甲氨基苯甲醛 (p-Dimethylaminobenzaldehyde)、甲基紅 (Methyl red)、 α -萘酚 (α -Naphthol)、氫氧化鉀、肌酸 (Creatine)、結晶紫、氯化鈉、明膠酶 (Gelatinase)、甲醛 (Formaldehyde)、乙醇、戊醇或異戊醇 (Amyl alcohol or isoamyl alcohol) 及鹽酸均採用試藥級。

2.1.14. 溶液：

2.1.14.1. 明膠酶溶液 (Gelatinase Solution)

取 5 g 明膠酶溶於 100 ml 蒸餾水中，以 9500 rpm 離心 10 分鐘後再經具有 0.45 μ m 孔径濾膜之微孔濾器作無菌過濾後，注入已滅菌之三角瓶內。

2.1.14.2. 生理食鹽水：

沙門氏桿菌之檢驗

取 8.5 g 氯化鈉溶於 1000 ml 蒸餾水中，分裝於試管中，經 121 °C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 7.0 ± 0.1 。

2.1.14.3.1 % 煌綠溶液：

取 1 g 煌綠溶於無菌水中使成 100 ml。

2.1.14.4.1 % 結晶紫溶液：

取 1 g 結晶紫溶於無菌水中使成 100 ml。

2.1.15. 試劑：

2.1.15.1. 柯瓦克氏試劑 (Kovacs reagent)

取 5 g 對 - 二甲氨基苯甲醛溶於 75 ml 戊醇或異戊醇中，再徐徐加入 25 ml 濃鹽酸，混合均勻後應呈黃色並須保存於 4 °C 冰箱中。

2.1.15.2. 甲基紅指示劑：

取 0.1 g 甲基紅溶於 300 ml 之 95 % 乙醇後再加蒸餾水使成 500 ml。

2.1.15.3. 歐普氏試劑 (Voges-Proskauer reagent, 簡稱 VP reagent)

溶液 A：取 5 g α -萘酚溶於 100 ml 無水乙醇中。

溶液 B：取 40 g 氫氧化鉀溶於蒸餾水中使成 100 ml。

2.1.16. 血清：

2.1.16.1. 沙門氏桿菌多價本體 (O) 抗血清 [*Salmonella* polyvalent Somatic (O) antiserum]

2.1.16.2. 沙門氏桿菌本體族群 (O) 抗血清 [*Salmonella* Somatic group (O) antisera]：A、B、C₁、C₂、C₃、D₁、D₂、E₁、E₂、E₃、E₄、F、G、H、I 及 Vi。

2.2. 檢液之調製：

2.2.1. 脫水蛋粉、殺菌之液蛋及冷凍蛋，調製成粉狀之食品（如糕餅類），含蛋食品（如麵條、蛋捲）、乾酪、涼拌沙拉、魚貝類、蛙肉、蝸牛肉及食用著色劑（其 10 % 懸浮液之 pH 值在 6 以上者）等檢體，若為冷凍檢體而須解凍者，最好放在冷藏溫度下解凍（如 2 ~ 5 °C 18 小時內即可解凍完全）；另外亦可使用更高的溫度快速解凍（即放在 45 °C 以下的水浴中，可於 15 分鐘內解凍），解凍時應經常搖動檢體，以幫助檢體的解凍。不須解凍或已解凍後之檢體，應予以適當切碎並混合均勻。取 25 g 加入 225 ml 已滅菌之乳糖肉羹中用攪拌均質器攪拌。攪拌方法為初以低速攪拌數秒鐘，然後高速，但攪拌的總時間不能超過 2 分鐘，將此溶液換置於已滅菌的廣口瓶中，並調節其 pH 值為 6.8 ± 0.2 後，供作檢液。

2.2.2. 脫脂乳粉及全乳粉之檢體取 25 g 加入含 225 ml 無菌水之廣口瓶中振搖後，調整 pH 值為 6.8 ± 0.2 ，加入 0.45 ml 之 1 % 煌綠溶液後搖勻，供作檢液。

2.2.3. 未經殺菌的冷凍蛋製品，未經調理或高度污染之肉類及其製品、內臟、魚粉、肉骨粉等檢體，解凍方法同 2.2.1. 節，解凍後檢體予以適當切碎並混合均勻。分取 25 g 各加入 225 ml 之亞硫酸鹽胱氨酸肉羹及四硫代硫酸鹽肉羹中，用攪拌均質器攪拌，攪拌方法同 2.2.1. 節，將此溶液換置於已滅菌的廣口瓶中，而四硫代硫酸鹽肉羹中應再加入 2.25 ml，0.1 % 煌綠溶液，最後 pH 值為 6.8 ± 0.2 ，供作檢液。

2.2.4. 經加熱調理過或乾燥之肉類及其製品、內臟、魚粉、肉骨粉、椰子等檢體，經適當切碎，混合後，取 25 g 加入含 225 ml 已滅菌之乳糖肉羹及適量已滅菌之乳化劑（註）（粉狀內臟製品可不需添加）並用攪拌均質器攪拌。攪拌方法同 2.2.1. 節，將此溶液換置於已滅菌的廣口瓶中，並調整 pH 值為 6.8 ± 0.2 ，供作檢液。

2.2.5. 食用著色劑（其 10 % 懸浮液之 pH 值在 6 以下者），取 25 g 加入含 225 ml 四硫代硫酸

鹽肉羹廣口瓶中，混合均勻後調整 pH 值為 6.8 ± 0.2 ，加入 2.25 ml 0.1 % 煌綠溶液後搖勻，供作檢液。

2.2.6. 酵母粉、香辛料（如黑胡椒、白胡椒、紅番椒、小茴香、芝麻等）檢體，取 25 g 加入含 225 ml 已滅菌之胰化酪蛋白大豆肉羹廣口瓶中，振搖使成均質狀態，調整 pH 值為 6.8 ± 0.2 後供作檢液。

2.2.7. 糖果、糖衣、巧克力等檢體，取 25 g 加入含 225 ml 已滅菌之脫脂乳粉培養基中，用攪拌均質器攪拌。攪拌方法同 2.2.1. 節，將此溶液換置於已滅菌之廣口瓶中，再加入 0.45 ml 1 % 煌綠溶液或 0.9 ml 1 % 結晶紫溶液搖勻後，供作檢液。

2.2.8. 明膠檢體取 25 g 加入含 225 ml 已滅菌之乳糖肉羹中，再加入 5 ml 5 % 明膠酶溶液，搖勻後靜置 60 分鐘，調整 pH 值為 6.8 ± 0.2 供作檢液。

2.3. 鑑別試驗：

2.3.1. 增菌培養：

2.2.3. 節及 2.2.5. 節之檢液置於 35°C 培養箱中增菌培養 24 ± 2 小時；2.2.6. 節中若為活性酵母粉時應置於 35°C 培養箱中先行培養 24 ± 2 小時後，再分取 1 ml 之培養液各置入 10 ml 硫酸月桂酸胰化蛋白胨肉羹及 10 ml 四硫代硫酸鹽肉羹中並置於 35°C 培養箱中增菌培養 24 ± 2 小時；2.2. 節中除上述各檢液外應先置於 35°C 培養箱中培養 24 ± 2 小時後再分別吸取 1 ml 各接種於 10 ml 亞硫酸鹽胱氨酸肉羹及四硫代硫酸鹽肉羹中，並置於 35°C 培養箱中增菌培養 24 ± 2 小時。

2.3.2. 分離培養：

2.3.2.1. 由 2.3.1. 節之各增菌培養液中分取一白金耳量在煌綠瓊脂培養基、沙門氏桿菌—赤痢菌瓊脂培養基及亞硫酸鉍瓊脂培養基表面作劃線培養後，於 35°C 培養箱中，培養 24 ± 2 小時。其中亞硫酸鉍瓊脂培養基若無發現典型菌落須繼續培養 24 小時，觀察所形成菌落之生長狀態，若為可疑沙門氏桿菌者，在煌綠瓊脂培養基上之菌落呈粉紅或白色、不透明或半透明且周圍之培養基為粉紅色或紅色；在沙門氏桿菌—赤痢菌瓊脂培養基上之菌落呈無色或淡粉紅色、不透明或半透明且菌落中心呈黑色；在亞硫酸鉍瓊脂培養基上之菌落呈褐色或黑色，有時帶有金屬光澤環繞培養基，通常菌落最初是褐色，培養時間增長時則轉為黑色，有些菌株產生綠色。

2.3.2.2. 鈎取 2.3.2.1. 節之可疑菌落利用斜面劃線穿刺法分別接種於三糖鐵瓊脂及離氨酸鐵瓊脂培養基並置於 35°C 培養箱中培養 24 ± 2 小時，觀察反應情形。若為可疑沙門氏桿菌者在三糖鐵瓊脂培養基的斜面呈紅色反應（鹼性），底部呈黃色反應（酸性），有（或無）硫化氫產生；離氨酸鐵瓊脂培養基上之斜面呈紫色反應（鹼性），底部呈紫色反應（鹼性），有（或無）硫化氫產生。

2.3.3. 純化：

自 2.3.2.2. 節之可疑沙門氏桿菌反應之三糖鐵瓊脂培養基中鈎取一白金耳量，在 MacConkey 瓊脂培養基及煌綠瓊脂培養基表面作劃線培養後，置於 35°C 培養箱中培養 24 ± 2 小時，觀察所形成菌落生長狀態，鈎取 MacConkey 瓊脂培養基上之無色透明菌落及煌綠瓊脂培養基上粉紅或白色、不透明或半透明且周圍之培養基為粉紅色或紅色之菌落，並依 2.3.2.2. 節進行接種於三糖鐵瓊脂培養基上及觀察其結果。

2.3.3.1. 尿素酶試驗：

自經純化過的可疑三糖鐵瓊脂培養基上鈎菌接種於尿素肉羹中，置於 35°C 培養箱中培養 24 ± 2 小時，若培養液由桔紅色變為紫紅色者為正反應，若維持桔紅色者為負反應。

沙門氏桿菌之檢驗

，沙門氏桿菌爲負反應。

若尿素酶試驗爲負反應者，應自負反應之三糖鐵瓊脂培養基中釣菌作以下的血清及生化試驗。

2.3.4. 血清學試驗：

從 2.3.3. 節之可疑沙門氏桿菌反應之三糖鐵瓊脂培養基中釣取一白金耳量於含數白金耳生理食鹽水之玻片上，調成懸浮液。

2.3.4.1. 多價本體（O）抗血清試驗：

利用蠟筆在載玻片上畫成兩部份大小約 1×2 cm，分別滴入一滴多價本體（O）抗血清及生理食鹽水（作對照組之用）後，再分取一白金耳懸浮液分別塗抹於載玻片上之兩部份內。反覆傾斜 1 分鐘，使各別充分混合均勻後觀察結果。若正反應者應呈凝集現象，但對照組則無，負反應者則無凝集現象，且對照組亦無；非特异性反應者抗原抗血清混合物及對照組均有凝集現象發生。

2.3.4.2. 本體族群（O）抗血清試驗：

取 2.3.4. 節懸浮液利用各本體族群（O）抗血清包括 Vi 抗血清代替多價本體（O）抗血清，依 2.3.4.1. 節進行試驗及觀察。若正反應者應呈凝集現象，但對照組則無，負反應者則無凝集現象，且對照組亦無。

2.3.5. 生化試驗：

自 2.3.3. 節之可疑沙門氏桿菌反應之三糖鐵瓊脂培養基中釣菌作以下試驗。

2.3.5.1. 離氨酸脫羧酶試驗（Lysine decarboxylase test）：

釣菌接種於離氨酸脫羧酶肉羹後，徐徐注入液態石蜡至高約 2.5 cm，使成厭氧狀態後，置於 35°C 培養箱中培養 96 ± 2 小時，每隔 24 小時觀察一次。若培養液維持原紫色者爲正反應，由紫色變爲黃色者爲負反應，沙門氏桿菌爲正反應。

2.3.5.2. 酚紅甜醇利用試驗（Phenol red dulcitol utilization test）：

釣菌接種於酚紅甜醇肉羹中，並置於 35°C 培養箱中培養 48 ± 2 小時，每隔 24 小時觀察一次。若培養液由紅色變爲黃色並（或）產生氣體者爲正反應，否則爲負反應，大部份沙門氏桿菌爲正反應。

2.3.5.3. 氰化鉀試驗（KCN test）：

釣菌接種於酚紅甜醇肉羹中，並置於 35°C 培養箱中培養 48 ± 2 小時，每隔 24 小時觀察一次。若培養液由清澈狀變爲混濁狀者爲正反應，仍維持清澈狀者爲負反應，大部份沙門氏桿菌爲負反應。

2.3.5.4. 丙二酸鹽試驗（Malonate test）：

釣菌接種於丙二酸鹽肉羹中，並置於 35°C 培養箱中培養 48 ± 2 小時，每隔 24 小時觀察一次。若培養液由綠色變爲藍色者爲正反應，仍維持綠色者爲負反應，大部份沙門氏桿菌爲負反應。

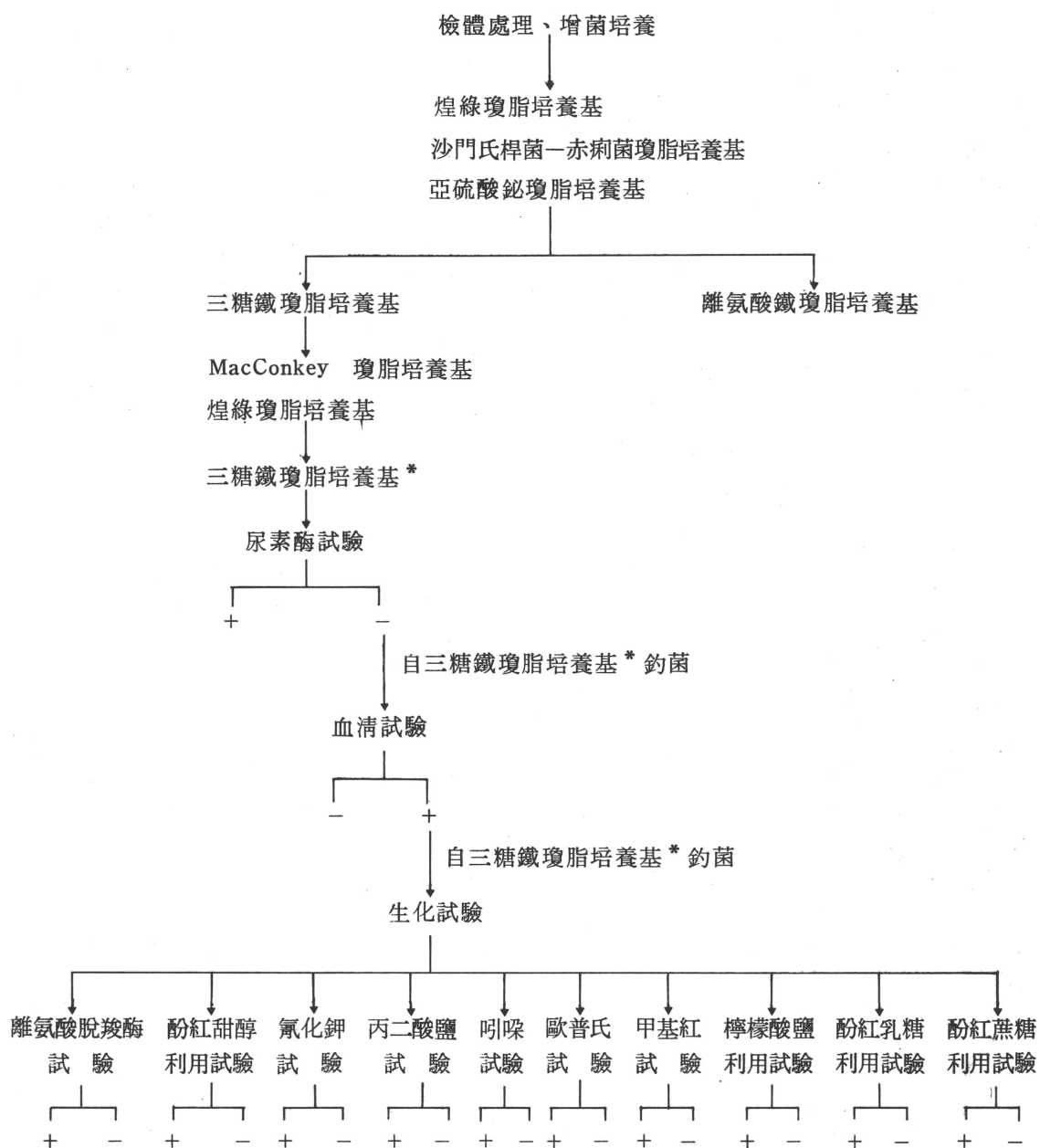
2.3.5.5. 吲哚試驗（Indole test）：

釣菌接種於胰化蛋白胨肉羹中，並置於 35°C 培養箱中培養 24 ± 2 小時後，加入 0.2 ~ 0.3 ml 柯瓦克氏試劑，輕輕搖動後靜置幾分鐘，若上層呈現紅色則爲正反應，否則爲負反應，大部份沙門氏桿菌爲負反應。

2.3.5.6. 歐普氏試驗（VP test）：

釣菌接種於葡萄糖肉羹中，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之試管中，加入 0.6 ml 歐普氏試劑之溶液 A 及 0.2 ml 歐普氏試劑之

附圖 沙門氏桿菌檢驗方法流程圖



沙門氏桿菌之檢驗

溶液B後，再加入少許肌酸，振搖均勻，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，大部份沙門氏桿菌為負反應。

2.3.5.7. 甲基紅試驗 (MR test) :

將2.3.5.6.節剩餘之葡萄糖肉羹培養液再培養 48 ± 2 小時後，加入0.3 ml 甲基紅指示劑，輕輕搖勻，若仍為紅色則為正反應，否則為負反應，大部份沙門氏桿菌為正反應。

2.3.5.8. 檸檬酸鹽利用試驗 (Citrate utilization test) :

鈎菌接種於辛蒙斯氏檸檬酸鹽瓊脂斜面上作劃線培養，並置於35℃培養箱中培養 96 ± 2 小時，每隔24小時觀察一次。若斜面上有菌體生長且培養基由綠色變為藍色者為正反應，否則為負反應，大部份沙門氏桿菌為正反應。

2.3.5.9. 酚紅乳糖利用試驗 (Phenol red lactose utilization test) :

鈎菌接種於酚紅乳糖肉羹中，並置於35℃培養箱中培養 48 ± 2 小時，每隔24小時觀察一次。若培養液由紅色變為黃色並產生氣體者為正反應，否則為負反應，大部份沙門氏桿菌為負反應。

2.3.5.10. 酚紅蔗糖利用試驗 (Phenol red sucrose utilization test) :

鈎菌接種於酚紅蔗糖肉羹中，並置於35℃培養箱中培養 48 ± 2 小時，每隔24小時觀察一次。若培養液由紅色變為黃色並產生氣體者為正反應，否則為負反應，大部份沙門氏桿菌為負反應。

以上檢驗方法流程如附圖。

2.4. 判定：

沙門氏菌陽性者，應符合附表所列之結果。

3. 參考文獻：

1. M. L. Speck, Compendium of Methods for the Microbiological Examination. (1976). APHA Inc.
2. Bacteriological Analytical Manual. 6th ed. (1979). FDA, U. S. Department of Health, Education, & Welfare.
3. P. R. Edwards and W. H. Ewing, Identification of Enterobacteriaceae. 3rd ed. (1972). Burgess. Publishing Co. Minneapolis, MN.
4. Official Methods of analysis, 13th ed. (1980). Secs. 46.054-46.065. AOAC, Washington, D. C.

附表 沙門氏桿菌的生化及血清反應

試 驗 或 基 質	正 反 應 (+)	負 反 應 (-)	沙門氏桿菌的反應 ^a
多價本體抗血清	凝 集	無凝集	+
葡萄糖 (三糖鐵培養基)	黃色底部	紅色底部	+
硫化氫 (三糖鐵培養基)	黑 色	非黑色	+
尿素酶	紫紅色	原 色	-
離氨酸脫羧酶	紫 色	黃 色	+
酚紅甜醇	產氣、黃色	不產氣、紅色	+ ^b
氯化鉀	混 濁	澄 清	-
丙二酸鹽	藍 色	綠 色	- ^c
吡 啶	表面產生紅色環	表面為黃色環	-
歐普氏	紅 色	原 色	-
甲基紅	紅 色	黃 色	+
檸檬酸鹽	生長、藍色	不生長、綠色	V
酚紅乳糖	產氣、黃色	不產氣、紅色	- ^c
酚紅蔗糖	產氣、黃色	不產氣、紅色	-

a “+”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；“V”表示不一定。

b 大部份的 *S. arizonae* 為負反應。

c 大部份的 *S. arizonae* 為正反應。

(註) Triton X-100 或 Tergitol Anionic 7。