

食品微生物檢驗方法—葡萄狀球菌之檢驗

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

1. 適用範圍：本檢驗法適用於食品中葡萄狀球菌之檢驗。

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/in²，1 kg/cm² 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。

2.1.7. 培養箱：能維持內部溫度溫差在 ± 1.0 °C 以內者。

2.1.8. 水浴（Water bath）：能維持水溫溫差在 ± 1.0 °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. 接種用白金針或白金耳。

2.1.11. 培養基：

2.1.11.1. 10 % 氯化鈉胰化酪蛋白大豆肉羹（Trypticase Soy Broth, 10 % NaCl）

胰化酪蛋白朊（Trypticase peptone）	17 g
大豆蛋白朊（Phytone peptone）	3 g
氯化鈉（NaCl）	5 g
磷酸氫二鉀（K ₂ HPO ₄ ）	2.5 g
葡萄糖（Dextrose）	2.5 g
蒸餾水	1000 ml

取 95 g 氯化鈉（註一）加入上述之肉羹中，加熱沸騰溶解後，分裝於試管或三角瓶中，以 121 °C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 7.3 ± 0.2。

2.1.11.2. 葡萄狀球菌培養基 110 號（Staphylococcus Medium No. 110）

明膠（Gelatin）	30 g
胰化酪蛋白朊（Trypticase peptone）	10 g
酵母抽出物（Yeast extract）	2.5 g
乳糖（Lactose）	2 g
甘露糖醇（D-mannitol）	10 g
氯化鈉（NaCl）	75 g
磷酸氫二鉀（K ₂ HPO ₄ ）	5 g

葡萄狀球菌之檢驗

洋菜 (Ager) (註二)	15 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℃ 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 7.0 ± 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檢查有無雜菌之污染。

2.1.11.3. 營養瓊脂 (Nutrient Agar)

牛肉抽出物 (Beef extract)	3 g
蛋白胨 (Peptone)	5 g
洋菜 (Agar)	15 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℃ 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 7.3 ± 0.1，分裝於試管者，作成斜面培養基。

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

胰化酪蛋白胨 (Trypticase peptone)	10 g
牛肉抽出物 (Beef extract)	1 g
酚紅 (Phenol red)	0.018 g
氯化鈉 (NaCl)	5 g
蒸餾水	1000 ml

取 10 g 葡萄糖 (註三) 加入上述之肉羹中，加熱溶解後，分裝於試管或三角瓶內，以 118℃ 滅菌 10 分鐘，最後 pH 值為 7.3 ± 0.2。

2.1.12. 試藥：葡萄糖 (Dextrose)、氯化鈉、磷酸二氫鈉 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)、無水磷酸氫二鈉 (Na_2HPO_4)、30 % 過氧化氫 (30 % H_2O_2)、結晶紫 (Crystal violet)、草酸銨 (Ammonium oxalate)、碘化鉀、碘、沙黃 (Safranin)、液態石蠟 (Liquid paraffin)、乙醇及溶菌素 (Lysostaphin) 均採用試藥級。

2.1.13. 試劑：

2.1.13.1. 0.02 M 磷酸鹽緩衝溶液 (0.02 M Phosphate Saline Buffer, pH 7.3 ~ 7.4)

原液 A：取 28.4 g 無水磷酸氫二鈉及 85 g 氯化鈉溶於蒸餾水中，使成為 1000 ml。

原液 B：取 27.6 g 磷酸二氫鈉及 85 g 氯化鈉溶於蒸餾水中，使成為 1000 ml。

取 10 ml 原液 B 加 90 ml 蒸餾水配成稀釋液 (C)，取 50 ml 原液 A 加 450 ml 蒸餾水配成稀釋液 (D)，將 C 液徐徐加入 D 液中，直至 pH 值為 7.3 ~ 7.4，即為 0.02 M 磷酸鹽緩衝溶液。

2.1.13.2. 3 % 過氧化氫溶液：

取 1 ml 之 30 % 過氧化氫加蒸餾水使成 10 ml，應保存於冰箱中。

2.1.13.3. 溶菌素溶液：

取 1 mg 溶菌素溶於 5 ml 之 0.02 M 磷酸鹽緩衝溶液，置冰箱凍結庫使用期限以不超過 3 星期為宜。

2.1.14. 革蘭氏染色液 (Gram's stain solution) (註四)：

2.1.14.1. 哈克氏 (Hucker's) 結晶紫液 (初染劑)：

溶液 A：取 2 g 結晶紫溶於 20 ml 之 95 % 乙醇中。

溶液 B：取 0.8 g 草酸銨溶於 80 ml 蒸餾水中。

將溶液A與溶液B混合，靜置 24 小時後過濾，取濾液作為初染劑。

2.1.14.2. 革蘭氏碘液（媒染劑）：

取 2 g 碘化鉀及 1 g 碘置於研鉢中，經研磨 5～10 秒鐘後，加 1 ml 蒸餾水研磨，次加 5 ml 蒸餾水研磨，再加 10 ml 蒸餾水，研磨至碘化鉀和碘完全溶於水中，將此溶液注入褐色瓶中，再以適量蒸餾水洗滌研鉢及杵後，以此洗液併入，使溶液達 300 ml。

2.1.14.3. 哈克氏（Hucker's）複染液（複染劑）：

取 2.5 g 沙黃溶於 100 ml 之 95 % 乙醇中，供作複染原液。使用時，取 10 ml 原液加 90 ml 蒸餾水，作為複染液。

2.2. 檢液之調製（註五）：

2.2.1. 固態檢體先適當切碎，混合均勻後，取 25 g 加入 225 ml 已滅菌之 10 % 氯化鈉胰化酪蛋白大豆肉羹中，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，但攪拌總時間不能超過 2 分鐘，即為 10 倍稀釋檢液。

2.2.2. 粉狀、粒狀或其他易於粉碎的檢體，可用已滅菌之藥勺或其他方便使用的用具加以粉碎，並混合均勻。取 25 g 加入 225 ml 已滅菌之 10 % 氯化鈉胰化酪蛋白大豆肉羹中，即為 10 倍稀釋檢液。

2.2.3. 液態檢體可用振搖的方式，使充分均勻混合後，取 25 ml 加入 225 ml 已滅菌之 10 % 氯化鈉胰化酪蛋白大豆肉羹中，即為 10 倍稀釋檢液。

2.2.4. 冷凍檢體若須解凍者，如冷凍魚（畜）肉、蔬果、水餃等，最好放在冷藏之溫度下解凍（如 2～5℃，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℃ 以下的水浴中，可於 15 分鐘內解凍者）。解凍時，應經常搖動檢體，以幫助檢體的解凍。俟檢體解凍後，再予以適當切碎並混合均勻。取 25 g 加入 225 ml 已滅菌之 10 % 氯化鈉胰化酪蛋白大豆肉羹中，用攪拌均質器攪拌（攪拌方法同 2.2.1. 節），即為 10 倍稀釋檢液。

不須解凍者，如食用冰塊、冰棒、冰淇淋等冰類製品，應速先行使成適當小塊。取 25 g 加入 225 ml 已滅菌之 10 % 氯化鈉胰化酪蛋白大豆肉羹中，用攪拌均質器攪拌（攪拌方法同 2.2.1. 節），即為 10 倍稀釋檢液。

2.2.5. 凝態及濃稠液態檢體，如布丁、煉乳等，經適當攪拌均勻後，取 25 g 加入 225 ml 已滅菌之 10 % 氯化鈉胰化酪蛋白大豆肉羹中，用攪拌均質器攪拌（攪拌方法同 2.2.1. 節），即為 10 倍稀釋檢液。

2.3. 鑑別試驗：

2.3.1. 增菌培養：

將 2.2. 節調製之稀釋檢液置於 35℃ 培養箱中，培養 24 ± 2 小時。

2.3.2. 分離培養：

由已增菌培養之 10 % 氯化鈉胰化酪蛋白大豆肉羹培養液中，取一白金耳量在葡萄狀球菌培養基 110 號之表面作劃線培養，於 35℃ 培養箱中培養 46 ± 2 小時，觀察所形成菌落之生長狀態（註六）。菌落若為圓形，直徑約 1～2 mm，表面平滑有光澤，並具乳脂狀或半透明狀且呈白色、黃色或橙黃色者；則為可疑之葡萄狀球菌。鈎取可疑菌落，接種於營養瓊脂斜面上，置於 35℃ 培養箱中，培養 18～22 小時。

2.3.3. 鏡檢：

自 2.3.2. 節之營養瓊脂斜面上鈎菌，作革蘭氏染色（註七）後鏡檢，其結果若為革蘭氏染色陽性，無芽胞之球菌，且直徑約 0.5～1.5 μm ，菌體呈單一、成對或不規則之簇狀排列者，則應進行生化試驗。

葡萄狀球菌之檢驗

2.3.4. 生化試驗：

2.3.4.1. 觸酶試驗 (Catalase test)：

自營養瓊脂斜面上釣菌，塗抹於載玻片上，加1~2滴3%過氧化氫溶液，觀察有無氣泡產生。若產生氣泡者，為正反應；不產生氣泡者，為負反應。葡萄狀球菌為正反應。

2.3.4.2. 溶菌素敏感性試驗 (Lysostaphin sensitivity test)：

自營養瓊脂斜面上釣菌，移植於含有0.2 ml之0.02 M 磷酸鹽緩衝溶液試管中，作成懸浮液 (試管A) (呈混濁狀態)。從試管A中取0.1 ml 懸浮液置入另一試管 (試管B) 中，然後取0.1 ml 溶菌素溶液加入試管A，作為試驗組；同時，另取0.1 ml 0.02 M 磷酸鹽緩衝溶液加入試管B，作為對照組。將試管A及試管B置於35℃培養箱中，培養2小時，培養期間隨時觀察。若混濁變成澄清者，為正反應；若仍維持原混濁狀態者，為負反應。葡萄狀球菌為正反應。

2.3.4.3. 厭氧下葡萄糖之利用 (Anaerobic utilization of glucose)：

自營養瓊脂斜面上釣菌，接種於酚紅碳水化合物肉羹中，再徐徐加入已滅菌之液態石蠟至高度約2.5 cm，使成厭氧狀態後，置於35℃培養箱中培養18~24小時。若培養液由紅色變成黃色者，為正反應；若培養液顏色不變成黃色者，為負反應。葡萄狀球菌通常為正反應 (註八)。

2.3.5. 判定：

葡萄狀球菌陽性者應符合下列試驗結果：

- (1)鏡檢為革蘭氏陽性、無芽胞之球菌，直徑約0.5~1.5 μm ，菌體呈單一、成對或不規則之簇狀排列者。
- (2)觸酶試驗、溶菌素敏感性試驗及厭氧下葡萄糖之利用，均為正反應者。

(註一)：若非市售已調配之培養基，需自行調配時氯化鈉可一次加100 g。

(註二)：自行調配時，應採用微生物級。

(註三)：若非市售已調配之培養基，需自行調配時葡萄糖可一起加至各成份中，再加蒸餾水。

(註四)：革蘭氏染色液因放久可能失效，因此若購買現成品時，其貯存期限應不得超過1年，但自行配製者經3~4個月後，應檢查其染色效果。

(註五)：處理含油脂量多，不易勻散及易起泡沫之檢體時，應加入適量之滅菌乳化劑 (如Triton X-100, Tergitol Anionic 7或1% Tween 80等)，並充分振搖，使之乳化。

(註六)：若有需要時，應再行純化。

(註七)：革蘭氏染色方法：

(1)製作薄抹片。

(2)初染：將已固定之抹片用哈克氏 (Hucker's) 結晶紫液染1分鐘後，水洗應不超過5秒鐘。

(3)媒染：加革蘭氏碘液作用1分鐘後，水洗。

(4)脫色：用95%乙醇洗至不再有紫色褪出時，再以自來水沖洗。此步驟需時甚短，僅數秒鐘即可，惟視抹片之厚薄而定。

(5)複染：用哈克氏 (Hucker's) 複染液複染30秒鐘，水洗。

(6)自然乾燥。

(7)鏡檢：呈現深紫色者為革蘭氏陽性菌，呈現淡紅色者為革蘭氏陰性菌。

(註八)：葡萄狀球菌大約有90%以上之菌株，能在厭氧下生長並發酵葡萄糖。

3. 參考文獻

1. Bacteriological Analytical Manual. 6th ed. (1979). FDA, U. S. Department of Health, Education, & Welfare.
2. M. L. Speck, Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. (1976). APHA Inc.
3. W. K. Joklik, H. P. Willet, and D. B. Amos, Zinsser Microbiology. 17th ed. (1980) Chapter 26 pp. 532-553.
4. B. D. Davis, R. Dullbeao, H. N. Eisen, and H. S. Ginsberg, Microbiology 3th ed. (1980). Chapter 29, pp. 624-633.
5. International Bulletin (1965) Vol. 15, No. 2, pp. 109-110. International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy.
6. K. H. Schleifer and W. E. Kloos, (1975). A Simple test System for the Separation of *Staphylococci* from *Micrococci*. J. of Clinical Microbio. 1: 337-338.