

標準檢驗局九十八年度輸歐盟漁產品 官方管制人員教育訓練

金黃色葡萄球菌、水中腸球菌、
沙門氏桿菌、大腸桿菌及李斯特菌
之ISO檢驗方法介紹

黃乃芸 博士

台北場：98年12月1日 高雄場：98年12月7日

暉凱國際檢驗科技股份有限公司

台北市信義區基隆路 2 段 189 號 9 樓之11

Tel: 02-5581-5988 Fax: 02-5581-5001

Email: foodsafety@fsii.com.tw

組織胺及微生物： 依歐盟法規編號No 2073/2005規定

食品種類	管制項目	取樣計畫 (1)		限量基準 (2) Mg/kg		參考檢驗 方法(3)	適用階段 Criterion stage
		n	c	m	M		
即食性產品， <i>Listeria monocytogenes</i> 嬰兒食品或療養膳食 ⁽⁴⁾	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	25公克不得檢出		EN/ISO 11290-1	上市後有效期間內
即食性產品，其製程支持 <i>Listeria monocytogenes</i> 生長，且非為嬰兒食品或療養膳食	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 CFU/g ⁽⁵⁾		EN/ISO 11290-2	上市後有效期間內
		5	0	25公克不得檢出		EN/ISO 11290-1	產品離開生產廠管控前
即食性產品，其製程無法支持 <i>Listeria monocytogenes</i> 生長，且非為嬰兒食品或療養膳食	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 CFU/g		EN/ISO 11290-2	上市後有效期間內
煮熟甲殼類	<i>Salmonella</i>	5	0	25公克不得檢出		EN/ISO 6579	上市後有效期間內

病原菌檢驗

1. 水中大腸桿菌、大腸桿菌群
2. 水中腸球菌
3. 金黃色葡萄球菌
4. 李斯特菌
5. 沙門氏桿菌

微生物檢驗四大步驟概念

1. 增菌培養
2. 分離培養
3. 生化試驗
4. 鑑定

增菌培養：

病原菌因冷凍、加熱而損壞或將近死亡，利用合適的培養液培養使菌株復活數量變多，讓後續分離的過程更順利。

分離培養：

接種病原菌於平板培養基，除助長目的菌之增殖外，尚能抑制雜菌之生長，然後在平版培養基行分離培養。觀察菌落之性狀、顏色、培養基之變化，檢查可疑菌落是否為典型陽性反應。

生化試驗：

利用化學試劑檢驗該微生物之代謝需求
（碳源、氮源）或產物，藉以判斷認定菌種，
例如

- IMVIC test
- 血清試驗
- 碳源試驗：乳糖、檸檬酸鹽等之利用
- 氮源試驗：氨基酸、硝酸鹽或尿素之利用

常見生化試驗(1)

- 革蘭氏染色 Gram stain
- 運動性試驗 motility test
- CAMP試驗 CAMP test
- 觸酶試驗 Catalase test
- 氧化酶試驗 Oxidase test
- 歐普氏試驗 VP test
- β -溶血試驗 β -hemolysis test
- 硝酸鹽還原反應 Reduction of nitrate

常見生化試驗(2)

- 離胺酸脫羧試驗 Lysine decarboxylase test
- 醣類利用試驗 Carbohydrate utilization test :
乳糖、蔗糖、鼠李糖、木糖、甘露糖醇、葡萄糖、
麥芽糖、粟糖苷
- 半乳糖醇利用試驗 Dulcitol utilization test
- 氰化鉀試驗 KCN test
- 丙二酸鹽試驗 Malonate test
- 吲哚試驗 Indole test
- 尿素酶試驗 Urease hydrolysis

常見生化試驗(3)

- 血清試驗
- 檸檬酸鹽利用試驗 Citrate utilization test
- 凝固酶試驗 Coagulase test
- 觸酶試驗 Catalase test
- 溶菌素敏感性試驗 Lysostaphin sensitivity test
- 厭氧下醣類之利用 Anaerobic utilization of carbohydrate : 葡萄糖、甘露醇
- 熱安定型核酸分解酶試驗 Thermostable nuclease test

生化試驗原理

觸酶試驗 Catalase test

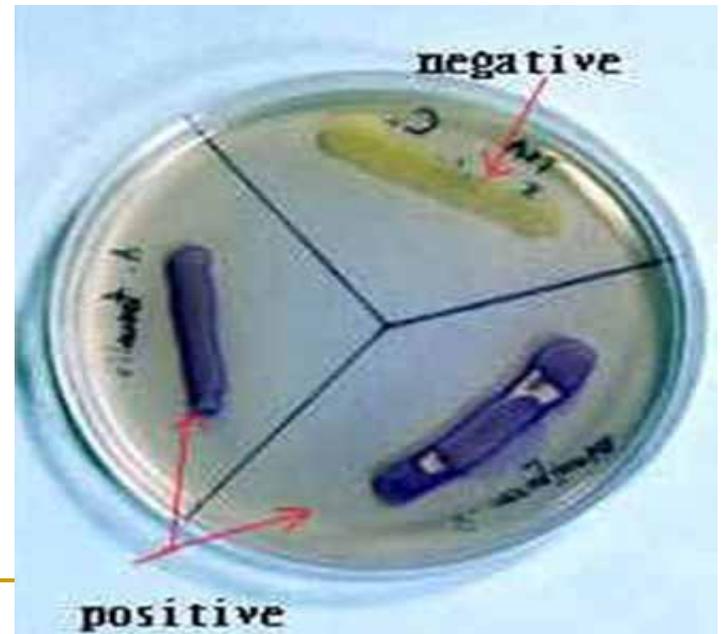
大多數的好氧及兼氣性細菌在利用氧氣時均會產生過氧化氫 (H_2O_2)。 H_2O_2 對生物之酵素系統有害，而此類生物得以生存乃因其會產生觸酶，可使 H_2O_2 分解成為氧氣 (O_2)。

觸酶存在多數細菌中，可分解 H_2O_2 放出 O_2 ，反應式如下：



氧化酶試驗 Oxidase test

- ★細胞內的氧化-細胞色素主要為呼吸鏈中之電子接受者，可將氫轉給氧原子而生出水。
- ★測定菌體有否生成氧化（oxidase能力），依此特性可與其他革蘭氏同性菌鑑別之。本測驗主要是利用 Tetramethylenediamine dihydrochloride 試劑代替氧原子做為電子接受者，在有氧化及氧氣存在下可將之變色，而作為測定該菌體中氧化之存在與否。



硝酸鹽還原反應 Reduction of nitrate

★硝酸鹽還原的生成能力為某些菌體的特性，此等菌體可將硝酸鹽還原：



★這些兼氣性菌體為利用 NO_3^- 的氧做為厭氧呼吸時，氫之最後接受者，而使 NO_3^- 變成 NO_2^- ；於培養基中可加入適量的sulfanilic acid，而後再加dimethylnathalamine測知，如培養基中有 NO_2^- 生成，在加入試劑後，會變成紅色；反之，則不變色。反應式如下：



→ sulfanilic acid + dimethylnaphthalamine

→ 紅色反應

硝酸鹽還原反應 Reduction of nitrat (2)

★加入5滴Solution A (Sulfanilic acid) ，滴 Solution B (a-naphthalamine) 後觀察液體是否有紅色產生。

★若無紅色產生則加入一些些鋅粉，觀察是否有紅色產生



左(1): uninoculated

左(2): positive(添加 solution A+B)有 NO_2^-

左(3): negative(加 solution A+B+Zn)

左(4): positive(加 solution A+B+Zn)有 N_2/NH_3

氰化鉀試驗 KCN test

由於 CN^- 會抑制cytochrome oxide，因而造成呼吸作用失效，對於耗氧菌而言， CN^- 是一種有毒物質。

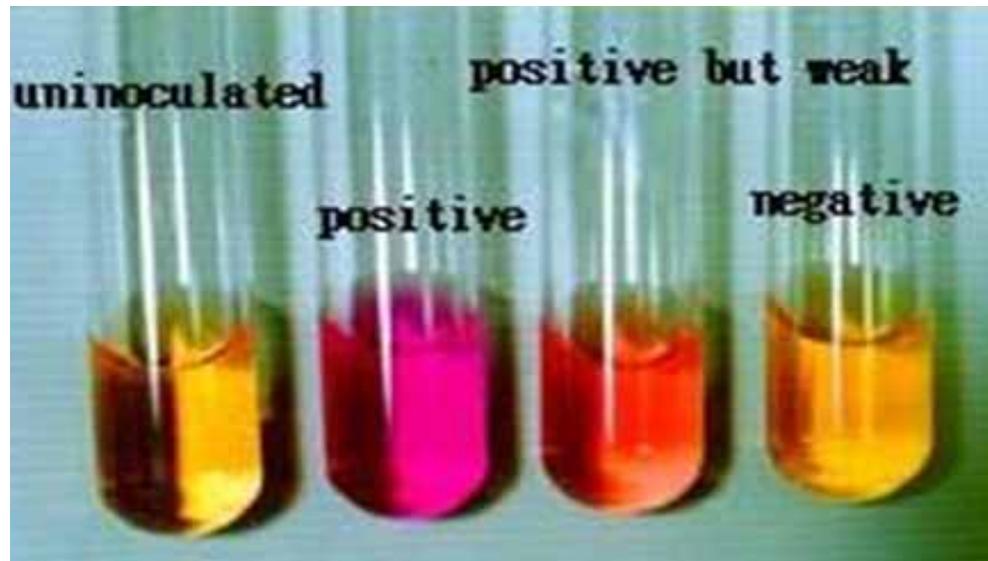
CN^- 對一些耗氧菌卻不起作用，因此這些菌便能在含 CN^- 中的培養基中生存。

尿素酶試驗 Urease hydrolysis

★尿素酶為有些菌體所釋出的胞外酵素，將培養基中所含的尿素酶分解成氨：

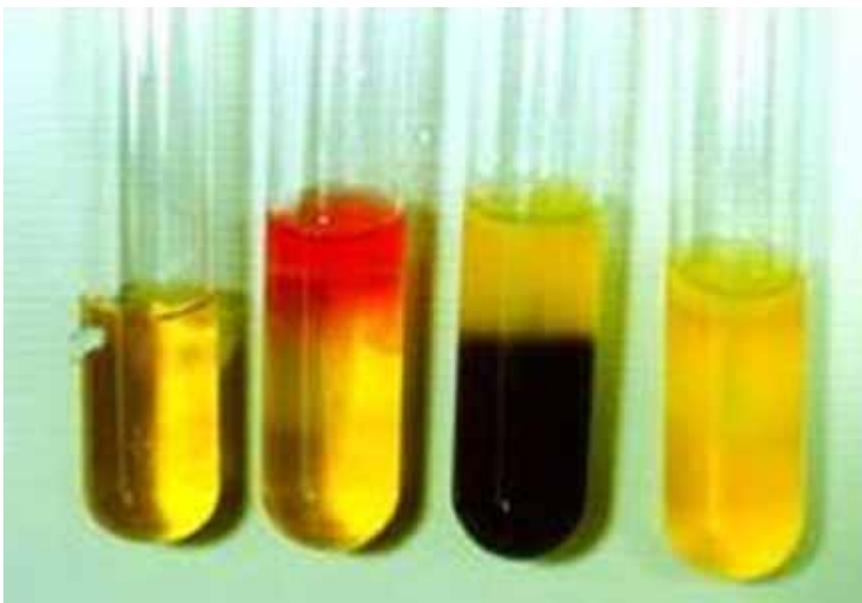


★當NH₃釋出後，會使培養基的pH升高，而酚紅指示劑會變成紅色（pH 8.1以上），如無生成尿素酶者，為負反應不變色，也就是維持黃色。



吲哚試驗 Indole test

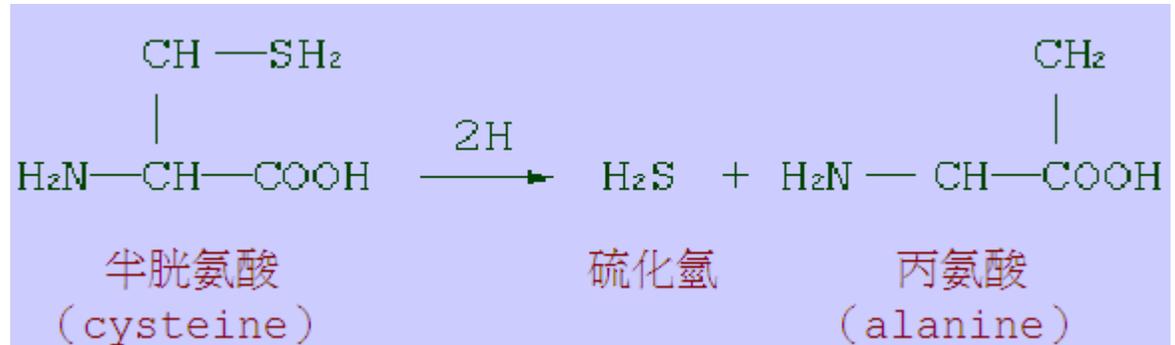
★ *E. coli* 具有可將色氨酸水解為及焦葡萄糖酸的能力，因為其具有色氨酸分解酶。當Indole遇到科瓦克（Kovac）試劑時即生成紅色，因此可以此方式測得。



左(1): uninoculated
左(2): positive
左(3): negative , H₂S
左(4): negative

硫化氫試驗 Hydrogen Sulfide test

- ★有些細菌在作用含硫的氨基酸後，尤其是半胱氨酸時，會產生硫化氫：



- ★產生的硫化氫若遇到重金屬（如鉍或鐵）則會生成硫化金屬的黑色沈澱，依此原理，則可鑑別是否產生硫化氫



- 左(1): uninoculated
左(2): positive with motility
左(3): negative with motility
左(4): negative, no motility

MR-VP test

當細菌利用葡萄糖產生酸性產物時若加入甲基紅指示劑則有紅色生成。如果產物為中性的acetoin(acetyl methyl-carbinol)時，加入KOH和a -naphthol時則呈粉紅色。

在醱酵的過程中可能產生不同的終產物，此乃與受質、微生物種類與培養狀況有關。有時有些菌利用glucose時會產生大的酸，但有些菌則會產生中性物質acetoin。因此為區分此種現象，使用MR-VP test來進行測試。

此種測試是利用含glucose的培養液培養，當菌產生大量的酸時便會使得加入的甲基紅仍維持紅色，若產生中性物質，甲基紅則由紅轉黃，產生acetoin可利用VP test來檢測，藉由加入potassium hydroxide和-naphthol來區別，若有acetoin存在，會使得培養液上層轉變成紅色，若無則是淡棕色。

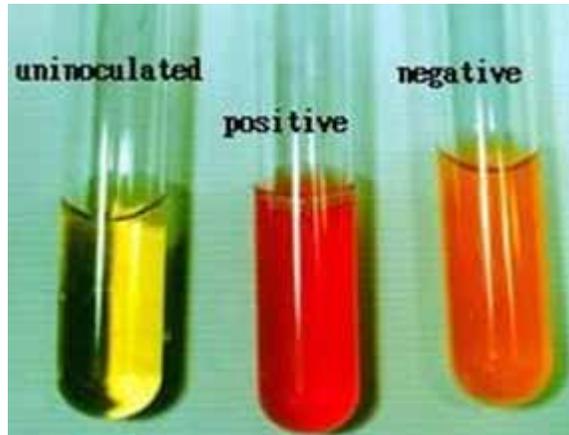
MR-VP test (2)

Methylred test

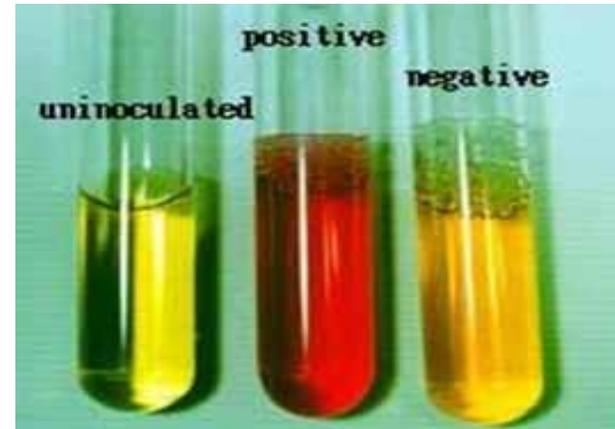


此種測試是利用含glucose的培養液培養，當菌產生大量的酸時便會使得加入的甲基紅仍維持紅色，若產生中性物質，甲基紅則由紅轉黃。

MR test



VP test



三糖鐵瓊脂試驗 Triple Sugar Iron agar test

用來區分Enterobacteriaceae不同的屬，且可用來區分Enterobacteriaceae和其他腸道菌，它們之間的不同主要是根據其醣類發酵和H₂S生成的模式來區分的。

為了加速觀察醣類使用的情形，TSI瓊脂斜面含1%的乳糖、蔗糖及0.1%葡萄糖。且培養基中含有酚紅酸鹼指示劑用來偵測醣類發酵時產酸與否，當產酸時培養基顏色由橘紅色變為黃色。



左(1): alkaline slant/alkaline butt , no
H₂S < no fermenter >

左(2): alkaline slant/acid butt , H₂S
< FeS黑色沉澱，利用Glc >

左(3): acid slant/acid butt , gas
< no H₂S , 利用Glc及Lac and/or Sur >

左(4): uninoculated

檸檬酸鹽利用試驗 Citrate utilization test

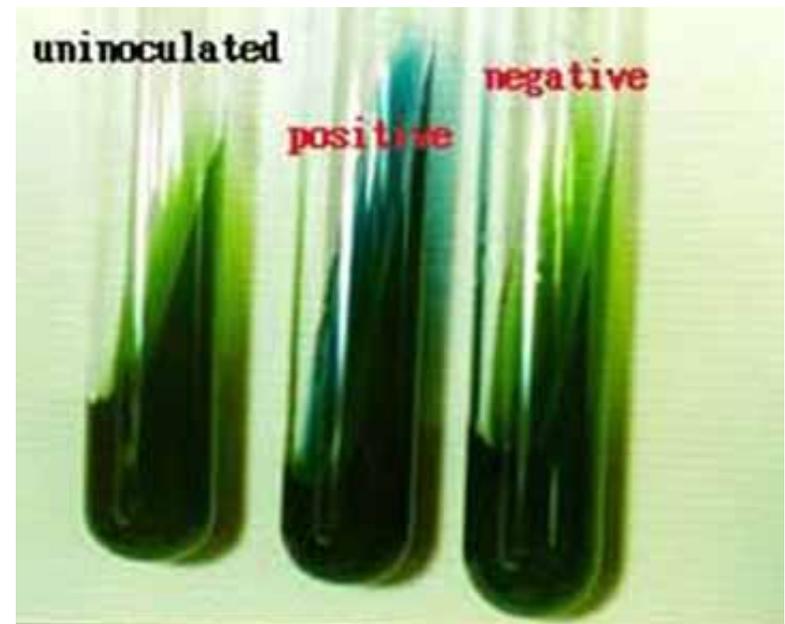
有些細菌，能利用檸檬酸鹽為其生長之碳源，結果使培養基之pH升高，指示劑變色。



陰性反應：表示無菌體生長



陽性反應



凝固酶試驗 Coagulase test

凝固酶具有可使血液凝結的作用，與prothrombin類似，將血纖維素轉變成血纖維而使得血液凝結成塊。

- ★原則上可生凝固的*Staphylococcus*可釋出apocoagulase，而與存在正常血漿中的致活劑結合形成一種凝結劑--凝固，由結塊的形狀可判定為陽性反應。
- ★試驗所用的血漿（兔子或人），為防止凝結可加入oxalate、檸檬酸或EDTA。試驗時使用血漿而血球可藉離心析出。
- ★菌體與0.5ml未稀釋之血漿37°C作用，在4及24小時後，觀察其反應。若為正反應，會在血漿中呈凝集反應。
- ★鑑別感染性及食物中毒的*Staphylococcus*為一公共衛生問題，而凝固試驗為最有效的單一試驗，其可於實驗室中快速驗定，藉以與其他菌種區分。

案例：IMViC test

大腸桿菌之生化試驗

I: Indole test

細胞色素氧化酶 Cytochrome Oxidase
Tryptophane(含pepton)，經培養後，有indole
代謝中間產物存在，遇到醌會呈紅色。

E.coli呈陽性反應(紅色)。

M: Methyl red test (測試pH值)

培養液中產生酸使 $\text{pH} < 4.5$ ，則呈紅色反應。

E.coli呈陽性反應(紅色)。

Vi: Voges-Prokauer reaction

此反應在測試葡萄糖經分解後是否產生 acetylmentyl carbinol 代謝產物，此代謝產物與培養液中之冗酸作用，會產生紅色化合物。

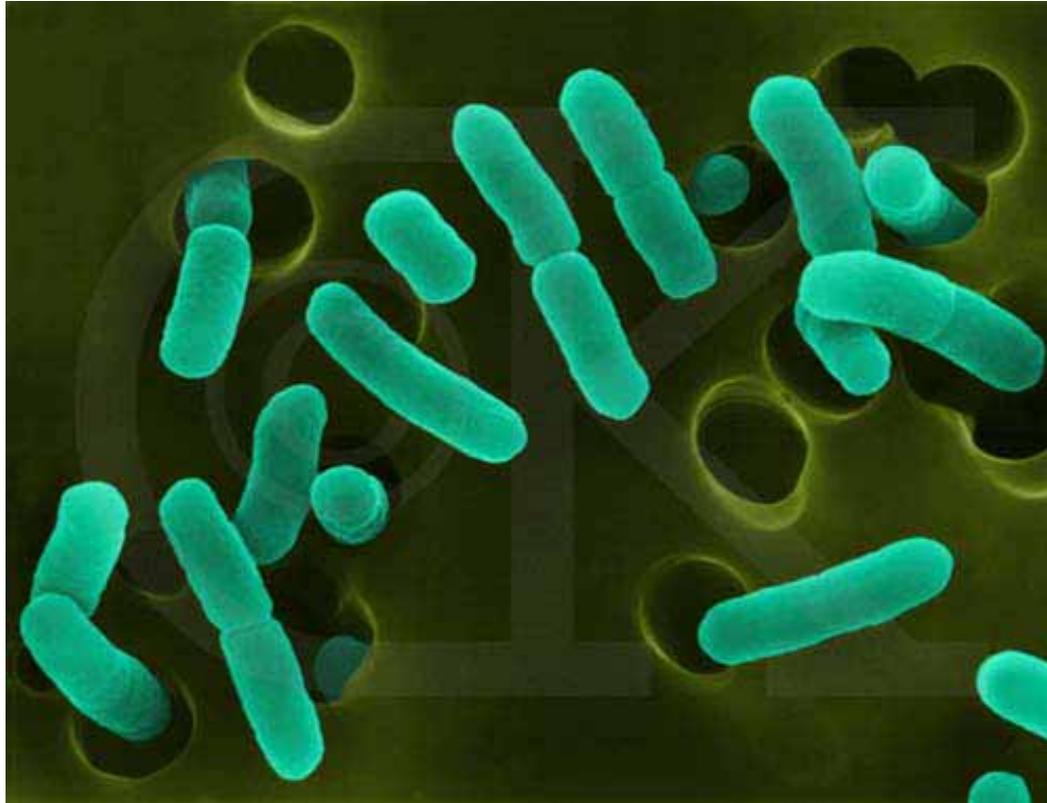
E.coli 呈陰性反應(不呈紅色)。

C: citrate test

測試是否可利用檸檬酸(Citrate)作為唯一碳源而生長。

E.coli 不可利用檸檬酸，培養液呈澄清。

Escherichia coli / coliform



水中大腸桿菌、大腸桿菌群檢驗分析方法

ISO 9308-1:2000(E)

標準法

水樣在進行檢測前必須劇烈搖晃使樣品充分混合均勻

↓

以無菌鑷子夾起無菌濾膜，放在無菌過濾裝置之有孔平板上，小心將漏斗固定。將過濾裝置接上抽氣幫浦

↓

過濾100 mL或更多的水樣體積

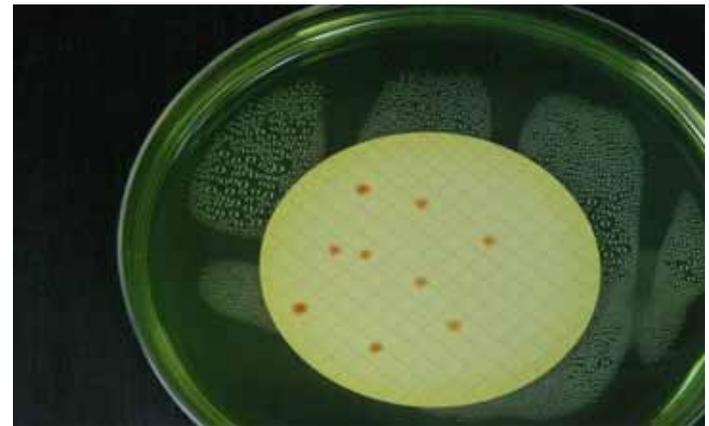
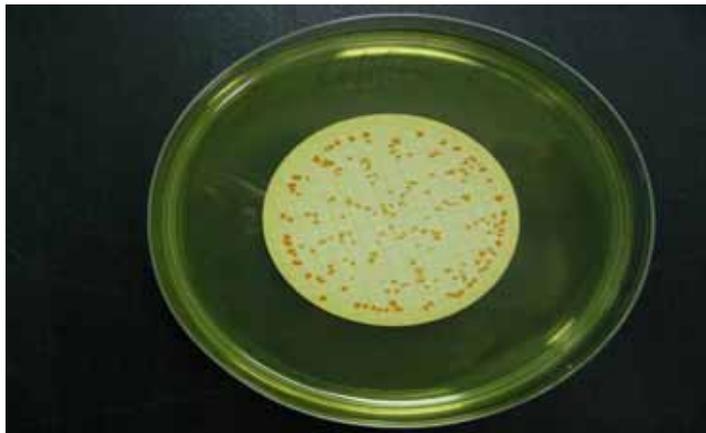
↓

解開真空裝置，將漏斗移開，儘速以無菌鑷子取出過濾後之濾膜置於Lactose TTC培養基上。濾膜應與培养基完全貼合，避免產生氣泡。培養皿置於 $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的恒溫培養箱中培養 21 ± 3 小時。

↓

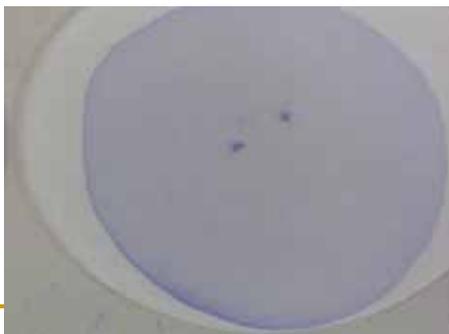
→ 若未長菌再培養 21 ± 3 hrs

若培養基變成黃色，再接著進行oxidase test和 indole test

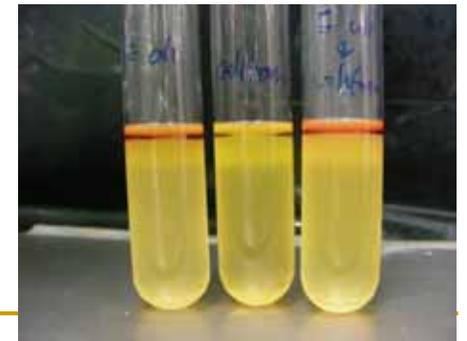


Coliform / *Escherichia coli*

Oxidase 試驗



Indole 試驗



Oxidase test

用接種環勾取TTC agar上的菌落於TSA培養 $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ 21 ± 2 小時，再用接種針勾取菌落於濾紙上，滴2~3滴的oxidase reagent，觀察30秒後，若呈現藍紫色即為陽性反應。

Indole test

用接種環勾取TTC agar上的菌落於tryptophan broth培養 $44\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 21 ± 3 小時後。在tryptophan broth加0.2~0.3ml的Kovacs' reagent，表面呈現櫻桃紅即為陽性反應。

試 驗	正 反 應 (+)	負 反 應 (-)	<i>Escherichia coli</i> 之反應	Coliform 之反應
Oxidase test	藍紫色	-	-	-
Indole test	表面呈現 櫻桃紅	-	+	+

■ 判定

- Count all colonies giving a negative oxidase reaction as **coliform bacteria**.
- Count all colonies giving a negative oxidase and a positive indole reaction as ***E. coli***.
- Coliform bacteria are Gram-negative non-sporeforming, oxidase-negative, rod-shaped bacteria which are capable of aerobic and facultatively anaerobic growth in the presence of bile-salts (or other surface-active agents with similar growth-inhibiting properties), and which are normally able to ferment lactose with the production of acid and aldehyde within 48 h when incubated at a temperature of (36 ± 2) °C. They also possess the enzyme -galactosidase.

快速法

水樣在進行檢測前必須劇烈搖晃使樣品充分混合均勻



以無菌鑷子夾起無菌濾膜，放在無菌過濾裝置之有孔平板上，小心將漏斗固定。將過濾裝置接上抽氣幫浦



過濾100 mL或更多的水樣體積



解開真空裝置，將漏斗移開，儘速以無菌鑷子取出過濾後之濾膜置於雙層培養基(TBA在下，TSA在上)培養 $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ for 4-5小時，接著培養 $44\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ for 19-20小時



將培養後的濾膜放在沾有indole reagent的濾紙上10-30 min



若有紅色菌落為陽性反應，*E coli*為陽性反應

ISO和NIEA 水中大腸桿菌群分析方法的比較

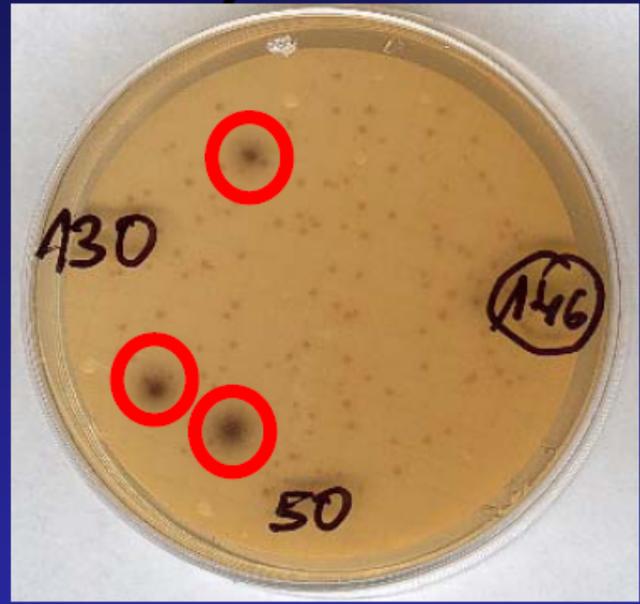
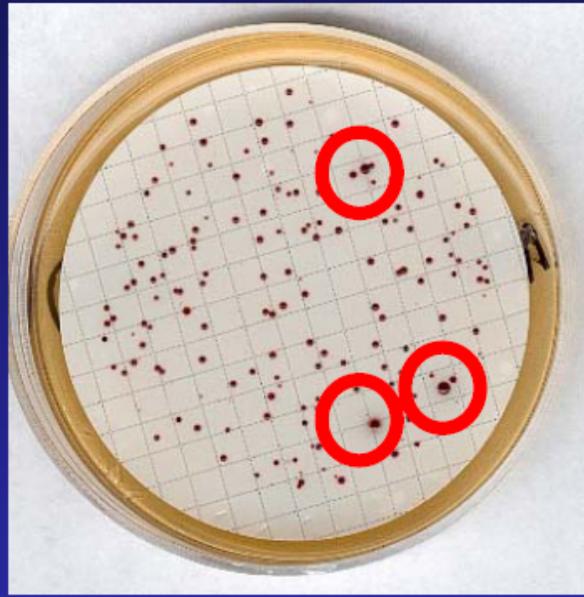
	ISO 9308-1:2000(E)	NIEA E202.53B
適用範圍	飲用水	地面水體、地下水體、廢水、污水及海域水質及水源水質
方法	濾膜法	濾膜法
取樣量	100 mL或更多的水樣體積	10 mL
培養基	Lactose TTC培養基	LES Endo agar 培養基
培養溫度/時間	36±2°C 21±3小時	35±1°C 24±2 小時
確認	oxidase test和 indole test	無

ISO和NIEA水中大腸桿菌分析方法的比較

	ISO 9308-1:2000(E)	NIEA E237.52B
適用範圍	飲用水	飲用水、飲用水水源、海水、地下水、放流水、廢（污）水及地面水
方法	濾膜法	酵素呈色濾膜法
取樣量	100 mL或更多的水樣體積	其他樣品 10 mL 飲用水 100 mL
培養基	Lactose TTC培養基	Chromocult [®] Coliform Agar
培養溫度/時間	36±2°C 21±3小時	35±1 °C 22至24小時
確認	oxidase test和 indole test	無

Intestinal enterococci

Membrane Filtration (ISO 7899-2)



水中腸球菌檢驗分析方法

ISO 7899-2:2000(E)

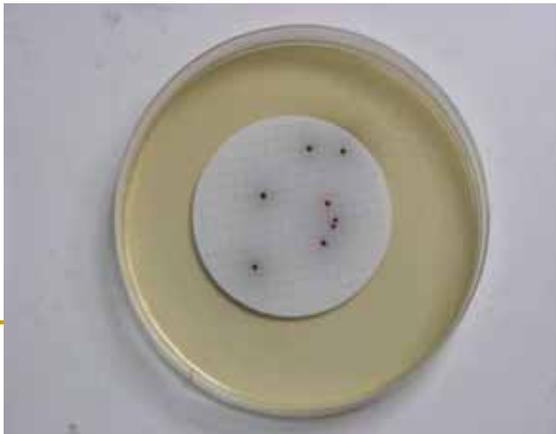
水樣在進行檢測前劇烈搖晃使樣品充分混合均勻

↓
以無菌鑷子夾起0.45 μm 無菌濾膜，放在無菌過濾裝置之有孔平板上小心將漏斗固定。將過濾裝置接上抽氣幫浦

↓
過濾100 mL或更多的水樣體積

↓
解開真空裝置，將漏斗移，儘速以無菌鑷子取出過濾後之濾膜置於Slanetz Bartley medium培養 $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ for 44 ± 4 時

↓
有出現紅色或粉紅菌落為陽性反應



↓

將濾膜用已滅過菌的鑷子夾起後，不移動濾膜的正反面，放至bile-aesculin-azide agar培養 $44\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ for 2hr

↓

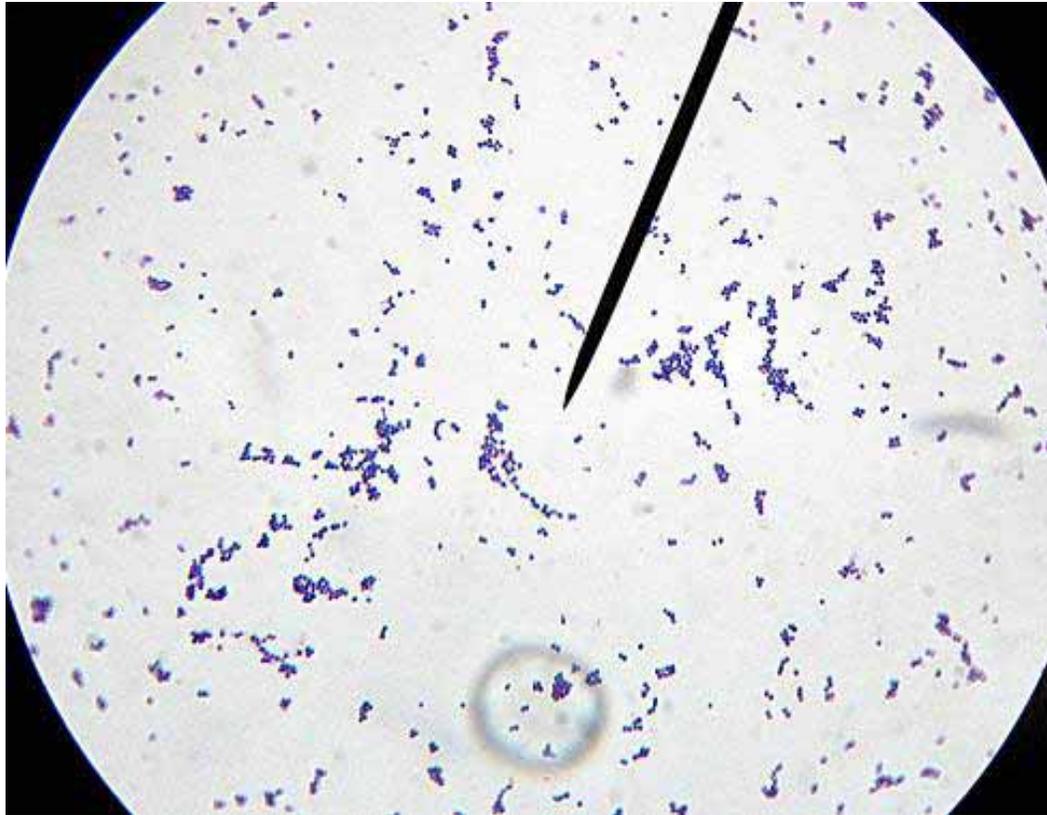
若有出現褐色、黑棕色、黑色在medium周圍為陽性反應



ISO和NIEA腸球菌分析方法的比較

	ISO 7899-2:2000(E)	NIEA E233.50C
適用範圍	飲用水、游泳池、其他被消毒的水和潔淨水(clean water)	地面水體、地下水體、飲用水水質(含自來水、簡易自來水、社區自設公共給水設備水、連續供水固定設備水及其他直接供人飲用之水等)、飲用水水源水質、娛樂用水、海水等水樣
方法	濾膜法	濾膜法
取樣量	100 mL或更多的水樣體積	其他樣品 10 mL 飲用水或水源水質 100 mL
培養基	Slanetz Bartley medium bile-aesculin-azide agar	m-E培養基 EIA培養基
培養溫度/時間	36±2°C for 44±4時 44±0.5°C for 2hr	41±1°C 48±3小時 41±1°C 20分鐘

Staphylococcus aureus



金黃色葡萄球菌檢驗分析方法

ISO 6888-1:1999(E)

50g檢體 + 450mL已滅菌的稀釋液(0.1% PW)(10倍稀釋液)

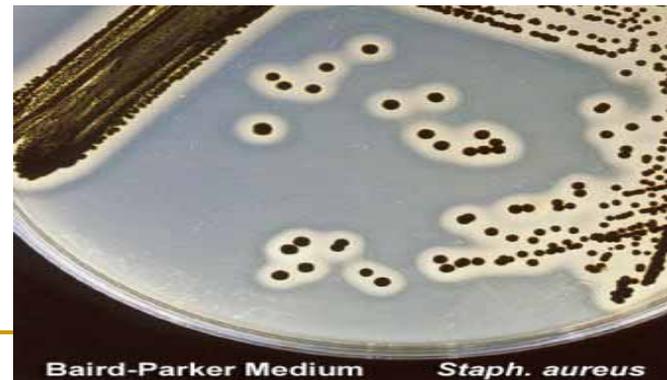
↓ 作一系列稀釋 10^2 、 10^3 倍的稀釋液
以滅菌吸管吸取0.1 ml注入Baird-Parker Medium中，以塗拌玻棒均勻塗抹於培養基表面上，

靜置乾後倒置於35 培養箱中培養 24 ± 2 小時

↓
勾取可疑菌落(為圓弧形，直徑1~1.5mm，表面平滑、呈灰黑色或黑色，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；非典型菌落特徵與典型菌落相同，但沒有透明環)

接種於BHIb置於35 培養箱中培養 24 ± 2 小時

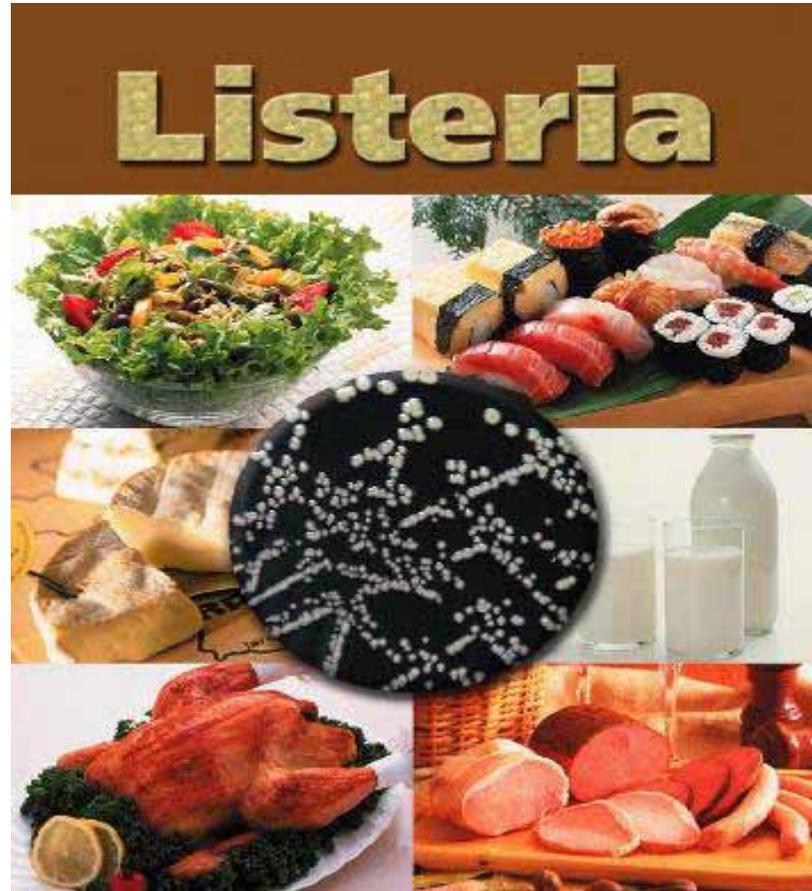
↓
凝固酶試驗



ISO和CNS金黃色葡萄球菌分析方法的比較

	ISO 6888-1:1999(E)	CNS 12542
取樣量	50g	50g
稀釋液	0.1% peptone	0.1% peptone
培養基	Baird-Parker Medium	Baird-Parker Medium
培養溫度/時間	35 °C 24±2小時	35 °C 45~48小時
確認	凝固酶試驗	凝固酶試驗、觸酶、溶菌素 敏感性、厭氧下葡萄糖利 用、厭氧下甘露醇之利用、 熱安定核酸分解酶試驗

Listeria monocytogenes



李斯特菌檢驗分析方法

ISO 11290-1:1996(E)

取Xg檢體至9X ml第一培養液(50%Fraser broth)，30°C 培養24±2小時

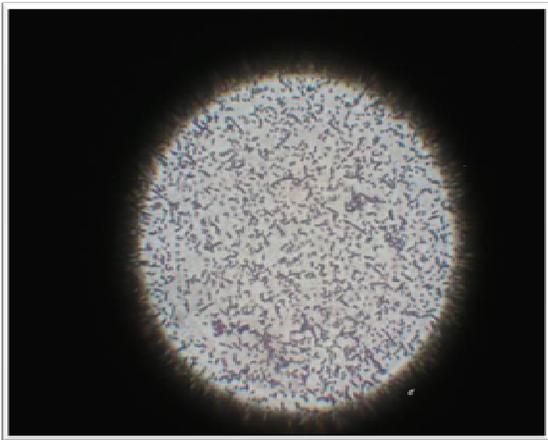
↓
取0.1mL第一培養液至10mL第二培養液(100%Fraser broth)，於35°C 或37°C 培養48±2小時

↓
取第一培養液和第二培養液劃線於Oxford agar與PALCAM agar 培養30°C 24小時後

→ 如沒有菌落，再培養18-24小時

↓
Oxford agar與PALCAM agar疑似黑環區之可疑菌落
進行生化鑑定

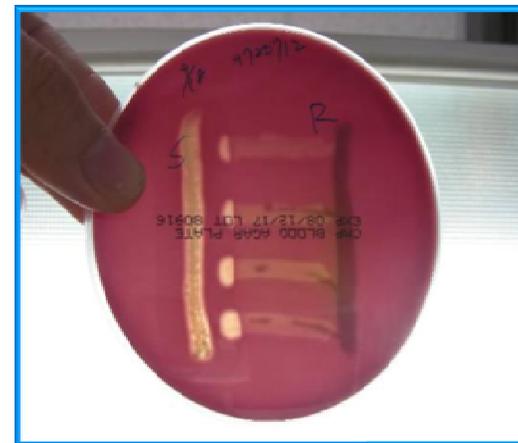
↓
觸媒試驗、革蘭氏染色、CAMP試驗、傘狀運動試驗、溶血反應、碳水化合物利用



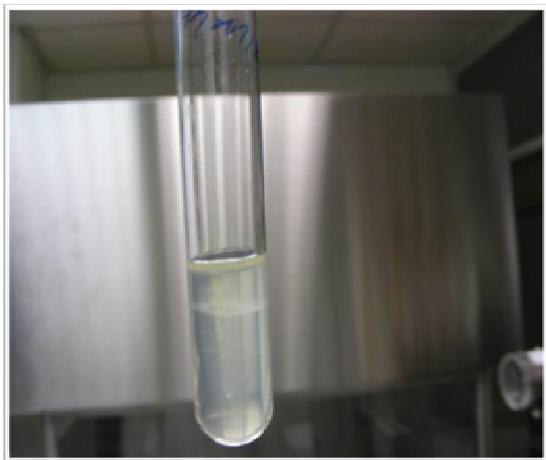
標準菌株之鏡檢



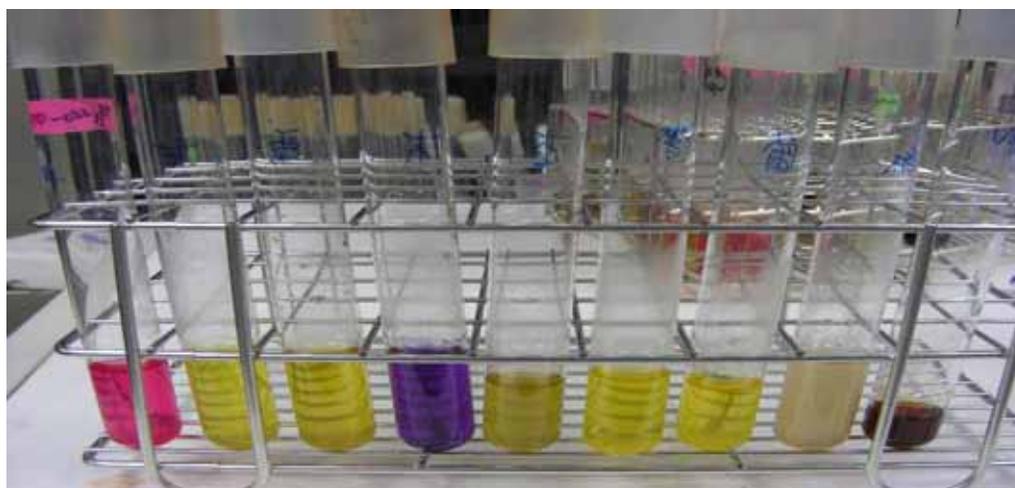
標準菌株之 β -溶血試驗



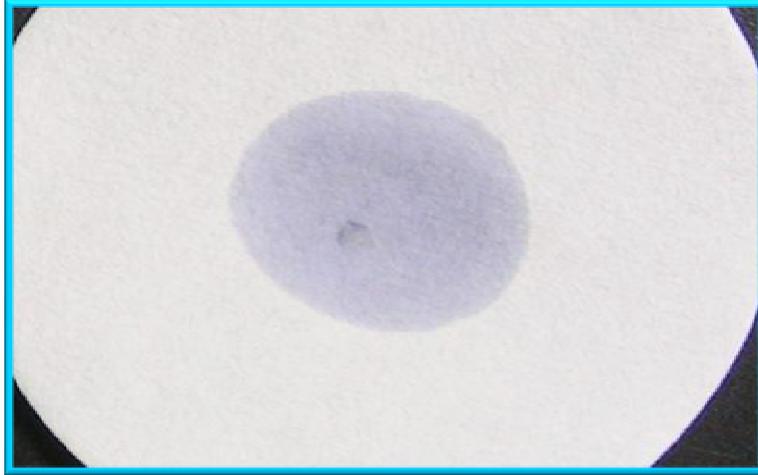
標準菌株之camp試驗



標準菌株之傘狀運動試驗



標準菌株之碳水化合物利用試驗



氧化酶試驗



觸酶試驗



傘狀運動試驗

ISO和CNS李斯特菌分析方法的比較

	ISO 11290-1:1996(E)	CNS 12982
取樣量	Xg	25g
增菌液	50% Fraser broth (取樣量的9倍)	UVM(第一度增菌培養液)
培養基	Oxford agar PALCAM agar	100% FB
		MOX
培養溫度/時間	30°C 24~48小時	35 °C 24~28小時
		35 °C 24~28小時
確認	傘狀運動試、CAMP試驗、觸媒試驗、Haemolysis test(溶血反應)、醣類利用試驗	傘狀運動試驗、CAMP試驗、觸媒試驗、氧化酶試驗、MR-VP試驗、醣類利用試驗

Salmonella



沙門氏桿菌檢驗分析方法

ISO 6579:1993(E)

取25g檢體，加入225ml buffered peptone water，於 35°C 或37°C 培養至少16小時，但少於20小時

取菌液0.1mL至10ml RV medium培養42°C，24小時

取菌液10ml至100ml selenite/cystine medium 培養35°C 或37°C，24小時，再繼續培養24小時

培養24小時RV medium
劃線 phenol red/brilliant green

培養24小時
selenite/cystine medium
劃線 phenol red/brilliant green agar

培養48小時
selenite/cystine medium
劃線 phenol red/brilliant green agar

phenol red/brilliant green agar培養35°C 或37°C，20-24小時。陽性反應其培養基由粉紅色變成紅色

如沒有菌落，再培養18-24小時

選取5個典型菌落劃線至NA plates，於35°C 或
37°C 培養18-24小時，進行生化鑑定



TSI agar(三糖鐵培養基試驗)、Urea agar(尿素酶試驗)、
L-lysine decarboxylation medium(離胺酸脫羧酶試驗)、
Detection of β -glactosidase、VP reaction、Indole reaction、
Serological test (血清試驗)

ISO和CNS沙門氏桿菌分析方法的比較

	ISO 6579:1993(E)	CNS 10952
取樣量	25g	25g
培養基	RV medium	RV、TT、SC
	selenite/cystine medium	
	phenol red/brilliant green	BS、HE、XLD
培養溫度/時間	42°C，24小時	42°C，24小時(RV) 35°C，24小時(TT、SC)
	35°C或37°C培，16小時	
	35°C或37°C，20-24小時	35°C，24小時
確認	TSI agar、Urea agar、L-lysine decarboxylation medium、Detection of β -galactosidase、VP reaction、Indole reaction、Serological test	TSI、Urea agar、L-lysine decarboxylation medium、酚紅甜醇培養液、氰化鉀培養液、丙二酸鹽培養液、吲哚試驗、MR-VP、酚紅乳糖及蔗糖培養液、辛蒙斯檸檬酸鹽培養基

**Thank you for
your attention**
