

# 臺灣堆肥中沙門氏桿菌 (*Salmonella*) 之檢驗

陳淑娟<sup>1</sup>、羅致逵<sup>1\*</sup>

## 摘要

陳淑娟、羅致逵。2017。臺灣堆肥中沙門氏桿菌 (*Salmonella*) 之檢驗。臺灣農藥科學 2：75-84。

沙門氏桿菌 (*Salmonella*) 所引起的食物中毒事件在臺灣排名第四。國外資料顯示禽畜糞堆肥產品可能有沙門氏桿菌污染。有報導認為污染的堆肥與食物中毒有關。因此有必要瞭解國內堆肥中沙門氏桿菌分布情形。檢驗方法依照美國環保署 1682 方法修改進行，檢驗確效顯示最低檢出量為 23 CFU/30g (3 CFU/4g)。自 2014 年至 2016 年間檢驗取樣自市售堆肥與農場自製堆肥共 212 件的堆肥產品，結果均為陰性，顯示由供試之國內堆肥尚未發現沙門氏桿菌之污染。

**關鍵詞：**沙門氏桿菌 (*Salmonella*)、木糖離胺酸去氧膽酸鹽培養基 (XLD)、大豆分解蛋白質乾酪酵素培養液 (TSB)、聚合酶連鎖反應 (PCR)

---

接受日期：2017 年 5 月 11 日

\* 通訊作者。Email: lcc@tactri.gov.tw

<sup>1</sup> 臺中市 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

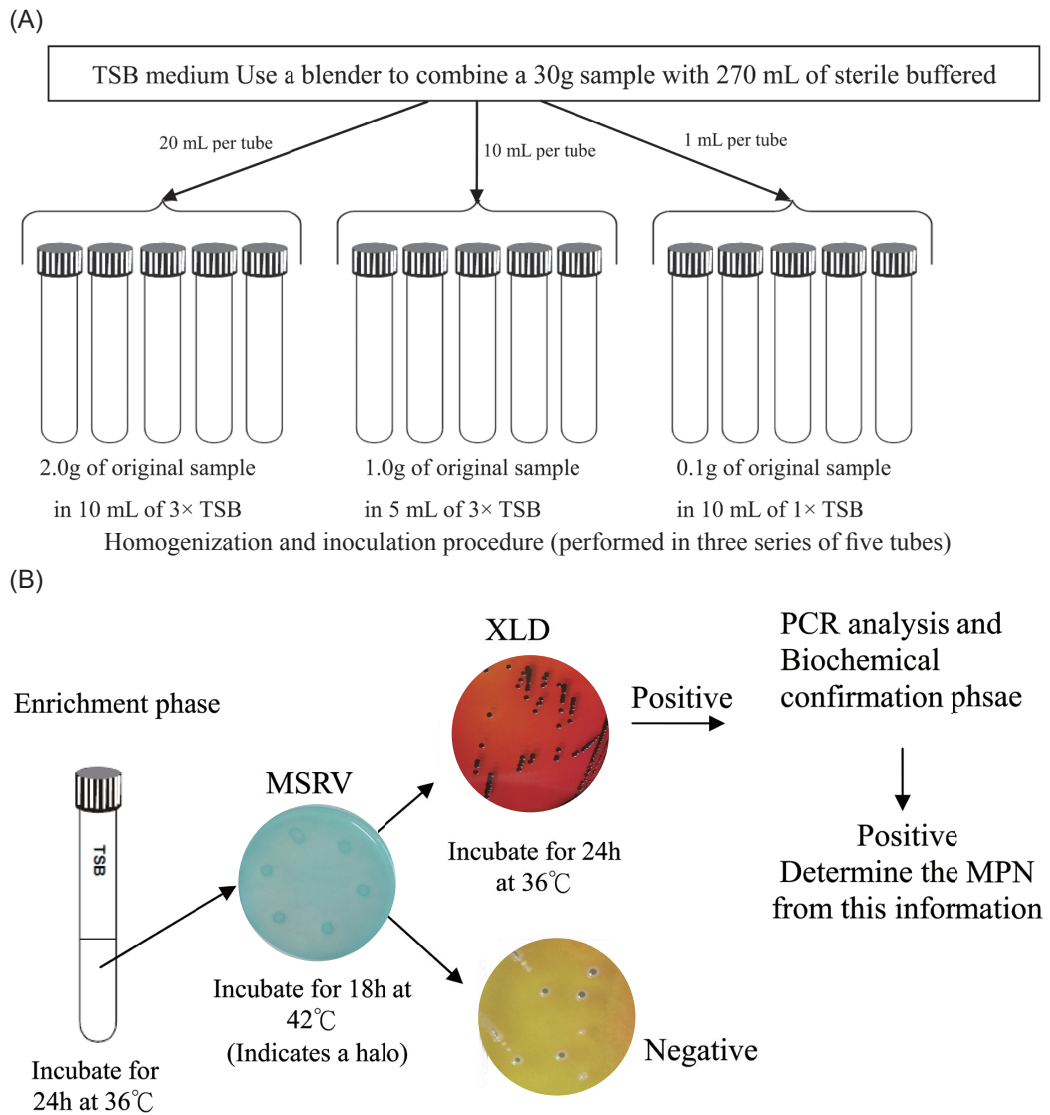
## 緒言

沙門氏桿菌 (*Salmonella*) 所引起的食物中毒事件，依衛生福利部食品藥物管理署 (Taiwan Food and Drug Administration, TFDA) 提供之資料顯示，在世界各地常居首位或第二位，在臺灣排名第四位<sup>(3)</sup>。人體誤食沙門氏桿菌後，在 4 ~ 48 h (平均約 24 h) 內就會發病，發病時間愈短，症狀愈嚴重。主要症狀為下痢、腹痛、寒顫、發燒 (高燒維持在 38 ~ 40°C)、噁心、嘔吐，症狀持續 2 ~ 3 d 後會痊癒，但有 5% 的人會成為帶菌者，死亡率在 1% 以下<sup>(4)</sup>。

在農業環境中，土壤、水及堆肥，均有病原菌生存之條件，因而可能導致食物污染。而禽畜糞堆肥產品中，可能因醱酵條件不完整，導致病菌殘存於蔬果中。因此美國環保署 (United States Environmental Protection Agency, USEPA) 對 A 級堆肥 (無使用限制, unrestricted application) 中食媒菌含量的限制，沙門氏桿菌需低於 3MPN/4g，或耐熱型大腸桿菌群 (Thermotolerant coliforms) 需低於 10<sup>3</sup>MPN/g<sup>(15)</sup>。歐盟 (European Union, EU) 亦要求在 50g 堆肥中沙門氏桿菌不得檢出 (0 MPN/50g)，產氣莢膜桿菌 (*Clostridium perfringens*) 則為 1g 堆肥中不得檢出<sup>(9)</sup>。堆肥在正常生產過程中，大部分病菌會因腐熟發酵的高熱而消滅，但仍有可能因熟成不完全或遭受二次污染，造成病原菌在堆肥中殘留。例如美國在 1996 年調查 72 件堆肥商品中，就發現有半數含有

沙門氏菌<sup>(10)</sup>，在 2008 年調查 108 件商品堆肥，有 7 件 (6.7%) 沙門氏菌量超出限值 (> 3 MPN/4 g)<sup>(15)</sup>，在 2009 年調查的 94 件商品堆肥中，有 1 件含沙門氏菌<sup>(7)</sup>。

本研究於 2014 年參與行政院跨部會食媒性病原菌檢驗計畫 (市售有機堆肥中食媒性病原菌之調查研究)，調查臺灣堆肥產品中是否有沙門氏桿菌污染。沙門氏桿菌之檢驗方法有多種，例如美國環保署 (United States Environmental Protection Agency, USEPA) 與美國農部 (United States Department of Agriculture, USDA) 方法 1682<sup>(15)</sup> 及美國食藥署 (US Food and Drug Administration, USFDA)<sup>(6)</sup> 與臺灣食藥署之培養法<sup>(5)</sup>，這些方法基本原理都相同，也都是先經增量培養、分離、純化後，再進行生化特性或分生比對，在操作時間上都相近，但是成本不同，例如臺灣食藥署的方法使用了 8 種培養基，美國環保署的方法，使用了 6 種培養基。美國環保署堆肥中沙門氏桿菌檢驗方法及臺灣食藥署食品中沙門氏桿菌檢驗法，均列有多價抗體抗血清試驗 (*Salmonella* O polyvalent A-I, Microgen Bioproducts Ltd, UK) 之免疫反應檢驗，但因購買不易，因此臺灣食藥署及美國農部也均未執行該項檢驗，其後兼採臺灣食藥署針對特定基因片段 (116 bp) 之聚合酶連鎖反應 (PCR) 方法協助確認<sup>(5)</sup>。本研究依照美國環保署 1682 方法修改成實際檢驗的方法，其流程如圖一所示。



圖一、沙門氏桿菌檢驗法<sup>(16)</sup>。(A) 接種方式；(B) 檢驗流程。

**Fig. 1.** Analytical method used to detect *Salmonella* contamination in compost. Sample homogenization and inoculation procedure (A), and MSRV procedure (B)<sup>(16)</sup>.

## 材料與方法

### 一、堆肥樣品來源與取樣

2014 ~ 2016 年間，搜集農糧署網站公布為國產有機質肥料<sup>(1)</sup>之市售堆肥，包裝有 5、20 或 25 kg 袋裝，品項有禽畜糞堆肥 (品目編號 5-09)，一般堆肥 (品目編號 5-10)，雜項堆肥 (品目編號 5-11) 和農場自製堆肥等共 212 件。

取樣以鏟子採取堆肥袋內深度 15 ~ 20 cm 之堆肥 200 g，將其分成 5 堆 (40 g/堆)，再自 5 堆各取 6.0 g，混合成 30.0 g 之分析樣品，共 3 重複。

### 二、前置分析

(一) 放大培養：上述取樣之 30.0 g 樣品，加入含有 270 mL 無菌緩衝稀釋液 (buffered dilution water) 之混合瓶 (500 mL 三角錐形瓶)，以鐵胃機 (ECO Blender II, VWR, USA) 均質 2 min，備為已均質之 10 倍稀釋檢液樣品，取 10 倍稀釋檢液 20 mL 接種於已裝有 10 mL 之 3 倍大豆分解蛋白質乾酪醇素培養液 (Tryptic soy broth, TSB, BD, USA) 培養液試管中，共 5 重複。另自 10 倍稀釋檢液中取 10 mL 接種於已裝有 5 mL 之 3 倍 TSB 培養液試管中，共 5 重複。再另自 10 倍稀釋檢液中取 1 mL 接種於已裝有 10 mL 之 1 倍 TSB 培養液試管中，共 5 重複。

(二) 選擇性培養基篩選試驗：上述 (一) 完成接種之培養液，培養於 36°C，24 h，

產生懸濁的試管，記錄為陽性反應。自每管 TSB 培養液試管中，取 30  $\mu$ L 滴在改良式半固態 RV 平板培養基 (modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis, MSRV, OXOID, England) 上，室溫下靜置約 1 h，移入 42°C 培養 18 h，共 6 重複。若出現直徑大於 20mm 灰白色半透明生長圈，即判為疑似陽性；若培養累計 24 h 後，其菌落直徑小於 20mm 之處理，則繼續培養至 48 h，若其菌落直徑仍然小於 20mm，即判定為陰性。以白金耳自疑似陽性之菌落邊緣，沾菌劃線到木糖離胺酸去氧膽酸鹽培養基 (Xylose lysine desoxycholate agar, XLD, NEOGEN, USA) 上，移入 36°C 培養 24 h，觀察所形成菌落，呈粉紅色有黑色中心者，即為陽性。符合 MSRV 及 XLD 測試皆為陽性者，進行下階段生化鑑別或 PCR 鑑定。於最終 PCR 反應確定為陽性者，則本項試驗之結果，可利用最確數表，推算出沙門氏桿菌之最確數 (MPN)<sup>(15)</sup>。

### 三、確效分析

取  $OD_{600} = 0.3$  之菌液 (預估菌量為  $1.0 \times 10^8$  CFU/mL)，經序列稀釋  $10^{-1}$  至  $10^{-7}$  後，擇取  $10^{-5}$  稀釋平板之菌落數，換算得沙門氏桿菌量為  $2.3 \times 10^3$  CFU/mL。將  $10^{-5}$  至  $10^{-7}$  稀釋之菌液 ( $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$  CFU 沙門氏桿菌/mL) 分別加入已滅菌之堆肥中，放入鐵胃袋中，加入 270 mL 稀釋緩衝液，以鐵胃機均質 2 min。再以生化鑑別及 PCR 鑑定進行確效分析。

## (一) 生化鑑別試驗

自 XLD 培養基上挑取沙門氏桿菌之典型菌落 (粉紅至紅色菌落具黑色中心)，每一菌落同時進行斜面劃線及穿刺接種於三糖鐵培養基 (Triple sugar iron agar, TSI, BD, USA) 與離胺酸鐵培養基 (Lysine iron agar, LIA, BD, USA) 斜面培養基及尿素培養液 (Urea broth, BD, USA)。將已接種菌之 TSI 及 LIA 斜面培養基於 36°C 培養 24 h。TSI 培養基底部出現黑色，判為沙門氏桿菌陽性反應。LIA 培養基底部黑色，亦判為沙門氏桿菌陽性反應。尿素培養液橘紅色，判為沙門氏桿菌陰性反應。

## (二) PCR 分析

陽性菌落則以 TSB 培養液進行 36°C 培養 24 h 後，取 1mL 菌液，以試劑組 (Tissue & cell genomic DNA purification kit, GeneMark, Taiwan) 萃取染色體 DNA。合成沙門氏桿菌標的基因 (*invA*, 116 bp) 之專一性引子對 (invasion (*invA*), *invA*-F (5'-CAAC-GTTTCCTGCGGTACTGT-3')/*invA*-R (5'-CCCGAACGTGGCGATAATT -3'), 116 bp)。PCR 反應液包含：10 mM Tris-HCl (pH 8.3)，50 mM KCl，1.5 mM MgCl<sub>2</sub>，0.2 mM dNTP，0.25 mM 混合引子對，2.5 U Taq 聚合酶，10 ng 模板 DNA，共 25 μL。PCR 反應條件為 95°C，3 min。94°C，30 s；58°C，30 s；72°C，30 s，35 個循環。再 72°C，5 min。PCR 產物以 1.5% 瓊脂膠於 100 v 電壓下，進行 30 min 電泳分離。

## 結果

### 一、確效分析

添加不同菌量之沙門氏菌於滅菌之堆肥中，經生化鑑別 (表一) 及 PCR 鑑定 (圖二)，結果顯示最低檢出量為 23 CFU/30 g (約 3 CFU/4g)。美國 A 級堆肥沙門氏桿菌量標準需小於 3 MPN/4 g，因此以生化鑑別及 PCR 鑑定檢驗堆肥之確效與美國 1682 的 MPN 方法相當。

### 二、市售與自製堆肥檢驗

2014 年至 2016 年間，取樣自市售禽畜糞堆肥 (品目編號 5-09)、一般堆肥 (品目編號 5-10)、雜項堆肥 (品目編號 5-11) 及農場自製堆肥，共 212 件，均未檢出沙門氏桿

表一、堆肥中沙門氏桿菌 (*Salmonella*) 生化鑑別及 PCR 鑑定確效分析結果

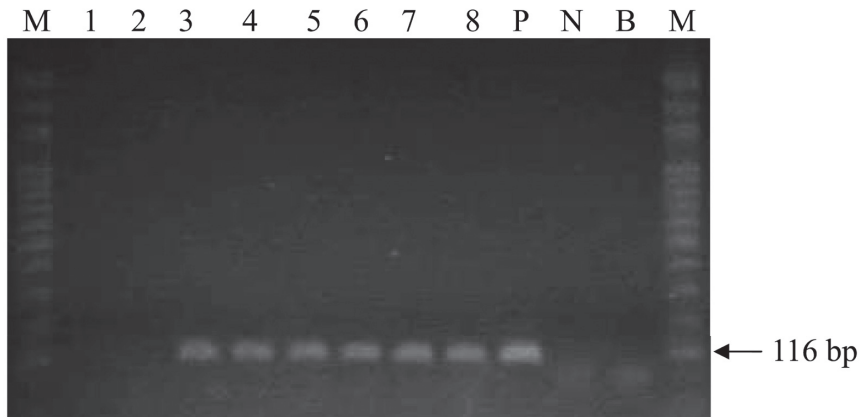
**Table 1.** Performance test results confirming the ability of biochemical and PCR methods to detect *Salmonella* in compost

CFU/30 g	Culture method <sup>1)</sup>	PCR method <sup>2)</sup>
2300	+	+
230	+	+
23	+	+
Blank	-	-

<sup>1)</sup>: method was modified from USEPA 1682<sup>(16)</sup>.

<sup>2)</sup>: method was modified from TFDA, "Methods of Test for Food Microorganisms -- Test of *Salmonella*"<sup>(5)</sup>.

+: detected; -: not detected.



圖二、每 30g 堆肥中含不同菌落之沙門氏桿菌 PCR 鑑定結果，確認 116 bp 條帶出現。

**Fig. 2.** Use PCR to detect *Salmonella* DNA (116 bp). For this, DNA samples were extracted from spiked composts.

行 1 ~ 2 : 無添加對照組 ; 行 3 ~ 4 : 23 CFU/30g ; 行 5 ~ 6 : 230 CFU/30g ; 行 7 ~ 8 : 2300 CFU/30g ; P : 腸炎沙門氏菌 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (BCRC10744) 對照組 ; N : 出血性大腸桿菌 O157 : H7 (BCRC 15377) 對照組 ; B : 空白。M : 100bp Ladder 標誌 (PROTech, 1/4)。

Lanes 1 and 2: control (i.e. compost with no *salmonella*); lanes 3 and 4: 23 CFU *salmonella* added; lanes 5 and 6: 230 CFU *salmonella* added; lanes 7 and 8: 2300 CFU *salmonella* added; P: Positive, DNA from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (BCRC 10744); N: Negative, DNA from Enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7; B: blank; M: marker (Bio-100 DNA Ladder). Electrophores was performed on 1.5 % agarose gel.

菌 (表二)，顯示試驗期間不同來源之國內堆肥，尚無發現沙門氏桿菌之污染。

## 討論

2014 年至 2016 年間，取樣自市售堆肥及農場自製堆肥，共 212 件，均未檢出沙門氏桿菌，顯示試驗期間不同來源之國內堆肥，尚無發現沙門氏桿菌之污染。在法國曾對禽畜糞製成的堆肥進行食媒菌調查，顯示經堆肥作業後 12 星期，沙門氏桿菌仍可存活<sup>(13)</sup>。瑞典在 2002 年檢驗堆肥生產工廠，發現堆肥中含有糞生大腸桿菌與大腸桿菌，

含量為  $10^1 \sim 10^5$  CFU/g<sup>(8)</sup>。在 4 個堆肥工廠中原料均含沙門氏桿菌，成品中僅 1 家工廠所抽檢的 5 件中有 2 件為陽性<sup>(8)</sup>。美國在 1996 年調查指出 72 件堆肥商品中，有半數含有沙門氏菌。雖然工廠堆肥製做過程的溫度及發酵時間均符合操作規範 (55°C，3 d，通氣靜態堆積法 (Aerated static piles)；或 55°C，15 d，堆積法 (Windrow systems)<sup>(10)</sup>。在 2008 年調查 108 件商品堆肥，其中有 7 件 (6.7%) 沙門氏菌量超出限值 (每 4 g 堆肥中之沙門氏菌量少於 3 MPN 單位)<sup>(11)</sup>。在 2009 年又調查 94 件商品堆肥，其中有 1 件含沙門氏菌，有 28% 的堆肥大腸桿菌群超

表二、2014~2016年市售堆肥與農場自製堆肥，共212件堆肥中沙門氏桿菌之結果

Table 2. Results of *Salmonella* in 212 composts samples collected from markets and from between 2014 and 2016

Sampling year	Sample number	Positive ratio (%)
2014	100	0 (0/100)
2015	70	0 (0/70)
2016	42	0 (0/42)
Total (3 years)	212	0 (0/212)

出限值，6%的堆肥含有出血性大腸桿菌，糞生鏈球菌群 (Fecal streptococci) 檢出率為100%，產氣莢膜桿菌 (*Clostridium perfringens*) 檢出率為70%。在47件商品中李斯特菌也有22件檢出<sup>(7)</sup>。希臘在2006年調查了28件市售堆肥，發現所有堆肥商品均不含沙門氏桿菌，但金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 檢出率為17%，且菌量都在 $10^5$  CFU/g以上<sup>(12)</sup>。綜合以上資料顯示國產堆肥品質較國外安全，推測其可能原因為國內堆肥製造工廠規模不大，生產量不大，且各堆肥工廠生產作業均有各改良試驗場所及大學進行產業輔導。堆肥製造溫度在正常情形下，皆可在數日內升高達攝氏60至70°C以上，並維持一段時間<sup>(4)</sup>，可殺滅病原菌。但如堆製失敗，高溫未達預期溫度，則可能仍有病原菌殘留。而堆肥的原料如來自禽畜糞，含有大量病原菌<sup>(14)</sup>，有可能因熟成不完全或二次污染，造成病原菌在堆肥中殘留，並經由蔬果等作物進入人體。目前國外許多國家針對堆肥中病原菌含量進行規範與分級，因此臺灣可考慮建立堆肥中病原菌的殘留標準，以協助源頭管理。

本方法可適用於檢驗農場中土壤、蔬果、堆肥及水域中病原菌。在XLD陽性反應之菌落，建議利用MALDI-TOF質譜分析 (Bruker Daltonics, BioTyper software) 來取代PCR分析或生化法確認是否為沙門氏桿菌。本研究室曾以水中樣品呈現XLD陽性之菌落進行質譜分析，SV值為2.051 (SV值>2.0為菌種確認)，結果與PCR分析或生化法一致，均確認為沙門氏桿菌。因此利用MALDI-TOF質譜分析可較PCR分析或生化法縮短確認時程，可更快速掌握田間生產資材及生產之生鮮蔬果品質之安全性。相關技術可移轉或協助農民或業者進行產品之安全性檢測。

## 謝辭

本報告由行政院農業委員會計畫補助 (103農科-10.4.1-藥-P1, 104農科-10.13.2-藥-P1, 105農科-10.11.2-藥-P1)。本報告使用之MALDI-TOF質譜儀承蒙疾管署食安中心主任邱乾順博士及其團隊王佑文、廖盈淑小姐等支援分析，謹此誌謝。

## 引用文獻

1. 行政院農業委員會農糧署。2017。公告 106 年國產有機質肥料品牌推薦名單。取自 [http://www.afa.gov.tw/peasant\\_index.aspx?CatID=1539](http://www.afa.gov.tw/peasant_index.aspx?CatID=1539)
2. 林財旺。1999。禽畜糞堆肥之製造。堆肥製造技術，第 107-142 頁。陳武雄、林俊義、簡宣裕、林木連、鄭智馨、張明暉 編，行政院農業委員會農業試驗所、中華永續農業協會。臺中。
3. 衛生福利部食品藥物管理署。2009。歷年食品中毒資料。取自 <http://www.fda.gov.tw/TC/siteContent.aspx?sid=323>
4. 衛生福利部食品藥物管理署。2010。沙門氏桿菌 (*Salmonella*)。取自 <http://www.fda.gov.tw/TC/siteContent.aspx?sid=1942#.WNneW2UVG1s>
5. 衛生福利部食品藥物管理署。2013。食品微生物之檢驗方法——沙門氏桿菌之檢驗。部授食字第 1021951187 號公告修正。
6. Andrews, W. H., Wang, H., Jacobson A., and Hammack, T. S. 2007. *Salmonella*, pp 21. In: Food and Drug Administration [ed.], Bacteriological analytical manual (BAM). Food and Drug Administration, Silver Spring, MD, USA.
7. Brinton, W. F., Jr., Storms, P., and Blewett, T. C. 2009. Occurrence and levels of fecal indicators and pathogenic bacteria in market-ready recycled organic matter composts. *J. Food Prot.* 72: 332-339.
8. Christensen, K. K., Carlsbaek, M., and Kron, E. 2002. Strategies for evaluating the sanitary quality of composting. *J. Appl. Microbiol.* 92: 1143-1158.
9. European Commission. 2001. Working document: biological treatment of biowaste, 2nd draft. DG ENV.A.2/LM/biowaste/2nd draft
10. Hay, J. C. 1996. Pathogen destruction and biosolids composting. *Biocycle* 37: 67-76.
11. Ingram, D., Millner, P., and Patel, J. 2008, August. Prevalence of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* and *Salmonella* in commercially available compost. Abstr. International Association of Food Protection Annual Meeting, Columbus, Ohio. 4-41 pp.
12. Lasaridi, K., Protopapa, I., Kotsou, M., Pilidis, G., Manios, T., and Kyriacou, A. 2006. Quality assessment of composts in the Greek market: the need for standards and quality assurance. *J. Environ. Manage.* 80: 58-65.
13. Lemunier, M., Francou, C., Rousseaux, S., Houot, S., Dantigny, P., Piveteau, P., and Guzzo, J. 2005. Long-term survival of pathogenic and sanitation indicator bacteria in experimental biowaste composts. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 5779-5786.
14. Smith, J. E., Jr., and Perdek, J. M. 2004. Assessment and management of watershed

- microbial contaminants. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 34: 109-139.
15. United States Environmental Protection Agency. 1993. Standards for the use or disposal of sewage sludge (40 Code of Federal Regulations Part 503). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA.
  16. United States Environmental Protection Agency Office of Water. 2006. Method 1682: *Salmonella* in sewage sludge (bio-solids) by modified semisolid rappaport-vassiliadis (MSRV) medium, EPA 821-R-06-14, Washington DC, USA. Available at <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/P1002DE9.PDF?Dockey=P1002DE9.PDF>

## Detection of *Salmonella* in Composts from Taiwan

Shu-Chuan Chen<sup>1</sup>, Chi-Chu Lo<sup>1\*</sup>

### Abstract

Chen, S. C., and Lo, C. C. 2017. Detection of *Salmonella* in Composts from Taiwan. Taiwan Pestic. Sci. 2: 75-84.

*Salmonella* infection was the 4th most common food illness in Taiwan. *Salmonella* has been found in composts in many countries, and some reports have suggested that the incidence of *Salmonella* infection is related to compost contamination. Therefore, in this study, we analyzed *Salmonella* contamination in manure compost in Taiwan using a procedure that was modified from USEPA method 1682. Results of performance test showed that the minimum detection limit of this procedure was 23 CFU/30g (3 CFU/4g). We also collected and analyzed composts samples from markets between 2014 and 2016. None of these samples were found to be contaminated with *Salmonella*.

**Key words:** *Salmonella*, Xylose lysine desoxycholate agar (XLD), Tryptic soy broth (TSB), polymerase chain reaction (PCR).

---

Accepted: May 11, 2017.

\* Corresponding author, Email: lcc@tactri.gov.tw

<sup>1</sup> Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture. Taichung.