

有機堆肥中沙門氏桿菌之檢驗方法

羅致逵、許齡尹、陳淑娟

前 言

有機農業操作大量使用有機堆肥，以使蔬菜生長良好。依過去20年美國調查顯示有機肥料中曾被檢出有致病菌存在。有機肥料大部份以禽畜糞為原料，如我國肥料品目5-09之禽畜糞堆肥，及品目5-11之雜項堆肥等。在正確的堆肥過程中，人畜共通致病菌會因熱與高溫而消失，但堆肥操作不謹慎，仍可能會有少量或部份的病原菌存活，一旦施用後即會附著在新鮮蔬果上繼續生長造成中毒。美國環境保護署與農部要求有機堆肥中沙門氏桿菌需低於3MPN/4克(乾重)。歐盟要求有機堆肥中沙門氏桿菌不得檢出(25克)。在我國有機堆肥中尚未列入對人畜共同性致病菌的檢驗項目。

本所於100~101年抽檢14種市售有機堆肥品牌，其中有少數品牌含有李斯特菌與糞生大腸桿菌，顯示部份廠商在製造有機堆肥的過程有困難。因此建立有機堆肥中人畜共通致病菌之檢驗非常重要。

有機堆肥中沙門氏桿菌之檢驗方法

- 1.適用範圍：本方法適用於有機堆肥中沙門氏桿菌之檢驗。
- 2.檢驗方法：檢體經系列稀釋後，以三階五重複進行培養，配合MPN計數之方法。
 - 2.1 工作環境：工作平台須寬敞、潔淨、光線良好，操作平台光度為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。本方法因使用第二級危險群微生物(Risk group 2, RG2)，需依生物安全等級規範第二級(Biosafety level 2, BSL 2)在P2級實驗室中操作。
 - 2.2 器具及材料
 - 2.2.1 無菌匙。

- 2.2.2 冰箱：能維持 $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 者。
 - 2.2.3 扁鏟。
 - 2.2.4 試管：硼矽玻璃， $25 \times 150 \text{ mm}$ ，與 $16 \times 100 \text{ mm}$ ，附可高溫高壓滅菌螺帽，或其他適用者。
 - 2.2.5 試管架：放置試管。
 - 2.2.6 吸管：已滅菌，硼矽玻璃或塑膠製。
 - 2.2.7 自動分注器(Automatic pipettor)。
 - 2.2.8 接種環：直徑約 3 mm ，鉑絲或可拋棄式者。
 - 2.2.9 拋棄式無菌塗抹棒。
 - 2.2.10 酒精燈。
 - 2.2.11 培養箱：能維持內部溫度溫差在 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 以內者。
 - 2.2.12 培養皿：已滅菌，微生物等級， $15 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$ 。
 - 2.2.13 載玻片。
 - 2.2.14 三角錐形瓶： 500 mL 。
 - 2.2.15 水浴：能維持水溫 50°C 者。
 - 2.2.16 過濾：孔徑 $0.22 \mu\text{m}$ 之注射過濾器。
 - 2.2.17 放大鏡。
 - 2.2.18 乳膠手套。
 - 2.2.19 酸鹼度測定儀(pH meter)。
 - 2.2.20 漩渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2.21 微量分注器(Micro pipettor)。
 - 2.2.22 吸管尖(Pipet tips)：可分注 $30 \mu\text{L}$ 。
 - 2.2.23 燒杯：玻璃或塑料製成，大小各異。
 - 2.2.24 高壓滅菌釜： 121°C ， 15 PSI 。
 - 2.2.25 天平：可稱量到 $2,000 \text{ g}$ 者，靈敏度為 0.1 g 。
 - 2.2.26 加熱板(Hot plate)：具有磁性攪拌功能。
 - 2.2.27 攪拌均質器(Blender)或鐵胃(Stomacher)：能適用於無菌操作者。
- 2.3 試劑及標準品
- 2.3.1 試劑之純度：在所有的測試中，必須使用試劑級(Reagent-grade)化學品。
 - 2.3.2 盡可能使用商品級的培養基以控管品質。

- 2.3.3 試劑水之純度：試劑級水須符合水及廢水標準檢驗方法之規格。
- 2.3.4 磷酸鹽緩衝稀釋液(Phosphate buffered dilution water)
- 2.3.4.1 磷酸鹽緩衝儲備溶液(Stock phosphate buffer solution)之製備：取磷酸二氫鉀(KH_2PO_4) 34 g，溶於蒸餾水500 mL，以1.0 N氫氧化鈉溶液調整pH值為7.2，再加蒸餾水使成1 L，分裝於稀釋用容器中，以121°C (15 PSI)滅菌15分鐘，儲存於冰箱備用。
- 2.3.4.2 氯化鎂儲備溶液(Stock magnesium chloride solution)之製備：取38 g無水氯化鎂(MgCl_2)或81.1 g的六水氯化鎂($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)，溶於蒸餾水1 L。以121°C (15 PSI)滅菌15分鐘，儲存於冰箱備用。
- 2.3.4.3 無菌磷酸鹽緩衝稀釋操作液(Working phosphate buffered dilution water)：取1.25 mL磷酸鹽緩衝儲備溶液和5 mL氯化鎂儲備溶液溶於1 L蒸餾水中混搖均勻，可根據檢測需求量，依配方比例配製。以121°C (15 PSI)滅菌15分鐘。最終pH須為 7.0 ± 0.2 。
- 2.3.5 無菌生理食鹽水(Sterile physiological saline solution, 0.85% w/v)：取氯化鈉8.5 g溶於1 L蒸餾水中，各分裝5~10 mL於16×100 mm螺旋試管中，以121°C (15 PSI)滅菌15分鐘。於室溫下儲存。
- 2.3.6 大豆分解蛋白質乾酪素培養液(Tryptic soy broth, TSB)
- | | |
|--|--------|
| 胰消化酪蛋白(Pancreatic digest of casein) | 17.0 g |
| 酶解豆粕(Enzymatic digest of soybean meal) | 3.0 g |
| 氯化鈉(NaCl) | 5.0 g |
| 磷酸氫二鉀(K_2HPO_4) | 2.5 g |
| 葡萄糖(Dextrose) | 2.5 g |
| 蒸餾水(Reagent-grade water) | 1.0 L |
- 加熱溶解後為1X TSB，分取10 mL注入試管中，以121°C (15 PSI)滅菌15分鐘。最終pH值為 7.3 ± 0.2 。
- 製備3X TSB，上述成分溶於蒸餾水使成333 mL，分取10 mL及5 mL注入試管中，以121°C (15 PSI) 滅菌15分鐘。最終pH值為 7.3 ± 0.2 。
- 2.3.7 改良式半固態RV培養基(Modified semisolid Rappaport-Vassiliadis, MSRV)

2.3.7.1 基礎培養基(Basal medium)：

| | |
|---|---------|
| 胰化蛋白胨(Tryptose) | 4.59 g |
| 酪蛋白水解物(酸)【Casein hydrolysate (acid)】 | 4.59 g |
| 氯化鈉(NaCl) | 7.34 g |
| 磷酸二氫鉀(KH ₂ PO ₄) | 1.47 g |
| 無水氯化鎂(MgCl ₂) | 10.93 g |
| 孔雀綠草酸鹽(Malachite green oxalate) | 0.037 g |
| 洋菜(Agar) | 2.7 g |
| 蒸餾水(Reagent-grade water) | 1.0 L |

2.3.7.2 諾波黴素(2%)儲備溶液：

| | |
|----------------------------|--------|
| 諾波黴素，鈉鹽(Sodium novobiocin) | 500 mg |
| 蒸餾水(Reagent-grade water) | 25 mL |

溶解後，經孔徑0.22 μm濾膜無菌過濾後，分裝1.1 mL的儲備溶液至2.0 mL離心管中，於-20°C冷凍保存。

2.3.7.3 基礎培養基攪拌加熱至沸騰溶解(注意不可滅菌)，以1.0 N鹽酸或1.0 N氫氧化鈉溶液調整pH值為5.2 ± 0.2，冷卻至50°C，每公升培養基原液加入1.0 mL的2%諾波黴素，攪拌均勻後每培養皿注入約25 mL，注意不可倒置保存。

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

| | |
|--|--------|
| 酵母抽出物(Yeast extract) | 3.0 g |
| L-離胺酸(L-lysine) | 5.0 g |
| 木糖(Xylose) | 3.75 g |
| 乳糖(Lactose) | 7.5 g |
| 蔗糖(Saccharose) | 7.5 g |
| 去氧膽酸鈉(Sodium desoxycholate) | 2.5 g |
| 檸檬酸鐵銨(Ferric ammonium citrate) | 0.8 g |
| 硫代硫酸鈉(Na ₂ S ₂ O ₃ · 5H ₂ O) | 6.8 g |
| 氯化鈉(NaCl) | 5.0 g |
| 洋菜(Agar) | 15.0 g |

| | |
|--------------------------|--------|
| 酚紅(Phenol red) | 0.08 g |
| 蒸餾水(Reagent-grade water) | 1.0 L |

攪拌加熱至沸騰溶解，注意不可加熱過度(不可滅菌)，最終pH值為7.4 ± 0.2。冷卻至45~50°C後，每培養皿(15×100 mm)注入約12 mL。接種前使培養基回復至常溫。

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

| | |
|--|---------|
| 牛肉抽出物(Beef extract) | 3.0 g |
| 酵母抽出物(Yeast extract) | 3.0 g |
| 胰消化酪蛋白(Pancreatic digest of casein) | 15.0 g |
| 胨蛋白胨 No.3(Proteose peptone No.3) | 5.0 g |
| 葡萄糖(Dextrose) | 1.0 g |
| 乳糖(Lactose) | 10.0 g |
| 蔗糖(Sucrose) | 10.0 g |
| 硫酸亞鐵(FeSO ₄) | 0.2 g |
| 氯化鈉(NaCl) | 5.0 g |
| 硫代硫酸鈉(Na ₂ S ₂ O ₃ · 5H ₂ O) | 0.3 g |
| 酚紅(Phenol red) | 0.024 g |
| 洋菜(Agar) | 12.0 g |
| 蒸餾水(Reagent-grade water) | 1.0 L |

加熱溶解後，分取5~7 mL注入試管，以121°C (15 PSI)滅菌15分鐘，最終pH值為7.4 ± 0.2。滅菌後作成斜面培養基。接種前使培養基回復至常溫。

2.3.10 離胺酸鐵培養基(Lysine iron agar, LIA)

| | |
|--|--------|
| 蛋白胨(Peptone) | 5.0 g |
| 酵母抽出物(Yeast extract) | 3.0 g |
| 葡萄糖(Dextrose) | 1.0 g |
| 左旋離胺酸鹽酸鹽(L-lysine hydrochloride) | 10.0 g |
| 檸檬酸鐵銨(Ferric ammonium citrate) | 0.5 g |
| 無水硫代硫酸鈉(Na ₂ S ₂ O ₃ ; anhydrous) | 0.04 g |

| | |
|--------------------------|--------|
| 溴甲酚紫(Bromcresol purple) | 0.02 g |
| 洋菜(Agar) | 15.0 g |
| 蒸餾水(Reagent-grade water) | 1.0 L |

加熱溶解後，分取5~7 mL注入試管中，以121°C (15 PSI)滅菌12分鐘，最終pH值為6.7 ± 0.2。滅菌後作成斜面培養基。接種前使培養基回復至常溫。

2.3.11 尿素培養液(Urea broth)

| | |
|---|--------|
| 尿素(Urea) | 20.0 g |
| 酵母抽出物(Yeast extract) | 0.1 g |
| 磷酸二氫鉀(KH ₂ PO ₄) | 9.1 g |
| 磷酸氫二鉀(K ₂ HPO ₄) | 9.5 g |
| 酚紅(Phenol red) | 0.01 g |
| 蒸餾水(Reagent-grade water) | 1.0 L |

溶解後，經孔徑0.22 μm濾膜無菌過濾後，分取3 mL濾液注入已滅菌之試管中，最終pH值為6.8 ± 0.1。

2.3.12 沙門氏桿菌菌體抗原群(A-I)與夾膜抗原Vi抗血清 (*Salmonella* O antiserum Polyvalent Groups A-I and Vi)

2.3.13 陽性對照(Positive control)

2.3.13.1 以腸炎沙門氏桿菌 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* BCRC 10744 做為MSRV，XLD，TSI，LIA及多價本體O抗血清(Polyvalent O antiserum)之陽性對照菌株。

2.3.13.2 以變形桿菌 *Proteus vulgaris* ATCC 13315做為Urea broth之陽性對照菌株。

2.3.14 陰性對照(Negative control)

2.3.14.1 以大腸桿菌 *Escherichia coli* BCRC 11509做為MSRV，XLD，TSI，LIA及多價本體O抗血清之陰性對照菌株。

2.3.14.2 以腸炎沙門氏桿菌 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* BCRC 10744 做為Urea broth之陰性對照菌株。

2.3.15 已調配之培養基和試劑之儲存溫度與保存時間如下：

表1. 已調配之培養基和試劑之儲存溫度與保存時間¹

| 培養基 | 儲存溫度 | 儲存時間 |
|---------------------------|-------------|-------|
| 無菌生理鹽水(0.85%w/v) | 室溫 | ≤3個月 |
| TSB：試管管蓋不旋緊 | 室溫 | ≤2週 |
| MSRV：平板(不能倒放儲存) | 室溫 | ≤48小時 |
| XLD：平板(倒放儲存) | 1°C至5°C | ≤2週 |
| TSI, LIA, Urea broth：管蓋鎖緊 | 1°C至5°C | ≤3個月 |
| 2% 諾波黴素(Novobiocin) | -20°C至-10°C | ≤1年 |
| 多價本體O抗血清 | 2°至8°C冷凍乾燥 | ≤3年 |

¹ 如果培養基是冷藏的，在接種前1~1.5小時從冰箱中移出，以確保其在使用之前已達到室溫溫度。

2.4 檢液之調製

2.4.1 稱取30.0 g±0.1 g樣品，加入含有270 mL無菌緩衝稀釋液(Buffered dilution water，參考2.3.4)之混合瓶(或500 mL三角錐形瓶)，高速均質1~2分鐘，作為已均質之樣品(Homogenized sample，為10⁻¹倍稀釋檢液)，必要時，調整pH值為7.0~7.5。

2.5 接種

以三階五重複分析2.0，1.0，和0.1 g的原始樣本(Original sample)(20.0，10.0，和1.0 mL之已均質樣品)(圖1.)。

- (A)使用已滅菌之吸管，吸取前述之已均質樣品20 mL接種於已裝有10 mL之3X TSB培養液試管中(5管)。各試管含有2.0 g的原始樣品。
- (B)使用已滅菌之吸管，吸取前述之已均質樣品10mL接種於已裝有5 mL之3X TSB培養液試管中(5管)。各試管含有1.0 g的原始樣品。
- (C)使用已滅菌之吸管，吸取前述之已均質樣品1 mL接種於已裝有10 mL之1X TSB培養液試管中(5管)。各試管含有0.1 g的原始樣品。

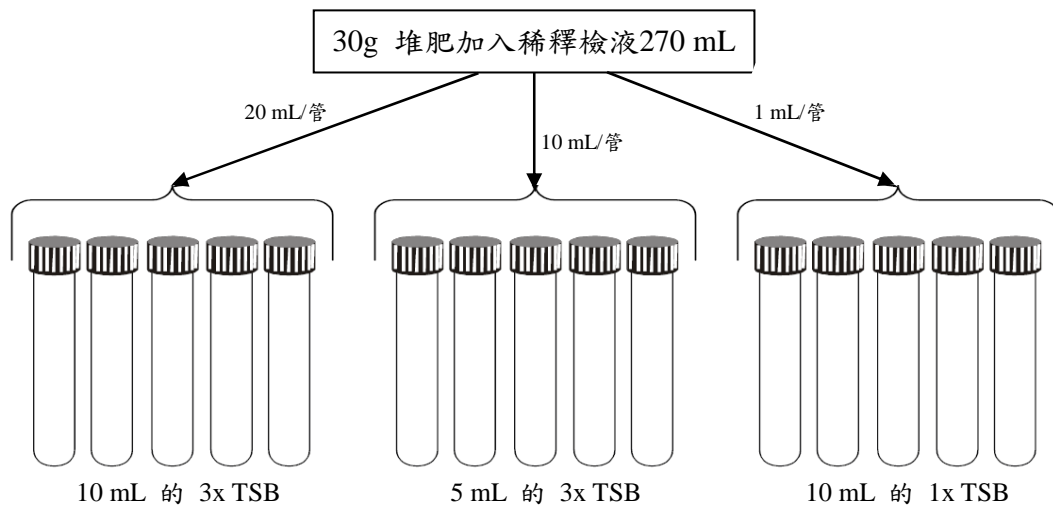


圖1. 接種計劃。

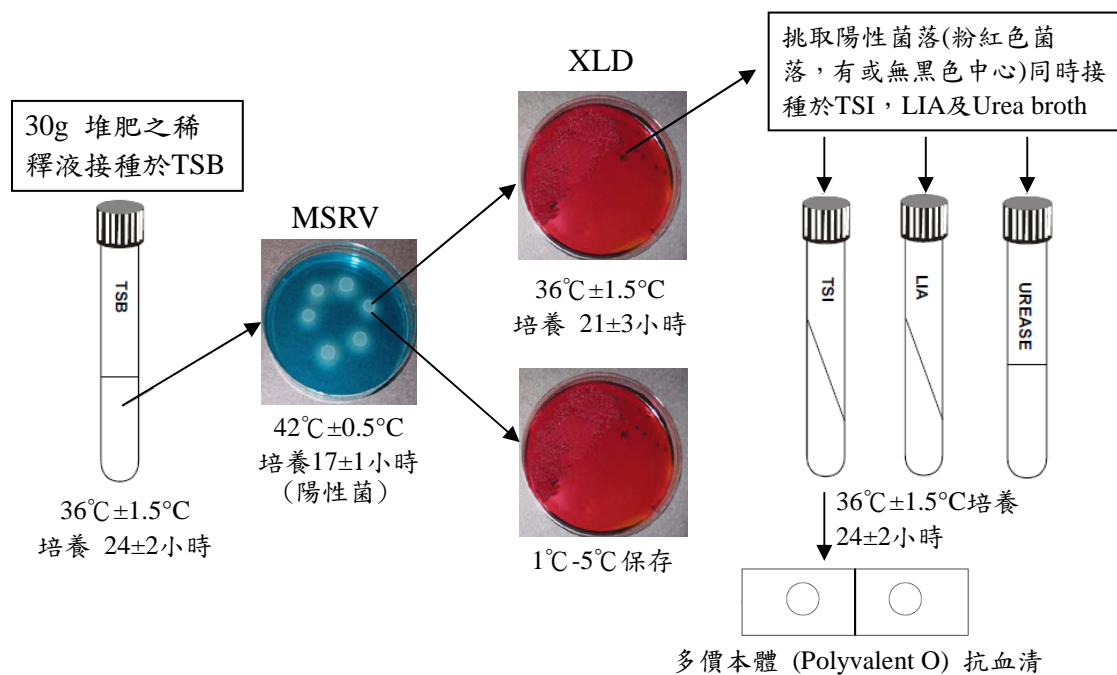


圖2. 沙門氏桿菌檢驗流程。

2.6 增菌培養(Enrichment phase)

2.6.1 將接種後之TSB培養於 $36^{\circ}\text{C} \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ ， 24 ± 2 小時。

2.6.2 所有產生懸濁的試管記錄為陽性反應。

2.7 選擇性培養(Selection phase)

2.7.1 自每管TSB增菌培養液中取6滴各 $30\mu\text{L}$ 滴在對應的MSRV培養基上，MSRV培養基上標註樣品編號、日期及原始接種量(例如： 20.0 ， 10.0 ，或 1.0 mL)。室溫下靜置約1小時後，於 $42^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 培養 $16\sim 18$ 小時，注

意不可倒置培養。若培養箱不具溼度調控功能，可於培養箱底部放入一盛水的水盤即可。

2.7.2 觀察MSRV培養基上滴加TSB增菌培養液處，是否出現離中心點約2公分之“灰白色暈環”(Whitish halo)，表示具運動性。

2.7.3 以無菌接種環穿刺(至少1/2深度)MSRV培養基暈環外圈處，在XLD培養基表面作劃線後，於 $36^{\circ}\text{C}\pm 1.5^{\circ}\text{C}$ 培養18~24小時，觀察所形成菌落型態，進行生化確認階段。同時取一重複保存於 $1\sim 5^{\circ}\text{C}$ 。

2.7.4 於XLD培養基上，呈粉紅色菌落，有黑色中心者。可視為沙門氏桿菌。

2.8 生化確認(Biochemical confirmation phase)

2.8.1 TSI、LIA及尿素培養液試管上標註日期、樣品編號及原始接種量(例如：20.0，10.0，或1.0 mL)，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)，每一菌落同時接種於TSI與LIA斜面培養基(同時進行斜面劃線及穿刺接種)及尿素培養液。將已接種菌之TSI及LIA斜面培養基於 $36^{\circ}\text{C}\pm 1.5^{\circ}\text{C}$ 培養 24 ± 2 小時。如XLD培養基上只有非典型菌落時，挑取非典型菌落，接種於TSI與LIA斜面培養基及尿素培養液，培養條件如上所述。

2.8.1.1 TSI斜面培養基：沙門氏桿菌在TSI培養基反應為底部呈酸性(黃色)，斜面呈鹼性(紅色)。有或無硫化氫(H_2S)氣體產生。當氣體產生時，TSI培養基底部可能為黑色，視為沙門氏桿菌之陽性反應。硫化氫的產生較TSI培養基底部酸性更可能發生。

2.8.1.2 LIA斜面培養基：在LIA培養基之底部呈鹼性反應(紫色)，斜面呈鹼性(紫色)，有或無硫化氫(H_2S)氣體產生。當氣體產生時，LIA培養基底部可能為黑色，視為沙門氏桿菌之陽性反應。

2.8.1.3 尿素培養液(Urea broth)：如為陽性反應，培養基會由橘紅色轉變為粉紅或深紫紅色。陰性反應者顏色不變，沙門氏桿菌為尿素酵素反應陰性。

2.8.2 沙門氏桿菌菌體抗原群(A-D)與夾膜抗原Vi抗血清試驗(*Salmonella* O antiserum Polyvalent Groups A-I and Vi)：

自TSI培養基斜面鉤取一接種環菌量至0.85%無菌生理食鹽水，混合均勻。分別取細菌懸浮液各一滴，滴入玻片上兩區部位。在第一區細菌懸

浮液加入一滴多價本體抗血清。在第二區細菌懸浮液加入一滴生理食鹽水(目測比較組)。在放大鏡下觀察凝集反應。如菌液與本體抗血清產生凝集為陽性反應。如菌液與本體抗血清不產生凝集為陰性反應。

2.8.3 判定：經由相關接種試驗，原始TSB試管為沙門氏桿菌陽性者，必須符合MSRV為陽性，XLD為陽性，TSI或LIA為陽性，尿素酶為陰性，及多價本體(O)抗血清試驗為陽性反應(表2)。再利用最確數表(表3.)推算沙門氏桿菌之最確數(MPN)(表4.)。

表2. 陽性對照與陰性對照於培養基之反應

| 培養基 | 沙門氏桿菌之反應 | 陽性反應 | 陰性反應 |
|-----------------------|----------|-----------------------------------|---|
| 大豆分解蛋白質乾酪素培養液(TSB) | 陽性 | 混濁 | 不混濁 |
| 改良式半固態RV培養基(MSRV) | 陽性 | 細胞具移動性，灰白色暈環 | 菌落周圍培養基顏色保留藍綠色，無灰白色暈環 |
| 木糖離胺酸去氧膽酸鹽培養基(XLD) | 陽性 | 菌落粉紅色，有(或無)黑色中心 ^a | 菌落其他顏色，有(或無)黑色中心。(例如： <i>E. coli</i> 為黃色菌落無黑色中心) |
| 三糖鐵培養基(TSI) | 陽性 | 鹼性斜面紅色，酸性底部黃色，有或無H ₂ S | 其他顏色組合(例如： <i>E. coli</i> 為黃色斜面及底部) |
| 離胺酸鐵培養基(LIA) | 陽性 | 鹼性斜面紫色，鹼性底部紫色，有或無H ₂ S | 其他顏色組合(例如： <i>E. coli</i> 為紅色至紅色/紫色斜面，且底部無H ₂ S產生) |
| 尿素培養液(Urea broth) | 陰性 | 粉紅色 | 無顏色變化(<i>Salmonella</i> 之尿素酶反應為陰性) |
| 多價本體(Polyvalent O)抗血清 | 陽性 | 凝集 | 無凝集 |

^{a)} 部分非典型菌落會形成黃色菌落，有(或無)黑色中心。

表3. 最確數表

| 正反應管數 | MPN/mL | 95% 信賴界限 | | 正反應管數 | MPN/mL | 95% 信賴界限 | |
|-------|-----------|----------|--------|-------|--------|----------|--------|
| | | 上限 | 下限 | | | 上限 | 下限 |
| 0-0-0 | <0.006473 | ---- | 0.0223 | 1-3-0 | 0.0312 | 0.0055 | 0.0678 |
| 0-0-1 | 0.0065 | 0.0012 | 0.0223 | 1-3-1 | 0.0393 | 0.0092 | 0.0821 |
| 0-0-2 | 0.0130 | 0.0012 | 0.0352 | 1-3-2 | 0.0475 | 0.0132 | 0.0967 |
| 0-0-3 | 0.0195 | 0.0012 | 0.0472 | 1-3-3 | 0.0559 | 0.0173 | 0.1119 |
| 0-0-4 | 0.0262 | 0.0033 | 0.0589 | 1-3-4 | 0.0644 | 0.0216 | 0.1277 |
| 0-0-5 | 0.0328 | 0.0062 | 0.0706 | 1-3-5 | 0.0730 | 0.0260 | 0.1444 |
| 0-1-0 | 0.0067 | 0.0012 | 0.0228 | 1-4-0 | 0.0409 | 0.0099 | 0.0849 |
| 0-1-1 | 0.0134 | 0.0012 | 0.0360 | 1-4-1 | 0.0495 | 0.0141 | 0.1002 |
| 0-1-2 | 0.0202 | 0.0012 | 0.0483 | 1-4-2 | 0.0583 | 0.0185 | 0.1163 |
| 0-1-3 | 0.0270 | 0.0037 | 0.0604 | 1-4-3 | 0.0672 | 0.0231 | 0.1331 |
| 0-1-4 | 0.0339 | 0.0067 | 0.0725 | 1-4-4 | 0.0763 | 0.0277 | 0.1509 |
| 0-1-5 | 0.0408 | 0.0099 | 0.0847 | 1-4-5 | 0.0855 | 0.0324 | 0.1700 |
| 0-2-0 | 0.0138 | 0.0012 | 0.0367 | 1-5-0 | 0.0517 | 0.0152 | 0.1042 |
| 0-2-1 | 0.0208 | 0.0012 | 0.0495 | 1-5-1 | 0.0609 | 0.0199 | 0.1212 |
| 0-2-2 | 0.0279 | 0.0040 | 0.0619 | 1-5-2 | 0.0703 | 0.0247 | 0.1391 |
| 0-2-3 | 0.0350 | 0.0072 | 0.0745 | 1-5-3 | 0.0799 | 0.0296 | 0.1583 |
| 0-2-4 | 0.0422 | 0.0106 | 0.0871 | 1-5-4 | 0.0897 | 0.0346 | 0.1790 |
| 0-2-5 | 0.0494 | 0.0141 | 0.1001 | 1-5-5 | 0.0998 | 0.0397 | 0.2015 |
| 0-3-0 | 0.0215 | 0.0012 | 0.0507 | 2-0-0 | 0.0155 | 0.0012 | 0.0404 |
| 0-3-1 | 0.0288 | 0.0044 | 0.0636 | 2-0-1 | 0.0226 | 0.0018 | 0.0526 |
| 0-3-2 | 0.0362 | 0.0077 | 0.0766 | 2-0-2 | 0.0303 | 0.0051 | 0.0662 |
| 0-3-3 | 0.0437 | 0.0113 | 0.0898 | 2-0-3 | 0.0382 | 0.0087 | 0.0801 |
| 0-3-4 | 0.0512 | 0.0051 | 0.1243 | 2-0-4 | 0.0462 | 0.0125 | 0.0943 |
| 0-3-5 | 0.0588 | 0.0095 | 0.1428 | 2-0-5 | 0.0543 | 0.0165 | 0.1090 |
| 0-4-0 | 0.0299 | 0.0049 | 0.0654 | 2-1-0 | 0.0234 | 0.0022 | 0.0540 |
| 0-4-1 | 0.0375 | 0.0084 | 0.0789 | 2-1-1 | 0.0315 | 0.0056 | 0.0683 |
| 0-4-2 | 0.0453 | 0.0121 | 0.0927 | 2-1-2 | 0.0397 | 0.0094 | 0.0827 |
| 0-4-3 | 0.0531 | 0.0160 | 0.1069 | 2-1-3 | 0.0480 | 0.0134 | 0.0976 |
| 0-4-4 | 0.0611 | 0.0200 | 0.1216 | 2-1-4 | 0.0565 | 0.0177 | 0.1131 |
| 0-4-5 | 0.0691 | 0.0241 | 0.1369 | 2-1-5 | 0.0652 | 0.0221 | 0.1293 |
| 0-5-0 | 0.0390 | 0.0090 | 0.0814 | 2-2-0 | 0.0327 | 0.0062 | 0.0705 |
| 0-5-1 | 0.0470 | 0.0129 | 0.0958 | 2-2-1 | 0.0413 | 0.0101 | 0.0856 |
| 0-5-2 | 0.0553 | 0.0170 | 0.1107 | 2-2-2 | 0.0501 | 0.0144 | 0.1013 |
| 0-5-3 | 0.0636 | 0.0212 | 0.1262 | 2-2-3 | 0.0590 | 0.0189 | 0.1176 |
| 0-5-4 | 0.0720 | 0.0255 | 0.1425 | 2-2-4 | 0.0681 | 0.0236 | 0.1349 |
| 0-5-5 | 0.0806 | 0.0299 | 0.1596 | 2-2-5 | 0.0774 | 0.0283 | 0.1533 |
| 1-0-0 | 0.0072 | 0.0012 | 0.0241 | 2-3-0 | 0.0431 | 0.0110 | 0.0887 |
| 1-0-1 | 0.0139 | 0.0012 | 0.0369 | 2-3-1 | 0.0523 | 0.0155 | 0.1053 |
| 1-0-2 | 0.0209 | 0.0012 | 0.0497 | 2-3-2 | 0.0617 | 0.0203 | 0.1227 |
| 1-0-3 | 0.0281 | 0.0041 | 0.0623 | 2-3-3 | 0.0714 | 0.0252 | 0.1412 |
| 1-0-4 | 0.0353 | 0.0073 | 0.0749 | 2-3-4 | 0.0813 | 0.0303 | 0.1611 |
| 1-0-5 | 0.0425 | 0.0107 | 0.0878 | 2-3-5 | 0.0914 | 0.0354 | 0.1826 |
| 1-1-0 | 0.0144 | 0.0012 | 0.0377 | 2-4-0 | 0.0547 | 0.0168 | 0.1098 |
| 1-1-1 | 0.0217 | 0.0013 | 0.0509 | 2-4-1 | 0.0647 | 0.0218 | 0.1284 |
| 1-1-2 | 0.0290 | 0.0045 | 0.0640 | 2-4-2 | 0.0750 | 0.0271 | 0.1484 |
| 1-1-3 | 0.0365 | 0.0079 | 0.0771 | 2-4-3 | 0.0855 | 0.0325 | 0.1700 |
| 1-1-4 | 0.0441 | 0.0115 | 0.0905 | 2-4-4 | 0.0964 | 0.0380 | 0.1937 |
| 1-1-5 | 0.0517 | 0.0153 | 0.1043 | 2-4-5 | 0.1076 | 0.0436 | 0.2201 |
| 1-2-0 | 0.0224 | 0.0017 | 0.0523 | 2-5-0 | 0.0681 | 0.0235 | 0.1349 |
| 1-2-1 | 0.0301 | 0.0050 | 0.0658 | 2-5-1 | 0.0791 | 0.0292 | 0.1566 |
| 1-2-2 | 0.0379 | 0.0085 | 0.0795 | 2-5-2 | 0.0904 | 0.0349 | 0.1805 |
| 1-2-3 | 0.0457 | 0.0123 | 0.0935 | 2-5-3 | 0.1021 | 0.0409 | 0.2070 |
| 1-2-4 | 0.0537 | 0.0162 | 0.1079 | 2-5-4 | 0.1143 | 0.0469 | 0.2372 |
| 1-2-5 | 0.0618 | 0.0203 | 0.1229 | 2-5-5 | 0.1268 | 0.0531 | 0.2725 |

表3. 最確數表(續)

| 正反應管數 | MPN/mL | 95% 信賴界限 | | 正反應管數 | MPN/mL | 95% 信賴界限 | |
|-------|--------|----------|--------|-------|-----------|----------|--------|
| | | 上限 | 下限 | | | 上限 | 下限 |
| 3-0-0 | 0.0255 | 0.0028 | 0.0585 | 4-3-0 | 0.0797 | 0.0295 | 0.1579 |
| 3-0-1 | 0.0330 | 0.0063 | 0.0710 | 4-3-1 | 0.0937 | 0.0366 | 0.1877 |
| 3-0-2 | 0.0417 | 0.0103 | 0.0863 | 4-3-2 | 0.1086 | 0.0441 | 0.2228 |
| 3-0-3 | 0.0506 | 0.0147 | 0.1023 | 4-3-3 | 0.1245 | 0.0520 | 0.2656 |
| 3-0-4 | 0.0598 | 0.0193 | 0.1191 | 4-3-4 | 0.1414 | 0.0602 | 0.3218 |
| 3-0-5 | 0.0691 | 0.0241 | 0.1368 | 4-3-5 | 0.1595 | 0.0686 | 0.4067 |
| 3-1-0 | 0.0344 | 0.0069 | 0.0734 | 4-4-0 | 0.1012 | 0.0404 | 0.2049 |
| 3-1-1 | 0.0435 | 0.0112 | 0.0896 | 4-4-1 | 0.1181 | 0.0489 | 0.2476 |
| 3-1-2 | 0.0529 | 0.0159 | 0.1065 | 4-4-2 | 0.1364 | 0.0578 | 0.3038 |
| 3-1-3 | 0.0626 | 0.0207 | 0.1244 | 4-4-3 | 0.1563 | 0.0672 | 0.3890 |
| 3-1-4 | 0.0725 | 0.0258 | 0.1434 | 4-4-4 | 0.1780 | 0.0770 | 0.5273 |
| 3-1-5 | 0.0827 | 0.0310 | 0.1640 | 4-4-5 | 0.2015 | 0.0873 | 0.6411 |
| 3-2-0 | 0.0456 | 0.0122 | 0.0932 | 4-5-0 | 0.1304 | 0.0549 | 0.2836 |
| 3-2-1 | 0.0555 | 0.0171 | 0.1112 | 4-5-1 | 0.1524 | 0.0653 | 0.3687 |
| 3-2-2 | 0.0657 | 0.0223 | 0.1303 | 4-5-2 | 0.1769 | 0.0766 | 0.5210 |
| 3-2-3 | 0.0763 | 0.0277 | 0.1510 | 4-5-3 | 0.2046 | 0.0886 | 0.6528 |
| 3-2-4 | 0.0872 | 0.0333 | 0.1735 | 4-5-4 | 0.2357 | 0.1015 | 0.7516 |
| 3-2-5 | 0.0984 | 0.0390 | 0.1984 | 4-5-5 | 0.2708 | 0.1150 | 0.8426 |
| 3-3-0 | 0.0583 | 0.0186 | 0.1164 | 5-0-0 | 0.0549 | 0.0162 | 0.1116 |
| 3-3-1 | 0.0693 | 0.0241 | 0.1371 | 5-0-1 | 0.0637 | 0.0213 | 0.1265 |
| 3-3-2 | 0.0806 | 0.0299 | 0.1597 | 5-0-2 | 0.0763 | 0.0277 | 0.1510 |
| 3-3-3 | 0.0924 | 0.0359 | 0.1847 | 5-0-3 | 0.0896 | 0.0345 | 0.1787 |
| 3-3-4 | 0.1046 | 0.0421 | 0.2128 | 5-0-4 | 0.1037 | 0.0417 | 0.2107 |
| 3-3-5 | 0.1173 | 0.0484 | 0.2452 | 5-0-5 | 0.0953 | 0.0165 | 0.2234 |
| 3-4-0 | 0.0733 | 0.0262 | 0.1450 | 5-1-0 | 0.0678 | 0.0234 | 0.1344 |
| 3-4-1 | 0.0856 | 0.0325 | 0.1700 | 5-1-1 | 0.0816 | 0.0304 | 0.1618 |
| 3-4-2 | 0.0984 | 0.0390 | 0.1982 | 5-1-2 | 0.0963 | 0.0379 | 0.1936 |
| 3-4-3 | 0.1118 | 0.0457 | 0.2307 | 5-1-3 | 0.1121 | 0.0459 | 0.2316 |
| 3-4-4 | 0.1258 | 0.0526 | 0.2695 | 5-1-4 | 0.1291 | 0.0542 | 0.2796 |
| 3-4-5 | 0.1405 | 0.0597 | 0.3184 | 5-1-5 | 0.1293 | 0.0304 | 0.3090 |
| 3-5-0 | 0.0913 | 0.0354 | 0.1825 | 5-2-0 | 0.0879 | 0.0337 | 0.1751 |
| 3-5-1 | 0.1055 | 0.0426 | 0.2150 | 5-2-1 | 0.1046 | 0.0421 | 0.2128 |
| 3-5-2 | 0.1204 | 0.0500 | 0.2538 | 5-2-2 | 0.1227 | 0.0511 | 0.2605 |
| 3-5-3 | 0.1362 | 0.0577 | 0.3029 | 5-2-3 | 0.1427 | 0.0608 | 0.3267 |
| 3-5-4 | 0.1529 | 0.0656 | 0.3715 | 5-2-4 | 0.1646 | 0.0710 | 0.4385 |
| 3-5-5 | 0.1707 | 0.0738 | 0.4795 | 5-2-5 | 0.1767 | 0.0503 | 0.5230 |
| 4-0-0 | 0.0381 | 0.0082 | 0.0809 | 5-3-0 | 0.1151 | 0.0474 | 0.2394 |
| 4-0-1 | 0.0461 | 0.0125 | 0.0942 | 5-3-1 | 0.1368 | 0.0580 | 0.3050 |
| 4-0-2 | 0.0563 | 0.0175 | 0.1126 | 5-3-2 | 0.1614 | 0.0695 | 0.4183 |
| 4-0-3 | 0.0668 | 0.0229 | 0.1323 | 5-3-3 | 0.1895 | 0.0821 | 0.5899 |
| 4-0-4 | 0.0777 | 0.0284 | 0.1537 | 5-3-4 | 0.2216 | 0.0957 | 0.7101 |
| 4-0-5 | 0.0890 | 0.0342 | 0.1773 | 5-3-5 | 0.2527 | 0.0814 | 0.7971 |
| 4-1-0 | 0.0484 | 0.0136 | 0.0983 | 5-4-0 | 0.1571 | 0.0676 | 0.3935 |
| 4-1-1 | 0.0592 | 0.0190 | 0.1181 | 5-4-1 | 0.1907 | 0.0826 | 0.5954 |
| 4-1-2 | 0.0705 | 0.0248 | 0.1395 | 5-4-2 | 0.2319 | 0.0999 | 0.7409 |
| 4-1-3 | 0.0822 | 0.0308 | 0.1631 | 5-4-3 | 0.2834 | 0.1196 | 0.8726 |
| 4-1-4 | 0.0945 | 0.0370 | 0.1894 | 5-4-4 | 0.3475 | 0.1417 | 1.0160 |
| 4-1-5 | 0.1072 | 0.0434 | 0.2193 | 5-4-5 | 0.4256 | 0.1437 | 1.1800 |
| 4-2-0 | 0.0626 | 0.0207 | 0.1244 | 5-5-0 | 0.2398 | 0.0762 | 0.7629 |
| 4-2-1 | 0.0748 | 0.0269 | 0.1479 | 5-5-1 | 0.3477 | 0.1172 | 1.0160 |
| 4-2-2 | 0.0875 | 0.0335 | 0.1742 | 5-5-2 | 0.5422 | 0.1791 | 1.4190 |
| 4-2-3 | 0.1009 | 0.0403 | 0.2041 | 5-5-3 | 0.9178 | 0.2672 | 2.2010 |
| 4-2-4 | 0.1150 | 0.0473 | 0.2392 | 5-5-4 | 1.6090 | 0.3837 | 4.1030 |
| 4-2-5 | 0.1299 | 0.0546 | 0.2820 | 5-5-5 | >1.609000 | 0.3837 | ---- |

表4. 樣品中沙門氏桿菌計算實例說明(陽性反應組合)

| 樣品 | 均質後樣品接種至TSB之體積 | | | 步驟1： MPN / mL (濕重) | 總固體百分比 (乾重) | 步驟2： MPN / 4g (乾重) |
|--------|----------------|---------|--------|-----------------------------|-------------|---|
| | 20.0 mL | 10.0 mL | 1.0 mL | | | |
| A (液體) | 0/5 | 1/5 | 0/5 | 0.0067 | 1% | (0.0067) (4) / (0.01) = 2.68 MPN / 4 g |
| B (液體) | 3/5 | 1/5 | 1/5 | 0.0435 | 2% | (0.0435) (4) / (0.02) = 8.7 MPN / 4 g |
| C (液體) | 5/5 | 5/5 | 2/5 | 0.5422 | 3% | (0.5422) (4) / (0.03) = 72 MPN / 4 g |
| D (固體) | 0/5 | 1/5 | 0/5 | $0.0067 / 0.1^1 = .067$ | 96% | (0.067) (4) / (0.96) = 0.28 MPN / 4 g |
| E (固體) | 4/5 | 4/5 | 4/5 | $0.1181 / 0.1^1 =$ 1.181 | 18% | (1.181) (4) / (0.18) = 26 MPN / 4 g |
| F (固體) | 5/5 | 5/5 | 2/5 | $0.5422 / 0.1^1 =$ 5.422 | 43% | (5.422) (4) / (0.43) = 50 MPN / 4 g |

¹固體樣品之稀釋倍數(1:10)

2.9 可參考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。PCR檢測可視需要執行。惟檢驗結果有爭議時，應以傳統方法為準，但不能取代血清學試驗。菌株經商業生化套組鑑定為疑似沙門氏桿菌，仍須進行本體族群(O)抗血清試驗，如為陽性反應，則判定為沙門氏桿菌陽性。

結 語

自民國70~100年國內細菌性食因性中毒事件共2,580件，其中最常見的感染型食因性食品中毒是沙門氏桿菌症，但沙門氏桿菌之鑑定複雜，有典型與非典型之菌落與生化反應，在不同基質中也有不同的干擾程度。因此本所參考USEPA與 USDA對有機堆肥中沙門氏桿菌之檢驗方法，建立國產市售有機堆肥中沙門氏桿菌之檢驗方法，將可協助業者生產安全之有機堆肥，並可協助有機農場操作，及時掌握田間蔬果品質之安全。

參考文獻

1. American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation. 1998. Standard Methods for Water and Wastewater. 20th Edition. Sections 9020, 9030, 9040, 9050, and 9221.
2. American Chemical Society (ACS). 2000. Reagent Chemicals, American Chemical Society Specifications. American Chemical Society, New York. For suggestions of the testing of reagents not listed by the American Chemical Society, see AnalR Standards for Laboratory Chemicals, BDH, Poole, Dorset, UK and the United States Pharmacopeia.
3. Bordner, R., J.A. Winter and P.V. Scarpino (eds.), Microbiological Methods for Monitoring the Environment, Water and Wastes, EPA-600/8-78-017. Office of Research and Development, USEPA
4. Klee, A. J. 1993. A computer program for the determination of the most probable number and its confidence limits. Journal of Microbiological Methods. 18:91-98.
5. USEPA. Results of the Interlaboratory Validation of EPA Method 1682 (MSRV) for *Salmonella* in Biosolids. EPA-821-B-04-008. September 2004.
6. USEPA Method 1682 : *Salmonella* in sewage sludge (biosolids) by modified semisolid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) medium. July 2006.