

食品微生物之檢驗方法－仙人掌桿菌之檢驗

Methods of Test for Food Microorganisms- Test of *Bacillus cereus*

第一部：仙人掌桿菌之分離、計數及鑑別

1. 適用範圍：本方法適用於食品中仙人掌桿菌之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經系列稀釋後，以選擇性培養基培養及計數之方法或以三階三支進行培養，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。
 - 2.2. 器具及材料
 - 2.2.1. 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。
 - 2.2.2. 乾熱滅菌器。
 - 2.2.3. 高壓滅菌釜。
 - 2.2.4. 冰箱：能維持 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 者。
 - 2.2.5. 培養箱：能維持內部溫度溫差在 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以內者。
 - 2.2.6. 水浴：能維持水溫溫差在 ± 1 以內者。
 - 2.2.7. 攪拌均質器(Blender)或鐵胃(Stomacher)：適用於無菌操作者。
 - 2.2.8. 天平：可稱量到 2000 g 者，靈敏度為 0.1 g；可稱量到 120 g 者，靈敏度為 1 mg。
 - 2.2.9. 顯微鏡：能放大至 1000 倍以上之一般光學顯微鏡。
 - 2.2.10. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2.11. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
 - 2.2.12. 加熱器。
 - 2.2.13. 吸管輔助器(Pipette aid)或微量分注器。
 - 2.2.14. 吸管或吸管尖：已滅菌，1 mL 吸管應有 0.01 mL 之刻度；5 mL 及 10 mL 吸管應有 0.1 mL 之刻度。
 - 2.2.15. 培養皿：已滅菌，內徑約 9 cm，深度約 15 mm，底皿之內外面應平坦，無氣泡、刮痕或其他缺點。

- 2.2.16. 稀釋用容器：無菌袋或有 1000 mL、500 mL、99 mL 或 90 mL 標記附蓋(栓)之可滅菌廣口瓶。
- 2.2.17. 試管：20 × 150 mm，13 × 100 mm 試管，或其他適用者。
- 2.2.18. 無菌濾膜：孔徑 0.45 μm 或以下之親水性濾膜。
- 2.2.19. 無菌棉花棒或塗抹棒。
- 2.2.20. 載玻片及蓋玻片：適用於染色及鏡檢者。
- 2.2.21. 接種針及接種環(直徑約 3 mm)：鎳鉻合金、鉑鈹或鉻線材質，或可拋棄式者。
- 2.2.22. 曲玻棒：可滅菌者，直徑 3~4 mm，塗抹區域 45~55 mm。
- 2.2.23. 研鉢、杵。
- 2.2.24. 藥勺、剪刀、小刀、鑷子：可滅菌或可拋棄式者。
- 2.2.25. 濾紙及褐色試藥瓶。
- 2.2.26. 試藥：氯化鈉、氫氧化鈉、磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)、磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)、磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)、硝酸鉀(KNO_3 ，無亞硝酸鹽者)、結晶紫(crystal violet)、草酸銨(ammonium oxalate)、多粘桿菌素 B 硫酸鹽(polymyxin B sulfate)、碘化鉀、碘、沙黃 O (safranin O)、30%過氧化氫溶液、冰醋酸(glacial acetic acid, 1.049 g/mL)、 α -萘酚(α -naphthol)、氫氧化鉀、肌酸(creatine)、酪胺酸(tyrosine)、無水乙醇、95%乙醇、甲醇、鹽酸、液態石蠟油、礦物油、磺胺酸(sulfanilic acid)、鋅粉、孔雀綠(malachite green)、鹼性復紅(basic fuchsin)、TB 石炭酸復紅 ZN (TB carbolfuchsin ZN)、異丙醇(isopropanol)、石炭酸(phenol)、酚紅(phenol red)、葡萄糖(dextrose)及 D-甘露糖醇(D-mannitol)均採用化學試藥級；溶菌酶(lysozyme)、月示蛋白胨(proteose peptone)、胰化酪蛋白(trypticase)、蛋白胨(peptone)、去血纖維蛋白綿羊血(defibrinated sheep blood)、酵母抽出物(yeast extract)、牛肉抽出物(beef extract)、洋菜(agar)、胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)、植物蛋白胨(phytone peptone)及月示蛋白胨 3 號(proteose peptone No.3)均採用微生物級。
- 2.2.27. 試劑

2.2.27.1. 革蘭氏染色液(Gram stain solution)^(註)

2.2.27.1.1. 哈克氏(Hucker's)結晶紫液(初染劑)：

溶液 A：取結晶紫 2 g 溶於 95%乙醇 20 mL。

溶液 B：取草酸銨 0.8 g 溶於蒸餾水 80 mL。

將溶液 A 與溶液 B 混合，靜置 24 小時後以濾紙過濾，取濾液作為初染劑。

2.2.27.1.2. 革蘭氏碘液(媒染劑)：

取碘化鉀 2 g 及碘 1 g 置於研鉢中，研磨 5~10 秒，加蒸餾水 1 mL 研磨，次加蒸餾水 5 mL 研磨，再加蒸餾水 10 mL，研磨至碘化鉀和碘完全溶於蒸餾水，將此溶液注入褐色試藥瓶，再以適量蒸餾水洗滌研鉢及杵，以此洗液併入，加蒸餾水使成 300 mL。

2.2.27.1.3. 哈克氏複染液(複染劑)：

取沙黃 O 2.5 g 溶於 95%乙醇 100 mL，供作複染原液。使用時，取原液 10 mL 加入蒸餾水 90 mL，作為複染液。

註：革蘭氏染色液因放久可能失效，因此購買成品時，要注意其保存期限；自行配製者，應檢查其染色效果。

2.2.27.2. 芽孢染色液(Endospore stain solutions)：

孔雀綠染色液：取孔雀綠 10 g 溶於蒸餾水 100 mL，以濾紙過濾，去除未完全溶解之染劑。

沙黃 O 染色液：取沙黃 O 0.25 g 溶於蒸餾水 100 mL。

2.2.27.3. 鹼性復紅染色液(Basic fuchsin staining solution)：取鹼性復紅 0.5 g 溶於 95%乙醇 20 mL，再以蒸餾水稀釋至 100 mL，染劑未完全溶解時，以濾紙過濾。

2.2.27.4. TB 石炭酸復紅 ZN 染色液(TB carbolfuchsin ZN stain solutions)：取鹼性復紅 1.7 g 及石炭酸 50 g，溶於異丙醇 95 mL，再加蒸餾水 905 mL。

2.2.27.5. 歐普氏試驗試劑(Voges-Proskauer test reagents, VP reagents)：

溶液 A：取 α -萘酚 5 g 溶於無水乙醇 100 mL。

溶液 B：取氫氧化鉀 40 g 溶於蒸餾水使成 100 mL。

2.2.27.6. 亞硝酸鹽檢測試劑(Nitrite detection reagents)：

溶液 A：取磺胺酸 1 g 溶於 5 N 醋酸溶液 125 mL。

溶液 B：取 α -萘酚 1 g 溶於 5 N 醋酸溶液 200 mL。

2.2.27.7. 3%過氧化氫溶液：取 30%過氧化氫溶液 1 mL，加蒸餾水使成 10 mL，使用時新鮮配製。

2.2.27.8. 液態石蠟油或礦物油：取液態石蠟油或礦物油 20~50 mL，裝入附蓋容器中約 1/2 滿，以 121°C滅菌 30 分鐘。

2.2.27.9. 5%酪胺酸溶液：取酪胺酸 5 g 溶於蒸餾水 100 mL，混合均勻，以 121°C滅菌 15 分鐘。

2.2.27.10. 0.01 N 鹽酸溶液：取鹽酸 8.5 mL，溶於蒸餾水使成 1000 mL。取此溶液 10 mL，加水稀釋至 100 mL。

2.2.27.11. 0.1%溶菌酶溶液：取溶菌酶 0.1 g 溶於無菌 0.01 N 鹽酸溶液 65 mL，加熱沸騰 20 分鐘，冷卻後以無菌 0.01 N 鹽酸溶液定容至 100 mL。或取溶菌酶 0.1 g 溶於蒸餾水 100 mL，混合均勻，以無菌濾膜過濾，冷藏備用。

2.2.27.12. 5 N 醋酸溶液：取冰醋酸 28.63 mL，加水使成 100 mL。

2.2.27.13. 1 N 氫氧化鈉溶液：取氫氧化鈉 40.0 g 溶解於蒸餾水，加蒸餾水使成 1000 mL。

2.2.27.14. 70%乙醇溶液：取 95%乙醇 736.8 mL，以蒸餾水稀釋至 1000 mL。

2.2.28. 稀釋液

2.2.28.1. 生理食鹽水：取氯化鈉 8.5 g 溶於蒸餾水 1000 mL，分裝於稀釋用容器中，經 121°C滅菌 15 分鐘。

2.2.28.2. 磷酸鹽緩衝溶液(Butterfield's phosphate-buffered dilution water)：取磷酸二氫鉀 34 g 溶於蒸餾水 500 mL 中，以 1 N 氫氧化鈉溶液調整 pH 值為 7.2，再加蒸餾水使成 1000 mL，以 121°C滅菌 15 分鐘，貯存於冰箱中，作為原液備用。使用時，取原液 1.25 mL 加入蒸餾水至 1000 mL，分裝於稀釋用容器中，以 121°C滅菌 15 分鐘。

2.2.28.3. 0.1%蛋白胨稀釋液(0.1% peptone diluent)：取蛋白胨 1 g 溶於蒸餾水使成 1000 mL，分裝於稀釋用容器中，經 121°C滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.0 ± 0.1 。

2.2.28.4. 蛋白胨緩衝液(Buffered peptone water)：取蛋白胨 10 g、氯化鈉 5 g、磷酸氫二鈉 3.5 g 及磷酸二氫鉀 1.5 g，溶於蒸餾水使成 1000 mL，分裝於稀釋用容器中，經 121°C滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.2 ± 0.2 。

2.2.29. 培養基

2.2.29.1. 甘露糖醇—蛋黃—多黏桿菌素培養基(Mannitol- egg yolk-polymyxin agar, MYP)

基礎培養基：

牛肉抽出物(beef extract).....	1 g
蛋白胨(peptone).....	10 g
D-甘露糖醇(D-mannitol).....	10 g
氯化鈉.....	10 g
酚紅(phenol red).....	0.025 g
洋菜(agar).....	15 g
蒸餾水.....	900 mL

50%蛋黃液(50% Egg yolk emulsion)：

蛋洗淨後，浸入 70%乙醇溶液中 1 小時，以無菌操作方式破殼，續以無菌針筒或廣口吸管無菌操作，取出蛋黃，加入等量之無菌生理食鹽水，混勻後冷藏備用。

1 萬 unit/mL 多黏桿菌素 B 硫酸鹽溶液(Polymyxin B sulfate solution)：

取 50 萬 unit 之多黏桿菌素 B 硫酸鹽 1 g，溶於蒸餾水 50 mL，以無菌濾膜過濾，冷藏備用。

完全培養基：

基礎培養基加熱溶解後，以 121°C滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.2 ± 0.2 。冷卻至約 50°C，加入 50%蛋黃液 50 mL 及 1 萬 unit/mL

多粘桿菌素 B 硫酸鹽溶液 10 mL，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 15~18 mL，使用前培養基表面應保持乾燥。

2.2.29.2. 胰化酪蛋白—大豆—多粘桿菌素培養液(Trypticase - soy- polymyxin broth, TSPB)

基礎培養基：胰化酪蛋白大豆培養液(Trypticase soy broth, TSB)

胰化酪蛋白朊(trypticase peptone)..... 17 g
植物蛋白朊(phytone peptone)..... 3 g
氯化鈉..... 5 g
磷酸氫二鉀(K₂HPO₄)..... 2.5 g
葡萄糖(dextrose)..... 2.5 g
蒸餾水..... 1000 mL

1.5 萬 unit/mL 多粘桿菌素 B 硫酸鹽溶液：

取 50 萬 unit 之多粘桿菌素 B 硫酸鹽 1g，溶於蒸餾水 33.3 mL，以無菌濾膜過濾，冷藏備用。

完全培養基：

基礎培養基加熱溶解後，取 15 mL 注入 20 × 150 mm 試管中，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.3±0.2，冷卻後加入 1.5 萬 unit/mL 多粘桿菌素 B 硫酸鹽溶液 0.1 mL。

2.2.29.3. 營養培養基(Nutrient agar, NA)

牛肉抽出物(beef extract)..... 3 g
蛋白朊(peptone)..... 5 g
洋菜(agar)..... 15 g
蒸餾水..... 1000 mL

加熱溶解後，分裝於試管及三角瓶，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 6.8±0.2。分裝於試管者，做成斜面培養基；三角瓶者，分裝於培養皿，每一培養皿倒入 15~18 mL，做成平板培養基，使用前培養基表面應保持乾燥。

2.2.29.4. 營養培養液(Nutrient broth, NB)

牛肉抽出物(beef extract)..... 3 g

蛋白胨(peptone)..... 5 g

蒸餾水..... 1000 mL

加熱溶解後，分取 2.5 mL 注入試管內，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 6.8±0.2。

2.2.29.5. 酚紅葡萄糖培養液(Phenol red glucose broth)

月示蛋白胨 3 號(proteose peptone No.3)..... 10 g

牛肉抽出物(beef extract)..... 1 g

葡萄糖(dextrose)..... 5 g

酚紅(phenol red)..... 0.018 g

氯化鈉..... 5 g

蒸餾水..... 1000 mL

加熱溶解後，分取 2.5 mL 注入試管內，以 118°C 滅菌 10 分鐘，最終 pH 值為 7.4±0.2。

2.2.29.6. 硝酸鹽培養液(Nitrate broth)

牛肉抽出物(beef extract)..... 3 g

蛋白胨(peptone)..... 5 g

硝酸鉀(KNO₃，無亞硝酸鹽者)..... 1 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，最終 pH 值為 7.0±0.2。

2.2.29.7. 酪胺酸培養基(Tyrosine agar)

取 2.2.29.3. 節已滅菌營養培養基 100 mL，冷卻至 48°C，加入 5% 酪胺酸溶液 10 mL，一面混合均勻，一面無菌分取 3.5 mL 注入已滅菌之試管，並迅速冷卻做成斜面，以避免酪胺酸之析出。

2.2.29.8. 溶菌酶培養液

取 2.2.29.4. 節已滅菌營養培養液 99 mL，冷卻後加入 0.1% 溶菌酶溶液 1 mL，混合均勻，再分取 2.5 mL 至已滅菌之試管。

2.2.29.9. 歐普氏培養液(Voges-Proskauer medium)

月示蛋白朊(proteose peptone)..... 7 g

氯化鈉..... 5 g

葡萄糖(dextrose)..... 5 g

蒸餾水..... 1000 mL

溶解後，分取 2.5 mL 注入試管內，以 121°C 滅菌 10 分鐘，最終 pH 值為 6.5±0.2。

2.2.29.10. 胰化酪蛋白—大豆—綿羊血培養基(Trypticase soy sheep blood agar)

基礎培養基：胰化酪蛋白大豆培養基(Trypticase soy agar, TSA)

胰化酪蛋白朊(trypticase peptone)..... 15 g

植物蛋白朊(phytone peptone)..... 5 g

氯化鈉..... 5 g

洋菜(agar)..... 15g

蒸餾水..... 1000 mL

加熱溶解後，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.3±0.2。冷卻至約 50°C，加入去血纖維蛋白綿羊血 50 mL，搖動混合均勻，每一培養皿倒入 15~18 mL。

2.2.29.11. 運動性試驗培養基(Motility medium)

胰化酪蛋白(trypticase)..... 10 g

酵母抽出物(yeast extract)..... 2.5 g

葡萄糖(dextrose)..... 5 g

磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)..... 3 g

蒸餾水..... 1000 mL

加熱溶解後，分取 2 mL 注入試管中，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4±0.2，使用前培養基表面應保持乾燥。

2.3. 檢液之調製

2.3.1. 固態檢體：將檢體切碎混合均勻後，取 50 g，加入稀釋液 450 mL，混合均勻，作為 10 倍稀釋檢液。

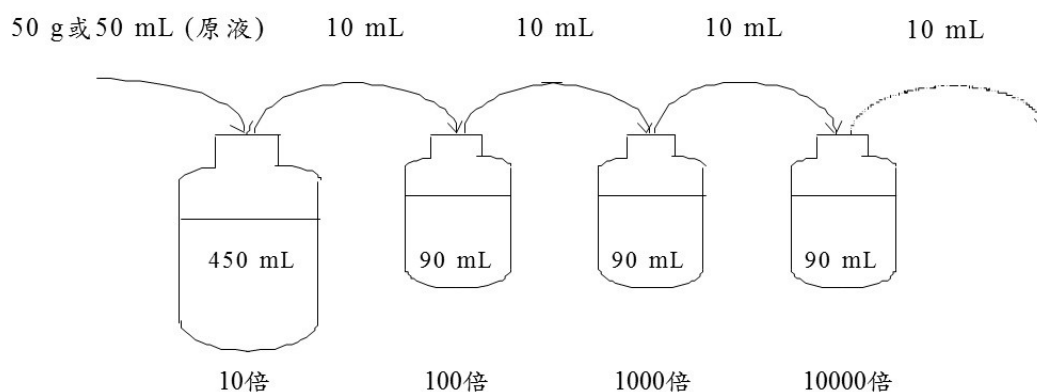
2.3.2. 粉狀、粒狀或其他易於粉碎之檢體：使用已滅菌之藥勺或其他用具將檢體粉碎後，混合均勻，取 50 g，以下步驟同 2.3.1. 節之操作。

2.3.3. 液態檢體：將檢體振搖均勻混合，取 50 mL，作為原液，以下步驟同 2.3.1. 節之操作。

2.3.4. 冷凍檢體：須解凍者，如冷凍魚、禽畜肉、蔬果、水餃等，應在冷藏之溫度下解凍(如 2~5°C，18 小時內即可解凍完全)；亦可使用較高溫度快速解凍(置於 45°C 以下之水浴中，可在 15 分鐘內解凍之檢體適用之)。解凍時應經常搖動檢體，以加速解凍。俟檢體解凍後，再予以切碎並混合均勻。不須解凍者，如食用冰塊、冰棒等冰類製品，應速先行使成適當小塊；再依 2.3.1. 節，製成 10 倍稀釋檢液。如檢驗工作無法立即進行，應將檢體貯存於-20°C。

2.3.5. 凝態及濃稠液態檢體：如布丁、煉乳、海苔醬等，經攪拌均勻後，取 50 g，以下步驟同 2.3.1. 節之操作。

2.3.6. 系列稀釋檢液：使用已滅菌之吸管，吸取上述之 10 倍稀釋檢液 10 mL，加至稀釋液 90 mL 中，依序作成一系列適當之 100 倍、1000 倍、10000 倍等稀釋檢液，其稀釋方法如下圖所示。



2.3.7. 塗抹物(Swab)檢體：將塗抹棒之頭部置於已滅菌試管內，以無菌操作折(剪)斷塗抹物木柄，添加蛋白胨緩衝液 5 mL 後，將試管蓋旋緊，於 10 秒內來回叩擊手心使其劇烈振盪(振盪幅度需達 15 公分) 50 次，或以旋渦混合器充分振盪至塗抹物頭部之棉絮鬆開，取溶出液供作檢液。

註： 1. 除肉製品使用蛋白胨稀釋液外，其他檢體以磷酸鹽緩衝溶液作為稀釋液。

2. 檢體總量不足 50 g (mL)時，應依檢體量，添加適量之稀釋液，作成 10 倍稀釋檢液。
3. 處理含油脂量多，不易勻散及易起泡沫之檢體時，應加入適量已滅菌之乳化劑(如 1% Tween 80)，並充分振搖，使之乳化。

2.4. 鑑別試驗

2.4.1. 分離培養

2.4.1.1. 直接平板法(Direct plate count method)

- 2.4.1.1.1. 將 2.3.節之稀釋檢液及(或)原液充分搖動，混合均勻。
- 2.4.1.1.2. 各吸取每一稀釋檢液及(或)原液 0.1 mL，分別置入 MYP 培養基平板，每一檢液至少做二重複，以塗抹曲棒均勻塗抹乾後，倒置於 30°C，培養 24~48 小時，觀察所形成菌落之生長狀態，必要時，應再行純化。
- 2.4.1.1.3. 仙人掌桿菌在 MYP 培養基的典型菌落為菌落中間部份通常為白色，邊緣為半透明、菌落周圍有濃厚沈澱之環帶(表示有卵磷脂酶之活性)，背景有明顯之粉紅色者為可疑仙人掌桿菌。
- 2.4.1.1.4. 選取含 15~150 個可疑仙人掌桿菌菌落之 MYP 培養基予以計數，並由前述培養基各鉤取至少 5 個可疑菌落，分別接種於 NA 斜面培養基，置於 30°C，培養 24 小時，供後續試驗使用。

2.4.1.2. 最確數(Most Probable Number，簡稱 MPN)計數法：預期檢體中仙人掌桿菌數低於 100 CFU/g 或 10 CFU/mL 時使用。

- 2.4.1.2.1. 將 2.3.節之稀釋檢液及(或)原液分別充分混合均勻。
- 2.4.1.2.2. 分別吸取 1 mL 接種於已裝有 15 mL 之 TSPB 培養液之試管中，每一檢液各接種 3 支(三階三支；為原液、10 倍、100 倍稀釋檢液時，每階試管含檢體量 1, 0.1, 0.01 (g 或 mL)；為 10 倍、100 倍、1000 倍稀釋檢液時，每階試管含檢體量 0.1, 0.01, 0.001 (g 或 mL))，於 30°C 培養 48±2 小時。
- 2.4.1.2.3. 從 2.4.1.2.2.節每一支呈混濁(細菌生長的現象)之 TSPB 培養液試管中各取一接種環菌量，劃線於 MYP 培養基，於 30°C 培養 24~48 小時。

2.4.1.2.4. 由每個有細菌生長的平板中，依照 2.4.1.1.4.節鉤取至少 5 個可疑菌落，分別接種於 NA 斜面培養基，置於 30°C，培養 24 小時。

2.4.2. 鏡檢(Microscopic examination)：自 2.4.1.節之 NA 斜面培養基鉤取可疑菌落，作革蘭氏染色及芽孢染色後鏡檢，其結果符合仙人掌桿菌典型反應者，則應自 NA 斜面培養基取 3 mm 接種環菌量，接種於裝有磷酸鹽緩衝溶液 0.5 mL 之試管中，以旋渦混合器混合均勻後，進行 2.4.3.節生化試驗。

2.4.2.1. 革蘭氏染色(Gram stain)

2.4.2.1.1. 鉤取菌體：加適量無菌生理食鹽水於載玻片上，以接種針(或環)自 2.4.1.1.4.節之 NA 斜面培養基上鉤取適量菌株，均勻塗抹成薄抹片，風乾後迅速通過火焰 3~4 次微熱固定，勿直接火烤。

2.4.2.1.2. 初染：將已固定之抹片，用哈克氏結晶紫液染 1 分鐘，水洗。

2.4.2.1.3. 媒染：加革蘭氏碘液作用 1 分鐘，水洗。

2.4.2.1.4. 脫色：用 95%乙醇洗至不再有紫色褪出時，再水洗，此步驟僅約 30 秒，惟視抹片之厚薄而定。

2.4.2.1.5. 複染：用哈克氏複染液複染 30 秒，水洗。

2.4.2.1.6. 風乾。

2.4.2.1.7. 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。仙人掌桿菌為革蘭氏陽性，菌體形成長或短鏈狀，芽孢為橢圓形，位於中央或微偏離中央位置，芽孢具薄壁，且不使菌體膨脹者。

2.4.2.2. 芽孢染色

依照 2.4.2.1.節製成薄抹片，經風乾及固定後，以孔雀綠染色液染色，並以微火溫和加熱 2~3 分鐘，但應避免染液蒸發，移走火焰，冷卻後以自來水沖洗，再加入沙黃 O 染色液染 30 秒後，以自來水沖洗，經自然乾燥後於油鏡下觀察，呈現綠色者為芽孢，呈現紅色者為營養菌體，仙人掌桿菌芽孢有明顯之綠色。

2.4.3. 生化試驗

2.4.3.1. 觸酶試驗(Catalase test)：自 2.4.1.節之 NA 斜面培養基鉤菌，塗抹於

載玻片上，加 3%過氧化氫溶液 1~2 滴，觀察有無氣泡產生，產生氣泡者為正反應，否則為負反應。仙人掌桿菌為正反應。

- 2.4.3.2. 厭氧下葡萄糖之利用(Anaerobic utilization of glucose)：自 2.4.2.節磷酸鹽緩衝溶液取 2 mm 接種環菌量，接種於酚紅葡萄糖培養液中，徐徐加入已滅菌之礦物油或石蠟油至高度約 2.5 公分後，於 35°C 培養 24 小時。培養液由紅色變成黃色者，為正反應，否則為負反應。仙人掌桿菌為正反應。
- 2.4.3.3. 硝酸鹽還原試驗(Reduction of nitrate)：自 2.4.2.節磷酸鹽緩衝溶液取 3 mm 接種環菌量，接種於硝酸鹽培養液中，於 35°C 培養 24 小時後，各加入亞硝酸鹽檢測試劑溶液 A 及溶液 B 各 0.25 mL，輕輕搖勻後觀察結果，10 分鐘內呈橘紅色者為正反應；顏色無變化時，加入少許鋅粉而有橘紅色呈現時，則為負反應，否則亦為正反應。仙人掌桿菌為正反應。
- 2.4.3.4. 歐普氏試驗(VP test)：自 2.4.2.節磷酸鹽緩衝溶液取 3 mm 接種環菌量，接種於歐普氏培養基中，於 35°C 培養 48±2 小時後，取培養液 1 mL 至另一已滅菌之試管中，加歐普氏試劑之溶液 A 0.6 mL 及歐普氏試劑之溶液 B 0.2 mL 後，再加入少許肌酸，輕輕搖勻，經 1 小時後觀察結果，呈現粉紅色者則為正反應，否則為負反應。仙人掌桿菌為正反應。
- 2.4.3.5. β -溶血性試驗(β -Hemolysis test)：用油性簽字筆在胰化酪蛋白—大豆—綿羊血培養基之培養皿底劃分成 6 至 8 等分區域，每區可接種一株菌，各區標示清楚後，自 2.4.2.節磷酸鹽緩衝溶液取 2 mm 接種環菌量，劃線於各區上，於 35°C 培養 24 小時。菌落生長的周圍有明顯透明環者，則為正反應；否則為負反應。仙人掌桿菌為正反應。
- 2.4.3.6. 酪胺酸分解試驗(Tyrosine decomposition test)：自 2.4.2.節磷酸鹽緩衝溶液取 3 mm 接種環菌量，接種於酪胺酸斜面培養基上，於 35°C 培養 48 小時。培養基斜面靠近菌落生長的部分呈透明者，表示酪胺酸已被分解，為正反應；否則為負反應，應再觀察 5 天。仙人掌桿菌為正反應。

2.4.3.7. 溶菌酶耐性試驗(Lysozyme-resistant test)：自 2.4.2.節磷酸鹽緩衝溶液取 2 mm 接種環菌量，接種於溶菌酶培養液及 NB 培養液(後者為對照組)，於 35°C 培養 24 小時。二者之培養液均呈混濁狀態者，則為正反應；否則為負反應，應再置於 35°C 培養 24 小時後觀察。仙人掌桿菌為正反應。

2.4.3.8. 運動性試驗(Motility test)：自 2.4.2.節磷酸鹽緩衝溶液取 3 mm 接種環菌量，穿刺接種於運動性試驗培養基中，深度約 3 mm，於 30°C 培養 18~24 小時，沿穿刺線呈放射狀生長者，為正反應，否則為負反應。大部分之仙人掌桿菌為正反應，部分仙人掌桿菌為負反應。

2.4.3.9. 蛋白質毒素晶體試驗(Protein toxin crystal test)：自 2.4.2.節磷酸鹽緩衝溶液取 3 mm 接種環菌量，接種於 NA 斜面培養基，於 30°C 培養 24 小時後，再置於室溫 2~3 天，在載玻片上滴一滴無菌水，取菌體製成薄抹片，風乾，通過火焰輕微加熱固定，冷卻後浸入甲醇中 30 秒，取出並傾掉載玻片上甲醇，自然風乾。浸入 TB 石碳酸復紅 ZN 染色液或鹼性復紅染色液，並以微火溫和加熱染色液至蒸氣出現，移走火焰，俟 1~2 分鐘後，再重複此步驟一次，放置 30 秒，再以自來水沖洗，經自然風乾，於油鏡下觀察是否產生游離芽孢及暗黑色的四角形或鑽石狀之毒素晶體，毒素晶體經常比游離芽孢稍小。仙人掌桿菌可產生游離芽孢，不產生毒素晶體。

2.4.3.10. 根狀生長試驗(Rhizoid growth test)：自 2.4.2.節磷酸鹽緩衝溶液取 2 mm 接種環菌量，接種於 NA 平面培養基(應盡量接種於培養基之正中央)，俟表面乾燥後，於 30°C 培養 24~72 小時。菌落呈現毛髮狀或根狀，且由接種處延伸數公分者，則為根狀生長。仙人掌桿菌不呈根狀生長。

2.5. 判定

仙人掌桿菌陽性者，應符合下表所列之結果。

試驗	正反應(+)	負反應(-)	仙人掌桿菌之反應
----	--------	--------	----------

鏡檢			
1. 革蘭氏染色	深紫色。菌體形成長或短鏈狀，芽孢橢圓形，在菌體中央或微偏離中央位置，芽孢具薄壁且不使菌體膨脹。	淡紅色	＋ ^(a)
2. 芽孢染色	芽孢呈明顯之綠色	營養菌體呈紅色	＋
觸酶試驗	有氣泡產生	無氣泡產生	＋
厭氧下葡萄糖利用試驗	黃色	原色	＋
硝酸鹽還原試驗	橘紅色	原色 ^(b)	＋
歐普氏試驗	粉紅色	原色	＋
溶血性試驗	透明環	無透明環	＋
酪胺酸分解試驗	透明	不呈透明	＋
溶菌酶耐性試驗	混濁	澄清	＋
運動性試驗	沿穿刺線呈放射狀生長	沿穿刺線無放射狀生長	± ^(c)
蛋白質毒素晶體試驗	產生四角形或鑽石狀之毒素晶體	不產生毒素晶體	—
根狀生長試驗	菌落呈毛髮狀或根狀	菌落不呈毛髮狀或根狀	—

(a) 「＋」表示 90%以上為正反應。

(b) 若無橘紅色產生時加入少許鋅粉，而有橘紅色呈現則為負反應，否則亦為正反應。

(c) 50～90%菌株為正反應。

2.6. 計數

2.6.1. 直接平板計數法菌數之計算：計算仙人掌桿菌數時，所選取的數個可疑菌落，經 2.4.2.節及 2.4.3.節試驗判定為仙人掌桿菌者，再依確定之比例計算。各稀釋倍數中僅有一種稀釋倍數培養皿之菌落數為 15～150 個，則應以該稀釋倍數之兩個培養皿之平均菌落數乘其稀釋倍數及判定的比例，即得其仙人掌桿菌數，其菌數之表示方式為 CFU/g 或 CFU/mL；但有兩稀釋倍數之培養皿之菌落數在 15～150 個之間時，則應依下列公式計算出平均菌落數再乘上稀釋倍數及判定為仙人掌桿菌

之比例。記錄仙人掌桿菌數時應將該數字第三位數字四捨五入，使其有效數為兩位。

仙人掌桿菌數 (CFU/g 或 CFU/mL) =

$$\left[\left(\frac{A_a + A_b}{2} \right) \times A \times \frac{Y_A}{X_A} + \left(\frac{B_a + B_b}{2} \right) \times B \times \frac{Y_B}{X_B} \right] \times \frac{1}{2}$$

A、B：稀釋倍數(當從 10 倍稀釋檢液吸取 0.1 mL，其稀釋倍數= 10 × 10 = 100 倍；當從 100 倍稀釋檢液吸取 0.1 mL，其稀釋倍數= 10 × 100 = 1000 倍)。

A_a、A_b：含 A 稀釋倍數各培養皿內之可疑仙人掌桿菌菌落數。

B_a、B_b：含 B 稀釋倍數各培養皿內之可疑仙人掌桿菌菌落數。

X_A、X_B：由 A 及 B 稀釋倍數各培養皿所鈎取之可疑菌落數。

Y_A、Y_B：由 A 及 B 稀釋倍數各培養皿所鈎取之可疑菌落數，經 2.5.節判定為仙人掌桿菌之菌落數。

2.6.2. 最確數計算：由 2.5.節判定為仙人掌桿菌之各階試管數，利用接種量為每試管 0.1, 0.01, 0.001 (g 或 mL)之三階三支最確數表(如附表)，計算出仙人掌桿菌之最確數(MPN/g 或 MPN/mL)。

附表：最確數表

正反應試管數			最確數 (MPN/g 或 MPN/mL)	95% 信賴界限		正反應試管數			最確數 (MPN/g 或 MPN/mL)	95% 信賴界限	
0.1*	0.01	0.001		下限	上限	0.1	0.01	0.001		下限	上限
0	0	0	< 3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420

正反應試管數			最確數 (MPN/g 或 MPN/mL)	95% 信賴界限		正反應試管數			最確數 (MPN/g 或 MPN/mL)	95% 信賴界限	
0.1*	0.01	0.001		下限	上限	0.1	0.01	0.001		下限	上限
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

*：各階試管中所含檢體量(g 或 mL)

說明：最確數表適用的接種量為各階試管含檢體 0.1, 0.01, 0.001 (g 或 mL)，當接種量不同時應乘或除倍率，換算公式為：

$$\text{最確數 MPN/g (MPN/mL)} = \frac{\text{最確數表之最確數}}{\text{第一階試管含檢體量} \times 10}$$

例如：經判定含有測試菌之正反應試管數為 3-1-0 時，對照最確數表之最確數為 43，

(1) 當接種量為各階試管含檢體 1, 0.1, 0.01 (g 或 mL)，推算出測試菌之最確數=

$$\frac{43}{1 \times 10} = 4.3 \text{ MPN/g (MPN/mL)}。$$

(2) 當接種量為各階試管含檢體 0.1, 0.01, 0.001 (g 或 mL)，推算出測試菌之最

$$\text{確數} = \frac{43}{0.1 \times 10} = 43 \text{ MN/g (MPN/mL)}。$$

(3) 當接種量為各階試管含檢體 0.01, 0.001, 0.0001 (g 或 mL)，推算出測試菌之

$$\text{最確數} = \frac{43}{0.01 \times 10} = 4.3 \times 10^2 \text{ MPN/g (MPN/mL)}。$$

2.7. 如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，其檢驗結果有爭議時，以本檢驗方法為準。

第二部：仙人掌桿菌之 real-time PCR 檢測

1. 適用範圍：本方法適用於仙人掌桿菌菌種及其腹瀉型毒素基因(*nheA*、*hblD*、*cytK*)、嘔吐型毒素基因(*ces*)之鑑別。
2. 檢驗方法：檢體之增菌液或經分離純化後之菌株，經 DNA 萃取後，以即時聚合酶鏈反應(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)進行鑑別之方法。
 - 2.1. 工作環境：工作平台需寬敞、潔淨、光線良好。檢體前處理、檢體 DNA 抽取、real-time PCR 試劑配製及 real-time PCR 等檢驗過程皆需有區隔空間，避免交叉污染。Real-time PCR 試劑之配製應於生物安全操作櫃內進行。
 - 2.2. 裝置^(註 1)
 - 2.2.1. 即時聚合酶鏈反應器：Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System，或同級品。
 - 2.2.2. 高壓滅菌釜。
 - 2.2.3. 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。
 - 2.2.4. 加熱振盪器：具溫控及振盪功能。
 - 2.2.5. 微量冷凍離心機(Micro refrigerated centrifuge)：可達 20000 ×g，並具 4°C 溫控功能。
 - 2.2.6. 離心機：供各式微量離心管離心用。
 - 2.2.7. 分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。
 - 2.2.8. 冷凍設備：具冷藏及凍結(-20°C)功能。
 - 2.2.9. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2.10. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
 - 2.2.11. 天平：最大稱重量為 2000 g，靈敏度為 0.1 g；最大稱重量為 100 g，靈敏度為 1 mg。
 - 註 1：本方法所使用或提及之產品品牌不代表為同類產品中最好者；反之，未使用或未提及之產品品牌亦不代表為同類產品中較差者。
 - 2.3. 試藥

2.3.1. DNA 抽取用：適用於革蘭氏陽性細菌 DNA 抽取之市售套組。

2.3.2. Real-time PCR 用^(註2)

2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探針

2.3.2.1.1. *Bacillus cereus* group (標的基因：*gyrB* gene)

引子 F：5'-GCCCTGGTATGTATATTGGATCTAC-3'

引子 R：5'-GGTCATAATAACTTCTACAGCAGGA-3'

探針 P：5'-(6FAM)-CCATTTTTCTTGTATACCAACT-(MGB)-3'

PCR 增幅產物大小 221 bp

2.3.2.1.2. Non-haemolytic enterotoxin, Nhe (標的基因：*nheA* gene)

引子 F：5'-TTATTGGTTACAGCAGTATCTACGA-3'

引子 R：5'-GATAATGTATTTGGAGCAATTACATTTTG-3'

探針 P：5'-(6FAM)-CTGTTTTCACCTTCTGTTTGCCCCTCCT-(BHQ1)-3'

PCR 增幅產物大小 119 bp

2.3.2.1.3. Hemolytic BL enterotoxin, Hbl (標的基因：*hblD* gene)

引子 F：5'-AGTTATTGCAGCTATTGGAGG-3'

引子 R：5'-GTCCATATGCTTAGATGCTGTGA-3'

探針 P：5'-(6FAM)-CTGTTGTTGGTGGACTCTCGGCT-(BHQ1)-3'

PCR 增幅產物大小 148 bp

2.3.2.1.4. Cytotoxin K, CytK (標的基因：*cytK* gene)

引子 F：5'-TGA CTTGACCAGTTGCAC-3'

引子 R：5'-ACAAATGCTGTAGAAGAAACGA-3'

探針 P：5'-(6FAM)-AGGGCCATTAGGCGTTACAGAAGCT-(BHQ1)-3'

PCR 增幅產物大小 121 bp

2.3.2.1.5. Emetic toxin Cereulide synthetase, Ces (標的基因：*ces* gene)

引子 F：5'-CGCCGAAAGTGATTATACCAA-3'

引子 R：5'-TATGCCCCGTTCTCAAACCTG-3'

探針 P：5'-(6FAM)-TGCATTTCTCGTTATTTTCCC-(BHQ1)-3'

PCR 增幅產物大小 103 bp

2.3.2.1.6. Crystal toxin (標的基因：*cryI* gene)

引子 F：5'-CATGATTCATGCGGCAGATAAAC-3'

引子 R：5'-TTGTGACACTTCTGCTTCCCATT-3'

探針 P：5'-(6FAM)-AAGCTTATCTGCCTGAGCTGTCTGT-(BHQ1)-3'

PCR 增幅產物大小 277 bp

註 2：合成之引子及探針，拆封後，以無菌去離子水稀釋成適當濃度，分裝後置於-20°C貯存備用，另探針需避光保存，探針 5'端採用 6-carboxy-fluorescein (FAM)標記，3'端採用 Black Hole Quencher-1 (BHQ1)標記。

2.3.2.2. TaqMan® Fast Reagents Starter Kit (適用於 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System)

本試劑內含 real-time PCR 所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，使用時添加引子、探針及待測檢體 DNA。

2.3.3. 對照用物質：仙人掌桿菌參考菌株或其 DNA 及蘇力菌(*Bacillus thuringiensis*)參考菌株或其 DNA。

2.4. 器具及材料^(註 3)

2.4.1. 微量吸管(Micropipette)：2 µL、10 µL、20 µL、100µL、200 µL 及 1000 µL。

2.4.2. 吸管尖頭(Pipette tip)：可滅菌。10 µL、20 µL、200 µL 及 1000 µL。

2.4.3. 離心管：200 µL、600 µL、1.5 mL 及 2 mL。

2.4.4. Real-time PCR 反應管：100 µL。

2.4.5. Real-time PCR 反應盤：具 96 個反應孔，適用於 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System。

2.4.6. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL 及 2000 mL。

註 3：使用之塑膠或玻璃器皿均為無 DNase 污染。

2.5. Real-time PCR 溶液^(註 4)

Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System 鑑別試驗用

5 µM 引子 F..... 2.0 µL

5 µM 引子 R..... 2.0 µL

5 μ M 探針.....	1.5 μ L
TaqMan® Fast Reagents Starter Kit.....	12.5 μ L
檢體 DNA 溶液.....	5.0 μ L
無菌去離子水.....	2.0 μ L
總體積.....	25.0 μ L

註 4：Real-time PCR 溶液應置於冰浴中配製。

2.6. 檢體 DNA 溶液之製備

2.6.1. 檢體增菌液之 DNA 溶液製備

自第一部 2.4.1. 節之培養液中，吸取菌液 1 mL，置入已滅菌之 1.5 mL 離心管中，以 15000 $\times$ g 離心 3 分鐘，去除上清液。

2.6.1.1. 直接煮沸法

將沉澱物加入無菌去離子水 1 mL，振盪混合均勻，以 15000 $\times$ g 離心 3 分鐘，去除上清液，續將沉澱物加入無菌去離子水 1 mL，振盪混合均勻，置入加熱振盪器中煮沸 10 分鐘，取出離心管，作為檢體 DNA 原液，置於-20°C 冷凍保存。

2.6.1.2. 抽取 DNA 法

採用適用於革蘭氏陽性細菌 DNA 抽取之市售套組，依套組操作說明步驟抽取 DNA。抽取之 DNA 溶液收集至已滅菌之 1.5 mL 離心管，作為檢體 DNA 原液，置於-20°C 冷凍保存。

2.6.2. 分離菌株之 DNA 溶液製備

自培養基上鉤取一接種環的菌量，置入含有 1 mL 無菌去離子水之已滅菌 1.5 mL 離心管中，振盪混合均勻，煮沸 10 分鐘，取出離心管，待冷卻後以 15000 $\times$ g 離心 3 分鐘，吸取上清液至另一已滅菌 1.5 mL 離心管，作為檢體 DNA 原液，置於-20°C 冷凍保存。亦可依 2.6.1.2. 節進行檢體 DNA 原液之製備。

2.6.3. DNA 濃度測定及純度判斷

取適量之檢體 DNA 原液，以無菌去離子水做適當倍數之稀釋，分別測定 260 nm 及 280 nm 之吸光值(O.D.)。以波長 260 nm 吸光值乘 50 ng/ μ L 及稀釋倍數，即為檢體 DNA 原液濃度。DNA 溶液純度則以

O.D.₂₆₀/O.D.₂₈₀ 比值作判斷，其比值應介於 1.7~2.0。

2.7. 鑑別試驗^(註 5)

2.7.1. Real-time PCR 操作步驟

以無菌去離子水適當稀釋檢體 DNA 原液、引子及探針備用。取已滅菌之 1.5 mL 離心管，依照 2.5. 節配製 real-time PCR 溶液，依序加入 TaqMan® Fast Reagents Starter Kit、稀釋過之引子及探針，混合均勻後，分裝 20 µL 入 real-time PCR 反應盤的反應孔中，各別加入檢體 DNA 溶液 5 µL，再將 real-time PCR 反應盤置於離心機中，以 200 ×g 瞬間離心，移入 real-time PCR 反應器，依下列條件進行反應。同時另製作正反應及負反應對照組。

2.7.1.1. 仙人掌桿菌菌種鑑別及毒素基因反應條件

步驟	溫度(°C)	時間(sec)
1. 熱活化	95	20
2. 最初變性	95	3
3. 黏接、延展	60	30
步驟 2 至步驟 3，共進行 45 個循環反應。		

2.7.2. Real-time PCR 螢光分析

檢體 DNA 經 real-time PCR 反應後，直接從 real-time PCR 反應器上之螢幕觀察探針所產生之螢光增幅曲線，即可判讀反應結果。同時另測試正反應及負反應對照組。

2.7.3. 確認

檢體 DNA 之 real-time PCR 增幅產物螢光分析圖與正反應對照組螢光分析圖進行相互比對，當檢體 DNA 與正反應對照組之 real-time PCR 螢光分析圖均出現經由探針所產生之螢光增幅曲線，即確認該 real-time PCR 增幅產物為標的基因片段。當 *Bacillus cereus* group 反應為正反應，Crystal toxin 反應為負反應時，菌種確認為仙人掌桿菌。當前述兩者皆為正反應時，則確認為蘇力菌。

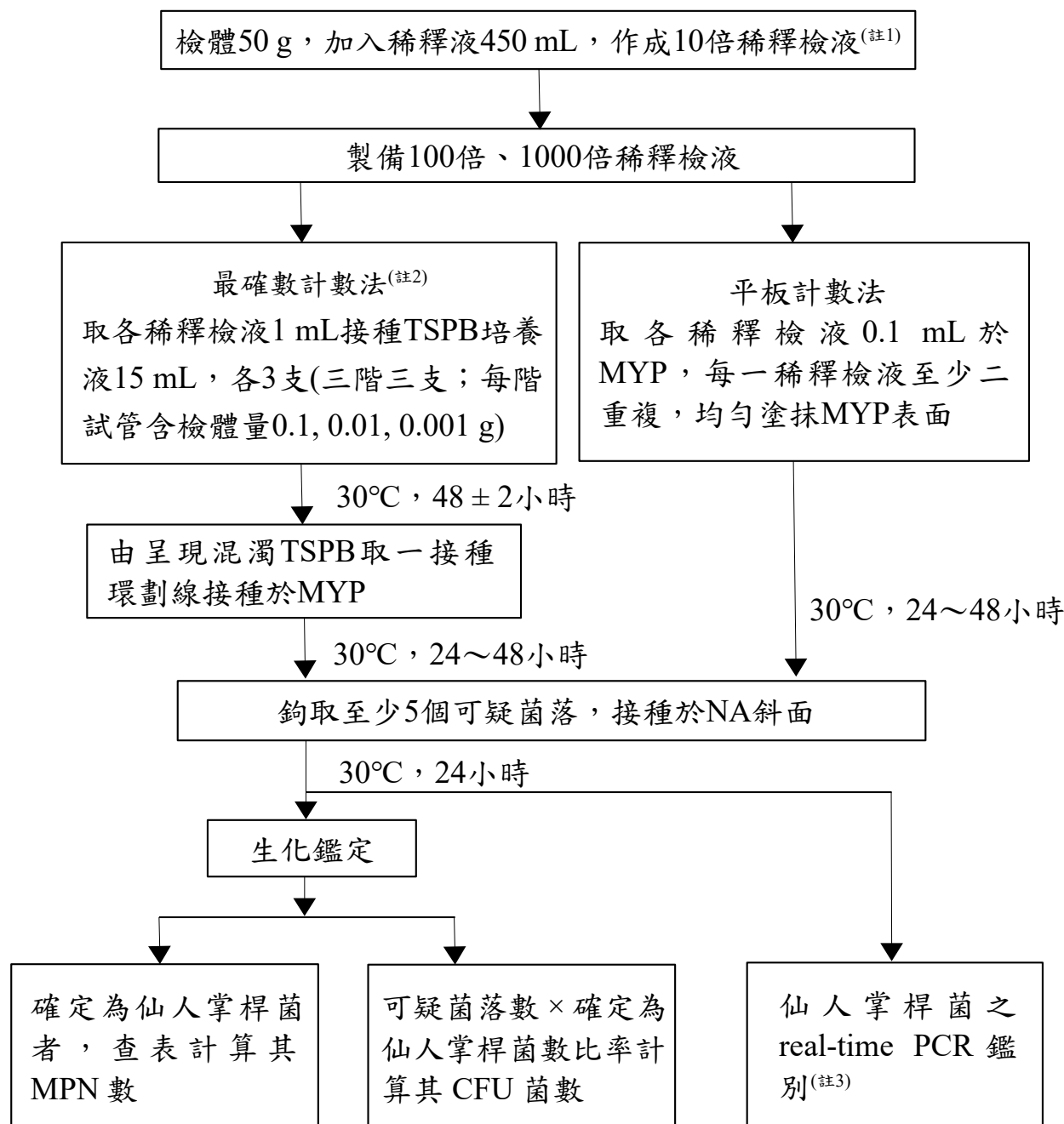
註 5：本 Real-time PCR 反應條件係採 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System 設定之，當使用其他機型時，應自行探討反應條件。

附註：第二部仙人掌桿菌之 real-time PCR 檢驗可視需要執行。

參考文獻

1. Sandra, M.T., E. J. Rhodehamel., Stanley, M. H., and Reginald, W. B., 2012. Bacteriological Analytical Manual Chapter 14 *Bacillus cereus*. US FDA.
2. Wehrle, E., Didier, A., Moravek, M., Dietrich, R. and Märklbauer, E. 2010. Detection of *Bacillus cereus* with enteropathogenic potential by multiplex real-time PCR based on SYBR Green I. Mol. Cell. Probes 24: 124-130.
3. Dzieciol, M., Fricker, M., Wagner, M., Hein, I. and Ehling-Schulz, M. 2013. A novel diagnostic real-time PCR assay for quantification and differentiation of emetic and non-emetic *Bacillus cereus*. Food Control 32: 176-185.
4. Fricker, M., Messelhäusser, U., Busch, U., Scherer, S. and Ehling-Schulz, M. 2007. Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. Appl. Environ. Microbiol. 73: 1892-1898.
5. Crighton, T., Hoile, R. and Coleman, N. V. 2012. Comparison of quantitative PCR and culture-based methods for evaluating dispersal of *Bacillus thuringiensis* endospores at a bioterrorism hoax crime scene. Forensic Sci. Int. 219: 88-95.

檢驗流程圖



註1：除肉製品使用蛋白腴稀釋液外，其他檢體通常以磷酸鹽緩衝液作為稀釋液。

註2：最確數(Most Probable Number，簡稱MPN)計數法：預期檢體中只含低菌量仙人掌桿菌時使用。

註3：可依檢體含菌量情況自行探討接續之real-time PCR之步驟及增菌時間，以達快速鑑別目的。