

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*

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 分鐘落菌數不超過 15 CFU/培養皿。
  - 2.2. 器具及材料
    - 2.2.1. 乾熱滅菌器。
    - 2.2.2. 高壓滅菌釜。
    - 2.2.3. 冰箱：能保持  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 。
    - 2.2.4. 培養箱：能維持內部溫度溫差在  $\pm 1^{\circ}\text{C}$  以內者。
    - 2.2.5. 水浴：能維持水溫溫差在  $\pm 1^{\circ}\text{C}$  以內者。
    - 2.2.6. 攪拌均質器(Blender)或鐵胃(Stomacher)：能適用於無菌操作者。
    - 2.2.7. 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。
    - 2.2.8. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
    - 2.2.9. 加熱器。
    - 2.2.10. 顯微鏡：能放大至 1000 倍之一般光學顯微鏡。
    - 2.2.11. 光源：日光燈。
    - 2.2.12. 吸管：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。
    - 2.2.13. 培養皿：已滅菌，內徑約 90 mm，深度約 15 mm，底皿之內外面應平坦，無氣泡、刮痕或其他缺點。
    - 2.2.14. 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。
    - 2.2.15. 試管：20 × 150 mm，13 × 100 mm 試管或其它適用者。
    - 2.2.16. 無菌濾膜：孔徑 0.45  $\mu\text{m}$  或以下之親水性醋酸纖維濾膜。
    - 2.2.17. 無菌棉花棒或塗抹棒。
    - 2.2.18. pH 測定儀。
    - 2.2.19. 載玻片及蓋玻片：適用於染色及鏡檢者。
    - 2.2.20. 接種針及接種環(直徑約 3 mm)：鎳鉻合金，鉑鈦或鉻線材質，或可拋棄式者。
    - 2.2.21. 針筒、藥勺、剪刀、小刀及鑷子：可滅菌或可拋棄式者。
    - 2.2.22. 吸管輔助器(Pipette aid)。
    - 2.2.23. 塗抹曲棒：可滅菌或拋棄式者，直徑 3~4 mm，塗抹端長 45~55

mm。

2.2.24. 濾紙、研鉢、杵。

2.2.25. 褐色試藥瓶：可盛裝 300 mL 以上者。

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)、 $\alpha$ -萘酚( $\alpha$ -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)、胨蛋白胨(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)及胨蛋白胨 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)

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，則以濾紙過濾。
- 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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. 0.01N 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 0.01N 鹽酸溶液 65 mL，加熱沸騰 20 分鐘，冷卻後以無菌 0.01N 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. 5N 醋酸溶液：取冰醋酸 28.63 mL，加水使成 100 mL。
- 2.2.27.13. 1N 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 1 L。
- 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 1N 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 多黏桿菌素 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-多黏桿菌素培養液 (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(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) .....	2.5 g
葡萄糖(dextrose) .....	2.5 g
蒸餾水.....	1000 mL

1.5 萬 unit/mL 多黏桿菌素 B 硫酸鹽溶液：

取 50 萬 unit 之多黏桿菌素 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
蛋白朊(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)

胨蛋白朊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。

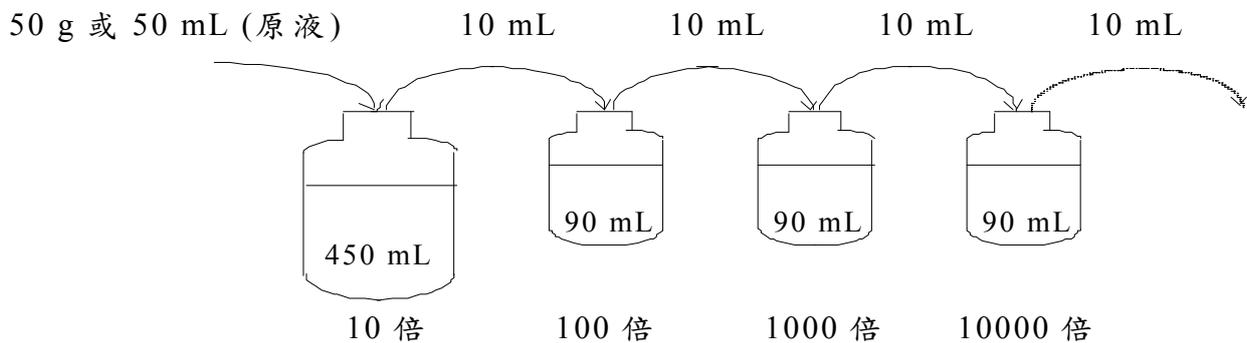
- 2.2.29.6. 硝酸鹽培養液(Nitrate broth)  
 牛肉抽出物(beef extract) ..... 3 g  
 蛋白胨(peptone) ..... 5 g  
 硝酸鉀(KNO<sub>3</sub>, 無亞硝酸鹽者) ..... 1 g  
 蒸餾水..... 1000 mL  
 加熱溶解後, 分取5 mL注入試管內, 以121°C滅菌15分鐘, 最終pH值為7.0±0.2。
- 2.2.29.7. 酪胺酸培養基(Tyrosine agar)  
 取2.2.30.3.節已滅菌營養培養基100 mL, 冷卻至48°C, 加入5%酪胺酸溶液10 mL, 一面混合均勻, 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(Lysozyme broth)  
 取2.2.30.3.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)  
 胨蛋白胨(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)  
 胰化酪蛋白胨(trypticase peptone) ..... 15 g  
 植物蛋白胨(phytone peptone) ..... 5 g  
 氯化鈉..... 5 g  
 洋菜(agar) ..... 15 g  
 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( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) ..... 2.5 g  
 洋菜(agar) ..... 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 100 倍、1000 倍、10000 倍等一系列稀釋檢液，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，添加蛋白腯緩衝液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，其溶

出液可供作檢液。

- 註：
1. 除肉製品使用0.1%蛋白腴稀釋液外，其他檢體以磷酸鹽緩衝溶液作為稀釋液，其次為生理食鹽水。
  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Tween 80，使其於檢液中濃度為1%)，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. 平板計數法：將2.3.節之各系列稀釋檢液及(或)原液充分搖動，混合均勻後，分別吸取0.1 mL，置入MYP培養基，每一稀釋檢液至少做二重複，以塗抹曲棒均勻塗抹培養基表面乾後，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。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。選取含15~150個可疑仙人掌桿菌菌落之MYP培養基予以計數，並由前述培養基各鈎取至少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。

### 2.4.1.2. 最確數(Most Probable Number, MPN)法

2.4.1.2.1. 當檢體中仙人掌桿菌數低於100 CFU/g或10 CFU/mL時，採用此法。

2.4.1.2.2. 分別吸取原液或2.3.6.節之10倍，100倍，1000倍等稀釋檢液1 mL，接種於裝有TSPB培養液之試管中，各階試管相對的含檢體量1，0.1，0.01，0.001 (g或mL)，每一檢液各接種3支(三階三支)，於30°C培養48±2小時，當TSPB培養液呈混濁狀，取一接種環菌量，劃線於MYP培養基，於30°C培養24~48小時，再依2.4.1.1.節鈎取至少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斜面培養基鈎取可疑菌落，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. 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.節之NA斜面培養基鉤取適量菌株，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。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。
- 2.4.3.3. 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。

- 2.4.3.4.  $\beta$ -溶血性試驗( $\beta$ -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。
- 2.4.3.5. 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。
- 2.4.3.6. 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。
- 2.4.3.7. 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。
- 2.4.3.8. 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。

2.4.3.9. 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	+( <sup>a</sup> )
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( <sup>b</sup> )	+
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	±( <sup>c</sup> )
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. 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<sub>a</sub>、A<sub>b</sub>：含 A 稀釋倍數各培養皿內之可疑仙人掌桿菌菌落數。

B<sub>a</sub>、B<sub>b</sub>：含 B 稀釋倍數各培養皿內之可疑仙人掌桿菌菌落數。

X<sub>A</sub>、X<sub>B</sub>：由 A 及 B 稀釋倍數各培養皿所鈎取之可疑菌落數。

Y<sub>A</sub>、Y<sub>B</sub>：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
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

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

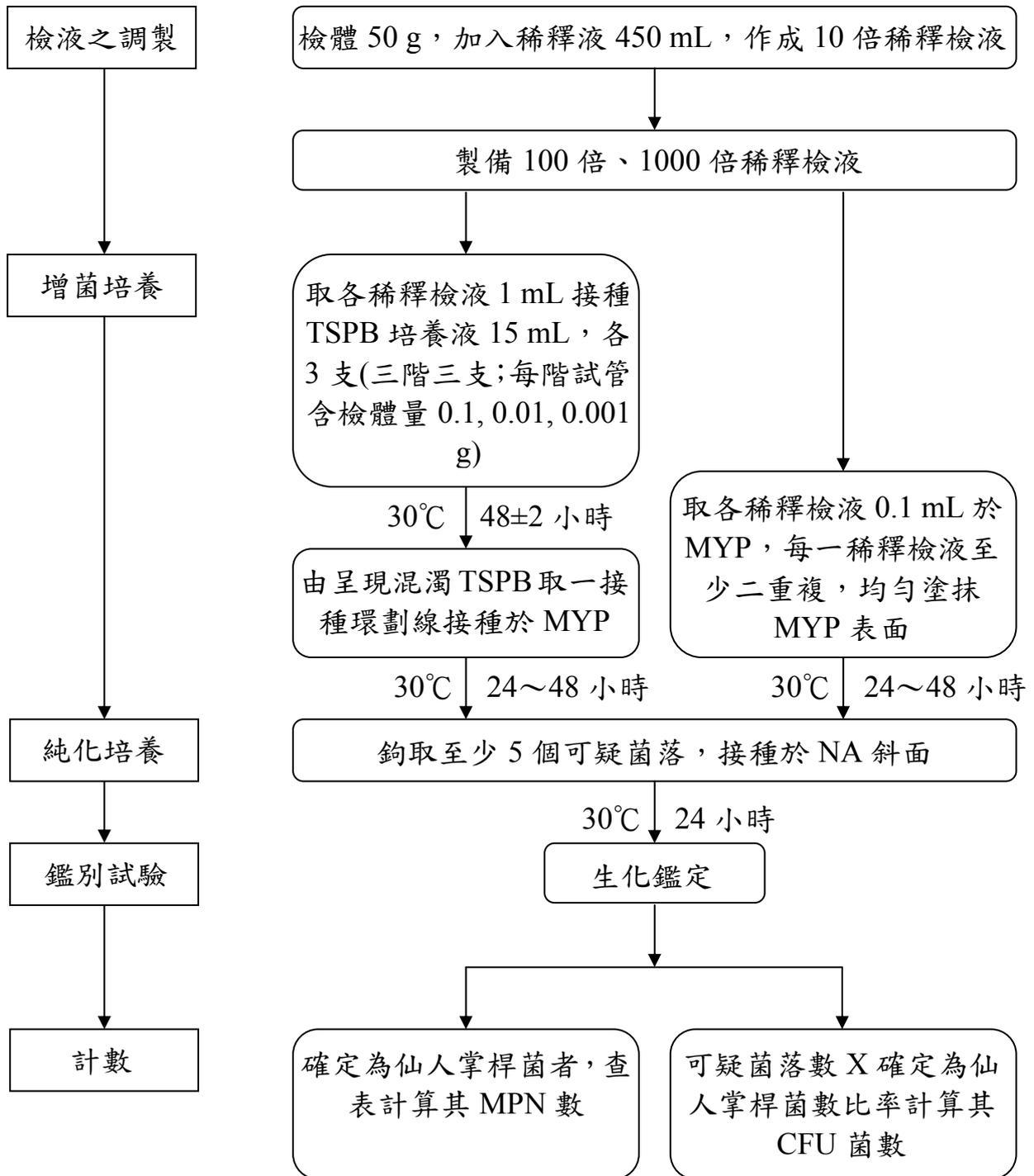
(2) 當接種量為各階試管含檢體 0.1, 0.01, 0.001 (g 或 mL)，推算出測試

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

(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

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

2.7. 檢驗流程圖



2.8. 可參考使用經確效認可之市售培養基、生化檢測套組或鑑定系統，惟檢驗結果有爭議時，應以本檢驗方法為準。