

仙人掌桿菌選擇性培養基之評估

林奇文 吳思靜 李冠樺 葉民煉 黃翠萍
林澤揚 許家銓 林美智 曾素香

衛生福利部食品藥物管理署 研究檢驗組

摘 要

仙人掌桿菌(*Bacillus cereus*, BC)為食品中毒常見之致病原，其發生率居台灣食品中毒案件之第三位。衛生福利部目前公告之檢驗方法係以甘露糖醇-蛋黃-多粘桿菌素(Mannitol-egg yolk-polymyxin, MYP) 培養基進行BC培養，但檢體中的背景菌群亦會於MYP培養基上生長而干擾BC之鑑別；因此，美國食品藥物管理局細菌學分析手冊(Bacteriological Analytical Manual, BAM)已增列使用選擇性培養基Bacara，該培養基可抑制背景菌群生長，進而提升BC之檢測準確性。本研究主要評估選擇性培養基Bacara對BC之檢測效能，包括靈敏度、專一性及回收率，並與MYP培養基作比較。結果顯示：Bacara培養基對BC之檢測靈敏度及專一性與MYP培養基相當，但前者抑制非BC菌株生長之比率(89.1%)明顯高於後者(18.8%)，表示Bacara培養基對BC之選擇性優於MYP培養基。當BC分別混合大腸桿菌或沙門氏桿菌培養時，Bacara培養基之BC回收率(94%-103%)與MYP培養基(96%-112%)無顯著差異，但當BC混合金黃色葡萄球菌時，Bacara培養基之BC回收率(100%)明顯高於MYP培養基(69%) ($p < 0.05$)，此乃因前者能有效抑制金黃色葡萄球菌而使BC生長不受干擾所致。將BC添加於5種食品基質(保久乳、白米飯、鮭魚炒飯、牛肉及青花菜)後分別培養於MYP及Bacara培養基，其BC回收率分別介於99-127%及104-131%間，兩培養基數值於各食品基質均無顯著差異。綜合以上結果，選擇性培養基Bacara對仙人掌桿菌具有優良的選擇性與檢測能力，且適用於各種食品基質中仙人掌桿菌之檢驗。

關鍵詞：仙人掌桿菌、Bacara培養基、MYP培養基、選擇性、靈敏度、專一性、回收率

前 言

仙人掌桿菌(*Bacillus cereus*, BC)廣泛分布於土壤、河川及海洋等自然環境中^(1,2)，其於土壤中含量可達 10^3 - 10^5 CFU/g⁽³⁾。由於動植物與土壤接觸頻繁，透過動植物原料可將BC散播至各類食品中，如：肉類、蔬菜、水果、乳製品、澱粉類食品、香料及醬料等^(4,5)。BC會

產生嘔吐型或腹瀉型毒素，當食入含有嘔吐型菌 10^3 - 10^5 CFU/g或腹瀉型菌 10^5 - 10^8 CFU/g之食品時，即會引發中毒症狀^(4,5)。在全世界食品中毒案件中，由BC所引起者佔1.4-12%⁽⁵⁾，於台灣則為4.2-6.6%⁽⁶⁻⁸⁾。若以確定病因的食品中毒案計算，在台灣BC中毒案佔10.9-15.6%，居第三位，僅次於諾羅病毒(2018-2021年)及金黃色葡萄球菌(2018-2019、2021年)或沙門氏桿菌

(2020年)⁽⁶⁻⁸⁾，故應了解BC的特性並採取必要的防範措施，以避免中毒。

BC為革蘭氏陽性桿菌，屬嗜氧菌或兼性厭氧菌，於4-50°C及pH 5.0-7.5環境下生長。其菌體具鞭毛，可運動，與形成菌落和生物膜(biofilm)有關⁽⁴⁾。生物膜如形成於食品生產線上，將增加BC污染食品之風險⁽⁹⁾。此外，在不良營養環境下，BC會形成內生孢子(endospore)，可耐受乾燥、熱、酸、輻射及酒精等物理化學刺激⁽¹⁰⁾而繼續存活，必須使用高溫高壓滅菌法才能消滅，或者先用催芽劑讓孢子發芽變成營養菌體，再進行滅菌⁽¹¹⁾。

BC引起的腸胃道疾病分為嘔吐型與腹瀉型，分別由不同毒素所引起，嘔吐型毒素為cereulide，腹瀉型毒素包括non-hemolytic enterotoxin (Nhe)、hemolysin BL (Hbl)及cytotoxin K (CytK) 3種⁽⁴⁾。嘔吐型BC主要由污染的澱粉類食物如米飯及麵攝入，潛伏期僅1-6小時即產生症狀，約6-24小時後緩解；腹瀉型BC則可見於各類食品中，食入後潛伏期較長，為8-16小時，約12-24小時後症狀緩解^(4,5)。在BC毒素基因及其致病機轉被大量研究下，已發現不同菌株所攜帶的毒素基因具有多變性^(5,12)。

目前，我國對食品中BC之檢測係依照106年衛生福利部所公告之檢驗方法⁽¹³⁾，包括傳統微生物培養鑑定法及real-time PCR檢測兩部分，前者為主要檢驗方式，後者則為輔助鑑定。微生物培養法乃參照美國食品藥物管理局細菌學分析手冊(Bacteriological Analytical Manual, BAM)使用甘露糖醇-蛋黃-多粘桿菌素(Mannitol-egg yolk-polymyxin, MYP)瓊脂做為BC之標準培養基⁽¹⁴⁾，但檢體中的背景菌群常於MYP培養基上生長而干擾BC之鑑定。近年來，有許多市售之選擇性呈色培養基利用多種抗生素抑制檢體背景菌群之生長，並將BC具有β-葡萄糖苷酶(β-glucosidase)和卵磷脂酶(lecithinase)的生化特性，分別以菌落呈色反應

和脂質沉澱環呈現⁽¹⁵⁻²⁰⁾，而BAM亦建議增列Bacara培養基以增加BC之檢測準確性。因此，本研究評估Bacara培養基對BC之檢測效能，以提供實證，作為增列此培養基於公告檢驗方法之參考。

材料與方法

一、儀器設備

生物安全操作櫃(NU-437-600, NuAire, USA)；恆溫培養箱(MIR-262及MIR-154, Sanyo, Japan)；振盪混合器(Velp-Wizard, Velp Scientifica, Italy)；菌液濁度計(Vitek DensiChek 422220, bioMérieux, France)；高壓滅菌釜(SX-700, Tomy, Japan)；電子天平(ML4002, Mettler Toledo, Switzerland)；加熱攪拌器(HTS-1003, LMS, Germany)；電動移液分注器(BS01-1000, Blue-Ray, ROC)；微量吸管(Pipet-Lite XLS, Rainin, USA)。

二、試藥與材料

(一)試藥：磷酸二氫鉀(Sigma-Aldrich, USA)、氯化鈉(Sigma-Aldrich, USA)；營養瓊脂(nutrient agar, NA) (BD, USA)、腦心浸出培養液(Brain heart infusion broth, BHI) (BD, USA)；MYP培養基(CMP, ROC)；Bacara培養基(bioMérieux, France)。

(二)材料：培養皿(內徑9 cm) (CBC, ROC)；Tip (10 µL、200 µL、1,000 µL) (Rainin, USA)；塑膠吸液管(5 mL、10 mL) (Biologix, China)；塑膠試管(12 × 75 mm) (bioMérieux, France)；離心管(15 mL、50 mL) (Corning, USA)；無菌棉花棒(CSD, ROC)；L型塗抹棒(CMP, ROC)；接種環(1 µL、10 µL) (Becton-Dickson, USA)。

(三)菌株：本研究包含靈敏度試驗、專一性試驗、混菌試驗及食品基質添加試驗，各試驗所使用之菌株如下：

1. 靈敏度試驗及專一性試驗菌株分別如表一及表二所列，共有3個來源：

(1)美國典型培養物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)：共21株。

(2)生物資源保存及研究中心(Bioresource Collection and Research Center, BCRC)：共4株。

(3)食品藥物管理署保存之食品檢體及環境檢體分離菌株：包括從食品中毒案、食品監測案及參與國際能力試驗檢體所分離菌株，共91株。

2. 混菌試驗及食品基質添加試驗使用之菌株：*Bacillus cereus* (*B. cereus*, ATCC 10876/0998Z)、*Escherichia coli* (*E. Coli*, ATCC 8739/0483Z)、*Staphylococcus aureus* (*S. Aureus*, ATCC 6538/0485Z)、*Salmonella typhimurium* (*S. Typhimurium*, ATCC 14028/0363Z) (Microbiologics, USA)。

(四)食品檢體：用於食品基質添加試驗，包括白米飯、保久乳、鮭魚炒飯、牛肉及青花菜(均於台北市大賣場購得)。

三、靈敏度試驗

取BC之標準/參考菌株及分離菌株共52株(表一)進行本項試驗，分離菌株(49株)來源為全國各地食品中毒案、食品監測案與國際能力試驗之食品檢體，以及食品中毒案之環境檢體，其中食品檢體(46株)佔94%且涵蓋9類食品，故這些分離菌株應具有一定的品系多樣性。將菌株接種於BHI培養液，置35°C培養18-24小時後，每一菌株培養液取10 µL分別接種於MYP及Bacara培養基，置30°C培養24小時後判讀各菌株之培養結果。BC於MYP培養基之典型生長特徵為：白色圓形菌落，菌落邊緣呈半透明，且菌落周圍具明顯之白色沉澱環(圖一A)；於Bacara培養基之典型生長特徵則為：橘色圓形菌落，菌落邊緣呈白色，其菌落周圍亦具明顯之白色沉澱環(圖一B)。試驗菌

表一、靈敏度試驗之仙人掌桿菌(*Bacillus cereus*)試驗菌株

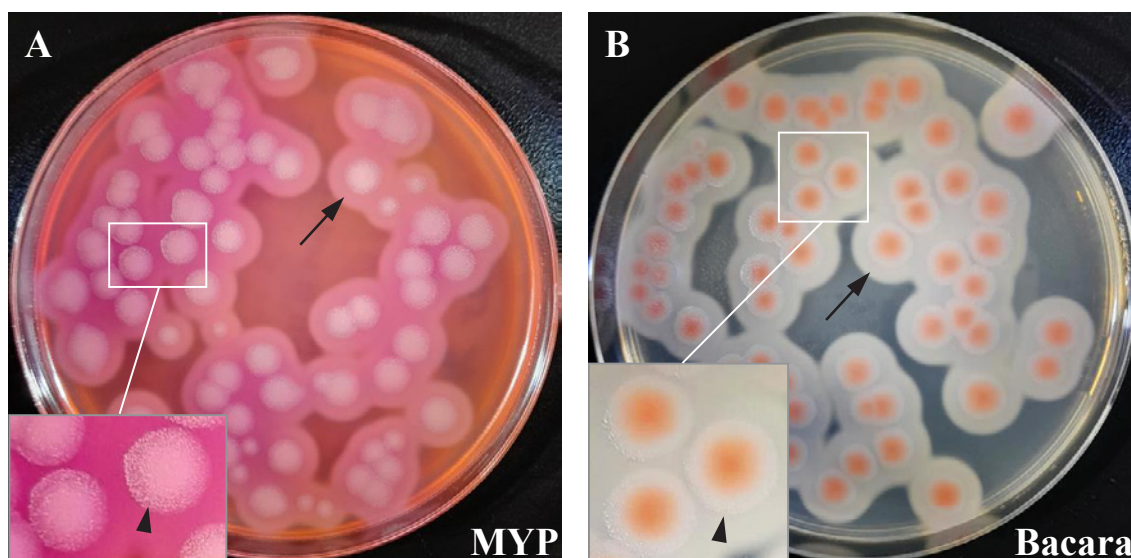
來源	菌株數	檢體種類	菌株編號
ATCC ^a	3	-	10876, 11778, 14579
食品檢體 ^b	3	禽肉類食品	B036, B088, B134
	4	紅肉類食品	B078, B102, B114, B133
	5	穀類食品	B004, B010, B011, B109, B123
	4	海鮮類食品	B086, B103, B197, B230
	5	蔬果類食品	B095, B096, B101, B111, B173
	1	乳類食品	B202
	1	飲料類食品	B125
	4	甜點類食品	B094, B158, B159, B233
	19	複合類食品 ^d	B012, B016, B025, B050, B057, B070, B076, B087, B110, B112, B113, B122, B130, B132, B166, B198, B199, B201, B203
	3	廚具拭子	B013, B045, B052
環境檢體 ^c	3	廚具拭子	B013, B045, B052
總菌株數		52	

^a美國典型培養物保藏中心

^b食品藥物管理署保存之食品檢體分離菌株

^c食品藥物管理署保存之環境檢體分離菌株

^d複合類食品為不同類別食品之混合，如便當、飯糰、鍋貼等



圖一、仙人掌桿菌之典型菌落特徵。A. 於MYP培養基上，仙人掌桿菌呈白色圓形菌落，菌落邊緣呈半透明(箭頭)，且菌落周圍具明顯之白色沉澱環(箭號)；然因細菌代謝產物使培養基變色，致菌落與沉澱環背景常呈現粉紅色。B. 於Bacara培養基上，仙人掌桿菌呈橘色圓形菌落，菌落邊緣呈白色(箭頭)，其菌落周圍亦具明顯之白色沉澱環(箭號)

株具以上典型菌落特徵者為陽性菌株，不生長或無典型菌落特徵者為陰性菌株，計算兩種培養基陽性菌株數占總測試菌株數的百分比，即為該培養基之檢測靈敏度。

四、專一性試驗

取非BC之*Bacillus*菌株31株及非*Bacillus*菌株33株共64株(表二)接種於BHI培養液，置35°C培養18-24小時後，每一菌株培養液取10 µL分別接種於MYP及Bacara培養基，置30°C培養24小時後，依圖一BC之典型菌落特徵判讀各菌株之培養結果，試驗菌株具典型菌落特徵者為陽性菌株，不生長或無典型菌落特徵者為陰性菌株，計算兩種培養基陰性菌株數占總測試菌株數的百分比，即為該培養基之檢測專一性。

五、混菌試驗

混菌試驗主要在測試其他菌種對BC於選擇性培養基生長之影響。將BC (ATCC 10876)分別與*E. coli* (ATCC 8739)、*S. aureus* (ATCC 6538)及*S. typhimurium* (ATCC 14028)等菌株依表三之比例及濃度混合於0.85% NaCl溶液中，取混合菌液0.1 mL分別塗抹接種於MYP及Bacara培養基(各3重複)，置30°C培養24小時後，計數各培養基BC菌落數並計算平均菌落數及回收率(recovery rate)。

$$\text{回收率(\%)} = \frac{\text{平均菌落數}}{\text{接種菌數}} \times 100\%$$

六、食品基質添加試驗

為了解不同食品基質對BC於Bacara培養基生長之影響，本研究使用白米飯、保久乳、鮭魚炒飯、牛肉及青花菜等5種食品進行BC添加試驗。將上述食品(保久乳除外)以121°C進

表二、專一性試驗之試驗菌株

菌名	菌株數	來源	菌株編號
<i>Bacillus</i> 菌株			
<i>Bacillus mycoides</i>	2	食品檢體 ^a	B007, B008
<i>Bacillus licheniformis</i>	4	食品檢體	B222, B224, B228, B234
<i>Bacillus pumilus</i>	5	食品檢體	B216, B220, B221, B225, B227
<i>Bacillus subtilis</i>	12	食品檢體	B207, B208, B209, B210 B211, B213, B214, B215 B218, B223, B226, B235
<i>Bacillus thuringiensis</i>	1	ATCC ^b	10792
<i>Bacillus thuringiensis</i>	4	食品檢體	B014, B015, B056, B131
<i>Bacillus vallismortis</i>	3	食品檢體	B212, B217, B219
非<i>Bacillus</i> 菌株			
<i>Aeromonas caviae</i>	1	ATCC	15468
<i>Citrobacter freundii</i>	1	ATCC	8090
<i>Citrobacter freundii</i>	1	食品檢體	C036
<i>Cronobacter sakazakii</i>	1	ATCC	12868
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	ATCC	13048
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	ATCC	13047
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	食品檢體	E438
<i>Enterobacter gergoviae</i>	1	食品檢體	E589
<i>Escherichia coli</i> (EHEC)	1	ATCC	43889
<i>Escherichia coli</i>	1	食品檢體	E590
<i>Escherichia hermannii</i>	1	食品檢體	E441
<i>Escherichia vulneris</i>	1	食品檢體	E479
<i>Hafnia alvei</i>	1	食品檢體	H001
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	ATCC	13182
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	食品檢體	K063, K072
<i>Khuyvera georgiana</i>	1	食品檢體	K073
<i>Listeria innocua</i>	1	ATCC	33090
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	ATCC	15313
<i>Morganella morganii</i>	1	食品檢體	M001
<i>Pantoea dispersa</i>	1	食品檢體	P019
<i>Proteus hauseri</i>	1	ATCC	13315
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	BCRC ^c	15541
<i>Salmonella bongori</i>	1	ATCC	43975
<i>Salmonella enterica</i>	1	ATCC	14028
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	ATCC	27592
<i>Shigella boydii</i>	1	ATCC	9207
<i>Shigella flexneri</i>	1	ATCC	9199

表二、(續)

菌名	菌株數	來源	菌株編號
<i>Shigella sonnei</i>	1	ATCC	25931
<i>Shigella spp.</i>	1	BCRC	15957
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	ATCC	12606
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	BCRC	10806
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	BCRC	10807

^a食品藥物管理署之食品檢體分離菌株

^b美國典型培養物保藏中心

^c生物資源保存及研究中心

表三、混菌試驗中各菌株混合比例與濃度

混合菌株	混合比例	1:10 ²	1:10 ³	1:10 ⁴	1:10 ⁵
<i>Bacillus cereus</i>		100	100	100	100
<i>Escherichia coli</i>		-	1 × 10 ⁵	1 × 10 ⁶	1 × 10 ⁷
<i>Staphylococcus aureus</i>		-	1 × 10 ⁵	1 × 10 ⁶	1 × 10 ⁷
<i>Salmonella typhimurium</i>		1 × 10 ⁴	1 × 10 ⁵	1 × 10 ⁶	-

混合菌液之濃度單位為CFU/mL，每種混菌比例係混合仙人掌桿菌(*Bacillus cereus*) (最終濃度均為100 CFU/mL)與另一種菌株(最終濃度如表中數字)，每一混合菌液各取0.1 mL分別塗抹接種於MYP及Bacara培養基(各3重複)。-：未試驗

行高壓滅菌15分鐘，置室溫中冷卻。以磷酸二氫鉀配製0.31 mM, pH 7.2之磷酸鹽緩衝液(Butterfield's phosphate-buffered dilution water, BPBW)做為檢體稀釋液，取1 g滅菌食品(包括保久乳)加入BPBW 8 mL，振盪混勻後於室溫靜置30分鐘，再加入BC菌液(ATCC 10876, 5,000 CFU/mL) 1 mL配製成500 CFU/mL之測試檢液。另以BPBW 9 mL添加BC菌液1 mL，做為對照檢液。上述BC菌液係取NA培養基上24小時菌落以0.85% NaCl先配製成5 × 10⁶ CFU/mL (相當於0.32 McFarland Unit)，再以0.85% NaCl做連續3次10倍稀釋而得。取測試檢液及對照檢液各0.1 mL，分別塗抹於MYP及Bacara培養基(各2重複)，置30°C培養24小時後，計數各培養基BC菌落數並計算平均菌落數及回收率。

$$\text{回收率(\%)} = \frac{\text{測試組平均菌落數}}{\text{對照組平均菌落數}} \times 100\%$$

七、數據計算與分析

BC之回收率以Mean ± SD表示，於混菌試驗中，每一混菌組合取2-3種混合比例之回收率計算平均值；於食品基質添加試驗中，各基質組取5次重複試驗之回收率計算平均值。各組數據以Student's *t*-test分析差異性，*p* < 0.05視為有統計學上的差異。

結果與討論

本研究評估了選擇性培養基Bacara對BC之檢測效能，並與傳統使用之MYP培養基作比較。評估項目包括靈敏度、專一性及回收率(包含混菌試驗和食品基質添加試驗)，其結果分述如下：

一、靈敏度試驗

表四、仙人掌桿菌培養基之專一性試驗

培養基	陽性菌株數	陰性菌株數		專一性
		有菌落	無菌落	
MYP	5 (7.8%)	47 (73.4%)	12 (18.8%)	92.2%
Bacara	7 (10.9%)	0 (0%)	57 (89.1%)	89.1%

試驗菌株包括31株非仙人掌桿菌之*Bacillus*菌株及33株非*Bacillus*菌株(詳見表二)；陽性：具典型仙人掌桿菌菌落；陰性：具其他非典型菌落或無菌落生長。專一性(%) = 陰性菌株數/(陽性菌株數+陰性菌株數) × 100%。括弧中為該類別菌株數占總試驗菌株數之百分比

全部52株BC測試菌株均能於MYP與Bacara培養基長出陽性菌落，靈敏度為100%，即兩種培養基均能靈敏檢測出BC。

二、專一性試驗

專一性試驗主要在測試非BC菌株是否會在MYP及Bacara培養基長出陽性菌落，即偽陽性試驗。本研究共測試64株菌，包括31株非BC之*Bacillus*菌株及33株非*Bacillus*菌株，其結果如表四。在MYP培養基中，僅5株*Bacillus*呈現粉紅色陽性菌落，其餘菌株則呈現陰性菌落(47株，占73.4%)或無生長(12株，占18.8%)，專一性達92.2%。Bacara培養基亦有7株*Bacillus*呈現橘色陽性菌落，其餘菌株則未生長，專一性為89.1%，雖與MYP培養基相近，但因Bacara培養基未生長之菌株比例約為MYP培養基的5倍，表示其抑制非BC菌株的能力遠優於MYP培養基。Bacara培養基對BC較佳的選擇性可能與其所含抗生素成分有關，雖然MYP培養基亦含抗生素polymyxin B，但似乎無法抑制本試驗所用的大部分菌株；因此，推測Bacara培養基可能含有2種以上的抗生素可抑制非BC菌株生長。

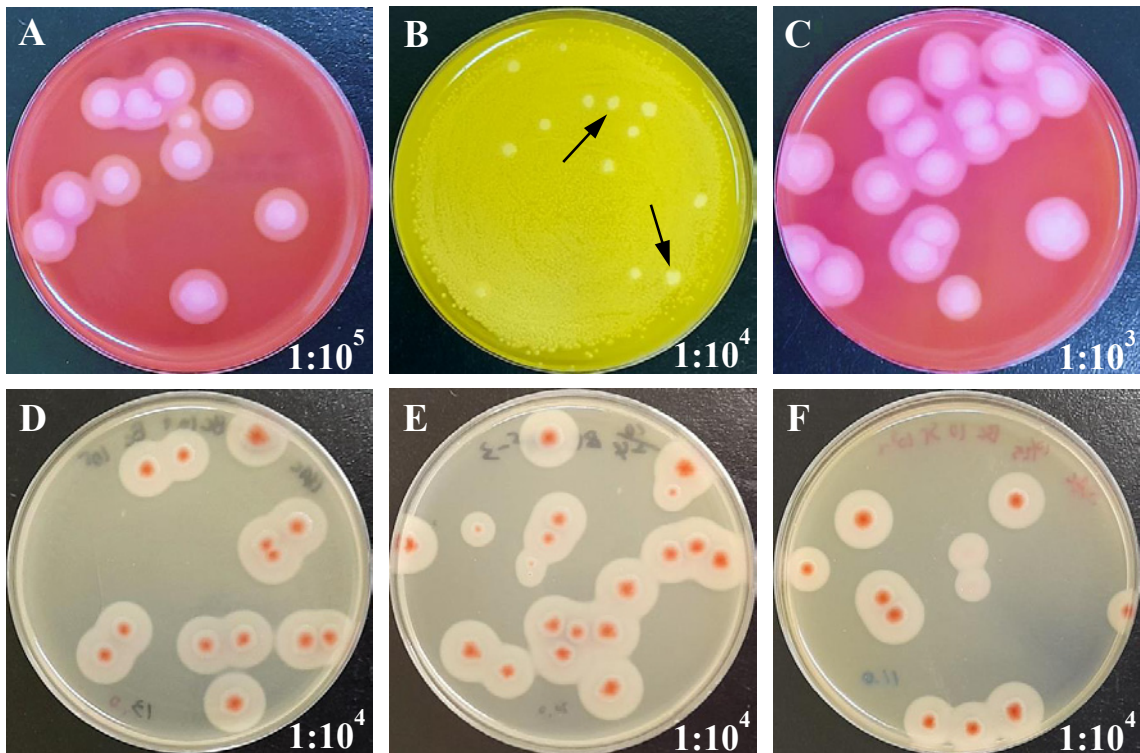
在MYP及Bacara培養基長出陽性菌落之菌株均為*B. Mycoides* (BM)和*B. thuringiensis* (BT)，兩者與BC同屬仙人掌桿菌群，因其生

化特性及菌落外觀相近，欲以這兩種培養基區分3者並不容易，須加做根狀生長試驗、毒素晶體染色及毒素基因檢測才能鑑別⁽¹³⁾。雖然歐洲食品安全局(EFSA)於2016年的報告指出仙人掌桿菌群有8株菌，但本專一性試驗僅測試BM和BT，係因此2株菌與BC為仙人掌桿菌群之主要分離菌株，佔了約88%⁽²¹⁾，而其他菌種則較為少見，故衛生福利部所公告之仙人掌桿菌檢驗方法亦只針對此3種菌作鑑別⁽¹³⁾。此外，Bacara培養基已經過國際確效並使用多年^(16,18,21)，且知悉無法單由選擇性培養基區分仙人掌桿菌群各菌種，必須做其他鑑定試驗才能鑑別⁽²¹⁾，而本研究也用BM和BT觀察到此現象，故雖未試驗同群其他菌種，亦可預期會有類似結果，應不影響對Bacara培養基效能之評估。

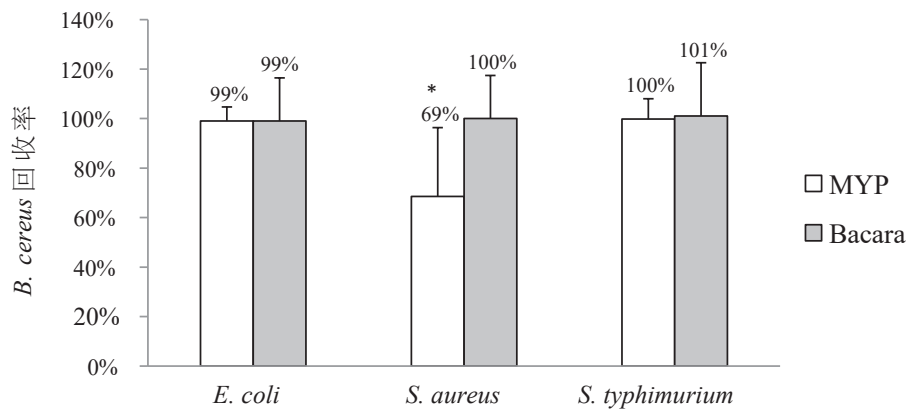
三、混菌試驗

為瞭解其他菌種對BC於Bacara培養基生長之影響，本研究選擇3株常見之食源性病原菌(*E. coli*、*S. aureus*及*S. typhimurium*)分別與BC以不同比例混合培養於MYP及Bacara培養基(表三)，其生長情形如圖二。BC與*E. coli*之混合比例為1:10³、1:10⁴及1:10⁵，經24小時培養後，*E. coli*於MYP及Bacara培養基均無生長(圖二A、D)，故不影響BC之生長，於兩種培養基之平均回收率均為99% (圖三)。BC與*S. typhimurium*之混合比例為1:10²、1:10³及1:10⁴，經24小時培養後，*S. typhimurium*於MYP及Bacara培養基亦均無生長(圖二C、F)，故亦不影響BC之生長，其平均回收率介於100-101%間，兩種培養基間並無顯著差異(圖三)。

BC與*S. aureus*之混合比例為1:10³、1:10⁴及1:10⁵，經24小時培養後，發現*S. aureus*於MYP培養基長出大量黃色菌落而抑制BC生長(圖二B)，但於Bacara培養基則受抑制而無生長(圖二E)，故BC於Bacara培養基之生長未受影響。因



圖二、仙人掌桿菌(*B. cereus*)之混菌試驗。 *B. cereus*分別與*E. coli* (A, D)、 *S. aureus* (B, E)及*S. typhimurium* (C, F)混合培養於MYP (A-C)及Bacara (D-F)培養基上，混合比例(*B. cereus*：混合菌)如各圖右下角標示。 *S. aureus*於MYP培養基長出大量黃色菌落而抑制*B. cereus* (箭號)生長(B)，但於Bacara培養基因受抑制而不影響*B. cereus*生長(E)。 *E. coli* (A, D)和*S. typhimurium* (C, F)在兩種培養基均被抑制，故不影響*B. cereus*生長



圖三、仙人掌桿菌(*B. cereus*)混菌試驗之回收率。菌株混合比例及濃度如表三。 *B. cereus*與*S. aureus*混合培養於MYP培養基之回收率明顯低於Bacara培養基(* $p < 0.05$)，但與*E. coli*及*S. typhimurium*混合培養時，兩培養基之回收率沒有差異。圖中每一長條為2-3種混合比例之回收率平均值

此，BC於MYP培養基之回收率($69\% \pm 28\%$)明顯低於Bacara培養基($100\% \pm 17\%$)，達統計上差異($p < 0.05$, t 檢定) (圖三)。*S. aureus*能於MYP培養基上生長係因不受培養基之抗生素抑制，且能利用其甘露糖醇(mannitol)所致。此結果顯示：當檢體中同時含有BC及金黃色葡萄球菌時，Bacara培養基比MYP培養基更適於檢測BC。

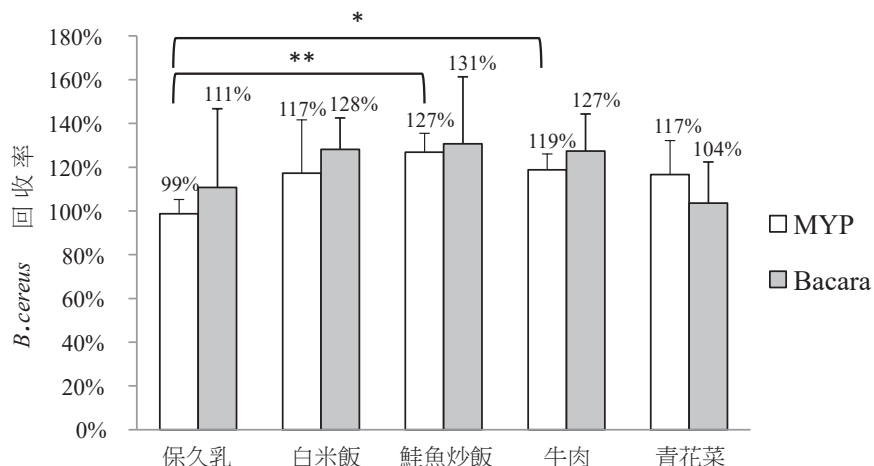
四、食品基質添加試驗

本研究使用白米飯、保久乳、鮭魚炒飯、牛肉及青花菜等5種食品進行BC (500 CFU/mL) 添加試驗，以了解不同食品基質對BC回收率之影響。於MYP培養基上，各基質之BC回收率介於99-127%間，其中牛肉($119\% \pm 7\%$)與鮭魚炒飯($127\% \pm 9\%$)之回收率明顯較保久乳($99\% \pm 6\%$)高(牛肉-保久乳： $p < 0.01$ ；鮭魚炒飯-保久乳： $p < 0.001$)，這可能因前兩者含有更多有利BC生長的因子所致；其餘各食品基質間之BC回收率沒有顯著差異(圖四)。

於Bacara培養基上，各基質之BC回收率介於104-131%間，且基質間並無統計差異(圖四)。此外，在這5種食品基質中，MYP及Bacara培養基之BC回收率均無差別。以上結果顯示：Bacara培養基可適用於不同食品中BC之檢測。

根據EFSA 2016年報告之統計數據，仙人掌桿菌食品中毒事件中較常見之原因食品為肉類、穀類、海鮮類、蔬果類、乳類及複合類食品⁽²¹⁾，而本研究所使用BC菌株之來源食品亦為以上類別，故於各類別(海鮮類除外)中分別選用一種食品進行前述基質添加試驗。除鮭魚炒飯之成分較為複雜外，其他試驗食品均為單一成分，希望藉此了解各單一基質及複合基質對MYP及Bacara培養基檢測效能之影響，結果所試驗基質均不影響BC之檢測。

本研究評估了選擇性培養基Bacara對檢測仙人掌桿菌之靈敏度、專一性、回收率與適用性，前兩項試驗結果顯示：Bacara培養基之檢測效能與傳統使用的MYP培養基相當，但其抑制非仙人掌桿菌群之菌種的能力遠優



圖四、食品基質添加仙人掌桿菌(*B. cereus*)之回收率。各食品基質添加*B. cereus* 500 CFU/mL後分別培養於MYP及Bacara培養基，結果於各基質中，兩培養基之*B. cereus*回收率均無顯著差異，但於MYP培養基中，牛肉與鮭魚炒飯之*B. cereus*回收率明顯較保久乳高(* $p < 0.01$ 及** $p < 0.001$)，其他各基質間回收率則均無顯著差異。圖中每一長條為5次重複試驗之平均值

於MYP培養基，具有較佳之仙人掌桿菌選擇性。混菌試驗亦顯示Bacara培養基對高濃度(10^6 - 10^7 CFU/mL)的致病菌(*E. coli*、*S. aureus*及*S. typhimurium*)仍具有抑制性，使少量的仙人掌桿菌(100 CFU/mL)能被檢測出來，而食品基質添加試驗也驗證了Bacara培養基對常見仙人掌桿菌污染的食品均能適用。本研究評估結果將可作為修訂仙人掌桿菌公告檢驗方法之參考，以提高仙人掌桿菌之檢驗效能。

參考文獻

1. Vilain, S., Luo, Y., Hildreth, M.B., and Brozel, V.S. 2006. Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4970-4977.
2. Bottone, E.J. 2010. *B. cereus*, a volatile human pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 23: 382-398.
3. Tewari, A. and Abdullah, S. 2015. *Bacillus cereus* food poisoning: international and Indian perspective. *J. Food Sci. Technol.* 52: 2500-2511.
4. Jessberger, N., Dietrich, R., Granum, P.E. and Märklbauer, E. 2020. The *Bacillus cereus* food infection as multifactorial process. *Toxins (Basel)*. 12:701. doi: 10.3390/toxins12110701.
5. Dietrich, R., Jessberger, N., Ehling-Schulz, M., Märklbauer, E. *et al.* 2021. The food poisoning toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins (Basel)*. 13:98. doi: 10.3390/toxins13020098.
6. 黃郁琄、林冠宇、林蘭珏、林旭陽等。2019。107年度臺灣食品中毒案件分析。食品藥物研究年報，10：409-414。
7. 顏捷凡、黃郁琄、林慧芬、江仟琦等。2021。108年度臺灣食品中毒案件分析。食品藥物研究年報，12：473-478。
8. 顏捷凡、邵芃茂、林慧芬、李婉嬪等。2023。109-110年度臺灣食品中毒案件概況。食品藥物研究年報，14：383-388。
9. Ryu, J.H. and Beuchat, L.R. 2005. Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxy-acetic acid-based sanitizer. *J. Food Prot.* 68: 2614-2622.
10. Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J. *et al.* 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 548-572.
11. Choi, W. and Kim, S.S. 2020. Outbreaks, germination, and inactivation of *Bacillus cereus* in food products: A review. *J Food Prot.* 83: 1480-1487.
12. Ehling-Schulz, M., Lereclus, D. and Koehler, T.M. 2019. The *Bacillus cereus* group: *Bacillus species* with pathogenic potential. *Microbiol. Spectr.* 7: 10.1128/microbiolspec.gpp3-0032-2018.
13. 衛生福利部。2017。食品微生物之檢驗方法－仙人掌桿菌之檢驗。106.05.11衛授食字第1061900908號公告修正。
14. Tallent, S.M., Knolhoff, A., Rhodhamel, E.J., Harmon, S.M. *et al.* 2020. Chapter 14: *Bacillus cereus*. *Bacteriological Analytical Manual*. [https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-14-bacillus-cereus].
15. Teramura, H., Otsubo, M., Saito, H., Ishii, A. *et al.* 2019. Comparative evaluation of selective media for the detection of *Bacillus cereus*. *Biocontrol Sci.* 24: 221-227.
16. Tallent, S.M., Kotewicz, K.M., Strain, E.A. and Bennett, R.W. 2012. Efficient isolation

- and identification of *Bacillus cereus* group. J. AOAC Int. 95: 446-451.
17. Kabir, M.S., Hsieh, Y.H., Simpson, S., Kerdahi, K. *et al.* 2017. Evaluation of two standard and two chromogenic selective media for optimal growth and enumeration of isolates of 16 unique *Bacillus* Species. J. Food Prot. 80: 952-962.
18. Fuchs, E., Raab, C., Brugger, K., Ehling-Schulz, M. *et al.* 2022. Performance testing of *Bacillus cereus* chromogenic agar media for improved detection in milk and other food samples. Foods. 11: 288. doi: 10.3390/foods11030288.
19. Juergensmeyer, M.A., Gingras, B.A., Restaino, L. and Frampton, E.W. 2006. A selective chromogenic agar that distinguishes *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. J. Food Prot. 69:2002-2006.
20. Reissbrodt, R., Rassbach, A., Burghardt, B., Rienäcker, I. *et al.* 2004. Assessment of a new selective chromogenic *Bacillus cereus* group plating medium and use of enterobacterial autoinducer of growth for cultural identification of *Bacillus* species. J. Clin. Microbiol. 42: 3795-3798.
21. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). 2016. Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. Including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. EFSA J. 14: 4524. doi: 10.2903/j.efsa.2016.4524.

Evaluation of Selective Media for *Bacillus cereus*

CHI-WEN LIN, SZU-CHING WU, KUAN-HUA LI, MIN-LIEN YEH,
TSUI-PING HUANG, CHE-YANG LIN, JIA-CHUAN HSU, MEI-CHIH LIN
AND SU-HSIANG TSENG

Division of Research and Analysis, TFDA, MOHW

ABSTRACT

Bacillus cereus (BC) is a common foodborne pathogen, ranking third in food poisoning outbreaks in Taiwan. According to the current detection method promulgated by Ministry of Health and Welfare, mannitol-egg yolk polymyxin agar (MYP) is used for culturing BC. However, the concurrent growth of background flora in samples can interfere with the accurate identification of BC. The U.S. FDA *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) has incorporated the use of selective medium Bacara, due to its advantageous inhibitory ability on the growth of background microorganisms and thus improvement of the detection accuracy for BC. In this study, the performance of Bacara medium for detecting BC, including sensitivity, specificity and recovery rate, was evaluated and compared with that of MYP. The sensitivity and specificity of Bacara were found comparable to those of MYP. However, Bacara demonstrated significantly higher selectivity; it inhibited the growth of 89.1% of non-BC strains tested, compared to just 18.8% on MYP. When BC was co-cultured with *Escherichia coli* or *Salmonella Typhimurium* in various proportions, there was no significant difference in recovery rates of BC between Bacara (94-103%) and MYP (96-112%). By contrast, co-culture of BC with *Staphylococcus aureus* led to a significantly lower recovery of BC on MYP (69%) compared to Bacara (100%) ($p < 0.05$), because the growth of *S. aureus* was flourishing on MYP but completely inhibited on Bacara. Spiking BC into five food matrices (long-life milk, rice, salmon fried rice, beef and broccoli) and culturing the spiked BC on MYP and Bacara generated BC recovery rates of 99-127% and 104-131%, respectively, with no significant difference between the two media. In conclusion, Bacara medium demonstrated excellent selectivity and was effective in the detection of *Bacillus cereus* across various food matrices.

Key words: *Bacillus cereus*, Bacara, MYP, selectivity, sensitivity, specificity, recovery