

平成15年10月  
厚生労働省医薬食品局  
食品安全部基準審査課

## セレウス菌に係る規格基準の設定について

### 1 経緯

セレウス菌による食中毒は欧米においても、肉類、スープ、米飯等によるものが多く、わが国でも米飯類で発生しているが、その症状は、下痢、嘔吐が主であり、食品衛生上特段の規制は行われていない。

他方、セレウス菌感染症と調製粉乳との因果関係は明らかにはなっていないが、近年、低出生体重児におけるセレウス菌感染症が報告され、重度の場合には、死亡例も報告されている。

### 2 わが国の規制

わが国では、乳・乳製品を含めセレウス菌についての食品中の規格基準は設定されていない。

### 3 諸外国の規制

諸外国における食品中のセレウス菌についての規格基準は以下のとおりである。

#### (1) 米国

セレウス菌についての食品の規格基準は設定されていないが、乳児におけるセレウス菌食中毒防止のため、乳児用調製粉乳に設定すべくパブリックコメントを本年6月末まで募集していた。

(規格案) 乳児用調製粉乳…セレウス菌 100/g 以下 (直接法又は MPN 法)

#### (2) オーストラリア

乳児におけるセレウス菌食中毒防止のため、乳児用調製粉乳に設定している。ただし、規格基準の変更のための移行期の基準がある。

2004 年 6 月まで。

乳児用調製粉乳・・・セレウス菌 1,000/g 以下 (5 検体中 4 検体は 100/g 以下であること。MPN 法)

2004 年 7 月以降

(乳児用調製粉乳・・・セレウス菌 100/g 以下 (5 検体中 3 検体は 10/g 以下であること。MPN 法))

### (3) EU、Codex

セレウス菌についての食品中の規格基準は設定されていない。

## 4 セレウス菌について

セレウス菌 (*Bacillus cereus*) は土壌細菌で、生活環境中に広く分布している。食品中では主に芽胞として存在するグラム陽性有芽胞桿菌である。セレウス菌による食中毒発生状況 (平成 12 年～平成 14 年) は次のとおりである。

	平成 14 年			平成 13 年			平成 12 年		
	事件	患者	死者	事件	患者	死者	事件	患者	死者
総数	6	29	0	8	443	0	10	86	0
乳類及びその加工品	-	-		-	-		1	5	0
穀類及びその加工品	3	17	0	3	17	0	3	23	0
豆類及びその加工品	-	-		-	-		1	21	0
菓子類	-	-		1	346	0	-	-	
複合調理食品	2	7	0	-	-		3	32	0
その他の食品 (食事特定)	1	5	0	3	73	0	1	3	0
不明	0	0	0	1	7	0	1	2	0

セレウス菌による食中毒は、下痢型と嘔吐型が知られている。発症には、一般成人の場合  $10^5/g$  以上の菌数が必要と考えられている<sup>1)</sup>が、乳児に対する発症菌量は明確にはなっておらず、成人より低いレベルで発症するものと考えられる。

溶解した調製粉乳を用いた増殖試験では、 $10^3/g$  レベルが  $26^{\circ}C$  で 24 時間以内に  $10^6/g$  レベルに増殖する<sup>2)</sup>。また、 $30^{\circ}C$  2 時間、 $10 \sim 12^{\circ}C$  24 時間で、 $3.2 \times 10^3/ml$  増加する<sup>3)</sup>ことから、調製粉乳を 100/g 以下にすることにより、前述の条件でも 1,000/ml 以下となり、食中毒は発生する可能性は少ないものと考えられる。

## 5 汚染実態

- (1) 国内の調製粉乳製造者が実施した調製粉乳中のセレウス菌汚染実態調査結果は以下のとおりである。

各調製粉乳中のセレウス菌の汚染実態（陽性件数／検査件数）

	調製粉乳 低出生体重児用	調製粉乳 一般乳児用	調製粉乳 フォローアップ <sup>®</sup> ミルク
直接法	0 / 17	0 / 33	0 / 15
MPN法	5* / 10	0 / 4	0 / 2

注：測定値 0.3～4.6/g

- (2) 社団法人日本乳業協会は、調製粉乳に対する自主基準を 100/g 以下と定め、低出生体重児医療機関に情報提供している。

## 6 今後の方向

調製粉乳について、米国、オーストラリアに準じて、セレウス菌の成分規格を設定すべく、食品安全委員会に健康影響評価を依頼する。

セレウス菌・・・100/g (MPN 法)

(参照文献等)

- 1) The International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) of the International Association of Microbiological Societies, Vol.5, 21-35, 1996
- 2) Federal Register, U.S.A, July 9, 1996 (Volume 61, Number 132)
- 3) Initial Assessment Report, Food Standards Australia New Zealand, Application A454, 19 March 2003

## 正誤表

### 資料 6－2 セレウス菌に係る規格基準の設定について

訂正箇所：2 ページの下から 2 行目	
正	100/g以下にすることにより10,000/ml以下となり、
誤	100/g以下にすることにより1,000/ml以下となり、

---

# MICRO- ORGANISMS IN FOODS

# 5

---

## MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS OF FOOD PATHOGENS

ICMSF

---



BLACKIE ACADEMIC & PROFESSIONAL

An Imprint of Chapman & Hall

London · Weinheim · New York · Tokyo · Melbourne · Madras

Co-published by James & James (Science Publishers) Ltd,  
Waterside House, 47 Kentish Town Road, London NW1 8NZ, and  
Blackie Academic and Professional, an imprint of  
Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London SE1 8HN, UK

---

Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London SE1 8HN, UK

Chapman & Hall GmbH, Pappelallee 3, 69469 Weinheim, Germany

Chapman & Hall USA, 115 Fifth Avenue, New York, NY 10003, USA

Chapman & Hall Japan, ITP-Japan, Kyowa Building, 3F, 2-2-1 Hirakawacho,  
Chiyoda-ku, Tokyo 102, Japan

Chapman & Hall Australia, 102 Dodds Street, South Melbourne,  
Victoria 3205, Australia

Chapman & Hall India, R. Seshadri, 32 Second Main Road, CIT East,  
Madras 600 035, India

---

First edition 1996

© 1996 ICMSF

Typeset in Times Roman 10/11 by Colset, Singapore

Printed in Great Britain by Clays Ltd, St Ives plc, Bungay, Suffolk

ISBN 0 412 47350 X

Apart from any fair dealing for the purposes of research or private study, or criticism or review, as permitted under the UK Copyright Designs and Patents Act, 1988, this publication may not be reproduced, stored, or transmitted, in any form or by any means, without the prior permission in writing of the publishers, or in the case of reprographic reproduction only in accordance with the terms of the licences issued by the Copyright Licensing Agency in the UK, or in accordance with the terms of licences issued by the appropriate Reproduction Rights Organization outside the UK. Enquiries concerning reproduction outside the terms stated here should be sent to the publishers at the London address printed on this page.

The publisher makes no representation, express or implied, with regard to the accuracy of the information contained in this book and cannot accept any legal responsibility or liability for any errors or omissions that may be made.

A catalogue record for this book is available from the British Library

## Bacillus cereus

### History

*Bacillus cereus* was first isolated and described in 1887 (Frankland and Frankland). Definite proof that this organism could cause foodborne illness came with the publications of Hauge (1950, 1955) who described four outbreaks, all involving vanilla sauce. These outbreaks, and those described by others over the ensuing 20 years, were characterized by watery diarrhoea occurring 8–16 h after ingestion of the food vehicle. These outbreaks are summarized in reviews by Goepfert *et al.* (1972), and Kramer and Gilbert (1989).

In 1971 an outbreak characterized by nausea and vomiting 1–5 h after ingestion of cooked rice was reported (PHLS, 1972). This report was met with scepticism but, as subsequent investigations were to document, certain strains of *B. cereus* are able to cause a 'staphylococcal-type' illness. It would now appear that this form of *B. cereus* food poisoning is more common than the type described originally by Hauge (Johnson, 1984).

Other species of *Bacillus*, including *B. subtilis* and *B. licheniformis*, have also been associated with foodborne disease, but definitive evidence is lacking to identify these organisms as foodborne pathogens. *B. subtilis* and *B. licheniformis* will not be addressed in this chapter, but information about them can be found in several review articles (Gilbert *et al.*, 1981; Kramer *et al.*, 1982; Kramer and Gilbert, 1989; Shinagawa, 1990).

### Taxonomy

The taxonomy of the bacilli could best be described as chaotic until the classic reports of Smith *et al.* (1946, 1952), which divided them into three groups based on spore and sporangium morphology. Group I bacilli (which includes *B. cereus*) are defined as having a sporangium that is not swollen by the spore. Within the group, subdivision of the species may be made on the basis of cell diameter. The large-celled species (including *B. cereus*) have cell diameters  $\geq 0.9 \mu\text{m}$ . The other large-celled Group I bacilli are *B. megaterium*, *B. anthracis*, *B. mycoides* and *B. thuringiensis*. Means of differentiation is shown in Table A and is described below.

### Symptoms

*B. cereus* food poisoning occurs after the ingestion of foods in which the organism has grown and formed its toxin(s). There are two types of intoxication. The first is characterized by diarrhoea occurring 8–24 h after the ingestion of large numbers of cells or toxin. The major symptom is diarrhoea, which is normally not severe, complete recovery typically occurring within 24 h. Large numbers of *B. cereus* organisms may be found in the faeces if samples are examined 1–2 days after ingestion of the food. The organisms are voided from the body quickly upon recovery.

The second type of intoxication is characterized by emesis occurring within a short period of time (1–6 h) after ingestion of the toxin. Again, the illness is relatively mild and recovery occurs within 12–24 h. Neither form of illness should be considered life-threatening to a normal healthy individual.

### Pathogenicity

Many strains of *B. cereus* elaborate a variety of extracellular metabolites, including toxins or virulence factors identified on the basis of their behaviour in animal models and their epidemiological association with diseases. These metabolites are produced mainly during the exponential phase of growth, and include a diarrhoeal enterotoxin (Spira and Goepfert, 1975; Turnbull *et al.*, 1979; Thompson *et al.*, 1984; Kramer and Gilbert, 1989), an emetic factor (Melling and Capel, 1978; Turnbull *et al.*, 1979; Kramer and Gilbert, 1989), a primary haemolysin (haemolysin I) (Turnbull *et al.*, 1979), a secondary haemolysin (haemolysin II) (Kramer and Gilbert, 1989), phospholipase C (Kramer and Gilbert, 1989) and an enterotoxin described by Ezechuk and Fluer (1973; Gorina *et al.*, 1975). The primary toxic metabolites of *B. cereus* have been described in a review by Kramer and Gilbert (1989).

The two forms of illness are principally caused by two significantly different moieties: the diarrhoeagenic toxin and the emetic toxin. The diarrhoeagenic factor (Thompson *et al.*, 1984; Kramer and Gilbert, 1989) is a protein with a molecular weight of about 38,000–46,000 and a pI of 5.1–5.6. The toxin is produced by actively growing cells and is inactivated by trypsin and pronase, as well as by exposure to 56°C for 30 min. The toxin is antigenic and can cause vascular permeability alterations in rabbit skin and dermonecrotic lesions in guinea pigs (Glatz *et al.*, 1974). The vascular permeability (VP) test correlates well with fluid-inducing activity in ligated ileal loops and is substantially easier to perform than the test for fluid-inducing activity in screening isolates for diarrhoeagenic activity. Interpretation of the zones of bluing and necrosis is the major problem with the VP assay (Thompson *et al.*, 1984). The toxin is also toxic to Vero cells and a high correlation has been observed between its toxic effects on Vero cells and a positive ligated ileal-loop assay (Thompson *et al.*, 1984). The toxin has been shown to have activity in the adenylyl cyclase-cyclic AMP system.

The mechanism of pathogenicity of the *B. cereus* diarrhoeagenic form of illness has not been clearly elucidated. Studies by Spira and Goepfert (1972) revealed that *B. cereus* cultures introduced directly into ilea did not elicit diarrhoea, and that fluid accumulation was associated with an increase in bacterial numbers within ileal loops, whereas cell numbers decreased for strains that were negative in this model. However, ileal loop-positive strains grown in broth before introduction into ileal loops failed to elicit a response following growth *in vivo*. It was concluded that the increase in cell numbers was a consequence rather than a cause of fluid accumulation; that intraluminal multiplication was not involved in fluid accumulation; and that *B. cereus*-induced diarrhoea was probably the result of an intoxication rather than infection.

Conversely, Thompson *et al.* (1984) determined through monkey feeding studies that diarrhoeal toxin is apparently degraded in the gastrointestinal tract. They observed that buffering systems (bicarbonate buffer followed by BHI) used in previous monkey feeding studies (Goepfert, 1974) caused diarrhoea in the absence of bacterial metabolism. The authors were not able to elicit diarrhoea using large amounts of crude or partially purified material in the absence of neutralizing buffer. They suggested that humans develop diarrhoea caused by *B. cereus* from toxin produced in the intestine after the ingestion of large numbers of bacterial cells. The relatively long incubation period (8–16 h) observed before the onset of diarrhoea substantiates this.

In contrast, the emetic toxin is a small peptide (mol. wt. < 5000) that is not antigenic, but is extraordinarily resistant to heat (126°C for 90 min), extremes in pH (2–11) and enzymatic digestion, i.e. refractory to both trypsin and pepsin (Melling and Capel, 1978). This toxin is produced well into the stationary phase of growth, and its association with sporulation is uncertain at this time. More rapid progress towards understanding the biology and pharmacology of the toxin is hampered by the present lack of a convenient assay method other than monkey feeding.

### Detection and enumeration

*B. cereus* food poisoning can presently be identified only by the isolation and enumeration of *B. cereus*, preferably in both the implicated food and the faeces or vomitus of the victims. Toxin analysis procedures are not yet widely available. Almost all procedures for the isolation and enumeration of *B. cereus* involve direct agar plating techniques. Many different plating media have been developed, based on the principle of providing conditions permitting the organism to exhibit haemolysis production, lecithinase activity, fermentation properties or morphological features characteristic of the species. Selective agents are usually incorporated to inhibit competitive microorganisms and facilitate enumeration.

Primary selective plating media generally use polymyxin B as the selective agent and rely on the expression of lecithinase on the egg yolk incorporated into the agar. The media most commonly used are mannitol-egg yolk-polymyxin agar (MYP) (Mossel *et al.*, 1967) or polymyxin-pyruvate-egg yolk mannitol-bromothymol blue agar (PEMBA) (Holbrook and Anderson, 1980). Dilutions of samples plated on MYP are incubated for 20–24 h at 30–32°C, and colonies typical of *B. cereus*, which have a dry, flat, 'ground-glass' appearance that may be translucent to creamy-white with a violet-red background surrounded by a readily visible zone of egg yolk precipitate, are counted. PEMBA exploits the mannitol-negative, lecithin-hydrolysing nature of *B. cereus*. After 18 h growth on PEMBA at 37°C, *B. cereus* forms flat, crenate to slightly rhizoid colonies that are turquoise to peacock-blue and have a 'ground-glass' surface appearance. Most strains have egg yolk precipitation reactions that form a zone up to 5 mm wide around each colony. Three or more presumptive colonies of *B. cereus* are transferred to nutrient agar and confirmed by



morphological and biochemical tests. Plating on blood agar is used primarily in the examination of faecal samples; on this medium characteristic bacillus-type colonies are surrounded by a zone of complete haemolysis.

### Identification

Very few organisms produce similar reactions on egg yolk - polymyxin-containing media to those elicited by *B. cereus*, hence differentiation from non-*Bacillus* species is rarely required. Specific identification of *B. cereus* requires only differentiation from *B. mycoides* (on the basis of colonial morphology), *B. thuringiensis* (*B. cereus* lacks a parasporal insect-toxic crystal), and *B. anthracis* (*B. cereus* is motile). Various biochemical tests can be used, but these are not as rapid or effective as the colonial and microscopic examinations already mentioned. Biochemical tests used for confirmation include the anaerobic production of acid from glucose, nitrate to nitrite reduction, acetylmethyl carbinol production, L-tyrosine decomposition, haemolysis, growth in the presence of 0.001% lysozyme, rhizoid growth, motility, susceptibility to gamma-phage (*B. cereus* negative, *B. anthracis* positive) and lack of fermentation of mannitol, arabinose or xylose after 5 days' incubation at 36°C (Lancette and Harmon, 1980; Kramer and Gilbert, 1989).

Serotyping of *B. cereus* strains from food-related outbreaks is important to achieving an understanding of the epidemiological aspects of outbreaks. A serotyping scheme for differentiating *B. cereus* strains on the basis of their flagellar antigens has been developed (Taylor and Gilbert, 1975; Gilbert and Parry, 1977; Kramer *et al.*, 1982). Twenty-three serotypes have been identified, but some are more frequently involved in outbreaks than others (Shinagawa, 1990). Although some strains remain untypable using existing antisera, about 70% of the strains that have been associated with emetic-type outbreaks are of serotype 1. In contrast, there is no consistent serotype pattern among the diarrhoeagenic types (Gilbert and Parry, 1977).

Biotyping using a combination of biochemical properties, including Voges-Proskauer reaction, nitrate reduction, citrate utilization, urea decomposition, starch hydrolysis and fermentation of sucrose and salicin, has also been a useful epidemiological tool (Kozasa *et al.*, 1977). Biotyping has not been standardized for routine use, hence its application is dependent on previously established individual criteria.

### Alternative methods

A *Bacillus* identification kit is available from Analytab Products, Inc. (API) (Plainview, New York, USA) that can rapidly confirm isolates of *B. cereus* from selective agars. Oxoid (Unipath Ltd, Basingstoke, Hampshire, UK) developed the BCET-RPLA kit that was designed to detect the presence of *B. cereus* diarrhoeal toxin by reverse passive latex agglutination. This kit was subsequently determined to lack specificity for *B. cereus* diarrhoeal toxin and yield false-positive results.

### Distribution in nature: importance in foods

*B. cereus* is widely distributed in nature. It is readily isolated from soil, dust, cereal crops, vegetation, animal hair, fresh water and sediments (Kramer and Gilbert, 1989). Consequently, it is not surprising to find the organism in or on virtually every raw agricultural commodity, although its presence and incidence in/on fish is not well established.

A survey by Nygren (1962) of the incidence of *B. cereus* in food materials revealed that 52% of 1546 food ingredients, 44% of 1911 cream and dessert dishes and 52% of 431 meat and vegetable products were contaminated, illustrating its widespread distribution. The organism is also a frequent contaminant of milk and dairy products, between 9 and 48% of such products, including UHT-treated (48%) milk, being contaminated with *B. cereus*.

The ability to form spores ensures survival through all stages of food processing short of retorting and the organism is present in most raw materials used in food manufacture. Under normal circumstances, *B. cereus* is found in food at concentrations  $<10^3$ /g and mostly  $<10^2$ /g. In such numbers, the organisms may be considered innocuous since the minimum level required to cause illness has been estimated to be  $>10^5$ /g (Hobbs and Gilbert, 1974).

Every well-documented report of *B. cereus* intoxication has described time/temperature abuse that has enabled relatively low (innocuous) levels of *B. cereus* in foods greatly to increase. In most incidents studied, the food vehicle has been a cereal or has contained cereal or spice ingredients.

Surveys have revealed 46–100% raw rice and 10–53% spices to be contaminated with *B. cereus* (Kramer and Gilbert, 1989). Cereal products frequently undergo processing, which greatly reduces the vegetative cell flora. They are also cooked before serving, which leaves a residual flora of spores. In the absence of competitive microorganisms, *B. cereus* is able to proliferate readily if the cooked product is held within the growth range of the organism. Therefore, primary control of this type of intoxication consists in prevention of time and temperature abuse, particularly in cooked products.

Any microorganism present in food and capable of causing illness must *a priori* be considered important. The number of incidents of *B. cereus* poisoning is increasing if considered globally. However, it must be remembered that it is only in the past 10–15 years that sufficient attention has been paid to this organism when investigating outbreaks of foodborne illness. Given the relative paucity of information available compared with that for more established foodborne illnesses, such as botulism, salmonellosis and staphylococcal intoxication, caution in attributing illness to *B. cereus* on finding elevated numbers of the organism in foods is advised. More knowledge is required about the growth of *B. cereus* with toxin production in foods and specific methods for detecting the toxin in food must be developed before true estimates of this foodborne illness can be made. Furthermore, the mild nature and short duration of the symptoms that characterize both forms of intoxication from *B. cereus* compared with the severity of other foodborne infections and intoxications relegate this organism to a status of lesser importance.

### Growth and survival characteristics

Strains of *B. cereus* vary widely in their growth and survival characteristics (Table B). Some strains are psychro-trophic, being able to grow at 4–5°C but not at 30–35°C, whereas other strains are mesophilic and can grow between 15°C and 50 or 55°C. The optimal temperature for growth ranges from 30 to 40°C (Table 1a). Similarly, the minimal pH for growth varies among strains and also depends on the acidulant; in general, growth does not occur at pH 4.8 in media acidulated with HCl, or at pH 5.6 in media acidulated with lactic acid (Table 3a).

The effect of water activity on the growth of food poisoning strains is not well documented. Present data indicate that *B. cereus* will not grow at  $a_w$  0.92–0.93 with NaCl as the humectant; however, the organism can grow at  $a_w$  0.93 but not at  $a_w$  0.92 in media containing glycerol as the humectant (Table 2). Although research is generally lacking on the effect of preservatives on *B. cereus*, 0.26% sorbic acid at pH 5.5 and 0.39% potassium sorbate at pH 6.6 are inhibitory of growth (Table 5b).

Destruction of the spores of *B. cereus* has been of concern to the food industry, and has received considerable attention. In general, the heat resistance of *B. cereus* spores is similar to that of most mesophilic spore-forming bacteria (Table 1c). However, there is considerable strain variability, the spores of a few strains having D-values at an equivalent temperature 15 to 20 times greater than spores of the most heat-sensitive strains. In addition, spores of *B. cereus* have no unusual resistance to irradiation (Table 4), or disinfectants compared with other spore-forming bacteria (Table 7).

The interactive effect of pH and water activity (NaCl concentrations) on the death of *B. cereus* has been studied by Raevuori and Genigeorgis (1975). Death is greatly influenced by both parameters; however, rates of death are relatively slow in substrates containing NaCl in brine concentrations  $\leq 5\%$  and having a pH of 6.1 or 7.5 (Table 8).

Data on the effect of many factors, such as pH and water activity, on growth are remarkably scanty. Research is needed in these areas to provide a more complete understanding of factors influencing *B. cereus* control in food environments.

Studies of the fate of *B. cereus* in bread-making have revealed that the addition of 0.2% calcium propionate to bread dough delayed germination of the organism and subsequent growth sufficiently to render the risk of food poisoning due to the presence of *B. cereus* in bread negligible (Kaur, 1985).

### Toxin characteristics and production

Methods for detecting *B. cereus* enterotoxins are neither highly specific nor quantitative. Hence, many of the data on these toxins are questionable. It has been reported that diarrhoeal toxin can be produced in ground beef and lasagna within 24 days at 4°C and within 12 days at 7°C; however, these studies will have to be confirmed using improved methods for detection. The optimal

temperature range for emetic toxin production in rice culture is 25–30°C (Melling and Capel, 1978).

The emetic toxin is heat stable and can withstand normal cooking procedures. Data are few, but the toxin has been reported to be thermostable at 126°C for 90 min (Turnbull *et al.*, 1979). In contrast, the diarrhoeal toxin is heat sensitive, and is inactivated by treatment at 56°C for 5 min.

### Control

Foods are commonly contaminated with *B. cereus* owing to the organism's widespread distribution in the environment. Their presence in small numbers (a few hundred cells per gram) is usually not a problem since ingestion of these low populations will not cause illness. Prevention of illness therefore requires the control of spore germination and the prevention of growth of vegetative cells in cooked, ready-to-eat foods.

Properly cooked foods, eaten hot soon after cooking, are safe. Most cooking procedures, including steaming under pressure, frying, grilling and roasting, will generally kill vegetative cells and, probably, spores. Cooking at temperatures of 100°C or below will allow the survival of some spores. Spore germination can be reduced greatly by low temperature, pH or  $a_w$ . The emetic toxin is not destroyed by cooking.

Cell multiplication during inadequate cooling of cooked cereal-based or protein-containing foods is a major concern. Conditions that favour *B. cereus* growth in foods include cooking procedures that activate spores followed by slow cooling and storage of large amounts of foods at temperatures between 10° and 50°C. Food to be stored should be cooled rapidly to a temperature that prevents the growth of *B. cereus*. Food to be held in a warm state should be maintained above 60°C.

Table A Taxonomic position of *Bacillus cereus* (aerobic, facultatively anaerobic, rod-shaped spore-formers, catalase-positive)

Group I	Group II	Group III
Sporangia not swollen by spore Small-celled bacilli, <0.9 µm cell diameter, non-vacuolated on glucose-nutrient agar	Sporangia swollen, oval spores	Sporangia swollen, round spores.
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>B. subtilis</i></li> <li>• <i>B. licheniformis</i></li> <li>• <i>B. pumilus</i></li> <li>• <i>B. coagulans</i></li> <li>• <i>B. firmus</i></li> <li>• <i>B. lentus</i></li> </ul>	Strictly aerobic: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>B. megaterium</i></li> </ul>	Large-celled bacilli, >0.9 µm cell diameter, vacuolated on glucose-nutrient agar  Facultatively anaerobic: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>B. cereus</i></li> <li>• <i>B. anthracis</i></li> <li>• <i>B. thuringiensis</i></li> <li>• <i>B. mycoides</i></li> </ul> Rhizoid growth: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>B. mycoides</i></li> </ul> Parasporal crystal: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>B. thuringiensis</i></li> </ul> Non-motile: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>B. anthracis</i></li> </ul> Motile: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>B. cereus</i></li> </ul>

Table B Limits for growth

	Minimum	Optimum	Maximum
Temperature (°C)	4	30–40	55
pH	5.0	6.0–7.0	8.8
Water activity	0.93	—	—

Growth limits for organisms under ideal conditions

Table 1a Temperature 1-55°C†

Substrate	Temp. (°C)	Growth (h/gen)	Growth (log/d)	Growth (descriptive)	pH	No. of strains	Ref.
10% tryptose <sup>a,b</sup>	30	0.31	—	—	7.0	1	1
2% soy flour <sup>a,b</sup>	30	0.31	—	—	7.0	1	1
2% peanut flour <sup>a,b</sup>	30	0.34	—	—	7.0	1	1
5% field pea flour <sup>a,b</sup>	30	0.32	—	—	7.0	1	1
Red lentils (soaking) <sup>b</sup>	22	6.6*	—	—	7.0	1	1
Red lentils (cooked) <sup>b</sup>	22	1.7*	—	—	7.0	1	2
Red lentils (soaking) <sup>b</sup>	37	2.8*	—	—	7.0	1	2
Red lentils (cooked) <sup>b</sup>	37	1.4*	—	—	7.0	1	2
Black-eye beans (soaking) <sup>b</sup>	37	3.6*	—	—	7.0	1	2
Kidney beans (cooked) <sup>b</sup>	22	1.7*	—	—	7.0	1	2
Rice + 10% beef extract	15	3.3*	—	—	7.0	4	3
Rice + 10% beef extract	25	0.66*	—	—	7.0	4	3
Rice + 10% beef extract	30	0.33*	—	—	7.0	4	3
Rice + 10% beef extract	35	0.25*	—	—	7.0	4	3
Rice + 10% beef extract	45	0.91*	—	—	7.0	4	3
Rice + 10% beef extract	55	NG	—	—	7.0	4	3
TSB	10	NG	—	—	7.0	4	3
TSB	15	2.1-3.2	—	—	7.0	4	3
TSB	25	0.74-0.98	—	—	7.0	4	3
TSB	30	0.48-0.76	—	—	7.0	4	3
TSB	35	0.43-0.65	—	—	7.0	4	3
TSB	40	0.30-0.52	—	—	7.0	4	3
TSB	45	0.58-3.1	—	—	7.0	4	3
TSB	50	NG (2 strains)	—	—	7.0	4	3
		2.4-3.6 (2 strains)	—	—	7.0	4	3
TSB	55	NG (1 strain)	—	—	7.0	4	3
		5.5-7.2 (3 strains)	—	—	7.0	4	3
Reconstituted milk	8	3.6*	—	—	—	1	4
Reconstituted milk	30	0.85*	—	—	—	1	4
Infant formula	8	3.6*	—	—	—	1	4
Infant formula	30	1.00*	—	—	—	1	4
Rice	23	0.48	—	—	—	1	5
Rice	43	0.68	—	—	—	1	5
Liver sausage	8	12.4*	—	—	5.9-6.1	1	6
Yeast extract phosphate broth plus glucose <sup>c</sup>	8	—	—	NG after 4 months	7.0	1	7
Yeast extract phosphate broth plus glucose <sup>c</sup>	12	—	—	Turbidity 4-5 d	7.0	1	7
Yeast extract phosphate broth plus glucose <sup>c</sup>	30	—	—	Turbidity 18-20 h	7.0	1	7
Skim milk	40	0.5*	—	—	6.6	Strain No. 7	8
Ground beef <sup>b</sup>	1	—	-1 log/> 14 d	Death	—	5	9
Ground beef <sup>b</sup>	4.5	—	-1 log/> 7 d	Death	—	5	9
Ground beef <sup>b</sup>	7	—	-1 log/> 5 d	Death	—	5	9
Ground beef <sup>b</sup>	12.5	—	-1 log/> 2 d	Death	—	5	9
Milk	30	0.44*	—	—	6.8	1	10
Pumpkin pie	4	—	—	NG/ND/84 h	—	1	11
Pumpkin pie	25	0.86*	—	—	—	1	11
Pumpkin pie	35	—	—	NG/ND/84 h	—	1	11
Boiled rice	22	0.43-0.84	—	—	—	8	12
Reconstituted dry milk	20	1.33*	—	—	—	—	13
Reconstituted dry milk	30	0.55*	—	—	—	—	13
BHI + 1% glucose	30	0.48*	—	—	6.8	4	14
BHI + 1% starch	30	0.55-0.60*	—	—	6.8	4	14

† Does not include psychrotrophic strains

\* Approximate growth rates from published data

<sup>a</sup> Additional ingredients include: (g/l) 10 glucose, 3.0 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.0 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>b</sup> Vegetative cells<sup>c</sup> Initial inoculum 1.3 x 10<sup>3</sup> CFU/ml

BHI, Brain Heart Infusion

NG/ND, no growth, no death

NG, no growth within 1 day

TSB, trypticase soy broth

1. Beuchat *et al.* (1980)
2. Blakey and Priest (1980)
3. Johnson *et al.* (1983)
4. Helmy *et al.* (1984)
5. Morita and Woodburn (1977)
6. Asplund *et al.* (1988)
7. Mol (1957)

8. Mikolajcik *et al.* (1973)
9. Goepfert and Klm (1975)
10. Wong *et al.* (1988)
11. Wyatt and Guy (1981)
12. Parry and Gilbert (1980)
13. Rodríguez and Barrett (1986)
14. García-Arribas and Kramer (1990)

Table 1b Temperature (toxin production) 4-30°C

Substrate	Temp. (°C)	Toxin type	Time to formation	Conc.	a <sub>w</sub>	pH	Other	Inoc. level (CFU/ml)	No. of strains	Ref.
BHI	25	Diarrhoeal*	—	≥ 2 ng/ml	—	—	Agitation (200 rpm)	—	71	1
Skim milk	21	Diarrhoeal*	—	15-65 ng/ml	—	—	Static	—	3	1
BHI + glucose	30	Tissue culture <sup>a</sup> toxicity	5-7 h	—	—	8.0	Static	10 <sup>4</sup>	45	2
Skim milk	30	Tissue culture <sup>a</sup> toxicity	7 h	—	—	6.6	Static	10 <sup>4</sup>	60	2
BHI + glucose	15	Tissue culture <sup>a</sup> toxicity	68-92 h	—	—	8.0	Agitation (200 rpm)	10 <sup>4</sup>	1	2
Skim milk	15	Tissue culture <sup>a</sup> toxicity	68-92 h	—	—	6.6	Agitation (200 rpm)	10 <sup>4</sup>	2	2
BHI + glucose	8	Tissue culture <sup>a</sup> toxicity	67 h	—	—	8.0	Agitation (200 rpm)	10 <sup>4</sup>	1	2
Skim milk	8	Tissue culture <sup>a</sup> toxicity	67-96 h	—	—	6.6	Agitation (200 rpm)	10 <sup>4</sup>	1	2
Whipped cream	8	Tissue culture <sup>a</sup> toxicity	72-96 h	—	—	7.4	—	10 <sup>4</sup>	1	2
Pasteurized milk	30	Tissue culture <sup>b</sup> toxicity	8 h	—	—	—	—	10 <sup>4</sup>	B4ac	3
Pasteurized milk + PO <sub>4</sub> buffer, pH 7.0	30	Tissue culture <sup>b</sup> toxicity	8 h	—	—	7.0	—	10 <sup>4</sup>	B4ac	3
BHI	30	Tissue culture <sup>b</sup> toxicity	16 h	—	—	—	—	10 <sup>4</sup>	1	3
BHI/milk	4	Diarrhoeal*	24 d	> 4 ng/g	1.0	5.8	—	10 <sup>1</sup>	—	4
BHI/milk	4	Diarrhoeal*	12 d	> 4 ng/g	1.0	5.8	—	10 <sup>1</sup>	—	4
BHI/milk	17	Diarrhoeal*	2 d	> 4 ng/g	1.0	5.8	—	10 <sup>1</sup>	—	4
Minced meat	4	Diarrhoeal*	24 d	> 4 ng/g	0.97	6.2	—	10 <sup>1</sup>	—	4
Minced meat	7	Diarrhoeal*	12 d	> 4 ng/g	0.97	6.2	—	10 <sup>1</sup>	—	4
Minced meat	17	Diarrhoeal*	2 d	> 4 ng/g	0.97	6.2	—	10 <sup>1</sup>	—	4
Lasagne	4	Diarrhoeal*	24 d	> 4 ng/g	0.95	5.8	—	10 <sup>1</sup>	—	4
Lasagne	7	Diarrhoeal*	11 d	> 4 ng/g	0.95	5.8	—	10 <sup>1</sup>	—	4
Lasagne	17	Diarrhoeal*	2 d	> 4 ng/g	0.95	5.8	—	10 <sup>1</sup>	NS	4
Rice meal	4	Diarrhoeal*	24 d	> 4 ng/g	0.97	6.3	—	10 <sup>1</sup>	NS	4
Rice meal	7	Diarrhoeal*	11 d	> 4 ng/g	0.97	6.3	—	10 <sup>1</sup>	NS	4
Rice meal	17	Diarrhoeal*	2 d	> 4 ng/g	0.97	6.3	—	10 <sup>1</sup>	NS	4
BHI	7	Diarrhoeal*	11 d	> 4 ng/g	—	—	—	ca. 10 <sup>3</sup>	3	4
BHI + glucose	30	VPR	6 h	—	—	6.8	Agitation (200 rpm)	10 <sup>5</sup>	4	5
BHI + starch	30	VPR	6 h	—	—	6.8	Agitation (200 rpm)	10 <sup>5</sup>	4	5
BHI + Tris-HCl	30	VPR	8-15 h	—	—	8.8	Agitation (200 rpm)	10 <sup>5</sup>	4	5
BHI + piperazine -HCl	30	VPR	8 h	—	—	5.0	Agitation (200 rpm)	10 <sup>5</sup>	4	5

\* A reverse passive latex agglutination assay with dubious specificity was used; results are questionable

<sup>a</sup> Tissue culture, HeLa, Vero, and human embryonic lung cells

<sup>b</sup> Tissue culture, Chinese Hamster Ovary cells

VPR, vascular permeability reaction activity

NS, not stated

1. Griffiths (1990)
2. Christiansson *et al.* (1989)
3. Wong *et al.* (1988)
4. van Netten *et al.* (1990)
5. Garcia-Arribas and Kramer (1990)

Table 1c Temperature 85-129.4°C

Medium	pH	Temp. (°C)	D (min)	z (°C)	a <sub>w</sub> (humectant)	Strain	Replicates	Method of heat/cool <sup>a</sup>	Recovery method	Ref.
0.25 M phosphate	7.0	85	33.8	9.7	—	T	6	RT/-0°C	TSA CC	1
0.25 M phosphate	7.0	85	106	13.9	—	1	6	RT/-0°C	TSA CC	1
0.25 M phosphate	7.0	85	34.4	6.9	—	1	6	RT/-0°C	TSA CC	1
0.06 M phosphate	7.0	95	2.6	10.0	—	1	—	—	NA CC	2
0.06 M phosphate	7.0	95	21.7	10.1	—	1	—	—	NA CC	2
Infant formula (milk-based)	6.3	95	2.7	8.1	—	1	—	—	NA CC	2
Infant formula (milk-based)	6.3	95	15.3	8.7	—	1	—	—	NA CC	2
Water	—	95	36	8.3	—	1	1	RT/-0°C	BA CC	3
Water	—	95	36	6.7	—	1	1	RT/-0°C	BA CC	3
Rice broth	7.0	100	6.3	—	—	1	—	RT/40°C	CC	4
Rice broth	7.0	100	4.2	—	—	1	—	RT/40°C	CC	4
Milk	—	95	1.8	9.4	—	—	—	—	—	—
Bread	—	95	2.9	—	—	1	—	RT/27.5°C	MYP CC	6
Bread	—	95	36.2	—	—	1	—	RT/27.5°C	MYP CC	6
Milk	—	95	3.0	—	—	1	—	RT	DNA-EY CC	7
Milk	—	95	19.1	—	—	<i>B. cereus</i> <i>var. albolactis</i>	—	—	—	—
0.05 M phosphate buffer	7.0	95	2.8	—	>0.995 (sorbitol)	T	—	RT	DNA-EY CC	7
	7.0	95	3.4	—	0.99 (sorbitol)	T	—	RT/-0°C	NA CC	8
	7.0	95	3.4	—	0.96 (sorbitol)	T	—	RT/-0°C	NA CC	8
	7.0	95	2.1	—	>0.995 (glycerol)	T	—	RT/-0°C	NA CC	8
	7.0	95	2.4	—	0.99 (glycerol)	T	—	RT/-0°C	NA CC	8
	7.0	95	2.4	—	0.91 (glycerol)	T	—	RT/-0°C	NA CC	8
	7.0	95	2.9	—	>0.995 (NaCl)	T	—	RT/-0°C	NA CC	8
	7.0	95	3.0	—	0.99 (NaCl)	T	—	RT/-0°C	NA CC	8
	7.0	95	2.9	—	0.96 (NaCl)	T	—	RT/-0°C	NA CC	8
0.067 M phosphate buffer	7.0	115.6	0.13— 11.3	7.9—9.9	—	—	2	37.8°C/ I-0°C	DTA CC	9
	7.0	121.1	0.03— 2.35	7.9—9.9	—	—	2	37.8°C/ I-0°C	DTA CC	9
	7.0	126.7	0.30	7.9	—	—	2	37.8°C/ I-0°C	DTA CC	9
	7.0	129.4	0.24	7.9	—	—	2	37.8°C/ I-0°C	DTA CC	9
Distilled water	—	100	5.5	9.7	—	1	5	RT/-0°C	AA med CC	10
Distilled water	—	115	0.13	9.7	—	1	5	RT/-0°C	AA med CC	10

(continued)

Table 1c Temperature 85–129.4°C (continued)

Medium	pH	Temp. (°C)	D (min)	z (°C)	a <sub>w</sub> (humectant)	Strain	Replicates	Method of heat/cool <sup>a</sup>	Recovery method	Ref.
Phosphate buffer	7.0	85	220	—	—	1	—	RT/I–0°C	TGEA CC	11
Phosphate buffer	7.0	90	71	—	—	1	—	RT/I–0°C	TGEA CC	11
Phosphate buffer	7.0	95	13	—	—	1	—	RT/I–0°C	TGEA CC	11
Phosphate buffer	7.0	100	8	—	—	1	—	RT/I–0°C	TGEA CC	11
Soybean oil	—	112	46.5	—	—	1	—	RT/I–0°C	TGEA CC	11
Soybean oil	—	121	30	—	—	1	—	RT/I–0°C	TGEA CC	11
Olive oil	—	121	17.5	—	—	1	—	RT/I–0°C	TGEA CC	11
Triolein	—	112	14	—	—	1	—	RT/I–0°C	TGEA CC	11
Triolein	—	121	10	—	—	1	—	RT/I–0°C	TGEA CC	11
Liquid paraffin	—	112	21	—	—	1	—	RT/I–0°C	TGEA CC	11
Liquid paraffin	—	121	8	—	—	1	—	RT/I–0°C	TGEA CC	11
Pumpkin pie	—	100	40	—	—	1	—	RT/I–0°C	TGEA CC	11
Pumpkin pie	—	108	10.5	—	—	1	—	RT/I–0°C	KG CC	12
Pumpkin pie	—	124	7	—	—	1	—	RT/I–0°C	KG CC	12
Distilled water	—	95	1.5–9.5	—	—	15	—	RT/I–0°C	KG CC	12
Distilled water	—	95	24.0–36.2	—	—	10	—	RT/I–0°C	BA CC	13
Distilled water	—	95	16.2–19.7	—	—	2	—	RT/I–0°C	BA CC	13

<sup>a</sup> RT, spores heated from or cooled to ambient temperature; I–0°C, vessel of heated spores cooled in ice water; other temperatures, temperatures used to cool heated spores

T, *B. cereus* strain T – not known to be associated with illness

TSA, tryptone soya agar

CC, colony counts

NA, nutrient agar

BA, blood agar

MYP, mannitol egg yolk polymyxin agar

DNA-EY, (Difco) Nutrient Agar + 1% NaCl + 0.5 ml 10% sodium citrate + 0.5–1 ml Oxoid egg yolk emulsion

DTA, dextrose tryptone agar

AA, antibiotic assay

TGEA, tryptone glucose extract agar

KG, egg yolk polymyxin medium of Kim and Goepfert (1971)

1. Johnson *et al.* (1982)
2. Rajkowsky and Mikolajcik (1987)
3. Gilbert *et al.* (1974)
4. Chung and Sun (1986)
5. Shehata and Collins (1972)
6. Kaur (1986)
7. Stadhouders *et al.* (1980)
8. Jakobsen and Murrell (1977)
9. Bradshaw *et al.* (1975)
10. Briggs (1966)
11. Molin and Snygg (1967)
12. Wyatt and Guy (1981)
13. Parry and Gilbert (1980)

Table 2 Water activity

Medium	Strain	$a_w$	Humectant	Growth	Temp. (°C)	pH	Ref.
TGE broth	NCTC2603 <sup>a</sup>	0.96	NaCl	Growth at 24 h	30	7	1
TGE broth	NCTC2603 <sup>a</sup>	0.95	NaCl	Growth at 72 h	30	7	1
TGE broth	NCTC2603 <sup>a</sup>	0.96	KCl	Growth at 24 h	30	7	1
TGE broth	NCTC2603 <sup>a</sup>	0.95	KCl	Growth at 72 h	30	7	1
TGE broth	NCTC2603 <sup>a</sup>	0.97	Fructose	Growth at 24 h	30	7	1
TGE broth	NCTC2603 <sup>a</sup>	0.95	Glucose	Growth at 24 h	30	7	1
TGE broth	NCTC2603 <sup>a</sup>	0.94	Sorbitol	Growth at 24 h	30	7	1
TGE broth	NCTC2603 <sup>a</sup>	0.94	Erythritol	Growth at 24 h	30	7	1
TGE broth	NCTC2603 <sup>a</sup>	0.94	Glycerol	Growth at 24 h	30	7	1
TGE broth	NCTC2603 <sup>a</sup>	0.93	Glycerol	Growth at 72 h	30	7	1
TGE broth	NCTC2603 <sup>a</sup>	0.95	DMSO	Growth at 24 h	30	7	1
TGE broth	NCTC2603 <sup>a</sup>	0.94	DMSO	Growth at 72 h	30	7	1
BHI broth (1/4 strength)	C3 and 5B	0.92	Glycerol	No growth at 28 d	30	—	2
BHI broth (1/4 strength)	C3 and 5B	0.92–0.93	NaCl	No growth at 28 d	30	—	2
Potato extract– yeast extract– glucose broth	—	0.92	NaCl	No growth	37	—	3

<sup>a</sup> *B. cereus* var. *mycoides*

TGE, tryptone glucose extract

DMSO, dimethyl sulphoxide

1. Jakobsen *et al.* (1972)2. Marshall *et al.* (1971)

3. Measures (1975)

Table 3a pH and growth

Substrate	pH	Lag (h)	Growth (h/gen)	Acidulant (buffer)	Temp. (°C)	No. of strains <sup>†</sup>	Ref.
2% tryptone	5.0	—	1.20	HCl	30	1	1
2% tryptone	6.0	—	0.38	HCl	30	1	1
2% tryptone	8.0	—	0.40	HCl	30	1	1
2% soy flour	5.0	—	NG	HCl	30	1	1
2% soy flour	6.0	—	0.39	HCl	30	1	1
2% soy flour	7.0	—	0.38	HCl/NaOH	30	1	1
2% soy flour	8.0	—	0.37	NaOH	30	1	1
2% peanut flour	5.0	—	0.54	HCl	30	1	1
2% peanut flour	6.0	—	0.31	HCl	30	1	1
2% peanut flour	8.0	—	0.38	NaOH	30	1	1
TSB	4.8	—	NG	HCl	30	1	2
TSB	5.0	—	1.73	HCl	30	1	2
TSB	5.2	—	0.39*	HCl	30	1	2
TSB	6.4	—	0.28*	HCl	30	1	2
TSB	5.6	—	NG	0.1 M lactate	30	1	2
TSB	5.8	—	0.69*	0.1 M lactate	30	1	2
TSB	6.4	—	0.39*	0.1 M lactate	30	1	2
TSB	6.0	—	NG	0.1 M formate	30	1	2
TSB	6.1	—	3.5*	0.1 M formate	30	1	2
TSB	6.4	—	0.58*	0.1 M formate	30	1	2
TSB	6.1	—	NG	0.1 M acetate	30	1	2
TSB	6.2	—	3.5*	0.1 M acetate	30	1	2
TSB	6.3	—	3.5*	0.1 M acetate	30	1	2
TSB	6.4	—	1.16*	0.1 M acetate	30	1	2
Skim milk	5.5	—	0.75*	Lactic acid	30	1	3
Skim milk	6.0	—	0.5*	Lactic acid	30	1	3
Skim milk	6.5	—	0.44*	Lactic acid	30	1	3
BHI	5.0	—	0.80–2.1*	Piperazine/HCl	30	4	4
BHI	8.8	6–8	1.5–2.1*	Tris/HCl	30	4	4

\* Approximate growth rates from published data

<sup>†</sup> Vegetative cells

NG, no growth

1. Beuchat *et al.* (1980)

2. Wong and Chen (1988)

3. Mikolajcik *et al.* (1973)

4. Garcia-Arribas and Kramer (1990)



Table 3b pH and survival

Substrate	pH	Acid	Temp. (°C)	D-value (h)	Death (log/2 h)	No. of strains	Ref.
TSB	4.3	HCl	30	3.3*	—	1	1
TSB	6.1	0.1 M acetate	30	11.0*	—	1	1
TSB	5.9	0.1 M formate	30	5.8*	—	1	1
TSB	5.8	0.1 M formate	30	3.8*	—	1	1
TSB	5.4	0.1 M lactate	30	1.15*	—	1	1
Skim milk	5.0	Lactic acid	30	—	2.7/2 h	1	1

\* Estimated from original data

1. Wong and Chen (1988)

Table 4 Irradiation

Medium/substrate	Temp. during irradiation (°C)	Radiation type	D-value (kGy)	Decrease (log/time)	Shoulder (kGy)	Gas phase	No. of strains (id)	Ref.
Polyvinyl chloride	RT	UV <sup>a</sup>	—	2–3 E/30 s*	—	Air	1 (B10)	1
High density polyethylene	RT	UV <sup>a</sup>	—	2–3 E/30 s*	—	Air	1 (B10)	1
Parchment paper	RT	UV <sup>a</sup>	—	2–3 E/30 s*	—	Air	1 (B10)	1
Distilled water	20–23	Co-60	1.6	—	2.0	Air	1 (NCTC 5893)	2
Mozzarella cheese <sup>b</sup>	–78	Co-60	3.6	—	—	Air	1	3
Ice cream <sup>b</sup>	–78	Co-60	4.1	ca. 2.0	—	Air	1	3
Yoghurt <sup>b</sup>	–78	Co-60	4.0	ca. 1.5	—	Air	1	3

\* Approximate death rates from published data

<sup>a</sup> Dose, 30W UV lamp for 30 s<sup>b</sup> Inoculum 10<sup>6</sup> spores/g1. Patil *et al.* (1988)

2. Briggs (1966)

3. Hashisaka *et al.* (1990)

Table 5a Preservatives and toxin production

Medium	Reagent	Temp. (°C)	Toxin type	Time to formation	pH	Inoc. level** (CFU/ml)	Ref.
BHI	None	7	Diarrhoeal*	12 d	7.0	3 × 10 <sup>1</sup>	1
BHI	0.27% lactic acid	7	Diarrhoeal*	ND/20 d	6.0	3 × 10 <sup>1</sup>	1
BHI	0.16% lactic acid	7	Diarrhoeal*	ND/20 d	6.0	3 × 10 <sup>1</sup>	1
BHI	0.10% sorbic acid	7	Diarrhoeal*	ND/20 d	6.0	3 × 10 <sup>1</sup>	1

\* A reversed passive latex agglutination assay of dubious specificity was used; results are questionable

\*\* Psychrotrophic strains

ND, no death

1. van Netten *et al.* (1990)

Table 5b Preservatives

Type	Conc. (mg/kg)	Substrate	pH	Temp. (°C)	Growth (h/gen)	Death (log/time)	No. of strains	Ref.
Sorbic acid	0	Rice filling	6.6	23	2.8*	—	1	1
Sorbic acid	1000	Rice filling	NI	23	7.7*	—	1	1
Sorbic acid	2600	Rice filling	NI	23	NG	—	1	1
Sorbic acid	3800	Rice filling	<5.6	23	NG	—	1	1
Pot. sorbate	1100	Rice filling	6.6	23	5.2*	—	1	1
Pot. sorbate	3900	Rice filling	6.6	23	NG	—	1	1
BHA	0	Nutrient broth	6.8	32	0.50*	—	1	2
BHA	25	Nutrient broth	6.8	32	0.62*	—	1	2
BHA	50	Nutrient broth	6.8	32	1.0*	—	1	2
BHA	75	Nutrient broth	6.8	32	NG/8 h	ND/8 h	1	2
BHA	100	Nutrient broth	6.8	32	NG/8 h	ND/8 h	1	2
BHA	0	Cooked rice	—	32	0.64*	ND/8 h	1	2
BHA	500	Cooked rice	—	32	1.33*	ND/8 h	1	2
BHA	1000	Cooked rice	—	32	NG/24 h*	ND/1 d	1	2
BHA	5000	Cooked rice	—	32	NG/24 h*	ND/1 d	1	2
BHA	10000	Cooked rice	—	32	—	D/1 d	1	2
BHA	0	Strained chicken	—	32	0.51*	—	1	2
BHA	1000	Strained chicken	—	32	0.59*	—	1	2
BHA	5000	Strained chicken	—	32	—	D/2 d	1	2

\* Approximate growth or death rates from published data

BHA, butylated hydroxyanisole

NG, no growth within 6 days

NI, not indicated

ND, not detected

D, death

1. Raevuori (1976)

2. Shelef and Liang (1982)

Table 6 Gases

Medium	Strain	Gas	Pressure	Growth (gen/h)	pH	Temp. (°C)	Ref.
Glucose-peptone-YE	1	Air <sup>a</sup>	0.0 atm	0.46	6.0	30	1
Glucose-peptone-YE	1	CO <sub>2</sub>	0.5 atm	0.37	6.0	30	1
Glucose-peptone-YE	1	CO <sub>2</sub>	1.0 atm	0.28	6.0	30	1
Glucose-peptone-YE	1	CO <sub>2</sub>	2.0 atm	0.13	6.0	30	1
Glucose-peptone-YE	1	CO <sub>2</sub>	3.0 atm	0.0	6.0	30	1

<sup>a</sup> Approx. 0.003 atm CO<sub>2</sub>

YE, yeast extract

1. Enfors and Molin (1980)

Table 7 Disinfectants

Medium/ substrate	Strain	Reagent	Conc. (mg/kg)	Decrease (log/time)	pH	Temp. (°C)	Ref.
Polyvinyl chloride	1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	300,000	3 E/2 min	—	60	1
Polyvinyl chloride	1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	200,000	1.5 E/2 min*	—	60	1
Polyvinyl chloride	1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100,000	0.5 E/2 min	—	60	1
High density polyethylene	1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	300,000	3 E/2 min	—	60	1
High density Polyethylene	1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	200,000	1 E/2 min	—	60	1
High density polyethylene	1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100,000	0.5 E/2 min*	—	60	1
Parchment paper	1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	300,000	3 E/2 min	—	60	1
Parchment paper	1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	200,000	1.8 E/2 min*	—	60	1
Parchment paper	1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100,000	0.5 E/2 min*	—	60	1
Polyvinyl chloride	1	NaOCl	300	2-3 E/4 min*	—	60	1
High density polyethylene	1	NaOCl	300	2-3 E/4 min*	—	60	1
Parchment paper	1	NaOCl	300	2-3 E/4 min*	—	60	1
Polyvinyl chloride	1	Formaldehyde	80,000	1.8 E/3 min*	—	NI	1
High density polyethylene	1	Formaldehyde	80,000	1.8 E/3 min*	—	NI	1
High density polyethylene	1	Formaldehyde	80,000	1.8 E/3 min*	—	NI	1
Deionized water	1 (spores)	Ozone	2.29	>6 E/5 min	—	28	2
Distilled water	1 (spores)	Iodophor	100	1 E/6 min	2.3	21	3
PO <sub>4</sub> buffer <sup>a</sup>	1 (spores)	Sodium dichloro- isocyanurate	50	1 E/1.5 min	6.5	21	3
PO <sub>4</sub> buffer <sup>a</sup>	1 (spores)	Sodium dichloroiso- cyanurate	100	1 E/5.5 min	8.0	21	3
PO <sub>4</sub> buffer <sup>a</sup>	1 (spores)	Dichlorodimethyl hydantoin	50	1 E/4.5 min	6.5	21	3
PO <sub>4</sub> buffer <sup>a</sup>	1 (spores)	Dichlorodimethyl hydantoin	100	1 E/34 min	8.0	21	3
Distilled water	1 (spores)	Iodophor	50	1 E/5 min	6.5	21	3
PO <sub>4</sub> buffer <sup>a</sup>	1 (spores)	Dibromodimethyl hydantoin	50	1 E/13.5 min	6.5	21	3
Distilled water	1 (spores)	Phenol	50,000	1 E/70 min	—	37	4
Wood	1 (spores)	Formaldehyde	50,000	3 E/45 min	—	—	5
Wood	1 (spores)	Formaldehyde	100,000	3 E/30 min	—	—	5
Wood	1 (spores)	Formaldehyde	200,000	3 E/15 min	—	—	5
Wood	1 (spores)	Peracetic acid	320	3 E/> 120 min	—	—	5
Wood	1 (spores)	Peracetic acid	1250	3 E/30 min	—	—	5
PO <sub>4</sub> buffer <sup>a</sup>	1 (spores)	NaOCl	50	1 E/1.5 min	6.5	21	3
PO <sub>4</sub> buffer <sup>a</sup>	1 (spores)	NaOCl	100	1 E/2.5 min	8.0	21	3
PO <sub>4</sub> buffer <sup>b</sup>	1 (spores)	NaOCl	150	1 E/0.17 min	5.2	25	6
PO <sub>4</sub> buffer <sup>b</sup>	1 (spores)	NaOCl	150	1 E/0.40 min	7.0	25	6
PO <sub>4</sub> buffer <sup>b</sup>	1 (spores)	NaOCl	150	1 E/1.2 min	8.0	25	6
PO <sub>4</sub> buffer <sup>b</sup>	1 (spores)	NaOCl	25	1 E/1.0 min	5.2	75	6
PO <sub>4</sub> buffer <sup>b</sup>	1 (spores)	NaOCl	75	1 E/0.08 min	5.2	75	6
PO <sub>4</sub> buffer <sup>b</sup>	1 (spores)	NaOCl	100	1 E/0.06 min	5.2	75	6
PO <sub>4</sub> buffer <sup>b</sup>	1 (spores)	NaOCl	150	1 E/0.38 min	7.0	25	6
PO <sub>4</sub> buffer <sup>b</sup>	1 (spores)	NaOCl	150	1 E/0.25 min	7.0	50	6
PO <sub>4</sub> buffer <sup>b</sup>	1 (spores)	NaOCl	150	1 E/0.08 min	7.0	75	6

\* Approximate death rates from published data

<sup>a</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0.5% solutions)<sup>b</sup> 0.5 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

NI, not indicated

1. Patil *et al.* (1988)
2. Broadwater *et al.* (1973)
3. Cousins and Allan (1967)
4. Briggs (1960)
5. Stockinger *et al.* (1989)
6. Wang *et al.* (1973)

Table 8 · Interactions

Substrate/ medium	% NaCl	pH	a <sub>w</sub>	Temp. (°C)	Death (log/10 d)*	No. of strains	Ref.
Rice	0	5.0	1.0	30	1.03.2	2	1
Rice	7.5	6.8	0.965	30	>5.3->6.5	2	1
Rice	7.9	5.2	0.960	30	>5.3->6.5	2	1
Meat	0.0	4.4	1.0	30	4.4-5.8	2	1
Meat	5.6	4.4	0.975	30	>5.4->6.0	2	1
Meat	10.1	4.4	0.935	30	5.4->6.0	2	1
Meat	4.1	6.1	0.980	30	0.0-0.1	2	1
Meat	9.6	6.1	0.940	30	>5.4->6.0	2	1
Meat	4.6	7.9	0.980	30	1.1-1.8	2	1
Meat	8.8	7.9	0.950	30	>5.4->6.0	2	1
BHI	0	4.6	-	30	4.9-8.0**	5	1
BHI	2.5	4.6	-	30	6.9-8.0**	5	1
BHI	5.0	4.6	-	30	6.8-8.0**	5	1
BHI	10.0	4.6	-	30	7.1->8.0**	5	1
BHI	2.5	6.1	-	30	0.3-1.0**	5	1
BHI	5.0	6.1	-	30	2.0-8.0**	5	1
BHI	10.0	6.1	-	30	7.0->8.0**	5	1
BHI	2.5	7.5	-	30	0-1.0**	5	1
BHI	5.0	7.5	-	30	2.0-7.2**	5	1
BHI	10.0	7.5	-	30	7.5->8.0**	5	1
BHI	0	8.8	-	30	0.5-1.2**	5	1
BHI	2.5	8.8	-	30	1.2->8.0**	5	1
BHI	5.0	8.8	-	30	6.5->8.0**	5	1
BHI	7.5	8.8	-	30	>8.0**	5	1

\* log<sub>10</sub> decrease in numbers over 10 days

\*\* Approx. death rate from published data

BHI, Brain Heart Infusion broth

1. Raevuori and Genigeorgis (1975)

## References

- Asplund, K., Nurmi, E., Hill, P. and Hirn, J. (1988) 'The inhibition of the growth of *Bacillus cereus* in liver sausage', *International Journal of Food Microbiology* 7:349-52.
- Beuchat, L.R., Ma-Lin, C.F.A. and Carpenter, F.A. (1980) 'Growth of *Bacillus cereus* in media containing plant seed materials and ingredients used in Chinese cookery', *Journal of Applied Bacteriology* 48:397-407.
- Blakey, L.J. and Priest, F.G. (1980) 'The occurrence of *Bacillus cereus* in some dried foods including pulses and cereals', *Journal of Applied Bacteriology* 48:297-302.
- Bradshaw, J.G., Peeler, J.T. and Twedt, R.M. (1975) 'Heat resistance of ileal loop reactive *B. cereus* strains isolated from commercially canned food', *Applied Microbiology* 30:943-5.
- Briggs, A. (1966) 'The resistance of spores of the genus *Bacillus* to phenol, heat and radiation', *Journal of Applied Bacteriology* 29:490-504.
- Broadwater, W.T., Hoehn, R.C. and King, P.H. (1973) 'Sensitivity of three selected bacterial species to ozone', *Applied Microbiology* 26:391-3.
- Christiansson, A., Satyanarayan Naidu, A., Nilsson, I., Wadström, T. and Pettersson, H.-E. (1989) 'Toxin production by *Bacillus cereus* dairy isolates in milk at low temperatures', *Applied Environmental Microbiology* 55:2595-600.
- Chung, K.-T. and Sun, H.-L. (1986) 'Distribution and characteristics of *Bacillus cereus* isolated from rice in Taiwan', *Journal of Food Science* 51:1208-12.
- Cousins, C.M. and Allan, C.D. (1967) 'Sporicidal properties of some halogens', *Journal of Applied Bacteriology* 30:168-74.
- Enfors, S.-O. and Motin, G. (1980) 'Effect of high concentrations of carbon dioxide on growth rate of *Pseudomonas fragi*, *Bacillus cereus* and *Streptococcus cremoris*', *Journal of Applied Bacteriology* 48:409-16.
- Ezepchuk, Y.V. and Fluor, F.S. (1973) 'The enterotoxin effect', *Modern Medicine* 3:20-5.
- Garcia-Arribas, M.L. and Barrett, E.L. (1990) 'The effect of glucose, starch, and pH on growth, enterotoxin and haemolysin production by strains of *Bacillus cereus* associated with food poisoning and non-gastrointestinal infection', *International Journal of Food Microbiology* 11:21-34.
- Gilbert, R.J. and Parry, J.M. (1977) 'Serotypes of *Bacillus cereus* from outbreaks of food poisoning and from routine foods', *Journal of Hygiene (Camb.)* 78:69-74.
- Gilbert, R.J., Stringer, M.F. and Peace, T.C. (1974) 'The survival and growth of *Bacillus cereus* in boiled and fried rice in relation to outbreaks of food poisoning', *Journal of Hygiene (Camb.)* 73:433-44.
- Gilbert, R.J., Turnbull, P.C.B., Parry, J.M. and Kramer, J.M. (1981) '*Bacillus cereus* and other *Bacillus* species: Their part in food poisoning and other clinical infections', in R.C.W. Berkely and M. Goodfellow (eds) *The Aerobic Endospore-forming Bacteria*, New York: Academic Press: 297-314.
- Glatz, B.A., Spira, W.M. and Goepfert, J.M. (1974) 'Alteration of vascular permeability in rabbits by culture filtrates of *Bacillus cereus* and related species', *Infect. Immun.* 10:299-303.
- Goepfert, J.M. (1974) 'Monkey-feeding trials in the investigation of the nature of *Bacillus cereus* food poisoning', *Proceedings of the IV International Congress of Food Science and Technology* 3:178-81.
- Goepfert, J.M. and Kim, H.U. (1975) 'Behaviour of selected food-borne pathogens in raw ground beef', *Journal of Milk and Food Technology* 38:449-52.
- Goepfert, J.M., Spira, W.M. and Kim, H.U. (1972) '*Bacillus cereus*: food poisoning organism. A review', *Journal of Milk and Food Technology* 35:213-27.
- Gorina, L.G., Fluor, F.S., Olovnikov, A.M. and Ezepchuk, Y.V. (1975) 'Use of the aggregate-hemagglutination technique for determining exo-enterotoxin of *Bacillus cereus*', *Applied Microbiology* 29:201-4.
- Griffiths, M.W. (1990) 'Toxin production by psychrotrophic *Bacillus* spp. present in milk', *Journal of Food Protection* 53:790-2.
- Hashisaka, A.E., Matches, T.R., Batters, Y., Hungate, F.P. and Dong, F.M. (1990) 'Effects of gamma irradiation at -78°C on microbial populations in dairy products', *Journal of Dairy Science* 55:1284-9.
- Hauge, S. (1950) 'Matforgiftninger fremkalt av *Bacillus cereus*', *Nordisk Hygienisk Tidsskrift* 31:189-206 (*Biol. Abstr.* 35:1063, 1951).
- Hauge, S. (1955) 'Food poisoning caused by aerobic spore-forming bacilli', *Journal of Applied Bacteriology* 18:591-5.
- Helmy, Z.A., Abd-El-Bakey, A. and Mohamed, E.I. (1984) 'Factors affecting germination and death of *Bacillus cereus* spores in milk', *Zentralblatt für Mikrobiologie* 139:135-41.
- Hobbs, B.C. and Gilbert, R.J. (1974) 'Microbiological counts in relation to food poisoning', *Proceedings of the IV International Congress of Food Science Technology* 3:159.
- Holbrook, R. and Anderson, J.M. (1980) 'An improved selective and diagnostic medium for the isolation and enumeration of *Bacillus cereus* in foods', *Canadian Journal of Microbiology* 26:753-9.
- Jakobsen, M. and Murrell, W.G. (1977) 'The effect of water activity and  $a_w$ -controlling solute on sporulation of *Bacillus cereus* T', *Journal of Applied Bacteriology* 43:239-45.
- Jakobsen, M., Filtenborg, O. and Bramsnaes, F. (1972) 'Germination and outgrowth of bacterial spores in the presence of different solutes', *Lebensmittel-Wissenschaftliche Technologie* 5:159-62.
- Johnson, K.M. (1984) '*Bacillus cereus* foodborne illness - An update', *Journal of Food Protection* 47:145-53.
- Johnson, K.M., Nelson, C.L. and Busta, F.F. (1982) 'Germination and heat resistance of *Bacillus cereus* spores from strains associated with diarrheal and emetic food-borne illnesses', *Journal of Food Science* 47:1268-71.
- Johnson, K.M., Nelson, C.L. and Busta, F.F. (1983) 'Influence of temperature on germination and growth of spores of emetic and diarrheal strains of *Bacillus cereus* in a broth medium and in rice', *Journal of Food Science* 48:286-7.
- Kaur, P. (1986) 'Survival and growth of *Bacillus cereus* in bread', *Journal of Applied Bacteriology* 60:513-16.
- Kim, H.U. and Goepfert, J.M. (1971) 'Enumeration and identification of *Bacillus cereus* in foods. I. 24 hour presumptive test medium', *Applied Microbiology* 22:581-7.
- Kozasa, M., Wake, M. and Azuma, R. (1977) 'Taxonomic studies on *Bacillus cereus* T-7112: 1. Biotype', *Annual Report Tokyo Veterinary Animal Science* 25:38-42.
- Kramer, J.M. and Gilbert, R.J. (1989) '*Bacillus cereus* and other *Bacillus* species', in M.P. Doyle (ed.) *Foodborne Bacterial Pathogens*, New York: Marcel Dekker: 21-70.
- Kramer, J.M., Turnbull, P.C.B., Munshi, G. and Gilbert, R.J. (1982) 'Identification and characterization of *Bacillus*

- cereus and other *Bacillus* species associated with foods and food poisoning', in J.E.L. Corry, D. Roberts and F.A. Skinner (eds), *Isolation and Identification Methods for Food Poisoning Organisms*, New York: Academic Press: 261-86.
- Lancette, G.A. and Harmon, S.M. (1980) 'Enumeration and confirmation of *Bacillus cereus* in foods: collaborative study', *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 63:581-6.
- Marshall, B.J., Ohye, D.F. and Christian, J.H.B. (1971) 'Tolerance of bacteria to high concentrations of NaCl and glycerol in the growth medium', *Applied Microbiology* 21:363-4.
- Measures, J. (1975) 'Role of amino-acids in osmo regulation of nonhalophilic bacteria', *Nature (Lond.)* 257 (5525):398-9.
- Melling, J. and Capel, B.J. (1978) 'Characteristics of *Bacillus cereus* emetic toxin', *FEMS Microbiology Letters* 4:133-5.
- Mikolajcik, E.M., Kearney, J.W. and Kristofferson, T. (1973) 'Fate of *Bacillus cereus* in cultured and direct acidified skim milk and Cheddar cheese', *Journal of Milk and Food Technology* 36:317-20.
- Mol, J.H.H. (1957) 'Temperature characteristics of spore germination and growth of *Bacillus cereus*', *Journal of Applied Bacteriology* 20:454-9.
- Molin, N. and Snygg, B.G. (1967) Effect of lipid materials on heat resistance of bacterial spores. *Applied Microbiology* 15 1422-1426.
- Morita, T.N. and Woodburn, M.F. (1977) 'Stimulation of *Bacillus cereus* growth by protein in cooked rice combinations', *Journal of Food Science* 42:1232-5.
- Mossel, D.A.A., Koopman, M.J. and Jongerius, E. (1967) 'Enumeration of *Bacillus cereus* in foods', *Applied Microbiology* 15:650-3.
- Nygren, B. (1962) 'Phospholipase C-producing bacteria and food poisoning', *Acta Pathologica Microbiologica (Scand. Suppl.)* 160:1-89.
- Parry, J.M. and Gilbert, R.J. (1980) 'Studies on the heat resistance of *Bacillus cereus* spores and growth of the organism in boiled rice', *Journal of Hygiene (Camb.)* 84:77-82.
- Patil, R.A., Singh, R.S. and Ghodekar, D. (1988) 'Effect of chemical sterilants on aseptic packaging and dairy products', *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 23:175-83.
- Raevuori, M. (1976) 'Effect of sorbic acid and potassium sorbate on growth of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in rice filling of Karelian pastry', *European Journal of Applied Microbiology* 2:205-13.
- Raevuori, M. and Genigeorgis, C. (1975) 'Effect of pH and sodium chloride on growth of *Bacillus cereus* in laboratory media and certain foods', *Applied Microbiology* 29:68-73.
- Rajkowsky, K.T. and Mikolajcik, E.M. (1987) 'Characteristics of selected strains of *Bacillus cereus*', *Journal of Food Protection* 50:199-205.
- Rodriguez, M.H. and Barrett, E.L. (1986) 'Changes in microbial population and growth of *Bacillus cereus* during storage of reconstituted dry milk', *Journal of Food Protection* 49:680-6.
- Shehata, T.E. and Collins, E.B. (1972) 'Sporulation and heat resistance of psychrophilic strains of *Bacillus*', *Journal of Dairy Science* 55:1405-9.
- Shelef, L.A. and Liang, P. (1982) 'Antibacterial effects of butylated hydroxyanisole (BHA) against *Bacillus* species', *Journal of Food Science* 47:796-9.
- Shinagawa, K. (1990) 'Analytical methods for *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species', *International Journal of Food Microbiology* 10:125-42.
- Smith, N.R., Gordon, R.E. and Clark, F.E. (1946) 'Aerobic mesophilic sporeforming bacteria', *USDA Miscellaneous Publications* No. 559.
- Smith, N.R., Gordon, R.E. and Clark, F.E. (1952) 'Aerobic sporeforming bacteria', *USDA Monograph* No. 16.
- Spira, W.M. and Goepfert, J.M. (1972) '*Bacillus cereus*-induced fluid accumulation in rabbit ileal loops', *Applied Microbiology* 24:341-8.
- Spira, W.M. and Goepfert, J.M. (1975) 'Biological characteristics of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*', *Canadian Journal of Microbiology* 21:1236-46.
- Stadhouders, F., Hyp, G. and Langeveld, L.P.M. (1980) 'Some observations on the germination, heat resistance, and outgrowth of fast-germinating and slow germinating spores of *Bacillus cereus* in pasteurized milk', *Netherlands Milk and Dairy Journal* 34:215-28.
- Stockinger, H., Bohm, R. and Strauch, D. (1989) 'Comparative testing of two different disinfectants with regard to their sporocidal effects in a model experiment using spores of pathogenic and apathogenic clostridia as well as of *Bacillus cereus* (in German)', *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin* 188(1-2):166-78.
- Taylor, A.J. and Gilbert, R.J. (1975) '*Bacillus cereus* food poisoning: A provisional serotyping scheme', *Journal of Medical Microbiology* 8:543-50.
- Thompson, N.E., Ketterhagen, M.J., Bergdoll, M.S. and Schantz, E.J. (1984) 'Isolation and some properties of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*', *Infection and Immunity* 43:887-94.
- Turnbull, P.C.B. (1981) '*Bacillus cereus* toxins', *Pharmacology and Therapeutics* 13:453-505.
- Turnbull, P.C.B., Kramer, J.M., Jorgensen, K., Gilbert, R.J. and Melling, J. (1979) 'Properties and production characteristics of vomiting, diarrhoeal, and necrotizing toxins of *Bacillus cereus*', *American Journal of Clinical Nutrition* 32:219-28.
- Ueda, S., Katsube, S. and Kuwabara, Y. (1986) 'Studies on the ecology of *Bacillus cereus* (1). The biochemical characteristics of *B. cereus* strains isolated from food, food poisoning outbreaks and environment', *Journal of Antibacterial Antifungal Agents* 13:547-54.
- van Netten, P., van de Moosdijk, A., van Hoensel, P., Mossel, D.A.A. and Perales, I. (1990) 'Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin', *Journal of Applied Bacteriology* 69:73-9.
- Wang, M.Y., Collins, E.B. and Lobben, J.C. (1973) 'Destruction of psychrophilic strains of *Bacillus* by chlorine', *Journal of Dairy Science* 56:1253-7.
- Wong, H.C. and Chen, Y.-L. (1988) 'Effects of lactic acid bacteria and organic acids on growth and germination of *Bacillus cereus*', *Applied Environmental Microbiology* 54:2179-84.
- Wong, H.C., Chen, Y.L. and Chen, C.L.F. (1988) 'Growth, germination and toxigenic activity of *Bacillus cereus* in milk products', *Journal of Food Protection* 51:707-10.
- Wyatt, C.J. and Guy, V.H. (1981) 'Incidence and growth of *Bacillus cereus* in retail pumpkin pies', *Journal of Food Protection* 44:422-4, 429.

## Bacillus cereus

### 歴史

*Bacillus cereus* は1887年に最初に分離され、記録された (Frankland and Frankland)。この菌が食中毒を引き起こすという確実な証拠は Hauge (1950, 1955) の発表による。彼は4件の事例を記載し、すべてがバニラソースを含むものであった。この事例とその後20年以上にわたるその他の事例から、この食中毒は媒体となる食品の摂食 8~16 時間後に起こる水様性の下痢が特徴であるといえる。これらの食中毒については Goepfert ら (1972), Kramer and Gilbert (1989) の総説にまとめられている。

1971年、調理米を摂食して1~5時間後に吐き気と嘔吐を特徴とする食中毒が報告された (PHLS, 1972)。この報告は当初懐疑的にみられたが、その後 *B. cereus* のある種の菌株は 'スタフィロコッカス様' の疾患を引き起こすことが出来るという研究が発表された。現在では、*B. cereus* のこの型の食中毒は Hauge によって最初に記載されたときよりはずっと一般的にみられる (Johnson, 1984)。

*B. subtilis*, *B. licheniformis* を含むその他の *Bacillus* 種も食中毒と関連しているが、これらの菌種が食中毒起因菌であるとする明確な証拠に欠けていることから、本章では *B. subtilis*, *B. licheniformis* については言及しない。これらについての情報はいくつかの総説にみられる (Gilbert ら, 1981; Kramer ら 1982; Kramer and Gilbert, 1989; Shinagawa, 1990)。

### 分類

*bacilli* の分類は Smitu ら (1946, 1952) の古典的な報告がなされるまでは混乱していた。彼らは芽胞と芽胞囊の形態にもとづいて3種のグループに分類した。( *B. cereus* を含む) グループ I は芽胞囊が芽胞によって膨出していないものと定義した。グループ内の下位分類は細胞の直径にもとづいてなされる。( *B. cereus* を含む) 大型細胞種の細胞の直径は  $0.9 \mu\text{m}$  以上である。グループ I に属するその他の大型細胞種としては *B. megaterium*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, および *B. thuringiensis* がある。鑑別法を A 表と以下に示す。

### 症状

*B. cereus* の食中毒はこの細菌が増殖し、毒素が形成されている食品を摂取した後に発症する。毒素中毒には2種の型がある。第1の型は大量の細胞または毒素を摂取した 8-24 時間後に起こる下痢が特徴である。主症状は下痢で、これは通常激しいものでは

なく、24 時間以内に完全に回復するのが特徴である。食品摂取後 1~2 日後の糞便を検査すると *B. cereus* の大量な菌数が見られる。この細菌は回復後速やかに体内には見られなくなる。

毒素中毒の第 2 の型は、毒素を摂取後短時間 (1~6 時間) に起こる嘔吐を特徴とする。これも疾患は比較的軽く、12~24 時間以内に回復する。どちらの型も普通の健常人にとっては生命にかかわるものとは考えられていない。

### 病原性

*B. cereus* の多くの菌株は、様々な細胞外代謝産物を作り出す。これには毒素または毒性因子が含まれるが、これらは動物モデルにおける特性や疾病との疫学的関連に基づいて同定されている。これらの代謝産物は主に指数関数的殖期に産生される。これらの代謝産物には下痢型エンテロトキシン (Spira and Goepfert, 1975; Turnbull 他, 1979; Thompson 他, 1984; Kramer and Gilbert, 1989)、嘔吐型因子 (Melling and Capel, 1978; Turnbull 他, 1979; Kramer and Gilbert, 1989)、一次溶血毒 (溶血毒 I) (Turnbul 他, 1979)、二次溶血毒 (溶血毒 II) (Kramer and Gilbert, 1989)、ホスホリパーゼ C (Kramer and Gilbert, 1989)、および Ezepechuk and Fluer (1973; Gorina 他, 1975) が記したエンテロトキシンが含まれる。*B. cereus* の主要な毒性代謝産物は、Kramer と Gilbert の総説 (1989) に述べられている。

疾病の 2 つの型は主として 2 つの明らかに異なる系統、すなわち下痢原生毒素と嘔吐性毒素により生じる。下痢原生因子 (Thompson 他, 1984; Kramer and Gilbert, 1989) は、分子量約 3 万 8000~4 万 6000、 $pI$  5.1~5.6 の蛋白質である。この毒素は活発に増殖する細胞により産生され、トリプシンおよびプロナーゼにより、または 56°C で 30 分間加熱することにより不活性化される。この毒素は抗原性があり、兎の皮膚には脈管透過変性を、またテンジクネズミ (モルモット) には皮膚壊死の障害を引き起こす (Glatz 他, 1974)。脈管透過性 (VP) 試験は回腸結さつ係蹄における液性誘導活性と関連があり、下痢原生活性のために分離したものを調べる液性誘導活性試験よりも実際には実行しやすい。青みを帯びた部分と壊死部分の解釈が VP アッセイ上の主要な問題である (Thompson 他, 1984)。この毒素はベロ細胞に対しても毒性を示し、ベロ細胞に対するその毒性効果と、結さつ回腸係蹄による陽性結果との間には高度な関連性が認められている (Thompson 他, 1984)。この毒素はアデニル酸シクラーゼ環状 AMP システムにおいて活性化することが証明されている。

*B. cereus* の下痢原生型病原性のメカニズムは十分に解明されていない。Spira と Goepfert の研究 (1972) により、回腸に直接注入した *B. cereus* 株は下痢を誘発せず、液体の蓄積は回腸の係蹄内部にある細菌の数の増加と関係しており、一方でこの実験モデルでは陰性だった菌株の細胞数は減少したことが明らかになった。しかしながら、回



腸係蹄に注入する前に培養液のなかで増殖した回腸係蹄陽性菌株は、生体内で増殖した後に何らかの反応を示すことはなかった。このことから以下の結論が導き出された。即ち、細菌数の増加は液体蓄積の原因というよりもむしろその結果として起こることであり、腸管内増殖は液体蓄積とは関係がなく、*B. cereus* が下痢を誘導するのはおそらく感染よりもむしろ毒素中毒の結果である。

これとは逆に Thompson 他 (1984) は、猿に対する給餌試験によって、下痢型毒素が消化管内で明らかに分解されることを突き止めた。彼らは、以前に行った猿の給餌試験 (Goepfert, 1974) で用いられた緩衝システム (BHI に続いて重炭酸塩緩衝剤を投与) が、細菌の代謝がない状態で下痢をが引き起こすことを認めた。この著者らは、中和緩衝剤がなければ大量の粗製または部分精製した代謝産物を用いても下痢を誘発することが出来なかった。彼らは *B. cereus* を原因とする下痢は、大量の細菌を摂取した後に、腸管内で産生される毒素により引き起こされると考えた。下痢が始まる前の比較的長い潜伏期間 (8 時間～16 時間) がこのことを実証している。

これに対して、嘔吐型毒素は、抗原性のない小さなペプチド (分子量 < 5000) であるが、熱抵抗性 (126°C で 90 分間)、極端な pH 値 (2 から 11)、そして酵素分解性に耐性が非常に強い、即ち、トリプシンとペプシンのいずれにも分解されにくい (Melling and Capel, 1978)。この毒素は定常期によく産生されるが、孢子形成との関連性はまだ明らかにされていない。猿の給餌試験以外には便利な評価分析法がないため、毒素の生物学及び薬理学の理解がなかなか進まないのが現状である。

#### 検出及び菌数測定

*B. cereus* による食中毒は、現在のところこの菌の分離と菌数測定によってのみ同定することができ、食中毒にかかったものからの糞便及び嘔吐物と、汚染された食物の両方で同定されるのが望ましい。毒素を分析する方法は、いまだ広く使用されていない。*B. cereus* の単離及びコロニー計数に用いる方法のほとんどには、直接寒天平板法が用いられている。菌種による溶血生産性、レシチナーゼ活性、発酵特性もしくは形態学的特徴を基にして、さまざまな平板培地が開発されてきている。選択薬剤は、通常、競合微生物を阻害し、当該細菌の増殖を促進するように用いられる。

主な選択平板培地には、通常ポリミキシン B が選択薬剤として用いられ、寒天に入れた卵黄上でのレシチナーゼの発現で検証する。最も一般的な培地はマンニトール-卵黄-ポリミキシン寒天培地 (MYP) (Mossel その他, 1967) もしくはポリミキシン-ピルビン酸塩-卵黄マンニトール-プロモチモールブルー寒天培地 (PEMBA) (Holbrook と Anderson, 1980) が用いられる。サンプルの希釈物を MYP 上に塗抹し、30～32°C で 20～24 時間培養して、*B. cereus* の典型的なコロニーを計数する。*B. cereus* のコロニーは、

乾燥し、扁平で“地面の草 ground glass”様の外観を呈し、コロニー周辺は卵黄沈殿物の可視ゾーンで取り囲まれた赤紫色の背景を有するクリームホワイトないし透明なものである。PEMBA 寒天培地は、*B. cereus* の持つレシチン-加水分解特性、マンニトール陰性を利用するものである。PEMBA 寒天培地上で 37℃、18 時間増殖させると、*B. cereus* はトルコブルーから孔雀ブルーの色合いで“地面の草”様外観を呈し、わずかに仮根を有する円鋸歯状の扁平なコロニーを形成する。ほとんどの菌種は、各コロニー周辺に幅 5mm 以下のゾーンを形成する卵黄沈殿反応を有する。*B. cereus* と推定されるコロニー 3 個以上を栄養培地に移植し、形態学的及び生化学的試験を行って確認する。主として血液寒天平板を糞便サンプルの検査に用いる。この培地上では、典型的な *Bacillus* 型のコロニーは完全溶血帯によって取り囲まれている。

#### 同定

卵黄-ポリミキシン含有寒天培地上での *B. cereus* がみせた反応と類似する反応をする生物はほとんど存在せず、それゆえ非-*Bacillus* 種との鑑別を必要とすることはほとんどない。*B. cereus* の特異的な同定には、*B. mycoides* (コロニーの形態に基づく)、*B. thuringiensis* (*B. cereus* には副芽胞昆虫毒性結晶がない)、*B. anthracis* (*B. cereus* は運動性を有する) との鑑別が求められるだけである。さまざまな生化学的試験が用いられているが、先に述べたコロニーおよび顕微鏡検査ほど迅速で有効ではない。確認のために用いる生化学的試験には、グルコースからの嫌氣的酸産生能、硝酸塩の亜硝酸塩への還元性、アセチルメチルカルビノール産生能、L-チロシン分解性、溶血性、0.001% リゾチーム存在下での増殖性、仮根成長性、運動性、γファージに対する感受性 (*B. cereus* は陰性で、*B. anthracis* は陽性)、36℃-5 日培養後でのマンニトール、アラビノースとキシロースの非発酵性が含まれる (Lancette and Harmon 1980, Kramer and Gibert 1989)。

食中毒に由来する *B. cereus* 菌株の血清型を分類することは、食中毒の疫学的面を理解する上で重要である。鞭毛抗原にもとづいて *B. cereus* を鑑別するために用いる血清型別スキーム (serotype) が開発されている (Taylor 及び Gilbert 1975, Gilbert と Parry 1977, Kramer その他 1982)。23 種の血清型が同定されてきているが、食中毒ではいくつかの血清型がそれ以外の血清型よりも頻繁に見られている (品川 1990)。いくつかの菌株は現在の抗血清を用いてタイプ別ができないままではあるが、催吐性型の食中毒に関連する菌株の約 70% が血清型 I である。これに対して、下痢性型で見られる血清型のパターンには一貫性はない (Gilbert と Parry 1977)。

Voges-Proskauer 反応、硝酸塩還元性、クエン酸利用能、尿素分解性、デンプン加水分解性、ショ糖及びサリシンの発酵性などの生化学的特性を組み合わせる生物学的に分類

するのもまた有用な疫学的手法である (Kozasa その他 1977)。生物学的型別は、日常的に使用できるようには標準化されておらず、その適用はそれまでに確立している個人基準に依存します。

#### 代替法

Bacillus 同定キットは Analytab Products, Inc. (API) (Plainview, New York, USA) にて入手可能で、選択培地から分離した *B. cereus* の菌株を迅速に確認できる。Oxoid (Inipath Ltd, Basingstoke, Hampshire, UK) は *B. cereus* の下痢毒の存在を逆受身ラテックス凝集反応によって検出する BCET-RPLA キットを開発した。その後このキットは *B. cereus* 下痢毒の特異性に欠けているとされ、誤った陽性結果をもたらすとされた。

#### 自然界での分布：食品における重要性

*B. cereus* は自然界に広く存在する。土、塵埃、穀類作物、植物、動物の毛、水、沈殿物などから容易に分離できる (Kramer and Gilbert, 1989)。その結果、魚における存在および病気の発生は未だよく分かっていないが、あらゆる生の農産物の内外から検出されるのは驚くにはあたらない。

食品原料中の *B. cereus* についての Nygren (1962) の調査によると、その広範囲の汚染を示すように 1546 件の食品素材の 52%、1911 件のクリームおよびデザート菓子類の 44%、431 件の肉・野菜製品の 52% に汚染が見られた。この微生物は乳および乳製品をしばしば汚染し、UHT 処理乳 (48%) を含む乳製品の 9~48% が *B. cereus* に汚染されていた。

芽胞を形成するので、不十分なレトルト加工など食品加工のあらゆる段階で生き残ることができ、食品加工業者が使用するほとんどの原材料に存在する。通常の状態において *B. cereus* は食品中に  $<10^3$ /g、大抵の場合は  $<10^2$ /g で存在する。この微生物が疾病を発症するのに必要な最低レベルは  $<10^5$ /g とされているため、この程度の菌量では無害とみなされている (Hobbs and Gilbert, 1974)。

*B. cereus* の毒素中毒についての詳細な報告には、時間/温度の不適切な組み合わせによって食品中の低レベル (無害) の *B. cereus* がかなり増加してくることが記されている。多くの食中毒発症研究では、媒体となる食品は穀物ないしは穀物を含むもの、またはスパイス原料であった。

ある研究によると 46-100%の生米、10-53%のスパイスが *B. cereus* に汚染されていた (Kramer and Gilbert, 1989)。穀物製品はしばしば加工工程を経るので、栄養細胞フロアはかなり減少する。さらに摂食する前に調理されるが、残存する芽胞フロアはそのまま残ることになる。競合する微生物のない状態では、調理された食品を増殖可能な状態に放置すると *B. cereus* は容易に増殖する。したがってこのタイプの毒素中毒の主要な制御法は、特に調理済み製品における時間と温度の誤用を防止することである。

食品のいかなる微生物の存在や疾病を発症させる可能性は、演繹的に重要であると認識されなければならない。世界的に見れば *B. cereus* 食中毒件数は増加している。しかしながら、食中毒発生に関連しこの微生物に十分な注意が払われるようになったのは、ここ 10~15 年にすぎないことを覚えておかなければならない。例えばボツリヌス症、サルモネラ症、ブドウ球菌毒素中毒症などの多くの食中毒症と比較すると、入手できる情報が少ないことから、食品中の *B. cereus* 菌数が多いことを見出した時にその疾病を *B. cereus* のせいにするには注意がいるといわなければならない。食品中での毒素生産を伴う *B. cereus* の増殖についてはさらに多くの知識が求められ、また、この食中毒の真の評価をする前に食品中の毒素を特異的に検出する方法が開発されなければならない。さらに、*B. cereus* の毒素中毒の 2 種の型の特徴として、他の食中毒症状の深刻さと比較して、症状が緩やかで短期間で済むことが *B. cereus* をより重要性の低い位置に留めることになっている。

#### 増殖および生存特性

*B. cereus* の各菌株には、増殖および生存の特性に幅広い差異がある (表 B)。4~5°C では増殖できるが 30~35°C では増殖できない低温性の菌株もあれば、15°C~50°C や 55°C で増殖する中温性の菌株もある。増殖の至適温度範囲は 30~40°C である (表 1a)。同様に、増殖の最低 pH も菌株ごとに様々で、酸耐性に依存する。一般的に、塩酸で酸性化した pH4.8 の培地や、乳酸で酸性化した pH5.6 の培地では、増殖は起きない。

食中毒菌株の増殖に及ぼす水分活性の影響については、それほど多くの文献はない。現在のデータでは、NaCl を湿潤剤として用いた  $a_w$  0.92~0.93 では増殖しないことが示されている。しかし、湿潤剤としてグリセロールを含有する培地では、当該菌は  $a_w$  0.93 で増殖できるのに、 $a_w$  0.92 では増殖しない (表 2)。概して、*B. cereus* に対する保存料の影響に関する研究は少ないが、pH5.5 の 0.26% ソルビン酸および pH6.6 の 0.39% ソルビン酸カリウムは増殖阻害環境である (表 5b)。

食品産業にとっては、*B. cereus* の芽胞を死滅させることに関心が持たれており、大きな注目を集めてきた。一般に、*B. cereus* 芽胞の熱抵抗性は大半の芽胞形成中温性細菌の熱抵抗性とよく似ている (表 1c)。しかしながら、菌株によって大きな差異があり、同等の温度に D 値を有する 2~3 の菌株の芽胞の熱耐性は、熱感受性の高い大部分の菌

株の芽胞が示す熱抵抗性よりも 15~20 倍高くなる。さらに、*B. cereus* の芽胞は他の芽胞形成細菌と比較して、放射線照射 (表 4) や殺菌剤 (表 7) に対して特異な耐性はない。

*B. cereus* の死滅に対する pH と水分活性 (NaCl 濃度) の相互影響は、Raevuori と Genigeorgis により研究されてきた (1975 年)。両因子は死滅に大きな影響を及ぼす。しかしながら、死滅速度は、ブライン濃度 5% 以下の NaCl を含有し、pH 6.1 または 7.5 の基質では比較的遅い (表 8)。

pH や水分活性など、増殖に関する多くの因子については、データが極めて少ない。食品環境中での *B. cereus* の制御に影響を及ぼす因子を十分に理解するためには、こうした分野についての研究が必要である。

製パン工程での *B. cereus* の生残性に関する研究では、0.2% プロピオン酸カルシウムをパン生地に加えると当該菌の発芽とその後の増殖が遅延し、その結果、パンの中の *B. cereus* の存在による食中毒のリスクを十分に無視できることが判明した (Kaur, 1985 年)。

#### 毒性の特性とその生産

*B. cereus* のエンテロトキシンを検出する方法は、特異的でも定量的でもない。したがって、こうした毒素に関するデータの多くは疑わしい。これまで、粗挽き牛肉およびラザニアでは、4℃で 24 日間または 7℃で 12 日間保持した場合に下痢性毒素が生産されることが報告されている。しかしながら、こうした研究は、改良された検出方法を用いて追認する必要があるであろう。米培養液における嘔吐性毒素の生産至適温度範囲は 25~30℃である (Melling および Capel, 1978 年)。

嘔吐性毒素は耐熱性を有し、通常の調理操作では消滅しない。データは少ないものの、この毒素は 126℃で 90 分間の耐熱性を有すると報告されている (Turnbell 等, 1979 年)。反対に、下痢性毒素は熱感受性が高く、56℃の 5 分間の処理で不活性化される。

#### 制御

*B. cereus* は環境中に広く分布しているので、食品は一般的にこの菌に汚染されている。少菌量を摂取しても病気を引き起すことはないので、少ない菌数の存在 (1 グラム当たりの細胞数 200~300 個) には問題はない。従って、この病気を防ぐには、芽胞の発芽を抑制し、調理済みで食べられる状態の食品における栄養細胞の増殖を阻止することが必要である。

適正に調理した食品を、調理後すぐに摂取した場合には安全である。圧力蒸し、フライ、グリル、ローストなど、ほとんどの調理手段ならば、一般的に、栄養細胞は死滅し、

おそらくは芽胞も死滅する。100℃またはそれ以下で調理した場合は、一部の芽胞の生存を許すこととなる。芽胞の発芽は、低い温度、pH、 $a_w$ で著しく減少する。嘔吐性毒素は調理操作で破壊されることはない。

調理後のシリアル・ベース食品や蛋白質含有食品を不適切に冷却すると、その過程で細菌が増殖してくることに高い関心が持たれている。食品中の *B. cereus* を増殖させやすい条件としては、調理後に緩慢に冷却したり、10℃～50℃の温度で大量の食品を保存することによって芽胞を活性化してしまうといった調理の仕方がある。食品を保存するには、*B. cereus* の増殖を阻止できる温度まで速やかに冷却するべきである。また、食品を温かい状態で保持する場合は、60℃以上に維持すべきである。