

Bacillus cereusの増殖挙動予測モデルの開発

韓, 文学

九州大学大学院生物資源環境科学府

内野, 敏剛

九州大学大学院生物資源環境科学府

藤元, 優希

九州大学大学院生物資源環境科学府

濱中, 大介

九州大学大学院農学研究院

他

<https://doi.org/10.15017/4376>

出版情報：九州大学大学院農学研究院学芸雑誌. 61 (1), pp.1-6, 2006-02-01. 九州大学大学院農学研究院

バージョン：

権利関係：

Bacillus cereus の増殖挙動予測モデルの開発

韓 文学¹・内野 敏 剛*
藤 元 優 希¹・濱 中 大 介・田 中 俊 一 郎

九州大学大学院農学研究院生産環境科学部門生産システム科学講座生産流通科学研究室
(2005年10月31日受付, 2005年11月16日受理)

Development of a growth model for *Bacillus cereus* at various conditions

Wenxue HAN¹, Toshitaka UCHINO*
Yuki FUJIMOTO¹, Daisuke HAMANAKA and Shun-ichiro TANAKA

Laboratory of Postharvest Science, Division of Bioproduction System Science,
Department of Bioproduction Environmental Sciences,
Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

緒 言

食品製造過程に HACCP が導入され、最終製品の安全性のみならず、原材料に至るまでの全工程に微生物制御が求められている。HACCP プランの開発の際、特に重要管理点 (CCP) の決定や管理基準の設定のためには、微生物挙動の正確な情報が必要となる。しかしながら、これらを実験的に求めるには微生物を取り扱う実験設備と専門的知識、さらに煩雑な操作と時間を要することから、数値モデルにより微生物の挙動を予測する方法が研究されている (清水, 2001)。また、種々の環境下での微生物による危害予測のため、温度や pH、水分活性などの環境因子を変化させ、これらに対応する微生物増殖モデルを提案する研究もみられるが (McClure *et al.*, 1994)、これらは経時的に変動する環境下での微生物の挙動予測ができず、静的な要素が強い。実際の食品は、生産・流通・消費というフードチェーンの中で経時的な変動環境に暴露されることから、このような変動環境下での微生物の増殖・死滅を予測する動的モデルの開発が急務とされる (藤川ら, 1999)。Fujikawa *et al.* (2004) はロジスティックモデルを改変し、さらに Arrhenius 式を組み込んで温度が動的に変動する場合の *Escherichia coli* の増

殖予測を行っているが、温度範囲も狭く、また、他の環境要因については全く触れていない。本研究では、環境要因の動的変化にも対応する微生物挙動予測エキスパートモデルの開発を最終目的とし、その第一段階として、種々の温度、pH、NaCl 濃度における *Bacillus cereus* の生菌数の時間的変化を表す基本的な増殖モデルの構築を行った。

供試材料および実験方法

1. 供試菌株

本研究では、低温流通を含む流通過程における微生物の挙動予測を目的としているため、菌の選定は低温条件下においても増殖できるものとした。これに加え、実験施設の関係から、危険度が少なく毒性の低い菌株が必要であるため、5~10℃での増殖が可能な中温菌で、毒性の低い *Bacillus cereus* を供試菌とした。本菌株 (*Bacillus cereus* NBRC13494) は、(独)製品評価技術基盤機構より分注した。

2. 孢子懸濁液の作成

B. cereus を Nutrient broth を用い、培養温度 30℃ で 2 日間振盪培養後、Nutrient 土壌培地 (表 1) で、30℃、10 日間培養して孢子を形成させた。これよ

¹九州大学大学院生物資源環境科学府生産環境科学専攻生産流通科学研究室

¹Laboratory of Postharvest Science, Department of Bioproduction Environmental Sciences, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University

*Corresponding author (E-mail: toshiu@bpes.kyushu-u.ac.jp)

表1 培地の組成

培地名	成分	分量
液体培地	ポリペプトン	10g
	酵母エキス	2g
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1g
	蒸留水	1000ml
NA 培地	ポリペプトン	10g
	酵母エキス	2g
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1g
	寒天	15g
	蒸留水	1000ml
Nutrient 土壌培地 (胞子形成用培地)	土壌エキス*	250ml
	ポリペプトン	10g
	酵母エキス	2g
	寒天	15g
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1g
	蒸留水	750ml

*園芸用赤玉土500gにMgSO₄ · 7H₂O 20mgを含む蒸留水1000mlを加え、1時間オートクレーブにかけ加熱加圧処理した後に濾過したもの。

りスプレッダーで菌を採取し、滅菌蒸留水で適度に希釈した。遠心分離(10分, 2500rpm)後、上清を除去して、再度懸濁する操作を2度繰り返し、洗浄した。その後、60℃、1時間の加熱処理により栄養細胞を死滅させ、胞子懸濁液とした。

3. 培養と生菌数の算出

培養液として、pH値およびNaCl濃度を調整した液体培地を用いた。作成した培養液を3つの500ml坂口フラスコに100mlずつ分注し、それぞれの坂口フラスコに1mlの胞子懸濁液を接種した。また、培養後の液体培地中の生菌数を計測するためにNA培地を用いた。それぞれの培地の組成は表1に示す。

接種した液体培地を、表2に示すNaCl濃度(4水準)、pH(4水準)、温度(6水準)の組合せで105rpm、48時間(15℃では72時間)振盪培養した。

生菌数は、振盪培養後の液体培地の吸光度を測定することによって求めた。吸光度は、予めコロニーカウント法により生菌数を求めて、作成した検量線により生菌数に換算した。増殖曲線は、接種直後を0分として、120分(15℃では180分)ごとに培養液2mlをサンプリングして吸光度を測定し、各温度における*B. cereus*の増殖曲線を作成した。

モデルの構築

通常、微生物の増殖挙動は誘導期、加速増殖期、減

表2 実験条件

NaCl (%w/v)	pH	温度(℃)
5.00	6.98	25
1.00	6.98	25
0.25	6.98	25
0.00	6.98	15
0.00	6.98	20
0.00	6.98	27
0.00	6.98	30
0.00	6.98	35
0.00	6.98	40
0.00	6.98	25
0.00	6.27	25
0.00	5.89	25
0.00	5.18	25

速増殖期および定常期を持ち、シグモイド曲線になる。このようなシグモイド型の増殖曲線を表現する連続関数としてGompertz曲線が多く用いられてきた(Gibson *et al.*, 1988)。Gompertzモデルは菌数*N*の常用対数をとった以下の修正モデルが使われることが多く、本研究でもこのモデルを用いた。

$$\log N = A + C \exp\{-\exp[-B(t-M)]\} \quad (1)$$

ここに、*A*は初期菌数の対数値、*C*は定常期における菌数の増加量(対数値)を表し、*B*は*C*とともに時間*M*における増殖速度、すなわち最大増殖速度を表す。(1)式のパラメータは表2の実験条件ごとに得られた実験値から非線形最小二乗法により求めた。また、菌の増殖挙動を表すのに有用な増殖速度*R_G*(log₁₀ count/h)、誘導期*t_L*(h)、世代時間*t_C*(h)は(1)式のパラメータを用いて、以下のように算出できる(Gibson *et al.*, 1987)。

$$R_G = BC/e \quad (2)$$

$$t_L = M - (1/B) \quad (3)$$

$$t_C = (\log_{10} 2)/R_G \quad (4)$$

ここで、*B*、*C*、*M*は環境要因の関数であることは、例えば、温度が変化すれば増殖曲線が変わることからも明らかであるので、これらを(5)式のように、本研究中で変化させた環境要因であるNaCl濃度*s*、温度*θ*、pH値*p*の多項式として表した。これにより、*s*、*θ*、*p*が変化する場合の*R_G*、*t_L*、*t_C*を予測することができ、(1)式に代入すれば、環境変化時の増殖曲線も得られる。(5)式のパラメータは重回帰分析により求めた。

$$\ln y = a + b_1 s + b_2 \theta + b_3 p + b_4 s^2 + b_5 \theta^2 + b_6 p^2 + b_7 s \theta + b_8 s p + b_9 \theta p + \vartheta \quad (5)$$

ここで*y*は*B*、*M*あるいは*C*、*θ*はランダムエラー

である。

最後にモデルの検証のため、(5)式により得られた R_G , t_L , t_G と(1)式のパラメータから得られた R_G , t_L , t_G とを文献のデータを用いて比較するとともに、米国農務省の Pathogen Modeling Program (PMP) を用いて計算した結果とも比較した。

結果および考察

1. 曲線のあてはめ

図1に *B. cereus* の生菌数の実測値と(1)式のパラメータ同定後の計算値を温度ごとに示す。このときの

NaCl 濃度は 0%, pH 値は 6.98 である。いずれの温度区においても計算値は実測値とよく一致し、Gompertz モデルは高い適合性を示した。また、培養温度が上昇するにつれて誘導期が短くなり、増殖速度が増加する傾向がみられ、前述のように誘導期および増殖速度に温度依存性があることが明らかであった。

2. Gompertz モデルパラメータの予測

Gompertz モデルのパラメータ B , C および M は、重回帰分析を行った結果、それぞれ以下の式が得られた。 B , C および M に対する重相関係数はそれぞれ

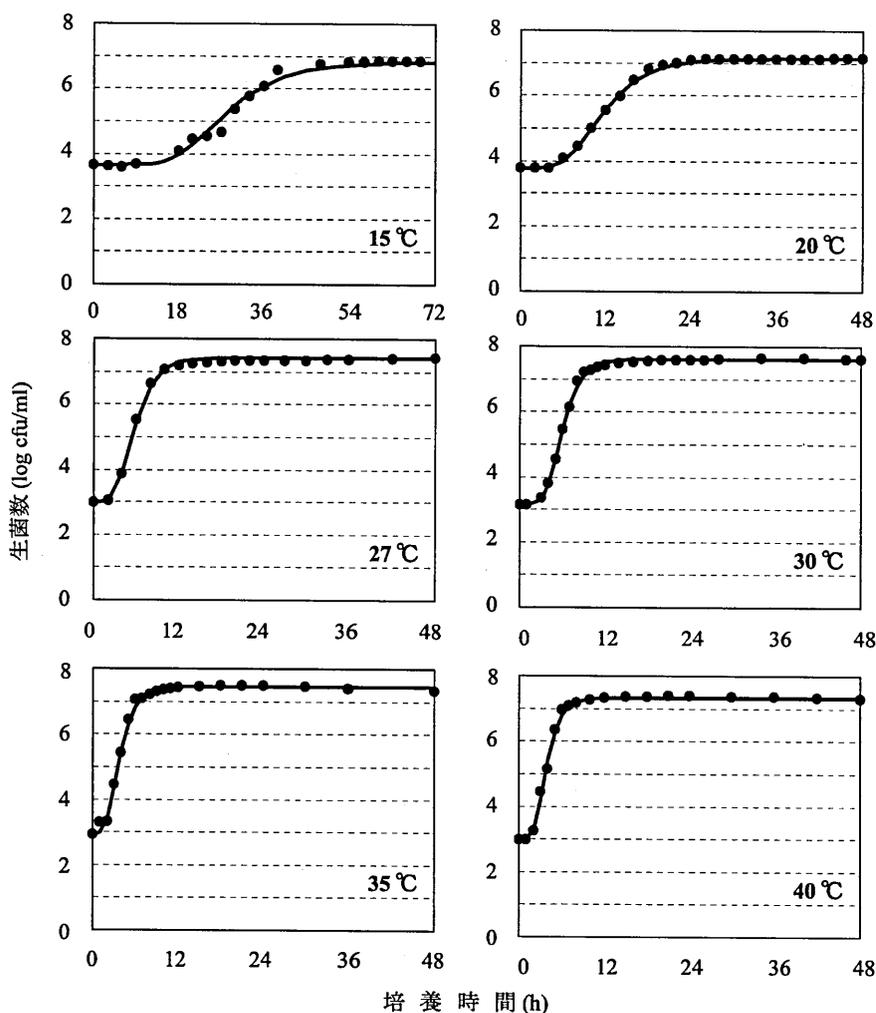


図1 *B. cereus* の各温度における増殖挙動と Gompertz 曲線の適合。
NaCl 濃度 0%, pH6.98 に調整した培養液を用いた。
●: 実測値, 実線: 計算値 (非線型最小二乗法による)。

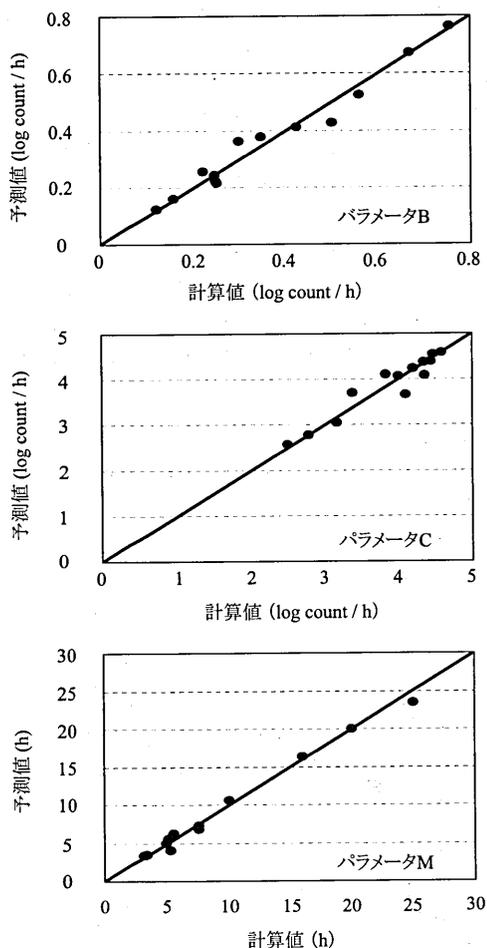


図2 Gompertz モデルパラメータの計算値と予測値との比較。
計算値は非線型最小二乗法、予測値は(6)~(8)式により求めたものである。

0.968, 0.915および0.991であり、いずれも高い相関関係を示した。

$$B: y = 0.039\theta - 320.8s^2 - 0.001\theta^2 - 0.0001p^2 + 0.059s\theta + 0.003p\theta - 0.477 \quad (6)$$

$$M: y = 12.00\theta - 86.45s^2 + 0.131\theta^2 + 5.131p^2 + 12.62s\theta - 2.753p\theta - 146379 \quad (7)$$

$$C: y = 0.417\theta + 2754s^2 - 0.017\theta^2 - 0.105p^2 - 6.473s\theta + 0.049p\theta + 0.394 \quad (8)$$

3. モデルの検証

図2に Gompertz モデルパラメータの計算値と予測値の比較を示す。計算値は実験条件ごとに求めた(1)式のパラメータであり、予測値は(6)~(8)式の s , θ , p に実験条件を入れて計算したものである(以下、同様に求めたものを計算値、予測値と呼ぶ)。プロットは傾きが1の直線の近傍に集中することから、 s , θ , p が与えられれば、(6)~(8)式により、*B. cereus* の増殖曲線を精度良く求めることができる。

表3に世代時間 t_G および誘導期 t_L の計算値と予測値、及びPMPにより計算した値の比較を示す。いずれの培養温度においても、世代時間および誘導期の実験値と予測値、PMP値はよく一致しており、本研究の手法は精度が高く、また、実用にも適するものと考えられる。

図3に *B. cereus* に対する世代時間 t_G の文献値と予測値との比較を示す。文献値は図3の表題に示した文献中の実測値から得たもので、予測値は(6)および(8)式に文献の実験条件を入れ、これを(2)および(4)式に代入して求めたものである。傾きが1の直線の上部は予測値が実測値よりも大きく、世代時間を長く予測する場合を示し、逆に下側は短く予測する場合である。短いと予測した場合は危険を十分に認識できるので、安

表3 世代時間および誘導期の比較

温度 (°C)	世代時間 (h)			誘導期 (h)			
	θ	t_G obs	t_G pred	t_G PMP	t_L obs	t_L pred	t_L PMP
15		2.16	2.21	2.26	16.64	15.17	14.08
20		0.99	1.00	1.13	5.94	6.10	4.60
27		0.37	0.44	0.49	2.89	2.56	1.74
30		0.33	0.35	0.37	3.41	2.08	1.42
35		0.27	0.27	0.24	1.65	1.83	1.04
40		0.25	0.25	0.18	1.97	2.08	1.15

obs: 計算値 (実験条件ごとに求めた(1)式のパラメータを(3)および(4)式に代入して求めたもの)、
pred: 予測値 ((6)および(8)式に実験条件を入れ、これを(3)および(4)式に代入して求めたもの)、
PMP: PMP値 (米国農務省の病原菌モデルプログラムにより予測したもの)。

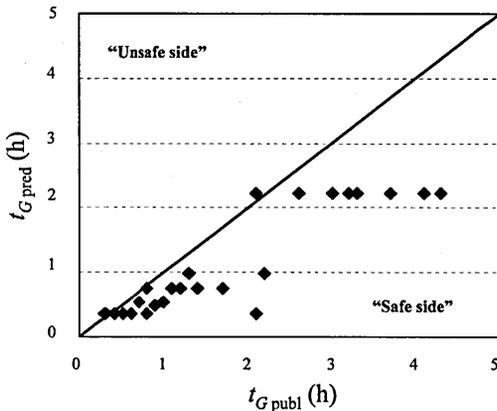


図3 *B. cereus* に対する世代時間の文献値と予測値との比較。

$t_{G\text{ publ}}$: 世代時間の文献値,
 $t_{G\text{ pred}}$: 世代時間の予測値 ((4)および(5)式により算出)。文献値は以下による。
 Wong and Chen, (1988); Sooltan *et al.*, (1987); Asplund *et al.*, (1988); Harmon and Kautter, (1991); Johnson *et al.*, (1983); Gilbert *et al.*, (1974); Nester and Woodburn, (1982); Blakey and Priest, (1980); Rodriguez and Barret, (1986); Garcia-Arribas and Kramer, (1990).

全対策を取ることができるが、逆の場合は、安全と判断した時間でも、予測に反し菌の増殖が速いことになるので危険である。プロットはほぼ全てが直線の下部に分散しており、正確に世代時間を予測したとは言いがたいが、ほとんどが安全側に入り、実用的には問題ないと考えられる。

摘 要

本研究では、動的条件にも対応する微生物挙動予測エキスパートモデルの開発を最終目的とし、その第一段階として、種々の温度、pH値、NaCl濃度における *Bacillus cereus* の生菌数の時間的変化を表す基本的な増殖モデルの構築を行った。その結果として、以下の知見を得た。

1. Gompertz モデルは実験値と高い適合性を示した。
2. Gompertz モデルを用いて算出した世代時間、誘導期は米国農務省の Pathogen Modeling Program を用いて算出した予測値と同等の値を示した。
3. 文献値を用いて検証した結果、本モデルによる

世代時間の予測値は安全側にあることが明らかとなった。

文 献

Aspulund, K., E. Nurmi, P. Hill, J. Hirn 1988 The inhibition of the growth of *Bacillus cereus* in liver sausage. *Int. J. Food Microbiol.*, 7: 349-352

Blakey, J. J. and F.G. Priest 1980 The occurrence of *Bacillus cereus* in some dried foods including pulses and cereals. *J. Appl. Bacteriol.*, 48: 297-302

藤川 浩 1999 予測微生物学. 食品衛生研究, 49 (7): 47-60

Fujikawa, H., A. Kai and S. Morozumi 2004 A new logistic model for *Escherichia coli* growth at constant and dynamic temperatures, *Food Microbiol.*, 21: 501-509

Garcia-Arribas, M. L., J. M. Kramer 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. *Int. J. Food Microbiol.*, 11: 21-34

Gibson, A. M., N. Bratchell and T. A. Roberts 1987 The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. *J. Appl. Bacteriol.*, 62: 479-490

Gibson, A. M., N. Bratchell and T. A. Roberts 1988 Predicting microbial growth: growth responses of *Salmonellae* in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *Int. J. Food Microbiol.*, 6: 155-178

Harmon, S. M. and D. A. Kautter 1991 Incidence and growth potential of *Bacillus cereus* in ready-to-serve foods. *J. Food Prot.*, 54(5): 372-374

Johnson, K. M., C. L. Nelson and F. F. Busta 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. *J. Food Sci.*, 48: 286-287

Nester, S. and M. Woodburn 1982 Contamination and growth of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* in Mexican-style beans. *J. Food Prot.*, 45: 638-642

McClure P. J., C. deW. Blackburn, M. B. Cole, P. S. Curtis, J. E. Jones, J. D. Legan, I. D. Ogden, M. W. Peck, T. A. Roberts, J. P. Sutherland, S. J. Walker 1994 Modelling the growth, survival and death of microorganisms in

- foods: the UK Food Micromodel approach. *Inter. J. Food Microbiol.*, 23: 265-275
- Rodriguez, M. and E. Barret 1986 Changes in microbial population and growth of *Bacillus cereus* during storage of reconstituted dry milk. *J. Food Prot.*, 49: 680-686
- 清水 潮 2001 食品微生物の科学. 幸書房, 東京
- Sooltan, J. R. A., C. G. Mead and A. P. Norris 1987 Incidence and growth potential of *Bacillus cereus* in poultry meat products. *Food Microbiol.*, 4: 347-351
- Wong, H. C. and Y. L. Chen 1988 Effects of lactic acid bacteria and organic acids on growth and germination of *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 2179-2184

Summary

The modified Gompertz model was applied for predicting the growth of *Bacillus cereus* under various conditions of pH, NaCl concentration of culture medium and temperature. Calculated values of cell population by the Gompertz model which was estimated parameters using by nonlinear least square method were agreed well with experimental values. The generation time and the lag time were predicted using parameters of Gompertz model which are represented as polynomial functions of pH, NaCl concentration and temperature. The predicted values were approximately equal to the values obtained by Pathogen Modeling Program. We will be able to estimate more safely shelf life of food by using the prediction value of generation time from the result of comparison with the values shown in previons reports. To realize our final goal of expert system for predicting the growth and death of microorganisms on food, it was necessary to accumulate more data of many different kinds of microorganisms.