



Title	畜舎の空気環境に関する実験法： . フィルターによる空中浮遊細菌数の測定
Author(s)	干場, 信司; 田中, 利明; 堂腰, 純
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 14(4), 370-375
Issue Date	1985-12-28
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/12036
Type	bulletin (article)
File Information	14(4)_p370-375.pdf



[Instructions for use](#)

畜舎の空気環境に関する実験法

I. フィルターによる空中浮遊細菌数の測定

干場信司・田中利明*・堂腰 純

(北海道大学農学部農業工学科農業物理学教室・*北海道庁)

(昭和60年5月14日受理)

Development of Experimental Methods for Air Environment in Livestock Buildings

I. Filtration Method for Measuring Bacterial Aerosol Concentration

Shinji HOSHIBA, Toshiaki TANAKA*
and Jun DOHKOSHI

Laboratory of Agricultural Physics, Department of Agricultural Engineering, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan
*Hokkaido Prefecture, Sapporo 060, Japan

I. 緒 言

畜舎内の環境は、これまで主に温度、湿度、放射熱等の熱的環境を対象として研究が行なわれて来ており、畜舎内環境の調節も、主に熱的環境をその指標として行なわれて来た。しかし、子牛の感染症の多発等は、熱的環境のみからでは解決し得ない問題であり、畜舎内環境のもう1つの側面である空気環境について考慮する必要性が生じている。

ここで言う空気環境とは、畜舎内外の環境要素の中で空気の質あるいは空気の衛生状態に関する環境要素の総称であり、より平易な言葉で表現すれば、空気の新鮮さに係わる環境とも言えよう。その要素として、具体的には、CO₂、NH₃等のガス・臭気成分、空中浮遊粉じん・空中浮遊細菌等の空中浮遊微粒子 (Aerosols) などがあげられる¹⁾。

空気環境の各要素に関するこれまでの研究をみると、CO₂、NH₃等のガス・臭気成分については DAY ら²⁾の報告に見られるように、古くから多くの研究がなされて来た。しかし、現在では、特殊な場合を除けば、畜舎内で各種ガス・臭気成分が家畜の疾病発症の臨界濃度を越えることはほとんどないと考えられる。これに対し、

空中浮遊微粒子、特に、空中浮遊細菌は、より直接的に家畜の疾病と関係がある空気環境要素であると考えられる。しかし、空中浮遊細菌に関する研究は、主に1970年代に入ってからで、たとえば CURTIS ら³⁾あるいは GOODRICH ら⁴⁾の報告などが見られるが、その数はあまり多くない。この理由の1つとして、測定の複雑さがあげられよう。すなわち、現在でも測定にはアンダーセンサンプラー⁵⁾が主に用いられており、多大な時間と労力および専門的技術を要し、多数の測点を設けることが困難である。したがって、空中浮遊細菌の簡易的測定法が確立されれば、空気環境という側面からの畜舎内環境の研究が大きく前進すると考えられる。

本研究は空気環境に関する実験法検討の一環としてフィルター法による空中浮遊細菌の簡易測定法をとりあげ、畜舎においてフィルター法を用いる上での種々の問題点を検討した。

II. 空中浮遊細菌数の測定方法とその畜舎における利用上の問題点

古橋⁶⁾は、空中浮遊細菌の測定方法をその捕捉機構から、①衝突法、②衝突洗浄法 (インピンジャー法)、③ろ過捕集法 (フィルター法) および④落下細菌法の4種に分

類している。

従来より広く用いられて来た落下細菌法は、簡便な方法ではあるが、その原理上、粒径 $3\mu\text{m}$ 以下の細菌粒子のすべてを捕集することはできない⁶⁾とされている。しかし、粒径(空気力学径)が $3\mu\text{m}$ の粒子の50%は、人の口呼吸において肺胞に沈着する⁷⁾と言われているため、この方法のみでは不十分であろう。インピンジャー法では、比較的安価に測定することができるが、サンプリング中の汚染に対する細心の注意やサンプリング前後の処理に多くの時間と労力および専門の技術を要するため、畜舎のような極めて汚染された場所で、しかも数多くのサンプリングが必要な場合には、あまり適さない。しかし、長時間吸引することによる異なった畜舎施設間の比較などには適しているものと考えられる。

衝突法に属する測定器として、アンダーセンサンプラーとスリットサンプラーがよく用いられる。特に、アンダーセンサンプラーは、粒径別に細菌を捕捉できるという大きな特長を持っている。また、スリットサンプラーも細菌数の経時変化を測定でき、畜舎においてもそれぞれの特長を生かした利用が考えられる。しかし、ともに高価であり、数多くの測点が必要な時にはあまり用いられない。また、アンダーセンサンプラーは、インピンジャー法と同様に多くの労力と専門の技術を必要とする。

一方、フィルター法は、フィルターの種類や処理の方法によっても異なるが、プラスチック製フィルターホルダーを用いて、細菌の捕捉後フィルターをホルダーにセットしたままで液体培地を注入し、そのまま培養する方法も開発されており⁸⁾、専門の技術をあまり必要としない。畜舎のような著しく汚染された場所における数多くのサンプリングも十分可能であり、空中浮遊細菌の簡易の測定法としては最も適した方法であると考えられる。

しかし、このフィルター法にも畜舎内空気を対象とするために、下に記した種々の解決すべき問題点が生じている。

(1) 培養温度と出現コロニー数

培地の仕様書には 32°C を培養温度と定めているが、畜舎内の細菌についてもこの培養温度が適正かどうか検討する必要がある。また、畜舎内には、乾草や敷料あるいはサイレージなど、糸状菌の発生源も多く、培養温度によっては、フィルター表面が菌糸で覆われてしまうことも考えられる。

(2) 培養時間と出現コロニー数

数日間にわたる測定などの場合、他の環境要素の測定との時間的競合もあり、出現コロニー数をカウントでき

る時間が制約される場合も生じる。このため、培地の仕様書の指定とは異なった時間で培養させた場合の出現コロニー数を知ることができれば、測定計画を立案する上で有用である。

(3) 吸引空気量と出現コロニー数

一般に細菌をペトリ皿で培養する場合、出現コロニー数は $30\sim 200$ 個が適正である⁹⁾とされており、これは、細菌同士の栄養分および場の競合を避けるためと言われている。一方、畜舎は人間の居住空間に比べて、著しく汚染されており、空中浮遊細菌も高濃度を示している¹⁰⁾。例えば、七面鳥用畜舎においては、空気 1m^3 当たりの出現コロニー数が 10^6 個(以下、 $10^6\text{CFP}/\text{m}^3$ 、CFP: Colony Forming Particles)のオーダーに達することもあり¹¹⁾、少量の空気を吸引してもフィルター表面には前述した出現コロニー数の適正範囲を大きく上回る数のコロニーが出現する可能性がある。したがって、フィルター表面に捕捉された細菌数と出現コロニー数との直線性が、どの程度の濃度レベルまで成立するかを知ることは重要である。また、大量の空気を吸引した際には、乾燥等による細菌の死滅も危惧される。

(4) サンプリングから培養開始までの時間と出現コロニー数

実験室内における測定と異なり、現地の畜舎における測定の場合、サンプリング場所と培養場所とが距離的に離れているため、培養開始まで時間がかかることも多い。また、一定時間間隔によるサンプリングの際、その直後毎に液体培地を注入して培養を開始させるよりは、一度に処理することができれば、培養後のコロニー数のカウントをも含めて好都合である。

III. 方法

本研究で検討を行なったフィルター法は、Fig. 1に略図を示すとおり、被測定空気を一定量メンブランフィルター(孔径 $0.47\mu\text{m}$)を通して吸引し、フィルター上に空中浮遊細菌を捕捉する方法である。捕捉後、フィルターホルダー底部より総細菌用の液体培地(M-TGE Broth)を注入して、フィルターの下に重ねてセットされている液体培地吸収パッドに浸みこませ、一定温度で培養の後、実体顕微鏡(20~40倍)により出現コロニー数をカウントした。

コロニー数の表示には通常、常用対数を用いた。その際コロニー数が0となる場合を考慮して次式を用いた。

$$C = \log(C' + 1)$$

ここで、

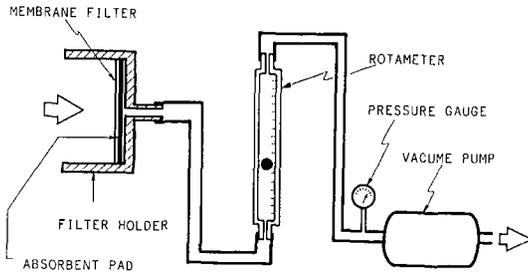


Fig. 1. Schematic diagram of instrument for measuring bacterial aerosol concentration using filtration method.

C : 空中浮遊細菌数 (常用対数表示) = 空気 10ℓ 当たりのコロニー数の常用対数 (LCFP/10ℓ)

LCFP: Common Logarithm of Colony Forming Particles

C' : 空気 10ℓ 当たりのコロニーのカウント数

また、平均を求めてそれを実際のコロニー数 (真数) で表示する必要がある場合には次式によった。

$$\bar{C}_g = 10^{\bar{C}} - 1$$

$$\bar{C} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \log(C_i + 1)$$

ここで、

\bar{C}_g : 空中浮遊細菌数の幾何平均値 (CFP/10ℓ)

\bar{C} : 常用対数表示をした空中浮遊細菌数の平均値 (LCFP/10ℓ)

n : サンプル数

検討事項としては、II において記したフィルター法における問題点の 4 項目であり、以下、それぞれの項目に関する実験方法を述べる。

(1) 培養温度と出現コロニー数

培養温度を 10°, 15°, 20°, 30°, 37°, 45°C の 7 段階に設定した。培養時間は培地の仕様書に従い、48 時間とした。サンプリングは北大農学部附属農場牛舎の搾乳牛けい留部中央通路において行なった。吸引空気量は約 7.5ℓ とし、30 秒間で吸引した。連続して 35 個のサンプリングを行ない、それらを順次 10°C 区から 45°C 区に振り分けて、各培養温度毎に 5 サンプルずつとした。培養後、発育した細菌コロニー数とともに同時に出現した糸状菌数をもカウントした。

(2) 培養時間と出現コロニー数

培養時間を 24, 48, 72 時間の 3 段階とし、それぞれの培養時間に対して 25°C と 37°C の 2 段階の培養温度を設定した。サンプリングは (1) と同様の方法で行ない、各

処理 5 サンプルずつとした。

(3) 吸引空気量と出現コロニー数

吸引空気量は吸引時間のみを変えることにより調節した。すなわち、吸引時間を 10, 20, 30, 45, 60, 90, 180, 300 秒の 9 段階に変えた。吸引速度は約 15 ℓ/min で一定としたため、対応する吸引空気量は、それぞれ 2.5, 5.0, 7.5, 11.3, 15.0, 22.5, 45.0, 75.0 ℓ であった。また、サンプリングは、(1) と同様の牛舎および空中浮遊細菌が高濃度な場所として前記農場内鶏舎において行なった。サンプル数は各処理 5 個ずつとした。培養温度は 25°C、時間は 48 時間であった。

(4) サンプリングから培養開始までの時間と出現コロニー数

サンプリング後から培養開始までの時間を 0, 8, 16, 24, 36, 48 時間の 6 段階とした。サンプリングは (1) と同様の方法で行ない、各処理 6 サンプルずつとした。培養温度および時間はそれぞれ 25°C、48 時間であった。

IV. 結果および考察

1. 培養温度と出現コロニー数

7 段階の培養温度における牛舎内空中浮遊細菌および同時に出現した糸状菌のコロニー数を Fig. 2 に示す。これによると、細菌コロニー数は、20°C ~ 25°C で最大と

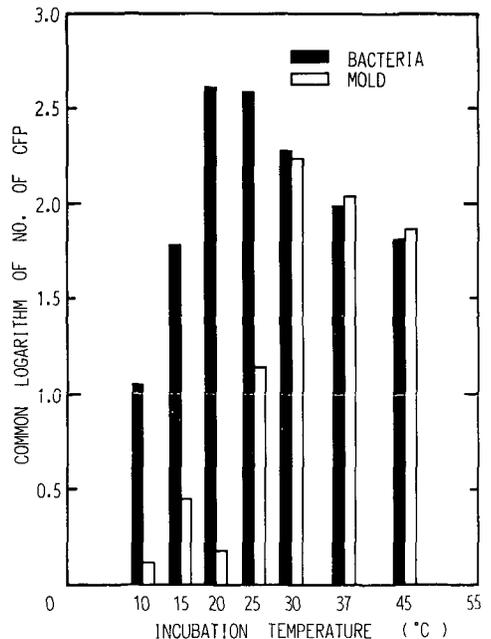


Fig. 2. Effects of incubation temperature on number of CFP.

なり、この温度域より上下に離れるに従い減少した。また、糸状菌コロニー数は30°Cで最大値を示した。最適培養温度は、その目的によって異なると考えられる。たとえば、家畜体内における細菌の育成に主眼をおいた場合には、家畜の体温と等しい37°Cから42°Cの温度域¹²⁾となるであろう。ここでは、最大のコロニー数をもたらす培養温度を最適と考えた。その際、20°Cと25°Cとが考えられるが、夏期に20°Cで培養するためには冷房装置が必要となること、および糸状菌コロニー数は20°Cよりも25°Cの方が多かったものの、25°Cでもカウントは可能であったことを考慮し、ここでは25°Cを基準の培養温度とした。なお、今回は行っていないが、牛舎以外の畜舎においても同様の検討が必要であると思われる。

2. 培養時間と出現コロニー数

牛舎内で捕捉した細菌を3通りの時間で培養した場合の出現コロニー数、およびその分散分析の結果をTable 1に示す。F-検定の結果から、培養温度にかかわらず、異なった培養時間による出現コロニー数には有意な差が認められなかった。これは、培養開始後24時間から72時間の間は、いつでもコロニー数をカウントする

Table 1. Effects of incubation period on number of CFP, and analysis of variance

a) Experimental data						
25°C			37°C			
	24hr	48hr	72hr	24hr	48hr	72hr
	2.40	2.43	2.44	1.99	2.07	2.00
	2.17	2.45	2.43	2.22	2.09	1.88
	2.01	2.48	2.31	2.01	1.96	1.81
	2.13	2.40	2.37	1.92	1.92	2.15
	2.31	2.10	2.30	1.90	1.92	1.90
Ave	2.20	2.37	2.37	2.01	1.99	1.95
b) Analysis of variance						
Temp.		SS	DF	MS	F	
25°C	Between	0.117	4	0.029	1.71	
	Within	0.207	12	0.017		
	Total	0.324				
37°C	Between	0.009	4	0.002	0.15	
	Within	0.160	12	0.013		
	Total	0.169				

ことが可能であることを示しており、実験の計画に時間的余裕を与えるものと思われる。

3. 吸引空気量と出現コロニー数

Fig. 3は、細菌濃度の非常に高い鶏舎、および鶏舎より1桁濃度の低い牛舎における、吸引空気量と出現コロニー数との関係を示している。両畜舎ともに15ℓまでは直線関係にあると見なすことができるが、吸引空気量が75ℓへと増加するに従いコロニー数の増加の割合が減少する傾向が見られた。これらの結果より、以下の2点のことが類推されよう。第1点としては、鶏舎においては約4,000 CFPまで吸引空気量との間にはほぼ直線関係が認められていることから、フィルター表面に捕捉される細菌の数そのものは、出現コロニー数にあまり影響を与えていないことが推察された。しかし、出現したコロニーは小径であり、また数も多すぎるため、そのカウントには困難を伴う。したがって、できるだけ出現コロニー数を抑えることが必要であろう。第2点としては、フィルター上の細菌が、吸引空気の通過にともない、乾燥あるいは物理的衝撃によって死滅しているのではあるまいかという推察である。すなわち、細菌濃度が鶏舎と牛舎とでは1桁以上も異なるにもかかわらず、ともに吸引空気量が75ℓへと増加するにつれて増加率が低下する理由は、この点にあると類推される。このことについては、金谷ら¹³⁾も牛舎および豚舎で同様な実験を行なってお

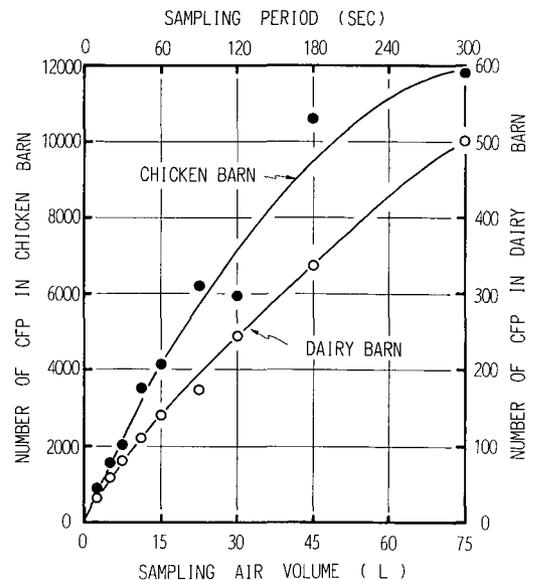


Fig. 3. Effects of sampling air volume on number of CFP in chicken barn and dairy barn.

り、特に豚舎において50ℓを越した際の増加率の激減を報告している。その理由として金谷らは、フィルターの目詰り、コロニーの結合、細菌のフィルターへの衝突と脱水による死滅などをあげているが、本実験で細菌濃度が大きく異なる空気環境のもとでも近似した変化曲線を示していることから、前2者はあまり大きな原因とは言えないものと考えられる。

以上の結果より、畜舎における通常の空中浮遊細菌数の測定における吸引空気量は、直線関係が十分に成立している範囲内の7.5ℓとし、これを30秒間で吸引することとした。

4. サンプルングから培養開始までの時間と出現コロニー数

Fig. 4にサンプルング後、培養開始までの時間と出現コロニー数との関係を示す。分散分析により、F-検定を行なったところ、培養開始までの時間が異なっても出現コロニー数には有意な差は認められなかった。しかし、Fig. 4において、48時間後に培養開始したサンプルの出現コロニー数が若干低くなっており、それ以上の時間間隔における減少の傾向を暗示している。実際に、各処理間の総当たりのt-検定でも8時間後と48時間後の間のみ5%水準で有意な差が認められた。したがって、本実験からは、36時間程度であれば、サンプルング後培養せずにおいても出現コロニー数には影響がないと言える。このことは、サンプルング後長距離の輸送等を伴う測定も可能であることを示しており、細菌測定の簡易性を高めるものと考えられる。なお、48時間以上については、今後の検討が必要であろう。

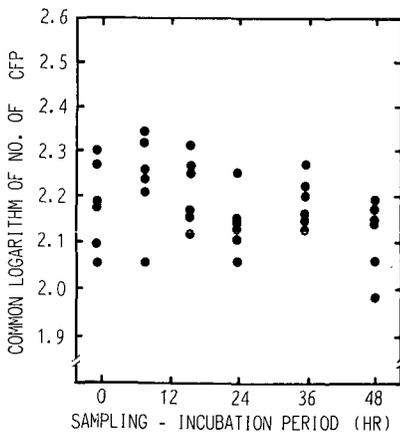


Fig. 4. Effects of period between sampling and start of incubation on number of CFP.

V. 摘 要

畜舎の空気環境に関する実験法検討の一環として、フィルター法による空中浮遊細菌の簡易測定をとりあげ、畜舎において同法を用いる上での種々の問題点を検討した。得られた結果は以下の通りである。

- (1) 10°C から 45°C までに 7 段階の培養温度を設定して、牛舎内空中浮遊細菌を培養したところ、20°C~25°C で最大のコロニー数を示した。最大のコロニー数をもたらす培養温度を最適培養温度と考え、また、北海道のような冷涼な地帯においては、夏でも 25°C であれば冷房装置を必要としないため、25°C を基準の培養温度とした。
- (2) 培養開始後 24 時間から 72 時間の間はいつでも、培養時間の影響を受けずにコロニー数をカウントすることが可能であることを確認した。
- (3) 鶏舎における実験の結果、約 4,000 CFP までは吸引空気量と出現コロニー数との間に直線関係が成立することが判明した。
- (4) 吸引空気量が大きくなるにつれて出現コロニー数の増加率の減少が見られた。これは、乾燥等によるフィルター表面の細菌の死滅などがその原因として考えられた。
- (5) 吸引空気量と出現コロニー数に直線関係が成立している吸引空気量の範囲内にある 7.5 ℓ を常法の空気量とし、30 秒間で吸引することとした。
- (6) サンプルング後 36 時間程度は培養開始せずにおいても、出現コロニー数にはほとんど影響を及ぼさないことが明らかになった。

辞 謝

本研究を実施するにあたり、北大農学部 朝日田康司教授および八戸芳夫教授をはじめ附属農場の関係者には、快く実験場所の便宜をはかっていただいた。また、北大農学部農業生物学科助手 中田 徹氏および百町満朗氏には、統計処理および微生物学の基礎知識に関し適切な御助言をいただいた。さらに農業物理学教室の職員・学生には種々御援助を願った。以上の諸氏に心から感謝の意を表する次第である。

参 考 文 献

1. 千場信司：乳牛の群管理施設，北海道家畜管理研究会報，19：11-13. 1984
2. DAY, D. L., E. L. HANSEN and S. ANDERSEN: Gases and odors in confinement swine buildings. Transactions of the ASAE, 8: 118-121.

- 1965
3. CURTIS, S. E., J. G. DRUMMOND, K. W. KELLEY, D. J. GRUNLOH, V. J. MEARES, H. W. NORTON and A. H. JENSEN: Diurnal and annual fluctuations of aerial bacterial and dust levels in enclosed swine houses. *J. Animal Sci.*, **41**: 1502-1511. 1975
 4. GOODRICH, P. R., S. L. SPIER, S. L. DIESH and L. A. WILL: Microbial aerosol monitoring of a beef housing oxidation ditch. In *Livestock Environment*, ASAE, St. Joseph, MI., pp. 189-194. 1974
 5. ANDERSEN, A. A.: New sampler for the collection sizing and enumeration of viable airborne particles. *J. Bacteriology*, **76**: 471. 1958
 6. 古橋正吉: 空中浮遊細菌の検査法, 臨床検査, **24**: 735-737. 1980
 7. LIPPMANN, M.: Size-selective sampling for inhalation hazard evaluations. In *Fine Particles* (LIU, B. Y. H., Ed), Academic Press, Inc., pp. 287-310. 1976
 8. 日本ミリポア・リミテッド: 空中浮遊菌の測定, ANJ-1 (カタログ), 1981
 9. 土壌微生物研究会編: 土壌微生物実験法, 養賢堂, pp. 24. 1975
 10. CURTIS, S. E. and J. G. DRUMMOND: Air environment and animal performance. In *Handbook of Agricultural Productivity, II, Animal Productivity* (RECHIGL, M., Ed.), CRC Press, pp. 107-118. 1982
 11. JACOBSON, L. D. and K. A. JORDAN: Aerosol concentration in a turkey barn environment. *Transactions of the ASAE*, **21**: 325-328. 1978
 12. 内藤元男 (監): 畜産大事典, 養賢堂, pp. 435. 1978
 13. 金谷尚知・森島 博・長島守正・川西啓文: 農業施設内空間における微生物の計測について, 昭和56年度農業施設学会大会要旨集, pp. 7-8. 1981

Summary

This paper discusses various problems and solutions for using a filtration method in measuring bacterial aerosol concentrations in livestock buildings. The optimum incubation temperature for bacteria sampled in a dairy barn was 20°C to 25°C. Since a cooling facility is required for incubation at 20°C in summer, the 25°C temperature was considered suitable for the routine method in Hokkaido area. An incubation period of 24 hours was sufficient for forming colonies visible in a stereoscopic microscope. There were no harmful effects on the number of colony forming particles (no. of CFP) with a routine sampling air volumes of 7-8 liters and a corresponding sampling time of 30 sec. However, high air sample volume (more than 15 liters) slightly decreased the no. of CFP. This may be caused by drying of the bacteria on the filter. The period between sampling and start of incubation did not affect on the no. of CFP within 36 hours.