

室内環境中の微生物発育速度・MVOC 放散のモデリングと数値予測手法の開発
 (第6報) 3種の真菌を対象とした周期変動する温度場における比増殖速度の測定
 Modeling and Numerical Analysis of Fungal Growth and MVOC Emission in Indoor Environment
 (Part 6) Measurement of Specific Proliferation Rate of Fungi under Various Temperature Conditions

学生会員 ○水野 優 (東京工芸大学大学院)

学生会員 中村 美咲 (東京工芸大学大学院)

正会員 伊藤 一秀 (東京工芸大学)

Yu MIZUNO*¹ Misaki NAKAMURA*¹ Kazuhide ITO*¹

*¹ Tokyo Polytechnic University

The fungal growth and infestation are deeply associated with indoor air humidity, temperature, building materials and ventilation rate. The overarching of this study is to develop the numerical model that predict microorganism growth and MVOC emission by taking into account the influence of moisture, temperature and building materials for various fungi. Towards this end, in this paper (Part 6), we focus on the measurement of specific proliferation rate of fungi (*Aspergillus penicillioides*, *Eurotium herbariorum* and *Penicillium citrinum*) on glass plate under various temperature conditions.

はじめに

本報では、前報(その5)に引き続き、室内環境中の微生物問題に関して検討を行う。特に微生物の成長・増殖問題に着目し、3種類の真菌を対象として、養分量・孢子濃度等を一定にした懸濁液条件下で、雰囲気温度を周期的に変化する環境下に暴露した状態で、ガラスプレート上での菌糸の増殖速度の測定を行った結果を報告する。

1. カビ指数と比増殖速度

カビに代表される真菌類の生育に関しては、多くの既往研究がある。多くは培地を設置したシャーレ上にて、コロニー数ならびにコロニーサイズを計測することで、真菌生育に対する温度・湿度の影響を検討している。

コロニーサイズの検討と比較し、相対的にミクロなカビの増殖速度の表現の一方法として、阿部²⁾によりカビセンサーを用いたカビ指数が提案されている。カビ指数とは、ある温湿度における菌糸の1週間あたりの応答 (ru/week、菌糸長を基に測定した発育程度)を定量的に表現する指標であり、ガラスシャーレ上での菌糸の比増殖速度を示すものである。カビ指数は雰囲気温度の影響を加味した菌糸の増殖速度を表現可能であるが、ガラスシャーレ上であること、一定量の養分上であること等の条件が一般の建材表面での性状と大きく異なるため、実際の建築空間に適用する際には大きな制約がある。柳ら²⁾は、カビセンサーをオフィスビル等の空調システム内に適用し、センサー菌(*Eurotium herbariorum*)のレスポンスと、温湿度の関係を検討している。特に湿度に対するレスポンスはその累積頻度と良い対応関係を示すことを報告している。

本報を含む一連の研究では、各種の建材表面での菌糸増殖の応答を測定することで、実際の建築空間に適用可能

表1 実験ケースと対象真菌

ケース	対象真菌	温度
Case1-Eu	<i>Eurotium herbariorum</i> (NBRC 33235)	28°C一定
Case2-Eu		変動
Case1-Asp	<i>Aspergillus penicillioides</i> (NBRC 33024)	28°C一定
Case2-Asp		変動
Case1-Pe	<i>Penicillium citrinum</i> (NBRC7784)	28°C一定
Case2-Pe		変動

表2 実験条件

温度条件	(1) 28±0.1 °C (2) 設定温度条件(図2に示す)
湿度条件	Rh 90±3 %
孢子濃度	<i>Eu, Pe</i> : 2.2×10 ⁷ [個/mL] <i>Asp</i> : 1.0×10 ⁸ [個/mL]
建材の再現	ガラス板: 基本ケース
表面付着養分量	PDA:6.12 g 蒸留水:300cc

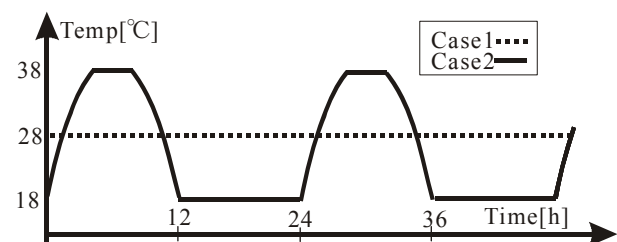


図1 設定温度条件

な比増殖速度データの蓄積を最終目標とする。

2. 対象真菌

本報で対象とした真菌種と実験ケースを表1に示す。室内に存在する代表的な真菌のなかで、*Aspergillus penicillioides* (NBRC 33024)、*Eurotium herbariorum* (NBRC 33235)、ならびに *Penicillium citrinum* (NBRC 7784)の3種類を対象とする。*Aspergillus penicillioides* (NBRC 33024)、*Penicillium citrinum* (NBRC 7784)は、前報(その5)で使用

図2 Case1-Eu
(*Eurotium herbariorum*)
温度条件：28℃一定
湿度条件：90%

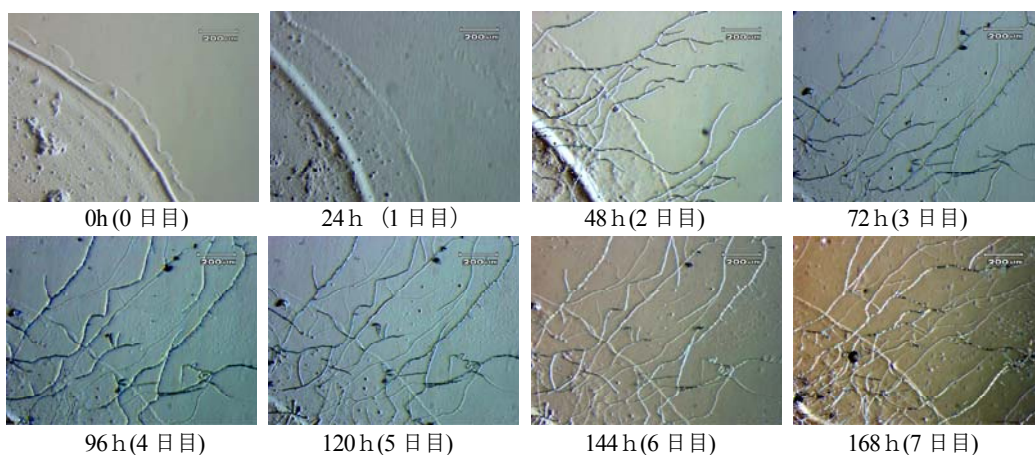
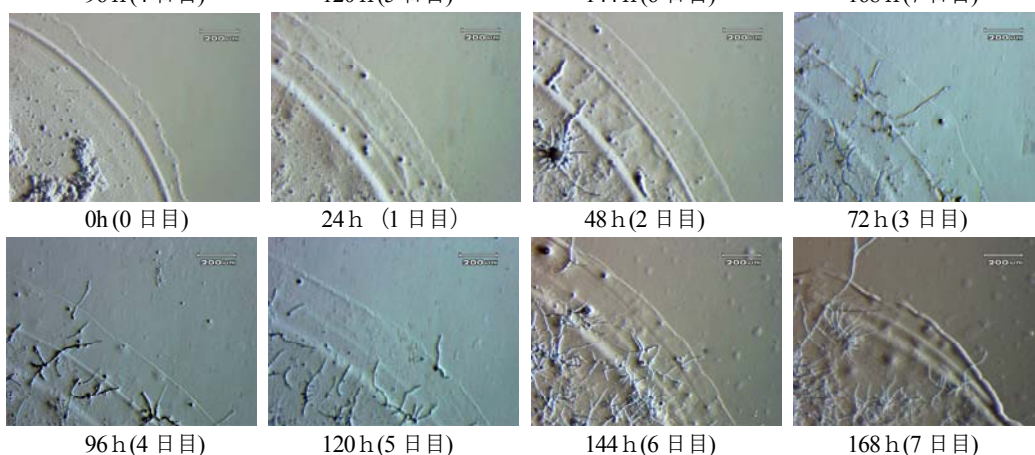


図3 Case2-Eu
(*Eurotium herbariorum*)
温度条件：変動あり
湿度条件：90%



した真菌と同一である。*Eurotium herbariorum* は好乾性カビで相対湿度 73%~95%の環境下で発育速度が高いことが知られている。また柳ら²⁾の報告で、相対湿度の累積頻度と菌糸成長が良い対応関係にあるとされている真菌である。

3. 実験概要

本報を含む一連の研究³⁾では、室内環境の各物理的パラメータを系統的に変化させ、微生物の発育速度の測定を行うものである。本報では、阿部のカビセンサーと同様にガラスプレート上に養分を含有させた孢子懸濁液を滴下し、菌糸の増殖を測定する。

3.1 建材ピースの作成

ガラスプレートは 26 mm×76mm の大きさにカットし、オートクレーブで滅菌することで実験用ピースとする。

3.2 実験手順

本研究では菌糸成長の観察、測定のために実現とは異なる養分として PDA を加えた懸濁液を作成する。本研究で用いた懸濁液は PDA 粉末 6.12 g に蒸留水 300cc を加えたものとする。対象とする真菌は NBRC より購入し、PDA 培地上で 1 週間以上の培養(28℃一定)を行ったものを使用する。

第一ステップとして、孢子濃度 2.2×10^7 [個/mL] 程度の孢子懸濁液を作成し、その後、PDA 溶液と混合させることで、一定 PDA 濃度の孢子懸濁液を作成する。実験に使

用する孢子懸濁液濃度は *Aspergillus penicillioides* に関して他の 2 ケースと比べ若干高めに作成した。

実験用ピース(ガラスシャーレ)に上記の孢子懸濁液を 4 点、各 3[μL]滴下し、相対湿度 90%に湿度コントロールした 150mm×150mm×700mm の密閉可能なプラスチック製ボックスに設置する。相対湿度は ASTM E 104-51⁴⁾ に従い、CaCl₂・二水塩を用いて制御する。プラスチック製ボックスはインキュベータ内に設置し、雰囲気温度を制御する。実験条件を表 2 示す。本報では図 1 に示すとおり、雰囲気温度 28℃一定の条件と、18℃から 38℃の間で周期的に温度変動する条件の 2 種類の温度条件にて実験を実施する。

各建材ピースは、インキュベータ内に設置後、24h 毎に位相差顕微鏡により孢子の発芽状況ならびに孢子より伸長した菌糸の発育状況を確認し、デジタル画像データとして保存する。本実験は 7 日間継続して実施する。

4. 実験結果

4.1 真菌生育状況の観察結果

各実験ケースにおける真菌生育状況を示す時系列写真を図 2 から図 7 に示す。

Eurotium herbariorum (NBRC 33235) を対象とした場合、雰囲気温度一定(28℃)の条件では 48 [h]後からの菌糸成長の様子が観察できた。*Eurotium herbariorum* の菌糸形態が波状成長ということもあり、菌糸長の定量評価は容易ではない。しかしながら、本報で対象とした 3 種の真菌中

図4 Case1-Asp
(*Aspergillus penicillioides*)
温度条件：28℃一定
湿度条件：90%

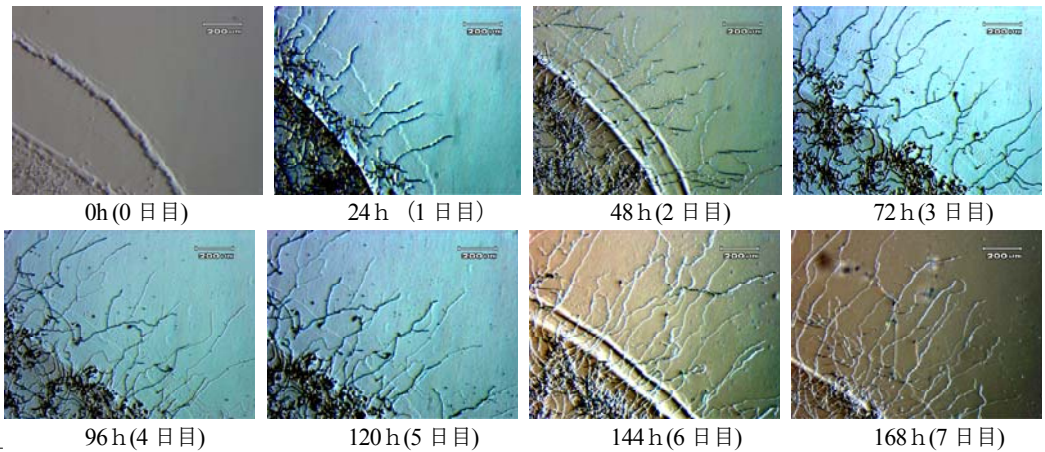
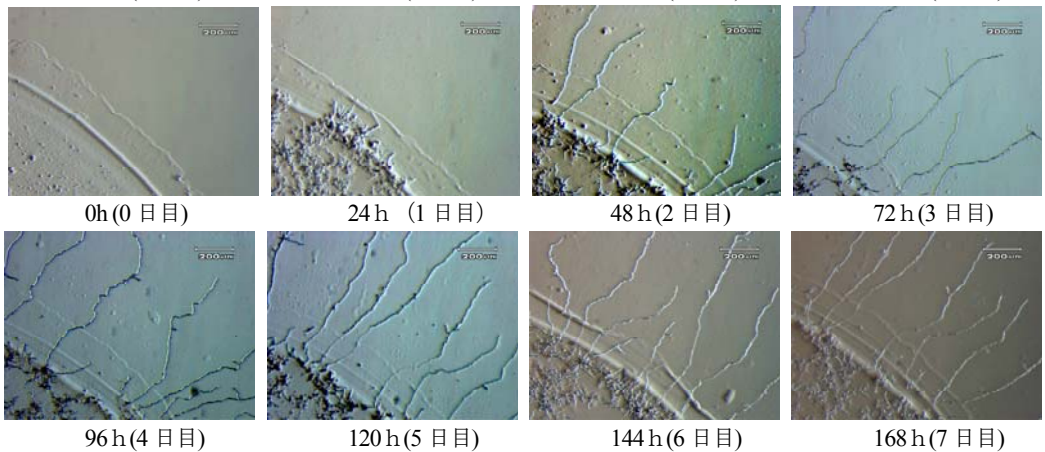


図5 Case2-Asp
(*Aspergillus penicillioides*)
温度条件：変動あり
湿度条件：90%



では、顕微鏡観察された菌糸長は最大であることが確認された。雰囲気温度を周期的に変化させた条件では168[h]後も発芽・菌糸の成長は確認できなかった。

Aspergillus penicillioides(NBRC33024)を対象とした場合、雰囲気温度一定(28℃)の条件において、24[h]後には菌糸の成長が見られた。3種の真菌中で初期の生育速度が最大となった。これは孢子濃度の違いにも起因している。雰囲気温度を周期的に変化させた条件では24[h]以降に菌糸発育時間の相違が見られた。温度変化が菌糸の成長に関し影響を与える結果となった。

Penicillium critrimum (NBRC7784) を対象とした場合、雰囲気温度一定(28℃)の条件では48[h]以降に菌糸の伸長の様子が観察できた。*Penicillium critrimum* の菌糸形態は直線状の成長であるため菌糸成長曲線の同定が容易な菌種と言える。本報では懸濁液境界部分(エッジ部分)からの菌糸長を成長分として判断するため、雰囲気温度を周期的に変化させた条件では菌糸生育は確認できなかったが、孢子懸濁液内部では孢子の発芽・菌糸成長が見受けられる。

4.2 増殖曲線の推定結果

菌糸長の定量評価が可能であった *Aspergillus penicillioides* ならびに *Penicillium critrimum* の2種の真菌に対し、24[h]毎に取得した画像データを用いて、実スケールでの菌糸長の評価を行い、菌糸長の増殖曲線を算出した。その結果を図8ならびに図9に示す。温度一定条件(28℃)においては、*Aspergillus penicillioides*、*Penicillium critrimum* の両者において、100[h]後にはほぼ定常状態になっているこ

とが確認できる。温度変動する環境下に暴露させた場合、*Aspergillus penicillioides* に関しては一定温度条件と比較して、菌糸成長に時間遅れが観察される。*Penicillium critrimum* に関しては殆ど菌糸成長が観察されず、温度変化に対し、大きな影響を受ける結果となった。

5. 考察

柳らは空調システム内を対象として、*Eurotium herbariorum* をセンサー菌とした場合の生育状況に関する検討を行っており、相対湿度が70%以上に保たれる時間長、即ち累積頻度が生育を左右する、と報告している。本実験では、塩化カルシウム水溶液を用いて容器内の相対湿度を制御しており、温度の周期変動の大きさと比較して容器内の相対湿度の変化は小さいと推定される。本実験結果では、雰囲気温度変動は菌糸成長に一定の影響を与えることが確認されたが、相対湿度変動に関しては今後の検討が必要な事項である。さらに、養分濃度レベル、孢子濃度等は真菌成長に大きな影響を与えるため、実現象との対応を検討するためには、温湿度条件は変化するのが通常であり、両パラメータの変化を加えた実験が実空間に対応する。今後実験ケースを増加させて検討を行う必要性が高い。

また、本報では懸濁液境界部分からの菌糸長のみを対象として増殖曲線を算出したが、同一の菌糸長条件であっても、発芽孢子数や菌糸密度には大きな差が観察される。現在、画像解析技術を用いて、全菌糸量を菌糸増殖面積

図6 Casel-Pe
(*Penicillium critrimum*)
温度条件：28℃一定
湿度条件：90%

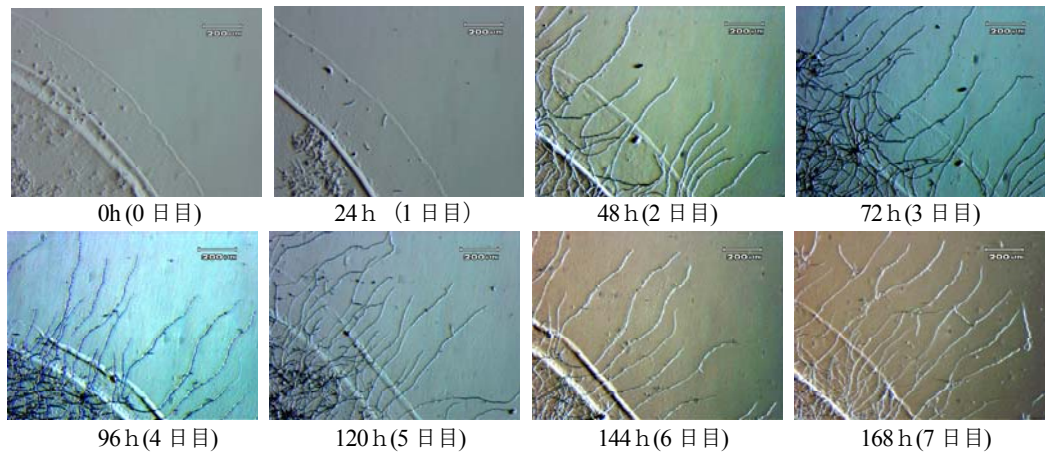
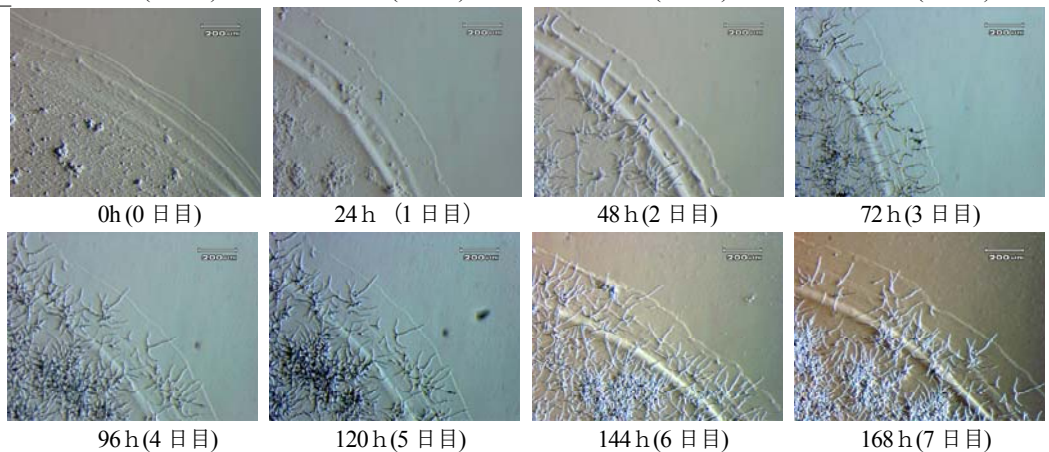


図7 Casel-Pe
(*Penicillium critrimum*)
温度条件：変動あり
湿度条件：90%



として推定する方法を検討しており、その評価結果は別報にて報告予定である。

6. 結論

耐乾性の3種類の真菌を対象として、雰囲気温度を変化させた場合におけるガラスシャーレ上における菌糸成長ならびに比増殖速度の測定を行った。湿度一定条件下において、温度のみをパラメータとする実験を実施することで、温度変動が菌糸成長に一定の影響を与えることが確認された。

注 本報では、画像データを元に計測可能な全菌糸の菌糸長を測定し、平均化することで、各時刻の平均菌糸長を推定している。サンプル数が最小のケースでも30本以上の菌糸長を平均化している。

参考文献

- [1] 阿部恵子：住環境のカビ指数：健康創造研究、Vol.2, 1号、2003年
- [2] 柳宇, 池田耕一：空調システムにおける微生物汚染の実態と対策に関する研究 第1報 微生物の生育環境と汚染実態：日本建築学会環境系論文集 No.593, pp.49-56, 2005.7
- [3] 水野 優, 伊藤一秀, 熊谷一清：室内環境中の微生物発育速度・MVOC 放散のモデリングと数値予測手法の開発 (その4) 各種建材を対象とした真菌類の比増殖速度の測定：室内環境学会総会講演集、2005.11、pp208-209
- [4] ASTM (1976) Standard Recommended Practice for Maintaining Constant Relative Humidity by Means of Aqueous Solutions, ASTM Designation E, 104-51, pp609-612

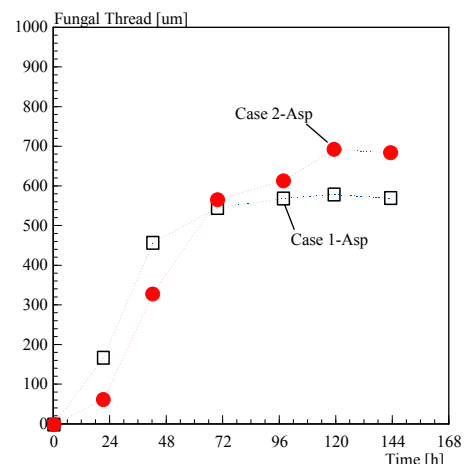


図8 *Aspergillus penicillioides* の増殖曲線

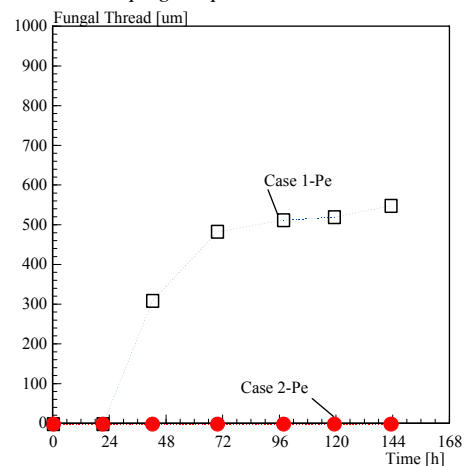


図9 *Penicillium critrimum* の増殖曲線