



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	魚類病原ウイルスと環境由来微生物との相互作用：飼育用水中での生存性
Author(s)	吉水, 守; 瀧澤, 宏子; 亀井, 勇統 他
Citation	魚病研究, 21(4), 223-231
Issue Date	1986-12
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/38324
Type	journal article
File Information	yoshimizu-38.pdf



魚類病原ウイルスと環境由来微生物との相互作用： 飼育用水中での生存性

吉水 守^{*1}・瀧澤宏子^{*2}・亀井勇統^{*1}・木村喬久^{*1}

(昭和 61 年 4 月 25 日受理)

Interaction between Fish Pathogenic Viruses and Microorganisms in Fish Rearing Water: Survival and Inactivation of Infectious Pancreatic Necrosis Virus, Infectious Hematopoietic Necrosis Virus and *Oncorhynchus masou* Virus in Rearing Water

Mamoru YOSHIMIZU^{*1}, Hiroko TAKIZAWA^{*2}, Yuto KAMEI^{*1}
and Takahisa KIMURA^{*1}

^{*1}Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University,
Hakodate, Hokkaido 041, Japan

^{*2}Central Research Laboratory, Ajinomoto Co. Ltd., Kawasaki, Kanagawa
210, Japan

(Received April 25, 1986)

The survival of three salmonid viruses; infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV), infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and *Oncorhynchus masou* virus (OMV), in fish rearing water, dechlorinated city water, double-distilled water, and Hanks' BSS were observed at 0, 5, 10 and 15°C. In addition, interaction between viruses and microorganisms present in the rearing water was observed.

The results obtained are summarized as follows:

1. IPNV was stable in all kinds of waters employed at every temperature tested for 14 days, but it was observed that, for IHNV, as the temperature increased, the loss of infectivity also increased.
2. OMV was labile even in Hanks' BSS and inactivated rapidly as the temperature was raised. Infectivity declined to less than minimum observable amount at 14 days postincubation both at 10 and 15°C. It was not survived at 5 to 7 days later in the fish rearing water.
3. When IHNV or OMV was suspended in filtered rearing water, titer reduction of the viruses was suppressed in comparison with the untreated water. This phenomenon was more conspicuous in the autoclaved water.
4. The infectivity of IHNV declined to less than minimum observable amounts at 3 days after incubation at both 5 and 15°C, when it was suspended in filtrated culture to which rearing water was added with 10% MEM 10 and incubated at 15°C for 2 days. In microflora of the culture, *Achromobacter* and *Pseudomonas* were dominant and the ratio was 7:3.
5. Representative strains of *Pseudomonas* has been proven to have the ability to produce anti-IHNV substance.

IPNV (infectious pancreatic necrosis virus) および
IHNV (infectious hematopoietic necrosis virus) の
PBS, BSS, MEM 中での生存性については, AMEND

(1970) や DESAUTELES and MACKELVIE (1975),
MACKELVIE and DESAUTELES (1975), GOSTING and
GOULD (1981) などの報告があるものの, 魚類生息環境
水中での消長に関する報告は少なく, TORANZO and
HETRICK (1982) が, 河川水や汽水, 海水中における

^{*1} 北海道大学水産学部微生物学講座

^{*2} 味の素株式会社中央研究所

poliovirus type 1 の生存性を IPNV, IHNV と比較したものおよび IPNV の海水中での生存性を検討した報告 (TRANZO *et al.*, 1983) がえられるにすぎない。

一方 poliovirus をはじめヒトの enterovirus については公衆衛生的観点から河川や海に入ってから生存性が研究され、これらのウイルスの感染性に影響を与える因子として塩分や水温 (MAGNUSSON *et al.*, 1967; LO *et al.*, 1976), 化学物質 (WARD and ASHLEY, 1977; SALO and CLIVER, 1978), 微細粒子や泥 (GERBA and SCHAIERGER, 1975; GOYAL and GERBA 1979; LABELLE and GERBA, 1979; LABELLE *et al.*, 1980; LABELLE and GERBA, 1980; SMITH *et al.*, 1978), それに微生物 (FUJIOKA *et al.*, 1980; HERRMAN *et al.*, 1974; MAGNUSSON *et al.*, 1967; O'BRIEN and NEWMAN, 1977) などが報告され、中でもこれらウイルスの生存率は、高圧滅菌あるいは濾過除菌海水中に比べ、無処理海水中で低いことから、海水中の微生物の関与が重要視されている。また MAGNUSSON *et al.* (1967) は抗ウイル

ス作用を有する細菌として *Vibrio marinus* を分離し報告している。

本報ではサケ科魚類の飼育用水、再蒸留水および Hanks' BSS を対象に、各種温度条件下での3種の魚類病原ウイルス IPNV, IHNV および OMV (*Oncorhynchus masou virus*) の消長を観察するとともに、飼育用水中

Table 1. Composition of the AYG broth medium used

L-glutamic acid	0.5 g
DL-aspartic acid	0.5 g
DL-serine	0.5 g
Yeast extract (Difco)	0.2 g
Glucose	1.0 g
NaCl	6.8 g
KCl	0.4 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
CaCl ₂ (anhyd.)	0.2 g
D.W. ₂	1,000 ml
pH; 7.2	

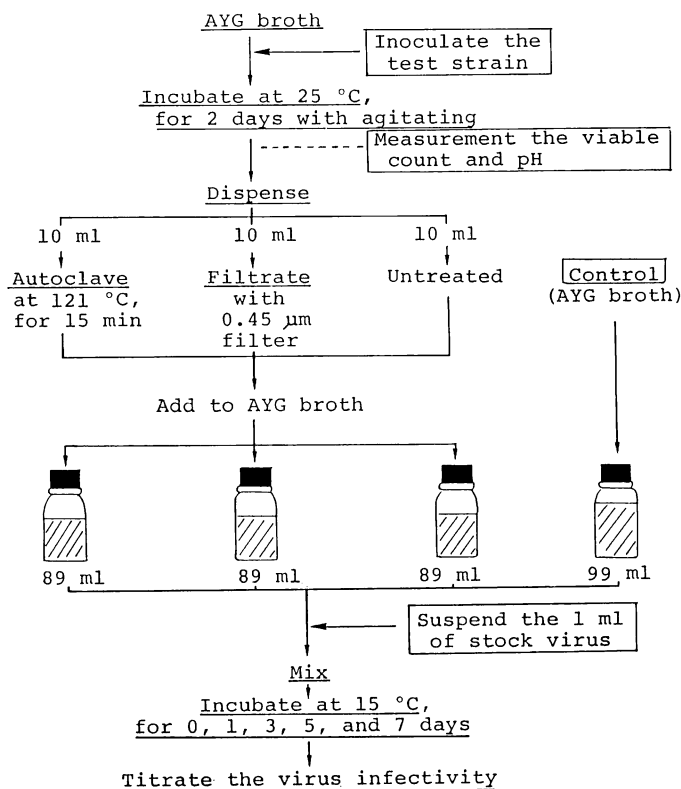


Fig. 1. Evaluation procedures of virus inactivation by culture broth of bacteria isolated from fish rearing water.

に存在する微生物との相互作用について、高圧滅菌あるいは濾過除菌した飼育用水ならびに無処理飼育用水中の IHNВ および OMV の消長の比較ならびに、飼育用水より分離した細菌の代表株を対象にその培養液の IHNВ に対する抗ウイルス効果を観察した。ここに得られた結果を報告する。

実験材料と方法

供試ウイルス

魚類病原ウイルスとして IPNV (Buhl), IHNВ (ChAb) および OMV (00-7812) の 3 種を供試し、100 IU/ml の penicillin (Sigma), 100 μ g/ml の streptomycin (Sigma), 10% FBS 加 EAGLE の MEM (Gibco), 以後 MEM 10 と称す、にて培養した RTG-2 (WOLF and QUIMBY, 1962) 細胞で 15°C・7 日間培養したウイルス液をミリポアフィルター HA (0.45 μ m) あるいは 0.40 μ m スクレオポアフィルター (OMV の場合) で濾過後、小分けして -80°C にストックし、以後の実験に用いた。

供試水

サケ科魚類の飼育用水として北海道大学水産学部七飯養魚場の養魚用水 (以後養魚用水と称す) および当教室内でサケの飼育に用いている脱塩素処理水道水 (以後脱塩素水と称す) を供試し、対照として再蒸留水および Hanks' BSS (Gibco) を供試した。飼育用水のうち養魚用水はさらに高圧滅菌あるいは 0.20 μ m スクレオポアフィルター濾過除菌したものも本実験に供した。

供試水中でのウイルスの生存性

16 本のローラーチューブ (16×125 mm) に上記供試水を 9 ml, 供試ウイルス液を 1 ml 懸濁し、各々 4 本ずつを 0, 5, 10, 15°C に 2 週間静置した。このウイルス懸濁直後, 3, 7, 14 日目にウイルス感染価を RTG-2 細胞を用い 96 well plate (Falcon) によるマイクロプレート法により測定した。ウイルス懸濁液の除菌は Hanks' BSS で 50% に希釈した FBS を予め通したミリポアフィルター HA あるいは 0.40 μ m スクレオポアフィルターを用いて行った。さらに IHNВ を対象に, 10% の割合で MEM 10 を加え 15°C で 7 日間静置培養した

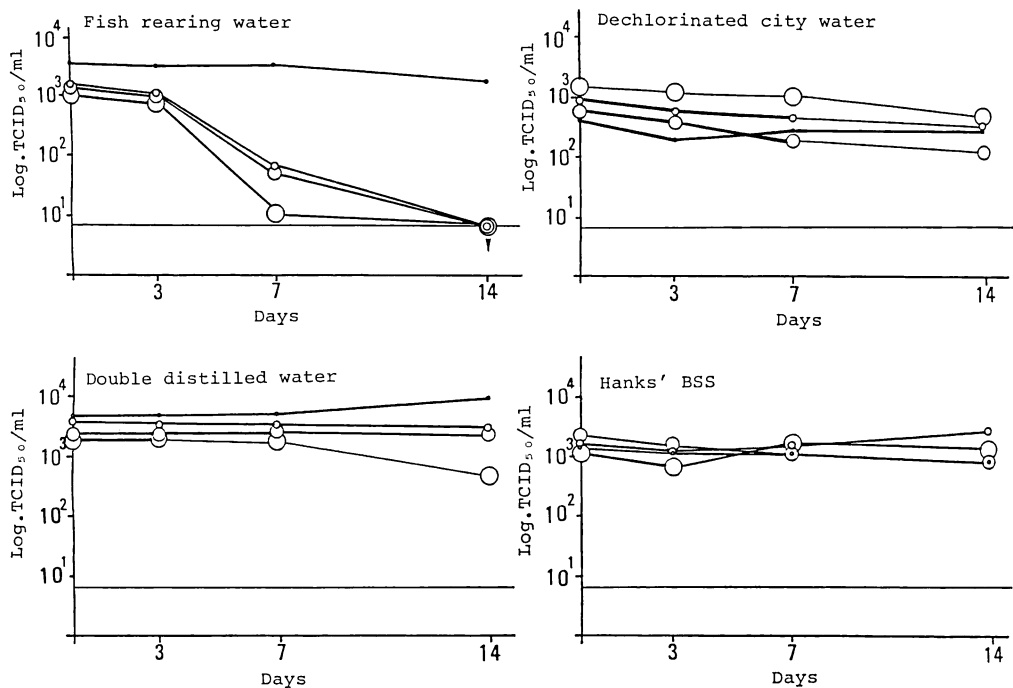


Fig. 2. Survival of IHNВ in fish rearing water, dechlorinated city water, double distilled water, and Hanks' BSS at temperatures 0°C (—○—), 5°C (—○—), 10°C (—○—), and 15°C (—○—). —: Average of three times examinations. —: Average of two times examinations.

後、0.20 μm ノックアウトフィルターにより濾過除菌した飼育用水に IHNV を懸濁したものについても、前記同様ウイルス感染価の消長の観察を行った。

15°C 7 日間培養 MEM 10 加飼育用水の生菌数および分離菌の分類

上記 MEM 10 加飼育用水の生菌数は、飼育用水を Hanks' BSS により 10 進希釈し、各希釈液の 0.2 ml を淡水基礎培地 (吉水ら, 1976) 表面に塗抹後、25°C で 7 日間好氣的に培養し、発生した集落数から 1 ml 当たりの生菌数として算出した。

菌株の分離は基礎平板培地上の一定面積中の全集落約 30 個を釣菌し、純分離を繰り返して供試分離菌株を得た。分離菌株は SHEWAN *et al* (1960), 吉水ら (1980) の方法に準拠して属レベルの分類を行った。

分離菌の抗ウイルス作用の判定

上記分離株の中から *Pseudomonas* 2 株 (No. NW-09 および NW-15), *Achromobacter* 2 株 (No. NW-23 および NW-27) を選び、Table 1 に示す組成のアミノ酸、酵母エキス、グルコースを主体とする液体培地 (AYG) にて 25°C 2 日間振とう培養後、Fig. 1 に示すように 3 等分し高圧滅菌あるいはミリポアフィルター HA (0.45 μm) 濾過除菌したものならびに無処理の培養液各々 10 ml にウイルス液を 1 ml, さらに AYG 培地を 89 ml 加え 15°C に静置した。ウイルス懸濁直後, 1, 3, 5, 7 日目にウイルス感染価の測定を行った。

結 果

各供試水中での IHNV の消長

供試した飼育用水, Hanks' BSS および再蒸留水中での IHNV の感染価の変化を Fig. 2 に示した。図は 3 回の反復実験の平均値で示したが、3 回中 1 回の結果が異なったものについては 2 回の平均値として細線で示した。

飼育用水のうち養魚用水に IHNV を懸濁した場合、0°C では 14 日間ウイルス感染価はほとんど変化せず安定であったが、5, 10, 15°C では 7 日目に急激なウイルス感染価の減少が観察され、温度が高くなるにつれその傾向は大きかった。脱塩素水では各温度共に 14 日間比較的安定な傾向を示したが、3 回のうち 1 回は 5, 10°C で 14 日目に、また 15°C では 3 日目に急激なウイルス感染価の減少が観察された。再蒸留水中では 0, 5, 10°C で 14 日間安定であったが、15°C で 14 日目に多少感染価の減少が観察された。また 15°C では 3 回のうち 1 回、3 日目に検出限界を下回った。Hanks' BSS 中では各温

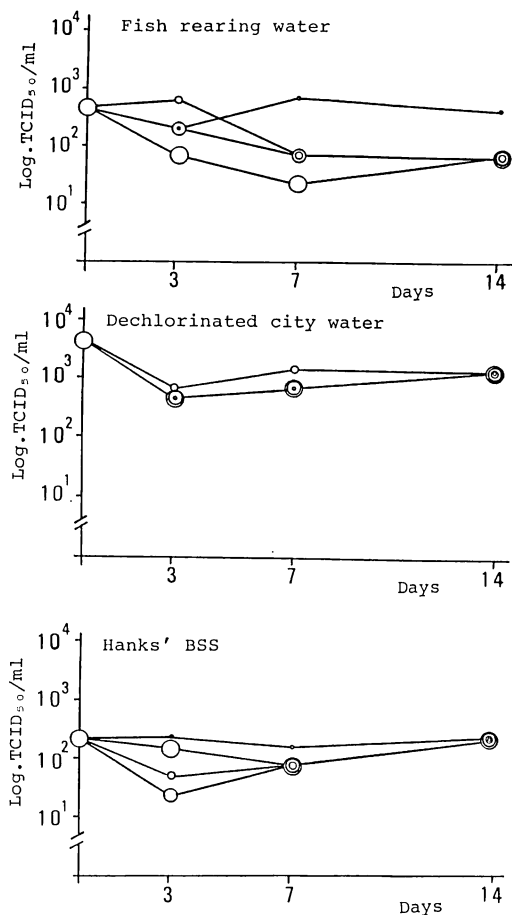


Fig. 3. Survival of IPNV in fish rearing water, dechlorinated city water, and Hanks' BSS at temperatures 0°C (—○—), 5°C (—○—), 10°C (—○—), and 15°C (—○—).

度ともに多少の増減はあるもののすべて 14 日間安定であった。

各供試水中での IPNV の消長

供試水中での IPNV の感染価の変化を Fig. 3 に示した。IPNV は供試した飼育用水, Hanks' BSS 共に 0, 5, 10, 15°C で 14 日間ウイルス感染価に大きな変化は見られず安定であった。

各供試水中での OMV の消長

供試水中での OMV の感染価の変化を Fig. 4 に示した。OMV の場合は Hanks' BSS 中においても 0, 5°C で漸減傾向を、10, 15°C ではかなり急激な減少傾向を示し、14 日目には共に検出限界を下回った。再蒸留水中でもほぼ同様の傾向を示し、15°C では 7 日目に検出限界

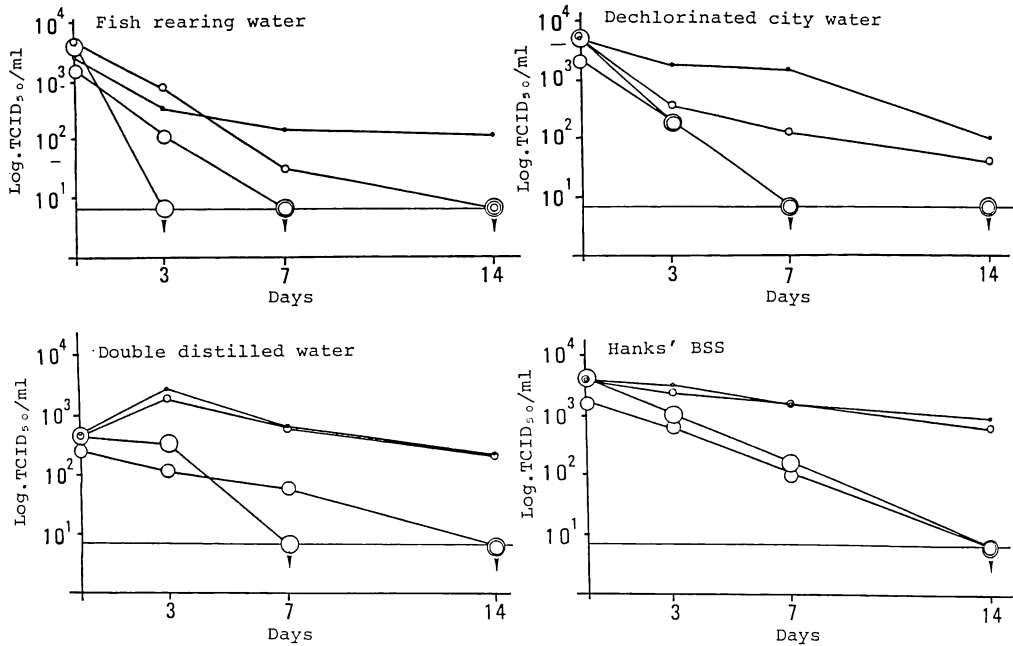


Fig. 4. Survival of OMV in fish rearing water, dechlorinated city water, double distilled water, and Hanks' BSS at temperatures 0°C (—○—), 5°C (—○—), 10°C (—○—), and 15°C (—○—).

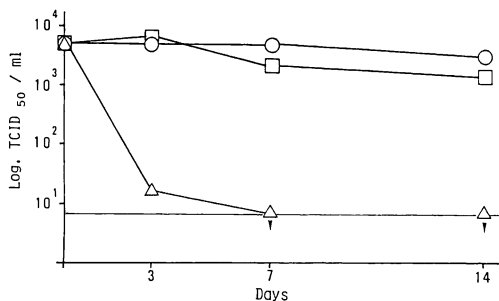


Fig. 5. Survival of IHNV in untreated (—△—), filter-sterilized (—□—) and autoclaved (—○—) fish rearing water at 15°C.

以下となった。一方飼育用水のうち養魚用水中では15°Cで3日目、10°C 7日目、5°Cでは14日目に検出限界以下となり、脱塩素水中でも10、15°Cで7日目に検出限界以下となった。

高圧滅菌および濾過除菌飼育用水中での IHNV ならびに OMV の消長

供試飼育用水として養魚用水を用い、無処理、高圧滅菌あるいは濾過除菌した飼育用水中での IHNV および OMV の感染価の変化を Fig. 5 および 6 に示した。

Fig. 5 に見られるごとく無処理水に IHNV を懸濁し

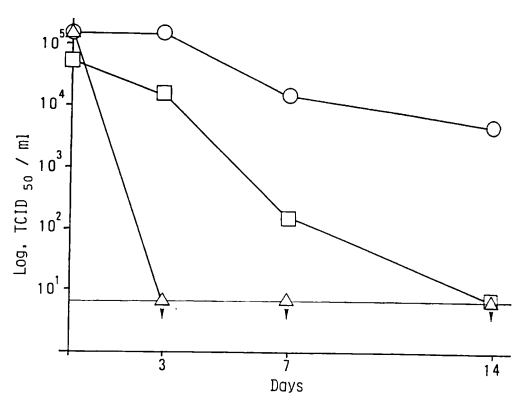


Fig. 6. Survival of OMV in untreated (—△—), filter-sterilized (—□—) and autoclaved (—○—) fish rearing water at 15°C.

た場合、3日目ですでに2ケタ以上の感染価の減少を示し7日目には検出限界以下となったが、高圧滅菌あるいは濾過除菌した飼育用水中では14日間感染価にさほど大きな変化はみられなかった。

OMVの結果を Fig. 6 に示した。OMV は IHNV よりも不安定で前述の Hanks' BSS 同様、濾過除菌飼育水中でも14日目に検出限界を下回った。しかし高圧滅

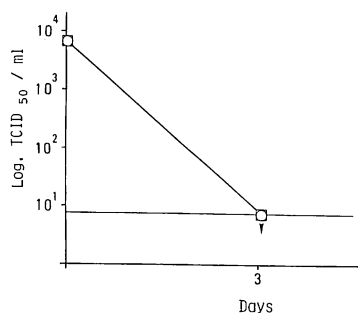


Fig. 7. Survival of IHN virus at 5°C (—○—) and 15°C (—□—) in filter-sterilized fish rearing water incubated with 10% (v/v) MEM 10 at 15°C, for 7 days.

菌飼育用水中では 14 日後に 1 ケタ半の減少を示すにとどまり、濾過除菌飼育水や Hanks' BSS より安定であった。一方無処理飼育水中に懸濁した場合には、すでに 3 日目に検出できなくなっていた。

15°C 7 日間培養 10% MEM 10 加飼育用水の濾過除菌液中での IHN の消長および濾過前の生菌数と菌叢

前述の養魚用水に 10% の割合に MEM 10 を加え 15°C で 7 日間培養した後、0.20 μm スクロポアフィルターで濾過除菌し、これに IHN を懸濁させ感染価の変化を観察した結果を Fig. 7 に示した。この場合 IHN は 5 および 15°C 共に 3 日目には検出できなくなった。

前培養後の養魚用水の生菌数は、 1.8×10^8 cell/ml であった。分離された 30 菌株のうち継代不能株を除く 27 株の属レベルでの分類の結果、培養後の飼育用水の、菌叢は *Achromobacter* と *Pseudomonas* の両者で構成さ

れ、その比率は 7:3 であった。

分離菌の抗ウイルス作用

上記養魚用水より分離された 27 株のうち *Pseudomonas* sp. の中から、No. NW-09 および NW-15 の 2 株を、*Achromobacter* sp. の中から No. NW-23 および NW-27 の 2 株を代表として選び、Fig. 1 に示した方法により IHN に対する抗ウイルス作用を観察した。

Pseudomonas sp. NW-9 および NW-15 の結果を Fig. 8 に示した。図の生存率は培地のみコントロールのスタート時の感染価に対する比率で示したが、コントロール（培地のみ）および両株の高圧滅菌培養液では IHN は 7 日間ほぼ安定であったが、NW-9 株の濾過除菌培養液中では 3 日目に、NW-15 では 7 日目に検出限界を下回り、さらに両株の無処理培養液中では、IHN は 1 時間後にすでに検出できなくなり、急激な感染価の減少が観察された。

次に *Achromobacter* sp. 2 株の結果を Fig. 9 に示した。供試した *Achromobacter* sp. 2 株の培養濾液に IHN に対する抗ウイルス作用は観察されなかったが、無処理培養液中では 1 時間後には検出出来なくなっていた。

考 察

本研究ではまず IHN, IPNV および OMV の 3 種の魚類病原ウイルスを対象に、飼育用水、再蒸留水及び Hanks' BSS 中での消長を 0, 5, 15°C の各温度条件下で 14 日間観察した。IPNV は各供試水いずれの温度でも 14 日間感染価に変化がなく安定であった。IHN も 0°C では各供試水および Hanks' BSS, 再蒸留水中で各

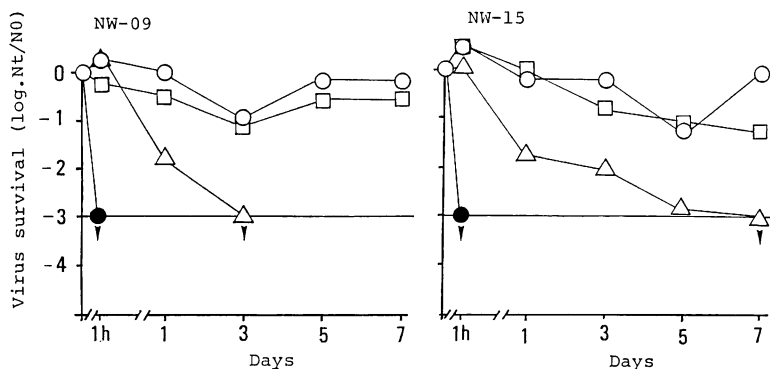


Fig. 8. Survival of IHN virus at 15°C in AYG broth (—○—), filter-sterilized (—△—), autoclaved (—□—), and untreated (—■—) culture broth of *Pseudomonas* sp. strain NW-09 and NW-15 isolated from fish rearing water.

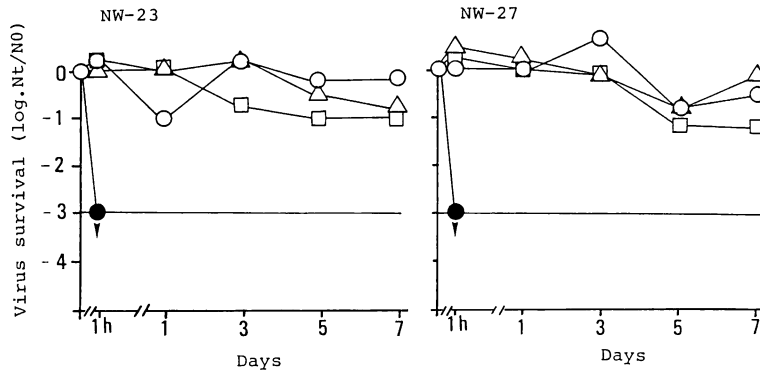


Fig. 9. Survival of INHV at 15°C in AYG broth (—○—), filter-sterilized (—△—), autoclaved (—□—), and untreated (—●—) culture broth of *Achromobacter* sp. strain NW-23 and NW-27 isolated from fish rearing water.

温度ともに 14 日間安定であったが、養魚用水中では、0°C を除き 7 日目に感染価の大幅な減少が観察され、その傾向は温度の上昇につれ大きくなり、14 日目には 5, 10, 15°C 共に検出限界以下となった。OMV は 0 および 5°C においても各供試水共に感染価に漸減傾向が認められ、Hanks' BSS 中ではほぼ直線的な減少が観察され 10, 15°C では 14 日目に検出できなくなった。再蒸留水や飼育用水中ではこの傾向はさらに強くなり、特に養魚用水中では 3 日目にすでに検出できなくなっていた。

これら Hanks' BSS 中での IPNV および INHV の消長は AMEND (1970) や DESAUTELES and MACKELVIE (1975), MACKELVIE and DESAUTELES (1975), GOSTING and GOULD (1981) の結果とほぼ一致しているが、INHV および OMV は Hanks' BSS に懸濁した場合に比べ、飼育用水ときには再蒸留水中でも急激な感染価の減少が観察された。これらの供試水は滅菌されていないことから INHV や OMV の感染価の減少に温度の他、共存する微生物が関与している可能性が示唆された。次に INHV と OMV を対象に高圧滅菌あるいは濾過除菌した飼育用水中での消長を無処理飼育用水中での消長と比較検討したところ、両ウイルス共に無処理飼育用水中では急速な感染価の減少が観察されたが、高圧滅菌あるいは濾過除菌した飼育用水中では比較的安定であった。前 2 者の比較では、高圧滅菌した飼育用水中より安定であった。これらの結果は海水環境中での IPNV の不活化に海水中的微生物が関与しているとする TORANZO and HETRICK (1982), TRANZO *et al.* (1983) やヒト enterovirus の不活化に海水中的微生物が関与しているとの報告 (FUJIOKA *et al.*, 1980; HERRMAN *et al.*, 1974,

MAGNUSSON *et al.*, 1967; O'BRIEN and NEWMAN, 1977) と類似し、この INHV や OMV の不活化現象は飼育水中に存在した微生物あるいは微生物の産生した 0.20 μ m の濾過膜を通過する物質による可能性がより強くなった。

そこでこのウイルス不活化現象に関与している微生物を特定するために、飼育用水に MEM 10 を 10% の割合に添加し、15°C で 7 日間培養した後、0.20 μ m スクレオポアフィルターで濾過除菌して、これに INHV を懸濁させその後の感染価の変化を観察したところ、INHV は、5, 15°C 共に 3 日目にすでに検出限界以下となった。この濾過除菌時の飼育用水の微生物叢を検討した結果、細菌が優勢であり、他の原生動物等は見あたらなかった。生菌数は 1.8×10^8 cells/ml、その菌叢は *Achromobacter* と *Pseudomonas* の両者が 7:3 の割合で主体を成していた。

この細菌の中に INHV に対する抗ウイルス作用を有する物質を産生する細菌が存在するか否かを、両属の代表分離株各 2 株を対象に、考案した 3 種のアミノ酸、酵母エキス、グルコースを主体とした AYG 培地で、25°C 2 日間培養した後、高圧滅菌、濾過除菌および無処理の培養液について、INHV に対する抗ウイルス作用を観察した。*Pseudomonas* の代表 2 株の培養液の場合、INHV の感染価は高圧滅菌したものでは変化なく安定であったが、濾過除菌液では 1 株の培養液で 3 日目に、もう 1 株では 7 日目に INHV は検出できなくなり、両菌株は菌体外に抗 INHV 作用を有する物質を産生していることが明らかとなった。さらに、菌体を含む無処理培養液中では、INHV は 1 時間後に検出できなくなった。

この急激な感染価の減少は菌体外産生物質の作用の他に、感染価測定時の濾過除菌により菌体と共にウイルスが除去されたことによるとも考えられる。*Achromobacter* の 2 株の濾過除菌培養液には抗ウイルス作用は観察されなかったが、無処理の菌体を含む培養液では *Pseudomonas* の場合と同様 1 時間後には検出できなくなっていた。ウイルスの泥など微細粒子への吸着に関しては GERBA and SCHAIERGER (1975), GOYAL and GERBA (1979), LABELLE and GERBA (1979), LABELLE *et al.* (1980), LABELLE and GERBA (1980), SMITH *et al.* (1978), WARD and ASHLEY (1977) らが報告しており、この点については今後さらに詳しく検討する必要があると考える。

このように Hanks' BSS 中や高圧滅菌した飼育用水中に懸濁した場合には安定であったにもかかわらず、飼育用水中に懸濁した場合に急速なウイルスの不活化が観察された現象は、飼育用水中に存在する細菌が菌体外へ産生した物質およびウイルスの菌体への吸着による可能性が示唆された。今後は今回分離された *Pseudomonas* sp. の産生する抗ウイルス物質の同定と共にこのような生理活性物質を産生する能力を有する細菌が魚類生息環境中にどの程度存在するかを検討し、それらの細菌を魚類ウイルス病防疫に有効に活用する技術を開発する必要があると考える。

要 約

サケ科魚類の 3 種の病原ウイルス IHNV, IPNV, OMV を対象に飼育用水、再蒸留水および Hanks' BSS 中における 0, 5, 10, 15°C での消長を観察すると共に、飼育用水中に存在する微生物との相互作用を検討し以下のごとき結論を得た。

1. IPNV は各供試水中でいずれの温度でも 14 日間安定であったが、IHNV では特に飼育用水中で感染価の減少が観察され、それは温度が高くなるにつれ速やかであった。
2. OMV は Hanks' BSS 中においても不安定で温度の上昇につれ速やかに不活化し、10, 15°C では 14 日目には検出限界を下回った。飼育用水中では 3~7 日目に検出できなくなった。
3. 飼育用水を濾過除菌して IHNV および OMV を懸濁した場合、無処理水に比し感染価の減少傾向は低下し、高圧滅菌した場合にはより安定であった。
4. MEM 10 を 10% 加え 15°C で 7 日間培養した飼育用水の濾過除菌液に IHNV を懸濁した場合、5, 15°C

いずれにおいても 3 日目に検出限界を下回った。供試飼育用水の微生物叢の中では細菌が優勢で *Achromobacter* と *Pseudomonas* の両者が 7:3 の割合を成していた。

5. 分離した *Pseudomonas* の代表株に抗 IHNV 作用を有する物質の産性能が認められた。

謝 辞

本研究の一部は昭和 60 年度日本水産資源保護協会魚病対策技術研究費、防疫技術開発研究：増殖対象サケ科魚類の防疫技術に関する研究によった。ここに記して謝意を表する。

文 献

- AMEND, D. F. (1970): Control of infectious hematopoietic necrosis virus disease by elevating the water temperature. *J. Fish. Res. Board. Can.*, **27**, 265-270.
- DESAUTELES, D. and R. M. MACKELVIE, (1975): Practical aspects of survival and destruction of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish. Res. Board. Can.*, **32**, 523-531.
- FUJIOKA, R. S., P. C. LOH, and L. S. LAU, (1980): Survival of human enteroviruses in the Hawaiian ocean environment: evidence for virus inactivating microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 1105-1110.
- GERBA, C. P. and G. E. SCHAIERGER (1975): Effect of particulates on virus survival in seawater. *J. Water Poll. Cont. Fed.*, **47**, 93-103.
- GOSTING, L. H. and R. W. GOULD (1981): Thermal inactivation of infectious hematopoietic necrosis and infectious pancreatic necrosis viruses. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 1081-1082.
- GOYAL, S. M. and C. P. GERBA (1979): Comparative adsorption of human enteroviruses, simian rotavirus, and selected bacteriophages to soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 241-247.
- HERRMAN, J. E., K. D. KOSTENBADER and D. O. CLIVER (1974): Persistence of enteroviruses in lake water. *Appl. Microbiol.*, **28**, 895-896.
- LABELLE, R. L. and C. P. GERBA (1979): Influence of pH, salinity, and organic matter on the adsorption of enteric viruses to estuarine sediment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 93-101.
- LABELLE, R. L., C. P. GERBA, S. M. GOYAL, J. L. MELNIC, I. GECH and G. F. BOGDAN (1980): Relationships between environmental factors, bacterial indicators, and the occurrence of enteric viruses in estuarine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 588-596.
- LABELLE, R. L. and C. P. GERBA (1980): Influence of estuarine sediment on virus survival under field

- conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 749–755.
- LO, S., J. GILBERT, and F. HETRICK, (1976): Stability of human enteroviruses in estuarine and marine waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**, 245–249.
- MACKELVIE, R. M. and D. DESAUTELES (1975): Fish viruses—Survival and inactivation of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish. Res. Board. Can.*, **32**, 1267–1273.
- MAGNUSSON, S., K. GUNDERSEN, A. BRANDBERG, and E. LYCKE (1967): Marine bacteria and their possible relation to the virus inactivation capacity of sea water. *Acta. Patho. Et Microbiol. Scandinavica*, **71**, 274–280.
- O'BRIEN, R. T. and J. S. NEWMAN (1977): Inactivation of polioviruses and coxsackieviruses in surface water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 334–340.
- SALO, R. J. and D. O. CLIVER (1978): Inactivation of enteroviruses by ascorbic acid and sodium bisulfite. *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**, 68–75.
- SHEWAN, J. M., G. HDBBS, and W. HODGKISS (1960): The *Pseudomonas* and *Achromobacter* groups of bacteria in the spoilage of marine white fish. *J. appl. Bact.*, **23**, 463–468.
- SMITH, E. M., C. P. GERBA, and J. L. MELNICK (1978): Role of sediment in the persistence of enteroviruses in the estuarine environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 685–689.
- TORANZO, A. E. and F. M. HETRICK (1982): Comparative stability of two salmonid viruses and poliovirus in fresh, estuarine and marine waters. *J. Fish Disease*, **5**, 223–231.
- TORANZO, A. E., J. L. BARJA, M. L. LEMOS, and F. M. HETRICK, (1983): Stability of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in untreated, filtered and autoclaved estuarine water. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **3**, 51–53.
- WARD, R. and C. S. ASHLEY (1977): Identification of the virucidal agent in wastewater sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 860–864.
- Wolf K. and M. C. QUIMBY (1962): Established eurythermic line of fish cells in vitro. *Science*, **135**, 1065–1066.
- 吉水 守・木村喬久・坂井 稔 (1976): サケ科魚類の腸内細菌叢に関する研究—I. 飼育魚の腸内細菌数と細菌叢. 日水誌, **42**, 91–99.
- 吉水 守・木村喬久・坂井 稔 (1980): サケ科魚類の稚仔魚期における腸内細菌叢の形成時期について, 日水誌, **46**, 967–975.