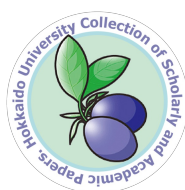




HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	人工海水中における低濃度オキシダントの魚類病原微生物に対する殺菌・不活化効果
Author(s)	伊藤, 慎悟; 吉水, 守; 絵面, 良男
Citation	日本水産学会誌, 63(1), 97-102 https://doi.org/10.2331/suisan.63.97
Issue Date	1997-01-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53293
Rights	© 1997 公益社団法人日本水産学会
Type	journal article
File Information	article83.pdf



人工海水中における低濃度オキシダントの 魚類病原微生物に対する殺菌・不活化効果

伊藤 慎 悟, 吉 水 守, 絵 面 良 男

(1996年4月30日受付)

Disinfectant Effects of Low Level of Total Residual Oxidants in Artificial Seawater on Fish Pathogenic Microorganisms

Shingo Itoh,* Mamoru Yoshimizu,* and Yoshio Ezura*

The disinfectant effects of total residual oxidants (TROs) produced by ozonization of artificial seawater on fish pathogenic bacteria and viruses were investigated. A dose of 0.1 mg TROs/l was not stable in natural seawater, but was stable in artificial seawater with a bromine compound (sodium bromide). By the treatment with TROs of 0.1 mg/l for 30 to 120 seconds, more than 99.9% of viable cells of *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida*, *A. caviae*, *A. hydrophila*, and *Escherichia coli* were killed, and 99.9% of infectivity of hiramé rhabdovirus (HIRRV), infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV), infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), and yellowtail ascites virus (YAV) were inactivated. HIRRV was more than 99.7% inactivated by a treatment with a dose of 3.5 g/m³ of ozone gas bubbles for 1 min.

キーワード: オゾン, TROs, 魚類病原微生物, 殺菌効果

水産増殖技術の発展と共に魚類病原微生物による被害も増大傾向にあり、特にウイルス病に対する対策は防除・防疫に頼るしかない。魚類病原微生物の防除・防疫法の一つとして飼育用水の殺菌法があげられる。現在、魚類飼育用水の殺菌法としては紫外線が広く用いられ、淡水域では紫外線を用いた魚類病原細菌の殺菌効果¹⁾やミズカビ類の菌糸伸長阻止、²⁾ ウイルスの不活化効果、³⁾ さらにサケ・マスの飼育成績⁴⁾が検討され、その有効性が報告されている。しかし、紫外線殺菌法では水中の懸濁粒子などにより遮光される可能性や、低水温期における殺菌効果の低下、さらに現在市販されている低圧ランプを用いた紫外線では殺菌されない病原微生物も知られている。³⁾ 現在、紫外線殺菌法と共に使用頻度が高い殺菌法はオゾン殺菌であり、淡水域ではオゾンを用いた魚類病原微生物の殺菌・不活化効果が認められている。^{5,6)} 水産業以外でもヨーロッパでは古くから上下水道の殺菌などにオゾンが使用されている。⁷⁾ しかし、海水を対象にしたオゾン殺菌法の効果を報告した例は少なく、^{8,9)} 海水にオゾンを注入することで生成されるBrO₃⁻やBrO⁻など(残留オキシダント; Total Residual Oxidants, 以下TROsと略す)の魚類に対する毒性も報告¹⁰⁾されて

いる。実際にオゾンを使用している現場においても、使用法によってはその殺菌効果に疑問を投げかける意見¹¹⁾もある。前報¹²⁾ではTROs濃度を0.5~1.0 mg/lとした時に海水中に生成されたオキシダントの安定性と魚類病原微生物に対する殺菌効果について検討し、TROs濃度を0.5 mg/lあるいは1.0 mg/lとし、1分間処理することで供試した魚類病原細菌・ウイルス・繊毛虫を99%以上殺菌・不活化できることを報告した。¹²⁾ 本報では、オゾン殺菌装置のランニングコストを下げるため、TROs濃度を前報¹²⁾より低い0.1 mg/l程度に設定し、魚類病原細菌・ウイルスの殺菌・不活化効果を検討した。

材料と方法

オゾン発生装置 原料ガスとして酸素(函館酸素K.K.)を用い、圧力調整機(日本フローセル)、オゾン発生装置(荏原実業K.K.)を順次通過させオゾンを生じさせた。発生したオゾンを接触槽(ガス洗浄瓶; Vidrex)中の海水に注入することによりオキシダントを生成させた(Fig. 1)。

TROs濃度の測定法 前報¹²⁾と同様にヨード法で

* 北海道大学水産学部微生物学講座 (Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Minato, Hakodate, Hokkaido 041, Japan).

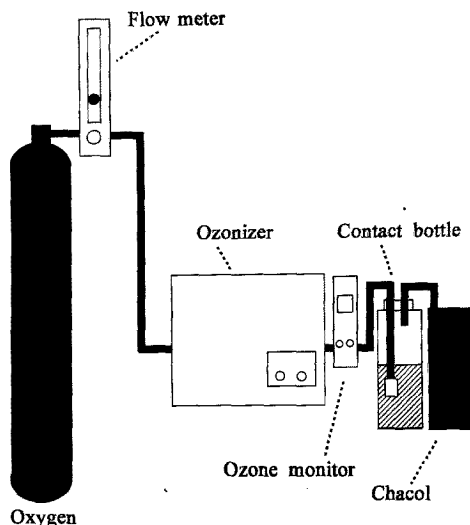


Fig. 1. Schematic illustration of seawater ozonization in this study.

TROs 濃度を測定した。海水試料を 1 N 硫酸で水素イオン濃度を 6 に調節した後、1 % ヨウ化カリウムを 5 ml 添加した。次に、1 % デンプン溶液を加え発色させた後、0.001 N のチオ硫酸ナトリウム溶液で滴定した。なお、以下の式で TROs 濃度を測定した。

$$\text{TROs 濃度 (mg/l)} = aF \times 1,000 \times 0.024 \times 1/X$$

a : 滴定量 (ml)

F : 0.001 N チオ硫酸ナトリウム溶液のファクター

X : 海水試料 (ml)

0.024 : 0.001 N チオ硫酸ナトリウム溶液 1 ml あたりのオゾン 0.024 mg/l に対応

供試海水 天然海水としては函館市立待郷で採水した海水を供試し、人工海水としては Herbst (塩化ナトリウム 30.0 g, 塩化カリウム 0.7 g, 硫酸マグネシウム 7 水和物 5.3 g, 塩化マグネシウム 6 水和物 10.8 g, 硫酸カルシウム 2 水和物 1.3 g, 蒸留水 1 l)¹³⁾ Brujewicz (塩化ナトリウム 26.518 g, 塩化カリウム 0.725 g, 硫酸マグネシウム 3.305 g, 塩化マグネシウム 2.447 g, 塩化カルシウム 1.141 g, 炭酸水素ナトリウム 0.202 g, 臭化ナトリウム 0.083 g, 蒸留水 1 l)¹⁴⁾ および Lyman & Fleming (塩化ナトリウム 23.476 g, 塩化カリウム 0.664 g, 硫酸ナトリウム 3.917 g, 塩化マグネシウム 4.981 g, 塩化カルシウム 1.102 g, 炭酸水素ナトリウム 0.192 g, 臭化カリウム 0.096 g, ほう酸 0.026 g, 塩化ストロンチウム 0.024 g, フッ化ナトリウム 0.003 g, 蒸留水 1 l)¹⁴⁾ の人工海水を供試した。また、前述の

Herbst の人工海水に 83 mg/l の臭化ナトリウム (臭素濃度 64 mg/l) を添加した人工海水も供試した。

各供試海水中の残留オキシダント (TROs) の安定性 各供試海水にオゾン注入後 0~10 分間の TROs 濃度を前述の方法により測定した。

供試ウイルスおよび培養細胞 供試ウイルスとして、サケ科魚類の伝染性造血器壊死症ウイルス (IHNV ChAb 株) と伝染性臓器壊死症ウイルス (IPNV VR-299 株), ヒラメラブドウイルス (HIRRV 8401-H 株), ブリ (*Seriola quinqueradiata*) のウイルス性腹水症ウイルス (YAV) を供した。IHNV については、4,000×g で 30 分間遠心分離することにより細胞片を取り除き、さらに 55,000×g で 120 分間遠心分離し、生成した沈殿をリン酸緩衝液 (塩化ナトリウム 8.0 g, 塩化カリウム 0.2 g, リン酸水素二ナトリウム 1.15 g, リン酸二水素カリウム 0.2 g, 蒸留水 1 l, pH 7.3, 以下 PBS と称す) に懸濁し、これをウイルス液とした。IPNV, HIRRV, YAV については 0.45 μm フィルターにより濾過した液をウイルス液とした。なお、IHNV, YAV の培養にはマスノスケ (*Oncorhynchus tshawytscha*) の胚由来である CHSE-214 (chinook salmon embryo) 細胞を、HIRRV の培養にはコイ (*Cyprinus carpio*) の上皮腫由来である EPC (epithelioma papulosum cyprini) 細胞を用いた。細胞の培養は 10% 牛胎児血清 (Gibco), ペニシリン (Sigma) 100 I.U./ml, ストレプトマイシン (Sigma) 100 μg/ml, トリス緩衝液 [0.17% Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane-HCl および 0.063% Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane, pH 7.8: Sigma] および 0.75% 炭酸水素ナトリウム (和光純薬) を含む Eagles' minimum essential medium (Gibco) を使用した。

供試細菌 供試細菌として *Vibrio anguillarum* (NCMB 6 株), *Aeromonas salmonicida* (ATCC 14174 株), *A. hydrophila* (IAM 1018 株), *A. caviae* (TUF 1 株), *Escherichia coli* (0-26 株) を供した。*V. anguillarum* の培養には液体海水培地 (ポリペプトン 5 g, 酵母エキス 1 g, 肉エキス 1 g, プロテオースペプトン 1 g, 75% Herbst 人工海水 1 l, pH 7.8) を、*A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. hydrophila*, *E. coli* の培養には普通ブイヨン (ポリペプトン 10 g, 肉エキス 5 g, 塩化ナトリウム 1.2 g, 蒸留水 1 l, pH 7.2) を用い、20°C で 1 週間培養後、1,500×g, 30 分間遠心分離した。沈殿を PBS に懸濁し、再び 1,500×g で 30 分間遠心分離することで菌体を洗浄した。菌体を再び PBS に懸濁し、Mcfarland No. 3 に濃度を調整した菌体を菌液として実験に供試した。なお、供試細菌の生菌数は、*V. anguillarum* では海水寒天培地 (先の液体培地に寒天を 15 g 加

えたもの)を用い、他の供試菌株には普通寒天培地を用いて測定した。

魚類病原微生物の殺菌・不活化効果 各供試細菌懸濁液を0.1 mg/lのTROs含有のBrjewiczの人工海水に1%の割合で混合し、20°Cで一定時間経過後にそれぞれ1 ml採取し、等量の液体海水培地もしくは普通ピジョンを加えてTROsの反応を停止してこの反応停止液の生菌数を求めた。ウイルス液についても同濃度のTROsを含むBrjewiczの人工海水に0.01%の割合で混合し、一定時間経過後、1 mlを採取し、等量の牛胎児血清により反応を停止させ、このウイルス液の感染価を測定してウイルスに対する不活化効果を求めた。対照としては無処理の人工海水に供試微生物を加え、反応停止液を添加した液から生菌数もしくはウイルス感染価を求めオキシダント処理した時の値と比較した。

オゾンガス気泡によるHIRRV不活化効果 HIRRV液を0.01%の割合で蒸留水に添加し、オゾン濃度を3.5 g/m³、圧力を0.5 kg/l、流量を1 l/minとして、1分間処理した後のウイルス感染価を測定すると共に、同一条件で天然海水をオゾン処理した場合に生成されるTROsの濃度を測定し、このTROs濃度でのHIRRV不活化効果を測定した。また、対照として、オゾン代わりにオゾン生成に使用している酸素ガスを蒸留水に同一条件で吹き込み、ウイルス感染価を測定した。

結 果

天然海水および人工海水中におけるTROsの安定性 天然海水中にオゾン吹き込み、TROs濃度を0.12および0.13 mg/lとした場合のTROs濃度の経時変化をTable 1に示した。5分後にはいずれの濃度でもヨウ化カリウムが発色せず、TROs濃度を測定できなくなった。

次に、各人工海水中でのTROsの安定性を検討した(Table 1)。Herbstの人工海水中におけるTROs濃度は、スタート時を0.22および0.17 mg/lとした場合、5分後にはそれぞれ0.20 mg/lおよび0.13 mg/lとなり、10分後には0.18および0.11 mg/lと徐々に濃度が低下していった。一方、Lyman & Flemingの人工海水中でのTROs濃度はスタート時に0.10、0.13 mg/lであったものが、5分および10分後でもほぼ同程度の値を示した。さらにBrjewiczの人工海水中におけるTROs濃度もスタートを0.14および0.13 mg/lとした場合、10分後でも同じ値となり、臭化物を含まないHerbstの人工海水に比べ、臭化物を含むLyman & FlemingおよびBrjewiczの人工海水では、TROs濃度は減少せず安定であった。そこで、臭化ナトリウムを83 mg/l (臭素濃度64 mg/l) 添加したHerbstの人工

Table 1. Stability of TROs produced by ozonation in seawater

Seawater	Time (minute)	TROs concentration (mg/l)	
Natural seawater	0	0.12	0.13
	5	ND*	ND
	10	ND	ND
Herbst's ASW**	0	0.22	0.17
	5	0.20	0.13
	10	0.17	0.12
Lyman & Fleming's ASW	0	0.10	0.13
	5	0.10	0.14
	10	0.09	0.11
Brjewicz's ASW	0	0.14	0.13
	10	0.14	0.13
Herbst's (with 83 mg/l of NaBr) ASW	0	0.15	0.25
	5	0.15	0.25
	10	0.15	0.25

* : ND; Not detected.

** : ASW; Artificial seawater.

Table 2. Effects of TROs on reduction rate of viable counts of fish pathogenic bacteria in Brjewicz's artificial sea water

Bacteria	Treatment time (second)	TROs concentration (mg/l)	Reduction rate (%)
<i>V. anguillarum</i>	30	0.12	99.4
	60	0.12	>99.9
<i>A. salmonicida</i>	30	0.11	>99.9
<i>A. caviae</i>	30	0.10	99.9
<i>A. hydrophila</i>	30	0.11	99.5
	60	0.11	>99.9
<i>E. coli</i>	60	0.10	97.5
	120	0.10	99.9

海水を作成し、オキシダントの安定性を検討した。スタート時のTROs濃度0.15および0.25 mg/lは、5、10分経過後も0.15および0.25 mg/lとなり、TROs濃度に変化は認められなかった。

TROsの魚類病原細菌に対する殺菌効果 Brjewiczの人工海水中のTROs濃度を0.10~0.12 mg/lとし、*V. anguillarum*, *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *E. coli*を30~120秒間処理した場合の生菌数の減少率をTable 2に示した。生菌数を99%以上減少させるために必要な処理時間は*V. anguillarum*, *A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. hydrophila*で30秒、*E. coli*の場合は、120

秒であった。

TROsの魚類病原ウイルスに対する不活化効果
Brujewiczの人工海水を用い、TROs濃度を0.11あるいは0.14 mg/lとし、供試ウイルスと反応させた場合の結果をTable 3に示した。HIRRVとIHNVの場合、0.11および0.14 mg/lのTROsを含む人工海水と30秒間反応させた場合、その感染価は99.9%以上減少した。IPNVの場合は30秒の処理で68.4%不活化され、60秒後に検出限界以下になった。また、YAVの場合も120秒後に99.9%以上不活化された。

オゾンガス気泡によるHIRRV不活化効果 オゾンガス気泡のHIRRVに及ぼす影響をTable 4に示した。蒸留水にオゾンガスを吹き込んで処理したときのHIRRV感染価は酸素ガスをコントロールとして処理したHIRRVに比べ、99.7%以上減少した。この時のTROsは測定限界以下であった。一方、天然海水を同じ条件で60秒間処理したときのTROs濃度は0.46 mg/lであった。また、TROs濃度が0.52 mg/lで1分間処理したときのHIRRV不活化率は99.9%と測定された。

Table 3. Inactivation of fish pathogenic viruses by TROs in Brujewicz's artificial sea water

Virus	Treatment time (second)	TROs concentration (mg/l)	Reduction rate (%)	Initial virus titer
HIRRV	30	0.11	>99.9	3.80*
IHNV	30	0.14	>99.9	4.05
IPNV	30	0.11	68.4	3.30
	60	0.11	>99.7	3.30
YAV	60	0.11	99.4	3.80
	120	0.11	>99.9	3.80

*: Log TCID₅₀/ml

Table 4. Effect of ozone gas bubbles on HIRRV infectivity

Treatment condition	TROs concentration (mg/l)	Infectivity of HIRRV		Reduction rate (%)
		Initial TCID ₅₀ /ml	After ozone gas treatment	
Distilled water*	Trace	3.30	≤0.80	99.7
Natural seawater	0.46	NT**	NT	NT
0.5mg/l TROs in natural seawater	0.52	5.80	2.80	99.9

*: Air pressure 0.5 kg/cm², Air supply 1 l/min, ozone gas concentration 3.5 g/cm³, Supplied time 1 min

** : Not tested

考 察

本実験では最初に海水中に生成したオキシダントの安定性を知るため、海水中でのTROs濃度を経時的に測定した。前報¹²⁾では天然海水中のTROs濃度を0.5～1.0 mg/lとした場合、TROs濃度測定開始から80分間は±0.11 mg/lの範囲で変動が観察されたにすぎなかった。しかし、0.1 mg/l程度の低TROs濃度の経時的変化を測定したところ、測定開始より5分経過した時点ですでにヨード法では測定不能となった(Table 1)。このことから、実際に天然海水へオゾンを注入し、低濃度オキシダントで海水を殺菌する場合には、TROs濃度をモニターし、常に0.1 mg/lとなるようにオゾン発生器の出力を調整する必要があることが示唆された。

天然海水の場合、0.1 mg/l程度のTROs濃度では海水中の有機物等でTROsが消費されたと考えられる。そこで、有機物等が含まれていない人工海水を用い、TROs濃度が0.1 mg/l程度におけるTROsの安定性を検討した。臭素化合物を含まないHerbstの人工海水では、測定開始時からTROs濃度が徐々に低下した。しかし、臭素化合物を含むLyman & Flemingの人工海水およびBrujewiczの人工海水の場合、スタート時のTROs濃度が10分後にも変化なく、臭化物を含まないHerbstの人工海水に比べ、臭化物を含む人工海水の方が安定であることが明らかになった(Table 1)。

そこで、人工海水中の臭素化合物がTROs濃度の安定性に関与しているかについて知るために83 mg/lの臭化ナトリウムを添加したHerbstの人工海水を作製し、この人工海水でのTROsの安定性を検討した。スタート時のTROs濃度が0.15および0.25 mg/lの場合、300および600秒後でも同じ値を示した。この結果は臭素化合物を含むBrujewiczの人工海水やLyman & Flemingの人工海水と同様、臭素化合物の添加によりTROsの安定性が増加することを示す結果となった。

使用する試薬数などを考慮すると Brujewicz の人工海水が適当と考えられ、以後この人工海水を用い実験を行った。

前報¹²⁾では、天然海水にオゾンを注入し、TROs 濃度が 0.5 あるいは 1.0 mg/l の TROs を含有する海水に魚類病原細菌およびウイルスを混合して所定時間反応させた後に生菌数あるいは感染価を測定した。生成した TROs 濃度が 1.0 および 0.5 mg/l の場合、*V. anguillarum* および HIRRV は共に 15 秒の処理により 99～99.9% 以上殺菌あるいは不活化され、*A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. hydrophila*, *E. coli* や IHNV も 15 秒の処理で不活化・殺菌された。また、IPNV では 99% 以上の感染価を減少させるためには 30 秒、YAV では 60 秒の処理が必要であった。ところで TROs 濃度を 0.5 あるいは 1.0 mg/l とするには装置が大型化し、ランニングコストも大きくなるため、より低濃度での殺菌効果が認められれば、経費はかなり節減される。

そこで、今回は低濃度での TROs の殺菌・不活化効果の検討を行う目的で上記の臭素化合物を含む人工海水を用い、0.1 mg/l での TROs の殺菌・ウイルス不活化効果を検討した。Brujewicz の人工海水を用い TROs 濃度を 0.1 mg/l 程度とし、魚類病原細菌の殺菌およびウイルスの不活化効果を同様に検討した。魚類病原細菌およびウイルスの生菌数あるいは感染価を 99.9% 以上もしくは検出限界以下まで減少させるには、*A. salmonicida*, *A. caviae*, HIRRV および IHNV の場合は 30 秒処理する必要がある、*A. hydrophila* および IPNV の場合は 60 秒、YAV, *V. anguillarum*, *E. coli* の場合は 120 秒処理する必要があった。以上の結果より、TROs 濃度が 0.1 mg/l 以上で 120 秒間処理することにより供試した全ての微生物を 99.9% 以上もしくは検出限界以下まで殺菌・不活化できると判断された (Table 2, 3)。

ところで、海水にオゾン吹き込み、海水をオゾン処理すると多数の微細オゾンガス気泡が生じる。このオゾンガス気泡の微生物に対する影響を HIRRV を対象に検討した。オキシダントが生成されないという条件を得るために蒸留水を用い、オゾンガス気泡による HIRRV 不活化効果を測定し、次いで同一条件下で天然海水を処理し、生成する TROs による不活化効果を比較検討した。オゾンガス気泡による不活化率は 99.7% 以上となった。また、オゾンガス気泡を蒸留水と接触させた場合と同条件で天然海水と接触させた後に生成する TROs 濃度は 0.46 mg/l であり、この濃度とはほぼ同じ濃度で 60 秒間反応させた場合の HIRRV 不活化率は 99.9% であった (Table 4)。この結果から、オゾンガス気泡にもかなりのウイルス不活化能力があると考えられる。

一方、Wedemeyer *et al.*^{5,6)} は、炭酸カルシウム不含有

の PBDW (phosphate-buffered distilled water) 中で残留オゾン濃度を 0.01～0.04 mg/l にし、30～60 秒間処理することにより IHNV, IPNV, *A. salmonicida* を 99.99～99.999% 以上殺菌・不活化することができると報告している。この値は今回の TROs による殺菌・不活化効果以上に効果があると考えられる。しかし、実際に硬水や軟水の湖水を用い、残留オゾン濃度が 0.01 mg/l となるようにオゾンガスを吹き込んだ場合、IHNV や IPNV を 99% 以上不活化させるには 2 分間以上が必要であり、⁶⁾ PBDW にオゾンを溶解させた場合やオキシダントに比べ不活化効果が低いと考えられる。

また、Sugita *et al.*⁹⁾ は純培養した細菌をオキシダント処理したときの殺菌率と、種々の細菌が多数存在している沿岸海水をオキシダント処理した場合を比べると、沿岸海水に対する殺菌率が低下することを示している。このことから、実際にオゾンを用い、殺菌を目的として天然海水を処理する場合は実験室レベルで設定したオキシダント濃度よりも高めの濃度で処理する必要があると推測される。いずれにしても海水をオゾン処理により殺菌する場合には、オゾンの海水への注入により生成されるオキシダント濃度を常にモニターし、オキシダント濃度が 0.1 mg/l となるようにオゾン発生器の出力を調整する必要があると考えられる。

文 献

- 1) 木村喬久, 吉水 守, 田島研一, 絵面良男, 坂井 稔: 養魚用水の紫外線殺菌法について—I. 魚類病原細菌ならびに養魚用水生菌の紫外線感受性. 日水誌, 42, 207-211 (1976).
- 2) 木村喬久, 吉水 守, 田島研一, 絵面良男: 養魚用水の紫外線殺菌について—II. 魚病原原因ミズカビの紫外線感受性について. 魚病研究, 14, 133-137 (1980).
- 3) 吉水 守, 瀧沢安子, 木村喬久: 魚類病原ウイルスの紫外線感受性. 魚病研究, 21, 47-52 (1986).
- 4) 木村喬久, 吉水 守, 阿刀田光昭: 養魚用水の紫外線殺菌について—III. U.V. 処理水使用によるサケ・マス孵化成績について. 魚病研究, 14, 139-142 (1980).
- 5) G. A. Wedemeyer and N. C. Nelson: Survival of two bacterial fish pathogens (*Aeromonas salmonicida* and enteric red mouth bacterium) in ozonated, chlorinated, and untreated waters. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 34, 429-432 (1977).
- 6) G. A. Wedemeyer, N. C. Nelson, and C. A. Smith: Survival of the salmonid viruses infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in ozonated, chlorinated, and untreated waters. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 35, 875-879 (1978).
- 7) 内藤茂三: オゾン殺菌装置. 「微生物制御実用事典」(石井泰造監修), フジ・テクノシステム, 東京, 1994, p. 417.
- 8) 吉水 守, 日向進一: 養魚用水の殺菌法—紫外線及びオゾンの利用一, 工業用水, 404, 2-8 (1992).
- 9) H. Sugita, T. Asai, K. Hayashi, T. Minuya, K. Amanuma, C. Maruyama, and Y. Deguchi: Application of ozone disinfection to remove *Enterococcus seriolicida*, *Pasteurella pisci-*

- cida*, and *Vibrio anguillarum* from sea water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 4072-4075 (1992).
- 10) 吉水 守: 魚類養殖および栽培漁業でのオゾンの利用. オゾン年鑑 93-94 年度版, リアライズ社, 東京, 1992, pp. 401-409.
 - 11) マリノフォーラム 21 編: 海水殺菌装置評価基準, 財団法人マリノフォーラム 21, 東京, 1991, pp. 54-63, 80-89.
 - 12) M. Yoshimizu, S. Hyuuga, M.-J. Oh, Y. Ezura, S. Ito, and G. Mimura: Disinfectant effect of oxidant produced by ozonization of sea water on fish pathogenic viruses, bacteria, and ciliata. In *Diseases in Asian Aquaculture II*. M. Schariff, J. R. Arthur & R. P. Subasinghe (eds.), Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, 1995, pp. 203-209.
 - 13) 中村 浩: 海洋微生物. 微生物学ハンドブック, 技報社, 東京, 1962, pp. 610-621.
 - 14) H. U. Sverdrup, M. W. Johnson, and R. H. Fleming: *The oceans their physics, chemistry, and general biology*. Prentice-Hallinc., Engle wood Cliffs. N. J. Charles E. Tuttle Company, Tokyo, 1966, pp. 185-186.