



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	シオミズツボワムシ複相単性生殖卵の消毒
Author(s)	渡辺, 研一; 篠崎, 大祐; 小磯, 雅彦 他
Citation	日本水産学会誌, 71(3), 294-298 https://doi.org/10.2331/suisan.71.294
Issue Date	2005-05-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53375
Rights	© 2005 公益社団法人日本水産学会
Type	journal article
File Information	article123.pdf



シオミズツボワムシ複相単性生殖卵の消毒

渡辺 研一,^{1a*} 篠崎 大祐,¹ 小磯 雅彦,¹ 桑田 博,¹ 吉水 守²

(2004年7月1日受付, 2004年10月18日受理)

¹佃水産総合研究センター能登島栽培漁業センター, ²北海道大学大学院水産科学研究科Disinfection of parthenogenetic eggs of the rotifer *Brachionus plicatilis*KEN-ICHI WATANABE,^{1a*} DAISUKE SHINOZAKI,² MASAHIKO KOISO,¹
HIROSHI KUWADA¹ AND MAMORU YOSHIMIZU²¹Notojima Station, National Center for Stock Enhancement, Fisheries Research Agency, Notojima, Ishikawa 926-0216, ²Graduate School of Fisheries Science, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan

The Disinfectant effect of chemical and physical treatments on parthenogenetic eggs of the rotifer was investigated. No disinfectant effect was observed by treatment with ozonated or electrolyzed seawater, and triton-X under several conditions. Treatments with povidone-iodine at 50 mg/L as iodine, pH 2, and 10,000 mg/L of hydrogen peroxide were effective for disinfection, but hatching rate was low. Glutaraldehyde treatment at the concentration of 1,250 mg/L for 30 min effectively disinfected the eggs of rotifer and did not reduce the hatching rate of parthenogenetic eggs.

キーワード：消毒, シオミズツボワムシ, *Brachionus plicatilis*, 複相単性生殖卵, グルタルアルデヒド

我が国では2001年度に51種類の海産魚類の種苗生産が行われ,¹⁾多くの種でシオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* などの輪虫類(以下ワムシ)の給餌が必須となっている。²⁾一方,ワムシが感染源として疑われる疾病の発生が報告されており,³⁻⁸⁾ワムシ由来で種苗生産対象種に疾病が発生することを防除する技術の開発が緊急の課題である。そのためには餌料として供給するワムシの病原体による汚染レベルを低くすることが必要である。

ワムシの病原体による汚染レベルを低くするためには,培養に使用する用水,水槽,器具,餌料および初めに接種する元種などを消毒する必要がある。ワムシの培養水⁹⁾や水槽・用具¹⁰⁾をはじめとした培養環境の消毒技術はすでに確立されている。¹¹⁾しかしながら,餌料や元種の消毒法については未検討であり,これらの消毒技術を早急に確立する必要がある。

ワムシの一生は,大きく卵と虫体とに分けられ,¹²⁾一般に消毒剤に対する耐性は卵の方が大きいと考えられる。¹⁰⁾ワムシの卵には複相単性生殖卵と耐久卵とがあ

り,¹²⁾単性生殖卵は雌が単性生殖により産出して急激な増殖をもたらすのに対して,耐久卵は雄の出現による両性生殖により産出されて休眠をもたらし,両性生殖の起こり易さはワムシの株により異なる。¹²⁾一方,現在我が国の種苗生産機関で培養されているワムシは,増殖の良さを基準として選抜が行われてきているため,耐久卵を生じる株を用いている機関は非常に少ないものと推察される。耐久卵の消毒に関しては Balompapung *et al.*¹³⁾ および Rombaut *et al.*¹⁴⁾ により報告されているが,単性生殖卵と耐久卵では消毒剤に対する感受性が異なることが予想され,種苗生産の現場における元種の消毒に耐久卵の消毒法をそのまま用いることは非常に危険である。

したがって,単性生殖卵の消毒技術を確立する必要があり,単性生殖卵の各種消毒薬に対する感受性と消毒効果について検討した。

試料および方法

供試ワムシ 独立行政法人水産総合研究センター能登

* Tel : 81-880-72-1207. Fax : 81-880-72-1111. Email : knabe@fra.affrc.go.jp

a 現所属：佃水産総合研究センター古満目栽培漁業センター (Komame Station, National Center for Stock Enhancement, Fisheries Research Agency)

島栽培漁業センター（以下当センター）において、地先から揚水し砂ろ過した天然海水と当センターの井戸から取水した井戸水を用いて、およそ 20 psu の塩分となるように希釈した培養水（以下：60% 海水）を用い、20～25℃で培養中のシオミズツボワムシ（いわゆる L 型ワムシ）小浜株を用いた。

ワムシ単性生殖卵の分離 小磯・日野¹⁵⁾の方法を一部改変して単性生殖卵（以下：卵）を分離した。すなわち、家庭用ミキサーで培養水とともにワムシを攪拌して虫体から卵を分離し、この培養水をメスシリンダーに移し入れ、卵が沈下するのを待って虫体を含む上清を廃棄した。上述の 60% 海水を加え、再度卵の沈下を待って同様に上清を廃棄した。この作業を数回繰り返して、沈下した卵を回収した。

実験用水の検討 薬剤を溶解する用水として、精製水、精製水と塩化ナトリウムで調整した 0.9% NaCl 溶液、60% 濃度の Herbst の人工海水および¹⁶⁾上述の 60% 海水を用いた。試験は 20℃の恒温器に 1 日以上放置した用水を用いて 20℃の室内で行った。それぞれの消毒用水 1 L を角形水槽（210×270×40 mm）に入れ、約 1 g の単性生殖卵を 30 分間浸漬した。浸漬中は 100 rpm で運転中の攪拌機（IKA Schüttler MTS4）に水槽を設置した。浸漬終了後、ネットで卵を濾し取り、淡水クロレラ（クロレラ工業；生クロレラ V12）を 1,000 万細胞/mL 含む 30 mL の 60% 海水が入った 50 mL 試験管に卵を数百粒入れ、100 rpm の攪拌機上にセットして 2 昼夜振とう後、実体顕微鏡下で胃がクロレラで緑色を呈する虫体を生存個体、呈さない虫体を死亡個体として、さらに未ふ化の卵を計数した。一方、ふ化率を以下の式により算出し、ふ化に及ぼす影響を検討した。

$$\text{ふ化率} = \{(\text{生存個体数}) \div (\text{生存個体数} + \text{死亡個体数} + \text{単性生殖卵数})\} \times 100$$

殺菌力を有する海水の単性生殖卵消毒効果 種苗生産場で用いる飼育器具類に対する消毒効果が報告されている電解海水¹⁷⁾（有効塩素濃度 0.5～4.8 mg/L）とオキシダント海水¹⁸⁾（オキシダント濃度 0.5 mg/L）を対象に、単性生殖卵に対する消毒効果を検討した。電解海水は海水電解装置（東和電機製作所試作機）で、オキシダント海水は海水オゾン処理装置（オゾン卵洗浄装置、荏原実業）で作製した。卵約 1 g をネットに入れ、それぞれの濃度に調整した 100% 海水（水温 10～20℃）を 3 L/min の流量で流水にした 25 L 容のコンテナ中に 5～60 分間振とうしながら浸漬した。浸漬終了後、ネットで卵を濾し取り、滅菌 2% ペプトン水（1.5% NaCl 加）を十分量加え、塩素およびオキシダントの作用を止めた。約 0.1 g の卵を滅菌したビニール袋に取り、秤量後滅菌した Herbst の人工海水 9 倍量を加えてホモジナイズした。10 倍希釈液列を作製し、海水寒天培地平板¹⁹⁾表面

に塗抹して 20℃で 5 日間好氣的に培養し、出現コロニー数から生菌数を算出した。なお、殺菌力を有する海水に浸漬する前の卵の生菌数についても同様に測定した。消毒率は以下の式により算出し、消毒効果を評価した。

$$\text{消毒率} = \{1 - (\text{浸漬後の生菌数} \div \text{浸漬前の生菌数})\} \times 100$$

なお、ふ化率を消毒前後の卵について上述の方法で算出した。

有効な消毒剤の検討 さけ科魚類の卵消毒剤として使用されている水産用イソジン液（明治製菓：有効ヨウ素 1～50 mg/L 濃度）、過酸化水素水（有効過酸化水素 0.1～1.0% 濃度）、Triton-X（0.05～0.1%）、水産用グルタラルール（三鷹製菓；グルタールアルデヒドとして 1,250 mg/L）の単性生殖卵の消毒剤としての有効性を調査した。pH の影響は、アルカリ側で pH 12、酸性側で pH 2 および 4 として観察した。pH の調整は水酸化ナトリウムもしくは塩酸を添加して行った。

これらの消毒剤について、上述の方法で消毒効果およびふ化率を検討した。水産用グルタラルールの場合には、製品に添付の中和剤（亜硫酸水素ナトリウム）を滅菌 60% 人工海水に 2,600 mg/L の濃度となるように溶解し、上述の 2% ペプトン水と同様に十分量かけてグルタールアルデヒドの作用を止めた。浸漬時間は、各剤・各濃度ごとに 1～30 分とした。

統計検定 ふ化率の平均値の差の検定を、ふ化率を逆正弦変換した値を用いて、クラスカル・ワーリス検定により行った。消毒用水の検討においては、さらに Scheffe の F 検定を用いて多重比較を行った。

結果と考察

実験用水の検討 各用水に卵を浸漬した場合のふ化率を Table 1 に示した。

精製水および 0.9% NaCl 溶液に卵を 30 分間浸漬した場合のふ化率はそれぞれ 11 および 66% であった。60% 人工海水および 60% 海水に浸漬した場合には、それぞれ 97 および 95% であった。これらの 4 種類の用水を用いたときのふ化率には有意差が認められた（ $p <$

Table 1 Effects of several waters on hatching rate of parthenogenetic eggs of rotifer

Water	Treatment time (min)	Hatching rate (%)
Refined water	30	10.9±1.45
Refined water with 0.9% NaCl	30	65.8±0.63
60% Herbst's artificial seawater	30	96.5±3.92
60% natural seawater	30	95.1±4.78

Table 2 Effects of ozonated or electrolysed seawater on disinfection of parthenogenetic eggs of rotifer

Material	Concentration (mg/L)	Treatment time (min)	Rate of disinfection (%)	Hatching rate (%)
Electrolysed seawater	0.52	5	63.9	86.0
	0.52	10	92.7	94.4
	0.52	15	72.2	94.0
	0.94	5	31.7	72.1
	0.96	5	58.8	94.0
	0.96	10	82.0	91.7
	0.96	15	81.5	87.6
	2.02	5	51.7	37.0
	2.96	5	37.3	6.9
	3.96	5	27.6	4.0
	4.81	5	66.8	3.0
Ozonated seawater	0.51	5	5.0	NT*
	0.51	10	31.8	NT
	0.51	15	-46.4	NT
	0.51	30	-91.0	NT
	0.51	60	-139.7	NT

* Not tested

0.05)。多重比較検定を行ったところ 60% 人工海水と 60% 海水の間では有意差は認められなかったものの、他の用水間では有意差が認められた。したがって、精製水および 0.9% NaCl 溶液は消毒剤の効果を検討する用水として適していないと考えられた。

一方、天然海水には有機物が含まれており消毒剤の減衰をもたらす可能性があること、時期により含有成分が異なることが予想され、消毒効果に影響する可能性があると考え、有効な消毒剤を検討するための用水として 60% 人工海水を用いることとした。

殺菌力を有する海水の消毒効果 電解処理もしくはオゾン処理した海水に浸漬した卵の消毒率とふ化率を Table 2 に示した。0.5 mg/L のオキシダントを含むオゾン処理海水では 60 分浸漬しても消毒効果は認められなかった。電解処理海水では最大で 1 オーダー生菌数の減少が認められたが、十分な消毒効果があるとは考えられなかった。さらに、およそ 3 mg/L 以上の塩素濃度となると、わずか 5 分の浸漬でもふ化率が 10% 未満に低下し、電解処理した海水も卵の有効な消毒剤とは考え難い結果となった。

有効な消毒剤の検討 60% 人工海水を用い各種の消毒剤で卵を処理した場合の消毒率とふ化率を Table 3 に示した。

イソジン液を用いて有効ヨウ素濃度 50 mg/L で 10 分以上処理した場合、99% 以上の消毒率が得られたが、ふ化率は 2% 程度以下と卵のふ化に悪影響を及ぼした。浸漬時間を 5 分以下、有効ヨウ素濃度を 50 mg/L 以下とした場合、99% 以上の消毒率が得られる条件は得られなかった。Triton-X では消毒効果は認められな

Table 3 Effects of chemicals on disinfection of the parthenogenetic egg of rotifer

Chemical	Concentration (mg/L)	Treatment time (min)	Rate of disinfection (%)	Hatching rate (%)
Iodine	1	1	7.4	91.7
	1	5	75.4	55.8
	5	1	48.6	60.5
	5	5	82.3	13.0
	10	1	55.6	63.8
	10	5	81.9	15.3
	25	1	61.8	64.6
	25	5	97.4	8.0
	50	1	82.7	93.1
	50	1	69.9	88.3
	50	2	79.6	89.5
	50	3	91.3	28.5
	50	4	96.9	82.8
	50	5	98.6	6.5
	50	5	95.8	12.2
	50	10	99.5	2.1
	50	15	>99.99	1.5
Triton-X	500	15	NC*	66.3
	1,000	15	NC	75.6
Glutaraldehyde	1,250	15	99.9	69.5
	1,250	15	>99.99	63.9
	1,250	15	>99.99	59.1
	1,250	15	>99.99	73.8
	1,250	30	99.99	66.3
	1,250	30	>99.99	88.3
	1,250	30	>99.99	96.0
	1,250	30	>99.99	67.9
pH	2	15	99.5	0.5
	4	15	80.5	95.6
	12	15	79.7	99.1
Hydrogen peroxide	1,000	15	80.9	20.0
	2,000	15	85.0	5.0
	5,000	15	87.4	2.2
	10,000	15	92.7	0.5

* Not countable

かった。

pH および過酸化水素について検討したところ、pH 2 で 2 オーダー、過酸化水素 10,000 mg/L で 1 オーダーの生菌数の減少が確認されたが、ふ化率がともに 0.5% と低かった。pH 4, 12 では消毒率がそれぞれ 81 および 80% と低かった。

以上のことから、イソジン液、Triton-X、pH および過酸化水素は、今回の試験条件下では、有効な消毒剤とは考えられなかった。

一方水産用グルタールでは、グルタールアルデヒドとして 1,250 mg/L の濃度で 15 分浸漬した場合に 99.9% 以上、30 分浸漬した場合に 99.99% 以上との生菌数の減少が観察され、30 分浸漬することにより十分な消

毒効果が認められた。ふ化率は15分浸漬した場合に59~74%, 30分浸漬した場合に66~96%であった。この試験に供した卵を消毒せずにふ化試験に供したところ、ふ化率は60~90%であった。統計検定の結果、これら3群の平均ふ化率の間に有意差は認められなかった($p>0.05$)。

ワムシ全体の細菌数の減少法については以下の報告がある。山野井・杉山²⁰⁾は給餌前のワムシの虫体および卵をニフルスチレン酸ナトリウム(以下NFS)処理し、未処理のものと比較して3オーダー生菌数が減少したことがあることを報告している。さらに山野井ら²¹⁾は、NFS処理したワムシおよびアルテミアノープリウスを用いてクロダイの種苗生産を行った結果を報告している。それによると、NFS処理した区のクロダイの消化管内細菌数は対照区のそれより少なく、病魚の消化管内細菌数が正常魚より多いと報告されている腹部膨満症²²⁾の発症の可能性を低減できたことを報告している。一方、我が国のアユ種苗生産機関にアンケート調査を行った結果²³⁾では、餌料生物のNFS処理を行った場合に大量死亡の発生が明らかに減少するが、NFS処理を行わなくても大量死亡が発生しない機関もあり、給餌直前における餌料生物のNFS処理の効果は必ずしも明確ではない。この要因として山野井・杉山²⁰⁾は、NFSに感受性を有する仔稚魚に有害な細菌が優先する時のみNFS処理効果が発揮されると考えられるとしている。また、山野井・杉山²⁰⁾が紫外線、水呉²⁴⁾が過酸化水素、Suantika *et al.*²⁵⁾がオゾンのワムシ細菌数の変化について検討している。いずれの方法も細菌数の減少は認められるものの、ワムシが死亡するか1オーダー程度の減少が確認されるのみで、種苗生産におけるワムシ元種の消毒法として有効な手段とは考えにくい。したがって、現状ではワムシ全体の消毒法は確立されておらず、元種を消毒する場合には卵の消毒法について検討する必要がある。

Balompapueng *et al.*¹³⁾は1 mg/Lの次亜塩素酸ナトリウムで60分耐久卵を処理することにより無処理のものよりふ化率が向上し、SEMにより卵表面に細菌が観察されなくなったことを報告している。今回の試験では次亜塩素酸ナトリウムについては検討しなかった。これは卵に対する次亜塩素酸ナトリウムの毒性が確認されているためである(桑田未発表)。また、Rombaut *et al.*¹⁴⁾は0.05 μ L/Lのグルタルアルデヒドで6時間耐久卵を処理することにより、無処理のものとふ化率に差が無く、細菌が検出されなくなったことを報告している。今回のグルタルアルデヒドを用いた消毒試験は1,250 mg/Lの濃度で行った。これは使用した水産用グルタルアルの推奨使用濃度で検討したためであり、また、単性生殖卵の消毒では発育段階をそろえることが非常に困

難であるため、消毒中もふ化する卵があり、長時間の消毒に問題があるためである。

以上のことから、種苗生産現場でワムシの培養に用いる元種を消毒するためには、単性生殖卵をグルタルアルデヒド1,250 mg/Lを含む60%人工海水で30分間処理することが最も効果的であると考えられる。

文 献

- 1) 水産庁, 日本栽培漁業協会. 海産魚介類の機関区分別種苗生産放流実績. 平成13年度種苗生産 入手・放流実績(全国), 水産庁, 日本栽培漁業協会, 東京. 2003; 8-12.
- 2) 日野明徳. N-1. 種苗生産. 「現代の水産学」恒星社厚生閣, 東京. 1994; 124-131.
- 3) 岩田一夫, 矢野原良民, 石橋 制. マダイの種苗生産過程におけるへい死要因に関する研究. 魚病研究 1978; 13: 97-102.
- 4) 田畑和男, 柄多 哲, M. S. Ruiz. 海水によるアユ種苗生産時の病害研究—II *Vibrio anguillarum* の動態. 魚病研究 1982; 17: 205-212.
- 5) 田谷全康, 室賀清邦, 杉山瑛之, 平本義春. 種苗生産過程の仔稚アユからの *Vibrio anguillarum* の検出. 水産増殖 1985; 33: 59-66.
- 6) 楠田理一, 横山 淳, 川合研児. クロダイ仔稚魚のいわゆる腹部膨満症に関する細菌学的研究. 日水誌 1986; 5: 1745-1751.
- 7) 増村和彦, 安信秀樹, 岡田直子, 室賀清邦. ヒラメ仔魚の腸管白濁症原因菌としての *Vibrio sp.* の分離. 魚病研究 1989; 24: 135-141.
- 8) Muroga, K, Yasunobu H, Okada N, K. Masumura. Bacterial enteritis of cultured flounder *Paralichthys olivaceus* larvae. *Dis. Aquat. Org.* 1990; 9: 121-125.
- 9) 石丸克也. 紫外線による飼育水の殺菌. 平成9年度栽培漁業技術研修事業基礎理論コース, 種苗期疾病対策シリーズ No. 13, 水産庁, 日本栽培漁業協会, 東京. 1997; 1-6.
- 10) 桑田 博. 2-1-4 水槽と用水の塩素処理. 栽培漁業技術研修事業基礎理論コーステキスト集Ⅱ—ワムシの培養技術—, 日本栽培漁業協会, 東京. 2000; 55.
- 11) 吉水 守, 笠井久会. 種苗生産施設における用水及び排水の殺菌. 工業用水 2002; 523: 13-26.
- 12) 日野明徳. 2 生活史. 栽培漁業技術研修事業基礎理論コーステキスト集Ⅱ—ワムシの培養技術—, 日本栽培漁業協会, 東京. 2000; 9-10.
- 13) Balompapueng MD, Munuswamy N, Hagiwara A, Hirayama K. Effect of disinfectants on the hatching of marine rotifer resting eggs *Brachionus plicatilis* Müller. *Aquaculture Research* 1997; 28: 559-565.
- 14) Rombaut G, Dhert Ph, Vandenbergh J, Verschuere L, Sorgeloos P, Verstraete W. Selection of bacteria enhancing the growth rate of axenically hatched rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture* 1999; 176: 195-207.
- 15) 小磯雅彦, 日野明徳. シオミズツボワムシの大量培養における増殖停滞の機構に関する研究. 水産増殖 2002; 50: 197-204.
- 16) 中村 浩. 海洋微生物. 「微生物学ハンドブック」技報社, 東京. 1962; 610-621.
- 17) 渡辺研一, 吉水守. 電解海水による飼育器具の消毒. 日水誌 2001; 67: 304-305.
- 18) 渡辺研一, 吉水 守. オゾン処理海水を用いた飼育器具類および受精卵の消毒. 魚病研究 1998; 33: 145-146.

- 19) Yamamoto H, Ezura Y, Kimura T. Effects of antibacterial action of seawater on the viability of some bacterial species. *Fish. Sci.* 1983; **48**: 1427-1431.
- 20) 山野井英夫, 杉山英之. シオミズツボムシの保有細菌数に及ぼすニフルスチレン酸ナトリウム薬浴と紫外線照射の影響. 水産増殖 1987; **35**: 191-195.
- 21) 山野井英夫, 萱野泰久, 尾田 正. クロダイ仔稚魚の成長, 生残, 及び消化管内細菌叢等に及ぼす餌料生物のニフルスチレン酸ナトリウム浴と冷凍保存の影響. 水産増殖 1990; **38**: 13-22.
- 22) 安信秀樹, 室賀清邦, 丸山敬悟. マダイ仔魚の腸管膨満症に関する細菌学的検討. 水産増殖 1988; **36**: 11-20.
- 23) 山野井英夫, 杉山英之, 片山勝介. アユの人工種苗生産における餌料と大量斃死に関するアンケート調査結果. 水産増殖 1988; **35**: 213-222.
- 24) 水呉 浩. 生物餌料の細菌数—広島県栽培漁業協会の事例—, 平成 11 年度広島県栽培漁業協会事業報告書, 2000; **19**: 75-80.
- 25) Suantika G, Dhert P, Rombaut G, Vandenberghe J, De Wolf T, Sorgeloos P. The use of ozone in a high density recirculation system for rotifers. *Aquaculture* 2001; **201**: 35-49.