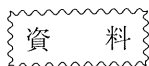


市販薬剤を用いたシオミズツボウムシ複相単性生殖 卵の消毒

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2025-04-24
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 渡辺, 研一, 小磯, 雅彦
	メールアドレス:
	所属:
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2014579

This work is licensed under a Creative Commons
Attribution 4.0 International License.





市販薬剤を用いたシオミズツボワムシ複相単性生殖卵の消毒

渡辺 研一^{*1}・小磯 雅彦^{*2}

Disinfection of Parthenogenetic Eggs of the Rotifer *Brachionus plicatilis* using commercial medicine

Ken-ichi WATANABE ^{*1} and Masahiko KOISO ^{*2}

The disinfectant efficacy of chemical treatments on parthenogenetic eggs of the rotifer was investigated. Treatments using several types of alcohol ranging from 30 to 70% concentration, several phenolic compounds at 1 to 5%, and 0.1% of benzalconium chloride were effective in terms of disinfection, but hatching were not observed. No effects of disinfectant were observed by treatment with formalin and sodium hypochlorite under several conditions which would enable hatching of the eggs. Glutaraldehyde treatment at concentrations ranging from 1,000 to 2,000 mg/L for 30 min effectively disinfected the rotifer eggs and did not reduce hatching rate of parthenogenetic eggs.

2006 年 6 月 26 日受理

我々は別報¹⁾で、海産魚介類の種苗生産において初期餌料として利用されているシオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* (以下ワムシ) 由来の疾病を防除するための方策の一つとして、ワムシ培養を開始するにあたって接種する元種の消毒法について検討した。消毒の対象を複相単性生殖卵とすることとして2種類の殺菌力を有する海水と、ヨウ素等4種類の消毒剤がワムシ卵の消毒に及ぼす影響を検討し、1,250 mg/Lのグルタルアルデヒドを含む人工海水に30分浸漬することが有効であると報告した。しかしながら、浸漬条件は同濃度に15分浸漬した場合と比較したのみであり、有効な濃度範囲、浸漬時間などは検討できていない。

そこで本報告では、ワムシ卵の消毒においてグルタルアルデヒドの有効な濃度とその浸漬時間の範囲を解明し、さらに未検討の他の消毒剤がワムシ卵の消毒に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

供試ワムシ 別報¹⁾に準じ、独立行政法人水産総合研究

センター能登島栽培漁業センターにおいて、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、水温20~25℃で培養したL型ワムシ小浜株を用いた。

ワムシ単性生殖卵の分離 別報に準じ、小磯・日野²⁾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、家庭用ミキサーでワムシを攪拌して虫体から卵を分離し、その攪拌液を平底トレイ(44×32×7 cm)に移して、卵が沈下するのを待って虫体を含む上清を廃棄した。そこへ60%海水を加え、卵の沈下を待って同様に上清を廃棄する作業を数回繰り返し、沈下した卵を回収した。

試験法 別報¹⁾で有効性を明らかにした、60%濃度のHerbstの人工海水を用いて試験を行った。他の試験法についても別報に準じ、20℃の人工海水を用いて20℃の室内で行った。人工海水1Lを100 rpmで運転中の攪拌機に設置した角形水槽に入れ、約1gの単性生殖卵を所定時間浸漬した。浸漬終了後、餌料を含む60%海水が入った試験管に卵を数百粒入れ、1昼夜振とう後、生存個体、死亡個体、未ふ化の卵を計数した。

^{*1} 独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所上浦栽培技術開発センター古満目分場 〒788-0315 高知県幡多郡大月町古満目330 (Komame Station, National Research Institute of Aquaculture, FRA, 330, Komame, Ootsuki, Kouchi 788-0315, Japan).

^{*2} 独立行政法人水産総合研究センター能登島栽培漁業センター 〒926-0216 石川県七尾市能登島曲町15-1-1

また、浸漬終了後、採取した卵に滅菌2%ペプトン水を十分量加えて消毒剤を洗い流し、約0.1 gの卵を用いて定法により生菌数を算出した。

効果判定の方法 ふ化率と消毒率は別報に準じて以下の式により算出し、ふ化に及ぼす影響と消毒効果を検討した。

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

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

グルタルアルデヒドのワムシ単性生殖卵の消毒に有効な濃度と浸漬時間の検討 グルタルアルデヒドの濃度を50, 100, 200, 500, 1,000, 1,250, 1,500, 2,000 mg/Lとして、浸漬時間はそれぞれ20, 30, 40分間として、ふ化率と消毒率を算出し、検討した。

有効な消毒剤の検討 一般的に用いられている消毒剤、エタノール、イソプロピルアルコール、*n*-プロピルアルコール、次亜塩素酸ナトリウム、フェノール、クレゾール、塩化ベンザルコニウム、ホルマリンの8種類について、消毒剤としての常用濃度で消毒試験を行った。浸漬時間は5～40分間とした。次亜塩素酸ナトリウムとホルマリンについては、卵のふ化が認められる濃度まで試験を行った。

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、Tukey法により多重比較を行っ

た。

結果と考察

グルタルアルデヒドのワムシ単性生殖卵の消毒に有効な濃度と浸漬時間の検討 表1に種々の濃度のグルタルアルデヒドに時間を変えてワムシ単性生殖卵を浸漬した場合のふ化率と消毒率を示した。

対照区のふ化率は、57～74%であった。多重比較の結果、いずれの消毒条件においても統計的な有意差は認められなかった。しかしながら、1,500 mg/L以上の濃度に40分浸漬した場合には、他の試験区と比較してふ化率が10%以上低下する試験例があったことから、これらの消毒条件は有効でないと考えられた。

消毒率は、500 mg/L以下のグルタルアルデヒドに浸漬した場合には、いずれの時間も99.8%未満であり、有効な消毒条件とは考えられなかった。また、1,000～1,500 mg/Lの濃度に20分浸漬した場合にも99.9%未満であり、有効な消毒条件とは考えられなかった。1,000 mg/L以上の濃度に30分以上浸漬した場合と2,000 mg/Lの濃度に20分浸漬した場合には消毒率が99.9%以上を示し、有効な消毒条件と考えられた。

以上の結果から、グルタルアルデヒドを使用した場合にワムシ単性生殖卵を効果的に消毒し、かつ消毒後のふ化率が低下しない実用性のある条件は、1,000～1,250

表1. グルタルアルデヒドのシオミズツボワムシ複相単性生殖卵に及ぼす影響

消毒剤	濃度 (mg/L)	浸漬時間 (分)	ふ化率			消毒率			
			1回目	2回目	3回目	1回目	2回目	3回目	平均値
対照区			73.6	57.1	62.7				
グルタルアルデヒド	50	20	72.6	57.2	68.6	<99.8	<99.4	<99.7	-
		30	72.4	58.5	65.4	<99.8	<99.4	<99.7	-
		40	75.9	60.6	65.6	<99.8	<99.4	<99.7	-
	100	20	76.1	59.3	59.0	<99.8	<99.4	<99.7	-
		30	74.0	59.4	58.8	<99.8	<99.4	<99.7	-
		40	74.5	57.9	63.0	<99.8	<99.4	<99.7	-
	200	20	73.2	59.1	61.7	<99.8	<99.4	<99.7	-
		30	75.7	58.6	60.1	<99.8	<99.4	<99.7	-
		40	76.4	57.2	63.8	<99.8	<99.4	<99.7	-
	500	20	75.6	56.0	60.1	<99.8	<99.4	<99.7	-
		30	77.2	60.3	58.1	<99.8	99.2	<99.7	-
		40	77.5	58.4	65.6	<99.8	99.4	<99.7	-
	1,000	20	78.0	57.7	69.7	<99.8	99.7	99.7	-
		30	77.0	57.1	60.1	99.8	>99.9	99.8	99.9
		40	62.1	59.0	58.6	99.9	>99.9	>99.9	99.9
	1,250	20	68.6	56.8	61.8	>99.9	99.5	>99.9	99.8
		30	71.5	58.5	61.8	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9
		40	70.4	57.8	61.4	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9
	1,500	20	70.6	58.2	63.5	>99.9	99.5	>99.9	99.8
		30	70.2	57.7	64.3	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9
		40	65.4	48.5	59.1	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9
	2,000	20	63.1	57.8	60.9	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9
		30	65.6	57.7	60.6	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9
		40	57.7	48.8	49.6	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9

mg/L の濃度では 30 分以上, 1,500 mg/L の濃度では 30 分, 2,000 mg/L の濃度では 30 分以下であると判断された。

有効な消毒剤の検討 各種の消毒剤にワムシ単性生殖卵を浸漬した場合のふ化率と消毒率を表 2 に示した。

エタノール, イソプロピルアルコール, *n*-プロピルアルコールなどのアルコール類では 30, 50, 70%, フェノール 1, 3, 5%, クレゾール 1, 2, 3%, 塩化ベンザルコニウム 0.1% のそれぞれの濃度で 5, 10, 15 分間浸漬した

ところ, 30% のエタノールに 5 分浸漬した場合を除いて消毒効果は認められたが全ての試験区においてふ化率が低下もしくは 0% であった。

次亜塩素酸ナトリウムでは, 0.001 ~ 10.0% の濃度と 10 ~ 30 分の浸漬時間で検討した。その結果, 0.001% の濃度で 10 ~ 20 分浸漬すると 5 ~ 31% のふ化率が得られたものの, 消毒効果は認められなかった。一方 0.1% の濃度に 30 分以上浸漬した場合には消毒効果が認められたが, ふ化率は 0% であった。

表 2-1. 各種消毒剤のシオミズツボワムシ複相単性生殖卵に及ぼす影響

消毒剤	濃度 (%)	浸漬時間 (分)	ふ化率 (%)			消毒率 (%)		
			1 回目	2 回目	3 回目	1 回目	2 回目	3 回目
対照区			73.6	57.1	62.7			
エタノール	30	5	0	0	0	<99.9	-	-
		10	0	0	0	-	-	-
		15	0	0	0	-	-	-
	50	5	0	0	0	>99.9	-	-
		10	0	0	0	-	-	-
		15	0	0	0	-	-	-
	70	5	0	0	0	>99.9	-	-
		10	0	0	0	-	-	-
		15	0	0	0	-	-	-
イソプロピルアルコール	30	5	0	0	0	>99.9	-	-
		10	0	0	0	-	-	-
		15	0	0	0	-	-	-
	50	5	0	0	0	>99.9	-	-
		10	0	0	0	-	-	-
		15	0	0	0	-	-	-
	70	5	0	0	0	>99.9	-	-
		10	0	0	0	-	-	-
		15	0	0	0	-	-	-
<i>n</i> -プロピルアルコール	30	5	0	0	0	>99.9	-	-
		10	0	0	0	-	-	-
		15	0	0	0	-	-	-
	50	5	0	0	0	>99.9	-	-
		10	0	0	0	-	-	-
		15	0	0	0	-	-	-
	70	5	0	0	0	>99.9	-	-
		10	0	0	0	-	-	-
		15	0	0	0	-	-	-
フェノール	1	5	0	0	0	99.7	-	-
		10	0	0	0	-	-	-
		15	0	0	0	-	-	-
	3	5	0	0	0	>99.9	-	-
		10	0	0	0	-	-	-
		15	0	0	0	-	-	-
	5	5	0	0	0	>99.9	-	-
		10	0	0	0	-	-	-
		15	0	0	0	-	-	-
クレゾール	1	5	0	0	0	>99.9	-	-
		10	0	0	0	-	-	-
		15	0	0	0	-	-	-
	3	5	0	0	0	>99.9	-	-
		10	0	0	0	-	-	-
		15	0	0	0	-	-	-
	5	5	0	0	0	>99.9	-	-
		10	0	0	0	-	-	-
		15	0	0	0	-	-	-

表 2-2. 各種消毒剤のシオミズツボウムシ複相単性生殖卵に及ぼす影響

消毒剤	濃度 (%)	浸漬時間 (分)	ふ化率 (%)			消毒率 (%)		
			1 回目	2 回目	3 回目	1 回目	2 回目	3 回目
塩化ベンザルコニウム	0.1	5	0	0	0	99.9	-	-
		10	0	0	0	-	-	-
		15	0	0	0	-	-	-
次亜塩素酸ナトリウム	0.001	10	11.2	31.0	21.4	<99.9	<99.9	<99.9
		20	4.7	17.2	7.9	<99.9	<99.9	<99.9
	0.002	10	9.6	-	-	<99.9	-	-
		20	3.6	-	-	<99.9	-	-
	0.005	10	3.8	-	-	<99.9	-	-
		20	1.1	-	-	<99.9	-	-
	0.01	10	0	-	-	<99.9	-	-
		15	0	-	-	<99.9	-	-
		20	0	-	-	<99.9	-	-
	0.02	30	0	-	-	<99.9	-	-
		10	0	-	-	<99.9	-	-
		15	0	-	-	<99.9	-	-
		20	0	-	-	<99.9	-	-
	0.05	30	0	-	-	<99.9	-	-
		15	0	-	-	<99.9	-	-
		30	0	-	-	<99.9	-	-
	0.1	15	0	-	-	<99.9	-	-
		30	0	-	-	99.9	-	-
	0.2	15	0	-	-	<99.9	-	-
		30	0	-	-	>99.9	-	-
	0.5	15	0	-	-	99.9	-	-
		30	0	-	-	>99.9	-	-
	1.0	15	0	-	-	>99.9	-	-
		30	0	-	-	>99.9	-	-
	2.0	15	0	-	-	>99.9	-	-
		30	0	-	-	>99.9	-	-
	5.0	15	0	-	-	>99.9	-	-
		30	0	-	-	>99.9	-	-
	10.0	15	0	-	-	>99.9	-	-
		30	0	-	-	>99.9	-	-
ホルマリン	0.1	10	32.7	34.9	36.8	<99.9	<99.9	<99.9
		20	28.6	23.2	17.6	<99.9	<99.9	<99.9
	0.2	10	21.6	16.0	14.2	<99.9	<99.9	<99.9
		20	17.7	11.8	8.4	<99.9	<99.9	<99.9
	0.5	10	11.9	-	-	-	-	-
		20	6.2	-	-	-	-	-
	1.0	10	2.5	-	-	-	-	-
		20	10.3	0.9	-	-	-	-
		40	7.2	-	-	-	-	-
	3.0	20	1.9	-	-	-	-	-
		40	5.6	-	-	-	-	-
	5.0	20	1.7	-	-	-	-	-
		40	7.1	-	-	-	-	-

ホルマリンでは 0.1 ～ 5.0% の濃度に 10 ～ 40 分浸漬した。その結果、0.2% 以下の濃度で 20 分以下浸漬した場合には 8 ～ 37% のふ化率が得られたものの、消毒効果は認められなかった。0.5% 以上の濃度では、ふ化率が 12% 以下と低く実用性はないと考えられたため消毒効果を検討しなかった。

ホルマリンはホルムアルデヒドを 35 ～ 38% 程度含む水溶液である。ホルマリン 0.1% はホルムアルデヒド 350 mg/L 程度に相当する。同じアルデヒド類であるグ

ルタルアルデヒドでは、本試験で示したように 20 分以下の浸漬では 2,000 mg/L 以下の濃度でふ化に影響を及ぼさないことが確認されている。グルタルアルデヒドの殺菌作用は分子中のアルデヒド基が細菌表面や内部のタンパクを凝固させるとともに酵素を失活させることによるとされている³⁾。ホルムアルデヒドも同じアルデヒド基が殺菌作用をもたらすと考えられるが、ワムシ単性生殖卵に対する安全性の違いを明らかとすることについては、今後の課題である。

また、今回の試験条件下において、エタノール、イソプロピルアルコール、*n*-プロピルアルコール、次亜塩素酸ナトリウム、フェノール、クレゾール、塩化ベンザルコニウム、ホルマリンは、消毒率や消毒後のふ化率からワムシ単性生殖卵の消毒剤として不適であると考えられた。

まとめ 以上の結果と、別報¹⁾の結果を併せて整理する。オゾン処理海水、電解海水、pH、ヨウ素、過酸化水素水、Triton-X、エタノール、イソプロピルアルコール、*n*-プロピルアルコール、次亜塩素酸ナトリウム、フェノール、クレゾール、塩化ベンザルコニウム、ホルマリン、グルタルアルデヒドの15種類の消毒剤がワムシ単性生殖卵の消毒に及ぼす影響を検討したところ、グルタルアルデヒドのみがワムシ単性生殖卵の消毒に効果があり、ふ化に影響を及ぼさないことがわかった。消毒を行うにあたっては、消毒剤の使用量は少ないことが望ましい。もっとも薄く、短時間でワムシ単性生殖卵を有効に消毒できる条件はグルタルアルデヒド1,000 mg/Lの濃度に30分浸漬することであり、今後はこの条件により消毒することを推奨する。

一方我々は、消毒したワムシ単性生殖卵が数日間消毒効果を維持したまま保存でき、その後の増殖に影響を及ぼさないため、日本全国に病原体による汚染の可能性の少ない元種として供給できる可能性があることを示し

た⁴⁾。また、消毒したワムシ単性生殖卵を元種とし、特定の細菌を添加してワムシ培養を行うと添加した細菌がワムシ細菌叢の主要な部分を占め、さらにはそのワムシを摂餌した仔魚の腸管内細菌叢の主要な部分も占めることができるため、菌種を選択することにより魚介類の種苗生産におけるワムシ給餌期の疾病を防除できる可能性があること⁵⁾を報告した。今後、これらの技術をさらに発展させ積極的な魚介類種苗生産における防疫対策技術を検討していく必要があると考える。

文 献

- 1) 渡辺研一、篠崎大祐、小磯雅彦、桑田 博、吉水 守 (2005) シオミズツボワムシ複相単性生殖卵の消毒. 日本水産学会誌, **71**, 294-298.
- 2) 小磯雅彦、日野明徳 (2002) 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, **50**, 197-204.
- 3) 都築正和監修 (1998) 殺菌・消毒マニュアル. 医歯薬出版, 東京, 7-9.
- 4) 小磯雅彦、手塚信弘、桑田 博、渡辺研一 (2006) 消毒したシオミズツボワムシ複相単性生殖卵の短期冷蔵保存. 日本水産学会誌, **72**, 239-240.
- 5) 清水智子、篠崎大祐、笠井久会、澤辺智雄、渡辺研一、吉水 守 (2005) 細菌叢を制御したシオミズツボワムシを給餌したヒラメの腸内細菌叢. 水産増殖, **53**, 275-278.