

億単位のワムシ複相単性生殖卵の消毒法

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2025-06-25 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小磯, 雅彦, 手塚, 信弘, 友田, 努, 榮, 健次 メールアドレス: 所属:
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2014812

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



億単位のワムシ複相単性生殖卵の消毒法

小磯雅彦・手塚信弘・友田 努・榮 健次
(能登島栽培漁業センター)

大量培養されたワムシは、 $10^6 \sim 10^8$ CFU/g の大量の細菌を保有していることが知られている¹⁻³⁾。これらの細菌の中にはワムシに増殖不良を引き起こすもの⁴⁾や、飼育仔魚に細菌性疾病を発生させる可能性があるもの⁵⁻⁸⁾が存在するため、ワムシの生菌数を減らす技術は、ワムシ培養や仔魚飼育において防疫上重要である。渡辺らが開発したグルタルアルデヒドによるワムシ複相単性生殖卵（以下、卵）の消毒法^{9,10)}は、ふ化率が66～96%とやや低下するものの、細菌の消毒率〔消毒率 = $\{1 - (\text{消毒後の生菌数} \div \text{消毒前の生菌数})\} \times 100$ 〕が99.99%以上と高く、効果的な消毒法であると考えられる。

しかし、この消毒法を用いて億単位のワムシ卵を処理すると、消毒前後の生菌数は 10^8 CFU/g から 10^6 CFU/g にとどまり、その消毒率が99%と低かった。この理由の1つには、渡辺らの方法では処理したワムシ卵量が約1 g（約百万粒）と少なく^{9,10)}、億単位のワムシ卵の処理では卵量が多いこと、卵の分離精度の低下によって卵以外の有機物量が多くなるため、消毒効果が減少したと推察される。

このため、億単位のワムシ卵を効果的に消毒するために、卵の分離回収法と消毒法について再検討した。

材 料 と 方 法

供試ワムシ 実験には、能登島栽培漁業センターの25kℓ水槽を用いて、水温18℃、塩分26psuの希釈海水（以下、希釈海水）で粗放連続培養法により培養（日間増殖率：30%）したL型ワムシ小浜株（携卵個体の背甲長： $238 \pm 15 \mu\text{m}$ ）の個体群を用いた。

ワムシ卵の分離回収法 ワムシ卵量が約1 g（約百万粒）の処理方法^{9,10)}は、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て収穫した後、ワムシ濃縮液をトレイ（ $44 \times 32 \times 7 \text{ cm}$ ）数個に移し、約5分間放置して卵がトレイ底に沈下してから上澄み液をワムシごと廃棄し、新たな希釈海水を加えて上澄み液を廃棄する作業を数回繰り返し、沈下した卵のみを回収する方法である。一方、億単位のワムシ卵の分離回収には、総卵率によって多少異なるものの約10億個体前後のワムシ数を必要とする。この大量のワムシを処理するためには、従来用いているトレイでは容量が小さく作業性が悪いため、大型容器（ 142

$\times 67 \times 35 \text{ cm}$ ）での卵の分離回収法を検討した。

大型容器を用いた分離回収の手順は以下の方法で行った。

- ① ワムシ虫体からの卵の分離は、ワムシ虫体から卵を強制的に離すために海水ポンプ（ポンディ SK-62510；工進）での収穫によって行う。
- ② 収穫後に約20 ℓ量に調整したワムシ濃縮液を大型容器に移し入れる（濃縮液の水深は約3 cm）。
- ③ 卵を容器底に沈下させるために10分間放置してから、海水ポンプで大型容器内に毎分5 ℓ量の希釈海水を注水して、オーバーフローで希釈海水ごと表層のワムシ虫体を流す（図1）。
- ④ 大型容器内の希釈海水がほぼ透明となり、沈下した卵（一部ワムシ虫体を含む）が確認できるようになった段階で大型容器を傾けて沈下した卵を流してワムシネットで回収する。

億単位のワムシ卵の分離回収 海水ポンプの収穫によってワムシ虫体から卵を離した12.58～15.32億個体のワムシ個体群を用いて、4回の分離回収実験を行った（表1）。各個体群の総卵率は36.0～48.2%であり、この値から各個体群の卵数は4.98～6.21億粒と計算された（表1）。大型容器による分離回収作業が終了した時点で、回収したワムシ卵数と混在しているワムシ虫数を計数して、以下の式で卵の回収率（%）とワムシ虫体の混在率（%）を求めた。

$$\text{卵の回収率 (\%)} = (\text{分離回収後の卵数}) / (\text{分離回収前の卵数}) \times 100$$

$$\text{ワムシ虫体の混在率 (\%)} = (\text{分離回収後のワムシ虫体数}) / \{(\text{分離回収後のワムシ虫体数}) + (\text{分離回収後の卵数})\} \times 100$$

ワムシ卵の消毒法と消毒処理法 渡辺ら^{9,10)}は、回収した卵をグルタルアルデヒド（水産用グルタール；川崎三鷹製薬）濃度1,250mg/ℓの消毒液1 ℓに収容し、30分間ゆっくり攪拌して消毒処理した。億単位のワムシ卵の処理では、処理するワムシ卵量が多いことに加え、卵の分離精度の低下によって卵以外の有機物量が多くなるため、消毒効果が減少すると推察されたため、処理中の消毒液の交換について検討した。

2回次で回収した1.70億粒のワムシ卵を用い、渡辺ら^{9,10)}に準じグルタルアルデヒド濃度1,250mg/ℓの5 ℓの消毒液（26psu 海水の滅菌海水を使用）の中

に、卵を収容（消毒処理の卵密度：3.4万個／ml）し、ゆっくり攪拌して30分間処理したもの（消毒1回区）と、消毒開始15分後に消毒1回区から1.5ℓを取り出し、ワムシネットですり過した卵を新たな消毒液1.5ℓに移し入れて合計30分間処理したもの（消毒2回区）および消毒開始10分後に消毒1回区から1.5ℓを取り出し、ワムシネットですり過した卵を新たな消毒液1.5ℓに移し入れ、さらに10分後（合計20分後）に新たな消毒液に卵のみを移し替えて合計30分間処理したもの（消毒3回区）の3通りで行った（図2）。

細菌調査は、消毒前と消毒1回～3回区のワムシ卵をそれぞれ約0.1g秤量後、滅菌したHerbstの人工海水9倍量とともに磨砕して10倍希釈液列を作製してZoBell培地（海水1,000mlに、ペプトン5.0g、酵母エキス1.0g、FePO₄ 0.1g、寒天15.0gを添加）とTCBS培地（日水製薬）に塗抹し、25℃の恒温器内で48時間培養して、出現したコロニー数から生菌数を算出した。ふ化率の調査には、6穴のマイクロプレートを用い、各区とも1穴当たり卵約200個ずつを水温20℃の滅菌希釈海水5mlとともに収容し、20℃に調温した恒温器内に静置して48時間後の卵数とふ化ワムシ数を計数し、以下の式でふ化率（％）を求めた。

$$\text{ふ化率}(\%) = (\text{ふ化ワムシ数}) / \{(\text{卵数}) + (\text{ふ化ワムシ数})\} \times 100$$

ふ化率の差の検定は一元配置分散分析で検定し、有意差が認められた場合には多重比較検定（Tukey-Kramer法）で平均値の違い（有意水準5％）を求めた。

結 果

億単位のワムシ卵の分離回収 卵の分離回収実験の結果を表1に示した。回収された卵数は1.70～2.04億粒と億単位のワムシ卵が得られ、その回収率は平均32.7％（31.7～34.1％）であった。なお、回収した卵の中のワムシ虫体の混在率は平均10.6％（6.3～17.1％）であった。

億単位のワムシ卵の消毒処理実験 各区のワムシ卵の生菌数とふ化率を表2に示した。生菌数は、消毒前のZoBell培地が 4.2×10^7 CFU/g、TCBS培地が 1.2×10^5 CFU/gに対して、消毒1回区ではZoBell培地、TCBS培地ともに1/100に減少し、消毒2回区ではZoBell培地が1/10,000、TCBS培地が1/100,000と大幅に減少し、消毒3回区ではZoBell培地が

表1 大型容器を用いたワムシ卵の分離回収結果の概要

回次	分離回収前			分離回収後			
	ワムシ数 (億個体)	卵数 (億粒)	総卵率 (%)	ワムシ数 (億個体)	卵数 (億粒)	卵の ^{*1} 回収率(%)	ワムシ虫体の ^{*2} 混在率(%)
1	12.58	6.06	48.2	0.13	1.92	31.7	6.3
2	13.85	4.98	36.0	0.35	1.70	34.1	17.1
3	14.10	6.16	43.7	0.18	2.04	33.1	8.1
4	15.32	6.21	40.5	0.24	1.99	32.0	10.8
平均						32.7	10.6

^{*1} 卵の回収率＝（分離回収後の卵数）／（分離回収前の卵数）×100

^{*2} ワムシ虫体の混在率＝（分離回収後のワムシ虫体数）／{（分離回収後のワムシ虫体数）＋（分離回収後の卵数）}×100

表2 異なる消毒処理法でのワムシ卵の生菌数とふ化率

	生菌数(CFU/g)		ふ化率 (%)
	ZoBell培地	TCBS培地	
消毒前	4.2×10^7	1.2×10^5	99.6±0.2 ^a
消毒1回	8.5×10^5	1.3×10^3	94.8±2.2 ^b
消毒2回	8.1×10^3	0	93.6±1.0 ^b
消毒3回	5.5×10	0	93.3±2.5 ^b

ふ化率は、水温20℃、塩分26psuの条件で48時間後に調べた。上付文字が異なる場合、有意差あり（Tukey-Kramer法、 $a > b, p < 0.05, n=6$ ）

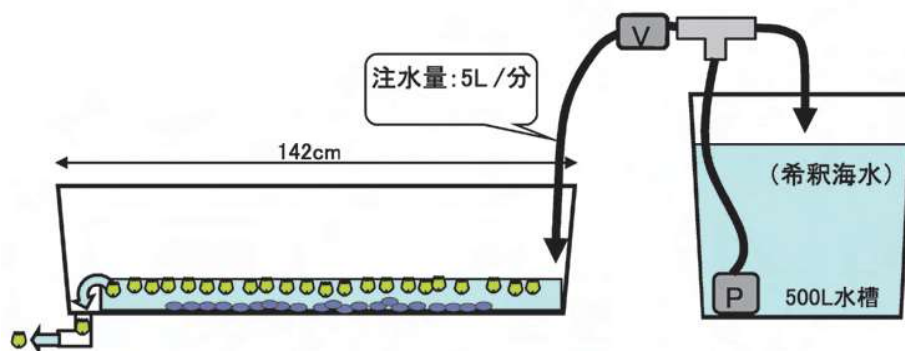


図1 億単位のワムシ卵の分離回収法の模式図

P：海水ポンプ，V：バルブ

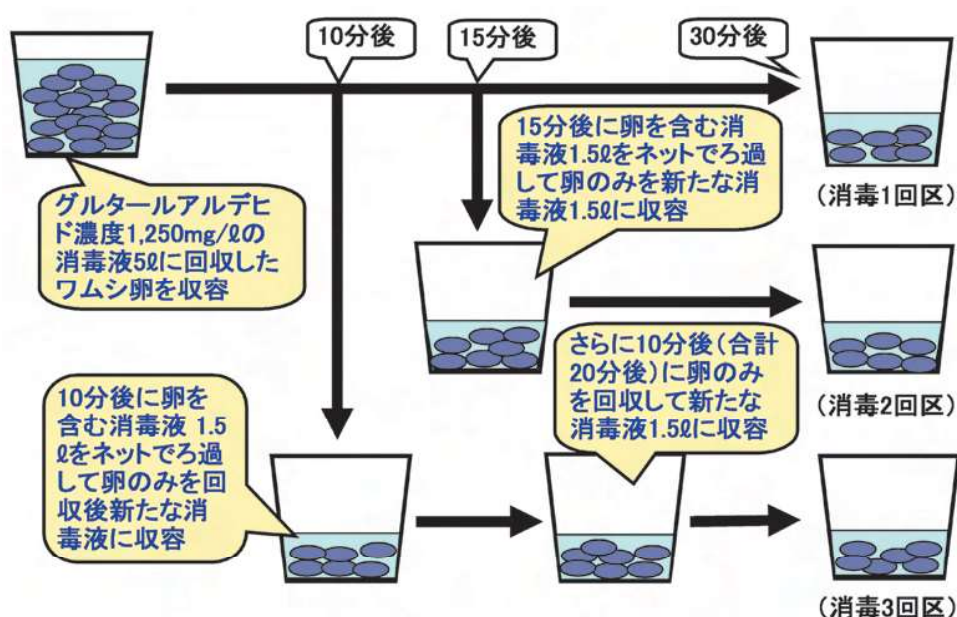


図2 億単位のワムシ卵の消毒処理実験

1/1,000,000，TCBS 培地が 1/100,000まで減少した。ふ化率は，消毒前の99.6%に対して，消毒1回～3回区が93.3～94.8%と有意に低下したものの（各 $p < 0.05$ ），消毒回数による違いは認められなかった。

考 察

本研究では，億単位のワムシ卵の分離回収法と消毒法を検討したところ，分離回収法では，大型容器を用いたワムシ卵の分離回収法により約3割の回収率で億単位のワムシ卵が得られた。消毒処理法では，グルタールアルデヒド濃度1,250mg/ℓの消毒液を用いて，

10分間隔で3回処理する（合計30分間）ことで，消毒率がZoBell培地では99.9999%，TCBS培地では99.999%といずれも大幅に高く，さらに処理した卵のふ化率が90%以上あることがわかった。従来法の消毒1回区では，本研究でも消毒率が99%と低いことから，億単位のワムシ卵を消毒処理する場合には，従来法では十分な消毒効果が得られないことが再確認できた。なお，分離回収の際に，流れ出たワムシ虫体は，一部，衰弱・死亡している個体が認められるものの，多くはワムシネットで回収して再利用できた。今後の課題としては，ワムシ収穫から分離回収を経て消毒するまでの作業工程に約3時間を要することから，

作業性の改善とともに卵の回収率を高め、ワムシ虫体の混在率を低下させる工夫が必要である。

ワムシの消毒卵は、消毒効果を維持したまま3日程度冷蔵保存することができ、ふ化率やその後の増殖にもほとんど影響がない¹¹⁾ことが報告されている。今回、億単位のワムシ卵の分離回収法と消毒法が把握されたことで、高密度輸送法¹²⁾を利用して生菌数が極めて少ない防疫面に配慮したワムシ消毒卵を億単位で日本全国に供給できる可能性が示された。また、消毒卵を利用した“ほっとけ飼育”¹³⁾の技術が開発できれば、ワムシ培養由来の原生動物や細菌の影響をほとんど受けない防疫的に優れた飼育手法が開発される可能性が高いと考えられる。

文 献

- 1) 宮川宗記・室賀清邦 (1988) シオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* 細菌叢. 水産増殖, **35**, 237-243.
- 2) 岡 彬 (1989) 細菌. 「初期餌料生物－シオミズツボワムシ」(福所邦彦・平山和次編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 34-36.
- 3) 日野明德 (1989) 細菌による制御. 「初期餌料生物－シオミズツボワムシ」(福所邦彦・平山和次編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 205-208.
- 4) Yu, J. P., A. Hino, T. Noguchi, and H. Wakabayashi (1990) Toxicity of *Vibrio alginolyticus* on the survival of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 1455-1460.
- 5) 田谷全康・室賀清邦・杉山瑛之・平本義春 (1985) 種苗生産過程の仔稚アユからの *Vibrio anguillarum* の検出. 水産増殖, **33**, 59-66.
- 6) 楠田理一・横山 淳・川合研児 (1986) 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, **52**, 1745-1751.
- 7) 安信秀樹・室賀清邦・丸山敬悟 (1988) マダイ仔魚の腹部膨満症に関する細菌学的検討. 水産増殖, **36**, 11-20.
- 8) 増村和彦・安信秀樹・岡田直子・室賀清邦 (1989) 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, **24**, 135-141.
- 9) 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. 日水試, **71**, 294-298.
- 10) 渡辺研一・小磯雅彦 (2006) 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. 栽培技研, **34**, 67-71.
- 11) 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. 日水試, **72**, 239-240.
- 12) 小磯雅彦・島 康洋・桑田 博 (2007) シオミズツボワムシの高密度輸送試験の実施状況 (2001～2005年). 栽培漁業センター技報, **6**, 37-40.
- 13) 高橋庸一 (1998) ヒラメの種苗生産マニュアル「ほっとけ飼育」による飼育方法－. 栽培漁業技術シリーズ No.4. (社)日本栽培漁業協会.