

養魚用水殺菌の検討

水産技術センター

土田 奈々・三浦 正之・三井 潔

Investigation of Disinfection of Hatchery Water

Fish Technology Center

Nana TSUCHIDA, Masayuki MIURA and Kiyoshi MITSUI

要 約

無電極放電プラズマ光による水殺菌処理装置（以下「プラズマ光殺菌装置」という）の殺菌性能について基礎的知見を得る目的で、水カビ病に対する予防効果及び各種魚病細菌に対する殺菌効果を検討した。水カビ病原菌*Saprolegnia diclina*に対しては、20mL/s以下の流量で遊走子の発芽が抑制された。しかし、サケ科魚類卵に対する水カビ防除効果を検討したところ、15mL/sの処理流量では卵の水カビ発生は予防できなかった。魚病細菌に対しては、せつそう病の病原菌*Aeromonas salmonicida*（以下「*A. salmonicida*」という）、ビブリオ病の原因菌*Vibrio ordalii*（以下「*V. ordalii*」という）及び*Flavobacterium psychrophilum*（以下「*F. psychrophilum*」という）について殺菌効果を検討した。各細菌とも約 10^6 cfu/mLの懸濁液において、80mL/s以下の流量で100%の殺菌効果が得られたが、実用化には大量の用水を処理できる装置の開発が大きな課題と考えられた。

Abstract

Effect of preservation of aquatic fungi and disinfection of some fish-pathogenic bacterium diseases by electrodeless discharge plasma emission were investigated. Germination of zoospore of *Saprolegnia diclina* was inhibited by treatment of less than 20mL/s flow rate. But, fungi infection of salmon eggs was not prevented by treatment of 15mL/s flow rate. Suspension of *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio ordalii* and *Flavobacterium psychrophilum* at the level 10^6 cfu/mL was sterilized by treatment of less than 80mL/s flow rate. It was considered essential that the problem to practical use was development of device that can sterilize more volumes of water.

1. 緒 言

近年、水産養殖においては、食の安全・安心に対する消費者の意識が高まってきており、薬剤の使用による病気の治療よりも、発生予防に重点を置いた薬剤に頼らない養殖技術が求められている。疾病の発生予防には、第一に病原菌に汚染されていない用水を使用することが基本となる。養魚用水の殺菌法としては、紫外線殺菌を用いた手法が各種魚類病原菌において検討されており^{1), 2), 3), 4)}、現在は広く普及している。しかし、ランプの交換などのメンテナンスが必要なため、より安価で効率的な殺菌手法が求められている。そこで本試験では、新たな殺菌システムとして各分野での応用が期待されているプラズマ光殺菌装置を用いて、マス類養殖において対策が急務となっている水カビ病に対する予防効果及びマス類に発生する主要な魚病細菌の殺菌効果について検討を行った。

2. 実験方法

2-1 水カビ病原菌に対する殺菌効果

供試菌は*Saprolegnia diclina* NJM0246を用いた。供試菌はGY寒天培地⁵⁾で15℃、5日間培養した後、菌株の集落を約8mm角に切り取り、GY液体培地に接種して2日間20℃で培養し、菌糸体を増殖させた。その後、菌糸体のみを寒天ブロックから切り取り、滅菌蒸留水で洗浄後、滅菌淡水中で1日静置して遊走子を産生させた。培養液中の遊走子数をNeubauer式血球計算板(IRIKA KOGYO)を用いて計測したところ、遊走子数は 2.5×10^3 個/mLであり、これを遊走子浮遊液として試験に用いた。

プラズマ光殺菌装置は内径12mm、全長500mmのU字管を2本クロスさせたU字管クロス構造の装置（以下「U字管殺菌装置」という）を使用した。使用時の条件は出力450W、真空度130paに設定し、作成した遊走子浮遊

液1Lを流量及び通過回数を変えてプラズマ光殺菌装置内を通過させ、照射処理を行った。通過回数は1回及び2回、通過流量は20mL/s及び40mL/sとした。2回通過させる場合は滅菌ガラス容器で通過した遊走子浮遊液を受け、再度装置を通過させ照射処理を施した。照射処理後は、水温の測定を行った。装置通過後の遊走子浮遊液は各試験区29mLを滅菌プラスチックシャーレに移し、GY液体培地1mLを加え、20℃で3時間静置後、無作為に100個の遊走子を選び、発芽の有無を計数した。その後は24時間後に再度発芽状況を観察した。

2-2 サケ科魚類卵に対する水カビ防除効果

第1回試験

第1回試験はガラス製容器に供試卵を収容し、インキュベーター内で管理する方法で行った。供試卵は水産技術センター忍野支所で採卵したニジマス *Oncorhynchus mykiss* の卵を用いた。供試卵は媒精後2時間吸水させた後、各試験区の飼育水を満たした1Lの滅菌済みガラス製容器に500粒ずつを収容した。

試験区は飼育水の種類と薬浴方法の組み合わせにより、照射区、対照区、薬浴区、薬浴処理照射区、薬浴処理対照区の5区を設定した。照射区はU字管プラズマ光殺菌装置を出力450W、真空度130paの条件に設定し、流量15mL/sで通過させて照射処理を施した井戸水を用いた。対照区は無処理の井戸水を使用した。薬浴区はパイセス（ノバルティス）100ppmで30分間の薬浴を毎日行い、薬浴後に無処理の井戸水に換水した。また照射区及び対照区と同じ条件で、収容前にパイセス100ppmで30分間の薬浴を1回行う区を、それぞれ薬浴処理照射区及び薬浴処理対照区とした。

卵を収容した容器は12.5℃のインキュベーターに収容し、エアーストーンでエアレーションを行いながら管理した。インキュベーターに収容する期間は受精後から発眼するまでの16日間とし、飼育水は試験期間中、毎日換水を行った。採卵から16日目に卵を取り出し、供試卵中の発眼卵の数から発眼率を求めた。また、水カビの付着した卵数を計数し、供試卵に対する割合から水カビ付着率を求めた。

計数後の発眼卵は、試験区別にプラスチック製のザルに収容して、プラスチック製のバットに並べ、12.5℃の井戸水をかけ流して管理した。採卵から30日後に孵化尾数を計数し、孵化率を求めた。なお、孵化率は発眼卵中に占める孵化尾数の割合として算出した。

第2回試験

第2回試験はFRP製タテ型孵化槽（アース）を用いて飼育水をかけ流して卵の管理を行った。第1回試験と異なり、第2回試験では、プラズマ光殺菌装置は内径8mm、全長500mmのストレート管を6本並列に配置した構

造の装置（以下「ストレート多管殺菌装置」という）を使用した。

供試卵は水産技術センター忍野支所で採卵したスチールヘッド *Oncorhynchus mykiss* の卵を用いた。供試卵は第1回試験と同様に吸水した後、各試験区約800粒を木枠とトリカルネットで作成した小型の孵化盆（13cm×14cm×2.5cm）に収容し、100ppmパイセスで30分間の薬浴を行った。薬浴後の供試卵を入れた孵化盆はFRP製タテ型孵化槽の1区画に収容し、各試験区の飼育水を流量15mL/sでかけ流して管理した。

試験区は照射区、薬浴区及び対照区の3区を設定した。照射区はストレート多管殺菌装置を出力450W、真空度130paの条件で15mL/sで通過させた井戸水を飼育水として用いた。薬浴区はパイセス100ppmで30分間の薬浴を毎日行い、薬浴時以外は無処理の井戸水を使用した。対照区は無処理の井戸水のみを用いた。水温は各試験区とも12.5℃で管理した。

タテ型孵化槽に収容する期間は受精後から発眼までの16日間とし、16日目に卵を取り出し、第1回試験と同様に発眼率及び水カビ付着率を求めた。その後は第1回試験と同様に管理を行い、孵化率を算出した。

2-3 魚病細菌に対する殺菌効果

供試菌は2005年にヤマメ *Oncorhynchus masou masou* から分離した *A. salmonicida* OTH0509、2005年にニジマスから分離した *V. ordalii* OTH0515及び *F. psychrophilum* OTH0504を用いた。 *A. salmonicida* 及び *V. ordalii* はトリプトソーヤ寒天培地（ニッスイ）で20℃、48時間培養後、 *F. psychrophilum* は改変サイトファーガ寒天培地〔trypton (2g/L), yeast extract (0.5g/L), meat extract (0.2g/L), anhydrous sodium acetate (0.2g/L), bact agar (15g/L)〕で18℃、72時間培養後、実験に供した。培養した各供試菌は滅菌淡水に10⁶cfu/mL前後になるように懸濁させ供試菌液とした。

プラズマ光発生装置はストレート多管装置を出力450W、真空度130paの条件で稼働させ、流量を変えて供試菌液を通過させて照射処理を行った。通過流量は20mL/sから装置の処理上限である200mL/sまでとした。対照区はプラズマ光殺菌装置を稼働させずに装置内を同様の流量で通過させた。通過後の菌液は10倍量希釈系列を作成し、50μLを平板培地上に塗抹する方法で生菌数の測定を行った。

3. 結果

3-1 水カビ病原菌に対する殺菌効果

遊走子に対する発芽阻止効果を表1に示した。対照区が20mL/s及び40mL/sにおいてそれぞれ78~95%と高い発芽率を示したのに対して、水量40mL/sの1回通過

では68%と顕著な発芽抑制効果は現れなかったものの、2回通過では5%と高い抑制効果がみられた。20mL/sにおいては1回通過のみで5%と高い抑制効果が現れた。2回通過後の水温を測定したところ、照射区においては40mL/sで1.4℃、20mL/s1.0℃の水温上昇がみられた。また、24時間後に菌糸の状態を観察したところ、対照区では菌糸が繁茂していたのに対し、20mL/s1回通過及び2回通過では殆ど菌糸の伸長が確認されなかった。

表1 遊走子に対する発芽阻止効果

流量	通過回数	試験区	発芽率 (%)	処理後水温 (℃)
20mL/s	1 pass	照射区	5.0	20.7
		対照区	85.0	20.0
	2 pass	照射区	4.0	21.3
		対照区	95.0	20.2
40mL/s	1 pass	照射区	68.0	20.9
		対照区	78.0	20.5
	2 pass	照射区	5.0	21.7
		対照区	80.0	20.0
無処理			98.0	20.3

3-2 サケ科魚類卵に対する水カビ防除効果

第1回試験

ニジマス卵の発眼率、水カビ付着率及び孵化率を表2に示した。発眼率は30.0~49.8%と全体的に低めであったが、対照区が35.6%であったのに対して、毎日薬浴を行った薬浴区では49.8%と有意に高くなった (χ^2 検定, $p<0.01$)。その他の試験区では有意差はみられなかった (χ^2 検定, $p>0.05$)。水カビ付着率は対照区の13.8%と比較していずれの試験区も有意に低い結果となった (χ^2 検定, $p<0.01$)。孵化率は薬浴区の85.5%が対照区の69.7%に対して最も高い結果となった。

表2 ニジマス卵に対する水カビ防除効果

試験区	発眼率 (%)	水カビ付着率 (%)	孵化率 (%)
照射区	30.0	7.2**	84.7**
薬浴区	49.8**	0.0**	85.5
薬浴1回処理照射区	40.8	2.4**	74.0**
薬浴1回処理対照区	39.6	1.6**	89.9**
対照区	35.6	13.8	69.7

** : 対照区に対して有意な差が見られた区 (χ^2 検定, $p<0.01$)

第2回試験

スチールヘッド卵の発眼率、水カビ付着率及び孵化率を表3に示した。発眼率はいずれの区も対照区と比較

して有意な差はみられなかった (χ^2 検定, $p>0.05$)。水カビ付着率は薬浴区は0.0%であったのに対し、照射区は25.0%で対照区の27.6%と比較して有意差はみられなかった。孵化率は90.2~93.3%と各区で差はなかった。

表3 スチールヘッド卵に対する水カビ防除効果

試験区	発眼率 (%)	水カビ付着率 (%)	孵化率 (%)
照射区	64.5	25.6	90.2**
薬浴区	72.5	0.0**	93.3
対照区	69.1	27.6	92.0

** : 対照区に対して有意な差が見られた区 (χ^2 検定, $p<0.01$)

2-3 魚病細菌に対する殺菌効果

魚病細菌に対する殺菌効果を表4~5に示した。3種類の病原菌とも、40及び80mL/sの流水量において100%の殺菌効果が確認された。160mL/sの流水量では*A. salmonicida*, *V. ordalii*及び*F. psychrophilum*でそれぞれ、97.74%, 93.48%, 99.09%の殺菌率となった。

表4 魚病細菌に対する殺菌効果 (*A. salmonicida*)

流水量 (mL/s)	生菌数 (cfu/mL)		殺菌率 (%)
	対照区	照射区	
40	6.0×10 ⁶	0	100.0
80	5.9×10 ⁶	0	100.0
160	3.2×10 ⁶	7.2×10 ⁴	97.74
200	6.8×10 ⁶	1.4×10 ⁴	97.91

表5 魚病細菌に対する殺菌効果 (*V. ordalii*)

流水量 (mL/s)	生菌数 (cfu/mL)		殺菌率 (%)
	対照区	照射区	
40	1.3×10 ⁵	0	100.0
80	2.8×10 ⁴	0	100.0
160	4.9×10 ⁶	3.2×10 ⁵	93.48
200	2.3×10 ⁶	2.8×10 ⁴	98.75

表6 魚病細菌に対する殺菌効果 (*F. psychrophilum*)

流水量 (mL/s)	生菌数 (cfu/mL)		殺菌率 (%)
	対照区	照射区	
40	3.1×10 ⁶	0	100.0
80	5.3×10 ⁶	0	100.0
160	1.2×10 ⁶	2.9×10 ⁴	98.77
200	2.1×10 ⁶	3.7×10 ⁴	99.09

4. 考 察

本試験で用いたプラズマ光殺菌装置は紫外線を主とした波長の光を照射することにより、通過する用水の殺菌を行う装置である。試験2-1では、照射処理後に最大1.7℃の水温上昇がみられたが、遊走子の発芽に影響を与えない範囲の温度であることから、本試験での遊走子の発芽阻止はプラズマ光照射によるものと考えられる。そのため、試験2-1の結果から20mL/s以下の流量でU字管殺菌装置を通過させれば、用水中の水カビ遊走子は殺菌が可能であり、また、ストレート多管殺菌装置についても構造上U字管殺菌装置よりも殺菌効果が高いことから、同様に遊走子の殺菌は可能であると推察された。

この結果に基づいて、サケ科魚類卵を用いた試験では遊走子の発芽阻止が確認された20mL/sよりもさらに流量を絞り、15mL/sの条件で実施した。しかし、第1回試験では対照区と比較して水カビ付着率が有意に低くなったものの、第2回試験では対照区とは有意差がなく、水カビ蔓延は防ぎきれない結果となった。

原因としては、用水以外からの水カビ侵入の可能性が考えられる。プラズマ光殺菌装置で照射処理を行うことにより用水中の遊走子は殺菌可能であっても収容前から卵に付着している水カビ菌糸や遊走子が殺菌されていないため、水カビの発生が阻止出来なかった可能性が高い。今回の試験では、その影響を考慮して卵の収容前にパイセスによる薬浴を行って収容した。パイセスは発眼期まで毎日薬浴を行うことにより水カビの発生を阻止する薬品であるが、1回の薬浴のみでは、卵表面や死卵内部に入り込んだ水カビの殺菌が不十分であった可能性が高い。

水殺菌により魚卵の水カビを抑制する手法については、紫外線殺菌装置や光触媒システムによる用水中の水カビ病原菌の殺菌によりその付着率の減少を示唆する報告³⁾⁶⁾もあるが、水カビの発生を大幅に抑制する効果は認められていない。理由としては、水自体に殺菌力がないため一度侵入してしまった水カビ病原菌を殺菌することができないことが挙げられる。そのため、孵化槽中の魚卵における水カビの繁殖は、卵の収容密度、換水率及び水カビの付着した卵の混入状況によって左右され、条件により効果が異なることが予測される。

また、本試験では孵化水槽の複数ある区画のうち1区画のみに卵を収容して試験を行ったが、一般の養魚場では下流の複数の区画にも卵を収容している場合が殆どである。そのため、上の段では水カビの発生が抑制されていても、下流の区画に行くに従って、死卵等から供給される遊走子の量が多くなり、水カビが蔓延する恐れも生じる。したがって、本装置を遊走子を殺菌できる流量で用いたとしても、卵管理条件も様々な養魚場で水カビの

防除手法として使用するのには難しいと考えられる。

魚病細菌に対する殺菌効果については、各細菌とも40mL/s及び80mL/sで100%の殺菌効果が得られたことから、80mL/s以下の流量でストレート多管殺菌装置を用いれば、用水中の3種の魚病細菌は殺菌可能である。

この結果から、プラズマ光殺菌装置が紫外線殺菌灯に変わる用水殺菌手法となりうるかについて検討を行った。魚病細菌に対する紫外線の感受性については木村ら¹⁾は紫外線殺菌装置を用いた試験を行い、*A. salmonicida*を含む5種の魚病原菌において $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^7$ cfu/mLの懸濁液を用いたところ流量約141mL/s、紫外線照射量 $22,300 \mu W \cdot sec/cm^2$ で99.99%以上の殺菌効果が認められたと報告がある。また、佐々木ら⁴⁾は15Wの殺菌灯を用いて水深10cmの*A. salmonicida*菌液に対して水面上20cmからの紫外線照射を行ったところ、止水中では105cfu/mLの菌液6Lに対して、10秒間の照射で、流水では103~104cfu/mLの菌液に対して、5,000mL/sまでの流量で100%の殺菌が可能であったと報告している。

本試験では装置内部での照射量が測定できなかったため、定量的な比較は困難である。しかし、現時点ではコスト及び殺菌効率の点において、本試験で用いたプラズマ光殺菌装置が紫外線殺菌装置よりも優れていると言えない。

本試験ではプラズマ光殺菌装置を用いることにより、病原菌フリーの用水を供給することは可能であることが明らかになった。しかしながら、大量の用水を必要とする養魚現場での実用化については安価で処理流量の高い装置の開発が大前提となる。また、養魚用水の殺菌については長期間に渡って常に一定以上の強さの光で殺菌を行うことが求められるため、長期間安定した波長の光を供給できる装置の開発が望まれる。

5. 結 言

無電極放電プラズマ光による水殺菌処理装置を用いて、水カビ病に対する予防効果及び各種魚病細菌に対する殺菌効果を検討した。

水カビ病に対する予防効果については、水カビ原因菌*Saprolegnia diclina*を用いた試験及びサケ科魚類卵を用いた試験を実施した。40mL/sにおける2回通過及び20mL/sにおける1回以上の通過で遊走子の発芽が抑制された。

サケ科魚類卵に対する水カビ防除効果を15mL/sの処理流量で検討したところ、止水で行った試験では対照に比べ有意に水カビ付着率が低くなったが、流水で行った試験では対照区との有意差はなく、魚卵の水カビの発生は予防できない結果となった。魚病細菌*Aeromonas salmonicida* *Vibrio ordalii*, *Flavobacterium*

*psychrophilum*について殺菌効果を検討した。各細菌とも約106cfu/mLの懸濁液において80mL/s以下の流量で100%の殺菌効果が得られた。

水カビ病の予防に関しては用水殺菌による完全な発生阻止が困難であることから、本装置の殺菌効率を上げたとしても、実用化は困難である。魚病細菌に対しては一定の効果が得られたものの、現時点では紫外線殺菌灯以上のコストと殺菌効果が望めない。本装置の養魚への応用については安価でメンテナンスの軽減を図った、処理流量の高い装置の開発が求められる。

参考文献

- 1) 木村喬久・吉水守・田島研一・絵面良男・坂井稔：日本水産学会誌，Vol.42, No.2, P.207-211 (1976)
- 2) 木村喬久・吉水守・田島研一・絵面良男：魚病研究，Vol.14, No.3, P.133-137 (1980)
- 3) 木村喬久・吉水守・阿刀田光紹：魚病研究，VOL.14, No.3, P.139-142 (1980)
- 4) 佐々木治雄・本西晃・武居薫：長野県水産試験場研究報告第2号，P.37-45 (1990)
- 5) 畑井喜司雄・江草周三：魚病研究，Vol.13, No.3, P.147-152 (1979)
- 6) 青島秀治：富士養鱒場だより，184号，P.1-3 (2005)