

Aeromonas salmonicida, Vibrio ordalii
に対する各種消毒剤の殺菌作用

中居 裕・森川 進¹⁾・鈴木雄策²⁾

宮崎統五³⁾・田原偉成⁴⁾・山本 聰⁴⁾

Bactericidal Activities of Four Disinfectants on
Aeromonas salmonicida and *Vibrio ordalii*

Yutaka NAKAI・Susumu MORIKAWA・Yusaku SUZUKI

Tougo MIYAZAKI・Hidesige TAHARA・Satosi YAMAMOTO

すでに魚病細菌に対する各種消毒剤の有効性についてはいくつか報告されており、それらは富山県水産試験場によってまとめられている³⁾。ところで、養殖場で化学的消毒の普及を推進する上で必要なものは、養殖場で使用される濃度で、さまざまな条件（例えば、消毒剤液温の低い冬季での使用、使用頻度による消毒剤の汚れの差など）により短時間感作させた時の知見である。しかしこれに該当する知見はほとんど見

当たらない。そこで、そのような知見を得るために、サケ科魚類の代表的病原細菌2種を用いて、養殖現場で常用されているイソプロピルアルコール、オスバン液「ダイゴ」、水産用イソジン液およびアンチホルミンの殺菌力を、その使用環境を想定した条件下で検討した。なお本研究の一部は、（社）日本水産資源保護協会委託事業「魚病対策技術開発研究（養殖サケ科魚類の防疫技術に関する研究）」として実施した。また

1) 現在 岐阜県農政部水産振興室

2) 静岡県水産試験場富士養鱒場

3) 富山県水産試験場 現在 富山県栽培漁業センター

4) 長野県水産試験場

その遂行は、静岡県水産試験場富士養鱈場、富山県水産試験場および長野県水産試験場と共同で行った。

材料および方法

1. 感作温度の相違による消毒剤の殺菌力への影響について

(1)供試菌株

供試菌株には、*Aeromonas salmonicida* (ATCC 14174株) と *Vibrio ordalii* (OS 8801株 岐阜県分離株) を用いた。*A. salmonicida* は普通寒天培地(日水)、また *V. ordalii* はブレインハートインヒュージョン寒天培地(日水)を用いて20°C、24時間培養した後に供試した。

(2)供試消毒剤および供試濃度

- a. イソプロピルアルコール [試薬特級 (99.5%以上) 和光純薬工業] 70%
- b. オスバン液「ダイゴ」 [塩化ベンザルコニウム10 (W/V) % 日本製薬製] 1%
- c. 水産用イソジン液 [有効ヨウ素10% 明治製薬製] 0.5%
- d. アンチホルミン [有効塩素5%以上 和光純薬工業製] 有効塩素600ppm

供試消毒剤 a および b については長野、富山の両県、c および d については静岡、岐阜の両県が担当した。

供試濃度は消毒剤感作菌液の濃度を示した。

供試消毒剤 a ~ c では原液に対する希釈率を示

しており、d については原液の有効塩素濃度をあらかじめオートリジン比色法¹⁾で測定した後、消毒剤感作菌液の有効塩素濃度が 600ppm になるように調整した。

(3)消毒剤効果判定法

佐古ら²⁾の方法に準じた。すなわち所定の濃度に希釈した消毒剤を 9 ml を試験管にとり、その液温を 0, 5, 10, 15 および 20°C にした。これらに滅菌生理食塩水に懸濁した供試細菌 ($1.0 \times 10^5 \sim 3.2 \times 10^7$ CFU/ml) を 1 ml 接種してよく混合し、30秒後の生残菌数を調べ殺菌力を評価した。消毒剤の希釈液は *A. salmonicida* では滅菌蒸留水、*V. ordalii* では滅菌生理食塩水を用いた。生菌数測定培地は *A. salmonicida* では 0.8% 寒天添加乾燥ブイヨン(日水)、*V. ordalii* では 0.8% 寒天添加ブレインハートインヒュージョン液体培地(日水)を用いた。生菌数の測定は混釀平板法を用い、次のように行った。消毒剤感作菌液を感作終了後すぐに 0.1 ml ずつを、生菌数測定用培地 20 ml と滅菌生理食塩水 9.9 ml におのおの加えた。生理食塩水はよく攪拌した後、0.1 ml および 1.0 ml を生菌数測定用培地に加えた。この操作により、供試菌液に対して $10^2 \sim 10^4$ の 3 段階希釈の生菌数を測定した。またその測定にあたっては、生菌数測定用培地に消毒剤が残存するため、あらかじめ供試菌の発育に影響を及ぼさない残存濃度を求め、生菌数測定用培地には消毒剤残存濃度がその 1/10 以下となるようにした。生残菌数の検出限界は第 1 表のとおりであった。

第1表 供試細菌2種の検出限界

供試菌	消毒剤	イソプロピルアルコール	オスバン液	イソジン液	アンチホルミン
<i>A. salmonicida</i>		10 ² (※)	10 ⁴	10 ²	10 ²
<i>V. ordalii</i>		10 ³	10 ⁴	10 ²	10 ²

※：単位 CFU/ml

2. 有機物混入による消毒剤の殺菌力への影響について

供試菌株、供試消毒剤および濃度は1と同じである。消毒剤効果判定法もほぼ同様である。相違点は消毒剤感作温度を15°Cとし、有機物を添加したことである。有機物は牛胎児血清（G IBCO社製 以下FBS）を用い、消毒剤感作菌液中の濃度として0（対照）、1および5%を設定し、水産用イソジン液は5分、その他3剤は2時間、15°Cで放置後、菌液を接種した。なお水産用イソジン液、アンチホルミンは遮光状態で実施した。

結果

1. 感作温度の相違による消毒剤の殺菌力への影響について

0～25°Cで、供試した4消毒剤すべてについて30秒後に供試菌は検出限界以下になった。

2. 有機物混入による消毒剤の殺菌力への影響について

1および5%のFBS添加でも、イソプロピルアルコールおよびオスバン液「ダイゴ」は30秒後に供試菌は検出限界以下になった。水産用イ

ソジン液およびアンチホルミンの結果を第2表に示した。

水産用イソジン液およびアンチホルミンではFBS添加による殺菌力低下が見られ、特に後者ではその影響が顕著で、*A. salmonicida*に対して5%添加で殺菌力が消失した例（岐阜）もあった。

考 察

魚病細菌に対して、感作温度の相違による消毒剤の殺菌力への影響については、供試4消毒剤の中ではイソプロピルアルコールを除く3剤について検討されており^{2), 4)}、その著しい影響をうけるものがオスバン液「ダイゴ」、影響が小さいものがアンチホルミン、水産用イソジン液とされている。しかし、この時の供試濃度は30～100倍と、本実験に比べてかなり低い。オスバン液「ダイゴ」を筆頭に、4消毒剤の常用濃度での殺菌力は低温下ではある程度低下していると思われるものの、常用濃度では低温下においても十分使用に耐えうると考えられる。したがって、供試4消毒剤を常用濃度で使用する場合、0～20°Cの範囲内では有効であるものと考えられる。

第2表 FBSの存在下での水産用イソジン液・アンチホルミンの殺菌力への影響
[水産用イソジン液]

供試菌 実験区	<i>A. salmonicida</i>		<i>V. ordalii</i>	
	岐阜	静岡	岐阜	静岡
対照区	1.0×10^6 (※)	2.8×10^7	3.2×10^6	2.4×10^6
FBS 1 %	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²
FBS 5 %	<10 ²	2.8×10^7	<10 ²	<10 ²

※：単位 CFU/ml

[アンチホルミン]

供試菌 実験区	<i>A. salmonicida</i>		<i>V. ordalii</i>	
	岐阜	静岡	岐阜	静岡
対照区	1.0×10^6 (※)	2.7×10^7	3.2×10^6	9.0×10^6
FBS 1 %	5.0×10^3	<10 ²	<10 ²	<10 ²
FBS 5 %	1.0×10^6	1.8×10^5	4.4×10^5	<10 ²

※：単位 CFU/ml

有機物混入による消毒剤の殺菌力への影響は、消毒剤によって実験結果が異なった。イソプロピルアルコールとオスパン液「ダイゴ」ではその影響は認められなかった。一方水産用イソジン液とアンチホルミンでは有機物混入による殺菌力への影響が顕著に認められた。水産用イソジン液ではFBS 1 %で生残菌数は検出限界以下であり、実用上十分な殺菌力を保持しているものと考えられた。しかしアンチホルミンではFBS 1 %でも生残菌が認められる例があり、有機物混入により殺菌力が極端に低下するものと考えられた。

有機物混入の影響については、これまでにイソプロピルアルコールを除く3剤について検討されており²⁾、有機物混入の影響が著しいものは水産用イソジン液とアンチホルミン、影響が

小さいものはオスパン液「ダイゴ」とされている。オスパン液「ダイゴ」の場合、常用濃度でFBS 5 %存在下での殺菌力はある程度低下していると思われるものの、その濃度ではFBS 5 %存在下においても十分使用に耐えうると考えられる。しかし、水産用イソジン液とアンチホルミンは、常用濃度においても有機物混入の影響が顕著に表れ、使用に際してその混入には十分な注意が必要であると考えられた。

なお富山県水産試験場らは*A. salmonicida*を用いて、オスパン液「ダイゴ」とアンチホルミンについて同様の実験を行っている⁴⁾。オスパン液「ダイゴ」については今回と同様の結果であったが、アンチホルミンについては、1 %の消毒剤濃度で、FBS 5 %存在下において生残菌数は検出限界以下であり、今回の結果と異なっ

ている。アンチホルミンは表示では「有効塩素5%以上」となっているが、製造元によれば、工場出荷時の有効塩素は12%前後としている。今回供試したアンチホルミンは購入時の測定では11.5%であったが、その数か月後の結果では6%に低下しており、未開封の同一ロットの品の有効塩素も同じ濃度であった。以上のことから、アンチホルミン1%溶液は製造直後では約1200ppm、その数か月後では約600ppmとなる。富山県水産試験場らの結果は、アンチホルミンの有効塩素濃度が12%に近い時期に供試したためと考えられる。アンチホルミンについては、上述のとおり有効成分の減少が激しく、その供試にあたっては必ずその測定を行う必要があるものと思われる。なお水産用イソジン液とアンチホルミンは、担当県により実験結果が異なった。その理由として、FBSが動物由来の蛋白質なのでロットにより蛋白量に差があることも考えられること、FBSが両消毒剤の有効成分を消費した結果、30秒で検出限界以下の生菌数となる有効濃度の最低限前後にまで低下し、供試菌数により結果が左右されたものと考えられる。その対策として、供試有機物には蛋白量の一定した物質を使用し、供試菌はできるだけ菌数および状態をそろえ、また有効成分の定量の可能なものは供試菌感作直前に濃度を測定しておくことが考えられる。

今回の実験の生残菌の検出限界は、オスバン液「ダイゴ」では両供試病原細菌とともに 10^4 CFU/mlであった。佐古ら²⁾の10CFU/mlとは著しい差がある。その理由は、比較的高濃度である

常用濃度としたためにどうしても生菌数測定用培地にかなりの量の消毒剤が混入するためと考えられる。実験精度の向上のため、検出限界の数値を下げなければならないが、オスバン液「ダイゴ」では、適当な中和剤も見あたらないので今回の実験手法ではこれ以上検出限界の数値を下げるることは困難であると思われる。その代わりに供試菌数をできるだけ多くする必要があるものと思われる。なお水産用イソジン液とアンチホルミンの検出限界は両供試病原細菌とともに 10^2 CFU/mlとなったが、これは生菌数測定用培地の培地成分が有効成分を消費したためと考えられる。

今回、供試4消毒剤の常用濃度の殺菌力を測定し、前述のとおりの結果を得たが、養殖現場での使用を考えるとき、調製直後からその劣化が始まっていると考え、それぞれの消毒剤の特性を十分に考慮してそれらの選択および更新を図っていかなければならない。しかしそれを判断するのに必要な知見は今回の結果だけでは不十分であり、その補充に努めなければならない。

要 約

1. *A. salmonicida*と*V. ordalii*を用いて、イソプロピルアルコール、オスバン液「ダイゴ」、水産用イソジン液およびアンチホルミンの4消毒剤の常用濃度での殺菌力を測定した。
2. 感作温度が0～20°Cでは4消毒剤ともすべて検出限界以下となり、この温度範囲内では

実用上十分な殺菌力を保持しているものと考えられた。

3. FBS 添加では、イソプロピルアルコール、オスバン液「ダイゴ」で 5 % 添加でも検出限界以下となったが、水産用イソジン液、アンチホルミンでは生残菌が認められ、これら両消毒剤の使用に際して、有機物混入には十分な注意が必要であると考えられた。

Vibrio anguillarum ならびに、*V. ordalii*に対する各種消毒剤の殺菌作用：魚病研究, 23 (4), 219-222.

- 3) 富山県水産試験場・長野県水産試験場・岐阜県水産試験場・静岡県水産試験場富士養鱒場, 1988 ; 消毒法のマニュアル化に関する研究：昭和62年度魚病対策技術開発研究成果報告書, 34-89.

文 献

- 1) 日本規格協会, 1986 ; 工場排水試験方法 JIS K 0102-1986, 東京, 200-210.
- 2) 佐古 浩・石田典子・前野幸男・反町 稔, 1988 ; *Aeromonas salmonicida*,

4) _____ • _____ • _____, 1989 ; 消毒法のマニュアル化に関する研究：昭和63年度魚病対策技術開発研究成果報告, 17-28.