

クマザサ抽出物の経口投与によるマダイ稚魚の抗病性向上

石丸克也¹・牧野壯一²・土田裕三³

Improvement of bacterial disease resistance of red seabream *Pagrus major* by oral administration of Kumazasa *Sasa veitchii* extract

Katsuya ISHIMARU¹, Soichi MAKINO² and Yuuzou TSUCHIDA³

In vitro antibacterial activity of Kumazasa *Sasa veitchii* extract (TWEBS GOLD) was examined against 5 strains of fish pathogenic bacteria. All strains tested were susceptible to the extract. The strains showed MICs of 2.5~10 mg/mL and MBCs of 5~40 mg/mL. The effects of the dietary intake of TWEBS GOLD on growth and bacterial disease resistance were investigated in juvenile red seabream *Pagrus major*. The fish (mean body weight 96.5 g) were fed dry pellets containing TWEBS GOLD as 0.1 and 1%. No significant effect of growth performance and survival rate were observed at 4 weeks. Then the fish was orally challenged with fish pathogenic bacteria, *Edwardsiella anguillarum*. The survival rate at 90 days post challenge was 70 to 85%, and no significant difference was observed among groups. However, significantly lower prevalence of the pathogen in survived fish was obtained in the group fed with a diet containing 1% of TWEBS GOLD. These results indicated that oral administration of TWEBS GOLD is presumed to activate the cellular immunity of red seabream.

Key words: Kumazasa, red seabream, *Edwardsiella anguillarum*, antibacterial activity, disease resistance

¹ 白浜実験場 (Shirahama Station, Aquaculture Research Institute, Kindai University, Shirahama, Wakayama 649-2211, Japan)

² 大阪成蹊短期大学 (Osaka Seikei College, Osaka, Osaka 533-0007, Japan).

³ 株式会社鳳凰堂 (Hououdou Co. Ltd., Shinagawa, Tokyo 142-0063, Japan).

クマザサ *Sasa veitchii* の葉や抽出物は生薬や健康食品としてヒトに利用されてきたが、近年サイトメガロウイルスに対する増殖抑制効果が確認され、治療薬への応用が進められている (Sasaki *et al.* 2008)。畜産・養鶏分野においても飼料添加物として検討が始まっている。魚類に対しては、キンギョのエロモナス人為感染に対する生存率向上が確認されているが(朝倉ら 投稿中)、水産分野における知見はほとんど無い。そこで本研究では、クマザサ抽出物として TWEBS GOLD を用いて海産魚類病原細菌に対する抗菌活性を確認すると共に、マダイ稚魚に経口投与して摂餌性と成長、および *Edwardsiella anguillarum* 人為感染に対する抗病性への影響を検討した。

材料および方法

クマザサ抽出物

クマザサ抽出物として TWEBS* GOLD (鳳凰堂) を使用した。本製品は、北海道天塩山系産のクマザサ乾燥粉碎物を185℃加圧蒸煮および120℃加圧熱水抽出し、濾過した液相抽出物を 50% Brix まで真空濃縮した後、110～130℃で流動殺菌して得られる。抽出効率を高めるため、一連の過程は専用装置 SSCC* により連続的に実施する。

供試菌株

海面養殖で問題となる魚類病原細菌として、グラム陰性菌 3 種 (*Edwardsiella anguillarum* 180801RS 株、*Vibrio alginolyticus* rM-8402 株、*Vibrio anguillarum* FY-8701 株) とグラム陽性菌 2 種 (*Lactococcus garvieae* 180803BT 株、*Streptococcus iniae* 180802RS 株)、標準菌株として *Eshirichia coli* K88 株と *Bacillus subtilis* ATCC 6633 株を抗菌力試験に使用した。

抗菌力の測定

TWEBS GOLD の最小発育阻止濃度 (MIC) と最小殺菌濃度 (MBC) を Clinical Laboratory Standards Institute (2008) に従い調べた。試験にはトリプトソイ寒天培地 (TSA、栄研化学) で 25℃、48 時間培養した菌体を用いた。液体培地として LB ブロスミラー (BD Difco) に終濃度 1% になるように NaCl を添加した培地 (LBN) を用いた。

まず TWEBS GOLD を蒸留水に溶解して、320mg/mL 溶液を調製した。この原液を蒸留水で 2 段階希釈し、3.13～160mg/mL の希釈列を調製した。また、TSA で培養した各菌株をエーゼで掻きとり、約 10⁶ CFU/mL になるように LBN に懸濁して以下の検査に用いた。

* TWEBS: 登録商標 第 4703561 号 (株式会社鳳凰堂)

* SSCC: 特許第 3212278 号、登録商標 第 5729864 号 (株式会社鳳凰堂)

クマザサ抽出物の経口投与によるマダイ稚魚の抗病性向上

調製した TWEBS GOLD 希釈液を 100 μ L ずつ 96 穴マイクロタイタープレートに分注した。各ウェルに上記の菌体懸濁液を 100 μ L ずつ接種し、25 $^{\circ}$ C で培養した。48 時間後、発育が認められなかった最低終濃度を MIC とした。同時に、各ウェルから 10 μ L を採取し、TSA 上に滴下して 25 $^{\circ}$ C で培養した。48 時間後、発育が確認されなかった最低終濃度を MBC とした。試験は 3 回繰り返し、結果は平均値で示した。

試験飼料

基礎飼料(タイハイカロリーRG P-4、日清丸紅飼料)に対して TWEBS GOLD を 0.1% および 1% 添加した飼料を以下のように調製した。TWEBS GOLD を蒸留水で 2 または 20% (w/w) に希釈し、基礎飼料に対して外割で 5% 添加した。完全に吸収させたのち、カルボキシメチルセルロース(CMC) 1% および蒸留水 5% を加え、飼料表面に均一に展着させた。TWEBS GOLD 希釈液の代わりに蒸留水を用いて同様に調製したものを対照飼料とした。

供試魚および飼育方法

供試魚として白浜実験場で生産したマダイ人工種苗当歳魚(平均体重 96.5g)を用いた。白浜実験場寒さ浦飼育棟に設置した 200L 容パンライト水槽 3 基に 20 尾ずつ収容し、TWEBS GOLD 0.1% 添加区、1% 添加区および対照区に 1 基ずつ割り当てた。2018 年 8 月 24 日～9 月 20 日の 4 週間を攻撃前投与期間とし、各試験飼料を 9 時および 16 時の 1 日 2 回、供試魚に手撒きで飽食給与した。飽食の判定に差が生じないように、期間中の給餌は全て専任の担当者 1 名が行った。換水率約 36 回転/日の流水で管理し、期間中の水温は 24.9~28.1 $^{\circ}$ C、溶存酸素濃度は 4.09~7.53mg/L であった。期間中、悪天候による飼育設備への影響が懸念された 2 日間は給餌を中止した。

飼育成績

試験飼料 4 週間投与の前後(8 月 23 日および 9 月 21 日)に体重と尾叉長を測定した。測定は約 200ppm の 2-フェノキシエタノール浸漬による麻酔下で行った。飽食摂餌量の記録と合わせて飼育成績を算出し、試験区間で比較した。

病原細菌による攻撃試験

9 月 21 日の測定と同時に、マダイ病原菌である *Edwardsiella anguillarum* 180801RS 株の経口投与による攻撃試験を開始した。前日の最終給餌から菌懸濁液投与開始まで約 18 時間の間隔を開けた。供試菌はブレインハートインヒュージョン(BHI)液体培地(日水製薬)で 30 $^{\circ}$ C、36 時間振盪培養した。培養菌体は PBS で 1 回遠心洗浄したのち、CMC を 0.5% 含む PBS に湿重量で 12.0mg/mL の濃度で懸濁した。菌懸濁液はフィーディングチューブ(Fr.8)を

取り付けた 5mL プラスチックシリンジに分注しておき、測定直後の麻酔状態にある供試魚の胃内に魚体重 10g あたり 0.1mL の比率で注入した。注入液量は 0.2mL 刻みのシリンジの目盛に従って調整した。希釈平板法によって算出した魚体重 1g あたりの接種生菌数は 6.1×10^7 cfu であった。

攻撃後の評価

攻撃の翌日から各試験飼料の飽食給与を再開し、攻撃前と同様に管理した。攻撃後の観察期間は 90 日とした。期間中の水温は 14.5~26.6°C (Fig. 1)、溶存酸素濃度は 5.6~10.3 mg/L であった。期間中は給餌の際に供試魚の状態を観察し、死亡個体があれば回収した。攻撃 90 日後の 12 月 20 日に生存個体を全て取り上げ、低温麻酔下で致死させた。

期間中の死亡個体および終了時の生存個体は外観および腹腔内を目視で観察した後、肝臓および腎臓から細菌の分離を試みた。死亡個体については各臓器 2カ所にステンレスエーゼ(ループ径 1mm)を挿入し、BHI 寒天培地および SS 寒天培地(いずれも日水製薬)に画線して 30°C で 3 日間培養した。致死させた生存個体は各臓器 2カ所の表面に先細ピンセットを刺し、開口部からポジティブディスプレイメント方式のピペット(マイクロマン M1000E、ギルソン)を穿刺して臓器中心部から試料を吸引採取した。肝臓は約 100mg の組織実質、腎臓は組織片を含む血液 50~200 μ L を採取した。試料は BHI 寒天培地および SS 寒天培地の表面にそれぞれ 5~10 μ L 程度付着させ、残りは 2mL の BHI 液体培地に注入した。30°C で 5 日間静置培養後、細菌の発育状況を観察した。寒天培地上に形成されたコロニーは、スライド凝集反応により *E. anguillarum* であるか確認した。

統計処理

飼育成績の各項目は JMP 8 (SAS Institute)を用いて Tukey-Kramer 法で検定した。攻撃試験後の生存率、非感染生存率および生存魚の保菌率は R version 3.5.2 (The R Foundation for Statistical Computing)を用いて Fisher の正確確率検定を行い、有意差が認められた場合は Bonferroni の方法で多重対比較した。Kaplan-Meier 法による生存時間関数の推定および Wilcoxon 検定は JMP 8 で行った。有意水準はいずれも 5%とした。

結果

抗菌力

海産魚の病原細菌 5 種に対する TWEBS GOLD の抗菌力を液体希釈法により調べた結果、供試菌全てに対して抗菌力を有していた (Table 1)。MIC は 2.5~10 mg/mL、MBC は 5~40 mg/mL であった。魚類病原菌 5 株の内、*L. garvieae* 180803BT 株は MIC 2.5 mg/mL、

MBC 40 mg/mL でやや感受性が低かったが、他の 4 株は TWEBS GOLD の抗菌活性に対して標準菌株以上の感受性を有することが明らかとなった。

Table 1. Inhibitory effect (MIC and MBC) of TWEBS GOLD on marine fish pathogenic bacteria with 2 standard strains

Species	Strain	Host fish	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
<i>Edwardsiella anguillarum</i>	180801RS	red seabream	5	10
<i>Vibrio alginolyticus</i>	rM-8402	red seabream (laeva)	2.5	5
<i>Vibrio anguillarum</i>	FY-8701	Japanese flounder	2.5	5
<i>Lactococcus garvieae</i>	180803BT	bluefin tuna	10	40
<i>Streptococcus iniae</i>	180802RS	red seabream	5	10
<i>Eshirichia coli</i>	K88	(standard)	5	10
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	(standard)	5	10

飼育成績

試験試料 4 週間給与後の飼育成績を Table 2 に示した。期間中に死亡は無く、外観や行動の異常も認められなかった。給与開始後 4~9 日は 0.1% 添加区の日間摂餌量が体重の 3% 程度で他の 2 試験区よりやや少なかったが、期間終了時の体重および肥満度に有意な差は無く、飼料効率も同程度であった。

Table 2. Growth performance and survival rate of red seabream fed diets containing TWEBS GOLD for 4 weeks

Addition rate of TWEBS GOLD to basal feed	Control	0.1%	1%
Initial body weight (g)	96.5±9.6 ^a	96.9±8.3 ^a	96.1±8.2 ^a
Final body weight (g)	166.3±23.3 ^a	160.5±12.0 ^a	163.9±14.1 ^a
Weight gain (%)	72.4	65.6	70.5
Feed intake (g/fish)	108.2	102.5	107.3
Feed efficiency (%)	64.6	62.0	63.1
Condition factor	29.0±1.7 ^a	28.7±1.4 ^a	28.5±1.5 ^a
Survival rate (%)	100	100	100

Values are mean ± standard deviation.

Values within a row followed by different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

攻撃試験

期間中の生存率と水温の推移は Fig. 1、観察終了時点での生存および感染状況は Table 3 に示した。攻撃後 30 日で一旦死亡は収束したが、57 日以降に各試験区で 1、2 尾の死亡が見られた。全ての死亡個体の肝臓および腎臓からは *E. anguillarum* が純粋に分離された。生存率は 70~85% で試験区間に有意な差は見られなかった。TWEBS GOLD の投与により用量依存的な生存日数の延長が観察されたが、有意差は認められなかった。生存個体の一部から寒天培地で *E. anguillarum* が純粋または優勢に分離されたが、外観および臓器に顕著な異常は認められなかった。液体培地については増殖の有無が寒天培地と完全に一致していたため、菌種の確認は行わなかった。生存魚中の *E. anguillarum* 感染率は 1% 添加区が他の 2 試験区の 1/5 以下で、対照区に対しては有意に低かった。終了時に非感染状態で生存していた個体の開始時尾数に対する比(非感染生存率)は 1% 添加区が 75% と最も高く、対照区に対しては 2.5 倍となり有意に高かった。

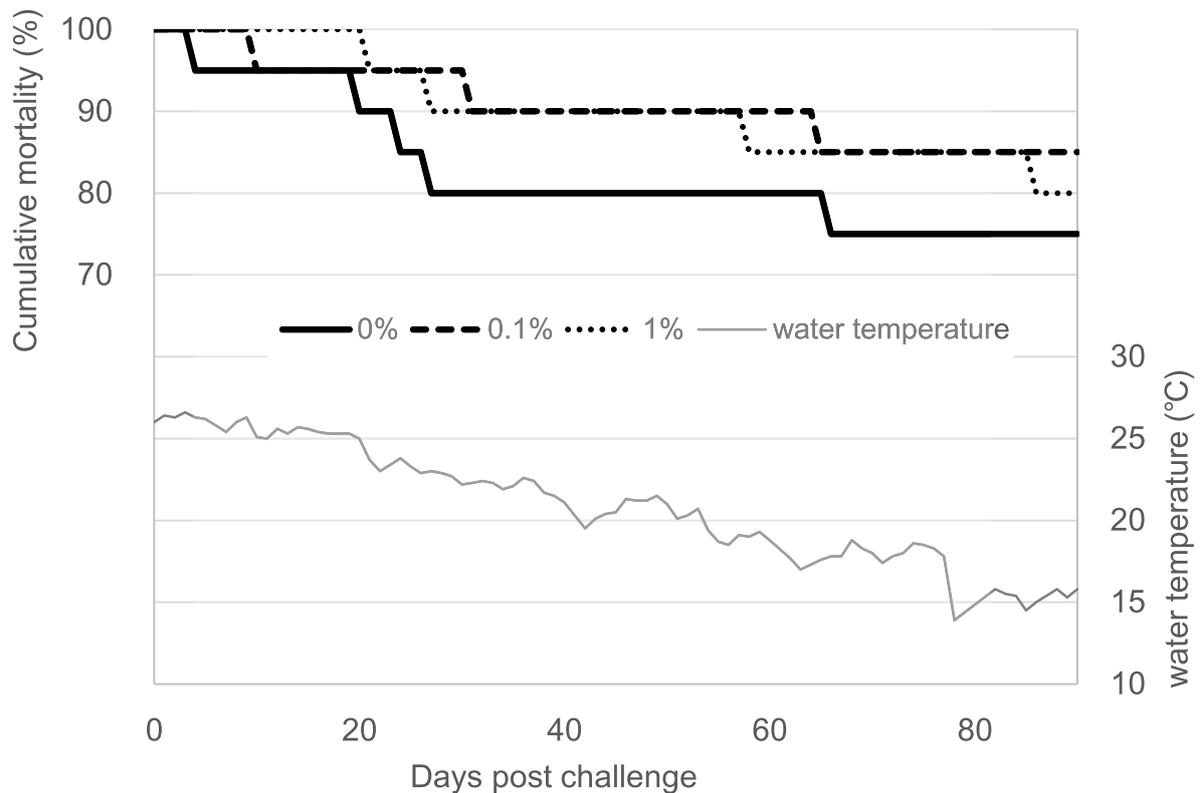


Fig. 1. Survival rate of the red seabream challenged orally with *E. anguillarum* 4 weeks after administration of diets supplemented with TWEBS GOLD.

Table 3. Protective efficacies of TWEBS GOLD administration against the artificial infection with *Edwardsiella anguillarum*

Addition rate of TWEBS GOLD to basal feed	Control	0.1%	1%
Survival rate (%)	70.0 ^a	85.0 ^a	80.0 ^a
Mean survival time (biased) (days)	55.6 ^a	59.6 ^a	77.4 ^a
Prevalence of <i>E. anguillarum</i> in survived fish (%)	60.0 ^a	35.3 ^{ab}	6.3 ^b
Rate of survived fish not infected by <i>E. anguillarum</i> (%)	30.0 ^a	55.0 ^{ab}	75.0 ^b

Values within a row followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$).

考察

イネ科植物の竹や笹は、各種細菌の増殖を抑える天然抗菌剤を含んでおり (Yang *et al.* 2009; Shirotake *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2010)、笹の葉はアジアで古くから食品の腐敗を抑えるために使用されている (Panee 2015)。本研究で使用したクマザサ抽出物 TWEBS GOLD は、ヒトの病原菌に対して抗菌力を有することが知られている (土田ら 2013)。著者らが淡水魚から分離された非定型 *Aeromonas salmonicida* 5 株および同属の 4 種 (*A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *A. sobria* および *A. veronii*) の基準株に対する抗菌力を調べた結果、MIC は 0.313~0.625 mg/mL であった (朝倉ら 投稿中)。

本研究で明らかになった海産魚の病原菌 4 属 5 種に対する TWEBS GOLD の MIC は *L. garvieae* を除き 2.5~10 mg/mL であり、魚類病原性 *Aeromonas* 属細菌より感受性は低いものの標準菌株と同等以上であった。これにより TWEBS GOLD の抗菌活性はヒト病原菌のみならず、淡水・海水を問わず魚類病原細菌に対しても有効であることが確認された。しかし TWEBS GOLD の水産への応用に当たっては、魚に対する安全性の確認が必要である。キンギョでは魚類病原性 *A. salmonicida* に対する MIC 相当の濃度で飼育水に添加しても顕著な異常は見られなかった (朝倉ら 投稿中)。本研究においても、マダイ稚魚への 4 週間の経口投与が成長や生存率に影響しないことが確認された。

抗菌薬が医療や水畜産領域で濫用された結果、薬剤耐性菌が社会的な大問題となっており、水産養殖においても抗菌薬の使用に対する規制は厳しさを増している。細菌感染症の対策としてはワクチンによる予防が重視されつつあるが、抗菌薬に代わる資材に対する要求は依然として強い。例えば免疫能が不完全な仔稚魚を扱う種苗生産では、ワクチンのような宿主側の抗病性に依存する対策は成り立たない。初期飼育では水質安定のためにナンクロロプシスなどの植物プランクトンを飼育水に添加しワムシなどの生物餌料を与えるため、潜在的病原菌の飼育環境への侵入を継続的に制御することも容易ではない。飼育水や生物餌

料の抗菌薬処理が検討されたことはあるが、現在このような使用法は法的に認められていない。え、前述の耐性菌出現リスクのため長期的な継続使用は現実的では無い。これに対して、抗菌剤に耐性が誘導される継続曝露条件下でも TWEBS GOLD の抗菌力に対する耐性は発現しないことが報告されている(櫻井 2018)。仔稚魚期の病原細菌として最も問題となる *V. alginolyticus* が比較的強い感受性を示したことから、TWEBS GOLD を飼育水に添加することで海産魚の初期飼育における細菌感染症を継続的に抑制することが期待される。今後は、海水環境で仔魚に対する安全性を確認したうえで、実用的な使用方法を検討する必要がある。

海面養殖の場合は開放された生簀で行われるため、低換水率の水槽で行われる初期飼育とは異なり、環境水に添加した TWEBS GOLD の濃度を保つことは不可能である。実用的な使用法としては、飼料に添加して投与することが考えられる。そこで、マダイ稚魚に経口投与して摂餌性への影響および魚体に対する安全性について評価した。TWEBS GOLD には独特の臭いと強い渋味があり摂餌性への影響が懸念されたため、添加後の飼料表面を CMC で被覆することで水中への流失阻害と摂餌への影響軽減を図った。摂餌性の指標となる飽食摂餌量は、0.1%添加区では給与開始当初にやや少なかったものの通常の養殖における給餌水準には達しており、10日以降は他の2試験区と同等の高い摂餌性を示した。より高濃度の1%添加区では終始対照区と同等であったことから、本報における調製法であれば TWEBS GOLD を飼料に1%添加しても長期継続投与時の摂餌性に影響はないと評価した。4週間連続投与後の体重、肥満度および飼料効率に試験区間で有意な差は無く、死亡やその他の異常が認められなかったことから、本試験の投与条件下では TWEBS GOLD のマダイに対する安全性に問題は無いと判断した。

TWEBS GOLD を4週間連続投与した後、魚類病原細菌 *E. anguillarum* の経口人為感染により抗病性を評価したところ、攻撃90日後の生存率は70~85%で試験区間に有意な差は無かった。飼料に1%添加した場合の消化管内液相への溶出濃度は、消化液や浸透圧調整のための飲水によって1% (=10 mg/mL)を下回ることが考えられる。本研究では給餌後の間隔が最も長くなる朝に経口攻撃を実施したため、消化管内の TWEBS GOLD 濃度が攻撃菌株に対する MIC (5 mg/mL)に達していなかったと推定される。消化管内には常在菌が多量に存在することなどから、MIC 測定環境より抗菌活性が低下することも想定される。1尾当たりの攻撃菌量が約 1×10^{10} cfu と極めて多量であったことから、TWEBS GOLD の菌体に対する直接的な抗菌力では投与した攻撃菌を充分不活化することはできなかったと推定され、結果として生存率に差がでなかったことが考えられる。

エドワジエラ症 (*Edwardsiella* 属細菌の感染症) では通常長期間に亘って死亡が継続する(馬久地ら 1995)ことから生存時間分析を行ったところ、Kaplan-Meier 法による生存時間関数に試験区間の有意差はなかったものの、TWEBS GOLD の添加量依存的な生存日数の延長

が観察された。植物抽出物にはマダイに経口投与することで免疫能の賦活作用を持つものが存在することから(Ji *et al.* 2007)、TWEBS GOLDも同様の効果を持つことが考えられる。

エドワジエラ症の対策が難しい理由の一つとして、原因菌が宿主の食細胞に捕食されてもその殺菌機構を回避して生存・増殖する細胞内寄生菌であることが挙げられる。そのため、抗菌剤による治療では一旦死亡が終息した後に再発が高頻度で見られる他、不活化ワクチンの単独投与では十分な予防効果が得られない(飯田ら 2016)。感染後長期間死亡が続くだけでなく、生残魚の一部が保菌状態となり(馬久地ら 1995)、後に再発したり新たな感染源になるという問題もある。そこで、攻撃後 90 日における生存魚の保菌状態を調べることで、細胞内寄生性病原菌の感染持続に対する TWEBS GOLD の抑制作用を評価した。その結果、生存個体の一部から *E. anguillarum* が純粋または優勢に分離されたが、外観および臓器に顕著な異常は認められず、保菌状態(不顕性感染)にあることが確認された。生存魚中の *E. anguillarum* 感染率は 1%添加区が他の 2 試験区の 1/5 以下で、対照区に対しては有意に低かった。死亡個体と保菌個体を除いた、すなわち終了時に非感染状態で生存していた個体の攻撃開始時尾数に対する比(非感染生存率)で見ても 1%添加区が 75%と最も高く、対照区に対しては 2.5 倍となり有意に高かった。観察期間後半の水温は 20℃以下となり、*E. anguillarum* の至適温度 30℃を大きく下回っていたが若干数に発症・死亡が見られた。この状況下でも保菌率を大きく低下させたことから、TWEBS GOLD の経口投与がマダイの細胞性免疫を活性化させ、*E. anguillarum* の慢性感染を抑制したのではないかと推定される。エドワジエラ症はヒラメ養殖で最も大きな被害をもたらす疾病であり、多糖アジュバントを含むワクチンが 2014 年に承認されたものの(飯田ら 2016)、承認された治療薬はない。マダイにおいてもマダイイリドウイルス病と並ぶ最重要疾病となっているが、実用的な予防法はなく承認された治療薬もホスホマイシンカルシウムのみであり(消費・安全局畜水産安全管理課 2018)、依然として大きな被害が続いている。本症に対する効果的な防除法が強く求められる中で、長期的に継続投与可能な TWEBS GOLD による慢性感染抑制は、単独あるいは他の対策との組み合わせにより実用的な防除法となることが期待される。今後はより効果的に抗病性を向上させる投与方法を検討し、自然感染時の被害軽減につなげていきたい。

文 献

Clinical Laboratory Standards Institute (2008) Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved standard, 3rd ed., Wayne, Pennsylvania. pp. 99.

飯田貴次・坂井貴光・高野倫一 (2016) エドワジエラ症. 魚病研究, **51**, 87-91.

Ji, S.-C., O. Takaoka, G.-S. Jeong, S.-W. Lee, K. Ishimaru, M. Seoka and K. Takii (2007) Dietary medicinal herbs improve growth and some non-specific immunity of red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Science*, **73**, 63-69.

馬久地隆幸・清川智之・本多数充・中井敏博・室賀清邦 (1995) ヒラメのエドワジェラ症に対する予防免疫の試み. *魚病研究*, **30**, 251-256.

Panee, J. (2015) Potential medicinal application and toxicity evaluation of extracts from bamboo plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, **9**, 681-692.

Sakai, A., K. Watanabe, M. Koketsu, K. Akuzawa, R. Yamada and Z. Li (2008). Anti-Human Cytomegalovirus Activity of Constituents from *Sasa albo-marginata* (Kumazasa in Japan). *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, **19**, 125-132.

櫻井静 (2018) 抗菌剤、特許第 6342211 号

Shirotake S., Nakamura J., Kaneko A., Anabuki E., Shimizu N. (2009) Screening bactericidal action of cytoplasm extract from kumazasa bamboo (*Sasa veitchii*) leaf against antibiotics-resistant pathogens such as MRSA and VRE strains. *Journal of Bioequivalence and Bioavailability*, **1**, 85-88.

消費・安全局畜水産安全管理課 (2018) 水産用医薬品の使用について 第 31 報. 農林水産省、pp. 31

土田裕三・土田小太郎・土田憲次郎・渡邊邦友・中村良子・岩沢篤郎 (2013) 抗菌剤及び抗菌性組成物、特許第 5276615 号

Yang, F.-C., K.-H. Wu., W.-P. Lin and M.-K. Hu (2009) Preparation and antibacterial efficacy of bamboo charcoal/polyoxometalate biological protective material. *Microporous and Mesoporous Materials*, **118**, 467-472.

Zhang, J., Gong J., Ding Y., Lu B., Wu X. and Zhang Y. (2010) Antibacterial activity of water-phase extracts from bamboo shavings against food spoilage microorganisms. *African Journal of Biotechnology*, **9**, 7710-7717