蓄養アワビから分離された *Haliphthoros milfordensis* について*

畑 井 喜 司 雄**

(昭和 57 年 10 月 20 日受理)

On the Fungus *Haliphthoros milfordensis* isolated from Temporarily held Abalone (*Haliotis sieboldii*)

Kishio HATAI

Aquaculture Research Laboratory, Nagasaki Prefectural Institute of Fisheries,
Nomoaki, Nagasaki 851-05, Japan

(Received October 20, 1982)

From June to August in 1981, an epizootic of mycosis occurred among the abalone (*Haliotis sieboldii*), which were temporarily held in aquaria with circulating sea water adjusted to 15°C by a cooling system, at an abalone storage facility in Sasebo, Nagasaki Prefecture.

The typical external symptom of diseased abalones was flat or tubercle-like swelling formed on mantle, epipode and dorsal surface of foot.

The mycelium was always observed in the lesions. A fungus was isolated by inoculating materials taken from lesions of diseased abalone onto AMES agar and incubating at 15°C. For the observation of spore discharge, fragments of vegetative hyphae were washed several times with sterile sea water, and then placed in a Petri dish containing sterile sea water. As a result, zoospores formed within the fragment were liberated through the orifice of discharge tube. Encysted spores were spherical, usually 7 µm (range of 6 to 10 µm) in diameter. The fungus was identified as *Haliphthoros milfordensis*.

The fungus grew at a temperature range of 4.9 to 26.5°C, with optimum of 11.9-24.2°C.

1981 年 6 月から 8 月にかけて長崎県佐世保市内の一アワビ蓄養場で、蓄養中のアワビにへい死を伴う疾病が発生した。罹病アワビを詳査したところ、病患部内には常に菌糸体が観察されたことから、本症は真菌に原因する疾病ではないかと推察された。そこで病患部より真菌の分離を試みた結果、寄生真菌と同一形状を示す真菌の培養に成功した。

本報では本症の発生概要ならびに分離真菌の性状について述べる。

材料および方法

真菌の分離・培養: 用いた培地は サブロー 寒天培地 (栄研), マイコセル寒天培地 (栄研), PYGS 寒天培地 (BIAN *et al.*, 1979) および海水で調製した Abalone

Meat Extract 寒天培地**** (AMES 寒天培地) である。真菌の分離はこれらの各平板培地にメガイの上足部に形成された病患部の肉片を切取って接種し、その上に硫酸ストレプトマイシンおよびペニシリン G カリウムの微量を添加し、15°C で培養する方法によった。

同定: 分離された菌株はすべて同種と判定されたことから、その中の 1 株 (NAA8101 株) を供試株とした。

供試株はあらかじめ AMES 寒天培地に発育させた後、菌糸を含む寒天を切り取り AMES ブイヨンに接種し、15°C で培養した。培養 7 日後、十分に発育した菌糸体を寒天ごと滅菌海水を含むシャーレに移しかえ、さらに別のシャーレに移しかえる操作を 2~3 回くりかえし菌糸体に附着した培地成分を除去した後に 15°C に静置し、以後定期的に遊走子形成の有無を観察した。

* 本研究の概要は昭和 57 年度日本魚病学会大会において発表した。

** 長崎県水産試験場増養殖研究所

**** アワビの肉質部を細切りにし、それに 9 倍量の海水を加えて、100°C, 30 分加熱後、そのろ液に寒天末を 1.5% 加えた培地。

発育に及ぼす温度の影響： 振盪温度勾配培養装置 TN-3 型 (東洋科学産業株式会社) を用い、NAA8101 株の至適温度を求めた。試験は L 字型試験管に AMES ブイオンを 10 ml ずつ分注し、それらを滅菌後、各試験管に供試株の休眠胞子を 1.5×10^4 個ずつ接種し、緩やかに振盪培養を行い、3 日および 7 日後に菌糸の発育程度を肉眼的に判定する方法によった。なお、培養 7 日後に菌糸の発育が認められなかった高温域の試験管は 15°C の培養槽に移し、さらに 10 日間培養を行ない、菌糸発育の有無からその生死を判定した。

次に AMES 寒天培地および PYGS 寒天培地上での NAA8101 株の発育に及ぼす温度の影響を検討した。試験は各平板培地に供試株の菌糸小片を含む寒天小片を静置した後、15、20 および 25°C の各温度で培養し、経時的に集落の径を測定する方法によった。なお、寒天小片とは供試株を AMES 寒天培地で 15°C、10 日間培養後、その集落の周縁部から菌糸体を寒天ごと径 3.5 mm の円盤状に切取ったものである。

結果および考察

本症の発生概要： 本症は水温を 15°C に冷却した循環ろ過式の室内コンクリート水槽内で、アワビを籠に収容して蓄養しているアワビ蓄養場に発生した。蓄養槽に天然で採捕したアワビを収容すると通常 10 日以内に病徴がみられるようになり、発症アワビは数日後にはへい死する。放置すると蓄養槽内のアワビは同一病徴を発現して全滅する。発症アワビは主としてメガイ (*Haliotis sieboldii*) であり、次いでマダカで多くみられ、概してクロでの発症頻度は低い傾向を示した。

罹病アワビの特徴的病徴は小突起状の患部 (図 1)、または扁平な膨隆患部 (図 2) が外套膜、上足および足背部の表面に多数形成されることで、これらの患部内には常に菌糸体が観察された (図 3-4)。

なお、本症の蔓延を防ぐため、感染源となる蓄養槽内の遊走子を殺滅させる目的で次亜塩素酸ソーダ (有効塩素として 10 ppm の濃度) で定期的に海水を殺菌消毒し

たところ本症の発生は著しく軽減した。

真菌の分離・培養： 用いた培地のうち、サブロー寒天培地、マイコセル寒天培地および PYGS 寒天培地には患部内寄生菌と同様の形態を示す真菌の発育はみられなかった。いっぽう、AMES 寒天培地には病患部内寄生菌と菌糸形態が一致する無隔壁で分枝する真菌の発育がみられた (図 5)。

なお、AMES 寒天培地で継代をくりかえした菌株は後述の如く発育は遅いが PYGS 寒天培地にも発育を示すようになることが判明したため (図 6)、その後の継代培養は調査が簡便な PYGS 寒天培地を用いている。

同定： 本菌は全実性の組織内寄生菌であり、AMES ブイオン中で培養した菌糸の径は 11~29 μm であった (図 7, 8)。fragment (胞子嚢の一種) は菌糸体を滅菌海水に移入後、48 時間以内に形成されたが (図 9)、この時点ではまだ遊走子の生産はみられなかった。しかし、72 時間後には活発な遊泳を示す多数の遊走子が確認された。遊走子の生産・遊出はまず fragment から直線状、波状またはコイル状に放出管 (discharge tube) が伸長し (図 10)、やがて内部で遊走子の形成がおこり、それらが活動を開始すると間もなく放出管の先端より遊出する様式で行われた (図 11~16)。

fragment の形態は多様であったが、protuberance (枝様の管) を有することはなかった。放出管の長さは 96~530 μm 、その径は 7~10 μm であった。放出管から遊出する遊走子は側生型の鞭毛を有し、その形状は多様であった。休眠胞子は球形で、その径は 6~10 μm 、通常 7 μm であった。卵胞子は観察されなかった。

以上述べた如く、本菌は全実性の組織内寄生菌で、遊走子が fragment 内に形成され、卵胞子が観察されず、また休眠胞子の径が通常 6~8 μm の範囲内にあることなどから、卵菌綱、クサリフクロカビ目 (Lagenidiales)、シロルピディア科 (Sirolpidiaceae) のハリフトロス属 (*Haliphthoros*) に類別された (THARP and BLAND, 1977; SPARROW, 1976; VISHNIAC, 1958)。現在本属に *H. philippinensis* (HATAI *et al.*, 1980) および *H.*

Fig. 1. Gross appearance of an abalone naturally infected with a mycosis. Note tubercle-like swellings on the mantle.

Fig. 2. Same as Fig. 1. Note flat swellings formed on the dorsal surface of the foot.

Fig. 3. Hyphae of *H. milfordensis* taken from lesions of a diseased abalone.

Fig. 4. Histological section through a lesion of a naturally infected abalone (PAS reaction).

Fig. 5. Colonies of *H. milfordensis* grown on AMES agar after 4 days incubation at 15°C.

Fig. 6. Colony of *H. milfordensis* grown on PYGS agar after 18 days incubation at 15°C.

Fig. 7. Colonies grown in AMES broth after 1 week incubation at 15°C.

Fig. 8. Vegetative hyphae grown in AMES broth after 2 days incubation at 15°C.

Table 1. Effect of temperature on growth of *H. milfordensis* NAA-8101 in AMES broth

Temperature (°C)	Days after incubation*		Survival**
	3	7	
4.9	—	+	
8.8	—	++	
11.9	+	+++	
14.8	++	+++	
17.4	++	+++	
20.1	+++	+++	
22.4	++	+++	
24.2	++	+++	
26.5	+	++	
28.6	—	—	—
30.5	—	—	—

* Symbols: —, indicates no growth.; +, ++, +++, increasing amounts of growth from slight to excellent.

** Viability of inoculated spores was checked by re-incubation at 15°C for more 10 days. (1.5×10^4 spores were inoculated into 10 ml of AMES broth.)

milfordensis (VISHNIAC, 1958) の 2 種類が知られている。これら既知種と NAA8101 株との性状を比較すると、NAA8101 株は常に放出管の先端から遊走子が遊出し、かつ protuberance の形成が認められなかったのに対し、*H. philippinensis* では遊走子が fragment から直接遊出することもあり、かつ protuberance の形成も知られている。従って、NAA8101 株と *H. philippinensis* とは別種と判定された。

いっぽう、THARP and BLAND (1977), FULLER *et al.* (1964) および VISHNIAC (1958) によって報告されている *H. milfordensis* の無性生殖の様式および形状などの性状に NAA8101 株のそれらはよく一致していることから、NAA8101 株を *H. milfordensis* に同定することは妥当と思われた。なお、本種の宿主範囲は広く、これまで oyster drill (巻貝の一種) の卵 (VISHNIAC, 1958), 海藻の表面 (FULLER *et al.*, 1964), アメリカロブスターの鰓 (FISHER *et al.*, 1975), ホワイティジュリンプの鰓および眼 (THARP and BLAND, 1977) などでの寄生が知られている。

発育に及ぼす温度の影響: 各温度での発育試験の結果 (表 1), 培養 3 日後には 11.9°C ~ 26.5°C の温度範囲内で菌糸の発育がみられ、とくに 20.1°C で最良の発育

Table 2. Effects of temperature on growth of *H. milfordensis* NAA-8101 on AMES agar and PYGS agar

Test media	Temperature	Days after incubation			
		3	5	7	10
AMES agar*	15°C	12.2 mm**	24.7 mm	34.1 mm	49.3 mm
	20	17.4	37.3	55.4	82.3
	25	16.5	34.0	51.8	72.4
PYGS agar	15	4.4	5.1	6.0	7.7
	20	5.3	5.7	6.4	8.1
	25	4.8	5.0	5.1	5.4

* Abalone Meat Extract Seawater agar.

** Diameter of mycelial mat.

(An agar block of 3.5 mm disc cut with a sterilized cork borer from the edge of a *H. milfordensis* NAA-8101 colony growing on AMES agar plate was placed at the center of test agar plate.)

Fig. 9. Fragmentation of a vegetative hyphae by cytoplasmic constriction.

Fig. 10. Vegetative hyphae, 48 hrs after the transferring into sea water. Note wavy or coil-like discharge tubes.

Fig. 11. Zoospores formed within the discharge tubes and fragments.

Fig. 12. Empty discharge tubes and fragments after releasing zoospores.

Fig. 13. Same as Fig. 11.

Fig. 14. Zoospores released one by one through the orifice of a discharge tube.

Fig. 15. Zoospores swarming within discharge tubes.

Fig. 16. Same as Fig. 12.

を示した。培養7日後には4.9°C~26.5°Cの温度範囲内で菌糸の発育がみられたが、11.9°C~24.2°Cの範囲が発育適温域と判断された。なお、菌糸の発育がみられなかった28.6°C以上の温度域でのNAA8101株の生死を確認した結果、すでに死滅していることが判明した。

次に、AMES寒天培地およびPYGS寒天培地上での発育に及ぼす温度の影響を試験した結果(表2)、前者では20, 25, 15°Cの温度順に、また後者では20, 15, 25°Cの温度順に発育が速やかであった。すなわち、NAA8101株の発育は上述の成績と同様、20°Cが最良であると判定された。いっぽう、20°C、10日培養後の両培地上での集落の径を比較すると、NAA8101株はAMES寒天培地では82.3mmと急速な発育を示したのに対して、PYGS寒天培地では8.1mmと極めて緩慢な発育を示した。従って、AMES寒天培地はNAA8101株の発育に適合した培地であると判断された。いっぽう、PYGS寒天培地は本株を速やかに発育させる培地としては不適であるが、調合が簡便である点、また継代が約30日毎でよい点など本株の保存を行う上からは有益な培地であると判断された。

稿を終るに当り、投稿を御許可下さった長崎県水産試験場の藤田矢郎場長に深謝の意を表する。

要 約

1. 1981年6月から8月にかけて蓄養中のアワビにへい死を伴う疾病が発生したためその原因を調査した結果、罹病アワビの外套膜、上足および足背部などの表面に形成される膨隆患部内には常に菌糸体が観察されたことから本症を真菌性疾病と判断した。

2. アワビ肉質部抽出液で作製したAMES寒天培地を用い、病患部から真菌の分離を試みた結果、寄生菌と

同一形状を有する真菌の培養に成功した。

3. 分離菌(NAA8101株)は全実性の組織内寄生菌で、遊走子がfragment内に形成され、それが放出管の先端より遊出し、また休眠胞子の径が通常7μmであったことなどから、クサリフクロカビ目、シロルビディア科の*Haliphthoros milfordensis*に同定された。

4. NAA8101株は4.9°C~26.5°Cの温度範囲内で発育したが、発育適温域は11.9°C~24.2°C、最適温度は20.1°Cと判断された。

文 献

- BIAN, B. Z., K. HATAI, G. L. PO and S. EGUSA (1979): Studies on the fungal diseases in Crustaceans. I. *Lagenidium scyllae* sp. nov. isolated from cultured ova and larvae of the mangrove crab (*Scylla serrata*). *Trans. mycol. Soc. Japan*, 20, 115-124.
- FULLER, M. S., B. E. FOWLER and D. J. McLAUGHLIN (1964): Isolation and pure culture study of marine Phycomycetes. *Mycologia*, 56, 745-756.
- HATAI, K., B. Z. BIAN, M. C. L. BATICADOS and S. EGUSA (1980): Studies on the fungal diseases in Crustaceans. II. *Haliphthoros philippinensis* sp. nov. isolated from cultivated larvae of the jumbo tiger prawn (*Penaeus monodon*). *Trans. mycol. Soc. Japan*, 21, 47-55.
- SPARROW, F. K. (1976): The present status of classification in biflagellate fungi. E. B. GARETH JONES, Ed. "Recent advances in aquatic mycology", 213-222. Elek Science, London, 749 pp.
- THARP, T. P. and C. E. BLAND (1977): Biology and host range of *Haliphthoros milfordensis*. *Can. J. Bot.*, 55, 2936-2944.
- VISHNIAC, H. S. (1958): A new marine phycomycetes. *Mycologia*, 50, 66-79.