病原性水生糸状菌の生理生態に関する研究—I.

新崎盛敏・野沢洽治・三宅 真

(東京大学農学部水産植物教室)

On the pathogenetic water mold—I.

Seibin ARASAKI, Koji NOZAWA, and Makoto MIYAKE,

The experiments and observations concerning the life cycle and pH suitable for growth of the pathogenetic *Saprolegnia* spp. isolated from some fungi-diseased fishes, eels and eggs of fish, showed the following results.

(1) Almost all the fungi were identical with *Saprolegnia parasitica* COKER. Some of the rest seemed to be other strain belonging to the same species, but could not be correctly identified. A few were believed to be the other strain that have rather stronger resisting power against malachite green. (Table 1)

(2) In simple-pepton-medium, the micellium continued only to grow, whereas in the dist. water they formed zoosporangia. Gemma were formed in low temperature (below 15°C) or after a long culture-period. Considering that gemma formed numerous zoospores in them, just as zoosporangium did, it seemed that there might be no essential difference between zoosporangia and gemma.

(3) The growth ratio of the mycellium measured in volume, was shown as a sigmoid curve that had rather long straight part. (Fig. 1)

(4) The same strain had almost the same top-point in optimum pH, near the neutral point, for growing. But some of them seemed to show the after-effect of their native ponds. (Fig 2) A pH value of the culture-medium gradually approached to the optimum value in the course of culture. (Fig 3) Correlation between growth and pH, in agar-plate-culture was quite different from that in solution culture.

古くから知られている魚類の水生菌病の中で、サケ・マス卵の病害に関しては多くの報文があるが、ウナギ・コイ等の病害に関する研究は少ない。こゝ数年来中部地方の養鰻池において水生菌による被害が屢々発生している。保科・大久保¹⁾はこの病原菌を *Saprolegnia parasitica* COKER と同定し、これに対する Malachite green の効果をくわしく報じている。

魚卵に水生菌が発生した場合の対策としては、古くは塩水、またはホルマリン、過マンガン酸カリ等の使用が提案されていたが、充分な成果をあげるまでには到っていない。FOSTER, F.J. & L. WOODBURY (1936),²⁾ O'DONNELL, D.J. (1941)³⁾等は早くから Malachite green が水生菌病対策に非常に有効であることを報じ、ROGER, E. BURROWS (1949) は一定濃度の Malachite green を含む水が流れるようにした定量サイフォンを考案して大なる成果をあげた。これは我国にも紹介されて (1950) Malachite green の使用は急速に普及し効果をあげている。

ところで Malachite green の適正濃度や水生菌に対する作用機構等については、保科等が固形培地上に純粋分離した菌糸について見た以外は、いづれも孵化中の卵や養殖中の魚によつておこなつた実験結果で、細かい点については不明なことが多い。水生菌に関する基礎的な研究は病害対策を一層有効にするうえからも重要なことであると考えられる。筆者等はこの観点から研究を進めて居り、研究はなお未完成で多くの問題を残しているが、これまでに得られたところをこゝに報告する。*

1. 菌種について

分離は寒天上で行ない、0.5%ペプトン寒天又は 0.5% ペプトン液で培養をおこなつたが、各地の病魚あ

Table 1. Collected strain

Strain No.	Collection	Property	Species
S ₁	The pond of the Faculty of Agriculture Tokyo Univ. pond water	The colony on the agar plate shaped as elouds.	
S ₂	The aquarium keeping the tropical fishes. water in tank	formed the sphere sporangium	<i>Saprolegnia parasitica</i>
S ₃	Red wag sword tail kept in the tank described above. snout	The same above	<i>S. parasitica</i>
C ₁	Fuji hatchery. caudal fin of rainbow trout		<i>S. parasitica</i>
C ₂	The mandible of the same fish		<i>S. parasitica</i>
C ₃	The eggs of rainbow trout that had been treated with M. G.	resisting against M. G.	unidentified
C ₄	Ikawazu eel-ponds. tail of eel		<i>S. parasitica</i>
C ₅	Ikawazu eel ponds. body of cultured greymulle		"
C ₆	Kasumigaura lake. eggs of <i>Hypomesus olidus</i>		"
C ₇	Kasumigaura lake. eggs of <i>Hypomesus solidus</i> treated with M. G.	resisting against M. G.	unidentified
C ₈	Oku-Tama hatchery. eggs of rainbow trout treated for long time with M. G.		<i>S. parasitica</i>

るいは病卵より分離された菌は第一表に示すように *Saprolegnia parasitica* COKER と同定されるものが殆んどであつた。なお熱帯魚槽の水及びその中で罹病した Red wag sword tail より分離したものは、菌糸の形等は *S. parasitica* に似ているが、游走子嚢が球形ないし洋梨形であることや、生長がやゝ遅い点が多少異なっている。また Malachite green で処理したマス卵（富士養鱒場）やワカサギ卵（霞ヶ浦）から分離したものは Malachite green に対する耐性が非常に強く、低濃度においてはむしろ生長が促進される傾向さえ見られた（第二報参照）。これは游走子嚢 Gemma 等の形成が見られなかつたので種の査定をおこなうことが出来なかつたが、菌糸が非常に細く生長も遅い。このため普通の場合は生長の早い *S. parasitica* 其他におされて認めることが出来ないであろう。

2. *Saprolegnia parasitica* の器官形成

実験をはじめに先立つて游走子嚢、游走子、蔵卵器、Gemma 等を必要に応じて得るために各器官の形成条件をしらべた。

古く KLEBS⁵⁾ は *S. mixta* で外圍条件をかえることによつて游走子嚢や蔵卵器等を自由に形成させる研究をおこない、また COKER⁶⁾ も培地の相違によつて各種孢子嚢の形成に差があることを観察している。筆者等は *S. parasitica* において游走子嚢、Gemma、游走子等の形成、及び放出、発芽等を自由に制御することが出来たが、蔵卵器を形成させることにはまだ成功していない。一般に云われているように繁殖は主として無性的におこなわれているものと思われる。

ペプトン寒天上に純粹分離した菌体の小片を置くと、又は滅菌した麻の実に接種したものを滅菌蒸留水に入れておくと、2 乃至 4 日後には周縁に菌糸が伸び、その一日後には游走子嚢が多数形成される。游走子嚢は低温その他の悪条件におくと游走子を形成しないが、20~21°C におくと内容が分割して急速に游走子を形成し、頂端に開く穴から遊出する。内容が分割しはじめてから游走子が完成する間は約 1~2 分で、直ちに遊出するが全部が遊出する時間は約 10 秒である。後生游走子嚢はほとんど貫生し側生するものはまれであ

る。泳ぎ出した游走子は頂部に二鞭毛を有するソラメ形でしばらく泳ぎ廻つた後に休止して第一次休眠胞子となる。約 24 時間後にはこれから出されたと推定される二次游走子が多数見られる。二次游走子は側生する二本の鞭毛を有し、しばらく游泳した後静止して二次休眠胞子となり、これは後発芽して菌体となる。第一次休眠胞子と第二次休眠胞子はよく似ていて識別困難であり、一次休眠胞子が発芽したと思われるような例も観察されたが今後確かめたい。二次休眠胞子は好条件下では間もなく発芽するが、悪条件では休眠を続け約一ヶ月後でもなお充分に発芽能力を有している。休眠胞子の発芽生長は 20°C 以上のペプトン培地で盛んであるが、蒸留水中では 450μ 程度で止つてしまう。なお清水中で游走子嚢が形成された菌体をペプトン培地に移すと、游走子は形成されずに游走子嚢自体から菌糸が伸長して来る。またペプトン培地あるいは、CZAPK 培地中の菌体は生長を続けるのみで游走子嚢形成は見られなかった。

ペプトン寒天上に培養して三日以上たつたもの、ペプトン液に培養したものを $4\sim 17^{\circ}\text{C}$ に一週間位おいたもの、培養を始めてから 2 週間以上たつた古いもの等、特殊な条件や環境が悪化した場合には菌糸の先端や側面に Gemma が形成される。Gemma は一般に游走子嚢より大形で、球状、ナスビ形、棍棒形、徳利形、瓢箪形、その他種々の変化に富んだ形を示し、屢々鎖状につながっていることがある。なお游走子嚢が出来ている菌体を低温其の他の悪条件に移すと、游走子嚢がそのまま Gemma にかわつたり、あるいは游走子嚢の先に新しく Gemma を形成するのが見られた。GÄUMANN⁷⁾ によると Gemma (Chlamydospore) は条件が良くなると発芽して菌糸または游走子嚢を形成すると記述されているが、このほかに Gemma を清水中に入れて約 20°C に保つと、12 時間後には内部に游走子が形成され、遊出する。この遊出は Gemma に分枝のある時は分枝の頂端から行なわれ、分枝のないときは游走子嚢のように頂端からおこなわれる。又遊出は

比較的緩慢で嚢内に一部が残ることが多い。新しいペプトン液中に移し好条件下におかれた Gemma は直接一乃至数本の菌糸を出し正常な菌体に生長した。このように Gemma と游走子嚢との間には機能的に非常に密接な関連が見られる。用語についても Gemma (胚芽、芽胞) あるいは Chlamydospore (厚膜孢子) 等が使われているが、よく検討すべきであると考える。

3. 生 長

Saprolegnia parasitica は固体培地では放射状にひろがり円形を示し、液体培地では球形またはやや扁平状になり、試験管内では管径一ぱいに円柱状に伸長する。従つて生長の測定は固体培地では円の半径を、液体培地では試験管を用いて円柱の高さを測定した。

正常の液体培地で得られる生長曲線は第 1 図に見られるように直線部の非常に長いシグモイドとなり、直線部は接種後一日目から四日目まで追跡できる。これに反し Malachite green によつて生長を阻害したものでは三日乃至五日目に直線になり、その勾配も阻害の強いものほど緩やかになる。固体培地では半径をそのまま縦軸にとつてグラフを書くと、曲線は次第に水平になるが、半径の二乗をとると明確なシグモイドとなる。しかしこの場合は直線部分がやや短かく、また後にのべるように誤差も大きいと思われるので実験は主として液体培地でおこなつた。測定を厳密にするためには各々について生長曲線を追跡して比較すべきであらうが、多くの材料を処理する必要から接種後三日又は四日たつて生長がもつとも定常的におこなわれ、しかも夫々の差の大きくなる時期に測定して標準とした。

生長曲線の直線部において、固体培地では半径の二乗即ち面積と生長が比例し、液体培地では円柱の高さが生長に比例する

Fig. 1 The growth-curve of mycelium under various conditions :

1. *S. parasitica*, in normal pepton-soln.
2. " , on normal pepton-agar-pl.
3. " , in pepton-soln. with 0.01 ppm. M. G.
4. Strain C, in normal pepton-soln.
5. " , pepton-soln. with 0.1 ppm M. G.

Fig. 2 The growth of the fungi in various pH.

目されることは液体培地とのいちぢるしい相異で、液体培地では一般的に至適 pH が 6 から 7 でこれより両側へへだたると従つて急に生長が悪くなる。しかるに pH 4 から 9 の間について実験をおこなつた固体培地では pH 4 でもつともよく生長し、pH が高くなるに従つて生長が悪くなり、しかも生長の良否の差は液体培地におけるほど大きくはあらわれなかつた。この相異がいかなる理由によるものか明らかではないが、種々の実験をおこなう上に考慮すべきことであらう。

個々の菌株の至適 pH は、起原を異にする菌株でも同種の菌ではほぼ一致し、 S_2 , S_3 , 及び C_1 , C_2 , C_4 , C_5 , C_6 , C_8 等は殆んど同じである。ただし同じく *S. parasitica* と同定されるにもかかわらず C_1 , C_2 , 等に比して C_4 , C_5 はアルカリ側における生長の低下がゆるやかである。 C_1 , C_2 はマスから分離したも

と云うことは、固体培地では菌は平面的に生長するため面積と体積は等しく、液体培地では円柱の高さが体積に比例していることから考えて、ともに菌の体積が時間に比例して増加していることを示している。

4. pH と生長との関係

水生菌の発生や生長と pH との関係については、孵化中のサケ卵についておこなつた研究があるが³⁾ 筆者等は純粹分離したものについて生長可能範囲及び至適 pH をしらべた。実験した pH の範囲は 2 から 11 の間で、その測定は比色法によつた。従つて両端はやや不正確である。又測定は培地の滅菌後と実験終了後の二回おこない、固体培地の場合だけは実験前のみおこなつた。

結果はまとめて第 2 図に示した。先づ注

Fig. 3 The change of pH of media (pepton-soln.-media) in the course of culture.

ので、それが生育していた水の pH は 7.2 から 7.6 であり、他方 C₄, C₅, はウナギ及びボラより分離したもので、生育していた池の pH は Blooming のために 7 から 9.8 の間にあつた。これ等の影響が考えられるが、こうした適応現象については慎重に検討すべきであろう。

実験の前と後における pH の差を見ると (第3図), S₁ は適応範囲が広いいため大きな変化は示さないが、大体 7 乃至 8 に収斂し、S₂, S₃, 及び C₁, C₂, は明瞭に中性附近に収斂するが、C₄, C₅, はむしろアルカリ側に収斂する傾向を示しており、さきにのべたように C₄, C₅, がアルカリに対する適応性が広いこととともに興味あることである。

文 献

- 1) HOSHINA, T. and M. OOKUBO : On a fungi-disease of eel. Jour. of Tokyo. Univ. Fish. 2 (1). 1956.
- 2) FOSTER, F. J. and L. WOODBURY : The use malachite green as a fish fungicide and antiseptic. Prog. Fish-Cult. 18, 7~9. 1936.
- 3) O'DONNELL, D. J. : A new method of combating fungus. Prog. Fish-Cult. 56, 18~30. 1941.
- 4) 水産庁漁政部漁業調整第二課 : 鮭鱒卵の人工孵化における水生菌の予防処理, 内水面漁業資料 第三輯. 1950.
- 5) KLEBS, G. : Willkürliche Entwicklungsänderungen by Pflanzen. Jena, 1903.
- 6) COKER, W. CH. The Saprolegniaceae, Chapel Hill. 1923.
- 7) GAUMANN, E. A. : The fungi. New York. 1952.
- 8) 田中林蔵 : 水生菌の発育に及ぼす水素イオン濃度の影響, 水雑誌 51. 25~30, 昭 18. 1943.