

マラカイトグリーン (Malachite Green) に関する二、三の試験

囑 託 高 安 三 次

(北海道立水産孵化場)

Some Experiments on Malachite Green.

Mitsugu TAKAYASU

The use of malachite green solution as fungicide for control of water molds, growing often around salmon eggs of hatchery, is now usually adopted to all the most of hatcheries. Salmon eggs, which are protected with thick capsule, can resist to some extent of considerably high concentration of malachite green, but the same concentration can not be considered to be harmless to fry.

On account of the necessity of arranging equipments, drainage of hatchery troughs in many hatcheries flow down directly into the succeeding rearing ponds. Accordingly, it may be necessary to know previously the harmful concentration of the waste fungicide solution to fry. From this reason the author presented on this paper some data of bioassay upon the effect of malachite green to fishes.

According to the results obtained, salmon fry and gold fishes are lethal within 24 hours in 1/800,000 ~ 1/1,000,000 solutions of malachite green and within 5~15 hours in 1/500,000~1/600,000 solutions. It is true that fry tolerate one hour or two in the water of some such concentration as 1/500,000 or so of malachite green, but from the fact that they have been killed in the course of 5~15 hours, there is no gainsaying the toxicity of these concentrations.

To reduce the toxicity of malachite green, an addition of a small amount of sodium sulphite solution to the waste fungicide solution proved to be best efficient. The addition of 14~15c.c. of 8% solution of sodium sulphite (anhydrous) to 180 litre (1 "Koku") of waste solution is mostly efficient to neutralize the toxicity of malachite green.

緒 言

Malachite green が鮭鱒卵の水生菌防止に効果ある事は既に 1936年 Foster, F. J. 其他に依つて知られたが 1949年 Roger E. Burrows は一連の精細な実験を行つて、本法が Roccal, Hyamine, Formalin 等より効力が確実であり、且つ経費も最小である事を確認した。彼は之れを Prog. Fish-Culturist (II) (397-102, Apr. 1949) 誌上に発表し、更に殺菌処理の具体的方法、使用液の最適濃度、使用器具等に就て極めて通俗的に、且つ具体的に記述し、本法の実施を各孵化場に推奨した。爾来米国々内の各孵化場には急速に普及される様になり、我国でも1953年(昭和28年)頃から一般に普及採用される様になつて今日に及んで居る。Malachite green 使用の効果は確かに顕著なものがあり、之れに依つて鮭鱒人工孵化の操作は著しく簡略化され、能率も増進した事は疑を容れない処であるが、唯 Malachite green は可なり強烈な毒物であるから、消毒作業の実施に当つては此点を深く念頭に置かないと不測の障害を起す事がないとは云はれない。依つて之等の点を明らかにし、予め危険を防止したい目的で二、三の補足的実験を行つたものである。

I Malachite green の永久比色標準液

Malachite green は適当な濃度ならば鮭鱒卵に顕著な害を与へる事なしに水生菌のみを駆除し得るが、或程度

以上に濃厚な溶液を用うると、水生菌のみならず鮭鱒卵其物にも害を及ぼすに至る。Roger E. Burrows は前記報告書中に、次の如き試験結果を掲げて居る。

Malachite greenの濃度	施用方法	結果
1/10,000	卵を唯1回60分間浸漬する	水生菌も卵も死ぬ
1/100,000	毎週2回60分間宛繰返し浸漬する	水生菌も卵も死ぬ。卵に対しては有害の最低濃度である
1/300,000	同上	水生菌は死滅する 卵には害を与へない

以上の結果から Burrows は 1/200,000 の濃度で毎週2回、1時間宛消毒を行うことが最良であると結論して居る。本場では現在 1/200,000~1/400,000 の濃度の液で毎週2回、1時間宛消毒するのを原則として指導して居るが、此程度でも大体効果は充分な様である。

消毒の実施方法は普通は孵化槽の給水管の直下に、濃厚な Malachite green 原液を定流式サイフォンを用いて予め計算した割合に加へ、孵化用水全部が Malachite green の所定の濃度になる様にし、此水を孵化槽内に一定時間(普通は1時間)流通させる方法が採られて居る。又時としては孵化室に導水する親樋に計算量の Malachite green 原液を加へ、用水全部を Malachite green の所定濃度の液とし孵化室収容卵全部を一時に消毒する場合もある。何れの場合にも先づ孵化用水の流量を極力正確に測定し、次で之れに加う可き Malachite green 原液の濃度と注加量を正確に計算することが必要である。此事は理屈は極めて簡単であるが、実際には色々困難な事情がある。例へば孵化用水の水量にしても正確に測ることは現場では中々困難であるし、孵化場に依つては此水量が必ずしも常に一定でない場合もある。又薬品の秤量、原液溶解用水の計測等に用うる計器類も必ずしも充分な精度を期待し得ない場合もないでもない。勿論消毒液の濃度の許し得べき幅は可なり広いものではあるが本来 Malachite green が可なり強い毒物である事から考へても、使用する消毒液の大体の濃度でも簡単に検出出来れば便利でもあり、又安全でもあろうと思う。之れが為めには比色に依るのが最も便利であるが、之れに用うる比色標準液としては Malachite green 其物を用うる事は出来ない。それは周知の如く Malachite green は日光の影響で時間と共に褪色する傾向があるからである。依つて Malachite green と同様な色調をもつた、他の安定な化合物の溶液を使つて永久比色標準液を作る事を考案した。

実験の結果次の処方が最も此目的に適する事を知り得た。

Malachite green 1/200,000 溶液と殆同様な色調をもつ永久比色標準液	
結晶硝酸銅 (Cu (NO ₃) ₂ · 3H ₂ O)	283.7gr.
ピクリン酸 (0.02%液)	39.2c.c.
以上を蒸溜水 1000c.c. に溶解する。	

以上の標準液は調製後一夜放置し、其上澄液を用うるか、或は乾燥濾紙で濾過して使用する。

茲には 1/200,000 の一例のみを掲げたが、其他の濃度に相当するものも、以上の割合から容易に計算することが出来る。例へば 1/100,000 に相当するものは上記の夫々二倍量の試薬を 1000c.c. に溶解し、又 1/300,000 に相当するものは上記の 2/3 量の試薬を 1000c.c. に溶解すれば得られる。猶實際に应用する場合には予め数個の同径のアンブル(内径2cm位が適当であらう)に幾つかの段階の標準液を熔封して何本かの永久比色標準管を作つて置き、之れと同径の試験管に槽内の消毒液を採つて比色標準管と比較すれば直ちに其濃度の概略を知り得るのであらう。

II Malachite green の魚に対する毒性

上述の如く Burrows は其報告中に Malachite green の鮭鱒卵に対する致死濃度を 1/100,000 内外であると

述べて居る。然し魚(殊に稚魚)に対する致死量に就ては触れて居ない。我国の多くの孵化場では孵化室の直下が養魚池になつて居り、孵化用水は直ちに養魚池に流入する様になつて居る。随つて消毒を行う場合には養魚池内の水も或る程度の濃さの Malachite green 溶液となる。斯かる場合養魚池内の稚魚に悪影響を及ぼす事はないか。此点を明らかにする目的で試験を行つた。

Malachite green の魚に対する毒性に就ては曾て本場大屋善延氏が鯉の仔魚及和金を用いて試験された結果がある。(マラカイトグリーンに依る鯉卵消毒試験, 水産試験報, 第10巻第1~2号, 112p, 1955) 之れに依ると, 1/100,000 濃度の液中で鯉の仔魚(体長 1.5~2.0cm)は2時間内に5尾中3尾死し, 残りの2尾は2時間後清水に移したが, 間もなく斃死した。1/200,000 では狂奔し平衡を失するものがあつたが2時間生存を続け, 之を清水に移した処最初から約3時間で全部斃死した, とのことである。1/300,000, 1/400,000 等の液中では多少不安な状態を示したものがあつたが2時間内に死したものはなく, 之れを清水に移しても翌日迄異常なく生存した。同氏は又 1/200,000 溶液中に浸漬する時間を1時間とし, 其後清水に移す方法で実験を繰返されたが, 鯉仔魚は溶液中で狂奔平衡を失し, 清水に移したる後3時間内に(最初から4時間)全部死し, 和金は溶液中では多少不安の状を示したが, 概ね平静を保ち, 清水に移行後も多少呼吸数が増加する程度で全部生存したと報じて居る。併し乍ら何れの場合にも溶液中に2時間以上浸漬して観測されたものはない。余は大屋氏の試験を追試すると共に更に長時間に亘る観測を行つた。

試験の方法

硝子製のバットに種々なる濃度の Malachite green 溶液の 1000c.c. 宛を入れ, 此中に和金(一年仔)若しくは鮭稚魚(孵出後30~40日内外のもの)を放ち, 全く死する迄に要した時間を観測した。(和金の場合は横臥する迄に要した時間も併せ記録した。)一回の試験に使用した試験魚尾数は和金は2尾内外, 鮭稚魚は10尾内外であつた。猶結果の余りに不規則なものは数回試験を繰返して其結果を平均した。

次に掲げたのは之等の試験結果で其内第1表は和金に就ての結果, 第2表は鮭稚魚に就ての結果である。

第1表 Malachite green の和金に対する影響

濃 度	試験液処方(c.c.)		横臥する迄に要した時間 (min)		全く死する迄に要した時間 (min)		備 考
	Malachite green 1/2,000sol	水	各個体毎	平均	各個体毎	平均	
1/80,000	25.00	水を加へて 1000 c.c.とす	75 95	85	95 105	100	試験中の水温 16~18°C
1/150,000	13.33	"	105 —	105	150 120	135	
1/200,000	10.00	"	165 180	173	175 215	195	
1/250,000	8.00	"	175 225	200	215 255	235	
1/300,000	6.67	"	210 215	213	240 260	250	
1/400,000	5.00	"	230 225	228	300 315	308	
1/500,000	4.0	"	290 330	310	360 370	365	
1/600,000	3.33	"	290 350	320	380 410	395	
1/800,000	2.50	"	1120 1180	1150	1150 1220	1185	
1/1,000,000	2.00	"	1440以上 1150 1220	1200~1300	1440以上 1220 1280	1440内外	
1/1,333,333	1.50	"	1280 1250 1440以上	1440内外	1440以上 1340 1440以上	1440以上	

第2表 Malachite green の鮭稚魚に対する影響

濃 度	試験液処方(c.c.)		全く死する迄に要した時間 (min)		備 考
	Malachite greenの 1/2000 sol.	水	各 個 体 毎	平 均	
1/80,000	25.00	水を加へて 1000c.c.とす	230, 240, 250, 250, 250, 260, 260, 275, 290, 290	259.5	試験中の水温 4~5°C
1/133,333	15.00	"	265, 270, 280, 280, 290, 290, 310, 310, 320, 330, 340, 390	306.3	
1/200,000	10.00	"	310, 390, 400, 420, 430, 480, 500, 570, 600, 630	473.0	
1/250,000	8.00	"	400, 440, 460, 470, 480, 500, 560, 620, 680	512.2	
1/300,000	6.67	"	460, 490, 540, 560, 570, 580, 600, 660, 720	575.6	
1/400,000	5.00	"	560, 590, 590, 610, 640, 650, 670, 710, 790	645.6	
1/500,000	4.00	"	765, 760, 780, 790, 820, 840, 880, 910, 950	826.1	
1/600,000	3.33	"	910, 940, 1010, 1030, 1080, 1080, 1100, 1140	1036.2	
1/800,000	2.50	"	1165, 1350, 1390, 1420, 1430, 1510, 1550, 1630, 1660, 1720	1482.5	
1/1,000,000	2.00	"	全部衰弱 横臥するも1440分以上全 く死するものなし	—	
1/1,333,333	1.50	"	一時横臥するものありしも、後回 復1440分以上比較的元気に游泳す	—	

即、和金は 1/200,000 の濃度では3時間余、1/250,000 では4時間弱、1/300,000 では5時間余 1/400,000 では約6時間、1/500,000 では6時間内外で死ぬ。1/800,000 では生存時間が急に長くなって20時間内外となり 1/1,000,000 で漸く1昼夜内外生き延びる。1/1,333,333 で始めて多くのものが1昼夜以上生命を保ち得る様になる。

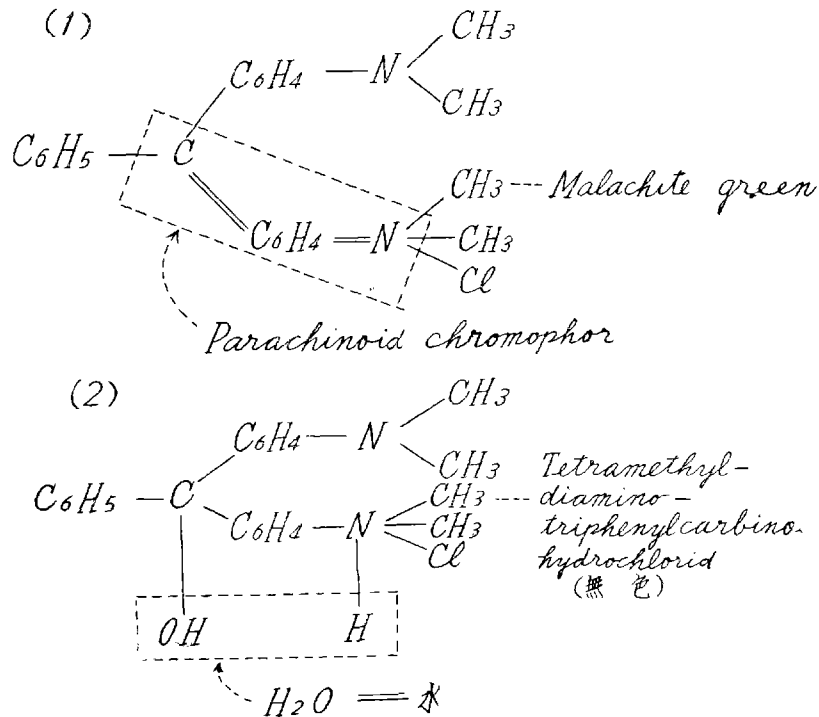
鮭稚魚は和金より幾分抵抗力が強い様であるが 1/200,000-で 5時間乃至10時間、平均 8時間位、和金より約 5時間永く生きる事が出来る。其他の濃度でも一般に 5~10時間和金より永く生命を保ち得る。而して1440分即 1昼夜内外で死ぬ程度の最小量は和金では1/1,000,000内外、鮭稚魚では 1/800,000 内外である。即魚に及ぼす毒性の強さは大体昇汞に匹敵する程度と見る事が出来る。

註……昇汞は曾て余の試験した結果では1/1000,000内外で1昼夜以内に山女魚を斃死させる。

Malachite green の毒性は以上の様に可なり強いものであるから鮭卵の消毒に使用した溶液が養魚池内に流入する様な場合には充分注意する必要がある。1/600,000 乃至 1/800,000 等の稀薄な溶液の場合、数時間では魚を斃死させる事はないが、長時間には斃死せしめると云う事は何等か生理的に障害を及ぼすものと考へる可きであらう。

III Malachite green の毒性の中和

元来 Malachite green は複雑な構造をもつた Tri-phenyl-methane 系の有機色素であつて、其分子構造の中に炭素と窒素を含み且つ二個の二重結合をもつた特殊の原子団(パラキノイド発色団, Parachinoid chromophor) を有して居り、この原子団の存在が発色並びに毒性の原因をなすものとされて居る。Malachite green と近縁のものに Methyl-violett, Phenylen-blau, Para-rosanilin, Fuchsin, 等があるが、何れも同様に Parachinoid chromophor を有し、同時に特殊の色と毒性を持つ。[参考の爲めに Malachite green の構造式を示すと下記(1)の如き形をして居り、その製造過程の一階梯前の化合物は(2)の如き形をした無色の化合物である。



(2)の点線で囲んだ部分は即、1分子の水であつて、これが煮沸によつて脱水されると(1)の形に変わり、此際2個の二重結合が出来、同時に特有の色が発現するのである。この呈色と毒性とが関係があるらしいと云う事から考へて先づ Malachite green を脱色する物質を捜索した。文献に依ると Malachite green はアルカリ及び還元剤に依つて脱色するとあるので、苛性曹達、硫化曹達、硫酸第一鉄、塩化第一錫、亜硫酸曹達等を試みたが、其内亜硫酸曹達が最も此目的に適する事を知つた。硫化曹達も可なり効果があるが、白色の沈澱物(硫化亜鉛?)を生じ硫化水素臭を残す。亜硫酸曹達は極めて少量の添加で殆無色となり、液は透明を失はず、何等の沈澱物をも生じない。試みに亜硫酸曹達の添加量と脱色の関係を試験したが、次の様な結果を得た。(第3表参照)

第3表 亜硫酸曹達の添加量と Malachite green 脱色の関係

Malachite green 1/2000 sol.(c.c.)	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0
水 (c.c.)	975.0	975.0	975.0	975.0	975.0	975.0	975.0	975.5	975.0
亜硫酸曹達 0.8%sol. (c.c.)	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0	5.0
色調 %	100.0	57.0	23.0	11.0	6.0	1.5	1.0	1.0	1.0
備考	(1/80,000) 本液の色調 を100とす								

即 Malachite green の1/80,000 液1Lに亜硫酸曹達の0.8%液を0.5c.c.加へると色調殆半減し、1.0c.c.では凡そ1/4、1.5c.c.では最初の濃さの11%内外、2.0c.c.では6%、2.5c.c.では1.5%程度迄脱色する。3.0c.c.以上加へると殆無色に近くなるが、猶原液(1/80,000)の1%程度の青色が微かに残存する。此の1%程度の青色は亜硫酸曹達を更に多く加へても完全には除き得ないようである。

兎に角微量の亜硫酸曹達の添加に依つて Malachite green の呈色の大部分を脱色し得ることが明らかになつたので、この脱色した Malachite green 液の毒性に就て、和金並びに鮭稚魚を材料として試験した。其結果を次に第4表、並びに第5表に掲げる。

第4表 亜硫酸曹達で脱色した Malachite green 液の和金に及ぼす影響

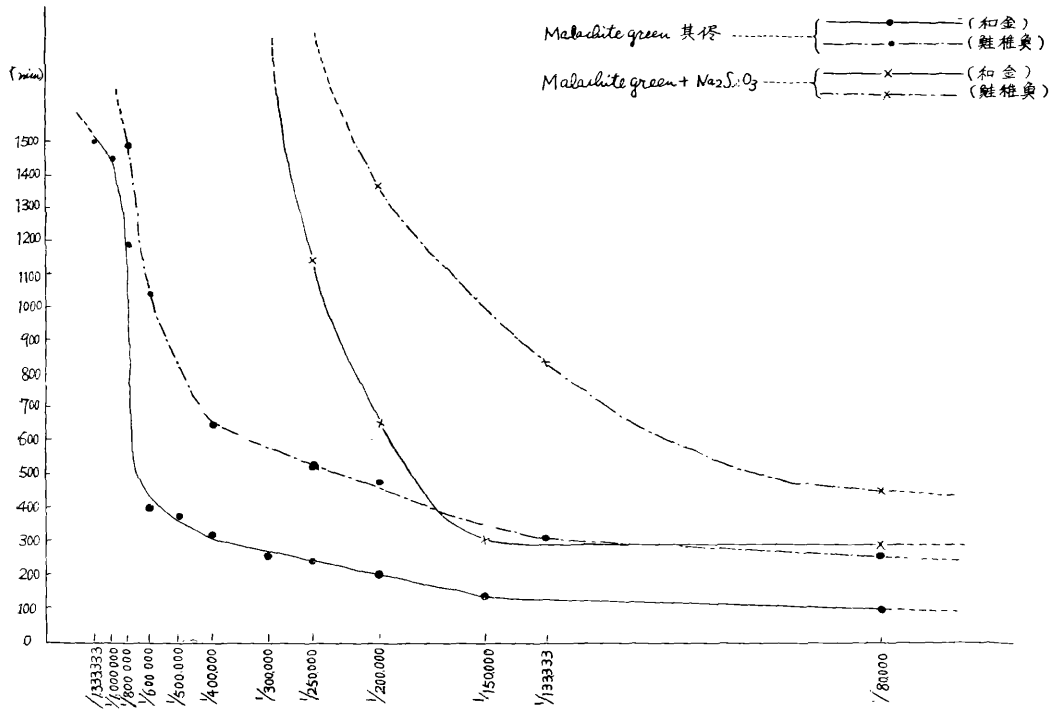
濃度	試験液処方 (c.c.)			横臥する迄に要した時間 (min)				全く死する迄に要した時間 (min)				備考
	Malachite green (1/2,000sol.)	水	亜硫酸曹達液 (0.8% sol.)	各 個 体 毎		平 均	各 個 体 毎		平 均			
1/80,000	25.00	水を加へて1000 c.c.とす	3.0	270	280	255	268	290	308	280	293	試験中の水温16~18°C
1/150,000	13.33	"	2.5	255	270		263	285	315		300	
1/200,000	10.00	"	2.0	500	430	580	503	600	620	720	647	
1/250,000	8.00	"	2.0	600	1280	1250	1040	700	1340	1360	1130	
1/300,000	6.67	"	2.0	1050	1440以上		1200	1300	1440以上		1440以上	
1/400,000	5.00	"	2.0	1440以上			1440以上	1440以上			1440以上	
1/500,000	4.00	"	2.0	1440以上			1440以上	1440以上			1440以上	
1/600,000	3.33	"	2.0	1440以上			1440以上	1440以上			1440以上	
1/800,000	2.50	"	2.0	1440以上			1440以上	1440以上			1440以上	
1/1,000,000	2.00	"	2.0	1440以上			1440以上	1440以上			1440以上	
1/1,333,333	1.50	"	2.0	1440以上			1440以上	1440以上			1440以上	

第5表 亜硫酸曹達で脱色した Malachite green 液の鮭稚魚に及ぼす影響

濃度	試験液処方 (c.c.)			全く死する迄に要した時間 (min)		備考
	Malachite green (1/2,000sol.)	水	亜硫酸曹達液 (0.8% sol.)	各 個 体 毎	平 均	
1/80,000	25.00	水を加へて1000 c.c.とす	3.0	325, 330, 365, 405, 475, 555, 565, 650	458.8	試験中の水温4~5°C
1/13,333	15.00	"	2.5	690, 750, 780, 800, 810, 850, 870, 910, 1030	832.2	
1/200,000	10.00	"	2.0	1110, 1220, 1270, 1300, 1350, 1430, 1490, 1510, 1550	1358.9	
1/250,000	8.00	"	2.0	一部横臥するものあるも1440分以上全部生存	—	
1/300,000	6.67	"	2.0	1440分以上一見異常なく生存す	—	
1/400,000	5.00	"	2.0	"	—	
1/500,000	4.00	"	2.0	"	—	
1/600,000	3.33	"	2.0	"	—	
1/800,000	2.50	"	2.0	"	—	
1/1,000,000	2.00	"	2.0	"	—	
1/1,333,333	1.50	"	2.0	"	—	

曩きに試験した第1, 2表の結果 (Malachite green 共儘の影響) 及び今回試験した第4, 5表の結果 (亜硫酸曹達を添加した Malachite greenの影響) を分り易く図示したものが第1図である。(但和金の場合の横臥曲線は省略した。)

(第1圖) Malachite green sol. 及び Malachite green sol. + Na₂S₂O₃ sol. の臭に対する致死曲線



以上の結果を通覧して次の事実を認めることができる。即

(1) Malachite green の毒性は少量の亜硫酸曹達を添加することに依つて著しく低下させることができる。24時間致死量を見ると(24時間内外で魚を殺す分量) Malachite green 其儘の液では 1/1,000,000 (和金) 乃至 1/800,000 (鮭稚魚) であるが、之れに少量の亜硫酸曹達を加へたものでは 1/300,000 (和金) 乃至 1/200,000 (鮭稚魚)(但何れも Malachite green としての濃度) である。Malachite green の1/500,000 の液では和金は5~6時間、鮭稚魚は10~14時間で死ぬが、之れに少量の亜硫酸曹達を加へたものでは何れも1昼夜以上何等異状なく生存する。

(2) 鮭稚魚は和金よりも抵抗力が強い。

前記の結果(殊に第1図) から見ると Malachite green 其儘のもの、並びに之れに亜硫酸曹達を加へたものを通じて一般に和金は鮭稚魚より短い時間で仆れる。両者の時間の相違は濃度に依つてまちまちであり、又甚不規則であるが、其時間は大凡鮭稚魚は和金の2倍内外である。但し一般に早期の稚魚は後期のものより多少抵抗力が強い様(換言すれば多少鈍感) であるから(此事は麻醉剤使用の際此傾向が見られる) 孵出後の時間(期) によつて、若干の相違がるかと思はれるが、之等の点に就ては今後の研究に俟つ。

何れにしても Malachite green は魚に対して可なりの程度に毒性がある。1/400,000 乃至 1/500,000 の濃度でも1~2時間では死なないが、4~14時間位で魚を殺す。随つて此程度の水の中に鮭稚魚を1~2時間でも置くと云うことは、仮令稚魚が死なない迄も、生理的に何等かの悪影響を及ぼすものと考へなければならぬ。

孵化場の設備の現状、並に現在行つて居る 鮭鱒卵消毒作業の実状から見て、養魚池内に或程度の Malachite green が流入することは免れ難いと思うが、其濃度が或限度以上に達する虞れのある場合には亜硫酸曹達を加へて其毒作用を中和する方が安全である。

(附) 亜硫酸曹達に依る Malachite green の毒力中和の方法。

前に試験した結果(第3表) から見て Malachite green の 1/80,000 液 1 L に亜硫酸曹達 0.8%液 3.0c.c. 加

へれば完全に脱色する事が分つて居るので、此割合で計算すると仮りに消毒廃液中の **Malachite green** の濃度が 1/300,000 であつたとすれば、廃液 1L に亜硫酸曹達0.8%液 0.8c.c. 加へれば良い事になる。即8.0%液ならば廃水 1L に対しては 0.08c.c., 同 1石 180L に対しては 14.4c.c. でよいと云うことになる。

廃液の濃度がそれより薄い時はそれより少ない量の亜硫酸曹達液を加へてもよい訳であるが、亜硫酸曹達は多少多く加へても、或限度以下(下記註参照)なら左したる悪影響はないから、大凡 1/300,000 以下と認められる廃液なら、その 1石に対し 8%亜硫酸曹達液 15.0c.c. 内外を目標として加へれば大体安全であろう。

(註)……曾て筆者の試験した処では、亜硫酸曹達の24時間致死量(24時間内外で魚を殺す量)は160mg/L内外、嫌忌極量(魚が嫌つて逃げる量)は 58.0mg/L 内外である。之れから計算すると24時間致死量は水 1石に対し亜硫酸曹達 8%液360c.c., 嫌忌極量は同じく水 1石に対し 130.5c.c. となる。それ故亜硫酸曹達を余りに大量(1石に対し 8%液で 100c.c. 以上)加へることは慎まなければならぬ。

廃液に亜硫酸曹達を加へると、暫時にして脱色するが多少攪拌すれば更に脱色が早い。それ故亜硫酸曹達を加へてから堰板を数回落下させるとか、或は適当に攪拌すれば更に宜しい。

廃水に亜硫酸曹達を加へる場所は孵化室の下流のなる可く上流(孵化室の直後)がよい。亜硫酸曹達元液を計算量宛注加する方法は **Malachite green** に使用すると同様な定流式サイホンを適当に調節して使う。

8.0%亜硫酸曹達液を作るには、水 1L に対し無水亜硫酸曹達 80.0gr. を溶解すればよい。但結晶亜硫酸曹達を使う場合には 7分子の結晶水がある為め分子量が大凡 2倍であるから以上の 2倍量、即 160.0gr. を水 1L に溶解すれば 8%液となる。

猶亜硫酸曹達液は時間の経過と共に漸次効力が衰へるから成る可く使用の都度溶解した方がよい。調製後数日間位なら若干効力が低下しても猶使用に堪えるが、1週間以上も経過したものは使はない方がよい。