

ノリ病害の細菌学的研究-Ⅲ

漁場海水とノリ葉体における細菌類の 消長, 特に病害関連細菌類の検出

藤 田 雄 二 ・ 小野原 隆 幸*

松 原 孝 之**・銭 谷 武 平

Bacteriological Studies on Diseases of Cultured Laver-III

Changes in bacterial population of farm-seawater and
laver, especially the detection of bacteria
associated with laver-diseases

Yuji FUJITA, Takayuki ONOHARA,

Takayuki MATSUBARA and Buhei ZENITANI

An epidemiological survey on the bacteria associated with laver-diseases was carried out with the sea water and laver fronds in Hama culture field, Saga, during the farming of laver.

The total heterotrophic bacteria were numerous found in sea water during the growth of laver frond and its harvest, namely from November to December. Chitinoclasts of bacteria were already distributed on laver buds at an early stage of cultivation. Whereas, xylan-decomposing bacteria were detected mainly from late November to January in sea water as well as in laver fronds.

In semi-selective isolation of bacteria associated with disease, 26 of 56 strains isolated were positive in the test of inoculation in vitro. *Vibrio*, causing green rot-like disease, were isolated from some diseased fronds, white rot, and also a healthy frond. Some strains of *Agarbacterium* and *Beneckeia* were detected and identified. Some chitinoclasts, causing frond reddening, are not yet identified. The strains of *Vibrio*, *Agarbacterium* and *Beneckeia* which were associated with laver-diseases were similar or related to the bacteria included in the phenons reported previously.

最近有明海のノリ養殖は病害の多発によって生産向上が阻害され, その対策を困難にしている。殊に病害が細菌性の疑いがある場合は, 発生要因が複雑であって, その原因の解明が一層困難である。

*佐賀県有明水産試験場, 佐賀県小城郡芦刈町永田 **佐賀県水産試験場, 佐賀県唐津市唐房

著者らは既に糸状細菌付着症^{1,2)} および緑斑病³⁾ の原因細菌を明らかにしたが、漁場細菌について疫学的な面まで追究するには至らなかった。そこで引き続き、病害関連細菌類⁵⁾ の性状からキチン・キシラン分解能を指標として選び、漁場海水における分布や葉体における出現状況などについて1970～1972年度の3ケ年に亘って疫学的調査と病害関連細菌の検出試験を行なった。

今回は、漁場細菌の消長、罹病葉体の菌相および検出した病害関連細菌の性状について報告する。

実 験 方 法

ノリ・海水の細菌検査用試料 ノリ葉体は佐賀県鹿島市浜ノリ漁場の試験網から、スサビノリ *Porphyra yezoensis* を定期的に採取し試料にした。病害発生時には、有明海の他の漁場産のノリも適宜に採取して供試した。海水試料は同試験地内の定点の海面下約30cm層からハイロート採水器を用いて無菌的に採水した。

一般有機栄養細菌・キチン分解細菌およびキシラン分解細菌の菌数測定法 菌数は葉体懸濁液あるいは海水を殺菌海水で逐次10倍希釈し、その1mlを試験培地に加える混釈平板法で測定した。葉体は殺菌海水で2・3回洗浄してから付着水分を殺菌口紙で吸い取り、湿重量1g宛を乳鉢中で無菌的に磨碎し10倍量の殺菌海水を加え懸濁液にした。

一般有機栄養細菌すなわち総生菌数・キチンおよびキシラン分解細菌数の測定には ZoBELL 2216E培地・0.5%精製キチン添加 ZoBELL 2216E培地およびキシラン分解細菌測定培地⁴⁾ をそれぞれ使用した。細菌の計数は20℃、10日間培養後に行なった。両多糖分解細菌はコロニー周囲に透明環の生成によってそれぞれ判別した。

病害関連細菌類の検出法 病害原因菌が確定すれば特殊の選択培地の考案も必要と思うが、今回は半選択的な方法を採用した。既報⁵⁾ の如く、緑斑型 (phenon III・IV) はキシラン分解性、赤変型 (phenon IIb) はキチン分解性で、両型はマンナン分解能を共有し、また緑斑・緑変型は寒天液化能が強力であった。そこで適当な菌数測定平板からキシラン・キチン分解細菌を、場合によっては寒天分解細菌を純離し、これらがマンナン分解陽性であれば病害関連細菌と推定した。これらの推定株について発病試験を行ない、葉体に変化を示せば病害関連細菌と確認した。

細菌の性状試験・同定は前報⁵⁾ に準じたが、*Beneckeia* 属については BAUMANN ら⁶⁾ の報告を参考にした。また性状は Table 3 に示した項目に若干の補足試験を行なった。

結 果

浜ノリ漁場における病害発生状況ならびに栽培管理

1970年度漁期： 採苗後平年より2℃前後高目の水温が続いたが、10月13日までは特に異常はみられていない。しかし、10月14・15日になると芽いたみ症が発生し、死細胞が急にふえ、脱落流失する幼芽が多くみられた。10月下旬になると病勢はとまり、二次芽がふえて来た。水温は下旬の後半になって平年並になった。このため、ノリの生育が遅れ、摘採は11月下旬に始まった。

12月にはいとあかぐされ病が発生し、中～下旬に蔓延した。被害網と冷凍網の張り替え

は、中旬以降逐次行なわれたが、下旬になると「疑似しろぐされ症（仮称）」に類似した病徴を示し、葉先から白変して流失する冷凍網が多く見られるようになった。このため、1月上旬で張り込みを中止し、中旬に全部のノリ網を撤去し、1週間漁場を空地にした後、下旬に再張り込みが行なわれた。しかし2月にはいと海水の栄養塩の不足からノリの色落ちが激しくなり、1月以降ほとんど生産をあげずに終漁した。

1971年度漁期：採苗後の発芽生長は順調で、11月上旬の後半に摘採が始まった。しかし、11月初めから壺状菌が出現し、また、中旬にはあかぐされ病も発生し、下旬になると末期症状になった。このため、12月3日までに全部のノリ網を撤去し、1週間漁場を空地にした後、12月11日から冷凍網の張り込みを行なった。

壺状菌は冷凍網にも見られたが、病勢の進行が緩慢で被害は小さかった。1月中旬になるとあかぐされ病が発生し、下旬には被害網がみられるようになり、逐次冷凍網と再張り替えが行なわれ、2月下旬には終漁した。

1972年度漁期：採苗後の発芽生長は順調で、11月下旬の後半に摘採が始まった。しかし10月末から壺状菌が出現し、11月中旬の終りには末期症状になった。このため、11月末までに全部のノリ網を撤去し、1週間漁場を空地にした後、12月8日から冷凍網の張り込みを行なった。

壺状菌は冷凍網にもみられ、1月上旬になると被害網がかなりみられるようになった。また、1月上旬にあかぐされ病が発生し、中～下旬に蔓延した。逐次冷凍網と再張り替えが行なわれたが、下旬から色落ちが激しくなり2月にはいと終漁した。

漁場の水温・塩分の変化、ならびに模式的に図示した病害発生の経過はFig. 1に示す。水温・塩分の変化から特に病害発生との関連性は指摘し得なかったが、1970年度の芽いたみ症発生には高水温の影響が一応考えられた。

漁場海水ならびにノリの細菌類

海水中の総菌数の変化：漁場海水中の一般有機栄養細菌すなわち総菌数 (Fig. 2) は、9月には夏季の影響で多いけれども、10月にはいとひとたび減少してから次第に増加した。11月下旬には、総菌数は 10^4 /ml以上に達し、その後多い場合には 10^5 /ml近くに増

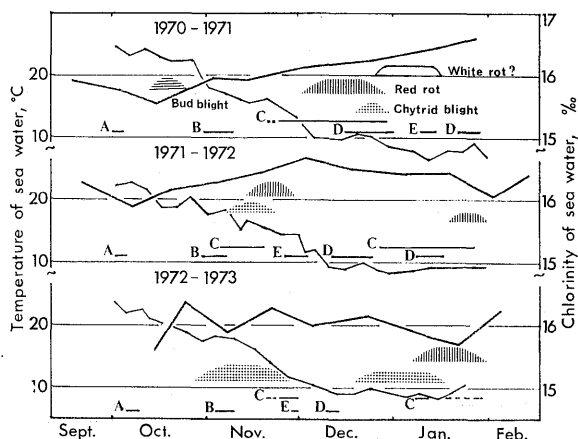


Fig. 1. Changes in the temperature and chlorinity of sea water, and occurrence of laver-diseases in Hama laver farm, Saga.

Management of laver farming:

- A : Netting for the collection of laver spores.
- B : Removing of nets for the reservation by freezing.
- C : Harvest of laver.
- D : Netting of reserved nets.
- E : Removing of all nets due to laver-disease.

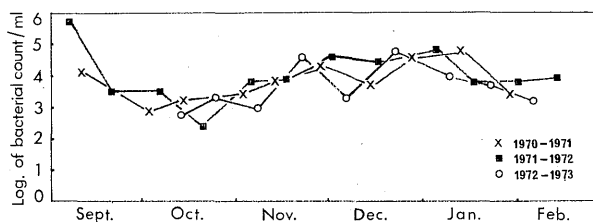


Fig. 2. Changes in the population of total heterotrophic bacteria in sea water at Hama laver farm, Saga.

Table 1. Bacterial population of fronds obtained from Ham laver farm, Saga during cultural season of laver.

No. of sample	Date of sampling	Bacterial counts / g. wet.			Appearance or symptom of sampled laver
		Total	CB	XB	
1	Oct. 15, '70	1.0×10^7	1.0×10^4	nd	Bud blight, ca. 0.5mm. About 15% reddening.
2	17	5.1×10^6	3.0×10^4	nd	" " , 2-3mm. " .
3 *	17	3.4×10^7	4.8×10^5	nd	" " , " . " .
4	Nov. 2	3.5×10^5	—	—	Some green spots.
5	13	4.5×10^5	2.5×10^4	nd	Growth-stopped laver after red spot.
6	28	3.2×10^3	nd	2.7×10^3	Fronds, ca. 9 cm. Good growth with less dirty.
7	Dec. 14	6.5×10^4	2.2×10	1.6×10	Fronds, 5-9 cm. Red spots slightly.
8 *	22	7.6×10^5	8.6×10	2.2×10^3	White rot ? with some Chytrid spots.
9	28	1.0×10^7	1.8×10^2	1.0×10^4	Red rot with whitish dirty.
10	Jan. 9, '71	1.3×10^7	1.7×10^2	2.1×10^5	White rot ?
11 *	9	2.9×10^6	1.8×10^2	2.0×10^4	White rot ?
12	13	1.0×10^7	5.0×10^4	mc	White rot ?
13	19	7.3×10^3	3.0×10^2	mc	Fronds, 3-4 cm. Good growth but slight reddish.
14 *	Oct. 30, '72	5.6×10^7	1.4×10^6	nd	Bud blight, lightly.
15 *	30	2.6×10^6	6.0×10^5	nd	Bud blight, intermediately.
16 *	30	7.0×10^7	1.2×10^6	nd	Bud blight, seriously.
17	30	2.8×10^6	1.0×10^6	nd	Healthy buds.
18 *	30	7.6×10^6	1.0×10^6	nd	Healthy buds.

* : Sample obtained from the other laver farm.

CB : Chitinoclastic bacteria, XB: Xylan-decomposing bacteria, nd: not detected, mc : Many colonies but not counted due to agar liquefaction.

Table 2. Occurrence of chitinoclaster and xylan-decomposing bacteria in seawater of laver farm.

Month	Chitinoclaster per ml						Xylan-decomposer per ml					
	1970-1971		1971-1972		1972-1973		1970-1971		1971-1972		1972-1973	
Sept.	17*	—	7*	12			17*	0	7*		4*	
			20	300					20	0		
Oct.	2	210	6	30	13	240	2	0	6	0	13	0
	14	500	20	50	24	200	14	0	20	0	24	0
Nov.	2	280	5	6000	7	40	2	0	5	0	7	0
	13	1100	17	16	22	50	13	0	17	16	22	2
	28	—					28	40				
Dec.	14	160	2	20	6	5	14	many	2	1	6	1
	28	60	17	900	22	30	28	3	17	120	22	3
Jan.	13	20	5	2700	9	25	13	30	5	1	9	7
	29	60	19	50	22	60	29	10	19	0	22	0
Feb.			1	200	5	30			1	0	5	0
			15	9					15	0		
Mar.			3	3					3	0		

* Day of sampling.

加することもあったが、水温の低い1月下旬には減少した。概して海水中の総菌数はノリの盛期・摘採期には増加している。

ノリ葉体の総菌数： 幼芽～成葉の総菌数（湿重量1g当り）はTable 1に示す。総菌数は外見上健全な幼芽・幼葉で 10^6 程度（試料17, 18），また成葉で 10^{3-4} （試料6, 7 および13）で、多数の有機栄養細菌類の存在を認めた。罹病葉体では幼芽・幼葉で 10^{6-7} 程度（試料1～3, 14～16）で、病害が進んだ成葉で 10^{6-7} であった。

キチン・キシラン分解細菌数： 1970年度に同漁場で発生した罹病葉体などについて、キチン・キシラン分解細菌の出現状況を見ると、10月発生の芽いたみ症葉体（試料1～3）にはキチン分解細菌数が 10^{4-5} であったが、キシラン分解細菌はほとんど検出し得なかった。1972年度の芽いたみ試料14～16でもキチン分解細菌が 10^{5-6} であった。しかし12月から1月にかけて発生した疑似しろぐされ症様葉体ではキチン分解細菌が少なかったが、キシラン分解細菌数が 10^{4-5} （試料10, 11）も存在した。幼芽から成葉へ、また発症への過程、あるいは時期によって菌相に変化がうかがわれる。

一方海水中の両多糖分解細菌の出現状況（Table 2）を見ると、キチン分解細菌は漁期前から既に分布しているが、キシラン分解細菌は11月にはいつてから漸く検出された。村上・藤沢⁷⁾ならびに藤沢・村上⁸⁾は、キシラン分解細菌は固形物上に付着増加し基質を分解すると思うと述べているが、海水から検出したキシラン分解細菌も葉体上で増加し、これが海水中に分散したのであろう。

おそらく谷口⁹⁾が同漁場で1963～1964年に認めたように、周年分布する¹⁰⁾ 付着性のキチン分解細菌などが、初期にはまず幼芽に着生増殖し、ノリ成育とともにキシラン分解細菌に移移してくるのであろう。この傾向は分離株のマンナン分解能にも認められ、11月に入ってから分離した菌株ではマンナン分解陽性株の出現率が高かった。

病害関連細菌類の検出と純離株の性状： キチン・キシラン分解細菌群には病害関連細菌が含まれる。1970年度に分離した病害関連推定56菌株について発病試験の結果、再現性のある26菌株を病害関連細菌と認めた。発病試験において当初顕著な病変を認めても、再試以後の試験で陰性化する菌株の存在も認められた。

病害関連菌株のうち保存中に死滅した4菌株を除いた22菌株について、菌学的性状を試験し、Table 3に示すようにⅠ～Ⅲ型に区別した。Ⅰ型は既報⁵⁾のphenon Ⅲの*Vibrio*、Ⅱ型はphenon Ⅱaの*Agarbacterium*、またⅢ型はphenon Ⅱbの*Beneckea*にそれぞれ一致あるいは近縁であった。しかしⅠc型はビブリオ殺菌剤0/129に非感受性であったが、他の性状の類似性ならびに*Vibrio alginolyticus*¹¹⁾のように同殺菌剤陰性種も存在する事実から、ここでは*Vibrio*と見なした。Ⅰc型はSHEWANら¹²⁾の分類法式に固執すると*Aeromonas*に該当すべきものである。なお赤変型5菌株の性状は未同定で、検討中のため省略した。

病害関連細菌の検出と試料との関係： 病害関連細菌としての再現性が確実な菌株について、その分離試料および発病型の関係をTable 4に示す。

芽いたみ試料2, 3からは赤変型のキチン分解細菌が検出された。芽いたみ症は生理的病害とされているが、赤変型病害関連細菌の接種によって実験的に類似症をおこす事実⁵⁾ならびに今回の観察例から細菌との関係についても再検討を要するよう思う。

疑似しろぐされ症、様の葉体からはいずれも緑斑病型の*Vibrio*と、試料によっては同時に*Agarbacterium*を分離した。実験的に疑似しろぐされ症をまだ再現し得ないが、緑斑病型菌は葉体全体を軟化・崩壊しやすくする性質がある。したがって生理障害葉体に接種した場合

Table 3. Characteristics of bacteria, associated with laver-diseases, isolated semi-selectively from fronds and sea water.

Characteristics	Type				
	Ia	Ib	Ic	II	III
Morphology	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Gram stain	—	—	—	—	—
Motility by flagella	P	P	P	P, MF	P
Kovacs' Oxidase	+	+	+	+	+
OF test in Hugh & Leifson	F	F	F	O	F
Pigmentation	—	—	—	+	+
Agar liquefaction	+	+3/4*	+	+	—
Alginate decomposition	+2/3	+	+6/7	+	—
Chitin decomposition	—	—	—	—	+
Sensitivities to					
Polymyxin B 100 u.	+	—~±	+	+	+
Vibriostatic agent 0/129	+	+3/4	—	+	—
Hydrogen sulfide production	+	+3/4	+5/7	—~+	+
Arginine dihydrolase	—	—	—	—	—
Ammonia from peptone	+	+	+	—~+	+
Methyl red test	+	+3/4	+	—~+	+
Voges-Proskauer test	—	—	—	—	—
Acid from glucose	+	+	+	+	+
galactose	+	+	+	—	—
xylose	+	+	+	—	—
cellobiose	+	+	+	—~+	+
mannitol	+	+	+	—~+	+
Starch hydrolysis	+	+	+6/7	+	+
Attack : xylan (straw)	+	+	+6/7	—	—
mannan (Konjak)	+	+	+	+	+
pectine	+	+3/4	+6/7	—	+
cellulose	—	—	—6/7	—	—
Gelatine liquefaction	+	+3/4	+	—	—
Number of strain	3	4	7	2	1
Type of disease in vitro		Green rot-like		Greening	Reddening
Suggested genera		<i>Vibrio</i>		<i>Agarbacterium</i>	<i>Beneckea</i>

P : polar flagellum, MF: mixed flagella, F : fermentative and O : oxidative.

* Number of strains, positive or negative / number tested.

は、緑斑病よりも病勢の進んだ病徴を現わすものと考えられるが、試験葉体が得難いために、未だ確認はしていない。この外、この *Vibrio* は外見上健全な葉体からも検出された。

考

察

養殖ノリに若し細菌性疾病がおきるとすれば、陸上植物の細菌病と同様にやはり宿主・病原菌・環境および非病原菌相の複雑な相互関係を考慮する必要がある。

ノリの細菌性疾病——緑斑病・疑似しろぐされ症もその疑いをもたれているが¹⁾——の発生

Table 4. Relations between specimens of laver and isolates.

No. of sample	Strain isolated and tested	Change in test pieces by inoculation
2	Chitinoclaster, 2 strains	Reddening of fronds.
3	Do., 2 strains	Do.
6	<i>Vibrio</i> , 8 strains	Green rot-like deterioration.
8	Chitinoclaster, 1 strain	Reddening of fronds.
9	<i>Beneckeia</i> , 1 strain	Do.
10	<i>Vibrio</i> , 3 strains	Green rot-like deterioration.
	<i>Agarbacterium</i> , 1 strain	Greening only at periphery of test pieces.
13	<i>Vibrio</i> , 2 strains	Green rot-like deterioration.
	<i>Agarbacterium</i> , 1 strain	Greening only at periphery of test pieces.
19**	<i>Vibrio</i> , 1 strain	Green rot-like deterioration.

** White rot-like fronds, Ryuo laver farm, Saga, January 21, 1971.

経過としては、まず異常葉体すなわち傷害部や軟弱～劣化葉面に一次的に着生増殖あるいは遷移過程で優先した病害関連細菌が主導的に葉面を犯し、この際他の腐生細菌類も共同的乃至付随的に作用し被害を拡大すると考える。細菌類がノリを犯すには着生細菌・分泌酵素が組織内部まで侵襲する必要がある、特に異常葉体では酵素が拡散・侵入しやすいように思われる。また分泌酵素による病害発現には細菌数が一定数以上に増殖する必要がある。

著者らが病害関連細菌とした細菌類は、漁期海水中には比較的によく分布する細菌群と思われる、特にいわゆる病原菌とは認め難い。正常に発育中の健全葉体では固有の細菌相が存在し、また、たとえ病害関連細菌が着生したとしても、組織内に細菌の侵入はもちろん、その分泌酵素の活性自体が阻害される¹³⁾と考える。したがって細菌性疾病が成立するとすれば、現在の処、誘因としてのノリ葉体が異常になる原因解明がとりわけ重要である。

この研究によって罹病葉体の細菌相変化の一面を確認し得たが、病気の種類によってはさらに適格な指標選定が要望される。そのため、葉体の分解に本質的に寄与する酵素系の解明が必要で、緑斑病菌ではノリ細胞壁や細胞間隙に存在するポルフィランの分解能¹⁴⁾が有力な一指標と考えている。また異常葉体に細菌接種した場合の病変や、ノリ細菌相の平衡の乱れが異常成長に導く¹⁵⁾とすれば細菌の混合接種試験など残された問題も多い。

要 約

漁場海水中の細菌数は、ノリ盛期・摘採期に多く、 $10^4/\text{ml}$ 前後に増加し、葉体の菌相を見ると漁期初期にはキチン分解細菌の着生を、11月に入るとキシラン分解細菌が増加した。

半選択的に検出した菌株の発病・性状試験から病害関連細菌 *Vibrio*, *Agarbacterium* および *Beneckeia* の諸型と少数の赤変型未同定キチン分解細菌が現場ノリ罹病葉に存在することを確認した。あわせてノリの細菌性疾病の成因について若干の考察を試みた。

文 献

- 1) 須藤俊造・斉藤雄之助・秋山和夫・梅林 修：のりの病気の種類とその病徴。東海区水研業績 E, 18, 23~26 (1972)
- 2) 藤田雄二・銭谷武平：アサクサノリの葉体に着生する糸状細菌 *Leucothrix mucor*—I。一般微生物学的性状ならびに発育環境要因について。本誌, 22, 81~89 (1967)
- 3) 中尾義房・小野原隆幸・松原孝之・藤田雄二・銭谷武平：ノリ病害の細菌学的研究—I。細菌による緑斑病様障害の実験的発症。日水誌, 38 (6), 561~564 (1972)
- 4) 藤沢浩明・村上正史・浜田盛承・瀬良洋：海洋中のキシラン分解細菌に関する研究—I。好気性 β -1, 4'キシラン分解細菌の分離, 計数法について。日水誌, 33 (5), 438~447 (1967)
- 5) 藤田雄二・銭谷武平・中尾義房・松原孝之：ノリ病害の細菌学的研究—II。養殖ノリの病害関連細菌類。日水誌, 38 (6), 565~569 (1972)
- 6) P. Baumann, L. Baumann and M. Mandel : Taxonomy of marine bacteria: the genus *Benckeia*. *J. Bacteriol.*, 107, 268~294 (1971)
- 7) 村上正史・藤沢浩明：海洋中のキシラン分解細菌に関する研究—II。沿岸海域における β -1, 4'キシラン分解細菌の分布。日水誌, 34 (12), 1124~1130 (1968)
- 8) 藤沢浩明・村上正忠：同前—IV。沿岸海域における β -1, 3'キシラン分解細菌の分布について。日水誌, 36 (7), 741~747 (1970)
- 9) 谷口忠敬・藤田雄二・銭谷武平：浅海域の微生物学的研究—II。多糖類分解能から見た有機栄養細菌群構成の季節的变化。本誌, 21, 243~249 (1966)
- 10) D. W. Lear, Jr. : Occurrence and significance of chitinoclastic bacteria in pelagic waters and zooplankton. In Symp. Mar. Microbiol. ed. by C. H. Oppenheimer. C. C. Thomas Publisher. Illinois, 594~610 (1963)
- 11) R. R. Colwell : Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio* : Numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *J. Bacteriol.*, 104 (1), 410~433 (1970)
- 12) J. M. Shewan, G. Hobbs and W. Hodgikiss : A determinative scheme for the identification of certain genera of Gram-negative bacteria with special reference to the Pseudomonadaceae. *J. appl. Bacteriol.*, 23, 379~390 (1960)
- 13) J. M. Sieburth : The influence of algal antibiosis on the ecology of marine microorganisms. *Ad. Microbiol. Sea*, 1, 63~94 (1968)
- 14) 藤田雄二：ノリに緑斑病様障害をおこす細菌の粗酵素による葉体崩壊。日水誌, 39 (8), 911~915 (1973)
- 15) J. Tsukidate : Microbiological studies of porphyra Plants—III. Abnormality on the growth of *Porphyra* plants by the disturbance of the bacterial flora accompanying the plant. *Bull. Nansei Regio. Fish. Res. Labo.*, No. 4, 1~12 (1971)