

前述と同じ方法で行った。

### 3. 病原細菌の産生物質

**物質の調整法** 実験には前の実験で作製した培養ろ液を、 $\times 12,000$  g, 30分間の高速遠心を行い、その上澄み液を凍結乾燥により 1 ml あたり 0.03 g の乾燥物に濃縮したものを供した。

**ゲルろ過** カラムには内径が20mm, 高さが760mmのガラス管を用いた。物質が分子量1,000以下であると推測されたことから、ろ過剤には蒸留水で膨潤させた Sephadex G-15 (Pharmacia 製) を用いた。流速は毎時30 ml とし、溶出は各試験管ごと 2 ml とした。ろ過は10°Cの恒温室で行った。カラムを使用する前にはブルーデキストラン (Pharmacia 製) を用いてあらかじめ、ポイドボリュームを測定した。試料として、乾燥物に濃縮した 0.2 g を 4 ml の蒸留水に溶かした液を展開した。各画分は凍結乾燥し、病原性の検討に供した。

**発症試験** 試験には冷凍保存していたノリ葉体を解凍後、18°Cで3日間培養して供した。供試葉体に対する病原性の試験法は、凍結保存された各画分に30.0%の海水を 1 ml ずついれて (pH8.0) 前述のノリ葉体を3時間浸漬したのち、淡水に10分間浸漬して原形質吐出の状況を観察した。

### 4. 産生物質の特性

本項では、前項のゲルろ過で得られた物質が、どのようなものであるか、薄層クロマトグラフィーにより検討した。

**物質の推定** 薄層クロマトグラフィーによって物質の推定を行った(滝谷・鈴木, 1991)。前項で分画した溶液は、20 $\times$ 20cm のワコーゲル FM プレート (和光純薬製) にスポットし、1-ブタノール-酢酸-水 (3:1:1, V/V) およびクロロホルム-メタノール-水 (68:28:8, V/V) の溶媒で、それぞれ125, 60分間展開した。展開後はニンヒドリン法 (Plummer, 1991) によって発色させ物質の確認を行った。

## 結 果

### 1. 病原細菌の培養ろ液による発症試験

培養ろ液による発症試験の結果は、Table 18 に示すとおりである。RS-5LY 株では病原性が認められ、その症状は Fig. 35 に示すように実験ノリ葉体を淡水につけると、本病の症状と同じ原形質吐出が観察され、吐出率は30%以上となった。なお、培養ろ液中の細菌数は $10^9$ 個/mlであった。

**Table 18.** Pathogenicity of the culture filtrate of isolate from "Suminori" diseased nori thalli

Isolate	Pathogenicity* <sup>1</sup>	
	RS-5LY	11-30%* <sup>2</sup>
Cotrol	none	none

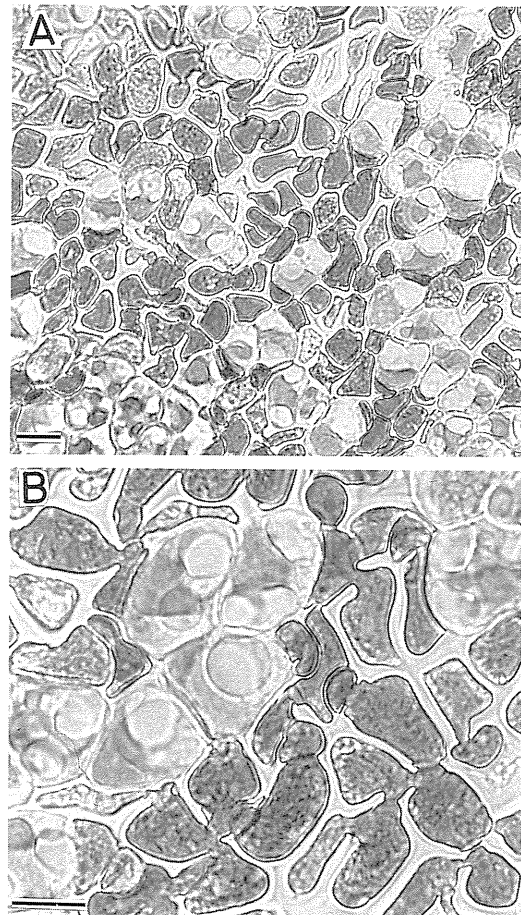
\*<sup>1</sup> Tested at 3 hours after immersion into the culture filtrate.

\*<sup>2</sup> Percentage (%) of burst and discharge ratio of protoplasm after dipping into fresh water for 10min.

\*<sup>3</sup> Hypertrophy of vacuole.

### 2. 産生物質の性状

産生物質の性状を知るために、種々の処理を行ったのちのろ液による発症試験を行った結果は、Table 19 に示すとおりである。ゲルろ過および凍結乾燥したものでは、無処理区と比べてもほとんど変わらない病原性が認められたが、加熱および高圧蒸気滅菌したものでは、病原性が弱くなって液胞の肥大が認められるにとどまった。



**Fig. 35.** Micrographs of burst and discharge of protoplasm after dipping nori thalli into fresh water for 15 min. Nori thalli immersed in the culture filtrate of RS-5LY for 3 hours. Scales = 10 $\mu$ m.

また、分画分子量1,000以上を透析し残った内液では、病原性はまったく認められなかった。

### 3. 病原細菌の産生物質

ゲルろ過で得られた画分の病原性を検討した結果は、Fig. 36 に示すとおりである。すなわち、フラクション No. 95~104 においては、Fig. 37-A, B に示すように、ノリ葉体を淡水に10分間浸漬すると、原形質吐出が観察され、病原性が認められた。また、このノリ葉体を38°C、40%の条件で2時間乾燥して表面を観察したところ、乾製品スミノリの表面観と同じ様な凹凸が観察された (Fig. 37-C, D)。したがって、フラクション No. 95~104 における物質が、原形質吐出を起こす物質であることが明らかとなった。

### 4. 産生物質の特性

前項で得られた画分のうち、フラクション No. 61, 79, 94, 100 の画分を薄層クロマトグラフィーに展開したのちのパターンは、Fig. 38 に示すとおりである。1-ブタノール-酢酸-水を用いた展開では、病原性を示した画分であるフラクション No. 100 において Rf 値が0.43 のところに黄色のスポットが明瞭に表れた (Fig. 38-A)。病原性を示さなかった画分では、黄色の発色は表れなかった。クロロホルム-メタノール-水を用いた展開では、フラクション No. 61, 76, 94 では赤褐色の展開像が表れ、No. 100 においては、まったくスポットは表れなかった (Fig. 38-B)。

## 考 察

第1節の発症試験において、強い病原性を示した菌株を用いて培養ろ液を作製し、その液にノリ葉体を浸漬したところ、養殖場で観察される症状と同じような症状がみられた。したがって、病原細菌は培養したのちのろ液中に本病の症状をひき起こす物質を産生していると考えられる。

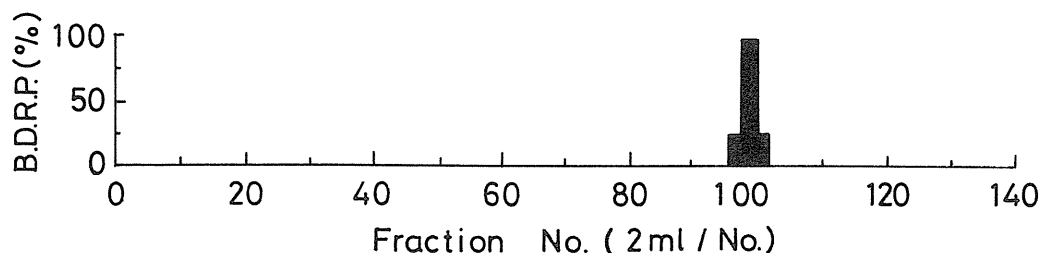


Fig. 36. Pathogenicity of fraction separated by gel filtration, Sephadex G-15. Void volume, 90 ml.

Table 19. Changes in pathogenicity of culture filtrate after chemical treatment

	Hours after treatment	
	2	5
100°C (10 min.)	-*1(+)*2	-(++)
121°C (15 min.)	-(+)	-(++)
Dialysis (12,000)	-(-)	-(-)
Dialysis (5,000)	-(-)	-(-)
Dialysis (1,000)	-(-)	-(-)
Gel filtration		
L. G. C (5,000)	+(+)	+(++)
Lyophilization	+(+)	+(++)
Control	+(+)	++(+++)

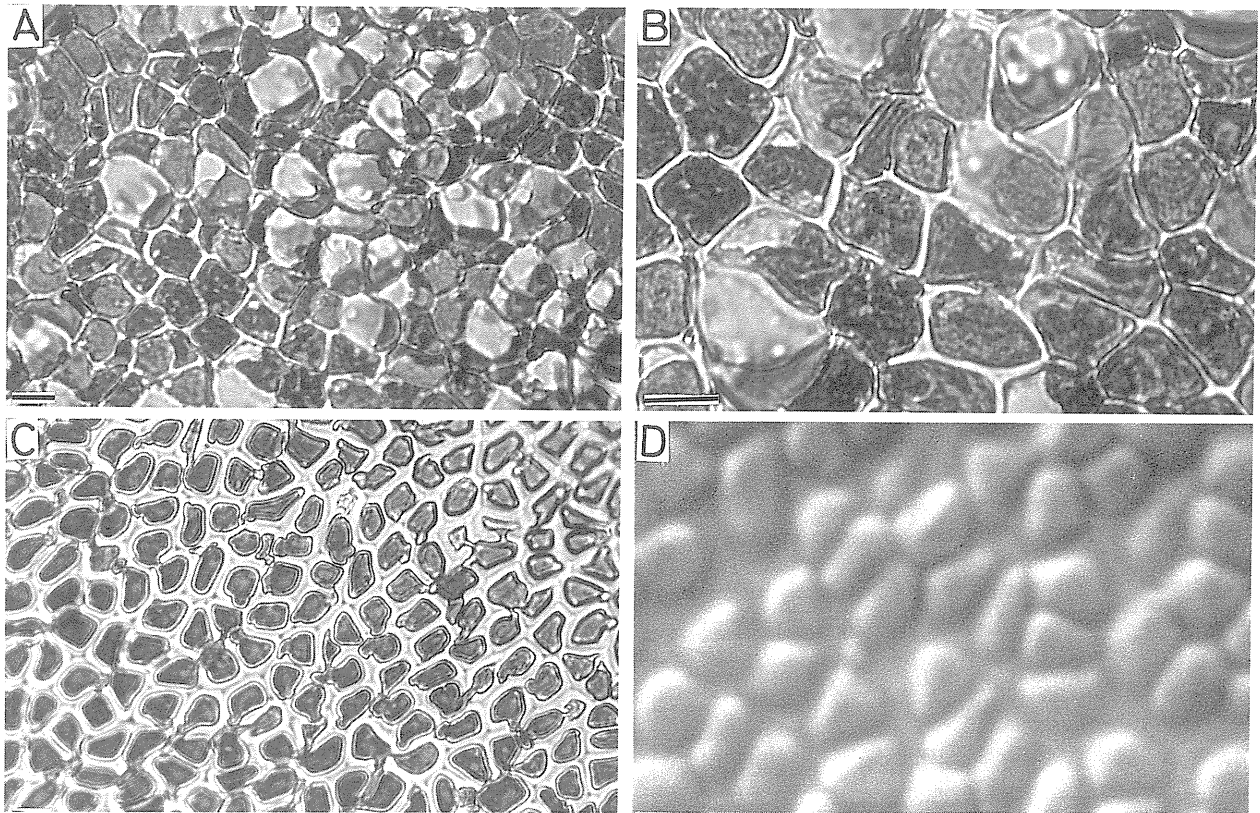
\*1 Percentage (%) of burst and discharge ratio of protoplasm after dipping into fresh water for 15 min. -, none; +, > 5%; ++, 5-10%.

\*2 Hypertrophy of vacuole. -, none; +, light; ++, heavy.

さらに、そのろ液に対して各種の処理をしたもので、発症試験を行ったところ、ゲルろ過および凍結乾燥したものでは、無処理区と比べてもほとんど変わらない病原性が認められたが、加熱および高圧蒸気滅菌したものは、病原性が弱くなった。また、分画分子量1,000以上を透析したのちの内液では、病原性はまったく認められなかったことから、産生物質は熱に比較的安定で、分子量は1,000以下であると推定された。

ゲルろ過を行って得られた物質のうち、フラクション No. 95~104 の画分で原形質吐出が発症した。したがって、病原細菌の産生物質が原形質吐出症状を起こしていることが明らかとなった。さらに、その画分を薄層クロマトグラフィーによって検討したところ、明瞭な黄色のスポットが表れ、アミノ基が付いていることが推測された。

今までに、ノリ葉体に病原力を及ぼす物質としては、



**Fig. 37.** Light micrographs (A-C), scanning electron micrograph (D) of symptoms. Burst and discharge of protoplasm after dipping the infected nori thalli into fresh water, A, B, for 10 min; C, for 40 min; D, after dried at 38°C, humidity 45% for 2 hours. Scales=10 $\mu$ m.

緑斑病様障害ではノリ葉体の組織を崩壊させるものとして、ポルフィラン分解酵素が関与していると考えられており(藤田, 1973), 穴あき症ではマンナン, キシラン, ポルフィラン分解酵素が関与していると考えられている(土屋, 1984)。ノリ養殖における細菌性疾病の病原物質としては, いずれもノリ葉体の細胞壁にある多糖類を分解する酵素が知られている。しかし, 本研究で得られた産生物質は低分子量で熱にも比較的安定であることから, 細胞壁などの組織を分解する酵素ではないと考えられる。ただ, 養殖場でみられる本病の病徴としては, 原形質吐出症状だけでなく, 種々の症状がみられるため, 前述のような酵素はこのような症状の発現に関与しているものと考えられる。本病は淡水にノリ葉体を浸漬することによって初めて起きる病気であり, 片山ら(1981), 瀬古ら(1984)は本病でみられる原形質吐出には浸透圧が関係していることを指摘していることから, この産生物質が浸透圧の調整機能を破壊するような物質である可能性も考えられる。

浸透圧の調整を阻害する物質としては, *V. cholerae* 培養液から耐熱性, 透析性のナトリウムポンプの障害物

質が得られている(新井編, 1981)。陸上栽培植物の分野においては, 病原性に関する研究は, かなり進んでおり(Dickinson and Lucas, 1986; 浅田ら, 1991), 病原細菌は毒素, 植物ホルモンおよび菌体外多糖類などの発病因子を産生し, 病徴をつくとされている(浅田ら, 1991)。本研究において病原性を示したような1,000以下の低分子物質としては, タブトキシン, ファゼオロトキシン, タゲチトキシン, コロナチン, シリンゴマイシン, シリンゴトキシン, リゾビトキシン, フェルベヌリン, トキソフラビン, トロポロン, 3(メチルチオ)プロピオン酸, アルピシジンなどの毒素が記載されている(後藤, 1981, 1990)。さらに, ナシ黒斑病菌 *Alternaria kikuchiana* Tanaka の A-K 毒素は, 感受性細胞の原形質膜の機能と構造に影響を与えるとされ(Park, 1977), エンバク苗立枯病菌 *Helminthosporium victoriae* の毒素であるビクトリンは, 細胞の透過性に対して影響を与えられると考えられている(Dickinson and Lucas, 1986)。今後, 産生物質の構造解析が行われることによって, これらの物質と比較することができると考えられる。また, この産生物質を用いた病理学的な研究が進められ

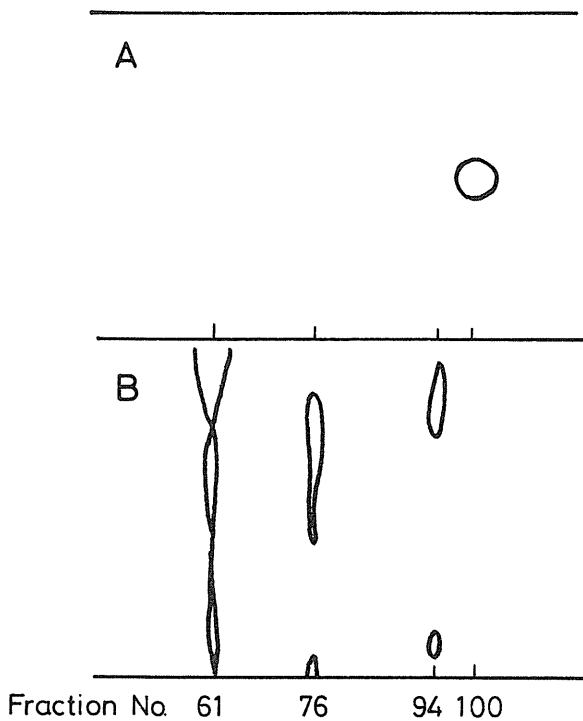


Fig. 38. Thin-layer chromatographs of fractions obtained from gel filtration. Developing solvent, Distilled water; A, 1-Butanol-Acetic acid-Distilled water (3:1:1); B, Chloroform-Methyl alcohol-Distilled water (68:28:8).

ることによって本病の発病機作が解明されると考えられる。

#### 第4節 摘要

本章ではノリ葉体から細菌を分離し、その分離菌のノリ葉体に対する病原性を、分離菌を接種する方法を用いて検討した。そして、病原性を示した菌株の分類に関する検討を行った。さらに、発症試験で病原性が強かった菌株が、ブイヨンで培養したのちのろ液でも病原性を示すかどうかを確認し、ろ液に含まれている産生物質がどのような性状であるかを調べた。そして、病原菌から産生物質を抽出して、どのような物質であるかを検討した。

まず、1985、1990年度に佐賀県有明海、1991年度に佐賀県有明海と唐津湾でみられた本病ノリ葉体から細菌を分離し、発症試験を行った。その結果、分離した8菌株は、養殖場でみられる原形質吐出症状をひき起こし、また、それぞれ接種した細菌が再分離できた。今回のように、同一ノリ葉体から分離した数種の細菌が病原性を持つこと、藤田・楠(1986)が、*Flavobacterium* 属で病原

性を確認していることから、本病を発症させる細菌は数種あり、それぞれで病原力が異なるものと考えられる。

ノリ葉体の緑斑病を起こす細菌は、ポルフィラン分解酵素を分泌し、細胞壁の一部を破壊し葉体を崩壊するため、ポルフィランなど細胞壁構成成分を直接分解すると考えられている(藤田, 1973)。ところが、本病の場合、実際の養殖場でみられる本病ノリ葉体や発症試験で原形質吐出症状を起こしたノリ葉体は、通常の海水中には、液胞肥大は観察されるものの、正常ノリ葉体と比べて表面の形状になんらの相違も認められていない。したがって、本病の原因細菌は、緑斑病の原因細菌のように細胞壁分解酵素は分泌していないか、あるいは少ないと考えられる。

水温を変えて発症試験を行ったところ、養殖場で本病が発生した時の水温条件において病原性が著しかった。この水温条件はノリ葉体の生育適温とされる温度よりもやや低い条件であった(右田・川村, 1981)。また、実際に使用するノリ葉体を冷凍保存条件を変えて供試し発症試験を行った。その結果、冷凍保存条件として適正温度でないとされる $-20^{\circ}\text{C}$ に冷凍保存されたノリ葉体に接種した試験区で、発症が著しかった。これらのことは生理状態が悪いノリ葉体では発症が著しくなることを示唆している。

病原菌株の形態学的、生物学的、生理学的ならびに生化学的性状および蛋白質分解性状を調べ、分類学的検討を行った。すなわち、発症が著しかったDY-1219 4Y, RS-5LY, KS-4Y 株では、共通している性状が多く、これらの菌株が有する性状が発症と深い関係があると考えられた。

*Flavobacterium* 属細菌は、グラム陰性、好氣的、色素産生、カタラーゼ、オキシターゼは陽性、カゼインとゼラチンを分解する。この菌株は本病の原因菌の1種で、*Flavobacterium* 属の新種であると考えられる。KS-4Y 株は、DY-1219 4Y 株の性状と比較すると、エスクリン分解、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ産生性、糖からの酸の産生性で異なるほか同一であり、近似の種と考えられる。

*Vibrio* 属細菌はグラム陰性、桿菌、運動性、オキシターゼは陽性、糖を発酵的に分解するとされている。Bergey's Manual 9版(1984)に記載されている *Vibrio* 属の24種と同じ性状であったのは、桿菌、グラム陰性、鞭毛、運動性、3.0%NaCl・ $20^{\circ}\text{C}$ での生育、糖を発酵する、グルコース、フラクトース、マルトースからの酸の産生性であった。緑斑病様を起こした *Vibrio* 属と同じ性状を示したのは、非色素産性、NaCl 要求性、オキ

シターゼ陽性、糖を発酵する、VP 反応、アルギニン脱炭酸、ゼラチン液化性、寒天加水分解性、キシロース、グルコース、スクロース、マニトールからの酸の産生性であった。

ここでは、遺伝子レベルでの分類学的検討は行っていないので、それぞれの菌株は、分類学上の位置としては *Flavobacterium* 属あるいは *Vibrio* 属として同定するのが妥当であると考えられた。

強い病原性を示した菌株を用いて培養ろ液を作製し、その液にノリ葉体を浸漬したところ、養殖場で観察される原形質吐出症状と同じ症状がみられたことから、ろ液中に本病の症状をひき起こす物質が産生されていると考えられる。さらに、そのろ液に対して各種の処理をしたもので、発症試験を行ったところ、加熱したろ液では病原性が認められ、分画分子量1,000以上を透析したのちの内液では、病原性は全く認められなかったことから、産生物質は熱に比較的安定で、分子量は1,000以下であると推定された。

ゲルろ過を行って得られた画分を用いて発症試験を行ったところ、養殖場で観察される原形質吐出症状と同じ症状がみられたことから、病原細菌は原形質吐出症状を起こす物質を産生していることが明らかとなった。さらに、その画分を薄層クロマトグラフィーによって検討したところ、アミノ基が付いていることが推測された。

本研究で得られた産生物質は、低分子量で熱にも比較的安定であることから、細胞壁などの組織を分解する酵素ではなく、浸透圧の調整機能を破壊するような物質である可能性も考えられる。また、養殖場でみられる病徴としては、原形質吐出症状だけではなく、ほかの症状も観察される。病原細菌の性状としてあげられた強い蛋白質分解活性などは、これらの症状の発現に関与していることが考えられる。今後、産生物質の構造解析を行い、特性を明らかにするとともに、産生物質を用いた病理学的研究を進めて、本病の発病機作を解明すべきであると考えられる。

## 第6章 病原細菌の消長に関する研究

ノリ養殖における細菌性疾病として、糸状細菌付着症(片山・本田, 1967; 藤田・銭谷, 1967, 1969), 緑斑病(中尾ら, 1972; 藤田, 1973; 斉藤, 1973), 橙胞病(林ら, 1982) および穴あき症(土屋, 1984) などがあげられ、疑いのある疾病として、疑似しろぐされ症(須藤, 1973; Tsukidate, 1977) があげられる。しかし、い

れの病気も疫学的な研究は、ほとんど行われていない(藤田ら, 1973; 月舘, 1973; 土屋, 1984)。

第4章第3節において、養殖場におけるノリ葉体付着細菌数の変動を調べ、本病の発生に細菌が関与していることが推測されたので、第5章において、本病のノリ葉体から細菌を分離し発症試験を行ったところ、病原性が確認され、しかも、その病原菌株は病原物質を産生することが明らかとなった。

そこで、本章では本病が発生した年と発生しなかった年における病原細菌の変動と付着細菌相を養殖場において精査し、どのような細菌が原因細菌となっていたかを検討した。

### 第1節 発生と病原細菌の消長との関係

本節では佐賀県有明海ノリ養殖場の同一地点において、本病が発生した年である1990年度と発生しなかった1991年度においてノリ葉体付着細菌を精査し、1990年度に発生した本病の原因細菌について検討した。

### 材料および方法

#### 1. 本病の発生とノリ葉体の生長

陸上で人工的に採苗したナラワスサビノリ *Porphyra yezoensis* f. *narawaensis* Miura を1990年10月5日、1991年10月6日に、それぞれ Fig. 24 に示す佐賀県福富町地先2.8kmに位置するセンターの六角川試験地の St. 3 に張り込み実験網とした。この網から、無菌的にノリ葉体を持ち帰って実験に供した。本病の発生を把握するため、持ち帰ったノリ葉体を室温で淡水に浸漬して10分経過したのち、前述のとおり原形質吐出率(%)として表示した。ノリ葉体の生長は、2cmの実験網に付着するノリ葉体の長いほうから10本を選び、葉長を計測して平均値で表した。

#### 2. ノリ葉体付着細菌数と病原細菌の変動

ノリ葉体の付着細菌数は、実験室に持ち帰り、ただちに、前述の方法に準じて、20°Cで10日間培養したのち、発生したコロニーを色調から黄色菌、橙色菌、白色菌、その他の菌に分けて計数し測定した。そして、ノリ葉体付着細菌数は、1gあたりの数に換算して表示した。なお、RS-5LY 菌株数は、常法により家兎抗血清を作製し、それに対するスライド凝集試験で陽性を示した菌株を同一菌株とし計数して測定した。

結 果

1. 本病の発生とノリ葉体の生長

本病の発生とその時のノリ葉体の生長は、Fig. 39 に示すとおりである。1990年度は本病の程度を表す原形質吐出が、冷凍網張込み2日後に観察され、18日後には原形質吐出率37%と最もひどくなり、その後は急激におさまった。1991年度には、本試験地において本病は発生しなかった。

冷凍網期のノリ葉体の生長は、本病が発生した1990年度よりも発生しなかった1991年度が良好であった。

2. ノリ葉体付着細菌数と病原細菌の変動

試験養殖場におけるノリ葉体付着細菌数の変動は、Fig. 40 に示すとおりである。付着細菌数の変動は、両年度ともに漁期当初少なく徐々に増加するといった傾向がみられた。ただ、発生した1990年度は発生しなかった1991年度よりも、2~10倍ほど細菌数が多く、秋芽網期34日後の第1回摘採までほぼ $10^7$ 個/g台で変動し、漁期後半になると $10^8$ 個/g台にまで増加した。冷凍網期になると、細菌数は張り込み直後 $10^6$ 個/g台であったが、3

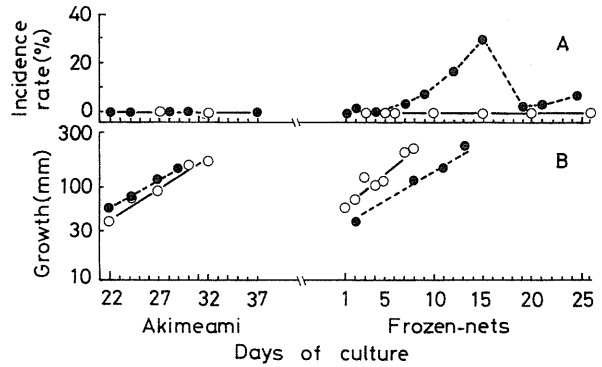


Fig. 39. Changes in the burst and discharge ratio of protoplasm with "Suminori" disease (A) and the growth of nori thalli (B). ●, 1990 ; ○, 1991.

日後には $10^8$ 個/g台にまで急増し、以後、 $10^7$ 個/g台で、本病が最もひどかったときには $2.4 \times 10^7$ 個/gとなった。12月下旬には再び増殖し $10^8$ 個/g台であった。とくに、1990年度では、第5章第1節の発症試験において原形質吐出を発症させた淡黄色菌であるRS-5LY株が、原形質吐出の変動と比例して増加し、4日後には最大となり、全細菌数の82%、 $1.4 \times 10^8$ 個/gとなった。この菌は原形質吐出率が低下するとともに減少した。いっぽう、1991年度にはRS-5LY株は、漁期を通じて計数されるもの

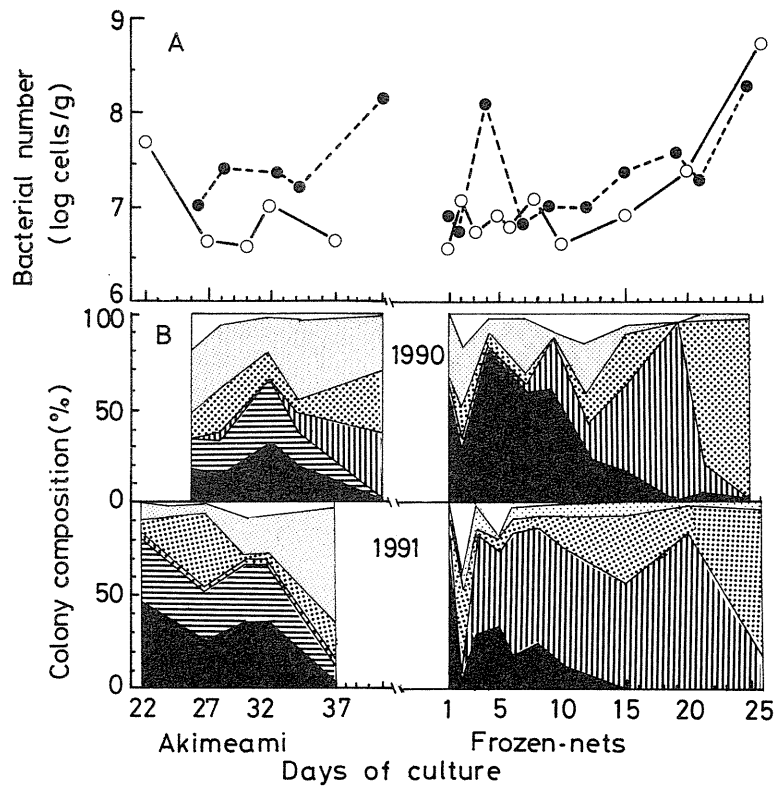


Fig. 40. Changes in the bacterial number (A) and its colony composition (B) on cultured nori thalli at St. 3 in 1990 and 1991. ●, 1990 ; ○, 1991 ; ■, RS-5LY strain ; ▨, light yellow ; ▩, yellow ; ▪, orange ; ▫, white ; □, others.

の、 $10^6$ 個/g の水準以下と少なかった。

コロニーの色調については、両年度の秋芽網期における淡黄色菌、黄色菌、橙色菌、白色菌の割合は、大差なかったが、両年度ともに冷凍網期に比べると白色菌の割合が高かった。冷凍網期になると、両年度とも色素産生菌の割合が高くなった。とくに、RS-5LY 株である淡黄色菌は、1990年度において多かったが、1991年度では、これに替わって黄色菌が多くなった。

## 考 察

本節では試験養殖場で本病が発生した1990年度と発生しなかった1991年度漁期を通じてのノリ葉体付着細菌数を詳細に比較した。すなわち、1990年が1991年よりも2~10倍も多く、細菌数は $10^7$ ~ $10^8$ 個/g の水準と高い値であった。しかも、前章の発症試験において病原性を示したRS-5LY 菌株数が、冷凍網張込み4日後に $1.4 \times 10^8$ 個/g と最も多くなった。この値は1991年度の同時期の値に比べ2桁も多い。RS-5LY 株の付着細菌数が多くなったときに、原形質吐出も最もひどくなったことから、1990年度の試験養殖場における本病の発生には、この株が原因細菌として関与していた可能性が高いのではないかと考えられる。

### 第2節 発生とノリ葉体付着細菌相との関係

第1節においては、同一地点における付着細菌数の変動を調べて、そこでの原因細菌を明らかにした。

本節では数地点において正常ノリ葉体および本病葉体付着細菌数と細菌相を調べて、本病の原因細菌がどのような細菌であるかについて検討した。

#### 材料および方法

正常ノリ葉体は1990年10~12月に Fig. 41 に示す St. 3 のものを、本病葉体は1990年12月に同 St. 3, 1991年12月に同鹿島市地先1.0kmの St. 4, 1992年1月に同唐津市地先1.5kmの St. 5 で発生したものを供した。ノリ葉体は実験室に持ち帰り、ただちに、細菌数の測定を行った。そののち、ノリ葉体の細菌相を調べるために、付着細菌数を測定した平板上に形成されたコロニーのうち、任意の30から40株を釣菌し、細菌を純分離した。分離した細菌は Yamamoto *et al.* (1983) の同定検索図にしたがって、属レベルまでの同定を行った。同定式に当たらない

菌株のうち、淡黄色あるいは黄色菌でグラム陰性、OF 試験は酸化あるいは陰性、オキシターゼ陽性、運動性がないものは *Flavobacterium* 属と同定し、そのほかは不明として取り扱った。性状検査は ZoBell 2216 E 培地および、そのブイヨン培地を基本とし、20°Cで24~48時間培養した新鮮培養菌を用い、常法にしたがって20°Cで実施した。運動性は SIM 培地および0.2%寒天 ZoBell 2216 E 培地を使って判定した。グラム染色は劉の方法、Hucker の変法で判定した。OF 試験はブドウ糖加 MOF 培地を基礎培地として行った。チトクローム・オキシダーゼ試験には日水製薬製を用いた。市販の培地はいずれも食塩濃度が2.0%になるように調整した。

## 結 果

正常ノリ葉体および本病ノリ葉体の細菌相は、Table 20 に示すとおりである。正常ノリ葉体の付着細菌数は、 $2.0 \times 10^7$ 個/g 以下で、細菌相は *Flavobacterium* 属が38.3~69.8%の範囲、そのほかに *Pseudomonas-Altermonas* 属, *Moraxella* 属, *Altermonas* 属, *Pseudomonas* 属, *Ascinetobacter* 属, *Vibrio* 属, グラム陽性球菌と多くの属の細菌が認められた。St. 3, 4 における本病ノリ葉体付着細菌数は、 $10^7$ ~ $10^8$ 個/g 台であったが、St. 5 のノリ葉体では $10^6$ 個/g と少なかった。細菌相については、St. 3 のノリ葉体では、*Flavobacterium* 属が83%を占め、そのうち、RS-5LY 株が67.8%であった。また、St. 4 の本病ノリ葉体では、RS-5LY 株はなかったものの、*Flavobacterium* 属は87.0%を占めていた。いっぽう、St. 5 の本病ノリ葉体では *Flavobacterium* 属が31.9%、*Vibrio* 属が30.2%と優先し、St. 3, 4 のノリ葉体とは異なった細菌相であった。ただ、これらは *Flavobacterium* 属の中には、第5章第1節の発症試験で顕著な発症をひき起した KS-4Y 株と同一の種が含まれていた。

## 考 察

付着細菌相については、本病ノリ葉体に占める *Flavobacterium* 属の割合が、健全ノリ葉体のそれよりも高い値であることが明らかとなった。いっぽう、月舘 (1973), Shiba and Taga (1980) も述べているように、*Flavobacterium* 属の割合は健全ノリ葉体でも高いことから、この属の中には常在細菌となっている細菌もあると考えられる。RS-5LY 株は、発生した年の秋芽網期および発生しなかった年の養殖期を通じて少ないなが

## 第3節 摘要

本章では本病が発生した年と発生しなかった年における病原細菌の変動と付着細菌相を養殖場において精査し、どのような細菌が原因細菌となっていたかを検討した。

すなわち、1990年度の試験養殖場 (St. 3) においては、RS-5LY 株の付着細菌数が多くなったときに、原形質吐出も最もひどくなったことから、ここにおける本病の発生には、この株が関与していた可能性が高いと考えられる。RS-5LY 株は、発生した年の秋芽網期および発生しなかった年の養殖期を通じて少ないながらも検出されており、ノリ葉体に付着する常在菌の一種である可能性もあると思われる。

付着細菌相については、本病ノリ葉体に占める *Flavobacterium* 属細菌の割合が、健全ノリ葉体のそれよりも高い値であることが明らかとなった。St. 4, 5 で採集した本病ノリ葉体からは、RS-5LY 株が分離されなかった。また、St. 5 のノリ葉体では細菌数が少なかったが、これには第5章第1節の発症試験で顕著な発症を引き起こした KS-4Y 株が含まれており、本菌株が発病に大きく関与したものであると思われる。St. 4, 5 の本病ノリ葉体から分離した菌株を用いた第5章第1節の発症試験においても、原形質吐出が観察されたことから、これらの3地点で発生した本病にはそれぞれの地点で異なる細菌が関与しているのではないかと考えられる。

以上のことから、本病は1990年度のように単一の病原細菌が優占して発病する場合と、ほかの例のように数種類の病原細菌が複合感染して発病する場合があるのではないかと考えられる。また、このように病原性を示す細菌がノリ葉体に付着しても、必ずしも発病するとは限らないが、発病には病原細菌が主因として関与していることを示唆しており、本病の発生に関与する細菌は、条件性細菌 (Facultative bacteria) であると考えられる。

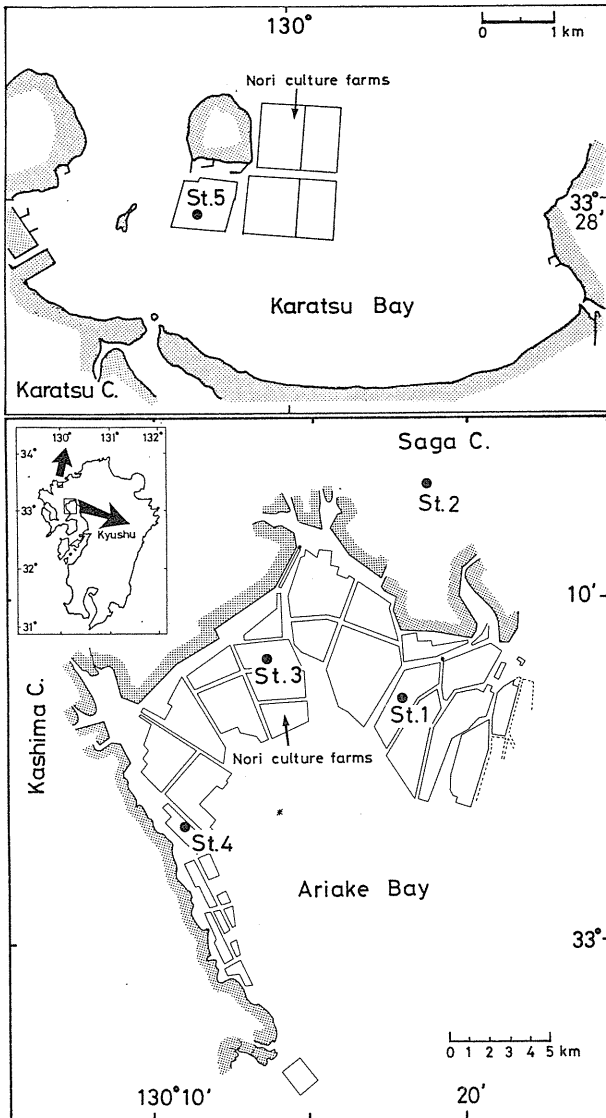


Fig. 41. Maps of the inner part of Ariake Bay and Karatsu Bay at Saga Prefecture, showing nori culture farms and the locations of experimental culture (St. 3), sampling stations (St. 3-5).

らも検出されており、ノリ葉体に付着する常在細菌の一種である可能性もあると思われる。さらに、St. 4, 5 で採集した本病ノリ葉体からは、RS-5LY 株が分離されなかった。また、St. 5 のノリ葉体では細菌数が少なかったが、これには第5章第1節の発症試験で顕著な発症を引き起こした KS-4Y 株が含まれており、本菌株が発病に大きく関与しているのではないかと考えられる。St. 4, 5 の本病ノリ葉体から分離した菌株を用いた発症試験においても、原形質吐出が観察されたことから、これらの3地点で発生した本病にはそれぞれの地点で異なる細菌が関与しているのではないかと考えられる。



**Table 20.** Composition of bacterial flora on normal and "Suminori" diseased nori thalli

Sampling station, date, symptom	Genus	F	PA	M	P	A	Ac	V	GC	GR	U	Total (%)	Cells /g
	Color of colony												
St. 3 Oct. 31, 1990 normal	Light yellow	6.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.2	$8.0 \times 10^5$
	Yellow	11.8	8.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	20.6	$2.7 \times 10^6$
	Orange	8.5	4.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	12.7	$1.7 \times 10^6$
	White	0.0	0.0	22.1	0.0	5.6	0.0	5.6	0.0	0.0	0.0	33.3	$4.3 \times 10^6$
	Others	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.6	$7.8 \times 10^4$
	RS-5LY	26.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	26.2	$3.4 \times 10^6$
	Total (%)	52.7	13.0	22.1	0.0	5.6	0.0	5.6	0.0	0.0	0.6	100.0	$1.3 \times 10^7$
St. 3 Nov. 8, 1990 normal	Light yellow	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.6	0.0	5.6	$1.1 \times 10^6$
	Yellow	0.0	9.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	9.0	$1.8 \times 10^6$
	Orange	5.1	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.6	$1.3 \times 10^6$
	White	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.04	0.2	0.0	0.0	0.0	40.2	$8.0 \times 10^6$
	Others	0.0	0.0	4.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.9	$9.8 \times 10^5$
	RS-5LY	33.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	33.7	$6.7 \times 10^6$
	Total (%)	38.8	10.5	4.9	0.0	0.0	0.0	40.2	0.0	5.6	0.0	100.0	$2.0 \times 10^7$
St. 3 Nov. 7, 1991 normal	Light yellow	26.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	26.9	$3.0 \times 10^6$
	Yellow	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.05	0.0	0.05	0.0	0.3	$3.3 \times 10^4$
	Orange	2.3	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	$3.3 \times 10^5$
	White	0.0	0.0	4.7	9.4	0.0	0.0	2.3	0.0	4.7	0.0	21.1	$2.3 \times 10^6$
	Others	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.3	8.3	$9.1 \times 10^5$
	RS-5LY	40.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	40.4	$4.4 \times 10^6$
	Total (%)	69.8	0.7	4.7	9.4	0.0	0.0	2.4	0.0	4.8	8.3	100.0	$1.1 \times 10^7$
St. 3 Dec. 10, 1991 normal	Light yellow	5.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.3	$2.1 \times 10^5$
	Yellow	44.6	22.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	66.9	$2.7 \times 10^6$
	Orange	14.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	14.4	$5.8 \times 10^5$
	White	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.75	3.75	0.0	0.0	0.0	7.5	$3.0 \times 10^5$
	Others	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.6	$2.4 \times 10^4$
	RS-5LY	5.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.3	$2.1 \times 10^5$
	Total (%)	69.6	22.3	0.0	0.0	0.0	3.75	3.75	0.0	0.0	0.6	100.0	$4.0 \times 10^6$
St. 3 Dec. 10, 1990 Suminori	Light yellow	6.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.8	0.0	0.0	0.0	13.6	$2.3 \times 10^7$
	Yellow	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	$5.6 \times 10^6$
	Orange	5.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.1	$8.7 \times 10^6$
	White	0.0	0.0	2.0	0.0	6.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.2	$1.4 \times 10^7$
	Others	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	RS-5LY	67.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	67.8	$1.1 \times 10^8$
	Total (%)	83.0	0.0	2.0	0.0	6.2	0.0	6.8	0.0	0.0	0.0	100.0	$1.7 \times 10^8$
St. 4 Dec. 13, 1991 Suminori	Light yellow	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	$4.4 \times 10^5$
	Yellow	55.2	2.59	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	57.8	$5.1 \times 10^7$
	Orange	31.8	7.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	39.7	$3.5 \times 10^7$
	White	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.05	0.0	0.0	0.0	0.05	$4.4 \times 10^4$
	Others	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	RS-5LY	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Total (%)	87.0	11.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.05	0.0	0.0	0.0	100.0	$8.8 \times 10^7$
St. 5 Jan. 13, 1992 Suminori	Light yellow	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	$1.9 \times 10^4$
	Yellow	5.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.7	$2.7 \times 10^5$
	Orange	25.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	25.8	$1.2 \times 10^6$
	White	0.0	12.1	12.1	0.0	12.1	0.0	30.2	0.0	0.0	0.0	66.5	$3.2 \times 10^6$
	Others	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.6	1.6	$7.7 \times 10^4$
	RS-5LY	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Total (%)	31.9	12.1	12.1	0.0	12.1	0.0	30.2	0.0	0.0	1.6	100.0	$4.8 \times 10^6$

F, *Flavobacterium*; PA, *Pseudomonas-Altermonas*; M, *Moraxella*; P, *Pseudomonas*; A, *Altermonas*; Ac, *Acinetobacter*; V, *Vibrio*; GC, Gram (+) cocci; GR, Gram (+) rod; U, unidentified.

## 第7章 防除に関する研究

## 材料および方法

陸上栽培種における細菌病の防除については、優れた防除薬剤がみあたらないため、植物防疫、圃場衛生、抵抗性品種の育成・利用、あるいは発生予察と連携した現有農薬の有効利用などに依存するところが大きいとされている(後藤, 1981)。

ノリ養殖の病害防除については、従来から、ノリ葉体を育苗期から健全に育成し(以下、健苗育成という)、病害が発生しないように網を管理し、発生した場合でも一斉に養殖水位を調節するなど集団で防除する方法が行われてきた。例えば、あかぐされ病の場合の対策としては、健苗育成は当然のことであるが、薄めの種付け、減柵、早期摘採、高吊り養殖、一斉撤去などが行われている(木下・中尾, 1973; 山下ら, 1979a, b, c)。いずれの病気でも、防除するための対策が立てられ、ある程度の効果が得られてきた。

いっぽう、本病の防除方法として、片山ら(1973)、鬼頭(1981)はノリ葉体を空中へ干出させ、とくに冷蔵入庫時に十分な干出を与え、健苗を作ることが考えられるとしている。大中ら(1984)は養殖場での育苗管理を充実させ、収量のみでなく、健全で外囲環境の変化に応じて強い葉体を育てることで防除できるのではないかとしている。実際の養殖場では、本病が発生すると良質の乾製品ノリは製造できないよう(鬼頭, 1981)、酸処理剤が対処療法的に使用されているのが現状である(山下, 1983; 半田, 1992)。

そこで、本章ではノリ葉体を空中へ干出させる養殖管理の有効性を検討し、対処療法として行われている酸処理の防除効果を明らかにすることによって、本病の防除対策について検討した。

### 第1節 養殖管理による防除

第4章において、ノリ葉体の空中への干出時間を短くして養殖することが、本病の発生および被害の拡大につながることを述べた。

そこで、本節では養殖管理の違い、すなわち、干出時間の長短がノリ葉体付着細菌数にどのような影響を及ぼすかを調べ、防除技術としての養殖管理の有効性を検討した。

**供試ノリ葉体** 試験に用いた品種は、室内で人工的に採苗したナラワスサビノリ *P. yezoensis* f. *narawaensis* Miura(品種名 佐賀5号)である。養殖試験には、着生密度が網糸2cmあたり平均で20個になるように室内採苗した網を育苗して冷凍入庫したノリ葉体を供した。

**養殖試験と管理** 養殖試験は1982年はFig. 41に示すSt. 1で養殖水位を1.6, 2.0mに、1990年は同じくSt. 3で養殖水位をそれぞれ1.3~2.3, 1.6~2.7mに、1991年もSt. 3で1.4, 2.0mに設定して行った。養殖網の干出時間は、本センターが発行しているのり養殖情報にもとづいて算出した。

**生育状況および品質** 各試験区のノリ葉体を持ち帰ったのち、検鏡するとともに、採集してきたノリ葉体の一部を常法のとおり全自動乾燥機を用いて製造し、等級格付けによる品質評価を行った。

## 結 果

1982, 1990および1991年度に行った試験区の干出時間とノリ葉体付着細菌数の変化は、Fig. 42に示すとおりである。すなわち、各年度における付着細菌数は、干出時間を変えて養殖を開始した直後から、干出時間の長い試験区(高水位養殖)が、短い(低水位養殖)試験区よりも1例を除いて明らかに少なく、養殖水位を低くして養殖すればノリ葉体付着細菌数は増殖することが明らかになった。この試験中、ノリ葉体の生育状況は、干出時間が長い試験区(高養殖水位)で良好であり、ノリの品質も干出時間が長い試験区(高養殖水位)で1等級ほど上位に格付けされた。

## 考 察

病害を防除する場合、まず、発生予察を行い、それに応じて対策を講じていくのが最も効率的で経済的でもあると考えられる。

ノリ養殖における発生予察に関する研究では、プランクトン量からノリの生産予察(山下, 1972)、気象条件から生産量の予想(俵, 1969; 木村, 1970)が行われている。あかぐされ病や壺状菌病の発生についても、疫学的調査(木下・中尾, 1973; 山下ら, 1979a, b, c; 山下, 1979; 中尾ら, 1980, 1983)や、海況の情報を利用して

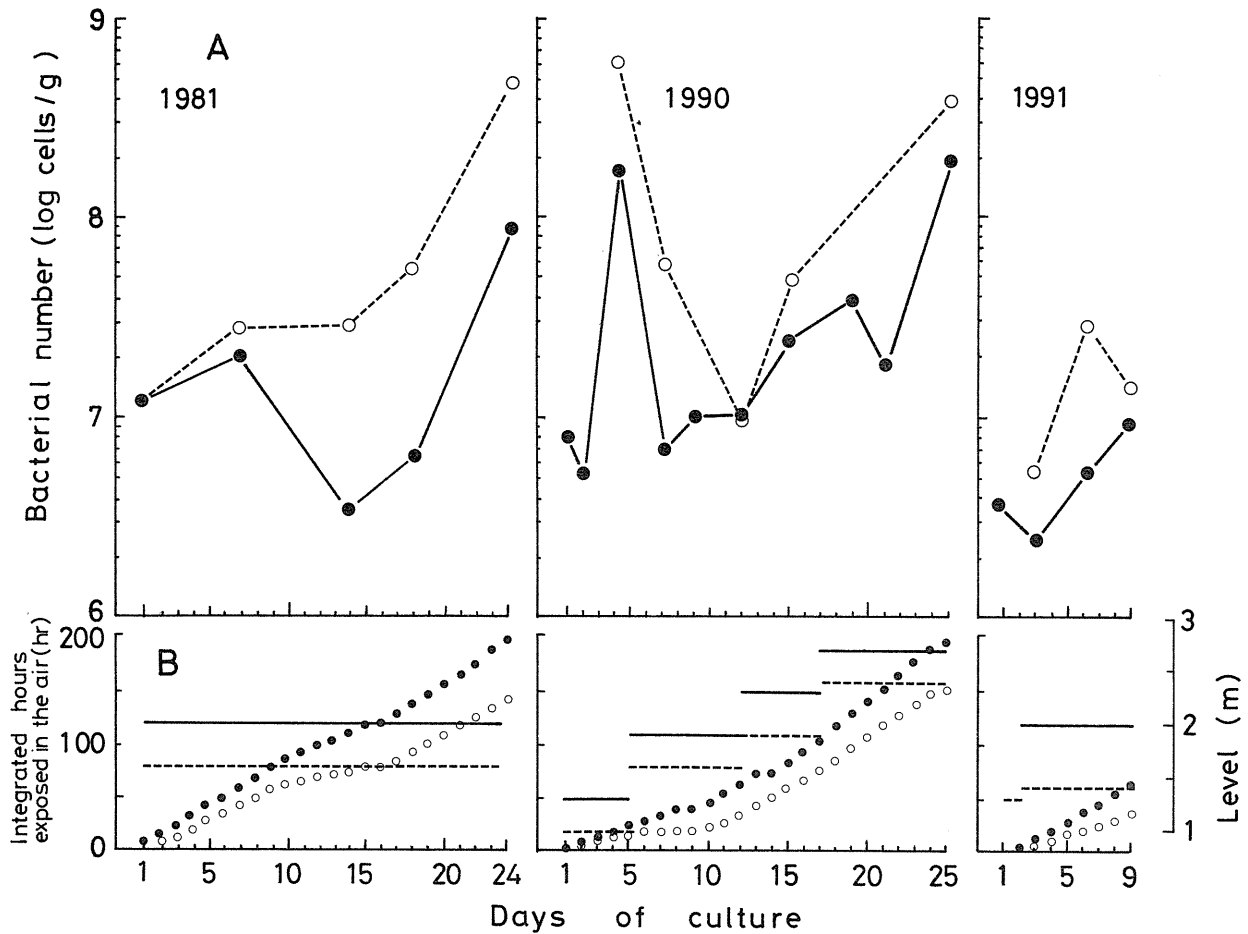


Fig. 42. Changes in the bacterial number on the nori thalli cultured for various hours exposed in the air in 1981, 1990, 1991. A, bacterial number; B, integrated hours exposed in the air and culture level.

発生予察 (馬場・山下, 1985) が行われている。第4章において、育苗期の環境要因と夏季以降の細菌数の変動を把握することによってある程度の発生予測ができると考えられたことから、この方法は実際の養殖計画や指導に活用できるのではないかと考えられる。しかし、これは病原細菌の変動からの予測ではないため、今後、より正確な予測を行うためには、蛍光抗体法 (佐賀県有明水産試験場, 1991; 福永ら, 1993), フェージ法 (後藤, 1981) などを用いた原因細菌の変動を把握する必要があると考えられる。また、病原物質が明らかになったことから、この物質を短時間で検知できる方法を開発すれば、より詳細な本病の発生予測が可能になるのではないかと考えられる。

第4章において、養殖水位の低い網で本病が発生しやすいことから、本病の防除対策の一つとして、養殖水位を高くし干出時間を長くする方法がよいと考えられる。

そこで、本節では干出時間を長くすると、どうして効果があるのかを、養殖水位を変えて養殖したときのノリ葉体付着細菌数の変化から検討した。その結果、干出時

間が長くなると付着細菌数が減少するため、干出時間が長い網では、本病の発生がみられないものと思われる。すなわち、以下のような原因によるものと考えられる。まず、適度な時間ノリ葉体を干出させると、ノリ葉体は光合成活性を増大させることから (渡辺ら, 1971; Tajiri and Aruga, 1984; 佐賀県有明水産振興センター, 1993), 生理活性が高くなって、細菌の付着を防除するものと思われる。また、細菌の側からすると、干出によって空中にさらされるため、乾燥や紫外線の殺菌作用で (野津, 1975; 山口, 1979), 細菌数は減少するものと考えられる。

本病が発生したときの干出時間は、冷凍網張り込み4日後に調べた第4章第2節の結果から、1日約6時間以下 (養殖水位1.5m以下) であることが明らかになった。また、本章の結果から干出時間を長くすることは、細菌数が減少し本病の防除につながるということが明らかとなった。したがって、本病の防除技術としては、半田 (1992) も記載しているように、冷凍網の張り込みを小潮から大潮にかけて行い、必然的に干出時間が長くなるような養殖

管理をする必要がある。しかし、佐賀県有明水産振興センター（1993）も記載しているように、干出時間をできるだけ長くして防除する方法では、生長が遅れるため生産量が増加しないこと、赤目の乾製品ノリとなって、商品価値が低下すること、本病を回避できても最終的にはしるぐされ症状を呈すること、本病の被害の程度が大きい年においては、本病を回避できないことなどの問題点があるものと考えられる。今後、病原細菌の変動から本病の発生程度などの予測が可能になれば、適正な養殖水位が決定できるものと思われる。

## 第2節 酸処理による防除

ノリ養殖においては、古くから養殖網や葉体に付着するアオノリ類、珪藻類などの有害生物を過度の干出操作および洗浄によって駆除してきた。1979年には養殖網を水素イオン濃度（pH）2程度の強酸溶液に浸漬するいわゆる酸処理法が開発され（伏屋ら，1980），これらの駆除に効果があがるようになった（伏屋ら，1980；高山ら，1983；山下，1983）。本法を用いると、網に付着するアオノリ類の駆除，ノリ葉体に付着する珪藻や細菌類の除去，葉体の栄養吸収の向上が可能であるとされている（伏屋ら，1980；高山ら，1983；山下，1983；鬼頭ら，1988）。

有明海においては、1985年以降、一部の海域を除いて、本病の防除に酸処理が行われるようになった（山下，1983；半田，1992）。しかし、酸処理によって本病の原因となるノリ葉体付着細菌を除去できるかどうかについての知見は少ない（山下，1983）。また、これらの付着細菌が酸処理を繰り返すことによって、酸耐性になるかどうかについては検討されていない。

そこで、本節では試験管内でノリ葉体を酸処理したのちのノリ葉体付着細菌数の変化，海水中の細菌数の変化ならびに細菌の酸耐性について実験するとともに，野外において酸処理したのちの付着細菌数の変化について調査し，本病の防除技術としての酸処理の有効性を検討した。

### 材料および方法

#### 1. 試験管内試験

**酸処理後のノリ葉体付着細菌数の変化** 陸上で人工的に採苗したナラワスサビノリ *P. yezoensis* f. *narawaensis* Miura（品種名 佐賀5号）の網を1987年10月5日か

ら Fig. 41 に示すセンター試験地（St. 3）に張り込み実験網とした。この網から葉長8～10cmのノリ葉体を採取して持ち帰り，実験に供した。供試酸剤には塩酸（和光純薬製，特級試薬）を用いた。塩分濃度が29.0%の滅菌海水に塩酸を加えてpHが1.5，2.0，2.5，3.0，3.5，4.0の6段階に調製し，それぞれ100mlを三角フラスコに入れた。これらの塩酸加海水にノリ葉体を0.2～0.3gずつ入れ，20°Cで酸処理した。各pHに対する処理時間は1，5，10，20分の4段階で行った。処理後は滅菌したトリス緩衝液でpHを8付近にもどし，ただちにそれぞれのノリ葉体付着細菌数および処理海水中の細菌数を測定した。ノリ葉体付着細菌数は前述のとおり測定した。酸処理液中の細菌数はそれぞれの処理海水から1mlを取り，滅菌海水を用いて10倍希釈系列を作製した。これらの希釈液系列をZoBell 2216 E培地を用いて混和平板培養を行い，20°Cで10日間培養したのち，発生したコロニー数を計数して測定した。そして，ノリ葉体付着細菌数は1gあたりの数，酸処理海水中の細菌数はノリ葉体1gあたりを処理したときの数に換算して表示した。

**酸処理後のノリ葉体の傷害度** ノリ葉体を3,000倍に希釈したエリスロシンで3分間染色し，顕微鏡を用いて染色される細胞数に対する全細胞数の割合を求め，傷害度として%で表示した。なお，幼芽・幼葉に与える酸処理の影響をみるために，3,000倍に希釈したエリスロシンで3分間染色して観察した。

**酸耐性獲得実験** 細菌は本病ノリ葉体から分離した *Pseudomonas* sp. DY-1219 40 および，Table 4 に示す *Flavobacterium* sp. DY-1219 4Y の2菌株を用いた。供試酸剤には塩酸（和光純薬製，特級試薬）を用いた。方法は Fig. 43 に示すとおりである。すなわち，実験前にZoBell 2216 E組成の液体培地で25°Cで24時間培養した菌を1世代とし， $10^7$ ～ $10^8$ 個/ml台の細菌懸濁液を作製した。つぎに，この懸濁液1mlをpH2.0に調製した滅菌海水97mlに入れて10分間静置後，滅菌したトリス緩衝液2mlを加えて，pHを8付近にもどし，ただちに溶液中の細菌数を測定した。細菌数の測定は前の実験の方法に準じて行った。この一連の操作を1世代の処理実験として6世代繰り返し，処理ごとに細菌数の変化を調べた。2世代以降の実験には，細菌数の測定に用いた平板上の1菌を釣菌して使用した。

#### 2. 野外実験

**養殖場における酸処理後のノリ葉体付着細菌数の変化** 養殖場における実験には，秋芽網期には室内実験に用いた実験網をひき続き供し，冷凍網期には1987年12月3

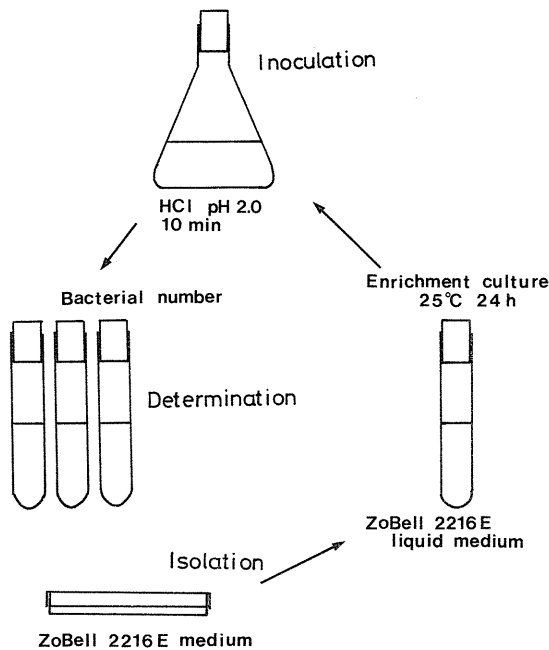


Fig. 43. Schematic diagram of the procedure to determine resistant bacteria.

日から、Fig. 41 に示すセンター試験地 (St. 3) に張り込み、実験網として供した。酸処理は秋芽網期の1987年11月5日、冷凍網期の1987年12月7、16、26日に同場所で実施した。なお、実験時の水温、塩分は秋芽網期がそれぞれ18.0°C、28.0‰、冷凍網期が12°C、29.0‰であった。供試酸剤には有機酸としてクエン酸 (和光純薬製、水和物一級試薬)、無機酸として塩酸 (和光純薬製、特級試薬) を用いた。

まず、実験直前に小型ポート内に入れた海水に各薬剤を添加して pH2.0 に調整し、これに実験網を10分間浸漬した。処理後は中和して養殖場にもどし、継続して養殖した。そして、処理直後あるいは一定期間ごとに実験網からノリ葉体を採取して実験室に持ち帰り、ただちに細菌数の測定を行った。ノリ葉体付着細菌数の測定は試験管内試験の方法に準じて行った。付着細菌数はノリ葉体1gあたりに付着する数に換算した。また、ノリ葉体は一定期間ごとに前述の方法のとおり乾製品ノリとし、等級付けによる品質評価を行った。

**酸処理後のノリ葉体の傷害度** 試験管内試験に準じて表示した。

## 結 果

### 1. 試験管内試験

#### 1) 酸処理後のノリ葉体付着細菌数の変化

酸処理後のノリ葉体付着細菌数と溶液中の細菌数の変化およびノリ葉体の傷害度は、Fig. 44 に示すとおりである。pH1.5で処理時間5分間の場合には、付着細菌数は実験直前の $10^7$ 個/gから $10^2$ 個/gまでに減少し、処理海水中には $10^3$ 個の細菌が認められた。各実験区での酸処理後の付着細菌数は、pHが低く、かつ処理時間が長くなるほど少なくなったり、酸処理の効果が認められた。しかし、いずれの条件でも処理後の溶液中には細菌が認められたことから、付着細菌数は急減するものの全菌が死滅することなく、しかも酸処理後に処理海水中に細菌が生存することが明らかとなった。傷害度は、pH1.5で1分間、pH2.0で5、10分間、pH2.5で5、10分間、pH3.0で20分間の処理が低い値となった。

しかし、幼芽・幼葉に与える酸処理の影響は大きかった。

#### 2) 酸耐性獲得実験

実験の結果は Fig. 45 に示すとおりである。DY-1219 40株の各世代の細菌数の変化は、世代数にかかわらず処理前の $10^7$ 個/mlから処理後 $10^2 \sim 10^4$ 個/mlにまで減少した。いっぽう、DY-1219 4Y株では、1世代後は処理前の $10^8$ 個/mlから処理後、 $10^4$ 個/mlにまで減少したが、代を重ねるごとに処理前の細菌数に対する処理後の細菌数の割合 (減少率) は大きくなり、6世代後は処理後でも処理前と大差なかった。

## 2. 野外実験

### 1) 養殖場における酸処理後のノリ葉体付着細菌数の変化

酸処理後のノリ葉体付着細菌数とノリ葉体の傷害度の変化は、Fig. 46 に示すとおりである。酸処理をしなかった網のノリ葉体付着細菌数は、秋芽網期には $10^6 \sim 10^7$ 個/gで、冷凍網期には当初 $10^6 \sim 10^7$ 個/gであったが、12月下旬後半以降には $10^8$ 個/g台と急増した。クエン酸処理区では秋芽網期には、処理直後に $10^4$ 個/gまで減少したのち、ゆるやかに増加したものの、処理後5日後までは $10^4$ 個/gであった。冷凍網期では酸処理1回目直後 $10^3$ 個/g、2回目では $10^4$ 個/g、3回目では $10^5$ 個/gとなり、酸処理直後にみられた細菌数の減少率は処理回数を増すとともに大きくなった。各酸処理後の細菌数の変化は、時間の経過とともに増加したが、酸処理をしなかった網に比べ、明らかに低い値を示した。塩酸処理区では秋芽網期には $10^4$ 個/gまで大きく減少したが、再び増加して5日後には無処理区と差がなくなった。冷凍網期には1回目直後 $10^4$ 個/gまで減少したものの、2、3回目で

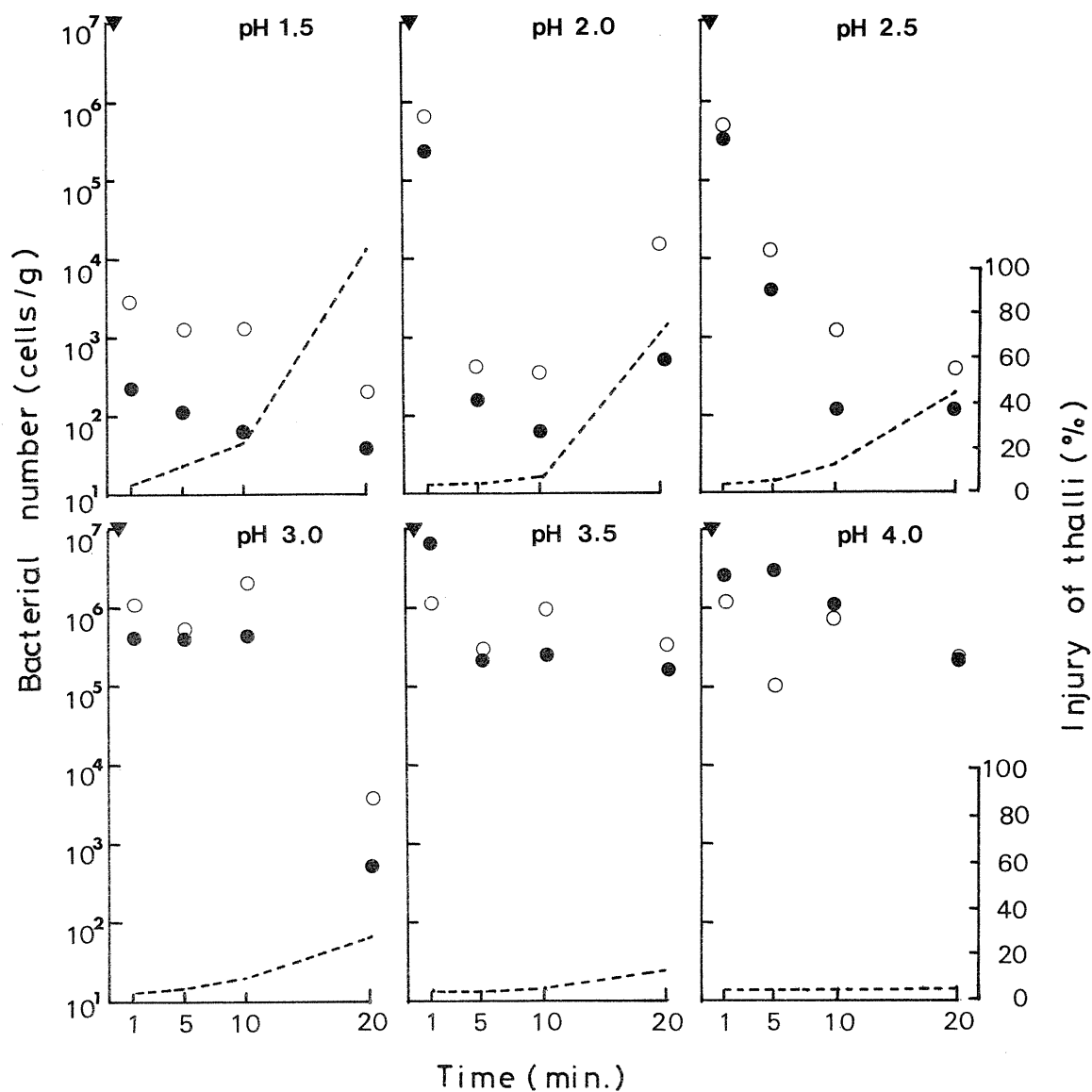


Fig. 44. Changes in the number of epiphytic bacteria and suspended bacteria in the seawater after the thalli were immersed in low pH seawater. ▼, epiphytic bacterial number per gram of thalli before acid treatment; ●, epiphytic bacterial number per gram of thalli after acid treatment; ○, bacterial number in the seawater after acid treatment.

は $10^5$ 個/gとなり、酸処理直後にみられた細菌数の減少率はクエン酸処理区よりも大きかった。酸処理後の細菌数の変化はクエン酸処理区と同じ傾向がみられた。

実験期間中のノリ葉体の傷害度については、酸処理をしなかった網のノリ葉体は、秋芽網期から冷凍網期の12月中旬まで健全であったが、12月下旬以降傷害度は増加した。これに対し、クエン酸および塩酸処理区の葉体では実験期間を通じて健全であった。また、ノリ葉体を乾

製品ノリとした結果は、酸処理しなかった場合、12月15日にはクモリ2等級、23日には別5等級であり、塩酸処理区ではそれぞれ黒2等級、上3等級で、クエン酸処理区ではそれぞれクモリ1等級、3等級であった。

#### 考 察

いままで、ノリ養殖における病害の防除は、健苗育成

を行い、養殖管理を実施することによって行われてきた。しかし、対処療法としての酸処理剤の使用は、本病の防

除技術として注目され、実際に効果が認められている(山下, 1983; 佐賀県有明水産試験場, 1988, 1989, 1990; 半田, 1992)。そこで、酸処理剤の使用が細菌にどのような影響を及ぼし、本病に対してどのような効果を及ぼすのかを検討した。まず、試験管内において、酸処理後のノリ葉体付着細菌数とそのときの溶液中の細菌数の変化を pH 別に調べた。その結果、pH1.5で1, 5分間、pH2.0で5, 10分間、pH2.5で5, 10分間、pH3.0で20分間の処理を行ったとき、処理前の $10^7$ 個/g から $10^2 \sim 10^3$ 個/g にまで減少させることができた。しかし、今回の実験では処理時間を長くすると、pH の条件によってはノリ葉体の生育状態を阻害し、幼芽・幼葉に障害を与えている観察結果も得られた。酸処理を行う場合には、養殖場所や時期などの違いによって使用条件を検討するなどの注意が必要であると思われる。

一般に細菌は最適生育 pH を有しており、一部の細菌を除いて低 pH の環境に置かれると死滅するといわれている(山口, 1979)。酸処理の効果の一つであるノリ葉体付着細菌の除去は、このような pH と細菌との関係を利用したものと思われる。しかし、酸処理後の溶液中には多数の細菌が生存していたことから、酸処理は細菌数を減少させるが、完全に死滅させることはできず、細菌

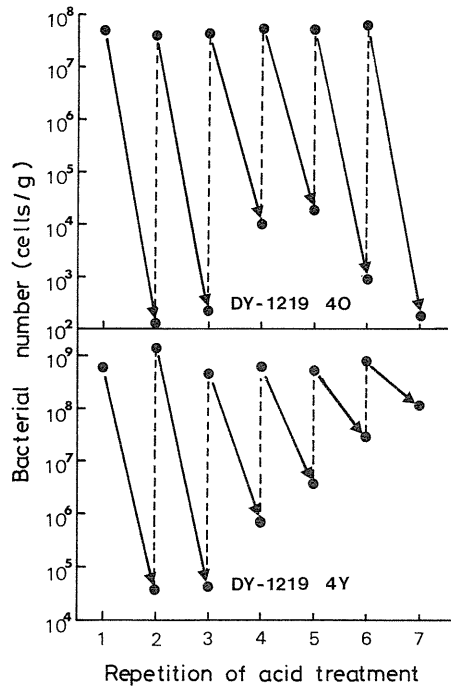


Fig. 45. Development of low pH resistant strains. *Pseudomonas* sp. DY-1219 40 and *Flavobacterium* sp. DY-1219 4Y, repeating acid treatment.

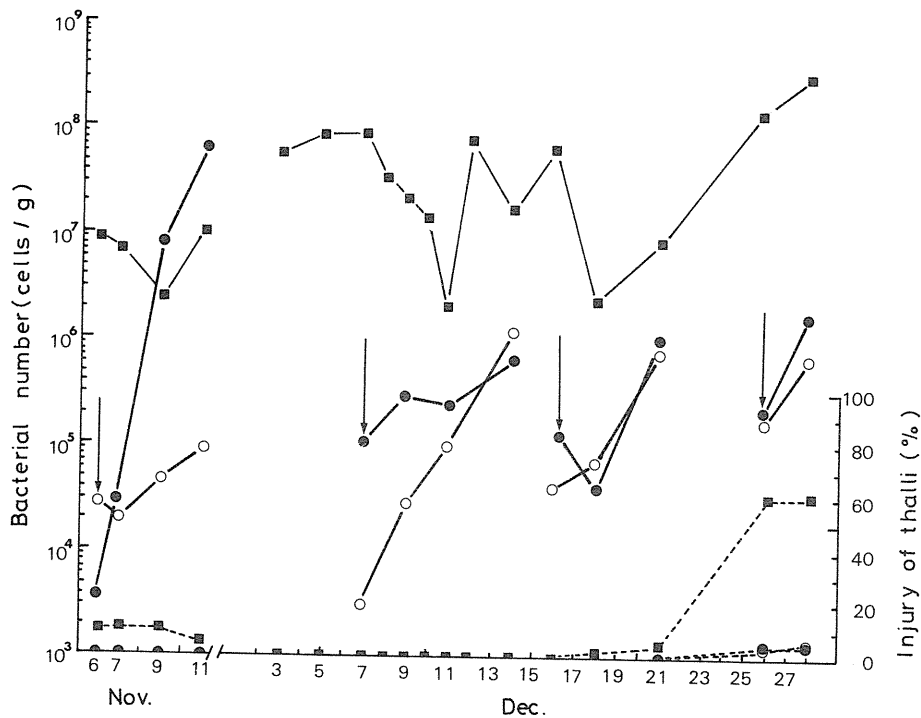


Fig. 46. Changes in the number of epiphytic bacteria and injury rate of thalli observed in the field after acid treatment in 1987. —, epiphytic bacterial number; ···, injury rate of thalli; ■, normal culture; ○, treated with citric acid; ●, treated with hydrochloric acid; ↓, acid treatment time.

を海水中に落とすものと考えられる。酸処理したのちに生き残った細菌は、ノリ葉体上では再び増殖し、落とされた細菌の一部は元のノリ葉体に再び付着して増加するものと考えられる。さらに、隣接する養殖网上的ノリ葉体に付着し増殖することも考えられる。

いっぽう、細菌の酸耐性獲得実験から、細菌の種類によっては酸耐性を獲得する細菌と獲得しない細菌が存在すると考えられる。したがって、養殖漁場において酸処理を繰り返すと、酸耐性細菌が増加してくる可能性があることが示唆された。

養殖場における実験では、クエン酸、塩酸で pH 2.0 に調整した海水に10分間ノリ葉体を浸漬した。その結果、付着細菌数は処理前の $10^6 \sim 10^8$ 個/gの範囲から $10^3 \sim 10^5$ 個/gの範囲に減少し、この低い水準とノリ葉体の良好な生育を数日間維持するという効果を確認できた。養殖場実験の結果は、ノリ葉体には $10^5 \sim 10^8$ 個/gの細菌が付着し、 $10^5 \sim 10^7$ 個/gの水準の時には生育も順調とされていること(藤田ら, 1973)、今回の室内実験結果ともほぼ一致した。したがって、酸処理はノリ葉体付着細菌数を減少させることができるので、本病の防除技術として有効であると考えられる。

今後は効果的な酸処理条件を把握するとともに、海水中の細菌相の変化や酸耐性細菌に関する研究を進めて行く必要があると思われる。

### 第3節 摘要

病害防除をする場合、まず、発生予察を行い、それに応じて対策を講じていくのが最も効率的で経済的でもあると考えられる。第4章において、育苗期の環境要因と細菌数の変動から、冷凍網張り込みの約1か月前にはある程度の発生予察を行うことができることが明らかとなったことから、実際の養殖計画や指導に活用できるのではないかと考えられる。

養殖管理面からの防除技術としては、実際には、冷凍網の張り込みを小潮から大潮にかけて行い、必然的に干出時間が長くなるような養殖管理をすると効果があることが明らかとなった。

また、酸処理剤の本病に対する効果を細菌数の変化から検討したところ、pH 1.5 で1, 5分間、pH 2.0 で5, 10分間、pH 2.5 で5, 10分間、pH 3.0 で20分間の処理を行ったとき、処理前の $10^7$ 個/gから $10^2 \sim 10^3$ 個/gにまで減少させることができたため、本病のように細菌の増殖で起こる病気には、効果があると考えられる。ただ、

酸処理後の溶液中には多数の細菌が生存していたことから、酸処理は細菌数を減少させるが、完全に死滅させることはできず、細菌を海水中に落とすものと考えられる。酸処理したのちに生き残った細菌は、葉体上では再び増殖し、落とされた細菌の一部は元の葉体に再び付着して増加するものと考えられる。さらに、隣接する養殖网上的ノリ葉体に付着し増殖することも考えられる。

いっぽう、細菌の酸耐性獲得実験から、細菌の種類によっては酸耐性を獲得する細菌と獲得しない細菌が存在すると考えられる。したがって、養殖場において酸処理を繰り返すと、酸耐性細菌が増加してくる可能性があることが示唆された。養殖場における実験では、クエン酸、塩酸で pH 2.0 に調整した海水に10分間ノリ葉体を浸漬した。その結果、付着細菌数は処理前の $10^6 \sim 10^8$ 個/gから $10^3 \sim 10^5$ 個/gに減少し、この低いレベルとノリの良好な生育を数日間維持するという効果を確認できた。したがって、酸処理はノリ葉体付着細菌数を減少させることができるので、本病の防除技術として有効であると考えられる。

以上のことから、本病の防除技術としては、養殖管理による方法と酸処理による方法が考えられるが、それぞれに問題がある。現在のところ、本病の防除方法としては発生予測を正確に行い、それに応じた養殖管理と酸処理の使用を組み合わせた方法を確立する必要があると思われる。ただ、今後、病原物質の構造解析が行われ、その阻害物質などの究明が行われることによって、さらに、効率のよい防除方法が開発されることも予想される。

## 第8章 総括

近年、スミノリと呼ばれている表面の光沢がなく、ほとんど商品価値のない乾製品ノリが各地のノリ養殖場で生産されるようになり、ノリ養殖業に多大な被害を与えるようになった。乾製品スミノリとなる原因は、ノリ葉体を加工する過程において、淡水に浸漬すると原形質が吐出するためであることは知られている。しかし、ノリ葉体を淡水に浸漬すると原形質が吐出するノリ葉体の病気、すなわち、スミノリ病については、発生原因に関する定説がなく、防除についてもほとんど研究されていない。

そこで、本研究では佐賀県有明海における本病の病徴、発生・被害状況、養殖環境について調べるとともに、発生原因を疫学的、細菌学的な面から明らかにして、その防除方法を確立することを目的に研究を行った。

病徴については肉眼観察によると、通常、若令ノリ葉



体に多い表面粘質物が少なくなる、全体にひきが弱くなって手でつかむと葉体が網糸から摘み取れる、表面は光沢がなく、淡い赤色を呈する、徒長気味などの症状がみられ、徐々にそれぞれの程度が著しくなることが明らかとなった。このようなノリ葉体を製造すると、製造後には「別」等級の乾製品ノリになった。

光学顕微鏡観察によると、細菌が付着している、縁辺部は凹凸がひどく、波状を呈している、本病の細胞は、色素体や液胞が不明瞭でくすんだ茶色を呈し、細胞の配列は不整で細胞間隙も広くなるなどが明らかになった。本病で共通して観察される症状は、葉体を淡水に浸漬したときにみられる原形質の吐出であり、それらは PP, CN および BC 型の 3 つの型にわけられた。原形質吐出率が增大するにつれて、乾製品ノリは、光沢と等級の低下が促進され、品質が悪化するといった症状として表れた。したがって、原形質吐出率で本病の程度を把握できると考えられる。

SEM 観察によると、正常ノリ葉体と比べて、やや凹凸が著しく、原形質吐出症状として観察されたところは、乾燥されると、凹凸のある形態になることが明らかとなった。したがって、乾製品スミノリは、表面にできた凹凸に乱反射して光沢のない製品に見えるのではないかと考えられる (第 2 章)。

病徴や原形質吐出率をもとに、本病の発生経過をまとめ、被害の拡大を比較検討した。その結果、スミノリ病は 12 月上旬以降、冷凍網として張り込み養殖されているノリ葉体に、東部あるいは西部養殖場の沖合い部で張り込み後 17 日以内に初認された。その後、被害を拡大し、年によっては全養殖場に蔓延した。本病の発生経過から細菌性疾病に近いものと考えられる。乾製品ノリの生産量に与える本病の影響は、毎年度少なからず存在し、本病が早くから発生し、被害度が急激に大きくなった年に著しいことが明らかとなった。しかも、冷凍網期における本病の早期発生は、生産額に大きく影響し、ノリ養殖漁家の経営を圧迫する。なお、本病は I 型 (大被害年型)、II 型 (被害年型)、III 型 (西部被害年型)、IV 型 (小被害年型) の 4 つの型に分類された (第 3 章)。

養殖環境として水温、塩分、全天日射量およびノリ葉体の空中への干出時間をとりあげて、発生との関係を検討した。その結果、水温との関係については、発生時の水温はノリ葉体の生育適温ではなく、一定の傾向もなかった。塩分との関係については、育苗期において、塩分が低い値を示し、その変化が大きい年に発生した。全天日射量との関係については、日射量が育苗期、冷凍網

期ともに少ない年に発生した。

養殖ノリ葉体の空中への干出時間との関係については、干出時間の短い養殖場で本病が発生しており、干出時間の長短が本病の発生に大きく関与しているのではないかと考えられる。したがって、本病は育苗期の少全天日射量などの天候不順は当然であるが、それによって起きる塩分が低く、塩分の変動が大きい育苗期の海況、さらには冷凍網張り込み後の低吊り養殖などが誘因となって発生するのではないかと考えられる。

さらに、本病の発生と細菌との関係を検討した。その結果、本病が発生したときのノリ葉体付着細菌数は  $10^6 \sim 10^8$  個/g の水準であり、海水中の細菌数は  $10^4$  個/ml 以上であったことから、本病の発生には細菌が大きく関与しているのではないかと考えられた (第 4 章)。

そこで、1985、1990 年度に佐賀県有明海、1991 年度に佐賀県有明海と唐津湾でみられた本病ノリ葉体から細菌を分離した。そして、これらの分離菌の病原性を、細菌の接種による方法で発症試験を行って検討した。その結果、分離した 8 菌株は、養殖場でみられる原形質吐出症状をひき起こし、また、それぞれ接種した菌が再分離できた。

病原菌株の形態学的、生物学的ならびに生化学的性状を調べ、分類学的な検討を行った。*Flavobacterium* 属細菌に該当すると考えられた最も病原性の強い菌株の主要な性状を調べるとともに、Bergey's Manual 9 版に記載されている *Flavobacterium* 属細菌の性状と比較した。その結果、DY-1219 4Y 株は、グラム陰性、好氣的、色素産生、カタラーゼ、オキシターゼは陽性で、カゼインとゼラチンを分解した。生化学的性状は、報告されている *Flavobacteria* のうち *F. aquatile* に類似していた。しかし、炭水化物からの酸の産生の点で多くの違う性状があった。したがって、この菌株は、本病の原因菌の 1 種で *Flavobacterium* 属の新種であると考えられる。また、KS-4Y 株は、DY-1219 4Y 株の性状と比較すると、エスクリン分解、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ産生性、いくつかの糖からの酸の産生性で異なるほか同一であり、近似の種と考えられる。今後、血清学的な検討が必要である。

*Vibrio* 属細菌に該当すると考えられ病原性を示した菌株の主要な性状を、Bergey's Manual 9 版に記載されている *Vibrio* 属細菌と、ノリ葉体に緑斑病様の障害を起こさせた *Vibrio* 属細菌の主要な性状を比較した。その結果、ノリ葉体分離菌である *Vibrio* 属は、グラム陰性、桿菌、運動性、オキシターゼは陽性、糖を発酵的に分解するなど、共通する性状もみられたが、記載されている菌株とは一致しなかった。

本研究においては、遺伝子レベルでの分類学的検討は行っていないので、それぞれの菌株は分類学上の位置としては *Flavobacterium* 属あるいは *Vibrio* 属の細菌に同定するのが妥当であると考えられる。

発症試験で最も強い病原力を示した菌株を供試して病原細菌の産生物質について検討したところ、病原性のある物質を産生することが明らかとなった。この物質は、アミノ基がついている1,000以下の低分子量の物質であった。したがって、本病の病原細菌は、この物質を分泌することによって、ノリ葉体に対して病原力を及ぼしているものと考えられる。今回、発症試験において、原形質吐出症状をひき起こした細菌は、性状検査から強い蛋白質分解活性があるため、このような酵素も本症状の発現に関与していると考えられる（第5章）。

本病が発生した年と発生しなかった年における病原細菌の変動と付着細菌相を養殖場において精査し、どのような細菌が原因細菌となっていたかを検討した。すなわち、RS-5LY 株の付着細菌数が多くなったときに、原形質吐出も最もひどくなったことから、1990年度の試験養殖場における本病の発生には、この菌株が関与していた可能性が高いと考えられる。RS-5LY 株は、発生した年の秋芽網期および発生しなかった年の養殖期を通じて少ないながらも検出されており、ノリ葉体に付着する常在細菌の一種である可能性もあると思われる。

ノリ葉体付着細菌相については、本病ノリ葉体に占める *Flavobacterium* 属の割合が、健全ノリ葉体のそれよりも高い値であることが明らかとなった。St. 4, 5 で採集した本病ノリ葉体からは、RS-5LY 株が分離されなかった。また、St. 5 のノリ葉体では細菌数が少なかったが、これには発症試験で顕著な発症をひき起こした KS-4Y 株が含まれており、本菌株が発病に大きく関与していたためと思われる。St. 4, 5 の本病ノリ葉体から分離した菌株を用いた発症試験においても、原形質吐出が観察されたことから、これらの3地点で発生した本病には、それぞれの地点で異なる細菌が関与していたのではないかと考えられる（第6章）。

以上のことから、本病は1990年度のように単一の病原細菌が優占して発病する場合と、ほかの例のように数種の病原細菌が複合感染して発病する場合があるのではないかと考えられる。また、このように病原性を示す細菌がノリ葉体に付着しても、必ずしも発病するとは限らないが、発病には病原細菌が主因として関与していることを示唆しており、本病の発生に関与する細菌は、条件性細菌 (Facultative bacteria) であると考えられる。

したがって、本病は、育苗期の養殖環境によってノリ葉体の生理状態が悪化したために、冷凍出庫後のノリ葉体上で条件性細菌が増殖するとともに、病原性が増大して、蔓延して行く細菌性の疾病ではないかと考えられる。

病害防除については、まず、発生予察を行い、それに応じて対策を講じていくのが最も効率的で経済的な方法であると考えられる。本病の場合、育苗期の養殖環境との関係が考えられたことから、育苗期の養殖環境を把握し検討することが、本病の発生予測の一助にもなるものと考えられる。また、被害の程度によって2つのグループに分けられた海水中の細菌数の変化は、本病の発生予測にも活用できると思われる。

養殖管理面からの本病の防除技術としては、干出時間が長くなるような養殖管理をすると効果があることが明らかとなった。実際には、冷凍網の張り込みを小潮から大潮にかけて行い、できるだけ干出時間が長くなるようにすればよいと考えられる。また、酸処理剤の本病に対する効果を細菌数の変化から検討したところ、pH 1.5 で1, 5分間、pH 2.0 で5, 10分間、pH 2.5 で5, 10分間、pH 3.0 で20分間の処理を行ったとき、処理前の $10^7$ 個/g から $10^2 \sim 10^3$ 個/g にまで減少させることができたため、細菌の増加で起こる本病には、効果があると考えられる。養殖場における実験では、クエン酸、塩酸で pH 2.0 に調整した海水に10分間ノリ葉体を浸漬した。その結果、付着細菌数は処理前の $10^6 \sim 10^8$ 個/g から $10^3 \sim 10^5$ 個/g に減少し、この低いレベルとノリの良好な生育を数日間維持するという効果を確認でき、本病の防除技術としての有効性が明らかとなった。

いっぽう、細菌の酸耐性獲得実験から、細菌の種類によっては酸耐性を獲得する細菌と獲得しない細菌が存在すると思われる。したがって、養殖場において酸処理を繰り返すと、酸耐性細菌が増加してくる可能性があることが示唆された。

以上のことから、本病の防除技術としては、養殖管理による方法と酸処理による方法が考えられるが、それぞれに問題がある。現在のところ、本病の防除方法としては発生予測を正確に行い、それに応じた養殖管理と酸処理の使用を組み合わせる方法を確立する必要があると思われる（第7章）。

以上のように、本研究では養殖ノリで発生する本病に関する新しい知見が得られた。今後、病原細菌の生理状態に関する研究および産生物質に関する検討などの詳細な病理学的研究を行って、より詳しく発生機構を解明すれば、的確な防除技術が確立されるものと考えられる。

## 文 献

- 赤井重恭・獅山慈孝・榎藤道夫・河村貞之助・向 秀夫・松尾卓見 (1971): 植物病学. 朝倉書店, 東京, 217 pp.
- 赤坂義民 (1956): 宮城県気仙沼湾及び万石浦におけるノリの「芽いたみ」について. 水産増殖, 4(2), 41-43.
- 秋山和夫 (1973): あかぐされ病. のりの病気 (日本水産学会編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 7-11.
- 新井 正 編 (1984): 微生物学. 広川書店, 東京, pp. 472.
- 浅川征男 (1987): 窒素肥料と病害発生. 化学と生物, 25(5), 302-310.
- 浅田泰次・井上忠男・後藤正夫・久能 均 (1991): 最新植物病理学概論. 養賢堂, 東京, 295 pp.
- 新崎盛敏 (1947): アサクサノリの腐敗病に関する研究. 日水誌, 13, 74-90.
- 新崎盛敏 (1960): アマノリ類に寄生する壺状菌について. 日水誌, 26(6), 543-548.
- 新崎盛敏 (1973): しろぐされ症. のりの病気 (日本水産学会編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 29-34.
- 馬場裕文・山下康夫 (1985): 佐賀県有明海のノリ養殖における漁海況情報の利用. 佐賀県有明水試研報, 9, 45-54.
- 馬場裕文・山下康夫・川村嘉広 (1989): ノリ養殖が周辺環境に与える影響についての2, 3の事例. 佐賀県有明水試研報, 11, 91-96.
- Baumann, P., A. L. Furniss, and J. V. Lee (1984): Genus *Vibrio* in Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1. 9th (ed. by Krieg, N. R. and J. G. Holt), Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 518-538.
- Bernardet, J. F. (1989): Etude phenotypique des bacteries appartenant aux genres *Cytophaga* et *Flexibacter* (order des *Cytophageles*) et comparaison avec le genre *Flavobacterium*; applicational' identification et a la taxonomie des es peces ichtyopathogenes. Ph. D. Thesis, Paris Univ., 191 pp.
- Cowan, S. T. (1974): 医学細菌同定の手びき第2版 (坂崎利一訳). 近代出版, 東京, 335 pp.
- Dickinson, C. H. and J. A. Lucas (1986): 植物病理学 (寺中理明編). 培風館, 東京, 251 pp.
- 藤田雄二・銭谷武平 (1967): アサクサノリの葉体に着生する糸状細菌 *Leucothrix mucor* - I 一般生物学的性状ならびに発育環境要因について. 長崎大学水産学部研報, 22, 81-89.
- 藤田雄二・銭谷武平 (1969): アサクサノリの葉体に着生する糸状細菌 *Leucothrix mucor* - II *L. mucor* の栄養要求について. 長崎大学水産学部研報, 27, 73-78.
- 藤田雄二・銭谷武平・中尾義房・松原孝之 (1972): ノリ病害の細菌学的研究 - I 養殖ノリの病害関連細菌類. 日水誌, 38(6), 565-569.
- 藤田雄二 (1973): 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.
- 藤田雄二・小野原隆幸・松原孝之・銭谷武平 (1973): ノリ病害の細菌学的研究 - III 漁場海水とのり葉体における細菌類の消長, 特に病害関連細菌の検出. 長崎大学水産学部研報, 36, 61-68.
- 藤田雄二・銭谷武平 (1976): 有明海のり漁場から分離したあかぐされ病原菌 *Pythium* に関する研究 - I 一般菌学的性状. 日水誌, 42(10), 1183-1188.
- 藤田雄二・銭谷武平 (1977): 有明海のり漁場から分離したあかぐされ病原菌 *Pythium* に関する研究 - II 生育環境要因ならびに栄養要求. 日水誌, 43(1), 89-96.
- 藤田雄二・楠 淳一郎 (1986): 有明海漁場で発生した「スミノリ」症ノリ葉体の観察とそれから分離された細菌について. 昭和61年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, pp. 66.
- Fujita, Y. (1990): Diseases of cultivated *Porphyra* in Japan. In "Introduction to applied phycology" (ed. by I. Akatsuka), SPB Academic Publishing, Hague, pp. 170-190.
- 福永 剛・半田亮司・山下輝昌 (1993): ノリの細菌性病原体の直接蛍光抗体法による識別. 福岡県水産海洋技術センター研報, 1, 185-188.
- 伏屋 満・高尾允英・日比野 光 (1980): クエン酸等によるノリ赤腐病防除試験. 昭和54年度愛知県水試事報, 47-49.
- 後藤正夫 (1981): 新植物細菌病学. ソフトサイエンス社, 東京, 272 pp.
- 後藤正夫 (1990): 植物細菌病学概論. 養賢堂, 東京, 283 pp.
- 半田亮司・藤田孟男・山下輝昌 (1984): ノリ漁期における好気性従属栄養細菌の分布並びに消長, 特にノリの細菌付着症と関連して. 昭和57年度福岡県有明水試研業報, 11-16.
- 半田亮司 (1992): 筑後川河口沖養殖場の環境とスミノリ症について. 西海ブロック資源増殖部会藻類・介類研究会報, 8, 25-29.
- 林 孝一郎・徳本裕之助・横江準一・岩田靖宏・森田和夫・朝田英二・土屋晴彦・家田喜一 (1982): 知多半島地先で発生するノリの橙胞病について. 愛知県水試研究業績B しゅう, 2, 1-39.
- Holmes, B., R. J. Owen, and T. A. McMeekin (1984): Genus *Flavobacterium* in Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1. 9th (ed. by Krieg, N. R. and J. G. Holt), Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 353-361.
- 医科学研究所学会編 (1984): 細菌学実習提要. 丸善, 東京, 590 pp.
- 今田 克・安藤 真・前木 樹 (1969): 天然海域におけるノリの生育と養殖環境との関係 - I ノリ養殖網周辺微小環境調査報告. 日水誌, 35(4), 362-378.
- 門田 元・奥谷康一 (1974): 有機物の分解と微生物との関連. 海洋微生物 (多賀信夫編), 東京大学出版会, 11, 153-168.
- 片山勝介・本田信夫 (1967): ノリ病害に関する研究 - 糸状細菌 (*Leucothrix mucor*) について. 昭和40年度岡山県水試指定調査研究報告書, 1-7.
- 片山勝介・杉山瑛之・篠原基之・三宅与志雄 (1973): ノリ

- 養殖品種の特性と生育環境について。昭和47年度岡山県水試指定調査研究報告書, 19-23.
- 片山勝介 (1981) : 乾海苔のくもり 特に”すみのり”と”裏ぐもり”について。海苔研究, 7, 14-20.
- 川村嘉応・山下康夫・島崎大昭 (1985) : 昭和56, 57年度において佐賀県有明海で発生したスミノリについて。佐賀県有明水試報, 9, 1-17.
- 川村嘉応・馬場浴文・中武敬一・山下康夫 (1986) : 有明海湾奥部で発生したスミノリと細菌類との関連について。西海区ブロック浅海開発会議藻類・介類研究会報, 3, 27-39.
- 川村嘉応・馬場浴文・山下康夫 (1989) : 1985, 1986年に発生したスミノリの病徴と発生経過。佐賀県有明水試研報, 11, 113-128.
- 川村嘉応・山下康夫・鬼頭 鈞 (1991) : 養殖ササビノリの生長と環境条件について。水産増殖, 39(3), 273-278.
- 川村嘉応・北嶋博卿 (1991) : 六角川河口沖合定点における微細環境-III 1980-1983年, 海水中における細菌数の変化およびノリ養殖との関係。佐賀県有明水試研報, 13, 107-112.
- 川村嘉応・馬場浴文・山下康夫・楠田理一 (1992a) : ノリ葉体付着細菌に及ぼす酸処理の影響。水産増殖, 40(1), 105-111.
- 川村嘉応・中尾義房・梅田智樹・白島 勳 (1992b) : スミノリ症に関する研究-I 1990年度に発生したスミノリ症の病徴と発生経過。西海ブロック資源増殖部会藻類・介類研究会報, 8, 15-24.
- 川村嘉応 (1992) : スミノリ症に関する研究-II スミノリ症の発生に及ぼす2, 3の環境要因。佐賀県有明水試研報, 14, 49-56.
- 川村嘉応・楠田理一 (1993a) : スミノリ病ノリ葉体から分離した細菌による実験的発症。水産増殖, 41(2), 227-234.
- 川村嘉応・楠田理一 (1993b) : スミノリ病ノリ葉体の付着細菌数の変動および細菌相。水産増殖, 41(2), 235-241.
- 川村嘉応・山下康夫 (1993) : 有明海湾奥部の佐賀県ノリ養殖場におけるスミノリ病の発生。水産増殖, 41(2), 243-250.
- 木村知博 (1970) : 気象条件からノリの生産量を推定する方法について。水産増殖, 18(2), 63-68.
- 木下和生・中尾義房 (1973) : あかぐされ病に関する疫学的研究。佐賀県養殖場報, 5, 42-54.
- 木下和生 (1981) : 有明海における”すみのり”について。海苔研究, 7, 10-13.
- 鬼頭 鈞 (1981) : ”すみのり”に関するアンケート調査の結果について。海苔研究, 7, 1-9.
- 鬼頭 鈞 (1986) : ノリ浅海養殖 (資源協会編)。大成出版社, 東京, pp. 512-516.
- 鬼頭 鈞・山崎 誠・井上清和 (1988) : 「酸処理」によるアマノリ葉体の窒素吸収変化。昭和63年度日本水産学会春季大会講演要旨集, pp. 262.
- 切田正憲 (1984) : 低比重下で干出 (乾燥) がノリ幼芽の生長に及ぼす影響について。西海区ブロック浅海開発関係研究連絡会議要録, 1-10.
- Kusuda, R., K. Kawai, F. Salati, Y. Kawamura and Y. Yamashita (1992) : Characteristics of *Flavobacterium* sp. causing "Suminori" disease in cultivated *Porphyra*. *Suisanzoshoku*, 40(4), 457-461.
- Marumo, R., N. Taga, and Nakai, (1971) : Neustinic bacteria of the equatorial waters. *Plankton Soci., Jap.*, 18, 36-41.
- 右田清治 (1969) : 養殖アマノリの壺状菌病について。長崎大学水産学部研報, 28, 131-145.
- 右田清治 (1979) : 乾海苔の光沢。長崎大学水産学部研報, 46, 11-22.
- 右田清治・川村嘉応 (1981) : 養殖ササビノリの核分裂の日変化と培養条件によるその変動。長崎大学水産学部研報, 50, 7-16.
- Mukai, L. S., J. S. Craigie, and R. G. Brown (1981) : Chemical composition and structure of the cell walls of the conchocelis and thallus phases of *Porphyra tenera* (Rhodophyceae). *J. Phycol.*, 17, 192-198.
- 中尾義房・小野原隆幸・松原孝之・藤田雄二・銭谷武平 (1972) : 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.
- 中尾義房・山下康夫・小野原隆幸 (1980) : ノリ壺状菌の生理・生態に関する研究-I。佐賀県有明水試報, 7, 55-75.
- 中尾義房・山下康夫・小野原隆幸・島崎大昭・川村嘉応 (1983) : ノリ壺状菌の生理・生態に関する研究-II。佐賀県有明水試報, 8, 21-88.
- 野沢治治・野沢ユリ子 (1955) : 海藻の原形質に関する研究-I。日水誌, 20(10), 878-880.
- 野沢治治・野沢ユリ子 (1957) : 海藻の原形質に関する研究-II アサクサノリの「アナグサレ病」について。日水誌, 22(11), 694-700.
- 野津敬一 (1975) : 紫外線の生物作用 核酸を中心として。共立出版, 東京, 114 pp.
- 尾形英二・北角 至 (1966) : 乾ノリの品質と光沢との関係について。水産大学校研報, 15(1), 41-48.
- 大中澄美子・萩田健二・天野秀臣・野田宏行 (1984) : くもりノリの原因と対策-II。水産増殖, 32(3), 164-169.
- Park, P (1977) : Effects of the host-specific toxin and other toxic metabolites produced by *Alternaria kikuchiana* on ultrastructure of leaf cells of Japanese Pear. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 43, 15-25.
- Plummer, D. T. (1991) : 実験で学ぶ生化学 (廣海啓太郎ら訳)。化学同人, 京都, 330 pp.
- 佐賀県有明水産試験場 (1986) : プイロボットの運用技術。マリンランニング計画昭和60年度委託事業報告書, 1-25.
- 佐賀県有明水産試験場 (1988) : 水素イオン濃度変化を利用した生産技術の開発に関する研究。昭和62年度地域重要新技術開発促進事業報告書, 1-50.
- 佐賀県有明水産試験場 (1989) : 水素イオン濃度変化を利用した生産技術の開発に関する研究。昭和63年度地域重要新技術開発促進事業報告書, 1-30.
- 佐賀県有明水産試験場 (1990) : 水素イオン濃度変化を利用した生産技術の開発に関する研究。平成元年度地域重要新技術開発促進事業報告書, 1-37.

- 佐賀県有明水産試験場 (1991) : 高品質ノリ生産技術の開発に関する研究. 平成2年度地域重要新技術開発促進事業報告書, 1-52.
- 佐賀県有明水産試験場 (1992) : 高品質ノリ生産技術の開発に関する研究. 平成3年度地域重要新技術開発促進事業報告書, 1-40.
- 佐賀県有明水産振興センター (1993) : 高品質ノリ生産技術の開発に関する研究. 平成4年度地域重要新技術開発促進事業報告書, 1-29.
- 斉藤雄之助 (1973) : 緑斑病. のりの病気 (日本水産学会編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 21-28.
- 坂崎利一 (1982a) : 新細菌培地学講座 上. 近代出版, 東京, 419 pp.
- 坂崎利一 (1982b) : 新細菌培地学講座 下. 近代出版, 東京, 431 pp.
- 佐藤重勝・佐々木 実 (1973) : あかぐされ病. のりの病気 (日本水産学会編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 59-69.
- Seki, H. (1966) : Seasonal fluctuations of heterotrophic bacteria in the sea of Aburatsubo inlet. *J. Ocean. Soc. Jap.*, 22, 93-104.
- 瀬古準之助・萩田健二・天野秀臣・野田宏行 (1984) : くもりノリの原因と対策-I. 水産増殖, 32(3), 157-163.
- 瀬古準之助・萩田健二・天野秀臣・野田宏行 (1977) : 今一色ノリ漁場におけるバリカン症追跡調査と環境調査. 昭和50年度三重伊勢湾水試事報, 25-36.
- Shiba, T. and N. Taga (1980) : Heterotrophic bacteria attached to seaweeds. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 47, 251-258.
- 清水 潮・相磯和嘉 (1962) : 千葉県鴨川沿岸の海水細菌. 日水誌, 28(11), 1133-1141.
- Shotts, E. B., T. C. Hsu, and W. D. Waltman (1984) : Extracellular proteolytic activity of *Aeromonas hydrophila* complex. *Fish Pathology*, 20(1), 37-44.
- 須藤俊造 (1973) : 疑似しろぐされ症 (仮称). のりの病気 (日本水産学会編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 35-41.
- Tajiri, S. and Y. Aruga (1984) : Effect of emersion on the growth and photosynthesis of the *Porphyra yezoensis* thallus. *Jap. J. Phycol.*, 32, 134-146.
- 高山繁昭・吉岡貞範・山本 翠 (1983) : 海苔網に着生したアオノリの酸処理による駆除. 山口県内海水試報, 13, 58-68.
- 滝谷昭司・鈴木政雄 (1991) : 薄層クロマトグラフ法機器分析実技シリーズ. 共立出版, 東京, 155 pp.
- 俵 佑方人 (1969) : 愛知県に於ける気象要因とノリ生産量の関係について. 水産土木, 5(2), 7-12.
- 富山 昭 (1973) : ノリ浮き流し漁場に発生した「しろぐされ症」について. 山口県内海水試報, 3, 9-16.
- 土屋 仁 (1984) : ノリの仮称「穴あき症」について-I. 千葉県水試研報, 42, 67-71.
- 辻田時美 (1963) : 有機懸濁物の海洋生態学意義について. 日水誌, 18(4), 234-245.
- 月館潤一 (1973) : 微生物環境. のりの病気 (日本水産学会編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 105-113.
- Tsukidate J. (1977) : Microbiological studies of *Porphyra* plants-V On the relation between bacteria and *Porphyra* diseases. *Bull. Nansei. Reg. Fish. Res. Lab.*, 10, 101-112.
- 山口辰良 (1979) : 一般微生物学. 技報堂, 東京, 398 pp.
- Yamamoto, H., Y. Ezura, and T. Kimura (1983) : Changes of bacterial flora in stored seawater and in incubated seawater inoculated with *Vibrio parahaemolyticus*. *Nippon Suisan Gakkai*, 49(2), 295-300.
- 山下輝昌 (1972) : 有明海湾奥部のノリ生産量とプランクトン量の相関について. 水産増殖, 20(1), 45-52.
- 山下輝昌・曾根元徳・藤田孟男 (1979a) : 海況の変動によるノリ病害の疫学的研究-I 1975年漁期のあかぐされ病について. 沿岸環境変動予察方法についての研究報告書, 219-228.
- 山下輝昌・曾根元徳・藤田孟男 (1979b) : 海況の変動によるノリ病害の疫学的研究-II 1976年漁期のあかぐされ病・壺状菌病について. 沿岸環境変動予察方法についての研究報告書, 229-239.
- 山下輝昌・曾根元徳・藤田孟男 (1979c) : 海況の変動によるノリ病害の疫学的研究-III 1977年漁期のあかぐされ病・壺状菌病について. 沿岸環境変動予察方法についての研究報告書, 241-252.
- 山下輝昌 (1983) : 近年有明海奥部漁場で多発する細菌付着症とその対策について. 昭和57年度福岡県有明水試研業報, 1-12.
- 山下康夫 (1979) : 佐賀県有明海におけるノリ壺状菌病の発生事例と気象・海象. 沿岸環境変動予察方法についての研究報告書, 279-284.
- 山下康夫・川村嘉応 (1985) : 水温・塩素量の年度別変動パターンと養殖ノリの病害について. 佐賀県有明水試報, 9, 45-53.
- 山内幸児 (1973) : ノリの幼芽の生長におよぼす塩分濃度の影響. 日水誌, 39(5), 489-496.
- Wakabayashi, H., G. J. Huh, and N. Kimura (1989) : *Flavobacterium branchiophila* sp. nov., a causative agent of bacterial gill disease of fresh water fishes. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39(3), 213-216.
- 渡辺 競・加藤 盛・阿部和夫・鈴木健三 (1971) : 宮城県下のノリ漁場における白クサレ病の発生機構に関する研究-II ノリの葉体生理に及ぼす干出の効果について. 宮城県水試研報, 5, 1-14.

## Summary

Cultivation of "nori", laver *Porphyra* spp. (Rhodophyta), is an important fishery industry of Japan. Nori culture farms of Saga Prefecture facing Ariake Bay in Kyusyu island is one of the places where nori is produced intensively. Though techniques for nori production have been developed, yet many difficulties remained, for example, economy, culture environment, disease etc. Recently, "Suminori" disease has occurred in the nori culture farms throughout Japan and inflicted great damages.

The present study was performed on the nori culture farms during a period from 1981 to 1991 to investigate the occurrence, symptoms and damage caused by "Suminori" disease. Furthermore, the pathogenicity, bacterial properties, bacteriology and prevention of the disease were also studied. The results obtained in this study are summarized as follows ;

The diseased thalli contained less viscous substance on the surface, thus were less glossy, discolored and fell easily from the culture nets, but could rapidly develop at the expense of the rest of the thalli. The diseased dried nori are classified into "betsu" grade, means lusterless black. Intercellular space and vacuoles in the cells developed extremely and the arrangement of vegetative cells became irregular. The number of rod shaped epiphytic bacteria, called "needle bacteria", increased on the surfaces of the edge. By erythrosin staining intercellular spaces were dyed clearly, whereas cells were dimly dyed. Cells were quickly burst or a protoplasm immediately discharged from the cells after dipping the diseased nori thalli into fresh water. The ratio of burst and discharge depends on the degree of the disease. Its symptoms were classified into 3 groups on the basis of patterns observed under the light microscope. They were as follows : PP pattern, peptization of the protoplasm ; CN pattern, continuous coagulation necrosis ; BC pattern, burst of cells. Roughness of the surface of the diseased thalli and dried nori were observed by scanning electron microscope. The diseased dried nori, called "Suminori" was caused by this roughness.

During 1981 to 1991, occurrence of the disease were observed in nori culture farms at Saga Prefecture, facing the inland of Ariake Bay. Developmental stages as well as the extend of damage and yields after the prevalence of the disease were studied. The disease first occurred at the nori culture farms on the offing of east or west within 17 days after setting frozen-nets. Thereafter, the disease spread to the central and the coastal farms, respectively. The development of the disease appeared to indicate the proliferation of facultative bacteria as described later. The disease was divided into 4 types on the basis of the following features, disease development, maximum damage ratio and yields. The 4 types were as follow : type I, severe occurrence year ; type II, occurrence year ; type III, west occurrence year ; type IV, slight occurrence year.

The occurrence of the disease was studied from the view points of water temperature, salinity and global solar radiation. In the years the disease occurred, the mean values of salinity and global solar radiation were generally lower during the period of nursing culture than those in nonoccurrence years, whereas the changes in water temperature and salinity were not stable. On the other hand, the changes in salinity and global solar radiation were similar in the period of frozen-nets culture and nursing culture. The results suggested that the occurrence of the disease might be influenced by the physiological conditions of the thalli during the period of nursing culture, and while storing in the freezer. Therefore, examination of the culture conditions in the period of nursing would be useful in forecasting the occurrence of the disease. In the year of the disease occurrence, time of exposing the thalli to the air were shorter than nonoccurrence years. The epiphytic bacterial number was within the range of  $10^5$ - $10^7$  cells/g on the normal thalli, whereas  $10^6$ - $10^8$  cells/g on the diseased thalli. Bacterial number in the seawater was within the level of  $10^4$  cells/ml in the disease occurrence

year. When bacterial number was within the level as described previously in the period of frozen-nets culture, the disease proved to be occurred in. Furthermore, it is suggested that the proliferation of the bacteria is associated with the development of the damage. On the other hand, change in bacterial number in the seawater was divided into 2 groups on the basis of degree of damage, for providing useful information in forecasting occurrence of the disease.

In 1985, 1990, 1991 and 1992, bacterial isolates were obtained from the diseased thalli. Isolates among these were proved to cause symptoms of the disease on the thalli *in vitro* using procedure of inoculation. The morphological, biological, cultural and biochemical characteristics of the isolates were studied. The results of tests for identification showed that among the pathogenic isolates 6 and 2 isolates were identified as belonging to the genera *Flavobacterium* and *Vibrio*, respectively. The latter proved to be a new species of *Flavobacterium* sp.. A pathogenic substance was purified from the culture filtrate of RS-5LY isolate by means of gel filtration using Sephadex G-15 column. The substance was composed of low molecular weight amino radicals. The results suggested that the disease might be a bacterial disease caused by facultative bacteria.

During 1990 and 1991, microbiological characteristics of the bacterial disease were examined in order to detect the major causes of the disease occurred in the nori culture farms located at Ariake Bay in Saga Prefecture. The epiphytic bacterial number on the diseased thalli was within the level of  $10^7$ - $10^8$  cells/g. The number of RS-5LY, a pathogenic isolate identified as *Flavobacterium* sp., increased along with the aggravation of the disease. However, during the nonoccurrence period of the disease, the bacteria still remained adherent to the thalli. On the other hand, the epiphytic bacterial number on the diseased thalli of other stations were within the level of  $10^6$ - $10^7$  cells/g. Furthermore, the RS-5LY isolate could not be found at other stations. The results suggested that the disease may be caused by the increased number of facultative bacteria which occurs, when the physiological condition of the thalli deteriorates due to some reasons, for example, when the cultural environment became worse.

Culture control, which changes the exposure time of the thalli to the air, to protect from the disease were examined by measuring epiphytic bacterial number. It is suggested that the disease might be prevented by exposing nets for longer time to the air, because by this treatment epiphytic bacterial number decreased, thus improving the physiological condition of the thalli. Acid treatment is a technique in which seaweeds are immersed in seawater of low pH. Experiment was carried out to examine the changes in epiphytic bacterial number on the thalli by *in vitro* and *in situ* acid treatment and to study the resistance to low pH of 2 pathogenic strains of *Pseudomonas* sp. and *Flavobacterium* sp. isolated from the diseased thalli. As results, when the thalli were immersed in seawater adjusted to pH 2.0, the number of epiphytic bacteria decreased from  $10^6$ - $10^8$  cells/g to  $10^3$ - $10^5$  cells/g. However, a lot of bacteria still remained living after the *in vitro* acid treatment. The presence of low pH resistant bacteria as confirmed after the acid treatment was repeated for 3 times. One of the pathogenic strain, *Flavobacterium* sp., showed resistance to the low pH. From the results of this experiment, it was possible to suggest that acid treatment of the thalli might be insufficient, because some resistant bacteria would be selected and remained in the surroundings of the nori culture farms.

The disease might be caused by the increased number of pathogenic facultative bacteria which were identified as belonging to the genera *Flavobacterium* and *Vibrio*, when the physiological condition of the thalli deteriorates due to some reasons, for example, when the salinity and global solar radiation of the cultural environment during the period of nursing were low. Mixed culture control and acid treatment were proved to be the most effective techniques to prevent the disease.