

促成マコンプ種苗培養水槽中の細菌群の変動について

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	絵面, 良男 川端, 美樹 宮下, 富美江
巻/号	54巻4号
掲載ページ	p. 655-663
発行年月	1988年4月

促成マコンブ種苗培養水槽中の細菌群の変動について

絵面良男, 川端美樹, 宮下富美江, 木村喬久

(1987年8月3日受付)

Changes of Bacterial Population in the Nursery Tanks for the Forced Cultivation of Makonbu *Laminaria japonica*Yoshio Ezura,*¹ Miki Kawabata,*¹ Humie Miyashita,*¹
and Takahisa Kimura*

Conditions for the forced cultivation of makonbu in the nursery tanks which were examined in this study were as follows; Zoospores of makonbu were collected by cremona strings (culture bed), and were reared until grown up to visible size of sporophytes in aerated tanks containing enriched seawater (culture medium) for two months at 10-13°C and 12-16 h light exposure per day. The culture medium was renewed every week after initial 12-13 days' incubation.

Changes of bacterial population in the culture medium and on the culture bed of the makonbu nursery tanks were examined for 40 days cultivation. Number of viable cells in the culture medium increased from 10^2 to 10^6 cells/ml after 12 days. During this period, the predominant *Alteromonas* and *Vibrio* (the decomposers of macromolecular organic substrates) were replaced by terrestrial or marine pseudomonads which were non-decomposers of macromolecular organic substrates. In the following two weeks, the number of viable cells decreased to 10^4 cells/ml, but the same groups of bacteria maintained their dominance. At the end of the experiment (40 days), viable cells increased again, and alginate and laminarin decomposers, such as the populations of marine pseudomonads, *Flavobacterium* and *Alcaligenes* increased.

On the culture bed, number of viable cells increased from 10^2 to 10^5 cells/g after 20 days and maintained the same level throughout the following periods. Changes of bacterial flora on the culture bed resembled with these of culture medium, but occurred about one week later.

北海道沿岸における養殖コンブの生産は年々増加の傾向にあり、特に北海道南部、渡島管内においては全生産量の約30%を占めるに至っている。^{*2}

しかし、近年マコンブ *Laminaria japonica* 種苗生産の過程において室内培養中の種苗糸に微生物に起因すると思われる赤斑が生じ、コンブ芽胞体が枯死または脱落するいわゆる芽落ちが多発し、種苗供給に大きな障害となっている。

従来、天然に生息する褐藻類の生長した葉体の付着細菌に関する研究は比較的多いが、¹⁻⁷⁾ 室内培養種苗の水槽における微生物群に関する研究はなされていない。そこでマコンブ種苗培養水槽中の細菌数および細菌相の変遷を調べ、種苗糸赤斑の原因究明および予防対策確立の一助とすることを目的として本研究を行ったのでその結果を報告する。

実験方法

試料 調査対象とした北海道南茅部町の採苗場における促成マコンブ種苗培養の概要は次のとおりである。⁸⁾ 加熱・冷却海水に補強栄養塩液を添加し、淡水で比重を調整した培養液の入った100l容プラスチック水槽を使用する。これに塩化ビニル製三角枠にクレモナ糸(16撚糸)を密に約300m巻いたものをコンブ遊走子の着生基質として入れる。この水槽に遊走子液を接種し、クレモナ糸上に着生させて培養を開始する。培養条件は止水式、通気、水温10°C前後、白色蛍光灯による明期12~16時間で、培養液は培養開始後10~14日目以降1週間毎に換水し、約40~50日間室内培養する。葉体が数mmとなったものを沿岸の施設に移植する。

試料は1983年と1984年の8月~10月にかけて南茅部町白尻および川汲採苗場において定期的に培養液および

*¹ 北海道大学水産学部微生物学講座 (Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate, 041, Japan).

*² 新原義昭, 高杉新弥: 昭和57年度指定調査研究事業報告書, 北海道立水産試験場, 1983, pp. 1-31.

種苗糸を採取して供試した。また、この調査期間中に発生した赤変種苗糸も供試した。

水質の測定 水槽中の水温, pH, 溶存酸素, 導電率を日立-堀場製水質チェッカー (U-7 型) で測定した。

生菌数測定 採取したコンブ培養液はそのまま試料原液とし、種苗糸は秤量後 10 倍量の滅菌海水で軽く洗滌し、再び同量の滅菌海水を加えてストマッカー (Colworth 製) で 1 分間ホモジナイズしたものを原液とした。試料原液を滅菌海水で適宜 10 倍希釈し、その 0.2 ml ずつを CAM 培地 (Difco-ソイトン 1 g, Difco-酵母エキス 1 g, CM-セルロース 1 g, アルギン酸ナトリウム 4 g, マンニトール 5 g, 寒天 13 g, 天然海水 750 ml, 蒸留水 250 ml, pH 7.5), 淡水寒天培地 (大五栄養-ポリペプトン 5 g, 大五栄養-酵母エキス 2.5 g, グルコース 1 g, 寒天 15 g, 蒸留水 1000 ml, pH 7.0) および BTB ティポール寒天培地 (栄研) 平板上にとり表面塗抹し、20°C 7

日間培養後、生じた集落数を計数し生菌数とした。

菌株の分離および同定 生菌数測定後の CAM 培地平板上の一定区画内から 30 集落を釣菌し、同培地にて純粋分離を繰り返し、分離菌株を得た。分離菌は常法⁹⁻¹¹⁾により、グラム染色、運動性、鞭毛染色、色素産生、オキシダーゼ、ゼラチン、カゼイン、デンプン、アルギン酸、ラミナリン、CM-セルロースおよび DNA 分解などを試験した。また糖の分解は MOF 培地¹²⁾ 塩類要求性には日高・坂井の培地¹³⁾の食塩無添加および 1% NaCl 添加培地のみを使用した。これらの検査性状に基づいて Fig. 1 に示す方法により簡易同定を行った。

結 果

生菌数の変化 1983 年白尻採苗場および 1984 年川汲採苗場において各々 1 水槽ずつを選び、マコンブ培養開始時から 40 日目までの間約 1 週間毎に水質 (水温, pH,

Table 1. Water quality and viable bacterial counts in the culture medium of makonbu *Laminaria japonica* at the Usujiri nursery in 1983

Incubation time (days)	Water quality				Viable bacterial counts (cells/ml)		
	Temp. (°C)	pH	DO* ¹ (ppm)	Cond.* ² (ms/cm)	CAM agar	Freshwater agar	BTB teepol agar
1	—	—	—	—	1.9×10 ²	3.3×10	—
5	10.5	—	9.8	31.8	1.5×10 ⁵	6.5×10 ³	4.2×10 ⁵
12	8.5	7.8	11.8	31.9	5.6×10 ⁵	1.3×10 ⁴	—
19	11.5	7.3	10.7	34.5	9.9×10 ⁴	6.3×10 ⁴	—
26	13.0	7.1	10.9	35.2	1.7×10 ⁴	7.5×10 ³	5.0×10 ⁵
33	10.5	7.3	11.8	32.8	4.5×10 ⁵	9.1×10 ⁴	2.4×10 ⁴
40	11.7	7.9	10.7	35.2	6.8×10 ⁵	7.8×10 ⁴	1.0×10 ⁴

*¹ DO; Dissolved oxygen, *² Cond.; Conductivity.

Table 2. Water quality and viable bacterial counts in the culture system of makonbu *L. japonica* at the Kakkumi nursery in 1984

Incubation time (days)	Water quality				Viable bacterial counts			
	Temp. (°C)	pH	DO* ³ (ppm)	Cond.* ⁴ (ms/cm)	CAM agar		Freshwater agar	
					Culture medium (cells/ml)	Culture bed (cells/g)	Culture medium (cells/ml)	Culture bed (cells/g)
0 b* ¹	11.8	7.9	8.5	40.5	6.2×10 ²	5.2×10 ²	6.2×10	7.4×10 ²
7 b	11.3	7.4	8.5	34.6	1.0×10 ⁶	1.4×10 ⁷	2.2×10 ⁴	7.3×10 ⁵
13 b	9.6	7.0	11.3	36.4	7.3×10 ⁶	9.8×10 ⁷	3.3×10 ⁶	4.6×10 ⁷
a* ²	10.3	7.7	8.7	39.1	7.2×10 ⁶	—	4.4×10 ⁶	—
20 b	12.3	7.5	10.9	36.9	7.1×10 ⁵	1.0×10 ⁶	1.2×10 ⁴	2.5×10 ⁵
a	10.4	8.1	8.4	35.3	2.8×10 ⁵	—	1.4×10 ⁴	—
26 b	11.1	7.2	11.4	35.4	9.2×10 ⁴	6.2×10 ⁵	5.8×10 ³	1.8×10 ⁵
a	11.3	8.2	8.3	35.1	8.2×10 ⁴	—	2.9×10 ⁴	—
33 b	11.9	7.4	11.4	36.1	8.2×10 ⁴	2.4×10 ⁵	2.9×10 ³	2.8×10 ⁵
a	11.5	7.7	9.5	35.1	2.4×10 ⁴	—	9.5×10 ²	—
40 b	11.3	7.8	11.8	33.7	5.8×10 ⁵	2.1×10 ⁵	2.2×10 ⁴	9.3×10 ⁷
a	10.8	8.0	10.0	35.8	2.2×10 ⁴	—	1.8×10 ³	—

*¹ b; Before renewal of culture medium, *² a; After renewal of culture medium, *³ DO; Dissolved oxygen, *⁴ Cond.; Conductivity.

溶存酸素、導電率) および生菌数を測定した結果を Table 1 および 2 に示した。なお、白尻採苗場では培養開始後 12 日目を以降約 1 週間毎に培養液を新しいものと交換 (以後、換水と称する) したが、Table 1 の結果は換水前の培養液について測定したものである。一方、川汲採苗場では 13 日目に最初の換水を行い、以後約 1 週毎に換水したが、Table 2 には培養液換水直前と直後の測定結果を示した。

水質の各測定値をみると、水温は 10°C 前後に保つように大型水槽に冷却水を流しその中に水槽を入れる方法を用いているが、実際には 8.5~13.0°C の範囲にあった。新しい培養液の pH は 8.0 前後に調整されているが 1 週間経過後に若干低下し、溶存酸素は 8.5 ppm であったものが、11 ppm 前後に増加する傾向が認められた (Table 2)。なお、導電率には顕著な変化は認められなかった。

培養液中の生菌数の変化は次のとおりである。両水槽とも海水を含む CAM 培地で計数される値は培養開始時の 10²/ml のレベルから最初の培養液換水時までの間に 10⁵~10⁶/ml まで増加した。この換水時には水槽の底面および種苗糸上に綿状のフロックが増加し、原生動物およびケイ藻類が多数観察された。2 回目 (培養 19 日または 20 日目) から 3 回目 (培養 26 日目) の換水時にかけて生菌数は最高時の値より 1 オーダー以上減少し、同時にフロックも減少した。そしてそれ以後、生菌数は再

び徐々に増加した。淡水培地で計数された生菌数は CAM 培地よりも約 1 オーダー低い値を示したが、白尻の培養水槽で 2 回目 (培養 19 日目, Table 1), 川汲の培養水槽では 1 回目 (培養 13 日目, Table 2) の換水前にはその差が非常に少なかった。また、培養液の換水直前、直後の生菌数の差は両培地いずれにおいても非常に少なかった。

一方、遊走子の付着基質である三角枠に巻いたクレモナ糸に付着した生菌数の変化は培養液中とは若干異なっていた (Table 2)。培養開始時には 10²/g と培養液とほぼ同程度であったが 1 回目の換水時 (培養 13 日目) までに両培地のいずれにおいても 10⁷/g までに増加した。その後大きな変動はなく 10⁸/g の高いレベルを維持し、培養液で観察されたような一時的な生菌数の減少はみられなかった。上述したように培養液の換水前後による生菌数の差が認められなかったがその原因は三角枠に巻いた約 300 m ものクレモナ糸上に付着したきわめて多量の細菌が換水後にも持ち越されたためと考えられる。なお、本実験に供試した水槽中の種苗糸には赤変現象は観察されなかった。

菌相の変化 白尻の培養水槽水から分離した 208 菌株を Fig. 1 に従って同定し、試料採取日毎に整理した結果を Table 3 に示した。種苗培養開始時の分離菌株はすべて発育に塩類を必要とする海洋型あるいは好塩型 (以後両型を合せて MH 型と称する) であった。このときの

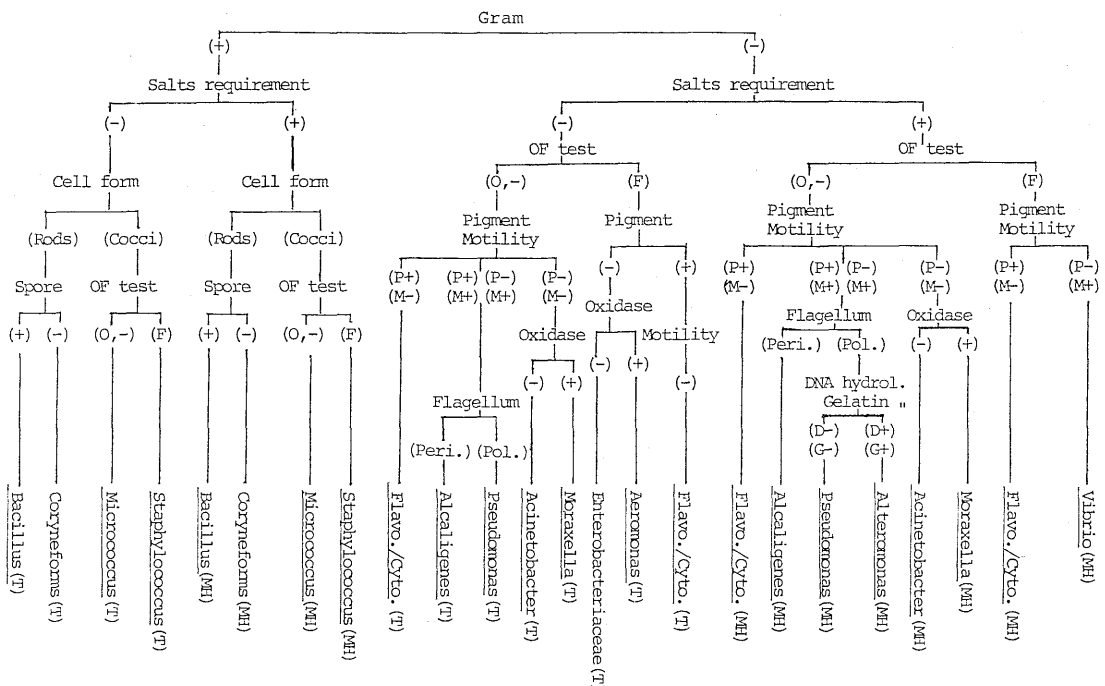


Fig. 1. A scheme for the identification of certain genera of bacteria isolated.

Table 3. Generic composition of isolates from the culture medium of makonbu *L. japonica* at the Usujiri nursery in 1983

Genus or group	Incubation time (days)						
	1	5	12	19	16	33	40
	No. of isolated strains						
	30	30	30	30	30	30	28
Terrestrial (T) type							
<i>Coryneforms</i>	0	0	2 (6.7)	0	2 (6.7)	0	0
<i>Micrococcus</i>	0	0	0	0	1 (3.3)	1 (3.3)	0
<i>Alcaligenes</i>	0	0	1 (3.3)	0	0	2 (6.7)	0
<i>Pseudomonas</i>	0	0	16 (53.3)	17 (56.7)	7 (23.3)	19 (63.3)	12 (42.9)
<i>Acinetobacter</i>	0	0	0	0	2 (6.7)	0	1 (3.6)
<i>Moraxella</i>	0	0	1 (3.3)	0	0	0	0
<i>Flavobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0
Not identified	0	0	0	0	0	0	0
Marine & halophilic (MH) type							
<i>Coryneforms</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Micrococcus</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Alcaligenes</i>	0	0	1 (3.3)	0	2 (6.7)	0	1 (3.6)
<i>Pseudomonas</i>	1 (3.3)	2 (6.7)	2 (6.7)	6 (20.0)	5 (16.7)	7 (23.3)	6 (21.4)
<i>Alteromonas</i>	20 (66.7)	11 (37.7)	5 (16.7)	0	0	0	0
<i>Acinetobacter</i>	0	0	1 (3.3)	5 (16.7)	9 (30.0)	0	5 (17.9)
<i>Moraxella</i>	0	0	0	2 (6.7)	2 (6.7)	1 (3.3)	1 (3.6)
<i>Vibrio</i>	7 (23.3)	15 (50.0)	0	0	0	0	0
<i>Flavobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	2 (7.1)
Not identified	2 (6.7)	2 (6.7)	1 (3.3)	0	0	0	0
T type	0	0	20 (66.7)	17 (56.7)	12 (40.0)	22 (73.3)	13 (46.4)
MH type	30 (100)	30 (100)	10 (33.3)	13 (43.3)	18 (60.0)	8 (26.7)	15 (53.6)

Numbers in parenthesis represent the percentage.

菌相は MH 型の *Alteromonas* (66.7%) および *Vibrio* (23.3%) が多く、両属で 90% を占め、培養 5 日目も両属の存在比が逆転したものの、合せて 87.7% と優勢であった。その後 12 日目 (最初の換水直前) には菌相が大きく変化した。すなわち、*Vibrio* は検出されず、*Alteromonas* も減少し (16.7%)、代って発育に塩類を必要としない陸型 (以後 T 型と称する) の菌株が多数出現し、特に T 型 *Pseudomonas* が半数以上 (53.3%) となり、また少数ずつではあるが多くの属の細菌が出現した。19 日目 (第 2 回換水直前) 以降、T 型 *Pseudomonas* と MH 型 *Pseudomonas* が優勢となり、この他では MH 型 *Acinetobacter* が比較的多く出現した。

次に川汲の培養水槽水および種苗糸付着細菌相の変化をそれぞれ Table 4 と Table 5 に示した。なお、分離菌 180 株および 210 株はすべて培養液換水直前の試料から分離したものである。培養液中の菌相は白尻の培養水水槽とほぼ同様の变化を示した (Table 4)。すなわち、培養開始時には MH 型の *Alteromonas* (96.7%)、7 日目には MH 型 *Vibrio* (53.3%) と *Alteromonas* (16.7%) が優勢であった。13 日目 (最初の換水直前) には T 型 *Pseudomonas* (76.7%) と MH 型 *Pseudomonas* (16.7%) が優勢

となり、*Vibrio* と *Alteromonas* は検出されなかった。これ以降、T 型 *Pseudomonas* が徐々に減少するにつれ、MH 型 *Pseudomonas* が増加し、この他に MH 型 *Alcaligenes*、MH 型 *Flavobacterium*、MH 型 *Acinetobacter* がそれぞれ 10% 以上を占める試料もみられた。また同水槽内の種苗糸付着細菌相の変化も培養液のものと同様のパターンを示した (Table 5)。ただ菌相の優勢菌群が MH 型 *Alteromonas* および *Vibrio* から T 型 *Pseudomonas* および MH 型 *Pseudomonas* へと変換する時期が培養液中よりも遅く、1 回目の換水 (13 日目) 以降であった点が異なっていた。

分離菌株の高分子分解能 1984 年、川汲の培養液および種苗糸由来分離菌株のカゼイン、ゼラチン、DNA、デンプン、アルギン酸、ラミナリン、CM-セルロースの分解能を調べ、試料毎に整理したのが Table 6 である。全体を通じて CM-セルロース分解菌は非常に少数であった。他の 6 種類の基質分解菌の出現パターンは培養液、種苗糸いずれの分離株も類似していた。すなわち、培養開始時には 6 種類の基質すべてを分解する広い分解能を有する菌株が大部分を占めていた。7 日目にはこれらの菌株の出現率は若干減少し、13 日目の培養液および 20

Table 4. Generic composition of isolates from the culture medium of makonbu *L. japonica* at the Kakkumi nursery in 1984

Genus or group	Incubation time (days)					
	0	7	13	26	33	40
	No. of isolated strains					
	30	30	30	30	30	30
Terrestrial (T) type						
<i>Coryneforms</i>	0	0	0	1 (3.3)	0	0
<i>Micrococcus</i>	0	0	0	0	1 (3.3)	0
<i>Alcaligenes</i>	0	0	0	0	1 (3.3)	1 (3.3)
<i>Pseudomonas</i>	0	1 (3.3)	23 (76.7)	8 (26.7)	4 (13.3)	0
<i>Acinetobacter</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Moraxella</i>	0	0	2 (6.7)	0	0	0
<i>Flavobacterium</i>	0	0	0	0	0	0
Not identified	0	0	0	0	0	0
Marine & halophilic (MH) type						
<i>Coryneforms</i>	0	0	0	1 (3.3)	1 (3.3)	0
<i>Micrococcus</i>	0	0	0	1 (3.3)	0	0
<i>Alcaligenes</i>	1 (3.3)	0	0	1 (3.3)	3 (10.0)	1 (3.3)
<i>Pseudomonas</i>	0	4 (13.3)	5 (16.7)	14 (46.7)	17 (56.7)	19 (63.3)
<i>Alteromonas</i>	29 (96.7)	5 (16.7)	0	1 (3.3)	0	1 (3.3)
<i>Acinetobacter</i>	0	0	0	0	3 (10.0)	0
<i>Moraxella</i>	0	0	0	2 (6.7)	0	1 (3.3)
<i>Flavobacterium</i>	0	0	0	1 (3.3)	0	7 (23.3)
<i>Vibrio</i>	0	16 (53.3)	0	0	0	0
Not identified	0	4 (13.3)	0	0	0	0
T type	0	1 (3.3)	25 (83.4)	9 (30.0)	6 (20.0)	1 (3.3)
MH type	30 (100)	29 (96.7)	5 (16.7)	21 (70.0)	24 (80.0)	29 (96.7)

Numbers in parenthesis represent the percentage.

日目の種苗糸においては基質分解菌がほとんど検出されなくなり、いずれの基質をも分解できない菌株のみとなった。その後培養液では 26 日目以降、徐々に分解菌が出現し、特に培養 40 日目にはアルギン酸分解菌 (56.7%) やラミナリン分解菌 (40%) が増加した。一方、種苗糸でも 40 日目にゼラチン、アルギン酸、ラミナリンを分解する菌株が再び出現した。

赤変試料の生菌数および細菌相 1983 年 9 月中旬から下旬にかけ 3 ケ所の採苗場で種苗糸上に赤斑が発生した。そこで赤変種苗糸から原因菌の分離を試みるとともに赤変種苗糸および培養液の生菌数と細菌相を調べた。赤変の発生した水槽の水質および生菌数を Table 7 に示した。赤変の発生時期は培養開始後 2 週間から 3 週間であったが、水質に特に異常な値はみられなかった。赤変種苗糸の生菌数は前述の異常のみられなかった種苗糸の同じ培養時期のもの (Table 2) と比較して、尾札部、鹿部、川汲 (培養 17 日目) ではほぼ 1 オーダー低かったが川汲 (培養 22 日目) のものはほぼ同程度であった。尾札部の培養液の菌数も正常のものとは差は認められなかった。これら試料の菌相についても培養同時期の正常なも

のと比較して大差がなかった (Table 8)。すなわち正常なものでは培養 2~3 週間目に種苗糸上で細菌相が大きく変化し、T 型 *Pseudomonas* と MH 型 *Pseudomonas* が優勢になったが、赤変試料中でも同様の傾向がみられた。ただ川汲の 22 日目の赤変種苗糸では他の試料でこの時期にほとんど出現しなかった。MH 型 *Alteromonas* が 10% と高い値を示した。なお、これら赤変試料から種々の培地を用いて原因菌の分離を試みたが成功しなかった。

考 察

本研究では培養マコンブ種苗の成長過程に関する観察を行わなかったが、同時期に同採苗場で行った新原・菊地らの海藻の形態学的観察結果* を参照して、細菌群の変動の結果を整理すると次のようになる。

遊走子液を培養水槽に接種して培養を開始した。この時点では培養液、種苗糸とも生菌数は少なく、その構成菌群は高分子分解力の強い海洋細菌の *Alteromonas* と *Vibrio* が大部分を占めた。遊走子は 10 数時間以内にクレモナ糸に着生した後、発芽して配偶体となるが、培養

* 新原義昭, 菊地和夫: 昭和 59 年度指定調査研究事業報告書, 北海道立函館水産試験場, 1985, pp. 1-20.

Table 5. Generic composition of isolates from the culture bed (strings) with sporophytes of makonbu *L. japonica* at the Kakkumi nursery in 1984

Genus or group	Incubation time (days)						
	7	7	13	20	26	33	40
	No. of isolated strains						
	30	30	30	30	30	30	30
Terrestrial (T) type							
<i>Coryneforms</i>	0	0	2 (6.7)	0	0	0	0
<i>Micrococcus</i>	0	0	0	0	0	0	7 (23.3)
<i>Alcaligenes</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas</i>	0	1 (3.3)	0	21 (70.0)	17 (56.7)	10 (33.3)	7 (23.3)
<i>Acinetobacter</i>	0	0	1 (3.3)	1 (3.3)	0	0	0
<i>Moraxella</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Flavobacterium</i>	0	0	0	1 (3.3)	0	0	0
Not identified	0	0	0	0	0	0	2 (6.7)
Marine & halophilic (MH) type							
<i>Coryneforms</i>	0	0	2 (6.7)	0	0	0	0
<i>Micrococcus</i>	0	0	0	0	1 (3.3)	0	0
<i>Alcaligenes</i>	0	0	0	0	0	0	4 (13.3)
<i>Pseudomonas</i>	0	4 (13.3)	5 (16.7)	6 (20.0)	8 (26.7)	15 (50.0)	7 (23.3)
<i>Alteromonas</i>	28 (93.3)	11 (36.7)	13 (43.3)	0	1 (3.3)	2 (6.7)	1 (3.3)
<i>Acinetobacter</i>	0	0	1 (3.3)	0	0	0	0
<i>Moraxella</i>	1 (3.3)	0	0	1 (3.3)	3 (10.0)	1 (3.3)	0
<i>Vibrio</i>	0	13 (43.3)	4 (13.3)	0	0	0	0
<i>Flavobacterium</i>	0	0	0	0	0	2 (6.7)	2 (6.7)
Not identified	1 (3.3)	1 (3.3)	2 (6.7)	0	0	0	0
T type	0	1 (3.3)	3 (10.0)	23 (76.7)	17 (56.7)	10 (33.3)	16 (53.5)
MH Type	30 (100)	29 (96.7)	27 (90.0)	7 (23.3)	13 (43.3)	20 (66.7)	14 (46.7)

Numbers in parenthesis represent the percentage.

Table 6. Changes in the percentage of some organic substrate decomposers in isolates from the culture medium and the culture bed (strings) with sporophytes of makonbu *L. japonica* at the Kakkumi nursery in 1984

Incubation days	Samples*	No. of strains tested	Decomposers (%)						
			Casein	Gelatin	DNA	Starch	Alginate	Laminarin	CM-cellulose
0	c	30	100	100	100	83.3	76.7	93.3	6.7
	s	30	100	100	93.3	100	93.3	96.7	6.7
7	c	30	76.7	80.0	83.3	80.0	83.3	13.3	0
	s	30	83.3	83.3	80.0	73.3	83.3	36.7	0
13	c	30	0	3.3	3.3	0	3.3	0	0
	s	30	73.3	80.0	76.7	76.7	73.3	56.6	3.3
20	c	—	—	—	—	—	—	—	—
	s	30	0	0	13.3	0	0	0	0
26	c	30	6.7	16.7	0	3.3	13.3	6.7	0
	s	30	0	6.7	0	0	6.7	0	0
33	c	30	3.3	26.7	3.3	6.7	10.0	16.7	0
	s	30	10.0	30.0	3.3	0	6.7	0	3.3
40	c	30	3.3	13.3	6.7	0	56.7	40.0	0
	s	30	6.7	16.7	3.3	0	16.7	16.7	0

* c; culture medium, s; culture bed (strings).

Table 7. Water quality and viable bacterial counts at three different nurseries, where red-spots were observed on the culture bed (string) in 1983

Nursery	Incubation time (days)	Water quality				Sample	Viable bacterial counts (/ml or g)	
		Temp. (°C)	pH	DO*1 (ppm)	Cond.*2 (mS/cm)		CAM agar	Freshwater agar
Osatsube	17	12.1	8.5	11.3	35.4	string	1.3 × 10 ⁷	1.4 × 10 ⁷
Osatsube	19	11.7	7.8	10.8	36.7	solution	2.9 × 10 ⁵	1.7 × 10 ⁵
Shikabe	15	12.0	—	—	—	string	1.7 × 10 ⁷	1.8 × 10 ⁷
Kakkumi	17	11.5	7.7	10.7	35.7	string	5.0 × 10 ⁷	4.1 × 10 ⁷
Kakkumi	22	12.4	7.6	12.4	35.3	string	6.1 × 10 ⁸	4.8 × 10 ⁸

*1 DO; Dissolved oxygen, *2 Cond.; Conductivity.

Table 8. Generic composition of isolates from the culture systems of three different nurseries, where red-spots were observed in 1983

Genus or group	Osatsube	Osatsube	Shikabe	Kakkumi	Kakkumi
	19	17	15	17	22
	Incubation time (days)				
	No. of isolated strains				
	26	30	30	29	30
Terrestrial (T) type					
<i>Coryneforms</i>	0	0	0	0	0
<i>Micrococcus</i>	0	0	0	0	0
<i>Alcaligenes</i>	1 (3.8)	0	0	1 (3.4)	2 (6.7)
<i>Pseudomonas</i>	13 (50.0)	15 (50.0)	16 (53.3)	17 (58.6)	13 (43.3)
<i>Acinetobacter</i>	0	0	0	1 (3.4)	0
<i>Moraxella</i>	0	0	0	0	0
<i>Flavobacterium</i>	0	0	0	0	0
Not identified	0	0	0	0	0
Marine & halophilic (MH) type					
<i>Coryneforms</i>	0	0	0	0	1 (3.3)
<i>Micrococcus</i>	0	0	0	0	0
<i>Alcaligenes</i>	1 (3.8)	5 (16.7)	3 (10.0)	0	4 (13.3)
<i>Pseudomonas</i>	8 (30.8)	9 (30.0)	10 (33.3)	5 (17.2)	5 (16.7)
<i>Alteromonas</i>	0	1 (3.3)	0	1 (3.4)	3 (10.0)
<i>Acinetobacter</i>	0	0	0	1 (3.4)	0
<i>Moraxella</i>	3 (11.5)	0	0	2 (6.9)	0
<i>Vibrio</i>	0	0	0	0	1 (3.3)
<i>Favobacterium</i>	0	0	1 (3.3)	1 (3.4)	0
Not identified	0	0	0	0	1 (3.3)
T type	14 (53.8)	15 (50.0)	16 (53.3)	19 (65.5)	15 (50.0)
MH type	12 (46.2)	15 (50.0)	14 (46.7)	10 (34.5)	15 (50.0)

Numbers in parenthesis represent the percentage.

液中の生菌数が急増し、フロックが形成しはじめるのが培養7日目頃で、配偶体期である。このときの菌相は *Alteromonas* と *Vibrio* が優勢を維持していた。培養液の最初の換水を行う 12~13 日目には配偶体が受精して芽胞体を生じ始める時期である。この時期に培養液では生菌数がピークに達し、細菌相に大きな変換が生じ、高分子分解能のない T 型 *Pseudomonas* が優勢となった。しかし、種苗糸上ではまだ生菌数増加が続き、細菌相も最初の菌相が継続して検出された。その後培養液の生菌数

が減少し、種苗糸上の生菌数がピークに達した 20 日目頃は配偶体と芽胞体が混生している時期で、培養液、種苗糸両方とも高分子分解能のない T 型および MH 型 *Pseudomonas* が細菌相の主体をなしていた。

この時点までの生菌数、細菌相の変動は Yamamoto ら¹⁴⁾が沿岸海水の保存試験で観察した採取海水中における細菌相変化の結果と非常に類似していた。すなわち、海水の保存開始後、生菌数が急増する初期に *Alteromonas* および *Vibrio* が優勢となるが、その後、生菌数

の減少とともに細菌相に大きな転換が生じ、高分子分解能のない菌群に置き換えるとしており、本研究の結果とよく一致している。このことからこの時点までのマコンブ培養水槽における細菌群の動態がマコンブ培養水槽環境に特有な変化とは判定できず、むしろ限定された環境下における海水中の一般的な微生物群の変遷とみなすことができるかもしれない。

しかし、次第に芽胞体の割合が増加し、培養 30 日目頃から芽胞体は多細胞期に入り、急速な生長を開始し、1 週間で葉長が 4~5 倍にもなり、培養 40 日目で葉長は 2~3 mm に達する。この培養後期には培養液中の生菌数が再び増加傾向に転じ、その細菌相もアルギン酸やラミニランなどマコンブ細胞成分の分解能を有する MH 型 *Pseudomonas* やその他の海洋細菌が出現した。すなわち、この時期の細菌相にはマコンブ芽胞体成長に伴う代謝産物の培養液への分泌などの影響が若干ながらうかがえる。しかし現在のところ、室内培養マコンブ成長過程における各ステージの細胞成分および分泌物などについてはほとんど知られていない。

ところで、沿岸域に生息する褐藻類の成長した葉体の付着細菌についての報告は比較的多く、葉体付着細菌数は一般に春から初夏にかけての成長期には少く、冬期に増加するとの報告が多い。¹⁻³⁾ また同一葉体上でも成長帯付近の細胞分裂の盛んな部分は菌数が少く、それから離れるに従って増加するといわれている。¹⁾ そしてこれらの菌数変動の大きな要因として褐藻類が産生するタンニンなどのフェノール系抗菌性物質の存在があげられている。^{4, 15)} これは付着細菌相にも影響し、葉体周囲の海水の菌相と異なる菌相を形成している。³⁾ また付着菌相は藻類の種や属あるいは時期により異なっており、*Ascophyllum nodosum* では *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Pseudomonas* が優勢であり、⁶⁾ *Laminaria longicurvis* では冬期が低温性の *Vibrio*, 夏期が中温性の *Pseudomonas*,¹⁾ *Sargassum hemiphyllum* と *Ectocarpus siliculosus* では *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Ateromonas*,⁵⁾ *Alaria esulenta* では *Vibrio* が主体⁷⁾ とされている。しかしながら、これらの知見と本研究の結果との関連性を見出すことは困難であった。先にも述べたように本研究のような特殊な培養条件下で、しかも、幼体期の褐藻類の微生物学的な研究はほとんどなされていない。

また褐藻類の細菌性疾患についてもほとんど知らされていない。¹⁶⁾ マコンブ促成培養中に発生する種苗糸の赤斑は種苗糸(クレモナ糸)自体が赤色に染色され、赤斑は時間とともに拡大し、かつ赤変種苗糸と健全種苗糸との接触で赤斑が転移する* とされていることから、この赤

変が細菌または真菌類に起因している可能性が大きい。培養水槽でこの赤斑が出現する時期は培養開始 2~3 週間目に集中しているが、この時期のマコンブ種苗は配偶体と芽胞体の混生している時期で、マコンブ自体にとって生理的に特別な段階とは考えられない。一方、この時期の培養水槽の細菌群観察結果では培養液中の生菌数の減少がみられるが、種苗糸上では生菌数がピークとなり、菌相が大きく変換するのが大きな特徴である。しかしながら、赤斑の発生した種苗糸上の生菌数、菌相とも正常のものとの差が認められず、また原因菌の分離も現時点ではできなかった。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり種々御協力を頂いた「マコンブ種苗病害防除連絡協議会」および渡島東部地区水産技術普及指導所の各位ならびに有益な御助言を頂いた北海道立函館水産試験場、新原義昭氏、北海道立栽培漁業総合センター、船野 隆氏に謝意を表す。また調査の実施に御助力頂いた川汲、白尻、尾札部、鹿部各マコンブ採苗場の各位に感謝申し上げます。

文 献

- 1) R. A. Laycock: *Mar. Biol.*, **25**, 223-234 (1974).
- 2) J. M. Sieburth, R. D. Brocks, R. V. Gessner, C. D. Thomas, and J. L. Tootle: in "Effect of the ocean environment on microbial activity" (ed. by R. R. Colwell and R. Y. Morita), University Park Press, Baltimore, 1974, pp. 418-432.
- 3) T. Shiba and N. Taga: *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **47**, 251-258 (1977).
- 4) J. M. Sieburth: in "Advances in microbiology of the sea, I", (ed. by M. R. Droop and E. J. F. Wood), Academic Press, New York, 1968, pp. 63-94.
- 5) M. K. Kong and K. Y. Chan: *Bot. Mar.*, **22**, 83-97 (1979).
- 6) E. C. S. Chan and E. A. McManus: *Can. J. Microbiol.*, **15**, 409-420 (1969).
- 7) B. T. Hollohan, P. E. Dabinett, and J. A. Gow: *Can. J. Microbiol.*, **32**, 505-512 (1986).
- 8) Y. Hasegawa: *Bull. Hokkaido Reg. Fish. Res. Lab.*, **37**, 49-52 (1971).
- 9) S. T. Cowan: 医学細菌同定の手びき (坂崎利一訳), 近代出版, 東京, 1974, pp. 183-261.
- 10) P. Baumann, L. Baumann, M. Mandel, and R. D. Allen: *J. Bacteriol.*, **110**, 402-429 (1972).
- 11) 坂崎利一: 培地学各論 (1), 納谷書店, 東京, 1967, p. 232.
- 12) E. Leifson: *J. Bacteriol.*, **85**, 1183-1184 (1963).

* 新原義昭: 昭和 58 年度指定調査研究事業報告書, 北海道立函館水産試験場, 1984, pp. 145-159.

- 13) 日高富男, 坂井 稔: 食衛誌, **6**, 235-241 (1965).
- 14) H. Yamamoto, Y. Ezura, and T. Kimura: *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, **49**, 295-300 (1983).
- 15) J. S. Graigie and J. McLachlan: *Can. J. Bot.*, **42**, 23-33 (1964).
- 16) J. H. Andrews: *Biol. Rev.*, **51**, 211-253 (1976).