

モズク類に対する抗菌剤3種の生育阻害試験

諸見里聰・島袋博文*1

1. 目的

オキナワモズクやイトモズクの養殖は分離培養した盤状体や糸状体を越冬保存しているが、長期間保存した場合、微生物の混入が原因と見られる繁殖不良や形態形成異常が発生する。そのため、毎年新しく株を分離して培養を行っており、その作業にはかなりの労力が必要となる。

培養藻類から微生物を排除あるいは繁殖抑制する手法として各種の抗菌剤を使用する方法が報告されている¹⁾²⁾が、抗菌剤には藻類の生育を阻害する作用があるため、対象藻類によって使用する種類、濃度を調査する必要がある。本県のモズク養殖は地先の野生株由来の種苗であり、品種の概念は今のところ希薄である。しかし、今後養殖漁場やフコイダン等の成分抽出用途への出荷に対応した品種改良を推進するためには盤状体、糸状体の長期保存技術の確立が必要であり、その基礎的知見を得ることを目的とした。

2. 材料と方法

使用したオキナワモズク盤状体と糸状体は沖縄本島知念村地先漁場で得られた母藻から分離、培養した。いずれも種板・寒天平板分離法により得られたものであった。

培養海水は水産試験場地先から汲み上げられた海水を濾過後、90℃に加熱滅菌、冷却して用いた。培地肥料は、市販の藻類培養液*2を使用した。

液体培地添加抗菌剤による盤状体生育阻害試験は藻類培養装置（ヤンマー社製）を使用し、光源は32W型三波長型昼白色蛍光灯（松下電工社製 FHF 32 EX-N）を使用した。

長期保存試験は植物組織培養器（三洋電機特機社製 MLR-350 光源は40型白色蛍光灯）とプレハブ型恒温槽を使用した。

2-1 液体培地添加抗菌剤によるオキナワモズク盤状体生育阻害試験

抗菌剤はペニシリン（Benzylpenicillin Potassium）、ストレプトマイシン（Streptomycin Sulfate）、クロラムフェニコール（Chloramphenicol）を使用した。各抗菌剤をあらかじめ用意した滅菌海水に20 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/mlを溶かし、300 ml コニカルピーカーに分注した。オキナワモズク遊走子を着生させるため、角形バット（280×220×50 mm）にスライドガラス20枚を敷き詰め、滅菌海水を満たし、オキナワモズク盤状体5 mlを入れて藻類培養器で24時間通気培養した。温度は23℃、光量70 µmol/m²/S、光周期12 L:12 Dとした。その後、スライドガラスを取り出して滅菌海水で軽く洗浄し、各濃度に調整した抗菌剤入りのコニカルピーカーに収容して培養試験を開始した。培地には施肥のため藻類培養液（KW 21）を0.1 ml/l 添加した。培養海水は3日目ごとに全量を交換した。温度は22℃、光量70 µmol/m²/S、光周期12 L:12 Dとした。測定は1日後、3日後、5日後に行った。測定は、盤状体を着生させたスライドガラスを取り出し、生物顕微鏡で無作為に25個の盤状体を選定してマイクロメーターで直径を計測した。

2-2 寒天平板培地添加抗菌剤による盤状体と糸状体の生育阻害試験

抗菌剤は前記と同様とし、海水1 lに12 gの粉末寒天を入れて煮沸し、冷却時にKW-21を0.5 mlと各抗菌剤を20 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml溶かし、シャーレに分注した。各濃度の抗菌剤入り寒天平板2枚にイトモズク糸状体とオキナワモズク盤状体を接種し、植物組織培養器に入れて培養を開始した。温度は23℃、光量70 µmol/m²/S、光周期12 L:12 Dとした。

*1: 非常勤職員 *2: KW 21 (第一製網社製) 成分: 1 l 当り窒素 36 g, リン酸 4 g, EDTA, 複合アミノ酸, ビタミン B₁, B₁₂, ビオチン

2-3 オキナワモズク盤状体長期保存および発芽試験

平成11年9月13日から平成14年の9月9までの3年間、オキナワモズク盤状体の長期保存試験を行った。保存にはストレプトマイシン 20 $\mu\text{g/ml}$ と玉城の培地³⁾ (KNO_3 300 mg, Na_2HPO_4 30 mg, クレワット 32 30 mg, L-シスチン 0.1 mg, ビタミンB₁₂ 0.2 mg, 以上を海水11に入れる。Na₂SiO₃ · 9 H₂Oは除く)を添加した寒天平板を用いた。試験区はプレハブ型恒温槽を20℃区とし、植物組織培養器を23℃区とした。各区2枚の寒天平板にオキナワモズク盤状体を接種して保存試験を行った。両区とも光量42 $\mu\text{mol/m}^2/\text{S}$, 光周期12 L:12 Dとした。

長期保存株の発芽試験は、各区2枚のスライドガラス(76 mm × 26 mm)に盤状体から放出された遊走子を適量着生させ、滅菌海水を満たした200 ml コニカルピーカーに別々に収容して植物組織培養器で培養した。温度は23℃, 光量70 $\mu\text{mol/m}^2/\text{S}$, 光周期12 L:12 Dとした。

3. 結果と考察

3-1 液体培地添加抗菌剤によるオキナワモズク盤状体生育阻害試験

ペニシリンはオキナワモズク盤状体の生育初期の培養3日目で100 $\mu\text{g/ml}$ 区と200 $\mu\text{g/ml}$ 区で阻害があり20 $\mu\text{g/ml}$ 区は有意な生長差(分散分析, $P < 0.05$)はなかった(図1)。しかし、培養5日目の測定ではペニシリン添加区の生長速度が増し、100 $\mu\text{g/ml}$ 区で有意(分散分析, $P < 0.05$)に生長が促進された。

ストレプトマイシンは培養3日目ですべての試験区で有意(分散分析, $P < 0.05$)に生育阻害があり、培養5日目の測定ではペニシリン区と同様にストレプトマイシン添加区の生長が早くなり対象区に追いついた(図2)。

クロラムフェニコールは、すべての試験区で盤状体が死滅した(図3)。培養1日目の検鏡で、盤状体細胞の約半分が脱色していた(写真1 A)。

ペニシリンは100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で、ストレプトマイシンは20 $\mu\text{g/ml}$ の低い濃度でも初期の盤

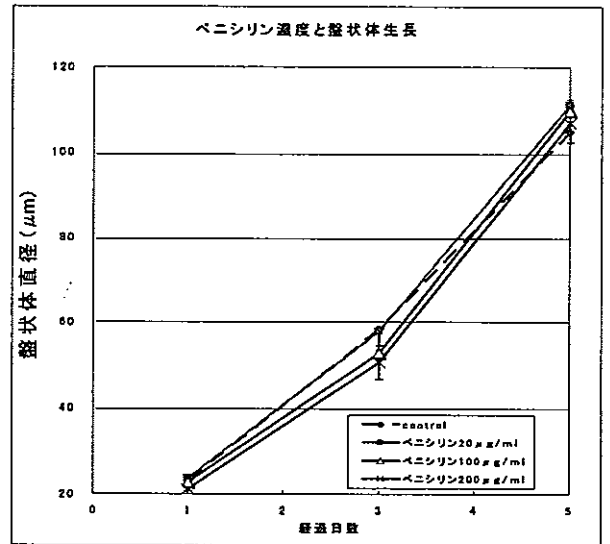


図1. ペニシリン濃度と盤状体生長の関係

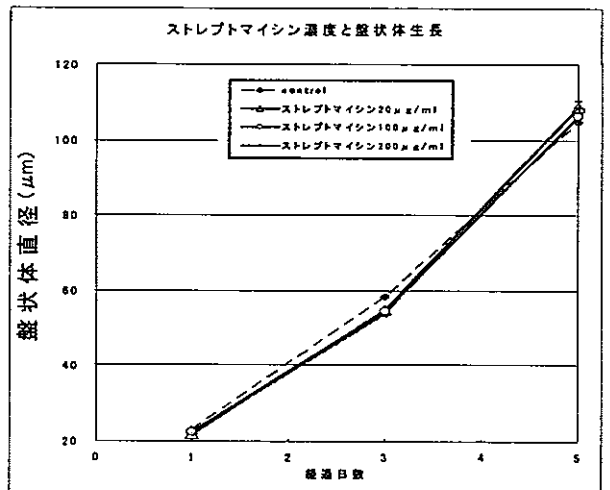


図2. ストレプトマイシン濃度と盤状体生長の関係

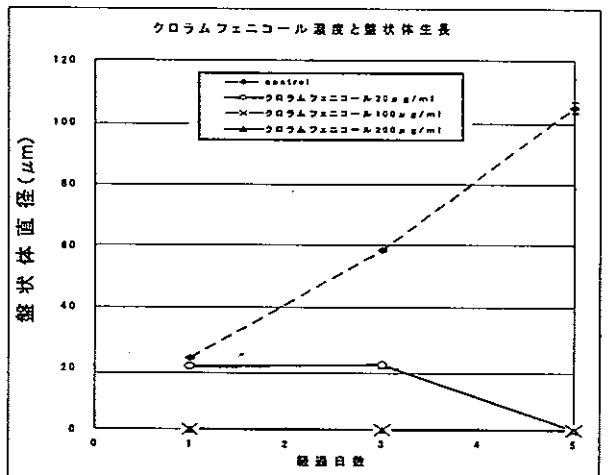


図3. クロラムフェニコール濃度と盤状体生長の関係

表1. 寒天平板抗菌剤濃度別モズク発生状況（培養30日後の状態） 薬剤濃度単位： $\mu\text{g}/\text{ml}$

種名	ペニシリン			ストレプトマイシン			クロラムフェニコール			
	20	100	200	20	100	200	20	100	200	
オキナワモズク	正常発生	正常発生	異常発生 団塊化	正常発生	正常発生	異常発生 団塊化	枯死	枯死	枯死	枯死
イトモズク	正常発生	正常発生	正常発生	正常発生	正常発生	正常発生	異常発生 泡状化	枯死	枯死	枯死

状体生長に阻害的に作用するが、致死的不是なのでオキナワモズク盤状体の無菌化に使用できると考えられる。抗菌剤は光の照射により効力が減少することが知られており、両抗菌剤使用区とも後半に生長が伸びたのは、抗菌剤による生育阻害が減じたことによると思われる。

クロラムフェニコールは $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ の低濃度でも盤状体を死滅させるので、同剤の使用は不適当と思われる。

3-2 寒天平板培地添加抗菌剤によるオキナワモズク盤状体とイトモズク糸状体の生育阻害試験

抗菌剤添加寒天平板培地におけるオキナワモズク盤状体とイトモズク糸状体の発生状況を表1に示した。オキナワモズク盤状体は、ペニシリン添加区、ストレプトマイシン添加区ともに $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ の高濃度で団塊状の異常発生が観察された（写真1 C）が、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の濃度では正常に発生した。

また、すべてのクロラムフェニコール添加区で接種した盤状体は脱色し増殖が見られないことから、枯死したものと判断された。以上の結果からオキナワモズク盤状体を無菌化するための寒天平板に添加するペニシリンとストレプトマイシンは $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下とする必要があると考えられる。

イトモズク糸状体ではペニシリン添加区、ストレプトマイシン添加区の糸状体はすべて正常に発生した（写真1 D, E）。イトモズク糸状体はオキナワモズク盤状体に比較してペニシリンとストレプトマイシンに強いことが示された。クロラムフェニコール添

加区ではオキナワモズク盤状体の場合と同様に糸状体細胞は脱色し増殖も見られないことから、枯死したものと判断された。

以上の結果からイトモズク糸状体を無菌化するための寒天平板に添加するペニシリンとストレプトマイシンの量は $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ でも良く、クロラムフェニコールは低濃度でも致死的影响があり使用できないことが示された。

3-3 オキナワモズク盤状体長期保存試験

20°C 保存区では、盤状体には特に異常は観察されず発生は正常であった。 23°C 保存区は 20°C 区に比較して盤状体の生長は早く、中心部の古くなった部分が白く脱色し、周辺部に新しく生長してきた部分が残る状態が観察された（写真1 F）。盤状体を長期保存する場合は、代謝速度を低く保ち、栄養塩の吸収と代謝産物の蓄積を極力少なくして培地の変異を抑制する必要がある。上記の結果から、盤状体を長期間保存する場合の保存温度は 20°C が良いことが示された。

長期保存株の発芽試験では両区ともに盤状体から正常に発芽し幼体に生長した（写真1 G）。

4. 今後の課題

- ・サルファ剤や紫外線照射によるオキナワモズク盤状体やイトモズク糸状体への影響を調査する。
- ・オキナワモズク盤状体、イトモズク糸状体の生育下限温度帯を明らかにし、休眠状態での保存試験、増殖、発芽試験を試みる。

参考文献

- 1) 渡辺篤.[微細藻類の分離法]「藻類実験法」(田宮博, 渡辺篤) 南江堂, 東京, 1965 ; 40-42
- 2) 館脇正和.[薬物による微生物の除去]「藻類研究法」(西澤一俊, 千原光男) 共立出版, 東京, 1979 ; 65-69
- 3) 玉城英信, 内藤美佐子. 有用海藻類のバイオテ

クノロジー基礎技術開発研究. 平成4年度沖縄県水試事業報告書, 沖縄県水産試験場, 沖縄, 1994 ; 230-236 .

- 4) 諸見里聰(2001). オキナワモズク盤状体のフリー化および施肥効果試験. 平成12年度沖縄県水試事業報告書 ; 125-129 .

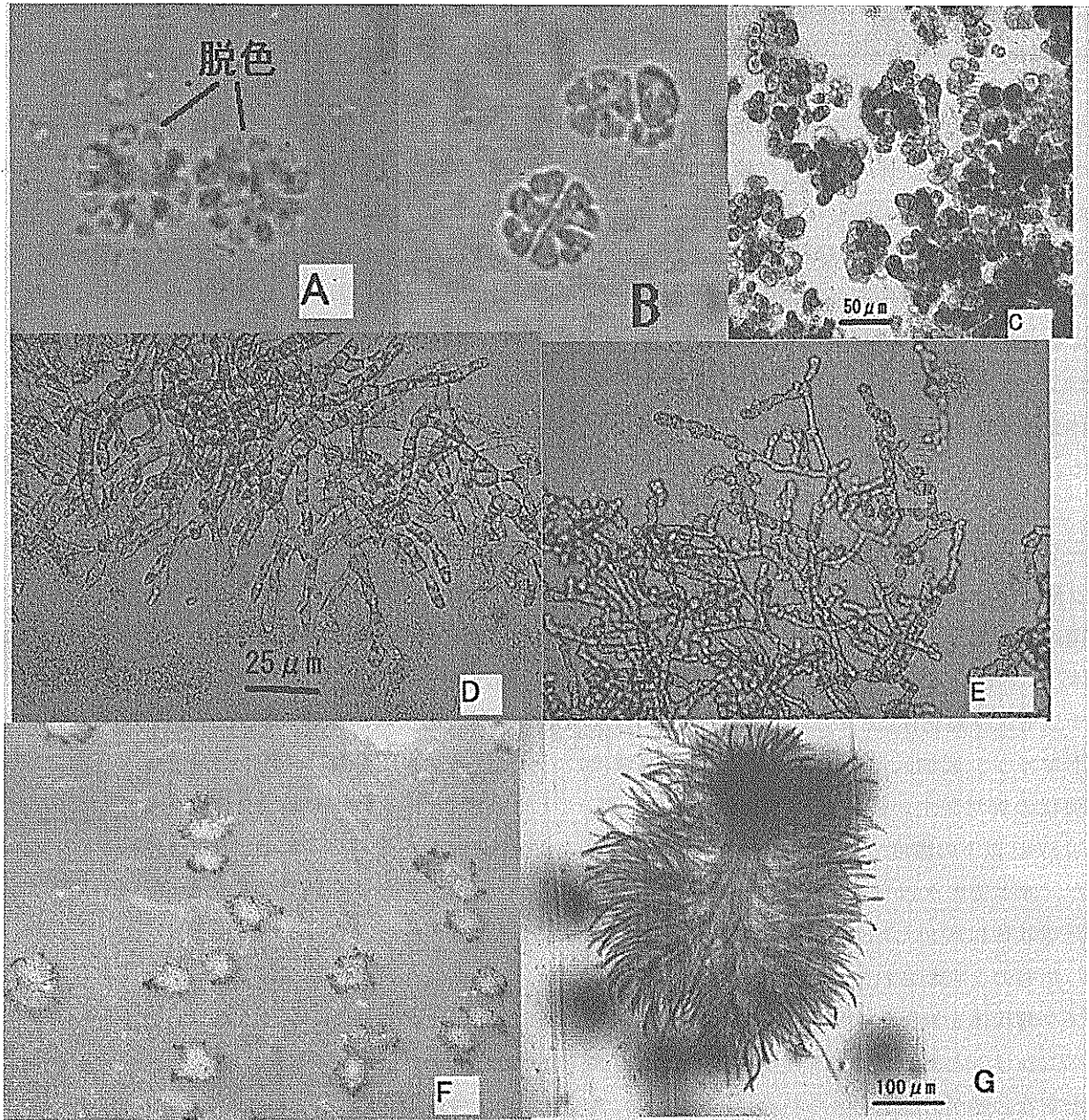


写真1 A: クロラムフェニコール $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 添加区の盤状体、細胞が脱色 B: 正常な盤状体 C: ペニシリン $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 添加寒天平板で団塊化した盤状体 D: ペニシリン $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 添加寒天平板の糸状体 (正常) E: ストレプトマイシン $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 添加寒天平板の糸状体 (正常) F: 保存温度 23°C で長期培養した盤状体, 中心部が枯死 G: 長期保存盤状体から発芽したオキナワモズク幼体 (着生後 23 日目)