

図6 凍結試験の要約

II 餌料藻類の培養試験

藻類培養時に細胞数が減少する現象がみられた。そこで、この原因を究明するため培地中に存在する細菌の動態を調べ、藻類との関係について検討した。

方法

(1) 無菌化試験

ミッセル海水に Oxytetracycline HCl (OTC) を 100, 50, 25, 12.5, 6.25、および 3, 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度になるように加えて *Nannochloropsis sp.*、*Tetraselmis tetrathele*、および *Chaetoceros gracilis* を培養し、薬剤処理の影響を調べた。

(2) *Nannochloropsis sp.* と細菌の関係

Nannochloropsis sp. の生海水調整培地培養時の培地中の細菌数の変化を普通寒天海水培地を用いた平板塗布法で調べた。そして、培養 19 日目頃に細胞数が減少した培養液から分離した細菌のうち、特徴が異なる 20 個の単一コロニーを再培養して簡単な性状検査を行ない、種類が異なると考えられる 12 株を用いて *Nannochloropsis sp.* に対する攻撃試験（一定の菌数を接種した培地で培養）を行なった。

(3) *Chaetoceros gracilis* と細菌の関係

Chaetoceros gracilis 培養時の培地中の細菌数を *Nannochloropsis sp.* の場合と同様に調べた。そして、細胞数の減少時に 6 株の細菌を分離し、簡単な性状と薬剤感受性（ディスク法）を調べた。また、*Nannochloropsis sp.*、*Tetraselmis tetrathele*、および *Chaetoceros gracilis* を用いて攻撃試験を行なった。方法は(2)と同じであるが、供試した株は種類が異なると思われる 2 株で、攻撃濃度はそれぞれ 10^7 と 10^1 CFU/ml オーダーの 2 段階を用いた。

結果と考察

(1) 無菌化試験

結果は図 7 に示す通りで、*Nannochloropsis sp.* では実験開始時にいずれも細胞数が減少し

たが、OTC 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度以下ではその後正常に増殖した。また、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上では増殖性が悪くなる傾向がみられた。

Tetraselmis tetrahele はOTC 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下ではいずれも正常に増殖したが、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では増殖性が悪い。

Chaetoceros gracilis はOTC 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下では正常な増殖がみられるが、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上では増殖の開始が遅れるか、または増殖しなかった。また、正常に増殖した区では培養 10 日目を過ぎた頃から細胞数の減少がみられ、顕微鏡観察でも細菌の増殖が認められた。

今回の結果では各藻類の無菌化は充分でなく、*Nannochloropsis sp.* と *Tetraselmis tetrahele* については平板培地を用いた方法が比較的簡単であると思われる。また、*Chaetoceros gracilis* は平板培地での発育性に難点があり、より良い方法を検討する必要がある。

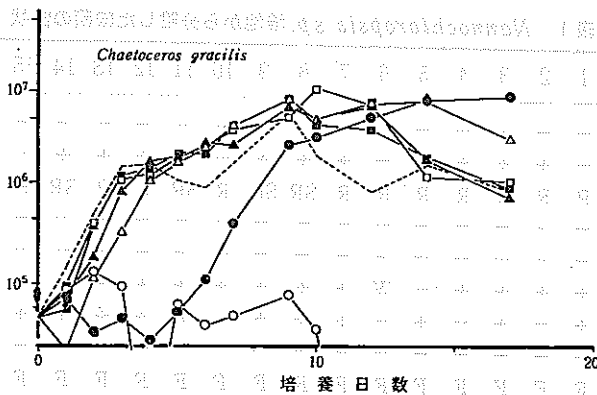
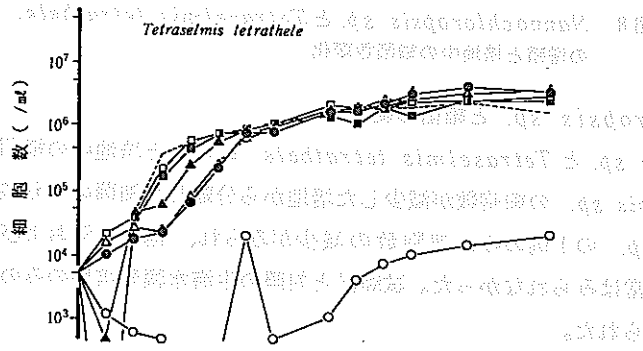
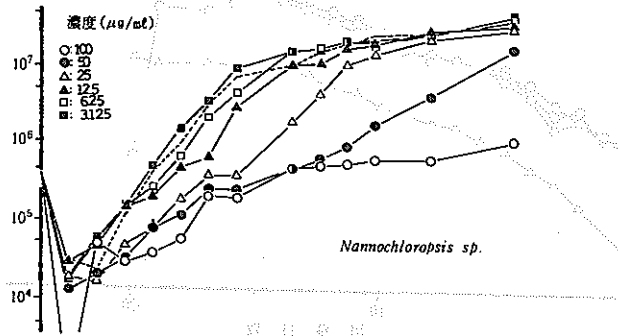


図7 オキシテトラサイクリン処理の増殖に及ぼす影響

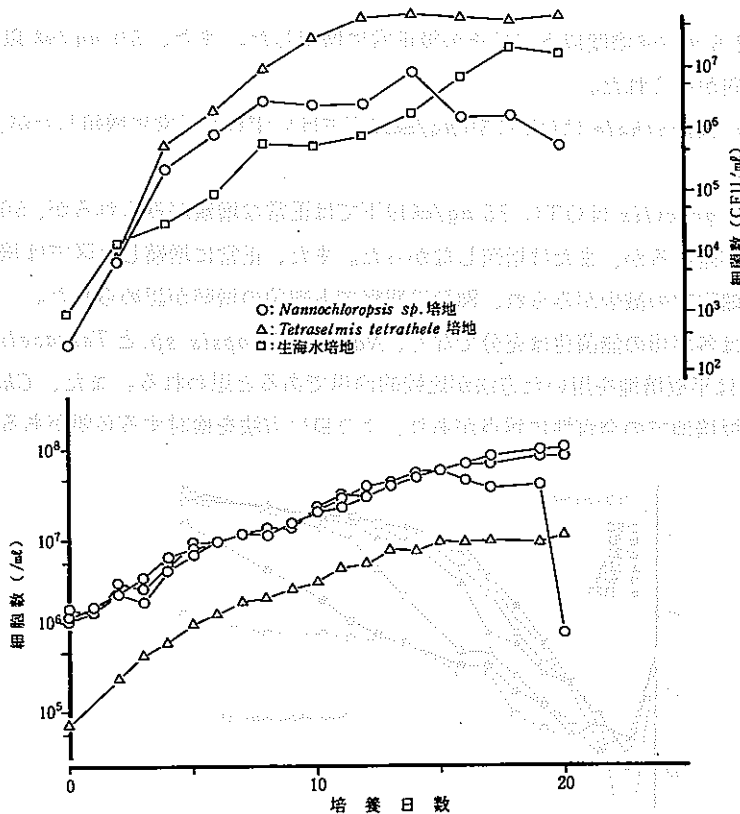


図8 *Nannochloropsis sp.*と*Tetraselmis tetrahele*.
の増殖と培地中の細菌数変化

(2) *Nannochloropsis sp.* と細菌の関係

Nannochloropsis sp. と *Tetraselmis tetrahele* の増殖と培地中の細菌数の変化を図8に、*Nannochloropsis sp.* の細胞数が減少した培地から分離した細菌の性状を表1に示す。*Nannochloropsis sp.* の1例のみに細胞数の減少がみられ、他の2例および *Tetraselmis tetrahele* では異常はみられなかった。試験区と対照の生海水調整培地のみ区では同じような細菌数の変化がみられた。

表1 *Nannochloropsis sp.* 培地から分離した細菌の性状

Strain No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
グラム	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
運動性	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
形	R	R	R	R	R	R	R	SR	SR	R	SR	R	R	SR	R	R	R	R	R	SR
H ₂ S 産生	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
インドール	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
オキシダーゼ	+	+	+	+	-	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
カタラーゼ	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	W	+	+	+	+	W	+	W	+	+
スウォーミング	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O F 試験	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F

R: 桿菌, SR: 短桿菌, W: 弱陽性, F: 醗酵的

表2 攻撃試験の細菌濃度

Strain No	CFU/ml ($\times 10^5$)
1	1.66
2	2.19
4	3.13
5	14.50
6	0.284
8	1.59
11	1.11
12	14.70
13	0.959
15	15.70
19	17.50
20	7.94

分離した細菌は多種類で、性状検査とコロニー観察から12株を選んで *Nannochloropsis sp.* に対する攻撃試験を行なった。供試株の濃度は表2に示す通り約 $10^4 \sim 10^6$ CFU/ml で、結果は図9に示す。いずれの株も *Nannochloropsis sp.* の増殖には影響しないと思われた。

この結果から培地中に普通に常在する細菌は *Nannochloropsis sp.* の増殖には影響せず、今回の細胞数の減少原因は生海水から混入した捕食動物等他の要因が予想される。

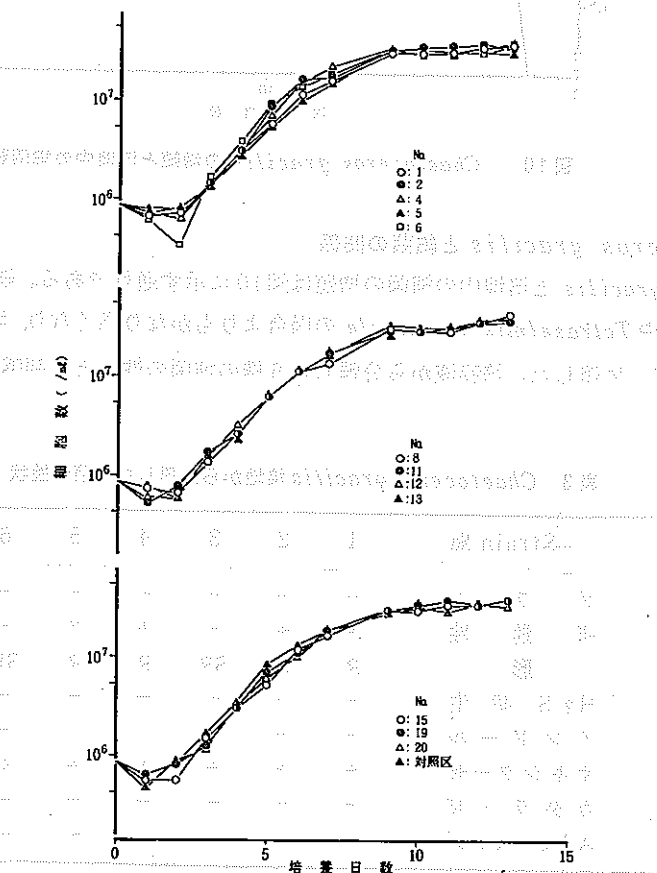


図9 *Nannochloropsis sp.* に対する細菌攻撃試験

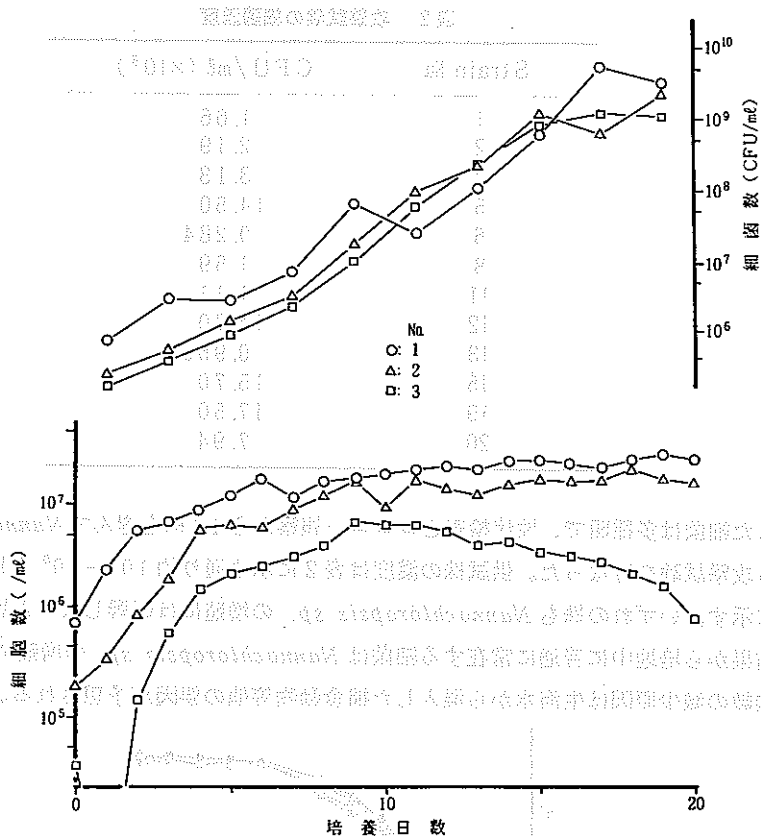


図10 *Chaetoceros gracilis* の増殖と培地中の細菌数変化

(3) *Chaetoceros gracilis* と細菌の関係

Chaetoceros gracilis と培地中の細菌の増殖は図10に示す通りである。細菌濃度は *Nannochloropsis sp.* や *Tetraselmis tetrahele* の場合よりもかなり高くなり、培養19日目に 10^9 CFU/ml オーダーに達した。培養液から分離した6株の細菌の性状と薬剤感受性は表3と4に示す通りである。

表3 *Chaetoceros gracilis* 培地から分離した細菌の性状

Strain No	1	2	3	4	5	6
グラム	-	-	-	-	-	-
運動性	+	+	-	+	?	-
形	R	R	SR	R	R	SR
H ₂ S 産生	-	-	-	-	-	-
インドール	-	-	-	-	-	-
オキシダーゼ	+	+	+	+	+	+
カタラーゼ	-	-	-	-	-	-
スウォーミング	-	-	-	-	-	-

R: 桿菌, SR: 短桿菌

表4. *Chaetoceros gracilis* 培地から分離した細菌の薬剤感受性

Strain No	1	2	3	4	5	6
アンピシリン	+	++	+++	-	++	+++
ストレプトマイシン	+	+	++	+	+	++
テトラサイクリン	+	++	+++	-	+	++
オキシテトラサイクリン	-	+	++	++	+	++
ジメチルクロルテトラサイクリン	+	++	+++	+	++	+++
ドキシサイクリン	-	++	+++	+	++	+++
エリスロマイシン	++	++	+++	++	+	-
スピラマイシン	-	-	+	-	-	++
クロラムフェニコール	++	+++	+	+++	+++	+
スルフィソキサゾール	-	-	++	-	-	++
スルファモノメトキシ	-	-	-	-	-	-
スルファジメトキシ	-	-	-	-	-	-
フラゾリドン	-	-	-	-	-	-
コリスチン	+++	++	-	-	++	-
ポリミキシン B	+++	++	-	++	+++	-
ナリジキック・アシド	++	+	++	+	+	+
オキソリン酸 (10 μ g/)	++	++	++	+	++	++
オキソリン酸 (2 μ g/)	+	+	+	-	+	+
オキソリン酸 (0.5 μ g/)	-	-	-	-	-	-

また2種の菌株を用いた攻撃試験の結果は図11に示す通りで、いずれの実験区でも増殖性に差はみられず、供試菌株の影響はないようである。

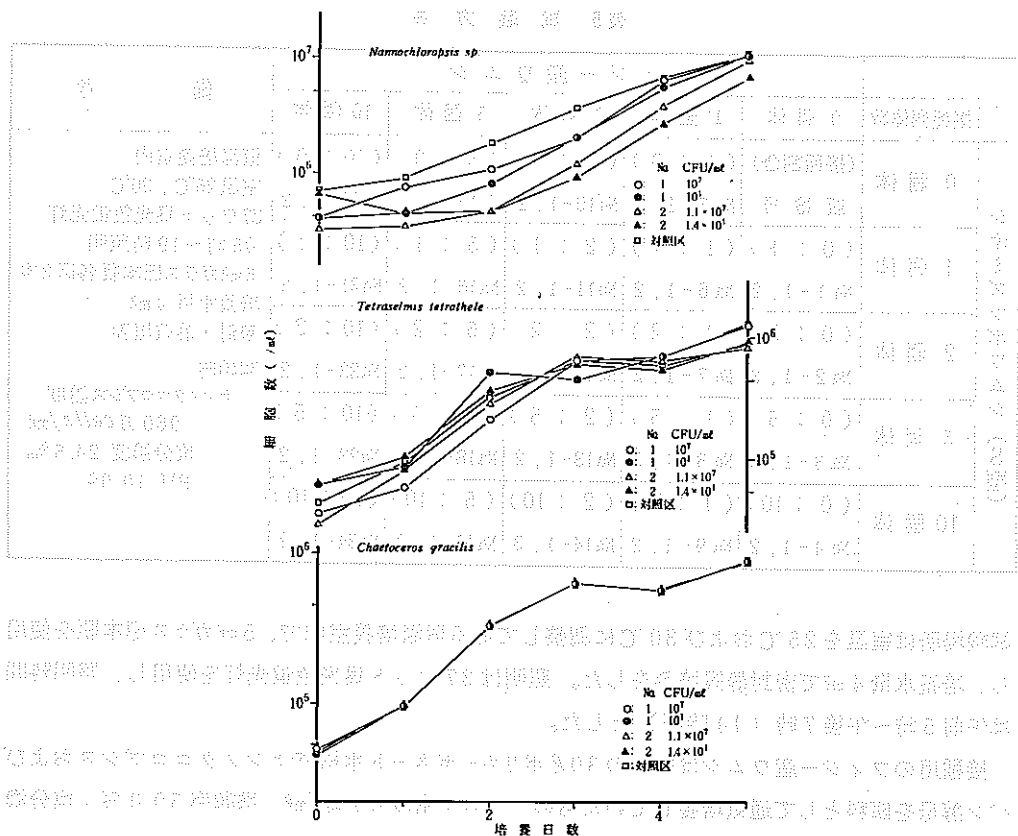


図11 *Chaetoceros gracilis* 培地分離細菌を用いた攻撃試験