

減退傾向がみられる。

-70℃(Step)は防御剤無添加区では総ての株が増殖せず、添加区は2例中2例が培養5~12日目にかけて増殖を開始した。保存2年目は培養3日目頃から増殖しており、少し増殖能力の減退がみられる。

以上のことから、キートセロスは凍害防御剤を用いて-70℃で凍結保存すれば、約3年間保存が可能である。

ナンノクロロプシス、テトラセルミス、及びキートセロスのいずれの株においても、保存2~3年目にかけて保存期間中の増殖能力減退傾向が明らかになった。より安定した保存は液体窒素等の使用で可能になると思われる。

II キートセロスの無菌化試験

キートセロス培養時に細胞数が減少し、細菌が増加する現象がみられた。そこで、キートセロスを無菌化することで安定した培養が可能になるのではないかと考えて、抗菌剤を用いて無菌化試験を行なった。

材料及び方法

材料 凍結保存試験に供したキートセロスを株分けして用いた。

方法 実験1 オキシテトラサイクリン塩酸塩、オキシリニン酸、ストレプトマイシン硫酸塩、アミノベンジルペニシリン、及びニフルスチレン酸ナトリウムをそれぞれ $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度に含んだミッケル海水(滅菌済み)で供試株を2日間培養し、その後滅菌海水で洗浄してから抗菌剤無添加ミッケル海水(滅菌済み)で培養して細胞数の変化を観察した。なお、滅菌海水で5回洗浄した株を対照区に用いた。

実験2 供試株を抗菌剤添加ミッケル海水(滅菌済み、抗菌剤濃度: $25 \mu\text{g}/\text{ml}$)で1日培養後、新しい抗菌剤添加培地に移して培養する。これを5日間繰り返し、毎日サンプリングして抗菌剤無添加ミッケル海水(滅菌済み)に接種し、細胞減少傾向の変化を調べた。用いた抗菌剤はオキシリニン酸(OA)、クロラムフェニコール(C)、アミノベンジルペニシリン(Pb)、ストレプトマイシン(S)、及びフラジオマイシン硫酸塩(F)で、同じ抗菌剤を繰り返し用いた区と、毎日異なる抗菌剤を用いた区の計6区である。なお、実験2の終了時点で顕微鏡観察で比較的細菌汚染がなくキートセロスの細胞が健全な区からサンプリングして再びミッケル海水(滅菌済み)で培養して増殖性を調べた。

結果と考察

実験1 滅菌海水洗浄のみの対照区は原株の特徴である培養14日目頃の細胞数減少傾向がみられたが、抗菌剤処理区はいずれも順調な増殖性がみられ、培養24日目頃から細胞数の減少や細菌の増加が観察された(図10)。ニフルスチレン酸処理区は増殖しなかった。

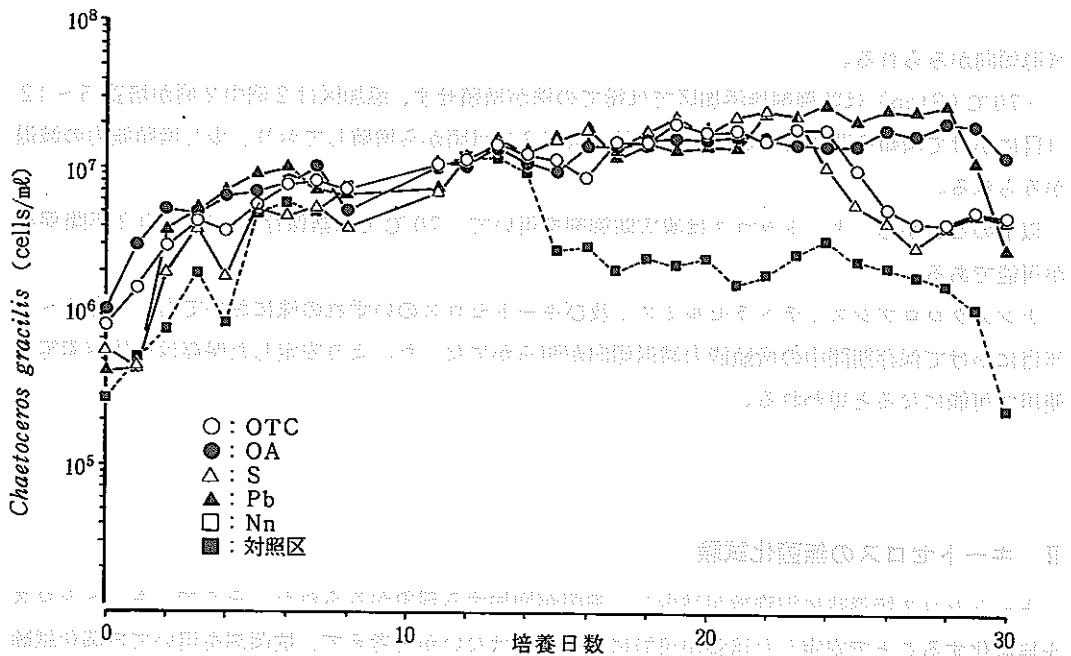


図10 キートセロスの増殖性に及ぼす薬剤処理の影響

実験2 抗菌剤添加培地1日培養後の供試株の増殖性は図11に示すとおりである。いずれの区も培養14日目頃(S区は16日目頃)から細胞の減少がみられた。抗菌剤添加培地2日培養後の供試株の増殖性は図12に示すとおりである。細胞減少期はOA区では13日目、C区は16日目、Pb区は16日目、S区は18日目、F区は16日目、及びOA/C区は14日目頃で、全体的に2日程細胞の減少期が遅れる傾向がみられる。

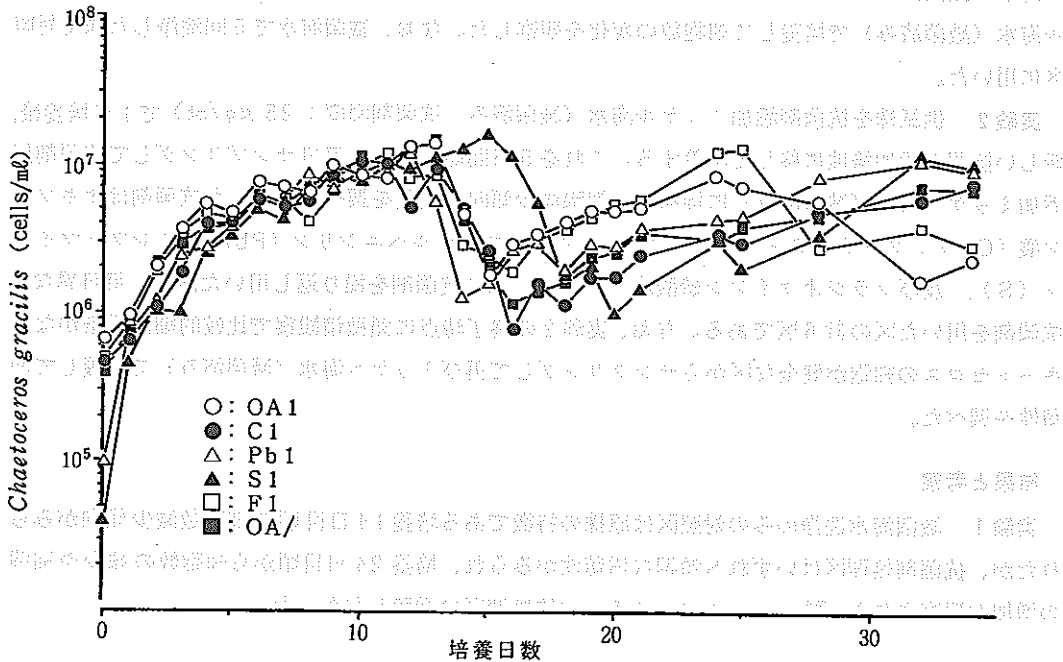


図11 キートセロスの増殖性に及ぼす薬剤処理の影響

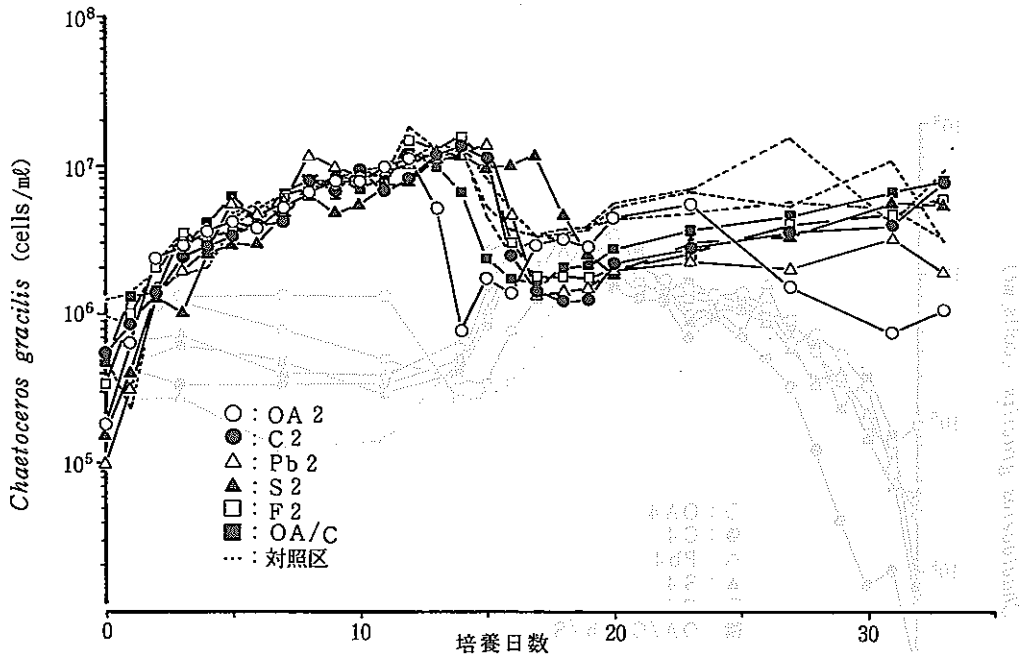


図 12 キートセロスの増殖性に及ぼす薬剤処理の影響

抗菌剤添加培地 3 日培養後の供試株の増殖性は図 13 に示すとおりである。細胞減少期は OA 区では 15 日目, C 区は 17 日目, Pb 区は 17 日目, S 区は 19 日目, F 区は 13 日目, 及び OA/C/Pb 区は 14 日目頃で OA, C, 及び Pb 区は細胞の減少期が 2 日処理区に比べて 1 日程遅れる傾向がある。

抗菌剤添加培地 4 日培養後の供試株の増殖性は図 14 に示すとおりである。細胞減少期は OA 区では 14 日目, C 区は 17 日目, Pb 区は 17 日目, S 区は 18 日目, F 区は 14 日目頃, 及び OA/C/S 区は 16 日目頃で, 3 日処理区とあまり差がない。

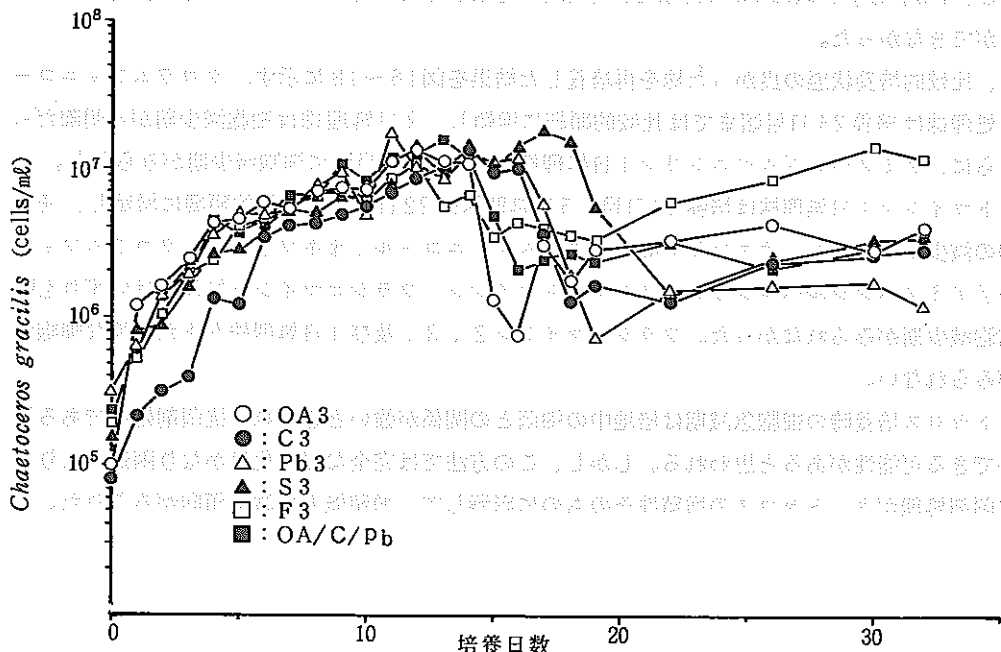


図 13 キートセロスの増殖性に及ぼす薬剤処理の影響

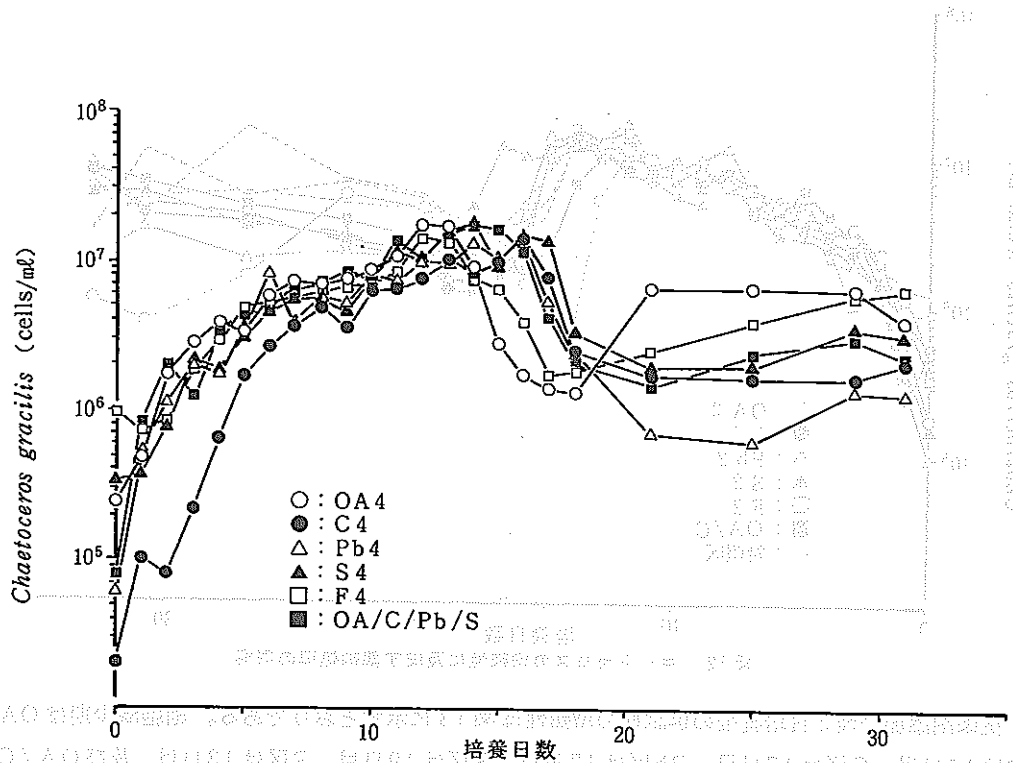


図14 キートセロスの増殖性及び薬剤処理の影響

抗菌剤添加培地で5日培養後の供試株の増殖性は図15に示すとおりである。細胞減少期はOA区では13日目、C区は18日目以降、Pb区は11日目、S区は16日目、F区は18日目以降、及びOA/C/Pb/S/F区は13日目頃で、処理回数を増加したにもかかわらず細胞減少期を遅らせることができなかった。

次に、比較的培養状態の良かった株を再培養した結果を図16~18に示す。クロラムフェニコール1日処理株は培養24日目頃までは比較的順調に増殖し、2日処理株は細胞減少期が不明瞭だった。さらに、アミノベンジルペニシリン1日処理株は培養20日目頃に細胞減少期がみられた。ストレプトマイシン1日処理株は培養24日目、5日処理株は22日目まで比較的順調に増殖し、その後細胞の減少がみられた。オキシリン酸/クロラムフェニコール、オキシリン酸/クロラムフェニコール/アミノベンジルペニシリン/ストレプトマイシン/フラジオマイシン処理株はいずれも明瞭な細胞減少期がみられなかった。フラジオマイシン2, 3, 及び4日処理株もまた明瞭な細胞減少期がみられない。

キートセロス培養時の細胞急減期は培地中の細菌との関係が強いと思われ、抗菌剤処理である程度改善できる可能性があると思われる。しかし、この方法では完全な無菌化はかなり困難であり、また抗菌剤処理がキートセロスの増殖性そのものに影響して、増殖能力の減退傾向がみられた。

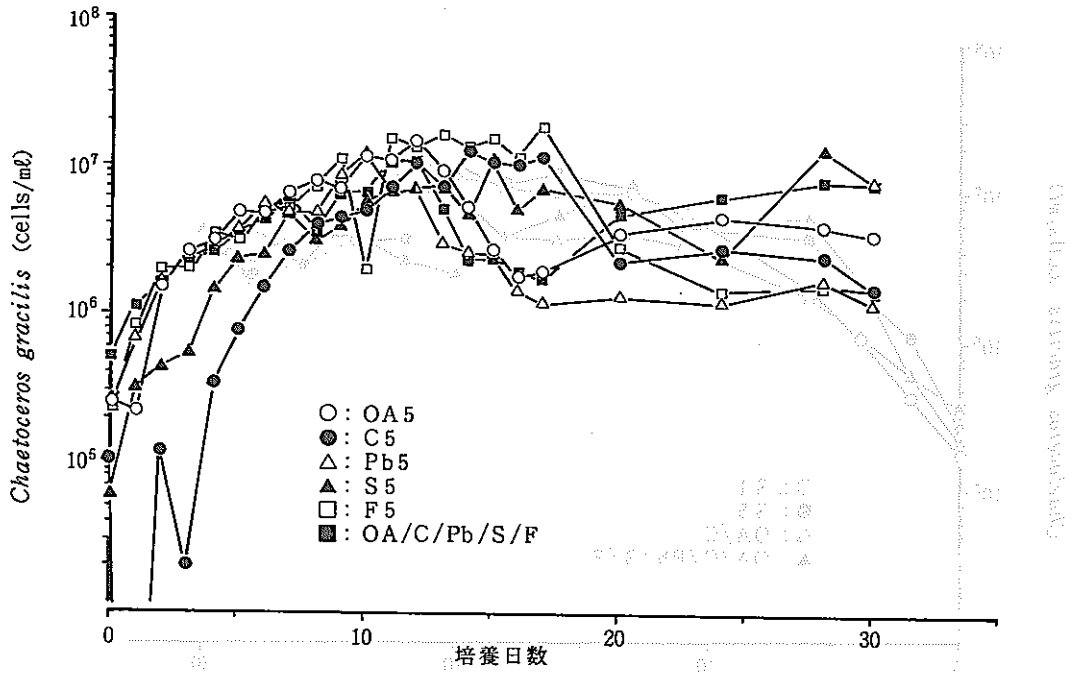


図 15 キートセロスの増殖性及ばす薬剤処理の影響

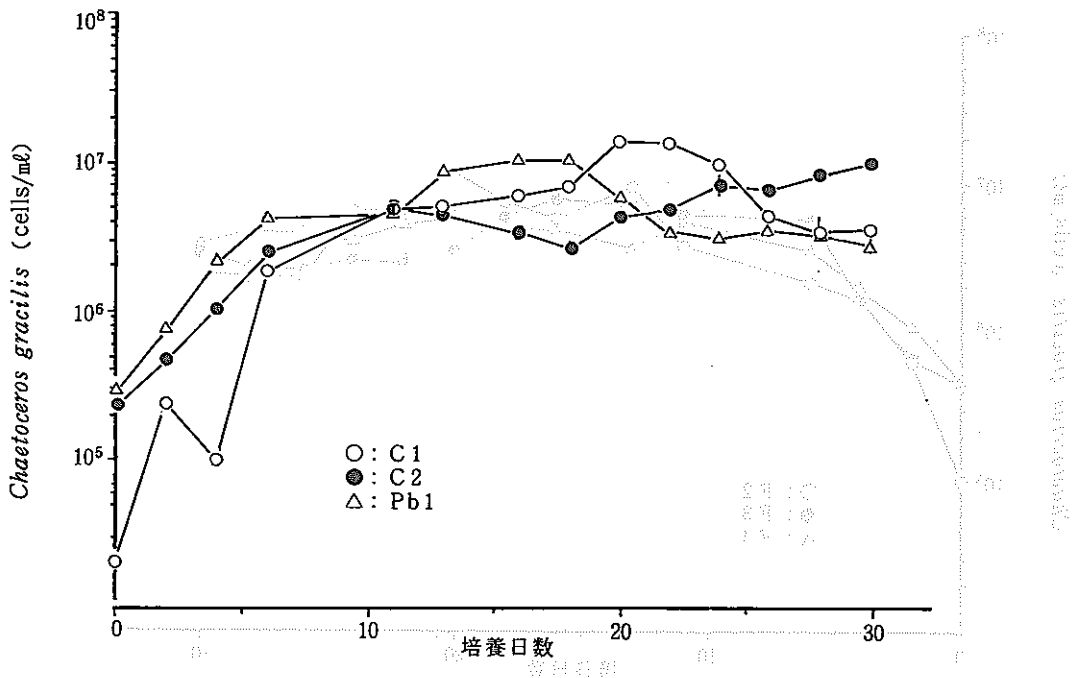


図 16 キートセロスの増殖性及ばす薬剤処理の影響

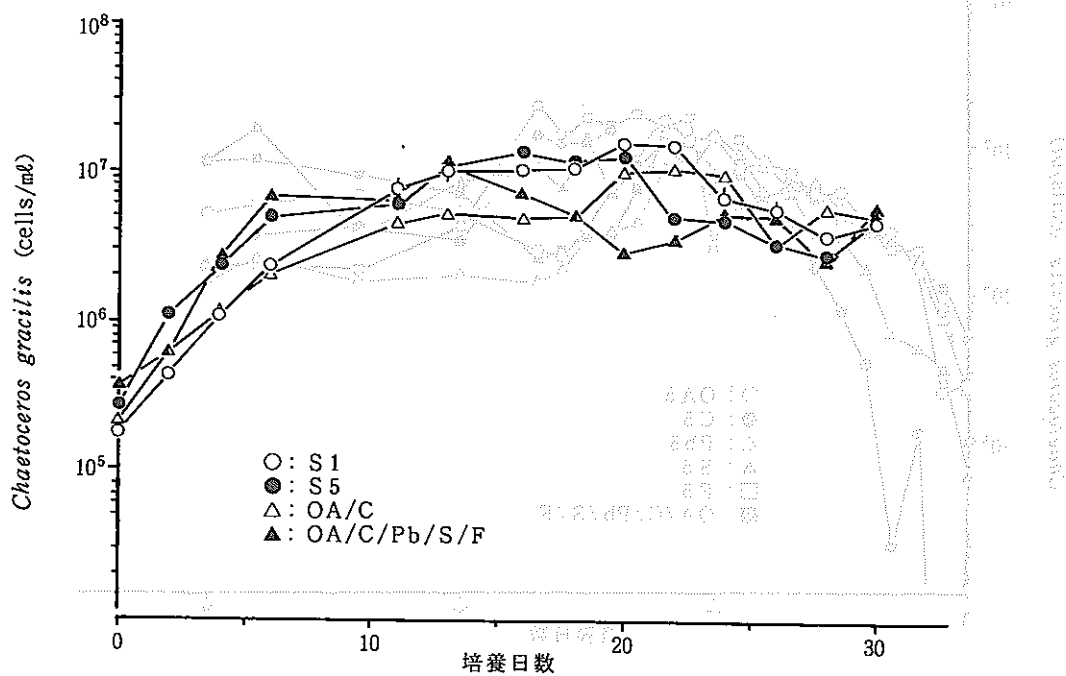


図 17 キートセロスの増殖性に及ぼす薬剤処理の影響

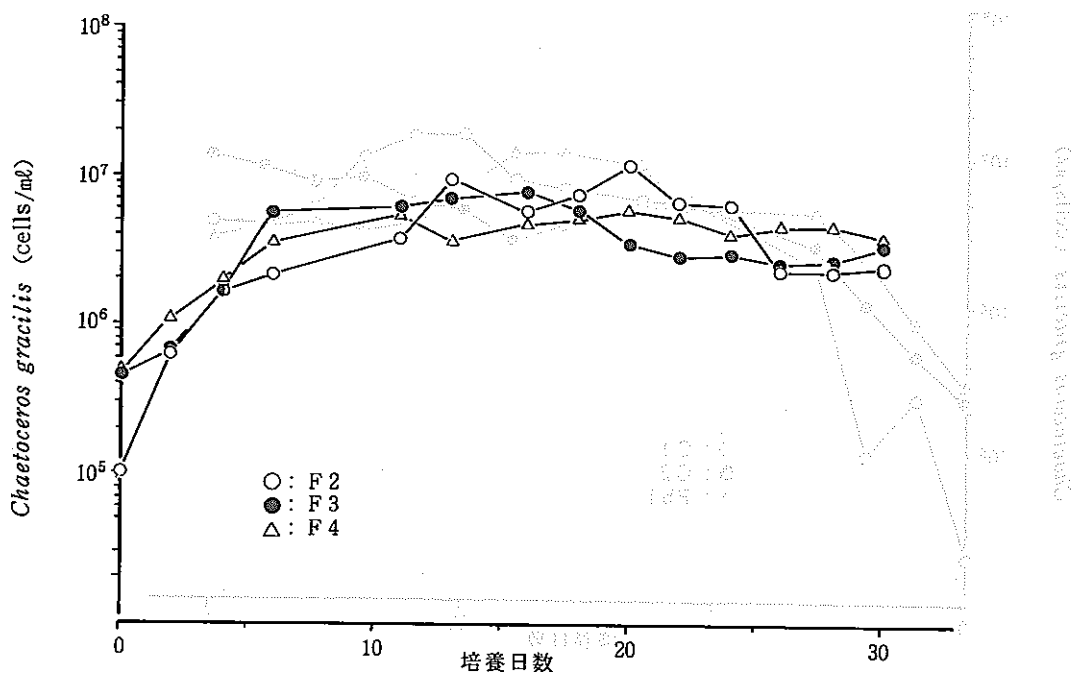


図 18 キートセロスの増殖性に及ぼす薬剤処理の影響