

(4) 継代培養試験

表6 継代培養試験の培養方法及び条件

表6に継代培養試験の培養方法及び条件を示した。試験は、初代培養からの継代(継代培養)、振盪培養からの継代(再通気初代培養)及び再通気初代培養からの継代(再通気継代培養)で行った。培養海水、照明時間、蒸発した水分の補完方法、細胞密度の計数方法等は初代培養と同様に行った。^{13,14)}

初代培養試験では、光強度、水温について検討し、継代培養試験では、主にシャコガイ種類、培地について検討を加えた。

共生藻種類	ヒレジャコ及びヒレナシジャコ
培養容器	500ml 平底フラスコ(保存培養は500~3,000ml)
水温	28~30℃
光強度	60 μ mol/m ² /s(保存培養は15~30 μ mol/m ² /s)
試験開始細胞密度	40 × 10 ⁴ cells/ml(保存培養は20~200 × 10 ⁴ cells/ml)
培地	P-ES 改変培地及び'イ' IMK 培地
培養形態	初代培養：外套膜から採取直後の元種を用いる。 継代培養：初代培養後の元種を用いる。 保存培養：初代培養及び継代培養後の元種を振盪培養。 再通気初代培養：保存培養後の元種を用いる。 再通気継代培養：再通気初代培養後の元種を用いる。
培養日数	7~13日(保存培養は10~200日)

2. 運動型細胞への変異条件の検討

培養は継代培養試験と同様の設備、器具及び条件で行い、培養後、増殖した試料内の運動型細胞の密度を計数した。総細胞密度に占める運動型細胞の比率を出現率とした。試料を血球計算盤に採った後、血球計算盤内での変異を連続して観察した。血球計算盤は、プラスチックバット(300 × 210 × 48mm)内に静置し、試料の乾燥を防ぐためにバット内には、水200mlを含ませた布を入れ、透明硬質塩ビ板で蓋をした。バットは、恒温室内に設置し光強度は培養時と同じ60 μ mol/m²/sとした。¹⁵⁾ 試験開始時間は、刺激を与えた時間とし、刺激後30分以降、60分置きに計数を行い、出現率の最高値を求めた。1試験区毎に6試料の平均値をとった。

(1) 運動型細胞出現推移の把握

運動型細胞の出現推移を把握するために、異なる明条件及び異なる照明時間での運動型細胞出現推移を観察した。また、攪拌刺激の強弱及び刺激時刻による出現推移を観察した。表7、表8、表9に試験の方法及び条件を示した。

表7 出現推移把握試験1(光刺激)の試験方法及び条件

	明条件(8:00~20:00)	明条件(14:00~2:00)	光条件(連続照明時間)
試験期間及び計数間隔	9:00~翌日13:00 60分後から120分置き 28時間	15:00~翌日19:00 60分後から120分置き 28時間	刺激を与え、90分後から60分置きに計数し、出現率が低下するまで
培養時の照明時間	8:00~20:00(12時間)	14:00~2:00(12時間)	12時間照明：8:00~20:00(12時間) 24時間照明：前日8:00~試験日8:00(24時間) 48時間照明：2日前8:00~試験日8:00(48時間)