多細胞海藻の無菌的培養—I.

サルファ剤による処理法

金 沢 昭 夫

(1968 年 2 月 19 日受理)

Axenic Culture of Multicellular Algae—I.
Treatment of Algae with Sulfa Drugs

Akio KANAZAWA*

The bacteriostatic effect of four sulfa drugs (sulfamerazine, sulfisomidine, sulfisoxazole and homosulfamin) on the axenic culture of multicellular algae, *Ulva pertusa* and *Porphyra tenera* was tested.

The summary of the method by which the axenic culture of algae can be obtained is as follows.

The algae was washed for ten minutes with a mixture consisting of each 200 ppm of the four sulfa drugs, and cultivated in the culture medium containing each 50 ppm of the four sulfa drugs, and then the culture medium was replaced in every two or three days.

By treating with this method, almost no harmful effect could be seen on the growth of algae.

藻類におけるビタミンなど微量有機成分の代謝を調べるためには、藻類の純粹培養と組成の明確な合成培養液を用いた実験が行なわれなければならない。藻類の人工培養については PROVASOLI ら¹⁾を始め多くの研究者により種々の処方が発表され、それらの合成培地を使用した藻類の純粹培養もさかんに研究されているが、ほとんどが単細胞微細藻類に限られている。大型海藻の無菌培養については、FISH²⁾が *Enteromorpha intestinalis* について、PROVASOLI³⁾が *Ulva pertusa* について、FOGG ら⁴⁾が *Ectocarpus confervoides* について、FRIES が *Goniotrichum elegans*^{5,6)}, *Nemalion multifidum*⁷⁾, *Polysiphonia urceolata*⁸⁾ について報告しているが、かならずしも成功するとは限らず安定していない。一方敦賀ら⁹⁾は藻類に付着する微生物の殺菌に紫外線及び抗生物質を用いてかなり効果のあることを認め、IWASAKI¹⁰⁾もアサクサノリについて抗生物質を使用している。

著者は多細胞海藻のビタミンなど微量有機成分の代謝を調べるにあたり、まず多細胞海藻の無菌的培養法としてサルファ剤による処理法を検討した結果、サルファ剤処理でも海藻の無菌化ができることを認めたので報告する。

実 験 方 法

人工培養液 海藻の人工培養液及び洗滌用滅菌海水には LEVRING の人工海水及び PROVASOLI ASP-6 を使用した。

海藻の処理方法 供試海藻にはアナアオサ *Ulva pertusa* とアサクサノリ *Porphyra tenera* を使用した。海藻はできるだけ若く、汚物、珪藻など付着物のない、また損傷、疾病のない活発なものを選び、適

* 鹿児島大学水産学部 (Fac. Fish., Kagoshima Univ., Kagoshima, Japan)

当な大きさのものをまず滅菌海水で洗い、つぎにサルファ剤（細菌汚過しないもの）100 ppm 添加滅菌海水中で、脱脂綿をもつて葉体の表面をこすりながら十分洗滌したのち、滅菌海水で洗いこれを前処理とした。つぎに前処理した海藻を無菌的に（以下無菌室、無菌箱で操作する）滅菌海水で数回洗滌したのち、サルファ剤溶液（細菌汚過したもの）に振盪しながら一定時間浸漬し、再び滅菌海水で数回洗滌して培養フラスコに投入した。

海藻の培養方法 海藻の培養は三角フラスコによる通気または綿栓による培養法を採用した。培養液は500 ml フラスコに250 ml 分注し、 1 kg/cm^2 で10分間加熱滅菌した。サルファ剤処理海藻は培養液250 ml 当り300 mg または径15 mm にくり抜いたもの15枚程度投入した。空気は毎分300 ml の割で通じ、培養温度はアオサ $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 、アサクサノリ $15 \pm 1^\circ\text{C}$ 、光は天然白色蛍光灯を一日に8時間（2,000 ルックス）照射した。なお培養液は2～7日毎に換水した。

無菌度検索法 本実験において、どの程度無菌になったかその処理効果を知るために、海藻を一定時間培養後その培養液1 ml または葉体を磨砕し培養液と混合したその1 ml をとつて菌数を測定した。無菌度検索用培地には ZoBELL 2216 培地、WAKSMAN 培地、PROVASOLI ASP-6、チオグレコレート培地及びカビ酵母用ブドウ糖ペプトン培地を使用した。ZoBELL, WAKSMAN, PROVASOLI 培地は 20°C 、2～5日平面培養とし、チオグレコレート培地は 37°C 、7日液体培養、カビ酵母用ブドウ糖ペプトン培地は 25°C 、10日平面培養とし、この条件で菌数0を一応無菌とした。

海藻の傷害度試験方法 海藻の傷害度を試験するために、FAHMY ら¹¹⁾ 及びそれを改良した NAGAI¹²⁾、尾形¹³⁾の方法によつた。すなわち TTC (テトラゾリウム塩; 2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride) 海水溶液（海水は1/2にうすめたもの）を入れたシャーレー中に葉体の一定量を入れ、真空デシケーター中で排気したまま、光（100 W）をあてながら 30°C で一定時間反応させる。つぎに葉体を引上げて濾紙で拭いたのち、70 メッシュの石英砂少量及び水4 ml とともに乳鉢でよくすりつぶし、それに氷酢酸及びトルエンをおのおの6 ml 加えかきまぜる。このカユ状物を遠心沈殿管に移し、3,000 rpm で3分間遠沈すれば、トルエン層にはフォルマザンと少量のクロロフィル及びカロチンが溶出する。この溶液のフォルマザンの吸収曲線におけるピークの吸光度（490 m μ ）をもとめて、その葉体の TTC 還元能とした（葉体の傷害度が高い程吸収の山が低い）。TTC 反応の条件はアオサの場合、試料0.2 g に TTC (5 mg/ml) 10 ml, 30°C 3時間、アサクサノリの場合、試料0.2 g に TCC (2 mg/ml) 10 ml, 30°C 1時間とした。

サルファ剤 サルファ剤は微生物の種類によつてその抗菌力が異なるので、グラム陰、陽性菌に有効な sulfamerazine, sulfisomidine, 大腸菌などに有効な sulfisoxazole 及び嫌気性菌に有効な homosulfamin の4種を混合して使用し、あらゆる微生物を静菌するようにした。これらサルファ剤は人工海水に溶かし、細菌汚過器で汚過したものを無菌処理及び培養液添加用に使用した。サルファ剤の濃度は上記4種の各ppm で表わした。

結 果

アオサに対するサルファ剤の無菌化効果 アオサに対するサルファ剤の無菌化効果を調べるために、まず前処理したアオサ葉体を100～500 ppm のサルファ剤で10～30分間振盪しながら浸漬したのち、滅菌海水で洗滌したものを滅菌培養液に投入し培養した。培養液にはサルファ剤を1～5 ppm 添加した。その結果は Table 1 の通りである。サルファ剤濃度100, 200, 500 ppm で葉体を処理した場合、いずれも0日目すなわち処理当日は菌が存在せず洗滌効果が認められるが、2日目には若干の細菌が、4日後はかなりの菌が検出され、またサルファ剤浸漬時間10分を20, 30分と延長してもその効果は認められなかつた。また毎日1回、4日間サルファ剤処理をくり返し、かつ換水してもやはり菌が検出され、この程度のサルファ剤処理では表面的効果だけで藻体内に存在する微生物には及ばないことがわかつた。この時間の経過とともに出現する微生物に対しては培養液中のサルファ剤により静菌する方法を試みた。すなわち培養液中のサルファ剤濃度を10～200 ppm に増加し、その無菌化効果を調べた結果は Table 2 の通りである。培養液に

Table 1. Bactericidal effect of sulfa drugs on axenic culture of *Ulva pertusa*.

Concentration and time of sulfa drugs in laver-washing	Concentration of sulfa drugs in culture medium of algae*	Bacterial count per 1 ml of culture medium of algae**			
		Incubation time of algae (days)			
		0	2	4	7
500 ppm, 10 min	5 ppm	0	0	0	2400
200 , 10	2	0	0	170	∞
100 , 10	1	0	590	2500	∞
100 , 20	1	0	280	2400	∞
100 , 30	1	0	50	370	∞

* LEVRING medium

** Bacterial count was measured on ZoBELL medium 2216.

Table 2. Bactericidal effect of sulfa drugs on axenic culture of *Ulva pertusa*.

Concentration and time of sulfa drugs in laver-washing	Concentration of sulfa drugs in culture medium of algae*	Bacterial count per 1 ml of culture medium of algae**							
		Incubation time of algae (days)							
		2	4	7	11	15	20	26	36
200 ppm, 10 min	200 ppm	0	0	0	0	10	0	0	0
" "	100	0	0	0	0	0	10	3	0
" "	50	0	0	0	0	0	0	0	0
" "	25	0	0	50	0	10	0	0	20
" "	10	20	30	30	560	470	320	30	150

* LEVRING medium

** Bacterial count was measured on ZoBELL medium 2216.

25~50 ppm 以上になるように添加すれば静菌作用があらわれ、2~3 日毎に換水すれば、ほとんど無菌状態に保持されることがわかった。

アオサに及ぼすサルファ剤の影響 培養液にサルファ剤を 25~50 ppm 以上になるように添加すると無菌化効果が認められたが、そのサルファ剤の藻体に及ぼす影響について海藻の傷害度と生長率を測定した。

Table 3. Effect of sulfa drugs on the growth of *Ulva pertusa*.

Concentration and time of sulfa drugs in laver-washing	Concentration of sulfa drugs in culture medium of algae*	Bacterial count per 1 ml of culture medium of algae**			Rate of growth $\frac{B-A}{A} \times 100(\%)^{***}$		TTC reaction (-log T)		
		Incubation time of algae (days)							
		0	7	14	7	14	0	7	14
200 ppm, 10 min	50 ppm	0(Z) 0(W)	0(Z) 0(W)	20(Z) 0(W)	39.9	57.2	0.201	0.135	0.154
200 , 10	100	0(Z) 0(W)	0(Z) 0(W)	0(Z) 0(W)	36.9	39.0	0.201	0.143	0.165

* LEVRING medium

** Bacterial count was measured on ZoBELL medium 2216 (Z) and WAKSMAN medium (W).

*** A: Weight of *Ulva pertusa* before incubationB: Weight of *Ulva pertusa* after a 7(14) day-incubation

その結果は Table 3 の通りである。培養液中のサルファ剤濃度 50 及び 100 ppm いずれもアオサの生長は正常で、とくに 50 ppm の方がよく、7 日で 39.9%, 14 日で 57.2% の生長率であつた。また TTC 反応も 1 週間目にはいくらか低いが、2 週間目は回復の傾向を示しており、使用サルファ剤濃度では藻体に対してそれほど影響がないものと思われる。また無菌度検索用培地は ZoBELL, WAKSMAN 培地を用い葉体を磨碎して調べた結果、培養一週間目では ZoBELL, WAKSMAN 培地ともに菌は検出されないが、2 週間で ZoBELL 培地に若干検出された。

アサクサノリに対するサルファ剤の無菌化効果と影響 アサクサノリについてもアオサ同様藻体に付着する微生物に対するサルファ剤の無菌化効果とその影響について調べた。その結果は Table 4 の通りである。アサクサノリはアオサ同様 200 ppm のサルファ剤で 10 分間処理し、培養液に 50 ppm 添加で効果があり、かつ藻体に及ぼす影響もほとんど認められなかつた。なおサルファ剤 5 ppm 添加のものが藻体の外観、生長率及び TTC 反応ともに悪いのは微生物による汚染がひどく藻体の一部が崩壊したためと思われる。

各培養液によるサルファ剤の無菌化効果 海藻の無菌的培養について、いかなる培養液が適するかを調

Table 4. Effect of sulfa drugs on axenic culture of *Porphyra tenera*.

Concentration and time of sulfa drugs in laver-washing	Concentration of sulfa drugs in culture medium of algae*	Bacterial count per 1 ml of culture medium of algae**		TTC reaction (-log T)			Rate of growth $\frac{B-A}{A} \times 100(\%)^{***}$	Condition of algae	
		Incubation time of algae (days)							
		7	14	0	7	14	14	7	14
200ppm, 10 min	50 ppm	0	0	0.67	0.62	0.43	39.7	Normal	Normal
200 , 10	20	0	20	0.67	0.54	0.51	37.5	"	"
200 , 10	5	80	640	0.67	0.68	0.38	19.3	"	Dwarfed

* LEVRING medium

** Bacterial count was measured on ZoBELL medium 2216.

*** A: Weight of *Porphyra tenera* before incubation

B: Weight of *Porphyra tenera* a 14 day-incubation

Table 5. Axenic culture of *Porphyra tenera* with various media.

Culture medium of algae*	Bacterial count per 1 ml of culture medium of algae**		TTC reaction (-log <i>T</i>)			Condition of algae	
	Incubation time of algae (days)						
	7	14	0	7	14	7	14
PROVASOLI ASP-6	10	0	0.68	0.60	0.54	Normal	Normal
LEVRING medium	0	20	0.68	0.72	0.60	"	"
Natural seawater	0	0	0.68	0.66	0.70	"	"

* *Porphyra tenera* was washed with 200 ppm of sulfa drugs for 10 min. before incubation and was cultivated in culture medium containing 50 ppm of sulfa drugs.

** Bacterial count was measured on ZoBELL medium 2216.

べた結果は Table 5 の通りである。LEVRING の人工海水、PROVASOLI ASP-6 及び天然海水いずれの培養液を使用しても大差なく同様の無菌化効果がえられた。

考 察

多細胞海藻アオサ及びアサクサノリについて、サルファ剤による無菌的培養を試みた結果、海藻の処理方法としてはまず藻体を脱脂綿で十分こすりながら洗滌したのち、4 種のサルファ剤 200 ppm 溶液に振盪しながら 10 分間浸漬洗滌すると、葉体表面に付着する微生物は除去することができる。しかしいくら洗滌をくり返しても藻体内を完全無菌にすることは不可能で、もし藻体内に菌が残存する場合、その菌の発育を阻止するためには培養液中にサルファ剤を添加し静菌することが必要で、その有効濃度は海藻の生育に及ぼす影響も考えあわせて、50 ppm 付近がよく、この方法により無菌的培養が可能であることを知った。

一般に多細胞海藻はその形態が千差万別で複雑なものが多く、とくに葉体の表面が平滑でない場合、粘質物が付着する場合、損傷、疾病がある場合、細胞壁に付着しないし侵入した微生物はなかなか殺菌できない。そのため海藻の種類によつては無菌になりにくいもの、全く不可能なものがある。また同じ海藻でもその棲息していた環境水で相違し、たとえば汚水のひどい場所に棲息する海藻はとうてい無菌になりえない。また海藻の種類によつてはサルファ剤の影響を受け易いもの、あるいは無菌的培養法に適せず直ちに枯死するものがあるので、個々にこれらを吟味した上で海藻の無菌的培養を進めなければならない。

また一般にサルファ剤の効果は殺菌作用より静菌作用であるから、葉体はできるだけ強く振盪しながら洗滌し、微生物を脱離させることが必要である。そしてこの操作をくり返すことによつて微生物を激減させ、藻体内に残存するかも知れない微生物に対しては、さらに培養液にサルファ剤を添加したまま培養し、無菌ないし静菌状態を保つのが目的である。このサルファ剤により無菌化する方法はアオサ及びアサクサノリの場合、かなり効果的であつたが、かならず成功するとはかぎらず、汚染される場合もある。もちろん完全無菌になれば、サルファ剤を培養液中に添加する必要はないわけであるが、今のところ完全無菌になつた例は極めて少ない。

なお本実験では無菌の検定について、ZOBELL, WAKSMAN, PROVASOLI ASP-6, チオグレコレート培地、酵母カビ用培地を使用して、培養液または藻体を磨砕し、その中の菌数を調べた。そしてその菌数 0 を無菌の一応の基準と定めた。もちろんこれ以外の培地、培養条件、とくに長期の観測によらないと完全無菌かどうか判明しない。著者の実験でも 3 カ月目に菌が検出された例がある。しかしながら、本法により菌数 0 となつた藻類は無菌あるいは微生物を極度に制限したものであり、藻類のビタミンなど微量有機成分の生理及び代謝を調べるためには使用できるのではないかと考えられる。

要 約

多細胞海藻アオサ及びアサクサノリについて、sulfamerazine, sulfisomidine, sulfisoxazole 及び homo-sulfamin 4 種のサルファ剤による無菌的培養を試みた結果、次の方法により無菌的培養が可能であることを知った。

1. 藻体は 4 種サルファ剤をおのおの 200 ppm 含む混液で 10 分間洗滌する。
2. 海藻の培養液に 4 種サルファ剤をおのおの 50 ppm になるように添加して培養を行なう。
3. 培養液は 2 ~ 3 日毎に換水する。

また本法においては海藻の生長に対するサルファ剤の影響はほとんど認められなかつた。

終りに、本研究のご校閲をいただいた鹿児島大学水産学部柏田研一教授に感謝の意を表する。

文 献

- 1) L. PROVASOLI, J. J. A. McLAUGHLIN, and M. R. DROOP: *Arch. Mikrobiol.*, **25**, 392~428 (1957).
- 2) G. R. FISH: *Med. Göteborgs Bot. Trädgård*, **18**, 82 (1950).
- 3) L. PROVASOLI: *Biol. Bull.*, **114**, 375~384 (1958).
- 4) G. E. FOGG and G. T. BOALCH: *Nature*, **181**, 789~790 (1958).
- 5) L. FRIES: *Nature*, **183**, 558~559 (1959).
- 6) L. FRIES: *Physiol. Plantar.*, **13**, 264~275 (1960).
- 7) L. FRIES: *Experientia*, **17**, 75~78 (1961).
- 8) L. FRIES: *Nature*, **202**, 110 (1964).
- 9) 敦賀花人・前重静彦: 水産増殖, **6**, 43~49 (1959).
- 10) H. IWASAKI: *Biol. Bull.*, **121**, 173~187 (1961).
- 11) A. R. FAHMY and E. O'F. WALSH: *Biochem. J.*, **51**, 55~56 (1952).
- 12) S. NAGAI: *J. Inst. Polytech. Osaka City Univ.*, **D 6**, 1~27 (1955).
- 13) 尾形英二: 本誌, **22**, 404~407 (1956).