

アマノリ葉体の生体凍結保存—I.

海水中および半乾燥状態で凍結保存した

アサクサノリ葉体の生存能力について

右 田 清 治

Freeze-Preservation of *Porphyra* Thalli in Viable State—I.

Viability of *Porphyra tenera* Preserved at Low Temperature
after Freezing in the Sea Water and Freezing
under Half-Dried Condition

Seiji MIGHTA

Some physiological studies on the freezing of algae had been reported. Recently many investigators have made researches on the preservation of micro-organisms for culture collections, and it seems likely that the freezing or freeze-drying is logical technique for maintaining viable cultures of cells, and has been successful in many instances. However, on marine algae, these experiments are rare in the literature.

In this study, the author experimented on the freeze-preservation of thalli of *Porphyra tenera* and observed the viability of freeze-thawed thalli under the microscope.

The results are summarized as follows:

1. When the cell of *Porphyra* thalli was injured by freezing, at first the plastid was scattered, and then the cell expanded in size, finally shrinking up.

2. The vegetative and rhizoidal cells of thalli showed higher resistivity against freezing than the carposporangial cells. On the other hand, the survivals of neutral spores were more than those of carpospores and free living *Chonchocelis*-filaments.

3. From the results of freeze-preservation at various temperatures, the percentage of survival cells was higher, in freezing at -20°C or over, than in deep-freezing at about -75°C . Furthermore, in deep freezing, the number of survival cells were less in rapid cooling than in slow cooling.

4. During freeze-preservation at $-18\sim-20^{\circ}\text{C}$, most of cells frozen in the sea water were dead after 30 days storage, whereas many cells frozen under half-dried condition remained fully viable after 4 months.

5. The survivals of thalli frozen in the presence of glycerol did not increase, while glucose protected thalli against injury of freeze-preservation.

藻類の凍結については、低温における致死温度や耐凍性に關連した生理学的研究が古くから行なわれており、最近では培養藻類の収集保存のための凍結の研究もみられ¹⁻³⁾、そのうちには採苗を目的としたものもある。このような生体を生存状態で凍結貯蔵する技術は、牛などの家畜の人工授精における精子の保存方法で大きな進歩を遂げており⁴⁾、また多くの微小生物を対象とした真空凍結乾燥による保存法も開発されてきたが、海藻についてのこれらの知見は比較的少ない。しかし、Kylin⁵⁾ が多数の海藻で行なった耐凍性についての実験ではアマノリ、アオノリ類などは短時間の海水中の凍結で強い抵抗性を示し、また富士川⁶⁾ は養殖ノリ葉体を低温で貯蔵し秋に採苗を試みたりしている。

このようにアマノリ葉体が強い耐凍性を示すので、その実態をさらに究明するため、海水中や半乾燥状態の葉体をいろいろの条件下で凍結保存して、融解後の葉体細胞の生死をしらべた。その結果を報告する。

材料および方法

凍結保存の実験に供したアサクサノリの葉体は佐賀県鹿島市地先と長崎市東望の浜で養殖網より採集した。また果胞子および糸状体はその成熟葉体より得たもので、中性胞子は未成熟葉体より放出されたものである。

凍結保存には、 -20°C 以上の場合は電気冷蔵庫の製氷室および保蔵温度の違った2種のアイストッカーを利用し、約 -75°C の温度には魔法びつにアルコールとドライアイスを入れて低下させ、実験期間中ドライアイスを補給してその温度を保った。

海水中での凍結の際は、径 3cm 高さ 8cm の管瓶に海水 (Cl. 18.0%) を入れ、その中央部より下に試料を沈めて凍らせた。試料の凍結部分の水を融解した海水の塩素量は Cl. 12.5~15.0% で、とくに低鹹ではなかったが、なお部分的な低鹹の影響を除くため、管瓶の底や壁面で凍結した部分は切除したあとで水を融かした。半乾燥状態での凍結の場合は、葉面に余分の水滴が残らない状態を水分含有量 100%、完全乾燥させたときを 0% とみなし、実際には葉体を広げて濾紙にはさみ強く圧さえて水分を切った状態を基準として 50% の水分量まで乾燥させ、それをポリエチレン袋につつんで凍結させた。

抗凍結物質と考えられるグリセリン、グルコースの効果については、それらの 2.5~20% の濃度の海水に葉体を直接入れ、またその海水に浸した葉体を濾紙で水分を切り半乾燥状態にして凍結した。

凍結時の温度降下の速度は、 -20°C 以上の凍結の場合は海水中のもので毎分約 0.4°C 、半乾燥状態で 1.1°C 、 -75°C の場合は海水中で約 12°C 、半乾燥状態で 16°C であり、いずれも海水が氷結する間は温度の降下は一時緩慢であった。凍結葉体は室温で融解し、ただちに栄養塩を添加した海水に入れ、1週間送気培養したのち顕微鏡下で生死を判定した。

葉体の生存状況は、個体や葉体の各部分によってかなり差があり、とくに栄養細胞部と果胞子嚢部では大きく相違したので、両部を区別してしらべた。なお精子嚢部は生死の判定が困難で、仮根部は栄養細胞部と差が少なかったため、これらの部分の調査は省略した。

生存能力の表示は、各個体の任意の 5ヶ所を検鏡して一視野 (40×10) における生存細胞と凍死細胞を数え、生存細胞の全細胞に対する生存率を求め、さらに 4~5 個体の総平

均値で表わした。

実 験 結 果

本実験では凍結融解後の葉体細胞の形態変化を生死の判定の基準としたので、まずその観察結果について述べる。

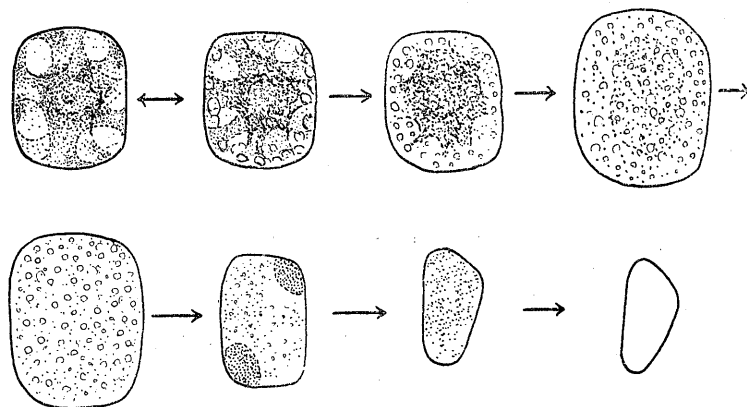


Fig. 1. Death-process of vegetative cell, *Porphyra tenera*, injured by freezing.

凍結後の生存栄養細胞は、生育時の細胞と同様に星状の色素体ははっきりみられ、細胞膜部の輪郭がやや不鮮明になることもあったが、両者には明瞭な差は見出せなかった。しかし凍結期間が長くなってくると、細胞の周辺部で色素体が分離した状態がみられることもあるが、全体の色素体の変形せずその色が濃い状態では、培養結果から判断してまだ生きていたものとみなされた。さらに凍結の障害を受けると、細胞内では色素体の拡散、退色が起り、次いで原形質の凝固、細胞の膨張がみられるようになるが、これらの状態では細胞は明らかに枯死しており、やがて萎縮、赤変し遂に白色となる。この栄養細胞の変化は Fig. 1 および Fig. 2, A に示した。栄養細胞では、これらの各過程は半乾燥状態で凍結した葉体をすばやく融解して検鏡した場合でもみられ、その後の培養で急激に

Table 1. Change of survival rate of *Porphyra tenera* during freeze-preservation at $-18\sim-20^{\circ}\text{C}$.

Period of preservation (days)	Vegetative cells	Test materials		
		Carpospores	Neutral-spores	<i>Conchocelis</i> phases (free living)
2	100	82	—	—
5	83	47	79	44
10	71	23	65	38
20	64	4	52	16
30	15	0	7	0

Number shows survival rate (%).

Table 2. Survival rate of thalli, *Porphyra tenera*, frozen in the sea water of various chlorinities and preserved at -18~-20°C.

Period of preservation	Chlorinity of sea water (%)				
	4.2	8.5	11.5	15.0	18.5
10 days	18 * (0)**	64 (35)	78 (60)	70 (63)	41 (32)
20 days	0 (0)	38 (21)	72 (67)	52 (27)	29 (5)

* Number shows survival rate (%) of vegetative cells.

** " " carposporangial cells.

は変わらないので、すでに凍結中に変化しているように観察され、解氷直後でも或る程度は生死の判定ができるようである。この凍死細胞の変化は、栄養細胞に限らず果胞子嚢、精子嚢、仮根細胞でもほぼ同様であるが、生殖細胞では色素体が明瞭でないため生死の判定は培養後でないとはっきり区別できなかった。

凍結保存後の生存率 凍結後の生存率はおもにノリ葉体を材料として、海水中や半乾燥状態で凍結保存し、凍結期間、凍結温度、葉体の水分含有量、抗凍結物質などの影響について実験した。

海水中凍結 海水中で葉体や放出半日後のガラス上に着生した果胞子、中性胞子および発芽1週間後の糸状体を -18~-20°C で凍結保存した。その結果は Table 1 のようになり、葉体の栄養細胞はかなり強い耐凍性を示し凍結20日後でも50%以上の細胞が生き残り、一方体外に放出された胞子は凍死したものが多かったが、中性胞子は果胞子や糸状体より抵抗性が強かった。

海水が凍結する際には、初めに凍る海水で塩分濃度が低い傾向があるので、塩素量の異なる海水に葉体を入れて凍結し、その影響をしらべた。その結果は Table 2 のようになり、Cl. 4.2%では葉体の細胞はほとんど凍死し、8.5%ではかなり生き残り、生存率は11.5、15.0%でより高くなったが、さらに高鹹の18.5%になると再び低くなっている。また葉体の栄養細胞部と果胞子嚢部では前者が耐凍性が強く、この傾向は後述の実験でも同様であった。このように塩分濃度で生存率に差がみられるので、海水中凍結のほかの実験では、方法の項で前述したように葉体の凍結部が低高鹹にならないよう留意した。

Table 3. Effect of glycerol and glucose on survival of thalli, *Porphyra tenera*, frozen in the sea water and preserved at -18~-20°C.

Concentration	Period of preservation	
	5 days	20 days
Glycerol 2.5%	72* (64)**	60 (33)
	87 (82)	69 (21)
	83 (75)	45 (30)
	55 (43)	62 (25)
Glucose 2.5	74 (75)	68 (47)
	70 (72)	51 (36)
	85 (74)	72 (50)
	93 (89)	85 (77)
Control (sea water)	87 (74)	54 (25)

*,** : Remarks are as in Table 2.

抗凍結物質としてグリセリン、グルコースなどの添加が生存能力を高める効果があるか、またそれらの濃度の影響を知るため、それぞれ2.5~20%に稀釈した海水中で葉体を凍結保存した。凍結融解後の葉体細胞の生存率は、Table 3 のようになり、対照の海水と比べグリセリン、グルコースを加えた海水ではとくに高い値を示さなかったが、20日間貯蔵したものではやや効果が認められ、グルコース10、20%海水で他の例より生存細胞が多かった。

凍結保存温度が違った場合の葉体細胞の生存率は Table 4 の如くなり、 $-70\sim-75^{\circ}\text{C}$ の超低温では -20°C 以上の温度より凍死細胞が多く、 -20°C 以上でも -10°C や -5°C で生き残りが多くなっている。この過度の低温凍結で凍死が多い傾向はグリセリン、グルコースを添加した場合も同様であった。

半乾燥状態での凍結 乾燥状態で凍結すると生存期間を延長できることが多くの生物で知られているので、アサクサノリ葉体でもこれに関連した実験を行なった。

Table 4. Survival rate of thalli, *Porphyra tenera*, frozen in the sea water and preserved at various low temperatures.

Period of preservation	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)			
	$-4\sim-6$	$-8\sim-10$	$-18\sim-20$	$-70\sim-75$
5 days	85 * (60)**	91 (73)	69 (46)	23 (4)
10 days	79 (52)	85 (54)	62 (27)	18 (0)

*,** : Remarks are as in Table 2.

葉体の乾燥度と生存との関係については、水分含有量の違った葉体を凍結保存して実験した。解氷後の生存率は Table 5 のようになり、一般的に海水中での凍結の場合より強い耐凍性を示し、乾燥度は水分含有量 40,60%のもので生き残りが多く、1ヶ月後でも90%以上の細胞が生存した。また凍結温度では、 $-18\sim-20^{\circ}\text{C}$ の場合が $-70\sim-75^{\circ}\text{C}$ より凍死がはるかに少なかった。

Table 5. Relation between moisture content and survival of thalli, *Porphyra tenera*, during freeze-preservation.

Temperature	Period of preservation	Moisture content			
		20%	40	60	80
$-18\sim-20^{\circ}\text{C}$	30 days	87 * (76)**	95 (93)	99 (97)	91 (82)
$-70\sim-75^{\circ}\text{C}$	10 days	31 (13)	37 (25)	40 (32)	25 (3)

*,** : Remarks are as in Table 2.

葉体をグリセリン、グルコースを添加した海水に浸したあと半乾燥状態（水分含有量50%）で凍結した場合、4ヶ月間の保存期間中における生存率は Table 6 のようになり、

グリセリンの添加は対照と比べてとくに著しい効果は認められなかったが、グルコースを添加したものでは凍死がやや少なくなっている。またその濃度の影響をみると、グリセリンでは2.5%で生き残りが多く高濃度では障害が出ており、グルコースでは5~20%の広範囲の濃度で効果がみられた。なお、この実験では比較的に長期にわたって凍結保存した

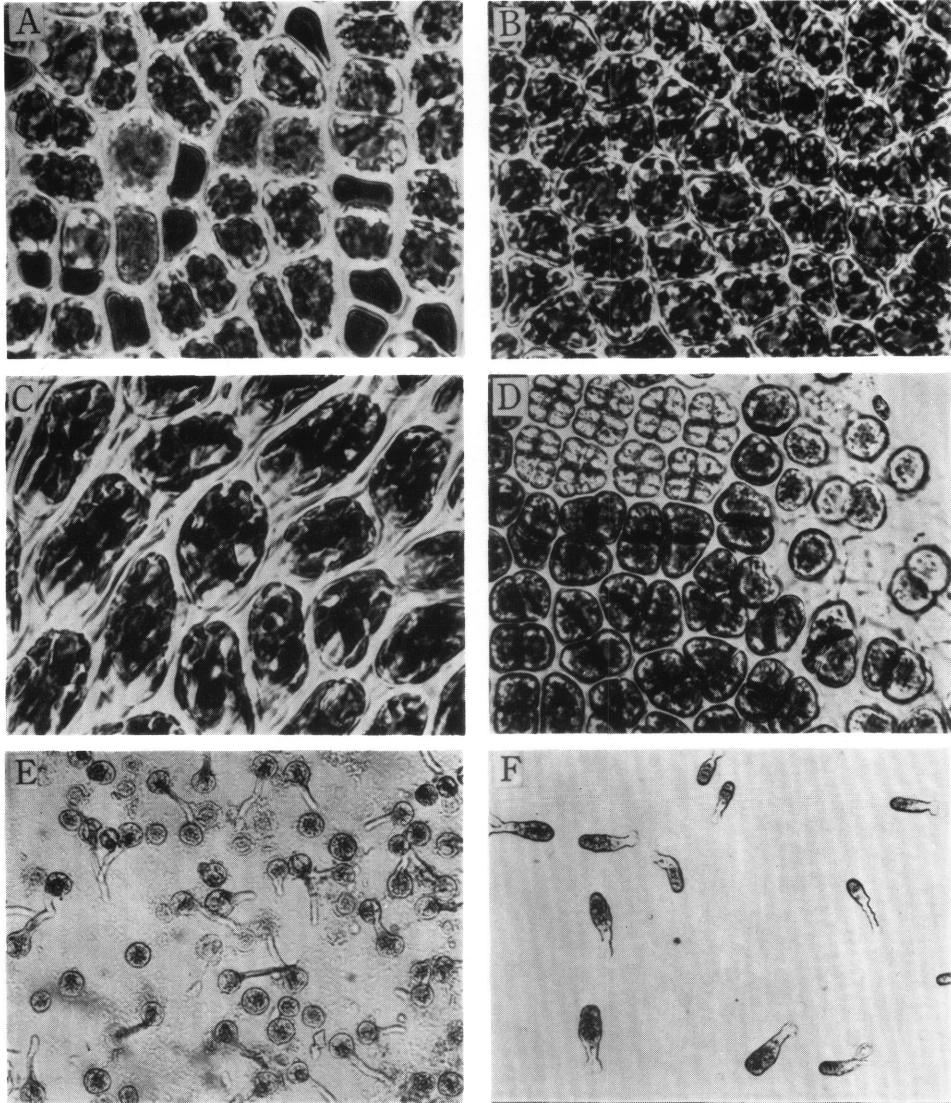


Fig. 2. Survival cells of *Prophyra tenera* during freeze-preservation. A : vegetative cells injure by freezing in sea water. B ; survival vegetative cells after 4 months' freeze-preservation. C ; survival rhizoidal cells after 4 months. D ; survival sexual cells after 4 months. E ; germination of carpospores, frozon in sea water and preserved for 10 days. F ; germination of neutral spores, frozen in sea water and preserved for 10 days. A-D ; $\times 350$, E ; $\times 100$ F ; $\times 80$.

Table 6. Effect of glycerol and glucose on survival of thalli, *Porphyra tenera*, frozen under half-dried condition and preserved at $-18\sim-20^{\circ}\text{C}$.
(Materials were soaked in 2.5~20% glycerol or glucose sea water, and then they were dried up to about 50% moisture content before freezing.)

Concentration	Period of preservation (months)		
	1	2	4
Glycerol 2.5%	96* (83)**	80 (52)	86 (70)
	5	98 (61)	72 (39)
	10	70 (28)	65 (20)
	20	52 (35)	58 (4)
Glucose 2.5	100 (98)	93 (84)	85 (52)
	5	100 (97)	96 (88)
	10	95 (91)	94 (90)
	20	99 (95)	97 (91)
Control (sea water)	97 (89)	98 (93)	90 (68)

*,** : Remarks are as in Table 2.

Table 7. Survival rate of thalli, *Porphyra tenera*, frozen under half-dried condition and preserved at various temperatures.

Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	$-4\sim-6$	$-8\sim-10$	$-18\sim-20$
Survival rate (%) vegetative cells	76	89	84
carposporangial cells	52	81	69

After the preservation for 30 days.

ので、保存日数と生存との関係を見ると、4ヶ月後までは凍死細胞の増加は割合に緩慢であって、対照の無処理のものでは栄養細胞部で90%、果胞子嚢部で68%、グルコースを添加した良好な例では栄養細胞部で95%、果胞子嚢部で90%の細胞が4ヶ月後もなお生存した。Fig. 2. B~D は4ヶ月間凍結保存した葉体の健全な細胞の顕微鏡写真である。

半乾燥状態での凍結で凍結温度と生存能力との関係は、すでに Table 5 から約 -75°C の過度の低温では凍死が多いことは明らかであるが、さらに -20°C 以上の3段階の温度で30日間凍結保存した。融解後の葉体細胞の生存率は、Table 7 の如くなり各温度でとくに大きな相違はみられないが、 $-8\sim-10^{\circ}\text{C}$ でもっとも高く、 $-18\sim-20^{\circ}\text{C}$ がそれに次ぎ、 $-4\sim-6^{\circ}\text{C}$ でやや小さな値となっている。

また葉体を凍結させる際に、保存温度まで下げる冷却速度が生存能力と関係があることが考えられるので、アイスストックとドライアイスを用いて、冷却速度を加減して -75°C まで冷却し、その温度で10日間保存した葉体の生存率をしらべた。その結果は Table 8 のようになり、A, B の如く急速に -75°C に下げたものでは凍死がきわめて

Table 8. Effect of cooling velocity on survival of thalli, *Porphyra tenera*, frozen under half-dried condition and preserved at $-70\sim-75^{\circ}\text{C}$

Exp.	Cooling velocity				Survival rate (%)	
					vegetative cells	carposporangial cells
A	7 min				12	10
	15	—75°C—				
B	15	10 min	1 hr	20 min	15	7
	4 —75°C—					
C	15	10 min	1 hr	1 hr	72	53
	4 —20—75°C—					
D	15	1 hr	24 hr	5 min	80	46
	—20—75°C—					

After the preservation for 10 days.

多く、C、D の如く -20°C までゆっくり下げた場合はかなり多くの細胞が生き残った。また 15°C より 4°C に至るまでの降下速度の生存に及ぼす影響はほとんど認められなかった。

考 察

凍結融解後の葉体の生存状態は、方法の項でも述べたように、個体によりまた同一個体の部分によっても大きな相違があり、例えば同じ条件下で凍結した葉体で一方はほとんど障害を受けなかったのに他方は大部分が凍死するようなこともしばしばみられ、アサクサノリ葉体の耐凍性は材料によってまた微小環境条件により大きく左右されているものと考えられる。さらに葉体各部を顕微鏡下でしらべて細胞の生き残り平均値で生存状態を表示する方法は、必ずしも適当とは思われないが、+・-などの表現では十分の比較ができないため、本研究ではこの方法を用いた。したがって、数値にはかなりの誤差が見込まれるが、送気培養後の肉眼的観察とその結果とは常によく一致し、生存の概略は表示し得たと思う。

アサクサノリの細胞が凍害を受けた場合にみられる細胞内容の拡散、細胞の膨大、萎縮、退色などの変化は、他の藻類の凍死⁷⁾の場合と比べてくに違った点はないようである。海藻を海水中で凍結した実験で、Kylin⁵⁾ はアマノリの葉体が $-18\sim-20^{\circ}\text{C}$ で10時間後も生存するとし、また照本^{8,9)} はアナアオサが -10°C で24時間、ボウアオノリが -20°C で24時間以上の耐凍性を示すと報告しているが、本実験でアサクサノリはさらに長期の凍結でも生存能力があることがわかった。しかし20日以上凍結保存では凍死細胞が増えており、海水中で1ヶ月以上良好な状態で生体を保存することは困難であると考えられる。また葉体の各部分、とくに果孢子嚢形成部と栄養細胞、仮根細胞部で耐凍性に相違があるのは、海水中凍結に限らず半乾燥での凍結でもみられる現象で、これは尾形・松井¹²⁾の呼吸に関する実験でも两部分で呼吸係数に差があることなどを考え合せると、两部分の生理的相違に起因するとも想像される。さらに実験例は少ないが、中性孢子と果孢子、糸状体では凍結後の生存率に差があり、これは各世代の乾燥に対する抵抗性とも一致し、あるいは両孢子に本質的な生態的差違があることを暗示しているようにも思われる。

これらの胞子は放出されたあとでも短時日であれば凍結保存が可能であるが、解氷後の付着能力はかなり弱まるようである。

海水中での凍結に際し、氷結の進行過程で塩分濃度が相違する部分ができるが、その差は予想以上に小さく、本実験ではそれによる誤差は一応排除し得たと思う。しかし塩分濃度を変え海水中で凍結した場合、葉体の生存率が大きく相違し、とくに正常海水よりやや低い濃度 (Cl. 11.5~15.0%) で生存が多かった点は興味深く、もし乾燥状態で凍結保存する場合の最終塩分濃度と生存能力と関係があれば、凍結前の処理には工夫を要することになる。いずれにしても、海水中でアサキサノリ葉体が想像以上の耐凍性を示したが、これは Mazur¹³⁾ 酒井¹⁴⁾ らが無機塩類の溶液中で凍結した実験でみられるように、海水中に含まれる食塩などの成分が凍結緩衝の保護作用をしているとも考えられる。

乾燥状態で凍結すると障害を軽減できることはすでによく知られており、本実験でも同様な結果がみられた。すなわち、海水中で凍結保存した葉体は1ヶ月後にほとんど凍死したが、半乾燥状態で凍結したものでは4ヶ月後でも大部分の細胞が生存し、さらに長期の生存の可能性が十分考えられる。最近、凍結真空乾燥が生物の保存に盛んに用いられており、藻類でも Watanabe²⁾ は藍藻の長期保存に成功しているのだから、ノリ葉体でこの方法が利用できるかも知れない。しかし桜田¹⁵⁾ は微生物の凍結で過度の乾燥は保存性をそこなうとしており、アサキサノリでも同じことがいえるようで、この方法については今後の研究が必要である。

グリセリン、グルコース、麦芽糖などが凍結緩衝の作用があるのは周知のことで、牛などの人工授精保存にすでに実用され⁴⁾、微生物の凍結保存にも効果があることが認められている^{16,17)}。この研究では、ノリ葉体に対するグリセリン、グルコースの効果は顕著ではないが、ただグルコース添加の海水に浸し半乾燥状態で凍結した例では生存率がやや高くなっている。しかし海水中にはほかの凍結緩衝の成分が含まれていること、半乾燥状態で効果を十分に判定するには実験期間が短かったことなどを考えると、この結果から抗凍結物質の効果が少ないと断定することはできないように思う。なお照本¹⁰⁾ はマリモの凍害に対して数種の多価アルコールで凍害防止の効果が相違することを指摘しており、さらに高級な凍結保護液の処方追求されねばならない。

凍結保存温度の影響については、最近照本⁸⁻¹¹⁾ がアナアオサ、ボウアオノリ、マリモなどで凍結温度が高いほど生存が多いことを実証しているが、本研究でも $-70\sim-75^{\circ}\text{C}$ の過度の低温で凍死が多く、 -20°C 以上で生存率が高い傾向がみられた。また保存の適温は -10°C 以上のように考えられるが、長期保存のための温度についてはなお検討の余地がある。一般に冷却速度と生物の生存能力とは深い関係があるといわれているが¹³⁾、アサキサノリでも同様の知見が得られ、 -75°C のような低温での凍結保存でも冷却速度が遅ければ凍死はかなり少なかった。しかし室温から氷結までの温度の降下速度と生存率とはあまり深い関係はないように考えられる。

この研究で、アサキサノリが凍結に対して強い抵抗性を示すことを確認し、4ヶ月間の凍結保存で多数の葉体細胞が生き残り、なお今後凍結前処理や保存状態の改善によってさらに長期間の生体保存が可能であると思われる。産業的な目的でこの凍結保存法を利用すれば、成熟葉体を保存して多忙な海苔養殖期に行なわれている糸状体の培養を終業期まで遅らせることが可能であり、さらに保存期間を延長して越夏させた葉体の中性胞子や栄

養細胞を用いて秋に採苗することも考えられるが、これについては保存法のほかにも究明されるべき課題が少なくないように思う。

摘 要

アサクサノリ葉体を海水中や半乾燥状態で凍結保存した場合の生存能力について実験した。

1. 凍結の障害を受けた細胞は、まず色素体の拡散が起り、次いで細胞が膨張し、さらに細胞は萎縮し色は退色する。

2. 凍結保存におけるアサクサノリ葉体の生存能力は、仮根・栄養細胞部が果孢子嚢部より強い耐凍性を示し、また放出後の中性孢子は果孢子や糸状体より多く生き残った。

3. -20°C 以上の温度で凍結保存した葉体細胞は $-70\sim-75^{\circ}\text{C}$ の場合より生存率が高く、凍結の冷却速度が速いと凍死細胞が多くなる。

4. $-18\sim 20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した場合、海水中で凍結した葉体は30日後にはほとんど死んだが、半乾燥状態で凍結したものは4ヶ月後でも大部分が生き残った。また凍結前の水分含有量が40~60%の葉体で生存細胞が多かった。

5. 抗凍結物質としてのグリセリンやグルコースの効果は明確には認められなかったが、グルコースを添加した海水に浸して半乾燥状態で凍結した葉体では生存率がやや高かった。

この研究を行なうにあたり御指導、御鞭撻をたまわった長崎大学高良夫助教授、御教示いただいた銭谷武平教授に深く感謝する。

文 献

- 1) Daily, W. A. and J. M. McGuire : Preservation of some algal cultures by lyophilization. *Butler Univ. Bot. Stud.*, 9, 139-143 (1954).
- 2) Watanabe, A. : Some devices for preserving Blue-green algae in viable state. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 5, 153-157 (1959).
- 3) Venkataraman, G. S. : A method of preserving Blue-green algae for seeding purposes. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 7, 96-99 (1961).
- 4) 西川義正 : 牛の人工受精に於ける最近の進歩、殊に精子の保存方法について。家畜繁殖学最近のあゆみ, 168-185 (1957).
- 5) Kylin, H. : Über die Kälteresistenz der Meeresalgen. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, 35, 370-384 (1917).
- 6) 富士川 溍 他 : 朝鮮海苔の生理に関する研究, 朝鮮総督府水試報告, 8, (2), 27 (1937).
- 7) 照本 勲 : 藻類の凍死 (綜述). 藻類, 6, 99-106 (1958).
- 8) 照本 勲 : アナアオサの耐凍性. 低温科学, 生物篇, 18, 35-38 (1960).
- 9) 照本 勲 : ポウアオノリの耐凍性. 低温科学, 生物篇, 19, 23-28 (1961).
- 10) 照本 勲 : マリモの凍害に対する凍害防止剤の効果について. 低温科学, 生物篇, 18, 43-50 (1960).
- 11) 照本 勲 : マリモの凍害と乾燥害. 低温科学, 生物篇, 17, 1-8 (1959).
- 12) 尾形英二・松井敏夫 : アサクサノリの呼吸に関する研究-Ⅱ. 生長物質, 窒素化合物の影響および乾燥, pH の影響に関する再検討. 日水誌, 29, 991-995 (1963).
- 13) Mazur, P. : Mechanisms of injury in frozen and frozen-dried cells. *In*, Culture collections; perspective and problems. Edited by S. M. Martin. Toronto (1962).

- 14) 酒井 明：植物細胞の凍害の機構 I . 凍害に対する媒液の影響 (1) . 低温科学, 生物篇, **19**, 1-16 (1961).
- 15) 桜田弘一：微生物についての凍結乾燥と液状乾燥の比較. 保存実験 (続報). 低温科学, 生物篇, **17**, 79-84 (1959).
- 16) Levine, N. D. and W. C. Marquardt : The effect of glycerol and related compounds on survival of *Trichomonas foetus* at freezing temperatures. *J. Protozool.* **2**, 100-107 (1955).
- 17) Bardley, S. G. : Loss of adaptive enzyme during storage. *In*, Culture collections ; perspective and problems. Edited by S. M. Martin. Toronto (1962).