

## 銅およびニッケルイオンによる浮遊性珪藻 *Chaetoceros gracilis* の成長阻害効果\*

岩瀬嘉之<sup>1</sup>・多記 徹<sup>1</sup>・常田和義<sup>1</sup>・横浜康継<sup>2</sup>

<sup>1</sup>大日本塗料(株)基礎研究部 (324 栃木県大田原市下石上 1382-12)

<sup>2</sup>筑波大学下田臨海実験センター (415 静岡県下田市 5-10-1)

Iwase, Y., Taki, T., Tsuneta, K. and Yokohama, Y. 1994: Inhibitory effects of copper and nickel ions on growth of a planktonic diatom, *Chaetoceros gracilis*. Jpn. J. Phycol. (Sôru) 44:145-148.

A short-term evaluation method of anti-fouling property was established using algal cultures in the laboratories. A planktonic diatom, *Chaetoceros gracilis*, was cultured in aqueous solutions with various concentrations of copper and nickel ions eluted from anti-fouling agents to examine the inhibitory actions. Results showed that an effective dose of anti-fouling substances can be estimated in a few days in laboratory experiments. The inhibitory effect of copper ion on the growth of *C. gracilis* was enhanced in the presence of nickel ion.

*Key Index Words:* anti-fouling - *Chaetoceros gracilis* - cupronickel - cuprous oxide - diatom - nickel

<sup>1</sup>Yoshiyuki Iwase, Tohru Taki and Kazuyoshi Tsuneta, Fundamental Research Laboratory, Dai Nippon Toryo Co., Ltd. Shimoishigami, Ohtawara, Tochigi, 324 Japan

<sup>2</sup>Yasutsugu Yokohama, Simoda Marine Research Center, University of Tsukuba, Shimoda, Shizuoka, 415 Japan

船底や海中構築物への生物付着を防除するために用いられる防汚剤の効果を評価する方法としては、それぞれの防汚剤を配合した塗料を塗布した試験板を海中に浸漬して評価する実海水浸漬試験が主流であるが、この方法には、1) 評価期間が長い、2) 季節や海域による影響を受け易い、3) 塗料配合が大きく影響する、4) 効果の判定が難しい、などの欠点がある。

そこで筆者らは実海水浸漬試験よりも短期間に、的確に防汚効果を評価できる実験室内での生物評価方法の開発を試みている。防汚効果の評価のための供試生物としては船底や海中構築物へ初期に付着する底生性珪藻を用いるのが望ましいと言えるが、底生性珪藻の培養は限られた専門家以外には困難と思われる (Lin 1977)。そこで本研究では、まず培養の容易な浮遊性の珪藻を供試生物として用いることにし、*Chaetoceros gracilis* を選んだ。現在広く使用されている代表的な防

汚剤 (日本造船研究協会 1993) として亜酸化銅と銅-ニッケル合金 (90/10) を対象として防汚効果の評価を行ったところ、この珪藻の成長速度と銅系防汚剤の溶出濃度との相関について興味ある結果が得られたので報告する。

### 材料および方法

供試生物としては福島水産試験場で単離培養された *Chaetoceros gracilis* 株を用いた。試験培養および試験培養に用いる藻体を確保するための継代培養は、ともに温度 23°C、日長 10 時間、明期の照度 500~1500ルクス (蛍光灯) で行った。培養液は福島県水産試験場で開発された方式 (石川・野口 1988) で調製し、これを継代培養と試験培養の双方に用いた。試験培養には 500ml の三角コルベンを用い、これに 300ml の培養液を入れ、毎分 500~700ml で通気した。

供試防汚剤としては亜酸化銅と銅-ニッケル合金 (90/10) を用いたが、両者とも水に難溶である。早急に

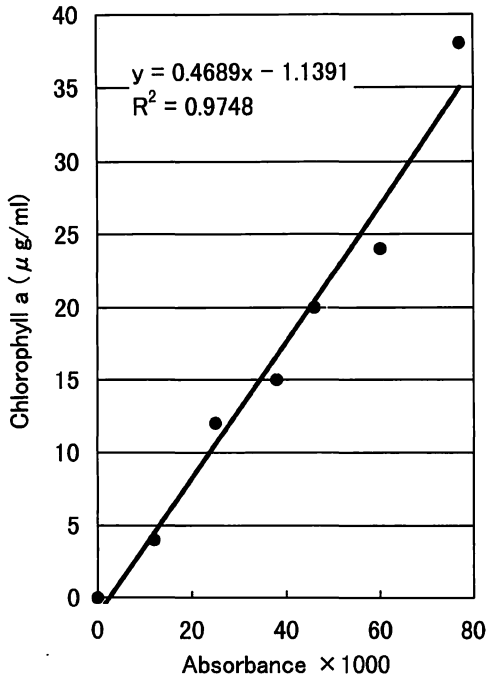


Fig. 1. Correlation between chlorophyll a content and the absorbance at 673 nm in the culture of *Chaetoceros gracilis*.

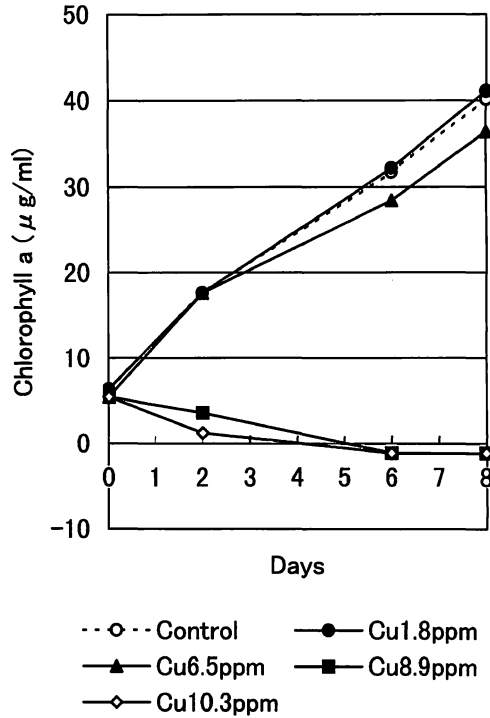


Fig. 2. Effects of concentrations of copper ion eluted from cuprous oxide on the growth of *Chaetoceros gracilis*.

溶解させるためには酸で分解し、pHを調整するという方法があるが、海水のpH (8.2) 付近で金属は不溶化して白濁してしまう。そこで培養液に防汚剤を浸漬し、スターラーを用い攪拌する時間を調整して種々の濃度の被検液を得るようにした。溶出イオンの濃度は島津原子吸光度計 AA-670 によって測定した。

ニッケルイオン単独の効果を検定するために、ニッケルの原子吸光分析用標準液 (和光純薬 原子吸光分析用ニッケル標準液) を用い、これを適当な濃度になるように培養液に加え、pH8.2に調整し被検液とした。

供試物質を種々の濃度で含む培養液に少量の藻体を加えて試験培養を開始した。培養は最大8日間行い、その間の藻体量の変化をクロロフィル a 量を指標として求めた。24時間ごとに藻体を均一に懸濁させた培養液の一部を採取して、生藻体に含まれるクロロフィル a の赤色部吸収極大波長673nmにおける吸光度を島津分光光度計 UV-240 で測定した。実験に先だって種々

の濃度の藻体懸濁液について、673nmにおける吸光度を測定した後、一定量の懸濁液を Whatman GF/C グラスファイバーフィルターで濾過して得られた藻体の90%アセトン抽出液の663nmにおける吸光度から Jeffrey ら (1975) の式 (下記) によってクロロフィル a 濃度を求めた。

$$\text{クロロフィル a} (\mu\text{g/ml}) = 11.64 \times e_{663} - 2.16 \times e_{645} + 0.10 \times e_{630}$$

藻体懸濁液の673nmにおける吸光度 ( $e_{673}$ ) とクロロフィル a 濃度とは相関しており (Fig.1), 両者の間には下記の式で表される関係が成り立つ。試験培養開始後24時間ごとに採取した藻体懸濁液について、673nmにおける吸光度から同式を用いてクロロフィル a 濃度を求めた。

$$\text{クロロフィル a} (\mu\text{g/ml}) = 0.4689 e_{673} - 1.139$$

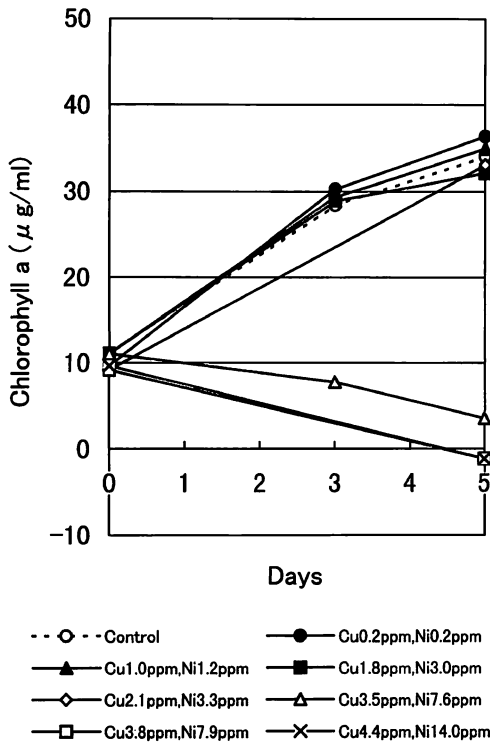


Fig. 3. Effects of concentrations of copper and nickel ions eluted from cupronickel (90/10) on the growth of *Chaetoceros gracilis*.

## 結果

Fig.2は供試物質として亜酸化銅を用いた場合の培養液中の銅イオンの濃度によって *Chaetoceros gracilis* 藻体の増殖がどのように影響を受けるかを示している。供試物質を含まない培養液中および銅イオン1.8ppmの培養液中では、藻体は時間とともにほぼ直線的に増加し、8日間で培養開始時の5.5倍に達した。これに対して、銅イオン6.5ppmの培養液中では藻体量はほぼ直線的に増加したものの、8日間の増殖率は供試物質を含まない場合の約85%にとどまった。さらに銅イオンが8.9ppmの場合には培養開始後藻体量は直線的に減少し、6日後にはすべての藻体が死滅した。10.3ppmの場合には藻体量はさらに急速に減少し、6日後にはすべての藻体が死滅していた。培養開始後2日間の藻体減少率から、すべての藻体が死滅したのは培養開始から3日後であったものと推定される。

Fig.3は供試物質として銅-ニッケル合金を用いた場合の培養液中の銅イオンおよびニッケルイオンの濃

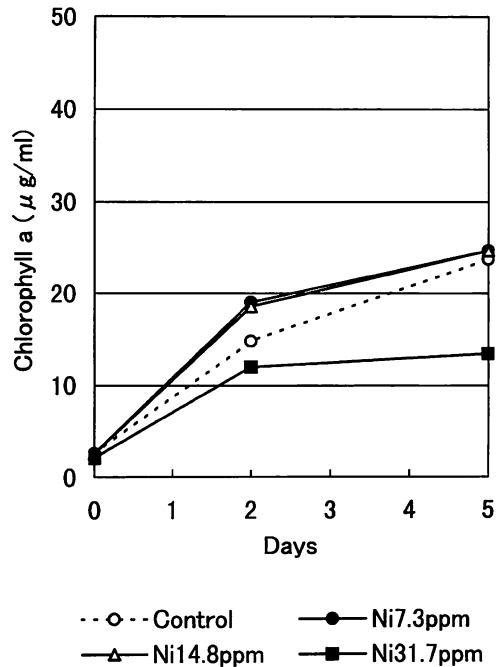


Fig. 4. Effects of concentrations of nickel ion on the growth of *Chaetoceros gracilis*.

度によって藻体の増殖がどのように影響を受けるかを示している。培養液が供試物質を含まない場合、5日間で藻体量は2.8倍に増加した。銅イオンおよびニッケルイオンともに0.2ppmから2.1ppmおよび3.3ppm含有する培養液での増殖率は供試物質を含まない条件下の値の70~80%であった。銅イオンおよびニッケルイオンが3.5ppmおよび7.6ppmの場合には藻体量は時間とともに減少し、5日間で40%ほどになったが、濃度のごくわずかに高い3.8ppmおよび7.9ppmや、それよりさらに濃度が高い4.4ppmおよび14.0ppmでは培養開始から5日後にすべての藻体が死滅した。

Fig.4はニッケルの原子吸光用標準液によってニッケルイオン濃度を調整した培養液を用いた場合のニッケルイオン濃度と藻体増殖率との関係を示している。培養液が供試物質を含まない場合、5日間で藻体量は6.6倍に達したのに対し、ニッケルイオンが14.8ppmの場合にも藻体の増殖はほとんど抑制はされず、ニッケ

ルイオンが31.7ppmという高濃度においても5日後の藻体量として供試物質を含まない場合の50%程度の値が維持されている。

#### 考察

従来長期間を要していた防汚剤の効果検定法に代わる、迅速かつ高精度な検定法の開発が本研究の目的であるが、種々濃度の防汚剤を含む培養液中での珪藻の増殖を追跡するという方法によって、数日間でも有効な判定が行えることはFig.2および3から明らかで、防汚剤の影響は培養期間の初期に認められ、後期になって逆転することはない。また亜酸化銅の場合銅イオンとして6.5ppmと8.9ppmとのあいだで (Fig.2), また銅-ニッケル合金の場合銅イオンとして2.1ppmと3.5ppmとの間で (Fig.3) 効果に顕著な相違が認められることから本検定はかなり精度が高いものであると考えられる。

亜酸化銅の場合、銅イオン濃度が6.5ppmでも藻体増殖率は15%ほどしか抑制されないのに対して、銅-ニッケル合金の場合の銅イオン濃度は、それよりはるかに低い3.5ppmで藻体量は時間とともに減少し、4.4ppmでは5日間ですべての藻体が死滅した。この事実は、銅-ニッケル合金中のニッケルイオンがきわめて有効に作用していることを示唆しているが、銅イオンが共存しない場合 (Fig. 4) にはニッケルイオンが31.7ppmという高濃度で存在しても藻体の増殖は可能である。また銅イオンが単独で作用する亜酸化銅の場合8.9ppmの銅イオン濃度で藻体は6日間で死滅したが、ニッケルイオンが単独で作用する原子吸光用標準液の場合7.3ppmおよび14.8ppmでも藻体の増殖はほと

んど抑制されない。このように単独では防汚効果がきわめて小さいニッケルイオンも銅イオンと共存した場合、銅イオンの効果を強く助長するものと考えられる。

なお浮遊珪藻 *Thalassiosira pseudonana* を用いた Erickson (1972) による実験では、銅イオン濃度5ppmでも増殖に対する顕著な阻害が認められたことから、供試生物によって防汚効果にかなりの差の生ずる可能性がある。付着珪藻を含む多様な生物を用いた試験が今後の課題として残されている。

#### 謝辞

本研究の遂行にあたっては筑波大学下田臨海実験センターの植田一二三氏をはじめ所員のご協力をいただいた。ここに厚くお礼申し上げる。

#### 引用文献

- Erickson, S. J. 1972. Toxicity of copper to *Thalassiosira pseudonana* in unenriched inshore seawater. *J. Phycol* 8: 318-323
- 石川 優・野口政止 1988. 棘皮動物 (4) ウニ類. 石川 優・沼宮内隆晴 (編) 海産無脊椎動物の発生実験. p.122-166. 培風館, 東京.
- Jeffrey, S. W. and Humphrey, G. F. 1975. New spectrometric equation for determining chlorophyll *a*, *b*, *c*<sub>1</sub> and *c*<sub>2</sub> in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 167: 191-194.
- Lin, C. K. 1977. Continuous flow culture of benthic diatoms and its application to bioassay. *J. Phycol* 13: 267-271
- 日本造船研究協会 1993. 第209研究部会船底塗料の新規防汚剤に関する調査研究報告書.

(Received June 21, 1996; Accepted September 12, 1996)