防汚効力の生物検定に関する研究—I

胞子テストと葉片テスト

宮内 徹夫*

(昭和 55 年 8 月 27 日受理)

Laboratory Methods for the Evaluation of Antifouling Paints and Toxic Chemicals I Spore Test and Leaf Test in Fouling Algae

Tetuo MIYAUTI

Miyademy Fisheries Laboratory, Futami, Watarai-gun, Mie 519-06

(Received August 27, 1980)

付着生物による汚損を防ぐための船底塗料などの防汚効力を判定する方法としては、浸漬試験と呼ばれる方法が一般に採用されているが、この浸漬試験法には、再現性が低いという欠点とともに、その効力判定に数ヵ月から1年以上という長期間を必要とするという大きな欠点があり、近年、防汚剤や防汚塗料などの改良・開発の必要性がたかまるに伴ない、短期間に再現性の高い結果を出す検定法の確立が望まれている。わが国におけるこの分野の研究では、馬渡ら (1970) 馬渡 (1970) が多くの業績をあげ各種の生物検定法を確立しているが、筆者は馬渡 (日本造船研究協会, 1973) の「防汚効力検定法の開発確立は、防汚技術発展のための必須研究である」という文に触発され、10年ほど前よりアオサ、アオノリ、フジソバなど付着生物そのものを用いて行なう防汚効力の生物検定に関する研究を行なうとともに、多くの船底塗料や防汚剤などの検定にその生物検定法を採用してきた (宮内, 1974, '75a, '75b)。

海藻類の防汚いわゆる防藻の効力検定法としては、後述するアオサ、アオノリの葉体を用いて行なう「葉片テスト」をすでに実用化しているが、今回、代表的な防汚剤 Cu と Sn の溶解濃度が明らかな海水を入手したのを機会に、葉片テストの価値の再検討と胞子を用いて行なう「胞子テスト」の有効度の検討を行なうとともに、その胞子テストから Cu と Sn の防藻の有効濃度を求めた。その結果、二・三の知見を得たので、ここに報告する。

本研究に際し指導と助言を賜った三重大大学水産学部喜田和四郎教授ならびに供試海水の提供をうけたカナエ塗料株式会社技術部高橋一暢氏に深謝の意を表する。

材 料 と 方 法

Cu 0.30 ppm, 1.90 ppm, Sn 0.41 ppm, 1.91 ppm と溶解濃度が明らかな 4 種類の海水と三重県五十鈴川河口域にて採集したヒラアオノリ *Enteromorpha compressa* を用いて、胞子テストと葉片テストを行なった。

1. 胞子テスト

厚さ 0.5 mm の透明アクリル板にて、長さ 55.5 cm, 幅 5 cm, 深さ 10 cm, その中に 5 cm 間隔で 9 枚の仕切りを入れて、10 種類の液が収容出来るように作製したケースを用い、先ずそれぞれの仕切り内に (1/2)^a 段階希釈法にて希釈した 9 種類の試験液 (胞子海水を加えた際に所定の濃度になるように調整した) と対照として普通海水を収容し、次に別に準備したヒラアオノリの胞子海水 (葉体を採集し数時間の干出後に胞子を放出させた海水で、胞子放出後 1 時間以内に用いるようにした) を加えた。

胞子注入後、ケースの側面より光を照射すると、胞子は光を照射した側面か逆の側面に集まるので**、胞子が集まる側面および底面をおおうアクリル板で作製した L 形の付着板 (布ヤスリで表面を傷つけ、胞子が付着しやすくした厚さ 0.5 mm の透明アクリル板) を入れ、それに胞子を付着させるようにした。

そして、24 時間後にそれら胞子を付着させた付着板を別に用意した試験液を入れたビーカー (500 cc) に移し、胞子の発芽生長の状態を観察した。

* カナエ付着生物研究所・水産開発研究所

** 配偶子は多く正走光性で、接合子及び遊走子は多く弱い負走光性を示す (須藤, 1950)

2. 葉片テスト

アオサ・アオノリの葉体より切りとった円形葉片（径 0.7 cm）を試験液中に浸漬し、20°C、1500 ルックスという条件下で通気培養して、24 時間後の葉片の傷害度を調べる方法を、筆者は葉片テストと呼んでいるが、今回は、Cu と Sn の溶解濃度の明らかな 4 種類の海水を (1/2)ⁿ 段階希釈法で希釈した試験液とヒラアオノリの葉片を用いて実験を行なった。

結 果

1. 胞子テスト

濃厚な胞子海水を用いて実験を行なうと、24 時間後の付着板は付着した胞子で薄い緑色を呈しているが、2 日に 1 回の割で軽くブラシで付着板を洗滌するとともに試験液を新しいものと交換するという方法で培養すると、死滅した胞子が脱色離脱するのに対し、傷害を受けぬ胞子は数日後に発芽しはじめ濃い緑色を呈してくる。

図 1. 培養 3 週間後の付着板。胞子が発芽生長している部分は濃い緑色（本図では黒色）を呈する。各付着板の上の分数は希釈度（原液の Cu 溶解濃度は 0.30 ppm）を、対は対照の普通海水を示す。

その結果、2～3 週間後には図 1 にみられる如く、胞子の発芽生長の度合、すなわち胞子が受けた傷害の程度は肉眼的にも明確になる。

付着後 3 週間目の胞子の発芽生長の状態から、付着板を次のように分類した。すなわち、－：全胞子が死滅している、±：数個の胞子が発芽生長している、＋：一部分の胞子群が発芽生長している、Ⅱ：全体にわたり発芽生長するも対照に比し劣る、Ⅲ：対照と同様に発芽生長する。実験の結果をとりまとめると表 1 のとおりである。

2. 葉片テスト

浸漬 24 時間後の葉片を 0.2% エリスロシン溶液で染色し、その着色度合（死細胞は赤く染色される）から葉片の傷害程度を以下のとおり分類した。－：肉眼的に傷害が認められない、＋：非常に軽い傷害で染色された小斑がわずかに認められる、Ⅱ：葉片の 1/2 以下の部分に傷害が認められる、Ⅲ：葉片の 1/2 以上の部分に傷害が認められる、Ⅳ：全体が染色されているが、傷害を受けぬ小斑が認められる、Ⅴ：全体が傷害を受け完全に染色されている。実験の結果をとりまとめると表 2 のとおりである。

考 察

本実験では、防藻効力判定法としての胞子テストの有効性を明らかにするとともに、Cu と Sn の防藻有効濃度を求めることが出来た。また、すでに実用化している葉片テストの有効性についても再確認することが出来た。

まず、胞子テストについていえば、これは防藻の対象であるアオノリの胞子そのものを用いて行なう方法だけに、試験液中での胞子の培養さえ問題なく出来れば、その結果が示すものは求める防藻効力そのものであるし、

表 1. Cu, Sn 含有海水中でのヒラアオノリ胞子の発芽生長（符号：本文参照，無符号：テストなし）

希 釈 度	1	(1/2) ¹	(1/2) ²	(1/2) ³	(1/2) ⁴	(1/2) ⁵	(1/2) ⁶	(1/2) ⁷	(1/2) ⁸
1980 年 5 月 12 日 胞子付け									
Cu 濃度 (ppm)	0.30	0.150	0.075	0.0375	0.0188	0.0094	0.0047	0.0023	0.0012
発芽生長の状態		—	+	Ⅱ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ
Sn 濃度 (ppm)	0.41	0.205	0.1025	0.0513	0.0256	0.0128	0.0064	0.0032	0.0016
発芽生長の状態			—	±	±	+	Ⅱ	Ⅲ	Ⅲ
1980 年 7 月 10 日 胞子付け									
Cu 濃度 (ppm)	1.90	0.95	0.475	0.2375	0.1188	0.0594	0.0297	0.0148	0.0074
発芽生長の状態			—	—	+	Ⅱ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ
Sn 濃度 (ppm)	1.91	0.955	0.478	0.2388	0.1194	0.0597	0.0298	0.0149	0.0075
発芽生長の状態				±	±	±	±	+	Ⅲ

表 2. Cu, Sn 含有海水中でのヒラアオノリ葉片細胞の傷害度 (符号: 本文参照, 無符号: テストなし)

希 釈 度	1	(1/2) ¹	(1/2) ²	(1/2) ³	(1/2) ⁴	(1/2) ⁵	(1/2) ⁶	(1/2) ⁷	(1/2) ⁸
テスト実施日: 1980 年 5 月 12 日~14 日									
Cu 濃度 (ppm)	0.30	0.150	0.075	0.0375	0.0188	0.0094	0.0047	0.0023	0.0012
傷 害 度			++	—	—	—	—	—	—
			++	—	—	—	—	—	—
			+	—	—	—	—	—	—
Sn 濃度 (ppm)	0.41	0.205	0.1025	0.0513	0.0256	0.0128	0.0064	0.0032	0.0016
傷 害 度							—	—	—
						++	—	—	—
							—	—	—
テスト実施日: 1980 年 7 月 10 日~12 日									
Cu 濃度 (ppm)	1.90	0.95	0.475	0.2375	0.1188	0.0594	0.0297	0.0148	0.0074
傷 害 度						—	—	—	—
						—	—	—	—
					++	—	—	—	—
Sn 濃度 (ppm)	1.91	0.955	0.478	0.2388	0.1194	0.0597	0.0298	0.0149	0.0075
傷 害 度								++	—
								—	—
								+	—

防藻効力判定法としての価値が高いことはいうまでもないが、本実験にて、その胞子の培養が比較的容易に行ない得ることが明らかになった。すなわち、この胞子テストは、胞子そのものを用いるために周年採用し得ないという欠点はあるものの、胞子の入手が容易な時期には比較的手軽に採用し得る防藻効力判定法であるということが、本実験によって確認された。

ところで、Cu と Sn の防藻有効濃度であるが、表 1 にみられる如く、Cu では 2 回の実験結果はかなりよく一致しており 0.15 ppm 付近に有効濃度の存在することが考えられたのに対し、Sn の場合には、5 月の実験では 0.1025 ppm で全胞子の死滅がみられたのに対し、7 月の実験時にはわずか数個体ではあったが 0.2388 ppm という濃度でも発芽生長するものがみられ、両者間にかんがりの差が認められた。この差の原因としては、ヒロハノヒトエグサ *Monostroma latissimum* の胞子培養にて配偶子の生残率が接合子に比しかなり低いことが知られている (喜田, 1973) ことから、配偶子と接合子の抵抗力の差に起因していることも考えられるが、仮にそうであれば今度は Cu の結果に疑問が生じることとなるし、また本実験では、用いた胞子を配偶子、接合子、遊走子というように厳密に分類していなかっただけに、この点についての議論は今後に残すこととする。

ただ、表中にて ± で示したものについていえば、数

千〜数万以上の胞子の内のわずか数個が生残り発芽したのみで、その発芽生長も対照に比しはるかに状態が悪く、そのまま生長し続け得るかどうかかなり疑問視され、少なくとも防藻塗料などの効力を判定する立場からいえば、無視してよいと判断される状態であった。そこで、ここでは ± についても防藻効果ありという立場をとることにするが、そのような立場から表 1 をみると、Sn の有効濃度は 0.02 ppm 付近に存在することになり、5 月と 7 月の実験結果はよく一致してくる。

次に、葉片テストについていうと、表 2 にみられる如く、胞子テストでみた防藻有効濃度と葉片に |||, すなわち葉片の全体が傷害をうけているが傷害をうけぬ小斑も認められるという傷害をもたらす濃度とはかなりよく一致している。すなわち、防藻有効濃度 = ||| という関係がみられるが、ただこの関係は、葉片の抵抗力に季節差が認められる (宮内, 未発表) ことからすれば、周年そのまま成立することはないといえる。

しかし、ここで安全度を考え、防藻有効濃度 = ||| という立場をとれば、その葉片の抵抗力の季節差もほとんどカバーし得るし、過去に多く実施してきた葉片テストによる防藻効力判定の結果と実際の海での浸漬試験の結果との関係ともよく一致してくる。いいかえれば、本実験にて、防藻効力の有無判定および防藻効力の強弱判定の手段としての葉片テストの有効性を再確認するととも

に、その有効濃度の判定に際しては 冊 を基準におくべきであるということが明確になったといえる。

最後に、胞子テストと葉片テストを比較してみると、胞子テストについては、直接的・実際的方法であり、その点では最も優れた方法といえるが、そのテストに用いる胞子を入手し得る時期が限られているだけに周年を通じて採用できぬという欠点も有するということが出来よう。それに対し、葉片テストの場合には、ヒラアオノリ、ウスバアオノリ、アナアオサなどの葉体を使いわければ周年その材料の入手には事欠かぬし、何よりも24時間という短時間で結果を出し得るという大きな長所があるだけに、周年を通じて自由に多量の胞子を入手する方法が確立されていない現在では、多くの船底塗料や防汚剤などの効力を検定する手段としては、葉片テストが胞子テストよりも数段優れた生物検定法であるということが出来よう。

要 約

防汚効力の生物検定法としての胞子テストと葉片テストの有効性について検討するとともに、胞子テストから Cu と Sn の防藻有効濃度を求めた。

1. 試験液中での胞子の培養は比較的容易であり、胞子テストが生物検定法として有効なことを認めた。

2. 防藻の有効濃度として、Cu 0.15 ppm 程度、Sn 0.02 ppm 程度という値を得た。

3. 葉片テストの生物検定法としての有効性を再確認するとともに、過去の実績を併せて、防藻効力の生物検定法として特に優れていると判断した。

文 献

- 喜田和四郎 (1973). ヒトエグサの人工採苗の手引き. 三重県漁連・三重県のり養殖研究会, 1-18.
- 馬渡静夫・北村晴男 (1970). 船底防汚塗料に関する生物学的研究 1. 各種防汚毒物の生物検定. 資源研彙報, No. 73, 67-102.
- 馬渡静夫 (1970). 船底防汚塗料に関する生物学的研究 2. 溶出毒物の生物検定. 同誌, No. 74, 80-101.
- 宮内徹夫 (1974). 防汚薬剤の生物検定——防藻効力の検定法について. 塗装と塗料, No. 243, 49-56.
- 宮内徹夫 (1975a). 船底塗料の防汚検定法に関する一提案. 同誌, No. 249, 29-33.
- 宮内徹夫 (1975b). 防汚薬剤の生物検定——防藻効力の受託検定について. 同誌, No. 257, 53-58.
- 日本造船研究協会 (1973). 第 141 研究部会・安全性の高い長期防汚塗料の開発研究・報告書 (1), 研究資料 No. 186-1, 1-100.
- 須藤俊造 (1950). 海藻の胞子の放出・散布及び着生に関する研究. 海藻胞子付けの研究 第 8 報. 日水誌, 16(1), 1-9.