

論 説

## 銅イオン担持ガラス繊維シートによる 有害植物プランクトンの殺藻効果

福垣内 暁 (紙産業イノベーションセンター)

丸山 颯 己 (農学研究科)

竹内 久 登 (南予水産研究センター)

清水 園 子 (南予水産研究センター)

### Algicidal Effect of Cu-ions-loaded Glass Fiber Sheet on Harmful Algae

Satoru FUKUGAICHI (Paper Industry Innovation Center)

Satsuki MARUYAMA (Graduate School of Agriculture)

Hisato TAKEUCHI (South Ehime Fisheries Research Center)

Sonoko SHIMIZU (South Ehime Fisheries Research Center)

キーワード：赤潮、プランクトン、殺藻、銅イオン、ガラス繊維

Keywords: red tide, algae, algicidal effect, Cu ions, glass fibers

【原稿受付：2022年7月22日 受理・採録決定：2022年8月1日】

#### 要旨

愛媛県は魚類の養殖が盛んであるが赤潮の発生による大きな被害が問題となっている。赤潮の防除策として、粉末状粘土鉱物の散布による除去が緊急的な措置として使用されているが使用後の回収が不可能であり、環境への負荷が懸念されている。そこで本研究では、回収可能な銅イオン担持ガラス繊維シートを有害植物プランクトンである、カレニア・ミキモトイ (*Karenia mikimotoi*)、及び、コクロディニウム・ポリクリコイデス (*Cochlodinium polykrikoides*) に適用した結果、銅イオン担持ガラス繊維シート暴露24時間後には、カレニア・ミキモトイの細胞数は90%減少した。また、全ての正常細胞が異常細胞に変化し、最終的に完全消失した。一方、コクロディニウム・ポリクリコイデスでは80%以上の細胞数の減少は確認されたが、異常細胞は6%以下で大部分は正常細胞であった。試験後の培地水溶液中に銅イオンが検出されたことから、銅イオンがプランクトンの細胞状態に影響を与えたと考えられるが、銅イオンへの感受性は、カレニア・ミキモトイとコクロディニウム・ポリクリコイデスで異なることが示唆された。

#### 1. 緒言

現在、日本の水産業の23%を養殖業が支えている(貝類、海藻類含む)<sup>1,2)</sup>。その中でも愛媛県は大きな役割を担っており、1978年から2018年まで、愛媛県は魚類養殖生産量が全国1位、また2014、2015年(全国2位)を除き魚類養殖産出額も全国1位であった<sup>3)</sup>。特にマダイの養殖は盛んであり、全体の半数以上が愛媛県で養殖されている。愛媛県と大分県に挟まれた水道(豊後水道)の愛媛県側に位置する宇和海は日本有

数のリアス海岸であり<sup>4)</sup>、波や風が穏やかで水深も深いことから養殖に適した地形であるとされている。また、黒潮の影響で年間の水温の変化が小さくプランクトンも豊富である<sup>5,6)</sup>。

その一方、入り組む閉鎖的な海域は海水の入れ替わりが少ないため汚れやすく、甚大な漁業被害となる赤潮の発生が問題となっている<sup>7)</sup>。赤潮とは、水中の微小生物、特に植物プランクトンの生態系のバランスに反した大量増殖や集積の結果生じる海水の着色現象

のことである<sup>8)</sup>。プランクトンが増殖する原因は、水温・pH・塩分濃度などの物理的環境が増殖に適した環境となることと、産業排水・生活排水に含まれる窒素やリンなどの細胞を構成する元素である栄養塩類の流入多寡（富栄養化）である<sup>9)</sup>。宇和海では主に5種の赤潮プランクトンが被害をもたらしている<sup>10)</sup>。現在の赤潮の防除策として、粘土鉱物の散布による除去は緊急的な措置として使用されている<sup>11)</sup>。しかし、粘土鉱物は粉末状であるため使用後の回収が不可能であり、環境への負荷が懸念されることが最大の問題点である。従って、回収が可能であり、緊急対応型の赤潮除去剤が必要とされている。そこで、本研究では、銅イオンが担持されたガラス繊維シートを作製し、これが有害プランクトンである、カレニア・ミキモトイ (*Karenia mikimotoi*, 以下 Km)、及び、コクロディニウム・ポリクリコイデス (*Cochlodinium polykrikoides*, 以下 Cp) に与える影響を検証することを目的とする。

## 2. 実験

### 2.1 銅イオン担持ガラス繊維シートの調製

本研究では、ユニチカ(株)製のEガラス繊維(SiO<sub>2</sub>:52-26%、Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:12-16%、CaO:15-25%、B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:5-13%)が編み込まれたガラス繊維シートを使用した。以後、未処理のガラス繊維シートをUNT-Gと表記する。顆粒状の水酸化ナトリウム(和光純薬工業(株)製特級試薬)で3 mol/L水酸化ナトリウム水溶液1.8 Lを調整し、82 gのUNT-Gとともに、容量2.9 Lのポリプロピレン製耐熱容器に入れ密閉した。この容器を定温乾燥機(OFT-450B、アズワン(株))で60℃、24時間加熱し、加熱後のガラス繊維シートを蒸留水でpHが10付近になるまで洗浄し、105℃で24時間以上乾燥させた。得られたガラス繊維シートをALK-Gと表記する。銅イオンを担持するために、82 gのALK-Gと硝酸銅(Ⅱ)三水和物(和光純薬工業(株)特級試薬)で調製された1.8 Lの0.01 mol/L硝酸銅水溶液(株)を2.9 Lのポリプロピレン製耐熱容器に入れ、72 rpmに設定された振とう機(TS-10、タイテック(株))で、室温下24時間振とうさせた。振とう後定温乾燥器で105℃、24時間以上乾燥させた。以後、銅イオンを担持したガラス繊維シートをCu-Gと表記する。また得られたCu-Gをマッフル炉(FM-37、ヤマト科学(株))で大気下300℃、2時間加熱した。以後、Cu-Gを加熱したガラス繊維シートをCuB-Gと表記する。Cu-Gに担持されている銅イオンを定量するために誘導結合プラズマ発光分光分析装置(iCAP、Thermo Fisher Scientific製)(以下ICP分析装置と表記)を用いて、Cu-G作製前後の硝酸銅

水溶液中の銅イオンを定量した。加えて、ALK-Gに銅を担持した際に、ALK-Gから溶出してきた陽イオン種の定性・定量を行った。

### 2.2 特性評価

各種サンプルの表面観察及び元素分析を走査電子顕微鏡(SEM-EDS分析:JSM-IT100、日本電子(株))で行った。SEM観察は加速電圧5~10 kVで二次電子像を観察した。SEM観察には前処理としてオートファインコーター(JEC-3000FC、日本電子(株))を使用し30 mAで90秒間白金蒸着させた。EDS分析の際は白金蒸着を行わなかった。

各種シート状試料の結晶構造分析を、X線回折装置(Ultima IV、(株)リガク製)で行った。測定はCuK $\alpha$ 線を用いて開始角度3°、終了角度60°、サンプリング幅0.02°、スキャンスピード2°/分、電圧40 kV、電流40 mAで行った。各種シート状試料の表面分析をフーリエ変換赤外分光光度計(Spectrum TwoシステムA、(株)パーキンエルマージャパン)を用い、全反射測定法(Attenuated Total Reflection法:ATR法)で行った。ALK-Gの熱特性を熱重量-示差熱分析(TG-DTA分析:Thermoplus TG 8120、(株)リガク製)で行った。大気環境下、昇温速度20 K/minで1000℃まで上昇させた。

### 2.3 溶出成分の分析

供試プランクトン培養用の改変SWM3培地<sup>12)</sup>(愛媛県愛南町の海水にリンやナトリウム、亜鉛やコバルト等の微量金属を添加した水溶液;以下培地)30 mLにCu-G 0.30 g及びCu-B-G 0.32 gを浸漬させ、小型レシプロシェーカー(NX-10N、(株)日伸理科)で50 rpm、24時間振とうさせた後の水溶液中に含まれる元素を、ICP分析装置で分析した。

### 2.4 供試プランクトン

Kmは2020年9月に愛媛県宇和海から採取し、愛媛大学南予水産研究センターにて分離培養したUKM001株を使用した。また、Cpは九州大学から譲渡されたCP-OI-3.5株を使用した。これら供試プランクトンは培地を用いて培養(水温20℃、光強度100  $\mu$ mol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>、明暗周期14 h:10 h)し、これを培養液として一部を次の殺藻試験に用いた。

### 2.5 プランクトン殺藻試験

プランクトンの細胞数を1000 cells/mL程度に調整した培養液を細胞培養6 wellプレート(well内径: $\phi$  34.5  $\times$  17.2 mm)(以下wellプレートと省略)の各wellに2.8 mLずつ添加し(株)PHC製グロースチャ

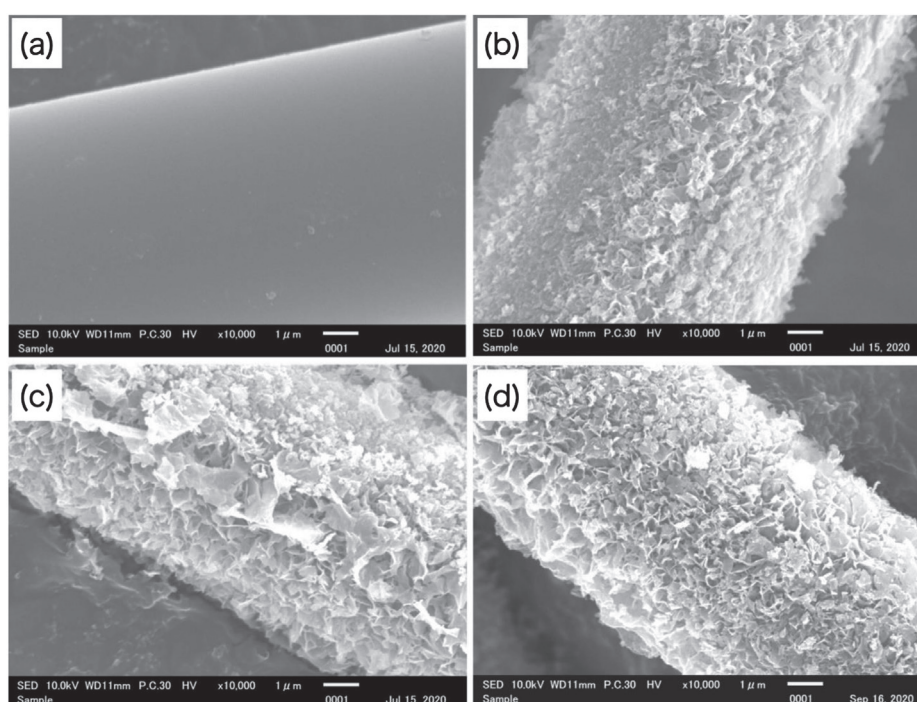


図1 各種試料のSEM像 (a) UNT-G、(b) ALK-G、(c) Cu-G、(d) CuB-G

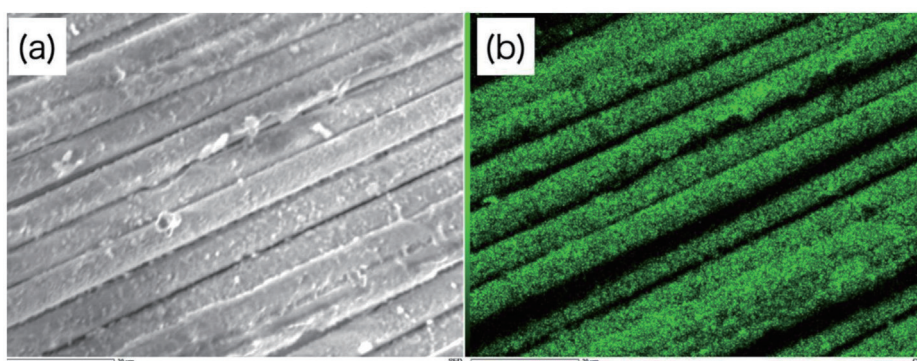


図2 Cu-GのSEM-EDS分析結果 (a) SEM像 (b) EDS分析Cuマッピング

ンバーで、20℃で、インキュベートした。24時間後、その中から800µLを採取し細胞数およびpHを測定した。その後各wellに各試料(1cm×1cmを1枚)添加し、(株)タイテック製恒温振とう培養機で20℃、回転速度50rpmでインキュベートさせた。0、1、3、6、12、24時間後に蛍光培養倒立顕微鏡(TS100-F、(株)ニコン)で細胞形態を観察し、24時間後に正立顕微鏡(CX31、(株)オリンパス)で各wellの細胞数(最終細胞数)およびpHを計測した。

### 3. 結果・考察

#### 3.1 銅イオン担持ガラス繊維シートの特性

図1に各種試料のSEM像を示す。UNT-G(図1(a))は、ガラス特有の滑らかな表面形態であった。一方、

ALK-G(図1(b))では、繊維表面が花びら状の形態に変化した。Cu-G(図1(c))も花びら状の形態を維持しており、CuB-G(図1(d))も変化はなかった。

図2にEDS分析で得られたCu-Gの銅マッピング像を示す。担持された銅イオンはガラス繊維表面に均一に分散していることが確認された。

図3にXRD分析結果を示す。いずれのサンプルとも非晶質の特徴であるブロードな回折ピークが確認された。ALK-G(図3(b))、Cu-G(図3(c))、及びCuB-G(図3(d))には $2\theta = 29.6^\circ$ 付近にカルサイト( $\text{CaCO}_3$ )を示す小さな回折ピークが確認された。これは、アルカリ処理によりガラス繊維表面のカルシウム成分の反応性が高くなり、大気中の $\text{CO}_2$ と反応したためと考えられる<sup>13)</sup>。以上より、得られた試料は



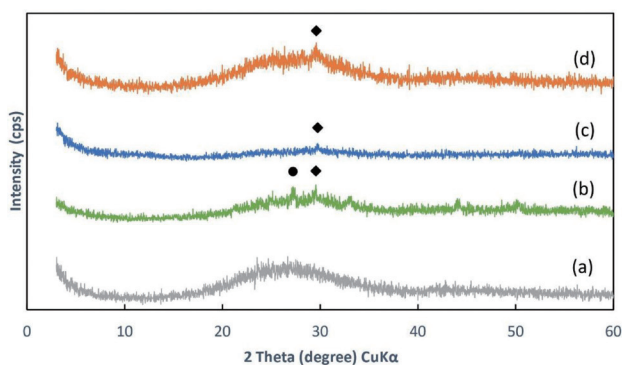


図3 各種試料のXRDパターン  
(a) UNT-G、(b) ALK-G、(c) Cu-G、(d) CuB-G  
◆：カルサイト (CaCO<sub>3</sub>)、●：unknown

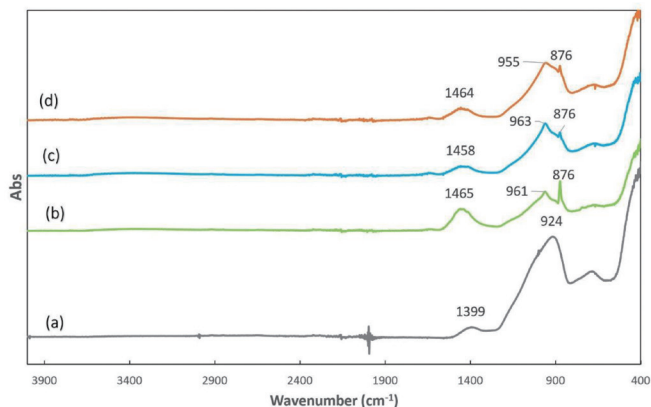


図4 各種試料のFT-IR スペクトル  
(a) UNT-G、(b) ALK-G、(c) Cu-G、(d) CuB-G

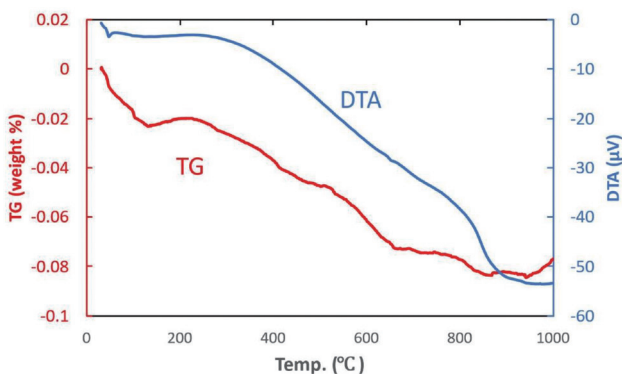


図5 ALK-GのDT-DTA分析結果

いずれも主構造は非晶質であることが示唆された。

図4にFT-IRの分析結果を示す。UNT-G (図4 (a))には924 cm<sup>-1</sup>にSi-OHの吸収ピークが確認された。これはUNT-GにSiO<sub>2</sub>が含まれていることに起因する<sup>14)</sup>。アルカリ処理(ALK-G)により876 cm<sup>-1</sup>と960 cm<sup>-1</sup>付近に新たなピークが出現した。876 cm<sup>-1</sup>と1470 cm<sup>-1</sup>付近の吸収ピークはC-O伸縮振動であることから炭酸カルシウムの生成が示唆されており<sup>15)</sup>XRDの結果と一致する。960 cm<sup>-1</sup>付近にみられるIR吸収ピークはSi-O (Q2) 逆対称伸縮振動の吸収ピークであり、ケイ酸カルシウム水和物(CSH)の生成が示唆された<sup>13)</sup>。

図5に熱分析結果を示す。100°Cから140°Cの温度範囲に重量減と吸熱ピークが確認されたことから脱水現象であることが確認された。従ってALK-Gには水和物が生成されたと考えられる。図1～5の結果から、ALK-Gの表面には非晶質のCSHが生成されたと考えられる。銅イオンを担持した際にALK-Gから溶出してきた陽イオン及びALK-Gに担持された銅イオンの定性・定量分析結果を表1に示す。表2にはEDS分析結果から求めた各試料のCa/Siモル比を示す。表1

表1 溶出元素の定量結果

element	elution amount (μmol/g)
Ca	40.6
Na	3.38
Si	1.61
B	0.936
Mg	0.845
Cu(*)	186

\*Cu-GのCu含有量

表2 各試料のEDS分析結果

element	atomic (%)			
	UNT-G	ALK-G	Cu-G	CuB-G
Ca	11.75	14.72	10.78	12.34
Si	15.66	12.57	14.38	14.67
Ca/Si mol ratio	0.7503	1.171	0.7497	0.8412

より、銅イオンをALK-Gに担持させるとALK-Gから40.6 μmol/gのカルシウムイオンが溶出し、Cu-Gには、186 μmol/gの銅イオンが担持された。このことから、カルシウムイオン→銅イオンによる陽イオン交換現象<sup>16)</sup>によってCu-Gに銅イオンが担持されたと考えられる。しかしCu-Gの銅イオン担持量>溶出したカルシウムイオン量、から過剰に担持された銅イオンは陽イオン交換現象とは異なる機構でCu-Gに担持されていると考えられる。ここでCSHの等電点はpH 3～3.5と報告されており<sup>13)</sup>、処理に用いた硝酸銅水溶液のpHは4.76であったことから、ガラス織

銅イオン担持ガラス繊維シートによる有害植物プランクトンの殺藻効果

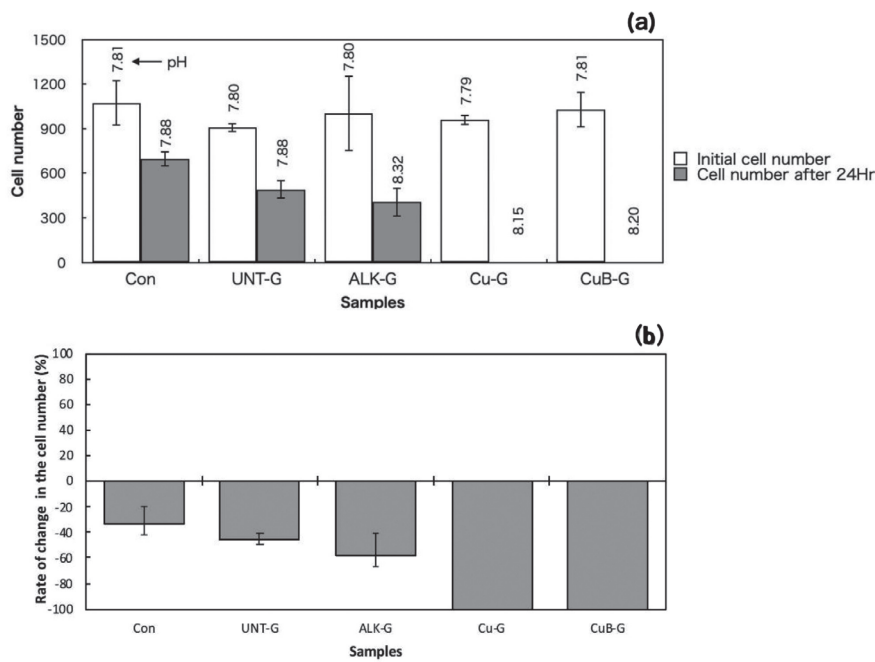


図6 24時間後のKmの細胞数の変化

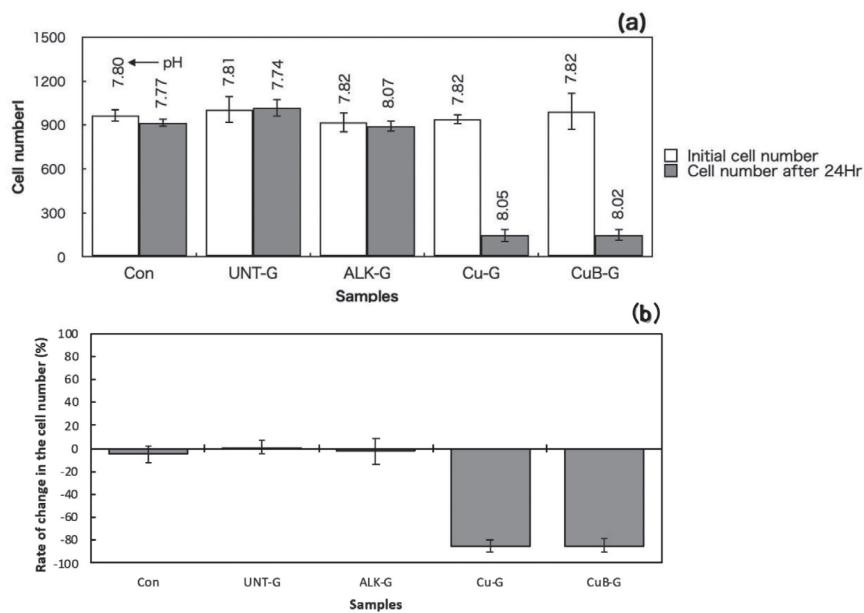


図7 24時間後のCpの細胞数の変化

維表面はマイナスに帯電していたと考えられる。従って多くの銅イオンはマイナスに帯電したガラス繊維表面に静電引力により担持されたと考えられる。よってCu-Gには、陽イオン交換機構と静電引力機構により担持された2種類の化学形態を有する銅イオンが存在していると考えられた。

### 3.2 プランクトン殺藻試験

図6に各種ガラス繊維シート暴露による試験開始から24時間後のKmの細胞数の変化(図6(a))、初期細胞数に対する24時間後の細胞数の増減率(図6(b))を示す。UNT-G、及び、ALK-Gはコントロール(Con)と同等の細胞減少率であった。Cu-GとCuB-Gは、24時間後には100%の細胞減少が確認された。

図7に各種ガラス繊維シート暴露による試験開始か

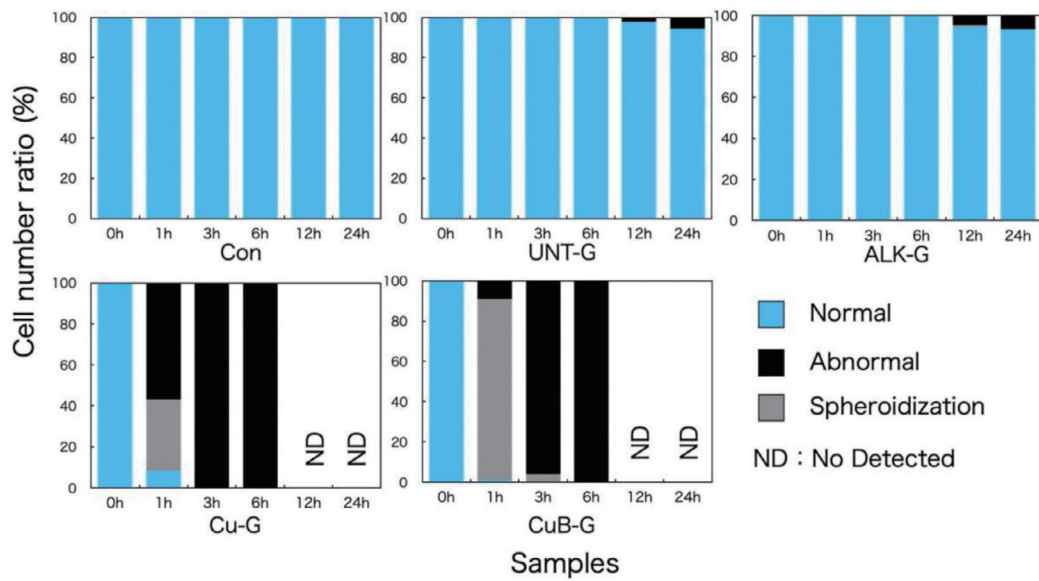


図8 暴露時間に対する Km の細胞状態の割合

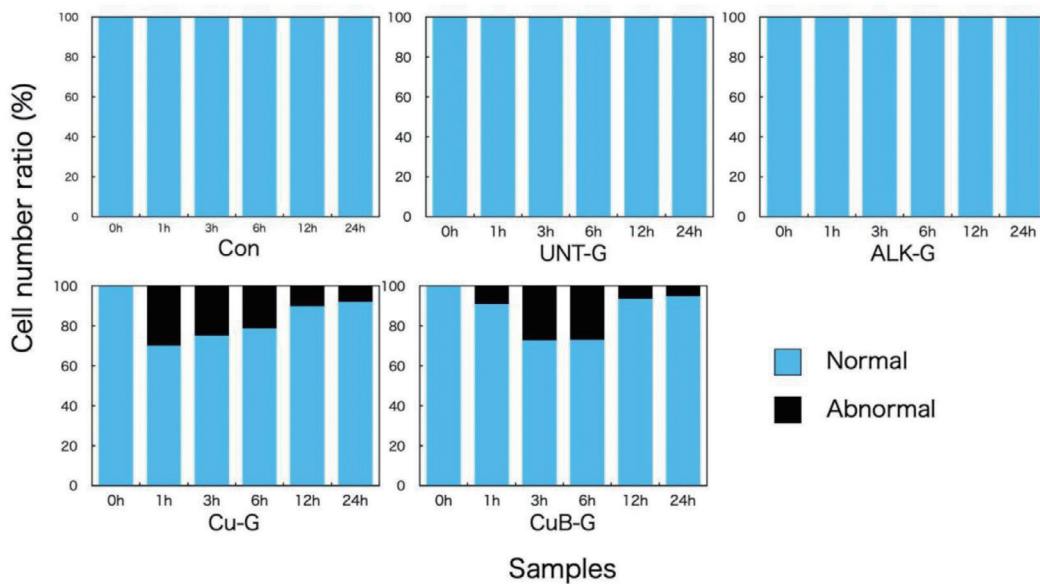


図9 暴露時間に対する Cp の細胞状態の割合

ら24時間後のCpの細胞数の変化(図7(a))、初期細胞数に対する24時間後の細胞数の増減率(図7(b))を示す。UNT-G及びALK-Gには顕著な細胞減少効果が確認できなかった。一方、Cu-G及びCuB-Gは試験開始から24時間後にそれぞれ、84.3%、84.5%の細胞減少が確認された。

図8に各種ガラス繊維シートの暴露時間に対するKmの細胞状態の割合を示す。Conは、24時間後も正常細胞であった。UNT-G、ALK-Gはいずれも12、24時間後に異常細胞がわずかに確認された。Cu-Gは1時間後には35%が球状化細胞、56.4%が異常細胞となり、3時間後には全ての細胞が異常細胞となっ

た。12時間以降は細胞が完全に消失した。CuB-Gでは1時間後には90%が球状化細胞、8.6%が異常細胞となった。3時間後には、球状化細胞は4%、異常細胞は95.7%となった。6時間後には、細胞は全て異常細胞となり、Cu-G同様、12時間以降は細胞が完全に消失した。

図9に各種ガラス繊維シートの暴露時間に対するCpの細胞状態の割合を示す。Con、UNT-G、ALK-Gの細胞は24時間後も変化はなく100%正常細胞であった。Cu-Gは1時間後に30%が異常細胞に変化した、その後は、異常細胞の割合は減少した。CuB-Gでは1時間後には10%が異常細胞となり、3時間後に異常

細胞は27%に増えたが、6時間後でも異常細胞割合に変化はなかった。12時間後及び24時間後の異常細胞はそれぞれ6%と5%へとさらに減少した。

Cu-G及びCuB-Gから溶出した培養液中の銅イオンを分析したところ、それぞれ、23  $\mu\text{mol/g}$ 及び15  $\mu\text{mol/g}$ の銅イオンが検出され、銅イオン担持ガラス繊維シートから液中に銅イオンが溶出していた。培養液中には大量の陽イオンが存在するため、陽イオン交換で担持された銅イオンが再び陽イオン交換現象により水中に溶出されたと考えられる。

以上の結果より、銅イオン担持ガラス繊維シートには、Km及びCpいずれのプランクトンに対しても細胞数を減少させる効果が見られた。特に、Kmは6時間後には、異常細胞の割合が100%となり、その後、完全消失したことから、銅イオン担持ガラス繊維シートには、Kmに対して顕著な殺藻効果があると考えられた。Cpでは24時間後に80%以上の細胞数の減少が認められたが、正常細胞が90%近くを占めていた。銅イオンには藻類などの殺藻効果があることが知られている<sup>17-18)</sup>が、銅イオンに対する感受性は、KmとCpで異なることが示唆された。しかしながら、銅イオンの溶出が確認されたことから、銅イオン担持ガラス繊維シートを開放系で使用することは望ましくなく、閉鎖域などで緊急的に使用することが適当であると考えられる。

#### 4. 結言

- (1) ガラス繊維を水酸化ナトリウムで処理すると、ガラス繊維表面に非晶質のケイ酸カルシウム水和物(CSH)が形成された。
- (2) ガラス繊維への銅イオンの担持は、イオン交換機構と静電引力機構によるものと考えられた。
- (3) 銅イオン担持ガラス繊維シートをプランクトンに暴露して24時間後には、Kmは細胞数が90%以上減少し、かつ、全ての正常細胞が異常細胞に変化し最終的に完全消失した。
- (4) 銅イオン担持ガラス繊維シートをプランクトンに暴露して24時間後には、Cpは細胞数が80%以上減少したが、異常細胞は6%以下で大部分は正常細胞であった。
- (5) 銅イオン担持ガラス繊維シートを培地水溶液に加えると、培養液中に銅イオンが溶出したことから、溶出した銅イオンが各プランクトンに大きく影響を与えたと考えられるが、銅イオンへの感受性は、KmとCpで異なることが示唆された。

#### 謝辞

本研究を遂行するにあたり、*C. polukrikoides*単離株のCP-OI-3.5株を譲渡していただいた九州大学農学研究院島崎洋平博士に厚く御礼申し上げます。

#### 参考文献

- 1) 農林水産省 HP、統計情報、分野別分類/水産業、海面漁業生産統計調査
- 2) 中国四国農政局 HP、平成30年～令和元年四国農林水産統計年報、第12部
- 3) 愛媛県 HP、えひめの水産統計 HP、5 養殖業(生産量、産出額)(1) 養殖生産の地位、魚類養殖生産の地位(昭和46年～平成30年)
- 4) 愛媛で就職! 農林水産まるかじり就職支援サイト、ehime-marukajiri.jp
- 5) 株式会社ヨンキュウ、宇和海における魚類養殖について、suisan-innv.jp
- 6) 愛媛県漁業協同組合連合会 代表理事会長 平井義則、愛媛県の養殖業と水環境等を巡る課題について、4 ページ、平成31年1月10日
- 7) Z会、瀬戸内海の漁業の特徴は?、www.zkai.co.jp
- 8) 今井一郎、山崎峰生、松岡数充、有害有毒プランクトンの科学 Advances in Harmful Algal Bloom Research、株式会社恒星社厚生閣、2016年2月10日 初版1刷発行
- 9) 日色和夫、富栄養化と赤潮発生、J-STAGE、環境技術、20巻12号、770-774、1991
- 10) 愛媛県 HP、宇和海で発生した赤潮による漁業被害について、有害赤潮プランクトンの詳細
- 11) 今井一郎、沿岸環境と赤潮、そるえんす79、10-17、2008
- 12) Yamasaki, Y. et al., Allelopathic interactions between the bacillariophyte *Skeletonema costatum* and the raphidophyte *Heterosigma akashiwo*. Marine Ecology Progress Series, 339, 83-92 (2007).
- 13) Shao, N. et al., Hierarchically Structured calcium Silicate Hydrate-Based Nanocomposites Derived from Steel Slag for Highly Efficient Heavy Metal Removal from Wastewater, ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 6, 14926-14935 (2018).
- 14) Laroche, G. et al., FT-IR-ATR spectroscopy in thin film studies: The importance of sampling depth and deposition substrate, Applied surface science, 273, 632-637 (2013).
- 15) 青木秀希、驚異の正体物質アパタイト、医歯薬出版株式会社、1999年9月20日、第1版第1刷発行
- 16) 井上耕三、恒松修二、山田英夫、野間弘昭、芳尾真幸、

アルミニウム含有低結晶質ケイ酸カルシウム水和物の陽イオン交換特性、無機マテリアル、Vol.6、May 184-191、1999

- 17) Cid, Á. et al., Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*: effects on photosynthesis and related parameters, *Aquatic Toxicology*, 94, 511-519 (1987).
- 18) Charles, C. et al., Impact of Copper Sulfate on Plankton in Channel Catfish Nursery Ponds, *Journal of the World Aquaculture Society*, 40, 122-128 (2009).