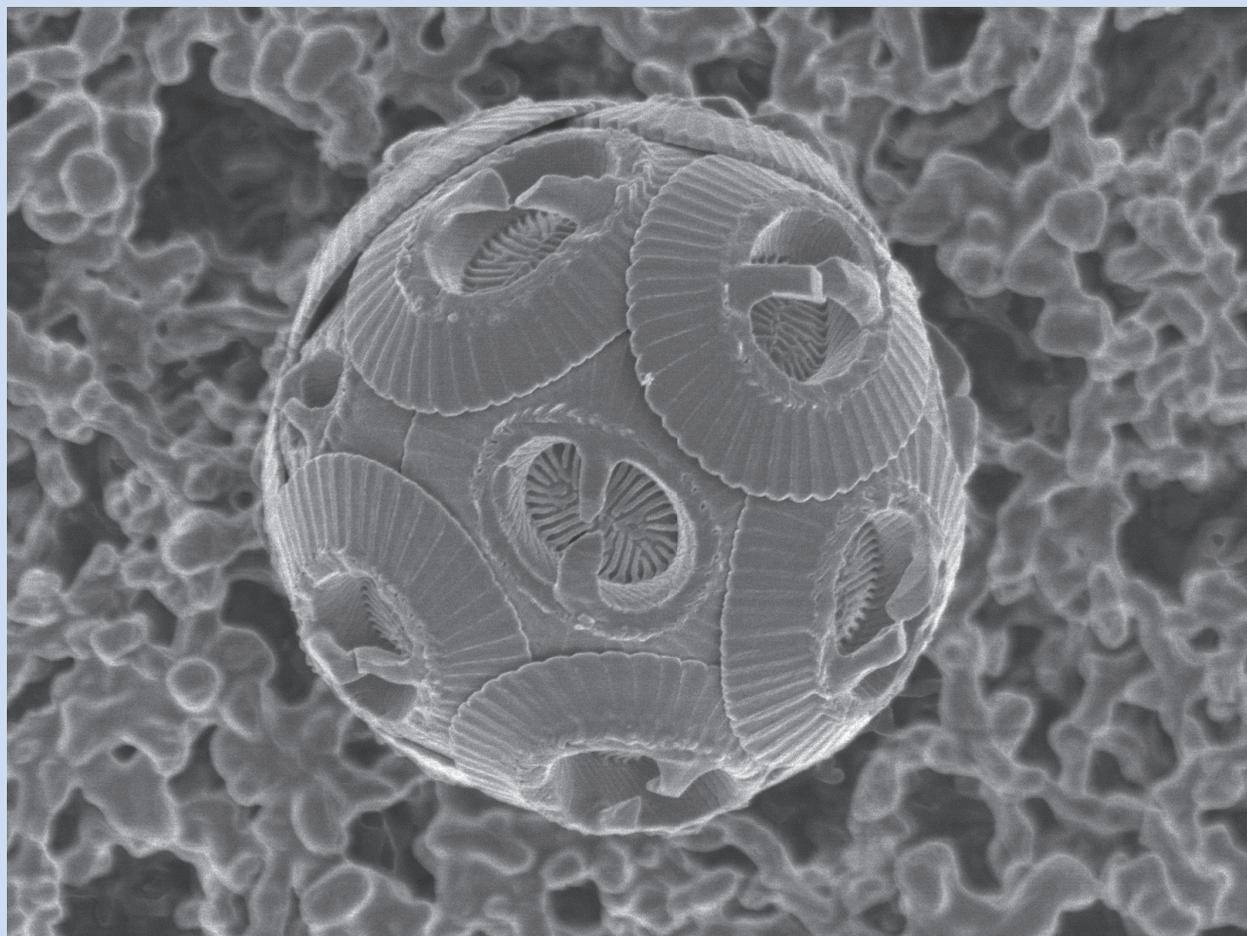


創価大学
プランクトン工学研究

Soka University

Bulletin of Plankton Eco-Engineering Research



「プランクトン工学研究」編集委員

秋月真一（プランクトン工学研究所）

桑原ビクター伸一（教育学部）

佐々木諭（看護学部）

伴 修平（滋賀県立大学）

高山佳樹（プランクトン工学研究所）

古谷 研（プランクトン工学研究所）編集委員長

「プランクトン工学研究」投稿規定

創価大学プランクトン工学研究所紀要「プランクトン工学研究」は原著論文、総説、短報、研究情報、その他編集委員会が認めた原稿を掲載する。このうち原著論文、総説、短報は他の学術誌に印刷されたことがなく、また印刷予定のないものとし、責任ある研究活動の成果について研究倫理を遵守してとりまとめられたもので無ければならない（参考「科学の健全な発展のために—誠実な科学者の心得—」日本学術振興会 (2015)、<https://www.jsps.go.jp/j-kousei/data/rinri.pdf>）。すでに印刷された図表ならびに本文 200 語以上の引用にあたっては著者の責任において著作権所有者の許諾を得るものとする。原稿は図表を含め編集委員長宛（古谷 研 furuya@soka.ac.jp）に送付すること。掲載されたすべての報文の著作権は創価大学プランクトン工学研究所が所有する。

原稿（以降テキスト部分を原稿と呼ぶ）の用語は和文とするが英文も受け付ける。和文論文では、要旨と図表の説明文には必ず英語を用いる。その他の原稿の図表の説明文はこの限りではない。A4 判で作成し、行間を 1.5 行とし、全ページにページ番号と行番号を付する。本文のフォントは明朝体系フォント 12 ポイントを、英文、学名、数値、単位、数式等については欧文用セリフ系フォント 12 ポイントを用いる。全角の英文フォントは用いない。

原稿第 1 ページ目には、表題、著者氏名、所属、住所を和英両文で書き、柱用の表題略語を和文 35 文字以下で指定する。また、責任著者の電子メールアドレスを書く。連名の著者が異なる所属である場合は、著者順に所属に連番を付して著者名の右肩に所属番号を付して区別する。

第 2 ページ目には要旨を書く。要旨には必ず英語を用い、報文全体の概要がやや詳しく示されるように 500 語程度にする。ただし、短報は 250 語程度とする。要旨の下に 5 つ以内のキーワード（英語）をアルファベット順に併記する。

本文はページを改めて書き始める。原著論文では緒言（序言、はじめに等）材料と方法、結果、考察、謝辞、引用文献、図の説明の順とし、総説では必要に応じて章立てを行い、短報では緒言から謝辞までをわけずに書く。

学名は斜体とし、その表記は藻類においては最新の国際藻類・菌類・植物命名規約、動物においては最新の国際動物命名規約に従う。属名は緒言、材料と方法、結果、考察のそれぞれの初出、および文頭では略さず表記する。

単位は原則として SI 単位（第 9 版）を用いる。慣例により非 SI 単位を用いることがある。単位は次のように表記することとする： m^2 、 m^3 、 L 、 L^1 、 mL 、 mL^1 、 ind 、 L^1 、 $inds$ 、 m^2 、 mM 、 μM 、 nM 、 $cm\ s^{-1}$ 、 $cm\ min^{-1}$ 、 $km\ h^{-1}$ 、 $\mu g\ C\ m^{-2}\ d^{-1}$ 、 $g\ C\ m^{-2}\ y^{-1}$ 、 $\mu mol\ (photons)\ s^{-1}\ m^{-2}$ など。単位と数値の間、演算記号の前後、単位の積における単位同士の間は半角スペース空ける。

表は一つずつページを改め、上欄にそれぞれの説明文（英文に限る）を付した後、番号順に引用文献の次におく。確率等の説明は説明文に入れる。例外的な事項の説明には、表中に肩記号を付して脚注に補足説明を置くことができる。図の説明文（英文に限る）は、本文を参照することなくそれ自体で一応の意味がわかるように書き、表の次にページを改めて一括して列挙する。図や写真は A4 版で受付ける。図中の説明は英文で作成する。図中の数字、記号、説明等のフォントは欧文用サンセリフ系フォントを用い、主要な文字や記号のサイズは 18 ポイント、最小でも 12 ポイント以上とすることを推奨する。

本文中の文献引用は、著者が複数で 2 名のときは佐藤・斉藤 (1980) または (Sato & Saito 1980)、3 名以上のときは (佐藤ほか 1980) または Sato et al. (1980) のようにする。カッコ内の著者名と出版年の間は半角スペースで区切る。複数の論文を引用するときは、(佐藤ほか 1980, 山田ほか 2010) のように半角カンマと半角スペースで区切り、出版年、筆頭著者の姓のアルファベット順とする。投稿中の論文は引用できないが、(私信) または (personal comm.) か、(未発表) または (unpubl.) とすることができる。卒業論文、修士論文、学会講演要旨集は引用不可とする。

引用文献リストの書き方は別項を参照すること。その他の不明の事項については本紀要の最新号に掲載の報文を参考にするか、編集委員に問い合わせること。

表紙写真：相模湾で採集された円石藻 *Gephyrocapsa oceanica*（細胞直径は約 $6\ \mu m$ 。詳細は矢野ほか参照）
(撮影者：名取則明)

Bulletin of Plankton Eco-Engineering Research

No. 2

June 2022

Contents

Review

- Research trends in carotenoids from microalgae and measurement of its antioxidant capacity
Seo Esaki and Mutsumi Sekine 1

Original papers

- Synthesis and characterization of ZnO photocatalyst with different morphologies
Yuito Narita, Kento Nishi, Tatsushi Matsuyama and Junichi Ida 14
- Coccolithophore *Gephyrocapsa oceanica* bloom occurrence in Sagami Bay for the first time in 25 years
Koichi Yano, Masahiko Kaji, Shinji Shimode, Hiroshi Murakami, Mitsuhiko Toratani and
Victor S. Kuwahara 24
- Examination of dietary microalgae for larval stage in the culture of *Acartia steueri*
Yoshiki Takayama, Minamo Hirahara and Tatsuki Toda 32
- Hydrothermal carbonization of compressed water hyacinth: Effects of operation parameters on energy
conversion and characterization of products
Tassapak Wutisirirattanachai, Solomon Addisu Legesse and Shinjiro Sato 44
- Improvement of the extraction of DNA from single copepod samples and the effect of formalin fixation
time on the PCR amplification of a mitochondrial gene
Maki Kobayashi, Yoshiki Takayama, Shinji Shimode, Tatsuki Toda and Norio Kurosawa 56
- ### Note
- Surface distribution of *Noctiluca scintillans* in the upper Gulf of Thailand in summer
Ken Furuya, Kenta Kozono and Thaithaworn Lirdwitayaprasit 66

総説

微細藻類由来のカロテノイドとその抗酸化能測定手法の研究動向

江崎世雄¹⁾、関根睦実^{1)*}

1) 創価大学理工学部 〒192-8577 東京都八王子市丹木町 1-236

Research trends in carotenoids from microalgae and measurement of its antioxidant capacity

Seo Esaki¹⁾, Mutsumi Sekine^{1)*}

1) *Faculty of Science and Engineering, Soka University, 1-236 Tangi-cho, Hachioji, Tokyo 192-8577, Japan*

* *Corresponding author: mu_sekine@soka.gr.jp*

2022年5月5日受付, 2021年5月23日受理

Abstract In recent years, the demand for phytochemicals has increased due to rising global health awareness. Among phytochemicals, carotenoids such as astaxanthin and β -carotene can detoxify singlet oxygen, one of the reactive oxygen species (ROS), and are effective in preventing human diseases such as cancer, cardiovascular problems, atherosclerosis. Because animals, including humans, are unable to produce carotenoids, they must ingest them from vegetables and fruits to protect their bodies from singlet oxygen oxidation. Some microalgae grow faster than other plants and can accumulate carotenoids in much higher concentrations in vivo. To date, approximately 200 different carotenoids have been identified in microalgae. Therefore, as an important source of natural carotenoids, these microalgae have been mass produced and used in supplements and cosmetics. However, the number of species actually used for commercial applications is still limited mainly to *Hematococcus* and *Dunaliella*.

Conventionally, comparison and evaluation of microalgae accumulating carotenoids have been conducted by measuring the concentration of each of the various carotenoids in biomass by high-performance liquid chromatography (HPLC). However, it was not possible to evaluate the antioxidant capacity of carotenoids in the target microalgae to determine antioxidant intake for comparison with other microalgae biomass. This is because it is not practical to quantify the type, content, and antioxidant capacity of all the various carotenoids in microalgae to obtain a total antioxidant capacity. In addition, it is not possible to analyze all carotenoids by HPLC because only a small number of carotenoids are commercially available as standards and some are unknown. Phenols, which is considered the two major antioxidants together with carotenoids, can be measured for total antioxidant capacity by the DPPH and ORAC methods. However, these methods cannot be applied to carotenoids, which have a different antioxidant mechanism. Although knowledge of the antioxidant capacity of carotenoids in microalgae is desired, techniques

to measure it remain limited.

Based on the above background, the singlet oxygen absorption capacity (SOAC) method was finally developed in 2010. In this method, a singlet oxygen generator (endoperoxide solution) and 2,5-Diphenyl-3,4-benzofuran (DPBF) solution are added to carotenoids samples and the decay rate of DPBF is used to evaluate the antioxidant capacity of the sample. Therefore, if the SOAC method can be applied to microalgae, the antioxidant capacity of all carotenoids in microalgae biomass can be quantified as SOAC values. The SOAC method also allows many samples to be analyzed at once using microplates. This can be useful for screening useful strains that accumulate high amounts of carotenoids. However, the SOAC method has not yet been applied to microalgae. Optimization of analytical processes, including the extraction of carotenoids from algae, is required as an immediate research priority.

Keywords: antioxidant capacity, carotenoids, microalgae, singlet oxygen, SOAC method

1. はじめに

この10年で微細藻類を用いた健康食品や化粧品をよく見かけるようになった。今や微細藻類は、タブレットや粉末の他、ビスケット、パスタ、チーズ、アイスクリーム、そして、植物性パテや代替チキン、百貨店で販売されるブランド化粧品の原料にも使われている (Ferreira et al. 2021)。これはインターネットの普及、平均寿命の延伸、そして新型コロナウイルス (COVID-19) 感染拡大に伴うライフスタイルの変化などによる、世界的な健康意識の高まりによるものと推察される (Lafarga 2019)。さらに微細藻類に含まれるたんぱく質、脂質、炭水化物、ビタミン、ミネラル、食物繊維の他、抗酸化物質の効能が高く評価されていることも大きな理由である。微細藻類は光合成により増殖するが、必要以上の光を受けると活性酸素が生成され、細胞が酸化損傷を受ける。そのため微細藻類は、この活性酸素を除去するための機構として、ポリフェノール、カロテノイド、クロロフィル、トリテルペノイドをはじめとする種々の抗酸化物質を合成・蓄積する能力を持つ (Halliwell & Gutteridge 2015)。これら抗酸化物質は摂取することで抗酸化作用、免疫賦活作用、抗腫瘍作用などを得ることができ、第7栄養素的物質“ファイトケミカル (植物性化学物質)”と呼ばれ、需要

が高まっている (野澤ほか 2015)。

抗酸化物質はフェノール系とカロテノイド系の2つに大別され、それぞれ作用する活性酸素種が異なる。このうちカロテノイド系抗酸化物質は、代表的な活性酸素種の一つである一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) に対し高い抗酸化能を示し (Foote 1968)、がん、心血管、眼科疾患などを含む種々の疾患リスクの低減に寄与する。しかし、ヒトを含む動物はカロテノイドを生合成できないため、体外から摂取する必要があり、食品添加物、着色料や水産飼料、家畜餌料としての需要が高い (Del Campo et al. 2007)。微細藻類からは、これまでにおよそ200種類のカロテノイドが検出されている (Egeland 2016)。他の高等植物と比較して増殖速度が速いため、天然のカロテノイド源として注目されている。

微細藻類のカロテノイドの種類・含量は、既知の物質であれば高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析できる (Markovitz et al. 1993, Fernandes et al. 2020)。しかし、微細藻類同士や他のバイオマスとの比較、抗酸化物質摂取量の把握のために、対象の微細藻類のバイオマス当たりの抗酸化能を評価したい場合に、微細藻類中の各種カロテノイドの全てについて種類、含量、抗酸化能を定量し、抗酸化能の総和を出すことは現実的ではない。また、標準物質が市販されているカロテ

ノイドはごく一部であり未知の物質もあるため、全カロテノイドを HPLC で分析することはできない。そこで 2010 年、一重項酸素消去能 (Singlet Oxygen Absorption Capacity, SOAC) 測定法が開発された (Ouchi et al. 2010)。カロテノイド抽出液に一重項酸素発生剤であるエンドペロキシド (EP) 溶液、2,5-ジフェニル-3,4-ベンゾフラン (DPBF) 溶液を加え、DPBF の吸光度を測定するといった簡易な手法である。既に野菜のカロテノイドの抗酸化能測定には使用されており (Mukai et al. 2012, Iwasaki et al. 2015, Bodó et al. 2020, Zacarias et al. 2020)、微細藻類への適用も望まれる。

以上より本稿では天然カロテノイドの生産における微細藻類の有用性と、効能の標準化に向けた抗酸化能評価法の研究動向を整理することを目的とし、活性酸素種とカロテノイドの抗酸化機能、そして微細藻類の産業利用の展望を示したのち、微細藻類の抗酸化能の評価における SOAC 分析法の利用可能性について述べる。

2. 活性酸素種と抗酸化物質

2-1. 活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS)

ヒトを含む好気性生物は、空気中に 21% 含まれる酸素を取り込み、主にミトコンドリアの電子伝達系によりエネルギー (ATP) を生産している。この過程で酸素は、4 つの電子を受け取り水に還元され、電子が 2 個で対をなす安定した状態になる ($O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$)。しかし、実際には全ての酸素が完全に電子還元されるわけではなく、分子中に電子が一つだけ存在する酸素や、電子が対をなしてもその受け取った電子のスピンが

異なる酸素が 1 ~ 3% 程度発生する (0.1 ~ 0.2% である可能性もある) (Halliwell & Gutteridge 2015, Prior 2015) (Fig. 1)。このような化学的に不安定な酸素は活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS) と総称され、強い酸化力を持つ。代表的なものには、スーパーオキシド (アニオン) ラジカル ($\cdot O_2^-$)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシラジカル ($\cdot OH$)、一重項酸素 (1O_2) があり、狭義の ROS と呼ばれる (中村 2013)。スーパーオキシド (アニオン) ラジカル ($\cdot O_2^-$) やヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) は不対電子を持つため、物質から電子を奪い標的分子を酸化する。過酸化水素 (H_2O_2) は、熱や光、生体内の Fe^{2+} により不対電子を持つヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) に分解されることで同様に電子を奪い、物質を酸化する (中村 2013)。一重項酸素 (1O_2) は正常に電子対を形成するが、電子のスピンによる熱が発生するため、不安定であり高い酸化作用を示す (Halliwell & Gutteridge 2015)。この他にも、広義の ROS としては、一酸化窒素 ($NO\cdot$)、脂質ペルオキシラジカル ($LOO\cdot$) などが含まれる (Prior 2015)。

ROS の酸化力は生体内で様々な利害をもたらす。食細胞であるマクロファージは、生体防御機構として、細胞外に ROS を産生し侵入した細菌や異物を酸化し無力化する (Halliwell & Gutteridge 2015)。また、ROS は細胞内のシグナル伝達分子として機能することも報告されている (D'Autréaux & Toledano 2007)。このように ROS は生体内の防御の機構の一部を担っている。しかし紫外線や外部ストレスなどにより生体内で ROS が過剰に生成されると、細菌や異物だけでなく、自身の生体成分を酸化してしまい、細胞内のタンパク質の変性、脂質の過酸化、遺伝子の損傷、がんや動脈硬化、心

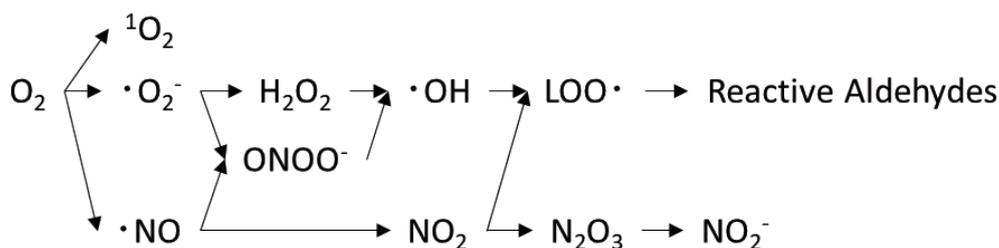


Fig. 1. Generation of reactive oxygen and nitrogen species. Modified from Fig. 1 of Prior (2015).

臓病などの生活習慣病の発症や老化を促進することが知られている (Bandyopadhyay et al 1999)。

2-2. 生体内での抗酸化物質とカロテノイド

抗酸化物質とは、簡潔に表現すれば上述のような標的分子の酸化損傷を遅らせる、防ぐ、または除去することのできる物質である (Hallwell & Gutteridge 2015)。ROS の酸化傷害に対し、生体内にはカタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、スーパーオキシドディスムターゼなどの抗酸化酵素、アスコルビン酸 (ビタミン C)、フェノール、カロテノイド類などの抗酸化物質からなる防御機構が存在する (Krishnamurthy & Wadhvani 2012)。フェノールやアスコルビン酸は ROS の中でもヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$)、過酸化水素 (H_2O_2)、ペルオキシナイトライト ($\text{ONOO}\cdot$) に対し抗酸化能を発揮する (Tommos & Babcock 1998)。その抗酸化能は、カロテノイドが持つ共役二重結合が開裂することで生じるヒドロキシ基が、ROS から電子を受けとる事で発揮されるが、ROS を一度無害化した後、これらは酸化物質と化し、抗酸化物質としては機能しない。酸化物質と化したあとはカタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼなどの抗酸化酵素により電子を奪われることで無害化される (Tommos & Babcock 1998)。

一方、カロテノイドは一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) に対し高い抗酸化能を示す (Fig. 2)。1968 年、近赤外分光解析により、カロテノイドのポリエン (共役二重結合) が一重項酸素から励起エネルギーを受け取り、一重項酸素を

安定な基底状態の三重項状態 (通常酸素) へ戻すという、カロテノイドによる一重項酸素消去機構が明らかにされた (Foote 1968)。カロテノイドは受け取ったエネルギーをポリエン (共役二重結合) の振動により熱として放出し消去するため、繰り返し周辺の一重項酸素を消去できる。また、カロテノイド自身が酸化物質になることもない。そのためカロテノイドは食品添加物、着色料や水産飼料、家畜飼料としての需要が高く (Del Campo et al. 2007)、研究開発も活発に行われている (Hirayama et al. 1994, Stahl & Sies 2003, Singh et al. 2020)。

カロテノイドはすべての光合成生物 (光合成細菌、藻類、陸上植物) や真菌類が生合成することが知られている。一方で、ヒトを含む動物はカロテノイドを生合成できず、動物の生体内に存在するカロテノイドはすべて食物から摂取されたものに由来する (眞岡 2007)。カロテノイドは、その種類によっては化学合成することもでき、現在は商業生産されるカロテノイドの 85% 以上が化学合成品であるものの、安全性の観点から天然由来のカロテノイド生産の需要が高まっている。これまでにマリーゴールド等の高等植物、*Haematococcus* 属および *Dunaliella* 属等の微細藻類の培養による天然由来のカロテノイドの商業生産がされてきた。カロテノイドの市場は、2019 年の 15 億米ドルから 2026 年には 20 億米ドルに達すると予想されており (Meticulous Market Research2021)、今後もニーズに応じて健康食品や、化粧品原料等のさまざまな用途への活用が期待されている。

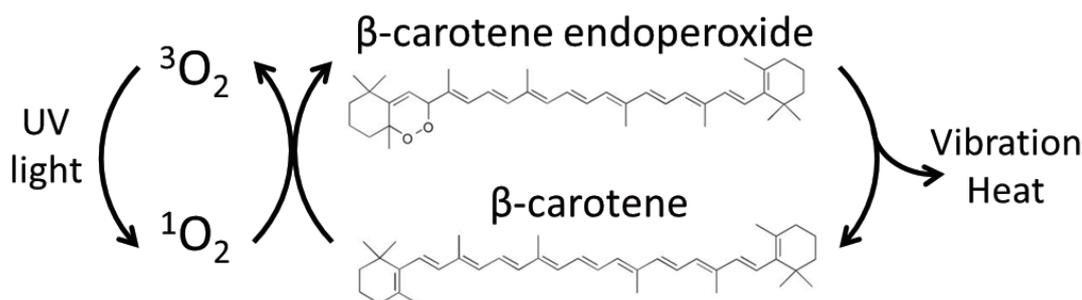


Fig. 2. Singlet Oxygen Scavenging Mechanism of β -carotene. $^3\text{O}_2$: triplet oxygen, $^1\text{O}_2$: singlet oxygen. Modified from Fig. 1 of Sandmann (2019).

3. 微細藻類によるカロテノイド生産

3-1. カロテノイド生産の代表的商業利用種：

Haematococcus lacustris および *Dunaliella salina*

自然界における微細藻類によるカロテノイド生産量は年間約1億tに達すると推定されている (Fraser & Bramley 2004)。特に、海洋で最も広く分布するカロテノイドの1つはフコキサンチンであり、主に珪藻や褐藻により年間約1000万t生産される (Dembitsky & Maoka 2007)。珪藻については、加えてジアトキサンチンやジアジノキサンチンの生産が良く知られる (Stauber & Jeffrey 1988)。他にも *Chlorella* 属のルテイン (Del Campo et al. 2004)、渦鞭毛藻のペリジニン (Dembitsky & Maoka 2007) など種々の微細藻類とカロテノイドの組み合わせが報告されているが、現在、商業的な大量生産に成功しているのは、*Haematococcus lacustris* のアスタキサンチンおよび *Dunaliella salina* の β -カロテンの2種である (Rammuni et al. 2019)。

H. lacustris は、淡水産の緑藻類でヨーロッパ、アジア、アフリカ、北アメリカなど世界中の湖に分布しており、しばしば一時的に生じる水たまりなどからも見つかる (Proctor 1957)。窒素欠乏、塩分増加、高照度、低温・高温などの生育に不適な環境条件にいて、ストレス応答として葉緑体膜に蓄積した β -カロテンをアスタキサンチンに変換して脂質小胞に蓄積し、赤色の休眠細胞 (シスト) を形成する (Li 2007)。その蓄積量は細胞の全乾燥重量の7%という高濃度まで達する (Rammuni et al. 2019)。そのため現在天然アスタキサンチンの主要な供給源として利用されている (Del Campo et al. 2004)。商業生産では上述のストレス応答特性を利用して2段階培養によってアスタキサンチンの生産を行う。この2段階培養は緑色の細胞を活発に分裂増殖させて細胞を増やすグリーンステージと、ストレス応答により細胞内にアスタキサンチンを蓄積させるレッドステージからなる (Hagen et al. 2001)。アスタキサンチン合成の誘導には強光ストレスと栄養塩類 (特に窒素源) の欠乏の組み合わせが一般的だが、これに高温や高塩濃度ストレスなどを組み

合わせることもある (Wang et al. 2003, Gao et al 2015)。1994年に上記の培養方法でスウェーデンの AstaReal Group が初めて *H. lacustris* を用いた世界初のアスタキサンチン生産を成功させた。その他にも、イスラエルの Algaenovation Ltd やアメリカの Cyanotech Ltd 等が同様に閉鎖型培養タンクを用いて *H. lacustris* でのアスタキサンチンを生産しており、現在最大の生産量を誇る Cyanotech Ltd では年間で乾燥重量13~15tのバイオマスを生産している (Del Campo et al. 2007)。しかしながら、*H. lacustris* はこれまで大量培養に成功している他の微細藻類に比べて増殖速度が低く、中性pHの淡水条件で増殖するため、後述の *D. salina* のように極端なpHや高塩分での培養ができず、バクテリアや他の藻類といった他種のコンタミネーションに対して脆弱である (Lorenz & Cysewski 2000, Del Campo et al. 2007, Solovchenko & Chekanov 2014)。そのため閉鎖型培養タンクなどを用い繊細に管理する必要があり、大量生産は難しい。アスタキサンチン生産において *H. lacustris* より高い増殖速度を持ち、バクテリアなどのコンタミネーションに強い新規有用株を見つけることが求められている。

D. salina は先端に二本の等長鞭毛を持つ緑藻類である。塩分の高い、塩田、塩湖、海水中でよく確認される (Del Campo et al. 2007)。高い塩分、温度、光強度、および窒素欠乏等のストレス条件で培養されると細胞内に β -カロテンを高濃度に蓄積する (Lamers et al. 2008)。この *D. salina* の商業生産は、1986年にオーストラリアの Western Biotechnology Ltd と Betatene Ltd によって初めて250ヘクタールの面積を持つ大型のオープンポンドにて実施された。天然の塩湖を整備し、機械的攪拌やCO₂供給を行わない最小限の制御であったため、 β -カロテンの面積生産性は低かったものの、オーストラリアの藻類に適した気候と低い土地代により利益が確保された (Del Campo et al. 2007)。その後、他国でも *D. salina* の商業生産が展開されたが、生産性を向上させるため、主にパドル攪拌を備えたレースウェイ式の培養槽が導入された (Del Campo et al. 2007)。初期には2段階の培養方式がとられ、まず、第一段階で *D.*

salina の増殖に最適な培養条件でバイオマスを増やした後に、第二段階にて培養液を希釈し、液中の細胞密度を下げ、高い光強度と窒素欠乏によって細胞内の β -カロテンを蓄積させていた (Ben-Amotz 1995)。しかし、培地に塩化ナトリウムを濃度 15%~25%になるよう添加していたことや、広い土地の確保が必要であったために費用がかかっていた。その後、海水を用いてより高い細胞密度で増殖できる株が発見されたことで、 β -カロテン生産性は最大で年平均約 $200 \text{ mg m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ に達した (Ben-Amotz 2004)。*D. salina* の生産は、オーストラリア、イスラエルから始まり、現在はインド、オランダ、ドイツにも展開している (Ferreira et al. 2021)。

3-2. 今後生産が期待される

新規有用藻類株とカロテノイドの種類

微細藻類のカロテノイド生産性は 1 日当たりの増殖速度とバイオマス中のカロテノイド含有量によって決まる。これまでに、上述の商業利用種 *H. lacustris* および *D. salina* よりも高い増殖速度やカロテノイド含有量を持ち、これにより高いカロテノイド生産性を示す有用微細藻類株が多数発見されている。それらの有用株を増殖速度やカロテノイド含有量とともに Table 1 にまとめた。培養容器や基質供給方法が変化すると攪拌効率、光量、および栄養塩濃度などの種々の環境パラメータが変化し、カロテノイド生産性を決める増殖速度やカロテノイド含有量にも影響するため、この Table 1 では 500 mL の三角フラスコで回分培養され、増殖速度とカロテノイド含有量が測定された微細藻類株のみを整理した。アスタキサンチンを蓄積する微細藻類株としては、商業利用種の *H. pluvialis* FACHB-872 (Cheng et al. 2016) より増殖速度の高い緑藻 *Chlorococcum* sp. MA-1 (Ma & Chen 2001)、*Chlorella zofingiensis* CCAP 211/14 (Del Campo et al. 2004)、*Monoraphidium* sp. GK-12 (Fujii et al. 2006) の 3 株が知られている。マレーシアの岩石の表面から単離された *Chlorococcum* sp. MA-1 は商業利用種と比べ、カロテノイド含有量こそ低いものの、増殖速度は 3 倍高い。一方、 β -カロテンを蓄積する微

細藻類の中には、商業利用種の *D. salina* CCAP19/18 (Wolf et al. 2021) より β -カロテン含有量の高い緑藻 *Asterarcys quadricellulare* PUMCC 5.1.1 (Singh et al. 2019)、*Chlamydomonas acidophila* A-2 (Cuaresma et al. 2011)、プラシノ藻 *Tetraselmis* sp. DS3 (Tsai et al. 2016) が発見されている。なかでもインドの淡水河川から単離された *A. quadricellulare* PUMCC 5.1.1 は商業利用種と比べ、9 倍高い β -カロテン含有量を示している。加えて、スペインの酸性河川から単離された *C. acidophila* A-2 は商業利用種と比べ、約 4 倍高い β -カロテン含有量を示す。この株の増殖速度は商業利用種のものより低い、pH 2.5 で最大の増殖速度を示す。商業利用種である *D. salina* CCAP19/18 は、pH 8.0 で大量培養されているが、pH 8.0 は他の微細藻類やバクテリアの増殖にとっても至適 pH であるため、大量培養時に他種のコンタミネーションが生じてしまう。これに対して、*C. acidophila* A-2 が増殖する pH 2.5 では、他の微細藻類種やバクテリアの増殖は抑制されるため、*C. acidophila* A-2 は大量培養時にコンタミネーションを生じ難いという利点を有する。このように、これまで知られている商業利用種よりカロテノイド生産性の高い微細藻類種が世界各地から単離されている。

前述のように、現在、カロテノイドの商業生産を目的とした微細藻類の大量生産は、*H. lacustris* のアスタキサンチンおよび *D. salina* の β -カロテンが主要であるが、カロテノイドの市場規模としては、ルテイン、アスタキサンチン、リコピン、ゼアキサンチンもこれらに続いて大きく、また伸びている (Meticulous Market Research 2021)。また、これまでにおよそ 200 種類のカロテノイドが微細藻類から検出されており (Egeland 2016)、近年でも新たなカロテノイドが発見され続けている。例えば 2013 年に、日本の土壌より単離された緑藻 *Coelastrella* sp. Ki-4 から水溶性アスタキサンチンが発見された (Kawasaki et al. 2013)。Kawasaki et al. (2013) はこの水溶性アスタキサンチンを 100°C で 1 時間熱処理し、後述する 2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル (DPPH) 分析法で抗酸化能を測定した。その結果、抗酸化能は熱処理をして

Table 1. Carotenoids in microalgae grown in 500 mL of flasks in batch culture.

Strain	Isolated site	Specific growth rate (d ⁻¹)	Typical pigment (mg g-dry weight ⁻¹)	References
Astaxanthin-accumulating microalgae				
<i>Chlorococcum</i> sp. MA-1	Surface of rock, Malaysia	1.81	Astaxanthin (7.1)	Ma & Chen 2001
<i>Chlorella zofingiensis</i> CCAP 211/14	Soil, United Kingdom	0.96	Astaxanthin (1.5)	Del campo et al. 2004
<i>Monoraphidium</i> sp. GK-12	Fresh river, Japan	0.90	Astaxanthin (2.5)	Fujii et al. 2006
<i>Haematococcus pluvialis</i> FACHB-872* ¹	Fresh water lake, China	0.61	Astaxanthin (29.6)	Cheng et al. 2016
β-carotene-accumulating microalgae				
<i>Chlamydomonas acidophila</i> A-2	Acidic lake, Spain	0.59	β -carotene (11.9)	Cuaresma et al. 2011
<i>Tetraselmis</i> sp. DS3	Coastal area, Taiwan	0.62	β -carotene (5.1)	Tsai et al. 2016
<i>Asterarcys quadricellulare</i> PUMCC 5.1.1	Fresh river, India	0.25	β -carotene (27.0)	Singh et al. 2019
<i>Dunaliella salina</i> CCAP19/18* ¹	Salt lake, Scotland	1.82	β -carotene (3.0)	Wolf et al. 2021
Other carotenoid-accumulating microalgae				
<i>Coelastrella striolata</i> SR-3	Surface of rock, Japan	0.22	Canthaxanthin (47.5)	Abe et al. 2007
<i>Coccomyxa acidophila</i> A-34	Acidic river, Spain	0.34	Lutein (6.1)	Casal et al. 2011
<i>Coelastrella</i> sp. Ki-4	Soil, Japan	0.25	Water-soluble astaxanthin (1.6)* ²	Kawasaki et al. 2013
<i>Chlorella saccharophila</i> M-5	Offshore area, New Zealand	0.31	Zeaxanthin (11.3)	Singh et al. 2013
<i>Mallomonas</i> sp. SBV13	Fresh water lake, Vietnam	0.44	Fucoxanthin (26.6)	Petrushkina et al. 2017
<i>Eustigmatos vischeria</i> S12	Soil, Bulgaria	0.32	Vaucherixanthin (2.4)* ²	Stoyneva-Gärtner et al. 2019

*¹ Strains for industrial use; *² Carotenoids found only in microalgae

いない場合と変わらず、高い熱耐性が示された。この水溶性アスタキサンチンは様々なタンパク質と複雑に結合しており、その詳細な物質構造についてはまだ解明されていない。そのため、どのタンパク質が高い熱耐性に寄与しているのかは明らかになっていないが、高い熱耐性を持つ水溶性アスタキサンチンは従来のアスタキサンチンよりも高温処理による抽出ができ、抽出液も有機溶媒ではなく水を使うことができる。そのため従来のアスタキサンチンよりもヒトを対象とした化粧品や健康食品として利用しやすい可能性が考えられる。2019年には、ブルガリアの雪山の土壌から単離された真正眼点藻 *Eustigmatos vischeria* S12 からバウケリアキサンチンが発見された (Stoyneva-Gärtner et al. 2019)。バウケリア

キサンチンも生体内で高いがん細胞のアポトーシス誘導作用、肥満分化抑制作用を持つことが明らかになっている有用カロテノイドである。加えてバウケリアキサンチンは氷点下の温度条件でも抗酸化能を示すという利点を持つ。以上のように新規カロテノイドの供給源としても微細藻類は注目を集めている (Del Campo et al. 2007)。

4. 微細藻類の抗酸化能評価

4.1. 微細藻類の有用性評価法

カロテノイドを蓄積する微細藻類の有用性評価は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) などでバイオマスのカロテノイド含量を測定すること (Markovits et al. 1993,

Fernandes et al. 2020)、あるいは2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル (DPPH) 法 (Brand-Williams et al. 1995)、酸素ラジカル吸収能 (Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC) 法 (Ou et al. 2001, Huang et al. 2002) などによりカロテノイド抽出物に直接フリーラジカルを加え、その減衰時間から抗酸化能を測定することによって行われてきた (Marxen et al. 2007, Banskota et al. 2019)。HPLC 分析では濃度の算出に各種カロテノイドの標準物質が必要だが、微細藻類には200種類以上のカロテノイドが存在し (Egeland 2016)、そのうち標準物質が市販されているカロテノイドはごく一部である (Bijttebier et al. 2014, Londoño-Giraldo et al. 2021)。例えば、アスタキサンチンやルテイン、 β -カロテン等のカロテノイドはそれぞれ *Haematooccus* 属、*Dunaliella* 属の微細藻類、マリーゴールドにカロテノイドを蓄積させ商業利用する生産プロセスが確立されているため、その標準試薬も市販されている。しかし、バウケリアキサンチン等の新規カロテノイドは、近年微細藻類から発見されたばかりで商業利用生産プロセスの確立までは至っておらず、標準試薬も確立されていない。さらにカロテノイドには異性体が存在し、アスタキサンチンではアスタキサンチンモノエステル、 β -カロテンでは9-シス- β -カロテンの標準試薬が入手できるが、その他のカロテノイドの異性体については市販製品が限られている。各カロテノイドの抗酸化能を明らかにするためには、標準試薬を上述のHPLC分析にかける必要があるが、以上の理由によりほとんどのカロテノイドで標準試薬が確立されておらず、その抗酸化能についても明らかにされていない。このことからHPLC分析では微細藻類中の全カロテノイド濃度や抗酸化能を評価することは困難である。

DPPH 法や ORAC 法についても、カロテノイドの抗酸化能を評価する上では大きな課題がある。DPPH は人工的に製造された安定した有機ラジカルである (Brand-Williams et al. 1995)。フェノール等の抗酸化物質が不対電子に電子を供与することで DPPH が還元される。このときの 517 nm の吸光度の減衰から試料の抗酸化活性を測定する。一方で ORAC 法は米国立老化研究所によって確立された抗酸化能評価法

であり、ラジカルを発生させる 2,2-アゾビス (2-アミノジプロパン) 二塩酸塩 (AAPH) と AAPH により発生したラジカルにより分解される蛍光指示薬フルオレセインを試料に添加し、蛍光強度の減衰速度の変化から試料中の抗酸化能を測定する (Ou et al. 2001, Huang et al. 2002)。溶媒を変えることにより、親水性酸素ラジカル吸収能 (H-ORAC) と、親油性酸素ラジカル吸収能 (L-ORAC) の両方を測ることができる。両手法は、フェノール類をはじめとする抗酸化物質のラジカル消去能の評価に適しており、広く食品の評価に使用されている (Prior 2015)。しかしながら、両手法はカロテノイドの一重項酸素の消去活性は評価することができない。一重項酸素は正常に電子対を形成するが、その電子のスピンにより熱が発生、不安定となり高い酸化作用を示す。カロテノイドはこの熱を奪うことで特に一重項酸素に抗酸化能を示し (Fig. 2)、一方でヒドロキシラジカル等の ROS には高い抗酸化能を示さないため (Zorov et al. 2014)、DPPH 法も ORAC 法もカロテノイドの抗酸化能の評価に適していない (Watanabe et al. 2009)。以上のことからこれまでの HPLC 分析による濃度測定や DPPH 法、ORAC 法による抗酸化能測定は、カロテノイドを蓄積する微細藻類の評価には適しておらず、微細藻類が生産するカロテノイドの一重項酸素消去能を特異的に測定できる方法の開発が求められている。

4.2. Singlet Oxygen Absorption Capacity (SOAC) 測定法

抽出液の活性酸素種 (ROS) に対しての消去能を測定する際は、その抽出液中に直接 ROS を発生させる発生剤を加える (Marxen et al. 2007, Banskota et al. 2019)。カロテノイドの一重項酸素消去能の測定には一重項酸素を産生するエンドペロキシド (EP) 試薬が不可欠である。しかし、この生成にはエーテルと過酸化水素による複雑な酸化処理が必要であり、また急激な重合反応による爆発の危険性が伴うため (de Mello & Wootton 2002)、EP 試薬は安易に生成ができず、カロテノイドの一重項酸素消去能測定に関する研究の妨

げになっていた (Mukai et al. 2012)。しかし、2010 年にこの EP 試薬が市販されたことをきっかけに、カロテノイドの一重項酸素消去能 (Singlet Oxygen Absorption Capacity, SOAC) 測定法が開発された。この方法では、カロテノイド抽出液に一重項酸素発生剤である EP 溶液、一重項酸素により減衰する 2,5-ジフェニル-3,4-ベンゾフラン (DPBF) 溶液を加える。DPBF は 413 nm に吸光度を持つが、一重項酸素により酸化されると、その吸光度が減衰する性質を持つ。そのため、DPBF の減衰速度から、カロテノイド抽出液の一重項酸素消去反応速度、すなわち一重項酸素に対する抗酸化能を求めることができる。なお、DPBF の減衰速度を α -トコフェロールで標準化した値を、抗酸化能を示す SOAC 値とする (Ouchi et al. 2010)。この SOAC 測定法はこれまで野菜などの食品由来カロテノイドの抗酸化能評価に利用されてきた (Mukai et al. 2012, Iwasaki et al. 2015)。微細藻類においても、SOAC 測定法を用いたカロテノイドの抗酸化能評価が望まれるが、未だ測定例は無い。微細藻類にこの SOAC 測定法を適用できれば、これまでの評価方法では実現できなかった、未知既知を問わないカロテノイド全体の抗酸化能を測定することができ、カロテノイド供給源としての微細藻類の新たな有用性を評価できる可能性がある。

4.3. SOAC 測定法の発展性

SOAC 測定法は当初、6 つのセルが収納できる分光光度計を用いて約 2 時間で 1 試料の SOAC 値しか測定できなかったが、24 ウェルプレートを用いた SOAC 測定法が確立され (Takahashi et al. 2016)、一度に 3 つの試料を測定が可能になった。近年では 96 ウェルプレートを用いた SOAC 値の測定が試みられ (Wang et al. 2018)、数時間で 15 の試料を同時に測定できるようになった。これにより、例えば、環境中から単離した多数の微細藻類株を強光、弱光、窒素欠乏などのストレス条件で培養した後、カロテノイドを抽出しウェルプレートにて一気に SOAC 値を測定することもでき、高い抗酸化能を有する微細藻類のスクリーニングに使用できる可能

性がある。SOAC の分析が数時間程度で済むのに対し、HPLC によるカロテノイドの分析では 15 の試料の測定におよそ 1 日を要する。また、SOAC 分析法は大型で高価な機械も必要なく、マイクロプレートリーダーさえあれば抗酸化能を測定できる。そのため、SOAC 分析法による簡便かつ短時間での効率的な有用微細藻類株のスクリーニングが期待される。

さらに、現在は、効率的なカロテノイドの抽出・精製のため、単一のカロテノイドを多量に蓄積する微細藻類の生産が利活用の主流となっているが、本 SOAC 法の導入によりバイオマス当たりの総カロテノイドの抗酸化活性を測定できるようになれば、特定のカロテノイドの含有量だけでなく抗酸化活性を基準として商品の効能を評価できるため、多種のカロテノイドが混在している微細藻類も抗酸化剤として陽の目を見る可能性がある。

SOAC 測定法を微細藻類に適用する際の注意点としては、溶媒の低い抽出効率が挙げられる。これまで微細藻類からのカロテノイド抽出には、ジメチルホルムアミド (DMF) やアセトン、ヘキサン、メタノール、クロロホルム等が用いられてきた (Suzuki & Ishimaru 1990, Furuya et al. 1998, Bocchini et al. 2015)。なかでも DMF やアセトン、ヘキサンは抽出効率が高く、メタノールやクロロホルムと比較して溶液中でカロテノイドが酸化しにくいという性質を持つため (Bocchini et al. 2015)、特に微細藻類からのカロテノイド抽出によく用いられてきた。特に DMF は、アセトン、ヘキサンよりも微細藻類バイオマスからのカロテノイド抽出効率が高い (Suzuki & Ishimaru 1990)。これに対し、SOAC 測定法では、通常、メタノール、クロロホルム、重水 (D_2O) が体積比 50:50:1 で構成された SOAC 溶媒を用いる (Ouchi et al. 2010)。この SOAC 溶媒のカロテノイド抽出効率をこれまで微細藻類に用いられてきた抽出効率の高い DMF、アセトンやヘキサンと、微細藻類 2 種について比較したところ、SOAC 溶媒は他の溶媒と比較して抽出効率が低いことが確認された (江崎 未発表)。野菜を対象とした既往研究においても、SOAC 溶媒の抽出効率がアセトンよりも低いことを報告している (Iwasaki et al. 2015)。

微細藻類に適用されている溶媒のカロテノイド抽出効率を改善する方法には、高温高压処理、超音波処理、ビーズ破碎、乳棒とすり鉢による破碎処理、マイクロ波処理（100℃）、浸透圧ショック（塩化ナトリウム使用）といった物理処理がある（De Ancos et al. 2000, Prabakaran & Ravindran 2011, Goiris et al. 2012）。なかでも高温高压処理は、抽出溶媒に対し高い圧力をかけ真空条件下で高温に晒し細胞を破壊することができるため、マイクロ波や超音波処理よりも熱と酸素によるカロテノイドの酸化が少なく、さらに、ビーズや塩化ナトリウムなどの化学物質を使わない点で利がある（De Ancos et al. 2000）。高温高压処理は従来の SOAC 法でも溶媒の抽出効率の改善に用いられてきた。もう一つの抽出効率の改善方法として、カロテノイドを SOAC 溶媒ではなく抽出効率が高いアセトン等の溶媒で抽出し、その抽出液と SOAC 溶媒の混合液を SOAC 測定にかける方法がある。実際に、カロテノイドの一種ノイロスポラキサンチンを細胞内に蓄積する真菌類 *Fusarium fujikuroi* の SOAC 値を測定した Parra-Rivero et al. (2020) では、アセトンでカロテノイドを抽出し、その抽出液と SOAC 溶媒を 1:8 で混合した混合液を SOAC 法で分析している。今後、分析に適した溶媒の種類や混合条件が結果に与える影響を十分に検討することで、SOAC 法を用いた微細藻類のカロテノイドの抗酸化能測定をより簡略化できると考えられる。

6. 結論

増殖が速く、かつ含有するカロテノイドの量・種類ともに多い微細藻類は、需要が高まっている天然カロテノイドの生産源として有望である。しかし実際に商業利用種として用いられている種は限定されており、新規微細藻類株の積極的導入が望まれる。近年開発された SOAC 測定法は、カロテノイドが特異的に寄与する活性酸素種“一重項酸素”の消去能を測ることができ、微細藻類中カロテノイドの抗酸化能評価に有効であると考えられる。また本評価法の導入は、有用微細藻類の

選定にも役立つ可能性がある。

謝辞

本研究の一部は JICA/JST SATREPS-COSMOS プロジェクト<JPMJSA1509>、JICA/JST SATREPS-EARTH プロジェクト<JPMJSA2005>による助成を受け実施された。

引用文献

- Abe K, Hattori H, Hirano M (2007) Accumulation and antioxidant activity of secondary carotenoids in the aerial microalga *Coelastrella striolata* var. *multistriata*. *Food Chem* 100: 656–661.
- Bandyopadhyay U, Das D, Banerjee RK (1999) Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Curr Sci* 77: 658–666.
- Banskota AH, Sperker S, Stefanova R, McGinn PJ, O’Leary SJB (2019) Antioxidant properties and lipid composition of selected microalgae. *J Appl Phycol* 31: 309–318.
- Ben-Amotz A (1995) New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for β -carotene production. *J Appl Phycol* 7: 65–68.
- Ben-Amotz A (2004) “Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products—major industrial species.” *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology* (ed Richmond A). Blackwell Publishing, Oxford, pp. 273–280.
- Bijttebier S, D’Hondt E, Noten B, Hermans N, Apers S, Voorspoels S (2014) Ultra high performance liquid chromatography versus high performance liquid chromatography: Stationary phase selectivity for generic carotenoid screening. *J Chromatogr A* 1332: 46–56.
- Bocchini P, Pinelli F, Pozzi R, Ghetti F, Galletti GC (2015) Quantitative determination of dimethyl fumarate in silica gel by solid-phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry and ultrasound-assisted extraction/gas chromatography/mass spectrometry. *Environ Monit Assess* 187: 65–72
- Bodó A, Radványi L, Kószegi T, Csepregi R, Nagy DU, Farkas Á, Kocsis M (2020) Melissopalynology, antioxidant activity and multielement analysis of two types of early spring honeys from Hungary. *Food*

- Biosci 35: 100587.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol* 28: 25–30.
- Casal C, Cuaresma M, Vega JM, Vilchez C (2011) Enhanced productivity of a lutein-enriched novel acidophile microalga grown on urea. *Marine Drugs* 9: 29–42.
- Cheng J, Li K, Yang Z, Zhou Z, Cen K (2016) Enhancing the growth rate and astaxanthin yield of *Haematococcus pluvialis* by nuclear irradiation and high concentration of carbon dioxide stress. *Bioresour Technol* 204: 49–54.
- Cuaresma M, Casal C, Forján E, Vilchez C (2011) Productivity and selective accumulation of carotenoids of the novel extremophile microalga *Chlamydomonas acidophila* grown with different carbon sources in batch systems. *J Ind Microbiol* 38: 167–177.
- D’Autréaux B, Toledano MB (2007) ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 813–824.
- De Ancos B, Gonzalez E, Cano MP (2000) Effect of high-pressure treatment on the carotenoid composition and the radical scavenging activity of persimmon fruit purees. *J Agric Food Chem* 48: 3542–3548.
- de Mello A, Wootton R (2002) But what is it good for? Applications of microreactor technology for the fine chemical industry. *Lab Chip* 2: 7–13.
- Del Campo JA, Rodríguez H, Moreno J, Vargas MA, Rivas J, Guerrero MG (2004) Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Appl Microbiol Biotechnol* 64: 848–854.
- Del Campo JA, García-González M, Guerrero MG (2007) Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: Current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 74: 1163–1174.
- Dembitsky VM, Maoka T (2007) Allenic and cumulenyl lipids. *Prog Lipid Res* 46: 328–375.
- Egeland ES (2016) “Carotenoids.” *The Physiology of Microalgae: Developments in Applied Phycology* (eds Borowitzka MA, Beardall J, Raven JA) Springer, Switzerland, pp. 507–563.
- Fernandes AS, Petry FC, Mercadante AZ, Jacob-Lopes E, Zepka LQ (2020) HPLC-PDA-MS/MS as a strategy to characterize and quantify natural pigments from microalgae. *Curr Opin Food Sci* 3: 100–112.
- Ferreira A, Guerra I, Costa M, Silva J, Gouveia L (2021) “Future perspectives of microalgae in the food industry.” *Cultured Microalgae for the Food Industry: Current and Potential Applications* (eds Lafarga T, Acien G). Academic Press, London, pp. 387–433.
- Foote CS (1968) Mechanisms of photosensitized oxidation: there are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. *Science* 162: 963–970.
- Fraser PD, Bramley PM (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res* 43: 228–265.
- Fujii K, Imazato E, Nakashima H, Ooi O, Saeki A (2006) Isolation of the non-fastidious microalga with astaxanthin-accumulating property and its potential for application to aquaculture. *Aquaculture* 261: 285–293.
- Furuya K, Hayashi M, Yabushita Y (1998) HPLC determination of phytoplankton pigments using N,N-dimethylformamide. *J Oceanogr* 54: 199–203.
- Gao Z, Meng C, Chen YC, Ahmed F, Mangott A, Schenk PM, Li Y (2015) Comparison of astaxanthin accumulation and biosynthesis gene expression of three *Haematococcus pluvialis* strains upon salinity stress. *J Appl Phycol* 27: 1853–1860.
- Goiris K, Muylaert K, Fraeye I, Foubert I, De Brabanter J, De Cooman L (2012) Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *J Appl Phycol* 24: 1477–1486.
- Hagen C, Grünwald K, Xyländer M, Rothe E (2001) Effect of cultivation parameters on growth and pigment biosynthesis in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis*. *J Appl Phycol* 13: 79–87.
- Halliwell B, Gutteridge JM (2015) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, New York, 905 pp.
- Hirayama O, Nakamura K, Hamada S, Kobayasi Y (1994) Singlet oxygen quenching ability of naturally occurring carotenoids. *Lipids* 29: 149–150.
- Huang, D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer, EK (2002) Development and validation of

- oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. *J Agric Food Chem* 50: 1815–1821.
- Iwasaki Y, Takahashi S, Aizawa K, Mukai K (2015) Development of singlet oxygen absorption capacity (SOAC) assay method. 4. Measurements of the SOAC values for vegetable and fruit extracts. *Biosci Biotechnol Biochem* 79: 280–291.
- Kawasaki S, Mizuguchi K, Sato M, Kono T, Shimizu H (2013) A novel astaxanthin-binding photooxidative stress-inducible aqueous carotenoprotein from a eukaryotic microalga isolated from asphalt in midsummer. *Plant Cell Physiol* 54: 1027–1040.
- Krishnamurthy P, Wadhvani A (2012) Antioxidant enzymes and human health. *Antioxid Enzyme* 3: 1–17.
- Lafarga T (2019) Effect of microalgal biomass incorporation into foods: Nutritional and sensorial attributes of the end products. *Algal Res* 41: 101566.
- Lamers PP, Janssen M, De Vos RCH, Bino RJ, Wijffels RH (2008) Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. *Trends Biotechnol* 26: 631–638.
- Li Y (2007) The role of carotenogenesis in the response of the green alga *Haematococcus pluvialis* to oxidative stress. PhD thesis, The University of Hong Kong, Hong Kong.
- Londoño-Giraldo LM, Bueno M, Corpas-Iguarán E, Taborda-Ocampo G, Cifuentes A (2021) HPLC-DAD-APCI-MS as a tool for carotenoid assessment of wild and cultivated cherry tomatoes. *Sci Hort* 7: 1–12.
- Lorenz RT, Cysewski GR (2000) Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol* 18: 160–167.
- Ma RYN, Chen F (2001) Enhanced production of free trans-astaxanthin by oxidative stress in the cultures of the green microalga *Chlorococcum* sp. *Process Biochem* 36: 1175–1179.
- 眞岡孝至 (2007) カロテノイドの多様な生理作用. *食品・臨床栄養* 2: 3–14.
- Markovits A, Gianelli MP, Conejeros R, Erazo S (1993) Strain selection for β -carotene production by *Dunaliella*. *World J Microbiol Biotechnol* 9: 534–537.
- Marxen K, Vanselow KH, Lippemeier S, Hintze R, Russer A, Hansen U (2007) Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression. *Sensors* 7: 2080–2095.
- Meticulous Market Research (2021) Carotenoids Market by Type (Astaxanthin, Beta-Carotene, Lutein, Lycopene, Canthaxanthin, and Zeaxanthin), Application (Feed, Food & Beverages, Dietary Supplements, Cosmetics, and Pharmaceuticals), Source, Formulation, Region - Global Forecast to 2026. *Markets and Markets*, pp.187.
- Mukai K, Ouchi A, Takahashi S, Aizawa K, Inakuma T, Terao J, Nagaoka SI (2012) Development of singlet oxygen absorption capacity (SOAC) assay method. 3. measurements of the SOAC values for phenolic antioxidants. *J Agric Food Chem* 60: 7905–7916.
- 中村成夫 (2013) 活性酸素と抗酸化物質の化学. *日医大医学会誌* 9:164–169.
- 野澤義則・平光美津子・山澤広之 (2016) 野菜・果物の健康有用性—ファイトケミカルの多様な機能とその仕組み—. *東海学院大学紀要* 9: 67-79.
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL (2001) Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 49: 4619–4626.
- Ouchi A, Aizawa K, Iwasaki Y, Inakuma T, Terao J, Nagaoka SI, Mukai K (2010) Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by carotenoids and food extracts in solution. development of a singlet oxygen absorption capacity (SOAC) assay method. *J Agric Food Chem* 58: 9967–9978.
- Parra-Rivero O, Barros MP, Del M, Prado M, Gil JV, Hornero-Méndez D, Zacarías L, Rodrigo MJ, Limón MC, Avalos J (2020) Neurosporaxanthin overproduction by *Fusarium fujikuroi* and evaluation of its antioxidant properties. *Antioxidants* 9: 1–18.
- Petrushkina M, Gusev E, Sorokin B, Zotko N, Mamaeva A, Filimonova A, Kulikovskiy M, Maltsev Y, Yampolsky I, Guglya E et al (2017) Fucoxanthin production by heterokont microalgae. *Algal Res* 24: 387–393.
- Prabakaran P, Ravindran AD (2011) A comparative study on effective cell disruption methods for lipid

- extraction from microalgae. *Lett Appl Microbiol* 53: 150–154.
- Prior RL (2015) Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *J Funct Foods* 18: 797–810.
- Proctor VW (1957) Some controlling factors in the distribution of *Haematococcus pluvialis*. *Ecology* 38: 457–462.
- Rammuni MN, Ariyadasa TU, Nimarshana PHV, Atalage RA (2019) Comparative assessment on the extraction of carotenoids from microalgal sources: Astaxanthin from *H. pluvialis* and β -carotene from *D. salina*. *Food Chem* 277: 128–134.
- Sandmann G (2019) Antioxidant protection from UV- and light-stress related to carotenoid structures. *Antioxidants* 8: 219.
- Singh D, Puri M, Wilkens S, Mathur AS, Tuli DK, Barrow CJ (2013) Characterization of a new zeaxanthin producing strain of *Chlorella saccharophila* isolated from New Zealand marine waters. *Bioresour Technol* 143: 308–314.
- Singh DP, Khattar JS, Rajput A, Chaudhary R, Singh R (2019) High production of carotenoids by the green microalga *Asterarcys quadricellulare* PUMCC 5.1.1 under optimized culture conditions. *PloS one* 14: e0221930.
- Singh N, Singh S, Ashraf SM, Riaz U (2020) Experimental and theoretical studies of benzoquinone modified poly (ortho-phenylenediamine): singlet oxygen generating oligomers. *Colloid Polym Sci* 298: 1443–1453.
- Solovchenko A, Chekanov K (2014) “Production of carotenoids using microalgae cultivated in photobioreactors” Production of biomass and bioactive compounds using bioreactor technology (eds Paek KY, Murthy N, Zhong JJ). Springer, Dordrecht, 63–91 pp.
- Stahl W, Sies H (2003) Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Aspects Med* 24: 345–351.
- Stauber JL, Jeffrey SW (1988) Photosynthetic pigments in fifty-one species of marine diatoms. *J Phycol* 24: 158–172.
- Stoyneva-Gärtner M, Stoykova P, Uzunov B, Dincheva I, Atanassov I, Draganova P, Borisova C, Gärtner G (2019) Carotenoids in five aeroterrestrial strains from *Vischeria/Eustigmatos* group: updating the pigment pattern of Eustigmatophyceae. *Biotechnol Biotechnol Equip* 33: 250–267.
- Suzuki R, Ishimaru T (1990) An improved method for the determination of phytoplankton chlorophyll using N, N-dimethylformamide. *J Oceanogr* 46: 190–194.
- Takahashi S, Iwasaki Y, Aizawa K, Terao J, Mukai K (2016) Development of singlet oxygen absorption capacity (SOAC) assay method using a microplate reader. *J AOAC Int* 99: 193–197.
- Tommos C, Babcock GT (1998) Oxygen production in nature: a light-driven metalloradical enzyme process. *Acc Chem Res* 31: 18–25.
- Tsai HP, Chuang LT, Chen CNN (2016) Production of long chain omega-3 fatty acids and carotenoids in tropical areas by a new heat-tolerant microalga *Tetraselmis* sp. DS3. *Food Chem* 192: 682–690.
- Wang B, Zarka A, Trebst A, Boussiba S (2003) Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) as an active photoprotective process under high irradiance 1. *J Phycol* 39: 1116–1124.
- Wang Y, Kimura T, Nohara T, Shen J, Hatta H (2018) Proposal of a micro analysis for singlet oxygen absorption capacity using a disposable 96-well microplate. *J Food Sci Technol* 14: 126–130.
- Watanabe A, Kajita M, Kim J, Kanayama A, Takahashi K, Mashino T, Miyamoto Y (2009) In vitro free radical scavenging activity of platinum nanoparticles. *Nanotechnology* 20: 45–53.
- Wolf L, Cummings T, Müller K, Reppke M, Volkmar M, Weuster-Botz D (2021). Production of β -carotene with *Dunaliella salina* CCAP19/18 at physically simulated outdoor conditions. *Eng Life Sci* 21: 115–125.
- Zacarias L, Cronje PJ, Palou L (2020) “Postharvest technology of citrus fruits.” *The Genus Citrus* (eds Talon M, Caruso M, Gmitter FG). Woodhead Publishing, Sawston, pp. 421–446.
- Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ (2014) Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Meas* 94: 909–950.

粒子形状の異なる ZnO 光触媒の合成と評価

成田唯人¹⁾、西健斗¹⁾、松山達²⁾、井田旬一^{2)*}

1) 創価大学大学院理工学研究科 〒192-8577 東京都八王子市丹木町 1-236

2) 創価大学理工学部 〒192-8577 東京都八王子市丹木町 1-236

Synthesis and characterization of ZnO photocatalyst with different morphologies

Yuito Narita¹⁾, Kento Nishi¹⁾, Tatsushi Matsuyama²⁾, Junichi Ida^{2)*}

2) *Graduate School of Science and Engineering, Soka University, 1-236 Tangi-machi, Hachioji, Tokyo 192-8577, Japan*

3) *Faculty of Science and Engineering, Soka University, 1-236 Tangi-machi, Hachioji, Tokyo 192-8577, Japan*

* *Corresponding author: ida@soka.ac.jp*

2022年4月29日受付, 2022年5月16日受理

Abstract In recent years, pollution by persistent organic pollutants (POPs) is becoming one of the severe environmental issues which cause damage to human health. Currently, although ozone treatment has been employed for POPs removal as an advanced treatment, it has disadvantages of high costs and production of harmful byproducts. Photocatalysts have been attracting attention as one of the innovative POPs removal methods. The photocatalyst is a semiconductor that triggers an oxidation-reduction reaction by light exposure on the particle surface and can achieve mineralization of pollutants. Although TiO₂ is a typical photocatalyst, ZnO has also attracted attention because of its low costs. Many researchers reported synthesis and characterization of various ZnO particles with different particle shapes and morphologies using different synthesis methods. However, comparison of their photocatalytic activity under the same experimental condition is very limited.

Therefore, in this study, we synthesized three different ZnO particles with different particle shapes and morphologies, such as flower-like, multi-shell and rod-like, and compared their particle properties and photocatalytic activities for the same degradation target compound under the same degradation condition. Samples were synthesized by a solvothermal method using Zn(NO₃)₂·6H₂O as raw material. The particle shape was controlled by adding appropriate structure-directing agents. The flower-like, multi-shell and rod-like samples were synthesized by adding hexamethylenetetramine, L(-)-proline and ethanolamine, respectively. The photocatalytic activity was evaluated by degrading 2,4-dinitrophenol (DNP) as a model POPs.

Morphologies of the resulting samples were observed by a scanning electron microscope. Based on the SEM observation, it was confirmed that flowerlike, multi-shell and rodlike samples were obtained as expected. The result of X-ray diffraction (XRD) shows that the peaks at $2\theta = 31^\circ, 34^\circ, 36^\circ, 48^\circ, 57^\circ, 63^\circ, 68^\circ$, and 69° can be attributed to ZnO. This result indicates

that ZnO is successfully obtained by all the synthesis methods. The results also showed that the intensity of the strongest diffraction peak of the three samples varies depending on the ZnO samples in the following order: flower-like < multi-shell < rod-like, and the rod-like sample showed a significantly strong peak intensity among the samples (approximately 15 times larger than that of the flowerlike).

On the other hand, the BET specific surface area exhibited a different order: rod-like < multi-shell < flower-like, and the surface area of the flower-like ZnO was more than 5 times larger than that of the other two samples. These results showed that the strongest peak intensity in XRD measurement and the specific surface area for the three samples are in a trade-off relationship. Finally, photocatalytic activity tests were carried out using 10 ppm DNP under UV light irradiation. The DNP is widely used as an indicator of the photocatalytic activity. The treated water was sampled periodically, and the DNP concentration change as a function of time was determined by measuring the absorption at 357 nm with a UV-vis spectrophotometer. It was found that the DNP degradation fitted the first-order kinetics well for all the samples and the degradation rate was in the following order: rod-like < multi-shell < flower-like. This order is similar to the order for the specific surface area and opposite to that of the strongest peak intensity. The results suggest that the highest photocatalytic activity for DNP degradation was in the flower-like shape where ZnO contributes a very high specific surface area and not by crystallinity of ZnO.

Keywords: Persistent organic pollutants, Photocatalyst, Wastewater treatment, Zinc Oxide

1. 緒 言

近年、生活排水や工場排水などに含まれる残留性有機汚染物質 (POPs: Persistent Organic Pollutants) による水質汚染が問題となっている。POPs とは、環境残留性や生物蓄積性、長距離移動性があり、人の健康や環境への有害性が懸念される物質のことを指し(梶原・松神 2021)、ストックホルム条約によって国際的に規制されていることから、適切な処理が求められる。

現在、排水中の POPs の処理方法として、オゾン酸化法がよく用いられている。オゾンは強力な酸化剤としてはたらくことで、着色や異臭の原因となる有機化合物や病原菌を酸化分解することができる(海賀 2008)。その一方、オゾン処理による消毒副生成物の発生が問題となっている。消毒副生成物とは、オゾンが水中の有機物と反応することにより非意図的に生成する物質のこ

とである(細田・勢川 2021)。代表的な消毒副生成物としてカルボニル化合物、カルボン酸が知られており、中でもホルムアルデヒドはわが国で規制の対象となっている。また、原水に臭化物イオンが含まれる場合には臭素酸イオンが生成し、非常に制御が困難な副生成物とされている(伊藤・越後 2008)。

そこで近年、太陽光を利用でき、有害な副生成物を生じないクリーンな POPs 処理技術の一つとして光触媒が注目されている。光触媒とは、光を吸収することで酸化還元反応を引き起こす半導体材料である。1972 年に本多・藤嶋効果が発見されて以降、水分解や CO₂ 還元といった人工光合成の実現を目指し、光触媒に関する研究が活発化した。本多・藤嶋効果とは、酸化チタン電極と白金電極を電解質溶液に浸し、酸化チタン電極に光を照射すると水が分解され、酸化チタン電極から酸素が、白金電極から水素が発生する現象である

(Fujishima & Honda 1972)。さらに、酸化チタンを用いた不均一系光触媒反応による酢酸の分解 (Kraeutler & Bard 1978) やトリクロロエチレンの分解 (Pruden & Ollis 1983) が報告され、有機物分解への応用が見出された。現在では、メチレンブルーのような合成染料 (Muhammad et al. 2021) や 2,4-ジニトロフェノールのような POPs (Bashir et al. 2019) など、構造が複雑な有機化合物を分解対象として研究が行われており、排水処理の実用化に向けた期待が高まっている。

光触媒による水中の有機物分解反応は以下のように進行する (Fig. 1)。まず、光触媒がバンドギャップエネルギーに相当する光を吸収することで励起電子 e^- 、および正孔と呼ばれる正電荷 h^+ が生じる。励起電子は水中の溶存酸素を還元し、スーパーオキシドアニオンラジカル $\cdot O_2^-$ を生成する。一方、正孔は水と反応して水酸ラジカルを生じる。これらのラジカルが強力な酸化剤としてはたらき、有機化合物を酸化分解する (大谷 2005)。

近年、酸化チタンに替わる低コストな光触媒として、酸化亜鉛 (ZnO) の研究が進んでいる。 ZnO 光触媒の合成は、粒子径を制御しやすく、結晶化度の高い粒子を容易に得られることから、ソルボサーマル法がよく用いられている。ソルボサーマル法とは、前駆体溶液をス

テンレス製オートクレーブに入れて加熱することで、高温高圧下で結晶を形成する方法である。また、溶媒が水の場合は特に水熱合成法と呼ばれる。これまで、構造制御剤を用いたソルボサーマル合成によって、さまざまな粒子形状の ZnO 光触媒が合成されている。Qu らは、ヘキサメチレンテトラミンを添加することでナノフラワー型 ZnO を合成し、抗生物質であるシプロフロキサシンの分解に用いた (Qu et al. 2020)。Chen らは、アミノ酸の一種である N-アセチル-d-プロリンを添加することでマルチシェル型 ZnO を合成し、一酸化窒素の酸化に用いた (Chen et al. 2018)。Wang らは、アミノエタノールを添加することでロッド型 ZnO を合成し、合成染料であるメチレンブルーの分解に用いた (Wang et al. 2011)。しかし、これら複数の研究の間では、反応に用いる光源や ZnO の濃度、分解対象物は統一されておらず、

粒子形状による光触媒活性の違いを単純に議論することはできない。そこで本研究では、粒子形状の異なる 3種の ZnO (ナノフラワー型、マルチシェル型、ロッド型) をそれぞれソルボサーマル合成し、2,4-ジニトロフェノールを分解対象物として統一された実験条件でそれらの光触媒活性を比較検討することを目的とした。

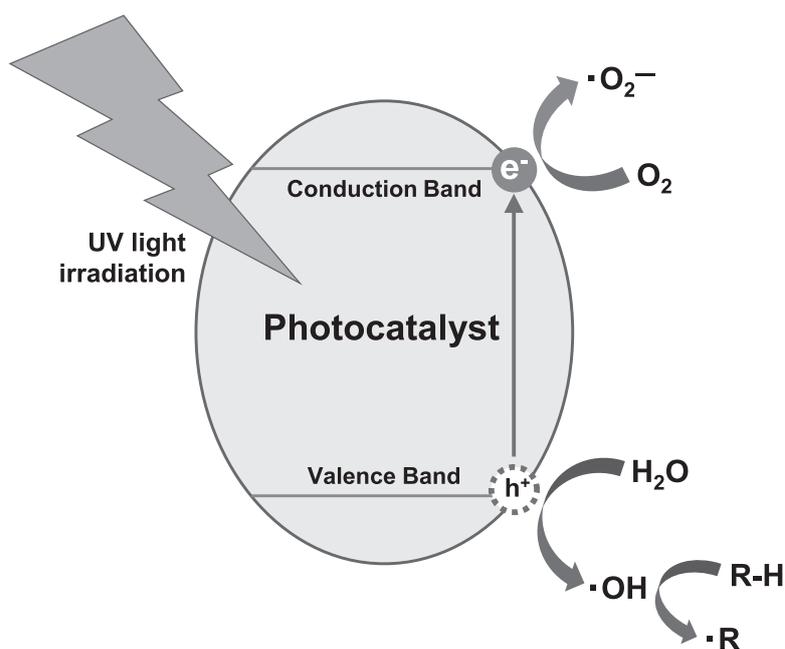


Figure 1. Mechanism of organic compounds degradation by photocatalyst.

2. 材料と方法

2.1. 材料

硝酸亜鉛六水和物 (和光特級)、水酸化ナトリウム (試薬特級)、ヘキサメチレンテトラミン (試薬特級)、L (-) - プロリン (試薬特級) は富士フィルム和光純薬株式会社から購入したものを使用した。エタノールアミン (99.0%) は東京化成工業株式会社から購入した。メタノール (試薬特級)、2,4-ジニトロフェノール (ナカライ規格特級) はナカライテスク株式会社から購入したものを使用した。いずれの試薬も精製を行うことなくそのまま使用した。

2.2. 粒子形状の異なる ZnO の合成

2.2.1. ナノフラワー型 ZnO の合成

ナノフラワー型 ZnO は、Qu らの報告を参考に合成した (Qu et al. 2020)。まず、硝酸亜鉛六水和物 0.335 g とヘキサメチレンテトラミン 0.158 g を超純水 37.5 mL に溶解した。その後、溶液を 550 rpm で磁気攪拌しながら 0.6 M 水酸化ナトリウム水溶液を 18.8 mL 滴下した。そのまま 10 分間攪拌を続けた後、懸濁液を 100 mL オートクレープ (TAF-SR100、耐圧硝子工業) に移し、100 °C で 13 時間、水熱合成した。加熱終了後、室温まで放冷し、得られた懸濁液を 3000 rpm で 30 分間遠心分離することにより粒子を回収した。回収試料を超純水で 2 回洗浄後、80 °C で 12 時間乾燥させ、ナノフラワー型 ZnO を得た。

2.2.2. マルチシェル型 ZnO の合成

マルチシェル型 ZnO は Chen らの報告を参考に合成した (Chen et al. 2018)。まず、硝酸亜鉛六水和物 0.258 g と L (-) - プロリン 0.196 g をメタノール 40.0 mL に溶解し、550 rpm で 20 分間磁気攪拌した。溶液を 100 mL オートクレープに移し、150 °C で 48 時間、ソルボサーマル合成した。得られた懸濁液を 3000 rpm で 30 分間遠心分離することにより粒子を回収し、超純水で 2 回洗浄した。得られた粒子を 80 °C で 12 時間乾燥した後、マッフル炉 (KDF S7、デンケン) を用いて空気中で昇温速

度 1 °C min⁻¹、最高温度 600 °C、保持時間 4 時間で焼成し、マルチシェル型 ZnO を得た。

2.2.3. ロッド型 ZnO の合成

ロッド型 ZnO は Wang らの報告を参考に合成した (Wang et al. 2011)。まず、硝酸亜鉛六水和物 0.595 g とエタノールアミン 10.0 mL を超純水 40.0 mL に溶解した。その後、溶液を 550 rpm で磁気攪拌しながら 0.8 M 水酸化ナトリウム水溶液 30.0 mL を滴下した。溶液を 100 mL オートクレープに移し、140 °C で 12 時間、水熱合成した。得られた懸濁液を 3000 rpm で 30 分間遠心分離することにより粒子を回収し、その後、超純水で 2 回洗浄した。最後に試料を 80 °C で 12 時間乾燥させ、ロッド型 ZnO を得た。

2.3. 特性評価

X 線回折装置 (XRD、D8 Advance、Bruker) を用いて試料の結晶構造解析を行った。40 kV、40 mA で CuK α 線 (0.154021 nm) を発生させ、 $2\theta = 20 \sim 80$ deg. の測定範囲、0.05 deg. のステップ幅、0.5 deg. s⁻¹ の走査速度で回折線を検出した。

走査型電子顕微鏡 (FE-SEM、JSM-7500M、JEOL) を用い、試料の表面観察を行った。試料表面に加速電圧 5 ~ 15 kV、エミッション電流 10 μ A で電子線を照射し、二次電子を検出した。

比表面積・細孔分布測定装置 (ASAP 2020、島津製作所) を用いて試料の比表面積を測定した。セル内の試料を 200 °C で 2 時間加熱することで脱ガス処理した後、-195.8 °C における窒素の吸着等温線を測定した。その後、Brunauer-Emmett-Teller (BET) 多点法による解析により比表面積 S (m² g⁻¹) を決定した。また、式 (1) を用いて BET 径 D (μ m) を算出した。

$$D = \frac{6}{\rho S} \quad (1)$$

ρ は試料の密度 (g cm⁻³) を示す。

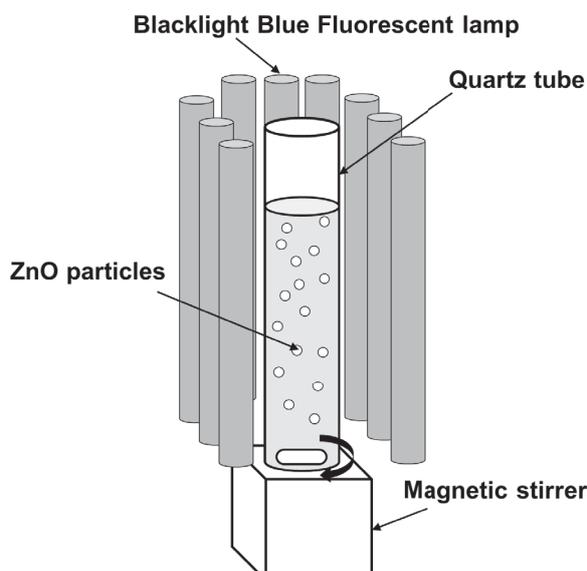


Figure 2. Reactor diagram for evaluation of photocatalytic activity.

2.4. 光触媒活性評価

2,4-ジニトロフェノール (DNP) を POPs のモデル物質として用い、Fig. 2 に示した実験装置で分解実験を行った。DNP は黒色染料の原料や重合防止剤として化学工業分野で広く用いられている。また、DNP 溶液は黄色を呈し、濃度変化を分光学的手法で測定可能なことから、光触媒研究における分解対象物としてよく用いられている。分解経路の解析も行われており、光触媒による DNP 分解の安全性が確かめられている (Aslam et al. 2014)。

光源には波長域 300 ~ 440 nm、6 W のブラックライト蛍光灯 (FL6BLB/N、東芝) を 9 本用いた。まず、10 ppm の DNP 溶液 50 mL に試料 0.06 g を超音波分散させた。その後、暗所で 30 分間攪拌することで試料表面と DNP との吸着平衡とした後、光照射を開始した。一定時間ごとに試料をサンプリングし、紫外可視分光光度計 (V-650、JASCO) を用いて波長 357 nm における吸光度を測定した。

分解反応を一次反応と仮定し、式 (2) を用いて反応速度定数 k (min^{-1}) を決定した。

$$k = -\ln\left(\frac{c_t}{c_0}\right) \quad (2)$$

c_0 は初濃度 (ppm)、 c_t は照射時間 t における濃度 (ppm) を示す。

3. 結果

3.1. 結晶構造解析

ソルボサーマル合成により得られた三種類の試料の X 線回折パターンを Fig. 3 に示した。全ての試料で ZnO のリファレンスパターンと一致し、不純物を含むことなく ZnO が合成されていた。

ナノフラワー型、マルチシェル型、ロッド型 ZnO の結晶化度はそれぞれ 71.1%、77.1%、90.6%、また、結晶子径はそれぞれ 30.2 nm、41.7 nm、79.4 nm であった。最強線ピークの結晶面は、ナノフラワー型、マルチシェル型 ZnO が (101) 面、ロッド型 ZnO が (100) 面であった (Table 1)。また、(100) 面と (101) 面のピーク強度比 R (100) / (101) はナノフラワー型が 0.74、マルチシェル型が 0.59、ロッド型は 11.45 であった。

3.2. 表面観察

ナノフラワー型 ZnO は、シート状の一次粒子が集まることで粒子径約 $1 \mu\text{m}$ 程度の花のような二次粒子を形成

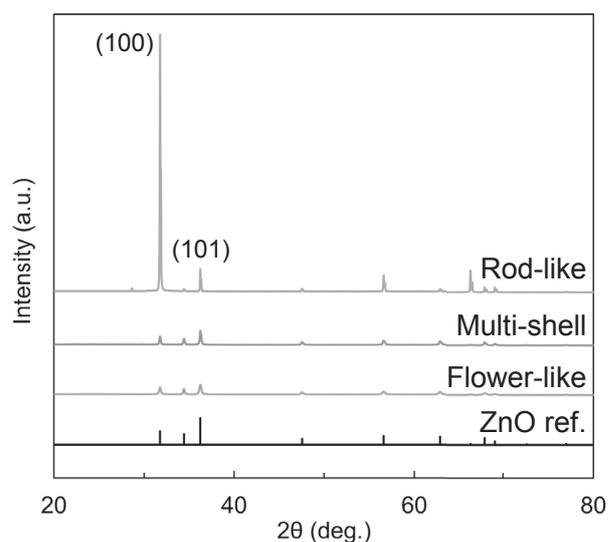


Figure 3. X-ray diffraction pattern of ZnO samples with difference morphologies.

Table 1. Crystallinity, crystallite diameter and crystal face of the strongest peak for ZnO samples with difference morphologies.

Samples	Crystallinity (%)	Crystallite diameter (nm)	Crystal face of strongest peak	R(100)/(101)
Flower-like	71.1	30.2	(101)	0.74
Multi-shell	77.1	41.7	(101)	0.59
Rod-like	90.6	79.4	(100)	11.45

していた (Fig. 4a)。マルチシェル型 ZnO は、100 nm 程度の球状一次粒子が集まって直径約 1 ~ 2 μm の球状二次粒子を形成していた。球状二次粒子は一部、最外殻が欠けている粒子が観察され、少なくとも 2 層のシェルを形成していることが確かめられた (Fig. 4b)。ロッド型 ZnO は、15 μm 程度の棒状粒子が形成されていた (Fig. 4c)。先端は尖っており、側面は複数の平面から成っている様子が観察された。以上より、全ての試料で調製法を参考にした論文と同様の形態が観察でき、目的の形状の ZnO 粒子が合成できたことが確認された。

3.3. 試料の比表面積測定

ナノフラワー型、マルチシェル型、ロッド型 ZnO の比表面積はそれぞれ 7.57 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ 、1.31 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ 、0.89 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ であった。また、BET 径はそれぞれ 0.14 μm 、0.81 μm 、1.21 μm であった。

3.4. 光触媒活性評価

調製した粒子形状の異なる各 ZnO 試料を用い、UV

光照射下で行なった 2,4-ジニトロフェノール (DNP) 分解実験の結果を Fig. 5a に示した。ナノフラワー型 ZnO を用いた分解実験では、反応時間 60 分で DNP をほぼ完全に分解した。一方、マルチシェル型およびロッド型 ZnO を用いた実験での DNP 分解率は、60 分後でそれぞれ約 78 %、60 % であった。

続いて、DNP の濃度変化の片対数プロットを Fig. 5b に示した。全ての試料において良好な直線関係が得られたことから、ZnO 光触媒による DNP 分解が一次反応であることが明らかとなった。また、光触媒活性はしばしば反応速度定数で議論される。ナノフラワー型、マルチシェル型、ロッド型 ZnO の反応速度定数はそれぞれ 0.0624 min^{-1} 、0.0259 min^{-1} 、0.0151 min^{-1} であった (Table 2)。

4. 考察

一般に、光触媒活性は粒子の比表面積と結晶化度によって左右される。なぜなら、比表面積の増大に伴い吸

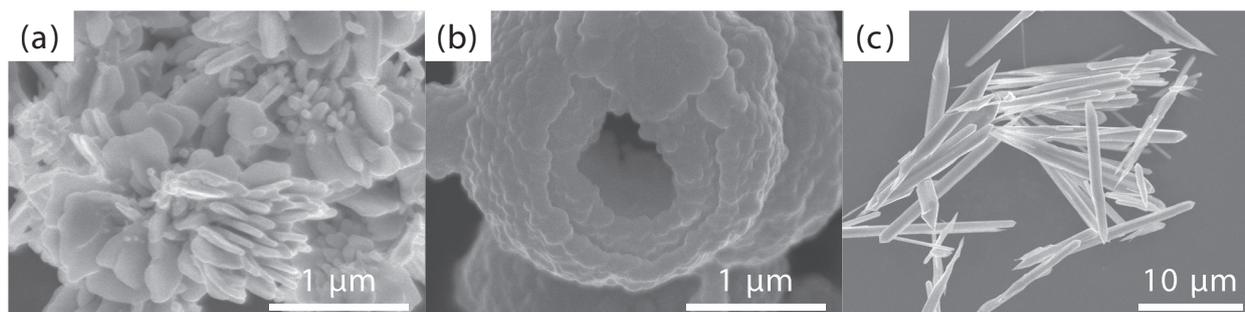


Figure 4. SEM images of (a) flower-like, (b) multi-shell and (c) rod-like ZnO particles.

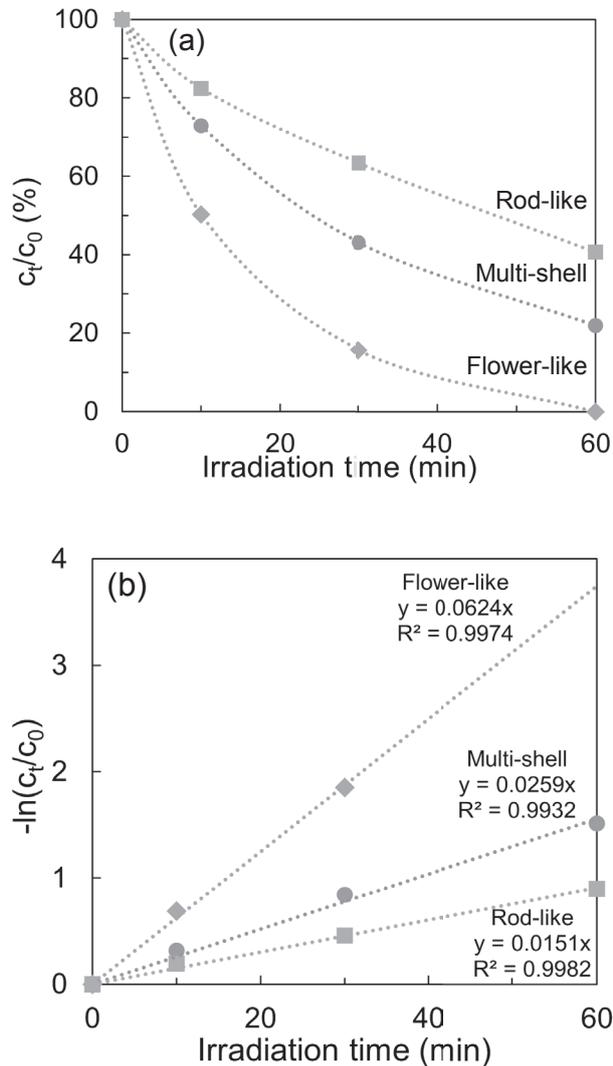


Figure 5. (a) The concentration changes and (b) the first order kinetic constants for DNP degradation by each sample.

収光束が増えること、また、分解対象物の吸着サイトが増えることで反応速度が向上するためである。一方で、結晶化度は量子収率に影響を与える。ここでの量子収率とは、光触媒粒子が吸収した光子のうち、反応に用いられた光子の割合を意味する。結晶化度が高い粒子は励起電子と正孔の再結合中心が少ないため、量子収率が向上する。したがって、一般的には比表面積と結晶化度が高い粒子ほど光触媒活性が大きくなると言われているが、用いる光触媒の材料や合成法、分解対象物質などによりどちらがより光触媒活性に影響する

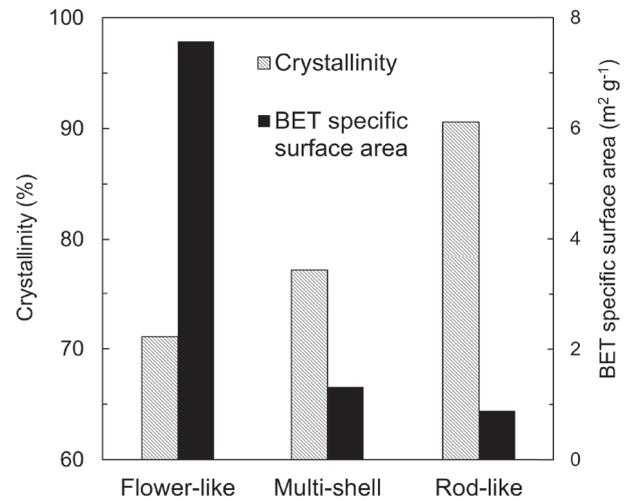


Figure 6. Relationship between crystallinity and BET specific surface area for each sample.

かは異なってくる。

Fig. 6 に示したように、本研究で合成した3つの試料の間では、粒子の結晶化度と比表面積はトレードオフの関係にあることが明らかとなった。この結果を光触媒活性の関係を比較すると、光触媒活性はナノフラワー型、マルチシェル型、ロッド型の順に高く、比表面積の順と一致し、結晶化度の傾向とは逆の傾向を示していることがわかる。このことから、ZnO 光触媒における活性への寄与は、本実験の範囲内では結晶化度よりも比表面積の方が大きいと考えられる。ここで、ZnO の光触媒活性は比表面積が $50 m^2 g^{-1}$ 程度を超えると頭打ちになることが報告されている (橋本ら 2013)。本研究で合成した3つの試料の比表面積はいずれも $50 m^2 g^{-1}$ を大きく下回るため、比表面積による寄与が大きいと考えられる。

また粒子径・結晶子径比から、1つの ZnO 粒子を構成する単結晶の量を評価することができる。1つの ZnO 粒子を構成する単結晶の量の増加は、結晶粒界の増加を意味する。結晶粒界は、励起電子と正孔の再結合中心として作用する格子欠陥を生じる (橋本ら 2013) ため、光触媒活性の低下を招くことが知られている。ナノフラワー型、マルチシェル型、ロッド型 ZnO の粒子径・結晶子径比はそれぞれ 4.7、19.5、15.2 であった。ナ

活性を示した。

以上より、ナノフラワー型 ZnO は高比表面積、かつ電荷分離性能に優れるという特徴を持ち、高い光触媒活性を有することが分かった。さらに、3つの試料の中で最も低温で合成できること、調製時に有機溶媒が不要であることから、グリーンケミストリーの観点からも優れた材料であると言える。また、光触媒の粒子形状は、結晶化度や比表面積などの粒子特性を左右する大きな要因の一つであり、光触媒開発における粒子形状制御の重要性が示された。

5. 結論

本研究では、3種の構造制御剤を用いたソルボサーマル合成により、ナノフラワー型、マルチシェル型、ロッド型の ZnO 光触媒を合成し、粒子特性および光触媒活性を比較した。得られた粒子の特性評価の結果、異なる構造制御剤を用いることで、粒子形状とそれに大きく影響される BET 比表面積、および結晶化度など、性状の異なる種々の ZnO を調製することができた。結晶化度はロッド型、マルチシェル型、ナノフラワー型の順に大きく、一方で、BET 比表面積はナノフラワー型、マルチシェル型、ロッド型の順に大きかった。この結果より、本研究で調製した3種の ZnO は、結晶化度と BET 比表面積はトレードオフの関係にあることが示された。また XRD の測定結果から、ロッド型のみ、(100)面と(101)面のピーク強度比である $R(100)/(101)$ が非常に大きく、(100)面だけが特異的に成長していることがわかった。

得られた各種形状の ZnO を用いて DNP 分解により光触媒活性を評価した結果、活性はナノフラワー型、マルチシェル型、ロッド型の順に大きく、BET 比表面積の傾向と一致した。また、ロッド型は結晶面の強度が(100)面に偏っていたことも活性が低い要因と考えられた。以上の結果より、ZnO を用いた DNP 分解反応においては、ナノフラワー型形状のものが最も適していることが示された。ただ一般に、比表面積の大きい

粒子は粒子径が小さいことから、水処理後に固液分離で光触媒粒子を回収・再利用することが困難となる。そのため、高比表面積を有しながら、回収および再利用可能な光触媒を開発することが今後の課題となる。

引用文献

- Al-Arjan WS, Al-Saeed S, Nazir S, Da'na E (2022) Synthesis of porous chlorophyll coated SiO₂/Fe₃O₄ nanocomposites for the photocatalytic degradation of organic pollutants. *React Kinet Mech Catal* 135: 555–570.
- Alturiqi AS, Al-Farraj ES, Anazy MM, Ammar RA (2021) Fabrication and characterization of reduced graphene oxide with silver nanoparticles and its utilities for enhancing photodegradation of 2,4-dinitrophenol compound. *Appl Nanosci*: doi.org/10.1007/s13204-021-02017-w.
- Aslam M, Ismail IMI, Almeelbi T, Salah N, Chandrasekaran S, Hameed A (2014) Enhanced photocatalytic activity of V₂O₅-ZnO composites for the mineralization of nitrophenols. *Chemosphere* 117: 115–123.
- Bashir H, Yi X, yuan J, Yin K, Luo S (2019) Highly ordered TiO₂ nanotube arrays embedded with g-C₃N₄ nanorods for enhanced photocatalytic activity. *J Photochem Photobiol, A* 382:111930.
- Chen X, Zhang H, Zhang D, Miao Y, Li G (2018) Controllable synthesis of mesoporous multi-shelled ZnO microspheres as efficient photocatalysts for NO oxidation. *Appl Surf Sci* 435: 468–475.
- Fujishima A, Honda K (1972) Electrochemical Photolysis of Water at a Semiconductor Electrode. *Nature* 238: 37–38.
- 橋本恭邦・坂下 優・高津淑人・日高重助 (2013) 粒子特性の制御が酸化亜鉛の光触媒活性に及ぼす影響. *粉体工学会誌* 50: 19–27.
- 細田 耕・勢川利治 (2021) 京都市の下水処理放流水の消毒副生成物特性. *水環境学会誌* 44: 103–114.
- 伊藤禎彦・越後信哉 (2008) 水の消毒副生成物. 技報堂出版, 東京, 45–48 pp.
- 海賀信好 (2008) オゾンと水処理. 技報堂出版, 東京, 17 pp.

Table 2. Comparison of DNP degradation rate for various photocatalysts.

Sample	Light source	Reaction rate constant (10^{-3} min^{-1})	Reference
Flower-like ZnO	UV (6W Black light blue fluorescent lamp \times 9)	62.4	This study
Multi-shell ZnO	UV (6W Black light blue fluorescent lamp \times 9)	25.9	This study
Rod-like ZnO	UV (6W Black light blue fluorescent lamp \times 9)	15.1	This study
Commercial ZnO ¹⁾	UV (500W tungsten halogen lamp)	2.12	Vora et al., 2009
Y ₂ O ₃ -ZnO	UV (500W xenon lamp)	16.4	Su et al., 2014
Ag/rGO ²⁾	UV (11W mercury lamp \times 6)	45	Alturiqui et al., 2021
MWCNTs/TiO ₂ ³⁾	Solar	62.1	Wang et al., 2009
SiO ₂ /Fe ₃ O ₄	Visible light (50W LED lamp)	8.19	Al-Arjan et al., 2022

1) Purchased from Merck.

2) rGO: Reduced graphene oxide.

3) MWCNTs: Multi-walled carbon nanotubes.

ノフラワー型 ZnO の値が他の試料に比べて圧倒的に小さいことから、比表面積に加え、結晶粒界の少なさもノフラワー型の高い光触媒活性の要因の一つであることが示唆された。

さらに ZnO は結晶面によって価電子帯と伝導帯の位置が異なることから、二つの異なる結晶面の界面でヘテロ接合が生じ、再結合が抑制されると言われている (Liu et al. 2019)。ロッド型 ZnO は (100) 面と (101) 面のピーク強度比である $R(100) / (101)$ が非常に大きく、(100) 面だけが特異的に成長していると言える。すなわち、ロッド型 ZnO では異なる結晶面の界面が少なく、電荷分離性能が他の試料より劣ることが示唆され、そのことも光触媒活性が低い要因の一つであると考えられた。

種々の光触媒による DNP 分解反応の速度定数を

Table 2 に示した。本研究のノフラワー型 ZnO は、不定形粒子である市販の ZnO (Vora et al. 2009) と比較して、低出力の光源を用いながら 30 倍近く高い光触媒活性を有することが分かった。また ZnO 以外にも、DNP 分解における電荷分離性能の向上のために、二種の金属酸化物を複合化した Y₂O₃-ZnO (Su et al. 2014) や、金属ドープ光触媒の一種である Ag/rGO (Alturiqui et al. 2021) が開発されている。さらに、高比表面積を得るため、TiO₂ に多層カーボンナノチューブ (MWCNTs: Multi-walled carbon nanotubes) を複合させた光触媒 (Wang et al. 2009) や、メソポーラスシリカを担体として利用した SiO₂/Fe₃O₄ (Al-Arjan et al. 2022) が開発され、DNP 分解に用いられているが、本研究のノフラワー型 ZnO はいずれの光触媒よりも高い

- 梶原夏子・松神秀徳 (2021) 新規 / 候補 POPs (PCNs, HCB, HBCDD, PFAS) 含有廃棄物処理の現状と今後の課題. 廃棄物資源循環学会誌 32: 8–27.
- Kraeutler B, Bard AJ (1978) Heterogeneous photocatalytic synthesis of methane from acetic acid - new Kolbe reaction pathway. *J Am Chem Soc* 100: 2239–2240.
- Liu Y, Huang D, Liu H, Li T, Wang J (2019) ZnO tetraikadecahedrons with coexposed {001}, {101}, and {100} facets: shape-selective synthesis and enhancing photocatalytic performance. *Cryst Growth Des* 19: 2758–2764.
- Muhammad ID, Rida K, Jawayria N, Zaib H (2021) Fundamentals and photocatalysis of methylene blue dye using various nanocatalytic assemblies- a critical review. *J Clean Prod* 298: 126567.
- 大谷文章 (2005) 光触媒標準研究法. 東京図書, 東京, 46–50 pp.
- Pruden AL, Ollis DF (1983) Photoassisted heterogeneous catalysis: The degradation of trichloroethylene in water. *J Catal* 82: 404–417.
- Qu Y, Xu X, Huang R, Qi W, Su R, He Z (2020) Enhanced photocatalytic degradation of antibiotics in water over functionalized N,S-doped carbon quantum dots embedded ZnO nanoflowers under sunlight irradiation. *Chem Eng J* 382: 123016.
- Su T, Qin Z, Ji H, Jiang Y (2014) Preparation, characterization, and activity of Y₂O₃-ZnO complex oxides for the photodegradation of 2,4-dinitrophenol. *Int J Photoenergy*: 794057.
- Vora JJ, Chauhan SK, Parmar KC, Vasava SB, Sharma S, Bhutadiya LS (2009) Kinetic study of application of ZnO as a photocatalyst in heterogeneous medium. *J Chem* 6: 531–536.
- Wang H, Wang HL, Jiang WF, Li ZQ (2009) Photocatalytic degradation of 2,4-dinitrophenol (DNP) by multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs)/TiO₂ composite in aqueous solution under solar irradiation. *Water Res* 43: 204–210.
- Wang X, Zhang Q, Wan Q, Dai G, Zhou C, Zou B (2011) Controllable ZnO architectures by ethanolamine-assisted hydrothermal reaction for enhanced photocatalytic activity. *J Phys Chem C* 115: 2769–2775.

25年ぶりに相模湾で発生した円石藻 *Gephyrocapsa oceanica* によるブルーム

矢野光一^{1)*}、梶正彦¹⁾、下出信次²⁾、村上浩³⁾、虎谷充浩⁴⁾、Victor S. Kuwahara¹⁾

1) 創価大学大学院理工学研究科 〒192-8577 東京都八王子市丹木町 1-236

2) 横浜国立大学大学院環境情報研究院附属臨海環境センター 〒259-0202 神奈川県足柄下郡真鶴町岩 61

3) 宇宙航空開発研究機構地球観測研究センター 〒305-8505 茨城県つくば市千現 2-1-1

4) 東海大学建築都市学部土木工学科 〒259-1292 神奈川県平塚市北金目 4-1-1

Coccolithophore *Gephyrocapsa oceanica* Bloom Occurrence in Sagami Bay for the First Time in 25 Years

Koichi Yano^{1)*}, Masahiko Kaji¹⁾, Shinji Shimode²⁾, Hiroshi Murakami³⁾, Mitsuhiro Toratani⁴⁾, Victor S. Kuwahara¹⁾

1) *Graduate School of Science and Engineering, Soka University, 1-236 Tangi-machi, Hachioji, Tokyo 192-8577, Japan*

2) *Manazuru Marine Center for Environmental Research and Education, Graduate School of Environment and Information Sciences, Yokohama National University, 61 Iwa, Manazuru, Kanagawa 259-0202, Japan*

3) *Earth Observation Research Center (EORC), Japan Aerospace Exploration Agency (JAXA), 2-1-1 Sengen, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8505, Japan*

4) *Department of Civil Engineering, School of Architecture and Urban Planning, Tokai University. 4-1-1 Kitakaname, Hiratsuka, Kanagawa 259-1292, Japan*

* *Corresponding author: koichiyano@soka.gr.jp*

2022年4月30日受付, 2022年5月16日受理

Abstract Coccolithophore is one type of phytoplankton that forms calcium carbonate plates called coccoliths, and is relatively diverse with about 200 species in the world's oceans. Coccoliths accumulate in massive calcareous deposits on the sea floor that serve as a sedimentary buffer of ocean chemistry and are also a major long-term carbon storage that has a significant impact on the global carbon cycle and climate. Coccolithophores are also a major producer of dimethyl sulfide (DMS) that is the dominant precursor for cloud condensation nuclei in the marine atmosphere; DMS emissions decrease solar radiation due to increasing cloud cover. Coccolithophores play an important role in biogeochemical cycles in the ocean by influencing the oceanic uptake of atmospheric carbon dioxide, and producing calcium carbonate sediments and DMS. Coccolithophores often bloom on massive scales. Around the Japan archipelago, coccolithophore blooms have also been reported; a *Gephyrocapsa oceanica* bloom in Tokyo Bay and Sagami Bay (1995) and Hakata Bay (2004, 2007, 2008), and a *Emiliana huxleyi* bloom in Suruga Bay (2007). In mid-May 2020, a massive bloom of coccolithophores were observed in Sagami Bay, Japan,

possibly for the first time in 25 years. The bloom was initially observed by the JAXA, GCOM-C ocean color remote sensing satellite “*Shikisai*” capturing a vast emerald green reflectance image in the bay. Researchers who received the report immediately conducted *in situ* observations, and found that coccolithophores caused the massive bloom. Coccolithophore is a common yet elusive group in the waters around Japan, and there has only been one report of a bloom observation in Sagami Bay. This study shows the characteristics of the coccolithophore bloom observed in Sagami Bay in 2020 and also reports on the marine environment during the bloom. Water temperature, salinity, nutrients, chlorophyll *a*, and cell density were collected from field samples. Satellite ocean color data was provided by “*Shikisai*”. Satellite images on May 13 and 17 in 2020 show that the bloom spread counterclockwise due to counterclockwise coastal currents in Sagami Bay. The species, *Gephyrocapsa oceanica*, was confirmed using light microscopy and a scanning electron microscope, and was the same species that occurred in 1995. Chlorophyll *a* concentration and cell density at the surface were $1.2 \mu\text{g L}^{-1}$ and $9.0 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$, respectively. NO_2^- and NO_3^- concentrations at the surface during the bloom were $0.10 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $1.83 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively, which were relatively higher than previous years. The results suggest that one of the causes of coccolithophore bloom is the relatively high concentration of inorganic nitrogen. Previous studies of prokaryotic and eukaryotic community structure in the coastal areas of Sagami Bay using genetic analysis have reported occurrence of haptophytes and the occurrence of coccolithophores throughout the year. These results suggest that coccolithophores are frequently present in Sagami Bay and form massive blooms in a short time period if environmental conditions are favorable. Further investigation including culture experiments are needed to resolve the details and specific causes.

Keywords: coccolith, haptophytes, remote sensing, spatial variability

1. はじめに

円石藻は炭酸カルシウムからなる円石 (Coccolith) をもつ植物プランクトンの1グループで、ハプト藻に分類される。三畳紀後期から海洋プランクトン群集の重要な構成要素をなしており、約200種の現生種が確認されている (Bown et al. 2004, Hay 2004, Young et al. 2005)。円石藻による円石の形成過程では二酸化炭素が発生する一方、円石は石灰質の堆積物として海底に蓄積され、海洋化学における炭素の堆積バッファーとしての役割を果たすとともに、全球的な炭素循環や気候に大きな影響を与える炭素貯蔵源となっている (Iglesias-Rodriguez et al. 2002, Balch 2004)。円石藻は、表層における一次生産の1–10%、

外洋における炭酸カルシウム堆積物生成の50%に寄与していると推定されている (Poulton et al. 2007, Broecker & Clark 2009)。また同時に、硫黄化合物であるジメチルスルフィド (DMS) の生成者としても知られている。DMSは雲の凝集核となることから、円石藻の増殖によるDMSの生成は、雲量の増加による日射量の減少を引き起こす (Brown & Yoder 1994)。以上のように円石藻は、大気中の二酸化炭素を海洋へと取り込み、炭酸カルシウム堆積物およびDMSを生成することによって、炭素の生物化学循環に重要な役割を果たしていると考えられている。

円石藻はしばしば巨大なブルームを引き起こすことで有名である。その際、円石による高い反射特性により、ブルーム時には海が白く濁る。「白潮」と呼ばれるこの現象

は、人工衛星から度々確認されており、日本近海においてもその発生状況が報告されてきた。これまで、東京湾・相模湾（1995年）、博多湾（2004・2007・2008年）では *Gephyrocapsa oceanica*、駿河湾（2007年）では *Emiliana huxleyi* によるブルームが発生したことが知られている（小倉・佐藤 2001, 池田 2007, 萩原ほか 2011）。

2020年5月中旬、相模湾において大規模な円石藻のブルームが観測された。この現象は、まず宇宙航空開発研究機構（JAXA）の気候変動観測衛星「しきさい」によって捉えられ、海色がエメラルドグリーンに変化した湾内の様子が認められた。これを受け、現場観測を実施したところ、海色の変化は円石藻のブルームによるものであることが判明した。これまで相模湾において円石藻ブルームの観測が報告されたのは1995年の1件のみであることから、25年ぶりに同海域で円石藻がブルームを起こしたと考えられる（小倉・佐藤 2001）。

本研究では、1995年の報告から25年ぶりに相模湾において観測された円石藻ブルームの特徴を明らかにすることを目的として、ブルーム時の海洋環境についての調査結果を報告する。

2. 材料と方法

調査は、横浜国立大学の実習船「たちばな」によって、

海色の変化が沿岸部まで広がった2020年5月15日に、相模湾真鶴半島沖 St. 550 (35° 09' 938N 139° 10' 777E) で行った (Fig. 1)。

2.1 水質調査項目と手法

水温と塩分は、CTDセンサー（Ocean Seven 316, Itronaut S.R.L.）を使って鉛直的に測定した。さらに、表層0mと水深5m地点から採水を行い、栄養塩類（ NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SiO_2 ）をオートアナライザー（SWAAT, BLTEC）で測定した。クロロフィル *a* 濃度は、試料を孔径 $0.7 \mu\text{m}$ のガラス繊維濾紙（GF/F 25 mm, Whatman）で濾過後、Zepata et al. (2000) にもとづいてメタノールで抽出し、フォトダイオードアレイ紫外可視分光光度計（SPD-M10A, SHIMAZU）を用いて測定した。

2.2 プランクトンの計数と同定法

プランクトン用試料は、目合い $180 \mu\text{m}$ のナイロンメッシュで船上にて濾過した採水試料から1Lを分取し、0.5%中性海水ホルマリンで固定した。この試水を静置沈殿させ、サイフォンを使って濃縮し、均一化した後、0.1 mLを分取してマス目合計400区画の計数盤に滴下して光学顕微鏡下で細胞数を計数した。また、ブルームを起こした円石藻の同定のために、走査型電子顕微

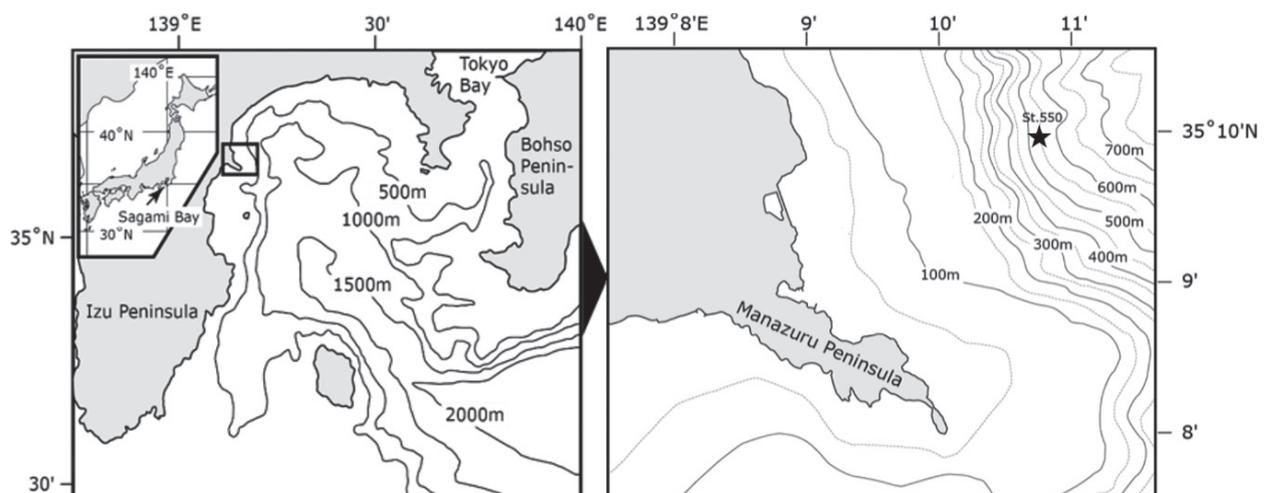


Figure 1. Map of the Pacific western boundary coastal region of Japan, bathymetry and sampling station (St. 550) in the temperate waters of Sagami Bay.

鏡 (SEM; JSM-7500F, JEOL) を用いた。

2.1 衛星観測

JAXA の気候変動観測衛星「しきさい」によって取得された衛星データを使用した。湾内の RGB 画像を出力するにあたり、海色をより強調するため、Ota et al. (2010) の放射伝達コードで大気分子散乱と透過率を計算して補正した。

3. 結果

3.1 環境要因

調査時には、真鶴半島沖全域において海色がエメラルドグリーンに変化していた。人工衛星からは、5月15日の海況は観測されなかったものの、その前後である5月13日と17日に観測された (Fig. 2)。

2020年5月15日の表層0 mと水深5 m地点における環境要因の結果を Table 1 に示した。また、比較のために1995年5月、東京・相模湾における円石藻ブルーム時の結果も同表に示した。両年の水質を比較すると、水温は同程度であるのに対して、塩分は2020年5月の方がやや高い結果となった。SiO₂ 濃度は1995年5月のデータがないため比較できないが、NO₂⁻・NO₃⁻・

PO₄³⁻ 濃度は2020年5月の方が高かった。また、2020年5月のクロロフィル *a* 濃度は、表層0 mと水深5 m地点でそれぞれ、1.2 μg L⁻¹と1.6 μg L⁻¹であり、1995年5月と比較するとかなり低かった。

3.2 種同定と細胞密度

光学顕微鏡による観察から、ブルームを起こしたのは円石藻であると確認された。さらに、走査型電子顕微鏡を用いて細胞の形状をより詳細に観察したところ、円石の低角から中角に橋を有する特徴が確認されたため、本種は *Gephyrocapsa oceanica* であると同定された (Fig. 3)。円石藻の細胞密度は、表層0 mと水深5 mでそれぞれ、9.0 × 10³ cells mL⁻¹と8.8 × 10³ cells mL⁻¹であった。

4. 考察

人工衛星によるリモートセンシングの強みは、広範囲を時系列に沿って観測できることである。本研究におけるブルームも、まず JAXA の気候変動観測衛星「しきさい」によって捉えられ、その報告を受けて採水を伴う現場観測が実施された。5月13日と17日の衛星画像を比較すると、ブルームは沿岸域を反時計回りに広がった。

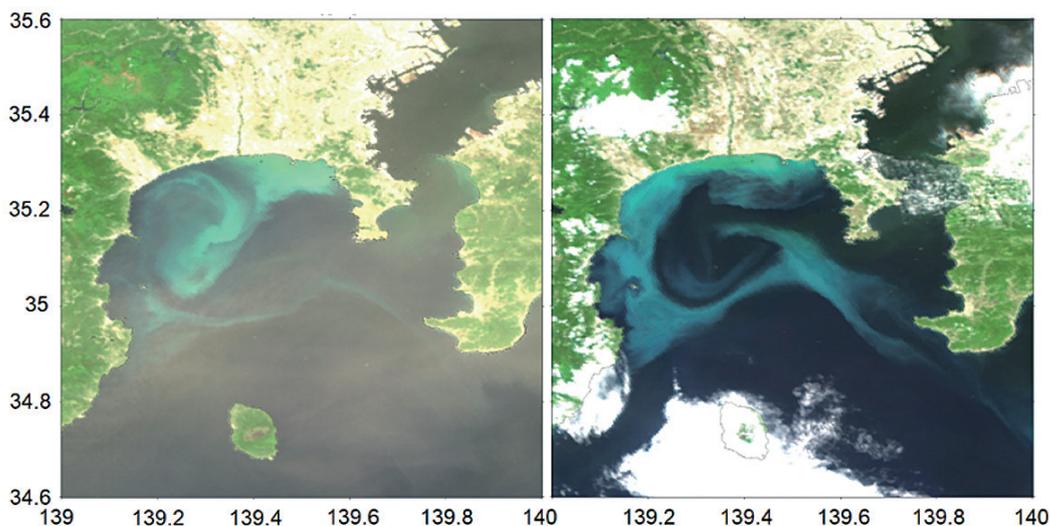


Figure 2. Initial remote sensing ocean color satellite images of the coccolithophore bloom in Sagami Bay on May 13 (left panel) and May 17 (right panel) 2020. The emerald green reflectance signal shows the extent of the bloom.

Table 1. Environmental factors collected from Station 550 during the onset of the coccolithophore bloom in Sagami Bay. Data in 1995 was based on Ogura & Sato (2001).

	May 15 2020	May 15 2020	May 9, 10 1995
	0 m	5 m	0.5 m
Water Temperature (°C)	18.7	18.3	18.7
Salinity	33.3	33.5	29.5
NO ₂ ⁻ (μ mol L ⁻¹)	0.10	0.09	0.05
NO ₃ ⁻ (μ mol L ⁻¹)	1.83	3.98	0.33
PO ₄ ³⁻ (μ mol L ⁻¹)	0.04	0.03	0.02
SiO ₂ (μ mol L ⁻¹)	3.34	5.01	—
Chlorophyll <i>a</i> (μ g L ⁻¹)	1.18	1.60	47.0

これは、相模湾内に存在する同方向の沿岸海流に起因するものだと考えられる（岩田ほか 1980）。

円石藻によるブルームの発生は、日本近海においても度々報告されており、これまでブルームを起こした種は *Emiliania huxleyi* か *Gephyrocapsa oceanica* のどちらかであった（小倉・佐藤 2001, 池田 2007, 萩原ほか 2011）。本研究においても、2020年5月に相模湾でブルームを起こしたのは *G. oceanica* であり、これは1995年5月に東京・相模湾においてブルームを起こした種と同種であった。また、相模湾という同一海域であっても、1995年5月の表層水における円石藻の細胞密度の最高値は、 1.5×10^5 cells mL⁻¹ であり、2020年5月の細胞密度はそれよりも2桁小さかった（小倉・佐藤 2001）。

環境要因との関係性については、小倉・佐藤（2001）は、1995年5月のブルーム時における NO₂⁻・NO₃⁻ 濃度は前年同月（1994年5月）よりも高いと結論した。2020年5月は、1995年5月よりもこれらの濃度が高いことから、無機態窒素が比較的豊富だったと考えられる。Skejić et al. (2021) は、海洋における円石藻の現存量と NO₃⁻ 濃度には正の相関があると指摘しており、比較的豊富な無機態窒素が2020年の円石藻ブルームの形成要因の一つであったことが示唆される。

駿河湾の沖合では、珪藻の大量増殖によりケイ酸塩と硝酸塩が枯渇した後、再び硝酸塩が供給された時期に *E. huxleyi* が増殖したと報告された（萩原ほか 2011）。また、2014年から2018年にかけてのバレンツ海では、*E. huxleyi* のブルームが毎年夏季に観測され、円石藻のブルーム時には珪藻がほとんど出現しなかったと報告された（Silkin et al. 2020）。温帯域に位置する相模湾では、2月から5月にかけて珪藻を主としたマイクロプランクトンの春季ブルームが発生し、栄養塩が消費される（Ara et al. 2019）。したがって、5月の相模湾は栄養塩が枯渇する傾向にあるが、2020年においては無機態窒素濃度が比較的高く、珪藻の増殖に不十分で、円石藻の増殖に十分であった可能性がある。*G. oceanica* は、日本近海に広く分布する種であることから、相模湾においても好適条件下では今回のように急増殖しブルームを形成すると考えられるが、その詳しい原因については、今後のさらなる調査と解析が必要である。

相模湾沿岸域における遺伝子解析を使った原核生物と真核生物群集構造の調査結果では、周年を通した円石を持たないハプト藻と円石藻の出現が確認されている（Sogawa et al. 2021）。また、同海域で2016年

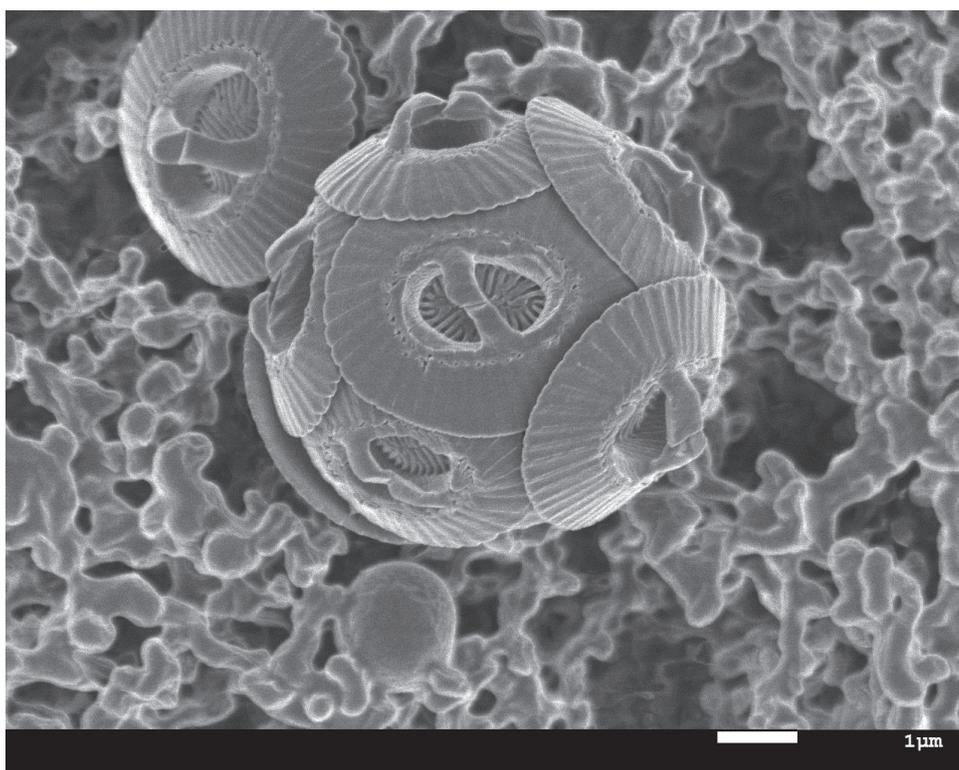


Figure 3. Scanning electron microscope image of the identified coccolithophore, *Gephyrocapsa oceanica*.

5月から2021年6月にかけて補助色素組成の変動を調査したところ、円石藻が細胞内に含有するとされている19'-hexanoyloxyfucoxanthinは、101回のサンプリングにおいて89回検出された(矢野 未発表)。これは同じ補助色素を含有する他のハプト藻が原因となっている可能性もある一方、円石藻由来である可能性も考えられる。また、円石を持たない状態の円石藻(非円石細胞)による寄与も含まれているかもしれない。培養実験においては、球形で2本の鞭毛を伴い、円石を持たずに浮遊する非円石細胞が観察されることが報告されている(Saruwatari et al. 2016)。これらの結果から、円石藻は相模湾に生息しており、環境状況が円石藻にとって良好であるなら、短期間に大規模なブルームが形成される可能性があると考えられる。今後は、円石藻がブルームを起こす良好な海洋環境を決定するため、その生理学的特徴の解明に焦点を当てた調査を行い、現場における生態学的説明に応用することが重要な課題といえる。そのため、高頻度の現場観測に加えて実験室での培養実験も行う必要がある。

5. おわりに

本研究は、2020年5月、25年ぶりに相模湾で発生した円石藻のブルームについて調査し、環境要因やブルームの特徴を記載した。本ブルームは、まずJAXAの人工衛星「しきさい」によって捉えられ、その報告を受けて行われた現場観測により詳細が明らかになった。ブルームを起こした種は、1995年と同種の*Gephyrocapsa oceanica*であったが、細胞密度は異なり、2020年の方が規模は小さかった。円石藻がブルームを起こした一要因は比較的豊富な無機態窒素であった可能性が示唆されたが、より詳細で具体的な原因については今後のさらなる調査・解析が必要である。

謝辞

本研究は宇宙航空開発研究機構(JAXA)地球観測研究センター(EORC)による第2回地球観測研究公募<ER2GCF312>の助成を受け実施された。

円石藻試料の固定方法および光学顕微鏡観察では、東京海洋大学名誉教授の石丸隆博士とマイクロワールドサービスの奥修博士にご助言頂いた。色素分析に際し、東京大学の高橋一生教授と片山智代博士にご指導賜った。SEM画像の撮影では名取則明博士にご協力頂いた。試料採集では、木村倫代船長を始めとする横浜国立大学臨海環境センターの皆様にご協力頂いた。この場を借りて厚く御礼申し上げる。

引用文献

- Ara K, Fukuyama S, Okutsu T, Nagasaka S, Shiimoto A (2019) Seasonal variability in phytoplankton carbon biomass and primary production, and their contribution to particulate carbon in the neritic area of Sagami Bay, Japan. *Plankton Benthos Res* 14: 224–250.
- Balch WM (ed) (2004) *Coccolithophores—From Molecular Processes to Global Impact: Re-evaluation of the physiological ecology of coccolithophores*. Springer-Verlag New York, Berlin, pp. 165–190
- Bown PR, Lees JA, Young JR (ed) (2004) *Coccolithophores—From Molecular Processes to Global Impact: Calcareous nannoplankton evolution and diversity through time*. Springer-Verlag New York, Berlin, pp. 481–508.
- Broecker W, Clark E (2009) Ratio of coccolith CaCO_3 to foraminifera CaCO_3 in late Holocene deep sea sediments. *Paleoceanography* 24: PA3205.
- Brown CW, Yoder JA (1994) Coccolithophorid blooms in the global ocean. *J Geophys Res* 99: 7467–7482.
- 萩原直樹・千賀康弘・仁木将人・杉本隆成 (2011) 駿河湾における円石藻類の出現特性に関する研究. *土木学会論文集 B2 (海岸工学)* 67: 871–875.
- Hay WW (ed) (2004) *Coccolithophores—From Molecular Processes to Global Impact: Carbonate fluxes and calcareous nannoplankton*. Springer-Verlag New York, Berlin, pp. 509–528.
- Iglesias-Rodriguez MD, Brown CW, Doney SC, Kleypas J, Kolber D, Kolber Z, Hayes PK, Falkowski PG (2002) Representing key phytoplankton functional groups in ocean carbon cycle models: Coccolithophorids. *Global Biogeochem Cycles* 16: 1100.
- 池田嘉子 (2007) 博多湾における *Gephyrocapsa oceanica* の大量発生事例. *福岡市保健環境研究所報* 33: 85–90.
- 岩田静夫・細田昌宏・松山優治 (1980) 相模湾沿岸の流れの変動について I. 神奈川県水産試験場研究報告 1: 61–71.
- 小倉久子・佐藤正春 (2001) 1995年5月の東京湾に発生した *Gephyrocapsa oceanica* KAMPTNER 赤潮について. *水環境学会誌* 24: 115–119.
- Ota Y, Higurashi A, Nakajima T, Yokota T (2010) Matrix formulations of radiative transfer including the polarization effect in a coupled atmosphere-ocean system. *J Quant Spectrosc Radiat Transfer* 111: 878–894.
- Poulton AJ, Adey TR, Balch WM, Holligan PM (2007) Relating coccolithophore calcification rates to phytoplankton community dynamics: Regional differences and implications for carbon export. *Deep-Sea Res, Part II* 54: 538–557.
- Saruwatari K, Satoh M, Harada N, Suzuki I, Siraiwa Y (2016) Change in coccolith size and morphology due to response to temperature and salinity in coccolithophore *Emiliania huxleyi* (Haptophyta) isolated from the Bering and Chukchi seas. *Biogeosciences* 13: 2743–2755.
- Silkin V, Pautova L, Giordano M, Kravchishina M, Artemiev V (2020) Interannual variability of *Emiliania huxleyi* blooms in the Barents Sea: *In situ* data 2014–2018. *Mar Pollut Bull* 158: 111392.
- Skejić S, Arapov J, Bužančić M, Gladan ŽN, Bakrač A, Straka M, Mandić J (2021) First evidence of an intensive bloom of the coccolithophore *Syracosphaera haldalii* in a highly variable estuarine environment (Krka River, Adriatic sea). *Mar Ecol* 42: e12641, doi.org/10.1111/maec.12641
- Sogawa S, Tsuchiya K, Nagai S, Shimode S, Kuwahara VS (2021) Annual dynamics of eukaryotic and bacterial communities revealed by 18S and 16S rRNA metabarcoding in the coastal ecosystem of Sagami Bay, Japan. *Metabarcoding Metagenom* 6: 41–58.
- Young JR, Geisen M, Probert I (2005) A review of selected aspects of coccolithophore biology with

implications for paleobiodiversity estimation.
Micropaleontolog 51: 267–288.

Zapata M, Rodriguez F, Garrido JL (2000) Separation
of chlorophylls and carotenoids from marine

phytoplankton: a new HPLC method using a reversed
phase C8 column and pyridine-containing mobile
phases. *Mar Ecol Prog Ser* 195: 29–45.

浮遊性カイアシ類 *Acartia steueri* の幼生・幼体の培養における微細藻類餌料の検討

高山佳樹^{1)*}、平原南萌^{2a)}、戸田龍樹^{1,2)}

1) 創価大学プランクトン工学研究所 〒192-8577 東京都八王子市丹木町 1-236

2) 創価大学理工学部 〒192-8577 東京都八王子市丹木町 1-236

a) マッハコーポレーション株式会社 〒220-0004 神奈川県横浜市西区北幸 2-5-15 プレミア横浜西口ビル 7階

Examination of dietary microalgae for larval stage in the culture of *Acartia steueri*

Yoshiki Takayama^{1)*}, Minamo Hirahara^{2a)}, and Tatsuki Toda^{1,2)}

1) *Institute of Plankton Eco-engineering, Soka University, 1-236 Tangi-cho, Hachioji, Tokyo 192-8577, Japan*

2) *Faculty of Science and Engineering, Soka University, 1-236 Tangi-cho, Hachioji, Tokyo 192-8577, Japan*

a) *Mach Corporation, Puremia Yokohama Nishiguchibiru 7 floor, 2-5-15, Kitasaiwai, Nishi-ku, Yokohama, Kanagawa, 220-0004, Japan*

* *Corresponding author: ytakayama@soka.gr.jp*

2022年4月29日受付, 2022年5月16日受理

Abstract In aquaculture and ornamental industries, copepods are recognized as preferred live feeds for marine fish larvae over commonly used organisms such as *Artemia* and rotifers. Marine fish larvae fed with copepods show better survival and growth. Despite obvious advantages of copepods as the live feed, their use is still limited owing to low productivity and cost-efficiency when mass cultivated.

Copepods from the genus *Acartia* are good candidates for a live feed because their body size, swimming behavior, and biochemical composition are suitable for many marine fish larvae which have small mouth gapes. In addition, *Acartia* species produce dormant eggs which can be stored and hatched to feed fish larvae. *Acartia steueri* Smirnov is widely distributed in the coastal waters of the western Pacific Ocean, and is an essential food source for the larvae of commercially important fish in their natural habitats.

Different dietary microalgae affect the egg production rate, hatching success, survival rate, growth rate, and the population growth of copepods. One of the underlying bottlenecks in the intensive cultivation of copepods is fatally low survival rate during their larval stages. Calanoid copepods including genus *Acartia* feed on live microalgae. In the present study, in order to clarify the favorable dietary microalgae for larvae of *Acartia steueri*, the nauplii individuals were fed with four mono-microalgal diets and one mixed-microalgal diet to measure their survival rate.

The present study conducted two experiments. In the first experiment, the nauplii hatched within 24 hours were individually reared in 6-well plates under three diet conditions (mono-diet

of *Tetraselmis suecica*, *Rhodomonas salina* and *Isochrysis galbana*) in April 2019. Survival rate and development stages of the copepods were measured every two days. In the second experiment, the nauplii were reared in 600 mL beakers under three diet conditions (mono-diet of *T. suecica*, *Chaetoceros gracilis*, and a mixed diet of *T. suecica* + *C. gracilis* at 1:1 carbon ratio) in April 2020. Survival rate and development stages of the copepods were measured at day 10 and day 20 during the incubation duration.

In the first experiment, the survival rate at day 20 was $26.8 \pm 7.2\%$ when fed with *T. suecica*, which was the highest value among the mono-microalgal diet conditions. However, only 0.6% of individuals fed with *T. suecica* were developed to the adult stage (copepodid VI). In addition, the malformation at first antennas was observed from the copepodid individuals fed with *T. suecica*. *T. suecica* is well known to be rich in amino acids but with poor fatty acid content. These results might suggest that *T. suecica* is the favorable diet for early developmental stages (i.e. nauplii) of the copepod *A. steueri*, but has a nutritional problem for the later development stages of life cycle. In the second experiment, the ratio of individuals developed until adult stages was maximized under the mixed diet condition of *T. suecica* and *C. gracilis*, and this mixed diet can be considered a favorable diet for *A. steueri* larvae in the present study.

Keywords: aquaculture; calanoid copepod; malformation; nauplii, survival rate

1. はじめに

カイアシ類は海洋において多くの仔稚魚の主要な餌資源であり、ときにその消化管内容物の80%を占めることが報告されている (Tanaka et al. 1987, Mauchline 1998)。カイアシ類は多価不飽和脂肪酸といった必須脂肪酸を多く含有しており、ワムシやアルテミアのような栄養強化のプロセスも必要なく (Næss et al. 1995, Støttrup 2003)、仔稚魚の餌料として適した体サイズを示すことから、水産養殖分野における仔稚魚の理想的な餌料と認識されている (Støttrup 2003)。そのためカイアシ類を仔稚魚の餌料として用いる試みが盛んに行われ、カイアシ類を給餌した仔稚魚はワムシやアルテミア等を給餌した仔稚魚と比べ、生存率や成長速度、体色や市場価値が向上することが報告されている (Shields et al. 1999, Barroso et al. 2013)。このような背景から天然域から採集されたカイアシ類が仔稚魚の餌料に用いられるが、季節や海況によって収量変動し、同種・同サ

イズのカイアシ類を生産することが難しく、寄生生物や病原菌が魚類種苗生産へ混入するといった欠点がある (荻原 2014)。そのため、培養環境を制御した屋内での集約的なカイアシ類の大量生産が求められているが、ワムシといった既存生物餌料の培養と比較した際にはその生産性は低く (Molejón & Alvarez-Lajonchère 2003)、未だ困難な技術とされている。

カイアシ類の個体群の増殖速度は、成体による卵生産数と生産された次世代幼生の加入率によって決定される。カイアシ類の培養において、給餌する餌料はカイアシ類の卵生産速度、孵化率、生存率や成長速度に影響し個体群の増加を決定づける (Camus & Zeng 2008, Pan et al. 2014)。卵生産速度は、カイアシ類の現場における二次生産や個体群変動に直接関連するため (Poulet et al. 1995)、異なる餌料環境下での雌成体の飼育実験が盛んに行われ、好適餌料に関する知見が報告されている。その一方で、幼生の好適餌料に関する研究はその実験の困難さや煩雑さから限定

されており、実用化されているアルテミアの幼生期から成体までの生存率が40～70%とされる一方(寺本・木下 1961, Balachandar & Rajaram 2018)、人工環境下におけるカイアシ類 *Acartia bifilosa* の幼生から幼体までの生存率は10%以下、成体までは0%と低いことが知られているため(Li et al. 2008)、幼生期の低い生存率の改善はカイアシ類の大量培養における喫緊の課題である。カイアシ類はノープリウス幼生から、コペポダイト幼体、そして成体まで発達する過程でその形態を変化させ、体長は数十倍増大するため、摂餌可能な餌料サイズ、摂餌に適した餌料サイズは発達段階毎の口器(体)サイズに依存する(Berggreen et al. 1988, Liu et al. 2010)。Roman (1991) は放射性炭素で標識した餌料藻類を異なる発達段階の *Acartia tonsa* に摂餌させ、標識した放射性炭素のタンパク質、多糖類、脂質への取り込み量を調べたところ、ノープリウス幼生ではタンパク質に最も放射性炭素がとりこまれたが、コペポダイト幼体、成体へと発達するに伴ってその割合は減少し、相対的に脂質への取り込み割合が増加したことを報告した。そのため、カイアシ類は発達に伴い、要求する栄養素は変化すると推測されるため、発達段階を考慮して餌料の検討を行うことで卵生産や生存率が向上する好適餌料を選択できると期待される。

Acartia 属カイアシ類は世界中の沿岸域において見出される浮遊性の普通種であり(Hansen et al. 2016)、多くの魚種の仔稚魚にとって適した体サイズ、遊泳行動、生化学組成を示すことから理想的な生物餌料とされている(Rajkumar & Vasagam 2006, Wilcox et al. 2006; Hansen et al. 2016)。また、卵は低酸素や低温といった不適環境にさらされると一時的に発生が停止するため(Uye 1985, Baumgartner & Tarrant 2017)、数百日程度の冷蔵保存が可能であることが示されている(Hansen et al. 2016)。したがって、必要に応じて常温に戻し、孵化させることで魚類餌料としての利用や培養系の立ち上げの際の播種個体としての利用が可能であり(Hansen et al. 2016, Pan et al. 2019)、保管・流通の点で有利である。*Acartia steuerei* Smirnov は北西太平洋内湾域に広く分

布し、その北限はロシア南クリル湾(Kos 1958)、南限は琉球列島の川平湾(Nishida 1985)とされている。本種のノープリウス幼生1期は体長70 μm 、雌成体の体長は1400~1600 μm 程度であり(Ueda 1997, Okada et al. 2009)、自然環境下においては水産重要魚種の仔稚魚の重要な餌資源となっている(Tanaka et al. 1987)。また、2000 ind. L^{-1} の高密度条件で培養しても、生存率、卵生産速度、孵化率が低下しないことが報告されており(Takayama et al. 2020)、ラボスケールでの実験対象種とされている(Takayama et al. 2021)。

カイアシ類培養の実用化において、非生物餌料は生物餌料と比較して入手の安定性や使用の利便性において有利である。先行研究によって、浮遊性カイアシ類の生物餌料の代替として養魚用人工餌料、醤油粕、微細藻類ペースト(*Thalassiosira weissflogii*, *Isochrysis* sp.)、冷凍微細藻類ペースト(*Tetraselmis* sp., *Nannochloropsis* sp.)を *Sinocalanus tenellus*, *Pseudodiaptomus inopinatus*, *Acartia clausi* (現在の分類で *Acartia hudsonica* もしくは *Acartia omorii*)、*Acartia sinjiensis*, *Parvocalanus crassirostris* の餌料として検討されたが卵生産性や生存率が極めて低かったことが報告されている(Uye 2005, Alajmi & Zeng 2015)。そこで本研究では、水産養殖分野で一般的に利用されている微細藻類種を用いた。また、先行研究によって単一餌料藻類よりも複数種の微細藻類からなる混合餌料を給餌することでカイアシ類の卵生産速度が向上することが知られており、これは餌料を混合することで不十分な栄養素が補われるためだと解釈されている(Li et al. 2008, Pan et al. 2014, Alajmi & Zeng 2015)。そこで本研究では、単一餌料藻類の餌料価値を評価した後に、混合餌料による検討を行った。本稿では、*A. steuerei* 培養における好適な餌料藻類を検討するため、異なる微細藻類種を餌料とした際のノープリウス幼生の成体期までの生存率を測定した。

2. 材料および方法

2.1. 微細藻類餌料

水産餌料として一般的に用いられており、細胞サイズ、

炭素・窒素比 (CN 比) や脂肪酸といった栄養組成の点で特徴を有する微細藻類を餌料候補として緑藻 *Tetraselmis suecica*、クリプト藻 *Rhodomonas salina*、珪藻 *Chaetoceros gracilis*、ハプト藻 *Isochrysis galbana* の4種を用いた (Table 1)。全ての微細藻類は 50 mL の三角フラスコを用い回分培養した。培養に用いた器具はあらかじめオートクレーブ (120°C、20 分間) を使用し滅菌した。また、以降の実験操作は全てクリーンベンチ内で無菌的に行った。培養には相模湾真鶴半島沖 3 km の定点 M にて採水した表層海水を数か月間保管後、塩分を 35 に調整し、孔径 0.22 μm のメンブレンフィルター (Merck Millipore) で濾過したものを基本海水とし、f/2 培地を作成し餌料藻類の培養に用いた。培養は水温 20°C、光強度 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、明暗周期各 12 時間条件に設定したインキュベーター (FLI-301N, EYELA) 内で実施した。培地中の餌料藻類の細胞濃度は血球計算版を用い、生物顕微鏡下 (OPTIPHOT-2, Nikon) で計数し、細胞サイズは接眼マイクロメーターを用いて測定した (Table 1)。餌料藻類の炭素量は、Nagao et al. (2001) にもとづき元素分析計 (Series II CHNS/O Analyser 2400, PerkinElmer) で測定した。

2.2. 動物プランクトン試料と培養海水の採集

動物プランクトン試料の採集は相模湾の北西域に位置する真鶴港 (35° 09'49"N, 139° 10'33"E; 水深 6 m) で実施した。*Acartia steueri* の培養に用いた海水は、

定点 M において表層海水をバケツにて採水し、現場において目合い 180 μm のナイロンメッシュで大型の動物プランクトンを取り除き、常温暗所で3か月以上保管後、目合い 0.22 μm のガラスファイバーフィルターで濾過滅菌した海水 (FSW < 0.22 μm) を用いた。

動物プランクトン試料は日中に目合い 180 μm の動物プランクトンネット (口径 30 cm、長さ 100 cm) を海底付近から海面まで複数回傾斜曳きすることで得た。試料採集時に併せて表層海水をバケツで採水し、棒状水温計 (Shinwa Rules Co., Ltd.) で海面水温を測定した。現場に存在する餌料を残しつつ、卵や他のカイアシ類の混入を防ぐため、目合い 65 μm のナイロンメッシュで濾過した現場表層海水を後述するカイアシ類の前培養に用いた。採集された動物プランクトン試料は 30 分以内に横浜国立大学大学院環境情報院附属臨海環境センター内の実験室へ移送し、実体顕微鏡 (WILD M10, Leica Co., Ltd.) で *A. steueri* 雌成体のみを、上田 (1997) が報告した形態学的特徴を基に選別した。

2.3. *Acartia steueri* ノープリウス幼生・コペポダイト幼体の好適餌料の検討

幼生・幼体の好適餌料の検討実験は計 2 回実施し、実験に用いたノープリウス幼生は、前述した、現場より採集した *A. steueri* 成体を実験室で培養することで得た。1、2 回目の実験に用いた成体個体はそれぞれ、2019 年 4 月、2020 年 4 月に採集した。選別された雌

Table 1. Microalgae used as diets for copepods in the present study.

Microalgae	Classification	Cell size (μm)	C/N molar ratio
<i>Tetraselmis suecica</i>	Chlorophyte	7.0 \pm 1.1	5.9 \pm 0.9
<i>Rhodomonas salina</i>	Cryptophyte	10.3 \pm 2.7	6.9 \pm 0.6
<i>Isochrysis galbana</i>	Haptophyte	4.5 \pm 1.1	11.5 \pm 1.3
<i>Chaetoceros gracilis</i>	Diatom	5.9 \pm 0.6	8.9 \pm 0.4
Mixed diet (<i>T. suecica</i> & <i>C. gracilis</i>)	—	—	—

成体を25個体ずつ、250 mLの現場濾過海水 (< 65 μm) で満たしたナルゲンボトルに収容し、*T. weissflogii* を十分量 (500 $\mu\text{g C L}^{-1}$) 給餌し、現場水温、暗条件で24時間の馴化培養を行った。馴化培養後、200 mLビーカー内に雌成体を10個体ずつ収容し、*T. weissflogii* (500 $\mu\text{g C L}^{-1}$) を給餌し、19°C、明暗周期各12時間条件で2日間培養することで卵を得た。得られた卵はFSWで満たした200 mLビーカーに移し、19°C、暗所下で48時間培養し、孵化後24時間以内のノープリウス幼生を以下の培養実験に供した。本実験の餌料濃度と量は、*A. steuerei*と同程度の体サイズを示す*Acartia tonsa*において卵生産速度と成長速度が飽和する餌料濃度と量に基づいた (Berggreen et al. 1988)。

1回目の実験では、*T. suecica*、*R. salina*、*I. galbana*の3つの単一餌料を用いた。2回目の実験では、*T. suecica*単一餌料と*C. gracilis*単一餌料に加えて*T. suecica*と*C. gracilis*の混合餌料(炭素比1:1)を検討した。

1回目のノープリウス幼生の培養実験には、ウェルプレート培養容器として用いた。ノープリウス幼生は1個体ずつ6 mLの滅菌海水で満たした6ウェルプレートに収容し、水温19°C、暗所で40日間、もしくは飼育容器内の全個体が死亡するまで培養した。餌料条件毎に100個体のノープリウス幼生を使用し3連で実験を行った。2日に一回50%の海水をパスツールピペットで取り除き、新たな海水と交換し、十分量の餌料(420 $\mu\text{g C L}^{-1}$)を与えた。個体の生存率を2日に一回測定し、コペポダイト期以降は形態学的特徴をもとに発達段階を記録した。

2回目のノープリウス幼生の培養実験では、ビーカーを培養容器とした。餌料条件ごとに600 mLの滅菌海水で満たしたビーカーを3つずつ用意し、それぞれのビーカーに100個体のノープリウス幼生を収容した(6 mL ind.⁻¹)。ビーカーには内径5 mmのガラス管を設置し、ビーカー底部から通気による攪拌を行った。海水交換は2日に一回行い、ビーカー内の300 mLの培養海

水を目合い20 μm のナイロンメッシュで濾しながら排水し、メッシュに捕集された個体は洗瓶ですすぐことでビーカーに戻し、新たな海水を加えた。水温、餌条件は、1回目のノープリウス幼生培養実験と同様とし、全個体が成体になる、もしくは全個体が死滅するまで培養を行った。培養10日目、20日目に培養海水をペトリディッシュに移し、実体顕微鏡下で生存個体を計数した。その際、コペポダイト期の個体については形態学的特徴にもとづき発達段階を求めた。培養20日目以降は、2日に1回同様の方法で観察を行い、成体個体が見出された場合は、容器内から取り除き、成体まで発達した個体数を記録した。

ノープリウス期における生存率(%)は以下の(1)式で算出した。

$$\text{Nauplius stage survival} = \frac{C \text{ ind}}{N \text{ ind}} \times 100 \quad (1)$$

$N \text{ ind}$ は実験に使用したノープリウス幼生の初期個体数(ind.)を、 $C \text{ ind}$ はコペポダイト1期まで発達した個体数(ind.)を示す。コペポダイト期における生存率(%)は以下の(2)式で算出した。

$$\text{Copepodid stage survival} = \frac{A \text{ ind}}{C \text{ ind}} \times 100 \quad (2)$$

$C \text{ ind}$ はコペポダイト1期まで発達した個体数(ind.)を、 $A \text{ ind}$ は成体(コペポダイト6期)まで発達した個体数(ind.)を示す。ノープリウス1期から成体での生存率(%)は以下の(3)式で算出した。

$$N1 \sim C6 \text{ survival} = \frac{A \text{ ind}}{N \text{ ind}} \times 100 \quad (3)$$

$N \text{ ind}$ は実験に使用したノープリウス幼生の初期個体数(ind.)を、 $A \text{ ind}$ は成体(コペポダイト6期)まで発達した個体数(ind.)を示す。

3. 結果

3.1. ウェルプレートを用いた1回目の実験

(2019年4月採集個体)

Tetraselmis suecica 単一餌料区において、生存率は培養日数に伴い緩やかに減少し、培養6日目にコペポダイト1期（C1）の出現が初めて観察され、培養30日目に成体（C6）が観察された（Fig. 1）。ノープリウス期の生存率は $48.9 \pm 13.8\%$ 、コペポダイト期の生存率は $1.0 \pm 1.5\%$ 、ノープリウス期から成体までの生存率は $0.6 \pm 0.8\%$ であった。培養10日目と20日目の生存率はそれ

ぞれ $62.4 \pm 14.8\%$ 、 $26.8 \pm 7.2\%$ を示し、培養20日目の値は、他の2つの餌料区と比べて有意に高い値であった（one-way ANOVA, Tukey-Kramer, $p < 0.05$, Fig. 2）。同餌料条件下で培養したほぼ全てのコペポダイト幼体において、第一触覚には欠損や曲がり、ねじれや折れといった奇形が観察された（Fig. 3）。

Rhodomonas salina 単一餌料区における生存率は、培養0日目から4日目に約60%減少し、培養6日目にコペポダイト1期（C1）の出現が初めて観察された（Fig. 1）。ノープリウス期の生存率は $17.3 \pm 19.8\%$ を示したが、

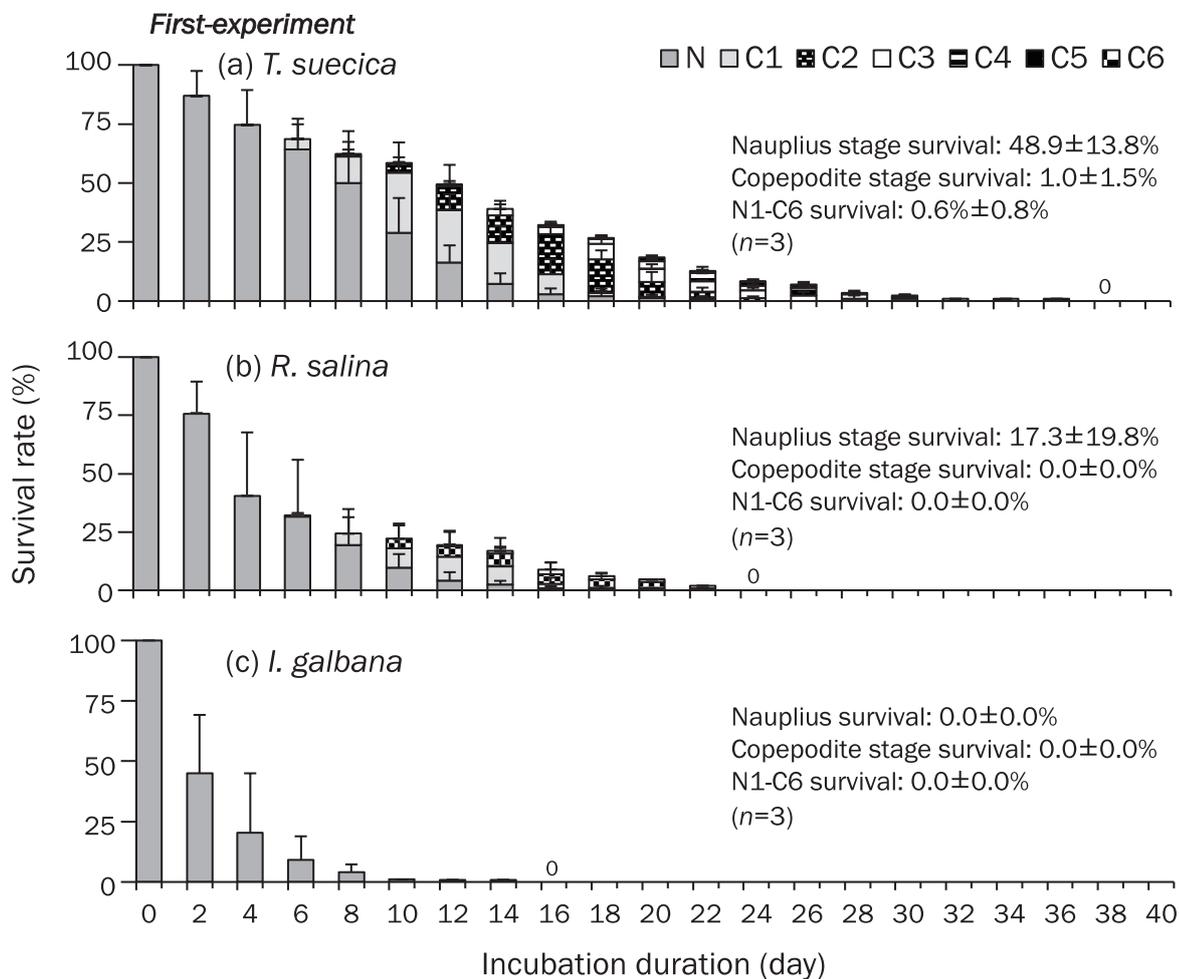


Figure 1. Temporal variations in survival rate and development of *Acartia steueri* fed with (a) *Tetraselmis suecica*, (b) *Rhodomonas salina*, and (c) *Isocrysis galbana* in the first-experiment using plastic well-plates as incubation containers. Bar graph colors represent development stage of the copepods (N: Nauplii, C: Copepodite). Survival rate from naupliar to copepodite stage, copepodite stage to adult, and from naupliar stage to adult are described in each figure. 370 individual nauplii were used in each diet treatment, which were spawned from adult females collected in April 2019 at Manazuru Port in Sagami Bay, Japan.

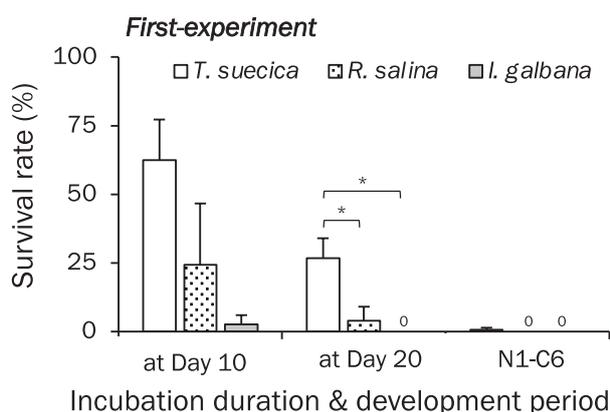


Figure 2. Survival rate of *Acartia steueri* fed with *Tetraselmis suecica*, *Rhodomonas salina* and *Isocrysis galbana*, in the first-experiment using plastic well plates as incubation containers. Bar graph colors represent each microalgal diet treatment. Survival rate of N1-C6 indicates the percentage of individuals surviving from nauplii first stage until copepodite sixth stage (matured adult). Error bars show the standard deviations ($n=3$). Asterisks on the top of bars denote a significant difference among conditions (one-way ANOVA, Tukey-Kramer, $p<0.05$). Nauplii specimens were prepared from adult females collected in April 2019 at Manazuru Port in Sagami Bay, Japan.

コペポダイト期の生存率とノープリウス期から成体までの生存率は0%と成体まで発達できた個体は皆無であっ

た。培養10日目と20日目の生存率はそれぞれ $24.4 \pm 22.3\%$ 、 $4.0 \pm 5.0\%$ を示した (Fig. 2)。

Isocrysis galbana 単一餌料区における生存率は培養開始より急激に減少し、培養16日以内にすべての個体が死亡し、コペポダイトに変態できた個体は皆無であったため、ノープリウス期、コペポダイト期、ノープリウス期から成体までの生存率は全て0%であった (Fig. 1)。培養10日目の生存率は $2.7 \pm 3.2\%$ 、培養20日目の生存率は0%であった (Fig. 2)。

3.2. ビーカーを用いた2回目の実験

(2020年4月採集個体)

T. suecica 単一餌料区における発達段階は、主にノープリウス幼生が占め (Fig. 4)、生存率は培養10日目に $40.0 \pm 5.2\%$ を示した後に、培養20日目には $6.1 \pm 5.4\%$ まで低下し、成体に変態できた個体の割合は0%であった (Fig. 5)。

C. gracilis 単一餌料区での生存率は培養10日目に $45.5 \pm 15.3\%$ を示した後に、培養20日目には $12.3 \pm 8.2\%$ まで低下した (Fig. 5)。成体に変態できた個体の割合は $10.5 \pm 3.8\%$ を示し、成体までの発達に最短で22日を要した。

T. suecica と *C. gracilis* の混合餌料区における培養10日目の発達段階の組成は *C. gracilis* 単一餌料区と

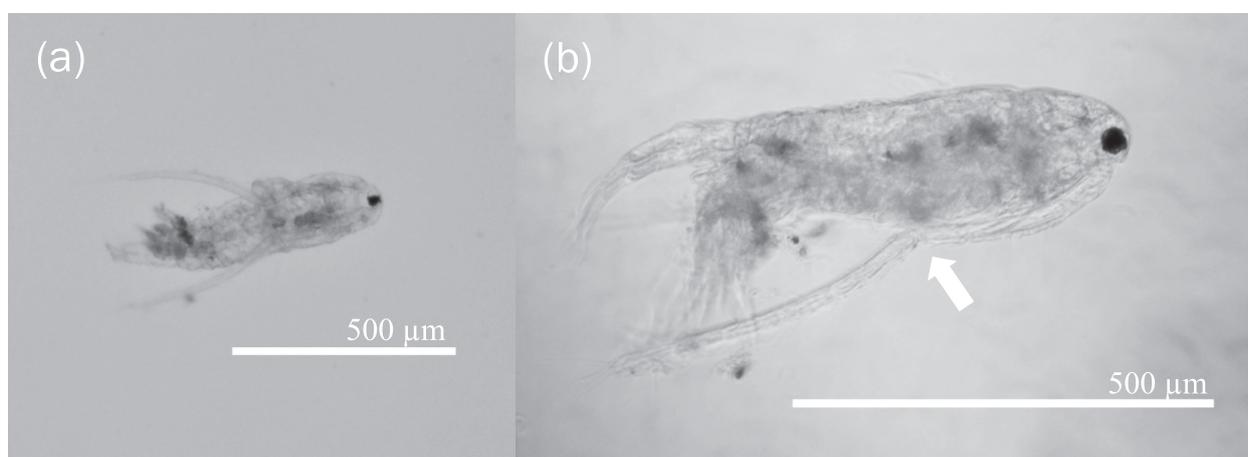


Figure 3. Images of malformation observed at first antennae of *Acartia steueri* copepodid fed with *Tetraselmis suecica*, in (a) dorsal view; (b) lateral view. An arrow in the right image indicates a broken point of right first antenna.

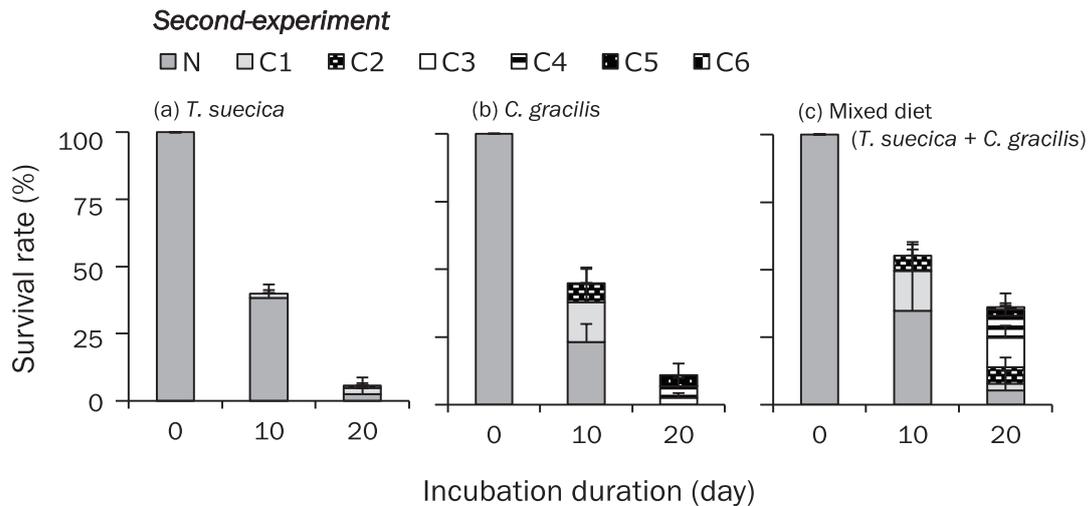


Figure 4. Temporal variations in survival rate and development of *Acartia steuerei* fed with (a) *Tetraselmis suecica*, (b) *Chaetoceros gracilis*, and (c) Mixed diet (*T. suecica* + *C. gracilis*) in the second-experiment using glass beakers. Bar graph colors represent development stage of the copepods (N: Nauplii, C: Copepodite). Error bars show the standard deviations ($n=3$). 370 individual nauplii were used in each diet treatment, which were spawned from adult females collected in April 2020 at Manazuru Port in Sagami Bay, Japan.

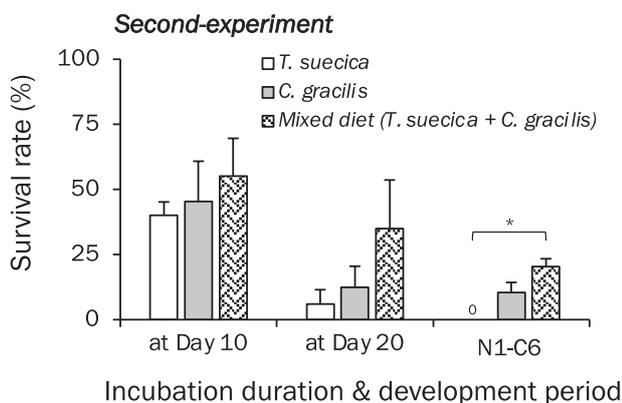


Figure 5. Survival rate of *Acartia steuerei* fed with *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros gracilis*, and the mixed diet (*T. suecica* + *C. gracilis*) in the second-experiment using glass beakers as incubation containers. Bar graph colors represent each microalgal diet treatment. Survival rate of N1-C6 indicates the percentage of individuals surviving from nauplii first stage until copepodite sixth stage (matured adult). Error bars show the standard deviations ($n=3$). An asterisk on the top of bars indicates a significant difference in among conditions (one-way ANOVA, Tukey-Kramer, $p<0.05$). Nauplii specimens were prepared from adult females collected in April 2020 at Manazuru Port in Sagami Bay, Japan.

類似しており (Fig. 4)、生存率は培養 10 日目に $55.2 \pm 14.4\%$ を示した後に、培養 20 日目には $35.0 \pm 18.7\%$ へ低下した (Fig. 5)。成体に変態できた個体の割合は $20.3 \pm 3.0\%$ と、*I. galbana* 単一餌料区と比べて有意に高い値を示し (one-way ANOVA, Tukey-Kramer, $p<0.05$)、成体までの発達に最短で 22 日を要した。

4. 考察

2019 年 4 月に行った 3 種の単一餌料を用いた 1 回目の *Acartia steuerei* 幼生・幼体の好適餌料の検討では、*Tetraselmis suecica* 餌料区でのノープリウス幼生期の生存率は 48.9% と、他餌料条件よりも高い値を示した。1 回目の実験において成体個体が唯一得られた *T. suecica* 餌料区であったが、コペポダイト幼体期の生存率は 1.0%、幼生から成体までの生存率は 0.6% と低く、第一触覚のねじれや折れや欠如といった異常形態が多く個体で観察されたことから、本種は *A. steuerei* のノープリウス幼生には有効な餌料であるがそれ以降の発達段階においては、栄養素に何らかの問題があると考えられた。Knuckey et al. (2005) は *Acartia sinjiensis* の

幼生に *T. suecica* を単一で給餌すると、遊泳脚のねじれや眼の欠如といった奇形が発生することを報告し、必須脂肪酸不足によると推測した。*T. suecica* はタンパク質含量が高く、脂肪酸の含有量が低いという特徴を有することから (Koski et al. 1998)、脂肪酸を多く含有する餌料を混合することで生存率の向上、異常形態が改善されると考え、*T. suecica* に脂肪酸を多く含有する *Chaetoceros gracilis* (Tachihana et al. 2020) を加えた混合餌料を2回目の実験では検討した。その結果、混合餌料区での成体までの生存率は 20.4% を示し、奇形個体も皆無であったため、本研究で検討した餌料候補内では、*T. suecica* と *C. gracilis* からなる混合餌料が *A. steueri* のノープリウス幼生・コペポダイト幼体の好適餌料と考えられた。

Roman (1991) は放射線炭素で標識した餌料を *Acartia tonsa* に摂餌させ、取り込まれた放射性炭素を追跡することで、ノープリウス幼生は成体と比べてタンパク質の要求割合が高く、発達段階が進むにつれ脂肪酸の要求割合が増加することを報告した。*T. suecica* 餌料区ではノープリウス幼生期の生存率は高かったものの、コペポダイト幼体へと変態した後の生存率は急激に減少した。この現象は、カイアシ類の発達に伴う要求栄養素の変化を反映した可能性を示唆する。

餌料サイズはカイアシ類の摂餌効率を決める要因であり、*A. tonsa* ではその体長の約 2~5% 程度のサイズ帯の微細藻類餌料を給餌した際に、摂餌速度が最大となることが報告されている (Berggreen et al. 1988)。そこで、*A. steueri* の体長に上記の値を乗ずることで、本種の各発達段階における最適餌料サイズを推定した (Fig. 6)。幼生・幼体の好適餌料の検討に用いた微細藻類のうち、*Rhodomonas salina* のみがノープリウス期の最適餌料サイズ範囲よりもわずかに大きな細胞サイズを示したため、*R. salina* 餌料区のノープリウス幼生の摂餌効率は他の餌料藻類区よりも低い可能性が考えられる。仮説の検証には今後、それぞれの餌料環境下での摂餌速度を測定する必要がある。

餌料に含まれるドコサヘキサエン酸 (DHA) はノー

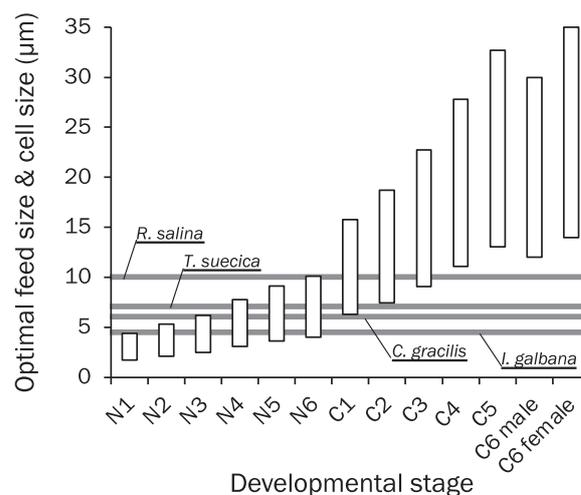


Figure 6. Range of optimal feed size that maximize ingestion rate in each development stage of *Acartia steueri*, and cell size of microalgae used as diets for the copepod in the present study. The range of optimal feed size (white bar) were estimated based on optimal feed size to body length ratio of copepod *A. tonsa* reported by Berggreen et al. (1988). The body length of *A. steueri* were referred from Onoue (2006) and Okada et al. (2009).

プリウス期から成体の発達や生存において重要な栄養素であり、カイアシ類の好適餌料の指標とすることが提案されている (Payne & Rippingale 2000)。*Isochrysis galbana* は DHA を豊富に含有することが知られ、*A. tonsa*、*A. sinjiensis*、*Gladiferens imparipes*、*Parvocalanus crassirostris* のノープリウス幼生期から成体までの発達、生存を促す好適餌料とされている (Drillet et al. 2011)。本研究の *A. steueri* においては、*I. galbana* 単一餌料区でノープリウス幼生からコペポダイト幼体へと発達できた個体は皆無であり、培養 16 日以内に死滅した。*I. galbana* の細胞サイズは *A. steueri* ノープリウス幼生の最適餌料サイズの範囲内であったことから、*I. galbana* は *A. steueri* が要求する何らかの栄養素が不足もしくは欠乏している可能性がある。エビ類やガザミ類では DHA の過剰摂取による斃死がよく知られ (竹内 2009)、例えば、アミノコギリガザミ (*Scylla serrata*) では、餌料に含まれる DHA が過多であると、ゾエア期における脱皮の失敗や形態異常を引き起こす (Hamasa-

ki et al. 2002, Suprayudi et al. 2004)。そのため、特定の栄養素の不足と過多の両仮説からの検証が必要と考えられ、今後、摂餌の有無の検証を行ったうえで、本研究で用いた株・条件で培養した *I. galbana* の生化学組成を先行研究と比較する必要があるだろう。

謝辞

本研究の一部は JICA/JST SATREPS-COSMOS プロジェクト< JPMJSA1509 >、JSPS 科研費< JP19H03035, 21K14902 >、笹川科学研究助成<2019-4093> による助成を受け実施された。試料採集にあたって横浜国立大学臨海環境センターの皆様が協力いただいた。また、実験の実施にあたって山本翼 氏、沖田一弥 氏に協力いただいた。厚く御礼申し上げる。

引用文献

- Alajmi F, Zeng C (2015) Evaluation of microalgal diets for the intensive cultivation of the tropical calanoid copepod, *Parvocalanus crassirostris*. *Aquac Res* 46: 1025–1038.
- Balachandar S, Rajaram R (2019) Influence of different diets on the growth, survival, fecundity and proximate composition of brine shrimp *Artemia franciscana* (Kellog, 1906). *Aquac Res* 50: 376–389.
- Barroso MV, De Carvalho CVA, Antoniassi R, Cerqueira VR (2013) Use of the copepod *Acartia tonsa* as the first live food for larvae of the fat snook *Centropomus parallelus*. *Aquaculture* 388: 153–158.
- Baumgartner MF, Tarrant AM (2017) The physiology and ecology of diapause in marine copepods. *Ann Rev Mar Sci* 9: 387–411.
- Berggreen U, Hansen B, Kiørboe T (1988) Food size spectra, ingestion and growth of the copepod *Acartia tonsa* during development: Implications for determination of copepod production. *Mar Biol* 99: 341–352.
- Camus T, Zeng C (2008) Effects of photoperiod on egg production and hatching success, naupliar and copepodite development, adult sex ratio and life expectancy of the tropical calanoid copepod *Acartia sinjiensis*. *Aquaculture* 280: 220–226.
- Drillet G, Frouël S, Sichlau MH, Jepsen PM, Højgaard JK, Joarder AK, Hansen BW (2011) Status and recommendations on marine copepod cultivation for use as live feed. *Aquaculture* 315: 155–166.
- 萩原篤志 (2014) “仔魚の餌料生物としての動物プランクトン”. 養殖の餌と水—塗の主役たち(杉田治男編). 恒星社厚生閣, 東京, pp.75–115.
- Hamasaki K, Suprayudi MA, Takeuchi T (2002) Effects of dietary n-3HUFA on larval morphogenesis and metamorphosis to megalops in the seed production of the mud crab, *Scylla serrata* (Brachyura: Portunidae). *Aquacult Sci* 50: 333–340.
- Hansen BW, Buttino I, Cunha ME, Drillet G (2016) Embryonic cold storage capability from seven strains of *Acartia* spp. isolated in different geographical areas. *Aquaculture* 457: 131–139.
- Knuckey RM, Semmens GL, Mayer RJ, Rimmer MA (2005) Development of an optimal microalgal diet for the culture of the calanoid copepod *Acartia sinjiensis*: effect of algal species and feed concentration on copepod development. *Aquaculture* 249: 339–351.
- Kos MS (1958) Some data on the coastal planktonic Copepoda from South-Kuril Bay. *Dokl Akad Nauk SSSR* 120: 191–192. (in Russian)
- Koski M, Breteler WK, Schogt N (1998) Effect of food quality on rate of growth and development of the pelagic copepod *Pseudocalanus elongatus* (Copepoda, Calanoida). *Mar Ecol Prog Ser* 170: 169–187.
- Li J, Sun S, Li CL, Zhang Z, Pu XM (2008) Effects of different diets on the reproduction and naupliar development of the copepod *Acartia bifilosa*. *J Exp Mar Biol Ecol* 355: 95–102.
- Liu S, Li T, Huang H, Guo ZL, Huang LM, Wang WX (2010) Feeding efficiency of a marine copepod *Acartia erythraea* on eight different algal diets. *Acta Ecologica Sinica* 30: 22–26.
- Mauchline J (1998) The biology of calanoid copepods. *Advances in Marine Biology*. Academic Press, New York, 709 pp.
- Molejón OG, Alvarez-Lajonchère L (2003) Culture experiments with *Oithona oculata* Farran, 1913 (Copepoda: Cyclopoida), and its advantages as a food for marine fish larvae. *Aquaculture* 219: 471–483.

- Nagao N, Toda T, Takahashi K, Hamasaki K, Kikuchi T, Taguchi S (2001) High ash content in net-plankton samples from shallow coastal water: possible source of error in dry weight measurement of zooplankton biomass. *J Oceanogr* 57: 105–107.
- Næss T, Germain-Henry M, Naas KE (1995) First feeding of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) using different combinations of *Artemia* and wild zooplankton. *Aquaculture* 130: 235–250.
- Nishida S (1985) Pelagic copepods from Kabira Bay, Ishigaki Island, southwestern Japan, with the description of a new species of the genus *Pseudodiaptomus*. *Publ Seto Mar Biol Lab* 30: 125–144.
- Okada N, Onoue Y, Othman BHR, Kikuchi T, Toda T (2009) Description of naupliar stages in *Acartia steueri* Smirnov (Copepoda: Calanoida). *J Crust Biol* 29: 70–78.
- 尾上保子 (2006) 相模湾沿岸域におけるカイアシ類 *Acartia steueri* の産卵生態に関する研究. 横浜国立大学学位論文.
- Pan YJ, Souissi S, Souissi A, Wu CH, Cheng SH, Hwang JS (2014) Dietary effects on egg production, egg-hatching rate and female life span of the tropical calanoid copepod *Acartia bilobata*. *Aquac Res* 45: 1659–1671.
- Pan YJ, Souissi A, Sadovskaya I, Hwang JS, Souissi S (2019) Egg hatching rate and fatty acid composition of *Acartia bilobata* (Calanoida, Copepoda) across cold storage durations. *Aquac Res* 50: 483–489.
- Payne MF, Rippingale RJ (2000) Evaluation of diets for culture of the calanoid copepod *Gladioferens imparipes*. *Aquaculture* 187: 85–96.
- Poulet SA, Ianora A, Laabir M, Breteler WK (1995) Towards the measurement of secondary production and recruitment in copepods. *ICES J Mar Sci* 52: 359–368.
- Rajkumar M, Vasagam KPK (2006) Suitability of the copepod, *Acartia clausi* as a live feed for seabass larvae (*Lates calcarifer* Bloch): Compared to traditional live-food organisms with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture* 261: 649–658.
- Roman MR (1991) Pathways of carbon incorporation in marine copepods: Effects of developmental stage and food quantity. *Limnol Oceanogr* 36: 796–807.
- Shields RJ, Bell JG, Luizi FS, Gara B, Bromage NR, Sargent JR (1999) Natural copepods are superior to enriched *Artemia* nauplii as feed for halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus*) in terms of survival, pigmentation and retinal morphology: relation to dietary essential fatty acids. *J Nutr* 129: 1186–1194.
- Støttrup JG (2003) Production and nutritional value of copepods. In: *Live Feeds in Marine Aquaculture* (eds Støttrup JG, Mcevoy LA). Blackwell Publishing, Oxford, pp. 145–205.
- Suprayudi MA, Takeuchi T, Hamasaki K (2004) Effects of *Artemia* enriched with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid on survival and occurrence of molting failure in megalop larvae of the mud crab *Scylla serrata*. *Fish Sci* 70: 650–658.
- Tachihana S, Nagao N, Katayama T, Hirahara M, Yusoff FM, Banerjee S, Shariff M, Kurosawa N, Toda T, Furuya K (2020) High productivity of eicosapentaenoic acid and fucoxanthin by a marine diatom *Chaetoceros gracilis* in a semi-continuous culture. *Front Bioeng Biotechnol* 1435.
- Takayama Y, Hirahara M, Liu X, Ban S, Toda T (2020) Are egg production and respiration of the marine pelagic copepod *Acartia steueri* influenced by crowding? *Aquac Res* 51: 3741–3750.
- Takayama Y, Hirahara M, Toda T (2021) Bioreactor cultivation of the planktonic copepod *Acartia steueri* Smirnov for egg collection. *Aquac Res* 52: 5912–5917.
- 竹内俊郎 (2009) 海産魚介類種苗の健全性向上に関する栄養学的研究. 日本水産学会誌 75: 623–635.
- Tanaka M, Ueda H, Azeta M (1987) Near-bottom copepod aggregations around the nursery ground of the juvenile red sea bream in Shijiki Bay. *Bull Japan Soc Sci Fish* 53: 1537–1544.
- 寺本賢一郎, 木下祝郎 (1961) アルテミアの培養に関する若干の知見. 日本水産学会誌 27: 801–804.
- 上田拓史 (1997) “アカルチア科.” 日本産海洋プランクトン検索図説 (千原光雄・村野正昭編). 東海大学出版会, 東京, pp. 672–680.
- Uye S (1985) Resting egg production as a life history strategy of marine planktonic copepods. *Bull Mar Sci* 37: 440–449.

- Uye S (2005) A brief review of mass culture copepods used for fish food in Japanese mariculture and a proposed plan to use high biomass natural populations of brackish-water copepods. In: Copepods in Aquaculture (eds Lee CS, O'bryen PL, Marcus NH). Blackwell Publishing, Iowa, pp. 75–90.
- Wilcox JA, Tracy PL, Marcus NH (2006) Improving live feeds: effect of a mixed diet of copepod nauplii (*Acartia tonsa*) and rotifers on the survival and growth of first-feeding larvae of the southern flounder, *Paralichthys lethostigma*. J World Aquac Soc 37: 113–120.

Hydrothermal carbonization of compressed water hyacinth: Effects of operation parameters on energy conversion and characterization of products

Tassapak Wutisirirattanachai ¹⁾, Solomon Addisu Legesse ²⁾, and Shinjiro Sato ^{1)*}

1) Graduate School of Science and Engineering, Soka University, 1-236, Tangi-cho, Hachioji, Tokyo, 192-8577, Japan

2) College of Agriculture and Environmental Sciences, Bahir Dar University, Bahir Dar, Ethiopia

* Corresponding author: ssato@soka.ac.jp

Received April 29 2022, Accepted May 23 2022

Abstract A massive infestation of a free-floating aquatic invasive plant, water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) has been causing numerous problems in Ethiopia. Water hyacinth (WH) is mainly composed of lignin, crystalline cellulose, and hemicellulose polymer, thus its solid part can be used as a potential alternative energy source through thermochemical treatment. Hydrothermal carbonization (HTC) is a conversion of biomass into solid components of char (biochar) and carbon-rich liquid products (biooil and aqueous phase) by heating biomass in the presence of water in a closed and autogenous environment. The objective of this study was to evaluate the effects of various operating conditions on energy conversion efficiency and characteristics of the final products using water hyacinth through hydrothermal carbonization. Hydrothermal treatment was carried out at three different operating temperatures (210°C, 240°C, and 270°C) for three different retention times (1, 2, and 4 hr) to obtain biochar, biooil, and aqueous phases. The study shows the possibility to convert WH biomass to biochar and biooil through HTC, where the best performance in energy conversion from both products was 64.5% at operating temperature of 240°C and retention time of 4 hr. Operation temperature and retention time significantly affected yield and higher heating value of biochar and biooil. Biochar yield decreased and biooil yield increased with increasing operating temperature and retention time. However, there are still low yield of biooil which potentially contains high gross energy. Therefore, it is necessary to evaluate other variables such as type of feedstock, amount and type of liquid mixed with feedstock, and operating environment to improve energy conversion efficiency through hydrothermal carbonization.

Keywords: biocrude oil; biofuel; biowaste; hydrothermal treatment, van Krevelen diagram

1. INTRODUCTION

A massive infestation of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*), a free-floating aquatic invasive weed, has

been causing numerous problems in Ethiopia (Hill et al. 2011). The invasion of water hyacinth affects water transportation systems, hydroelectric operations, hydraulics of canals and rivers, flooding hazard, human health,

fishing, irrigation, navigation, livestock, and aquatic biodiversity (Dersseh et al. 2019). Water hyacinth has invaded the largest lake in the Ethiopian highlands, Lake Tana, and was officially recognized in September 2011 and the infestation area of the lake has reportedly reached up to 50,000 ha (Abera 2018). The rapid and extensive increase has led to urgent necessity of research aimed at solving the problem or finding ways to utilize the plant. One of effective ways of treating water hyacinth is separating the plant into liquid and solid parts by squeezing or compressing, of which each part can be utilized for further treatments (Hudakorn & Sritrakul 2020). Water hyacinth is mainly composed of lignin, crystalline cellulose, and hemicellulose polymer, thus its solid part can be used as a potential alternative energy source (Moki et al. 2020, Zhang et al. 2020).

Thermochemical treatment is one of effective technologies to convert biomass into energy sources because it does not require expensive equipment, concludes treatment quickly, and produces valuable products (Yao & Ma 2019). There are two main thermochemical treatments which are pyrolysis and hydrothermal carbonization. Pyrolysis is a traditional method in thermochemical conversion which is the degradation (decomposition) of biomass by heat in the absence of oxygen (Demirbas & Arin 2002). On the other hand, hydrothermal carbonization (HTC) is the conversion of biomass into solid components of char (biochar) and carbon-rich liquid products (biooil and aqueous phase) by heating biomass in the presence of water in closed and autogenous environment (Sahoo et al. 2019). HTC has unique advantages in terms of biomass conversion compared to pyrolysis: 1) HTC requires relatively low reaction temperatures (e.g., 180°C–350°C); 2) HTC keeps water in liquid state under autogenous pressure prevents conversion of biomass to biogas such as carbon dioxide and nitrous oxide (Li et al. 2013); 3) HTC can be used as the most suitable

pretreatment methods for wet biomass with high organic content (Zhang et al. 2020). There have been many studies on the transformation of water hyacinth through hydrothermal carbonization (Román 2020, Zhang et al. 2020), however have rarely been studied on energy conversion efficiency of water hyacinth into biochar and biooil.

Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects of various operation conditions on energy conversion efficiency and characteristics of the final products using compressed water hyacinth through hydrothermal carbonization.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

Water-born water hyacinth used in this study was collected from Suijo Park in Saitama, Japan. The collected water hyacinth was immediately transported to a laboratory at Soka University and crushed and squeezed to separate to liquid and solid residues. The solid residue was dried at 45°C for 48 hr in a drying oven (WFO-510, Eyela). The dried solid residue was sieved with particle size less than 2 mm (WH), and then stored in a drying oven at 90°C for 24 hr for further experiments. The WH sample used in this study showed 11.8% of moisture content, 39.6% of total carbon, and 16.4 MJ kg⁻¹ of higher heating value (HHV; Table 1).

2.2 Hydrothermal carbonization of water hyacinth

To investigate the effects of operating reaction temperatures and retention time on HTC, three operating reaction temperatures (210°C, 240°C, and 270°C) and three retention times (1, 2, and 4 hr) were performed using an electric furnace (FUW242PA, Advantec). Hereafter, the operating conditions are expressed as operating reaction temperature/retention time such as 210/1 and

Table 1. Main characteristics of solid residue of water hyacinth.

pH	Moisture content (%)	C (%)	H (%)	N (%)	O [†] (%)	Higher heating value (MJ kg ⁻¹)
6.75	11.8	39.6	6.11	1.81	52.5	16.4

[†] Difference by 100% – (C%+H%+N%)

270/4. Approximately 4.0 g of dried WH and 60 mL of distilled water were filled in a 100 mL stainless steel autoclave vessel (TX-202, Huanyu). The vessel was purged with high purity nitrogen gas to avoid oxygen in the vessel. The vessel was completely enclosed with a steel handle. The temperature was raised to the desired temperature at a heating rate of 5°C min⁻¹ and kept for a specific retention time at the reaction temperature (Zhang et al. 2020). After the reaction, the vessel was left to cool down to room temperature. The sample was taken out and recovered from the vessel, and stirred with 80 mL of dichloromethane for 2 hr in glass beaker to separate into solid product, biooil, and aqueous phase (Jaiswal et al. 2021). The solid and liquid phases were separated by vacuum filtration by filter paper (Whatman No.1). The solid residual was rinsed in deionized water for 24 hr, dried in the oven at 95°C, weighed and designated as solid product. The liquid phase was loaded into a separatory funnel, then separated to obtain a water-soluble oxygenated hydrocarbon designated as aqueous phase, and dichloromethane mixed with biooil in the bottom of the funnel. The dichloromethane compound was evaporated at room temperature, weighed, and designated as biooil. Each experiment was performed at least three times to ensure repeatability and reliability.

The yield percentage of each of the final products was calculated as follows:

$$\text{Solid product yield (SY)(wt\%)} = \frac{\text{weight of solid product}}{\text{weight of WH}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{Biooil yield (OY)(wt\%)} = \frac{\text{weight of biooil}}{\text{weight of WH}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\begin{aligned} \text{Aqueous phase and gas yield (AY)(wt\%)} \\ = \frac{\text{weight of (WH - solid product - biooil)}}{\text{weight of WH}} \times 100\% \end{aligned} \quad (3)$$

2.3 Analytical procedures of hydrothermal products of water hyacinth

The dried WH and the final products (solid product and biooil) from each HTC operation were analyzed for elemental composition and higher heating value (HHV). The elemental composition of each sample was determined using a CHNS organic elemental analyzer (2400II, PerkinElmer). The total amount of O was calculated by the difference between 100% and sum of C%, N%, and H%. The HHV of each sample was determined by a bomb calorimeter (6050, Parr) in accordance to is based on ASTM D240-19 (ASTM 2019).

In order to determine energy conversion efficiency of HTC operation, energy densification and energy recovery efficiency of the final products (solid product or biochar and biooil) were calculated by the following formulas:

$$\text{Energy densification (ED)} = \frac{\text{HHV of solid product or biooil}}{\text{HHV of WH}} \quad (4)$$

$$\begin{aligned} \text{Energy recovery efficiency (\%)} \\ = (\text{yield of biochar or biooil (\%)} \times \text{ED of biochar or biooil}) \end{aligned} \quad (5)$$

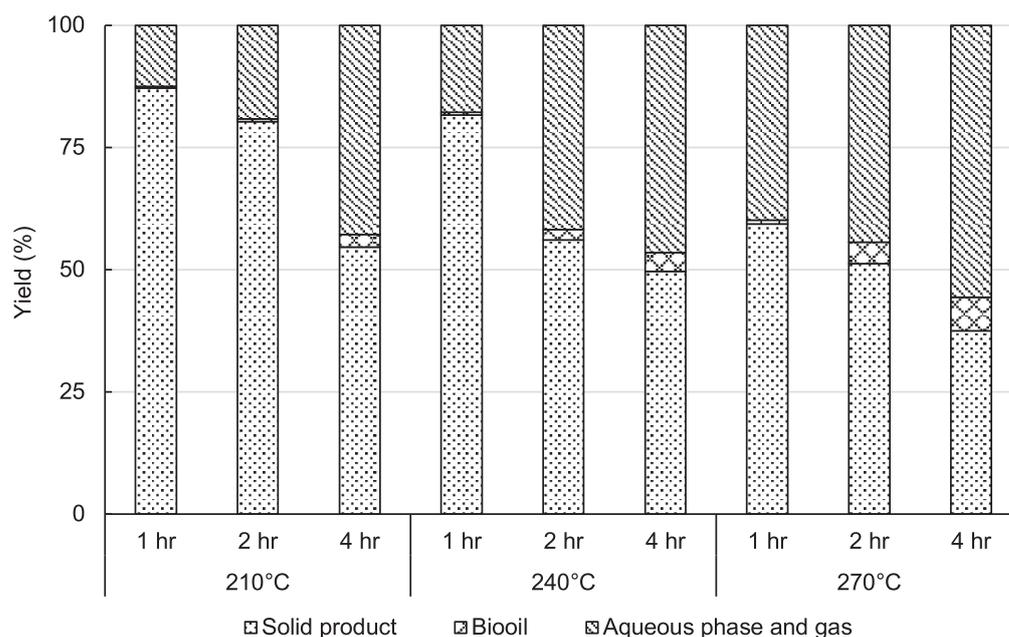


Figure 1. Relative yield percentages of solid product, biooil, and aqueous product and gas from hydrothermal carbonization of water hyacinth.

3. RESULTS

3.1 Yields of hydrothermal carbonization products

The HTC reaction of WH was performed at three different temperatures of 210°C, 240°C, and 270°C for three different retention times of 1, 2, and 4 hr. Relative yields of solid product (SY), biooil (OY), and aqueous phase and gas (AY) showed wide ranges (37.5%–87.2%, 0.35%–6.86%, 12.5%–55.6%, respectively (Fig. 1). The operating condition of 210/1 resulted in the highest SY and was not significantly different from those of 210/2 and 240/1, but these values were significantly higher than those of other operating conditions. The maximum OY and AY values were observed at operating condition of 270/4.

3.2 Elemental analysis of hydrothermal carbonization products

Relative C, H, N, and O contents of solid product ranged between 42.7%–50.0%, 3.56%–5.27%,

1.48%–1.97%, and 44.5%–50.3%, respectively, and those of biooil between 64.8%–71.1%, 9.58%–16.9%, 0.54–2.47%, 11.5%–24.3%, respectively (Table 2). As operating temperature and retention time increased, C and N contents increased and H and O contents decreased in the solid product, while there were no particular trends in elemental contents except for increasing N in biooil with increasing operating temperature and retention time.

3.3 Fuel characteristic of hydrothermal carbonization products

Comparing with WH (16.4 MJ kg⁻¹), HHV values of solid product and biooil overall increased to 16.0–19.7 and 23.1–27.8 MJ kg⁻¹, respectively (Table 2). The maximum HHV of solid product and biooil were observed at operating conditions of 270/4 and 240/4, respectively. HHV values of solid product overall increased with both increasing operating temperature and retention time, while those of biooil overall increased only with increasing retention time (Fig. 2).

Table 2. Elemental analysis and higher heating value for water hyacinth, solid product, and biooil.

Operating conditions [†]	Elemental analysis (%)				Higher heating value (MJ kg ⁻¹)	Energy densification
	C	H	N	O [‡]		
Water hyacinth						
	39.6	6.11	1.81	52.5	16.4	-
Solid product						
210/1	42.7	5.27	1.51	50.5	16.1	0.983
210/2	43.0	5.04	1.54	50.4	16.0	0.974
210/4	44.4	4.16	1.82	49.6	17.9	1.09
240/1	43.2	5.05	1.48	50.3	16.0	0.976
240/2	46.1	4.20	1.85	47.9	17.8	1.09
240/4	48.8	4.33	1.59	45.3	19.2	1.17
270/1	45.5	4.49	1.67	48.3	17.1	1.04
270/2	46.8	4.20	1.70	47.4	18.5	1.13
270/4	50.0	3.56	1.97	44.5	19.7	1.20
Biooil						
210/1	69.9	14.8	0.540	14.7	23.1	1.41
210/2	70.2	16.2	0.780	12.9	25.4	1.55
210/4	67.8	12.1	1.63	18.4	25.9	1.58
240/1	71.1	16.9	0.567	11.5	24.8	1.51
240/2	64.5	9.60	1.60	24.3	26.3	1.60
240/4	67.0	10.8	2.16	20.1	27.8	1.69
270/1	69.1	13.4	1.20	16.3	25.0	1.52
270/2	65.3	9.58	2.04	23.1	23.8	1.45
270/4	69.9	10.8	2.47	16.8	26.2	1.60

[†] Operating conditions refer to operating temperature (210°C, 240°C, and 270°C) and retention time (1, 2, and 4 hr).

[‡] Difference by 100% – (C%+H%+N%)

$$\text{Energy densification (ED)} = \frac{\text{HHV of product}}{\text{HHV of WH}}$$

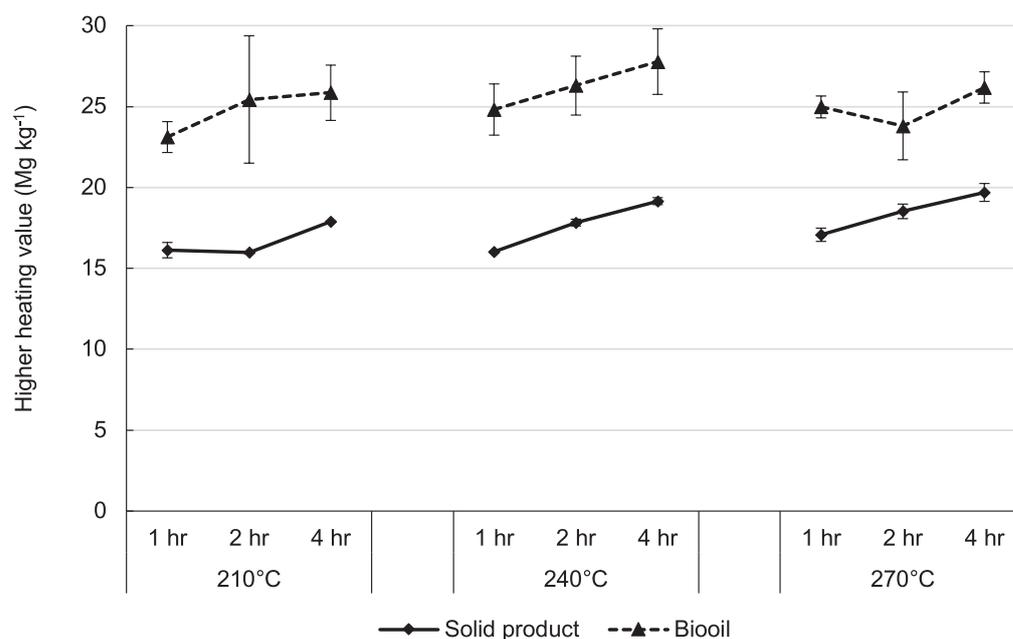


Figure 2. Higher heating values of solid product and biooil from hydrothermal carbonization of water hyacinth.

In addition, when operating temperature and retention time increased, ED of solid product overall increased, however ED of biooil was overall positively affected with only increasing retention time (Table 2). The highest ED values were obtained at operating conditions of 270/4 and 240/4 for solid product and biooil, respectively. Noteworthy was that ED values of solid product at operating conditions of 210/1, 210/2, and 240/1 were below 1.00 (0.983, 0.974, 0.976, respectively (Table 2), which meant HHV of solid product was lower than that of WH feedstock. This may be explained by a possibility of operating temperature and retention time being too low and short to complete HTC reactions to form biochar and biooil (uncarbonized). In fact, visual observation of solid product at these operating conditions (Fig. 3b, 3c, and 3d) revealed that appearance was similar to that of WH (Fig. 3a) and different from that at operation condition of 270/1 (Fig. 3e), which could represent functional biochar produced through HTC. Therefore, in this study, solid product of these 3 operating conditions were excluded as uncarbonized

product, and those at the rest of operation conditions were defined as biochar.

3.4 Energy characteristic of hydrothermal carbonization products

Energy recovery efficiency of biochar (excluding uncarbonized product at operating conditions of 210/1, 210/2, and 240/1) exhibited 45.0%–61.7% and overall showed a decreasing tendency with increasing operating temperature (comparing only 4 hr retention time among 3 different temperatures) and retention time (comparing only between 240°C and 270°C temperatures, respectively (Fig. 4). On the other hand, energy recovery efficiency of biooil exhibited 1.28%–10.9% and overall showed an increasing tendency with increasing operating temperature (comparing only 4 hr retention time among 3 different temperatures) and retention time (comparing only between 240°C and 270°C temperatures, respectively; Fig. 4). The sum of energy recovery efficiency of biochar and biooil resulted in an almost equivalent range of 63.0% and 64.5%, except for

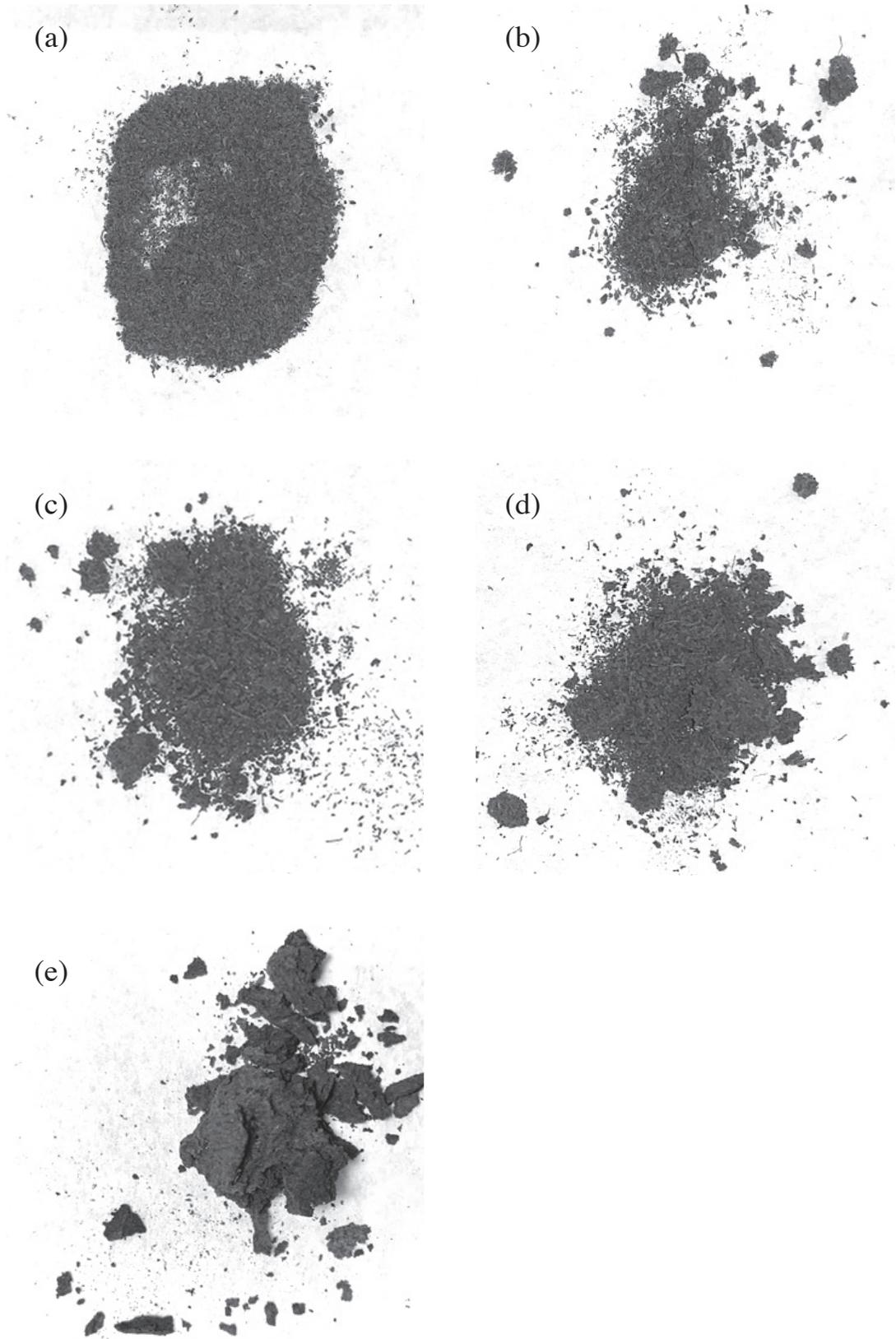


Figure 3. Images of (a) water hyacinth before and solid products after hydrothermal carbonization of water hyacinth with operating conditions (b) 210/1, (c) 210/2, (d) 240/1, and (e) 270/1.

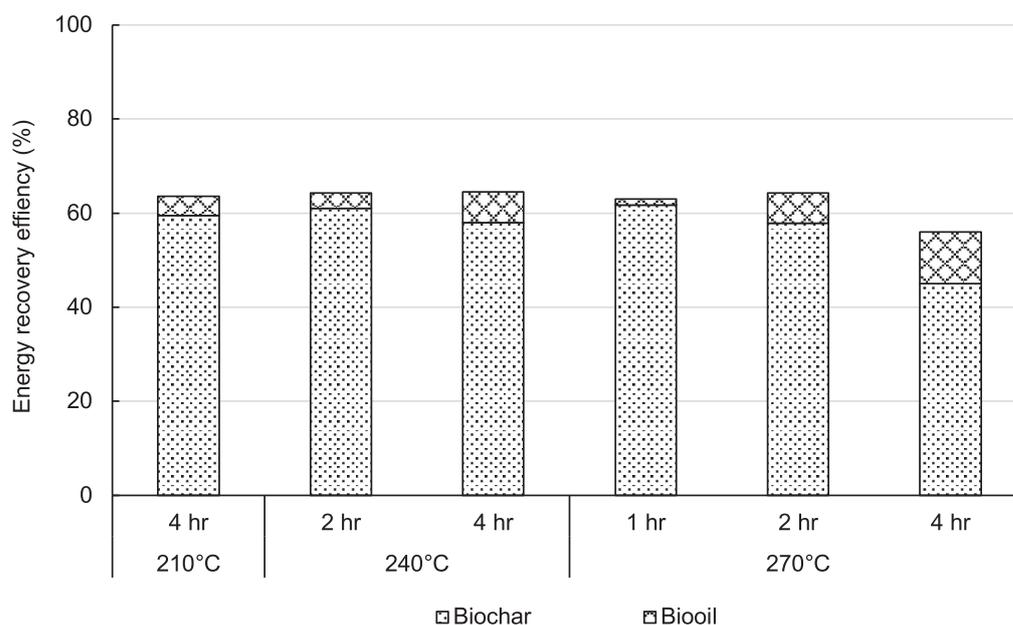


Figure 4. Energy recovery efficiency of biochar and biooil from hydrothermal carbonization of water hyacinth.

that at operating condition of 270/4 showing 56.0%.

4. DISCUSSION

4.1 Effects of operating temperature and retention time on energy conversion

In this study, energy conversion from varying operating conditions showed 56% to 64.5% (Fig. 3). The best energy conversion efficiency was achieved at operation 240/4 comprising of 58.0% from biochar and 6.5% from biooil, most of which came from biochar. The higher the operating temperature and the longer retention time were, the lower the yield of biochar obtained (Fig. 1) which was the main reason for lower energy conversion. Higher temperature and longer reaction time could lead to enhanced migration of C to gas phase as mostly CO₂ meaning reduced energy conversion efficiency as biochar (Singh 2015). Comparing energy conversion of hydrothermal carbonization with other studies, Zhang (2020) showed the highest hydrochar (biochar produced through HTC) energy recovery efficiency from WH of

66.1% at operating condition of 210°C for 0.5 hr and the lowest of 39.8% at 270°C for 1 hr. Román (2012) showed that the highest energy conversion efficiency on hydrochar from walnut shell was 58.9% at operating temperature of 190°C for 20 hr, and the lowest was 49.6% at 230°C for 20 hr. The different results in energy conversion efficiency may indicate that there are other variables than operating temperature and retention time such as type of feedstock, amount and type of liquid mixed with feedstock, and operating environment such as size and withstanding pressure of carbonizing reactor. In this study, the sum of energy conversion of biochar and biooil was comparable with other studies and approximately same for all operating conditions except for 270/4. Therefore, it appears that these operating conditions used in this study were suitable for HTC of water hyacinth. However, depending on demand for different final products, an operation of 270/1 may be suitable for large energy conversion by biochar and an operation of 270/4 can produce high energy conversion by biooil.

4.2 Effects of operating temperature and retention time on hydrothermal reaction

Operating temperature played important roles on the final product yields during HTC process in this study, which was consistent with previous studies that showed temperature was the most critical parameter for the conversion process (Garrote et al. 1999). At all retention times (1, 2, and 4 hr), SY decreased and OY increased with increasing operating temperature (from 210°C to 240°C then 270°C; Fig. 1). Reza (2014) explained that temperature accelerated kinetic energy on HTC reaction at the beginning of the process. Mok & Antal (1992) referred that through decarboxylation and depolymerization reactions happened at the first stage of HTC, hemicellulose and lignin in biomass began to degrade with water at operating temperature from 190°C, and dissolve into water from 220°C. These reactions also led to forming the liquid phase intermediates in which a variety of organic compounds were incorporated (Xiu et al. 2010). The intermediates could undergo a wide range of reactions such as isomerization, dehydration, and condensation, which could separate the intermediates into biochar, biooil, and aqueous phase (Bobleter 1994).

Retention time also showed important effects on the final product yields during HTC reaction. At all operating temperatures (210°C, 240°C, and 270°C), increasing retention time (from 1 to 2 then 4 hr) caused decrease of SY and increase of OY (Fig. 1). Noteworthy was that operating conditions of 210/1, 210/2, and 240/1 probably did not create enough energy to complete HTC reactions to form biochar resulting in high SY (80.3%–87.2%) of uncarbonized products. However, longer retention time even with lower temperatures (210/4, and 240/2, and 240/4) could create enough energy to complete the first HTC reaction of decomposition to form biochar, then as a result SY was reduced (49.7%–56.1%). In case of operating temperature of 270°C, even with

short retention times (1 and 2 hr), it is possible that there was enough energy to complete the decomposition reaction to form biochar. Therefore, SY values at 270/1 and 270/2 (51.3%–59.3%) were comparable with those at operating conditions of 210/4, and 240/2, and 240/4. However, 270/4 caused significant reduction of SY to 37.5% probably because the secondary HTC reaction of repolymerization may have continued longer to partially convert biochar to biooil (Zhang et al. 2020), resulting in high OY (6.86%).

Relationship between O/C and H/C atomic ratios of feedstock (WH) and the final products (solid product and biooil) under different operating conditions can be summarized as van Krevelen diagram (Fig. 5), which can represent different reactions during HTC such as dehydration, decarboxylation, and demethylation. WH used in this study had O/C (0.99) and H/C (1.8) ratios which fell in a category of carbohydrate based on van Krevelen diagram for major biomolecular component areas (Julien et al. 2016). Solid product produced in this study had O/C and H/C ratios ranging 0.67–0.89 and 0.8–1.5, respectively, which decreased when operating temperature and retention time increased (Fig. 5). van Krevelen diagram can suggest that the dominant HTC mechanism was dehydration resulting in C-richer solid product from WH with increasing temperature and retention time, which was represented by a tannin category in van Krevelen diagram (van Krevelen 1982, Kambo et al. 2017). In addition, decreasing O and H contents of solid product with increasing temperature and retention time (Table 2) can also explain the reason for decreasing solid product yield (Fig. 1) through dehydration reaction during HTC (Lu et al. 2013). On the other hand, biooil produced in this study had O/C and H/C ratios ranging 0.12–0.28 and 1.75–2.83, respectively, which partially fell in a category of biocrude oil based on van Krevelen diagram (Cheng et al. 2021). Increased H/C and decreased O/C ratios of

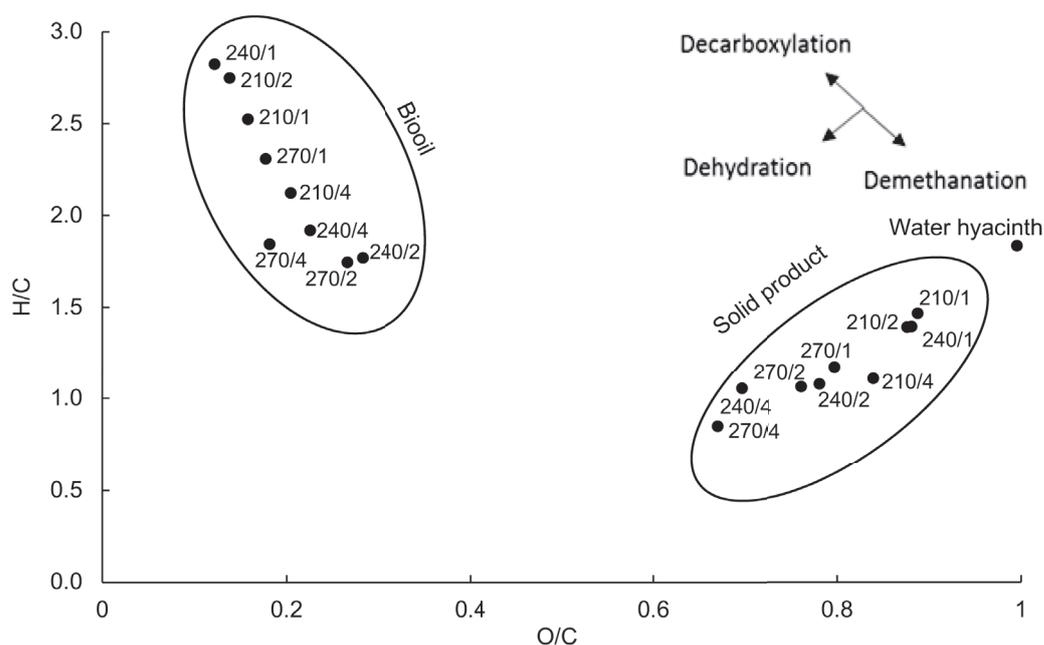


Figure 5. van Krevelen diagram showing the H/C and O/C atomic ratios of water hyacinth, solid product, and biooil from hydrothermal carbonization of water hyacinth.

biooil compared with those of WH could be explained by hydrodeoxygenation which could happen during the initial reaction of HTC (Bi et al. 2014). Among biooil produced at different operating conditions, those at middle temperature and retention time (e.g., 210/4, 240/2, and 240/4) probably went through a next HTC reaction of demethanation which lost more H per mole of C. Then, next reaction could be decarboxylation which lost more O per mole of C resulting in reduced O/C ratio for biooil produced at higher temperature (e.g., 270/2 and 270/4).

5. CONCLUSION

This study investigated the effects of various hydrothermal reactions at different temperatures and retention times on energy conversion efficiency and characteristics of the final products using compressed water hyacinth through hydrothermal carbonization. In this study, it was shown possible to convert water hyacinth biomass to biochar and

biooil through HTC. HTC's best performance in energy conversion from biochar and biooil was 64.5% at operating temperature of 240°C and retention time of 4 hr. Biochar and biooil yields greatly varied depending on operating conditions. Therefore, depending on demand for different final products, operation of 270/1 may be suitable for large energy conversion by biochar and operation of 270/4 can produce high energy conversion by biooil. It was shown that hydrothermal carbonization had a potential to increase value on WH feedstock due to producing C-rich fuel when appropriate operating conditions were applied. However, there are still low yields of biooil which potentially contains high gross energy. Therefore, there are needs to evaluate other variables such as type of feedstock, amount and type of liquid mixed with feedstock and operating environment such as size and withstanding pressure of carbonizing reactor to improve energy conversion efficiency through hydrothermal carbonization.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are thankful to city government of Saitama City for allowing to sample water hyacinth. This research was supported by Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development (SATREPS; Grant Number JPMJSA2005) funded by Japan Science and Technology Agency (JST)/Japan International Cooperation Agency (JICA).

List of figures

Figure 1. Relative yield percentages of solid product, biooil, and aqueous product and gas from hydrothermal carbonization of water hyacinth.

Figure 2. Higher heating values of solid product and biooil from hydrothermal carbonization of water hyacinth.

Figure 3. Images of (a) water hyacinth before and solid products after hydrothermal carbonization of water hyacinth with operating conditions (b) 210/1, (c) 210/2, (d) 240/1, and (e) 270/1.

Figure 4. Energy recovery efficiency of biochar and biooil from hydrothermal carbonization of water hyacinth.

Figure 5. van Krevelen diagram showing the H/C and O/C atomic ratios of water hyacinth, solid product, and biooil from hydrothermal carbonization of water hyacinth.

REFERENCE

- ASTM (2019) Standard test methods for heat combustion of liquid hydrocarbon fuels by Bomb Calorimeter, *ASTM D240-0919*. Am Soc Test Mater, USA
- Bobleter O (1994) Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Prog Polym Sci* 19: 797–841.
- Bi Y, Wang G, Shi Q, Xu C, Gao J (2014) Compositional changes during hydrodeoxygenation of biomass pyrolysis oil. *Energy Fuel* 28: 2571–2580.
- Cheng F, Tompsett G, Alvarez D, Romo C, McKenna A, Niles S, Nelson R, Reddy C, Granados FS, Paulsen A, Ruihan Z, Timko M (2021) Metal oxide supported Ni-Impregnated bifunctional catalysts for controlling char formation and maximizing energy recovery during catalytic hydrothermal liquefaction of food waste. *Sustain Energy Fuels* 5: 941–955.
- Dersseh MG, Kibret AA, Tilahun SA, Worqlul AW, Moges MA, Dagnaw DC, Abebe WB, Melesse AM (2019) Potential of water hyacinth infestation on Lake Tana, Ethiopia: A prediction using a GIS-Based multi-criteria technique. *Water* 11:1921.
- Demirbas A, Arin G (2002) An overview of biomass pyrolysis. *Energy Sources* 24: 471–482.
- Garrote G, Domínguez H, Parajó JC (1999) Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz Roh Werkstoff* 57: 191–202.
- Hill M, Coetzee J, Julien M, Center T (2011) Water Hyacinth. In: Simberloff D, Rejmanek M (ed.) *Encyclopedia of Biological Invasions*. University of California Press, Berkeley, 689–692 pp.
- Hudakorn T, Srirakul N (2020) Biogas and biomass pellet production from water hyacinth. *Energy Rep* 6: 532–538.
- Jaiswal K, Kumar V, Verma R, Verma M, Kumar A, Vlaskin M, Nanda M, Kim H (2021) Graphitic bio-char and bio-oil synthesis via hydrothermal carbonization-co-liquefaction of microalgae biomass (oiled/de-oiled) and multiple heavy metals remediations. *J Hazard Mater* 409: 124987
- Julien G, Mourad H, Olivier M, Marianna L, Lionel R, Jean L, Philippe SK (2016) Ultrahigh-resolution FT-ICR mass spectrometry for molecular characterisation of pressurised hot water-extractable organic matter in soils. *Biogeochemistry* 128: 307–326.
- Kambo HS, Minaret J, Dutta A (2018) Process water from the hydrothermal carbonization of biomass: A waste or a valuable product? *Waste Biomass Valor* 9: 1181–1189.
- Li C, Yang X, Zhang Z, Zhou D, Zhang L, Zhang S, Chen J (2013) Hydrothermal liquefaction of desert shrub *Salix psammophila* to high value-added

- chemicals and hydrochar with recycled processing water. *Bioresources* 8: 2981–2997.
- Lu X, Pellechia PJ, Flora JR, Berge ND (2013) Influence of reaction time and temperature on product formation and characteristics associated with the hydrothermal carbonization of cellulose. *Bioresource Technol* 138: 180–190.
- Mok WS, Antal MJ (1992) Uncatalyzed solvolysis of whole biomass hemicellulose by hot compressed liquid water. *Ind Eng Chem Res* 31: 1157–1161.
- Moki EC, Oyibo MC, Yauri AU, Rapheal IA., Yahaya Y, Ogunleye AO (2020) Enhancing the properties of water hyacinth biomass briquettes by Mercerization Process. *Int Res J Pure Appl Chem* 21: 43–55.
- Reza MT, Uddin MH, Lynam JG, Hoekman SK, Coronella CJ (2014) Hydrothermal carbonization of loblolly pine: Reaction chemistry and water balance. *Biomass Convers Biorefin* 4: 311–321.
- Román S, Ledesma B, Álvarez A, Coronella C, Qaramaleki SV (2020) Suitability of hydrothermal carbonization to convert water hyacinth to added-value products, *Renew Energ* 146: 1649–1658.
- Román S, Nabais JMV, Laginhas C, Ledesma B, González JF (2012) Hydrothermal carbonization as an effective way of densifying the energy content of biomass, *Fuel Process Technol* 103: 78–83.
- Sahoo D, Awasthi A, Dhyani V, Biswas B, Kumar J, Yenumala S, Adarsh V, Puthiyamadam A, Mallepuredy K, Sukumaran R, Beevi US, Bhaskar T (2019) Value-addition mixture of water hyacinth and para grass a Loktak lake biomass through pyrolysis and hydrothermal liquefaction. *Carbon Resour Convers* 2: 233–241.
- Singh R, Balagurumurthy B, Prakash A, Bhaskar T (2015) Catalytic hydrothermal liquefaction of water hyacinth. *Bioresource Technol* 178: 157–165.
- van Krevelen DW (1982) Development of coal research — a review. *Fuel* 61:786–790.
- Worku M, Sahile S (2018) Impact of water hyacinth, *Eichhornia crassipes (Martius) (Pontederiaceae)* in lake Tana Ethiopia: a review. *J Aquac Res Dev* 9: 520.
- Xiu S, Shahbazi A, Shirley V, Cheng D (2010) Hydrothermal pyrolysis of swine manure to bio-oil: Effects of operating parameters on products yield and characterization of bio-oil. *J Anal Appl Pyrol* 88: 73–79.
- Yao Z, Ma X (2019) Hydrothermal carbonization of Chinese Fan Palm. *Bioresource Technol* 282: 28–36.
- Zhang C, Ma X, Chen X, Tian Y, Zhou Y, Lu X, Huang T (2020) Conversion of water hyacinth to value-added fuel via hydrothermal carbonization. *Energy* 197: 117–193.

カイアシ類 1 個体からの DNA 抽出方法の改良とホルマリン固定期間がミトコンドリア遺伝子の PCR 増幅に与える影響

小林真輝¹⁾、高山佳樹²⁾、下出信次³⁾、戸田龍樹¹⁾、黒沢則夫^{1)*}

1) 創価大学大学院理工学研究科 〒192-8577 東京都八王子市丹木町 1-236

2) 創価大学プランクトン工学研究所 〒192-8577 東京都八王子市丹木町 1-236

3) 横浜国立大学大学院環境情報研究院附属臨海環境センター 〒259-0202 神奈川県足柄下郡真鶴町岩 61

Improvement of the extraction of DNA from single copepod samples and the effect of formalin fixation time on the PCR amplification of a mitochondrial gene

Maki Kobayashi¹⁾, Yoshiki Takayama²⁾, Shinji Shimode³⁾, Tatsuki Toda¹⁾, Norio Kurosawa^{1)*}

1) *Graduate School of Science and Engineering, Soka University, 1-236 Tangi-machi, Hachioji, Tokyo 192-8577, Japan*

2) *Institute of Plankton Eco-Engineering, Soka University, 1-236, Tangi-machi, Hachioji, Tokyo 192-8577, Japan*

3) *Manazuru Marine Center for Environmental Research and Education, Graduate School of Environment and Information Sciences, Yokohama National University, 61 Iwa, Manazuru, Kanagawa 259-0202, Japan*

* *Corresponding author: kurosawa@soka.ac.jp*

2022 年 5 月 1 日受付, 2022 年 5 月 23 日受理

Abstract Considerable skill is required to identify copepods at the species level based on their morphological characteristics. However, DNA analysis does not require advanced microscopy techniques and provides objective data on the phylogenetic relationships between samples. Therefore, DNA analysis is useful as an alternative method for taxonomic studies of copepods. The lysis buffer method by Lee & Frost (2002) is a simple protocol for extracting DNA from single copepod samples. In this method, a fixative, such as formalin, is first replaced with ethanol and a buffer solution. Then, the copepod sample is lysed in the lysis buffer containing a proteolytic enzyme. Thus far, we have conducted DNA extraction of single copepod samples using this method and performed gene amplification by PCR. However, due to the low success rate of PCR amplification, genetic data could not be obtained for approximately 50% of the formalin-fixed samples. In this study, we improved the lysis buffer method with the aim of enhancing the success rate of DNA extraction and PCR amplification from single copepod samples. In addition, the effect of formalin fixation time on PCR amplification was also examined.

Zooplankton samples were collected from Manazuru Port, Sagami Bay on September 14, 2017, using a plankton net with a mesh size of 180 μm and fixed with 5% neutralized formalin-seawa-

ter. Adult females of the calanoid copepod *Acartia japonica* were selected from these samples and stored individually in ethanol. DNA was extracted from these copepods via a modified ethanol removal method, with adjustments made to the dilution of the lysis buffer, and incubation time. The mitochondrial cytochrome b gene was amplified from these DNA samples by PCR. When the concentration of the PCR product was 20 ng μL^{-1} or more, PCR amplification was considered to be successful. Based on the conditions optimized by the above studies, the effect of the formalin fixation time on the PCR amplification of copepods was also investigated.

A higher success rate was obtained when natural drying or vacuum drying was performed to remove ethanol during DNA extraction rather than removal by pipetting. Since there was no significant difference between the results of natural drying and vacuum drying, natural drying, which is easier to perform, was selected as the optimum method. We also confirmed that a high success rate was maintained without diluting the lysis buffer after the inactivation of proteolytic enzyme. Regarding the incubation time for lysis, changing from the conventional 60 minutes to 30 minutes did not result in a significant decrease in the success rate of PCR amplification. Thus, the success rate of PCR increased to approximately 90%. Additionally, compared with the conventional lysis buffer method, the number of steps was reduced by half, and the required time was shortened from 1.5 hours to approximately 50 minutes. Furthermore, we confirmed that this improved lysis buffer method can be applied to single cells of small protozoa such as flagellates and ciliates. The effect of formalin fixation time on PCR amplification of the mitochondrial cytochrome b gene after DNA extraction via this improved lysis buffer method was investigated. As expected, the success rate of PCR amplification decreased with the formalin fixation time. However, when the fixation period was within 1 month, PCR products with a concentration of more than 20 ng μL^{-1} were obtained in 95% of the individual copepod samples. Furthermore, even after 3 months, similar concentrations of PCR product were obtained in 80% of individuals.

Genetic analysis of small zooplankton is increasingly important not only in taxonomy but also for biodiversity and phylogeographic studies. The data presented in this study will be very important and useful in such studies.

Keywords: copepod, DNA extraction, formalin, lysis buffer, PCR amplification

1. 序論

カイアシ類は、甲殻亜門カイアシ亜綱に属する体長が0.3 mmから10 mmほどの小型甲殻類である。現在9目8000種以上が記載され、浮遊性や底生性種の他、魚類や無脊椎動物に寄生する種も存在する (Boxshall & Halsey 2004)。極域を含む世界中の海洋と淡水域のほか、一部は陸上の土壌中など幅広い環境中に生息し

ている (Razouls et al. 2005-2022)。また、海洋に生息するカイアシ類の生物量は、海洋動物プランクトン全体の約8割を占めていると言われており (Mauchline 1998)、魚類や肉食性動物プランクトンの主要な餌となっている。同時に多くのカイアシ類は植物プランクトンを摂餌することから、食物連鎖において一次生産者と高次消費者をつなぐ重要な役割を担っている (Mauchline 1998)。さらに前述の寄生性カイアシ類は養殖魚の健康に悪

影響を与える一方で (Johnson et al. 2004)、仔稚魚の優れた餌として注目されているカイアシ類も存在する (Støttrup 2003)。このようにカイアシ類は、水圏生態学および水産学両分野で重要視される生物として、分類学的研究や生態学的研究が盛んに行われている。

一般に、カイアシ類の分類学的研究は顕微鏡を用いた形態観察によって行われてきた (Bradford-Grieve 2010)。しかしながら、小型な種が数多く存在し、そのような種では特徴的な部位を判別し難い (Hirai et al. 2013) ことや、形態がよく似た種も多く存在することから、種レベルの同定や分類を行うには相当の経験を必要とし、研究者によって結果が異なる可能性も含んでいる。一方 DNA 解析は高度な手技を必要とせず、個人差が生じ得ない塩基配列に基づいて評価を行うためより客観的である。また、属や種間はもとより種内の進化系統関係を定量的に推測することも可能である。これらのことから、DNA 解析はカイアシ類の新たな分類方法として近年広く利用されるようになってきた (Goetze 2005, Hirai et al. 2015, Cornils et al. 2017)。

DNA 解析を行うためにはまず DNA を抽出する必要があるが、この方法の 1 つとして Lysis buffer 法がある (Lee & Frost 2002)。この方法は、カイアシ類 1 個体から DNA を抽出する方法として報告されたもので、まずホルマリンなどの固定液をエタノールに置換し、次にエタノールをピペッターで取り除く。その後タンパク分解酵素を含む Lysis buffer 中でカイアシ類の個体を部分的に溶解し、最後にタンパク質分解酵素を失活させて DNA 試料とする。当研究室ではこれまで、この Lysis buffer 法を用いてカイアシ類の DNA 抽出を行ってきた。しかしながら、PCR 増幅までの成功率が 50% 程度と低く、分析に使用した個体の多くが無駄になってしまうという問題があった。成功率が低い原因として、エタノールの残存や溶解効率の低さも考えられたが、ピペッティング操作に伴う個体の喪失も大きな原因と考えられた。本研究では、カイアシ類 1 個体からの DNA 抽出と PCR 増幅までの成功率を 100% に近づけることを目的として、Lysis buffer 法における各工程の条件について再検討を行うとともに

に、工程全体の簡略化を試みた。加えて、試料採集から DNA 抽出までの期間を様々に設定することにより、ホルマリン固定期間がカイアシ類の遺伝子の PCR 増幅に及ぼす影響についても検証した。

2. 材料と方法

2-1. 試料採集

2017 年 9 月 14 日に相模湾真鶴港 (35°09'N, 139°10'E) において目合 180 μm 、口径 30 cm のプランクトンネットを用いて動物プランクトンを採集し、5% 中性ホルマリン海水で固定した。このバルク試料から、実体顕微鏡下で *Acartia japonica* (Calanoida 目、Acartia 科、*Acartia* 属、*Odontacartia* 亜属) の雌成体を選別した。DNA 抽出方法の改良に用いた個体は、シャーレに取った少量の純水に短時間浸漬した後、あらかじめ 0.2 mL の PCR 用チューブに分注された 99.5% エタノール 50 μL 中に 1 個体ずつ浸漬し、DNA 抽出を行うまで 4°C で保存した。ホルマリン固定期間の影響を調べた実験では、設定した固定期間 (2-4 参照) が経過した後純水洗浄とエタノール置換を行い、同様の方法で保存した。

2-2. DNA 抽出方法の検討

Lysis buffer 法 (Lee & Frost 2002) をもとに、エタノール除去方法および Lysis buffer の量と溶解時間を変えて DNA を抽出し、得られた DNA を鋳型として PCR 増幅を行い、その結果に基づいて各工程の最適条件を決定した。併せて行程の簡略化を行った。Lysis buffer の組成は、原報と同じく 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.5% Tween 20、50 mM KCl、20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Proteinase K とした。1 実験区につき 20 個体を用いた。

2-2-1. エタノール除去方法

エタノール浸漬試料から、ピペッターを用いてエタノールを除去した。この時、*A. japonica* 個体を誤って吸い取ってしまうことを避けるため、完全にエタノールを除去せず、5 μL 程度のエタノールはチューブに残し

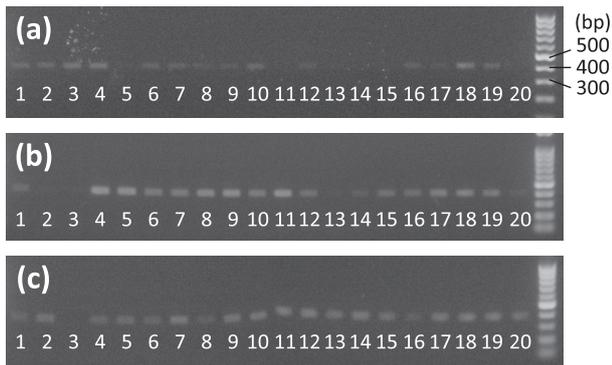
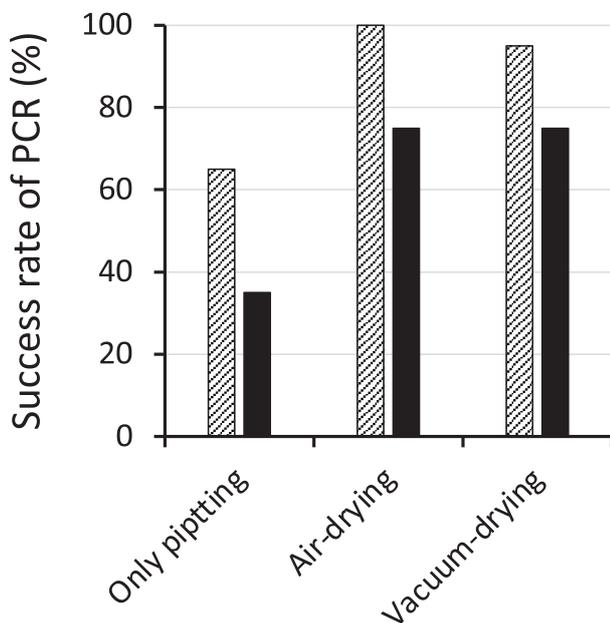


Figure 1. Agarose gel electrophoresis of PCR products in the study of ethanol removal methods. Ethanol was removed from the ethanol-soaked copepod samples by (a) pipetting only, (b) pipetting and natural drying, and (c) pipetting and vacuum drying. Twenty *A. japonica* individuals were used for each condition. After the PCR amplification of mitochondrial cytochrome b gene, 2 μ L of the reaction solution was electrophoresed.



Etanol removal method

Figure 2. Success rate of PCR amplification in the study of ethanol removal methods. The proportion of individuals with confirmed PCR products are shown in hatched columns, and with PCR product concentrations of 20 ng μ L⁻¹ or higher are shown in black columns.

た。この試料を3つの条件、すなわち1)そのまま、2)クリーンベンチ内で10分風乾、3)遠心濃縮機を用いて10分真空乾燥した。Lysis bufferを20 μ L加え、65°Cで60分保温して個体を溶解した後、95°Cで15分保温してProteinase Kを失活させた。最後に滅菌水で5倍希釈したものをDNA抽出液としてPCR増幅の鋳型に用いた。

2-2-2. Lysis buffer 量と溶解後の希釈の効果

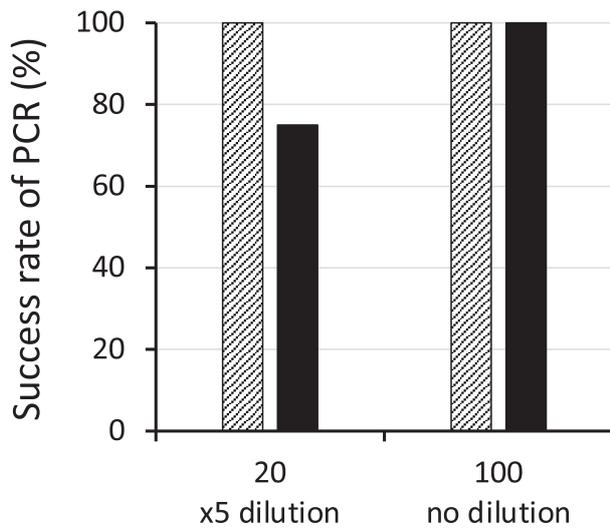
エタノール浸漬試料から、ピペッターを用いてエタノールを9割程度除去した後、チューブのふたを開けた状態で10分風乾しエタノールを完全に揮発させた。この試料について次の2つの条件でDNA抽出を行った。1)2-2-1に記載した条件で冷凍保存まで行った。2)Lysis bufferを100 μ L加え、65°Cで60分保温して個体を溶解した後、95°Cで15分保温してProteinase Kを失活させた。これを滅菌水による希釈無しにDNA抽出液としてPCR増幅の鋳型に用いた。

2-2-3. 溶解時間

エタノール浸漬試料から、ピペッターを用いてエタノールを9割程度除去した後、チューブのふたを開けた状態で10分風乾しエタノールを完全に揮発させた。Lysis bufferを100 μ L加え、65°Cで0~60分保温して個体を溶解した後、95°Cで15分保温してProteinase Kを失活させた。これをDNA抽出液としてPCR増幅の鋳型に用いた。



Figure 3. Agarose gel electrophoresis of PCR products in the study of volume and dilution of lysis buffer. Twenty *A. japonica* individuals were lysed in (a) 20 μ L of the lysis buffer and diluted 5 times with sterile water, or (b) 100 μ L of the lysis buffer (no dilution). After the PCR amplification of mitochondrial cytochrome b gene, 2 μ L of the reaction solution was electrophoresed.



Lysis buffer volume (μL) and dilution of lysate

Figure 4. Success rate of PCR amplification in the study of volume and dilution of lysis buffer. The proportion of individuals with confirmed PCR products are shown in hatched columns, and with PCR product concentrations of 20 ng μL⁻¹ or higher are shown in black columns.

2-3. PCR 増幅と塩基配列解析

2-3-1. PCR 増幅

2-2. で得られた DNA 抽出液を鋳型として、PCR 法によりミトコンドリアの cytochrome b 遺伝子 (mt-cytB) の部分領域を増幅し、2% アガロースゲル電気泳動により PCR 産物の確認と定量を行った。PCR プライマーには、151F (5'-TGTGGRGCNACYGTWATYACTAA) および 270R (5'-AANAGGAARTAYCAYTCNGGYTG) (Milligan et al. 2011) を用いた。PCR 反応液 (全量 25 μL) の組成は、鋳型 DNA 1 μL、2 × PCR プレミックス試薬 (EmeraldAmp[®] MAX PCR Master Mix、タカラバイオ株式会社) 12.5 μL、10 μM Forward および Reverse プライマーをそれぞれ 2.5 μL、滅菌水 6.5 μL とした。反応液をサーマルサイクラーにセットし、初期変性 (94℃、3 分)、[変性 (94℃、30 秒)、アニーリング (50℃、30 秒)、伸長 (72℃、1 分)] を 35 サイクル、最終伸長

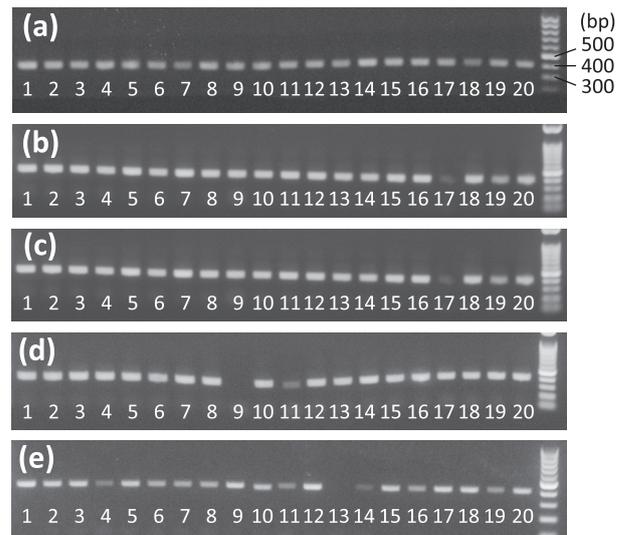


Figure 5. Agarose gel electrophoresis of PCR products in the study of incubation time for lysis. Twenty *A. japonica* individuals were lysed in 100 μL of the lysis buffer for (a) 60, (b) 45, (c) 30, (d) 15, and (e) 0 min. After the PCR amplification of mitochondrial cytochrome b gene, 2 μL of the reaction solution was electrophoresed.

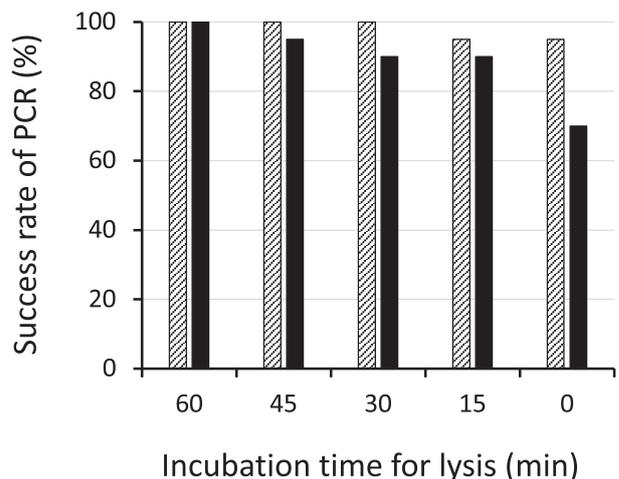


Figure 6. Success rate of PCR amplification in the study of incubation time for lysis. The proportion of individuals with confirmed PCR products are shown in hatched columns, and with PCR product concentrations of 20 ng μL⁻¹ or higher are shown in black columns.

(72°C, 3分) で PCR 増幅を行った。PCR 反応液 2 μ L を 2% アガロースゲルを用いて電気泳動し、増幅の有無と PCR 産物の濃度を確認した。

2-3-2. 塩基配列解析

本実験で得られた PCR 産物が塩基配列解析可能であること、ならびにカイアシ類の *mt-cytB* であることを確認するために、DNA 抽出方法の検討における各実験区のサンプルから無作為に選んだ計 6 サンプルについて、PCR 産物の塩基配列をサンガー法により解析した。得られた塩基配列について、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) を用いて DNA データベースに対する相同性検索を行った。

2-4. ホルモン固定期間が PCR 増幅に与える影響

試料採集後に 5% 中性ホルモン海水で固定したバルクサンプルを、2 週間から 12 週間 4°C で保存し、2 週間毎に実体顕微鏡下で *A. japonica* の雌成体を 20 個体選別した。2-2. により最適化された改良 Lysis buffer 法を用いて 1 個体ごとに DNA を抽出し、前項に記載した方法にしたがって *mt-cytB* 遺伝子の PCR 増幅と生成物の確認を行った。

3. 結果

3-1. DNA 抽出方法の検討

Lysis buffer 法による DNA 抽出条件の最適化を目指して、エタノール除去方法、Lysis buffer の量と溶解後の希釈、および溶解時間について検討した。評価の基礎データとした PCR 増幅産物の電気泳動写真を Fig. 1, 3, 5 に示した。またこの結果に基づいて計算した検討項目毎の PCR 増幅の成功率を Fig. 2, 4, 6 に示した。

Acartia japonica 個体を浸漬したエタノールの除去方法について、ピペッターによる除去のみと、10 分間の風乾または遠心濃縮乾燥を比較した結果を Fig. 2 に示した。ピペッターによる除去のみの場合、PCR 産物が電気泳動により確認できたのは 20 個体中 13 個体 (65%) で、そのうち 20 ng μ L⁻¹ 以上の PCR 産物が得られた

のは 7 個体 (35%) であった。それに対して、風乾または遠心濃縮乾燥では、ほぼすべての個体において PCR 産物が確認され、いずれも 15 個体 (75%) で 20 ng μ L⁻¹ 以上の PCR 産物が確認された。

Lysis buffer の量と溶解後の希釈の効果に関する検討の結果、Lysis buffer 20 μ L 中でカイアシ類個体を溶解し蒸留水で 5 倍希釈した場合、20 個体すべてにおいて PCR 産物が確認されたが、20 ng μ L⁻¹ 以上の PCR 産物が得られたのは 15 個体 (75%) であった。それに対して、Lysis buffer 100 μ L 中でカイアシ類個体を溶解し、蒸留水による希釈をしなかった場合は、20 個体すべてにおいて 20 ng μ L⁻¹ 以上の PCR 産物が得られた (Fig. 4)。

Lysis buffer による溶解時間の検討の結果、溶解時間が 30 分以上の場合、すべての個体において PCR 産物が確認された。そのうち 20 ng L⁻¹ 以上の PCR 産物が得られたのは、溶解時間 60 分で 20 個体 (100%)、45 分で 19 個体 (95%)、30 分で 18 個体 (90%) であった。溶解時間を 15 分または 0 分にした場合は、19 個体 (95%) で PCR 産物が確認され、20 ng μ L⁻¹ 以上の PCR 産物が得られたのはそれぞれ 18 個体 (90%) および 14 個体 (70%) であった (Fig. 6)。

以上の結果から、Lysis buffer を用いたカイアシ類 1 個体からの DNA 抽出の最適条件 (改良 Lysis buffer 法) を次の通りとした (Fig. 7)。1) 個体を浸漬していたエタノールをピペッターで 9 割程度除いた後、10 分風乾することによりエタノールを完全に揮発させる。2) Lysis buffer を 100 μ L 加え、65°C で 30 分保温することによりカイアシ類個体を溶解する。3) 95°C で 15 分保温することにより Proteinase K を失活させる。これを DNA 試料として -25°C 以下で冷凍保存する。

3-2. 塩基配列解析

DNA 抽出方法の検討において得られた PCR 産物 6 サンプル [Fig. 1 (b) 19、20、Fig. 5 (a) 4、11、(b) 11、12] について、サンガー法によりそれぞれ 273 bp の塩基配列を決定した。6 つの塩基配列は互いに 100%

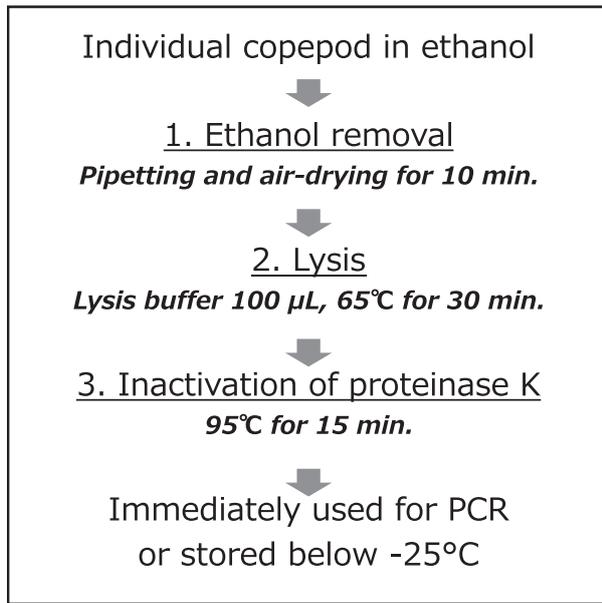


Figure 7. The protocol of improved lysis buffer method.

一致し、BLAST 検索の結果、*Acartia amboinensis* の *mt-cytB* (GenBank 登録番号: LC027648) の相同領域と 75.9% の相同性を示した。以上の結果から、本研究により抽出した DNA を鋳型として PCR 増幅された DNA は *Acartia* 属の *mt-cytB* であり、塩基配列解析にも使用できることを確認した。なお、現時点で *A. japonica* の *mt-cytB* は DNA データベースに登録されていない。

3-3. ホルマリン固定期間が PCR 増幅に与える影響

ホルマリン海水中、2～12 週間 4°C で保存した個体について、3-1. に記した改良 Lysis buffer 法により DNA を抽出し、それらを鋳型として *mt-cytB* を PCR 増幅したときの電気泳動写真を Fig. 8 に示した。またこの結果に基づいて計算した PCR 増幅の成功率を Fig. 9 に示した。ホルマリン固定期間が 2～12 週間では、PCR 増幅が確認された個体数は 19 個体 (95%) 以上で有意差は認められなかった。ただし、20 ng μL^{-1} 以上の PCR 産物が得られた個体数は、固定期間が 2 週間の時の 20 個体 (100%) から徐々に減少し、12 週間後では 16 個体 (80%) であった。

4. 考察

4-1. Lysis buffer 法の改良

序論でも述べた通り、DNA 解析には熟練を要する特別な手技は必要としないが、カイアシ類のような生物 1 個体から確実に DNA を抽出する場合には、微少なサンプルを扱うがゆえの不確かさが伴う。この点で Lysis buffer 法は、操作が比較的簡単かつ少ない工程によって構成されている良い方法である。しかしそれでも DNA 抽出から PCR 法による遺伝子増幅までの成功率は、少なくともわれわれの研究室では 50% 程度と低かったため、今回、各工程の条件の最適化と更なる工程の簡略化を試みた。

Lysis buffer 法 (原法と略す) では、エタノールの除去はバッファー交換により行われるが、本研究により確立した改良 Lysis buffer 法ではピペッターによる除去と風乾とした。これは、原法において少なくとも 2 回必要だったピペッターによる吸引を 1 回とすることで、カイアシ類個体を誤って吸引し喪失するリスクを減らすことが目的であった。ただし、エタノールは PCR 反応を阻害することが知られており (Rossen et al. 1992)、本研究においてもピペッターによる除去のみの場合には PCR 増幅の成功率が低下した。

カイアシ類個体の溶解に用いる Lysis buffer の量については、原法の 20 μL から 100 μL に増やしたことで、十分な増幅量 (20 ng μL^{-1}) の PCR 産物が得られる割合がほぼ 100% となった。これは、Lysis buffer 量を増やしたことで、カイアシ類個体が確実に溶解液中に浸漬されたためであると考えている。当初、溶解後の純水による Lysis buffer の希釈は、Lysis buffer の 1 成分である界面活性剤 Tween 20 を薄めるために必須であると考えていたが、予備実験の結果から薄めなくとも PCR 増幅を阻害しないことが確認され、結果として工程数の削減につながった。

Lysis buffer による溶解時間は、原法の 60 分から 30 分に減じても、PCR 増幅の成功率に変化は無かったが、PCR 産物の濃度は溶解時間の減少とともに徐々に低下した。DNA の塩基配列解析には 5 ng μL^{-1} 程度の試

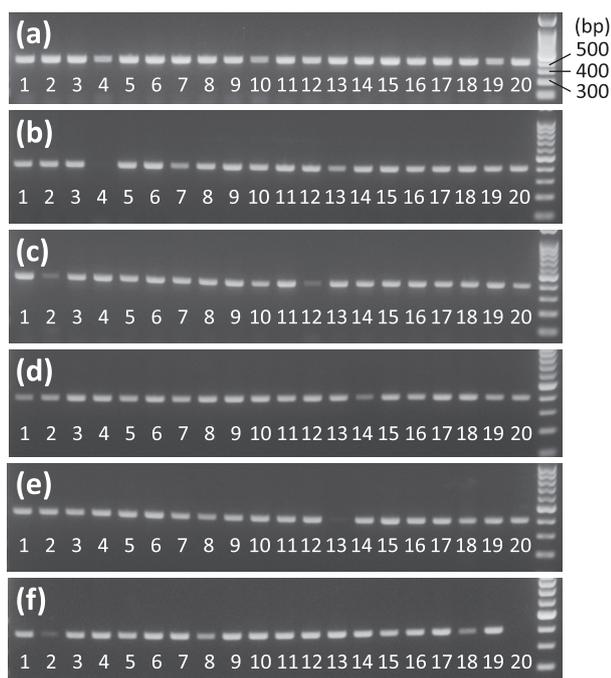


Figure 8. Agarose gel electrophoresis of PCR products in the study of the effect of formalin fixation time on PCR amplification. Zooplankton samples were collected and kept in 5% neutralized formalin-seawater for (a) 2, (b) 4, (c) 6, (d) 8, (e) 10, (f) 12 weeks. Twenty *A. japonica* individuals were selected from each fixed sample, and DNA was extracted by improved lysis buffer method.

料が $10 \mu\text{L}$ あれば十分であるため、PCR 産物を直接塩基配列決定に供する場合は、溶解時間は 30 分で十分であると考えられる。一方、PCR 産物をプラスミドベクターなどにクローニングするような場合には、原法通り 60 分の溶解を行った方がよい。

以上の検討により、DNA 抽出から PCR 法による遺伝子増幅までの成功率をほぼ 100% にすることができ、同時に原法では約 1.5 時間であった全行程時間が約 50 分に短縮された。また、本研究により確立した改良 Lysis buffer 法を用いて、これまでに *Acartia japonica* の以外のカイアシ類 *Acartia steueri*、*Calanus sinicus*、*Clausocalanus arcuicornis*、*Dioithona oculata*、*Oithona similis*、*Oncaea venusta*、*Paracalanus parvus* s.l.、*Pseudodiaptomus nihonkaiensis*、*Tigriopus japonicus* の他、渦鞭毛虫

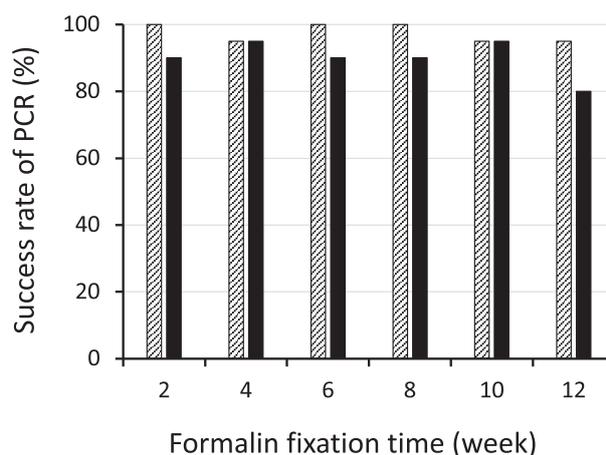


Figure 9. Success rate of PCR amplification in the study of the effect of formalin fixation time on PCR amplification. The proportion of individuals with confirmed PCR products are shown in hatched columns, and with PCR product concentrations of $20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ or higher are shown in black columns.

Gyrodinium rubrum、*Gyrodinium heterogrammum*、*Noctiluca scintillans*、繊毛虫 *Euprotos vannus* についても、それぞれ 1 個体または 1 細胞からの DNA 抽出と PCR 法による遺伝子増幅に成功している。カイアシ類よりもさらに小さな単細胞原生生物においても適用できたことは、本法の汎用性と有用性を示すものである。

4-2. ホルマリン固定期間が PCR 増幅に与える影響

ホルマリンは、生物個体や組織の形態を長期間保持する役割を担っているが、同時に DNA の構成単位であるヌクレオチドの共有架橋結合や不可逆的変性、修飾、断片化を起こすため (Chaw et al. 1980, Paäbo et al. 1989, Chang & Loew 1994)、DNA 解析のための生物試料の固定剤としては不向きであるとされてきた。また、DNA 自体の化学変化の他にも、DNA とタンパク質の架橋構造が形成され、その結果としてホルマリン固定試料からの DNA 抽出効率が著しく低下することも報告されている (Srinivasan et al. 2002)。このような問題を解決するため、ホルマリン固定試料からのさまざまな DNA 抽出方法が検討されてきた (Goelz

et al. 1985, Bucklin et al. 2004, Paireder et al. 2013)。中でも最近 Shiozaki ら (2021) は、長期間ホルマリン固定されたプランクトン試料から、DNA メタバーコーディングに用いることが可能な DNA の抽出方法を開発した。この方法は、試料を界面活性剤とタンパク質分解酵素を含む溶解液中でインキュベートし、その後、市販の DNA 抽出キットならびに DNA 修復キットを用いて精製 DNA を得るというものである。しかしながらこのような方法は、DNA メタバーコーディングのようにバルク試料を扱う場合には適用可能であるが、微小動物 1 個体あるいは原生生物 1 細胞から微量の DNA 抽出を行う場合には、その過程で個体や細胞、あるいは DNA を失うリスクが高い。したがって、本研究により確立した改良 Lysis buffer 法のような簡便な DNA 抽出法も依然として必要性が高く、そのような方法を用いた場合のホルマリン固定期間が PCR 増幅に与える影響を調べることには意味があると思われた。

本研究において、ホルマリン海水中で 2 ~ 12 週間 4°C で保存した *A. japonica* の雌成体について、改良 Lysis buffer 法による DNA 抽出と PCR 法による遺伝子増幅を試みた結果、固定期間が 10 週間までは PCR 増幅の成功率に有意差は無く、12 週目に僅かながら阻害が見られた。航海による調査において試料採集を行うような場合においても、3 ヶ月以内に実験室に持ち帰りその後の処理が行える場合には十分 DNA 解析が可能である。ただし今回の研究において、PCR 増幅の対象領域が 300 bp 程度と短かったことには留意すべきである。ホルマリンによって DNA 鎖状にランダムに化学修飾が生じることを考えれば、PCR 増幅の対象領域が長くなるほど成功率が低下することが考えられる。そのような場合には、ホルマリン海水中で保存できる期間が本研究結果よりも短くなることが予想される。

5. 結論

本研究により、ホルマリン固定されたカイアシ類 1 個体から、簡便かつ高い成功率で DNA 抽出を行う方法

を確立した。またこの方法は、カイアシ類のみならず、渦鞭毛虫や繊毛虫などの原生生物 1 細胞にも適用可能であった。本法を用いてカイアシ類の DNA 抽出を行う場合、ホルマリン固定期間が 3 ヶ月程度までであれば、十分 PCR 法による遺伝子増幅が可能であることも確認された。微小動物プランクトンの遺伝子解析は、分類学のみならず、生物多様性解析や系統地理学的研究においてもますます重要になっている。本論文で報告した改良 Lysis buffer 法は、そのような研究にとって非常に有用であると考えられる。

引用文献

- Boxshall GA & Halsey SH (2004) An introduction to copepod diversity. Ray Society, London, 966 pp.
- Bradford-Grieve JM, Boxshall GA, Ahyong ST, Ohtsuka S (2010) Cladistic analysis of the calanoid Copepoda. *Invertebr Syst* 24: 291–321.
- Bucklin A and Allen LD (2004) MtDNA sequencing from zooplankton after long-term preservation in buffered formalin. *Mol Phylogenet Evol* 30: 879–882.
- Chang Y-T and Loew GH (1994) Reaction mechanisms of formaldehyde with endocyclic imino groups of nucleic acid bases. *J Am Chem Soc*, 116: 3548–3555.
- Chaw YFM, Crane LE, Lange P, Shapiro R (1980) Isolation and identification of cross-links from formaldehyde-treated nucleic acids. *Biochem* 19: 5525–5531.
- Cornils A, Wend-Heckmann B, Held C (2017) Global phylogeography of *Oithona similis* s.l. (Crustacea, Copepoda, Oithonidae) - A cosmopolitan plankton species or a complex of cryptic lineages? *Mol Phylogenet Evol* 107: 473–485.
- Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B (1985) Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human-tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 130: 118–126.
- Goetze E (2005) Global population genetic structure and biogeography of the oceanic copepods *Eucalanus hyalinus* and *E. spinifer*. *Evolution* 59: 2378–2398.
- Hirai J, Shimode S, Tsuda A (2013) Evaluation of ITS2-28S as a molecular marker for identification of

- calanoid copepods in the subtropical western North Pacific. *J Plankton Res* 35: 644–656.
- Hirai J, Tsuda A, Goetze E (2015) Extensive genetic diversity and endemism across the global range of the oceanic copepod *Pleuromamma abdominalis*. *Prog Oceano* 138: 77–90.
- Johnson SC, Treasurer JW, Bravo S, Nagasawa K, and Kabata Z (2004) A review of the impact of parasitic copepods on marine aquaculture. *Zool Stud* 43: 229–243.
- Lee CE, Frost BW (2002) Morphological stasis in the *Eurytemora affinis* species complex (Copepoda: Temoridae). *Hydrobiologia* 480: 111–128.
- Mauchline J (1998) The biology of calanoid copepods. *Adv Mar Biol* 33: 1–710.
- Milligan PJ, Stahl EA, Schizas NV, Turner JT (2011) Phylogeography of the copepod *Acartia hudsonica* in estuaries of the northeastern United States. *Hydrobiologia*, 666: 155–165.
- Paäbo S, R. G. Higuchi RG, Wilson AC (1989) Ancient DNA and the polymerase chain reaction: the emerging field of molecular archaeology. *J Biol Chem* 264: 9709–9712.
- Paireder S, Werner B, Bailer J, Werther W, Schmid E, Patzak B, Cichna-Markl M (2013) Comparison of protocols for DNA extraction from long-term preserved formalin fixed tissues. *Anal Biochem* 439: 152–160.
- Razouls C, de Bovée F, Kouwenberg J et Desreumaux N (2005–2022) Diversity and Geographic Distribution of Marine Planktonic Copepods. <http://copepodes.obs-banyuls.fr/en/> (2022年5月1日アクセス)
- Rossen L, Norskov P, Hoimstrom K, Rasmussen OF (1992) Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int J Food Microbiol* 17:37–45.
- Shiozaki T, Itoh F, Hirose Y, Onodera J, Kuwata A, Harada N (2021) A DNA metabarcoding approach for recovering plankton communities from archived samples fixed in formalin. *PLoS One* 17;16(2):e0245936. doi:10.1371/journal.pone.0245936.
- Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S (2002) Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* 161: 1961–1971.
- Støttrup JG (2003) Production and nutritional value of copepods. In: *Live Feeds in Marine Aquaculture* (eds Støttrup JG, Mcevoy LA). Blackwell Publishing, Oxford, pp. 145–205.

短報

夏季タイ湾奥部表層におけるヤコウチュウの分布

古谷研^{1)*}, 小藺健太^{2,4)}, Thaithaworn Lirdwitayaprasit³⁾

- 1) 創価大学プランクトン工学研究所 東京都八王子市丹木町 1-236
- 2) 東京大学大学院農学生命科学研究科 東京都文京区弥生 1-1-1
- 3) チュラロンコン大学海洋科学科 Phyathai Rd., Bangkok 10330, THAILAND
- 4) 現所属 東洋水産株式会社

Surface distribution of *Noctiluca scintillans* in the upper Gulf of Thailand in summer

Ken Furuya¹⁾, Kenta Kozono^{2,4)} and Thaithaworn Lirdwitayaprasit³⁾

- 1) *Institute of Plankton Eco-engineering, Soka University 1-236, Tangi-cho, Hachioji, Tokyo*
- 2) *Graduate School of Agricultural Sciences, The University of Tokyo 1-1-1, Yayoi, Bunkyo, Tokyo*
- 3) *Department of Marine Science, Chulalongkorn University Phyathai Rd., Bangkok 10330, THAILAND*
- 4) *Present affiliation Toyo Suisan Kaisha, Ltd.*

* Corresponding author: furuya@soka.ac.jp

2022年4月26日受付, 2022年5月2日受理

Abstract Distribution of *Noctiluca scintillans*, nutrients and chlorophyll *a* at the surface was investigated in the upper Gulf of Thailand in summer. Observation was made along two longitudinal lines across the inner gulf during the southwest monsoon period. Significantly high chlorophyll *a* was observed at stations on the northern line compared to the southern line, and the highest abundance was located in the eastern part of the line. This was accompanied by significantly elevated nitrate in the eastern part. Higher abundance of *N. scintillans* cells was observed also along the northern line, and its maximum occurred in the eastern part. The high abundance of both chlorophyll *a* and *N. scintillans* in the northeastern part of the study area supports Sriwoon et al. (2008) who showed a build-up of *N. scintillans* and phytoplankton biomass in the northeastern part of the upper gulf, where surface water circulation alters according to the monsoon cycle: the southwest monsoon induces a clockwise circulation from the west to the east, and the northeast monsoon develops a counterclockwise circulation. Sriwoon et al (2008) concluded that the southwest monsoon circulation produces a favorable condition for growth of *N. scintillans* in the northeast part of the upper gulf. In the present study a significant correlation was found among nitrate, chlorophyll *a* and abundance of *N. scintillans*, suggesting phytoplankton abundance supported by high nitrate availability served as prey for *N. scintillans*. This inference is compatible with findings of Sriwoon et al. (2008).

Keywords: *Noctiluca scintillans*, Gulf of Thailand, surface distribution, Southwest monsoon

従属栄養性の渦鞭毛藻ヤコウチュウは濃い赤色の赤潮を形成することが知られているが、東南アジアやアラビア海の沿岸域では鮮やかな緑色のブルームを形成する(齋藤・古谷 2006)。これは細胞内にペディノ藻 *Pedinomonas noctilucae* が共生するためその緑色を呈するからである。タイ湾奥部 (Upper Gulf of Thailand、以下 UGoT) では、この共生藻を持つヤコウチュウブルームにより貧酸素水塊が形成され魚類の斃死やエビ養殖への被害が問題になっている (Suvapepun 1989)。この問題へのとりくみの一環として、貧酸素水塊が形成しやすい夏季の UGoT におけるヤコウチュウの水平分布を調べた。タイ湾は半閉鎖性であり、北側から4つの大きな河川、すなわち西から東へ順に、Mae Klong 川、Tha Chin 川、Chao Phraya 川、Bang Pakong 川が注ぎ (Fig.1)、流入栄養塩により UGoT を富栄養環境にしている (Buranapratheprat et al. 2002)。

観測と採水を UGoT の 14 測点において 2009 年 8 月 24 日から 25 日にかけて行った (Fig. 1)。水温、塩分は多項目水質計 (Model 30; YSI) を用いて測定した。表層からバケツを用いて採水し、クロロフィル *a* (Chl *a*)、栄養塩および検鏡用試料を得た。Chl *a* は、試水を船上にて 25 mm 径グラスファイバーフィルター (Whatman, GF/F) で濾過した後、N, N-dimethylformamide で暗中常温下にて 1 昼夜抽出し、蛍光光度計 (Aquafluor, Turner Design) を用いて濃度を測定した (Suzuki & Ishimaru 1990)。試水を 200 μm 目合いのプランクトンネットによりヤコウチュウおよび大型の植物プランクトンを濾別し

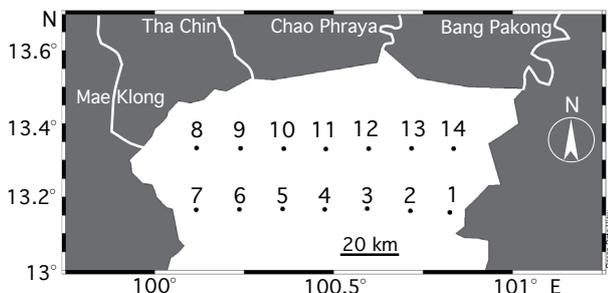


Figure 1. Sampling stations in the upper Gulf of Thailand. Four rivers flow into the northern part of the upper gulf.

た試水の Chl *a* 濃度を同様の方法で測定した (Grashof et al. 1983)。栄養塩濃度は海水試料を冷凍して持ち帰り陸上で測定した。ヤコウチュウ細胞密度は海水 5 L を 60 μm 目合いのプランクトンネットで濃縮したものを終濃度 2.0% 中性ホルマリンで固定し、実体顕微鏡下で計数した。

海面水温は 30.1 – 31.9 $^{\circ}\text{C}$ と高く、全測点で水柱は成層していた。塩分は 24.7 – 28.7 で変動し、Bang Pakong 川河口付近の測点 13 および 14 で最も低かった。河川水の影響は硝酸塩の分布に現れ、北側の測線の平均値は南側のそれに比べて有意に高かった ($p < 0.05$, Fig. 2)。一方、アンモニウム塩、リン酸塩はそれぞれ 0.96 – 5.0 μM 、0.84 – 1.88 μM の範囲で変動したが南北の測線間での有意差は認められなかった。窒素:リン比は

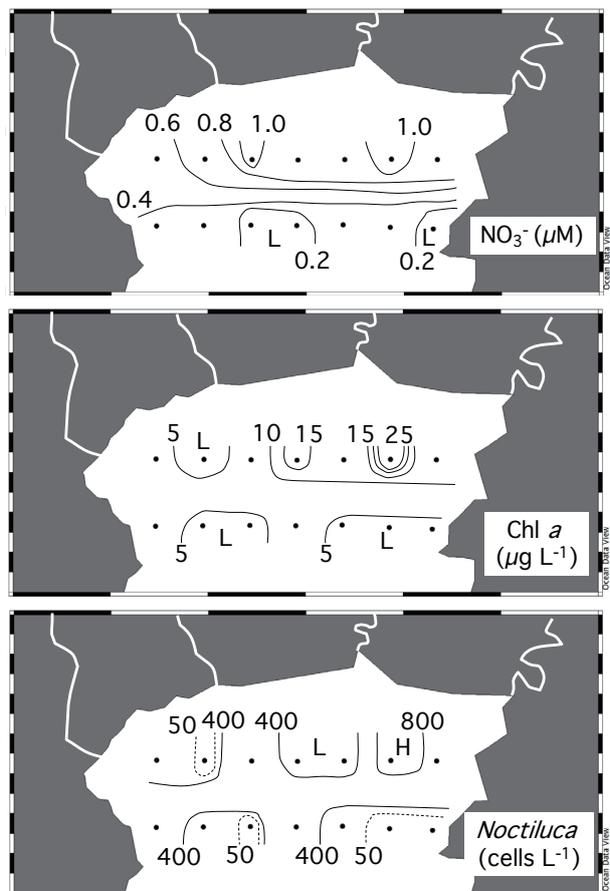


Figure 2. Distribution of nitrate (top), chlorophyll *a* (middle) and cellular abundance of *N. scintillans*.

Table 1 Pearson correlation matrix among temperature, salinity, nitrate, ammonium, phosphate, chlorophyll *a* and cellular abundance of *Noctiluca* in the upper Gulf of Thailand.

	temperature	salinity	nitrate	ammonium	phosphate	Chl <i>a</i>
temperature	1					
salinity	-0.48	1				
nitrate	-0.21	0.02	1			
ammonium	0.38	-0.27	-0.07	1		
phosphate	0.06	0.039	0.56*	0.03	1	
Chl <i>a</i>	-0.39	-0.19	0.62*	-0.16	0.29	1
Noctiluca	-0.27	-0.36	0.72*	0.05	0.34	0.81*

* significant at $p < 0.01$ ($n=14$)

1.4 – 3.9 で変動しており調査海域全域が窒素制限の状態であることを示した。

Chl *a* は南の測線の平均値よりも北の測線のそれが有意に高く ($p < 0.05$)、北の測線では東に向かって有意な増加傾向を示した ($p < 0.05$, Fig. 2)。ヤコウチュウは全測点で出現し、4 – 945 細胞 L^{-1} の間で変動した。細胞数は南の側線よりも北の側線で高く、特に北の測線では東に向かって有意な増加傾向が認められ ($p < 0.05$)、分布の極大は Chao Phraya 川および Bang Pakong 川河口沖の測点 13 であった (Fig. 2)。UGoT における表層水の循環はモンスーンサイクルに応じて変化する (Buranapratheprat & Yanagi 2003)。すなわち 3 月から 9 月の南西モンスーン期には時計回りの循環が卓越し、表層水は西側から東側に向かい、11 月から 2 月の北東モンスーン期には反時計回りの循環が卓越し、南から低栄養塩濃度の海水が UGoT 東部に流入する。この循環に伴い、UGoT ではヤコウチュウブルームの発生場所が変化し、南西モンスーン期には東部で、北東モンスーン期には西部で発生する (Sriwoon et al. 2008)。本研究において北側測線の東部で高い Chl *a* 濃度およびヤコウチュウ現存量が観察されたのは南西モンスーン期にあたっていたためこの現象を捉えたものといえる。

ヤコウチュウ細胞数は硝酸塩および Chl *a* と有意な正の相関を示した ($p < 0.01$, Table 1)。北の測線では *Chaetoceros* 属を主とする中心目珪藻が卓越していた

が、*P. noctilucae* 自体が含有する Chl *a* とともに東部において高い Chl *a* 濃度をもたらした。UGoT では河川流量が南西モンスーン期に顕著に増加するため (Buranapratheprat et al. 2002)、流入した栄養塩を利用して植物プランクトンブルームが発生したと考えられる。Sriwoon et al. (2008) は、UGoT の Bang Pakong 川河口沖における観測において、Chl *a* 濃度とヤコウチュウの細胞密度が正に相関したことから、植物プランクトンの摂餌によりヤコウチュウが高い増殖活性を得た可能性が高いことを指摘している。本研究においても多くのヤコウチュウ細胞内に食胞が観察されており、硝酸塩と Chl *a* の有意な相関 (Table 1) は、硝酸塩を利用して増殖した餌生物をヤコウチュウが摂餌して高い増殖活性を得ていた可能性を示唆する。

引用文献

- Buranapratheprat A, Yanagi T (2003) Seasonal variations in circulation and average residence time of the Bangprakong estuary, Thailand. *La Mer* 41: 199–213.
- Buranapratheprat A, Yanagi T, Boonphakdee T, Sawangwong, P (2002) Seasonal variations in inorganic nutrient budgets of the Bangpakong estuary, Thailand. *J Oceanogr* 58: 557–64.
- Grasshoff K, Ehrhardt M, Kremling K (1983) *Methods of Seawater Analysis*, 2nd ref ed., Verlag Chemie

GmbH, Weinheim, 419p.

齋藤春菜・古谷 研 (2006) 微細藻類の細胞内共生：
夜光虫と緑色鞭毛藻 *Pedinomonas noctilucae*. 日本
プランクトン学会報 53: 14-21.

Sriwoon R, Pholpunthin P, Lirdwitayaprasit T, Kishino
M, Furuya K (2008) Population dynamics of green
Noctiluca scintillans (Dinophyceae) associated with
the monsoon cycle in the upper Gulf of Thailand. J
Phycol 44: 605-615.

Suvapepun S (1989) "Occurrences of red tide in the Gulf
of Thailand." In Red Tides. Biology, Environmental
Science and Toxicology (eds Okaichi T, Anderson D
M & Nemoto T). Proc. First Int. Symp. Red Tides,
Takamatsu, Japan. Elsevier, New York, pp. 41-44.

Suzuki R, Ishimaru, T (1990) An improved method for
the determination of phytoplankton chlorophyll using
N, N-dimethylformamide. J Oceanogr Soc Japan 46:
190-194.

引用文献の書き方

引用文献表はページを改め、本文の次に入れる。文献の配列は著者名(姓)のアルファベット順と出版年順に従う。文献表の書き方は、(), . : などの記号や書体に注意を払い、次の例にならう。引用文献表中では et al., Ditto, Ibid. などの語は使用しない。著者名や年号が不明なインターネット上の情報は本文中でその URL と参照年月日を記述する。

1. 筆頭著者が同じ場合、単著、共著の順とする。
2. 著者が 11 名を超える文献は、順に 10 名までを記述し、11 名以降は「～ほか」または「et al.」と表記する。
3. アルファベットの著者名は、Family name を先に、given name や middle name のイニシャルを後に記述する。(例：Smith KL Jr, van der Wal EJ, Marshall J-A)
4. 姓か名が漢字 1 文字の場合は、姓と名の間を全角 1 字あける(例：吉水 翔, 岸 正敏)。
5. 和文雑誌名は原則として省略しない。欧文雑誌名は CAS Source Index (CASSI) (<https://cassi.cas.org/search.jsp>) に登録された略称をピリオドを省いて記載する。CASSI に出ていないタイトルの略語については ISSN International Centre の List of Title Word Abbreviation (LTWA) (<http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>) に準拠する。例外的に Nature 誌は Nature, Science 誌は Science と表記する。
6. 英語以外の外国語で書かれた文献は末尾に (in Chinese) のようにし、英文要旨がある場合は、(in Greek with English abstract) のように記載する。

[例]

論文

- 中尾賢志 (2019) 閉鎖性水域における栄養塩類管理を目的とした下水高度処理の運転管理。用水と廃水 61: 655–661.
- Cervantes-Avilés P, Keller AA (2021) Incidence of metal-based nanoparticles in the conventional wastewater treatment process. Water Res 189: 116603. (論文番号のみの場合)
- Wangpraseurt D, You S, Azam F, Jacucci G, Gaidarenko O, Hildebrand M, Kühl M., Smith AG et al. (2020) Bionic 3D printed corals. Nat Bakraoui M, Karouach F, Ouhammou B, Aggour M, Essamri A, El Bari H (2020). Biogas production from recycled paper mill wastewater by UASB digester: Optimal and mesophilic conditions. Biotechnol Reports 25: e00402, doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00402 (電子版のみの場合)

単行本

- 小久保清治 (1932) 浮游生物分類学。恒星社厚生閣、東京、394 pp, 34 pls.
- 高原義昌 (編著) (1980) 廃水の生物処理。地球社、東京、384 pp.
- Speece RE (1996) Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters. Archae Press, Tennessee, 393 pp.
- Bazargan A (ed) (2022) Photocatalytic Water and Wastewater Treatment. IWA Publishing, London, 220 pp.

単行本の章

- 佐々木健 (1993) “光合成細菌の生理と生態。” 嫌気性微生物 (上木勝司・永井史郎編著)。養賢堂、東京、pp. 145–166.
- Khalifa O, Banat F, Hasan SW (2021) “Integrated and hybrid processes for oily wastewater treatment.” Integrated and Hybrid Process Technology for Water and Wastewater Treatment (eds Mohammad AW, Ang WL). Elsevier Publishing, Amsterdam, pp. 313–337.

学位論文

- 阿部憲一 (2012) 生物膜型廃水処理における亜硝酸化の制御。長岡技術大学大学院工学研究科学学位論文。
- Katayama T (2015) Photoprotective acclimation of xanthophyll pigments to high light in marine diatoms. PhD thesis, Soka University, Japan.

報告書

- 水産庁九州漁業調整事務所 (1993) 平成 4 年九州海域の赤潮。水産庁、67 pp.
- United Nations World Water Assessment Programme (WWAP) (2017) The United Nations World Water Development Report 2017. Wastewater: The Untapped Resource. UNESCO, Paris, 180 pp.

インターネット上の公開データベース等の引用

- WoRMS Editorial Board (2019) World Register of Marine Species. <http://www.marinespecies.org> (2019 年 6 月 10 日アクセス)

2022 年 6 月 27 日発行



発行所 創価大学プランクトン工学研究所
〒192-8577 東京都八王子市丹木町 1-236
E-mail: plankton-eco-eng@soka.ac.jp
URL: <https://www.soka.ac.jp/perc>

印刷所 (株)プリンテック
〒193-0835 東京都八王子市千人町 2-8-20
Tel: 042-629-9231

第2号（2022年6月）目次

◆ 総説

- 微細藻類由来のカロテノイドとその抗酸化能測定手法の研究動向
江崎世雄・関根睦実 1

◆ 原著論文

- 粒子形状の異なるZnO光触媒の合成と評価
成田唯人・西 健斗・松山 達・井田旬一 14

- 25年ぶりに相模湾で発生した円石藻*Gephyrocapsa oceanica*によるブルーム
矢野光一・梶 正彦・下出信次・村上 浩・虎谷充浩・Victor S. Kuwahara ... 24

- 浮遊性カイアシ類*Acartia steueri*の幼生・幼体の培養における微細藻類餌料の
検討
高山佳樹・平原南萌・戸田龍樹 32

- Hydrothermal carbonization of compressed water hyacinth: Effects of
operation parameters on energy conversion and characterization of products
Tassapak Wutisirattanachai, Solomon Addisu Legesse, Shinjiro Sato ... 44

- カイアシ類1個体からのDNA抽出方法の改良とホルマリン固定期間がミトコン
ドリア遺伝子のPCR増幅に与える影響
小林真輝・高山佳樹・下出信次・戸田龍樹・黒沢則夫 56

◆ 短報

- 夏季タイ湾奥部表層におけるヤコウチュウの分布
古谷 研・小菌健太・Thaithaworn Lirdwitayaprasit 66