

創価大学  
プランクトン工学研究

Soka University

Bulletin of Institute of Plankton Eco-Engineering



---

# 「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）

高山佳樹（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）

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](mailto: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、 $\mu M$ 、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：カイアシ類 *Sapphirina darwinii*  
（撮影者：下出信次）

# Bulletin of Plankton Eco-Engineering Research

**No. 3**

June 2023

## Contents

### Review

Mass cultivation of marine planktonic copepods

Yoshiki Takayama ..... 1

### Original papers

Effect of plastic-type and photocatalyst concentration on plastic film degradation using TiO<sub>2</sub>

Manami Yamaguchi, Yuito Narita, Kento Nishi, Tatsushi Matsuyama and Junichi Ida ..... 20

Treatment of synthetic poultry slaughterhouse wastewater using a consortium of anaerobic digestion microorganisms and purple phototrophic bacteria

Shin-ichi Akizuki and Masaaki Fujiwara ..... 29

Characterization of the phytoplankton size composition and light absorption coefficient in the temperate coastal waters of Sagami Bay

Koichi Yano, Shinji Shimode and Victor S. Kuwahara ..... 39

### Note

Surface nutrient regime and bottom hypoxia in Manila Bay during the southwest monsoon

Ken Furuya, Mari Yasuda and Valeriano M. Borja ..... 47

### Report

Practical Science and Environmental Education Workshop in Manaus, Brazil

Shinjiro Sato, Paulo H.R. Aride, Luciano G. do Nascimento, Victor S. Kuwahara, Yoshiki Takayama, Koichi Yano, Marcelo T. Ono, Tatsuki Toda, Adriano T. de Oliveira, Laila Y. dos S. Silva, Débora N. Carvalcante, Luise B.R. Pereira, Francisco F. da S. Brito, Mayara O. Martins, Sofia R. Aranha, André L. de S. Chaves, Meris de S. Barros, Maria F. da S. Gomes, Ana B.S. dos Santos, Bruno da C. Takaki, Arlindo J.A. de Lima, Alexandra dos S. Silva, Tamy Y. Kobashikawa, Rodrigo Izumi and Tais Tokusato ..... 51

## 総説

# 海産浮遊性カイアシ類の大量培養

高山佳樹<sup>1)\*</sup>

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

## Mass cultivation of marine planktonic copepods

Yoshiki Takayama<sup>1)\*</sup>

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

\* *Corresponding author. e-mail : ytakayama@soka.gr.jp*

2023年5月1日受付, 2023年5月17日受理

**Abstract** To meet the increasing global demand for seafood, efficient and stable aquaculture production is essential. This requires mass production of fish fry and development of suitable live diets for their growth. In aquaculture and the ornamental industry, marine planktonic copepods are recognized as preferred live feeds for marine fish larvae over the commonly used organisms *Artemia* and rotifers. Marine fish larvae fed with the copepods show better survival, pigmentation and growth. Based on this, wild copepods collected from the natural ecosystem have been used as the live diet for fish larvae culturing. Mass culture of copepods under a controlled environment is desirable due to the unstable collection amount, difficulties in obtaining consistent quality, and risk of parasite/pathogen contamination when collecting copepods from natural ecosystems. Despite being a preferred live feed, copepod use is still limited due to low productivity and cost efficiency when intensively cultured.

This review focuses on the status and challenges in the mass cultivation technology of marine planktonic copepods. Section 2 summarizes the importance of live diets for marine fish production and the challenges of a conventional live diet using rotifer and *Artemia* from the viewpoint of prey size and nutrient demand of the fish larvae. Section 3 focuses on the characteristics of marine planktonic copepods as aquaculture live diets, and briefly introduces the research history of culturing copepods from the 1970s. Section 4 reviews which copepods have been cultured as target species to date. Section 5 presents the types of diets that have been used to cultivate copepods, and what factors should be considered in selecting their diets. In addition, non-microalgal diets such as yeast, bacteria and protists, which are considered to be cheaper to produce than microalgal diets, will also be introduced. Section 6 discusses copepod stocking density, which determines productivity and production cost in the mass culture, and presents how stress caused by high-density conditions affects their survival, egg production, and hatching success. Section 7 deals with cannibalism, one of the most serious problems limiting productivity in mass copepod culturing, and discuss how many eggs and larvae are lost through cannibalism based on quantitative data. Section 8 summarizes the various methods developed for collecting and separating



eggs and nauplii from individual adults to minimize cannibalism risk. Section 9 covers the methods for storing copepod eggs and nauplii, which can enable copepod products to be transported between producers and consumers, and assist producers in maintaining backup cultures.

**Keywords:** aquaculture, cannibalism, copepod culture, live prey, stocking density

---

## 1. はじめに

世界人口は2050年には93億人に達し、この急激な人口増加と世界的な食生活の向上によって、2005年時の2倍のタンパク質の供給が必要になると予想されている (Godfray et al. 2010, Lee 2011)。現在の農業・畜産業の方式では環境負荷が高く、持続可能でないことが指摘され、タンパク質の需要と供給のバランスが崩れる“タンパク質危機 (protein crisis)”が早ければ2030年頃に顕在化するとされる。動物性タンパク質供給の一端を担ってきた水産物に注目すると、漁獲漁業による生産は1990年代から横ばいに推移しているが、養殖による生産量は年々増加しており、現在では総生産量の46%を占める (FAO 2020)。世界の水産物の需要は今後も拡大することが予測され、計画的かつ安定的に生産が可能な養殖に対する期待は高い。これらを効率的に進めるためには、魚類種苗の大量生産が必要だが、そのためには仔稚魚の生育に適した初期生物餌料の大量生産技術の確立が喫緊の課題である。カイアシ類は海洋において優占する小型甲殻類であり、そのバイオマスはメソ動物プランクトン群集の8割を占め、プランクトン食性の魚類や、仔稚魚全般の重要な餌資源である (Mauchline 1998)。カイアシ類の初期生物餌料としての有用性は古くから知られ、天然産のものを採集して利用されてきたが、採集量が天候や海況によって著しく変動するため、計画的かつ安定的な確保を目的とした大量培養技術の確立と実用化が渴望されている。本稿では、海産浮遊性カイアシ類の水産餌料としての有用性や、その集約的な大量培養に関する研究動向、課題について整理する。

## 2. 種苗生産における生物餌料の重要性と既存の餌料系列の課題

天然水産資源の保全とその持続性の観点から、天然域からの種苗採集に依存しない人工種苗の重要性が近年増している (飯島ら 2012)。仔魚は孵化後、親魚由来の卵黄を内部栄養源として用い、口と肛門が開くと索餌行動を開始し、摂餌による外部栄養様式へと変化する。開口初期は口が小さく遊泳力も弱いことから、仔魚が摂餌できる餌はサイズが小さく、遊泳力も乏しいものに限定されるため、天然域に生息する仔魚は小型動物プランクトンを摂餌して成長する (荻原 2014)。淡水域で仔魚期を過ごすサケやマス類の仔魚は、人工餌料での飼育が可能である。その一方、海産の仔稚魚の場合、タンパク質を消化するプロテアーゼ活性が低く、生物餌料が保有するプロテアーゼを利用しないと消化できないため人工餌料での飼育は困難である (荻原 2014)。そのため海産魚類の種苗生産の発展には、適したサイズと栄養価を示す餌料生物種の開発、生産が欠かせない。種苗生産において、大きさや栄養価の面で対象の仔稚魚に適した初期生物餌料を生産することは、種苗の減耗を防ぎ対象魚種を広げることから種苗生産における鍵となっている (Marcus 2005)。

1960年代、本邦において *Brachionus plicatilis* (シオミズツボムシ) の餌料としての有用性が見出され (伊藤 1960)、その後、大量培養技術が確立され、初期生物餌料として世界中で利用されている (Uye 2005)。種苗生産ではワムシを給餌して育った仔稚魚の次のサイズ帯の生物餌料として耐久卵 (シスト) から孵化した *Artemia* sp. (アルテミア) ノープリウス幼生が広く用いら

れている。アルテミアのシストは容易に孵化させ使用でき、長期間の保存が可能なことから流通の点でも優れているが、世界の流通量の90%を占めるアメリカ Grate Salt Lake 産では(萩原 2014)、資源量が年により大きく変動する難点がある (Fig. 1)。

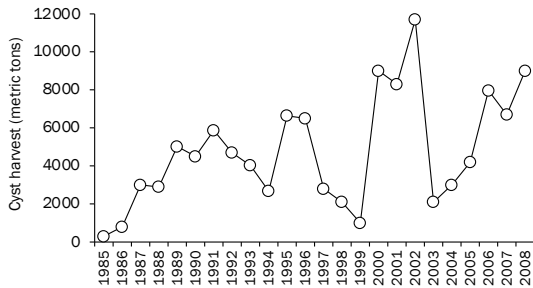


Fig. 1. Annual variation in harvested amount of *Artemia* cysts from the Great Salt Lake, the USA (data from State of Utah Division of Wildlife Resources).

このような背景から、シストの価格は度々高騰しており、例えば乾燥シスト 1 kg の価格が 1993 年の 10 ドル前後から 2000 年には 70 ドルに達している (Stappen et al. 2020)。ワムシ、アルテミア中には仔稚魚の成長および発達に必要な、ドコサヘキサエン酸 (Docosahexaenoic acid: DHA) やエイコサペンタエン酸 (Eicosapentaenoic acid: EPA) に代表される n-3 高度不飽和脂肪酸が不足するため、これらの生物餌料のみを仔稚魚に給餌した際には、大量斃死、形態異常、異常行動を示す (日野 1994, 竹内 2009)。そのため既存の生物餌料では微細藻類、イカやサメの肝油や卵黄、ラビリンチュラ類を用いて栄養強化することで餌料としての栄養不足に対処している (萩原 2014)。しかし、栄養強化剤に要するコストは非常に大きく、ワムシでは栄養強化の効果は 6 時間しか持続せず、アルテミアでは高純度の DHA で栄養強化してもドコサペンタエン酸 (Docosapentaenoic acid: DPA) や EPA に変換、またはエネルギーとして利用してしまい、3 分の 1 程度しか DHA が強化できないという課題もある (竹内 2009)。水産養殖における種

苗生産では、ワムシを初期餌料とし、その後アルテミア、そして人工餌料の順からなる餌料系列が主流となっているが、本餌料系列には生産ができない空白の餌料サイズ帯 (100  $\mu\text{m}$  以下、350  $\mu\text{m}$  から 600  $\mu\text{m}$  の間) が存在し (萩原 2014) (Fig. 2)、これらを餌料とする養殖魚種を制限しているのも無視できない課題である。

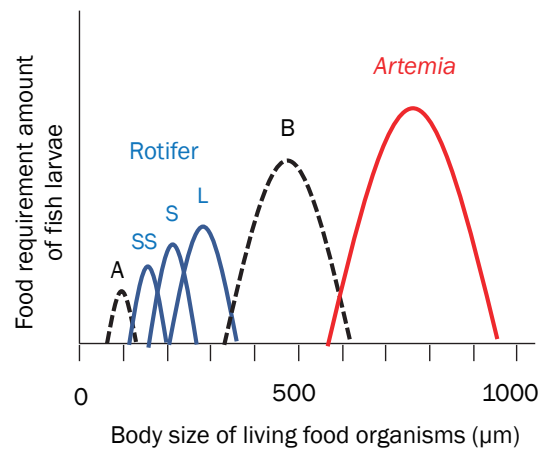


Fig. 2. Body size spectra of living food organisms and food requirement of fish larvae in marine fish fry production (modified from Hagiwara 2014). A and B with dashed lines indicate the blank ranges that cannot be produced by rotifers and *Artemia* nauplii.

### 3. 海産カイアシ類の生物餌料としての有用性

カイアシ類は天然域において多くの魚種仔稚魚の重要な餌資源であり、時にそれらの消化管内容物の 80% を占める (Tanaka et al. 1987, Mauchline 1998)。カイアシ類は発達段階によってその体長が、およそ数十  $\mu\text{m}$  から数千  $\mu\text{m}$  へと成長するため、対象とする魚種の成長段階にあったサイズ帯の餌料を生産できる利点があり、これまでの既存の生物餌料では生産できなかったサイズ帯である 100  $\mu\text{m}$  以下には、*Acartia* 属カイアシ類であればノープリウス幼生初期が、350 ~ 600  $\mu\text{m}$  の範囲にはコペポダイト幼体初期が該当する。Fig. 3 に海産仔稚魚 13 種の餌料サイズと *A. steueri* ノープリウス幼生の

体幅を参考に示す。

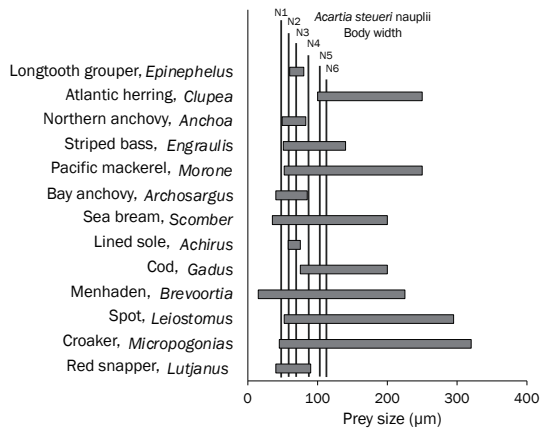


Fig. 3. Prey size spectra of marine fish larvae (modified from Chesney 2005). Horizontal black lines in the figure indicate the body widths of nauplius stages of a marine cope-

pod *Acartia steuerei*. N1 to N6 in the figure indicate the first nauplius to sixth nauplius stage.

またカイアシ類ノープリウス幼生が示す“jerky zig-zag”と呼ばれる遊泳行動は、視覚捕食者である仔稚魚の捕食行動を誘発する重要な要因であると考えられている (Buskey 2005)。さらに、カイアシ類は高度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、ワムシヤアルテミアのような栄養強化のプロセスも必要としない (Næss et al. 1995, Støttrup 2003)。先行研究によってワムシヤアルテミアを餌料とした際と比べて、カイアシ類を餌料とした場合のほうが仔稚魚の成長、生残、ストレス耐性、奇形が改善され、さらには体色の向上による市場価値の増加が報告されている (Table 1)。

Table 1. Effects of copepod as diets on marine fish larvae.

Fish species	Copepod species	Effects	References
Turbot <i>Scophthalmus maximus</i>	<i>Eurytemora affinis</i>	To improve survival	Witt et al. 1984
Atlantic halibut	Wild copepods (cladoceran, <i>Temora</i> )	To prevent malpigmentation	Næss et al. 1995
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	<i>longicornis</i> & <i>Pseudocalanus minutus</i> )		
Red snapper <i>Lutjanus argentimaculatus</i>	<i>Acartia sinjiensis</i>	To improve survival	Doi et al. 1997
Atlantic halibut, <i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Wild copepods ( <i>Eurytemora affinis</i> , <i>Acartia teclae</i> , <i>Centropages hamatus</i> & other copepods)	To improve pigmentation & growth	McEvoy et al. 1998
Atlantic halibut, <i>Hippoglossus hippoglossus</i>	<i>Eurytemora velox</i>	To prevent malpigmentation, eye migration, & to improve survival	Shields et al. 1999
Grouper <i>Epinephelus coioides</i>	<i>Acartia tsuensis</i> , <i>Pseudodiaptomus</i> spp. & <i>Oithona</i> sp.	To improve feeding, survival & growth	Toledo et al. 1999
West Australian seahorse <i>Hippocampus subelongatus</i>	<i>Gladioferens imparipes</i>	To improve growth & survival	Payne & Rippingale 2000b
Seabass larvae <i>Lates calcarifer</i>	<i>Acartia clausi</i>	To improve survival	Rajkumar & Vasagam 2006
Southern flounder <i>Paralichthys lethostigma</i>	<i>Acartia tonsa</i>	To improve growth & survival	Wilcox et al. 2006
Fat snook <i>Centropomus parallelus</i>	<i>Acartia tonsa</i>	To improve survival & development	Barroso et al. 2013

このように、カイアシ類はサイズ、遊泳行動、栄養組成の点で餌料生物として優れた特徴を有しており、既存の餌料系列では飼育が不可能であった新たな魚種の種苗生産を可能にすると期待されている (Payne et al. 2001)。今日までのカイアシ類の利用方法としては、天然域からの採集に加え (Uye 2005)、野外池で鶏糞等を施肥し、自然発生する微細藻類や原生動物を摂餌して増殖するカイアシ類を採集、利用する粗放的培養が挙げられる。粗放的な培養によって水産養殖、また観賞魚用の餌料要求を満たすような生産が可能で、アジア地域を中心に利用されている (Drillet et al. 2011, Blanda et al. 2015)。しかし、これらの方法では、収量が季節的な温度変化や天候、海況の影響を受け、同種・同サイズの生産が難しく、寄生生物や病原菌が混入する危険性が高いといった難点がある (荻原 2014)。このような背景から、培養環境を制御した集約的なカイアシ類の大量培養技術の確立が望まれるようになった。

本邦においては水産庁が1970年代に「魚類の初期餌料としての動物プランクトンの探索と大量培養研究」事業を開始し、その候補として枝角類に加えカイアシ類 (浮遊性10種、底生性3種)も選定され、大量培養に関する研究が集中的に行われた (安楽 1979, Uye 2005)。しかし、検討対象となった10種の浮遊性カイアシ類については、個体群の増加が低く不安定であり培養系の維持が困難であったと報告されている (Uye 2005)。候補種の中では底生カイアシ類 *Tigriopus japonicus* で唯一大規模での培養が成功したものの (福所 1980)、器壁に付着する匍匐性を示すため仔稚魚が摂餌しにくい (北島 1973)、*Acartia* 属といった浮遊性種に比べ高度不飽和脂肪酸含量が少ない、時には仔稚魚の体表を匍匐して傷つけたり、消化管壁を突き破るといった欠点のため実用には至らず (北島 1979, Uye 2005)、その後本邦でのカイアシ類の大量培養に関する研究は数える程度しかない。このような背景から、仔稚魚にとって理想的な栄養組成、遊泳行動を示す浮

遊性種の大量培養の成功が渴望されているが、ワムシなどの既存の生物餌料の培養と比較すると生産性が低く (Molejón & Alvarez-Lajonchère 2003)、実用化の例は限定的であり、未だ困難な技術とされている。しかしながら、適種の探索は現在も続けられており、特に近年の海外における研究の進展は著しい。以下に、その検討状況を整理する。

#### 4. 培養対象種

培養対象としては一般的に水温や塩分といった環境変化に強いことや、幅広い餌料に適応でき、高い繁殖力を有するといった培養の容易さに加えて、仔稚魚に対する栄養価値が高い種であることが望ましい (安楽 1979)。海産浮遊性カイアシ類のうち *Acartia*、*Apocyclops*、*Bestiolina*、*Calanus*、*Centropages*、*Eurytemora*、*Euterpina*、*Gladioferens*、*Oithona*、*Paracyclops*、*Parvocalanus*、*Pseudodiaptomus*、*Sinocalanus*、*Temora* の3目14属が大量培養の対象種として今日まで検討されており (Table 2)、その大部分は広塩分に適応できる汽水・内湾性種が占める。対象種を選定する上で、入手の容易性、体サイズや食性、遊泳行動とともに産卵様式が重要である。カイアシ類の産卵形式は雌成体がノープリウス幼生の孵化まで卵を保持する抱卵型 (egg-carrying) と卵を産み落とす自由放卵型 (free-spawner) に大別され、自由放卵型では卵の状態での収穫・保管が可能である。*Acartia* 属や *Centropages* 属に代表される一部の Calanoida では卵 (急発卵) が低酸素や低温に曝されると一時的に発生が停止するため (Uye 1985)、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)。必要なときに常温に戻し、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 (Marcus 2005, Pan et al. 2019)、保管・流通の面で優れた特徴である。



Table 2. Research list of marine copepod culture.

Copepod species	Temp. (°C)	Salinity	Photo period (Light : Dark)	Food diet	References
<i>Acartia bilobata</i>	26±3	20	12:12h	<i>Isochrysis galbana</i>	Pan et al. 2014
<i>Acartia bilobata</i>	28	20	12:12h	<i>Isochrysis galbana</i>	Pan et al. 2019
<i>Acartia bilobata</i>	28±1	30±1	Ambient light	<i>Isochrysis galbana</i>	Chintada et al. 2021
<i>Acartia bilobata</i>	28±1	30±1	Ambient light	<i>Isochrysis galbana</i>	Chintada et al. 2023
<i>Acartia centruta</i>	28-30	32-37	-	Mixture of <i>Chlorella marina</i> , <i>Isochrysis galbana</i> & <i>Nannochloropsis salina</i>	Vengadeshperumal et al. 2010
<i>Acartia clausi</i>	15-20	-	12:12h	Mixture of <i>Isochrysis</i> sp. & <i>Monochrysis</i> sp.	Iwasaki 1979
<i>Acartia erythraea</i>	20	-	12:12h	<i>Thalassiosira weissflogii</i>	Rahman et al. 2022
<i>Acartia grani</i>	19	38	12:12h	<i>Rhodomonas salina</i>	Da Costa et al. 2005
<i>Acartia sinjiensis</i>	28±2	30	-	Mixture of <i>Heterocapsa niei</i> , <i>Isochrysis</i> sp., <i>Rhodomonas</i> sp. & <i>Tetraselmis</i> sp.	Knuckey et al. 2005
<i>Acartia sinjiensis</i>	27-30	30-35	18:6h	Mixture of <i>Tetraselmis chuii</i> & <i>Isochrysis tahitians</i>	Milione & Zeng 2007
<i>Acartia sinjiensis</i>	30±1	33±1	12:12h	Mixture of <i>Isochrysis</i> sp. & <i>Tetraselmis chuii</i>	Camus & Zeng 2008
<i>Acartia sinjiensis</i>	30±1	30±1	18:6h	Mixture of <i>Isochrysis</i> sp. & <i>Tetraselmis chuii</i>	Camus & Zeng 2009
<i>Acartia southwelli</i>	28-30	32-37	-	Mixture of <i>Chlorella marina</i> , <i>Isochrysis galbana</i> & <i>Nannochloropsis salina</i>	Vengadeshperumal et al. 2010
<i>Acartia southwelli</i>	25-28	30-35	-	Mixture of <i>Isochrysis galbana</i> & <i>Nannochloropsis salina</i>	Santhosh et al. 2018
<i>Acartia steueri</i>	25	35	Cont. dark	<i>Thalassiosira weissflogii</i>	Takayama et al. 2020
<i>Acartia steueri</i>	25	35	12:12h	Mixture of <i>Tetraselmis suecica</i> & <i>Thalassiosira weissflogii</i>	Takayama et al. 2021
<i>Acartia steueri</i>	25	35	12:12h	Mixture of <i>Tetraselmis suecica</i> & <i>Chaetoceros gracilis</i>	Takayama et al. 2022
<i>Acartia tonsa</i>	6-28	1-26	Ambient light	Natural microalgae	Ogle et al. 1979
<i>Acartia tonsa</i>	16-18	35	Cont. dim light	<i>Rhodomonas baltica</i>	Støttrup et al. 1986
<i>Acartia tonsa</i>	17	30	12:12h	<i>Rhodomonas salina</i>	Broglio et al. 2003
<i>Acartia tonsa</i>	20	30	16:8 h	Mixture of <i>Isochrysis galbana</i> & <i>Rhinomonas reticulata</i>	Medina & Barata 2004
<i>Acartia tonsa</i>	18-23	25-30	13:11h	<i>Rhodomonas</i> sp.	Peck & Holste 2006
<i>Acartia tonsa</i>	25	-	14:10h	<i>Rhodomonas lens</i> / <i>Rhodomonas salina</i>	Marcus & Wilcox 2007
<i>Acartia tonsa</i>	17	30	Cont. dark	<i>Rhodomonas salina</i>	Jepsen et al. 2007
<i>Acartia tonsa</i>	20	30	14:10h	Mixture of <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Rhinomonas reticulata</i> & <i>Rhodomonas baltica</i>	Zhang et al. 2013
<i>Acartia tonsa</i>	20±1	27	18:6h	Mixture of <i>Tetraselmis suecica</i> & <i>Nannochloropsis</i> sp.	Drillet et al. 2014
<i>Acartia tonsa</i>	17±1	34	Cont. dim light	<i>Rhodomonas salina</i>	Drillet et al. 2015
<i>Acartia tonsa</i>	17	32	Cont. dark	<i>Rhodomonas salina</i>	Jepsen et al. 2015
<i>Acartia tonsa</i>	17	34	Cont. dim light	Mixture of <i>Rhodomonas baltica</i> & <i>Isochrysis galbana</i>	Franco et al. 2017
<i>Acartia tonsa</i>	25	25	Ambient light	<i>Isochrysis lutea</i>	Sarkisian et al. 2019
<i>Acartia tonsa</i>	18±1	34	12:12h	<i>Rhodomonas baltica</i>	Pan et al. 2021
<i>Acartia tsuensis</i>	22-27	25-32	Ambient light	Natural microalgae	Ohno & Okamura 1988
<i>Acartia tropica</i>	-	10	-	<i>Isochrysis galbana</i>	Wilson et al. 2021
<i>Acartia tropica</i>	-	15	-	<i>Dicrateria inornata</i>	Wilson et al. 2022
<i>Acartia</i> spp.	28-32	30-34	Ambient light	Mixture of <i>Rhodomonas</i> sp., <i>Tetraselmis</i> sp. & <i>Isochrysis</i> sp.	Schipp et al. 1999
<i>Apocyclops cmfri</i>	30	29-35	-	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	Santhosh et al. 2018
<i>Apocyclops dengizicus</i>	30	10	12:12h	Mixture of bacteria grown by palm oil mill effluent (POME), yeast grown by POME & frozen microalgae	Isa et al. 2020
<i>Apocyclops royi</i>	25-30	15-20	12:12h	<i>Isochrysis galbana</i>	Su et al. 1997
<i>Apocyclops royi</i>	28	20	12:12h	<i>Isochrysis galbana</i>	Pan et al. 2016
<i>Apocyclops royi</i>	26-28	20	12:12h	<i>Isochrysis galbana</i>	Pan et al. 2018

<i>Apocyclops royi</i>	25	20	12:12h	<i>Rhodomonas salina</i>	Jepsen et al. 2021
<i>Apocyclops royi</i>	25	20	12:12h	<i>Rhodomonas salina</i> / <i>Dunaliella tertiolecta</i> / beaker's yeast	Nielsen et al. 2021
<i>Bestiolina similis</i>	26±1	27±1	12:12h	Mixture of <i>Isochrysis</i> sp., <i>Pavalova</i> sp. & <i>Tetraselmis chuii</i>	Camus & McKinnon 2009
<i>Bestiolina similis</i>	25-28	30-35	-	Mixture of <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Nannochloropsis</i> <i>salina</i> & <i>Chlorella marina</i>	Santhosh et al. 2018
<i>Bestiolina similis</i>	27±1	30±1	12:12h	Mixture of <i>Isochrysis</i> sp., <i>Pavalova</i> sp. & <i>Tetraselmis chuii</i>	Camus et al. 2021
<i>Calanus helgolandicus</i>	18	38	12:12h	Mixture of <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Rhodomonas baltica</i> , <i>Prorocentrum minimum</i> & <i>Thalassiosira weissflogii</i>	Carotenuto et al. 2012
<i>Centropages typicus</i>	19-21	38	12:12h	<i>Prorocentrum minimum</i> / <i>Isochrysis galbana</i> / <i>Tetraselmis suecica</i>	Bonnet & Carloti 2001
<i>Centropages typicus</i>	20±1	36	12:12h	Mixture of <i>Prorocentrum minimum</i> , <i>Isochrysis</i> <i>galbana</i> & <i>Tetraselmis suecica</i>	Buttino et al. 2012
<i>Eurytemora affinis</i>	10-15	15	12:12h	<i>Rhodomonas marina</i>	Devreker et al. 2009
<i>Euterpina acutifrons</i>	19	38	12:12h	<i>Rhodomonas salina</i>	Da Costa et al. 2005
<i>Euterpina acutifrons</i>	-	-	-	<i>Nannochloropsis oculata</i>	Gopakumar & Santhosi 2009
<i>Euterpina acutifrons</i>	27±1	30±1	12:12h	Mixture of <i>Isochrysis</i> sp., <i>Tetraselmis chuii</i> & <i>Pavlova</i> <i>salina</i>	Camus & Zeng 2012
<i>Euterpina acutifrons</i>	28	35	-	<i>Isochrysis galbana</i> / <i>Tetraselmis gracilis</i> / <i>Chaetoceros calcitrans</i> / <i>Chlorella marina</i>	Jasmine et al. 2016
<i>Euterpina acutifrons</i>	25-28	30-35	-	Mixture of <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Nannochloropsis</i> <i>salina</i> & <i>Chlorella marina</i>	Santhosh et al. 2018
<i>Euterpina acutifrons</i>	25-31	30±2	12:12h	<i>Isochrysis</i> sp.	Amatus et al. 2020
<i>Gladioferens imparipes</i>	20-25	27	Cont. dark	<i>Isochrysis tahitiensis</i>	Payne & Rippingale 2000a
<i>Gladioferens imparipes</i>	23-27	18	Cont. dark	<i>Isochrysis tahitiensis</i> / <i>Chaetoceros muelleri</i>	Payne & Rippingale 2001
<i>Oithona brevicornis</i>	-	-	-	-	Anraku 1979
<i>Oithona davisae</i>	20	30	-	<i>Oxhyrris marina</i>	Kjørboe 2007
<i>Oithona nana</i>	28	35	12:12h	<i>Isochrysis galbana</i> / <i>Chaetoceros calcitrans</i>	Huanacuni et al. 2021
<i>Oithona oculata</i>	23±2 31±3	38±1	Ambient light	Mixture of <i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Chaetoceros</i> <i>ceratosporum</i> , <i>Tetraselmis tetraathele</i> , <i>Chlorella</i> spp. & <i>Dunaliella tertiolecta</i>	Molejón & Alvarez-Lajonchere 2003
<i>Oithona oculata</i>	25-28	30-35	-	Mixture of <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Nannochloropsis</i> <i>salina</i> & <i>Chlorella marina</i>	Santhosh et al. 2018
<i>Oithona oculata</i>	28	35	12:12h	Mixture of <i>Isochrysis galbana</i> & <i>Thalassiosira</i> <i>weissflogii</i>	Takayama et al. 2021
<i>Oithona oculata</i>	25	35	Cont. dark	<i>Rhodomonas salina</i>	Takayama et al. 2023
<i>Oithona</i> sp.	25-28	30-35	-	Mixture of <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Nannochloropsis</i> <i>salina</i> & <i>Chlorella marina</i>	Santhosh et al. 2018
<i>Paracyclopina nana</i>	28	15	12:12h	<i>Tetraselmis suecica</i> / <i>Isochrysis galbana</i>	Lee et al. 2006
<i>Paracyclopina nana</i>	18	15	12:12h	<i>Rhodomonas salina</i>	Dayras et al. 2020
<i>Parvocalanus crassirostris</i>	26±1	36±1	16: 8h	Mixture of <i>Isochrysis</i> sp. & <i>Chaetoceros muelleri</i>	Alajmi & Zeng 2015
<i>Parvocalanus crassirostris</i>	25±1	22	Cont. light	Mixture of <i>Chaetoceros muelleri</i> & <i>Isochrysis</i> <i>galbana</i>	Kline & Laidley 2015
<i>Parvocalanus crassirostris</i>	25-28	30-35	-	Mixture of <i>Isochrysis galbana</i> & <i>Nannochloropsis</i> <i>salina</i>	Santhosh et al. 2018
<i>Pseudodiaptomus dubia</i>	28	27	12:12h	<i>Isochrysis zhanjiangensis</i> / <i>Chaetoceros muelleri</i>	Luo et al. 2019
<i>Pseudodiaptomus annandalei</i>	25-30	15-20	12:12h	<i>Tetraselmis chui</i> , <i>Isochrysis galbana</i> , & <i>rotifer</i> <i>Brachionus rotundiformis</i>	Dhanker et al. 2012
<i>Pseudodiaptomus annandalei</i>	26	20	12:12h	<i>Tetraselmis chuii</i>	Rayner et al. 2017
<i>Pseudodiaptomus annandalei</i>	25	20	12:12h	<i>Rhodomonas salina</i> / <i>Dunaliella tertiolecta</i>	Nielsen et al. 2021
<i>Pseudodiaptomus annandalei</i>	23±2	34	16:8h	<i>Tetraselmis suecica</i>	Kumar et al. 2021
<i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i>	27±1	35	12:12h	<i>Chaetoceros muelleri</i>	Puello-Cruz et al. 2009
<i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i>	24	35	Cont. light	<i>Isochrysis</i> sp.	Anzueto-Saches et al. 2014

<i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> & <i>Tisbe monozota</i> (co-culture)	27	35	12:12h	<i>Isochrysis</i> sp.	Puello-Cruz et al. 2013
<i>Pseudodiaptomus hessei</i>	26±1	28±1	Cont. light	Mixture of <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Tetraselmis suecica</i> & <i>Siqwepu</i> et al. 2017 <i>Rhodomonas salina</i>	
<i>Pseudodiaptomus inopinus</i>	-	-	-	-	Anraku 1979
<i>Pseudodiaptomus inopinus</i>	20	17	12:12h	Mixture of <i>Phaeodactylum</i> sp., <i>Pavlova</i> sp. & <i>Isochrysis</i> sp.	Matsui et al. 2021
<i>Pseudodiaptomus marinus</i>	20-25	8-18	Ambient light	Mixture of <i>Isochrysis</i> sp. & <i>Monochrysis</i> sp.	Iwasaki 1979
<i>Pseudodiaptomus nihonkaiensis</i>	25	36	12:12h	<i>Isochrysis galbana</i>	Koga 2022
<i>Pseudodiaptomus pelagicus</i>	26	25	14:10h	Mixture of <i>Thalassiosira weissflogii</i> & <i>Isochrysis</i> sp.	Ohs et al. 2010
<i>Pseudodiaptomus serricaudatus</i>	-	-	-	<i>Nannochloropsis oculata</i>	Gopakumar & Santhoshi 2009
<i>Pseudodiaptomus serricaudatus</i>	25-28	30-35	-	Mixture of <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Nannochloropsis salina</i> & <i>Chlorella marina</i>	Santhosh et al. 2018
<i>Sinocalanus tenellus</i>	-	-	-	-	Anraku 1979
<i>Temora stylifera</i>	20	-	12:12h	Mixture of <i>Prorocentrum minimum</i> & <i>Rhodomonas baltica</i>	Buttino et al. 2009
<i>Temora stylifera</i>	20±1	36	12:12h	Mixture of <i>Prorocentrum minimum</i> , <i>Isochrysis galbana</i> & <i>Tetraselmis suecica</i>	Buttino et al. 2012
<i>Temora turbinata</i>	25-28	30-35	-	Mixture of <i>Isochrysis galbana</i> & <i>Nannochloropsis salina</i>	Santhosh et al. 2018

## 5. 培養餌料

カイアシ類に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 (Dayras et al. 2020)。カイアシ類の培養餌料には一般的に微細藻類が用いられているが (Table 2)、対象種の好適餌料の選定には、餌料サイズや栄養素性、入手の容易性などを考慮する必要がある。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、摂餌可能なサイズ、摂餌に適したサイズは発達段階毎の体サイズに依存する (Berggreen et al. 1988)。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 *A. tonsa* に摂餌させ、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。その結果、ノープリウス幼生ではタンパク質に最も放射性炭素が取り込まれ、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。これは、発達に伴い、要求する栄養素が変化することを示唆する。脂質は、甲殻類の卵黄の主要成分であり

ポピテリンの 30~50% を占め (Lee et al. 2006)、カイアシ類の卵や卵巣においても高濃度に含まれていることが知られている (Sargent & Falk-Peterson 1988)。餌料中に含まれる、脂質を構成する脂肪酸の量および組成の違いがカイアシ類雌成体の卵生産速度へ与える影響は盛んに研究されており、C20:5n-3 (Eicosapentaenoic acid: EPA) あるいは C22:6n-3 (Docosahexaenoic acid: DHA) などの特定の脂肪酸の摂取により卵生産速度が増加することから (Chen et al. 2012)、好適な餌料を選定する際の指標として用いることが出来る。

餌料として用いる微細藻類の生産コストは未だ高く、カイアシ類の生産コスト増を招くことから、より費用対効果の高い餌料の開発がカイアシ類培養の実用化に向けた急務の課題である。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ことから、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.) が浮遊性カイアシ類 *Sinocalanus tenellus*、*Pseudodiaptomus inopinus*、*A. clausi* (現在の分類で *A. hudsonica* もしくは *A. omorii*)、*A. sinjiensis*、

*Parvocalanus crassirostris* の餌料として検討されたが卵生産性や生存率が低かったことが報告されている (Uye 2005, Alajmi & Zeng 2015)。近年では、パームオイル廃液 (Palm oil mill effluent) にて培養したバクテリアや紅色光合成細菌、酵母、原生動物をカイアシ類 *Apocyclops dengizicus* の餌料として用いる実験がなされ、微細藻類を餌料とした場合と同程度かそれ以上の個体群増殖が見られたことが報告されており (Isa et al. 2020)、今後の発展が待たれる。

## 6. 培養個体密度

カイアシ類培養における個体数密度は培養槽あたりの生産性のみならず生産コストを決定づける (Drillet et al. 2011)。現場海域における生息密度は、例えば *Acartia* 属カイアシ類の場合、最大でも 500 inds. L<sup>-1</sup> 程度であるが (Santu et al. 2016)、培養系では収量の増加をめざし *Acartia tonsa* で最大 45,000 inds. L<sup>-1</sup> での培養が実験的に試みられている (Torres et al. 2022)。高個体密度でカイアシ類を培養した際には、餌料の不足、溶存酸素濃度の低下、代謝産物の蓄積、物理的な他個体との接触などを引き起こす (Støttrup & Norsker 1997, Ozaki et al. 2010, Drillet et al. 2015)。そのため、高密度環境においてカイアシ類の生存率の低下 (Franco et al. 2017)、発達速度の低下 (Medina & Barata 2004)、卵生産速度の低下 (Rayner et al. 2017)、卵孵化率の低下 (Drillet et al. 2015)、卵孵化時間の遅滞 (Kahan et al. 1988, Camus & Zeng 2009)、内因性休眠卵 (diapause egg) 生産の誘発 (Ban 1992) が報告されている。*A. tonsa* においては、個体密度が 100 inds. L<sup>-1</sup> から 2,500 inds. L<sup>-1</sup> へ増加したのに伴い卵生産速度が 70% 以上低下し (Franco et al. 2017)、10 inds. L<sup>-1</sup> から 5,300 inds. L<sup>-1</sup> へ個体密度が増加するのに伴い孵化率が 10% 低下したことが報告されている (Drillet et al. 2015)。さらに、餌料が十分な環境においても、個体の込み合いによって摂餌速度が減少することが実験的に示されており (Tackx & Polk

1986, Mauchline 1998, Båmstedt et al. 2000)、例えば、*A. tonsa* においては、飽和餌環境下であっても個体密度が 20 ~ 500 inds. L<sup>-1</sup> へ増加するとその摂餌速度は半減する (Vu et al. 2017)。過剰な個体密度は、培養槽あたりの卵の収穫量を深刻に低下させ、生産される卵の質をも低下させるため、生産性が最大となる適切な個体密度を検討する必要がある。

個体密度と海産浮遊性カラヌス目カイアシ類の卵生産速度の関係を Fig. 4 に示す。

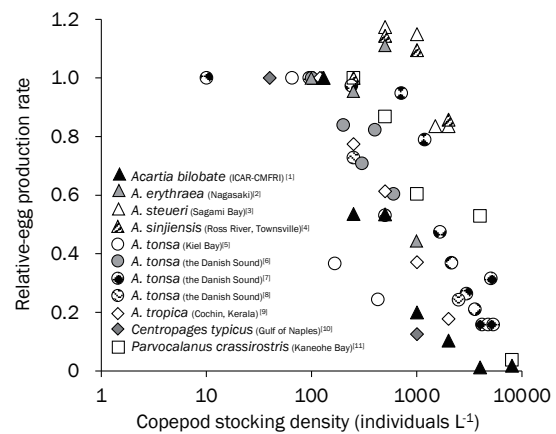


Fig. 4. Relationship between copepod stocking density and egg production rate (relative unit) standardized by the value of egg production rate at lowest stocking density (i.e. control condition) in marine planktonic copepods. [1] Chintada et al. 2021; [2] Rahman et al. 2022; [3] Takayama et al. 2020; [4] Camus & Zeng 2009; [5] Peck & Holste 2006; [6] Jepsen et al. 2007; [7] Drillet et al. 2015; [8] Franco et al. 2017; [9] Wilson et al. 2022; [10] Miralto et al. 1996; [11] Kline & Laidley 2015.

これらのカイアシ類の卵生産速度は培養密度がおおよそ 1,000 inds. L<sup>-1</sup> を超えると減少するため、卵生産速度に対する個体密度の閾値の存在が示唆される。しかし、同属種やたとえ同種であっても、その閾値の程度には差異が認められる (e.g. *A. tonsa*)。これらの差異は、個体群ごとに固有の環境に適應し、固有の特性を有するためと考えられている (Drillet et al. 2008)。高密度



環境に対して耐性を有する種や株を選択することで、より高密度での培養が期待されるため、高密度耐性（有用な形質）をもつ個体を選びだし、それらの継代を繰り返す選抜育種も提案されている（Drillet et al. 2011）。

## 7. 共食い

海産浮遊性カイアシ類において、同種内での成体個体による卵やノープリウス幼生の捕食すなわち共食いは *Acartia clausi* (Landry 1978a)、*A. liljeborgi* (Ara 2001)、*A. sinjiensis* (Camus & Zeng 2009)、*A. tonsa* (Lonsdale et al. 1979)、*A. tsuensis* (Ohno 1991)、*Calanus finmarchicus* (Basedow & Tande 2006)、*C. pacificus* (Landry 1981)、*Centropages furcatus* (Paffenhöfer & Knowles 1980)、*Labidocera trispinosa* (Landry 1978b)、*Oithona davisae* (Uchima & Hirano 1986)、*O. nana* (Lampitt 1979)、*O. oculata* (山本 2020)、*Rhincalanus nasutus* (Mullin & Brooks 1967)、*Sinocalanus tenellus* (Hada & Uye 1991)、*Temora longicornis* (Daan et al. 1988)、*Tigriopus fulvus* (Lazzaretto & Salvato 1992)、*Tigriopus japonicus* (Koga et al. 2022)、*Tortanus discaudatus* (Mullin 1979) など肉食性、雑食性問わずに報告されている。Ohno (1991) は *A. tsuensis* を単一槽内で 50 日間培養し、その個体群動態を調査した。その結果、成体の個体密度が増加した際に卵とノープリウス幼生が消失し、その後、成体個体密度も急激に減少しやがて培養系が破綻することを見出し、共食いによる次世代個体の加入阻害によるものと推察している。カイアシ類培養において、共食いによる卵とノープリウス幼生の損失は、収穫量の減少のみならず、次世代の個体群の加入量の減少や消失を招き、培養系における個体数や生産性を不安定にさせると考えられる。

共食いによる卵の損失数を増減させる要因としては、水温、餌濃度、成体・コペポダイト幼体の個体密度、卵生産数が挙げられるが (Drillet et al. 2014)、培養環境下では、一般的に水温と餌濃度は一定に維持され

るため、主に捕食者（成体・コペポダイト幼体）密度、卵生産数によって共食いによる卵の損失数は決定される。カイアシ類培養において共食いの発生は度々報告されているが、共食いによる卵・ノープリウス幼生の損失数を調査した研究は限られる。Drillet et al. (2014) は *Acartia tonsa* の培養において槽内で生産された卵の 30% が共食いによって損失すると報告し、高山ら (2021) は *Oithona oculata* を対象種として、3.5 L 規模での半連続培養を 45 日間行った実験から、槽内で生産されたノープリウス幼生の 30~90% が共食いによって損失すると推定しており、高密度での培養が望まれる大量培養では、卵・幼生の速やかな保護・分離が必要であろう。以下に、卵・幼生の保護・分離手法を整理する。

## 8. 卵・幼生の分離、リアクター

カイアシ類の培養にはアクリル製やガラス樹脂製の円形パンライト水槽や、沈殿槽型のアルテミア孵化槽、コンクリート製の水槽などが用いられる (安楽 1979, Drillet et al. 2011)。大量培養では、培養槽内で生産、成長した個体は収穫され魚類の餌料として利用されるが、一部の個体は継代培養されることで培養系は連続的に維持される。本邦において 1970 年代に行われた一連の研究では、卵・幼生の分離は行われず、生産された卵が槽内で孵化し、成体へと成長することで個体群が増加する。この方法では槽内にすべての発達段階が混在する。本手法は Ohno (1991)、Schipp et al. (1999)、Carotenuto et al. (2012)、Kline & Laidley (2015) によって利用、発展がなされている。

1980 年代にはいと、Støttrup et al. (1986) は培養槽内に沈殿した卵をサイフォンホースで回収する手法を考案した。これは、回収した卵の一部を継代用に培養し、成体になると採卵を開始し、回収した卵を用いて再び培養を繰り返すというものである。その後、カイアシ類の急発卵の冷蔵保存に関する一連の研究が展開され、その利便性から卵が収穫対象の主流となり、サイフォンホースでの回収を用いた研究が多数行われている (Medina

& Barata 2004, Marcus 2005, Marcus & Wilcox 2007, Franco et al. 2017)。この方法では、卵のみならず、糞粒や遺骸、脱皮殻や餌料藻類等からなるデトライトも同時に排出できるため水質の維持に貢献する一方で、手作業で分離作業を行うため労力がかかり、産卵から卵回収作業を行うまでの期間は共食いの脅威にさらされるため分離の即効性に課題がある。

2000年代には Payne & Rippingale (2001) によってノープリウス幼生回収槽を用いた培養が行われた。この培養方法では、抱卵型カイアシ類を対象とし、培養水の一部を目合いの異なる2種類のメッシュを備えたノープリウス幼生回収槽を通すことでノープリウス幼生のみを選択的に回収し、一部を別水槽で培養し継代用の個体を用意する。この手法は、自由放卵型の種においても利用され、共食いのリスクを最小限化することを目的に、卵の沈降や水流によって卵を成体から簡便に分離する手法へと発展している (Toledo et al. 2005, Buttino et al. 2012, Drillet et al. 2015, Sarkisian et al. 2019, Takayama et al. 2021, 高山ら 2021, Torres et al. 2022)。今後の実用化に向けては、これらの分離・回収性能の定量的な評価に加えて、規模を拡大しての実証、さらに自動化技術との融合による分離・回収作業の低労力化が期待される。

## 9. 保存技術

集約的培養における生産形態は、魚類孵化場においてカイアシ類餌料の使用者自らによる分散生産 (decentralized production) と企業等による集中生産 (centralized production) の2種類に大別される (Drillet et al. 2011)。集中生産では、生産された生物餌料は、魚類餌料として利用されるまでの間に出荷・輸送のプロセスを要するため、その保存方法が検討されている。抱卵型のカイアシ類ではノープリウス幼生ならびに成体での冷蔵保存が検討されており、*Gradiiferens imparites* のノープリウス幼生では 8°C で保存することで、12日間

程度であれば生存率は 99% 以上を示すことから (Payne & Rippingale 2001)、種苗生産でのノープリウス幼生の利用量に応じた一時的な保存が可能であると考えられている。その一方で自由放卵型のカイアシ類では、卵の状態での保存方法について検討されており、*Acartia tonsa* の急発卵を無酸素海水内で冷蔵保存することで 100日間程度であれば 75% 以上の孵化率を示すことが報告されている (Hansen et al. 2016)。

海産及び、汽水性の浮遊性カイアシ類において、現在までに 30 種が内因性休眠を生産することが報告されている (Takayama & Toda 2019)。内因性休眠卵は休止卵 (急発卵) と比べて長い不応期を有し、水産養殖で用いられる殺菌剤に暴露しても休止卵よりも高い生存率を示すことが報告されている (Lavens & Sorgeloos 1996)。そのため、内因性休眠は魚類生産槽への寄生生物や病原菌の混入の危険性を低減できるとされる (Marcus & Murray 2001)。その一方で、内因性休眠卵はその生産の誘発と休眠覚醒 (孵化) に種特異的な環境条件を必要とするため、水産養殖において内因性休眠卵の利用する際には、人工的にその環境を再現する必要があり、休止卵と比べ煩雑である。Ban (1992) は *Eurytemora affinis* の内因性休眠生産は、雌個体がノープリウス幼生、コペポダイト幼体期の際に経験した日長、水温そして個体数密度によって誘発されることを実験的に証明した。水産養殖での内因性休眠卵の利用には、休眠卵生産の誘発と休眠覚醒のメカニズムの解明による制御技術の開発が必要である。

## 10. 結語

50年にも及ぶ一連の研究によって、適種の探索、培養環境の最適化、培養手法の検討がなされ、実用規模での大量培養が海外で盛んに試みられており、その培養技術は一定のレベルまで成熟したといえる。一方で、カイアシ類大量培養の経済性や実現可能性を評価した研究例は限られており (e.g. Abate et al. 2015, 2016)、その経済的合理性に関する知見の公表が待たれる。カ

カイアシ類培養において餌料として用いる微細藻類の大量培養研究の進展は目覚ましいものがあるが、その生産コストは未だ高く、より費用対効果の高い餌料の開発がカイアシ類大量培養の実用化に向けた急務の課題と考えられる。プランクトン工学研究所が研究開発を行なっている有機性廃棄物・排水からの微細藻類生産プロセスとカイアシ類大量培養研究の融合は、低コスト・低環境負荷なカイアシ類生産の達成を目指す一つの方向性である。

## 謝辞

原稿について貴重なコメントを頂いた戸田龍樹博士、黒沢則夫博士、西部裕一郎博士、下出信次博士には記して深く感謝申し上げます。本研究の一部は日本学術振興会科研費（JP19H03035、JP21K14902）による助成を受け実施された。

## 引用文献

- Abate TG, Nielsen R, Nielsen M, Drillet G, Jepsen PM, Hansen BW (2015) Economic feasibility of copepod production for commercial use: result from a prototype production facility. *Aquaculture* 436: 72–79.
- Abate TG, Nielsen R, Nielsen M, Jepsen PM, Hansen BW (2016) A cost-effectiveness analysis of live feeds in juvenile turbot *Scophthalmus maximus* (Linnaeus, 1758) farming: copepods versus *Artemia*. *Aquac Nutr* 22: 899–910.
- 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.
- Amatus M, Basri NA, Shapawi R, Shaleh SRM (2020) Effect of temperature on population growth of copepod, *Euterpina acutifrons*. *BJoMSA* 4: 57–61.
- 安楽正照 (1979) 餌料用動物プランクトンの大量培養. 日本水産資源保護協会, 東京, 142 pp.
- Anzueto-Sánchez MA, Barón-Sevilla B, Cordero-Esquível B, Celaya-Ortega A (2014) Effects of food concentration and temperature on development, growth, reproduction and survival of the copepod *Pseudodiaptomus euryhalinus*. *Aquac Inter* 22: 1911–1923.
- Ara K (2001) Daily egg production rate of the planktonic calanoid copepod *Acartia lilljeborgi* Giesbrecht in the Cananéia Lagoon estuarine system, São Paulo, Brazil. *Hydrobiologia* 445: 205–215.
- Båmstedt U, Gifford DJ, Irigoien X, Atkinson A, Roman M (2000) “Feeding.” *Zooplankton Methodology Manual* (eds Harris RP, Wiebe PH, Lenz J, Skjoldal HR, Huntley M). Academic Press, Tokyo, pp. 297–399.
- Ban S (1992) Effect of photoperiod, temperature, and population density of induction of diapause egg production in *Eurytemora affinis* (Copepoda: Calanoida) in Lake Ohnuma, Hokkaido, Japan. *J Crust Biol* 12: 361–367.
- 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.
- Basedow SL, Tande KS (2006) Cannibalism by female *Calanus finmarchicus* on naupliar stages. *Mar Ecol Prog Ser* 327: 247–255.
- 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.
- Blanda E, Drillet G, Huang CC, Hwang JS, Jakobsen HH, Rayner TA, Su HM, Wu CH, Hansen BW (2015) Trophic interactions and productivity of copepods as live feed from tropical Taiwanese outdoor aquaculture ponds. *Aquaculture* 445: 11–21.
- Bonnet D, Carlotti F (2001) Development and egg production in *Centropages typicus* (Copepoda: Calanoida) fed different food types: a laboratory study. *Mar Ecol Prog Ser* 224: 133–148.
- Broglio E, Jónasdóttir SH, Calbet A, Jakobsen HH, Saiz E (2003) Effect of heterotrophic versus autotrophic food on feeding and reproduction of the calanoid copepod *Acartia tonsa*: relationship with prey fatty acid composition. *Aquat Microb Ecol* 31: 267–278.
- Buskey EJ (2005) “Behavioral characteristics of copepods that affect their suitability as food for larval fishes.” *Copepods in Aquaculture* (eds Lee CS, O'bryen PL, Marcus NH). Blackwell Publishing, Iowa, pp. 91–105.

- Buttino I, Ianora A, Buono S, Vitello V, Sansone G, Miralto A (2009) Are monoalgal diets inferior to plurialgal diets to maximize cultivation of the calanoid copepod *Temora stylifera*? *Mar Biol* 156: 1171–1182.
- Buttino I, Ianora A, Buono S, Vitiello V, Malzone MG, Rico C, Langellotti AL, Sansone G, Gennari L, Miralto A (2012) Experimental cultivation of the Mediterranean calanoid copepods *Temora stylifera* and *Centropages typicus* in a pilot re-circulating system. *Aquac Res* 43: 247–259.
- 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.
- Camus T, Zeng C (2009) The effects of stocking density on egg production and hatching success, cannibalism rate, sex ratio and population growth of the tropical calanoid copepod *Acartia sinjiensis*. *Aquaculture* 287: 145–151.
- Camus T, Zeng C, McKinnon AD (2009) Egg production, egg hatching success and population increase of the tropical paracalanid copepod, *Bestiolina similis* (Calanoida: Paracalanidae) fed different microalgal diets. *Aquaculture* 297: 169–175.
- Camus T, Zeng C (2012) Reproductive performance, survival and development of nauplii and copepodites, sex ratio and adult life expectancy of the harpacticoid copepod, *Euterpina acutifrons*, fed different microalgal diets. *Aquac Res* 43: 1159–1169.
- Camus T, Rolla L, Jiang J, Zeng C (2021) Effects of microalgal food quantity on several productivity-related parameters of the calanoid copepod *Bestiolina similis* (Calanoida: Paracalanidae). *Fron Mar Sci* 8: 812240.
- Carotenuto Y, Esposito F, Pisano F, Lauritano C, Perna M, Miralto A, Ianora A (2012) Multi-generation cultivation of the copepod *Calanus helgolandicus* in a re-circulating system. *J Exp Mar Bio Ecol* 418: 46–58.
- Chen M, Liu H, Chen B (2012) Effects of dietary essential fatty acids on reproduction rates of a subtropical calanoid copepod, *Acartia erythraea*. *Mar Ecol Prog Ser* 455: 95–110.
- Chesney EJ (2005) “Copepods as live prey: a review of factors that influence the feeding success of marine fish larvae.” *Copepods in Aquaculture* (eds Lee CS, O’bryen PL, Marcus NH). Blackwell Publishing, Iowa, pp. 13–150.
- Chintada B, Ranjan R, Santhosh B, Megarajan S, Ghosh S, Rani AB (2021) Effect of stocking density and algal concentration on production parameters of calanoid copepod *Acartia bilobata*. *Aquac Rep* 21: 100909.
- Chintada B, Ranjan R, Rani AB, Santhosh B, Megarajan S, Ghosh S, Gopalakrishnan A (2023) Effects of salinity on survival, reproductive performance, population growth, and life stage composition in the calanoid copepod *Acartia bilobata*. *Aquaculture* 563: 739025.
- Da Costa RM, Franco J, Cacho E, Fernández F (2005) Toxin content and toxic effects of the dinoflagellate *Gyrodinium corsicum* (Paulmier) on the ingestion and survival rates of the copepods *Acartia grani* and *Euterpina acutifrons*. *J Exp Mar Bio Ecol* 322: 177–183.
- Daan R, Gonzalez SR, Klein Breteler WCM (1988) Cannibalism in omnivorous calanoid copepods. *Mar Eco Prog Ser* 47: 45–54.
- Dayras P, Bialais C, Lee JS, Souissi S (2020) Effects of microalgal diet on the population growth and fecundity of the cyclopoid copepod *Paracyclops nana*. *J World Aquac Soc* 51: 1386–1401.
- Devreker D, Souissi S, Winkler G, Forget-Leray J, Leboulenger F (2009) Effects of salinity, temperature and individual variability on the reproduction of *Eurytemora affinis* (Copepoda; Calanoida) from the Seine estuary: a laboratory study. *J Exp Mar Bio Ecol* 368: 113–123.
- Dhanker R, Kumar R, Hwang JS (2012) Predation by *Pseudodiaptomus annandalei* (Copepoda: Calanoida) on rotifer prey: size selection, egg predation and effect of algal diet. *J Exp Mar Bio Ecol* 414: 44–53.
- Doi M, Ohno A, Taki Y, Singhagraiwan T, Kohno H (1997) Nauplii of the calanoid copepod, *Acartia sinjiensis* as an initial food organism for larval red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*. *Aquac Sci* 45: 31–40.
- Drillet G, Jepsen PM, Højgaard JK, Jørgensen NOG, Hansen BW (2008) Strainspecific vital rates in four *Acartia tonsa* cultures II: life history traits and biochemical contents of eggs and adults. *Aquaculture*



- 279: 47–54.
- 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.
- Drillet G, Maguet R, Mahjoub MS, Roullier F, Fielding MJ (2014) Egg cannibalism in *Acartia tonsa*: effects of stocking density, algal concentration, and egg availability. *Aquac Inter* 22: 1295–1306.
- Drillet G, Lombard F (2015) A first step towards improving copepod cultivation using modelling: the effects of density, crowding, cannibalism, tank design and strain selection on copepod egg production yields. *Aquac Res* 46: 1638–1647.
- Drillet G, Rais M, Novac A, Jepsen PM, Mahjoub MS, Hansen BW (2015) Total egg harvest by the calanoid copepod *Acartia tonsa* (Dana) in intensive culture-effects of high stocking densities on daily egg harvest and egg quality. *Aquac Res* 46: 3028–3039.
- FAO (2020) The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, 244 pp.
- Franco SC, Augustin CB, Geffen AJ, Dinis MT (2017) Growth, egg production and hatching success of *Acartia tonsa* cultured at high densities. *Aquaculture* 468: 569–578.
- 福所邦彦 (1980) 油脂酵母によるティグリオプスのシオミズツボフムシとの混合生産. *日本水産学会誌* 46: 625–629.
- Godfray HCJ, Beddington JR, Crute IR, Haddad L, Lawrence D, Muir JF, Pretty J, Robinson S, Thomas SM, Toulmin C (2010) Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science* 327: 812–818.
- Gopakumar G, Santhosi I (2009) Use of copepods as live feed for larviculture of damselfishes. *Asian Fish Sci* 22: 1–6.
- Hada A, Uye SI (1991) Cannibalistic feeding behavior of the brackish-water copepod *Sinocalanus tenellus*. *J Plankton Res* 13: 155–166.
- 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.
- 日野明德 (1994) “種苗生産.” 現代の水産学 (日本水産学会出版委員会編). 恒星社厚生閣, 東京, pp. 124–131.
- Huanacuni JI, Pepe-Victoriano R, Lora-Vilchis MC, Merino GE, Torres-Taípe FG, Espinoza-Ramos LA (2021) Influence of microalgae diets on the biological and growth parameters of *Oithona nana* (Copepoda: Cyclopoida). *Anim* 11: 3544.
- 飯島沙織, 岡原良太, 鷲尾健司, 森川正章 (2012) 海水環境でバイオフィルムを形成する *Pseudoalteromonas* 属細菌に見られるユニークな微生物学的特性. *日本水産学会誌* 66: 186–190.
- Isa NFM, Loo PL, Sabaratnam V (2020) Waste-grown heterotrophic microorganisms improve the production of *Apocyclops dengizicus*. *Aquaculture* 528: 735566.
- 伊藤隆 (1960) 輪虫の海水培養と保存について. *三重県立大学水産学部紀要* 3: 708–740.
- 岩崎英雄 (1979) “IV 浮遊性コペポーダ・枝角類の培養.” 餌料用動物プランクトンの大量培養 (安楽編). *日本水産資源保護協会*, 東京, pp. 34–57.
- Jasmine S, George RM, Lazarus S (2016) Observations on the laboratory culture of the harpacticoid copepod *Euterpina acutifrons* (Dana, 1847) using different diets. *Indian J Fish* 63: 82–88.
- Jepsen PM, Andersen N, Holm T, Jørgensen AT, Højgaard JK, Hansen BW (2007) Effects of adult stocking density on egg production and viability in cultures of the calanoid copepod *Acartia tonsa* (Dana). *Aquac Res* 38: 764–772.
- Jepsen PM, Andersen CV, Schjelde J, Hansen BW (2015) Tolerance of un-ionized ammonia in live feed cultures of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. *Aquac Res* 46: 420–431.
- Jepsen PM, Gréve S, Jørgensen, KN, Kjær KG, Hansen BW (2021) Evaluation of high-density tank cultivation of the live-feed cyclopoid copepod *Apocyclops royi* (Lindberg 1940). *Aquaculture* 533: 736125.
- Kahan D, Berman Y, Bar-El T (1988) Maternal inhibition of hatching at high population densities in *Tigriopus japonicus* (Copepoda, Crustacea). *Biol Bull* 174: 139–144.
- 北島力 (1973) コペポーダの大量増殖の試験的試み. *日*

- 本プランクトン学会報 20: 54–60.
- 北島力 (1979) “VI 餌料効果.” 餌料用動物プランクトンの大量培養 (安楽編). 日本水産資源保護協会, 東京, pp. 113–128.
- Kjørboe T (2007) Mate finding, mating, and population dynamics in a planktonic copepod *Oithona davisae*: there are too few males. *Limnol Oceanogr* 52: 1511–1522.
- Kline MD, Laidley CW (2015) Development of intensive copepod culture technology for *Parvocalanus crassirostris*: optimizing adult density. *Aquaculture* 435: 128–136.
- 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.
- 古閑伸一 (2022) 半底生性かいし類 *Pseudodiaptomus nihonkaiensis* の培養における付着基質の影響. 創価大学大学院理工学研究科修士論文.
- Koga S, Takayama Y, Toda T (2022) Suppression of cannibalism in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* (Mori, 1932) and improvements in population density using artificial substrates. *Aquac Fish Fisher* 2: 146–150.
- Kumar DS, Krishnaveni N, Santhanam P, Raju P, Perumal P, Begum A, Ahmad SU, Pragnya M, Dhanalakshmi B, Kim MK (2021) Growth enhancement in marine copepod, *Pseudodiaptomus annandalei* fed with the sodium acetate containing N/P starved medium grown, *Tetraselmis suecica*. *Aquac Res* 52: 4154–4165.
- Lampitt RS (1979) Aspects of the nutritional ecology of the marine planktonic copepod *Oithona nana*. PhD thesis. University of Aberdeen, United Kingdom.
- Landry MR (1978a) Population dynamics and production of a planktonic marine copepod, *Acartia clausii*, in a small temperate lagoon on San Juan Island, Washington. *Inter Rev Ges Hydro Hydrog* 63: 77–119.
- Landry MR (1978b) Predatory feeding behavior of a marine copepod, *Labidocera trispinosa* 1. *Limnol Oceanogr* 23: 1103–1113.
- Landry MR (1981) Switching between herbivory and carnivory by the planktonic marine copepod *Calanus pacificus*. *Mar Biol* 65: 77–82.
- Lavens P, Sorgeloos P (1996) Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper 361. FAO, Rome, 295 pp.
- Lazzaretto I, Salvato B (1992) Cannibalistic behavior in the harpacticoid copepod *Tigriopus fulvus*. *Mar Biol* 113: 579–582.
- Lee RF, Hagen W, Kattner G (2006) Lipid storage in marine zooplankton. *Mar Ecol Prog Ser* 307: 273–306.
- Lee (2011) The outlook for population growth. *Science* 333: 569–573.
- Lonsdale DJ, Heinle DR, Siegfried C (1979) Carnivorous feeding behavior of the adult calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. *J Exp Mar Biol Ecol* 36: 235–248.
- Luo X, Li C, Huang X (2019) Effect of diet on the development, survival, and reproduction of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus dubia*. *J Oceanol Limnol* 37: 1756–1767.
- Marcus NH, Murray M (2001). Copepod diapause eggs: a potential source of nauplii for aquaculture. *Aquaculture* 201: 107–115.
- Marcus NH (2005) “Calanoid copepods, resting eggs and aquaculture.” *Copepods in Aquaculture* (eds Lee CS, O'bryen PL, Marcus NH). Blackwell Publishing, Iowa, pp. 3–10.
- Marcus NH, Wilcox JA (2007) A guide to the meso-scale production of the copepod *Acartia tonsa*. Technical publication - Florida Sea Grant 27.
- Matsui H, Sasaki T, Kobari T, Waqalevu V, Kikuchi K, Ishikawa M, Kotani T (2021) DHA accumulation in the polar lipids of the euryhaline copepod *Pseudodiaptomus inopinus* and its transfer to red sea bream *Pagrus major* larvae. *Front Mar Sci* 8: 632876.
- Mauchline J (1998) *Advances of Marine Biology* 33: The Biology of Calanoid Copepods. Academic Press, Cambridge, 710 pp.
- McEvoy LA, Naess T, Bell JG, Lie Ø (1998) Lipid and fatty acid composition of normal and malpigmented Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed enriched *Artemia*: a comparison with fry fed wild copepods. *Aquaculture* 163: 237–250.
- Medina M, Barata C (2004) Static-renewal culture of *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida) for ecotoxicology.

- logical testing. *Aquaculture* 229: 203–213.
- Milione M, Zeng C, Tropical Crustacean Aquaculture Research Group (2007) The effects of algal diets on population growth and egg hatching success of the tropical calanoid copepod, *Acartia sinjiensis*. *Aquaculture* 273: 656–664.
- Miralto A, Ianora A, Poulet SA, Romano G, Laabir M (1996) Is fecundity modified by crowding in the copepod *Centropages typicus*? *J Plankton Res* 18: 1033–1040.
- Molejón OH, Alvarez-Lajonchere L (2003) Culture experiments with *Oithona oculata* Farran, 1913 (Copepoda: Cyclopoida), and its advantages as food for marine fish larvae. *Aquaculture* 219: 471–483.
- Mullin MM, Brooks ER (1967) Laboratory culture, growth rate, and feeding behavior of a planktonic marine copepod 1. *Limnol Oceanogr* 12: 657–666.
- Mullin MM (1979) Differential predation by the carnivorous marine copepod, *Tortanus discaudatus*. *Limnol Oceanogr* 24: 774–777.
- Nielsen BLH, Gréve HVS, Hansen BW (2021) Cultivation success and fatty acid composition of the tropical copepods *Apocyclops royi* and *Pseudodiaptomus annandalei* fed on monospecific diets with varying PUFA profiles. *Aquac Res* 52: 1127–1138.
- 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.
- 萩原篤志 (2014) “5章 仔魚の餌料生物としての動物プランクトン.” 養殖の餌と水一塗の主役たち (杉田治男編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.75–115.
- Ogle J (1979) Adaptation of a brown water culture technique to the mass culture of the copepod *Acartia tonsa*. *Gulf Caribb Res* 6: 291–292.
- Ohno A, Okamura Y (1988) Propagation of the calanoid copepod, *Acartia tsuensis*, in outdoor tanks. *Aquaculture* 70: 39–51.
- Ohno A (1991) Fundamental study on the extensive seed production of the red sea bream, *Pagrus major*. Special Research Report 2: 1–110.
- Ohs CL, Chang KL, Grabe SW, DiMaggio MA, Stenn E (2010) Evaluation of dietary microalgae for culture of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus pelagicus*. *Aquaculture* 307(3-4): 225–232.
- Ozaki Y, Kaneko G, Yanagawa Y, Watabe S (2010) Calorie restriction in the rotifer *Brachionus plicatilis* enhances hypoxia tolerance in association with the increased mRNA levels of glycolytic enzymes. *Hydrobiologia* 649: 267–277.
- Paffenhöfer GA, Knowles SC (1980) Omnivorousness in marine planktonic copepods. *J Plankton Res* 2(4): 355–365.
- 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, Souissi S, Hwang JS (2016) Effects of salinity on the reproductive performance of *Apocyclops royi* (Copepoda, Cyclopoida). *J Exp Mar Biol Ecol* 475: 108–113.
- Pan YJ, Sadovskaya I, Hwang JS, Souissi S (2018) Assessment of the fecundity, population growth and fatty acid composition of *Apocyclops royi* (Cyclopoida, Copepoda) fed on different microalgal diets. *Aquac Nutr* 24: 970–978
- 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.
- Pan YJ, Wang WL, Hwang JS, Souissi S (2021) Effects of epibiotic diatoms on the productivity of the calanoid copepod *Acartia tonsa* (Dana) in intensive aquaculture systems. *Front Mar Sci* 8: 728779.
- Payne MF, Rippingale RJ (2000a) Evaluation of diets for culture of the calanoid copepod *Gladiferens imparipes*. *Aquaculture* 187: 85–96.
- Payne MF, Rippingale RJ (2000b) Rearing West Australian seahorse, *Hippocampus subelongatus*, juveniles on copepod nauplii and enriched *Artemia*. *Aquaculture* 188: 353–361.
- Payne MF, Rippingale RJ (2001) Effects of salinity, cold storage and enrichment on the calanoid copepod *Gladiferens imparipes*. *Aquaculture* 201: 251–262.
- Payne MF, Rippingale RJ, Cleary JJ (2001) Cultured co-

- pepods as food for West Australian dhufish (*Glaucosoma hebraicum*) and pink snapper (*Pagrus auratus*) larvae. *Aquaculture* 194: 137–150.
- Peck MA, Holste L (2006) Effects of salinity, photoperiod and adult stocking density on egg production and egg hatching success in *Acartia tonsa* (Calanoida: Copepoda): optimizing intensive cultures. *Aquaculture* 255: 341–350.
- Puello-Cruz AC, Mezo-Villalobos S, González-Rodríguez B, Voltolina D (2009) Culture of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus euryhalinus* (Johnson 1939) with different microalgal diets. *Aquaculture* 290: 317–319.
- Puello-Cruz AC, Mezo-Villalobos S, Voltolina D (2013) Progeny production of the copepods *Pseudodiaptomus euryhalinus* and *Tisbe monozota* in monospecific and mixed cultures. *J World Aquac Soc* 44: 447–454.
- Rahman NA, Teh JC, Katayama T, Wahid ME, Nagao N, Yamada Y, Takahashi K (2022) Effect of newly isolated high antioxidant diatom on the reproduction and stress tolerance of the marine copepod, *Acartia erythraea* under crowding stress. *Aquac Res* 53: 5365–5374.
- 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.
- Rayner TA, Højgaard JK, Hansen BW, Hwang JS (2017) Density effect on the ovigerous rate of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus annandalei* (Sewell 1919): implications for aquaculture. *Aquac Res* 48: 4573–4577.
- Roman MR (1991) Pathways of carbon incorporation in marine copepods: Effects of developmental stage and food quantity. *Limnol Oceanogr* 36: 796–807.
- Santhosh B, Anil MK, Anzeer FM, Aneesh KS, Mijo V, Abraham GG, Rani MG, Gopalakrishnan A, Unnikrishnan C (2018) Culture Techniques of Marine Copepods. ICAR-Central Marine Fisheries Research Institute, Kerala, 144 pp.
- Santu KS, Nandan SB, Athira K (2016) Occurrence of mass swarming of family Acartiidae (calanoid copepods) (zooplankton) in Ashtamudi Estuary, Kerala. *Int J Mar Sci* 6: 1–8.
- Sargent JR, Falk-Petersen S (1988) The lipid biochemistry of calanoid copepods. *Hydrobiologia* 167: 101–114.
- Sarkisian BL, Lemus JT, Apeitos A, Blaylock RB, Sailant EA (2019) An intensive, large-scale batch culture system to produce the calanoid copepod, *Acartia tonsa*. *Aquaculture* 501: 272–278.
- Schipp GR, Bosmans JM, Marshall AJ (1999) A method for hatchery culture of tropical calanoid copepods, *Acartia* spp. *Aquaculture* 174: 81–88.
- 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.
- Siqwepu O, Richoux NB, Vine NG (2017) The effect of different dietary microalgae on the fatty acid profile, fecundity and population development of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus hessei* (Copepoda: Calanoida). *Aquaculture* 468: 162–168.
- Stappen VG, Sui L, Hoa VN, Tamtin M, Nyonje B, Rocha RM, Sorgeloos P, Gajardo G (2020) Review on integrated production of the brine shrimp *Artemia* in solar salt ponds. *Rev Aquac* 12: 1054–1071.
- State of Utah Division of Wildlife Resources (2020) Brine shrimp sampling data. <https://wildlife.utah.gov/> (2020年8月1日アクセス)
- Støttrup JG, Richardson K, Kirkegaard E, Pihl NJ (1986) The cultivation of *Acartia tonsa* Dana for use as a live food source for marine fish larvae. *Aquaculture* 52: 87–96.
- Støttrup JG, Norsker NH (1997) Production and use of copepods in marine fish larviculture. *Aquaculture* 155: 231–247.
- Støttrup JG (2003) “Production and nutritional value of copepods.” *Live Feeds in Marine Aquaculture* (eds Støttrup JG, Mcevoy LA). Blackwell Publishing, Oxford, pp. 145–205.
- Su HM, Su MS, Liao IC (1997) Collection and culture of live foods for aquaculture in Taiwan. *Hydrobiologia*



- 358: 37–40.
- Tackx M, Polk P (1986) Effect of incubation time and concentration of animals in grazing experiments using a narrow size range of particles. *Syllogeus* 58: 604–609.
- Takayama Y, Toda T (2019) Switch from production of subitaneous to delayed-hatching and diapause eggs in *Acartia japonica* Mori, 1940 (Copepoda: Calanoida) from Sagami Bay, Japan. *Reg Stu Mar Sci* 29: 100673.
- 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.
- 高山佳樹, 山本 翼, 戸田龍樹 (2021) 抱卵型カイアシ類 *Oithona oculata* のバイオリアクターを用いた試験的培養. *プランクトン工学研究* 1: 22–31.
- 高山佳樹, 平原南萌, 戸田龍樹 (2022) 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. *プランクトン工学研究* 2: 32–43.
- Takayama Y, Yamasaki T, Toda T (2023) Evaluation of microalgal diet to culture adult *Oithona oculata* Farran (Copepoda, Cyclopoida). *Aquac Res* 2023: 2089803.
- 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.
- Toledo JD, Golez MS, Doi M, Ohno A (1999) Use of copepod nauplii during early feeding stage of grouper *Epinephelus coioides*. *Fish Sci* 65: 390–397.
- Toldedo JD, Golez MS, Ohno A (2005) “Studies in the Use of Copepods in the Semi-intensive Seed Production of Grouper *Epinephelus coioides*.” Copepods in Aquaculture (eds Lee CS, O'bryen PL, Marcus NH). Blackwell Publishing, Iowa, pp. 169–182.
- Torres GA, Merino GE, Prieto-Guevara MJ (2022) Continuous egg separation of the copepod *Acartia tonsa*. Implications for increasing adult density at an intensive level. *Aquac Rep* 22: 100995.
- Uchima M, Hirano R (1986) Predation and cannibalism in neritic copepods. *Bull Plankton Soc Japan* 33: 147–149.
- 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.” Copepods in Aquaculture (eds Lee CS, O'bryen PL, Marcus NH). Blackwell Publishing, Iowa, pp. 75–90.
- Vengadeshperumal N, Damotharan P, Rajkumar M, Perumal P, Vijayalakshmi S, Balasubramanian T (2010) Laboratory culture and biochemical characterization of the calanoid copepod, *Acartia southwelli* Sewell, 1914 and *Acartia centrura* Giesbrecht, 1889. *Biol Res* 4: 97–107.
- Vu MT, Hansen BW, Kiørboe T (2017) The constraints of high density production of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. *J Plankton Res* 39: 1028–1039.
- 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.
- Wilson JM, Ignatius B, Sawant PB, Santhosh B, Chadha NK (2021) Productivity of the calanoid copepod *Acartia tropica* in response to different salinities and multigenerational acclimatization. *Aquaculture* 531: 735818.
- Wilson JM, Ignatius B, Santhosh B, Sawant PB, Som SA (2022) Effect of adult density on egg production, egg hatching success, adult mortality, nauplii cannibalism and population growth of the tropical calanoid copepod *Acartia tropica*. *Aquaculture* 547: 737508.
- Witt U, Quantz G, Kuhlmann D, Kattner G (1984) Survival and growth of turbot larvae *Scophthalmus maximus* L. reared on different food organisms with special regard to long-chain polyunsaturated fatty acids. *Aquac Eng* 3: 177–190.
- 山本 翼 (2020) 抱卵型かいあし類の連続培養法に関する研究～半連続培養における共食いの影響～. 創

価大学大学院理工学研究科修士論文.

Zhang J, Wu C, Pellegrini D, Romano G, Esposito F, Ianora A, Buttino I (2013) Effects of different monoalgal diets on egg production, hatching success and apop-

tosis induction in a Mediterranean population of the calanoid copepod *Acartia tonsa* (Dana). *Aquaculture* 400: 65–7

# TiO<sub>2</sub> 光触媒を用いたプラスチックフィルム分解におけるプラスチックの種類と光触媒濃度の影響

山口真奈未<sup>1)</sup>、成田唯人<sup>1)</sup>、西健斗<sup>2)</sup>、松山達<sup>2)</sup>、井田旬一<sup>2)\*</sup>

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

## Effect of plastic-type and photocatalyst concentration on plastic film degradation using TiO<sub>2</sub>

Manami Yamaguchi<sup>1)</sup>, Yuito Narita<sup>1)</sup>, Kento Nishi<sup>2)</sup>, Tatsushi Matsuyama<sup>2)</sup> and Junichi Ida<sup>2)\*</sup>

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

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

\* Corresponding author: [ida@soka.ac.jp](mailto:ida@soka.ac.jp)

2023年4月29日受付, 2023年5月10日受理

**Abstract** Microplastics, small plastic pieces less than 5 mm in size, are one of the most concerning pollutants that can be harmful to the environment and its biota today. Because of their high abundance and small particle size, microplastics are known to be easily ingested by microorganisms and affect many organisms as they move through the food chain. In addition, there is concern that microplastics can be vectors of hazardous substances as they are known to adsorb persistent organic pollutants (POPs) in the environment. However, an efficient treatment method for removing microplastics in wastewater has yet to be established. In recent years, research on introducing photocatalytic oxidative degradation systems into wastewater treatment plants (WWTPs) was reported for the potential removal of microplastics from wastewater. Nevertheless, previous reports only focused on developing and evaluating photocatalysts suitable for microplastic degradation, and the examination of the effects of the types of plastic and photocatalyst concentration on microplastic degradation remains limited. The aim of this study is to evaluate the effect of plastic type and photocatalyst concentration on the degradation of plastic. We used four types of plastic films in the experiment: low-density polyethylene (LDPE), high-density polyethylene (HDPE), polypropylene (PP) and polyethylene terephthalate (PET), where the degradation of the plastic was measured by weight. The most used and commercially available TiO<sub>2</sub> (P25) was used as a photocatalyst with different concentrations from 0.001 to 1.0 g L<sup>-1</sup>. The plastic degradation experiment used 3.30 cm squares films with 25 to 30 μm thickness under ultraviolet light irradiation using nine black-light fluorescent lamps (6 W; wavelength: 340–400 nm). The degradation and surface morphology of the plastic film was evaluated by measuring weight loss, carbonyl index, and scanning electron microscopy. The result showed the LDPE had

the highest weight loss compared to other plastic types, which could be due to its simple structure consisting solely of C–H single bonds. Additionally, the highest degradation rate was observed when the photocatalyst concentration was  $0.01 \text{ g L}^{-1}$ . The reason for the degradation rate decrease at concentrations above  $0.01 \text{ g L}^{-1}$  was probably due to the self-light shielding effect of  $\text{TiO}_2$ . The low degradation rate at a lower concentration of less than  $0.01 \text{ g L}^{-1}$  could be due to insufficient catalyst concentration. In the future, it will be important to analyze the degradation pathways by measuring intermediates during the degrading process for each plastic type.

**Keywords:** Microplastic degradation, Photocatalyst, Titanium oxide, Wastewater treatment

---

## 1. 緒言

近年、生活圏から流出したマイクロプラスチック (MP) による海洋汚染が国際的に問題となっている。プラスチックは加工しやすく、大量生産しやすいなどの点から日用品に多く利用されている。しかし、自然界では分解されにくいという特徴から、一度環境中へ放出されると海洋まで流れ着き、蓄積する。2019年のG20大阪サミットにおいて、2050年までに海洋プラスチックごみによる追加的な汚染をゼロまで削減することを目指す「大阪ブルー・オーシャン・ビジョン」が提唱された。このような背景から効率的なMP削減に向けた技術の確立が求められており、太陽光照射によって有機化合物の酸化分解が可能である光触媒に期待が寄せられている。

MPは、その発生源から一次と二次に分けられる。一次MPとは、元々5mm以下のサイズで製造されたプラスチックである。例えば、ペレット、洗顔料・歯磨き粉に含まれるマイクロビーズがある。これらが排水処理施設に流されると、一部のMPはろ過システムを通過し、淡水環境に放出される可能性がある (Carr et al. 2016, Murphy et al. 2016)。二次MPは、プラスチック製品が断片化して形成されたものである。プラスチックは、高分子、疎水性、架橋構造であることから生分解に強い耐性がある (Gautam et al. 2007)。焼却されずに環境中に放出されたプラスチックは、紫外光や高温、波の影響で断片化しMPとなる。また、衣服の素材として利用

されている合成繊維も別の形態のプラスチックであるが、洗濯中に衣服あたり最大1900本の繊維を排出することが指摘されており (Browne et al. 2011)、一次MPと同様の経路で、環境中に放出される可能性がある。

MPは存在量が多くかつ粒子径が小さいために、動物プランクトンや微生物によって摂取されやすく、食物連鎖を通じてさまざまな海洋生物に侵入する。マグロ (Neto et al. 2020)、メカジキ (Romeo et al. 2015) など、ヒトが消費する魚種からもMPが検出されている。また、空気中や塩、飲料水などにも含まれているとの報告もある (Zhang et al. 2020)。MPは私たちヒトの唾液 (Abbasi & Turner 2021)、肺組織 (Amato-Lourenço et al. 2021)、および便 (Luqman et al. 2021) などからも発見されており、年間約74,000–113,000個のMP粒子が人体に侵入していると推定されている (Cox et al. 2019)。インドネシアで行われたヒトの便に含まれるMPの調査 (Cox et al. 2019) では、高密度ポリエチレン (HDPE) が最も多く検出された。また、低密度ポリエチレン (LDPE)、ポリプロピレン (PP)、ポリスチレン (PS)、ポリエチレンテレフタレート (PET) などのMPが検出されており、様々な種類のプラスチックを摂取していることがわかった。しかし、MPが人体に与える影響は未だ解明されておらず、ヒト臓器細胞を用いた研究が進められている。

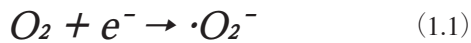
MPは比表面積が大きく、環境中の多環芳香族炭化水素 (PAHs)、ポリ塩化ビフェニル (PCB)、臭素系難



燃剤 (PBDEs)、ダイオキシン及び金属などを表面吸着することが確認されている (Besseling et al. 2013)。これらの環境汚染物質を表面吸着した MP が、風や海流の作用で長距離運搬されることや、生物体内に侵入することが懸念されている。

一方、光触媒とは、光を吸収して酸化還元反応を引き起こす半導体材料である。固体はバンド構造からなり、半導体や絶縁体は、価電子帯と呼ばれる電子が最大限収容されているバンドと、伝導帯と呼ばれるエネルギーの高い空のバンドを持つ。二つのバンドのエネルギー差をバンドギャップといい、これより大きいエネルギーを持つ光を吸収することで、価電子帯の電子が励起され伝導帯へ移る。この際に価電子帯にできた電子の空きを正孔という。

光触媒は励起電子および正孔によってラジカルを生成し、これが有機化合物を分解するきっかけとなる。(1.1) 式に示す通り、励起電子  $e^-$  は酸素を還元し、スーパーオキシアニオンラジカル  $\cdot O_2^-$  を発生させる。



この反応により、励起電子と正孔の再結合を抑制し、光触媒反応速度を向上させる。

正孔  $h^+$  では、(1.2) 式、(1.3) 式のように、水や水酸化物イオンを酸化し、ヒドロキシルラジカル  $\cdot OH$  を発生させる。



有機化合物  $R-H$  と  $\cdot OH$  が反応すると、(1.4) 式のような水素引き抜き反応が起こり、有機ラジカル  $\cdot R$  が発生する。



また、正孔が直接反応する場合、(1.5) 式のようにカチオンラジカル  $\cdot RH^+$  が生成する。しかし、(1.6) 式のように分解され、(1.4) 式と同様の  $\cdot R$  が発生する。



酸素が存在すると、このラジカルを開始剤とする連鎖反応によって、有機化合物の酸化分解が進むことが明らかになっている (大谷 2005)。

光触媒による酸化分解はこれまで、合成染料や医薬品などの水中に溶存する難分解性有機化合物を分解対象として研究されてきた。しかし近年、水中に溶存する有機化合物のみならず、固形の環境汚染物質である MP 分解への応用が注目され始めている (Ariza-Tarazona et al. 2019)。プラスチックは、光触媒反応によって鎖の切断、分岐、架橋を引き起こし、最終的に  $H_2O$  と  $CO_2$  に完全に無機化される (Ali et al. 2016, Tofa et al. 2019, Yousif & Haddad 2013)。排水処理システムに光触媒技術を導入することで、生活排水や産業排水に含まれる MP を除去し、環境中に放出される MP を取り除くことが可能と期待される。しかしながら、微細な懸濁粒子の MP の場合、光触媒による分解の過程を分光法や高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、または MP の重量変化などで評価することが困難という課題があった。そこで、プラスチックの種類による分解効率への影響を体系的に評価するため、より分解評価が容易なフィルム状のプラスチックを MP の代わりに用いて評価を行うこととした。フィルム状プラスチックであれば、光触媒粒子や処理水との分離が容易であり、分解過程を重量変化で追跡しやすい。したがって、本研究では、1) 光触媒を用いた紫外光下でのプラスチックフィルム分解の実験系および評価方法を確立すること、2) プラスチックの種類による分解速度の違いを検討すること、3) 光触媒濃度が分解速度に及ぼす影響を検討することの三点を目的とした。

## 2. 材料と方法

### 2.1. 材料

光触媒として、酸化チタン  $\text{TiO}_2$  (P25、日本アエロジル)

および、分解対象物として高密度ポリエチレン (HDPE)、低密度ポリエチレン (LDPE)、ポリプロピレン (PP)、ポリエチレンテレフタレート (PET) の4種類のプラスチックフィルム (Table 1) を使用した。

Table 1. Plastic films used as degradation objects.

Type	abbreviation	Manufacturer	variety	thickness ( $\mu\text{m}$ )
Low-density polyethylene	LDPE	Japax Corporation	Transparent	25
High-density polyethylene	HDPE	Asahi Jushi Kogyo	White	30
Polypropylene	PP	Taiyo Kogyo	Transparent	25
Polyethylene terephthalate	PET	Toray Industries, Inc.	Transparent	25

### 2.2. プラスチックフィルム分解実験

超純水に任意の濃度となるよう  $\text{TiO}_2$  を加え、15 分間超音波分散した。次に、各プラスチックフィルムを 3.30 cm 四方に切り取り、直径 4.7 cm のシャーレに乗せ、 $\text{TiO}_2$  分散液を 10.0 mL 加えた。フィルムが浮かないように円筒状の透明なガラスに乗せ、フタをした。UV ランプ (6 W、340–400 nm) を上部に 3 本、左右 3 対の計 9 本を用いて、3 方向から紫外光を照射した。分解実験は、異なる種類のプラスチックフィルム分解実験および、異なる  $\text{TiO}_2$  濃度によるプラスチックフィルム分解実験の 2 種類行った。異なる種類のプラスチックフィルム分解実験では、分解対象物として上述の 4 種類のプラスチックフィルムを使用し、 $\text{TiO}_2$  濃度  $1.0 \text{ g L}^{-1}$ 、上部のライトとの距離を 20 cm とした。一方、 $\text{TiO}_2$  濃度を変えた実験では、0.001、0.01、0.1、 $1 \text{ g L}^{-1}$  とし、分解対象物を LDPE、上部のライトとの距離を 15 cm (Fig. 1) とした。

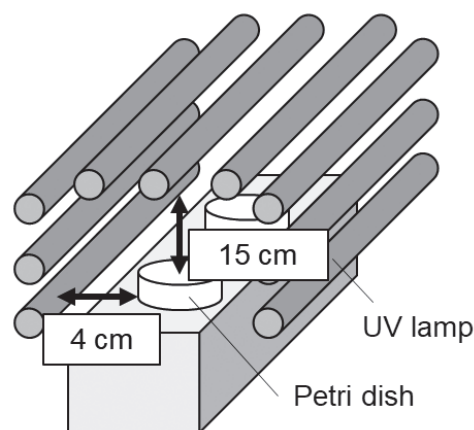


Fig. 1. Reactor diagram for plastic film degradation.

### 2.3. 評価方法

以下の手順で経時的に質量損失を測定した。まず、紫外光照射を停止した後、シャーレからフィルムを取り出し、超純水 (洗瓶) で洗浄した。その後、3 時間風乾し、フィルムの質量を測定した。測定後、フィルムをシャーレに元通りセットし、紫外光照射を開始して実験を続けた。質量損失は (2.1) 式を用いて算出した。

$$\text{質量損失 (\%)} = \frac{(M_0 - M)}{M_0} \times 100\% \quad (2.1)$$

ここで、 $M_0$  は実験前のフィルムの質量、 $M$  はサンプル

リング時のフィルムの質量である。

走査型電子顕微鏡 (FE-SEM、JSM-7500M、JEOL) を用い、実験前後の各フィルムの表面観察を行った。帯電防止のために、オスmiumのスパッタコーティング (放電時間 8 秒) を行い、加速電圧 5 kV、エミッション電流 10 μA で電子線を照射し、二次電子を検出した。

フーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR、IRAffinity-1S、島津製作所) を用いて、実験前後のプラスチックフィルムの官能基および化学結合を同定し、カルボニルインデックス (CI) を算出した。試料作成には、粉碎機を用いて KBr を粉末状にし、フィルムの一部をカッターで切り取った。切り取ったフィルムの上に粉末を充填させ、錠剤を作成した。分解能を 4 cm<sup>-1</sup>、積算回数を 20 回として測定した。得られたスペクトルから、(2.2) 式を用いて CI を算出した。

$$CI = \frac{1720 \text{ cm}^{-1} \text{ のピーク面積}}{1360 \text{ cm}^{-1} \text{ のピーク面積}} \quad (2.2)$$

1720 cm<sup>-1</sup> 付近のピークは C=O 伸縮振動、1360 cm<sup>-1</sup> 付近のピークは C—H 変角振動に起因する。CI はプラスチックの劣化評価によく用いられる指数であり、プラスチックの酸化分解が進むにつれて大きい値を示す。プラスチックは酸化分解が進むと、ケトン、アルデヒド、カルボン酸が生成され、C=O 伸縮振動に由来する IR ピーク強度が大きくなるためである。

### 3. 結果

#### 3.1. 異なる種類のプラスチックフィルム分解

##### 3.1.1. 質量損失

Fig. 2a に各プラスチックフィルムの質量損失の経時変化を示した。実験開始から 24 日後の LDPE、HDPE、PP、PET の質量損失はそれぞれ 7.46、1.08、6.33、1.42 % となった。最小二乗法を用いて分解速度を求めた結果、得られた近似直線はすべての条件において決定係数 R<sup>2</sup> が 0.95 以上を示したことより、時間に比例して質量損失が大きくなる 0 次反応の分

解モデルであることが示唆された。得られた各フィルムの分解速度を Fig. 2b に示した。LDPE と PP の分解速度はそれぞれ 0.296、0.249 % day<sup>-1</sup> であり、比較的高い値を示した。一方、PET と HDPE の分解速度はそれぞれ 0.052、0.041 % day<sup>-1</sup> であり、低い分解速度であった。対照区 (LDPE、TiO<sub>2</sub> なし) では、実験期間中にわずかに質量変化が確認されたものの、質量損失は 0 であった。したがって、本実験では、紫外光によるプラスチックの直接劣化は質量損失に影響なく、すべて光触媒による分解であることが確認できた。

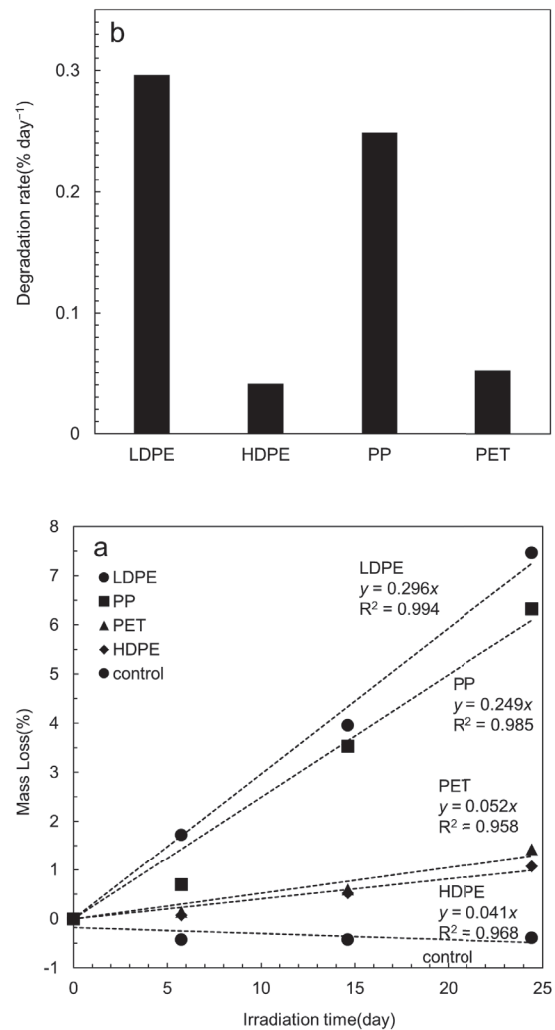


Fig. 2. (a) Change over time in mass loss of each plastic film and (b) Degradation rate of each plastic film.

### 3.1.2. カルボニルインデックス (CI) の算出

分解前後の LDPE の FT-IR スペクトルを Fig. 3 に示した。それぞれのスペクトルはポリエチレンにみられる 4 本のピークを示した。2915  $\text{cm}^{-1}$  と 2850  $\text{cm}^{-1}$  に見られたピークは C—H 伸縮振動に由来する。また、1465  $\text{cm}^{-1}$  と 720  $\text{cm}^{-1}$  に見られたピークは C—H 変角振動に由来する。LDPE 分解後のスペクトルには、1710  $\text{cm}^{-1}$  にケトンの C=O 伸縮振動に由来するピークが見られた。光触媒実験前後の LDPE の CI は 0.003 から 0.214 まで増加し、酸化分解が進行したことが確認された。一方で、その他 3 種類の試料ではカルボニル基のピークの増加がみられず、CI は変化しなかった。

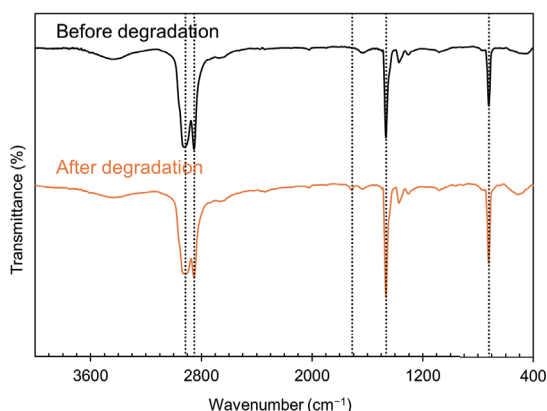


Fig. 3. FT-IR spectra of LDPE film before and after degradation.

## 3.2. $\text{TiO}_2$ 濃度が LDPE フィルム分解に与える影響

### 3.2.1. 質量損失

Fig. 4a に各光触媒濃度 (0.001、0.01、0.1、1  $\text{g L}^{-1}$ ) での質量損失の経時変化を示した。得られた結果の最小二乗法による近似直線は、すべての条件において決定係数  $R^2$  が 0.95 以上を示し、3.1 の実験と同様に 0 次分解モデルであった。30 日後の LDPE フィルムの各光触媒濃度での質量損失、および分解速度を Table 2

に示した。また、 $\text{TiO}_2$  濃度と分解速度の関係を Fig. 4b に示した。得られた分解速度は、 $\text{TiO}_2$  濃度に対して上に凸となり、最も高い分解速度は  $\text{TiO}_2$  濃度 0.01  $\text{g L}^{-1}$  の条件であった。 $\text{TiO}_2$  濃度 0.01  $\text{g L}^{-1}$  の質量損失は 33.46 %、分解速度は 1.115  $\% \text{ day}^{-1}$  となった。一方、 $\text{TiO}_2$  濃度 0.001  $\text{g L}^{-1}$  で最も低い分解速度を示し、質量損失は 4.20 %、分解速度は 0.140  $\% \text{ day}^{-1}$  となった。

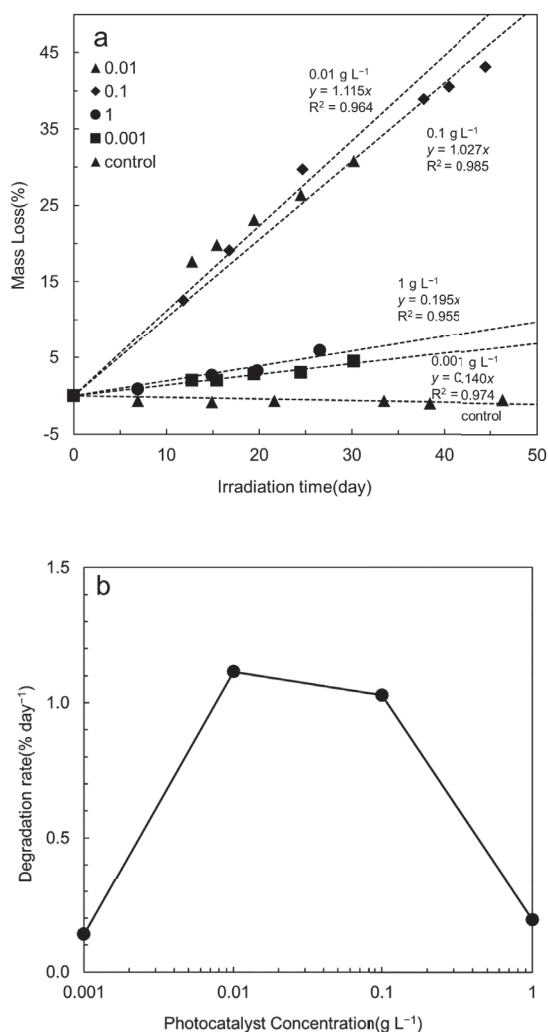


Fig. 4. (a) Change over time in mass loss at each photocatalyst concentration and (b) Relationship between photocatalyst concentration and LDPE film degradation rate.



Table 2. LDPE degradation rate and mass loss after 30 days at each photocatalyst concentration

Photocatalyst concentration (g L <sup>-1</sup> )	0.001	0.01	0.1	1
Mass Loss (%)	4.20	33.46	30.80	5.86
Degradation rate (% day <sup>-1</sup> )	0.140	1.115	1.027	0.195

### 3.2.2. 表面観察結果

Fig. 5 に、各 TiO<sub>2</sub> 濃度における実験終了時の LDPE フィルム表面観察結果を示した。SEM 画像より、TiO<sub>2</sub> 濃度が高くなるほど TiO<sub>2</sub> 粒子の付着量が多く観察された。0.001、0.01 g L<sup>-1</sup> では、表面がほとんど分解され凹凸ができていた。0.1、1 g L<sup>-1</sup> では、フィルム全体に TiO<sub>2</sub> 粒子が吸着しており、穴は数か所で観察された。

各フィルムの目視による観察では、TiO<sub>2</sub> 濃度が低い 0.001、0.01 g L<sup>-1</sup> の条件では、フィルム表面に光沢が確認され、フィルムの色は透明から白色になった。一方で、0.1、1 g L<sup>-1</sup> では、フィルムの色は半透明となった。

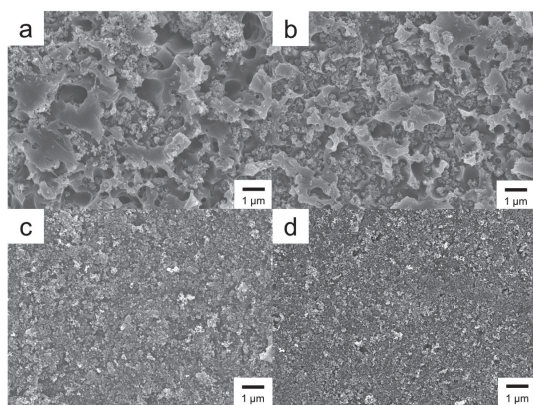


Fig. 5. SEM images of LDPE film 30 days after the start of degradation for each photocatalyst concentration (a) 0.001 g L<sup>-1</sup> (b) 0.01 g L<sup>-1</sup> (c) 0.1 g L<sup>-1</sup> (d) 1 g L<sup>-1</sup>

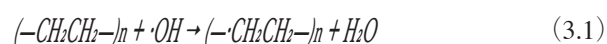
## 4. 考察

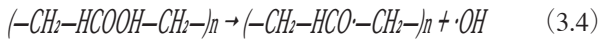
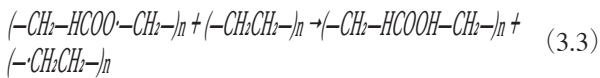
異なるプラスチックフィルムの分解実験より、プラスチックの構造によって分解速度が左右されたと考えられる。LDPE、PP は C—H 単結合からなる単純な構造を持

つことから、活性種による主鎖の切断が起こりやすい。PET は、ベンゼン環やエステル結合を含むことで、主鎖の切断に使われる活性種の数が相対的に減少したため、低い分解速度を示した。同じポリエチレンであるにも関わらず、HDPE の分解速度が LDPE に劣ったのは、HDPE フィルムがより高密度であることから、活性種の拡散抵抗が大きいこと、また、LDPE が透明であるのに対し、HDPE は白色であるためフィルム内の光透過率が低く、特にフィルム裏側に存在する TiO<sub>2</sub> への光供給が不十分であったことなどが理由と考えられる。

FT-IR による結果から、LDPE を除くほとんどの試料でカルボニル基由来のピークが見られなかった。測定には実験したフィルムの一部を切り取って用いていることから、測定した箇所では分解が進んでいなかったと考えられ、分解は局所的に進行していることが示唆された。

LDPE フィルムの分解は、以下の (3.1-3.5) 式の経路で進行すると報告されている (Tofa et al. 2019)。光触媒によって生成された  $\cdot\text{OH}$  と LDPE が反応すると、ポリエチレンアルキルラジカル  $(-\text{CH}_2\text{CH}_2-)_n$  が発生する。次に、酸素と反応し、ペルオキシラジカル  $(-\text{CH}_2-\text{HCOO}\cdot-\text{CH}_2-)_n$  が生成される。その後、水素引き抜き反応によってヒドロペルオキシド  $(-\text{CH}_2-\text{HCOOH}-\text{CH}_2-)_n$  が生成される。(3.4) 式のようにヒドロペルオキシドが分解することでアルコキシラジカル  $(-\text{CH}_2-\text{HCO}\cdot-\text{CH}_2-)_n$  が生成される。このアルコキシラジカルによってカルボニル基が生成される。したがって、ヒドロペルオキシドの存在量が分解速度を決定する重要な値となる。





TiO<sub>2</sub> 濃度による LDPE フィルム分解での結果より、Fig. 4b のプロットの概形が上に凸となった理由として、TiO<sub>2</sub> 濃度が低濃度の領域では、フィルムと TiO<sub>2</sub> との総接触面積が小さくなり、分解速度が低下する一方、光触媒濃度が一定以上になると、TiO<sub>2</sub> 自身による自己遮蔽効果により光供給が不十分となり、分解速度の低下が起きていると考えられる。すなわち、シャーレに対する TiO<sub>2</sub> 粒子の被覆率がおよそ 1 となる光触媒濃度で分解速度が最大になると推察できる。そこで、以下の (3.6) 式から光触媒粒子によるプラスチックフィルム表面の被覆率を算出し、実験で得られた最適値と比較した。

$$\text{被覆率} = \frac{\frac{cV}{\rho} \times \frac{6}{\pi D^3} \times \frac{\pi D^2}{4}}{S} \quad (3.6)$$

ここで、 $c$  は光触媒濃度 [ $\text{g L}^{-1}$ ]、 $V$  は懸濁液量 [L]、 $\rho$  は TiO<sub>2</sub> 密度 [ $\text{g cm}^{-3}$ ]、 $D$  は P25 の平均粒子径 [cm]、 $S$  はシャーレ底面積 [ $\text{cm}^2$ ] である。本実験では、 $V = 10.0 \times 10^{-3}$  L、 $\rho = 4.23$   $\text{g cm}^{-3}$ 、 $D = 21 \times 10^{-7}$  cm、 $S = 17.3$   $\text{cm}^2$  であるため、これらをもとに光触媒濃度を算出した結果、 $c = 0.0103$   $\text{g L}^{-1}$  が得られた。この値は、本実験で最大の分解速度を示した光触媒濃度である  $0.001$   $\text{g L}^{-1}$  と非常に良い一致を示している。

以上より、今回用いた 4 種のプラスチックの中では、最も単純な構造を持つ LDPE が最も光触媒により分解されやすく、また光触媒濃度としては、シャーレ底面への TiO<sub>2</sub> 被覆率が 1 となる濃度、すなわち  $0.001$   $\text{g L}^{-1}$  で最も高い分解速度を示すことがわかった。プラスチックの構造、光触媒の濃度が分解速度を左右する大きな要因となることが示された。

## 5. 結論

本研究では、TiO<sub>2</sub> 光触媒を用いて紫外光下でプラスチックフィルムの分解を行った。プラスチックの種類による比較を行った結果、LDPE が最も大きい分解速度を示した。LDPE は C—H 単結合からなる最も単純な構造を持つプラスチックであり、活性種による主鎖の切断が起きやすいためと考えられた。TiO<sub>2</sub> 濃度による比較を行った結果、 $0.01$   $\text{g L}^{-1}$  で最も大きい分解速度を示した。シャーレに対する TiO<sub>2</sub> 粒子の被覆率がおよそ 1 になる光触媒濃度は、 $0.0103$   $\text{g L}^{-1}$  と算出され、実験で得られた結果と良い一致を示した。本研究は光触媒によってプラスチック分解が進むことを明らかにし、MP 分解に向けた足掛かりとなった。

FT-IR スペクトルを測定した結果、C=O 伸縮振動に由来するピークはほとんど見られず、中間体の同定を行えていない。そこで、今後はプラスチック分解の最終生成物となる CO<sub>2</sub> 生成量をモニタリングする実験系を構築し、プラスチック分解がどこまで進行するかを調査する予定である。また、実際に MP を用いて実験を行い、MP 分解の実験系および評価方法の確立を目指す。今回は市販の TiO<sub>2</sub> 光触媒を用いて紫外光下で実験を行ったが、今後は、可視光応答性を持つアインタイプヘテロ接合  $\text{g-C}_3\text{N}_4$  を用いて、可視光下で実験を進めていく。これにより太陽光を用いた持続可能な MP 処理システムの確立を目指す。

## 引用文献

- Abbasi S, Turner A (2021) Human exposure to microplastics: A study in Iran. *J Hazard Mater* 403: 123799.
- Ali SS, Qazi IA, Arshad M, Khan Z, Voice TC, Mehmood CT (2016) Photocatalytic degradation of low density polyethylene (LDPE) films using titania nanotubes. *Environ Nanotechnol Monit Manag* 5: 44-53.
- Amato-Lourenço LF, Carvalho-Oliveira R, Júnior GR, dos Santos Galvão L, Ando RA, Mauad T (2021)

- Presence of airborne microplastics in human lung tissue. *J Hazard Mater* 416: 126124.
- Ariza-Tarazona MC, Villarreal-Chiu JF, Barbieri V, Siligardi C, Cedillo-González EI (2019) New strategy for microplastic degradation: Green photocatalysis using a protein-based porous N-TiO<sub>2</sub> semiconductor. *Ceram Int* 45: 9618–9624.
- Besseling E, Wegner A, Foekema EM, van den Heuvel-Greve MJ, Koelmans AA (2013) Effects of microplastic on fitness and PCB bioaccumulation by the lugworm *Arenicola marina* (L.). *Environ Sci Technol* 47: 593–600.
- Browne MA, Crump P, Niven SJ, Teuten EL, Tonkin A, Galloway T, Thompson RC (2011) Accumulation of microplastic on shorelines worldwide: sources and sinks. *Environ Sci Technol* 45: 9175–9179.
- Carr SA, Liu J, Tesoro AG (2016) Transport and fate of microplastic particles in wastewater treatment plants. *Water Res* 91: 174–182.
- Cox KD, Covernton GA, Davies HL, Dower JF, Juanes F, Dudas SE (2019) Human consumption of microplastics. *Environ Sci Technol* 53: 7068–7074.
- Gautam R, Bassi AS, Yanful EK (2007) A review of biodegradation of synthetic plastic and foams. *Appl Biochem Biotechnol* 141: 85–108.
- Luqman A, Nugrahapraja H, Wahyuono RA, Islami I, Haekal MH, Fardiansyah Y, Putri BQ, Amalludin FI, Rofiqah EA, Götz F et al (2021) Microplastic contamination in human stools, foods, and drinking water associated with Indonesian coastal population. *Environments* 8: 138.
- Murphy F, Ewins C, Carbonnier F, Quinn B (2016) Wastewater treatment works (WwTW) as a source of microplastics in the aquatic environment. *Environ Sci Technol* 50: 5800–5808.
- Neto JGB, Rodrigues FL, Ortega I, Rodrigues LDS, Lacerda ALDF, Coletto JL, Kessler F, Cardoso LG, Madureira L, Proietti MC (2020) Ingestion of plastic debris by commercially important marine fish in southeast-south Brazil. *Environ Pollut* 267: 115508.
- 大谷文章 (2005) 光触媒標準研究法 . 東京図書 , 東京 , 46–50 pp.
- Romeo T, Pietro B, Pedà C, Consoli P, Andaloro F, Fossi MC (2015) First evidence of presence of plastic debris in stomach of large pelagic fish in the Mediterranean Sea. *Mar Pollut Bull* 95: 358–361.
- Tofa TS, Kunjali KL, Paul S, Dutta J (2019) Visible light photocatalytic degradation of microplastic residues with zinc oxide nanorods. *Environ Chem Lett* 17: 1341–1346.
- Yousif E, Haddad R (2013) Photodegradation and photostabilization of polymers, especially polystyrene: review. *Springerplus* 2: 398.
- Zhang Q, Xu EG, Li J, Chen Q, Ma L, Zeng EY, Shi H (2020) A Review of microplastics in table salt, drinking water, and air: Direct human exposure. *Environ Sci Technol* 54: 3740–3751.

# メタン発酵－紅色光合成細菌共存系による模擬養鶏 屠殺場廃水処理性能の評価

秋月真一<sup>1)\*</sup>, 藤原正明<sup>2)</sup>

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

## Treatment of synthetic poultry slaughterhouse wastewater using a consortium of anaerobic digestion microorganisms and purple phototrophic bacteria

Shin-ichi Akizuki<sup>1)\*</sup> and Masaaki Fujiwara<sup>2)</sup>

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

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

\* *Corresponding author: akizuki@soka.ac.jp*

2023年5月5日受付, 2023年5月16日受理

**Abstract** As global population increases and living standards improve in developing countries, the demand for meat is increasing, resulting in the rise of highly concentrated organic wastewater generated from poultry processing. An effective method for treating this wastewater is through anaerobic digestion, which converts it into biogas as an energy source using anaerobic microorganisms. However, while this process effectively removes organic carbon, nutrients such as nitrogen and phosphorus remain in high concentrations in the effluent, necessitating secondary treatment facilities such as separate nitrification and denitrification tanks. Purple phototrophic bacteria are microorganisms that can uptake organic matter and nutrient-rich pollutants in wastewater, accumulating protein and carbohydrate in their cells. Since both anaerobic digestion and purple phototrophic bacterial processes occur under anaerobic conditions and have similar suitable environments such as pH and temperature, they can potentially be integrated into a single reactor. This study proposes a new process using a consortium of anaerobic digestion microorganisms and purple phototrophic bacteria for simultaneous treatment of organic carbon and nutrients from poultry slaughterhouse wastewater. The performance of the proposed simultaneous process was compared with that of the only-anaerobic digestion process and only-purple phototrophic bacterial process in a 19-day batch experiment at  $33 \pm 2^\circ\text{C}$  under anaerobic conditions. Synthetic poultry slaughterhouse wastewater was used as the substrate, and anaerobic digestion sludge collected from a mesophilic anaerobic digestion plant and *Rhodospseudomonas capsulata* were used as the inoculums.

In the simultaneous process, biogas production and organic carbon (chemical oxygen demand)



removal progressed first with and without infrared light irradiation, followed by an increase in bacteriochlorophyll *a* concentration, an indicator of the biomass of purple phototrophic bacteria. These results indicate that the anaerobic digestion process and purple phototrophic bacterial process functioned in a single reactor, although there was a time gap between the two processes. Despite uniform substrate input, the simultaneous process produced higher biogas (276-337 mL) than the only-anaerobic digestion process (138 mL), possibly due to degradation of some purple phototrophic bacteria biomass as feedstock for anaerobic digestion. In the simultaneous process, organic carbon removal efficiencies ranged from 40 to 81%, similar to or lower than the removal efficiency of the only-anaerobic digestion process (81%). In purple phototrophic bacteria added conditions, nitrogen removal was not confirmed, indicating low nutrient removal capability. The treatment performance of the simultaneous process can be enhanced by improving light permeability using flat-panel reactors or granular anaerobic sludge and acclimation of purple phototrophic bacteria with highly concentrated organic wastewater before using it as an inoculum.

**Keywords:** Integrated process; photosynthetic bacteria; biogas recovery; carbon removal; bacteriochlorophyll *a*

---

## 1. 序論

人口増加と開発途上国の生活レベルの向上に伴い、世界の食肉需要は増加の一途を辿っている。特に家禽肉は手頃な価格、健康的なイメージ、宗教的問題の少なさから先進国・開発途上国を問わず需要増加が著しく、2011～2013年は8600万トンであった年間消費量が2024年には1億1100万トンを超えると推定されている(農林水産政策研究所2015)。家禽肉需要の増加は、必然的に養鶏場数、ひいては屠殺や鶏糞尿・鶏卵の洗浄水に起因する汚濁物質濃度の高い廃水発生量の増加に直結する。養鶏場廃水の未処理での放流は、周辺水環境の汚染に繋がるため、しばしば機械的曝気を利用した生物学的浄化槽を設け処理を施している(Jia et al. 2012)。しかし、曝気は膨大な電力を消費するため、経済的基盤が脆弱であり、環境問題よりも経済発展を優先せざるを得ない開発途上国への普及は困難であった。2000年以降、養鶏場廃水中の有機物を嫌気性微生物の働きを利用したメタン発酵によりバ

イオガス化し、エネルギー源として回収する手法が着目されてきた(Salminen & Rintala 2002)。しかし、メタン発酵では有機炭素分(化学的酸素要求量 Chemical oxygen demand: COD)は効果的に除去される一方で、窒素(N)やリン(P)等の栄養塩類は除去されず、発酵処理液中に高濃度に残存する。そのため、二次処理施設として硝化槽、脱窒素槽等を別途設ける必要があり、メタン発酵によるエネルギー回収という利点を相殺することが課題であった。

近年、オーストラリアのクイーンズランド大学の研究チームが発端となり、紅色光合成細菌(Purple phototrophic bacteria: PPB)を利用した廃水処理と有用物質生産に関する研究が再び注目を集めている(Hülse et al. 2014, 2016, 2018)。PPBが赤外光照射下で廃水中の汚濁物質を体内に取り込み、タンパク質・炭水化物等を蓄積する特徴に着目したもので、回収したPPBは餌料・飼料として有効利用できる。しかし、PPBバイオマスの平均体組成はCOD:N:P比で100:6:1であるが、廃水のCOD:N:P比はその種類によって大きく異なり、PPB

と同じ比率になることの方が稀である。そのため、PPBを用いた廃水処理研究では、処理水にCODまたは栄養塩類が残存することが報告されている (Hülse et al. 2018)。例えば Yaakob et al. (2018) によると、養鶏屠殺場廃水はCODに対する栄養塩の割合が低く、COD:Pは平均で1000:1を超える。このような廃水をPPBで処理した場合、主にP律速でCODが取り込まれず、処理水には高濃度のCODが残存すると考えられる。

メタン発酵関連菌とPPBは共に嫌気条件下で反応が進行し、pHや温度等の至適生育環境が比較的近似していることから (Speece 1996, Lu et al. 2021)、両微生物を単一槽に共存させる“メタン発酵-PPB共存系”が構築できる可能性がある。この共存系では、主要なCOD除去をメタン発酵が担い、一部のCOD除去と栄養塩類除去をPPBが担うことで、養鶏屠殺場廃水の適正処理を単一槽で進めることができる。さらに、バイオガスによるエネルギー回収と有用物質を蓄積したバイオマス回収を同時に行うことで、廃水から有価物への転換も期待できる。そこで本研究では、模擬廃水を用いた回分実験により、共存系、メタン発酵単独、PPB単独それぞれの処理性能を比較し、メタン発酵-PPB共存系による養鶏屠殺場廃水処理の有用性を評価することを目的とした。

## 2. 材料と方法

### 2.1. 基質と播種試料

基質には、肉エキス粉末、グリセロール、塩化アンモニウム、リン酸二水素カリウム等で構成される模擬養鶏屠殺場廃水 (Cao & Mehrvar 2011) を3倍濃縮したものをを用いた。播種試料には、下水汚泥を原料とした中温嫌気性消化槽由来の消化汚泥と、市販のPPB含有液 (主要種 *Rhodospseudomonas capsulata*、シマテック) をを用いた。嫌気性消化汚泥は槽から採取後、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$  で数日間放置し、残存有機物分を除去してから実験に用いた。PPB含有液は遠心分離操作 (4000 rpm、10分) により上澄み液と固形分に分け、上澄み液を取り除いた

後の濃縮バイオマスを実験に用いた。

### 2.2. 実験条件

反応槽には有効容積0.5Lのメジウム瓶を用い、播種試料として嫌気性消化汚泥とPPBを混合した条件 (ADS-PPB条件、ADS: Anaerobic digestion sludge)、嫌気性消化汚泥のみを用いた条件 (ADS条件)、およびPPBのみ用いた条件 (PPB条件) を設けた。各条件において、投入基質CODおよび全N濃度はそれぞれ  $4592 \text{ mg L}^{-1}$ 、 $733 \text{ mg-N L}^{-1}$  とし、ADSとPPBの初期添加量は揮発性有機物 (Volatile solid: VS) 基準で  $2.95 \text{ g L}^{-1}$  に統一した。ADS-PPB条件では、赤外光強度 (単位:  $\text{W m}^{-2}$ 、波長: 850 nm) を0 (暗所: Dark)、9.1 (弱光: Weak)、15.3 (強光: Strong) の3条件設定した。PPB条件には弱光条件を用いた。また、ADS条件では、汚泥由来のバイオガス生成量を評価するために基質無添加の条件を設けた (ADS-NS、NS: No substrate)。基質と播種試料を混合した後、窒素ガス ( $\text{N}_2$ ) で反応槽内を置換することで嫌気環境を形成し、温度  $33 \pm 2^\circ\text{C}$ 、攪拌条件下で19日間の回分実験を実施した。Fig. 1に実験条件概要を示した。

### 2.3. 分析項目

試料採取は実験0、2、4、7、11、19日目の計6回行った。懸濁液中のpH、酸化還元電位 (Oxygen redox potential: ORP)、バクテリオクロロフィルa濃度 (BChl. a) を測定し、懸濁液を孔径  $0.45 \mu\text{m}$  のシリンジフィルターでろ過したろ液については、溶存態COD (soluble COD: sCOD) と溶存態全N濃度 (soluble TN: sTN) を測定した。pHとORPは、それぞれ卓上pHメーター (Seven Compact pH/Ion meter S220, Mettler Toledo) とデジタルORPメーター (YK-23RP, Mother Tool) を用いて測定した。懸濁液中のBChl. a濃度は、アセトン/メタノール溶媒 (78:22 v/v) を用いて抽出後、吸光光度計 (DR3900, Hach) による測定と Lambert-Beer 式を用いて算出した (Liaaen-Jensen & Jensen 1971, Brotosudarmo et al. 2015)。sCODとsTNはHach社の試薬を用い、

それぞれクロム法（水銀フリー）とペルオキシ二硫酸カリウム分解法によって測定した（DR3900、Hach）。播種試料中の VS 濃度は常法（American Public Health Association 1998）に準拠して測定した。

COD 除去率は、以下の式（1）により算出した。

$$\text{COD除去率 (\%)} = \left(1 - \frac{s\text{COD}_{\text{last}}}{s\text{COD}_{\text{initial}}}\right) \times 100 \quad (\text{式 1})$$

ここで、 $s\text{COD}_{\text{initial}}$  と  $s\text{COD}_{\text{last}}$  はそれぞれ投入基質 sCOD 濃度と、実験終了時の sCOD 濃度を表している。

バイオガス生成量は、ガス生成に伴う反応槽上部空間の圧力上昇をデジタル圧力計（KDM30、Krone）に測定し、ボイル・シャルルの法則を用いて算出した。PPB 条件で生成されたバイオガス組成を調べるために、水素（ $\text{H}_2$ ）濃度と二酸化炭素（ $\text{CO}_2$ ）濃度を検知管式気体測定器（GV-100、Gastec）により測定した。

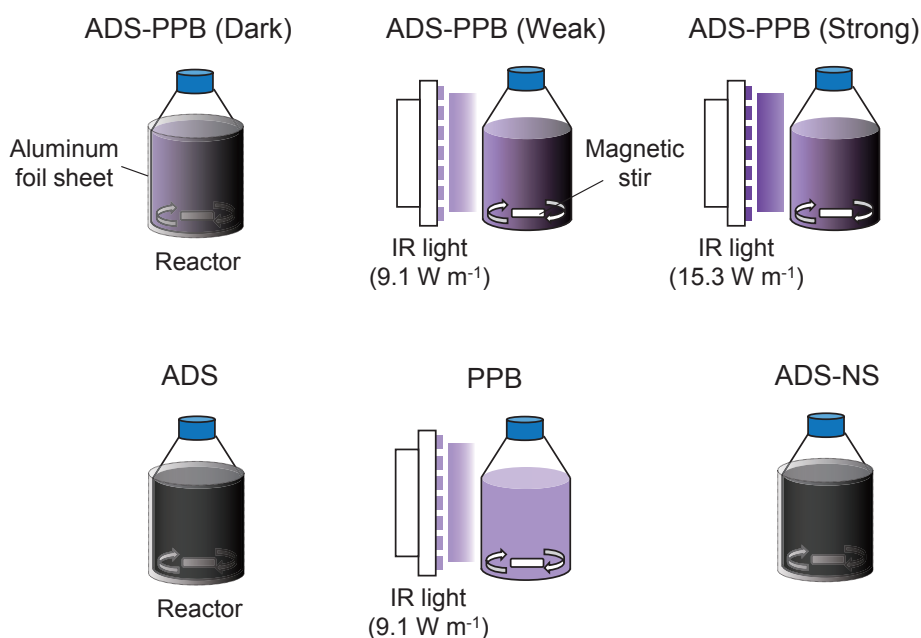


Fig. 1. Illustration of experimental apparatus. ADS: Anaerobic digestion sludge; PPB: Purple phototrophic bacteria; NS: No substrate; IR: Infrared. Aluminum foil sheet was used to block light from the outside.

### 3. 結果と考察

#### 3.1. pH と ORP

ADS-PPB 条件と ADS 条件における pH は、実験開始から 5 日目にかけて減少後、7 日目にかけて上昇する傾向を示し、6.7 ~ 7.4 の範囲を推移した（Fig. 2a）。この結果は、模擬養鶏屠殺場廃水中の有機化合物の加水分解による有機酸生成とメタン発酵に

よるバイオガス化が生じたことを示唆している。一方で、PPB 条件における pH は実験期間を通し緩やかに減少し、実験最終日に 6.1 を示した。メタン発酵と *Rhodospseudomonas capsulata* 等の紅色非硫黄細菌が好む pH 範囲は、それぞれ 6.5 ~ 8.2（Speece 1996）と 6.0 ~ 9.0（Lu et al. 2021）であり、共存系条件か単独条件（ADS または PPB 条件）かに関わらず至適範囲に収まっていた。ORP は全条件で嫌

氣的な値を示し、特に ADS-NS を除く条件で  $-100 \sim -300$  mV の強い嫌気環境が維持されていた (Fig. 2b)。嫌気性プロセスであるメタン発酵が円滑に進むためには  $-200$  mV 以下の ORP 値が望ましく (Moletta

2005)、PPB は  $-200 \sim -300$  mV の低 ORP 環境でも生育すると報告されているため (Izu et al. 2001)、ORP 値も至適範囲に収まっていた。

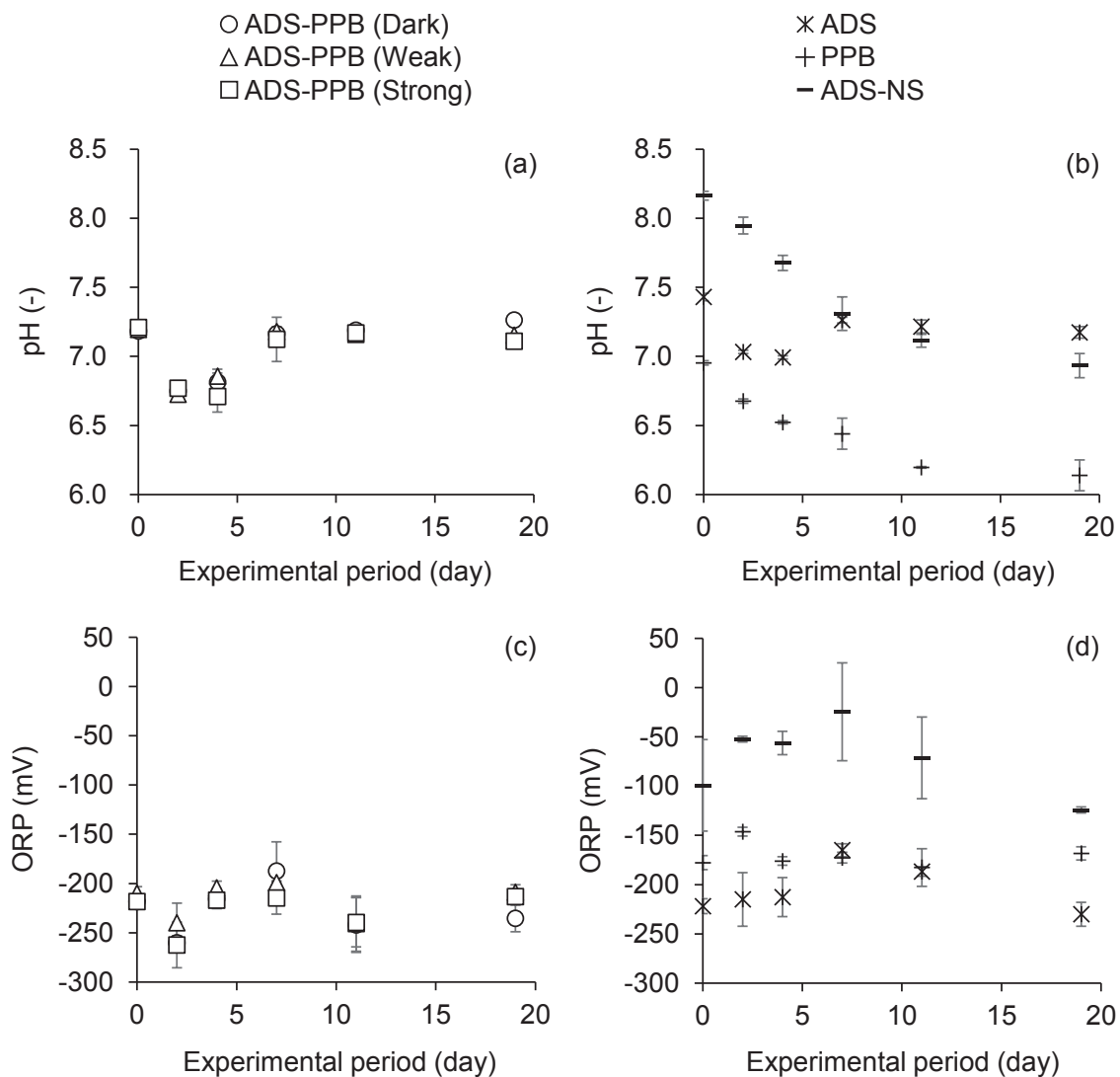


Fig. 2. Variations of pH and ORP for all conditions. (a) pH for ADS-PPB conditions; (b) pH for single conditions; (c) ORP for ADS-PPB conditions; (d) ORP for single inoculum conditions.

### 3.2. 積算バイオガス生成

ADS-PPB 条件における積算バイオガス生成量は暗所下 (Dark) で比較的高く ( $337 \pm 68$  mL)、強光下 (Strong) で比較的低い値 ( $276 \pm 32$  mL) を示した (Fig. 3a)。PPB は暗所下での化学合成従属栄養環境と比較

して、光従属栄養環境でより活発にバイオマス合成を行うことが知られている (Mata-De-la-Vega et al. 2022)。本研究では、暗所でより活発にメタン発酵によりバイオガス化が進み、一方で、強光条件下では PPB による有機炭素の取り込みが活発化した可能性が示唆された。投

入基質量は均一にも関わらず、ADS-PPB 条件と比較して、ADS 条件では低いバイオガス生成量 ( $138 \pm 8$  mL) を示した (Fig. 3b)。両条件間に大きな差が見られた理由として、PPB の一部がメタン発酵の原料となり分解されていた可能性が挙げられる。

PPB 条件でバイオガスが生成した理由として、嫌気的な光従属栄養環境下で生じる  $H_2$  生成が考えられた

が (Chen et al. 2007)、分析の結果  $H_2$  は生成されておらず、 $CO_2$  生成が確認された。酢酸等の有機酸を基質とした光従属栄養環境では、PPB の増殖に伴い  $CO_2$  を生成する代謝が進むことが知られており (Mckinlay & Harwood 2010)、本研究でも同様の反応が生じたと考えられる。

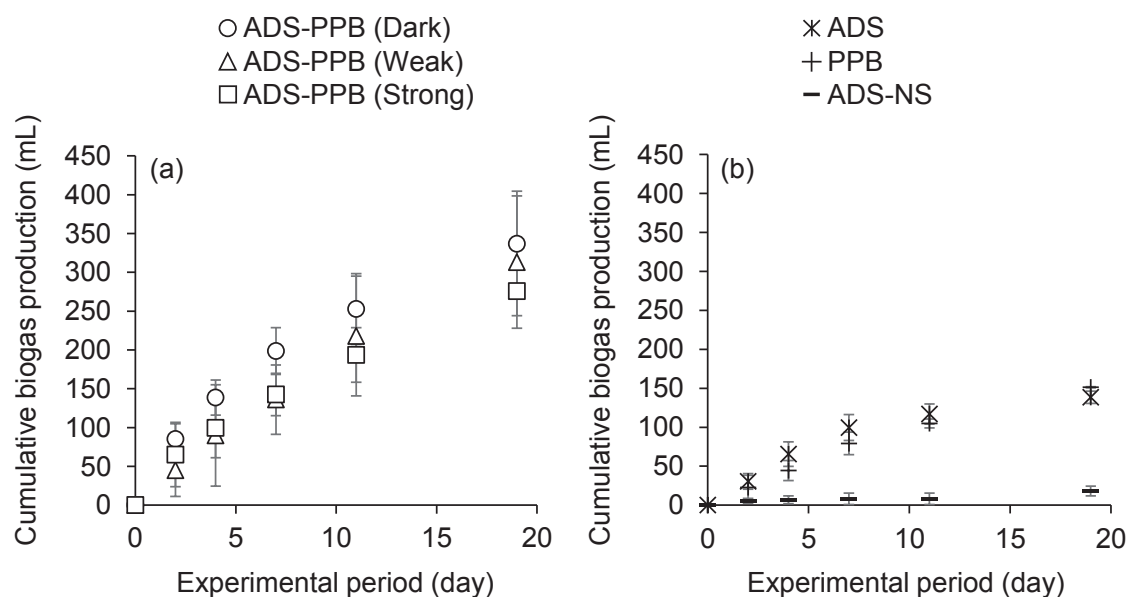


Fig. 3. Variation of cumulative biogas production for all conditions. (a) ADS-PPB conditions; (b) single inoculum conditions.

### 3.3. 有機炭素と窒素処理性能

ADS-PPB 条件では、sCOD 濃度は実験開始から 2 日目までに増加し、その後実験期間を通し減少する傾向を示した (Fig. 4a)。これは、基質および PPB バイオマスの一部が分解された後、共存系により利用されたことを示唆している。ADS 条件では、ADS-PPB 条件と比較して速やかに sCOD 濃度が減少した。一方で、PPB 条件では sCOD は除去されず、実験期間を通して蓄積し続けた (Fig. 4b)。投入基質の COD 除去率を比較すると、ADS-PPB (Dark) 条件と ADS 条件で 81% の高い値を示した (Fig. 5)。PPB は従属栄養環境下において赤外光照射によりバイオマス合成を促進するため、

光照射下の ADS-PPB 条件の方が暗所よりも高い COD 除去率が得られると期待していたが、本研究では反対の結果となった。特に、弱光下 (Weak) では暗所下の約半分の COD 除去率を示し、弱光環境は共存系の有機炭素処理性能に好ましくない影響を与える可能性が示唆された。PPB 条件では COD 除去が進行しなかった。PPB を用いた有機性廃水処理を行う場合、前処理として可溶化槽を設け、廃水中の成分を有機酸まで分解することが望ましいとされている (嶋田・高市 2020)。本研究では、他条件と比較を行うために、可溶化槽を設けずに処理を行った結果、効果的な COD 除去が生じなかったと考えられる。



全条件において sTN 濃度の減少は見られず、反対に実験期間を通して徐々に増加する傾向が見られ (Fig. 6)、本研究では PPB による栄養塩類除去は効果的には進まなかったことが示された。ADS-PPB 条件では、

PPB の一部がメタン発酵により分解された結果バイオマス由来の sTN 濃度が増加し、PPB 条件では、可溶化工程を経なかったため PPB が基質を利用し難く、結果として廃水由来の N 成分が残存したものと考えられる。

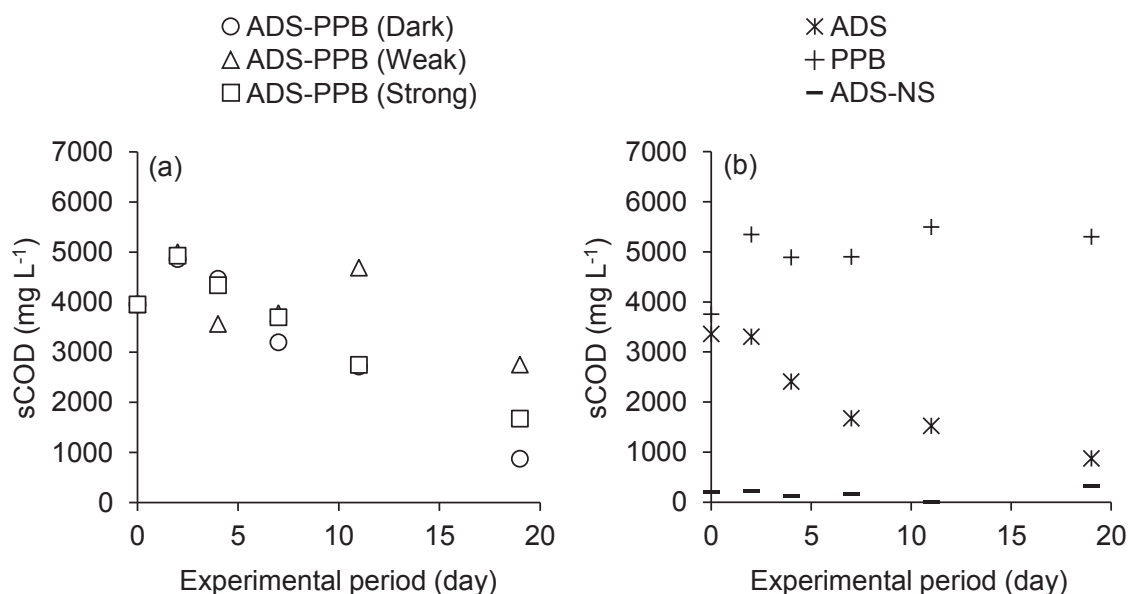


Fig. 4. Variation of sCOD concentration for all conditions. (a) ADS-PPB conditions; (b) single inoculum conditions.

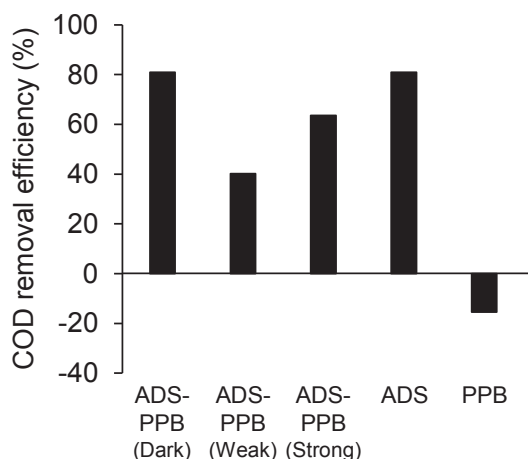


Fig. 5. COD removal efficiency for all conditions.

### 3.4. BChl. a 濃度

ADS-PPB 条件における BChl. a 濃度は、実験開始

から4日目にかけて徐々に減少しており、一部の PPB バイオマスが分解されたことが示された (Fig. 7)。一方で、BChl. a 濃度は7日目以降から増加し始め、特に12日目から19日目にかけて大幅な増加が見られた。この結果から、実験前半はメタン発酵のみが機能したが、後半は PPB、もしくはメタン発酵と PPB の両プロセスが機能したと考えられた。時間的な縦分けはあるものの、メタン発酵関連菌と PPB が単一槽で共存できる可能性が示された。PPB 条件における BChl. a 濃度は、実験開始から12日目にかけて減少傾向が見られた後、ADS-PPB 条件と同様に12日目から19日目にかけて増加した。しかし、ADS-PPB 条件と PPB 条件では BChl. a 濃度が増加したにも関わらず、顕著な COD 除去と N 除去が起きなかった (Figs 5, 6)。これは、PPB 増殖に伴う COD と栄養塩類の摂取量が sCOD 濃度と sTN 濃度を減少させる程大きくなかったことを示唆している。

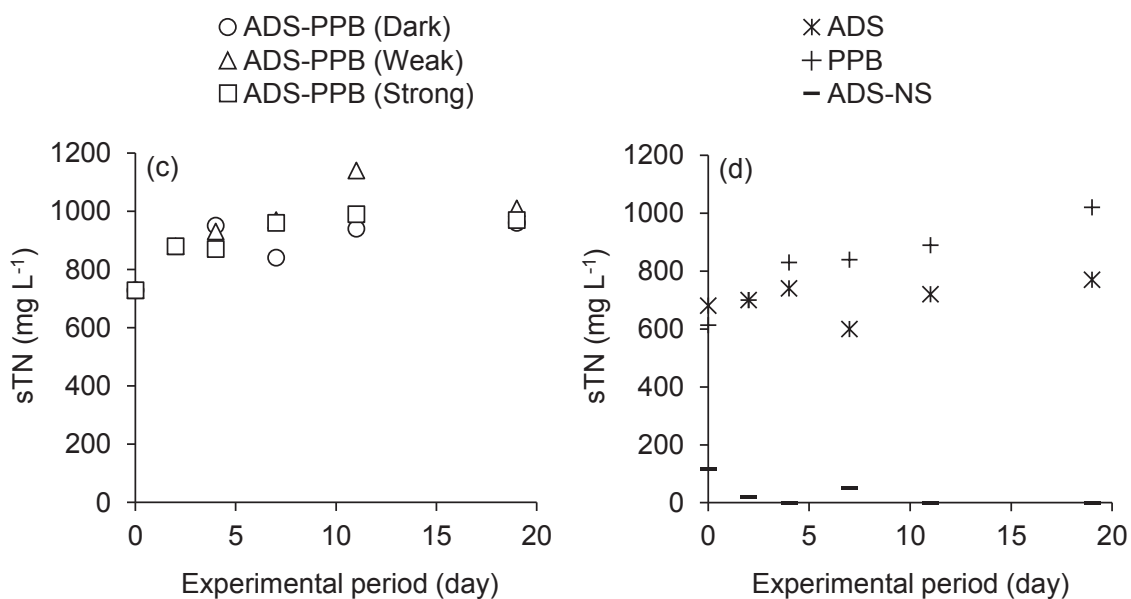


Fig. 6. Variation of sTN concentration for all conditions. (a) ADS-PPB conditions; (b) single inoculum conditions.

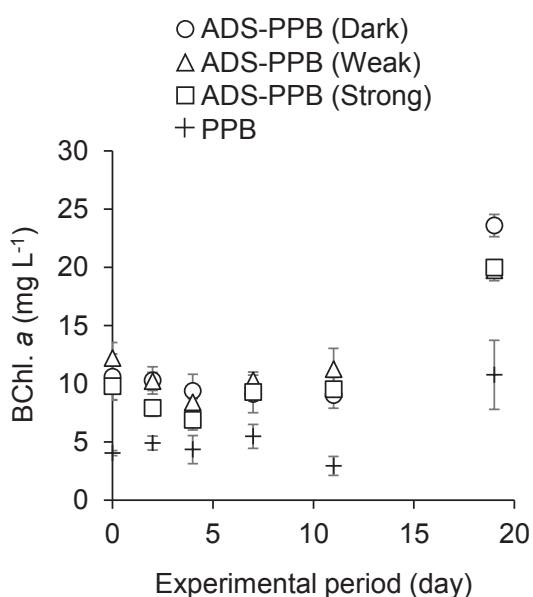


Fig. 7. Variation of BChl. a concentration for all conditions.

### 3.5. メタン発酵-PPB 共存系による廃水処理性能向上に向けて

3.1 ~ 3.4 で述べた結果から、本研究では、メタン発酵-PPB 共存系は機能し、有機炭素除去と BChl.

a 濃度の増加が確認されたものの、従来のメタン発酵を越える廃水処理性能は得られなかった。処理性能を向上させるためには、(1) 光透過性の向上と (2) 高濃度有機性廃水への PPB バイオマス事前順養等の対策が効果的と考えられる。

#### (1) 光透過性の向上

本研究では、分散状の ADS と PPB を混合し実験を実施した。しかし、ADS は濃い黒色を呈しているため、混合状態では赤外光が効率的に PPB に照射されなかった可能性がある。例えば微細藻類の大量培養でよく導入されているフラットパネル型反応槽 (Kumar et al. 2010) や、ADS が顆粒状に凝集したグラニュール汚泥 (Schmidt & Ahring 1996) を用いることで、遮光性の高い ADS と混合した際にも効果的に光を透過できると期待される。

#### (2) 高濃度有機性廃水への PPB バイオマスの事前順養

本研究で播種試料として用いた PPB は、熱帯魚・観賞魚用水槽の水質浄化細菌として販売されているもので、それを高濃度に濃縮して利用した。元々の用途

が高濃度有機性廃水処理ではないため、高有機炭素・栄養塩負荷環境下に曝されて直ぐには機能しなかった可能性がある。一方で、本研究で用いた ADS は、高濃度有機性廃棄物（下水汚泥）を処理していたメタン発酵槽から採取したものであり、養鶏場廃水等の高濃度有機性廃水にも実験開始直後から効果的に対応できたと考えられる。そのため、高濃度有機性廃水に事前に順養した PPB バイオマスを播種試料として用いることで、PPB の廃水処理への寄与率が向上し、メタン発酵-PPB 共存系が効果的に進む可能性がある。実験終了後も 2. 材料と方法に記載した条件下で各反応槽を置き続けていたところ、約 1 か月後に PPB 条件において、赤外光照射の受光面にバイオフィルムの形成が確認された。この結果は、高濃度有機性廃水に PPB を長期間暴露することで、高濃度に耐え得るバイオマスが順養された可能性を示唆している。

今後は、これらの改善策を講じて再度メタン発酵-PPB 共存系の構築を試み、省エネルギー・資源循環型の養鶏屠殺場廃水処理技術の開発を目指す。

#### 4. 結論

本研究では、メタン発酵-PPB 共存系による模擬養鶏屠殺場廃水処理の有用性を評価するために、模擬廃水の回分処理実験において、共存系の ADS-PPB 条件、メタン発酵単独プロセスの ADS 条件、PPB 単独プロセスの PPB 条件の性能を比較した。ADS-PPB 条件では、明暗条件に関わらず、まず初めにバイオガス生成と COD 除去が進み、その後 BChl. *a* 濃度が増加する結果が得られ、単一槽で共存系が成立したことが示された。しかし、COD 除去性能は ADS 条件と同程度かそれ以下を示し、顕著な N 除去は確認されなかった。フラットパネル型反応槽の利用や嫌気性消化汚泥の凝集化により光透過性を向上する、PPB バイオマスを播種試料として用いる前に高濃度有機性廃水で順養する等の手法を取り入れることで、共存系の処理性能が改善できると期待される。

#### 5. 謝辞

本研究は、公益財団法人前川報恩会 2020 年度学術研究助成の支援により実施された。実験で用いた嫌気性消化汚泥試料は、神奈川県横浜市北部汚泥資源化センターから提供を受けたものであり、関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。本研究の化学分析の一部は、創価大学理工学部共生創造理工学科 修復生態学研究室の機器・装置によって行われたものであり、戸田龍樹教授を始め研究室の皆様に感謝の意を表す。

#### 引用文献

- American Public Health Association (1998) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (20th ed), American Public Health Association, Washington, DC, 1220 pp.
- Brotosudarmo THP, Limantara L, Heriyanto, Prihastyanti MNU (2015) Adaptation of the photosynthetic unit of purple bacteria to changes of light illumination intensities. *Procedia Chem* 14: 414–421.
- Cao W, Mehrvar M (2011) Slaughterhouse wastewater treatment by combined anaerobic baffled reactor and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> processes. *Chem Eng Res Des* 89: 1136–1143.
- Chen CY, Lu W-B, Wu JF, Chang JS (2007) Enhancing phototrophic hydrogen production of *Rhodospseudomonas palustris* via statistical experimental design. *Int J Hydrog* 32: 940–949.
- Hülßen T, Barry EM, Lu Y, Puyol D, Keller J, Batstone DJ (2016) Domestic wastewater treatment with purple phototrophic bacteria using a novel continuous photo anaerobic membrane bioreactor. *Water Res* 100: 486–495.
- Hülßen T, Batstone DJ, Keller J (2014) Phototrophic bacteria for nutrient recovery from domestic wastewater. *Water Res* 50: 18–26.

- Hülsemann T, Hsieh K, Tait S, Barry EM, Puyol D, Batstone DJ (2018) White and infrared light continuous photobioreactors for resource recovery from poultry processing wastewater – a comparison. *Water Res* 144: 665–676.
- Izu K, Nakajima F, Yamamoto K, Kurisu F (2001) Aeration conditions affecting growth of purple nonsulfur bacteria in an organic wastewater treatment process. *Syst Appl Microbiol* 24: 294–302.
- Jia Y, Gao C, Zhang L, Jiang G (2012) Effects of pre-fermentation and influent temperature on the removal efficiency of COD,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  and  $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$  in slaughterhouse wastewater by using SBR. *Energy Procedia* 16: 1964–1971.
- Kumar A, Ergas S, Yuan X, Sahu A, Zhang Q, Dewulf J, Malcata FX, van Langenhove H (2010) Enhanced  $\text{CO}_2$  fixation and biofuel production via microalgae: Recent developments and future directions. *Trends Biotechnol* 7: 371–380.
- Liaaen-Jensen S, Jensen A (1971) Quantitative determination of carotenoids in photosynthetic tissues. *Meth Enzymol* 23: 586–602.
- Lu H, Zhang G, He S, Zhao R, Zhu D (2021) Purple non-sulfur bacteria technology: a promising and potential approach for wastewater treatment and bioresources recovery. *World J Microbiol Biotechnol* 37:1–15.
- Mata-De-la-Vega JF, Akizuki S, Sakai HD, Cuevas-Rodríguez G (2022) Slaughterhouse wastewater treatment using purple phototrophic bacteria: A comparison between photoheterotrophic and chemoheterotrophic conditions. *Biochem Eng J* 179: 108273.
- McKinlay JB, Harwood CS (2010) Carbon dioxide fixation as a central redox cofactor recycling mechanism in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 11669–11675.
- Moletta R (2005) Winery and distillery wastewater treatment by anaerobic digestion. *Water Sci Technol* 51: 137–144.
- 農林水産政策研究所 (2015) 2024 年における世界の食料需給見通し-世界食糧需給モデルによる予測結果-. 農林水産省, 28 pp.
- Salminen E, Rintala J (2002) Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste – a review. *Bioresour Technol* 83: 13–26.
- Schmidt JE, Ahring BK (1996) Review granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biotechnol Bioeng* 49: 229–246.
- 嶋田敬三・高市真一 (2020) 光合成細菌の利用. “光合成細菌—酸素を出さない光合成—”. 裳華房, 東京, 302 pp.
- Speece RE (1996) *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters*. Archae Press, Tennessee, 393 pp.
- Yaakob MA, Mohamed RMSR, Al-Gheethi AAS, Kassim AHM (2018) Characteristics of chicken slaughterhouse wastewater. *Chem Eng Trans* 63: 637–642.

# 温帯沿岸域相模湾における植物プランクトンのサイズ組成と光吸収係数の特徴

矢野光一<sup>1)\*</sup>、下出信次<sup>2)</sup>、Victor S. Kuwahara<sup>1)</sup>

1) 創価大学大学院理工学研究科 〒192-5877 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

## Characterization of the phytoplankton size composition and light absorption coefficient in the temperate coastal waters of Sagami Bay

Koichi Yano<sup>1)\*</sup>, Shinji Shimode<sup>2)</sup> and Victor S. Kuwahara<sup>1)</sup>

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*

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

2023年5月1日受付, 2023年5月22日受理

**Abstract** Phytoplankton constitute the base of the aquatic food web and are the primary driver of biogeochemical processes such as the export of carbon to the deep ocean. Knowledge of the distributions, compositions, and biomass of the phytoplankton community are essential to understand biogeochemical cycles. Phytoplankton can be enumerated by microscopy, but this requires extensive time for sample preparation and counting, especially if statistically valid counts of the less abundant phytoplankton classes are required. Further, smaller picoplankton can be difficult to identify since they lack taxonomically external morphological features. Thus, the accessory pigment-based model has been used to estimate phytoplankton communities based on their size classes: micro- (M;  $> 20 \mu\text{m}$ ), nano- (N;  $2\text{--}20 \mu\text{m}$ ) and pico-phytoplankton (P;  $< 2 \mu\text{m}$ ). Light absorption by phytoplankton has a direct influence on the optical properties of seawater, and there is a growing effort to develop approaches to identify the spatial and temporal variability of the phytoplankton community from satellites. However, estimating the phytoplankton community in optically complex coastal waters from satellites is still a challenging problem because phytoplankton are only one of multiple optically significant constituents of seawater. Also, there are limitations of wavelength that satellites can measure, and overlapping signature pigment of each phytoplankton community. In order to improve the estimation of phytoplankton communities, it is necessary to understand the light absorption coefficient of phytoplankton,  $a_{\text{ph}}(\lambda)$  associated with the varying community structure. The objective of this study was to characterize the



variability of phytoplankton size classes and their light absorption coefficients in the temperate coastal waters of Sagami Bay. The specific objectives were (1) to classify phytoplankton communities based on cell size, (2) to investigate co-variability of  $a_{ph}(\lambda)$  spectra according to the classification. The present study conducted in situ observations from April 2016 to September 2022 at Station M (St. M: 35° 09' 45" N, 139° 10' 00" E) in the temporal coastal waters of Sagami Bay, Japan. Water samples for pigments and light absorption properties of phytoplankton were collected from surface water with a bucket, and measured by high-performance liquid chromatography and spectrophotometry, respectively. Phytoplankton size class composition was estimated based on pigment concentrations. The results showed that the three groups (Group M, N, P) generated according to the phytoplankton size composition were significantly different ( $R = 0.646, p < 0.001$ ). Also, the most dominant group throughout the study period was microplankton ( $n = 110$ ). The  $a_{ph}(\lambda)$  spectra showed peaks around 438 nm and 465 nm in the blue band and 674 nm in the red band. Using three wavelengths peaks, although the  $a_{ph}(\lambda)$  of group M was significantly higher than that of group N, Group P was not significantly different from other groups. This study suggests that the  $a_{ph}(\lambda)$  spectrum in the temperate coastal waters of Sagami Bay is significantly co-varying with the variability of phytoplankton size composition. The results suggest that analyzing the difference in  $a_{ph}(\lambda)$  spectra ratios and performing derivative analysis, coupled with analysis of phytoplankton size distribution and pigment composition should improve our ability to characterize phytoplankton spatio-temporal distribution from space.

**Keywords:** optical properties, pigments, remote sensing, size fraction

---

## 1. はじめに

植物プランクトンは海洋の一次生産者として食物網の基盤を形成しており、その光合成生産量は地球上全体の50%を占めている (Falkowski et al. 2004, Dutkiewicz et al. 2019)。植物プランクトン群集は、グループに応じて、生物地球科学的循環における主要な役割を果たす。例えば、珪藻類はシリカ、円石藻はカルシウム、藍藻類は窒素の循環に寄与する (Brownlee & Taylor 2002, Nair et al. 2008, Roy et al. 2011)。したがって、植物プランクトンのバイオマス量や群集組成の時空間的な変動を調査し明らかにすることは、全球的な物質循環の理解につながり、気候変動に関連した地球環境の未来を予測する上でも必須となる。従来、植物プランクトン群集の観察には顕微鏡が用いられてきたが、分類

群の識別と同定には専門的な知識と多くの時間を必要とする。そのため、植物プランクトンの細胞サイズに着目し、補助色素を測定することによって、それらのサイズ組成を推定する方法が確立された (Uitz et al. 2006)。この時、細胞直径が2  $\mu\text{m}$  以下のピコプランクトン、細胞直径が2 ~ 20  $\mu\text{m}$  のナノプランクトン、および細胞直径が20  $\mu\text{m}$  以上のマイクロプランクトンの3つに分けられる。

人工衛星などによるリモートセンシングは、広い範囲を高頻度で観測する有用な手法である。人工衛星が感知する海洋からの反射光は植物プランクトンの群集構造の違いによって変化するが、感知できる波長の数には限りがあるため群集の推定には課題が残る。また、植物プランクトンの主要色素であるクロロフィル *a* (Chl *a*) と比較して、群集によって特徴的な補助色素は濃度が低いいため、光学的な感知が難しい。さらに、その補助色

素同士も吸収・反射する波長に重なりがあるため、それぞれを区別するのが困難である (Aguirre-gomez et al. 2001, Bricaud et al. 2004)。そこで、既存の衛星プロダクトとして、群集構造の特徴を光学的に表している植物プランクトンの光吸収係数  $a_{ph}(\lambda)$  を使用し、植物プランクトンの細胞サイズに従って、その組成やバイオマスを推定するモデルが開発された (Roy et al. 2013, Wang et al. 2015, Zhang et al. 2015)。しかし、これらのモデルが沿岸域などの局所的な海域に適用できるかについては未だ検証が行われていない。局所的な沿岸域などにおいて、人工衛星による群集のサイズ組成推定を向上させるためには、植物プランクトンのサイズ組成の違いが  $a_{ph}(\lambda)$  に表れるかどうかを検証する必要があると指摘されている (Reynolds & Stramski 2019)。そこで本

研究の目的を、相模湾沿岸域において、植物プランクトンのサイズ組成、およびその光吸収係数の変動性を特徴づけることとし、具体的には (1) 細胞サイズ別に植物プランクトン群集を分類化し、(2) その分類と植物プランクトン光吸収係数スペクトルの共変動性を調査した。

## 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、2016年5月から2022年9月の期間に、相模湾真鶴半島沖 St. M (St. M: 35° 09' 45" N, 139° 10' 00" E) で行われた (Fig. 1)。表層から採水を行い、植物プランクトンの色素および光吸収係数を測定した。

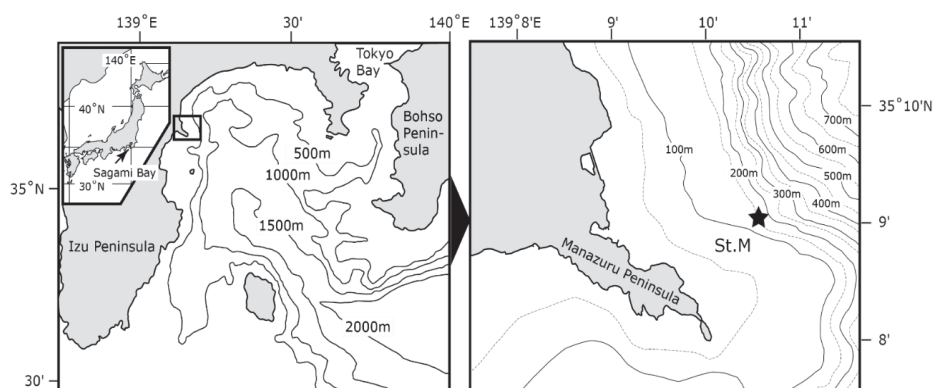


Fig. 1. Map of Pacific western boundary coastal region of Japan, bathymetry and sampling station (St. M) in the temperate waters of Sagami Bay.

### 2.1. 色素分析

海水試料 (500—2000 mL) を GF/F フィルター (25 mm, Whatman) を用いて濾過し、懸濁粒子を捕集した。2016年5月から2018年2月までの試料は、Suzuki et al. (2015) にもとづいて N, N-ジメチルホルムアミド (DMF) で色素を抽出し、C<sub>8</sub> カラム (Agilent Technologies) を用いた液体クロマトグラフィー (Nexera X2 SR system, Shimadzu) で分析した。2018年3月から2019年3月までの試料では色素を DMF で抽出し、Head & Horne (1993) に従って液体クロマトグラフィー (168 Diode Array Detector, Beckman Coulter) で分析した。

2019年4月から2022年9月までの試料は、Zepata et al. (2000) にもとづいてメタノールで抽出後、C<sub>8</sub> カラム (GL Science) を用いた液体クロマトグラフィーで分析した (Photodiode array UV-Vis detector SPD-M10A, Shimadzu)。

### 2.2. 光吸収係数

海水試料を孔径 0.7  $\mu\text{m}$  のガラス繊維濾紙 (GF/F 25 mm, Whatman) で濾過し、懸濁粒子を捕集した。光吸収係数を、波長域 300 ~ 700 nm、分解能 1 nm で、T-method により分光光度計を用いて測定した

(Cleveland & Weidemann 1993, Stramski et al. 2015, IOCCG 2018)。得られた光吸収係数を、植物プランクトンによるものと非生物粒子によるものとに分割するため、次亜塩素酸ナトリウムで色素抽出を行った後、同様の測定を行った。

### 2.3. 色素によるサイズ分画

マイクロ (> 20  $\mu\text{m}$ )、ナノ (2–20  $\mu\text{m}$ )、ピコプランクトン (< 2  $\mu\text{m}$ ) のサイズ組成を、式 (1) ~ (3) を用いて、補助色素濃度から推定した (Uitz et al. 2006)。用いた補助色素は以下の 7 種である: Fucoxanthin (Fuco)、Peridinin (Peri)、Alloxanthin (Allox)、19'-butanoyloxyfucoxanthin (19'-But)、19'-hexanoyloxyfucoxanthin (19'-Hex)、Zeaxanthin (Zeax)、Chlorophyll *b* (Chl *b*)。

$$f_{\text{micro}} = (1.41 \times \text{Fuco} + 1.41 \times \text{Peri}) / \Sigma DP \quad (1)$$

$$f_{\text{micro}} = (0.60 \times \text{Allox} + 0.35 \times 19'\text{-But} + 1.27 \times 19'\text{-Hex}) / \Sigma DP \quad (2)$$

$$f_{\text{micro}} = (0.86 \times \text{Zeax} + 1.01 \times \text{Chl } b) / \Sigma DP \quad (3)$$

ここで  $\Sigma DP$  は係数を乗じられた補助色素濃度の総和を示す。

$$\Sigma DP = 1.41 \times \text{Fuco} + 1.41 \times \text{Peri} + 0.60 \times \text{Allox} + 0.35 \times 19'\text{-But} + 1.27 \times 19'\text{-Hex} + 0.86 \times \text{Zeax} + 1.01 \times \text{Chl } b \quad (4)$$

### 2.4. 統計解析

式 (1) ~ (3) において  $f$  はサンプルにおける植物プランクトンの相対的なサイズ組成を示すため、最大の  $f$  を示す植物プランクトンサイズをそのサンプルにおいて優占的であるとみなした。これにより、全 133 サンプルは、マイクロプランクトンが優占するグループ M ( $n = 110$ )、ナノプランクトンが優占するグループ N ( $n = 17$ )、ピコプランクトンが優占するグループ P ( $n = 6$ ) に分けられた。

植物プランクトンのサイズ組成から、各サンプルの類似度を、ユークリッド距離による非計量多次元尺度法 (NMDS) から求め、これを ANOSIM 検定にかけた。これらの計算には PRIMER-E (version 7) を用いた (Clarke & Gorley 2015)。サイズグループ間にお

ける植物プランクトン光吸収係数の統計的差異は、Steel-Dwass 多重比較検定により調べた (有意水準は  $p < 0.05$ ) (Underwood 1997)。

## 3. 結果

### 3.1. サイズ組成

グループ M においてマイクロプランクトンは組成の  $73.3 \pm 17.6\%$  (39.3% ~ 100%) を占め、ナノプランクトンおよびピコプランクトンは、それぞれ  $15.9 \pm 12.8\%$  (0% ~ 43.9%) と  $10.8 \pm 9.3\%$  (0% ~ 35.0%) であった (Fig. 2)。グループ N においてナノプランクトンは組成の  $49.2 \pm 6.5\%$  (36.9% ~ 61.6%) を占め、マイクロプランクトンとピコプランクトンは、それぞれ  $34.2 \pm 5.2\%$  (28.2% ~ 45.8%) と  $16.6 \pm 8.8\%$  (3.2% ~ 33.4%) であった。グループ P におけるピコプランクトンの組成割合は  $44.5 \pm 5.7\%$  (37.4% ~ 55.8%) で、マイクロプランクトンとナノプランクトンは、それぞれ  $32.1 \pm 3.4\%$  (25.9% ~ 35.4%) と  $23.5 \pm 6.7\%$  (37.5% ~ 55.8%) であった。また、各グループにおける Chl *a* 濃度の平均値はグループ M ( $2.18 \pm 2.66 \mu\text{g L}^{-1}$ ) が最も高く、グループ N ( $1.37 \pm 1.33 \mu\text{g L}^{-1}$ ) とグループ P ( $0.90 \pm 0.42 \mu\text{g L}^{-1}$ ) がこれに次いだ。

NMDS および ANOSIM 検定では、グループ M、N、P における植物プランクトンのサイズ組成はそれぞれ有意に異なった ( $R = 0.646$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 2)。

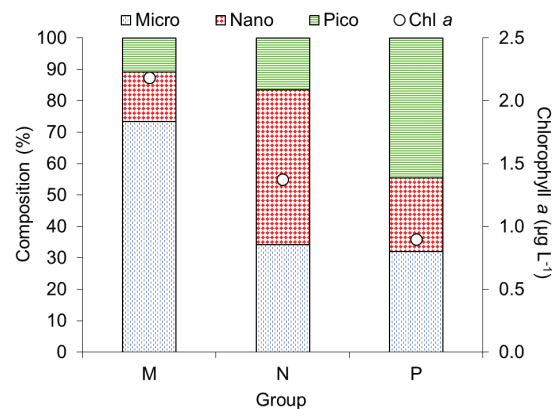


Fig. 2. Average of phytoplankton size class composition and Chl *a* concentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) based on the size classification. The number of total samples are 133; (M)  $n = 110$ , (N)  $n = 17$ , (P)  $n = 6$ .

### 3.2. 光吸収係数

植物プランクトンの光吸収係数  $a_{ph}(\lambda)$  スペクトルは、短波長側の 438 nm と 465 nm、長波長側の 674 nm を中心にピークを示した。グループ M のスペクトルは比較的高く、グループ P とグループ N がこれに次いだ (Fig. 4)。

この  $a_{ph}(\lambda)$  スペクトルの 3 ピークにおいて、グループ M ではグループ N より有意に高かったが (Fig. 5)、グループ P は他のグループと比較して有意な差は認められなかった。

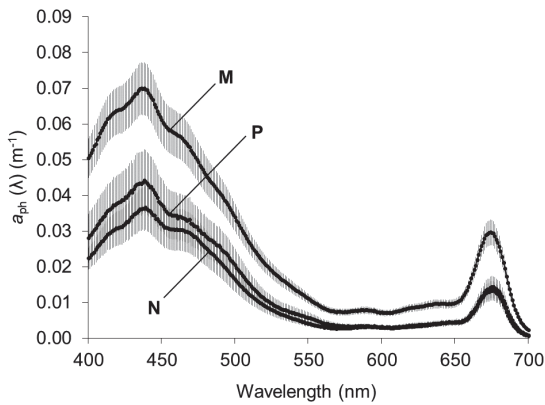


Fig. 4. Mean spectra of the light absorption coefficient of phytoplankton [ $a_{ph}(\lambda)$ ] for each phytoplankton size-based group (Group M, N, P). Error bars shows the standard error of the mean ( $=SD/\sqrt{n}$ ). The number of total samples are 127; (M)  $n = 104$ , (N)  $n = 17$ , (P)  $n = 6$ .

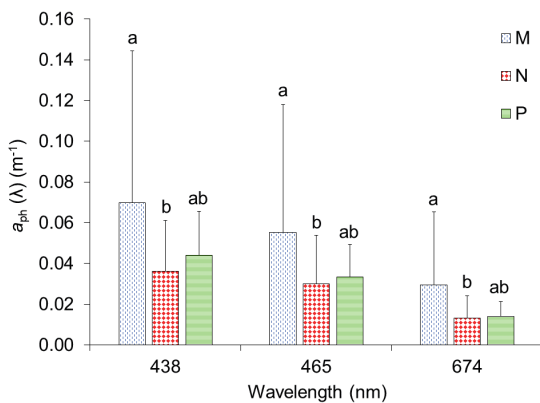


Fig. 5. Average of the light absorption coefficient of phytoplankton [ $a_{ph}(\lambda)$ ] at 438 nm, 465 nm, and 674 nm. Error bars show the standard deviations. Different letters of the top the bars indicate statistically significant differences at  $p < 0.05$  among the groups (Steel-Dwass). The number of total samples are 127; (M)  $n = 104$ , (N)  $n = 17$ , (P)  $n = 6$ .

### 4. 考察

優占している植物プランクトンサイズに応じて生成された 3 つのグループを比較すると、Chl *a* 濃度はグループ M、N、P の順に高かった。(Fig. 2)。またこれら分類群のグループ間における植物プランクトンの組成は有意に異なった (Fig. 3)。本海域における植物プランクトン群集構造を細胞サイズで表す場合、その組成には少なくとも以下 3 つの特徴的なパターンがあると考えられる: Chl *a* 濃度が比較的高く、マイクロプランクトンが優占するグループ M; Chl *a* 濃度は他 2 グループの中間で、ナノプランクトンが優占するグループ N; Chl *a* 濃度が比較的低く、ピコプランクトンが優占するグループ P。一般的に、Chl *a* 濃度が低い外洋域などでは円石藻や無殻渦鞭毛藻などの細胞サイズが小さいナノプランクトンやピコプランクトンが卓越する一方、Chl *a* 濃度が高い沿岸域などでは珪藻や渦鞭毛藻などのマイクロプランクトンが優占することが知られている (Malone 1980)。また、世界規模の海洋観測データを用いて植物プランクトンのサイズ構造を推定するモデルを開発した先行研究でも、細胞サイズの小さな植物プランクトンが、Chl *a* 濃度が低い ( $< 1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) 環境下において優占的であることが報告されている (Brewin et al. 2010)。本研究においても、Chl *a* 濃度が低いほど、より小さな植物プランクトン群集が優占的であったことが示されており、上記の先行研究と同様の傾向といえる。

植物プランクトンの光吸収特性を理解することは、一次生産や群集構造を推定する生物光学モデルを構築するに当たり重要である。群集構造の変化に伴う植物プランクトン光吸収係数のスペクトル形状の変化は、色素や細胞サイズの違いから生じており、群集構造を識別し推定するための基礎となる。本研究では、植物プランクトンの光吸収係数を測定し、細胞サイズの違いに従って生成されたグループに分類することにより、相模湾沿岸域における群集とその吸収係数を特徴づけた。植物プランクトン光吸収係数スペクトルは、短波長側の 438 nm と 465 nm、長波長側の 674 nm でピークを示しており、



これはカロテノイドおよび Chl *a* による吸収に起因すると考えられる (Alcântara et al. 2016) (Fig. 4)。

本研究では、相模湾沿岸域の植物プランクトン群集におけるサイズ組成の違いが、 $a_{ph}(\lambda)$  スペクトルに有意な差として表された (Fig. 5)。しかし、グループ P においては、 $a_{ph}(\lambda)$  では他のグループと識別できなかった。この場合、水の吸収を加えた吸収係数のスペクトルや後方散乱係数に関するデータを現場調査から取得し、それらの大きさを加味することで識別できる可能性がある (Reynolds & Stramski 2019)。また、波長間における吸収係数の比の算出や、本研究のようにハイパースペクトルデータが利用可能である場合は  $a_{ph}(\lambda)$  スペクトルを微分することにより、その特徴を強調することができる。と期待される (Torrecilla et al. 2011, Uitz et al. 2015)。本研究で扱ったサンプルの多くはマイクロプランクトンが優占しており、ナノプランクトンやピコプランクトンが優占したサンプルは全体の 17% であった。植物プランクトンのサイズ組成が反映された吸収係数の特徴を明確にするためには、上記に述べたような比の計算やスペクトルの微分解析が今後必要であると考えられる。

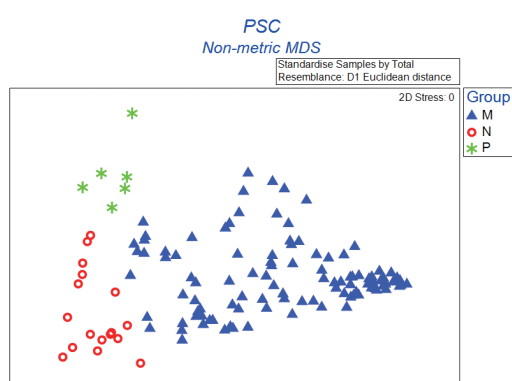


Fig. 3. The non-multidimensional scaling (NMDS) plot of the phytoplankton size class at the surface of Sagami Bay, Japan. The plot (M, N, and P) shows the classification based on size composition. Analysis of similarities (ANOSIM) test indicates significantly difference in each cluster M, N, P ( $p < 0.001$ ). The number of total samples are 133; (M)  $n = 110$ , (N)  $n = 17$ , (P)  $n = 6$ .

## 5. おわりに

本研究は、温帯沿岸域に位置する相模湾において、植物プランクトンのサイズ組成、およびその光吸収係数の変動性を特徴づけることを目的として、細胞サイズ別に植物プランクトン群集を分類し、その分類に従って植物プランクトン光吸収係数スペクトルの共変動性を調べた。マイクロプランクトンとナノプランクトンが優占的なグループでは、植物プランクトン光吸収係数のスペクトルの大きさに差異が確認された。植物プランクトンサイズ組成をその吸収係数から明確に識別するために、今後は波長間における吸収係数比の計算や微分解析を行うことで、サイズによる分類群のスペクトル特性を強調化し、比較する必要がある。

## 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) 第2回地球観測研究公募 < ER2GCF312 >、第3回地球観測研究公募 < ER3GCF308 >、および笹川科学研究助成 < 2022-4107 > による助成を受け実施された。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。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。この場を借りて厚く御礼申し上げる。

## 引用文献

- Aguirre-gomez R, Week AR, Boxall SR (2001) The identification of phytoplankton pigments from absorption spectra. *Int J Remote Sens* 22: 315–338.
- Alcântara E, Watanabe F, Rodrigues T, Bernardo N (2016) An investigation into the phytoplankton package effect on the chlorophyll-a specific absorption coefficient in Barra Bonita reservoir, Brazil. *Remote Sens Lett* 7: 761–770.
- Brewin RJW, Sathyendranath S, Hirata T, Lavender SJ, Barciela RM, Hardman-Mountford NJ (2010) A three-component model of phytoplankton size class for the



- Atlantic Ocean. *Ecol Modell* 221: 1472–1483.
- Bricaud A, Claustre H, Ras J, Oubelkheir K (2004) Natural variability of phytoplanktonic absorption in oceanic waters : Influence of the size structure of algal populations. *J Geophys Res* 109: 1–12.
- Brownlee C, Taylor AR (2002) “Algal calcification and silification.” *Encyclopedia of Life Science*. Macmillan, London, UK, pp. 1–6.
- Clarke KR, Gorley RN (2015) *PRIMER v.7: User Manual/Tutorial*. PRIMER-E, Plymouth.
- Cleveland JS, Weidemann AD (1993) Quantifying absorption by aquatic particles: A multiple scattering correction for glass-fiber filters. *Limnol Oceanogr* 38: 1321–1327.
- Dutkiewicz S, Hickman AE, Jahn O, Henson S, Beaulieu C, Monier E (2019) Ocean colour signature of climate change. *Nat Commun* 10: 578.
- Falkowski PG, Katz ME, Knoll AH, Quigg A, Raven JA, Schofield O, Taylor FJR (2004) The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science* 305: 354–360.
- Head EJJ, Horne EPW (1993) Pigment transformation and vertical flux in an area of convergence in the North Atlantic. *Deep Sea Res Part II Top Stud Oceanogr* 40: 329–346.
- IOCCG Protocol Series (2018) “Absorption Coefficient.” *Inherent Optical Property Measurements and Protocols* (eds Neeley AR, Mannino A) IOCCG Ocean Optics and Biogeochemistry Protocols for Satellite Ocean Colour Sensor Validation, Vol 1.0, Dartmouth.
- Malone TC (1980) “Algal size.” *The Physiological Ecology of Phytoplankton* (ed Morris I). Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, pp. 433–463.
- Nair A, Sathyendranath S, Platt T, Morales J, Stuart V, Forget MH, Devred E, Bouman H (2008) Remote sensing of phytoplankton functional types. *Remote Sens Environ* 112: 3366–3375.
- Reynolds R.A, Stramski D (2019) Optical characterization of marine phytoplankton assemblages within surface waters of the western Arctic Ocean. *Limnol Oceanogr* 64: 2478–2496.
- Roy S, Llewellyn CA, Egeland ES, Johnsen G (2011) “Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography.” *Phytoplankton Pigments* (eds Roy S, Llewellyn CA, Egeland ES, Johnsen G). Cambridge Univ Press, Cambridge, UK, pp.12–15.
- Roy S, Sathyendranath S, Bouman H, Platt T (2013) The global distribution of phytoplankton size spectrum and size classes from their light-absorption spectra derived from satellite data. *Remote Sens Environ* 139: 185–197.
- Stramski D, Reynolds RA, Kaczmarek S, Uitz J, Zheng G (2015) Correction of pathlength amplification in the filter-pad technique for measurements of particulate absorption coefficient in the visible spectral region. *Appl Opt* 54: 6763–6782.
- Suzuki K, Kamimura A, Hooker SB (2015) Rapid and highly sensitive analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton using ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) with the first derivative spectrum chromatogram (FDSC) technique. *Mar Chem* 176: 96–109.
- Torrecilla E, Stramski D, Reynolds RA, Millán-Núñez E, Píera J (2011) Cluster analysis of hyperspectral optical data for discriminating phytoplankton pigment assemblages in the open ocean. *Remote Sens Environ* 115: 2578–2593.
- Uitz J, Claustre H, Morel A, Hooker SB (2006) Vertical distribution of phytoplankton communities in open ocean: An assessment based on surface chlorophyll. *J Geophys Res* 111: C08005.
- Uitz J, Stramski D, Reynolds RA, Dubranna J. (2015). Assessing phytoplankton community composition from hyperspectral measurements of phytoplankton

- absorption coefficient and remote-sensing reflectance in open-ocean environments. *Remote Sens Environ* 171: 58–74.
- Underwood AJ (1997) “More analysis of variance” *Experiments in ecology*. Cambridge University Press, UK, pp. 198–242.
- Wang S, Ishizaka J, Hirawake T, Watanabe Y, Zhu Y, Hayashi M, Yoo S (2015) Remote estimation of phytoplankton size fractions using the spectral shape of light absorption. *Opt Express* 23: 10301–10318.
- Zapata M, Rodriguez F, Garrido JL (2000) Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C<sub>8</sub> column and pyridine-containing mobile phases. *Mar Ecol Prog Ser* 195: 29–45.
- Zhang X, Huot Y, Bricaud A, Sosik HM (2015) Inversion of spectral absorption coefficients to infer phytoplankton size classes, chlorophyll concentration, and detrital matter. *Appl Opt* 54: 5805–5816.

## Note

# Surface nutrient regime and bottom hypoxia in Manila Bay during the southwest monsoon

Ken Furuya<sup>1), 2)\*</sup>, Mari Yasuda<sup>2), 4)</sup> and Valeriano M. Borja<sup>3)</sup>

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

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

3) *National Fisheries Research and Development Institute, Mo. Ignacia Av., Brgy, Diliman, Quezon City 1103 Philippines*

4) *Present address: Nippon Koei Co., Ltd., Koujimachi, Chiyoda, Tokyo, 102-8539 Japan*

\* *Corresponding author: furuya@soka.ac.jp*

Received April 25 2023, Accepted April 30 2023

**Abstract** We examined the surface nutrient regime and hypoxia in Manila Bay, Philippines, during the southwest monsoon along a transect from off Limay, Bataan Peninsula, to Metro Manila. The water column showed stratification, with warm, less saline water in the top 10 meters overlying cold, saline bottom water. Hypoxia was present in the bottom waters along the entire transect, and anoxic conditions were observed off Manila. Ammonium concentrations ranged from 6.7 to 40.2  $\mu\text{M}$ , exceeding those of nitrate and nitrite, both of which were nearly depleted at almost all stations except off-Manila, with levels below 0.1  $\mu\text{M}$ . Phosphate varied from 0.1 to 1.9  $\mu\text{M}$ , resulting in a stoichiometrically nitrogen-rich condition at the surface, with N:P ratios ranging from 17.1 to 149.7 and an average of 37.4. This is in contrast to the phosphate-rich conditions reported during the northeast monsoon period. A plume with high nutrient concentrations and high chlorophyll *a* was observed off Manila, indicating freshwater inflow from sewage and the Pasig River. Diatoms, including the *Skeletonema costatum* complex and *Chaetoceros* spp., were abundant, and these eutrophic conditions likely favored the occurrence of green *Noctiluca*, while it was not observed during our study.

**Keywords:** Manila Bay, nutrient, chlorophyll *a*, hypoxia, southwest monsoon

The discharge of sewage from land areas around the world has increased due to human activities and population growth. This has caused eutrophication in coastal areas and various environmental issues, as noted by Glibert et al. (2005). In the South China Sea, the situation is particularly serious, as anthropogenic activities have resulted in the inflow of large amounts of nutrients via river water, leading to the formation of

eutrophic waters (Huang et al. 2003, Wang et al. 2008, Qiu et al. 2010). This cultural eutrophication in coastal areas is responsible for the proliferation of harmful algal blooms (HABs) and the formation of a hypoxic or anoxic layer in the bottom layer during the stratification period in enclosed waters. In this study, we investigate the characteristics of the surface nutrient regime and hypoxia in Manila Bay, one of the most important semi-

enclosed waters in the South China Sea during the southwest monsoon.

Manila Bay is a semi-enclosed water body that spans an area of 1,700 square kilometers and has an average depth of 17 meters. The climate of Manila Bay can be divided into two distinct seasons: a dry season from November to April and a rainy season from June to September. Additionally, three prevailing wind periods exist: the northeast monsoon from October to January, the southwest trade winds from March to May, and the southeast monsoon from June to September (Jacinto et al. 2006).

Observations were conducted on September 3 and 4, 2019 (Fig. 1). A CTD (Sea-Bird 19 Plus) was used to obtain profiles of water temperature, salinity, dissolved oxygen (DO), and in vivo fluorescence of chlorophyll from the surface to the near-bottom. Water samples were collected from the surface using a bucket to measure chlorophyll *a* (Chl *a*) and nutrient concentrations. The samples were filtered through GF/F filters (Whatman) on board a ship and then measured for Chl *a* using a fluorometer (Aquafluor, Turner Designs) after extraction with acetone in the dark at ice temperature for 24 h, and sonication. Nutrient concentrations were measured using an autoanalyzer (TRAACS, BL-TEC) after being frozen for transportation back to a land laboratory. Phytoplankton was observed by fixing seawater with neutral formalin (final concentration 2.0%).

The bay was stratified with less saline water in the top 10 meters overlaying cold, saline bottom water (Fig. 2). At Stn. 15, a significant decrease in salinity relative to the neighboring stations was observed at the surface, indicating an inflow of river water. DO concentrations were relatively high near the surface and diminished with depth (Fig. 2). DO concentrations fell below the standard value of 2.8 mg L<sup>-1</sup> for hypoxia at depths of approximately 10-18 meters, confirming the formation

of hypoxic conditions (Jacinto et al. 2011). Moreover, the bottom water at Stn. 16 displayed an extremely low DO concentration of less than 0.01 mg L<sup>-1</sup>, signifying the development of anoxic conditions. This was in contrast to the supersaturation of DO observed at a depth of 3 meters above the anoxic zone.

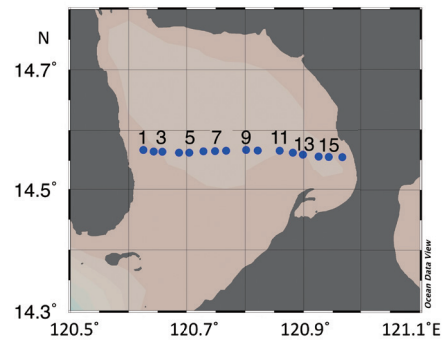


Fig. 1. Station locations. For simplicity, even-numbered stations are not labeled on the map.

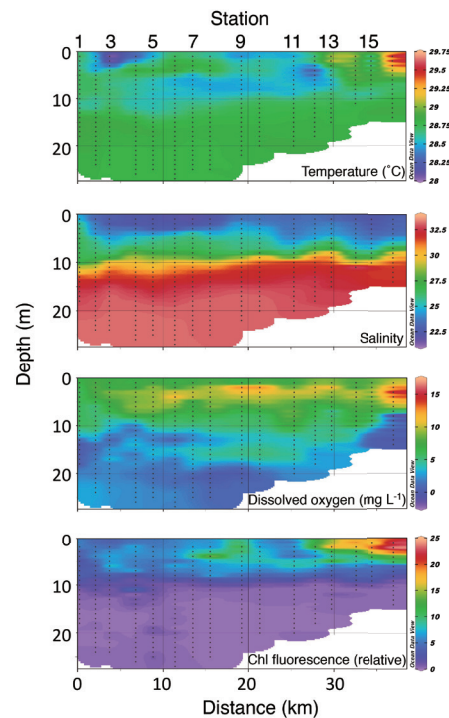


Fig. 2. Vertical profiles of temperature (upper), salinity (middle), dissolved oxygen (middle), and in vivo chlorophyll fluorescence (lower).

Ammonium exceeded nitrate and nitrite varying from 6.7 to 40.2  $\mu\text{M}$ . In contrast, nitrate and nitrite were almost exhausted at Stns. 1 to 14 ranging below 0.1  $\mu\text{M}$  (Fig. 3). Thus, the high ammonium concentrations produced an overall nitrogen-rich condition at the bay's surface despite the low concentrations of both nitrate and nitrite. Phosphate varied from 0.1 to 1.9  $\mu\text{M}$ , making a stoichiometrically nitrogen-rich condition at the surface with the N:P ratio ranging from 17.1 to 149.7 with an average of 37.4. This was in contrast to the phosphate-rich condition observed during the northeast monsoon period (Furuya et al. 2006, Jacinto et al. 2011). The observed concentrations of nutrients were within the reported range for the southwest monsoon period (Chang et al. 2009), and the high ammonium concentrations are ascribable to loading from land. The maximum concentrations of ammonium, nitrate, and phosphate of 40.2, 4.0, and 1.9  $\mu\text{M}$ , respectively, were observed at Stn. 15, which coincided with low salinity, indicating freshwater inflow presumably from Pasig River. This inference is compatible with the high fecal coliform counts in Pasig River estuary which indicate the discharge of untreated sewage from sewage pipes and direct sewage discharge from sheds along the coast (Jacinto et al. 2006). In the city of Manila, the sewerage system is not well developed and still has low coverage (Jacinto et al. 2006). In addition, a study on the origin of particulate organic matter in Manila Bay using stable isotopes showed that most of the nitrogen in Manila Bay comes from the Pasig River and is derived from urban sewage and industrial effluents (Miller et al. 2011). Thus, the southwest monsoon with high precipitation brings the nitrogen-rich conditions, particularly with high ammonium concentrations in Manila Bay.

Chlorophyll *a* was in the range between 6.9 and 111.3  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Fig. 3). The higher concentration was observed toward the urban district of Manila (Figs. 2 and 3). There

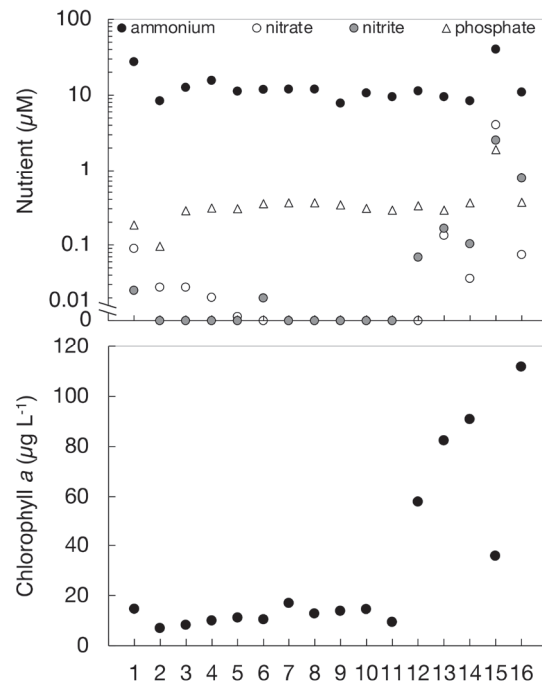


Fig. 3. Distribution of nutrients (upper) and chlorophyll *a* (lower) at the surface.

was a drop of Chl *a* at Stn. 15 accompanied by a sharp increase in nutrients and the drop of salinity, indicating the inflow of freshwater (Figs. 2 and 3). The nutrient influx from rivers likely resulted in the blooming of phytoplankton. Diatoms including *Skeletonema costatum* complex and *Chaetoceros* spp. were most abundant. These species have been reported as the dominant diatom species in Manila Bay (Borja et al. 2019).

In Manila Bay, *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* was the dominant bloom-forming species until the 1990s, but since 2001, green *Noctiluca* has emerged and become the dominant species (Hansen et al. 2004, Furuya et al. 2006, Harrison et al. 2011, Borja et al. 2019). Green *Noctiluca* grows by feeding on increased prey due to eutrophication (Sriwong et al. 2008). Therefore, Manila Bay in the southwest monsoon period is considered to be suitable for the proliferation of green *Noctiluca* with an abundance of diatoms. While green *Noctiluca* did not occur during our observation, its recurrent bloom can be expected in the bay.



## REFERENCES

- Borja VM, Furio EF, Gatdula NC, Iwataki M (2019). Occurrence of harmful algal blooms caused by various phytoplankton species in the last three decades in Manila Bay, Philippines. *Phil J Nat Sci* 24: 80–90.
- Chang KH, Amano A, Miller TW, Isobe T, Maneja R, Siringan FP, Imai H, Nakano S (2009) “Pollution study in Manila Bay: eutrophication and its impact on plankton community” *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry – Environmental Research in Asia* (eds, Obayashi Y, Isobe T, Subramanian A, Suzuki S, Tanabe S) TERRAPUB, Tokyo, pp. 261–267.
- Furuya K, Saito H, Sriwoon R, Vijayan AK, Omura T, Furio E F, Borja VM, Boonyapiwat S, Lirdwitayaprasit T (2006) Persistent whole-bay red tide of *Noctiluca scintillans* in Manila Bay, Philippines. *Coast Mar Sci* 30: 74–79.
- Glibert PM, Seitzinger S, Heil CA, Burkholder JM, M. Parrow W, Codispoti LA, Kelly V (2005) The role of eutrophication in the global proliferation of harmful algal blooms. *Oceanogr* 18: 198–209.
- Hansen PJ, Miranda L, Azanza R (2004) Green *Noctiluca scintillans*: a dinoflagellate with its own greenhouse. *Mar Ecol Prog Ser* 275: 79–87.
- Harrison, PJ, Furuya K, Glibert PM, Zu J, Liu HB, Yin K, Lee JHW, Anderson DM, Gowen R, Azri ARA, Ho YT (2011). Geographical distribution of red and green *Noctiluca scintillans*. *Chin J Oceanol Limnol* 29: 807–831.
- Huang XP, Huang LM, Yue WZ (2003) The characteristics of nutrients and eutrophication in the Pearl River estuary, South China. *Mar Poll Bul* 47: 30–36
- Jacinto GS, Velasquez IB, McGlone MLSD, Villanoy CL, Siringan F B (2006) “Biophysical environment of Manila Bay - Then and now.” *The Environment in Asia Pacific Harbours* (ed Wolanski E) Springer, Amsterdam, pp. 293–307.
- Jacinto GS, Sotto LPA, Senal MIS, McGlone MLSD, Escobar MTL, Amano A, Miller TW (2011) Hypoxia in Manila Bay, Philippines during the northeast monsoon. *Mar Poll Bul* 63: 243–248.
- Miller TW, Jaquinto GS, McGlone M, Isobe A, Shibata J, Hamaoka H, Omori K (2011) “Tracing dynamics of organic material flow in coastal marine ecosystems: results from Manila Bay (Philippines) and Kyucho Intrusion (Japan).” *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry – Environmental Research in Asia* (eds, Obayashi Y, Isobe T, Subramanian A, Suzuki S, Tanabe S) TERRAPUB, Tokyo, pp. 95–104.
- Qiu D, Huang L, Zhang J, Lin S (2010) Phytoplankton dynamics in and near the highly eutrophic Pearl River Estuary, South China Sea. *Cont Shelf Res* 30: 177–186.
- 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.
- Wang SF, Tang D, He F, Fukuyo Y, Azanza RV (2008) Occurrences of harmful algal blooms (HABs) associated with ocean environments in the South China Sea. *Hydrobiol* 596: 79–93.

## Report

# Practical Science and Environmental Education Workshop in Manaus, Brazil

Shinjiro Sato <sup>1)\*</sup>, Paulo H.R. Aride <sup>2)</sup>, Luciano G. do Nascimento <sup>3)</sup>, Victor S. Kuwahara <sup>1)</sup>, Yoshiki Takayama <sup>1)</sup>, Koichi Yano <sup>1)</sup>, Marcelo T. Ono <sup>1)</sup>, Tatsuki Toda <sup>1)</sup>, Adriano T. de Oliveira <sup>2)</sup>, Laila Y. dos S. Silva <sup>2)</sup>, Débora N. Carvalcante <sup>2)</sup>, Luise B.R. Pereira <sup>2)</sup>, Francisco F. da S. Brito <sup>2)</sup>, Mayara O. Martins <sup>2)</sup>, Sofia R. Aranha <sup>2)</sup>, André L. de S. Chaves <sup>2)</sup>, Meris de S. Barros <sup>2)</sup>, Maria F. da S. Gomes <sup>2)</sup>, Ana B.S. dos Santos <sup>2)</sup>, Bruno da C. Takaki <sup>2)</sup>, Arlindo J.A. de Lima <sup>2)</sup>, Alexandra dos S. Silva <sup>2)</sup>, Tamy Y. Kobashikawa <sup>3)</sup>, Rodrigo Izumi <sup>3)</sup> and Tais Tokusato <sup>3)</sup>

1) *Soka University, Tokyo, Japan*

2) *Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Manaus, Brazil*

3) *Instituto Soka Amazônia, Manaus, Brazil*

\* *Corresponding author: ssato@soka.ac.jp*

Received May 12 2023, Accepted May 16 2023

## 1. INTRODUCTION

It is an unequivocal fact that Amazonian tropical forest is the largest remaining primary forest in the world. The ecosystem in the region is extremely complex with high biodiversity (Peres et al. 2010). Conservation and protection of the dynamic forest and river regions is extremely important not only for the natural environments, but also for the economy and social dependence of benefits from such abundant natural environments.

Important natural parameters that affect status of the natural environments include light (natural sunlight), soil, and water, which abundantly exist in the Amazon region. Solar energy is the primary energy source for the majority of living organisms in both terrestrial and aquatic ecosystems, and drives the diurnal and seasonal cycles of biogeochemical processes (Monteith & Unsworth 2013). In particular, in situ light data remains one of the most underappreciated data measurements

although having a significant impact on the physical, chemical and biological processes in the ecosystem (Johnsen 2012). Soil provides the fundamental basis for all terrestrial living organisms including the Amazonian forests as well as life-sustaining infrastructure for human society. Water is the most essential single entity to constitute all organisms from a single cell to the earth. Understanding of importance and roles of each factor and interaction of such complex dynamics in the natural environments can serve as fundamental platform for natural scientists, particularly for young scientists such as university students.

The objective of this workshop was to provide hand-on scientific and environmental education for university students in Manaus, Amazonas, Brazil through practical field measurements using the three most important parameters in the natural ecosystem composed of natural sunlight, soil, and water. The workshop was divided into a series of lectures, in situ field sampling, and data processing, analysis and interpretation with the

ultimate goal of empowering the undergraduate students with research-centered environmental education and experience of developing international collaboration.

### 1.1. Practical Science and Environmental Education Workshop

The workshop was conducted at the Instituto Soka Amazônia (ISA) and laboratories of Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), Manaus, Amazonas, Brazil from March 7 through March 10, 2023. The workshop schedule is summarized in Table 1.

Table 1. Workshop schedule

Date	Program	Conductor	Location
March 7	Lecture on Aquatic Ecology	Dr. Yoshiki Takayama	ISA Auditorium
	Lecture on Environmental Optics	Prof. Victor Kuwahara	ISA Auditorium
	Lecture on Soil Science	Prof. Shinjiro Sato	ISA Auditorium
	Environmental optical data collection	Prof. Victor Kuwahara	ISA campus
	Soil sample collection	Prof. Shinjiro Sato	ISA campus
March 8	Water and plankton samples collection	Dr. Yoshiki Takayama	Amazon River
	Environmental optical data collection	Prof. Victor Kuwahara	Amazon River
	Soil pH measurement	Prof. Shinjiro Sato	IFAM laboratory
	Water pH measurement	Dr. Yoshiki Takayama	IFAM laboratory
March 9	Soil available phosphorus measurement	Prof. Shinjiro Sato	IFAM laboratory
	Measurement of suspended solid concentration and plankton observation	Dr. Yoshiki Takayama	IFAM laboratory
	Calculations of data from light, soil, and water samples	Prof. Victor Kuwahara Prof. Shinjiro Sato Dr. Yoshiki Takayama	IFAM laboratory
March 10	Explanation and discussion on calculated data from light, soil, and water samples	Prof. Victor Kuwahara Prof. Shinjiro Sato Dr. Yoshiki Takayama	ISA Auditorium

## 2. MATERIALS & METHODS

### 2.1. Light Measurements

Natural sunlight was measured using an Apogee Instruments handheld quantum meter (MX-200X) fitted to a 102 cm water submersible sensor wand (AM-320), and all radiance measurements conducted in spot-mode. The sensor collects cosine corrected quanta ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) with a spectral response of (370 – 650 nm) for photosynthetically

active radiation (PAR) in the air and water. Measurements were conducted at four sampling stations in the forest (described below), and at four sampling stations in the river (see Fig. 1b). Data collected in the river were corrected using the suggested immersion factor correction by multiplying values by 1.15. Quantum data were measured in triplicate at each location in addition to weather conditions, GPS location and local time (AMT).

Collected data was later processed to calculate diurnal variability [ $E(t)$ ], daily insolation [ $Q_s$ ], extinction coefficient [ $K_d$ ] and/or euphotic depth [ $Z_{eu}$ ] as follows (Kirk 2011):

$$E(t) = E_{noon} \sin(\pi t/N) \quad (\text{Eq. 1})$$

where  $E(t)$  is PAR quanta ( $\mu\text{mol m}^{-2}$ ) at time  $t$  (hours),  $E_{noon}$  is PAR quanta at noon,  $t$  is hours after sunrise (hours) and  $N$  is day length from sunrise to sunset (hours).

$$Q_s = \int_0^N E(t) dt \quad (\text{Eq. 2})$$

where  $Q_s$  is the daily PAR insolation ( $\mu\text{mol m}^{-2}$  day),  $N$  is day length from sunrise to sunset (hours) and  $E(t)$  is PAR quanta ( $\mu\text{mol m}^{-2}$ ) at time  $t$  hours.

$$E_z = E_0 e^{-kz} \quad (\text{Eq. 3})$$

where  $E_z$  is PAR quanta ( $\mu\text{mol m}^{-2}$ ) at depth ( $z$ ) in centimeters (cm),  $E_0$  is PAR quanta ( $\mu\text{mol m}^{-2}$ ) just below water surface and  $k$  is the attenuation coefficient ( $\text{cm}^{-1}$ ).

$$Z_{eu} = 4.6/k \quad (\text{Eq. 4})$$

where  $Z_{eu}$  is the euphotic depth, or the depth layer which  $E_0$  (PAR) falls to 1% of the surface value and  $k$  is the attenuation coefficient ( $\text{m}^{-1}$ ).

## 2.2. Soil Samples

Soil samples were collected from four different locations within ISA campus: 1) dense upland forest with abundant organic matter (mata densa), 2) thin upland forest with insufficient organic matter (capoeira), 3) upland forest with presence of Indian Black Earth (IBE) or biochar (*Terra Preta de Índio*), and 4) lowland forest with seasonal flooding (baixio). At each sampling location, 3 sub-samples were collected using a shovel from the top 10-15 cm depth and combined in a bag to

represent soil sample of the location. The collected soil samples were dried in an oven at  $80^\circ\text{C}$  for overnight, and sieved by 2-mm sieve for soil pH and available phosphorus (P) analyses.

### 2.2.1. Soil pH

Fifteen grams of dry soil sample were weighted using an electric balance into 50-mL centrifuge tube and 30 mL of distilled water was added to tube in triplicate. Tubes were shaken vigorously for 10 min manually. Tubes were let sit in tube rack for 10 min, and soil pH was measured using a pH meter.

### 2.2.2. Soil Available Phosphorus

Soil available P was extracted using Mehlich 1-extracting solution, which was prepared by sulfuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) and hydrochloric acid (HCl) to make the final solution concentrations of  $0.0125 \text{ mol H}_2\text{SO}_4 \text{ L}^{-1}$  and  $0.05 \text{ mol HCl L}^{-1}$  (Mehlich 1953). Five grams of dry soil sample were weighted using the electric balance into 50-mL centrifuge tube and 20 mL of Mehlich 1-solution was added to tube in triplicate. Tubes were shaken vigorously for 10 min manually. Tubes were let sit in tube rack for 10 min, and supernatant was filtered through Whatman No. 1 equivalent filter paper. Phosphorus concentration in the filtrate was determined using P packtest (Kyoritsu Chemical-check Lab. Corp., Japan) by molybdenum blue method. Soil available P was calculated by using the following equation.

$$\text{Soil available P (mg kg}^{-1}\text{)} = \text{P concentration in filtrate (mg L}^{-1}\text{)} \times (0.02 \text{ L}/0.005 \text{ kg}) \quad (\text{Eq. 5})$$

## 2.3. Aquatic Environment

The survey was conducted in the center of the Amazon basin where Solimões River and Negro River merge in Manaus, Brazil (Fig. 1a). The water and zooplankton samples were collected from 9:00 to

11:00 on 8th March 2023 during the rising water period (rainy season) at four sites across the rivers: the center of Amazon River (St. 1, S  $03^{\circ} 07.3596''$ S, W  $059^{\circ} 54.4180''$ ), Amazon River side of the confluence (St. 2, S

$03^{\circ} 08.0770''$ , W  $059^{\circ} 54.1392''$ ), Solimões River side of the confluence (St. 3, S  $03^{\circ} 07.9152''$ , W  $059^{\circ} 53.9902''$ ) and the center of Solimões River (St. 4, S  $03^{\circ} 08.0890''$ , W  $059^{\circ} 53.4420''$ ) (Fig. 1b).

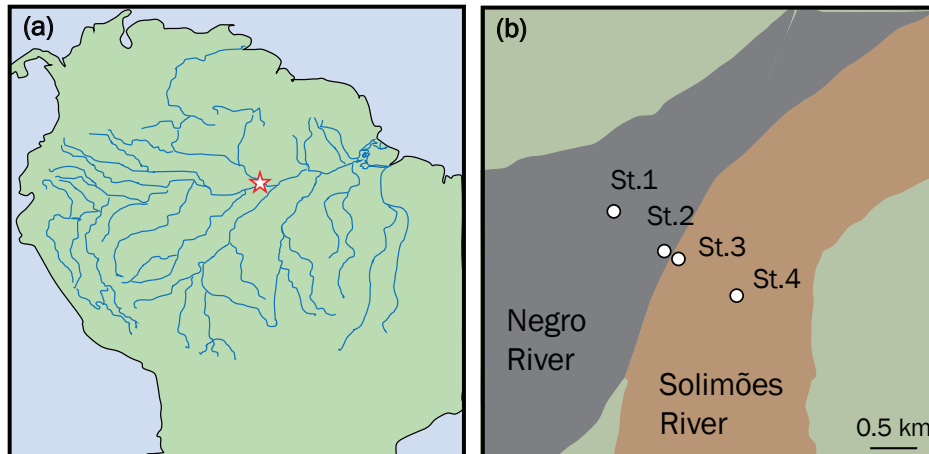


Fig. 1. Location of water and zooplankton sample collection. (a) the Amazon Basin in South America. (b) sampling sites across the two rivers: the center (St. 1) of the Negro River, the confluence (St. 2 & 3), and the center (St. 4) of the Solimões River.

On each sampling site, surface water was collected by a bucket and sieved through  $180\text{-}\mu\text{m}$  nylon mesh to remove debris, and then transported to the field laboratory. The temperature of air and river surface water was measured at the time of field sampling by a mercury thermometer (Shinwa Rules Co., Ltd.). Triplicate water subsamples for pH were measured using a pH meter. Three replicate aliquots of water samples for suspended solid (SS) concentrations were filtered onto pre-weighted  $1.6\text{-}\mu\text{m}$  glass microfiber filters (GF/A, Whatman Co., Ltd.). The filters were oven-dried at  $60^{\circ}\text{C}$  for over 24 hours, then weighed by a microbalance. The SS concentration was estimated by the difference in the filter weight before and after sample filtration.

Zooplankton samples were collected by a single vertical haul from the 20 m depth to the surface, using

a plankton net (mesh size  $100\ \mu\text{m}$ ; diameter 30 cm; length 100 cm) equipped with a flowmeter (Rigo Co., Ltd.). The collected samples were immediately fixed in 5% buffered formalin–water solution. Under a dissecting microscope, zooplankton was identified using morphological characteristics and counted into four groups; copepods, cladocerans, fish larvae, insect larvae and others.

### 3. RESULTS

Fig. 2a, 2b, 2c, and 2d show light measurement on the research boat at the confluence of Negro and Solimões River, soil sample collection in the forest, water sample measurement in the laboratory at IFAM, and all participants and staff in the training workshop.



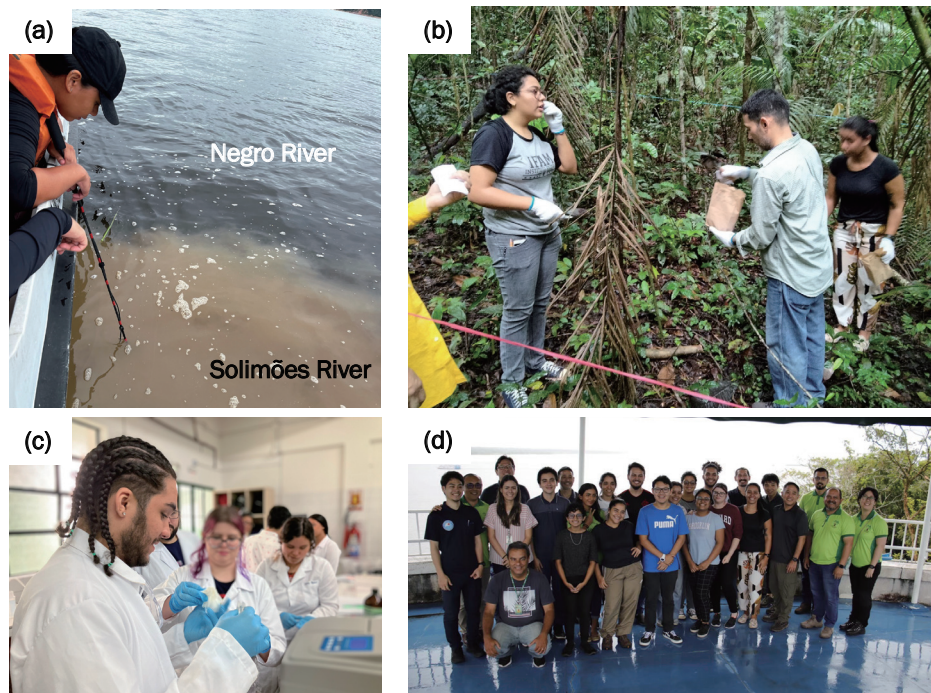


Fig. 2. Images of (a) light intensity measurement on the research boat at the confluence of Negro and Solimões River, (b) soil sample collection in the forest, (c) water sample measurement in the laboratory at IFAM, and (d) all participants and staff in the training workshop.

### 3.1. Light Measurements: Forest

Weather during quanta measurements in the forest was generally overcast, cloudy and unstable in the afternoon during the survey. Measurements from the capoeira forest station showed  $\sim 200$ ,  $\sim 50$  and  $\sim 10$  spot-mode quanta ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) readings for Direct-Sky, Trail/Canopy and Canopy, respectively (Fig. 3). Using Eq. 1., the potential diurnal variability and solar insolation of solar radiance for each station was modeled assuming atmospheric conditions remained stable for each location (Fig. 3). Similar measurements and calculations were conducted at the mata densa and Terra Preta de Índio forest sampling stations (not shown). All air measurements conducted during the day showed seasonally low and unstable solar radiance, but revealed consistent differences between dense canopy and direct-sky measurements.

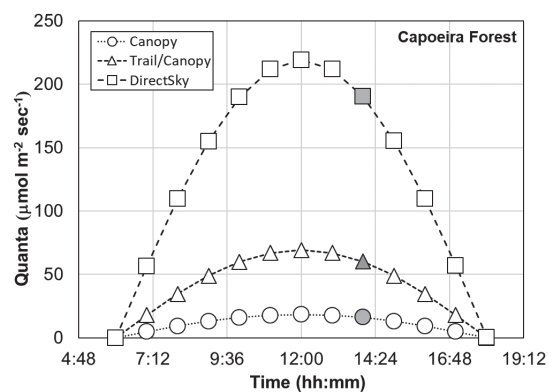


Fig. 3. Diurnal variability of the solar radiance from under the canopy ( ● ), along trail/canopy ( ▲ ) & under direct sky surrounded by canopy ( ■ ) based on spot-measurements of quanta ( $\text{mmol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ ) during soil sampling at Capoeira Forest on 07-Mar-23 around 14:10. White symbols represent hourly modeled quanta based on spot-measurements (grey symbols) assuming a cloud free day. Weather conditions during the day were cloudy/overcast. Modelled estimate of the daily insolation ( $Q_s$ ) for the direct sky surrounded by canopy location was  $1667 \text{ mmol m}^{-2} \text{day}^{-1}$ .

### 3.2. Light Measurements: River

Weather during the river sampling was overcast, partly cloudy and rain throughout the ~30 min survey. Light measurements conducted in the Amazon river showed distinct light attenuation patterns at the three stations sampled (Fig. 4). Depth measurements of quanta conducted at the Rio Negro sector ( $K_d = 0.103 \text{ cm}^{-2}$ ;  $Z_{eu} = 58 \text{ cm}^{-2}$ ) showed relatively high light transparency compared to the Mixed sector ( $K_d = 0.132 \text{ cm}^{-2}$ ;  $Z_{eu} = 32 \text{ cm}^{-2}$ ) and Rio Solimoes sector ( $K_d = 0.231 \text{ cm}^{-2}$ ;  $Z_{eu} = 17 \text{ cm}^{-2}$ ) (Fig. 4). The visually dark color of the Rio Negro (low SS) and light-brown color of the Rio Solimões (high SS) was consistent with the light attenuation patterns observed.

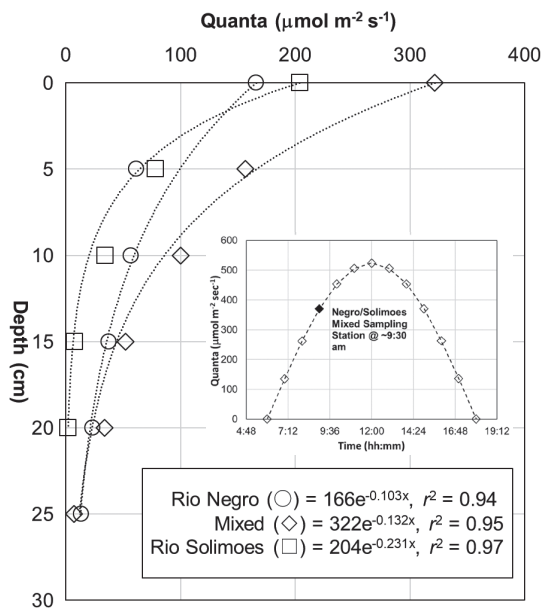


Fig. 4. Diffuse attenuation (cm) of the solar radiance quanta ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ ) from the Rio Negro ( $\circ$ ), Negro/Solimões Mixed ( $\diamond$ ) & Rio Solimões sectors of the Amazon River ( $\square$ ) based on spot-measurements at depth on 08-Mar-23 between 09:30 – 10:00 am. Weather conditions during the day was cloudy/overcast. The diffuse attenuation coefficients ( $K_d$ ) and euphotic depth ( $Z_{eu}$ ) were  $0.103 \text{ cm}^{-2}$  ( $58 \text{ cm}^{-2}$ ),  $0.132 \text{ cm}^{-2}$  ( $32 \text{ cm}^{-2}$ ) and  $0.231 \text{ cm}^{-2}$  ( $17 \text{ cm}^{-2}$ ), respectively. Modelled estimate of the diurnal variability of solar radiance based on spot-measurement at 9:30 am ( $\blacklozenge$ ) is also shown (insert). The daily insolation ( $Q_s$ ) based on the spot-measurement was  $3983 \mu\text{mol m}^{-2} \text{day}^{-1}$ .

### 3.3. Soil pH and Available Phosphorus

Soil pH in mata densa, capoeira, Terra Preta de Índio, and baixio were 3.80, 3.25, 4.00, and 4.90, respectively (Fig. 5). Soil pH in capoeira was significantly lower and that in baixio was significantly higher than that in the other locations ( $p < 0.05$ ).

Soil available P in mata densa, capoeira, Terra Preta de Índio, and baixio were 5.72, 5.35, 8.39, and 3.33  $\text{mg kg}^{-1}$ , respectively (Fig. 5). Soil available P in Terra Preta de Índio was significantly higher than that in capoeira and baixio ( $p < 0.05$ ).

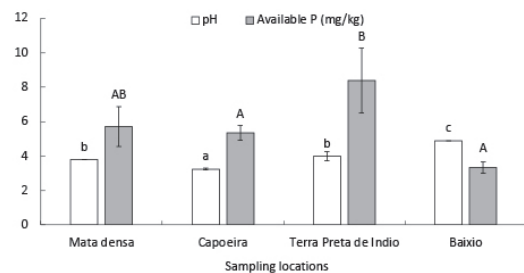


Fig. 5. Soil pH and available phosphorus of 4 sampling locations. The same letters represent no significant differences among different sampling locations for pH (lowercase) and available P (uppercase) (one-way ANOVA, Tukey–Kramer,  $p < 0.05$ ).

### 3.4. Environmental Parameters Across Two Rivers

The temperature of air and river surface water ranged from 28 to 29 and from 24 to 29, respectively (Fig. 6a). From Negro (st. 1) to Solimões River (st. 4), river surface temperature showed a decreasing trend.

Suspended solid concentration at st. 1, 2, 3 and 4 were  $1.8 \pm 1.2$ ,  $22.6 \pm 3.1$ ,  $89.8 \pm 10.1$ ,  $111.4 \pm 11.2 \text{ g-DW L}^{-1}$ , respectively (Fig. 6b), and the values at St. 3 and 4 in Solimões River were significantly higher than

that of st. 3 and 4 in Negro River (one-way ANOVA, Tukey–Kramer,  $p < 0.05$ ). River water pH at st. 1, 2, 3 and 4 were  $5.0 \pm 0.0$ ,  $6.5 \pm 0.1$ ,  $7.1 \pm 0.1$ ,  $7.1 \pm 0.2$ , respectively (Fig. 6c), and the value at St. 1 in the center of Negro River was significantly lower than that of other three sites (one-way ANOVA, Tukey–Kramer,  $p < 0.05$ ).

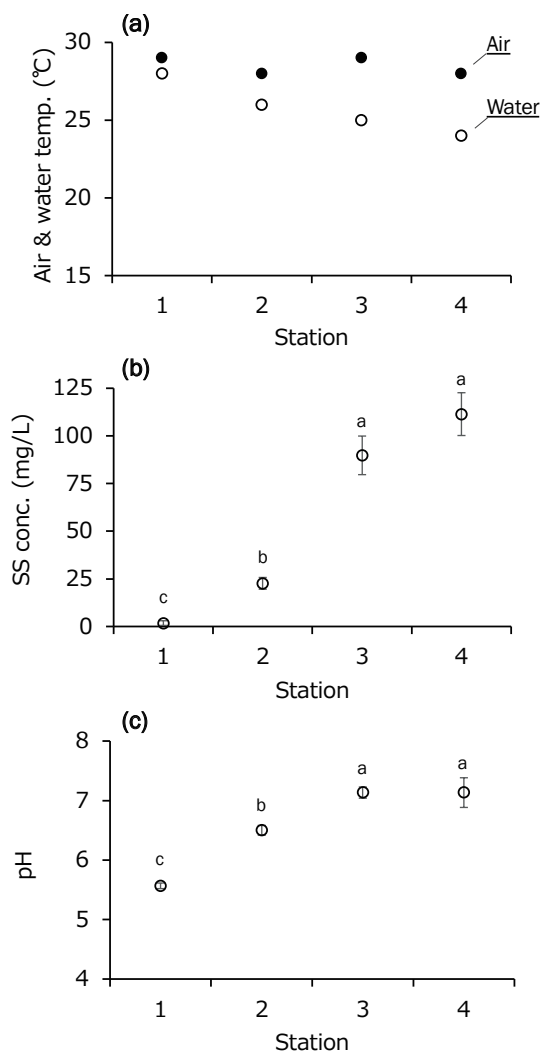


Fig. 6. Spatial variations in (a) air and surface water temperature, (b) suspended solid concentration, and (c) pH at the center (St. 1) of the Negro River, the confluence (St. 2 & 3), and the center (St. 4) of the Solimões River. Error bars show standard deviations (N=3). Letters above plots indicate significant differences (one-way ANOVA, Tukey–Kramer,  $p < 0.05$ ).

The relatively higher abundance ( $393.9 \text{ inds. m}^{-3}$ ) of mesozooplankton was observed at st. 2 than at other sites, while the lower abundance ( $7.1 \text{ inds. m}^{-3}$ ) was found at st. 4 (Fig. 7a). Cladocerans were dominant, contributing with 28.3–58.0% to the total mesozooplankton abundance at all sites except for st. 4 (Fig. 7b). Copepods were appeared from all sites and contributed 17.2–38.7% of the total abundance.

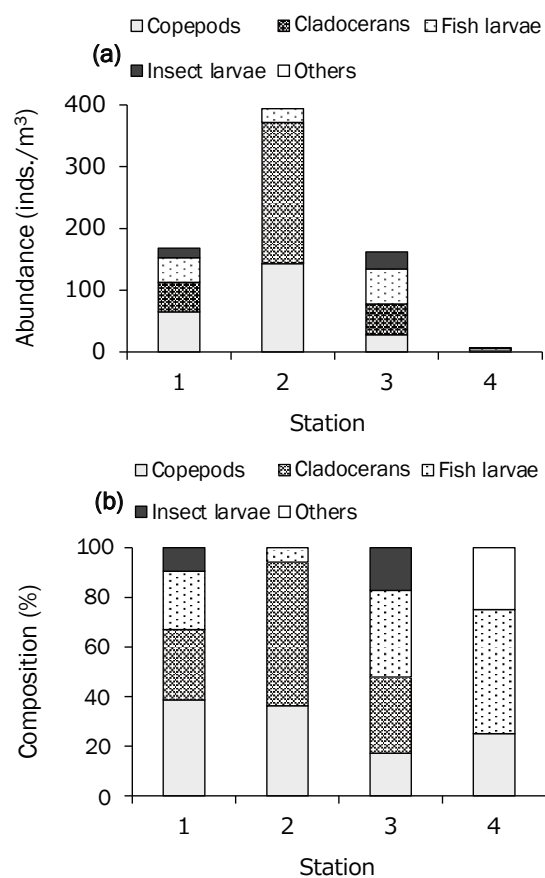


Fig. 7. Spatial variations in (a) abundance and (b) composition of mesozooplankton at the center (St. 1) of the Negro River, the confluence (St. 2 & 3), and the center (St. 4) of the Solimões River.

## 4. DISCUSSION

### 4.1. Light measurements

The daily and annual average (climatology) of solar

irradiance in Manaus, Brazil is  $\sim 460 \text{ W m}^{-2}$  and  $\sim 1680 \text{ kW m}^{-2}$  (Pinker & Laszlo 1992). During the two days of measurements in the forest and river the weather was overcast with rapidly changing cloud conditions and occasional rainfall limiting our measurement capabilities. Although measurements were not under clear-sky conditions, we were able to capture the difference between under the canopy, along the trail/canopy and under open, direct-sky (Fig.3). The results suggest that the vegetation (and soil) during the present study under the canopy and along trails receives less than half of the available solar radiation during the day. However, previous studies have shown solar irradiance above the canopy to be around 70 – 100 times higher than within the canopy that can have a significant impact on the total carbon uptake of new growth versus old growth of the forest (Saleska et al. 2003). In the future, it would be advisable for researchers at ISA to consistently measure solar radiation in conjunction with ongoing tree growth experiments towards evaluating the potential carbon dioxide sequestration potential and contribution of the regional rainforest.

Measurements of natural downwelling quanta attenuation across the Amazonian river (Fig. 1) were extremely interesting due to the significant discrepancy between the Rio Negro (low TSM) and Rio Solimões (high TSM). The 1% light (quanta) penetration depth (cm) in the Rio Negro and Rio Solimões were 58 cm and 17 cm (Fig. 4), respectively. Previous studies of light attenuation in the Amazon River showed similar 1% penetration depth reaching less than 1 m depth in the Rio Solimões (Costa et al. 2013). Further, Costa et al. (2013) reported that both rivers had relatively low concentrations of chlorophyll *a* pigments, while TSM was significantly higher in Rio Solimões and colored dissolved organic matter absorption was significantly higher in Rio Negro, respectively. In the future, it would be interesting to

measure the inherent optical water properties (in addition to light measurements) in the river.

#### 4.1. Forest Soil

Soil in the tropical forest including Amazonian forest is generally very acidic, thus soil pH can be as low as 4.0-4.5 (McGrath et al. 2001), which corresponded with soil pH of the upland forest sampling locations in this workshop (mata densa, capoeira, and Terra Preta de Índio). A slightly higher soil pH in Terra Preta de Índio than other upland forest was probably due to the presence of IBE (Glaser and Birk 2012) which was remaining carbonized materials from living and agricultural activities of ancient human settlement. A significantly higher soil pH in baixio was probably due to redox fluctuation caused by seasonal flooding by formation of dissolved ferrous sulfate during reduction, and oxidation of the ferrous sulfate to ferric oxide and sulfuric acid at the soil surface followed by drainage of the acid floodwater (van Breemen 1987).

Soil available P is usually very low in the tropical forest because P is fixed by aluminum (Al)- and/or iron (Fe)-oxide minerals in soil. Available (Mehlich-1 extractable) P in the upland forest sampling locations in this workshop was in similar ranges found in literature (McGrath et al. 2001). Noteworthy was higher available P in Terra Preta de Índio probably caused by the presence of IBE (Glaser and Birk 2012). Even slightly higher soil pH can cause dissolution of Al- and Fe-oxide minerals releasing P to soil.

It appears that soil sampling and analyses of soil pH and available P were properly performed because the standard deviation of both data were very low, particularly soil pH. Since analysis of soil available P was done using P packtest, which was qualitatively measured by

blue-color development using chart, the standard deviation of soil available P was relatively high, however still in an acceptable range. Nevertheless, the most important was that both soil pH and available P data showed differences by sampling locations, which is relatively in accordance with hypotheses.

### 4.3. Aquatic Environment

The Amazon River is the largest and most dense river network in the world and discharges continental water to the oceans, which is 20% of the total global amount (Sioli 1984). In the center of the Amazon basin, the muddy white water of the Solimões River meets with the black water of the Negro River, creating a visible boundary. The black water of the Negro River is derived from the high concentration of humic substances, while the white water of the Amazon River is derived from highly suspended inorganic materials (Junk et al. 2015). These characteristics of each river probably made clear differences in pH and SS concentration among the study site in the present study. Surface water temperature in Negro River was relatively higher than Solimões River in the present study, which is congruent with previous research reporting higher temperatures by 1°C and 0.6°C in the Negro River (Franzinelli 2011, Nakajima et al. 2017). The warmer water in the Negro River may result from its darker color and slower current speed compared to the Solimões River (Franzinelli 2011). In the present study, mesozooplankton was more abundant in the Negro River and the confluence than in the Solimões River, which is congruent with a previous report by Nakajima et al. (2017). The plankton net used in the present study was not strictly designed for the ichthyoplankton collection (usually a net with a larger mouth and mesh opening is used). Therefore, attention should be given to the fact that our data may have underestimated the abundance of fish larvae.

### 4.4. Environmental Education

Researchers and educators have identified several educational contexts that empowered future scientists (students) towards achieving sustainable development goals (SDGs) (Acevedo-Duque et al. 2023). Although the acquisition of scientific knowledge remains the primary fuel empowering students to contribute to environmental sustainability efforts, hands-on practical experience remains the most efficient source of inspiring participation (Sigahi & Sznelwar 2023). Although the focus of the present study was to share hands-on practical field experience to IFAM undergraduate students and ISA researchers, we were able to receive valuable (select) feedback from the participants as follows,

“The Workshop was an incredible experience in all aspects. First, the interdisciplinary partnership of IFAM, Soka U. and ISA, added new knowledge to the students that attended. The workshop was satisfactory regarding the schedule of the collaboration. I am proud for being selected to the first edition of this event, and grateful for all commitments of the teachers and staff involved for the success.” Mr. Bruno da Costa Takaki, IFAM (Student)

“I acquired a lot of knowledge regarding the methods that were used in the environmental analyses, new methods and with simple and efficient equipment, which is necessary when doing a research in the Amazon rainforest interior, for example. Thus, environmental education is present in all the developed activities, showing the importance of maintaining the quality of our terrestrial, aquatic, and atmospheric environment. The teachers are always dialoguing about social and ecological values, with approaches towards the conservation of the environment, a perspective that we must have in order to keep our biodiversity alive and healthy. But, this only depends on us and the knowledge we have.” Ana Beatriz



Souza dos Santos, IFAM (Student)

“Brazil, despite being a country with a large amount of cultures, offers few opportunities to interact with people of other ethnicities. In more than seven years of academic life, I have not had any opportunity to participate in events that encourage us to speak in a foreign language. The Workshop made this unprecedented experience possible for me. Besides making me feel great joy for the student’s happiness.” Mr. Rodrigo Izumi, ISA (Graduate Student)

The overall feedback was helpful in determining the next steps to take in continuing the next workshop planned for FY2023. Further, the international collaboration showed that in-person exchange, particularly after the global pandemic, coupled with environmental education could open the doors for multi-lateral research collaborations beyond student-centered learning activities. Indeed, the most inspiring aspect of the international exchange was the interest in some of the students (and instructors) to pursue graduate school and/or a profession in environmental science. These comments from the workshop participants suggests that the students gained valuable hands-on practical experience that inspired them to contribute to sustainable development goals in the future.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Special thanks go to all staffs who helped for preparation and execution of the workshop from IFAM including Prof. Elson Antonio Sadalla Pinto, Prof. Márcio Quara de Carvalho Santos, Prof. Lais Alves da Gama, Prof. Flavia Camila Schimpl, Prof. Rodrigo de Souza Amaral, Prof. Andre Wilson Archer Pinto Salgado, and Prof. Jaqueline Araújo Bezerra, and ISA including Milton Fujiyoshi, Jean Dinelly, Dulce de

Moraes, Vanderlei Sonoda, Iris Andrade, Carla Osawa, Pablo Caina, Talita Oliveira, and Roziane Queiroz de Castro.

This workshop was funded by International Joint Research Grant of Faculty of Science and Engineering at Soka University.

#### REFERENCES

- Acevedo-Duque Á, Jiménez-Bucarey C, Prado-Sabido T, Fernández-Mantilla MM, Merino-Flores I, Izquierdo-Marín SS, Valle-Palomino N (2023) Education for Sustainable Development: Challenges for Postgraduate Programmes. *Int J Environ Res Public Health* 20: 1759.
- Costa MPF, Novo EMLM, Telmer KH (2013) Spatial and temporal variability of light attenuation in large rivers of the Amazon. *Hydrobiologia* 702: 171–190.
- Franzinelli E (2011) Morphological characteristics of the Negro and Solimões rivers confluence. *Rev Bras Geoc* 41: 587–596.
- Glaser B, Birk JJ (2012) State of the scientific knowledge on properties and genesis of Anthropogenic Dark Earths in Central Amazonia (terra preta de Índio). *Geochim Cosmochim Acta* 82: 39–51.
- Johnsen S (2012) *The Optics of Life, A Biologist’s Guide to Light in Nature*. Princeton University Press, New Jersey, 336 pp.
- Junk WJ, Wittmann F, Schöngart J, Piedade MT (2015) A classification of the major habitats of Amazonian black-water river floodplains and a comparison with their white-water counterparts. *Wetl Ecol Manag* 23: 677–693.
- Kirk JTO (2011) *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*, 3rd Edition. Cambridge University Press, Cambridge, 649 pp.
- McGrath DA, Duryea ML, Cropper WP (2001) Soil

- phosphorus availability and fine root proliferation in Amazonian agroforests 6 years following forest conversion. *Agr Ecosyst Environ* 83: 271–284.
- Mehlich A (1953) Determination of P, Ca, Mg, K, Na, and NH<sub>4</sub>. Raleigh, North Carolina, 8 pp.
- Monteith JL, Unsworth MH (2013) *Principles of Environmental Physics* (4th ed). Elsevier Academic Press, Amsterdam, 401 pp.
- Nakajima R, Rimachi EV, Santos-Silva EN, Calixto LS, Leite RG, Khen A, Yamane T, Mazeroll AI, Inuma JC, Utsumi YK et al. (2017) The density and biomass of mesozooplankton and ichthyoplankton in the Negro and the Amazon Rivers during the rainy season: the ecological importance of the confluence boundary. *PeerJ* 5: e3308.
- Peres CA, Gardner TA, Barlow J, Zuanon J, Michalski F, Lees AC, Vieira ICG, Moreira FMS, Feeley KJ (2010) Biodiversity conservation in human-modified Amazonian forest landscapes. *Biol Conserv* 143: 2314–2327.
- Pinker RT, Laszlo I (1992) Interannual variability of solar irradiance over the Amazon basin including the 1982–83 El Niño year. *J Climate* 5: 1305–1315.
- Saleska SR, Miller SD, Matross DM, Goulden ML, Wofsy SC, da Rocha HR, de Camargo PB, Crill P, Daube BC, de Freitas HC et al. (2003) Carbon in Amazon forests: unexpected seasonal fluxes and disturbance-induced losses. *Science* 302: 1554–1557.
- Sigahi TFAC. and Szelwar LI (2023) From isolated actions to systemic transformations: Exploring innovative initiatives on engineering education for sustainable development in Brazil. *J Clean Prod* 384: 135659.
- Sioli H (1984) “The Amazon and its main affluents: hydrography, morphology of the river courses, and river types.” *The Amazon: limnology and landscape-Ecology of a Mighty Tropical River and its Basin* (ed Sioli H). Springer, Dordrecht, Berlin, pp. 127–165.
- van Breemen N (1987) Effects of redox processes on soil acidity. *Neth J Agr Sci* 35: 271–279.

## 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 Commun 11: 1748. (著者が8人のみの場合)
- 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)

2023年6月26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3号（2023年6月）目次

### ◆ 総説

- 海産浮遊性カイアシ類の大量培養  
高山佳樹 ..... 1

### ◆ 原著論文

- TiO<sub>2</sub>光触媒を用いたプラスチックフィルム分解における  
プラスチックの種類と光触媒濃度の影響  
山口真奈未、成田唯人、西健斗、松山達、井田旬一 ..... 20

- メタン発酵-紅色光合成細菌共存系による模擬養鶏屠殺場廃水  
処理性能の評価  
秋月真一、藤原正明 ..... 29

- 温帯沿岸域相模湾における植物プランクトンのサイズ組成と光吸収係数の特徴  
矢野光一、下出信次、Victor S. Kuwahara ..... 39

### ◆ 短報

- Surface nutrient regime and bottom hypoxia in Manila Bay  
during the southwest monsoon  
Ken Furuya, Mari Yasuda and Valeriano M. Borja ..... 47

### ◆ 報告

- Practical science and environmental education workshop in Manaus, Brazil  
Shinjiro Sato et al. .... 51