

炭酸ガス通気海水を用いたコペポーダ除去法の開発

野口浩介・野田進治

The Development of a Method for Removing Copepods by Sea Water aerated with Carbon Dioxide

Kohsuke NOGUCHI and Shinji NODA

Our sea cucumber seed production way is to metamorphose swimming larvae of sea cucumber *Apostichopus japonica* to juveniles on corrugated plates with adhesion diatoms, so that the juveniles can eat the diatoms. However, it was a problem that copepods *Tigriopus japonicus* multiplied on the plates and made the adhesion diatoms deteriorate seriously. That required the development of a method for removing the copepods by using the sea water aerated with carbon dioxide. The results of experiments in vitro showed 30 minute-immersion in the aerated sea water of below pH5.2 removed copepods from the plate with adhesion diatoms and killed the juveniles on it. Those in vivo showed the immersion in aerated sea water removed copepods and that copepods multiplied again in about 10 days after getting back the plates because of pouring sea water including copepods. Setting a 10 micrometer-cartridge type filter on the water filler was evidently able to delay the multiplication of copepods for about 25 days.

キーワード：マナマコ種苗生産，炭酸ガス，コペポーダ，付着珪藻

佐賀県栽培漁業センター（現、佐賀県玄海水産振興センター）では、マナマコの種苗生産技術開発において付着珪藻を繁茂させた塩化ビニール製波板（以下、付着珪藻板とする）を使用して浮遊幼生を稚ナマコへ変態させ、さらに稚ナマコの初期餌料として、付着珪藻を利用する生産方式（採苗方式）を開発し、体長約10mmの稚ナマコを量産規模で飼育することができるようになった¹⁾。この飼育開発にあたり、カイアシ類（以下、コペポーダとする）が大量に増殖し、マナマコの初期餌料である付着珪藻の被食や凋落するといった問題が生じた。このコペポーダについては、小林・石田²⁾は稚ナマコの減耗要因の一つとして食害生物と指摘し、対策としてDEP乳剤を使用した駆除法を検討していた。そこで、付着珪藻を繁殖、維持を行うため、異なる水温での処理時間や濃度等、また稚ナマコに対する毒性についてより詳細に検討し、採苗方式での駆除法を確立した¹⁾。

その後、各県でのマナマコ種苗生産において、これを使用したコペポーダの駆除が行われたが、薬事法の改正（平成18年度）により、ナマコ、ウニ、アワビ等の種苗生産において、薬品の使用が一切禁止され、現状に対応した新技術の開発が急務となっている。

中牟田³⁾は炭酸ガスを通気した海水（以下、炭酸ガス通気海水とする）を用いて、コペポーダ（抱卵個体）を除去する方法を開発した。そこで、本研究では炭酸ガス通気海水が、コペポーダ（ノープリウス期幼生およびコペポダイト期幼生含む）、稚ナマコおよび付着珪藻の活動に与える影響をより詳細に調査し、ナマコ種苗量産規模での、炭酸ガス通気海水を使用したコペポーダ除去効果の検討を行い、新たな知見を得たので、報告する。

材料および方法

1. 炭酸ガス通気海水の作製

炭酸ガス通気海水の作製では、海水中の炭酸ガス濃度と pH には一定の関係があることが知られており、炭酸ガス濃度が高いほど、海水中の pH は低下する。中牟田³⁾は pH5.2以下の炭酸ガス通気海水にコペポータを浸漬することで、コペポータ除去効果があると報告している。そこで、まず pH5.2以下の炭酸ガス通気海水を作製する条件（通気量、水温条件）について検討した。なお、pH、水温などのデータはハンディメーター（556MPS、ワイエスアイ・ナノテック(株)）で測定した。

2. 炭酸ガス通気海水によるコペポータへの影響試験

試験に用いたコペポータは、ナマコ種苗生産時に使用する付着珪藻板1枚（40×32cm）から海水シャワーで離脱させ、ナイロンプランクトンネット（目合い50 μ m）で採取した。採取したコペポータは成長段階に応じてノープリウス期（以下、幼生とする）コペポダイト期からアダルト期（以下、成体とする）、卵嚢に区分した。

pH5.0、pH5.2、pH5.5、pH6.0の炭酸ガス通気海水は100L水槽で作製し、幼生、成体を各々50個体ずつ収容した容器（径20mmのガラス管で、底部に50 μ mのナイロンネットを張ったもの）を浸漬し、コペポータに対する影響を観察した。浸漬時間は5分、10分、30分、1時間、2時間、24時間（場合により48時間）とし、所定時間経過後、コペポータを通常海水に戻し、1時間および24時間後に生死を判定した。なお、生死の判定は小林・石田²⁾の方法に準じ、光学顕微鏡下（倍率100倍）で触覚の運動の有無により行った。試験は3例ずつ行い、試験中の水温は18~21℃であった。

3. 炭酸ガス通気海水による稚ナマコへの影響試験

前述したコペポータへの影響試験と同濃度の炭酸ガス通気海水を100L水槽に作製し、試験に用いた。稚ナマコは当センターで種苗生産している変態着底直後の体長0.4mmから10.0mmの個体を供試した。なお、稚ナマコ体長は自然に体を伸ばすまで一定時間放置した後、万能投影機 Nikon V-12BS により計測した。試験区は体長

0.4mm以上1.0mm未満、1.0mm以上3.0mm未満、3.0mm以上5.0mm未満、5.0mm以上10.0mm未満の4段階とし、それぞれ10個体ずつ収容した容器（径500mmのプラスチック容器（300ml）で底部に100 μ mのナイロンネットを張ったもの）を各濃度の炭酸ガス通気海水にそれぞれ浸漬した。浸漬時間は30分、1時間、2時間、4時間、24時間とし、所定時間経過後、稚ナマコを通常海水に戻した。生死判定は1時間および24時間後に光学顕微鏡下（倍率40倍）で行った。なお、生死判定時（1時間後）に管足を伸ばしている稚ナマコをダメージなし個体、管足が縮んだままの稚ナマコをダメージあり個体とした。試験は3例ずつ行った。試験中の水温は18~21℃であった。

4. 炭酸ガス通気海水による付着珪藻への影響試験

当センター水槽の付着珪藻板に繁茂している数種の付着珪藻を採取して、直径8cmの平板シャーレ上（底面積約50cm²）（以下平板シャーレとする）で培養した後、その中から *Navicula* 属の付着珪藻を分離培養し、供試した。培養時の栄養塩は藻類培養液 KW21（株第一製網社製）とメタケイ酸ナトリウム（0.045 g/L）を用いた。

試験は pH5.0の炭酸ガス通気海水に24時間浸漬する実験区と浸漬しない対照区を設置した。所定時間経過後、両区とも通常海水に戻し、その後の付着珪藻の増殖を比較した。増殖比較方法は、毎日5日間0.5mm四方（0.25mm²）の付着珪藻数をランダムに10箇所、光学顕微鏡下（倍率×100）で計数した。試験は温度20℃照度1,000Lxの条件下で3例ずつ行った。

5. 量産化規模での炭酸ガス通気海水を用いたコペポータ除去試験

試験は稚ナマコを収容する前の付着珪藻培養中（以下、付着珪藻培養水槽とする）および稚ナマコを飼育している水槽（以下、稚ナマコ飼育水槽とする）で行った。

付着珪藻培養水槽におけるコペポータの除去試験ではFRP角形7 kL水槽に pH5.2の炭酸ガス通気海水を作製し、付着珪藻板フォルダー100セットを収容し、試験を行った。なお、当センターでは、付着珪藻板1枚（40

×32cm)を10枚1セットの付着珪藻板フォルダー（以下フォルダーとする）を使用している。試験区は30分、1時間、2時間浸漬の3区設定し、各々4回ずつ行った。なお、浸漬後は、どの試験区も同様にろ過海水シャワー（50L/分）で洗浄する作業工程を経た。試験開始および終了時にフォルダー1セットを真水で洗浄し、コペポータを50 μ mのナイロンネットで回収した後、計数し、除去率を算出した。

次に稚ナマコ飼育水槽の試験では、稚ナマコを飼育しているコンクリート角形15kL水槽を止水にし、炭酸ガスをpH5.47になるまで通気した。その後、注水と通気を開始した。炭酸ガス通気前と通気後の付着珪藻板上の稚ナマコ、コペポータの状況を観察した。なお、試験時の水温は17.4 $^{\circ}$ Cであった。

6. 量産化規模でのカートリッジ式フィルターを用いたコペポータ除去試験

試験に供した付着珪藻板は、pH5.2の炭酸ガス通気海水に30分浸漬し、コペポータを除去したものを使用した。稚ナマコ飼育試験時には、注水口にカートリッジ式のフィルター（10 μ m）を取り付けた試験区と取り付けしていない対照区を設定し、付着珪藻板上のコペポータ数がフォルダー1セット当たり1,000個体以上になるまでの日数を調べた。なお、稚ナマコ飼育では採苗から3日目まで止水飼育を行い、その後は飼育経過に伴い流量を増加し、最小で0.3回転/日、最大で8回転/日で飼育し、対照区は6水槽、試験区は7水槽で行った。

結 果

1. 炭酸ガス通気海水の作製

pH5.2以下の炭酸ガス通気海水を作製する条件は、水温19.2 $^{\circ}$ C下では、100Lの海水がpH5.0（炭酸ガス濃度約300ppm）まで低下する時間は、通気量5L/分では約17分、10L/分では約10分、20L/分では約6分であった（図1）。また、通気量を10L/分とした条件下で水温別にpH5.0に低下する時間を調べたところ、図2に示すように水温が高いほど長い時間を要した。

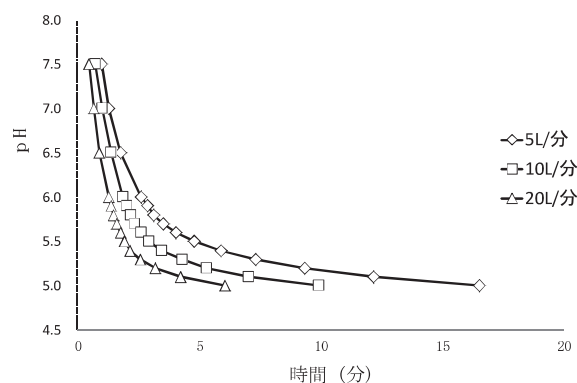


図1 異なる炭酸ガス通気量における海水のpH低下の推移
水温19.2 $^{\circ}$ C, 水槽容量100L.

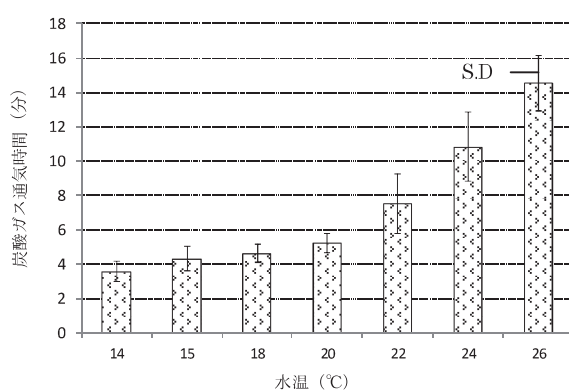


図2 海水pH5.0に達するまでの水温と炭酸ガス通気時間との関係
通気量10L/分, 水槽容量100L.

2. 炭酸ガス通気海水によるコペポータへの影響試験

炭酸ガス通気海水がシオダマリミジンコのノープリウス期およびコペポダイト期、アダルト期に与える影響を表1に示した。その結果、ノープリウス期幼生、コペポダイト期幼生、アダルト期ともに、pH5.0では30分、pH5.2では1時間浸漬で100%斃死することが判明した。しかしながら、pH6.0では、48時間浸漬しても40%以上が生残する結果となった。

3. 炭酸ガス通気海水による稚ナマコへの影響試験

炭酸ガス通気海水が、稚ナマコへ与える影響試験の結果について表2に示した。pH5.2以下の海水に、1時間浸漬では稚ナマコの斃死はなかったが、2時間浸漬では斃死個体がみえ始め、4時間浸漬では斃死個体が増加し、全滅する試験区もみられた。また、斃死はないもの

の、通常海水に戻した1時間後でも稚ナマコの管足が縮まったままの個体が観察された。

4. 炭酸ガス通気海水による附着珪藻への影響試験

炭酸ガス通気海水が附着珪藻に与える影響試験の結果について図3に示した。附着珪藻の細胞数は試験開始時に 1×10^4 cells/cm² であったが、3日目には対照区で 8×10^4 cells/cm² になったのに対して、pH5.0、24h 浸漬した試験区では 12×10^4 cells/cm² となり、有意に増殖効果がみられた ($p < 0.05$)。

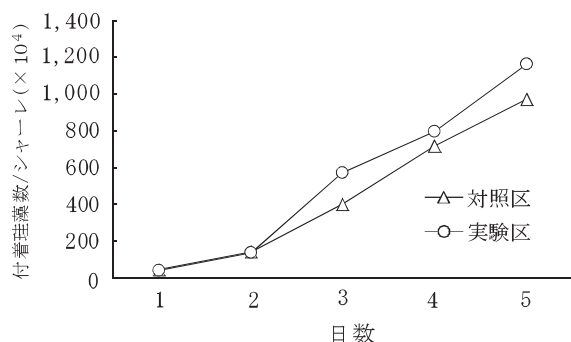


図3 炭酸ガス通気海水による附着珪藻 (*Navicula* 属) の増殖

5. 量産化規模での炭酸ガス通気海水を用いたコペポータ除去試験

量産化規模である FRP 角形 7 kL 水槽での炭酸ガス通気海水によるコペポータ除去試験結果を表3に示した。30分、1時間、2時間浸漬のいずれの試験区においても、コペポータ数は約200,000個体/フォルダーから約200個体/フォルダーまで減少し、除去率は99.9%以上となった。なお、2時間浸漬区では、除去率が100%となった区もみられた。

次に実際に稚ナマコを飼育しているコンクリート角形15kL水槽に炭酸ガスを pH5.47になるまで通気したところ、附着珪藻板上のコペポータの除去率は約90%であった。しかし、通常飼育に戻した10日後には再び附着珪藻板上にコペポータの増殖が確認された。稚ナマコに関しては附着珪藻板上から落下している個体も観察されたが、3日後には附着珪藻板上に附着しているのが確認された。

6. 量産化規模でのカートリッジ式フィルターを用いたコペポータ除去試験

附着珪藻板上のコペポータ数がフォルダー1セット当たり1,000個体以上になる日数について調査した結果を表4に示した。注水口にカートリッジ式のフィルターを取り付けていない対照区では、7~12日目(平均10日目、6例)であったのに対し、試験区では15~27日(平均25日目、7例)と発生が遅くなったことを確認した。

考 察

本研究で pH5.2以下の炭酸ガス通気海水に浸漬することで、コペポータではおよそ30分で100%斃死することが判明したが、炭酸ガスの効果については、海洋生物に及ぼす影響など多くの研究が報告されている。杉本・田中⁴⁾はアワビ稚貝への麻酔効果の検討とともに、炭酸ガスによる麻酔は pH が低下することによるものでないと報告している。渡辺ら⁵⁾は中深層プランクトンに対する二酸化炭素の急性影響実験を行い、二酸化炭素濃度の上昇とコペポータ類の生存数には負の相関関係がみられたが、pHの低下によるものではないと報告している。これらのことから、本研究の炭酸ガス通気海水によるコペポータ除去効果は pH の低下によるものではないことが示唆される。

また、白山・ソントン⁶⁾は、空気に200ppmのCO₂を添加して、マナマコと同じ棘皮動物のバフィンウニ (*Hemicentrosus pulcherrimus*)、ナガウニ (*Echinometra mathaei*) および軟体動物のマガキガイ (*Strombus luhuanus*) を6ヶ月間飼育した結果、成長が阻害されたと報告し、喜田⁷⁾は、炭酸カルシウムの殻及び骨格をもつ生物(マナマコを含む)が炭酸ガスに暴露された場合、殻及び骨格が形成しにくくなると報告している。本研究においても、稚ナマコを濃度が高い炭酸ガス通気海水に浸漬することにより大きな影響を受ける結果となり、稚ナマコを飼育している水槽では、炭酸ガスを使用しない方が好ましいことが判明した。

本研究では採苗前の稚ナマコが水槽内に存在しない状況下で附着珪藻板上にコペポータが大量に発生した場合、炭酸ガス通気海水を利用することで量産規模の水槽においても、除去率99.9%以上となり、この附着珪藻板

を採苗に用いれば、コペポーダが存在しない状態で稚ナマコ飼育が可能と考えられた。

しかし、付着珪藻板上のコペポーダを除去し、稚ナマコを収容し飼育を開始後10日目頃には、再びコペポーダが大量発生し、稚ナマコの大量減耗を生じていた。これまで筆者は、稚ナマコ飼育時に発生するコペポーダは、元々付着珪藻板に増殖しているものと考えていたが、炭酸ガス通気海水による駆除を行っても、10日ほどで増殖してくることから、他の要因が疑われた。そこで、注水している海水を調査したところ、約3.1Lに1個体の割合でコペポーダ（幼生含む）が侵入していた。稚ナマコ飼育水槽（15kL）の注水量は最大8回転/日であることから、多いときは1日当たり38,000個体のコペポーダが侵入していることが判明した。そこで、今回の除去試験で採苗後の稚ナマコ飼育水槽の注水口にカートリッジ式のフィルターを設置したところ、物理的にコペポーダを除去でき、コペポーダの発生を約25日目まで遅延することが可能であった。

コペポーダの稚ナマコへの影響については、筆者ら⁸⁾が体長3mm以上に成長した稚ナマコはコペポーダによる影響がなくなること、また、コペポーダの密度を低く保つことで斃死軽減に繋がることを報告しており、今後は、ナマコ種苗生産をより安定的に生産するために、コペポーダ発生をより遅延させるためのフィルターの改良や、その他の侵入経路の探索、また稚ナマコの成長を促す配合飼料の開発や循環ポンプによるコペポーダの捕獲方法⁹⁾等を組み合わせることで、コペポーダによる減耗を防除する方法を検討していきたい。

また、今回はナマコでの実験を行ったが、同様に付着珪藻を用いて飼育しているウニアワビへの活用も可能であると考えられる。

謝 辞

本報告は（独）水産総合研究センター、新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業、乾燥ナマコ輸出のための計画的生産技術の開発（平成19-21年）として研究しました。ここに深謝致します。

文 献

- 1) 伊藤史郎（1995）：マナマコの人工大量生産技術の開発に関する研究. 佐裁セ研報, **4**, 1-87.
- 2) 小林 信・石田雅俊（1984）：稚ナマコの減耗要因に関する二・三の実験. 栽培技研, **13**(1), 41-48.
- 3) 中牟田弘典（2008）：炭酸ガスを用いたアワビ類付着珪藻板飼育時のカイアシ類の除去方法. 栽培技研, **35**(2), 15-19.
- 4) 杉本元彦・田中彌太郎（1982）：炭酸ガス麻酔によるアワビ稚貝の剥離について. Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture, **3**, 37-44.
- 5) 渡辺雄二・石田 洋・山口 篤・石坂丞二（2001）：中層プランクトンへのCO₂の影響. 月間海洋, **33**, 813-818.
- 6) 白山義久・ソントン久代（2001）：ベントスに対するCO₂の影響. 月間海洋, **33**, 791-796.
- 7) 喜田 潤（2008）：二酸化炭素による海洋の酸性化. 第20回海洋工学シンポジウム.
- 8) 野口浩介・野田進治（2011）：ナマコ種苗生産時に出現するコペポーダの影響について. 水産技術, **3**(2), 131-135.
- 9) 酒井勇一・近田靖子（2008）：マナマコ人工種苗の食害防除技術について. 北水試だより, **76**, 8-14.

表1 炭酸ガスによるコペポーダへの影響

	成体	幼生	成体	幼生	成体	幼生	成体	幼生	成体	幼生	成体	幼生	成体	幼生
浸漬時間	5分		10分		30分		1時間		2時間		24時間		48時間	
pH5.0	○	×	○	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	-	-
pH5.2	△	×	△	×	○	○	◎	◎	○	◎	◎	◎	-	-
pH5.5	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	○	△	-	-
pH6.0	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	△	△

成体：コペボダイト期幼生～成体、幼生：ノープリウス期幼生 ◎：死亡率100%、○：死亡率91～99%、△：死亡率50～90%、×：死亡率50%未満、-：無試験。成体50匹、幼生50匹ずつ供試し、3例ずつ試験した平均値を用いて算出した。

表2 炭酸ガスによる稚ナマコへの影響

サイズ (mm)	0.4~1	1~3	3~5	5~10	0.4~1	1~3	3~5	5~10	0.4~1	1~3	3~5	5~10	0.4~1	1~3	3~5	5~10	0.4~1	1~3	3~5	5~10
浸漬時間	30分				1時間				2時間				4時間				24時間			
pH5.0	○	○	○	○	○	○	○	○	◎	◎	◎	◎	△	◎	△	△	×	×	×	×
pH5.2	○	○	○	○	○	○	○	○	●	◎	◎	◎	×	◎	◎	◎	×	◎	×	×
pH5.5	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●	●
pH6.0	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

◎：生残率100%，○：生残率90～99%，●：生残率50～89%，△：生残率50%未満，×：生残率0%

◎：生存しているが、半数以上の稚ナマコが管足を動かさない状態（ダメージあり）を示す。

※稚ナマコは5匹ずつ供試し，3例ずつ試験した平均値を用いて算出した。

表3 炭酸ガス通気海水によるコペポータ除去効果

炭酸ガス通気海水の 浸漬時間（時間）	付着珪藻板1セット当たりの コペポータ数（個体数）*1	浸漬後のコペポータ数 （個体数）*1	コペポータ除去率（%）*1
0.5	233,000	321	99.86
1.0	189,000	176	99.91
2.0	212,000	13	99.99

*1：値は全て4例の平均値を示す。

表4 カートリッジ式フィルターによるコペポータの発生の遅延効果

	対照区	試験区
コペポータ発生日時（日目）*1	7～12	15～27
平均日数（日目）	10	25
水槽数	6	7

*1：採苗した日を0日目とした。