

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

高山佳樹<sup>1)\*</sup>、平原南萌<sup>2a)</sup>、戸田龍樹<sup>1,2)</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

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

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

Yoshiki Takayama<sup>1)\*</sup>, Minamo Hirahara<sup>2a)</sup>, and Tatsuki Toda<sup>1,2)</sup>

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

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

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

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

2022 年 4 月 29 日受付, 2022 年 5 月 16 日受理

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

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

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

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

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

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

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

## 1. はじめに

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

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

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

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

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

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

カイアシ類培養の実用化において、非生物餌料は生物餌料と比較して入手の安定性や使用の利便性において有利である。先行研究によって、浮遊性カイアシ類の生物餌料の代替として養魚用人工餌料、醤油粕、微細藻類ペースト（*Thalassiosira weissflogii*, *Isochrysis* sp.）、冷凍微細藻類ペースト（*Tetraselmis* sp., *Nannochloropsis* sp.）を *Sinocalanus tenellus*, *Pseudodiaptomus inopinus*, *Acartia clausi*（現在の分類で *Acartia hudsonica* もしくは *Acartia omorii*）、*Acartia sinjiensis*, *Parvocalanus crassirostris* の餌料として検討されたが卵生産性や生存率が極めて低かったことが報告されている（Uye 2005, Alajmi & Zeng 2015）。そこで本研究では、水産養殖分野で一般的に利用されている微細藻類種を用いた。また、先行研究によって単一餌料藻類よりも複数種の微細藻類からなる混合餌料を給餌することでカイアシ類の卵生産速度が向上することが知られており、これは餌料を混合することで十分な栄養素が補われるためだと解釈されている（Li et al. 2008, Pan et al. 2014, Alajmi & Zeng 2015）。そこで本研究では、単一餌料藻類の餌料価値を評価した後に、混合餌料による検討を行った。本稿では、*A. steueri* 培養における好適な餌料藻類を検討するため、異なる微細藻類種を餌料とした際のノープリウス幼生の成体期までの生存率を測定した。

## 2. 材料および方法

### 2.1. 微細藻類餌料

水産餌料として一般的に用いられており、細胞サイズ、

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

## 2.2. 動物プランクトン試料と培養海水の採集

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ノープリウス期における生存率(%)は以下の(1)式で算出した。

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

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

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

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

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

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

### 3. 結果

#### 3.1. ウェルプレートを用いた1回目の実験

(2019年4月採集個体)

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

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

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

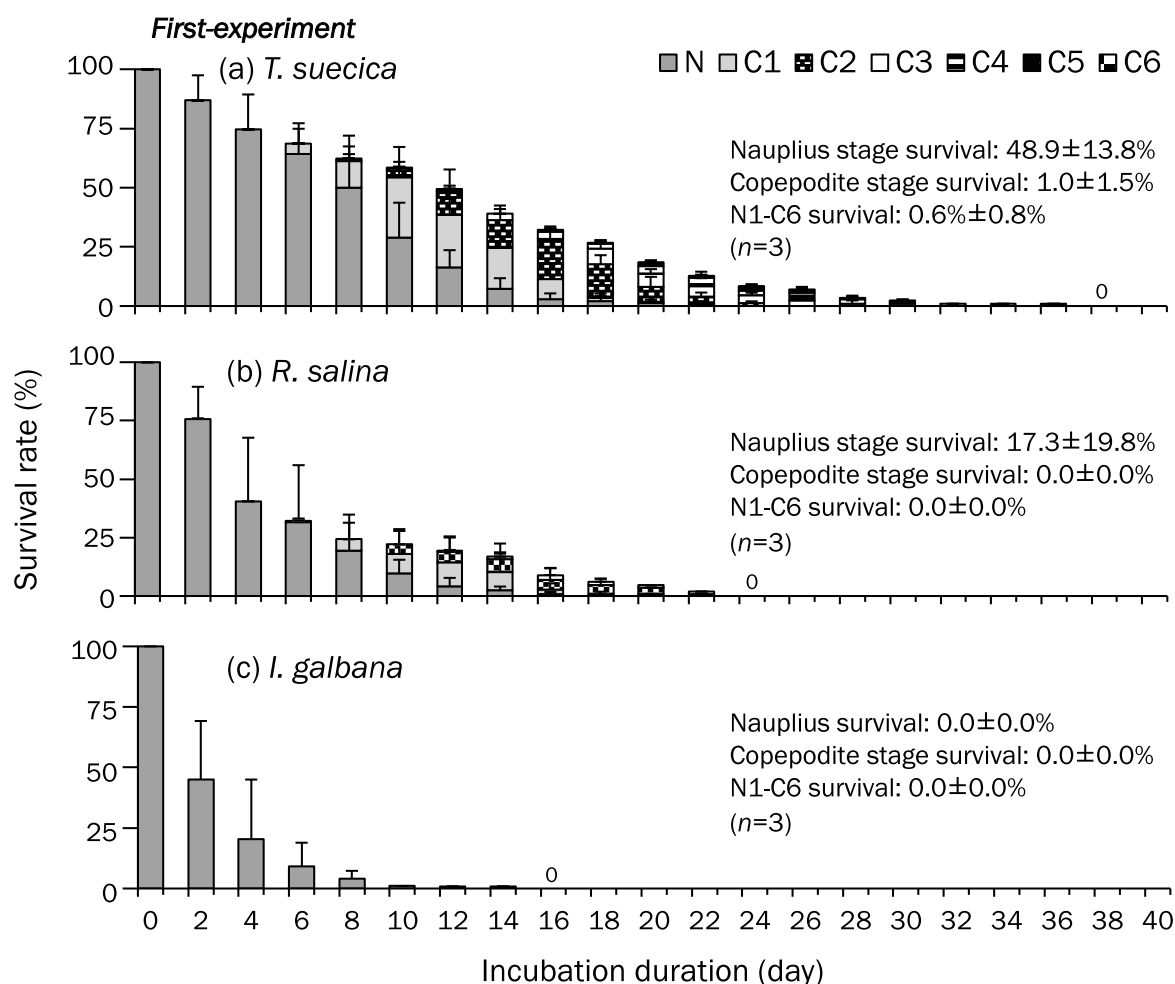


Figure 1. Temporal variations in survival rate and development of *Acartia steueri* fed with (a) *Tetraselmis suecica*, (b) *Rhodomonas salina*, and (c) *Isocrysis galbana* in the first-experiment using plastic well-plates as incubation containers. Bar graph colors represent development stage of the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

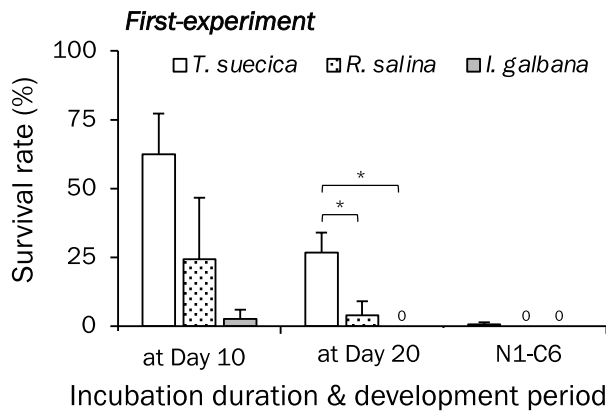


Figure 2. Survival rate of *Acartia steueri* fed with *Tetraselmis suecica*, *Rhodomonas salina* and *Isocrysis galbana*, in the first-experiment using plastic well plates as incubation containers. Bar graph colors represent each microalgal diet treatment. Survival rate of N1-C6 indicates the percentage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

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

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

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

### 3.2. ビーカーを用いた2回目の実験

#### (2020年4月採集体)

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

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

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

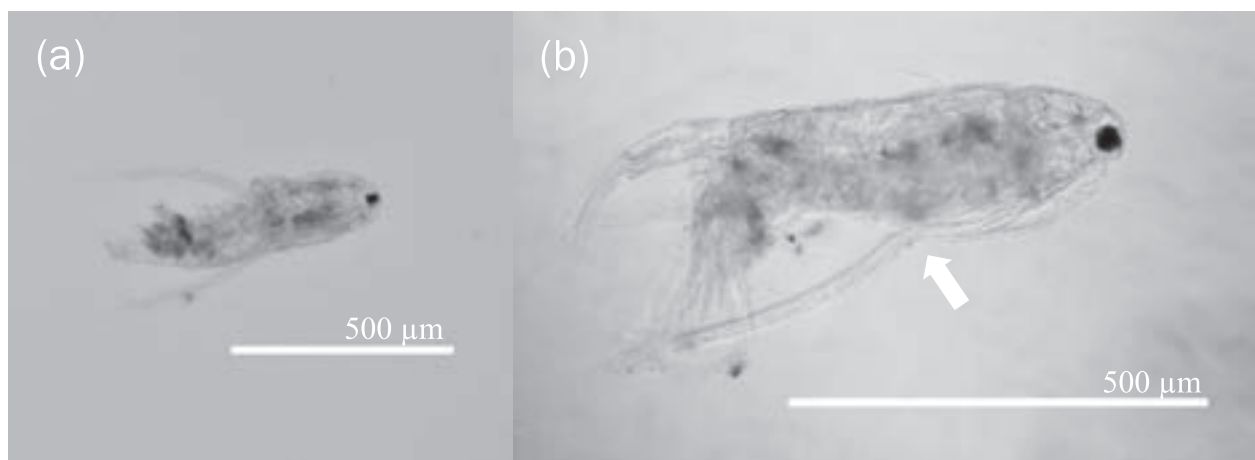


Figure 3. Images of malformation observed at first antennas of *Acartia steueri* copepodid fed with *Tetraselmis suecica*, in (a) dorsal view; (b) lateral view. An arrow in the right image indicates a broken point of right first antenna.

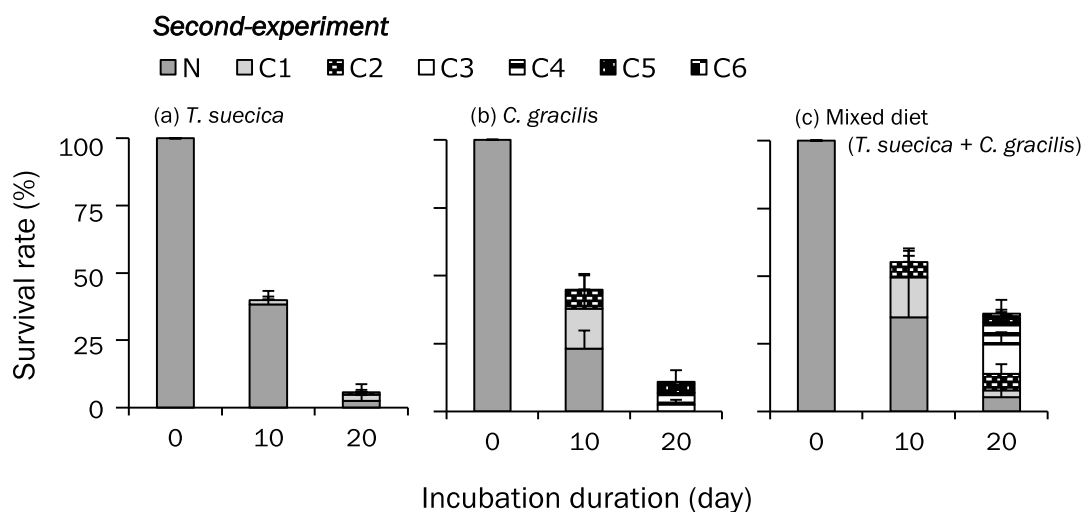


Figure 4. Temporal variations in survival rate and development of *Acartia steueri* fed with (a) *Tetraselmis suecica*, (b) *Chaetoceros gracilis*, and (c) Mixed diet (*T. suecica* + *C. gracilis*) in the second-experiment using glass beakers. Bar graph colors represent development stage of the copepods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

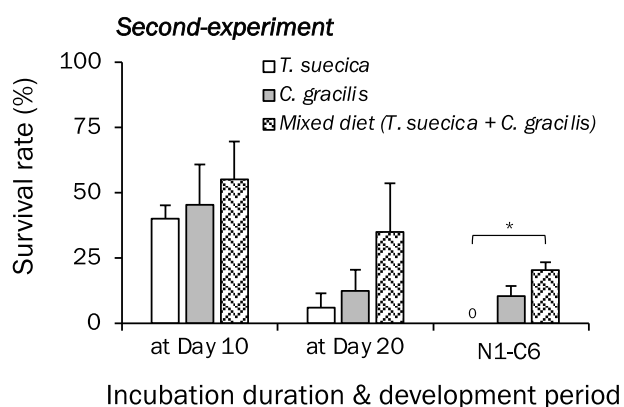


Figure 5. Survival rate of *Acartia steueri* fed with *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros gracilis*, and the mixed diet (*T. suecica* + *C. gracilis*) in the second-experiment using glass beakers as incubation containers. Bar graph colors represent each microalgal diet treatment. Survival rate of N1-C6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

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

#### 4. 考察

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



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

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

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

餌料に含まれるドコサヘキサエン酸 (DHA) はノー

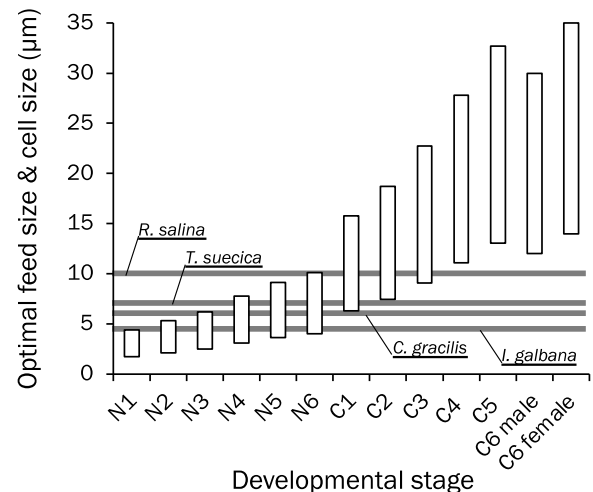


Figure 6. Range of optimal feed size that maximize ingestion rate in each development stage of *Acartia steueri*, and cell size of microalgae used as diets for the copepod in the present study. The range of optimal feed size (white bar) were estimated based on optimal feed size to body length ratio of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

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

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

## 謝辞

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

## 引用文献

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

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

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