

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

高山佳樹^{1)*}、山本翼²⁾、戸田龍樹¹⁾

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

2) 株式会社ワールドインテック R&D 事業部 〒530-0001 大阪府大阪市北区梅田 1-1-3-500

Experimental cultivation of the egg-carrying copepod *Oithona oculata* in a pilot bioreactor

Yoshiki Takayama^{1)*}, Tsubasa Yamamoto²⁾ and Tatsuki Toda¹⁾

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

2) WORLD INTEC CO., LTD., 1-1-3-500 Kita Ward, Umeda, Osaka 530-0001, Japan

* Corresponding author: ytakayama@soka.gr.jp

2021年4月1日受付, 2021年5月11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 live feed, their use is still limited owing to low productivity and cost-efficiency when mass cultured.

Copepods can be divided into free-spawner and sac-spawner (egg-carrying) according to their spawning style. In cultivation of egg-carrying copepod, a simple nauplii collection/harvesting method with low labor has not been established, because females carry the egg-sac until hatching. Manual collection of nauplii using a siphon hose and mesh-filters is a common method in copepod cultivation, but automation is necessary to reduce labor costs if copepods are to be viably cultured at a commercial scale. Recently, we devised a zooplankton bioreactor for rapid separation of free-spawner copepod eggs from adults in a tank. The automation collects eggs on a mesh filter in a water flow system which can also function as water exchange device. In the present study, we apply this bioreactor to egg-carrying copepod, and report the results from cultivation at laboratory-scale for 45 days.

Species of *Oithona* are good candidates for live feed because their body size and biochemical composition are suitable for many marine fish larvae which have small gapes. *Oithona oculata* is widely distributed and a typical dominant species in coastal waters, and was chosen as target species of egg-carrying copepod in present study. 150 adult individuals of *O. oculata* were placed into a culture chamber which were immersed in a reproduction tank containing 3 L seawater. The culture chamber to retain the copepods has a 100- μ m nylon mesh placed 5 mm above the

bottom, while allowing passage of nauplii. The copepods were fed daily with a sufficient amount of *Thalassiosira weissflogii* and *Isochrysis galbana* and incubated at 28°C for 45 days. Produced nauplii in the reproduction tank were collected daily using water flow of 1.5 L min⁻¹. The species abundance in each development, ovigerous rate and collected number of nauplii were measured daily.

In the semi-continuous culture, the collected nauplii were cultured in maturation vessels and returned to the production tank after their maturation, and 45 days cultivation (four generations) was achieved. Total abundance was gradually increased from day 4 to day 20 and reached at 500 inds. L⁻¹. Ovigerous rate varied from 0 to 88% during the incubation period. The maximum number of collected nauplii was 380 nauplii L⁻¹ at day 5. The results obtained in present study suggest that the bioreactor can also be applied to egg-carrying copepod by optimization of the mesh size and the water flow velocity.

Keywords: sac-spawner, cannibalism, ovigerous rate, aquaculture

1. はじめに

カイアシ類は海洋において多くの仔稚魚の重要な餌資源であり、ときにその胃内容物の80%を占めることが知られている (Mauchline 1998)。カイアシ類はエイコサペンタエン酸 (EPA)・ドコサヘキサエン酸 (DHA) などの脂肪酸やカロテノイド色素を多く含有し、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実験が度々なされ、カイアシ類を給餌した仔稚魚はワムシやアルテミアといった生物餌料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, Toledo et al. 1999, Rajkumar & Vasagam 2006, Wilcox et al. 2006, Barroso et al. 2013)。このような背景から沿岸域や汽水池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、収量が季節や海況によって変動し、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仔稚魚培養槽へ混入するといった欠点がある (萩原 2014)。このような背景から、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渴望されているが、ワムシといった既存生物餌料の培養と比べてその生産性は低く (Molejón & Alvarez-Lajonchère 2003)、未だ実利用には至っていない。

カイアシ類の集約的培養では、培養槽内で生産、成長した成体や幼生が収穫され魚類の餌料として利用されるが、一部は継代培養されることで培養系は連続的に維持される。そのため対象とする仔稚魚の口径にあったサイズを示す個体の選択的収穫や継代用に特定の発達段階の個体を選択的に回収する技術が不可欠である。*Acartia* 属に代表される自由放卵型 (Free-spawner) の種においては槽内に沈殿した卵をサイフォンホースを用いて選択的に回収する方法が確立されており、回収卵を保管・孵化させたのちに魚類餌料や培養槽の立ち上げ用の播種個体として利用するプロセスが提案されている (Støttrup et al. 1986, Marcus & Wilcox 2007, Drillet et al. 2011, Santhosh et al. 2018)。一方、*Pseudodiaptomus* 属 (Calanoida) や *Oithona* 属 (Cyclopoida)、*Tisbe* 属 (Harpacticoida) といった様々な分類群から構成される抱卵型 (egg-carrying) の種は卵が孵化するまで雌成体が卵嚢を保持するため卵の状態での回収が困難である。そのため培養槽内の全海水を排水

し、手作業で槽外に設置した目合いの異なる2種類のメッシュへ通過させることで成体とノープリウス幼生を分離する手法が一般的であり、その煩雑さに難点が残る (Santhosh et al. 2018)。カイアシ類の集約的な培養の実用化に向けては、生産性の向上に加えて、培養の簡便さや低労力化が欠かせないが、特に抱卵型ではその分離・回収法の簡便化が喫緊の課題である。

Oithona 属は世界中の河口域から沿岸域において優占する小型の浮遊性カイアシ類であり (Paffenhöfer 1993)、幅広い温度、塩分耐性を有するとされている (Santhosh et al. 2018)。本属のノープリウス幼生の体幅は 60 μm 程度と小さく、仔稚魚の口径が小さなハタ科やフエダイ科といった魚種の餌料としての利用が可能である。*Oithona oculata* Farran は高密度での培養が達成されたことから大量培養の候補種として期待され (Molejón & Alvarez-Lajonchère 2003)、本研究の試料採集場所である相模湾真鶴港では通年を通して出現し、冬季から春季を除いて高い個体密度で出現する優占種である (Natori 2018)。

近年、培養槽内にメッシュを設置することで低労力に卵の分離・回収を行うバイオリアクターが提案され、自由放卵型カイアシ類 *Acartia steueri* Smirnov の培養においてその有用性が示された (高山 2020)。本稿では自由放卵型の卵の分離・回収用に開発された本バイオリアクターを抱卵型カイアシ類へ応用し、半連続培養を行った結果を報告する。加えて、抱卵型カイアシ類のノープリウス幼生の選択的分離・回収を達成するために実施した分離メッシュの目合い並びに分離に用いた水流の流速検討の結果も併せて報告する。

2. 材料および方法

2-1. カイアシ類試料の採集

本研究で用いた動物プランクトン試料は 2018 年 11 月から 2019 年 11 月に相模湾真鶴港 (35°09'49"N, 139°10'33"E) において、目合い 180 μm のプランクトンネット (口径 30cm, 長さ 100 cm) を用いて採集し

た。また、各実験で使用した海水には同港において表層海水をバケツで採水し、粒子保持能 0.7 μm のグラスファイバーフィルター (Whatman, GF/F) で濾過したものを使用した。採集した動物プランクトン試料は直ちに実験室に持ち帰り、実体顕微鏡下 (WILD M10, Leica) で形態学的特徴をもとに *O. oculata* 成体を同定・選別し (千原・村野 1997)、各実験前に 24 時間の馴致培養を行った。本研究におけるすべての馴致培養及び実験での水温と餌料密度は、本種の卵嚢生産速度が最大となる水温 28°C (Ambler et al. 1999)、餌料密度 2×10^6 cells mL⁻¹ (Molejón & Alvarez-Lajonchère 2003) とし、餌料には Molejón & Alvarez-Lajonchère (2003) によって推奨された *Isochrysis galbana* Parke と *Thalassiosira weissflogii* Grunow の混合餌料 (細胞数比 1:1) を用いた。両餌料藻類は f/2 培地にて水温 20°C、24 時間光照射条件で培養した。

2-2. バイオリアクター

本研究で用いた培養システムは成体を培養する沈殿槽型の生産槽(3 L)と、生産槽から分離・回収されたノープリウス幼生が一時的に集積する回収器、そして継代用のノープリウス幼生を成体まで培養する成熟槽からなり、生産槽は高山 (2020) によって開発されたものを本研究へ流用した (Fig. 1)。生産槽の内にはプラスチック筒が設置され、筒底部にはノープリウス幼生のみが通過でき、成体が通過できない目合いのナイロンメッシュが備わっており、筒内で成体を培養する。回収器内の海水を水中ポンプ (CompactOn 300 pump, EHEIM GmbH & Co KG, Germany) で生産槽上部へ流し、生産槽下部のコックを開放することで生産槽と回収器内の海水を循環し、生産槽内のノープリウス幼生は生産槽上部から下部へ流れる水流によって、回収器に設置したプラスチック筒に運ばれる。このプラスチック筒底部には、ノープリウス幼生が通過しない目合い 20 μm のナイロンメッシュが張っており、低労力で生産槽内のノープリウス幼生を分離・回収することが可能である。本研究では生産槽内に設置した分離用メッシュの目合

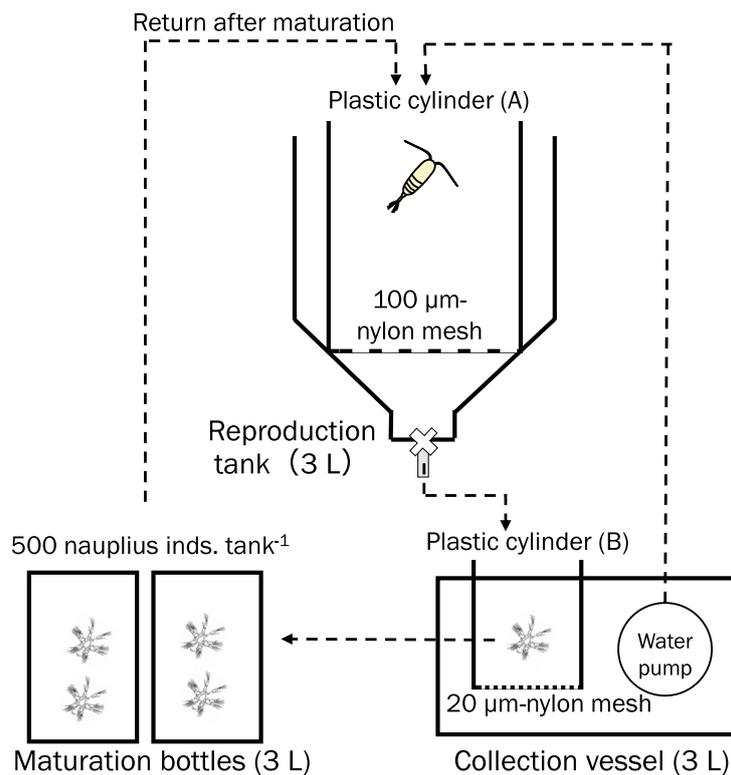


Figure 1. A reproduction tank (3 L) for incubation of adults copepods, a collection vessel (3 L) for collection of nauplii and maturation vessels for rearing nauplius used for semi-continuous culture of *Oithona oculata* in the present study. A reproduction tank has a plastic cylinder (A) with a 100 μm -nylon mesh at the bottom, which retains adult copepods and allows passage of nauplii. A collection vessel has a plastic cylinder (B) with a 20 μm -nylon mesh at the bottom, which retains nauplii. Sea water run from a collection vessel into a reproduction tank by a water pump, and from a reproduction tank into a collection vessel by gravity. Collected nauplii were reared in maturation vessels. Matured adults were returned from maturation vessels to a reproduction tank.

い、並びに水流の流速の検討を行った後に培養実験を実施した。

2-3. 分離用メッシュの目合い及び水流の流速の検討

成体が通過しない目合いを検討するため、4種類の目合いの異なるナイロンメッシュ (50、100、150、200 μm) を片面に張ったアクリル筒を 200 mL ビーカー内に設置し、筒内に *O. oculata* 成体 30 個体を収容後、暗所で 6 時間培養した後にナイロンメッシュを通過した個体数を計数した。

ノープリウス幼生の分離に用いる水流の適当な流速を検討するため、異なる流速条件における分離効率と

ノープリウス幼生の死亡率を測定した。目合い 100 μm のナイロンメッシュを備えた生産槽内に 50 個体のノープリウス幼生を収容し、ホースを用いて生産槽上部から異なる流速で濾過海水を流し、回収器へ輸送された個体と死亡個体を 3 分毎に 1 時間計数した。水流の流速は、生産槽における水理学的滞留時間がそれぞれ 3 分、2.5 分、2 分となる 1.0 L min^{-1} 、 1.2 L min^{-1} 、 1.5 L min^{-1} の 3 条件とした。

2-4. 半連続培養

現場より採集した *O. oculata* 成体 150 個体を生産槽へ播種し、45 日間の運転を行った。水温は 28℃、

明暗周期は12時間毎、餌料には *I. galbana* と *T. weissflogii* の混合餌料を選定し、十分量 (2×10^6 cells mL⁻¹; Molejón & Alvarez-Lajonchère 2003) を海水の循環後に与え、ガラス管を用いて槽内下部から通気による弱い攪拌を行うことで餌料の沈殿を防いだ。生産槽のメッシュの目合いは100 μm、ノープリウス幼生回収時に生産槽上部から流す水流の流速は1.5 L min⁻¹ とし、一日に一回生産槽と回収器内の海水を1時間循環することで生産槽内のノープリウス幼生を回収、計数した。なお、培養期間中に生産槽内のメッシュに顕著な目詰まりが見られたため培養20日目に生産槽内のメッシュの交換を行った。回収したノープリウス幼生は500個体ごとに3Lプラスチックボトル内で培養し、成熟後に生産槽へ返送した。返送頻度は約3日に1度、16日目から20日目までは成体個体密度を増加させるため毎日返送を行った。返送された成体個体数は成体期までの生存率に依存し、返送された成体個体数は最大で232個体、最小で35個体、平均で 142.3 ± 66.7 個体であった。

測定項目は水温、塩分、餌料藻類密度、ノープリウス幼生回収個体数、生産槽内の各成長段階の個体密度とし、水温は棒状水温計、塩分は屈折式塩分計 (S-10, Atago) を用いて計測し、餌料密度は光学顕微鏡 (OPTISHOT-2, Nikon) 下で血球計算盤を用いて計数し求めた。カイアシ類の発達段階毎の個体数は、生産槽内部を駒込ピペットで優しく攪拌した後に、槽上部から試水300 mLをビーカーで採取し、試水内の発達段階毎並びに卵嚢を有した雌成体の個体を実体顕微鏡下で計数することで求めた。なお、計数後の個体は直ちに培養槽へ戻した。この操作を5回繰り返し生産槽内の個体密度を推定した。ノープリウス幼生の生産数 (nauplii L⁻¹) は以下の式により算出した。

$$NP = F \times OR \times SS \times HS \quad (1)$$

F は雌成体の個体密度 (inds. L⁻¹)、 OR は雌成体における卵嚢を持つ個体の割合 (%)、 SS は卵嚢サイズ

(eggs egg-sac⁻¹)、 HS は孵化率 (%) を示す。卵嚢サイズと孵化率は半連続培養実験中の測定が困難であるため、以下の方法で求めた値を使用した。卵嚢サイズは半連続培養と同様の条件で培養した雌個体を5%中性ホルマリン海水で固定し、実体顕微鏡下にてタングステン針を用いて卵嚢を解剖することで卵数を計数した。孵化率は Ambler et al. (1999) の方法に従い、稀に観察される雌成体から自然離脱した卵嚢を集め、培養することで孵化率を測定した。

3. 結果

実験に用いた目合い50、100、140、200 μmのメッシュの内、目合い50、100 μmではメッシュを通過した個体は皆無であった (Fig. 2)。目合い140 μmでは $2.2 \pm 3.8\%$ 、目合い200 μmでは $15.6 \pm 5.1\%$ の個体がナイロンメッシュを通過した。

ノープリウス幼生の回収効率率は回収時間の経過とともに増加し、いずれの流速条件でも回収開始から1時間後には飽和した (Fig. 3)。回収開始から1時間後の

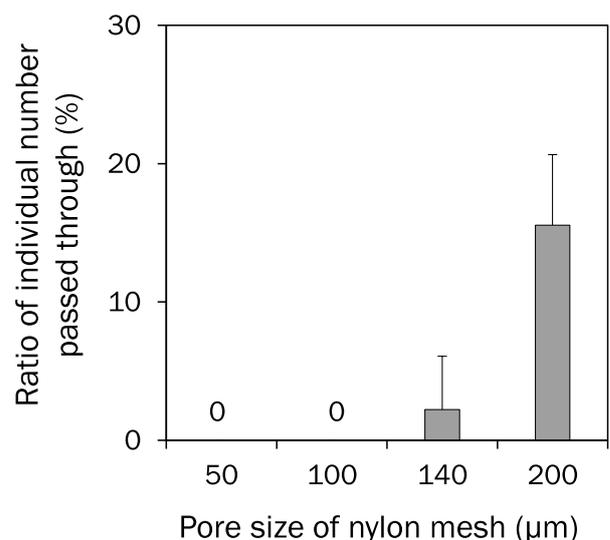


Figure 2. The ratio of individual number of adult female *Oithona oculata* passed through different pore size of nylon mesh for 6 hours at 28°C under dark condition. Error bars indicate standard deviations ($n=3$).

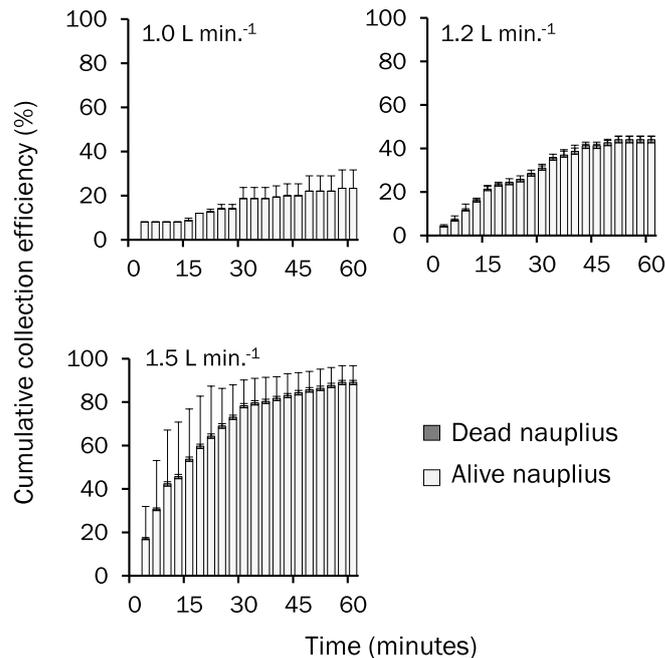


Figure 3. Cumulative collection efficiency of *Oithona oculata* nauplii reared in a reproduction tank (3 L) under three different flow rates as follows; 1.0, 1.2 and 1.5 L minutes⁻¹. White and gray bars indicate the alive and dead nauplius, respectively. Error bars indicate standard deviations ($n=3$).

ノープリウス幼生の回収効率は、1.5 L min⁻¹ の条件で 89.0% と他流速条件と比べ有意に高い値を示した (one-way ANOVA, Tukey-Kramer, $p<0.01$)。回収開始から 1 時間後の死亡個体の割合は流速 1.0 L min⁻¹ 条件で 0.0%、1.2 L min⁻¹ の条件で $4.0 \pm 2.8\%$ 、1.5 L min⁻¹ の条件では $2.0 \pm 2.0\%$ であり、統計的な有意差は認められなかった。

半連続培養における生産槽内の水温、塩分は培養期間を通しておおよそ一定の値を示した (Fig. 4A, B)。餌料藻類の細胞密度は培養初期から培養後期にかけて上昇する傾向を示した (Fig. 4C)。総個体密度は最小で $44.0 \text{ inds. L}^{-1}$ (4 日目)、最大で $508.3 \text{ inds. L}^{-1}$ (10 日目) を示し、培養期間中大きく変動した (Fig. 5)。雌成体の個体密度は培養 19 日目に $182.6 \text{ inds. L}^{-1}$ と最大値を示した後に減少し、培養最終日まで増減を繰り返した。雌成体の内、卵嚢を有した雌成体の割合を示す携卵率は、0.0% (45 日目) から 87.9% (7 日目) の間で変動し、平均で $44.2 \pm 20.9\%$ であった (Fig. 6)。回収されたノープリウス幼生数は培養 5 日目に $381.0 \text{ inds. L}^{-1}$ と最大値を

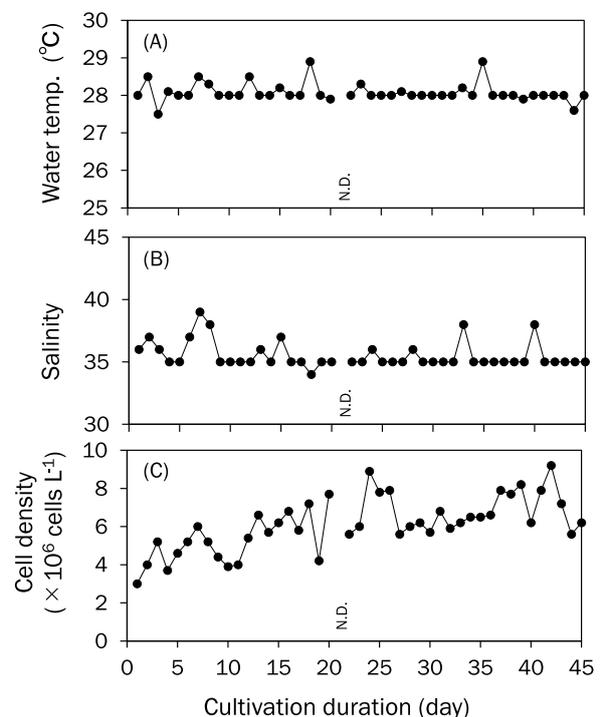


Figure 4. Temporal variations of water temperature, salinity and cell concentration of microalgae in a reproduction tank in semi-continuous culture for 45 days. Cell concentration is the sum of concentrations of *Isochrysis galbana* and *Tharassiosira weissflogii*.

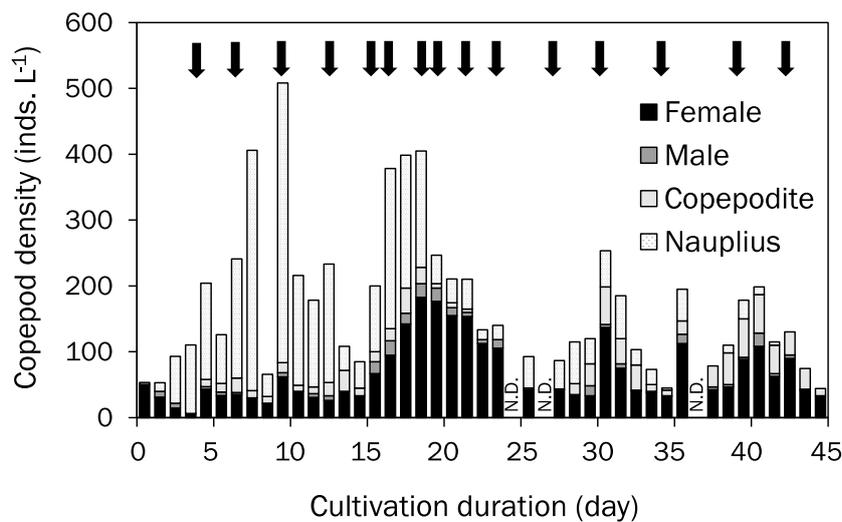


Figure 5. Temporal variations of density in different growth stage of *Oithona oculata* in semi-continuous culture for 45 days using a reproduction tank. The arrows indicate the date of return of matured adults from maturation vessels.

示し、その後培養最終日まで緩やかに減少を続けた (Fig. 7)。推定されたノープリウス幼生の生産数は培養中期にかけて増加し、培養 31 日目に 1523.0 nauplii L^{-1} と最大値を示し、培養期間中の平均値は 450.0 ± 384.2 nauplii L^{-1} であった (Fig. 7)。培養期間中に推定されたノープリウス幼生生産数と回収されたノープリウス幼生数の関係について回帰分析を行った結果、回帰式 ($y = 0.106x, y$; 回収されたノープリウス幼生数 (nauplii L^{-1}), x ; 推定されたノープリウス生産数 (nauplii L^{-1}): $r^2=0.3676$) を得た ($p<0.01$, Fig. 8)。

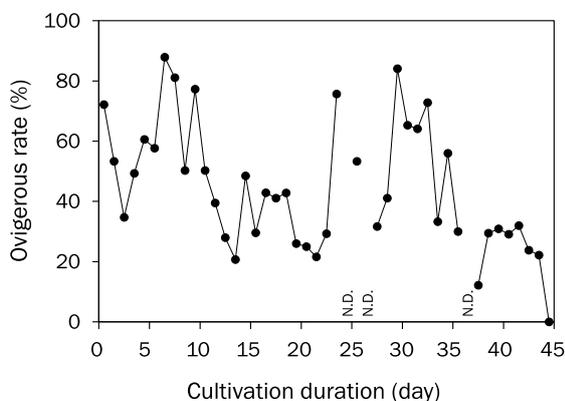


Figure 6. Temporal variation of ovigerous rate of *Oithona oculata* female in semi-continuous culture for 45 days.

4. 考 察

ナイロン製のプランクトンネットを用いた動物プランクトンの採集においては網目の伸長や生物体の圧縮により網目の大きさよりも体サイズが大きなカイアシ類でも網目を通過することが古くから知られている (Vannucci 1968, 上田 1993)。本研究においても $140 \mu m$ と

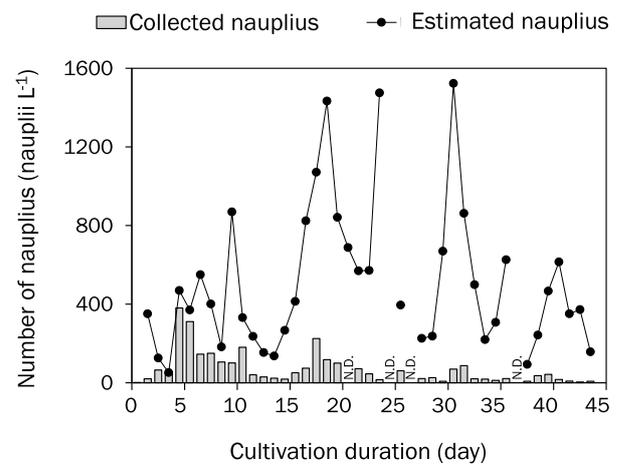


Figure 7. Temporal variations of nauplius number collected and estimated in semi-continuous culture of *Oithona oculata* for 45 days using a reproduction tank.

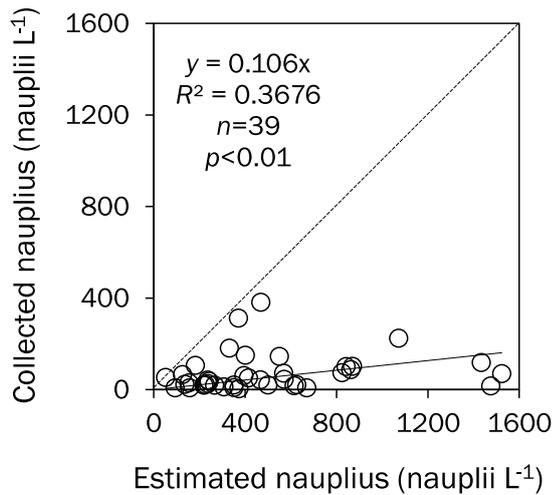


Figure 8. Relationship between estimated number of total produced nauplii and number of collected nauplii. The dotted line in the figure represents a 1:1 relationship.

Oithona oculata 成体の体幅 ($234 \pm 9.8 \mu\text{m}$) よりも小さな目合いのメッシュであっても個体の通過が観察された。100 μm の目合いのメッシュでは成体が通過しなかったことから、本種の成体を槽内に留めるためには成体の体幅の40%程度の目合いを選択する必要があることが示唆された。成体と卵・ノープリウス幼生の分離には自由放卵型の *Acartia tonsa* Dana、*A. tsuensis* Ito Tak、*A. steuerei* においては体幅の45–60% (Toledo et al. 2005, Drillet et al. 2015, Sarkisian et al. 2019, 高山 2020)、抱卵型の *Gladioferens imparipes* Thomson (Payne & Rippingale 2001) においては50%の目合いのメッシュが使用されている。そのため、およそ体幅の半分程度がこれら浮遊性種成体を保持する目合いの目安となると考えられるが、対象種の形態等の差異によって最適な目合いも変化すると予測されるため、対象種ごとに目合いの検討実施が推奨される。

ナイロンメッシュと水流を用いたノープリウス幼生の分離において、ノープリウス幼生の積算死亡率は全条件通して0–4%程度であったことから、本研究で検討した流速条件の範囲では流速によるノープリウス幼生の死亡は考慮する必要がないことが明らかとなった。培養槽内の激しい攪拌はカイアシ類の卵生産性や生存

率を低下させることが知られている (Payne & Rippingale 2001)。本研究では検討できなかったより高い流速条件では、更なるノープリウス幼生の回収効率の向上が期待されるが、同時に生産槽内に保持される成体の卵生産や生存率を低下させる可能性がある。今後、更なるノープリウス幼生の回収効率の向上のためには、本研究で検討した流速よりもより高い流速における、ノープリウス幼生の回収効率と生産槽内に保持される成体の卵生産、生残率の関係を明らかにする必要がある。

本研究ではナイロンメッシュと水流を用いることで、抱卵型カイアシ類におけるノープリウス幼生の選択的分離並びに回収技術の確立を試みた。その結果、生産槽内のおよそ90%のノープリウス幼生を水中ポンプを使用することで半自動的に回収することが出来た。また、半連続培養では回収したノープリウス幼生を培養し、成熟後に生産槽に返送することで45日間の運転が行われ4世代の継代が達成された。本研究の半連続培養では生産槽の連続運転中におけるノープリウス幼生の回収効率能を評価するため、生産槽内におけるノープリウス幼生生産数を推定し、回収されたノープリウス幼生数と比較を行った (Fig. 7, 8)。推定されたノープリウス幼生生産数と回収されたノープリウス幼生数は有意な正の相関を示し、推定値に対する回収数の関係から得られた回帰式の傾きは0.1であったことから (Fig. 8)、生産槽内で生産されたノープリウス幼生の10%程度しか回収されなかった可能性が考えられる。半連続培養中における、このような回収効率の顕著な低下の要因として2つの可能性が考えられる。第一に生産槽内に設置したメッシュの目詰まりによるノープリウス幼生の回収効率の低下である。使用後のメッシュにはバイオフィームが形成され、餌料藻類やカイアシ類の遺骸、糞粒等の付着が観察された、長期使用によるメッシュの目詰まりがノープリウス幼生の回収効率低下の一要因かもしれない。但し、培養20日目にメッシュを新たなものに交換したが、培養20日目以降に推定値と回収数の差が縮まる傾向はみられないため (Fig. 7)、メッシュの目詰まりは本事象の主な原因ではない

と考えられる。第2の要因としては成体によるノープリウス幼生の捕食(共食い)である。カイアシ類培養において共食いは収穫量の損失に加え、次期個体群の喪失を招くため培養系へ致命的な影響をあたえると認識されている(Drillet et al. 2014)。肉食性、雑食性を問わず多くの種で共食いをすることが知られており(Hada & Uye 1991, Drillet et al. 2011)、*O. oculata*においてもその存在が確認されているため(高山 未発表)、共食いは本研究における回収効率の顕著な低下の一要因であるかもしれない。本研究と同様の生産槽を用いて自由放卵型の *A. steueri* を培養した際には、卵は沈降によって10分以内に成体から分離されたが生産卵数の15%が共食いによって消費されたと推定されている(高山 2020)。メッシュを生産槽内に設置した場合、自由放卵型の種の場合は被捕食者である卵が捕食者である成体から分離されるまでの時間は卵自体の沈降速度と槽の水深に依存する一方で、抱卵型の種では被捕食者であるノープリウス幼生は水中内を遊泳し捕食者と混在するため、水流を用いた回収操作の頻度に依存する。本研究での回収頻度は1日1回であり、孵化後のノープリウス幼生は最大で24時間共食いの可能性に晒される。従って、1日に複数回の回収操作を行うことで捕食者と被捕食者間の遭遇率を低下させることができると考えられるが、複数回の回収操作が成体の卵生産や生存率へ与える影響や、実用段階では人的労力や電力コストの増加が想定されるため、最適な回数の検討が今後必要である。

謝辞

本研究を行うにあたって、試料採集にご協力いただきました横浜国立大学臨海環境センターの皆様へ感謝申し上げます。本研究の一部はJICA/JST SATREPS-COSMOS プロジェクト<JPMJSA1509>、JSPS 科研費<JP19H03035>による助成を受け実施された。

引用文献

- Ambler JW, Ferrari FD, Fornshell JA, Buskey EJ (1999) Diel cycles of molting, mating, egg sac production and hatching in the swarm forming cyclopoid copepod *Dioithona oculata*. *Plankton Biol Ecol* 46: 120–127.
- 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.
- 千原光雄・村野正昭(編)(1997)日本産海洋プランクトン検索図説. 東海大学出版, 東京, 1574 pp.
- 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, & egg availability. *Aquaculture* 22: 1295–1306.
- 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.
- 荻原篤志(2014)仔魚の餌料生物としての動物プランクトン.“養殖の餌と水一塗の主役たち”(杉田治男編). 恒星社厚生閣, 東京, pp.75–115.
- Hada A, Uye S (1991) Cannibalistic feeding behavior of the brackish water copepod *Sinocalanus tenellus*. *J Plankton Res* 13: 155–166.
- Marcus NH, Wilcox JA (2007) A guide to the meso-scale production of the copepod *Acartia tonsa*. Technical publication - Florida Sea Grant 27.
- 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.
- Natori N (2018) Ecological role of copepod nauplii in the microbial food web in temperate embayment waters. PhD thesis, Soka University, Japan.

- Paffenhöffer GA (1993) On the ecology of marine cyclopoid copepods (Crustacea, Copepoda). *J Plankton Res* 15: 37–55.
- Payne MF, Rippingale RJ (2001) Intensive cultivation of the calanoid copepod *Gladioferens imparipes*. *Aquaculture* 201: 329–342.
- Rajkumar M, Vasagam KP.K (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.
- 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, Kochi, Kerala, India, 144 pp.
- 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.
- 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, 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 (2003) Production and nutritional value of copepods. In: *Live Feeds in Marine Aquaculture* (eds Støttrup JG, Mcevoy LA.). Blackwell Publishing, Oxford, pp. 145–205.
- 高山佳樹 (2020) 海産浮遊性カイアシ類 *Acartia steueri* の集約的培養技術の確立. 創価大学大学院工学研究科学位論文.
- Toledo JD, Golez MS, Doi M, Ohno A (1999) Use of copepod nauplii during early feeding stage of grouper *Epinephelus coioides* larvae. *Fish Sci* 68: 478–483.
- Toledo JD, Golez MS, Ohno A (2005) Studies on the use of copepods in the semi-intensive seed production of grouper *Epinephelus Coiodes*. In: *Copepods in Aquaculture*. (eds Lee CS, O'Bryen PJ, Marcus NH.), Blackwell Publishing, Oxford, pp. 11–24.
- 上田拓史 (1993) 内湾における浮遊性カイアシ類の量的変動に関する研究. 京都大学大学院学位論文.
- Vannucci M (1968) Loss of organisms through the meshes. In: *Zooplankton Sampling*, (eds Tranter DJ, Fraser JH.), The Unesco Press, Paris, pp. 77–86.
- 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.