

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32690

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14902

研究課題名（和文）食品廃棄物を起点とする微生物食物連鎖を利用した海産浮遊性カイアシ類生産技術の開発

研究課題名（英文）Development of marine planktonic copepod production technology using microbial food chain starting from food waste

研究代表者

高山 佳樹 (Takayama, Yoshiki)

創価大学・理工学部 プランクトン工学研究所・助教

研究者番号：00897605

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：単離した繊毛虫 *Euplotes vannus* を、浮遊性カイアシ類 (*Acartia steueri*, *Oithona oculata*, *Pseudodiaptomus nihonkaiensis*) に給餌する実験区、微細藻類を給餌する対象区を設けて飼育実験を行った。*A. steueri* は繊毛虫区において生存率が低下し、卵生産が停止した。*P. nihonkaiensis* は生産された卵数は微細藻類区の半数であった。*O. oculata* は繊毛虫区の生存率は微細藻類区を上回り、卵数は微細藻類区と同程度の値を示した。提案する繊毛虫を餌料として用いるプロセスには *O. oculata* が適すると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今日までは、微細藻類を餌料とした、生食物連鎖を利用したカイアシ類培養のみであったが、本研究では食品廃棄物を起点とした微生物食物連鎖の駆動によってカイアシ類培養を行う全く新たな試みであり、国際的に前例がない（図3）。また、繊毛虫は必須脂肪酸合成能を有することから、繊毛虫を介することによって、合成された必須脂肪酸がカイアシ類へ転送される（Trophic upgrading）。このような自然界での現象を人工環境下での培養へ応用した点に独自性がある。

研究成果の概要（英文）：The isolated ciliate *Euplotes vannus* was fed to planktonic copepods (*Acartia steueri*, *Oithona oculata*, *Pseudodiaptomus nihonkaiensis*). *A. steueri* had a decreased survival rate and stopped egg production in the ciliate food condition. The number of eggs produced by *P. nihonkaiensis* was half that of the microalgae condition. The survival rate of *O. oculata* in the ciliate condition was higher than that in the microalgae condition, and the number of eggs was similar to that in the microalgae condition. It was suggested that *O. oculata* is suitable for the proposed process using ciliates as food.

研究分野：水産増殖学

キーワード：海産浮遊性カイアシ類 繊毛虫 食品廃棄物 プランクトン工学 生物餌料 卵生産

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

海産魚介類の種苗生産には、その初期餌料としてワムシとアルテミアが一般的に用いられる。ワムシとアルテミアの最大の欠点は、栄養価に乏しいことで、オメガ 3 高度不飽和脂肪酸 (n-3HUFA)、特にドコサヘキサエン酸 (DHA) が欠乏しており、DHA の不足による仔稚魚の大量へい死や、異常形態、異常行動が知られている。そのため、ワムシ及びアルテミアを種苗に用いる際には栄養強化 (EPA や DHA の添加) が不可欠である。本邦ではワムシとアルテミアによる種苗生産が確立されており、他の餌料生物の培養技術開発は僅かである。天然域において仔稚魚はカイアシ類を最も多く捕食しており、ワムシやアルテミアよりも栄養豊富なカイアシ類を餌料としたほうが種苗の生残、成長が良くなることが知られている。そのためカイアシ類を初期餌料として用いる試みがなされ、天然海域より採集したカイアシ類を仔稚魚に給餌することで、成長、生残、ストレス耐性、市場価値の向上が報告されているが、浮遊性カイアシ類培養の生産性は既存生物餌料の培養と比較した際には低く、社会実装化は未だ困難とされている。従ってカイアシ類を水産餌料として実利用するには、**生産性の向上、培養に要するコスト削減の両アプローチ**が必要である。

カイアシ類培養において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増加を決定づけるため、多くの研究によって餌料の最適化が試みられてきたが、その餌料候補は微細藻類一辺倒である。しかし、微細藻類培養には曝気や光源に多量のエネルギー、培地試薬を要するため生産コストが高いという課題が存在する。このような背景から、浮遊性カイアシ類の微細藻類餌料の代替として魚用人工餌料、醤油粕、微細藻類ペーストといった非生物餌料が検討されたが餌料効果は得られなかったと報告されている。浮遊性カイアシ類大量培養の有力候補種とされる *Acartia* 属、*Oithona* 属、*Pseudodiaptomus* 属、*Eurytemora* 属は、現場海域では微細藻類に加え、繊毛虫といった微小動物プランクトンをその重要な食物源としている。そして、微細藻類をよりも繊毛虫を摂餌した際にカイアシ類の卵生産が増加したとの報告が数例存在する一方で、卵生産が低下したとの報告もあり、未だ“カイアシ類にとって繊毛虫は好適な餌料なのか?”という問いに対する答えは不明瞭である。海洋における微小動物プランクトンの主要な構成群である繊毛虫類は、バクテリアや小型植物プランクトン、デトライタスを摂餌し、その摂餌量は1日に炭素量で自身の体の24倍にも達し、1日に2~4倍増殖する。経験的に米やトウモロコシの芯などで繊毛虫の培養が可能であることが知られており、食品廃棄物を用いることで繊毛虫を安価に生産し、微細藻類の代替餌料とすることで、カイアシ類培養に要する生産コストを削減出来るかもしれない。

2. 研究の目的

本研究では、食品廃棄物を基質に繊毛虫を生産し、浮遊性カイアシ類の餌料として利用する新規プロセスの確立を目的とする。今日までは、微細藻類を餌料とした、生食食物連鎖を利用したカイアシ類培養のみであったが、本研究では食品廃棄物を起点とした微生物食物連鎖の駆動によってカイアシ類培養を行う全く新たな試みであり、国際的に前例がない。また、繊毛虫は必須脂肪酸合成能を有することから、繊毛虫を介することによって、合成された必須脂肪酸がカイアシ類へ転送される (Trophic upgrading)。このような自然界での現象を人工環境下での培養へ応用した点に独自性がある。

3. 研究の方法

【実験1】繊毛虫の単離・培養

実験1では餌料として用いる繊毛虫を単離した。相模湾真鶴港に設けた定点において、目合い35 μmのプランクトンネットを用いて繊毛虫を採集した。また、ラボで運転を行なっているカイアシ類培養槽内に非意図的に混入し、増殖している繊毛虫も併せて単離した。単離された複数種の繊毛虫を選別し、6ウェルプレート内で培養を行い、良好な増殖が見られた1種を対象に生物顕微鏡下での形態観察を行い、分子系統的に種同定を試みた。

選択された繊毛虫を対象に、米ぬかを基質に、200 mL三角フラスコを使用し通気曝気を行い、水温25°C、塩分35、暗所下で培養を行い、増殖を観察した。良好な増殖が得られたため、実験2で使用した。

【実験2】食品廃棄物を用いた繊毛虫の培養実験

カイアシ類対象種は相模湾に生息する *Acartia steueri*, *Oithona oculata*, *Pseudodiaptomus nihonkaiensis* を対象とし、繊毛虫を摂餌するか事前に確認し、その結果をもとに1~2種を選定し実験に用いる。実験条件は無給餌区(対象区)、繊毛虫餌料区に加えて、比較のために微細藻類餌料区の計3条件とする。本実験に用いる微細藻類は、それぞれのカイアシ類種で良好な生存率・卵生産を示す餌料藻類とし、*A. steueri*には緑藻 *Tetraselmis suecica* を、*O. oculata*にはクリプト藻 *Rhodomonas salina* を、*P. nihonkaiensis*には珪藻 *Thalassiosira weissflogii* を用いた。カイアシ類メス成体を200 mLビーカーに個別に収容し、それぞれ繊毛虫、微細藻類を給餌し10日間の培養を行った。給餌量は炭素量で統一し、毎日十分量を与え、飼育海水は毎日交換した。培養期間中はカイアシ類の生存率、卵生産を毎日測定した。それぞれのカイアシ類雌個体と卵の炭素量を測定し、雌1個体が自身の体重と比較してどの程度の割合の卵を1日に生産しているか示す指標である Specific egg production rate (SEPR) を求め、カイアシ類種間で比べた。

4. 研究成果

【実験1】繊毛虫の単離・培養

相模湾より単離した繊毛虫は、形態学的な特徴から *Euplotes* sp. と同定され、18SrRNA 遺伝子を分子系統解析したところ *Euplotes vannus* と同定された。繊毛虫 *Euplotes vannus* 株の維持条件として、水温と餌料藻類の検討を行った。その結果、水温20度程度が良好な増殖が見られた。また、クリプト藻 *Rhodomonas salina* を給餌した条件で良好な増殖が見られ、これらの条件で2年以上の維持培養を達成した。また、米ぬかを基質に、200 mL三角フラスコを使用し通気曝気を行い、水温25°C、塩分35、暗所下で培養を行い、増殖を観察した。良好な増殖が得られたため、実験2で使用した。

【実験2】食品廃棄物を用いた繊毛虫の培養実験

Acartia steueri, *Oithona oculata*, *Pseudodiaptomus nihonkaiensis* の全てのカイアシ類が繊毛虫を摂餌し、その摂餌量は微細藻類と同等、もしくはそれ以上の値を示した。*A. steueri* は繊毛虫区において生存率が顕著に低下し、やがて卵生産が停止した(図1, 図2, 下記参照)。*P. nihonkaiensis* では、繊毛虫区においても卵生産が行われたが、生産された卵数は微細藻類区の半数程度であった。興味深いことに、繊毛虫と微細藻類を混合した餌料を給餌したところ、生産した卵数は微細藻類区を上回った。*O. oculata* においては、繊毛虫区の生存率は微細藻類区を

上回り、生産された卵数は微細藻類区と同程度の値を示した。これらの結果より、微細藻類の餌料としての効果はカイアシ類種ごとに全く異なり、本研究で提案する繊毛虫を餌料として用いるプロセスの対象種としては *O. oculata* が適すると示唆された。加えて、7種の微細藻類を用いた微細藻類の好適餌料検討では、いずれの微細藻類条件でも *O. oculata* は卵生産を継続したため、繊毛虫や微細藻類と非常に幅広い餌料条件に対応可能な種であると考えられた。

Acartia と *Pseudodiaptomus* に比べて、*Oithona* は比較的高い SEPR (雌1個体が自身の体重と比較してどの程度の割合の卵を1日に生産しているかを示す指標) を示した (表1)。また、得られた SEPR は既往研究の藻類餌料を給餌した際の値と同等であったため、本種は繊毛虫を餌とした培養系に適すると考えられた。これらの解析結果を国内学会で発表し、国際雑誌にて発表するため原稿を執筆中である。また、好適餌料藻類に関する実験結果を2編の論文にまとめ、国際雑誌に投稿し、2編が受理掲載された。

当初は、食品廃棄物 繊毛虫 カイアシ類の三段階の培養を想定していたが、追加実験の結果、新たな展開として、食品廃棄物 カイアシ類の可能性が見出されたため、より簡略的なプロセスとして期待されるため、継続して実験・開発を行なっている。コロナ渦においては、臨海実験所などの利用が長期間制限され、実験進行に大きな影響を与え、遅れが生じたが、継続して本プロセスの開発し、培養系を構築することで、本研究の目的である“微細藻類の代替餌料として食品廃棄物を用いることで、カイアシ類培養に要する生産コストの削減”を達成すると考えている。

図1

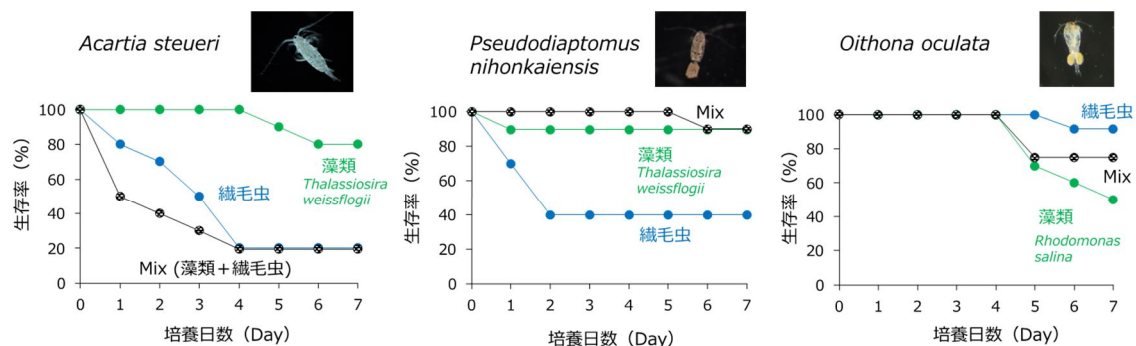


図2

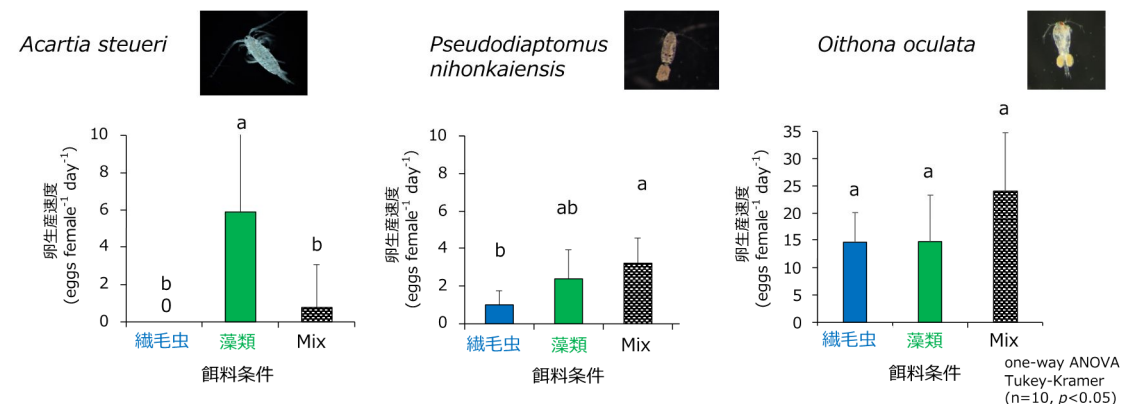


表 1

Acartia steueri



*Pseudodiaptomus
nihonkaiensis*



Oithona oculata



Egg production rate ($\mu\text{g-C female}^{-1} \text{ day}^{-1}$)

	<i>A. steueri</i>	<i>P. nihonkaiensis</i>	<i>O. oculata</i>
纖毛虫区	—	0.19	0.09
藻類区	0.17	0.47	0.10
Mix区	0.02	0.62	0.16

**Weight-specific egg production rate (day^{-1})*

	<i>A. steueri</i>	<i>P. nihonkaiensis</i>	<i>O. oculata</i>
纖毛虫区	—	0.01	0.32
藻類区	0.03	0.02	0.32
Mix区	0.01	0.03	0.53

**Weight -specific egg production (day^{-1})*

= 卵生産速度 ($\text{eggs female}^{-1} \text{ day}^{-1}$) \times 卵 1 個の炭素量 / 雌 1 個体の炭素量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takayama Yoshiki, Yamasaki Taisei, Toda Tatsuki	4. 巻 2023
2. 論文標題 Evaluation of Microalgal Diet to Culture Adult Oithona oculata Farran (Copepoda, Cyclopoida)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Aquaculture Research	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2023/2089803	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takayama, Y., Fatimah Md Y, and T. Toda. (in press)	4. 巻 -
2. 論文標題 Evaluation of dietary microalgae in the culture of the Acartia steueri (Copepoda, Calanoida)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Sustainability Science and Management	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 高山佳樹, 平原南萌, 戸田龍樹	4. 巻 2
2. 論文標題 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	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 プランクトン工学研究	6. 最初と最後の頁 32-43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takayama Yoshiki, Hirahara Minamo, Toda Tatsuki	4. 巻 52
2. 論文標題 Bioreactor cultivation of the planktonic copepod <i>Acartia steueri</i> Smirnov for egg collection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Aquaculture Research	6. 最初と最後の頁 5912 ~ 5917
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/are.15421	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 高山佳樹, 山本翼, 戸田龍樹	4. 巻 1
2. 論文標題 抱卵型カイアシ類 <i>Oithona oculata</i> のバイオリクターを用いた試験的培養	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 プランクトン工学研究	6. 最初と最後の頁 22-31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 高山佳樹, 平原南萌, 戸田龍樹	4. 巻 2
2. 論文標題 浮遊性カイアシ類 <i>Acartia steueri</i> の幼生・幼体の培養における微細藻類餌料の検討	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 プランクトン工学研究	6. 最初と最後の頁 32-43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 高山佳樹	4. 巻 3
2. 論文標題 海産浮遊性カイアシ類の大量培養	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 プランクトン工学研究	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 高山佳樹
2. 発表標題 海洋における動物プランクトンの多様な生存戦略と生産生態
3. 学会等名 国立研究開発法人海洋研究開発機構 地球表層システム研究センター 海洋生態系研究グループが主催するセミナー (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高山佳樹、熊谷祐貴、名取則明、高橋一生、戸田龍樹
2. 発表標題 カイアシ類の二次生産推定に及ぼす死亡個体の影響とは？
3. 学会等名 日本プランクトン学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshiki Takayama, Razif Bin Harun, Abd Wahab Farahin, Fatimah Md. Yusoff, Masahiro Ohtake and Tatsuki Toda.
2. 発表標題 Status and development of floating photobioreactors for outdoor microalgae cultivation
3. 学会等名 COSMOS International Conference 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高山佳樹、山崎泰誠、吉水翔、戸田龍樹
2. 発表標題 カイアシ類培養における繊毛虫の餌料価値とは？
3. 学会等名 日本海洋学会海洋生物研究会海洋生物シンポジウム2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshiki Takayama and Youta Sugai
2. 発表標題 High-density aggregation of meso-zooplankton at sea surface micro layer in temperate coastal water of Sagami Bay, Japan.
3. 学会等名 ECSA59 Using the best scientific knowledge for the sustainable management of estuaries and coastal seas (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高山佳樹 , 山本翼 , 戸田龍樹
2. 発表標題 浮遊性カイアシ類の培養における卵・ノープリウス幼生の分離・回収
3. 学会等名 日本海洋学会海洋生物研究会海洋生物シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉水翔 , 高山佳樹 , 戸田龍樹
2. 発表標題 繊毛虫Euplotes vannusを餌料として培養した 浮遊性かいあし類 2 種の摂餌と再生産
3. 学会等名 日本海洋学会海洋生物研究会海洋生物シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshiki Takayama , Tatsuki Toda
2. 発表標題 Evaluation of dietary microalgae for culture of the marine planktonic copepod <i>Acartia steueri</i> .
3. 学会等名 5th International Postgraduate Conference on Biotechnology (IPCB) 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高山佳樹 , 戸田龍樹
2. 発表標題 浮遊性カイアシ類 <i>Acartia steueri</i> の培養における餌料藻類の検討
3. 学会等名 日本海洋学会海洋生物研究会海洋生物シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎泰誠 , 高山佳樹 , 戸田龍樹
2. 発表標題 繊毛虫Euplotes vannusがかいあし類Oithona oculataの卵生産に与える影響
3. 学会等名 日本海洋学会海洋生物研究会海洋生物シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------