

宇宙生活における生物餌料タマミジンコの青波長依存的な高効率増殖と季節性の解析

佐藤 直稀[†], 菊池 彩香[†], 飯島 美月[†], 金田 智美[†], 茅根 幹泰[†], 國府田 宏輔^{†*}[†]茨城県立太田西山高等学校 自然科学部 〒313-0007 茨城県常陸太田市新宿町 210

(2023 年 12 月 25 日 受付 ; 2024 年 3 月 22 日 受理)

Abstract

現在、人間が月や火星などの衛生・惑星で生活するための有人活動基地の研究開発が進められている。近年、動物性タンパク質の必要性や食の多様性等の点で、宇宙生活においても動物性食糧の摂取が求められている。ティラピアや食用コイなどの魚類は、動物性食糧として利用可能である。これらの生物餌料として、タマミジンコ *Moina macrocopa* が注目されており、宇宙の養殖システムにおいてタマミジンコの高効率・高濃度培養技術の開発が進められている。タマミジンコは、生活環境が良いときは雌の単為生殖によって育苗中の未受精卵が発達・発育して子となり体外へ放出される。一方、生活環境が悪くなると雄が出現し、雌と交尾して受精卵を形成する。受精卵は耐久卵と呼ばれ、耐久性が強く水不足や水の枯渇など、生活環境の変化による状況の悪化に耐えられる構造になっている。

タマミジンコやその他のミジンコに関する培養条件の知見はすでにいくつか報告されている。しかし、光環境がタマミジンコの増殖に与える影響は報告されていない。そこで、効率的培養に重要な光環境を明らかにした。その結果、白色 LED を光源とした培養環境に対して、450 nm をピークに持つ青色 LED の照射下における培養では、7 日間の期間で 2.5 倍の効率で増殖することを明らかにした。一方で、明暗周期と放射照度と、増殖の効率に関連性は見られなかった。また、時期により産仔効率に大きな違いが生じ、季節性があることが明らかとなった。興味深いことに、特に 5 月から 7 月にかけて、青色光照射下では、雄の産仔が抑制されていることがわかった。このことから、青色光照射下での効率的なタマミジンコの増殖の要因は、耐久卵が抑制され単為生殖によるものであることが示唆された。

Introduction

現在、人間が月や火星などの衛生・惑星に生活するための有人活動基地の研究開発が日々進められている。宇宙空間では、限定的・閉鎖的な環境で循環的かつ安定的に食糧やその資材を供給するための効率的栽培・飼育・培養可能な食糧生産のシステム⁽¹⁾が必要である。現在、オオムギやレタスなどの植物の生産方法に関する研究が活発に進められている⁽²⁾。これらの食物は、ビタミンやミネラル、食物繊維、植物性タンパク質を摂取することが可能である。しかし、動物性タンパク質の必要性や、食の多様性などの考えると、動物性食糧の摂取も必要性が高く、近年研究が進められている。そこで、ティラピアや食用コイなどの魚類が、動物性食糧として利用可能であり、これらの淡水産魚類の生物餌料として、タマミジンコ *Moina macrocopa* が有用であることが注目されている。このようなことから、宇宙の養殖システムにおいてタマミジンコの高効率・高濃度培養技術の開発が進められている⁽³⁾。

タマミジンコとは、タマミジンコ科ミジンコ類のタマミジンコ属、タマミジンコモドキ属の 2 属を含む、体長約 1.0~1.5 mm の動物である。節足動物甲殻類の仲間、甲殻は全体に丸く膨らむ。汚れた浅い溝や池、水田などに棲んでおり、生活環境が良いときは雌の単

為生殖によって育苗中の未受精卵が発達・発育して子となり体外へ放出され、1 週間で 8 倍程増殖する。生活環境が悪くなると雄が出現し、雌と交尾して受精卵を形成する⁽⁴⁾。受精卵は耐久卵(休眠卵)と呼ばれ、耐久性が強く水不足や水の枯渇など、生活環境の変化による状況の悪化に耐えられる構造になっている。

タマミジンコやその他のミジンコに関する培養の知見はすでにいくつか報告されている。例えば、培養時の餌濃度の影響について、遠藤氏らの動物プランクトン利用による微細藻類のバイオマス変換の論文によると、クロレラ給餌密度に対するタマミジンコの SGR の実験で、タマミジンコの増殖はクロレラ給餌密度 $10^{6.5}$ cells/mL 付近で最大に達し、 $10^{6.5}$ cells/mL 以下に給餌量を設定することで安定した増殖が得られると報告されている⁽⁵⁾。また、培養の水温については、高久氏らの毒性試験用シオダマリミジンコ *Tigriopus japonicus* の小型容器による飼育および繁殖の論文によると、飼育水温の実験で成熟期間の適正水温は 28 度で 7~9 日で最も短く、産卵期間は 24 度と 28 度で大差は無く、10 日で一番短かった。また、産仔数は 16 度が最も産仔数が多く、第一世代は 28.5 個、第二世代は 40.6 個、第三世代は 41.9 個であった。このことから成長及び繁殖に好適な水温は 23-25 度と報告されている⁽⁶⁾。水質の影響についてはメダカ飼育のための生物餌料培養の経験的な知見からも、学術論文として報告されていない物も含めるとさまざまなことが知られている。

* Corresponding author. e-mail address: kouda.kousuke.research@

***** = gmail.com

一般的に、水質が悪化すると、有性生殖へ切り替わるだけではなく、汲み置き水以外に、緑茶等で培養すると、ミジンコ *Daphnia flea* や *D. similis* の個体数や産仔数に違いがあることが分かっている⁽⁷⁾。水流の影響についても大森らにより報告されており、流速がタマミジンコ増殖に与える影響を調べる実験で、10 cm/min 以下の流速において、高い増殖が得られることが分かっている⁽⁸⁾。

このように、ミジンコのなかまと、餌濃度や水温、水質、水流などとの関連性が報告されている。しかしこれまで、光環境がタマミジンコの増殖に与える影響に関する研究は報告されていない。そこで我々は、高校のラボスケールで安定的に培養可能な環境を確立した上で、効率的培養に重要な、①明暗周期、②波長、③照度、の光環境を明らかにする研究を実施した。その結果、白色 LED を光源とした培養環境に対して、450 nm をピークに持つ青色 LED の照射下における培養では、7 日間の期間で 2.5 倍の効率で増殖すること、一方で、明暗周期および放射照度の違いは、増殖の効率に影響しないことを報告する。

また、この研究の過程で我々は、タマミジンコには増殖に関する性質について、遺伝的な季節性を有するのではないかという示唆を得た。そこで一定の条件下で 1 年間にわたり培養した結果、時期により産仔効率に大きな違いが生じ、季節性があることが明らかとなった。1 月および 5 月では、青色光照射下の方が生涯産仔数が多かった。白色光では雄の産仔数が、青色光の結果に比べて顕著に多かった。5~7 月下旬では、雄の数は白色光で顕著に増加し、青色光では雄が全く観察されなかった。単為生殖のタマミジンコを白色光で継続的に培養した場合、次世代の産仔数は減少することが強く示唆される。

これらの結果は、タマミジンコの効率的・安定的な培養のために重要な基礎知見となる。今後、外部環境の変化によって誘導される現象なのかを検証し、季節性をコントロールできる要素を調査することにより、安定的に生物餌料を供給することが可能になるだろう。

Results

培養環境の構築

タマミジンコは、サン・ニュートリション株式会社から休眠卵を購入し、ふ化したものを用いた。約 28 L の水槽に、濾過装置を設置した。2 L/min のエアレーションを行い、水温はクーラーおよびヒーターによって 24~26 °C を保った。この水槽を本体水槽とし、タマミジンコは本体水槽外に連結した外部培養ボックスで培養した。連結部でタマミジンコが外部培養ボックスから流出しないよう、100 メッシュを貼り付けた

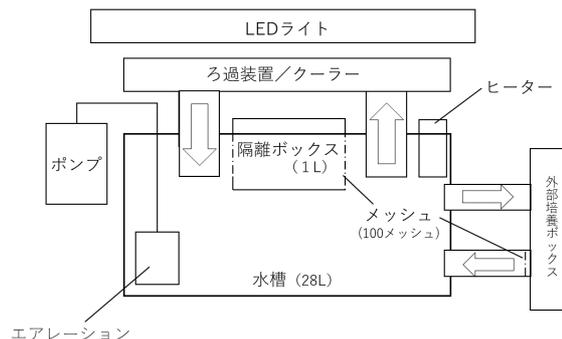


Fig. 1 タマミジンコの培養システムの概念図

(Fig. 1)。餌は 0.4 g ドライイーストを 1 日 1 回、本体水槽は、1 週間に 5 回の洗浄及び水交換 (本体水槽の 5%) を行った。タマミジンコの増殖率を調べる実験では、本体水槽内に 100 メッシュで区切られた 1 L の容量の隔離ボックスを設置し、この中で実験を行った。

以上の環境で、安定的に培養可能かどうかを検証するために、L : D = 14 : 10、水面における放射照度 27 W/m² (9000 lx) の白色 LED の条件下で増殖曲線を調べた。本体水槽内の隔離ボックスにタマミジンコを 10 個体移入し、3 日間培養、6 日間培養、9 日間培養し、各培養期間における生存個体を計測した。その結果、培養開始 3 日後の個体数は 71.7 個、6 日後は 740.3 個、9 日後は 1036.3 個だった。この結果を増殖率 (培養開始時の個体数を 1 とした相対値) として Fig. 2 に示した。この結果から、3~6 日で増殖期に入り、9 日間程度で定常期に入ったと考えられる。

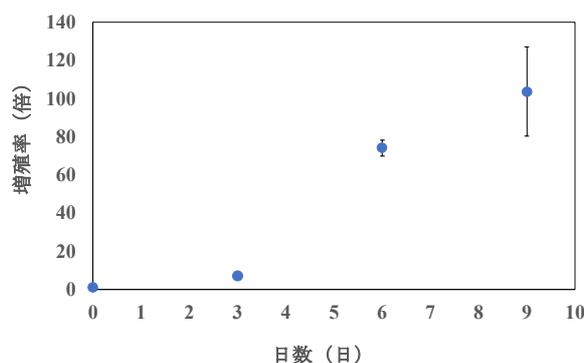


Fig. 2 構築した培養環境における増殖曲線
10 個体のタマミジンコを、L:D = 14:10 の明暗周期で 7 日間、27 W/m² の白色 LED 照射下で培養し増殖率を調べた。3~6 日間で増殖期に入り、9 日間程度で定常期に入ったと考えられる。エラーバーは 95% 信頼区間を示す (n=3)。

タマミジンコは明暗周期非依存的に増殖する

まず、明暗周期がタマミジンコの増殖に与える影響を調べるために、タマミジンコを隔離ボックスに 10 個体移入し、白色 LED (放射照度 27 W/m² (9000 lx) 照射

下, 明暗周期をL:D = 0:24, 10:14, 14:10, 24:0の各明暗周期で培養した。7日後, 増殖した個体数を測定し, 培養開始時の個体数を1とした相対値を増殖率とした。その結果, いずれの明暗周期にも増殖率に違いが見られなかった(Fig. 3)。このことから, タマミジンコの増殖は, 明暗周期非依存的であることが示唆された。

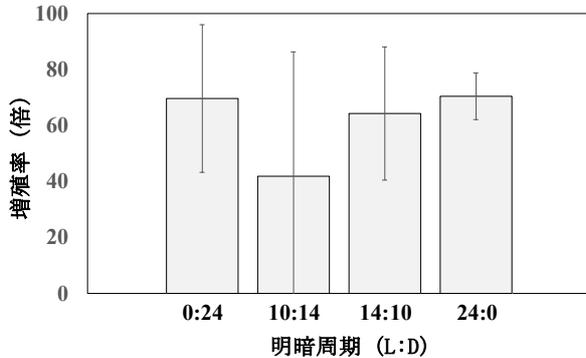


Fig. 3 明暗周期による増殖率の違い
10個体のタマミジンコを, 各明暗周期で7日間, 27 W/m²の白色LED照射下で培養し増殖率を調べたところ, 明暗周期による増殖率の違いは見られなかった。エラーバーは95%信頼区間を示す(n=3)。

タマミジンコは放射照度非依存的に増殖する

次に, 照度がタマミジンコの増殖に与える影響を調べるために, 白色LEDを0 W/m²(0 lx), 642.4×10⁻³ W/m²(214 lx), 6.8 W/m²(2250 lx), 13.5 W/m²(4500 lx), 27 W/m²(9000 lx)の各放射照度での照射下で, 7日間培養して増殖率を比較した。その結果, いずれの放射照度でも増殖率に違いが見られなかった(Fig. 4)。このことから, タマミジンコの増殖は, 放射照度非依存的であることが示唆された。

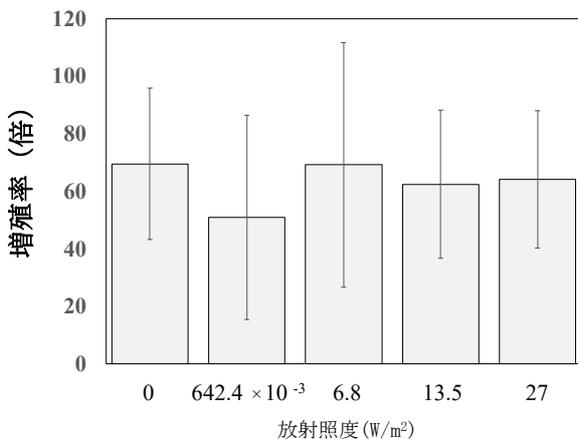


Fig. 4 放射照度による増殖率の違い
10個体のタマミジンコをL:D = 14:10の明暗周期で7日間, 各放射照度の白色LED照射下で培養し増殖率を調べたところ, 放射照度による増殖率の違いは見られなかった。エラーバーは95%信頼区間を示す(n=3)。

青色光照射下で効率的に増殖する

最後に, 波長がタマミジンコに与える影響を調べるために, さまざまな波長の光の条件下でのタマミジンコの増殖を調べた。そこで, 665 nmにピークにもつ赤色LED, 450 nmにピークにもつ青色LED, 白色LEDを光源とした緑色セロハン透過光(530 nmにピークをもつ)を使用し, 7日間培養して個体数を計測し増殖率を調べた。各波長のエネルギーが均一になるように, 各波長の分光視感効率を0.075(665 nm), 0.038(450 nm), 0.86(530 nm)とし, 照度計により照度を測定しながら, 放射照度が642.4 W/m²となるように光源から水面までの距離を調節した。その結果, それぞれの波長での増殖率は次の通りであった: 白色LED照射下は51倍, 665 nm照射下は66倍, 530 nm照射下は95倍, 450 nm照射下は130倍(Fig. 5)。白色LEDと665 nm照射下では有意な差は見られなかった。一方で, 530 nm照射下では白色LEDに対して1.8倍, 450 nm照射下では白色LEDに対して2.5倍効率的に増殖した(Fig. 5)。このことから, 青色の波長(450 nm)の照射下で最も効率的に増殖することが示唆された。

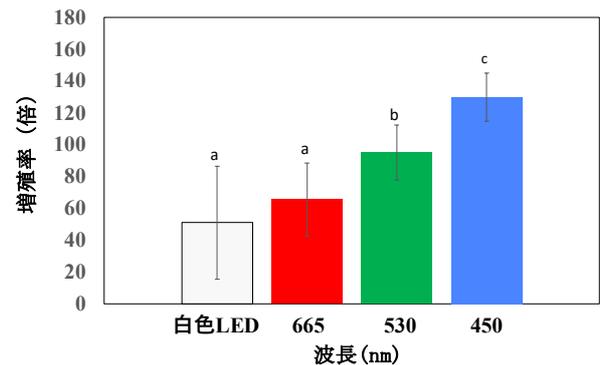


Fig. 5 波長による増殖率の違い
10個体のタマミジンコを, L:D = 14:10の明暗周期で7日間, 642.4 W/m²の各波長の光を照射し培養した。増殖率を調べたところ, 白色LEDと665 nmの赤色光では増殖率に差が見られなかった。一方, 白色LED照射下に対して, 530 nmの緑色光照射下では1.8倍, 450 nmの青色光照射下では2.5倍の増殖率を示した。エラーバーは95%信頼区間を示す(n=3)。a, b, cの異なるアルファベットは, p<0.05の有意な差があることを示す。

タマミジンコの増殖には季節性が存在する

本研究を進めていく中で, 培養中の水温や, 放射照度, 明暗周期, 餌の量や給餌頻度など, 培養環境が全く同じにも関わらず, 10月と12月に行った増殖率比較のための実験結果に有意な差が見られた(data not shown)。このことから, タマミジンコには増殖の特性に季節性があることが考えられた。この可能性を検証するために, 1月~12月に渡って同環境で培養しながら

ら増殖の特性を調べた。増殖の特性を詳細に調べるために、増殖率を調べる方法ではなく、次のような方法により検討した。すなわち、24時間以内に産仔された雌1個体を培養し、これが死亡するまで、生涯産仔数、産仔個体の雌雄判別、生存日数、産仔回数を調べた。その結果、生涯産仔数は、1月から5月まで低い状態を保ち、7月で最も高くなり、8月以降再び減少した (Fig. 6A)。このことから、外的要因が一定であったと

しても、産仔数は季節変動することが示唆された。一方、生涯産仔回数および生存日数は、11月のみ変動が見られたものの、生涯産仔数のような明らかな季節性は認められなかった (Fig. 6B, C)。また、一日あたりの産仔数を月別で比較するために、生存日数あたりの生涯産仔数 (生涯産仔数/生存日数) を産仔効率とし、比較したところ、7月上旬から下旬にかけて最も産仔効率が高いことが明らかとなった (Fig. 7)。

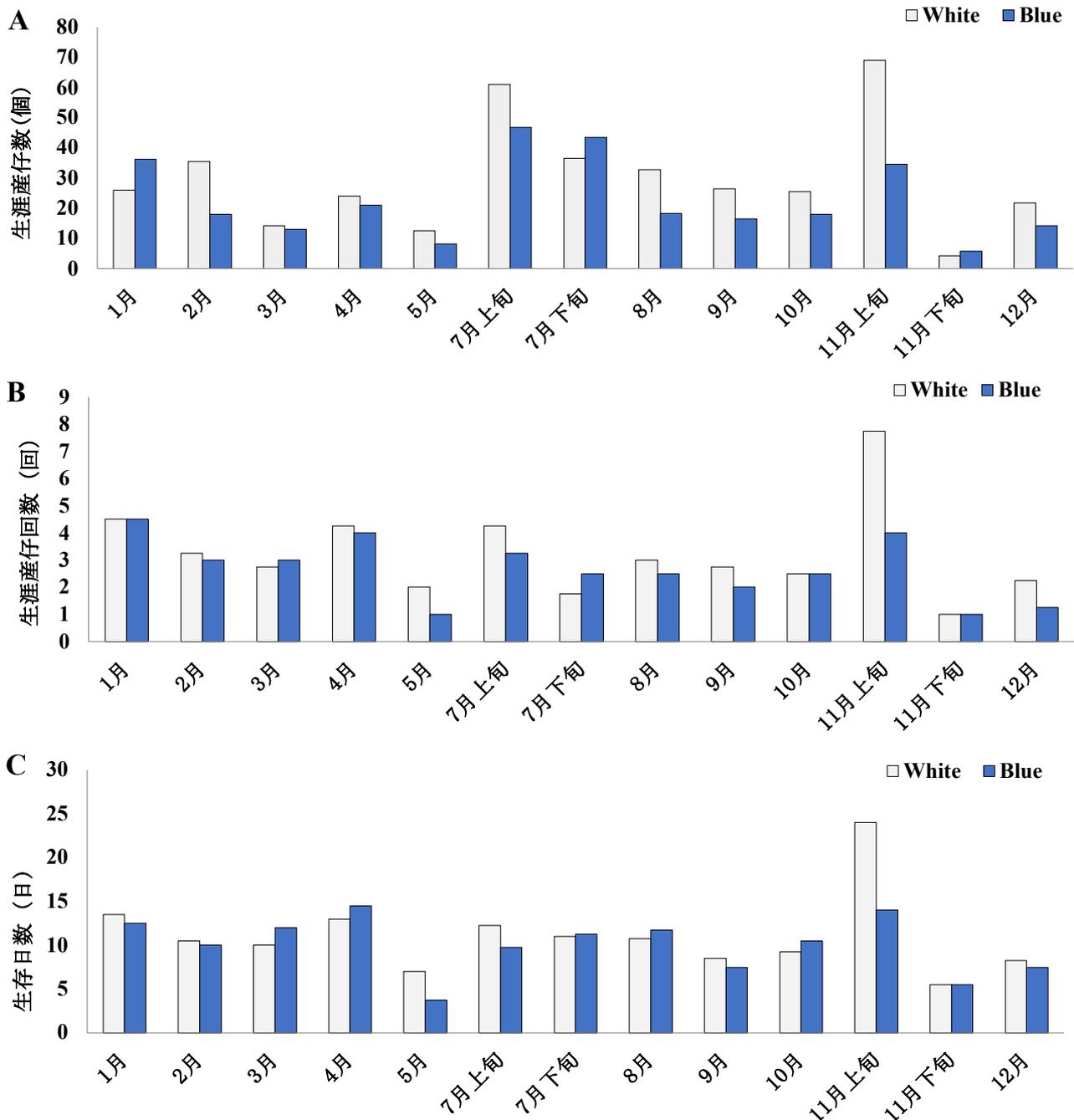


Fig. 6 白色LEDおよび青色LED照射下における産仔と生存の変化

白色グラフは白色LED照射下の結果、青色グラフは青色LED照射下の結果を示す。1月から12月までの生涯産仔数(A)、生涯産仔回数(B)、生存日数(C)のいずれについても、年間を通して一定ではなく変化が見られた。

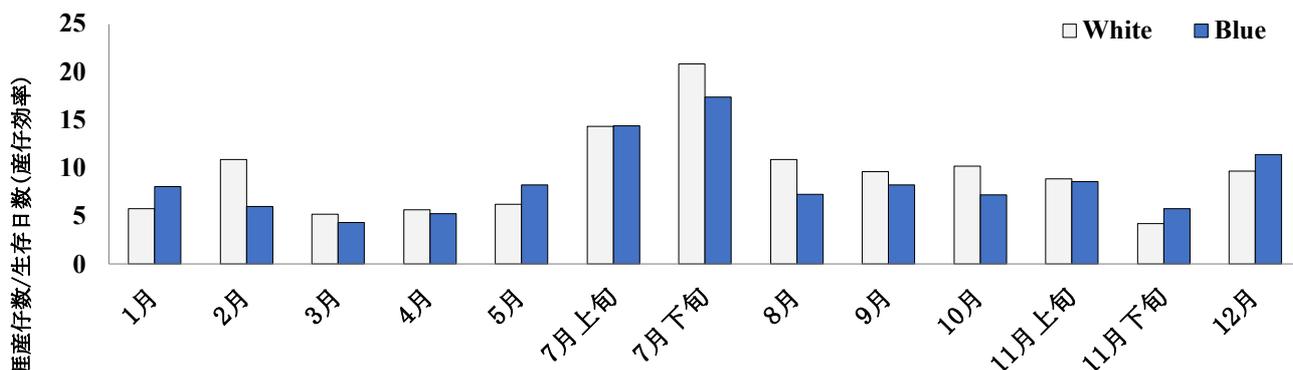


Fig. 7 各波長照射下における一日あたりの産仔数の月別変化
 白色グラフは白色LED照射下の結果, 青色グラフは青色LED照射下の結果を示す。生涯産仔数/生存日数を産仔効率とした。7月上旬から7月下旬にかけて, 産仔効率が上昇していた。

青色光照射は, 繁殖期の雄の産仔を抑制する

タマミジンコは, 水質などの環境悪化により雄を産仔し耐久卵をつくる。耐久卵が孵化するためには一定の時間を要する。したがって, 宇宙空間で効率的にタマミジンコを増殖させたい場合, 耐久卵をつくらせず, 単為生殖で増殖させた方が効率的である。すなわち, 可能な限り雌のみを産仔させ, 雄が産仔されない条件が重要となる。そこで, 年間を通して産仔された全個体について, 雌雄判別を行い, 産仔された全個体に占める雌雄それぞれの割合を調査した。年間を通して, 雌が産仔される割合は, 白色光照射下でも青色光

照射下でもほぼ横ばいであった (Fig. 8A)。一方で雄の割合を見てみると, 大変興味深いことに, 年間を通して大きな変動がある上に, 青色光照射下では, 5月から7月にかけて, 雄個体が全く見られなかった (Fig. 8B)。このことは, 青色光照射によって, 雄の産仔が抑制されていることを示唆している。

これらのことから, Fig. 7 で見られたような7月における高い産仔効率の結果は, この季節に青色光によって耐久卵が抑制され単為生殖をすることによって, 効率的に増殖していたことが考えられる。

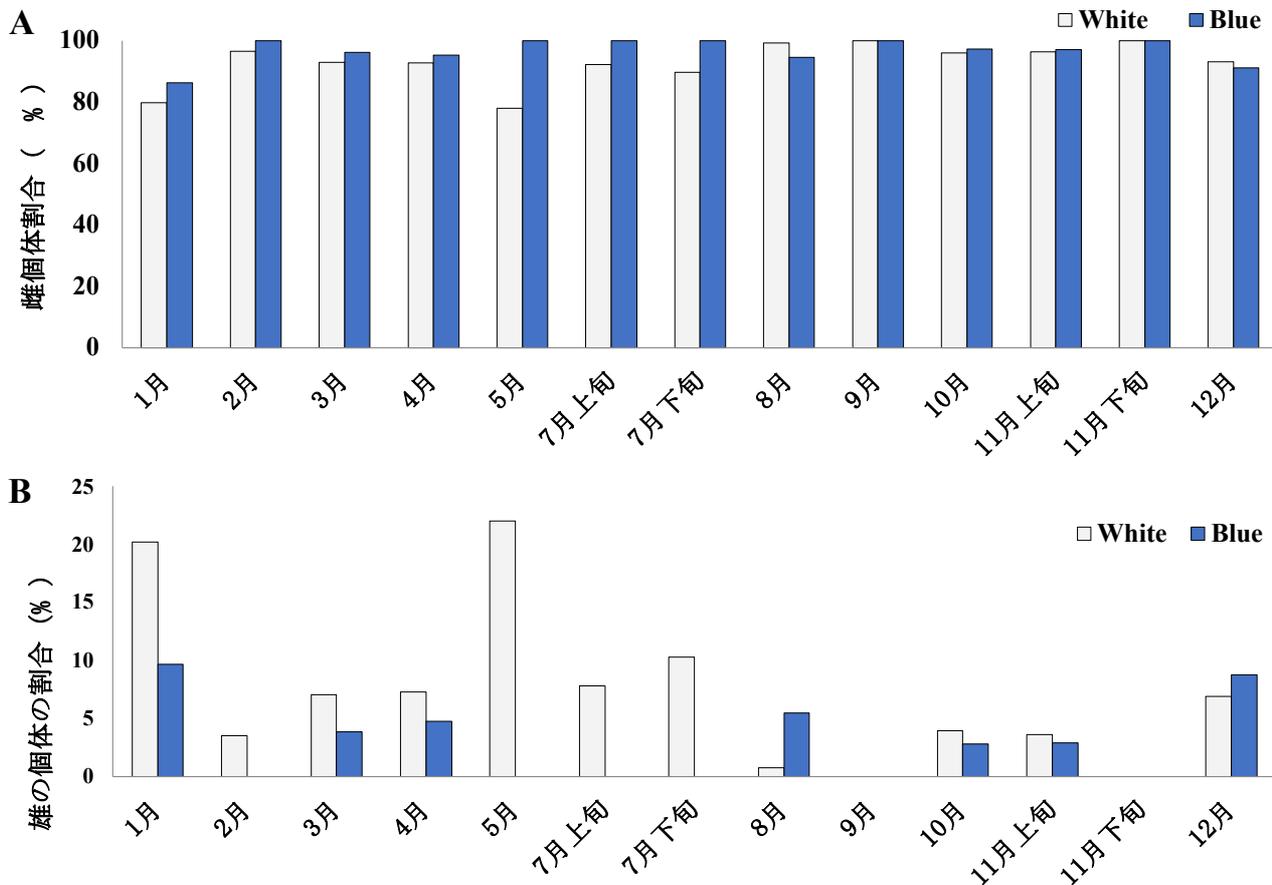


Fig. 8 白色LEDおよび青色LED照射下における雌および雄の割合の月別変化
 白色グラフは白色LED照射下の結果, 青色グラフは青色LED照射下の結果を示す。1月から12月までの雌個体の割合 (A), 雄個体の割合 (B) を示した。5月から7月において, 雄個体はまったく産仔されていなかった。

Discussion

本研究ではまず、高校のラボスケールで安定的に培養できる環境を構築した (Fig. 1)。この環境では、増殖曲線の結果から、培養開始時から3日後から6日後の間に増殖期に入り、9日後には定常期にあると考えられる (Fig. 2)。本研究では、あくまで宇宙空間での活用を想定しているため、一般的なタマミジンコの飼育で用いられるような井戸水やミネラルウォーターなどは利用しておらず、純水を利用した。このことが、一般的なタマミジンコ飼育における経験的な知見とは異なる影響を及ぼしている可能性が考えられる。

本研究ではまず、環境がタマミジンコの増殖に与える影響を調べることを目的とした。光環境の変数として、①明暗周期、②波長、③照度の影響の3つの視点から、どのような光環境が影響を与えるのかをスクリーニング的に調査した。Fig. 2 および3 が示すように、白色LEDを用い明暗周期や放射照度を変化させても、タマミジンコの増殖率には違いが見られなかった。このことは、タマミジンコを24時間連続照射下で培養した場合も、24時間連続暗所で培養した場合も産仔数には影響がないという先行研究の結果と一致する⁽⁴⁾。高久氏らの毒性試験用シオダマリミジンコ *Tigriopus japonicus* の小型容器による飼育および繁殖の論文によると、成長速度および産仔間隔は、4000 lx, 10000 lx に対して、200 lx が8-9日と最も短く、産仔数は200 lx が 27.5 ± 10.6 で最も多く効率的であったという報告がある⁽⁶⁾。大きな差はないものの、飼育及び繁殖については、適切照度は200 lx であると報告されている。シオダマリミジンコは潮溜りに生息するミジンコであり、自然生態系では強い照度に晒されることが考えられるが、増殖や産仔についてのみ調べてみると、比較的弱い照度が適しているようである。タマミジンコも浅い水面付近に生息し高い照度である太陽光に晒される環境に生息するので、シオダマリミジンコとは異なる照度に対する反応を持っていると考えられる。

波長がタマミジンコの増殖に与える影響について調べる実験では、赤色光、青色光、緑色光の3つの波長のうち、青色光が最も効率的に増殖した。本研究では、各波長の光を照射する際には、一定の放射照度に揃えて実験をした。比較的短波長である青色LEDで効率的に増殖したのは興味深い。この生物学的な意義ははっきりしないものの、先行研究で興味深い向色性の実験が報告されている。この実験では、タマミジンコに対し白熱球のプリズムによって分光したスペクトルを照射した結果、タマミジンコは青~藍色の短波長の光に集まったことを報告している⁽⁹⁾。しかし、波長を見分けているわけではなく、青色の明暗を認識し、より明るい青色光に集まるようである。この生物学的意義も不明である。短波長である青色光は、緑色光や赤色光などに比べて、水中の深い領域まで光が届く。また、タマミジンコは明るい水面に集まるので、波長の短い

青色光と増殖について何らかの関係がある可能性が考えられる。一つの仮説として、タマミジンコがクロレラを餌とする生態を持つことが考えられる。クロレラは、クロロフィル a, b の光合成色素を持ち、酸素発生型光合成を行う原核細胞である。実際の生態系では、青色光の豊富な環境で、クロレラは活発に光合成をする。タマミジンコは、そのような場所に積極的に移動することで、クロレラを効率的に摂取しているのかもしれない。

さらに、このような青色光による効率的な増殖の要因は、雄の産仔を抑制することによるものであることが考えられる。Fig. 7 が示すように、タマミジンの産仔効率には季節性が認められ、7月上旬~下旬にかけて産仔効率が高い。そしてFig. 8 が示すように、この季節にかけては、青色光の照射によって雄個体の産仔が極端に抑制されていることがわかった。雄個体が産仔されるということは、耐久卵のつくられることを意味する。雌個体のみの単為生殖に比べると、耐久卵がつけられ、孵化する過程の方が時間を要することが考えられる。つまり、青色光によって効率的に増殖する理由の一つとして、雄個体の産仔を抑制することによる単為生殖の効率化が考えられるのだ。

本研究は、タマミジンコの増殖に与える光環境をスクリーニング的に調査したものである。特定の時期に限定されているものの、青色光照射が雄の産仔を抑制するという興味深い結果が得られた。本研究では一定条件で培養しているものの、単年度で調査を行なっている。一定条件の培養を継続した場合に、今回見られた季節性が維持されるのか、消失するのかを調べる必要があるだろう。その性質によって、宇宙環境で効率的な培養条件が変わってくる。タマミジンコが遺伝的な季節性を有しているのかどうかさらに詳細な調査が望まれる。

先行研究では、鶏糞とクロレラを混ぜたものがタマミジンコの産仔や増殖において最適であることが分かっている。とはいえ、宇宙での閉鎖式循環型の培養システムでは鳥や動物を飼育することは難しく、循環型の宇宙生活を達成するためには、地球から資源を供給し続けることも現実的ではない。今後は、タマミジンコの餌を、クロレラのような植物プランクトンの生物に変更し、クロレラとタマミジンコを共培養することで循環型の培養が可能かどうかを探る必要もあるだろう。

Materials & Methods

試料

タマミジンコは、サン・ニュートリッシュ株式会社から休眠卵の状態で購入した。

培養

水槽は Glasstrior (GEX) 幅 60 cm × 奥行 20 cm × 高さ 25 cm を用い、水質・水温を一定にするために、ろ過装置 (テトラオート パワーフィルター AX-45PLUS (Tetra)), 酸素ポンプ (屋内観賞魚飼育水槽専用エアープンプ SILENTFOURCE (GEX)), エアープンプ (屋内観賞魚飼育水槽専用エアープンプ イーエアー B289-1 (GEX)), 24 ~ 26°C 設定になるようにクーラー (トラクールタワー CR-2NEW (Tetra)) ・ ヒーター (26°C ミニメーター 50W カバー付き (Tetra)) を設置した (以降、これを本体水槽とよぶことにする)。外の日光や蛍光灯の光が実験に影響を与えることを防ぐため、光の入らない暗室に本体水槽を設置し培養した。

タマミジンコの増殖速度の測定の前培養では、飼育ボックスは外掛式多目的飼育ボックス サテライトスリム MS-5904 (STARPET) を用いた。飼育用ボックスにはタマミジンコが通ることのできない 100 メッシュを水生生物に無害な接着剤で隔離ボックスに貼り付け、本体水槽内のろ過された水が飼育ボックスに循環しながらも、タマミジンコが本体水槽内に流出しないようにした。メッシュを貼り付けるための接着剤には、ゼリー状接着剤 (カミハタ) を使用した。

タマミジンコの増殖速度の測定を行う際には、次の方法で培養した。すなわち、ろ過装置等に吸い込まれる事を防ぐため、本体水槽内に隔離ボックスを設置し、この隔離ボックス内でタマミジンコを培養した。隔離ボックス内の水を循環させるために、タマミジンコが通ることのできない 100 メッシュを水生生物に無害な接着剤で隔離ボックスに貼り付け、水の中に沈まない高さで内壁に吸盤で張り付けて設置した。隔離ボックスは幅 13.5 cm × 奥行 8.0 cm × 高さ 11.5 cm のもの (JPO) を用いた。メッシュを貼り付けるための接着剤には、ゼリー状接着剤 (カミハタ) を使用した。

タマミジンコの生涯産仔数・産仔回数・生存日数を測定の前培養では、タマミジンコの個体は、100 ml ビーカー内で培養し、ビーカーを水槽内にフロート板を用いた浮かせた状態で培養した。

餌は 0.4 mg/ml の濃度となるようドライイースト (日清フーズ, スーパーカメラヤ) を調整し、一回あたり 0.4 g を与えた。継代培養の給餌頻度は、週 3 回とした。休日など人の手で与えられないときは自動給餌機を使用した。自動給餌機は (AF-2019C) を用いた。

光源には、観賞魚飼育用水槽専用照明器具 CLEAR LED POWER III (GEX) を用いた。継代培養では、白色 LED を放射照度 542.4 mW/m² となるよう照射した。

明暗周期の影響を調べる実験

明期 : 暗期 (以下, L : D) = 14 : 10, 10 : 14, 24 : 0 の条件で、タマミジンコの増殖の影響を検証した。明期では白色 LED ライトを照度 27 W/m² (9000 lx) で点灯させ、暗期では LED ライトを点灯させず、照度 0 lx の状態にした。水槽にタマミジンコを 10 個体入れた隔離ボックスを設置し、それぞれ暗室で 7 日間培養した。LED ライトが設定した時間に点灯するようにプログラムタイマーを設置した。プログラムタイマーは EXP (REVEX (PT77)) を使用した。生存個体数は実験を 3 回行った平均とした。

波長の影響を調べる実験

赤色 LED, 青色 LED はそれぞれ、波長 665 nm, 450 nm にピークを持つ LED を光源として用いた。緑色光は、白色 LED の発光部に緑色セロハンを張り付けたものを光源として用いた。緑色セロハンは、カラーセロハン ((株) 大創産業) を使用した (透過光のピークは 530 nm)。各波長のエネルギーが均一になるように、各波長の分光視感効率を 0.075 (665 nm), 0.038 (450 nm), 0.86 (530 nm) とし、照度計により照度を測定しながら、放射照度が 642.4 W/m² となるように光源から水面までの距離を調節した (光源から水面までの距離 (cm) を、赤色 13 cm, 青色 24 cm, 緑色 44 cm に設定した)。照度と放射照度の計算では、1 lx あたりの放射照度 (mW/m²) を 665 nm では 19.5 mW/m², 450 nm では 1.7 mW/m², 530 nm では 38.5 mW/m² とした。水槽にタマミジンコを 10 個体入れた隔離ボックスを設置し、暗室でそれぞれ 7 日間培養した。生存個体数は実験を 3 回行った平均とした。

照度の影響を調べる実験

白色 LED を点灯し、水面から LED ライトの距離を変えて照度をそれぞれ 9000 lx (27 W/m²), 4500 lx, 0 lx で照度がタマミジンコの増殖にどんな影響を及ぼすのか調べる実験を行った。水槽にタマミジンコを 10 個体入れた隔離ボックス設置し、暗室でそれぞれ 7 日間培養した。生存個体数は実験を 3 回行った平均とした。

タマミジンコの個体数の測定

タマミジンコの個体数の測定には、隔離ボックスで培養していたタマミジンコをビーカーへ移し替え、ビーカーからスポイトで 1 匹ずつ吸い取り、目視または実体顕微鏡下またはルーペ下で個体数を数えた。

生涯産仔数・雌雄判別・産仔回数・生存日数の測定

継代培養しているタマミジンコから、24 時間以内に産仔されたタマミジンコについて、実体顕微鏡下で第一触覚の長さをもとに雌雄を判別し、1 個体の雌 (以降、これを親の雌個体と呼ぶ) を 100 ml の純水の入っ

たビーカーへ移した。この親の雌個体を、白色LEDおよび450 nmをピークに持つ青色LEDの照射下で培養した。その後、週3回(月・水・金曜日)、産仔された個体の産仔数と雌雄の判別を行った。産仔した場合は、親の雌個体を新しい100mlの水を入れたビーカーへ移動し、0.04mgの給餌を行った。その後、親の雌個体が死亡するまでこの計測を継続し、生涯産仔数、産仔された子ミジンコの雌雄判別、産仔回数、生存日数を測定した。生涯産仔数/生存日数、すなわち1日あたりの産仔数を産仔効率と呼ぶことにした。

統計解析

反応速度の有意差の判定にはt検定を用いた。有意水準は、 $p < 0.05$ とした。質量・長径・短径の測定および糖度・pHの測定は、同じ木の枝から得られた1房のブドウから、サンプル数 $n=9$ (粒)とし、アントシアニン含有量の測定、ポリフェノール濃度の測定、抗酸化活性の測定は、 $n=3$ (粒)とした。

References

- 1) 竹内俊郎, 遠藤雅人, 吉崎悟郎, 豊部睦, 神吉良二, 小口美津夫, 木部勢至郎, 田仲広明, 閉鎖生態系循環式養殖システム(CERAS)の開発に関する研究II. 密閉式魚類飼育装置におけるティラピア *Oreochromis niloticus* の限界放養量の推定, CELSS 学会誌 第11(1998年9月), 27-34.
- 2) 宇宙航空研究開発機構, 月面農場ワーキンググループ検討報告書 第1版(2019年6月), 1-103.
- 3) 遠藤雅人, 宇宙環境下における閉鎖移住施設における食料生産用養殖技術の開発, 生物工学会誌第94巻 第1号(2016年), 36-37.
- 4) 中本崇, ミジンコ類大量培養技術の開発と魚介類幼生への餌料効果に関する研究, 福岡県水産海洋技術センター研究報告 第18巻(2008年3月), 173-214.
- 5) 遠藤雅人, 吉崎五郎, 竹内俊郎, 動物プランクトン利用による微細藻類のバイオマス変換, 原著論文 第14巻, (2002年), 13-18.
- 6) 高久浩, 伊藤康男, 秋元泰, 中村幸雄, 土田修二, 山田久, 毒性試験用シオダマリミジンコ *Tigriopus japonicus* の小型容器による飼育及び繁殖, 海生研報 第12号(2009年3月), 9-24.
- 7) 笠原恵, 玉川愛実, ミジンコ簡易飼育法に関する研究-飼育水および餌の検討-, 兵庫教育大学 研究紀要 第56巻(2020年2月), 175-179.
- 8) 大森克徳, 竹内俊郎, 小口美津夫, 循環式動物プランクトン飼育装置における水流条件に関する検討, Eco-Engineering, 第16巻(2004年1月), 61-64.
- 9) 森喬以, タマミジンコ *Moina macrocopa* STRAUS の Heliotropism に就いて, 動物心理 第2巻(1935年11月12日), 37-42.