

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-503966

(P2021-503966A)

(43) 公表日 令和3年2月15日(2021.2.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 2 3 K 50/80 (2016.01)	A 2 3 K 50/80	2 B 0 0 5
A 2 3 K 10/20 (2016.01)	A 2 3 K 10/20	2 B 1 0 4
A O 1 K 63/06 (2006.01)	A O 1 K 63/06	C 2 B 1 5 0
A O 1 K 61/85 (2017.01)	A O 1 K 61/85	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2020-547318 (P2020-547318)	(71) 出願人	520188695 インスティトゥト エスパニョール デ オセアノグラフィア スペイン, 28002 マドリード, 8, コラゾン デ マリア
(86) (22) 出願日	平成30年11月21日 (2018.11.21)	(74) 代理人	110000338 特許業務法人HARAKENZO WOR LD PATENT & TRADEMA RK
(85) 翻訳文提出日	令和2年6月25日 (2020.6.25)	(72) 発明者	トゥル エストラダ, リカルド スペイン, 28002 マドリード, 8, コラゾン デ マリア
(86) 国際出願番号	PCT/ES2018/070749		
(87) 国際公開番号	W02019/106212		
(87) 国際公開日	令和1年6月6日 (2019.6.6)		
(31) 優先権主張番号	P201731369		
(32) 優先日	平成29年11月29日 (2017.11.29)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	スペイン (ES)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マダコ (OCTOPUS VULGARIS) の幼生の培養方法

(57) 【要約】

ワレカラPhtisica marinaおよびCaprella equilibraおよび/またはJassa spp.タイプのヨコエビを含む餌の飼料に基づいて、マダコ (Octopus vulgaris) の幼生を培養する方法。ライトの条件、水の入替え、温度、他の要因は、上記幼生の生存率を最大とするために最適化される。

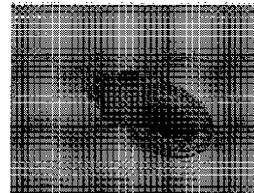
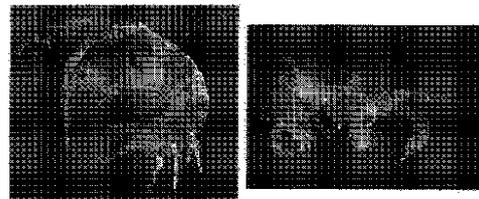


FIG. 1



A)

B)

FIG. 2

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

水を含有する培養槽中におけるマダコ (*Octopus vulgaris*) の幼生を培養する方法であって、

上記方法は、

Jassa spp. タイプのヨコエビ

Phtisica spp. および / または *Caprella* spp. タイプのワレカラ、または

それらの組み合わせ

から選択される餌を上記培養槽へ添加することを含むことを特徴とする、方法。

【請求項 2】

上記 *Jassa* spp. タイプのヨコエビは、*Jassa falcata* および *Jassa marmorata* から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

上記 *Phtisica* spp. タイプのワレカラは、*Phtisica marina* であり、上記 *Caprella* spp. タイプのワレカラは、*Caprella equilibra*. である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

上記幼生の生後 1 日目から生後 20 ~ 30 日には、1 ~ 4 mm のヨコエビを添加し、この時期から生後 50 ~ 70 日には、全長 2 ~ 8 mm のヨコエビおよび全長 4 ~ 30 mm のワレカラを添加し、50 ~ 70 日から上記幼生が成熟するまでは、全長 1 ~ 4 mm のヨコエビのみを投与する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

上記幼生の生後 1 ~ 10 日から上記幼生が成熟するまでは、上記ヨコエビを添加し、一方で生後 20 ~ 30 日から上記幼生が成熟するまでは、上記ワレカラを添加する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

上記幼生の生後 1 日目から上記幼生の成熟までは、上記ヨコエビを添加し、10 日目から上記幼生の成熟までは、上記ワレカラを添加する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

上記幼生の生後 30 日目から上記幼生の成熟までは、上記ヨコエビおよびワレカラを添加する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

ヨコエビおよびワレカラの組み合わせを添加し、餌の総数に対して、1 ~ 10 % のワレカラ、および餌の総数に対して 90 ~ 99 % のヨコエビを投与する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

餌の総数に対して、5 % のワレカラおよび 95 % のヨコエビを投与する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

上記培養槽中の幼生の密度は、3 ~ 7 幼生 / リットルである、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

上記培養槽に、1 日あたり、合計 3 ~ 5 餌 / 幼生を供給する、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

生後 1 日目から生後 50 ~ 70 日まで使用される上記培養槽は、黒色の円錐台形状であり、50 ~ 70 日から、上記幼生を別の灰色の平底培養槽に移動させる、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

上記灰色の平底培養槽の幼生の密度は、0.1 ~ 0.5 幼生 / リットルである、請求項

10

20

30

40

50

12に記載の方法。

【請求項14】

上記培養槽は、上記槽の端部に位置するライトによって、人工的に照射される、請求項1～13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項15】

供給される上記ライトの強度レベルは、上記幼生の生後最初の10～15日は1077～1436 W/m²；生後10～15日から生後50～70日までは517～1077 W/m²に変化し、この時期から成熟までは、上記ライトは、69～517 W/m²に低減される、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

上記培養槽中の上記水は、以下の通り入れ替えられる、請求項1～15のいずれか1項に記載の方法：

最初の2日間は、上記槽においていずれの種類の上記水の入れ替えを行わず、続いて、最初の5日間は、1日あたり20%が入れ替えられるように、1時間あたり上記槽の総体積の4～10%の流量で入れ替えを開始し、そこから10～15日で1日あたり100%まで流量を増加し、30日までは、この入れ替えを100%で維持し、そこから1日あたりの入れ替えが約200%である入れ替えを、持続的に24時間行い続け、この入れ替え割合(%)を上記幼生が成熟するまで維持する。

【請求項17】

上記槽へ、微小藻類 *Isochrysis* spp. および *Nannochloropsis* spp. の混合物を、添加時にその濃度が $0.7 \sim 1.5 \times 10^6$ cells/mL となるまで添加する、請求項1～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】

上記微小藻類の混合物を、1日1回添加する、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

上記培養槽中の上記水における酸素濃度は、5.5 mg/L を超えることを特徴とする、請求項1～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】

上記培養槽中の上記水における塩分濃度は、35～36 g/L であることを特徴とする、請求項1～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】

上記培養槽中の上記水の温度は、18～22 であることを特徴とする、請求項1～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】

上記培養槽の底部を吸引することなく維持する、請求項1～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項23】

上記餌の貯蔵槽の壁部および底部を吸引することによって、または培養における上記水の排出管を使用した濃縮器によって、上記餌の上記貯蔵槽から上記培養槽へ餌を添加し、上記管上に餌を通過させるネットが位置し、上記管の底部により細かいネットが位置し（上記より細かいネットは、上記管の内側に餌を保持する）、上記餌が上記管の内部に入ると、上記幼生槽に餌を添加するために、当該管は除去され、上記餌が容器へ移動される、請求項1～22のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、マダコ (*Octopus vulgaris*) の幼生を培養する方法に関する。特に、本発明は、この種の幼生の成熟段階とすることを可能にする培養手順に関する。従って、本発明は、水産養殖の分野に属する。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【 0 0 0 2 】

マダコ (*Octopus vulgaris*) は、その急速な成長、高い繁殖能力、捕獲の容易性、高い市場価格および高い需要のために、水産養殖における多様化の強い可能性を有する種である。タコの産業肥育は、1996年にスペイン北西部のGaliciaで始まった。この関心は、スペイン海洋学研究所の研究者らによって、750gの幼若体がわずか4ヶ月で商業的サイズ(2.5~3kg)に達することが証明されたパイロット試験において得られた結果 (Iglesias, J. and Fuentes, L. (2014) "Octopus vulgaris paralarval culture," in *Cephalopod Culture*, eds J. Iglesias, L. Fuentes, and R. Villanueva (New York, NY; Heidelberg; Dordrecht; London: Springer), 427-450.) から浮上した。これらの最初の結果で注目された進展に続いて、1997年に、主にGalician Rias Bajasに位置する場所で、12メートルトン (t) の生産量が得られた (Garcia-Garcia, J. et al (2004) Cost analysis of octopus ongrowing installation in Galicia. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2: 531-537)。

10

【 0 0 0 3 】

しかしながら、肥育のための個体の供給が自然界で捕獲された幼生に完全に依存しているという事実のために、このタイプの潜在的な生産量は、非常に限定されている。これらの理由により、このタイプの生産量は、2012年にはわずか4.5tに減少したが、現時点では有意義なデータはなかった。このように生産量を制限する別の側面として、成体のための人工飼料の欠如があり、現在、低い商業的コストを有する冷凍餌 (例えば、甲殻類、魚等) に依存している。しかし、この分野における最近の研究は、人工飼料を用いて得られる結果を改善している (Cerezo Valverde, J., & Garcia, B. G. (2017) High feeding and growth rates in common octopus (*Octopus vulgaris*) fed formulated feeds with an improved amino acid profile and mixture of binders. *Aquaculture Research*, 48(7), 3308-3319)。これら全ての問題に対する解決策は、自然界から幼若体を捕獲するのではなく、栽培技術によって幼若体を生産することにある。しかし、生後1日目の高い死亡率 (事実上100%) が、商業レベルでの幼生の生産を妨げている (Iglesias and Fuentes, 2014)。

20

【 0 0 0 4 】

上述のことから、商業的レベルでのタコの水産養殖の実行可能性は、主に、幼生として知られる成長段階の間の個体の生存率を増加させることに依存する。この段階は、水柱に住む個体として特徴付けられる (その個体は、プランクトン様である)。この段階の持続時間は、温度および飼料に大きく依存し、20で65~70日間持続し得る (Iglesias and Fuentes, 2014)。初めに、これらの個体は、特徴的な外観を有し (図1)、乾燥重量で0.20~0.30mgの重さであり、各腕に3つの吸盤を有する。タコが乾燥重量で9mgを超え、18~20個の吸盤を有するとき、小型の成体タコの典型的な形状をとり、底部に移動し (底生性となる)、幼若段階に入る。この時点で、マダコの培養に関する文献の一部が日本で作成されていることを明らかにすることは重要である (Okumura, S., et al. (2005) Improved survival and growth in *Octopus vulgaris* paralarvae by feeding large type *Artemia* sp. and Pacific sandeel, *Ammodytes personatus*. *Aquaculture* 244, 147-157)。しかし、日本の個体群は、現在*Octopus sinensis*と呼ばれる異なる種であることが、最近示されている (Amor, M. D. et al. (2017). Morphological assessment of the *Octopus vulgaris* species complex evaluated in light of molecular based phylogenetic inferences. *Zoologica Scripta*, 46(3), 275-288)。従って、ヨーロッパの個体群において、結果は異なり、再現性はほとんどないため、注意して比較しなければならない (Iglesias and Fuentes, 2014)。

30

40

【 0 0 0 5 】

幼生段階の死亡率は、動物工学的側面および/または栄養学的側面に関連しているように思われる。生後最初の段階では、生餌を用いることで最良の結果が得られており、現在までに最も受け入れられているのは十脚類、特にカニ (*Maja* sp) の幼生 (ゾエア) である。カニのゾエアを用いて、捕獲状態で*O. vulgaris*の生活環を完了させることに初めて

50

成功したのは、2001年であった。しかし、この試験では2匹のタコだけが成体齢に達した。他の著者も同様の結果を得たが、成熟段階において、生存率が5%を超えることはなかった (Iglesias and Fuentes, 2014)。加えて、その後の結果が有意な変動性を示していることから、これらの経験は再現性がない (Garrido, D., et al. (2016). Meta-analysis approach to the effects of live prey on the growth of *Octopus vulgaris* paralarvae under culture conditions. *Reviews in Aquaculture* doi:10.1111/raq.12142)。上記に加えて、全ての試験において、カニ等の甲殻類のゾエアが使用されており、これはコストおよび大規模にゾエアを入手することの困難性の観点から、商業規模では実行可能ではない。

【0006】

今日まで、唯一の商業的に実行可能な餌は、入手しやすく、魚の幼生に餌を与える水産養殖において非常に有用な小さな甲殻類である *Artemia* sp. である。しかし、この *Artemia* sp. を用いて行われた試験では、栄養プロファイルを増強する数多くの試行にもかかわらず、幼生が成熟するまでに必要な成長や生存率を達成していない。これらの餌の使用の別の代替法として、幼生の発育に好適な栄養プロファイルを有する人工不活性微量飼料 (直径0.5~2mm) を設計することがあった。様々な研究でこの経路が試まれてきたが、現在までに、生存率および成長において有意な改善は観察されなかった。これは、おそらく、低い受容性、低い浮遊性、または好適な栄養プロファイルの欠如等の原因の総和のためである。最近、新規のタイプの不活性飼料を提案し、以前の結果を改善することについての特許 (ES 2 599 603) が出願された。しかし、この飼料によって得られた結果 (73日目に乾燥重量で2.5mg) は、カニのゾエアを用いた以前の研究で得られた45日目に乾燥重量で9.5mgからはまだ遠い。上記のことから、捕獲状態において適度なコストで生産することができるか、または自然界において豊富で入手し易い代替となる餌を特定しなければならない。

【0007】

最後に、別の重要な側面として、有効性が実証された、標準化された培養方法または培養手順を有することが必要とされる。この点については、Iglesias and Fuentes (2014) によって上述に示されたレビューからわかるように、数多くの研究があるが、結果は依然として不十分である。これに関して、最近の研究 (Garrido, D., et al. (2017). *Assessment of stress and nutritional biomarkers in cultured Octopus vulgaris paralarvae: effects of geographical origin and dietary regime. Aquaculture*, 468, 558-568) は、様々なタコの個体群 (大西洋および地中海) においてそれらの結果を比較した標準化された手順を提案した。この手順は、OCTOWELFプロジェクト (AGL2013-49101-C2-1-R. MINECO. Spanish government) の一環として実施される様々な試験の基礎となっている。

【0008】

以下に提示する本発明は、特定の海洋ニッチ中において豊富であるために自然界から容易に収集することができ、また、十脚類のゾエアを用いて得られる幼生の成長値に近く、*Artemia* sp. での幼生の成長値よりも大きな幼生の成長値を達成する新しい餌を使用し、幼生の成熟が、65~75日齢で乾燥重量9mgを超えることを可能にする。また、以前の研究に基づき、プランクトン期間から成熟時までの全体を通して、幼生の生存率を著しく増加させることを可能にする改善された培養手順を提案する。

【発明を実施するための形態】

【0009】

本発明のマダコ (*Octopus vulgaris*) の幼生の培養方法は、タコの最初の成長段階 (幼生と呼ばれる) の実行可能性について有意に改善することを可能にし、この種の商業的培養における幼生の生存率という現在までの障害を克服する。

【0010】

本発明者らは、新規の培養パラメータ、特に新規の餌 (食糧) を使用することにより、この種の以前の培養に対して、タコの幼生において高い生存率および成長率が得られることを見出した。

10

20

30

40

50

【0011】

本発明における幼生という用語は、卵の被覆を放棄する（ふ化）時点から、海または槽の底部に完全に定着する（底生段階）までの、マダコ（*Octopus vulgaris*）の発育状態に関する。幼生期は、変態自体を経験しないので、言及できない。従って、幼生期と幼若体～成体段階とを区別するために、幼生という用語が使われる。幼生は水柱に生息するため、「プランクトン段階」とも呼ばれる。この段階の持続時間は、培養条件（水の温度、ライト、培養体積等）および飼料に大きく依存する。例えば、20 で好適な飼料の場合、この段階の持続時間は、65～75日であり得る（Iglesias and Fuentes, 2014）。初めに、これらの個体は、特徴的な外観を有し（図1）、0.2～0.3mg（乾燥重量）の重さである。タコが乾燥重量で9mgを超える場合、それらは成熟段階に達したと考えられる（通常、これは65～75日齢で起こる）。この時点で、小型の成体タコの典型的な形状を獲得し始め（図6）、底部に移動する（底生性となる）。この時点からは、タコは、主に槽の底部（水柱ではない）で食べることが多く、隠れようとする傾向があり（ある種の隠れい力）、ライトの少ない場所を好む。

10

【0012】

成熟の前に、幼生の乾燥重量が6～9mgであるときに開始する前成熟と呼ぶことができる中間段階が存在し、これは、通常50～70日齢で起こり、成熟の時点まで続く。この前成熟段階は、幼生が完全に成熟することなく底部に移動し始めることを特徴とし、成熟段階に達したときに終結する。

20

【0013】

一度成熟すると、幼若（底生性）段階が始まる。この段階では、個体に、小型のカニおよびエビ（全長約1cm）等の甲殻類を与え始め、また、これらと同じ冷凍甲殻類に基づく不活性飼料または頭足類のための特定飼料のいくつかのタイプを与え始めることもできる（Iglesias and Fuentes, 2014）。しかし、本発明は、幼生が成熟するまでの培養方法に関する。本発明では、特に、*Jassa* spp.タイプのヨコエビ、好ましくは*Jassa falcata*および*Jassa marmorata*、ならびに*Phtisica* spp.および*Caprella* spp.の2つのタイプのワレカラ、好ましくは*Phtisica marina*および*Caprella equilibra*を、タコの幼生の培養のための新規の餌として特定している。

【0014】

ヨコエビとワレカラの両方とも、端脚類のグループに属する。

30

【0015】

また、本発明は、水を含有する培養槽中におけるマダコ（*Octopus vulgaris*）の幼生を培養する方法に関し、上記方法は、

Jassa spp.タイプのヨコエビ

Phtisica spp.および/または*Caprella* spp.タイプのワレカラ、または

それらの組み合わせ

から選択される餌を上記培養槽へ添加することを含むことを特徴とする。

【0016】

Jassa spp.タイプのヨコエビは、好ましくは*Jassa falcata*および*Jassa marmorata*から選択される、

40

上記*Phtisica* spp.タイプのワレカラは、好ましくは*Phtisica marina*から選択され、*Caprella* spp.タイプのワレカラは、*Caprella equilibra*.である。

【0017】

この餌は、唯一の食糧として、あるいは*Artemia* sp.または他の甲殻類のゾエアと組み合わせることで添加することができる（例えば、得られた餌の数が十分でない場合、または生まれたときには、幼生は餌を捕獲して摂食できるような大きさではない）。両方の餌の場合、従来技術に記載されている最も一般的な濃度を使用することができ、その濃度を0.1～1個体/ml（好ましくは約0.5個体/ml）の間で変動させることができる。従来技術に示されるように、種々の投与量、好ましくは1日あたり3～5回の投与量で餌を与えることが好適である。

50

【 0 0 1 8 】

Jassa spp. タイプのヨコエビおよびPhtisica spp. および / またはCaprella spp. タイプのワレカラの組み合わせ (混合物) を添加する場合、餌の総数の 1 ~ 10 % を、Phtisica spp. および / またはCaprella spp. タイプのワレカラの形態で投与し、90 ~ 99 % をJassa spp. タイプのヨコエビの形態で投与する。より好ましくは、5 % のPhtisica spp. および / またはCaprella spp. のワレカラおよび95 % のJassa spp. タイプのヨコエビを投与する。

【 0 0 1 9 】

好ましい実施形態において、幼生の生後 1 ~ 10 日から幼生が成熟するまでは、ヨコエビを添加し、一方で生後 20 ~ 30 日から幼生が成熟するまでは、ワレカラを添加する。

10

【 0 0 2 0 】

ヨコエビとワレカラと一緒に投与する場合、一方および他方の使用される割合は、好ましくは上述の割合である。Jassa spp. タイプのヨコエビの給餌開始は、言及したように1日目 (卵から孵化する日) ~ 10 日齢の間で変更してもよい。この給餌開始は、生まれたときの幼生のサイズおよび餌を攻撃、接触する幼生の能力を考慮して、上記生後の日数の間で変更できる。

【 0 0 2 1 】

本発明の別の好ましい実施形態において、幼生の生後 1 日目から幼生が成熟するまでは、Jassa spp. タイプのヨコエビを投与し、生後 10 日から幼生が成熟するまでは、Phtisica spp. および / またはCaprella spp. タイプのワレカラを投与し始める。好ましくは、Jassa spp. タイプのヨコエビおよびPhtisica spp. および / またはCaprella spp. タイプのワレカラの割合は、それらと一緒に投与する場合、上記に示されている。

20

【 0 0 2 2 】

本発明の別の好ましい実施形態において、幼生の生後 30 日から幼生が成熟するまでは、Jassa spp. タイプのヨコエビとPhtisica spp. および / またはCaprella spp. タイプのワレカラの両方を投与する。好ましくは、Jassa spp. タイプのヨコエビおよびPhtisica spp. および / またはCaprella spp. タイプのワレカラの割合は、一緒に投与する場合、上記に示されている。

【 0 0 2 3 】

好ましい実施形態において、餌 : 幼生の比が良好となるよう餌の総数を最適化し、個体へのストレスを回避することを目的として、培養槽中の幼生の密度は、3 ~ 7 幼生 / リットルである。成熟槽 (詳細は以下を参照のこと) の場合、個体の密度は減少し、密度が、0.1 および 0.5 幼生 / リットルであることが好ましい。

30

【 0 0 2 4 】

好ましい実施形態において、幼生 / 日あたり、これらの餌 (Jassa spp. タイプのヨコエビ、Phtisica spp. および / またはCaprella spp. タイプのワレカラ、またはこれらの組み合わせのいずれか) の合計を 3 ~ 5 個体で添加し、槽中に常に入手可能な餌が存在するように、投与量を分配する。これを達成するために、最初の投与量を調整し、前日からの餌の数が槽中で残存することを予測して、1 日あたりの投与量の総数を、好ましくは 1 ~ 4 の間で変動させる。例えば、槽中に 300 匹の幼生が存在するならば、1 日あたりに添加される餌の数は、幼生 / 日あたり 3 餌を添加する場合、900 (300 × 3) となるだろう。この 900 餌を、好ましくは 1 ~ 4 回の投与量で分配する。

40

【 0 0 2 5 】

供給される餌のサイズは、好ましくは幼生のサイズ / 年齢の関数として変化するだろう。好ましい実施形態において、生後 1 日目から 20 ~ 30 日齢までの最初の段階では、全長 (尾節と眼の中央との間の距離) 1 ~ 4 mm のJassa spp. タイプのヨコエビを添加する。この時点 (20 ~ 30 日齢) から 50 ~ 70 日までは、全長 2 ~ 8 mm のヨコエビおよび全長 4 ~ 30 mm のPhtisica spp. および / またはCaprella spp. タイプのワレカラを添加する。最後に、生後 50 ~ 70 日から成熟するまでは、試料を再び、全長 1 ~ 4 mm のサイズを有するヨコエビに制限する。この最後の変化は、成熟したばかりの幼生で観察

50

されたものである。成熟したばかりの幼生は、成熟期間中に明らかにより脆弱になり、槽の底部でより大きなヨコエビによって攻撃される可能性がある。

【0026】

好ましい実施形態において、生後1日目～前成熟段階（乾燥重量で6～9mg、生後50～70日）で使用される培養槽は、好ましくは黒色の円錐台形状であり、好ましくは100～1000Lの体積を有する。より好ましい実施形態において、乾燥重量で6mgに達した幼生（通常、50～70日の間に起こる）を、別の培養槽（以下、成熟槽と呼ぶ）に個別に移動させる。この成熟槽は、平坦な底部を有し、好ましくは透明（例えば、灰色）であり、長方形または正方形であり、より好ましくは、200～400リットルの体積、40～60cmの高さを有し、メッシュまたはキャンバスで部分的に覆われている。これらの成熟槽は、予め準備され、元の槽からの水（熟成水）で満たされ、好ましくは、生息環境を豊かにするために、隠れ家（例えば、直径1～2cmのPVC管）および小さな石を含む。この全てにより、槽交換に伴うストレスを最小限に抑えることができる。

10

【0027】

本発明の手順における別の重要な態様として、幼生の培養の全体において、吸引することなく（すなわち、底部存在し得る残留食糧および幼生を吸い上げることなく）維持されることがある。この場合、生き残った餌は腐食性生物であり、底部に堆積した有機物質を消費し、病原体の増殖を防ぐので、生き残った餌を残し、コロニー形成させ、清潔に保たせる。次に、この態様は、吸引処理によって引き起こされる可能性のあるストレスを排除するので、幼生の健康を改善する。

20

【0028】

本発明の好ましい実施形態において、幼生の培養中、槽は、（中心位置ではなく）槽の端部に位置するランプまたはライトによって、人工的に照射され、ライトの反射および屈折の変化により、表面へのライトの入射角を変化させ、不均一なライト条件を引き起こす。蛍光灯（冷白色）を用いることが好ましい。

【0029】

供給されるライトの強度は、好ましくは40～800ルクス（69～1436W/m²）に変化する。より好ましくは、使用されるレベルは、幼生の生後最初の10～15日は600～800ルクス（1077～1436W/m²）であり、生後10～15日からは300～600ルクス（517～1077W/m²）である。前成熟である最初の幼生（生後6～9mg、生後50～70日）が観察されるとき、ライトは40～300ルクス（69～517W/m²）に低減され、全ての幼生が成熟するか、または成熟槽に移動させるまで、このように維持される。

30

【0030】

一度幼生を成熟槽に移動させると、円錐台形状の槽で使用されるランプと同じ位置および最終強度（40～300ルクス、すなわち、69～517W/m²）を維持する。幼生の発育（生後1日目から）から成熟までの全体にわたる光周期は、照射が10～14時間、好ましくは8:00～22:00である。

【0031】

残りの培養水の状態に関しては、重要な態様として、入れ替え割合および緑色水（agua verde）の使用が挙げられる。どちらの場合も、文献において手順の多くのバリエーションが存在し得るが、一方と他方の違いを見ることができる試験は存在しない。以上のことから、本発明では、幼生の発育に応じて両方の態様（入れ替えおよび緑色水）を変化させる手順を提案する。

40

【0032】

好ましくは、最初の2日間は、槽においていずれの種類の水の入れ替えを行わない。好ましくは、幼生の生後5日までは1日あたり20%が入れ替えられるように、1時間あたり槽の総体積の4～10%を入れ替える好ましい流量で入れ替えを開始し、そこから10～15日で1日あたり100%まで増加する。30日までは、この入れ替えを100%に維持し、そこから、1日あたり約200%に相当する入れ替えを、持続的に（24時間）

50

行い続ける。この入れ替え割合を、幼生が成熟するか、または幼生を成熟槽に移動させる（乾燥重量で6～9mgに達し、生後約50～70日）まで維持する。成熟槽において、この入れ替え割合（1日あたり約200%）を均一に維持する。

【0033】

入れ替えの開始は、酸素の低下（5.8mg/L未満）がない限り、好ましくは定期的な保守作業（酸素、温度等の測定）および最初の食糧投与の後の正午（約12:00）であり、酸素の低下がある場合、できるだけ早く流れを開放して推定時間を維持し、酸素レベルが5.8mg/Lを超えない場合、推定時間を延長し得る。

【0034】

培養槽中の水の再循環は、閉回路（水の再循環による）および開回路の両方で機能することができるシステムによって実施することができる。後者の場合、沈殿物または任意の生きている生物、特に潜在的に病原体であり得る生物の入口を防ぐ濾過システムが使用される。槽からの水の排出は、中心に位置し、300～400ミクロン、好ましくは300ミクロンのメッシュ目開きを有する排出フィルター、好ましくは管によって行われる。

10

【0035】

次に、好ましくは、当該方法は、微小藻類、好ましくはIsochrysis spp and Nannochloropsis spp.の添加することからなる技術である、緑色水の技術を利用する。

【0036】

微細藻類の添加は、必要に応じて、好ましくは1日あたり1回（幼生の生後1日目から）行われ、添加量は、0.7～1.5×10⁶ cells/mL、好ましくは1×10⁶ cells/mLの濃度となるのに必要な量である。藻類の添加は、好ましくは毎日同じ時間（入れ替えが完了してすぐ）に、上述の藻類の濃度レベルに達することが必要な場合のみ実施される。30日からは、微細藻類の添加を止め、成熟槽にも添加しない。

20

【0037】

好ましい実施形態において、培養水中の酸素濃度は、常に5.5mg/Lを超えて（好ましくは6mg/Lを超えて）維持される。適度な流れのエアレーターにより、多くて、100%の飽和にまで達してもよい。なぜなら、そうでなければ、幼生の無酸素症や大規模な死亡の危険性があるからである。

【0038】

別の好ましい実施形態において、水の塩分濃度は、海からの天然水の塩分濃度（約35～36g/L）であり、大規模な死亡を引き起こし得る急激な低下を防ぐ。

30

【0039】

別の好ましい実施形態において、培養水の温度は、常に18～22℃に維持される。

【0040】

様々な培養段階の参考として使用される幼生の乾燥重量を測定するために、幼生のサンプルを槽から採取し（好ましくは10～30匹の幼生）、これを麻酔し（海水中、Cl₂Mg1.5%）、そして犠牲にし（海水中、Cl₂Mg3.5%）、Fiorito et al., (2015). Guidelines for the Care and Welfare of Cephalopods in Research-A consensus based on an initiative by CephRes, FELASA and the Boyd Group. "Laboratory animals," 49(2_suppl), 1-90の指示に従う。これらの幼生を、オープン（100、20時間）で脱水し、精密秤で計量する。

40

【0041】

本発明の培養方法または培養手順は、既知の手順に対して有利である。使用される餌に関して、他の従来餌（例えば、カニのゾエア）に対するその顕著な利点は、それらが、ガリシア川のいかだ、貝類農場およびイガイ清浄器上で自然にかつ大規模に生産されるので、非常に容易に得られることである（Camacho, A. P., Gonzalez, R., & Fuentes, J. (1991). Mussel culture in Galicia (NW Spain). Aquaculture, 94(2-3), 263-278）。また、地理的に広範囲に分布し、最大ピークがタコの自然孵化期と一致する季節的存在量の変動を伴う種と考えられ、30個体/cm³が地中海でリストに記載された（Scinto, A., Benvenuto, C., Cerrano, C., & Mori, M. (2007). Seasonal cycle of Jassa marmo

50

rata Holmes, 1903 (Amphipoda) in the Ligurian Sea (Mediterranean, Italy)."Journal of Crustacean Biology,"27(2), 212-216)。

【0042】

端脚類の両方のグループ(ヨコエビおよびワレカラ)は、ガリシア川に位置するイガイの培養いかに使用されるローブから容易に得られた。次に、ヨコエビは、甲殻類およびイガイ清浄器を維持する貝類農場の排出チャンネルで得ることもできる。これらの端脚類を得るためには、水(25~30L)を含有する槽中で、ローブまたはイガイの集団を沈め、それらを穏やかに攪拌するだけで十分であり、それによって大部分がイガイから分離し、槽の壁部に移動する。これらの槽は、培養設備に輸送され、好ましくは酸素の低下を回避するために小さなエアレーターを使用する。

10

【0043】

一度培養設備に入ると、端脚類は、捕獲状態に容易に適応し、特別な保守条件を必要としない。端脚類は、好ましくは成熟槽と同様の培養槽において保持されるが、培養槽は、被覆されておらず、より大きな入れ替え(1日あたり10~12回の入れ替え)を伴う。端脚類には、魚飼料、または魚肉または軟体動物を自由に与え、底部に消費されずに多くの残留物が残り過ぎることを回避する。

【0044】

餌の貯蔵槽からの餌の収集は、様々な方法を用いて行われる。第1には、餌の貯蔵槽の壁部および底部を吸引することによるものである。端脚類は、求められる餌のサイズに応じて、開口径の異なるネット中に濃縮される。このシステムは、好ましくはより大きな餌に使用される。第2の収集システムは、培養槽からの水の排出管を有する濃縮器からなる。この管の壁部上には、餌を通過させるネットが位置し(そのネットの開口径は、所望の餌のサイズに応じて異なり得る)、より細かいネット(好ましくは200ミクロン)が管の底部(排出口)に位置し、より細かいネットは管の内側に餌を保持する。一度餌が管の内部に入ると、幼生槽に餌を添加するために、管は除去され、餌が容器へ移動される。両方(吸引および濃縮器)の場合において、餌が空気と接触することで、餌の外骨格に気泡が蓄積され、これは、餌が沈むことを妨げ、幼生が餌を捕獲することを困難にするため、餌が空気と接触することを回避する試みがなされる。

20

【0045】

本発明の方法では、40日齢で90%超、50日齢で80%超、および60日齢で65%超の生存率データを得た。これらの結果は、カニを用いて得られた現在までの最良の結果よりも良好であり、従って、幼生が30日齢を超えることはまれであるArtemia sp.(唯一の商業的に実現可能な飼料)を用いて得られた結果よりも良好である。成長率に関して、本発明で提案される手順では、1日あたり、幼生の乾燥重量の5~6%で重量が増加する。これらの値は、カニのゾエアを使用した先行文献の著者らが得た7~8%未満であるが、Artemia sp.を用いて得られた値の多く(大部分が3~4%)より大きく、カニのゾエアを与えるのに対して10~20日の遅れがあるものの、これらの値は成熟を達成するには十分であることが、研究で裏付けられている。この違いにもかかわらず、カニのゾエアを得ることの困難さに対して提案される餌(端脚類)を得ることは容易であることから、商業的規模で幼生の栽培を進展させることにおいて、端脚類は明らかな利点を有する。

30

40

【0046】

本発明の方法で使用される餌の自然での入手可能性が高いことは、工業生産(少なくとも小規模または中規模)を可能にする。また、いかにおよび貝類農場に関連するマルチ栄養生産(ある種の過剰分または浪費分を、別の種に与えるために利用して、影響を減少させ、収益性を増加させる、異なる種の組み合わせ栽培)を実施し得る。

【0047】

明細書および特許請求の範囲の全体にわたって、「含む」という語およびその変形は、他の技術的特徴、追加、構成要素またはステップを排除することを意図しない。当業者にとって、本発明の他の目的、利点および特徴は、明細書の一部、および本発明の実施の一

50

部から明らかになるだろう。以下の実施例および図面は、例示として提供され、本発明を限定することを意図しない。

【0048】

〔図面の簡単な説明〕

図1は、マダコ (*O. vulgari*) が孵化した直後の幼生の、生理学的特性を示す画像である。

【0049】

図2は、*Jassa falcata* (A) および *Jassa marmorata* (B) の成体の一例を示す画像である。

【0050】

図3は、*Phitistica marina* のオスおよびメス (A)、および *Caprella equilibra* のオスおよびメス (B) の成体の一例を示す画像である。

【0051】

図4：異なる試験において、マダコの幼生の成長を乾燥重量 (mg) によって示すグラフである。4A：生後40日まで *Artemia sp.* のみ与えたパラ幼虫の対照群と、30日まで *Artemia sp.* およびゾエアを与え、その後31日から50日までは端脚類のみを給餌した実験群である。バーは標準偏差を示す。4B：25日まで対照処理 (*Artemia sp.*) を行った幼生、および、8日間 *Artemia sp.* を、9～25日齢まで端脚類を与える実験処理を行った幼生。

【0052】

図5は、本発明において使用される培養槽を示す図である。5A：生後1日目から幼生が成熟段階 (通常、生後50～70日の間に現れる、乾燥重量で6mg～9mg) に入るまで使用される円錐台形槽。図中、水の入口 (1) および光源 (2)、中央通気 (3)、フィルターを備えた中央管 (4)、および水の高さの調節を可能にする外部排水管 (5) が表されている。5B：成熟段階 (乾燥重量で9mg以上) に達するまで、幼生を移動させておく定着槽。図中、水の入口 (1) および光源 (2) 底部に設置された、あるいは上部から吊り下げられた避難場所 (3)、フィルターを備えた中央管 (4)、および水の高さの調節を可能にする外部排水管 (5) が示されている。

【0053】

図6：成熟段階の幼生。B) では、避難場所として使用されるPVC管も観察される。

【実施例】

【0054】

本発明者らによって実施された、本発明の生成物の有効性を明らかにする試験結果によって、本発明を説明する。

【0055】

〔実施例1：従来技術 (Garrido.D et.al (2017) *Aquaculture*, 468, 558-568) として公知のマダコ幼生培養試験〕

中央位置に弱～中程度の通気をした、総体積が500Lである、壁部および底部が黒色の円錐台形槽にて実験を行った。緑色水 (植物プランクトン) を使用し、実験全体 (30日間) を通して、2μmのカートリッジフィルターによって濾過された水で、1日当たり150%を入れ替えた。ライトは、培養槽の中央上部に設置した、36Wの冷白色蛍光灯を使用した。実験全体を通して、700ルクスの単一強度が使用された。食糧は、海洋リン脂質によって肥育された、別の微小藻類で肥育された、*Artemia sp.* を主とした。*Artemia sp.* を、1日を通して3回に分けた投与量で供給した。30日齢での生存率は0.14～3.77%であったが、成長速度は1日当たり乾燥重量で3.9～6.4%の増加を示した。

【0056】

〔実施例2：対照試験：幼生の生後1日目から40日目まで餌として *Artemia sp.* を使用したマダコの幼生の培養 (1000L槽)〕

幼生が槽を自由に移動するのを妨げる気泡が生じることを防ぐために、中央位置に中程

10

20

30

40

50

度の通気をした、総体積1000Lである、壁部および底部が黒色の円錐台形槽にて実験を行った(図5A)。温度範囲18.5 ~ 21.3、塩分濃度35g/Lに対し、5幼生/Lの密度で、溶存酸素値を5.5mg ~ 6.7mg/Lの間で変動させた(実験期間全体)。微小藻類添加時、Nannochloropsis sp.およびIsochrysis aff. galbanaの濃度が 10^6 cells/mLである緑色水を30日間使用した。この方法は以前の試験(従来技術の試験)と同じだったが、この第2の試験での水の入替えにおける変更は、その濃度に影響を及ぼした。これらの違いは、槽の「熟成」が起こる最初の2日間、槽を閉じた状態にしておくことにあった(従来技術の方法との1つ目の違い)。この期間に続き、(1ミクロンのカートリッジフィルターで濾過した水での)入替えを開始する。続く5日間で槽の総体積の15~20%の入替え速度(10ml/sで5時間)で開始し、15日目に100%の入替えとなるように、徐々に時間を増加させる。この割合を30日目まで維持し、そこから1日当たり約200%に相当する入替えを持続的に続け(24時間/日)、これを生後40日に槽が閉鎖されるまで維持する(2つ目の違い)。排水を300ミクロンのネットを有する中央管によって行い、水位は外部管によって維持される。

10

【0057】

ライトに関しては、35Wの冷白色蛍光灯を槽の端部で(中央位置に代わって)使用し、水面に対するライトの入射角を変化させ、水柱内に不均一なライトの条件を生じさせた(3つ目の違い)。試験中に使用した強度値を、3つの強度レベル内に留めた。使用されるライトのレベルは、生後最初の15日間は600~800lux(1077~1436W/m²)、生後15~40日間は300~600lux(517~1077W/m²)である(4つ目の違い)。生後1日目から試験終了まで、8:00~22:00の間の光周期は14:10(明:暗)であった。

20

【0058】

試験期間全体(40日間)の餌は、Isochrysis aff. galbanaで7日間肥育したArtemia sp.を主として、0.5個体/mLの密度で幼生に供給され、槽内に摂食可能な餌が常に存在するように、1~4投与量/日の範囲で投与量を分配した。成長速度(GI)が1日当たり4%を超えて増加せず、乾燥重量1~1.5mgの間に維持されていたため、40日目にタンクを閉じることを決定した(図4A参照)。この日齢での生存率は65%からであった。

30

【0059】

[実施例3:生後1日から30日までArtemia sp.およびカニゾエアを用い、生後31日から本発明の端脚類を使用した、マダコ幼生培養試験(1000L槽)]

本試験を、異なる餌の効果を比較するために、上記の試験と同時に、同じ培養条件で実施した。この試験において、Artemia sp.は30日齢までカニゾエア(0.1個体/mL)によって補完された(しかしながら、ゾエアの捕食が困難であることを考慮して、これらは最初の30日のうち10日しかタンクに添加できなかったため、これは予想される成長を減少させた)。それから、端脚類のみの供給を開始した。一方ではJassa spp.(好ましくはJ.falcataおよびJ.marmorata)タイプのヨコエビが個体総数の95%に相当し、Phtisica spp.および/またはCaprella spp.(好ましくはPhtisica marinaおよびCaprella equilibra)タイプのワレカラは個体総数の5%に相当した。ヨコエビの全長は2~8mmに達し、ワレカラの全長は4~30mmに達した。端脚類の場合、給餌手順は、1日当たり、1幼生に対して3~5匹の餌を供給することからなり、槽内に摂食可能な餌が常に存在するように、1~4投与量/日の範囲で投与量を分配する(従来技術に対する5つ目の違い)。

40

【0060】

55日齢から、乾燥重量で6mgを超え、底部に移動し始めた幼生が観察された。これらの個体を、体積400L、正方形、高さ50cm、平底、灰色である成熟槽(図5B)と呼ばれる新しい槽に移し、その表面の3/4をシャドーイングネットで覆った。この槽は、元の槽からの水で満たされ、生息地を豊かにするための槽の底部に避難場所(1~2

50

cmのPVC管)または垂直に吊るされたケーブル、ならびに小さな石を含んでいる。個体密度は0.1幼生/Lであった。この時点で、幼生は(少なくとも一時的に)脆弱になり、より大きな餌に攻撃されることが分かったので、全長が最大4mmのヨコエビのみを幼生に与えた(6つ目の違い)。

【0061】

この成熟槽では、幼生の日齢30日から最初の槽と同様の入れ替え割合、すなわち、毎日槽の総体積の約200%を入れ替える持続的な入れ替え(24時間)を維持した。排水を300ミクロンのネットを有する中央管を通して行った。ライトに関しては、最初の幼生が前成熟(55日および乾燥重量で6mgを超える)状態で観察された時点で、ライトを最初の槽内で40~300ルクス(69~517W/m²)の範囲に減少させた。成熟槽に移してすぐに、最初の槽と同じ光周期(14:10)で、強度を約40ルクス(69W/m²)に維持した(7つ目の違い)。

10

【0062】

幼生について槽の底部が吸引されることを記載している試験は無い。目的は幼生に対するストレスを減少させ、また端脚類は腐食性生物であるために、それらに水槽の底部にコロニーを形成させ、底部から有機残存物を取り除き清潔に保つのを助け、起こり得る病原体の増殖を防ぐことである(8つ目の違い)。

【0063】

端脚類(ヨコエビおよびワレカラ)は、ガリシア川のイガイの培養に使用されるラフトおよび浄化装置から得た。端脚類は図5Bの槽(成熟槽)と同様の1000Lの槽内に保持され、覆いなしで、その体積分の水の入れ替えを1日当たり10回行った。餌は、魚の飼料および軟体動物のad libitumの残留物を主とした。幼生に給餌するために、端脚類を2つのシステムによって捕獲した。より大きな端脚類を、槽の壁部および底部を吸引することによって得て、ネットの中に集めた。2つめの収集システムは、餌が貯蔵されている槽自体からの水の排出管を使用する濃縮器で構成されている。餌を通過させる500ミクロンのネットをこの管の壁部上に位置させ、餌を管の内側に保持する200ミクロンのネットを管の底部(排出口)に位置させた。一度餌が管の内部に入るとこの管を槽から除去し、餌を容器に集めた後、1~2Lのプラスチックジャグによって、餌を幼生の槽に加える(9つ目の違い)。

20

【0064】

この試験のデータは、生後40日において90%超、生後60日において約65%の生存率を示した。成長速度は1日当たり5~6%の重量増加を示し、50日齢に乾燥重量で5mgに達し(図4A)、その後、65~75日齢に乾燥重量で9mgを超える幼生を得た。

30

【0065】

[実施例4:対照試験:幼生の生後1日から25日まで、餌としてArtemia sp.のみを使用した、マダコ幼生培養(100L槽)]

この試験は、上記2つの実施例に記載されたものと同じ培養試験条件下で実施されたが、異なる点としては、槽の体積が1000Lではなく100Lであり、1つではなく、3つのレプリカを使用したことである。試験を25日間続けた。実施例2と同様に、対照処理では、Isochrysis aff. galbanaで7日間肥育したArtemia sp.のみを使用した。幼生の成長結果は、図4Bで観察されるように実施例2の成長結果と同様であり、生後25日に乾燥重量で約1mgであった。

40

【0066】

[実施例5:生後1日から8日までArtemia sp.を使用し、生後9日から25日の間に本発明の端脚類を使用した、マダコ幼生培養試験(100L槽)]

この試験は、Artemia spp.を、実施例3と同じJassa spp.タイプの端脚類を使用した実験処理と比較することを目的として、実施例4に記載されたものと同じ培養条件下で並行して実施した。この場合の異なる点は、生後8日目からこれらの端脚類が供給され始めたことである。これは、生後8日目には幼生の大部分がこのタイプの餌を接触したことが観

50

察されたからである（いつ餌の供給を開始するかを知るために、幼生の行動を観察するか、または以下の実施例で説明される手順を実施することで、当業者は容易にこれを理解できる）。この実験では、最初の8日間の給餌はArtemia sp.（実施例4と同じタイプ）のみであり、9日目と10日目の間に、Artemia sp.（全個体のうち75%）および全長1~3mmのJassa spp.タイプの端脚類（25%）の混合物を幼生に給餌した。幼生は、10日から培養が完了するまで、実施例3と同じ条件（3~5餌/幼生/日）下で、これらの端脚類のみの給餌を開始された。この実施例における幼生の成長結果は、図4Bで観察されるように、実施例3の成長結果と同様であり、25日に成長速度が6.7%、生存率が70%であった。

【0067】

〔実施例6：異なる日齢での端脚類の捕獲および摂食〕

幼生がJassa spp.タイプの端脚類を捕獲し、摂食することができる日齢をより正確に特定すること、および産卵に違いがあるかどうかを決定することを目的として、残りの実験と並行して新しい実験を行った。この目的のために、ふ化時に異なる初期重量を示した2匹の異なる雌から得た幼生を比較した。1番目の雌からの幼生は、乾燥重量で平均0.24mgの重さである一方、2番目の雌からの幼生の初期乾燥重量は平均0.29mgであった（共にこの種の重量の正常範囲内であった）。両グループの幼生を、上記実施例2~5と同じ培養条件下、密度は4幼生/Lで、別個の100L槽に入れた。いずれの場合も、生後1日から、Jassa spp.タイプの端脚類（20~30%）を、Artemia sp.（80~70%）と共に、3~5餌/幼生の密度で供給した。

【0068】

いずれの場合も、すべての端脚類が捕獲されたことを観察した。餌を捕獲し、2~3分間餌を保持した幼生を槽から除去して（餌を含む）、顕微鏡下（倍率40倍）で幼生を観察し、その消化器系に餌を有することを確認した。この観察についての技術的詳細は、Nade, M. et al (2017). Prey Capture, Ingestion, and Digestion Dynamics of Octopus vulgaris Paralarvae Fed Live Zooplankton. "Frontiers in Physiology," 8, 573で見られる。この実施例では、乾燥重量で0.24mgの、孵化したばかりの幼生が、生後1日目から餌を攻撃したことが観察されたが、摂食割合は30%にすぎず、結果として、上記飼料を供給するには早すぎると考えられた。さらに、乾燥重量で0.29mgの幼生は生後1日目から80%の摂食範囲を示し、これは、Jassa spp.タイプの端脚類の供給を開始するのに適していると考えられる。

【0069】

この試験は、ある産卵から次の産卵まで、これらの端脚類を使用した給餌の開始を変化させてもよいこと、この餌を使用した給餌の開始を最適化するために、捕獲および摂食試験を並行して実施することが、必須ではないが、推奨されることを明らかにした。しかしながら、これらの餌（端脚類）は、1日目から投与を開始してもよい。

【0070】

〔対照実験および本発明の結果の比較〕

本発明に基づく実験結果を、従来技術として知られているものと比較すると、本発明の方法を用いた100および1000Lの両方の試験を含む、提示された全ての実施例（2、3、4および5）における改善は、明らかに有意である。従来技術の方法（Garrido et al., 2017）における30日齢の幼生の生存率は、0.14~3.77%であり（実験は合計18槽で行った）、実験はこの日齢で完了している。対照的に、端脚類を使用した本発明の1000L槽での試験の条件では、40日齢で90%超、60日齢で65%超の生存率が得られた。次に、端脚類を使用した100L槽中の培養条件では、生後25日で70%超の生存率が得られた。また、1000L試験では、次善の飼料を有しているかはどうかであれ、Artemia sp.を使用した処置によって、40日で65%超の生存率を示し、これは、端脚類の使用による違いだけでなく、培養手順が生存率を改善したことを示していることも指摘しなければならない。重量に関しては、従来技術の方法（Garrido et al. 2017）では、1日当たり乾燥重量で3.9~6.4%の増加を伴った成長速度を得られて

10

20

30

40

50

いるが、15日齢までの値のみである一方、端脚類を使用した槽における本発明の方法のデータでは、1000Lの槽において、従来技術の最大値（1日当たり乾燥重量で5～6%）と同様の増加が得られ、100Lの槽において、1日当たり乾燥重量で6.5～7.5%の増加が得られる。1000Lの槽の場合には、65～75日齢で乾燥重量9mgを超える重量を有する成熟した幼生が得られた。図4Aおよび4Bは、本発明の方法を用いた実施例2、3、4および5における重量増加を示す。この実験では、端脚類を使用した処理とArtemia sp.を用いた処理との違いも観察できる。

【図面の簡単な説明】

【0071】

【図1】図1は、マダコ（*O. vulgaris*）が孵化した直後の幼生の、生理学的特性を示す画像である。 10

【図2】図2は、*Jassa falcata*（A）および*Jassa marmorata*（B）の成体の一例を示す画像である。

【図3】図3は、*Phitistica marina*のオスおよびメス（A）、および*Caprella equilibra*のオスおよびメス（B）の成体の一例を示す画像である。

【図4A】図4：異なる試験において、マダコの幼生の成長を乾燥重量（mg）によって示すグラフである。4A：生後40日までArtemia sp.のみ与えたパラ幼虫の対照群と、30日までArtemia sp.およびゾエアを与え、その後31日から50日までは端脚類のみを給餌した実験群である。バーは標準偏差を示す。4B：25日まで対照処理（Artemia sp.）を行った幼生、および、8日間Artemia sp.を、9～25日齢まで端脚類を与える実験処理を行った幼生。 20

【図4B】図4：異なる試験において、マダコの幼生の成長を乾燥重量（mg）によって示すグラフである。4A：生後40日までArtemia sp.のみ与えたパラ幼虫の対照群と、30日までArtemia sp.およびゾエアを与え、その後31日から50日までは端脚類のみを給餌した実験群である。バーは標準偏差を示す。4B：25日まで対照処理（Artemia sp.）を行った幼生、および、8日間Artemia sp.を、9～25日齢まで端脚類を与える実験処理を行った幼生。

【図5】図5は、本発明において使用される培養槽を示す図である。5A：生後1日目から幼生が成熟段階（通常、生後50～70日の間に現れる、乾燥重量で6mg～9mg）に入るまで使用される円錐台形槽。図中、水の入口（1）および光源（2）、中央通気（3）、フィルターを備えた中央管（4）、および水の高さの調節を可能にする外部排水管（5）が表されている。5B：成熟段階（乾燥重量で9mg以上）に達するまで、幼生を移動させておく定着槽。図中、水の入口（1）および光源（2）底部に設置された、あるいは上部から吊り下げられた避難場所（3）、フィルターを備えた中央管（4）、および水の高さの調節を可能にする外部排水管（5）が示されている。 30

【図6】図6：成熟段階の幼生。B）では、避難場所として使用されるPVC管も観察される。

【 図 1 】

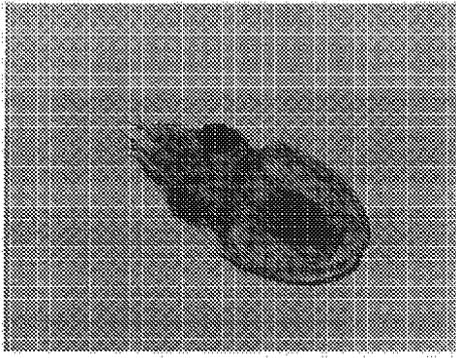
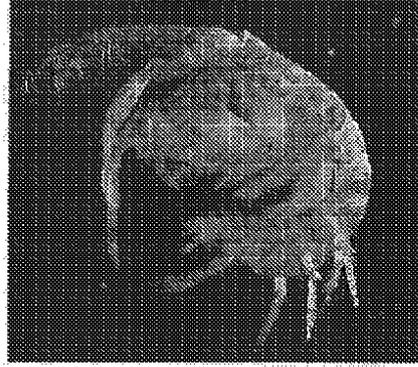


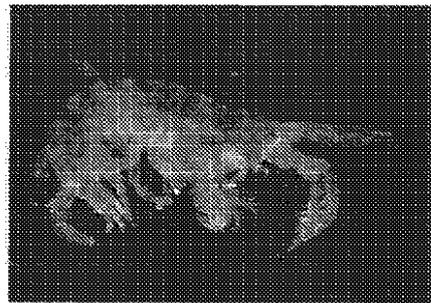
FIG. 1

【 図 2 A) 】



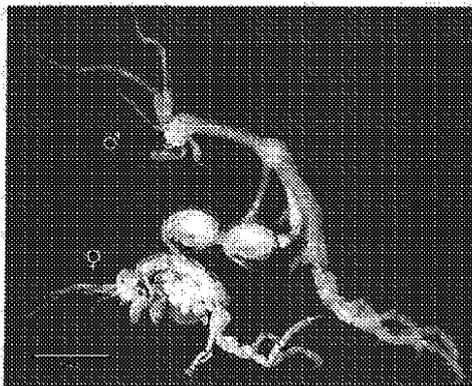
A)

【 図 2 B) 】



B)

【 図 3 A) 】



A)

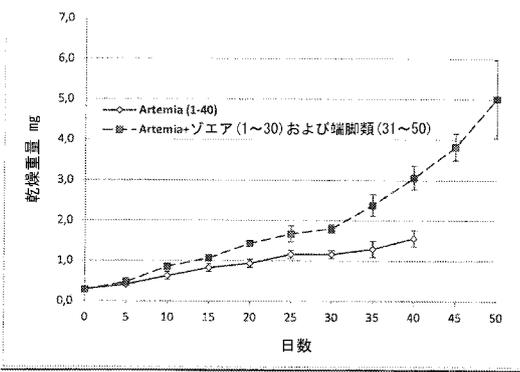
【 図 3 B) 】



B)

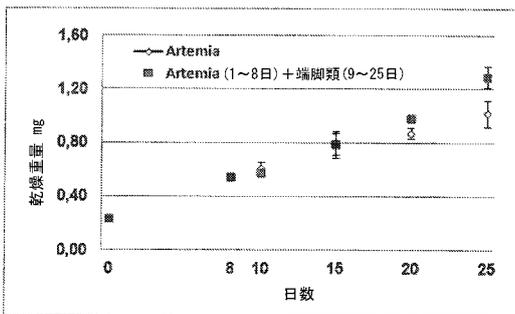
【 図 4 A 】

図 4A



【 図 4 B 】

図 4B



【 図 5 A 】

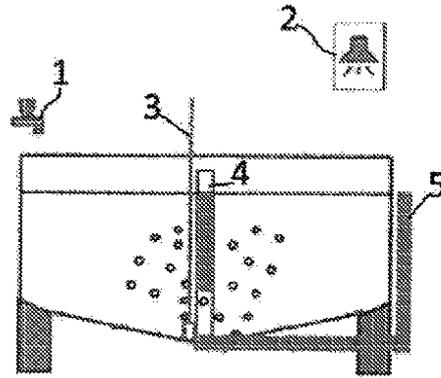


FIG. 5A

【 図 5 B 】

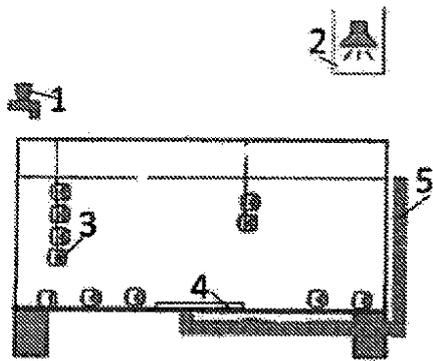
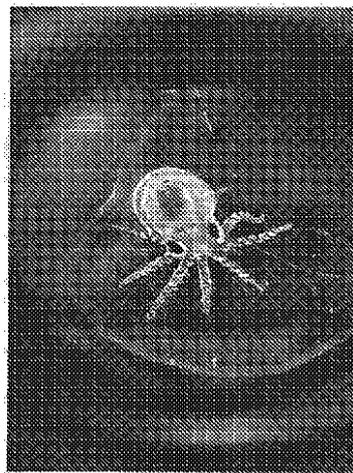


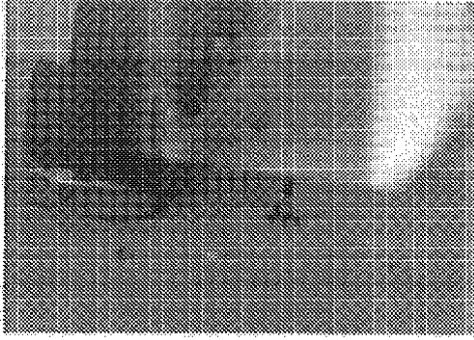
FIG. 5B

【 図 6 A) 】



A)

【 図 6 B) 】



B)

【 国際調査報告 】

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2018/070749

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD INV. A01K61/00 De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.		
B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA		
Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación) A01K		
Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda		
Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	IGLESI AS ET AL: "Rearing of Octopus vulgaris paralarvae: Present status, bottlenecks and trends", AQUACULTURE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol .266, no. 1-4, 24 April 2007 (2007-04-24), pages 1-15, XP022043601, ISSN: 0044-8486, DOI: 10.1016/J. AQUACULTURE.2007.02.019 abstract pages 2-13 ----- -/--	1-23
<input checked="" type="checkbox"/> En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos <input type="checkbox"/> Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo		
* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		
Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 9 Abril 2019	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 16/04/2019	
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Funcionario autorizado Rojo Galindo, Ángel	
N° de fax	N° de teléfono	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2018/070749

C (continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	<p>ELENA BAEZA-ROJANO ET AL: "Marine gammarids (Crustacea: Amphipoda): a new live prey to culture Octopus maya hatchlings", AQUACULTURE RESEARCH, vol . 44, no. 10, 29 Abril 2012 (2012-04-29), páginas 1602-1612, XP055578554, GB ISSN: 1355-557X, DOI: 10.1111/j.1365-2109.2012.03169.x resumen página 1602 - página 1609</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-23
A	<p>ELENA BAEZA-ROJANO ET AL: "Use of Amphipods as alternative prey to culture cuttlefish (Sepia officinalis) hatchlings", AQUACULTURE, vol . 300, no. 1-4, 1 Febrero 2010 (2010-02-01), páginas 243-246, XP055578623, Amsterdam, NL ISSN: 0044-8486, DOI: 10.1016/ j .aquaculture.2009.12.029 resumen páginas 243-245</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-23
A	<p>SHIGEN0BU OKUMURA ET AL: "Improved survival and growth in Octopus vulgaris paralarvae by feeding large type Artemi a and Pacific sandeel , Ammodytes personatus", AQUACULTURE, vol . 244, no. 1-4, 1 Febrero 2005 (2005-02-01), páginas 147-157, XP055578519, Amsterdam, NL ISSN: 0044-8486, DOI: 10.1016/ j .aquaculture.2004.11.044 resumen páginas 147-156</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-23
A	<p>ROGER VILLANUEVA: "Experimental rearing and growth of planktonic Octopus vulgaris from hatching to settlement.", CANADIAN JOURNAL OF FISHERIES AND AQUATIC SCIENCES, vol . 52, no. 12, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 2639-2650, XP055578522, resumen páginas 2639 - página 2649</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/ES2018/070749

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A01K61/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A01K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	IGLESIAS ET AL: "Rearing of Octopus vulgaris paralarvae: Present status, bottlenecks and trends", AQUACULTURE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 266, no. 1-4, 24 April 2007 (2007-04-24), pages 1-15, XP022043601, ISSN: 0044-8486, DOI: 10.1016/J.AQUACULTURE.2007.02.019 abstract pages 2-13 ----- -/--	1-23
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 9 April 2019		Date of mailing of the international search report 16/04/2019
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Rojo Galindo, Ángel

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/ES2018/070749

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>ELENA BAEZA-ROJANO ET AL: "Marine gammarids (Crustacea: Amphipoda): a new live prey to culture Octopus maya hatchlings", AQUACULTURE RESEARCH, vol. 44, no. 10, 29 April 2012 (2012-04-29), pages 1602-1612, XP055578554, GB ISSN: 1355-557X, DOI: 10.1111/j.1365-2109.2012.03169.x abstract page 1602 - page 1609 -----</p>	1-23
A	<p>ELENA BAEZA-ROJANO ET AL: "Use of Amphipods as alternative prey to culture cuttlefish (Sepia officinalis) hatchlings", AQUACULTURE, vol. 300, no. 1-4, 1 February 2010 (2010-02-01), pages 243-246, XP055578623, Amsterdam, NL ISSN: 0044-8486, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2009.12.029 abstract pages 243-245 -----</p>	1-23
A	<p>SHIGENOBU OKUMURA ET AL: "Improved survival and growth in Octopus vulgaris paralarvae by feeding large type Artemia and Pacific sandeel, Ammodytes personatus", AQUACULTURE, vol. 244, no. 1-4, 1 February 2005 (2005-02-01), pages 147-157, XP055578519, Amsterdam, NL ISSN: 0044-8486, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2004.11.044 abstract pages 147-156 -----</p>	1-23
A	<p>ROGER VILLANUEVA: "Experimental rearing and growth of planktonic Octopus vulgaris from hatching to settlement.", CANADIAN JOURNAL OF FISHERIES AND AQUATIC SCIENCES, vol. 52, no. 12, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 2639-2650, XP055578522, abstract page 2639 - page 2649 -----</p>	1-23

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(72)発明者 ロドリゲス ドス サントス ドミンゲス, ペドロ ミゲル
スペイン, 28002 マドリード, 8, コラゾン デ マリア

(72)発明者 アルマンサ ベッコ, エドゥアルド
スペイン, 28002 マドリード, 8, コラゾン デ マリア

(72)発明者 ラゴ ロウコ, マリア ヘスス
スペイン, 28002 マドリード, 8, コラゾン デ マリア

(72)発明者 ガルシア フェルナンデス, パブロ
スペイン, 28002 マドリード, 8, コラゾン デ マリア

(72)発明者 ベレス リアル, エヴァリスタ
スペイン, 28002 マドリード, 8, コラゾン デ マリア

Fターム(参考) 2B005 GA05 GA09 LA05 MB05
2B104 AA13 BA01 BA08 CB53 EG03
2B150 AA07 CD34 DD01