

# 平成28年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input checked="" type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	養殖漁場の健全性評価における新規な海洋細菌種の探索	
研究者所属・氏名	研究代表者：農学部 水産学科 講師 永田 恵里奈	

## 1. 研究目的・内容

養殖漁場底泥の有機汚濁による劣化の程度を把握するために使われている硫化物量や硫酸還元菌数などの指標は、すでに養殖漁場の環境が劣化してしまった『結果』を把握する指標である。養殖漁場の劣化が起きる『予兆』を知る指標があれば、漁場の回復・改善にかかる労力は少なくてすむ。本研究では、養殖漁場海底泥から漁場劣化の早期発見に使える指標細菌を探索するため、その候補となる海洋細菌のカルチャーコレクションを構築した。

## 2. 研究経過及び成果

養殖漁業においては、閉鎖的な内湾などに設置された網生簀で魚類を高密度で飼育し、系外から大量の有機物を餌飼料として投与している。養殖魚の餌の食べ残しや糞などの海底に堆積した有機物は、自然環境の浄化能力、すなわち水柱や底泥に存在する微生物（主に細菌）により、ある程度は分解・無機化される。しかし、夏季の高水温時には海水の鉛直混合が十分に行われず、水域が成層化し、表層から底層への酸素の供給が不十分になる。この時期に海底に達する有機物量が多くなると、微生物による分解・無機化による酸素消費量が増え、海底は貧酸素状態になる。すると、底泥中の乳酸などの有機酸濃度が上がり始め、硫酸還元細菌がこれを電子供与体として利用し硫化水素を生成する。魚介類の生産性が低下する自家汚染（漁場劣化）の始まりである(図)。

漁場劣化の程度を評価するために、従来は底泥に蓄積した硫化物量や硫酸還元細菌数が用いられていた。しかし、これらの指標は、すでに養殖漁場の環境が劣化してしまった『結果』を調べているにすぎない。劣化を予防するためには、劣化が起きる予兆を知る指標の方が役にたつ。そこで、本研究では、養殖漁場の底泥から「漁場劣化を早期発見する指標細菌」になりそうな海洋細菌を見つけることを目的とした。

本研究では、「漁場劣化を早期発見する指標細菌」として乳酸菌に着目した。底泥の硫酸塩還元活性は硫酸還元細菌の現存量ではなく、有機酸（主に乳酸）濃度に依存し、有機酸量が硫化水素の生成に強く関わっていることが知られている。従って、底泥で乳酸の蓄積に貢献していると考えられる生理活性の高い乳酸菌数を指標とすれば劣化の進行を事前に察知できるのではないかと考えた。本研究課題に着手する前に行った予備調査により、①分離培養法により養殖漁場海底の泥から乳酸菌を検出

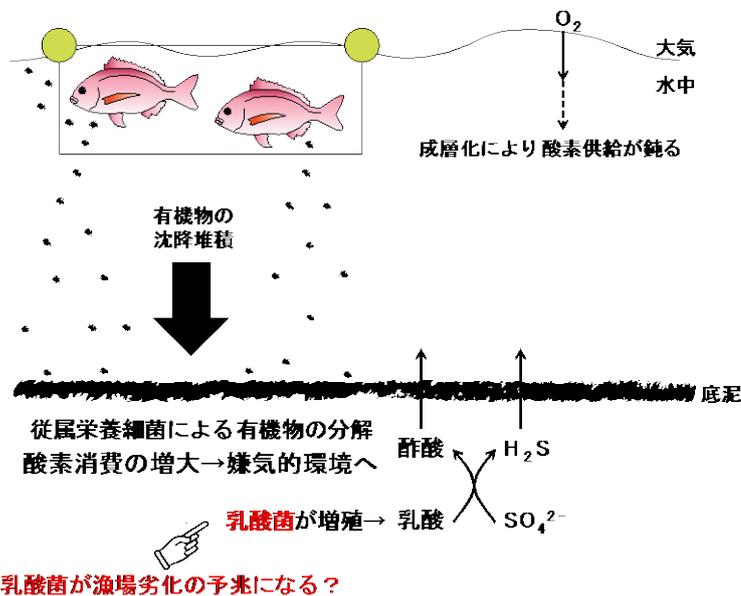


図 夏季の養殖漁場底層での貧酸素化の進行

可能であること、②年間を通して給餌養殖をしている海底の方が非養殖域の海底よりも乳酸菌が多く存在していること、③養殖漁場海底の泥に存在する生理活性の高い乳酸菌は冬季よりも夏季に多くなることを明らかにしていた。これらのことは、養殖活動が海底の乳酸菌に影響を及ぼしていることを示している。そこで、本研究課題では、養殖活動の活発な海域の海底泥から夏季（6月～9月）に2週間ごとに乳酸菌を分離・培養し、細菌種の同定を行った。

和歌山県田辺湾の養殖漁場内の養殖魚（マダイやシマアジ）が入っている養殖生簀直下の地点と、養殖魚が入っていない空生簀直下の地点でサンプリングを実施した。エックマン・バージ型採泥器にて海底の泥を採取し、船上で滅菌済み薬サジを用いて、表層0～1 cm層の泥を採取した。採取した泥0.5 gをリン酸緩衝生理食塩水（PBS）4.5 mLに入れ、激しく攪拌して細菌を遊離させた。この細菌懸濁液を1/10ずつPBSで段階的に希釈し、各希釈段階の細菌懸濁液0.1 mLを、de Man、Rogosa、Sharpe（炭酸カルシウム1%添加）寒天培地（MRSA培地）に塗抹した。20℃と30℃の嫌気状態で1週間培養し、MRSA培地上の白色で透明帯を持つコロニーを乳酸菌と判断した。乳酸菌コロニーを釣菌し、新しいMRSA培地上に画線する作業を3回繰り返し、乳酸菌を純粋分離した。分離した乳酸菌コロニーを用いてMALDI Biotyper 3.1（Bruker Daltonics社）にて細菌種同定を試みた。MALDI-TOF MSで同定できなかった細菌種については、16S rRNA遺伝子の塩基配列相同性解析を行い、相同性の高い細菌種の検索を行った。また海底の水温と溶存酸素との関係も調べた。

養殖生簀と空生簀の下の海底に存在している乳酸菌数には違いが見られ、養殖魚の入っている生簀の下の方が乳酸菌が多く存在することがわかった。20℃と30℃の異なる培養温度によって乳酸菌数に大きな違いがでることはなかった。水温や溶存酸素濃度は、生簀の中に魚がいるかどうかに関わらず、全ての地点で同様の傾向を示していた。乳酸菌は、生簀の中に魚がいるほうが多く分離されていたので、水温や溶存酸素よりも、養殖活動の方が乳酸菌数の増減に影響していると考えられる。分離株の細菌種同定を行ったところ、海底の乳酸菌集団は、少なくとも14種類の乳酸菌から構成されており、そのうち2種類の乳酸菌は養殖生簀の下から高頻度で分離された。

### 3. 本研究と関連した今後の研究計画

本研究により、生簀の中に魚がいるかどうか底泥の乳酸菌の数に影響を与えていることがわかった。さらに、本研究で分離された少なくとも2種類の乳酸菌は、養殖活動の影響を強く受けていることが示唆された。乳酸菌は、養殖をおこなっている海域に特徴的な細菌であることが明らかとなったことから、養殖漁場劣化の兆候を早期に把握するための手法として乳酸菌を活用できると考えられる。今後は、本研究で存在を確認した乳酸菌2種の増減を迅速・簡便に検出するDNAモニタリング手法を開発し、実際の養殖場での分布調査を実施する。

### 4. 成果の発表等

発表機関名	種類（著書・雑誌・口頭）	発表年月日（予定を含む）
環境微生物系合同大会 2018	ポスター発表	2017年8月29-31日（予定）