

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05798

研究課題名(和文) 海洋性乳酸菌を用いた養殖漁場悪化の早期発見法の開発

研究課題名(英文) Development of early detection approach of eutrophication at a coastal fish farming area using marine lactic acid bacteria

研究代表者

永田 恵里奈(NAGATA, ERINA)

近畿大学・農学部・講師

研究者番号：20399116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、魚類養殖場で進行する有機汚濁を早期に検知する「隠れメタボ診断」の様なツールの開発を目指した。魚類養殖を行うと、底泥においてBacteroidia綱、Clostridia綱、Spirochaetia綱、Fusobacteriia綱、Bacilli綱などの発酵微生物群の割合が増加した。有機汚濁が進行した危機的漁場の海底の細菌群集構造は硫化物や含水率と高い相関を示し、健全な養殖漁場の海底の細菌群集構造は乳酸菌生菌数、コハク酸、総有機酸濃度、Bacilli綱と相関が高いことが示された。本研究結果から、養殖漁場の底質悪化の予兆として、検出が迅速で簡便な乳酸菌数を評価することを提案する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

養殖漁場の有機汚濁の程度を評価するために現在用いられている硫化物量や底生生物の減少などの指標は、すでに養殖漁場の環境が悪化してしまった『結果』を調べていることになる。結果をみてから対策を講じるということでは後手に回る感があるのは否めない。漁場の悪化を早期発見し、回復のための措置(治療)を行えば、人間が手を貸さなくても環境がもともと持つ自然の浄化能力が働くことが期待でき、漁場回復の労力は従来よりも軽減されるであろう。本研究結果は、環境の保全・修復をしながら養殖生産を行う持続可能な次世代の養殖業の構築へ大きく貢献できる。

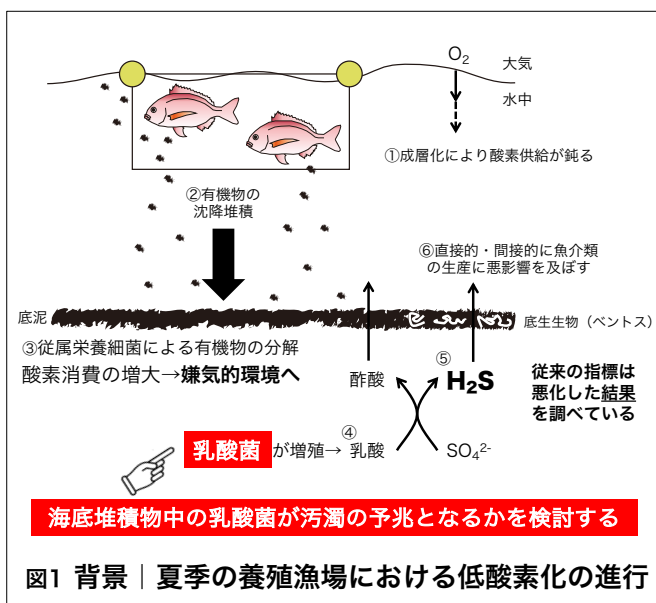
研究成果の概要(英文)：In this study, we aim to develop a tool similar to “hidden metabolic syndrome diagnosis” that can detect organic pollution progression in marine aquaculture sediment at an early stage. We found that aquaculture increased the proportion of fermentative bacteria such as Bacteroidia, Clostridia, Spirochaetia, Fusobacteriia and Bacilli in the seabed sediment. The bacterial community structure in the sediment of “critical area” where organic pollution has already progressed showed a high correlation with sulfide and water content. However, the bacterial community structure in the sediment of healthy and/or moderately eutrophicated areas showed a high correlation with the number of viable lactic acid bacteria, succinic acid and total organic acid concentration. In conclusion, we propose a simple tool to evaluate sediment deterioration in non-critical aquaculture sites by measuring the amount of easily detectable live lactic acid bacteria that act as a marker of deterioration.

研究分野：水産微生物学

キーワード：乳酸菌 魚類養殖 有機汚濁 硫化物 細菌群集

### 1. 研究開始当初の背景

内湾などに設置された網生簀で長期間にわたり魚介類の養殖をおこなうことにより、漁場環境が悪化し、その海域での生産性が低下する自家汚染がおきる。夏季の高水温時には、海水の鉛直混合が十分に行われず、水塊が成層化し底層水が停滞する(図1①)。そこに有機物が大量に負荷されると(図1②)、底泥の有機物を分解する従属栄養細菌の酸素消費量が増大し、底層水の低酸素化が進行する(図1③)。続いて、底泥中の乳酸などの有機酸濃度が増大し始め(図1④)、硫化物生成が進行する(図1⑤)。

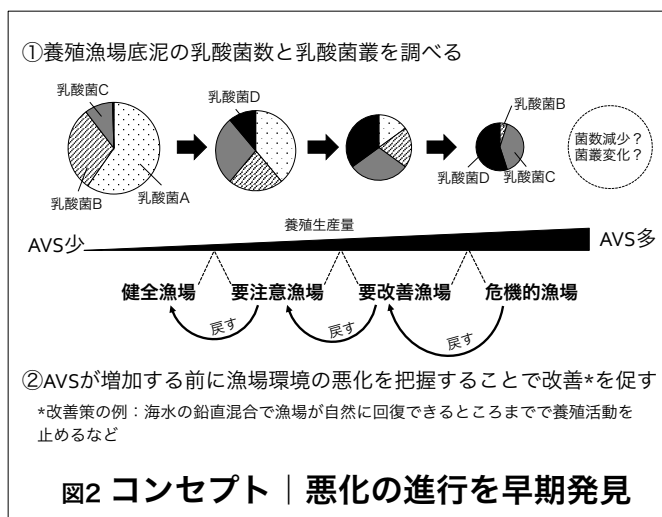


これまで養殖漁場の有機汚濁の程度を評価するために、底泥に蓄積した硫化物量(酸揮発性硫化物: AVS)や底生生物(ベントス)等が指標として用いられてきた(Yokoyama, Rev. Aquacul. 2010)。これらの指標は、すでに養殖漁場の環境が悪化してしまった『結果』を調べていることになる。結果をみてから対策を講じるということでは後手に回る感があるのは否めない。漁場の悪化を早期発見し、回復のための措置(治療)を行えば、人間が手を貸さなくても環境がもともと持つ自然の浄化能力が働くことが期待でき、漁場回復の労力は従来よりも軽減されるであろう。

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明らかになっている(Maeda and Kawai, Nippon Suisan Gakkaishi, 1988; 菅原庸, Nippon Suisan Gakkaishi, 1998)。そこで申請者らは、底泥で有機酸(主に乳酸)の蓄積に貢献していると考えられる細菌(本研究では乳酸菌)を指標とすれば漁場環境の悪化の進行を今までよりも早い段階で把握できるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、漁場悪化の進行を早期発見するための新しい評価指標の開発である。養殖漁場の環境、特に底質の悪化を早期発見するために、海底の硫化物量、乳酸菌種数や生菌数、発酵代謝産物である有機酸の種類や量、細菌叢などを調べ、底質悪化の予兆としての乳酸菌の有効性について検証した。



### 3. 研究の方法

和歌山県田辺湾の養殖生簀設置水域において、2017年から2019年にかけて、底質悪化の程度が異なる St. 0J (平均 AVS-S=0.24 mg-S/g-dry mud) と St. UM (平均 AVS-S=1.16 mg-S/g-dry mud) を調査した。エクマンバージ採泥器で採取した底泥(表層1 cm)について、AVS、含水率、乳酸菌数、分離培養した乳酸菌の種類、有機酸そして細菌叢(16S rRNA)を調べた。

### 4. 研究成果

調査を行った St. 0J と St. UM の海底の溶存酸素濃度は、夏の高水温期になるほど低くなり、2018年9月の最も低い時には3.6 mg/Lとなったが、水温が低下する冬季に回復した。St. 0J で

は、2018年9月23日から10月3日にかけて生簀が空になった期間（12日間）を除いて、常にマダイ成魚を飼育していた。St. UMでは2017年は3月末から5月末まで、2018年は4月から5月末までマダイ稚魚を飼育し、それ以外の期間は魚を飼育していなかった。

両地点のAVS-Sは、St. OJでは平均AVS-S=0.24 mg-S/g-dry mudであり、St. UMでは平均AVS-S=1.16 mg-S/g-dry mudであった。AVS-Sは春から夏にかけて上昇し、秋が最も高く、冬から春にかけて減少する傾向を示した。

St. OJでは年間を通じて乳酸菌が検出された。一方、St. UMでは乳酸菌が検出されないか、検出されてもSt. OJよりも乳酸菌数が約1桁少なかった。乳酸菌数は6月に高くなり、その後10月と11月にも高くなる傾向を示した。20℃と30℃で培養した乳酸菌数はおおむね同様であったが、20℃の培養ではコロニー形成が見られない試料があった。MALDI-TOF MSで同定できた乳酸菌種はSt. OJで31種であり、St. UMでは7種であった。

有機酸分析の結果、St. OJとSt. UM共に、年間を通じて常に低濃度のコハク酸が検出された。St. OJでは、2018年8月8日にギ酸が検出された。そして、St. OJでは、10月から12月にかけて酢酸が検出された。8月6日に赤潮が発生していたこと、10月4日からマダイの養殖を再開したことが有機酸検出の理由と考えられた。養殖漁場の泥の有機酸分析データから、有機物負荷に対して鋭敏に反応していることがわかった。養殖を継続していた漁場の泥では有機酸の急激な増加は見られなかった。

St. OJとSt. UMに存在する細菌叢を比較したLDAスコアから、両地点を特徴づけるバイオマーカーを探した。St. OJに比べて、St. UMにはArchaeaが多く、Bacteria domainでSt. UMに特徴的なのは、Desulfosarcinaceae、Anaerolineaceae、Calditrichaceae、Desulfatiglandaceae、Syntrophobacterales、Lactobacillales、Nitrospirota、Patescibacteria、Verrucomicrobiota、Zixibacteriaであった。St. OJに特徴的だったのは、上位から、Bacteroidia、Pirellulaceae、Clostridia、Peptostreptococcales\_Tissierellales、VibrionaceaeやAlteromonadalesなどであった。

Uede (Uede, 2008) の基準にしたがって、海底のAVS-Sをもとにサンプルを以下の7群に分けた、すなわち、0.1以下 (n=3)、0.22以下 (n=8)、0.43以下 (n=8)、0.71以下 (n=3)、1.0以下 (n=1)、1.5以下 (n=11)、1.5以上 (n=6) の7グループである。観測されたOTUはおおよそ99%でありサンプルに存在する細菌叢を網羅しており、観測されない種の推定存在確率は低かった。観測されたOTU数が最も多かったのは0.71以下のグループであった。系統的な多様性が最も高いのもAVS-Sが0.71以下の地点であった。種数の多さや均等度の指標が高いのも0.71以下の地点となり、AVS-Sが少なくてもAVS-Sが多くても多様性が低くなり、存在する生物種の偏りがあることがわかった。PCoA解析の結果、AVS-Sをもとにして分けた7つのグループごとに類似した細菌群集構造を示し、AVS-Sの濃度に応じて、細菌の群集構造が変化している。

St. OJでは、2018年9月23日から10月3日にかけて12日間養殖を休止した。養殖再開後のSt. OJの海底では、Bacteroidia、Clostridia、Bacill、Desulfobacteria、Spirochaetes、そしてFusobacteriaの相対現存量が増加していた。St. OJに存在する細菌叢をAVS-S毎に両地点を特徴づけるバイオマーカーを探した。養殖休止後AVS-Sが上昇したAVS-S 0.71以下の地点では、Bacteroidales、Desulfobacterales、IzemoplasmatalesやSpirochaetalesなど138のマーカーが検出された。

St. OJとSt. UMにおいてAVS-Sに対して正の相関を示したのは含水率であり、コハク酸、総有機酸、20℃で培養した乳酸菌数 (LAB20) と30℃で培養した乳酸菌数 (LAB30) は負の相関を示した。St. OJのパラメーターのみで相関を調べると、AVS-SとLAB20の間に正の相関が、LAB20とLAB30に対してBacilliの間に正の相関が示された。総有機酸に対してLAB20、LAB30、そしてAVS-Sは正の相関を示した。St. UMでは、コハク酸に対して総有機酸とLAB20が、水温に対して含水率とAVS-Sが正の相関を示した。

nMDS解析の結果、St. OJとSt. UMで異なる環境変数と相関があることが示された。St. OJはコハク酸、総有機酸、LAB30、LAB20、そしてBacilliの存在量と相関が強いことが示された。St. UMはAVS-Sと含水率との相関が示された。

本研究結果から、養殖漁場の底質悪化の予兆として、検出が簡便な乳酸菌数を評価することを提案する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永田恵里奈・杉崎光葉・中瀬玄徳・江口 充
2. 発表標題 魚類養殖場を模したマイクロコズム における底質と乳酸菌数の短期間での変化
3. 学会等名 令和二年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永田恵里奈・宮本昌佳・杉 勇佑・中瀬玄徳・江口 充
2. 発表標題 魚類養殖場の底質悪化と海底の乳酸菌の関係
3. 学会等名 平成31年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中瀬玄徳・永田恵里奈・谷口亮人・江口 充・家戸敬太郎
2. 発表標題 養殖漁場の利用休止時の底質回復と漁場特性との関係
3. 学会等名 平成31年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永田恵里奈・中瀬玄徳・江口 充
2. 発表標題 養殖漁場の底質悪化を早期発見するための乳酸菌の利用
3. 学会等名 令和三年度日本水産学会秋季大会
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
研究 分担者	中瀬 玄德  (Nakase Gentoku)  (40454623)	近畿大学・水産研究所・講師    (34419)	

	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
連携 研究者	澤辺 智雄  (Sawabe Tomoo)  (30241376)	北海道大学・水産科学研究科(研究院)・教授    (10101)	

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
---------	---------