

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月24日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05252

研究課題名(和文)メコンデルタの魚類養殖と組み合わせた赤潮藻類による有用脂質生産

研究課題名(英文)Oil production of bloom forming algae in conjunction with fish aquaculture in Mekong delta

研究代表者

和田 実 (WADA, Minoru)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・教授

研究者番号：70292860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：メコンデルタのホコハゼ養殖池で常に高密度で存在する優占緑藻について18SrRNA遺伝子配列から分子系統を推定するとともに、各緑藻株の細胞内脂質蓄積を評価した。さらに緑藻株と共存する細菌群集の16SrRNA遺伝子配列を解析した。その結果、ホコハゼ養殖池由来の緑藻の多くはオオキスティス科に近縁だった。それらは中性脂質を蓄積し、細胞あたりの脂質含量や脂質成分の多様性において優れた性質を示す株も見出された。緑藻株と共存する細菌は他の緑藻株に対する増殖促進作用などが知られているリゾビア科やプレブドモナス属、スフィンゴモナス属などの分類群に属す種類を含み、塩分環境に鋭敏に応答することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は南ベトナム・メコンデルタのホコハゼ養殖池における常在緑藻に注目して、その種類(分子系統)、増殖特性、脂質蓄積能および、共存細菌との相互作用の観点から緑藻の特徴を初めて明らかにしたものである。その成果は、医薬・食品分野への応用が期待される。3脂肪酸を含む油脂生産において、これまで未知の微生物資源であった水産養殖環境に由来する緑藻の潜在的な有用性を明らかにするとともに、「魚を育てながら、意図的に赤潮藻類を増やして高付加価値産物を得る」という、新たな養殖事業の可能性を示した点で社会的な意義をもつ。

研究成果の概要(英文)：In search of potential microbial resources for the production of valuable oil, we examined the green algal strains that had been isolated from aquaculture ponds of the mudskipper, *Pseudapocryptes elongates* in Mekong Delta. The 18S-rRNA gene sequences revealed most of the algae were affiliated with Oocystaceae, had better growth characteristics (specific growth rates and maximum growth yield). A couple of the algal strains even showed greater extent of oil accumulation and fatty acid diversity per cell than that of *Chlorella vulgaris*. We also examined bacteria associated with the non-axenic strains of Oocystis based on the bacterial 16SrRNA amplicon sequencing. The predominant bacteria in the late log phase of the algal growth included those affiliated with Rhizobiaceae, Brevundimonas, and Sphingomonas, all of which had been known for their ability to promote algal growth. Predominant bacteria varied sensitively in response to the change in salt condition of algal culture.

研究分野：水圏微生物学

キーワード：ホコハゼ 養殖池 メコンデルタ 緑藻 脂質蓄積

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

閉鎖的な池で魚介類を給餌飼育すると、堆積した残餌や排泄物から窒素やリン等が溶出し、富栄養化によって微細藻類は容易に赤潮化する。赤潮になると藻類自身が有害・有毒性種でなくても夜間にはおびただしい数の細胞が呼吸するため、給気が不十分な場合には池全体を低酸素化あるいは無酸素化するなど生産性低下の要因となり得る。一方、養殖池の赤潮藻類が有用物質をつくるならば、その「回収および利用」を進めることによって、閉鎖的な池における養殖業の付加価値を高め、養殖環境の改善にもつながる可能性がある。養殖池で赤潮を形成する微細藻類は、シアノバクテリア、珪藻、緑藻、渦鞭毛藻など多岐にわたるが、いずれの種類も潜在的に有用物質の生産能力を持っている。実際に微細藻類は「21世紀のバイオマス資源」として注目され、特にバイオ燃料の生産に対して国内外で大きな関心が高まっており、中性脂質や炭化水素など「脂質」生産能力の高い藻類について研究が盛んに行われている(引用文献)。水産分野では藻類由来の脂質の中で高度な生理作用を持つDHAやEPAなどのオメガ3脂肪酸、抗酸化活性が高いカロテノイド等が、餌料の栄養強化に使われている。しかし脂質を燃料として利用するには「脂質の生産効率や機能性の高度化」と「大量培養の低コスト化」を強力に進めることが必要であり、これらの要件を満たす「有用微細藻類の探索」と「低コストな大量培養法」の開発には多くの余地が残されている。

先行研究によりメコンデルタで展開しているホコハゼ (*Pseudoapocryptes elongatus*) の養殖池では水は常に濃緑色を呈し、クロレラに近縁と考えられる微細緑藻類が高い密度細胞で存在していることを予備的に見出した。一方、ホコハゼは空気呼吸するため、水質悪化や貧酸素化の影響を受けずに成長できる。こうしたホコハゼの養殖に給気や攪拌は不要で、エビ養殖に比べて格段に少ない投資で容易に実施できるため、西暦2000年以降Bac Lieuとその周辺のメコンデルタにおいて養殖面積が急速に拡大している(引用文献)。これまでにホコハゼ養殖池のクロレラを主体とした赤潮藻類による有用脂質生産能力は未知だが、藻類はホコハゼの飼育過程で自律的に増えるため、藻類培養のために新たなコストがかからない点は注目すべきである。

2. 研究の目的

以下の3つの研究目的を掲げた。

- (1) <ホコハゼ養殖池の水質および微細藻類群集の組成解析>
メコンデルタのホコハゼ養殖池において、水質調査ならびに微細藻類の群集組成解析を行い、養殖池における「水質」と「藻類の多様性」を明らかにする。
- (2) <微細藻類カルチャーコレクションの構築と有用脂質生産能力のスクリーニング>
養殖池から微細藻類を分離・培養して、カルチャーコレクションを構築するとともに、分離株の有用脂質生産能力を明らかにする。
- (3) <魚類養殖と組み合わせた藻類株の培養および有用脂質生産の実践と評価>
有用脂質の生産に優れ、ホコハゼの養殖稚魚(種苗)に対して無害であることを確認した株を、魚類養殖と組み合わせて培養し、魚と有用脂質の生産を同時に行う新規な養殖事業の可能性を実践的に評価する。

3. 研究の方法

- (1) <ホコハゼ養殖池の水質および微細藻類群集の組成解析>
試料採取: 2015年8月(雨期)および2016年3月(乾期)に、ベトナム・メコンデルタのBac Lieu省におけるホコハゼ養殖池、ならびに対照として近隣のエビ養殖池から採水を行い水質分析および微細藻類株の分離・培養に供した。また先行研究で同じ養殖池で採水後にホルマリン固定した試料を微細藻類解析に供した。
水質分析: 試水のクロロフィル濃度を簡易蛍光光度計により求め、アンモニア態窒素およびリン酸態リン濃度を吸光度法により測定した。
藻類群集組成解析: 固定試料を枠付きのスライドグラスに入れて、顕微鏡観察により外部形態から科・属レベルでの同定を行った。
細菌数: DAPI染色した固定試料を黒色のポリカーボネートフィルターで濾過した後、蛍光顕微鏡下で計数した。
- (2) <微細藻類カルチャーコレクションの構築と有用脂質生産能力のスクリーニング>
緑藻の分離・純化(単藻化): 2015年および2016年にホコハゼ養殖池で採取した試水から微細藻類を純粋分離し、IMK培地に継代培養した。
藻類株の分子系統解析: 各緑藻株からDNAを抽出し、18S rRNAの塩基配列から分子系統を推定した。
藻類株の増殖特性試験: 各緑藻株を塩分10のIMK培地で培養し、24時間明条件、28℃、二酸化炭素通気下で比増殖速度、最大到達細胞量を評価した。
藻類株の脂質蓄積能評価: 脂質含量については各緑藻株を塩分10のIMK培地で培養後、ナイルレッドを用いて細胞内脂質含量を蛍光顕微鏡およびフローサイトメーターを用いて、蛍光強度から評価した。脂質蓄積量と増殖速度、収量が高い藻類株についてはガスクロマトグラフィー法による脂質成分分析も行った。
- (3) <魚類養殖と組み合わせた藻類株の培養および有用脂質生産の実践と評価>

上記(2)の各種スクリーニングにおいて優れた性質を示した藻類株 (*Oocystis* sp) を用いて、動物プランクトン(ワムシ)へ給餌し、ワムシの生涯産仔数、寿命、バッチ培養下での増殖速度をクロレラ プルガリス (*C. vulgaris*)を給餌した場合と比較した。同じ緑藻株をマングロープキリフィッシュの仔魚飼育水槽に添加し、仔魚の全長を測定した。

同じ緑藻株をベトナムの Can Tho(カントー)大学構内においてホコハゼの稚魚と共存させて約1ヶ月間飼育した。飼育前後の稚魚の全長および体重を測定した。

4. 研究成果

(1) <ホコハゼ養殖池の水質および微細藻類群集の組成解析>

水質分析結果：

雨期にホコハゼ養殖池 (n=2)におけるクロロフィル濃度(ウラン換算値)は0.1mg/Lを超えたのに対して、近隣のエビ養殖池 (n=1)では0.1mg/L未満となったが、乾期では、ホコハゼ養殖池のクロロフィル濃度は雨期の10%以下に低下していた。乾期のホコハゼ養殖池のアンモニア態窒素は1-8 mg/L、リン酸態リンは0.04-0.7 mg/Lの範囲にあり、エビ養殖池と比べてアンモニア濃度は高く、リン酸濃度は著しく低いことが示された。

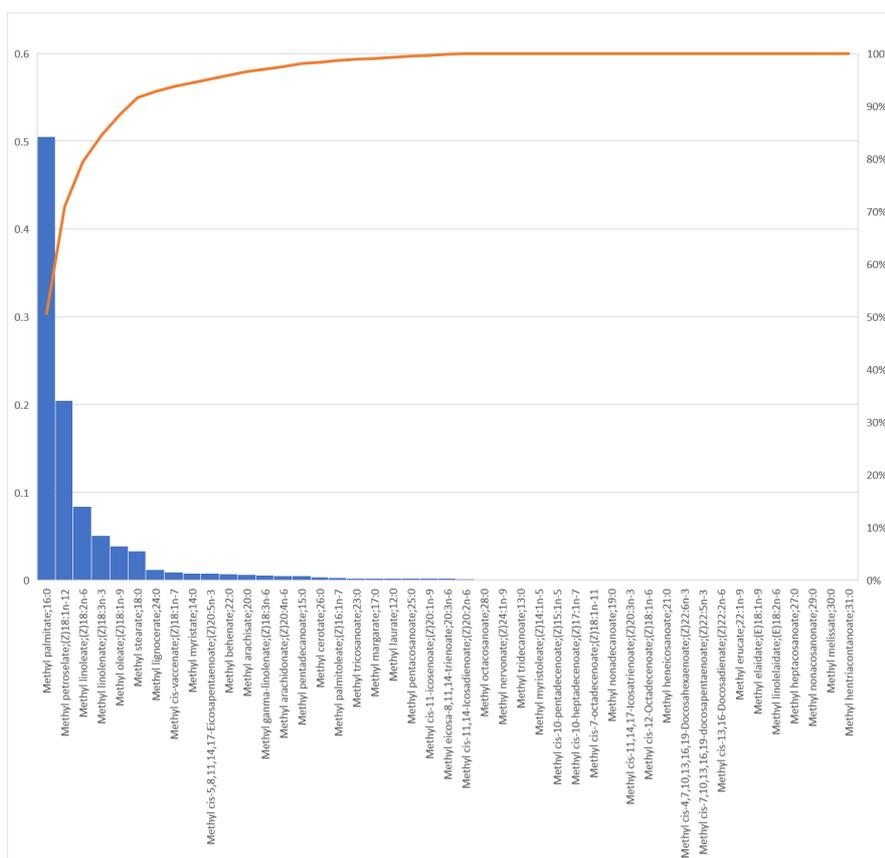
藻類群集組成解析結果：細胞の形態から推定された *Chlorella* 属だけでなく、*Oocystis* 属や *Trebouxiophyceae* 属などの緑藻類も含まれることが分った。

(2) <微細藻類カルチャーコレクションの構築と有用脂質生産能力のスクリーニング>

藻類株の分子系統解析結果：緑藻5株中4株はオオキスティス科、残り1株はクロレラ科に近縁だった。

藻類株の増殖特性試験結果：比増殖速度は0.58~1.52 (h⁻¹)、増殖収量も1Lあたり10の6乗細胞から10の7乗細胞の範囲を示し、同じ系統群に属す緑藻株において、増殖特性には顕著な違いがあることを見出した。比増殖速度、到達密度、乾燥重量はいずれも *Chlorella vulgaris* と同程度もしくはそれ以上の値を示した。

藻類株の脂質蓄積能評価の結果：緑藻株は定常期中性脂質を蓄積したが、細胞あたりの脂質含量はF1G388株において顕著に高かった。藻体湿重量100gあたりの不飽和脂肪酸量および飽和脂肪酸量はそれぞれ300mgと400mgだった。脂肪酸組成としては、中性脂質を構成する脂肪酸は、主にテトラデカン酸{ミリスチン酸(炭素数は14、二重結合数は0)}ヘキサデカン酸{パルミチン酸(炭素数は16、二重結合数は0)}ヘキサデセン酸{パルミトレン酸(炭素数は16、二重結合数は1)}オクタデセン酸{オレイン酸(炭素数は18、二重結合数は1)}だった(下図参照)。



図：オオキスティス科緑藻株の脂肪酸組成の例

共存細菌の組成解析の結果:Oocystis 属緑藻株の培養液中には従属栄養性細菌が共存しており、その数は緑藻株の増加と対応するように共存細菌数も増加する傾向を示した。Oocystis sp. 株の培養液中に存在する従属栄養性細菌群の中から分離株として得られた共存細菌の多くが Microbacterium 属であることが分かった。緑藻類の共存細菌群集の 16SrRNA 遺伝子タグシーケンス解析により、この細菌グループが、最も優占する一群であることも確かめられた。

同じ藻類の培養液から抽出した細菌 DNA について 16SrRNA 遺伝子のタグシーケンスを行ったところ、Microbacterium 属と Rhodobacter 属が同程度に優占し、全配列の約 40% を占めることを見出した。その次に Ralstonia 属細菌が優占することが分かった。また分離から 1 年半が経過した同じ藻類株について、再度、共存細菌組成を解析したところ、海水培地では F1G387 の定常期に Nocardioideae, Rhizobiaceae および Sphingobium の細菌が優占し、淡水培地では Brevundimonas や Sphingomonas の割合が顕著に増加した。

以上の結果から、ホコハゼ養殖池には、クロレラと近縁のオオキスティス科に分類される緑藻が優占しており、高いバイオマス（乾燥重量）と高い脂質生産能をもつことが示された。その多くは *C. vulgaris* よりも脂質生産において効率的であると考えられ、ホコハゼ養殖池の緑藻類が、微生物資源として高い潜在的価値を持つと言える。

(3) < 魚類養殖と組み合わせた藻類株の培養および有用脂質生産の実践と評価 >

クロレラ プルガリス (*C. vulgaris*) を給餌した場合と比較して、ワムシの生涯産仔数には差が見られなかったものの、ワムシの寿命は長くなることが分かった。一方、バッチ培養下でワムシの増殖速度を調べたところ、Oocystis を給餌した場合は *C. vulgaris* を給餌した場合に比べて遅くなるものの、最高到達密度に有意差はないことが分かった。

同じ緑藻株 (*Oocystis*.sp) をマングローブキリフィッシュの仔魚飼育水槽に添加して、いわゆるグリーンウォーター効果を調べたところ、藻類株を添加しない場合にくらべて仔魚の全長が増加する効果が認められた。

同緑藻株をホコハゼの稚魚と共存させて約 1 ヶ月間飼育したところ、稚魚の全長および体重はともに緑藻株添加区で有意に増加した。添加した緑藻株も稚魚と共存させた場合に顕著に増殖が促進された。

以上の結果は、緑藻の存在が魚類養殖現場において、魚の増殖促進に貢献している可能性を示している。

(4) < その他、本研究によって得られた成果 >

ベトナム・メコンデルタ沿岸域から新種の渦鞭毛藻類の発見：

本研究遂行時にメコンデルタ沿岸域で採取した海水中より分離した渦鞭毛藻のなかから、新種が見出された。

ラフィド藻類における細胞外溶存有機物の放出と共存細菌群集の同調的増殖・組成変化の発見：

赤潮藻類の 1 種であるラフィド藻のシャットネラマリーナが増殖依存的に細胞外に溶存有機炭素を放出しており、本研究の解析技法を用いることにより、共存する細菌群集がそれらの有機物を利用している可能性が示された。

< 引用文献 >

三井物産戦略研究所レポート 2011

Minh et al. (2010) Asian Fisheries Science 23:224-239

< 本研究実施にあたって生じた問題点と対策 >

研究開始当初はメコンデルタのなかで、南ベトナムの Bac Lieu 省にあるホコハゼ養殖池を調査地とし、養殖池の水質および底質調査を含めた観測を行う予定だったが、2015 年 8 月に渡越した際、日本を含む外国からの研究者による Bac Lieu 省への立ち入りが厳しく制限され、その後も本研究の全期間を通じて、研究代表者および分担者による養殖池での現地調査は実施できなかった。その代替措置として、ベトナム・Can Tho 大学における本研究課題の協力者にホコハゼ養殖池での採水を依頼した。このため、微細藻類株のカルチャーコレクションの拡充にも支障をきたし、分離培養株として確立できた緑藻類は 5 株となった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Wada, M., Takano, Y., Nagae, S., Ohtake, Y., Umezawa, Y., Nakamura, S., Yoshida, M., Matsuyama, Y., Iwataki, M., Takeshita, S., and Oda, T. "Temporal dynamics of dissolved organic carbon (DOC) produced in a microcosm with red tide forming algae *Chattonella marina*, and its associated bacteria.", Journal of Oceanography, 査読

有、74 卷、2018、587-593、doi.org/10.1007/s10872-017-0455-8

Takahashi, K., Moestrup, Ø., Wada, M., Ishimatsu, A., Nguyen, V. N., Fukuyo, Y., Iwataki, M., “*Dactylocladus pterobelotum* gen. et sp. nov., a new marine woloszynskioid dinoflagellate positioned between the two families *Borghiellaceae* and *Suessiaceae*.”, Journal of phycology, 査読有、53 巻、2017、1223-1240、DOI: 10.1111/jpy.12575

Wada, M., Mori, F., Yokouchi, K., Yagi, M., Takita, T., Ishimatsu, A., Iwataki, M., Takahashi, K., Mai, V. H., Vo, T. T., Ha, H. P., Tran, D. D., “Comparison of planktonic microbial abundance and dissolved oxygen consumption between the aquaculture ponds of mudskippers and shrimps in the Mekong Delta, Southern Vietnam.”, Fisheries Science, 査読有、82 巻、2016、787-797、DOI: 10.1007/s12562-016-1000-1

[学会発表](計 7 件)

和田実, 迫田亮, 皆川真行, 平坂勝也, 高橋和也, 岩滝光儀, Tran Dac Dinh, 石松惇、メコンデルタのホコハゼ養殖池で優占する緑藻類：分子系統・増殖・脂質蓄積および共存細菌からみた特徴、平成 31 年度日本水産学会春季大会、2019 年

Wen, J., Minagawa, M., Sakoda, R., Washio, K., Wada, M., “Preliminary investigation on the bacterial community composition associated with *Chattonella marina* by Next Generation Sequencing.”, The 11th International Workshop on the Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea, 2017 年

Minakawa, M., Sakoda, R., Takahashi, K., Iwataki, M., Wada, M., “Growth characteristics and molecular phylogenies of bacteria associated with a green alga derived from an aquaculture pond in Mekong Delta, southern Vietnam.”, The 11th International Workshop on the Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea, 2017 年

Sakoda, R., Minakawa, M., Takahashi, K., Iwataki, M., Hirasaka, K., Wada, M., “Molecular phylogenies and growth characteristics of green microalgae isolated from aquaculture pond in southern Vietnam.”, The 11th International Workshop on the Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea, 2017 年

Wakita, K., Muawanah, Iwataki, M., Komatsu, T., Takahashi, K., Wada, M., Fukuyo, Y., “Harmful algal blooms, fish kills, and economic impact: A case study of Lampung Bay, Indonesia” ., JSPS-COre-RENSEA First Joint Seminar on Coastal Ecosystems in Southeast Asia, 2016 年

Takahashi, K., Moestrup, Ø., Wada, M., Ishimatsu, A., Iwataki, M., “Ultrastructure and molecular phylogeny on an undescribed woloszynskioid dinoflagellate showing characters intermediate between the two families *Borghiellaceae* and *Suessiaceae*.”, 17th International Conference on Harmful Algae, 2016 年

Takahashi, K., Wada, M., Ishimatsu, A., Iwataki, M., “Ultrastructure and phylogeny of an undescribed woloszynskioid Vietnamese coast” ., 9th International EASTHAB Symposium, 2015 年

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：岩滝 光儀

ローマ字氏名：IWATAKI, Mitsunori

所属研究機関名：東京大学

部局名：アジア生物資源環境研究センター

職名：准教授

研究者番号(8桁)：50423645

研究分担者氏名：横内 一樹

ローマ字氏名：YOKOUCHI, Kazuki

所属研究機関名：国立研究開発法人水産研究・教育機構

部局名：中央水産研究所

職名：研究員

研究者番号(8桁)：50723839

研究分担者氏名：菅 向志郎
ローマ字氏名：SUGA, Koushiro
所属研究機関名：長崎大学
部局名：水産・環境科学総合研究科（水産）
職名：准教授
研究者番号（8桁）：60569185

研究分担者氏名：平坂 勝也
ローマ字氏名：HIRASAKA, Katsuya
所属研究機関名：長崎大学
部局名：海洋未来イノベーション機構
職名：准教授
研究者番号（8桁）：70432747

(2)研究協力者

研究協力者氏名：石松 惇
ローマ字氏名：ISHIMATSU, Atsushi

研究協力者氏名：高橋 和也
ローマ字氏名：TAKAHASHI, Kazuya

研究協力者氏名：阪倉 良孝
ローマ字氏名：SAKAKURA, Yoshitaka

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。