

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 1 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：2013～2016

課題番号：25303021

研究課題名(和文) 標高の異なるタイ国養魚池を活用した環境ゲノミクスによる温暖化影響の解析

研究課題名(英文) Analysis on the effect of Global Warming for aquaculture ponds at different Altitudes using Environmental Genomics

研究代表者

板山 朋聡 (ITAYAMA, Tomoaki)

長崎大学・工学研究科・教授

研究者番号：80353530

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)：養魚池への温暖化影響の中で有毒藍藻増殖の評価を主な目的とした。タイ国の標高の異なる養魚池を調査し、栄養塩、気温、水温、クロロフィルa(植物プランクトン)、藍藻毒マイクロシスチンに関する分析と全藍藻(フィコシアニン遺伝子ITS領域)、有毒藍藻(マイクロシスチン合成mcyB遺伝子)の定量PCRを行った。統計解析の結果から、植物プランクトンは窒素とリン両方の負荷増加と水温上昇が、それらの増加をもたらすこと、藍藻全般と有毒藍藻も窒素負荷の増大と水温上昇が増殖を促進した。一方、マイクロシスチン現存量は窒素負荷増大で増加するが、水温上昇により減少することをベース統計解析で明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We surveyed aquaculture ponds at different altitudes in order to evaluate the effect of global warming for proliferation of toxic cyanobacteria. Water temperature, nutrients, chlorophyll-a (phytoplankton surrogate), cyano-toxin microcystin were measured. Phycocyanin-ITS gene (total cyanobacteria surrogate), microcystin synthesis gene mcyB (toxic cyanobacteria with producing microcystin surrogate) were quantified by real-time PCR. We analyzed the obtained data by statistical model. The results clearly showed the following facts. The increment of water temperature and the increase of both N and P loading enhanced the growth of phytoplankton. Increment of water temperature and increase of nutrients N loading enhanced the growth of the total cyanobacteria and the toxic cyanobacteria. However, we found new fact that the standing crops of cyano-toxin microcystin was suppressed by the increment of water temperature, though the increase of nutrients N loading added to microcystin.

研究分野：土木環境

キーワード：有毒藍藻 藍藻毒 マイクロシスチン 地球温暖化 養魚池 統計モデル

### 1. 研究開始当初の背景

極めて強い肝臓毒であるミクロシスティン等を産生する有毒藍藻の淡水域での増殖は、世界的な課題であるが、温暖化により有毒藍藻が益々増加することは更なる懸念事項である<sup>1)</sup>。また、タイ等の東南アジアで盛んな淡水養魚池(テラピアやナマズ等)の有毒藍藻やカビ臭を発生させる有害藍藻も深刻な問題である<sup>2)</sup>。以前の調査では養魚への給餌による窒素、リン負荷のために全ての養魚池で藍藻が増殖していたが、ミクロシスティンが実際に検出された養魚池は藍藻が繁茂した養魚池の中で約25%であった。また、ミクロシスティン合成*mcyD*遺伝子が検出される確率が50%となるリン(TP)濃度も約2mg-P/Lとなり、国内の貯水池等と比べると非常に高い値であった。しかるに、テラピアやナマズは東南アジアで常食されている他、多くが輸出されており、食の安全の観点から、有毒藍藻の養魚池での増殖と温暖化の影響の評価は極めて重要な課題である。

### 2. 研究の目的

本研究では、タイの養魚池において、藍藻と藍藻毒ミクロシスティン産生と富栄養化の要因である栄養塩(窒素、リン)濃度の関係に加え、今後の温暖化のリスクを明らかにするために、標高の異なる地域と気温の異なる時期(低温期、雨期、高温期)において、養魚池からのサンプル採取と水質分析、定量PCRを実施し、植物プランクトン(Chl-a)、全藍藻とミクロシスティン(MC)産生有毒藍藻の増殖、およびミクロシスティン現存量に対する温度と栄養塩(窒素、リン)等の環境要因の影響を統計モデルにより解析・評価することを目標とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 調査養魚池

タイ国内の標高の異なる養魚池として、チェンライ地域(400m、8池)、パヤオ地域(400m、8池)、チェンマイ地域(316m、8池)、サムーン地域(580m、8池)、ランパン(247m、7池)スコータイ地域(50m、19池)、ナコンスワン(34m、4池)の合計52カ所(図1参照)を対象として、2013年の12月、2014年の5月、2014年の9月、2014年の12月に調査を実施した。魚種はテラピア養魚池を中心に調査したが、ヒレナマズ、さらに、スネークヘッドフィッシュ等との混合養殖も多かった。

#### (2) 養魚池の水温モニタリング

上記地域の代表的養魚池に水温データロガー(サーモクロンGタイプ、SLタイプ:(株)KNラボラトリーズ)を設置し、表層水温(20~30cm)を連続測定した。気温には各地域の気象台からの時系列データを用いた。

#### (3) 分析・測定項目(メジャー大で実施)

<水質項目> クロロフィルa, NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, NH<sub>4</sub>-N, PO<sub>4</sub>-P, T-N, T-P, DT-N, DT-P

#### <藍藻毒ミクロシスティン(MC)>

サンプル水を30分煮沸し、上澄をPP2A(Promega社)による酵素アッセイ法により毒性強度測定を実施した。MCが検出された(擬陽性も含め)サンプルに対して、酢酸抽出と固相抽出(Phenomex社, StrataX)を行い、C18-ODSカラム(Cosmosil)、移動相はTFA0.05%Bufferとアセトニトリルで勾配分析をおこない、UV238nmでMC-LR, -YR, -RRを検出した(Agilent社-HP1100)。

<DNA抽出とreal time PCR> -20℃の凍結保存サンプル35mLに同量の2-プロパノールとTE Buffer1.4mLを添加して融解し、遠心機(20,000G, 30min)で回収した後にNucleoSpin Soil(Macherey Nagel社)で抽出・精製した。ミクロシスティン産生遺伝子*mcyB*とフィコシアニンPC-ITS領域(全藍藻用)のプライマーとTaqMan probeを用いた<sup>3)</sup>。real-time PCRには、MJ research PTC-200 with Chromo 4 detector (BioRad)を用いた。

#### (4) 統計解析

統計解析のフリーウェアR(ver.3.3.1)をRStudio(ver.0.99)上で用いてデータ解析を行った。さらに、マルコフ連鎖モンテカルロ法によるベイズ解析を実施した(OpenBUGS323)。



図1 各養魚池の調査地点  
Google Map上に調査地域を記入

### 4. 研究成果

#### (1) 養魚池の水質

クロロフィルa、栄養塩の値とともに、調査対象の養魚池は、明らかに富栄養~過栄養状態に分布していた(図2)。また、アンモニア態窒素が高いが、亜硝酸態窒素の蓄積もなく、硝化阻害も考えにくいことから、養魚池の魚からのアンモニアの排泄が主な原因と考えられた。また、図2の濃度軸(縦軸)は対数であるが、各水質の濃度分布は対数変換により、近似的に正規分布として扱うことができるか否か、5%有為水準でコロモゴロフ・スミルノフの正規性検定を実施した。この検定で\*は棄却された項目を示す。

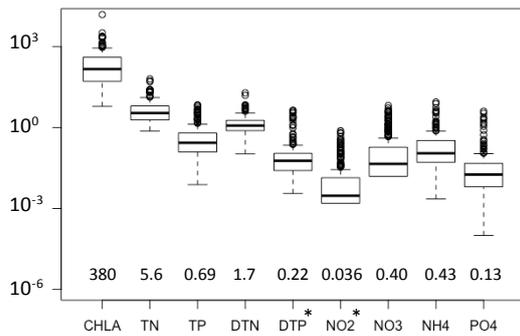


図2 養魚池の基本水質の分布

縦軸(対数)の単位は、CHLA(クロロフィル a)は  $\mu\text{g/L}$  で、各態窒素は  $\text{mg-N/L}$ 。各態リンは  $\text{mg-P/L}$ 。プロット中の数値は平均水質である。\*はコロモゴロフ・スミルノフの正規性検定で正規性が棄却されたものを示す(5%有為水準)。

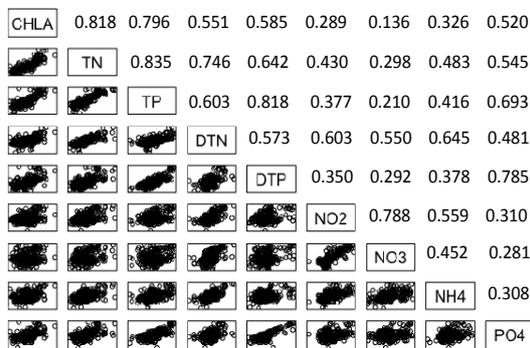


図3 基本水質間の相関

散布図は両対数プロットで、各数値は水質の対数変換値間のピアソンの積率相関係数。

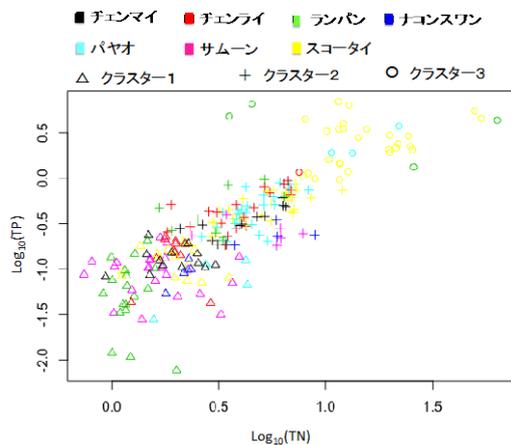


図4 各地域の養魚池の TN, TP の分布

色で地域を表し、マーカー記号で3段階の栄養塩(TN,TP)毎のクラスターを示した。

次に、図3には、各水質間の相関を示し、図4に全窒素 TN と全リン TP の両対数プロットによる散布図を示した。図3から TN( $\text{mg-N/L}$ )、TP( $\text{mg-P/L}$ )の対数変換値の間には高い相関(ピアソン相関係数=0.835)が見られた。なお、対数変換しない TN と TP 間の相関係数も 0.671 と比較的高い相関であった。この場合に、N:P 比を回帰式  $\text{TN}=\text{a} * \text{TP}$  の

係数として求めると 8.04 となり、レッドフィールド比に近い値であった。ただし、N:P 比が極端に低い 2 以下を示したものは、測定上のエラーの問題と考えて除外した。この値は、養魚の餌の N:P 比と関係していると考えられる。実際の養魚池は、通常、魚の成長を考えてタンパク比等を調整したペレットを購入し餌としており、投入量は異なるが、N:P 比としては安定していると考えられる。

また、餌は魚からの排泄物や残渣や死骸等の微生物分解を受けて無機態の窒素、リンとして栄養塩負荷となる。それが、植物プランクトンに取り込まれ、残りが、溶存態全窒素(DTN)と溶存態全リン(DTP)となる。DTN の中で無機態の窒素のアンモニア態窒素(NH4)、亜硝酸および硝酸態窒素(NO2, NO3)は、養魚池中の硝化反応、底質での脱窒反応に関係し、多くの要因で変化する。その結果、TN と NH4、NO2、NO3 の相関が低くなる。一方で、硝化反応では NH4、NO2、NO3 の順序で変化して行くので、NH4、NO2、NO3 の間の相関はある程度高くなる。

植物プランクトン全体の定量指標であるクロロフィル a(CHLA)は、TN、TP との相関が大きい。一方で、植物プランクトンの直接の栄養塩である NH4、NO2、NO3 や PO4 は植物プランクトンが吸収せずに残った分と考えられ、実際に無機態窒素との相関は低い。

次に各地域の養魚池の TN, TP の違いを明確にするために、3 段階分類のクラスター分析を実施した(図4)。クラスター1の養魚池は一般の富栄養化湖沼の状態に対応し、クラスター2は過栄養状態、クラスター3は超過栄養状態に対応している。地域毎に見ると、スコータの養魚池は、このクラスター3を占める割合が多いことが判る。反対に、チェンライ、ナコンスワン、サムーンとチェンマイの養魚池は、大部分がクラスター1と2に対応していた。パヤオとランパンの養魚池は、クラスター1、2、3に分布していた。スコータには、大規模な商業的な養魚池が平野部にあり、そこでは生産性を上げるために餌の投入も多く、さらに豚舎や鶏舎と養魚池の組み合わせもあった。このような養魚池では必然的に栄養塩負荷は非常に高い。一方で、サムーンは山間部の地域であり、自家用の養魚池で餌の投入も少なく栄養塩負荷が少ない養魚池が多い傾向にあった。

## (2) 各地域の気温と養魚池の水温

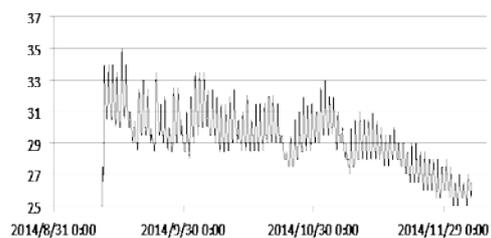


図5 データロガーによる水温時系列  
パヤオの養魚池の表層水温変化の例

表 1 各地域の気象観測所 (NOAA 提供)

Location	Latitude	Longitude	Altitude
Chiang Ra (CRI)	+19.885	+099.827	+0399.9
Phayao (PHA)	+19.133	+99.900	+0399.0
Chiang Mai (CMI)	+18.767	+098.963	+0315.8
Lampang (LMP)	+18.271	+099.504	+0247.2
Sukhothai (SKT)	+17.100	+099.800	+0050
Nakhonswan (NKS)	+15.673	+100.137	+0034.4

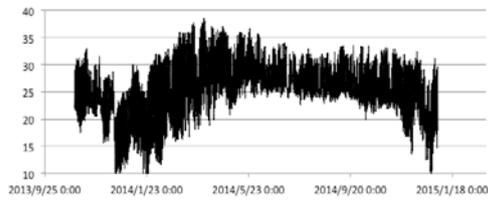


図 6 NOAA による気温時系列  
パヤオの気象観測所のデータの例

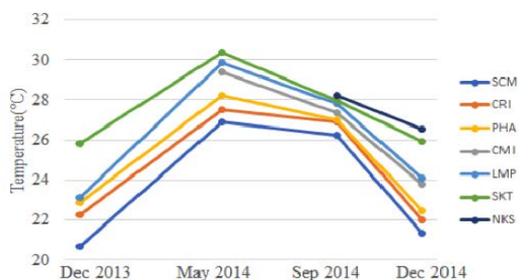


図 7 各調査地域における観測月平均気温  
SCM (サムーン)、CRI (チェンライ)、PHA (パヤオ)、  
CMI (チェンマイ)、LMP (ランパン)、SKT (スコ  
タイ)、NKS (ナコンスワン)

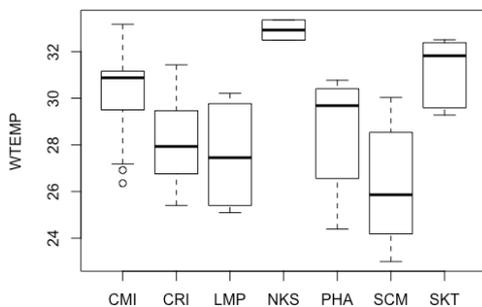


図 8 各地の養魚池の水温分布  
地域の記号は図 7 と同じである。データロガー  
による実測値と、気温からの推定値を合わせて  
プロットした。

設置した水温データロガー (図 5) と既知の水温時系列と NOAA 提供の気象観測所の気温データ (表 1, 図 6) 時系列から水温の推定を行った。なお、サムーンに最も近い観測所はチェンマイなので、チェンマイのデータを標高差で補正した。サンプリングの一月前までの期間の水温の平均値を推定した。図 7 には各地の気温の観測月の平均値を示した。図 8 には、各地の水温の変化幅を Boxplot で示した。図 7、図 8 から明らかなように、1 2 月が低温期で 5 月が高温期であった。9 月は雨期であるが気温低下はそこまで大きく

ない。また、タイ中部のスコタイとナコンスワンは水温、気温ともに高く、山間部のサムーンは水温、気温ともに低かった。チェンマイの養魚池は比較的高い水温を示した。ランパンとパヤオは水温の分布が広がった。

### (3) 植物プランクトンと藍藻、藍藻毒ミクロシスティンへの水質と温度の影響

クロロフィル a と TN, TP の関係は図 3 で示したので、全藍藻と有毒藍藻と TN, TP との関係を図 9 に、水温との関係はクロロフィル a も含め、図 10 に示した。

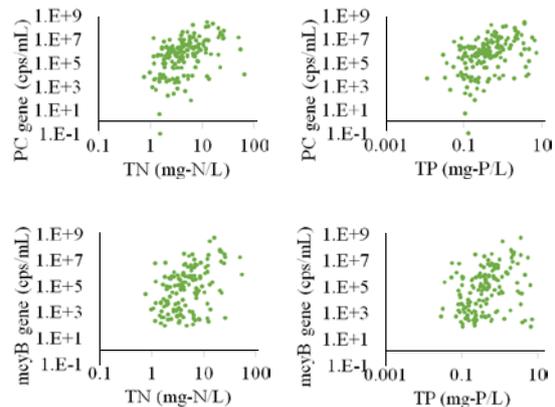


図 9 全藍藻 (PC) と有毒藍藻 (mcvB) と TN, TP との関係

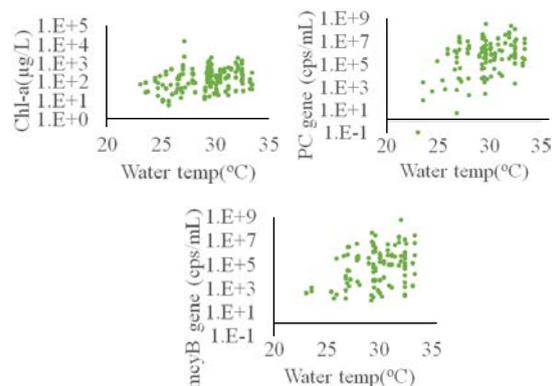


図 10 クロロフィル a (Chl-a)、全藍藻 (PC) と有毒藍藻 (mcvB) と水温との関係

全藍藻、有毒藍藻ともに、クロロフィル a と同様に TN と TP に関して明瞭な正の相関が見られた (対数プロット)。一方で水温に対しても、正の相関が見られるが栄養塩よりも相関は低い傾向にあった。次に、藍藻毒ミクロシスティンは、大部分の池で検出限界以下であり (134 池)、検出された池数は 82 池であった。なお、10 池は MC の測定が出来なかった。TMCs と TN, TP、水温の単純な相関関係は明確ではなかった。

次に、これらのデータに関して、線形モデル解析を実施した。本研究では、有毒藍藻の発生に対する栄養塩負荷 (N, P 負荷) と温度影響 (水温) を統計モデルで分離して解析・評価することが課題である。そこで、説明変数として栄養塩 ( $\text{NO}_{2+3}\text{-N}$ ,  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{PO}_4\text{-P}$ , TN, TP) の対数変換値 (底は 10)、水温  $T_w$  (採水日の

一ヶ月前までの平均：実測値と推定値)、気温Ta (採水日の一ヶ月前までの平均)、高度Elevationを用いた。目的変数には植物プランクトン全体を示すクロロフィルa(Chl-a)濃度、全藍藻はPC-ITS(PC)、ミクロシスティン産生有毒藍藻(mcyB)、さらに藍藻毒MC-LR、-YR、-RRの合計値(TMCsとした)に選び、これらの対数変換値に対して線形モデル解析を実施した(交互作用は考慮しない)。赤池情報量基準(AIC)が小さいモデルを良いモデルとし変数の選定を実施した(表2)<sup>4)</sup>。

表2 AIC 基準による変数選択例(目的変数はクロロフィルaの対数変換値、栄養塩も対数変換値) Xの印は選択しなかった変数を示す

TN	TP	NO <sub>x</sub>	NH <sub>4</sub>	PO <sub>4</sub>	Temperature 水温	Elevation 高度	AIC	Adjusted R squared
***	***	.			*	*	108.2	0.7199
***	***	*	X		*	*	106.9	0.7204
***	***	*	X	X	*	*	104.9	0.7218
***	***	X	X	X	*	*	108.8	0.7147
***	***	X	X	X		X	112.1	0.7083
***	***	X	X	X	X		112.9	0.7071

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

この表から、TN、TPにNO<sub>x</sub>(硝酸態窒素と亜硝酸態窒素の和)と水温、さらに高度(Elevation)を組み合わせた線形モデルが選定された。なお、このモデルでTN、TPは対数変換値(底は10)を採用した。全藍藻(PC)、有毒藍藻(mcyB)、ミクロシスティン(TMCs)に関してもAIC基準で変数の選択を行った。

次に、マルコフ連鎖モンテカルロ法によるベイズ解析を実施した(OpenBUGS323)<sup>4)</sup>。ここで、偏回帰係数から各説明変数の寄与率を評価するために、変数の標準化(平均=0, 分散=1)を施した。事前確率に無情報分布を用い、50,000回のIterationで、マルコフ連鎖が安定するまでの最初の5,000回を捨て(Burn In)、3本の系列でシミュレーションを実施した。表3にはベイズ解析によるクロロフィルa(Chl-a)、全藍藻(PC)、有毒藍藻(mcyB)とミクロシスティンTMCsの線形モデルの各回帰係数の平均と分散を示し、図11には80%信頼区間の解析結果を示した。

表3 標準化偏回帰係数の平均と分散

目的変数	変数説明			
Chla	TN	TP	水温	高度
平均	0.924	0.458	1.178	0.189
標準偏差	0.146	0.096	0.359	0.049
PC	TN	TP	水温	高度
平均	1.952		5.710	
標準偏差	0.284		1.116	
mcyB	TN	TP	水温	高度
平均	2.743		6.025	-0.859
標準偏差	0.562		2.520	0.342
TMCs	TN	TP	水温	高度
平均	0.816		-0.476	
標準偏差	0.204		0.850	

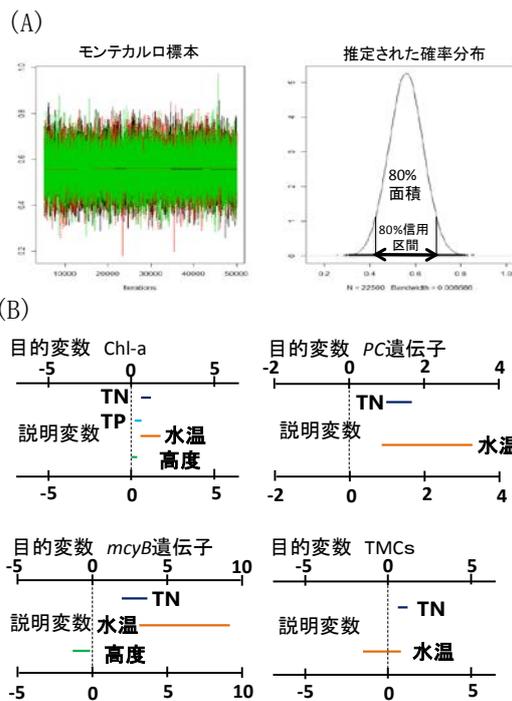


図11 (A) マルコフ連鎖によるモンテカルロ標本(左)と推定された確率分布(右)の例 (B) 偏回帰係数の80%信用区間

図11と表3から、クロロフィルa、すなわち植物プランクトン全体に対しては、TN、TPと水温、さらに高度が有効な説明変数として選ばれた。なお、標準化は説明変数に対して施されたもので、推定された偏回帰係数の確率分布はデータに応じた平均値と標準偏差を持つ。TNはTPの約2倍の寄与であるが、両変数が選択され窒素が制限因子とは言えない。水温の影響は大きく、水温上昇で植物プランクトンは増加する。また高度は水温に直接関係する因子であるが、高度も変数として有効であった。高くなると水温は下がるが、植物プランクトンとしては増加傾向にあった。高度は地域を表しており、地域毎の養魚池の特徴が影響している可能性がある。全藍藻(PC)は、栄養塩ではTNのみに影響された。水温上昇は、植物プランクトン全体よりも、強く影響した(水温上昇で著しく増加)。mcyBを持つ有毒藍藻も同様にTNのみに影響され、水温上昇で著しく増加する傾向が判った。ミクロシスティン(TMCs)もTNのみに影響されたが、水温の増加でミクロシスティン現存量は低下する傾向にあることが判った。ミクロシスティン現存量には、藍藻自身の生産速度と環境中での分解速度の両方が関係するが、環境中での分解速度は、主に溶存態の部分に関係する。今回は溶存態ミクロシスティンは測定していないが、通常は細胞内が多く、これは生産速度に関係しているので、温度が上昇すると、環境中ではミクロシスティン生産速度が低下する傾向にあることに関係している可能性が示唆され、今後、より詳細な検討が必要である。

参考文献：

- 1) Science(2008) Apr. 4;320(5872):57-58
- 2) J. Agri. Res. and Extension(2010), 19-27
- 3) App. Env. Microb(2010), 76(14), 4750-4759
- 4) The BUGS Book, Chapman &Hall/CRC

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① N. Whangchai, R. Gutierrez, U. Sompong, S. Suwanpakdee, P. Pimolrat, T. Itayama C. Ariyadet and K. Whangchai, Use of flue gas desulfurization gypsum for the removal of off-flavor compounds in fish pond water, International Journal of GEOMATE: 査読有り、11 巻 (24) 2016, 2186-2982
- ② Supanee Suwanpakdee, Redel Gutierrez, Santiwat Pithakpol, Arunothai Jampeetong, Wasu Pathom-aree, Nakao Nomura, Tomoaki Itayama and Niwooti Whangchai, Earthy-musty odour and off-flavour taints in the Phayao Lake in Thailand, Chiang Mai J. Sci: 査読有り、43 巻 (1)、2016, 22-31
- ③ Pornpimol Pimolrat, Niwooti Whangchai, Chanagun Chitmanat, Tomoaki Itayama, Louis Lebel, Off-Flavor Characterization in High-Nutrient-Load Tilapia Ponds in Northern Thailand, Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences: 査読有り、15 巻、2015、275-283
- ④ 板山朋聡、東アフリカと東南アジアにおける水の安全安心：査読無し、畜産の研究, 69 巻、2015、1029-1033
- ⑤ Dong Xia, Norio Iwami, Korntip Kannika, Chayarat Pleumsumran, Sirapran Fakrajang, Chayaporn Teercharernwong, Redel Gutierrez, Zhong Junsheng, Niwooti Whangchai and Tomoaki Itayama, Isolation and Identification of Cyanobacteria from a Freshwater Aquaculture Pond in Northern Thailand, Journal of Agr. Research & Extension: 査読有り、30 巻(3)、2014, 40-48
- ⑥ Redel Gutierrez, Niwooti Whangchai, Khomsan Ruangrit and Tomoaki Itayama, Control of Off-flavor Cyanobacteria in Ponds using Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Charcoal Bioreactor System, Journal of Agr. Research & Extension: 査読有り、30 巻(3)、2014, 14-28

[学会発表] (計 10 件)

- ① ウィン ティ ホン ザン、ワン ポンフェイ、グヤン、夏冬、清水 和哉、間世田 英明、岩見 徳雄、ワンチャイ ニウット、岡野 邦宏、板山 朋聡、標高

の異なるタイ養魚池に発生する有毒藍藻の調査解析、第 5 1 回日本水環境学会、2017年3月17日、熊本県熊本市 (熊本大学)

- ② Tomoaki Itayama, Redel Gutierrez, Kazuya Shimizu, Dong Xia, Norio Iwami, Reunkaew Praphrute, Norio Sugiura and Niwooti Whangchai, Study on toxigenic cyanobacteria in aquaculture fish ponds in Thailand, 15<sup>th</sup> World Lake Conference, Perugia, Italy, 2014, Sep. 1~5

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

板山 朋聡 (ITAYAMA, Tomoaki)

研究者番号：80353530

長崎大学・工学研究科・教授

(2) 研究分担者

岩見 徳雄 (IWAMI, Norio)

研究者番号：00353532

明星大学・理工学部・准教授

杉浦 則夫 (SUGIURA, Norio)

研究者番号：10302374

筑波大学・生命環境科学研究科・教授

清水 和哉 (SIMIZU, Kazuya)

研究者番号：10302374

東洋大学・生命科学部・助教

間世田 英明 (MASEDA, Hideki)

研究者番号:10372343

徳島大学・ソシオテクノサイエンス研究

部・准教授

岡野 邦宏 (OKANO, Kunihiro)

研究者番号:00353532

秋田県立大学・生物資源科学部・助教

(4) 研究協力者

Niwooti Whangchai

メジョー大学・准教授

Ruenkeaw Praphrute

メジョー大学・技術職員

Korntip Kannika

パヤオ大学・助教

Rattapoom Prommana

パヤオ大学・准教授

Redel Gutierrez

セントラルルボン大学・准教授

Louis Lebel

チェンマイ大学・研究ディレクター

Khomsan Ruangrit

チェンマイ大学・研究員