

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月12日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21040412

研究課題名（和文）タイ北部における有毒藍藻の実態調査

研究課題名（英文）Investigation of Toxic Cyanobacteria in North Thailand

研究代表者

板山 朋聡（ITAYAMA TOMOKI）

長崎大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：80353530

研究成果の概要（和文）：タイ北部のほとんどの調査養魚池（商用池とメジョー大実験養魚池）で、ミクロシスティス属等の有毒藍藻が観察されたが、藍藻毒ミクロシスティンの定量と、その合成遺伝子(*mcy*)の定量PCRの結果、ミクロシスティンを産生しない株の割合が多いことが判明した。一方、ナマズ養魚池はテラピア養魚池より有毒藍藻が多いことも判明した。また、メジョー大実験池の養魚から検出されたミクロシスティンは僅かであったが、一方、藍藻産生カビ臭物質も多く、養魚から検出されたため、バイオフィェンス生物濾過法による養魚池の直接浄化について浄化予備実験と浄化の数理モデル解析を実施し、本手法が今後、安全な養殖のために開発すべき生態工学技術であることを示すことができた。

研究成果の概要（英文）：We found toxic cyanobacteria such as *Microcystis* sp. in almost investigated fish ponds (including the experimental fish ponds of Maejo University) in North Thailand. Especially, the amount of toxin producing cyanobacteria in the catfish pond was much than that in the tilapia ponds. However we also found the high ratio of non-toxin-producing strains of *Microcystis* sp. in such fish ponds by a cyanotoxin microcystin analysis and qPCR for the microcystin synthetase *mcy* genes. A few amount of microcystin was detected from several fishes in the experimental ponds in Maejo University. On the other hand, musty odors substances produced by cyanobacteria were detected in many fishes and in many ponds. Therefore, because we thought that it is important to clarify such fish ponds using a bio-fence type biological filtration method, we conducted a preliminary experiment and mathematical analysis of purification process of the ponds. As a result, we presented that the bio-fence method should be developed as an adequate eco-engineering for safe fish production in aquaculture.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 4,500,000 | 1,350,000 | 5,850,000 |
| 2010年度 | 3,900,000 | 1,170,000 | 5,070,000 |
| 2011年度 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 11,900,000 | 3,570,000 | 15,470,000 |

研究分野：土木環境システム

科研費の分科・細目：工学、土木工学

キーワード：タイ・養魚池・藍藻・藍藻毒 microcysti・*mcy* 遺伝子・定量 PCR・microcystin 分解菌

1. 研究開始当初の背景

藍藻の中には、毒性物質（藍藻毒）を産生する、いわゆる有毒藍藻が多く存在しており、水源池等の有毒藍藻による汚染が世界的な水問題の一つとなっている。また、タイ北部を始め東南アジアでは、セラピアやナマズ等の淡水養殖が極めて盛んであるが、養魚池は餌由来の窒素、リン負荷が非常に大きく、富栄養～過栄養状態となっている。そのため、有毒藍藻が容易に増殖する水環境であり、淡水養殖魚を常食している住民への健康影響が懸念される。

2. 研究の目的

本研究では、実際の現地養魚池における有毒藍藻の発生の実態、藍藻毒の中でも強い肝臓毒であるマイクロシスティンによる汚染状況を調査し水質等との関係性等についての解析と、養殖過程における有毒藍藻とマイクロシスティン動態解析を目的とした。また、養魚池の実態を踏まえた対策法の提案と、その効果予測のためのモデル解析も目的とした。

3. 研究の方法

(1) 現地調査

タイ北部を調査対象地域とし、チェンマイ近郊の養魚池、パヤオ近郊の養魚池で合計39カ所（セラピア養魚池22、ナマズ養魚池17：位置や名前は個人所有の池のため秘匿）、さらにパヤオ湖とチェンマイ市内公園池（ラーマ III 池）も調査対象とした。

(2) 実験養魚池モニタリング

タイ北部の共同研究先であるチェンマイ近郊のメジョー大学の実験養魚池（セラピア池、ナマズ池：サイズは両者とも約10mX10mX深さ1.5m程度）のモニタリングを実施した。

(3) 分析・測定項目

水質：NO₃-N, NO₂-N, NH₄-N, PO₄-P, T-N, T-P
クロロフィル a

藻類：プランクトンネットで採取し、光学顕微鏡による観察同定・計数を実施し、さらに藍藻の単離培養を試みた。

定量PCR: ミクロシスティン合成 *mcy* 遺伝子、藍藻特異的 16SrDNA 領域 (CYA), ミクロシスティス特異的 16SrDNA 領域 (MIC) を定量した。なお、DNA は、-20℃で凍結保存サンプルにCTAB と TE を添加して再度凍結融解し、溶存DNA も含め回収した後、FastDNA Spin Kit for Soil (MPBio) を用い抽出した。

藍藻毒マイクロシスティンは酢酸処理後、固相抽出 (Strata X) し、HPLC 分析 (ODS カラム (C18), 移動相: 0.05M Phosphate buffer 7: Acetonitrile 3) と、PP2A 酵素アッセイ法による毒性強度測定を実施した。

(4) 養魚池浄化予備実験とモデル解析

現地養魚池にフェンス型の木炭担体生物濾

過リアクターを設置し、浄化実験を実施し、また、ベンチスケールのリアクターで室内実験（長崎大）で実施した。さらに、フェンス型リアクターによる浄化効果を検討するために、数理モデル解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 現地調査：2009年9月、12月、2010年3月にチェンマイ近郊とパヤオ近郊のセラピア養魚池22カ所、ナマズ養魚池17カ所、チェンマイ市内の公園池 (Pond) 一カ所と、パヤオ湖 (lake1,2) 2カ所を調査した。それらの水質の状況を図1に示す。養魚池の窒素、リン濃度が極めて高く、過栄養状態にあること、さらにナマズ池がセラピア池より栄養塩濃度が高いことが、図1より

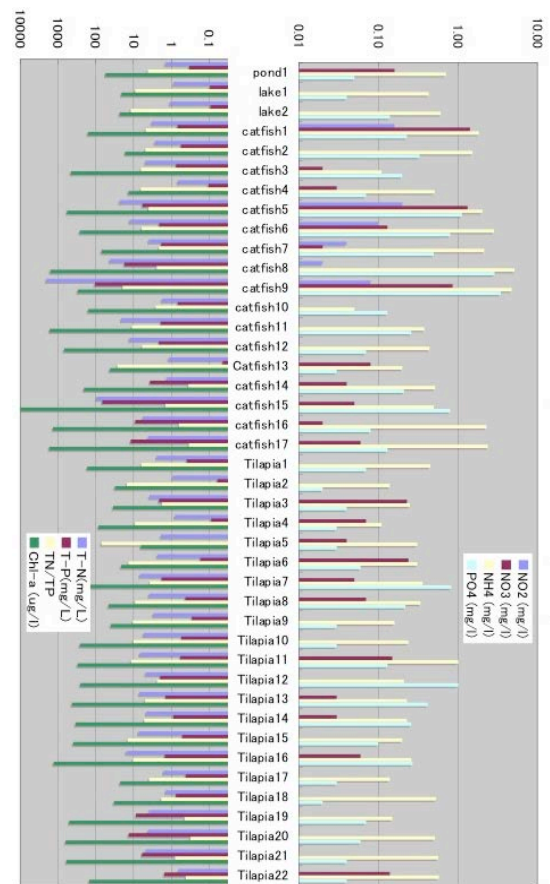


図1 各調査水域の水質状況（窒素、リン濃度とクロロフィル a）

表1 $\text{Chl-a} \sim a+b \cdot \text{log TN} + c \cdot \text{log TP} + d \cdot \text{log TN} \cdot \text{log TP}$

| 分散分析表 | | | | |
|-------|-----|-------------|-------------|-------------------------|
| | 自由度 | 変動 | 分散 | 検測された分散, 有意 F |
| 回帰 | 3 | 84.07573995 | 28.02524665 | 39.69433642 1.18579E-11 |
| 残差 | 37 | 26.12297419 | 0.70602633 | |
| 合計 | 40 | 110.1987141 | | |

| | 係数 | 標準誤差 | t | P-値 | 下限 95% |
|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| 切片 | 4.349984116 | 0.258928428 | 16.79994798 | 6.69595E-19 | 3.825345291 |
| log TN | 0.594966531 | 0.175831261 | 3.383735799 | 0.001703288 | 0.238698559 |
| log TP | 0.511122281 | 0.119706889 | 4.269781689 | 0.000130801 | 0.268573087 |
| log TN*log TP | 0.002635746 | 0.055608876 | 0.047397944 | 0.962450987 | -0.110038539 |

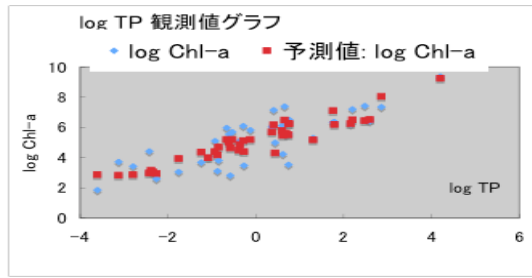


図2 全リンと観測値、予測値の関係
テラピア池

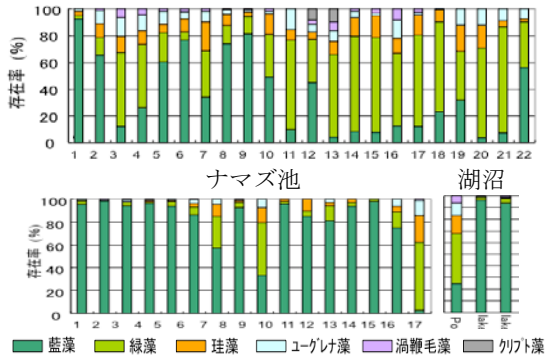


図3 各池の微細藻(網)の割合
テラピア池

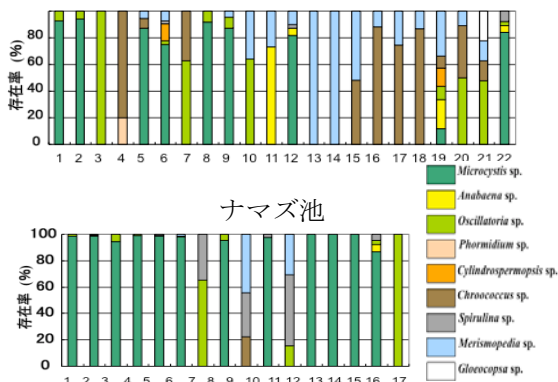


図4 各池の各藍藻(属)の割合

明らかとなった。特に、リン濃度とアンモニア濃度が高く、餌由来や魚の尿中由来と考えられる。次に、藻類バイオマス指標であるクロロフィル a (Chl-a)と栄養塩負荷の関係を見るために、全窒素 (TN)、全リン (TP)との重回帰分析を実施した (表1、図2)。この結果から、クロロフィル a 量、すなわち藻類量は全リンとの間に強い関係があり、養魚池も、通常の水域で多くみられるように、リンが制限因子となっていたと考えられる。

次に、藻類の発生状況を、光学顕微鏡での観察結果に基づき、同定分類・計数した。図3には、観察された各微細藻類の網レベルでの割合 (細胞数) を示し、また図4には、各藍藻を細胞数での割合で示した。図3から、全ての調査水域で藍藻の発生が認められたが、ナマズ池はテラピア池よりも明らかに、藍藻の割合が多い結果となった。さらに、図4から、ナマズ池では藍藻の中でもマイクロシ

スティス属の割合が多く、一方でテラピア池では、糸状藍藻であるアナベナ属やオシロトリア属の割合が多いことが判明した。全般に有害藍藻はナマズ池で多く見られた。

各池の各微細藻類細胞数でクラスタ解析 (Average 法) を行い、テラピア池とナマズ池で、異なるクラスターに明確に分類された (図5)。これはテラピアが微細藻類を捕食すること、また、ナマズが底生魚であるために、底泥を攪拌し栄養塩の溶出を促進すること等が原因と考えられた。

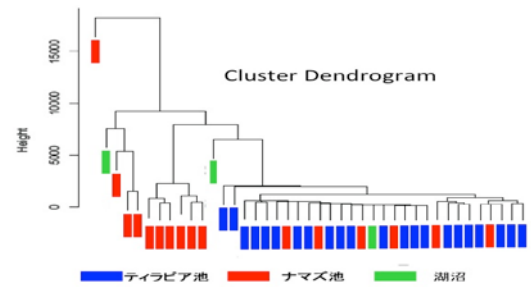


図5 微細藻細胞数に基づくクラスター解析

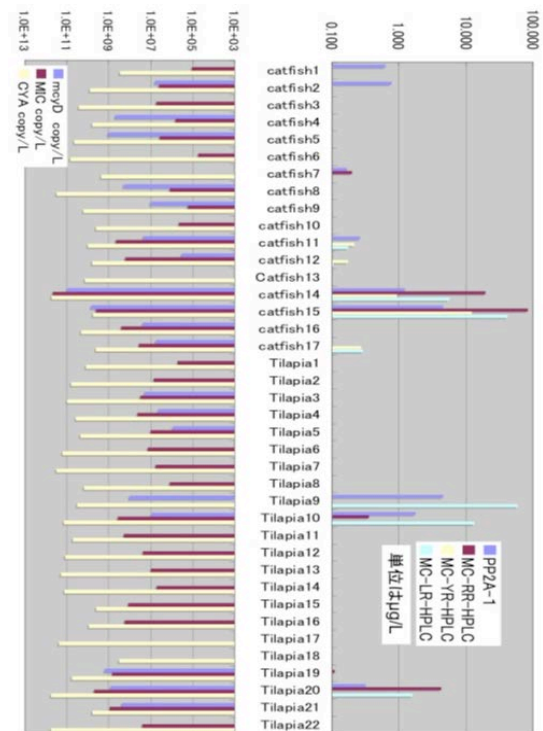


図6 定量PCRとマイクロシスティン分析結果

表2 定量PCRとマイクロシスティン分析結果の養魚種についてのまとめ

| 調査池数 | テラピア池 22 | ナマズ池 17 |
|--------------------------------|-------------|------------|
| 藍藻検出 | 22 | 17 |
| マイクロシスティス検出 | 19 | 15 |
| mcyD検出 | 8 | 11 |
| マイクロシスティン検出池数 | 4 | 7 |
| 平均濃度 | 3.6µg/L | 9.8µg/L |
| (最大濃度) | (42 µg/L) | (167 µg/L) |
| マイクロシスティスは検出されたがmcyDが検出されない池数 | 12 | 5 |
| mcyDが検出されたが、マイクロシスティンが検出されない池数 | 7 | 7 |

マイクロシスティン合成遺伝子クラスター内の *mcyD* 遺伝子、16SrDNA のマイクロシスティン特異的領域と藍藻共通の特異的領域に対するそれぞれのプライマーと Taqman プロブを用いて¹⁾、各養魚池サンプルから抽出した DNA サンプルの定量 PCR を実施した。さらに、マイクロシスティン (MC) 濃度を HPLC と PP2A 法で定量した。HPLC 分析では標準物質として MC-LR, MC-RR, MC-YR を使い、PP2A では MC-LR 等価毒性強度として評価した。これらの結果を図 6 に示した。定量 PCR では藍藻はすべての池で検出された。さらに、表 2 に示したように、MC が HPLC か PP2A で検出された池はテラピア池では、22 池中の 4 池のみで、ナマズ池でも、17 池中の 7 池のみであった。またナマズ池がテラピア池よりも MC 濃度が高かった。さらに、マイクロシスティスが検出されたものの、*mcyD* 遺伝子が検出されない池、*mcyD* が検出されたものの、MC が検出されない池も多く存在し、MC 合成酵素 *mcy* 遺伝子が欠損しているもの、また、*mcy* 遺伝子の一部が壊れる等により、MC 合成機能を失った株が多数存在することが示唆された。

次に、栄養塩濃度と有毒藍藻の発生の関係を解析した結果、T-N, T-P 濃度と *mcyD* コピー数の関係は明確ではなかったが、*mcyD* が検出された池 (1)、されない池 (0) で 2 値化し、(対数変換された) T-N, T-P 濃度との関係をロジスティック回帰分析した結果、表 3 と図 7 に示したように T-P との関係は有意であったが T-N とは棄却された (5% 有意水準)。その結果、T-P で約 2 mg/L を超えると *mcyD* 遺伝子を持つ藍藻の出現確率が 50% 以上となることが判明した。

表 3 ロジスティック回帰の分散分析表

| Coefficients: | | | | |
|---------------|----------|------------|---------|----------|
| | Estimate | Std. Error | z value | Pr(> z) |
| (Intercept) | -0.2494 | 0.3432 | -0.727 | 0.4673 |
| logTP | 0.53140 | 0.2229 | 1.815 | 0.0134 |

| Coefficients: | | | | |
|---------------|----------|------------|---------|----------|
| | Estimate | Std. Error | z value | Pr(> z) |
| (Intercept) | -0.9624 | 0.5212 | -1.847 | 0.0648 |
| logTN | 0.5347 | 0.2945 | 1.816 | 0.0694 |

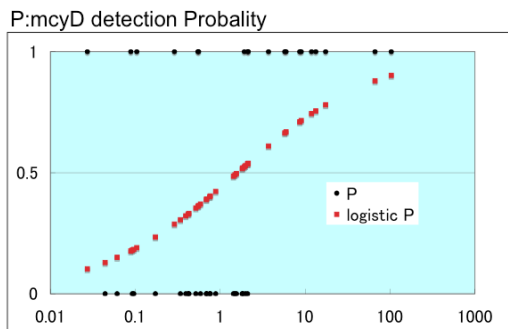


図 7 *mcyD* と T-P のロジスティック回帰

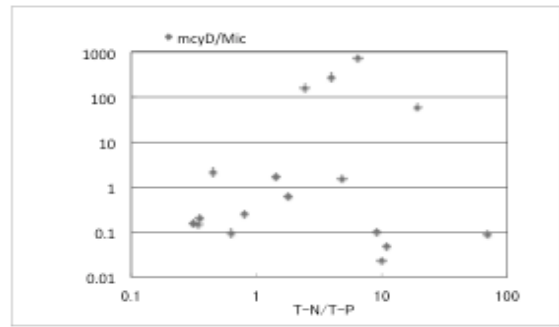


図 8 ミクロシスティスに対する *mcyD* 遺伝子の割合と N/P 比 (T-N/T-P) の関係

さらに、図 8 に示したように、マイクロシスティス (特異的な 16SrDNA の MIC 領域のコピー数) に対する *mcyD* コピー数の割合は、N/P 比が約 7~8 で最大となることが明らかとなった。これらの結果からは、マイクロシスティン産生有毒藍藻の発生確率は、主に全リン濃度に影響されるが、有毒株の占める割合は N/P 比に影響されるという、藍藻種間の栄養塩獲得競争に加え、有毒株と無毒株の間の複雑な競争関係の存在が推測された。

また、現地の調査池から希釈法により *Microcystis* sp. と *Oscillatoria* sp. 類似の糸状藍藻を単藻化した。 *Microcystis* sp. の比増殖速度 μ と硝酸態窒素濃度 N、リン酸態リン濃度 P との関係を求め、Monod 式 $\mu = \mu^{max} * N / (K_n + N) * (P / K_p + P)$ に非線形回帰した。その結果、最大比増殖速度は $\mu^{max} = 0.774 \text{ day}^{-1}$ となり、半飽和定数は $K_n = 0.784 \text{ mgN/L}$, $K_p = 0.002664 \text{ mgP/L}$ と推定された。

さらに、単藻化 *Microcystis* は *MIC*, *CYA*, *mcyD*, *mcyE*, *mcyA* について PCR を実施した (表 4)^{1), 2)}。この結果から、これは *mcyD* と *mcyE* がなく、マイクロシスティン合成能を持たない株であることが判明した。 *mcyA* は増幅が認められたの予想される電気泳動バンド位置と異なっており (図 9)、DNA 配列からの系統樹の上でも *mcyA* とは離れていた (図 10)。

表 4 単藻化 *Microcystis* sp. の遺伝子

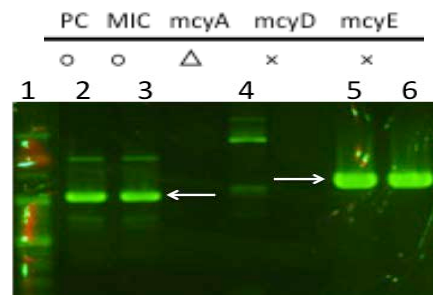


図 9 *mcyA* プライマーを用いた PCR 産物 1(Marker), 2,3 (Isolated *Microcystis*), 4 (Isolated *Oscillatoria*), 5,6 (NIES843 *Microcystis*)

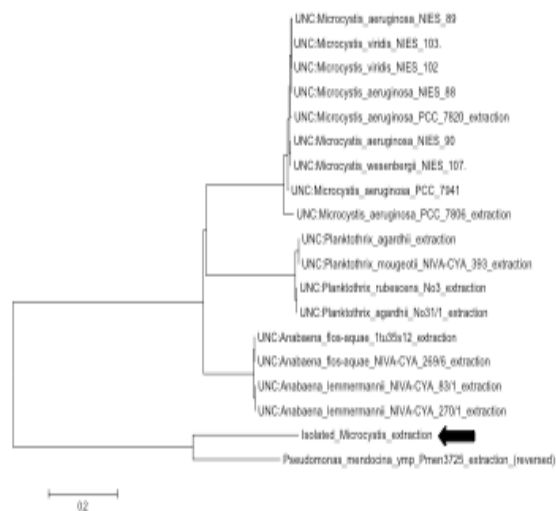


図 10 単藻化ミクロシスティスの *mcyA* 類似遺伝子の系統関係 (近接結合法)

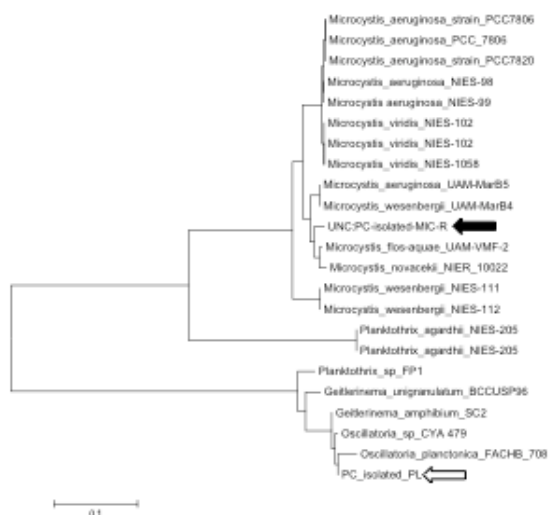


図 11 単藻化ミクロシスティス (黒矢印) と糸状藍藻 (白矢印) の *cpcB* 遺伝子の系統関係 (近接結合法)

得られた藍藻 2 種の系統関係は、フィコシアニン遺伝子(*cpcB*)を用いて解析し³⁾、形態で *Microcystis* とされたものは、*Microcystis* sp. であったが、NIES 株とは離れていること、さらに糸状藍藻は *Oscillatoria* sp.、*Planktothrix* sp.、*Geitlerinema* sp. の近縁種あることが推定された。

(2) 実験養魚池モニタリング：チェンマイ市近郊のメジャー大内に実験養魚池 (テラピア養魚池とナマズ養魚池) を用いて、養殖過程におけるモニタリングを実施した (2011 年 1 月から 150 日間)。その結果、現地調査結果と同じくテラピア池がナマズ池よりも藻類発生量 (クロロフィル a)、ミクロシスティン濃度、MIC、*mcyD*、*mcyE* とともに少ない結果となった。テラピア池の藻類量は一ヶタ少なく、餌負荷量はテラピア池はナマズ池の約

1.5 倍程であった。むしろテラピアの捕食が藍藻を減少させていると考えられた。ナマズとテラピアのフィレの部分で約 $0.2 \mu\text{g/Kg}$ の MC-YR と MC-RR の蓄積があった。養殖池のテラピアはかび臭物質 2 MIB を $4.6 \mu\text{g/L}$ 、Geosmin を $2.6 \mu\text{g/L}$ 蓄積しており、これらは商品価値を低下させる原因となっていた。*mcyE* と *mcyD* の比率がテラピア池とナマズ池で異なり経目的にも変化した。この *mcyE* プライマーは *Microcystis* に特異的であるが、*mcyD* プライマーは *Planktothrix* 等も増幅するので有毒藍藻中の *Microcystis* の比が変化することを示している。

次に、ミクロシスティン特異的分解遺伝子 *mlrA* の動態をモニタリングした⁴⁾。明らかに MC 濃度が高くなるに従い *mlrA* 保有分解

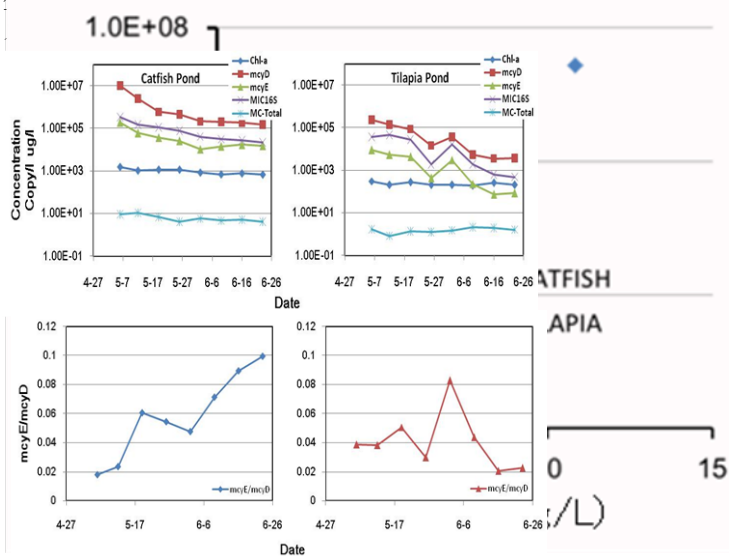


図 13 実験池モニタリングの結果 左側がナマズ池で右側がテラピア池

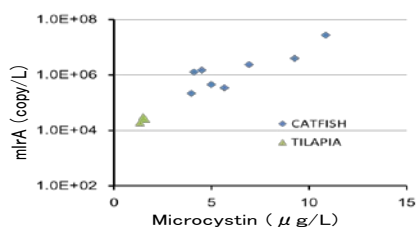


図 14 実験池における *mlrA* 遺伝子とミクロシスティン濃度の関係

(3) 養魚池浄化予備実験とモデル解析：木炭担体を充填したフェンス型生物ろ過リアクター (バイオフィェンス) 試験装置 (図 15 a) をパヤオ近郊の養魚池に設置し、滞留時間約 6 時間で約半年間運転した。その結果、クロロフィル除去率で約 70~80% を維持した。また、室内ベンチスケールリアクター実験 (図 15 b) では、滞留時間 5 時間でミクロシスティン除去率 80% 以上を得た。

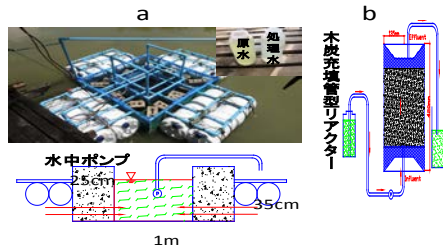


図15 木炭担体充填浄化リアクター実験

次に、バイオフィェンスを養魚池内に設置し、フェンス内の浄化領域から水を一定速度で引き抜いた場合、藍藻はロジスティック増殖とし、バイオフィェンスは一次反応で藍藻を分解すると考えると、フェンス内と外部の藍藻量の比 Y は、以下の式で近似でき、養魚池浄化システム構築のための設計式とできた。

$$Y = \frac{1}{2} \left[(1-X) + \sqrt{(1-X)^2 + 4Xe^{-k/V_f}} \right] \quad X = \frac{Q}{\mu V_c} \quad \kappa = \frac{kV_f}{\mu V_c}$$

k 、 V_f ：リアクターの比分解速度と充填体積
 μ は藍藻増殖速度、 V_c はフェンス内養魚池の容積、 Q は引き抜くポンプ流量である。

参考文献：

- 1) Env. Sci. Technol (2005) 39, 4198-4205
- 2) App. Env. Microb (2006), 7(9), 6101-6110
- 3) App. Env. Microb (1995), 61(11), 3875-2883
- 4) App. Env. Microb (2009), 75(15), 5167-5169

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2件)

- ① Kazuya Shimizu, Hideaki Maseda, Kunihiro Okano, Tomoaki Itayama, Yukio Kawauchi, Rongzhi Chen, Motoo Utsumi, Zhenya Zhang, Norio Sugiura, How microcystin-degrading bacteria express microcystin degradation activity, Lakes & Reservoirs: Research & Management, 査読有り、16巻、2011、169-178
- ② Niwooti Whangchai, Chayarat Pleumsumran, Siraprapa Fakrajang, Norio Iwami and Tomoaki Itayama, Musty Odor in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Cultured in Cages and Earthen Ponds, Journal of Agricultural Research and Extension, 査読有り、27巻、2010、19-27

[学会発表] (計28件)

- ① Tomoaki Itayama, Norio Iwami, Xue-Ying Bi, Dong Xia, Kazuya Shimizu, Korntip Kannika, Redel Gutierrez, Fumiaki Furusawa, Kohmsan Ruangdet, Niwooti Whangchai and Norio Sugiura, Water

Purification by Bio-fence system, The fourth International Fisheries Conference Climate change: Impact on Aquatic Resources and Fisheries, 2011年12月1日, Chiang Mai, Thailand

- ② Tomoaki ITAYAMA, Nobuyuki TANAKA, Norio IWMAI, Takashi KUWABAAR, Niwooti WHANGCHAI, Development of Controlling Methods of Toxic Cyanobacteria in Eutrophicated Reservoirs, World City Water Forum, 2009年8月18-21日, Incheon, Korea (招待講演)

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・大学院工学研究科・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

(3) 連携研究者

佐野 友春 (Sano Tomoharu)

研究者番号：10178808

(独) 国立環境研究所・環境計測研究センター・主任研究員

朴 虎東 (Park Hodong)

研究者番号：20262686

筑波大学・生命環境科学研究科・教授

(4) 研究協力者

Niwoot Whangchai, Associate Professor, Maejo University, Thailand

Ruenkeaw Praphrute, Technical Staff, Maejo University

Korntip Kannika, Assistant Professor, Phayao University, Thailand

Rattapoom Prommana, Associate Professor, Phayao University, Thailand

Redel Gutierrez, Associate Professor, Central Luzon State University, Phillipine

Yuwadee Peerapornpisa, Associate Professor, Chiang Mai University, Thailand