

魚類寄生虫を指標とした水質管理を目指して

○高崎一人¹, 今中応亘¹, 塚原啓太¹, 松平崇弘¹, 鈴木良博², 杉村誠²
 (¹株式会社ファスマック, ²新江ノ島水族館)

目的

水質を適正に管理・維持することは、魚類や海獣類等の飼育を行う上で非常に重要であるとともに、来場するお客様への安心・安全にもつながる。現在の水質管理は物理的作業(濾過工程など)や化学分析(電気伝導率、濁度やpH等の測定)が主流であり、魚病を引き起こす微生物群(細菌や寄生虫など)を対象とした生物学的な分析はあまり行われていない。魚病の原因微生物群のうち、特に寄生虫に関しては生活様式を含めて未解明の部分が多く、早期に寄生虫を発見し対処療法等の対策を行うことが非常に重要となる。そこで今回は、次世代シーケンサーを利用して水槽、貯水タンク(原水)及び簡易培養後の各海水中に含まれる環境DNAを分析し、繊毛虫の検出を試みた。また、継続的に採水を行うことで繊毛虫の水槽への持ち込み経路を推定し、貯水タンクの洗浄効果を示すことができたのでご紹介する。



方法

① 採水

検出1

水槽(A-13及びA-14) 貯水タンク(原水)

検出2

簡易培養の様子 (発症したソコイトヨリ+海水)

・各2Lずつ採水

② フィルター濾過

センチーノ 微生物検査用ポンプ (日本PALL)

・採水後すぐにフィルタリング処理。
 ・ガラスフィルター(watman, 0.7um径)使用

③ DNA抽出

DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)

・市販のキットを使用し、ガラスフィルターからDNAを抽出

④ 網羅的解析

MiSeq (illumina), Qiime

・次世代シーケンサーMiSeqによるアンプリコン解析を実施し、抽出したDNA内の生物叢を網羅的に解析

結果

検出1: 水槽内/タンク内の繊毛虫

| 繊毛虫名 | 2017.5.25 (洗浄前) | | | 2017.8.9 (洗浄後) | | |
|--------------------------|-----------------|---------|---------|----------------|--------|-------|
| | A-13 | A-14 | タンク | A-13 | A-14 | タンク |
| <i>Miamiensis</i> | 257 | 1 | 0 | 22 | 377 | 0 |
| <i>Pseudocohnilembus</i> | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Mesanophrys sp.</i> | 0 | 1061 | 0 | 25 | 0 | 0 |
| <i>Uronema</i> | 0 | 244 | 139 | 0 | 125 | 20 |
| <i>Cohnilembus</i> | 0 | 0 | 101 | 67 | 122 | 0 |
| <i>Cryptocaryon</i> | 327 | 426 | 3,780 | 10 | 0 | 5 |
| <i>Homalogastra</i> | 494 | 2951 | 62 | 76 | 903 | 41 |
| total reads | 194,569 | 163,997 | 163,997 | 76,222 | 87,059 | 6,946 |

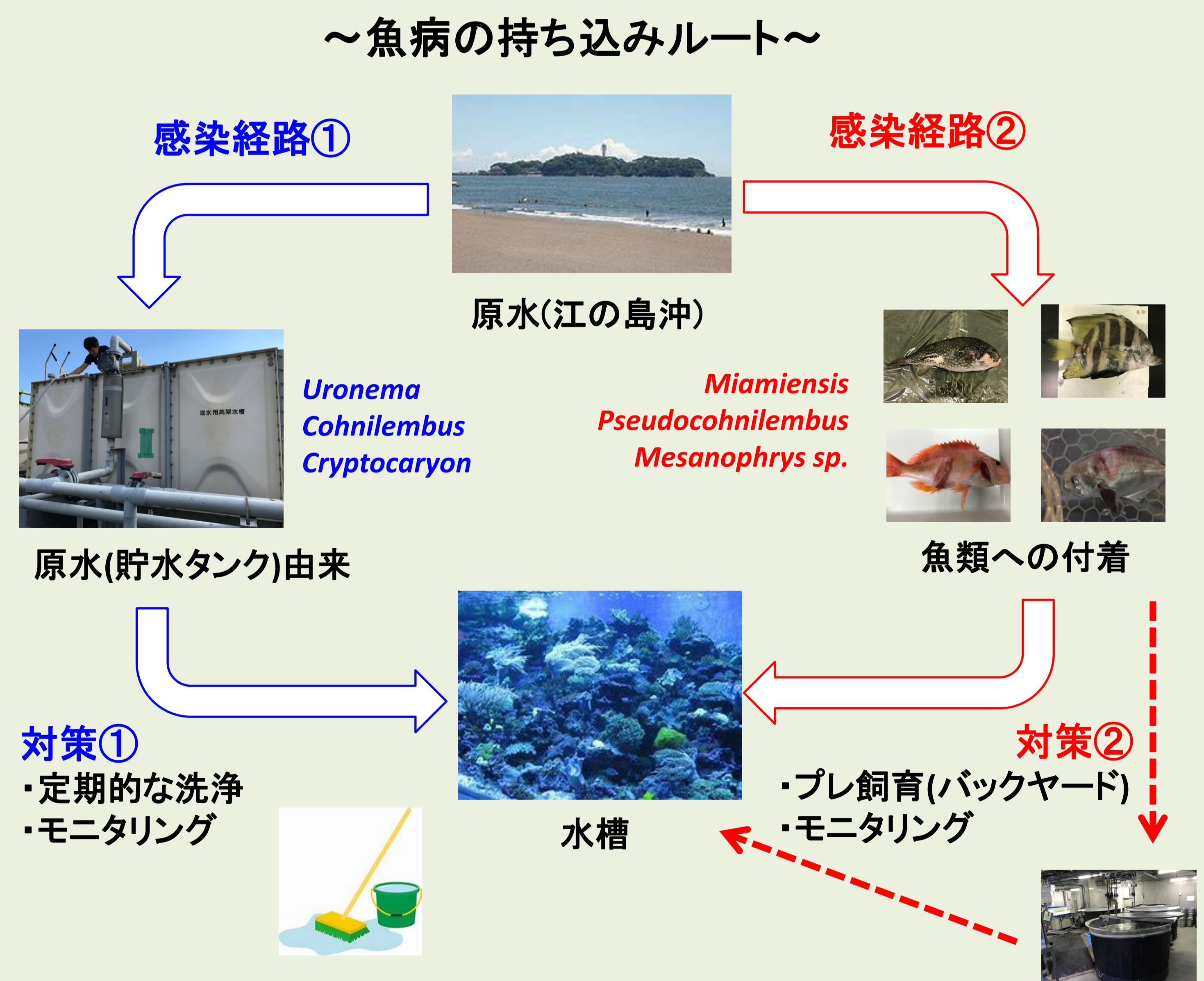
- レ 水槽のみ検出された繊毛虫:
Miamiensis (スクーチ力症), *Pseudocohnilembus* (スクーチ力症)及び*Mesanophrys sp.*
- レ 水槽/タンクの両方から検出された繊毛虫:
Uronema (スクーチ力症), *Cohnilembus* (スクーチ力症)及び*Cryptocaryon* (白点病)
- ◎ タンクの洗浄前と洗浄後を比較した場合:
Cohnilembus (検出されず), *Cryptocaryon* (大幅に減少), *Uronema* (減少)

検出2: 魚類に付着した繊毛虫

| 繊毛虫名 | ソコイトヨリ (培養後) | | | | 2017.10.9採水 |
|------------------------|--------------|---------|--------|---------|-------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | A-13 |
| <i>Miamiensis</i> | 63,187 | 77,874 | 59,331 | 45,565 | 288 |
| <i>Entodiscus</i> | 48,360 | 57,763 | 39,684 | 45,616 | 32 |
| <i>Mesanophrys sp.</i> | 12,455 | 14,538 | 6,987 | 8,473 | 54 |
| <i>Homalogastra</i> | 11,618 | 4,745 | 5,801 | 5,336 | 152 |
| total reads | 191,863 | 132,897 | 67,835 | 148,319 | 156,452 |

- レ 病症が確認されたソコイトヨリを海水に浸した状態で繊毛虫の簡易培養を試みた。
- レ 3日間室温で静置後の海水をフィルター濾過し(計4回)、アンプリコン解析を実施した。
- レ リードの多い順に*Miamiensis*, *Entodiscus*, *Mesanophrys sp.*及び*Homalogastra*であった。
- ◎ 検出1及び検出2より、ソコイトヨリの病症はスクーチ力症であり原因繊毛虫は*Miamiensis avidus*と推定された。

まとめ



<網羅的分析>

- ◎ 海水中に生息する微生物を網羅的に検出!
- ◎ 魚病の病原微生物を事前に確認することが可能!
- ◎ 定期的に検査を行うことで、病原性微生物の変動を把握!
- ◎ タンクや水槽の洗浄前後を検査することで、洗浄効果を確認!

<個別分析> ←今後の展開

- ◎ 特定の病原性微生物に着目し、特定微生物のみを検出!
- 試験室での検査...qPCR
- 現場レベルでの簡易検査...DNAクロマト

是非、企業ブースへお立ち寄りください!!