

TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

アミメノコギリガザミ幼生期に発生する壊死症状を伴う細菌性疾病の防除に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2023-07-10 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 翠川, 優希 メールアドレス: 所属:
URL	https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/1909

博士学位論文

アミノコギリガザミ幼生期に発生する壊死症状を伴う細菌
性疾病の防除に関する研究

2019 年度

(2020 年 3 月)

東京海洋大学大学院

海洋科学技術研究科

応用生命科学専攻

翠川優希

博士学位論文

アミメノコギリガザミ幼生期に発生する壊死症状を伴う細菌
性疾病の防除に関する研究

2019 年度

(2020 年 3 月)

東京海洋大学大学院

海洋科学技術研究科

応用生命科学専攻

翠川優希

目次

第1章 序論	1
第1節 ノコギリガザミの感染症例	1
第2節 日本におけるノコギリガザミの種苗生産と感染症	3
第3節 本研究の目的	6
第2章 アミメノコギリガザミ壊死症原因細菌の代表株である NY1 の性状解析	7
第1節 材料と方法	7
第2節 結果	12
第3節 考察	28
第3章 アミメノコギリガザミ壊死症原因細菌検出法の開発	30
第1節 材料と方法	30
第2節 結果	35
第3節 考察	40
第4章 アミメノコギリガザミ壊死症防除法の検討	41
第1節 材料と方法	41
第2節 結果	46
第3節 考察	57
第5章 総合考察	59
謝辞	62
参考文献	63

第1章 序論

ノコギリガザミは *Scylla serrata*、*S. paramamosain*、*S. olivacea*、*S. tranquebarica* の合計4種類が知られている。これらノコギリガザミは太平洋とインド洋の温帯から亜熱帯にかけて分布している[1]。ノコギリガザミは沿岸域に属する国の漁業において高い需要が存在する水産重要種である。しかしながら、ノコギリガザミの天然資源の減少にともない、資源量の回復と水産養殖を行うために種苗生産施設で生産された人工種苗が必要となっている[2]。そのため、現在多くの国でノコギリガザミ類の種苗を供給するために種苗の大量生産が試みられている。しかし、種苗生産施設では細菌や卵菌類による幼生の大量斃死が頻発しており、感染症がノコギリガザミエ種苗生産の最も大きな障害の一つとされている[3, 4]。

第1節 ノコギリガザミ *Scylla spp.*の感染症

ウイルス：ノコギリガザミの病原体として、white spot syndrome virus (WSSV)、muscle necrosis virus、reovirus、baculovirus の4種類のウイルスが報告されている。

ノコギリガザミのウイルス感染に関する報告は、自然または実験的に感染したノコギリガザミに由来する WSSV が多くを占めている[5-7]。タイでの研究によると、アミメノコギリガザミ *S. serrata* および他のカニ類は、Taura syndrome virus (TSV) に注射によって感染させることができることが報告されている。また、TSV 感染個

体はウイルスを最大 50 日間保持する可能性があるため、TSV のキャリアとなりエビ養殖に潜在的なリスクをもたらす可能性がある[8]。しかし、野生から捕獲されたノコギリガザミが TSV に自然感染している例はこれまで報告されていない。また、ノコギリガザミに対して Yellow head virus (YHV) のようなエビに感染性を持つウイルスを用いた実験感染によると、これらのウイルスはノコギリガザミには感染しないことが示されている[9]。

細菌: ノコギリガザミにおいて細菌性の壊死症状は幼生期における典型的な疾病である[10]。この壊死症状を伴う疾病は“black spot”、“brown spot”、“burnt spot”、“shell disease”、“chitinolytic bacterial disease”ともさまざまな呼ばれ方をしている。この疾病は甲殻類の外骨格であるキチンを分解するキチン分解性の細菌が侵入することで引き起こされ、感染部位で糜爛やメラニン色素沈着を引き起こす。この疾病の原因とされているのは *Vibrio* 属細菌、*Pseudomonas* 属細菌、*Aeromonas* 属細菌である[11]。

卵菌: *Lagenidium*、*Atkinsiella* および *Haliphthoros* の 3 つの卵菌が、ノコギリガザミの卵死亡率に関わる病原体として報告されている[12-15]。また、*Lagenidium* spp. はインドネシアにおいてアミメノコギリガザミの卵および幼生に病原性があることが報告されている[16]。成熟した雌のカニの卵の死亡などの卵菌感染による雌の繁殖障害は大きな問題であった[17]。卵菌感染により、部分的または完全な卵塊の損失をもたらすことが養殖場で観察されている。また、アミメノコギリガザミにお

いて *Haliphthoros* spp.が卵塊内で優占し卵の死亡を引き起こすことが報告されている[15]。受精卵は、膜が真菌の侵入を制限するために、未受精卵よりも感染の影響を受けにくいことが示唆されている[18]。幼生期に *Lagenidium* spp.に感染した場合、末期症状としては、広範・高度に枝分かれした菌糸体が、体全体に侵入し、最終的に発達した菌糸が表皮を突き抜けることが確認できる。対策としてはホルマリンおよびトリフルラリンを投与した予防法が存在する。実験において対照と比較してメガロパへの生存率および幼生発育に有効であることが示唆された[19]。

寄生虫：ある研究では、調査したすべてのノコギリガザミにおいて内部寄生虫または外部寄生虫が観察できた[20]。その寄生虫はそれぞれ原生動物 (*Hematodinium* sp.、 *Epistylis* sp.、 *Acinata* sp.) および後生動物 (*Levinseniella* sp.、 *Polypocephalus* sp.、 *Octolasmis* sp.、 *Chelonibia* sp.) であった。また、多くの共生生物もまたノコギリガザミにおいて見出された [20]。また、発達中の卵において高い死亡率を引き起こす可能性のある *Thraustochytriaceae* 科に分類される新しい寄生虫がオーストラリアから報告されている[21]。

第2節 日本におけるノコギリガザミ *Scylla* spp.の種苗生産と感染症

日本の沖縄県石垣島にてアミメノコギリガザミ *S. serrata* 種苗生産が行われている。しかし、種苗生産過程で壊死症状を伴う幼生の大量斃死が発生することで種苗生産が妨げられている[3, 4]。過去にニフルスチレン酸ナトリウムやホルマリンを

添加することで疾病の防除が試みられてきた。しかし、現在食用の水産物にこれらを使用することは認められておらず、代替となる防除方法が必要となっている。

2000年に、グラム陰性長桿菌が疾病に罹患したアミメノコギリガザミ幼生から分離された。この分離細菌のアミメノコギリガザミ幼生に対する病原性は実験感染によって確かめられた[22]。疾病に罹患した幼生は背棘部に壊死症状を伴うメラニン色素性結節形成が生ずる。以上より、この分離株はアミメノコギリガザミ幼生大量死の原因細菌であることが示唆された。この原因細菌の形態および生化学性状より *Flavobacteriaceae* 科の細菌であることが考察されている[22]。しかしながら、この原因細菌の正確な分類や診断方法、薬剤を用いない防除方法は開発されていない。

第3節 バクテリオファージや拮抗細菌を用いた疾病防除法

これまで細菌感染症に対してバクテリオファージや拮抗細菌を利用した薬剤を用いない疾病防除が試みられてきた[23]。

バクテリオファージ：バクテリオファージは1915年に英国の研究者である Frederick Twort によって発見された[24]。バクテリオファージを用いた疾病防除はファージセラピーと呼ばれバクテリオファージの溶菌性を利用し細菌性疾病の防除・治療を行う。このファージセラピーは最初、1919年から赤痢菌患者の治療に対して試みられた[24, 25]。抗生物質の発見により、調製の容易さや安定した高い殺菌・静菌活性の点でファージセラピーの評価は低かった[25]。しかし、1970年代に

はバクテリオファージの微生物干渉の特異性や患者への毒性が低いことや抗生を使用することで耐性菌が増加することが報告され、ファージセラピーは再評価されてきた[23, 26, 27]。その後、*Escherichia coli*、*Salmonella typhimurium*、*Clostridium difficile*、*Pseudomonas aeruginosa* など多くの細菌性疾患に対するファージセラピーの研究が報告されてきた[28-34]。水産分野においても、*Aeromonas salmonicida*、*A. hydrophila*、*Edwardsiella tarda*、*Yersinia ruckeri*、*Lactococcus garvieae*、*Pseudomonas plecoglossicida* などの細菌に対する治療・予防にバクテリオファージを用いた研究がされている[35-37]。

拮抗細菌：環境中の微生物群集は共生、拮抗、寄生などの複雑に相互作用をしながら成り立っている[38]。細菌の中には空間中で有利に増殖するために他の細菌に対して拮抗性を有するものが存在する。この拮抗作用には細菌の乳酸などの二次代謝産物やリゾチーム、毒素、バクテリオシンなどの細胞外酵素、ストレプトマイシンやテトラサイクリンなどの抗生物質によって引き起こされることが知られている[39-43]。このような、乳酸菌や放線菌をはじめとした細菌の持つ拮抗作用を利用して細菌性疾患の防除が試みられてきた[44-46]。水産分野においても拮抗細菌を用いて疾患の防除に関する研究がされてきた[22, 47-52]。

第4節 本研究の目的

そこで本研究では、上記の壊死症状を伴うアミメノコギリガザミ幼生の大量死について、生化学性状試験、ゲノム解析、他の甲殻類への病原性を検討し原因細菌の同定と性状に関する知見を得ること（第2章）、原因細菌の診断を行うための検出ツールの開発（第3章）、薬剤を用いずに原因細菌の防除をする方法の開発（第4章）を行うこととした。

第2章 アミメノコギリガザミ壊死症原因細菌の代表株である NY1 の性状解析

第1節 材料と方法

第1項 病アミメノコギリガザミから分離された菌株

実験には壊死症原因細菌の代表的な分離株である NY1 株を使用した。本分離株は沖縄県石垣島の種苗生産施設において 2000 年に分離された[22]。本細菌はマリンアガー (MA; Difco) またはマリンプロス (MB; Difco) を用いて 25°C で培養を行った。

第2項 生化学性状試験

原因細菌 (NY1 分離株) の形態を塩化ピノシアノール (Sigma) 染色を用いて観察した。Gram's Stain Reagent Solution (Nacalai Tesque) を用いてグラム染色を行った。Flexirubin-type 色素の産生は先行研究に記載された方法に沿って行った[53]。異なる温度における発育性を確認するために、NY1 株を 6°C、20°C、25°C、30°C、33°C および 37°C で 5 日間培養した。ポリペプトン寒天培地を使用して、細菌の成長に対する 20% から 80% の濃度の海水の影響を調べた。カタラーゼおよびオキシダーゼ活性およびカゼイン、デンプン、ゼラチン、セルロースおよび Tween 20 の加水

分解を含む、NY1 株の生化学的特性を調べた。キチンの分解能は、滅菌海水を含むキチン寒天培地を使用して検査した[54]。

第3項 ゲノム解析

NY1 株のゲノム DNA を DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) を使用して抽出した。Nextera XT Library Preparation Kit (Illumina) を使用してライブラリーを調製した。ライブラリー調製は Nextera XT Library Prep Reference Guide に沿って行った。MiSeq Reagent Nano Kit version 2 (Illumina) および Illumina MiSeq を用いてライブラリーをシーケンスした。シーケンスによって得られた塩基配列は CLC Genomics Workbench 9 (CLC bio) を用いてアセンブルを行った。細菌の 16S rRNA 遺伝子配列は、MEGA X [55]を使用して他の細菌種との比較を行った。また、16S rRNA を用いた系統樹を neighbor-joining アルゴリズムを用いて作製した。系統樹の遺伝距離は、Kimura's two-state parameter model [56]によって推定された。いずれの場合も、ブートストラップ値は 1,000 回の繰り返しの基づいて計算した。遺伝子のコーディング領域とアノテーションは、RAST によって予測した[57]。今回得られた NY1 株ゲノムと *Aquimarina spongiae* ゲノム (GenBank accession no. FQYP01000001) を Mauve [58] を用いて比較した。

第4項 アミメノコギリガザミを含む4種の甲殻類を用いた感染試験

4種類の甲殻類が NY1 株を用いた感染実験に使用した。実験に使用したアミメノコギリガザミ *S. serrata* (ゾエア一期幼生) は西表島で捕獲された親ガニを国立研究開発法人水産研究・教育機構西海区水産研究所の亜熱帯研究センターで飼育し、孵化させたものを使用した。アルテミア *Artemia franciscana* (メタノープリウス幼生) は市販の米国ユタ州ソルトレイクシティで採取された卵から東京海洋大学で孵化を行い、孵化翌日に使用した。ガザミ *Portunus trituberculatus* (ゾエア一期幼生) は国立研究開発法人水産研究教育機構瀬戸内海区水産研究所百島庁舎で親ガニの養成と孵化を行わせたものを孵化翌日に使用した。ヤマトヌマエビ *Caridina multidentata* (ゾエア一期幼生) は東京海洋大学で飼育された親エビ由来の卵から孵化した当日に使用した。

MB を用いて 25°C で一晩振盪培養した NY1 株を感染実験に用いた。その後、MB で 1 : 100 (高濃度感染区) および 1 : 10,000 (低濃度感染区) で希釈した 500 μ L の希釈液を 50 mL の滅菌海水に加え接種菌液とした。各 90 尾の幼生を菌液に室温下 (ノコギリガザミ) または 25°C (そのほか 3 種類の甲殻類) で一時間浸漬した。その後、アミメノコギリガザミ幼生は 10 mL の滅菌海水で満たした 6-well plate に各ウェル 5 尾ずつ収容し室温で飼育した。ヤマトヌマエビ幼生とガザミ幼生は 5 mL の滅菌海水で満たした 12-well plate に各ウェル 1 尾ずつ、アルテミア幼生は 1 mL の滅菌海水で満たした 24-well plate に各ウェル 1 尾ずつ収容し 25°C で飼育した。そ

れぞれアミメノコギリガザミは 30 尾、その他の 3 種類の生物は 20 尾を観察区とした。観察区のプレートは実態顕微鏡下で観察を行い、死亡数の計数と死亡個体の除去を行った。

アミメノコギリガザミの高濃度感染区において、観察用のプレート以外から経時的なサンプリングを行った。サンプリングは感染前、感染直後、感染 1 日後、感染 2 日後に 3 尾ずつ行った。採取された 3 尾は 10 %海水ホルマリンで固定後、後述する切片作製・組織観察に用いた。

第 5 項 組織観察

アミメノコギリガザミの感染 2 日後のホルマリン固定サンプルを 2%寒天-2,5%ゼラチンでプレ包埋を行った[59]。その後、パラフィン包埋を通常の方法で行った後、切片を作製した。作製した切片をメイグリユンワルド-ギムザ染色に供するために May-Grünwald's Stain solution (Nacalai Tesque) と Giemsa Stain solution (Fujifilm) を用いた。蛍光免疫染色を行う際には切片の脱パラフィン後、Aptum Bio Retriever 2100 (Aptum Biologics) を用いて抗原の賦活化処理を行った。その後、1,000 倍希釈した抗 NY1 株血清 (後述 第 3 章 第 1 節) と 500 倍希釈した Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (H&L; Abcam) および Hoechst 33342 で染色を行った。

第6項 統計解析

フィッシャーの正確確率検定を用いて $p < 0.05$ となった場合、有意差有りと判定した。

第2節 結果

第1項 生化学性状試験

MA 上に発育した NY1 株のコロニーは滑面かつ明るい黄色であった (Figure 2-1)。塩化ピノシアノール染色によって長桿菌の存在が確かめられた (Figure 2-2)。本実験で得られた NY1 株の生化学性状を Table 2-1 に示した。NY1 株は長さ 5 から 10 μm のグラム陰性長桿菌で、カタラーゼおよびオキシダーゼを産生し、キチン、カゼイン、ゼラチン、DNA を分解した。Flexirubin-type 色素は存在しなかった。MA 上では 20°C から 33°C で発育し、40% から 80% 海水を含んだポリペプトンアガーで発育したが、60% 以下の海水濃度では増殖性が弱まる傾向であった。

第2項 ゲノム解析

ゲノムシーケンスの結果、Table 2-2 のデータが得られた。アセンブルの結果。合計 3.56 Mbp の 29 個のコンティグが得られ、コンティグの G+C 含量は 32.5% であった。遺伝子を予測した結果、2,971 個の遺伝子が予測され、その中に 16 個のキチナーゼ関連遺伝子が含まれていた (GenBank accession nos. LC512060 - LC512075)。これらのキチナーゼ関連遺伝子のアミノ酸配列の相同性検索を行ったところ、*Aquimarina* 属と *Tenacibaculum* 属細菌の Type IX Secretion System (T9SS) の遺伝子と相同性があった (Table 2-3)。16S rRNA 配列の分子系統樹を作製した結果、NY1

株は *A. hainanensis* に分類された (Figure 2-3)。*A. spongiae* ゲノムと比較を行った結果、T9SS 遺伝子の 1 つを中心に、タンパク質の並びが共通している部分がみられた (Figure 2-4)。

第 3 項 アミメノコギリガザミを含む 4 種の甲殻類を用いた感染試験

アミメノコギリガザミ：高濃度感染区において感染 1 日後から、低濃度感染区では 2 日後から死亡がはじまった (Figure 2-5)。3 日間観察を行った結果、最終的な死亡率は高濃度感染区、低濃度感染区、非感染区でそれぞれ 100%、73%、7%となった。フィッシャーの正確確率検定で統計解析を行ったところ、高濃度感染区、低濃度感染区ともに非感染区に対して有意な差があった ($p < 0.05$)。また、感染個体の中には背棘部にメラニン色素沈着がみられた (Figure 2-6)。

アルテミア：高濃度感染区、低濃度感染区ともに感染 4 日後から死亡がはじまった。その後、7 日後には高濃度感染区、低濃度感染区においてすべてのアルテミアが死亡し、非感染区では死亡が起こらなかった (Figure 2-5)。フィッシャーの正確確率検定で統計解析を行ったところ、高濃度感染区、低濃度感染区ともに非感染区に対して有意な差があった ($p < 0.05$)。

ヤマトヌマエビ：高濃度感染区において感染 2 日後から、低濃度感染区において感染 3 日後から死亡がはじまった (Figure 2-5)。5 日間観察を行った結果、最終的な死亡率は高濃度感染区、低濃度感染区、非感染区でそれぞれ 100%、70%、0%となった。フィッシャーの正確確率検定で統計解析を行ったところ、高濃度感染区、低濃度感染区ともに非感染区に対して有意な差があった ($p < 0.05$)。

ガザミ：高濃度感染区において感染 1 日後から、低濃度感染区では 2 日後から死亡がはじまった (Figure 2-5)。3 日間観察を行った結果、最終的な死亡率は高濃度感染区、低濃度感染区、非感染区でそれぞれ 90%、50%、20%となった。フィッシャーの正確確率検定で統計解析を行ったところ、高濃度感染区では非感染区に対して有意な差があった ($p < 0.05$)。また、感染個体の中には背棘部にメラニン色素沈着がみられた (Figure 2-7)。

第 4 項 組織観察

A. hainanensis に感染させたアミメノコギリガザミ幼生のホルマリン固定サンプルから組織切片を作製した。その結果、メイグリュンワルド-ギムザ染色、蛍光免疫染色ともに *A. hainanensis* が幼生の付属肢に菌塊を形成している様子が確認できた (Figure 2-8, 2-9)。また、メイグリュンワルド-ギムザ染色において *A. hainanensis* コ

ロニー周辺の細胞の核が変性している様子や細胞が死亡し核濃縮が起こっている
様子が観察できた (Figure 2-8)。

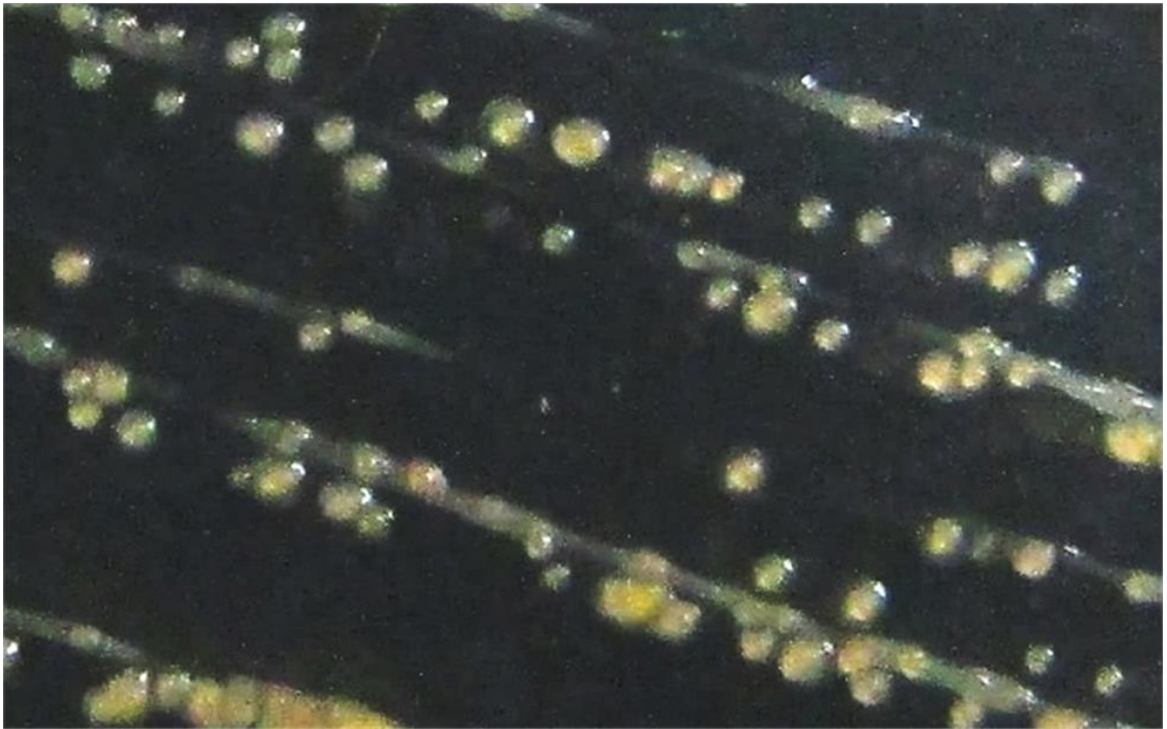


Figure 2-1. NY1 株のマリンアガー上に発育したコロニー

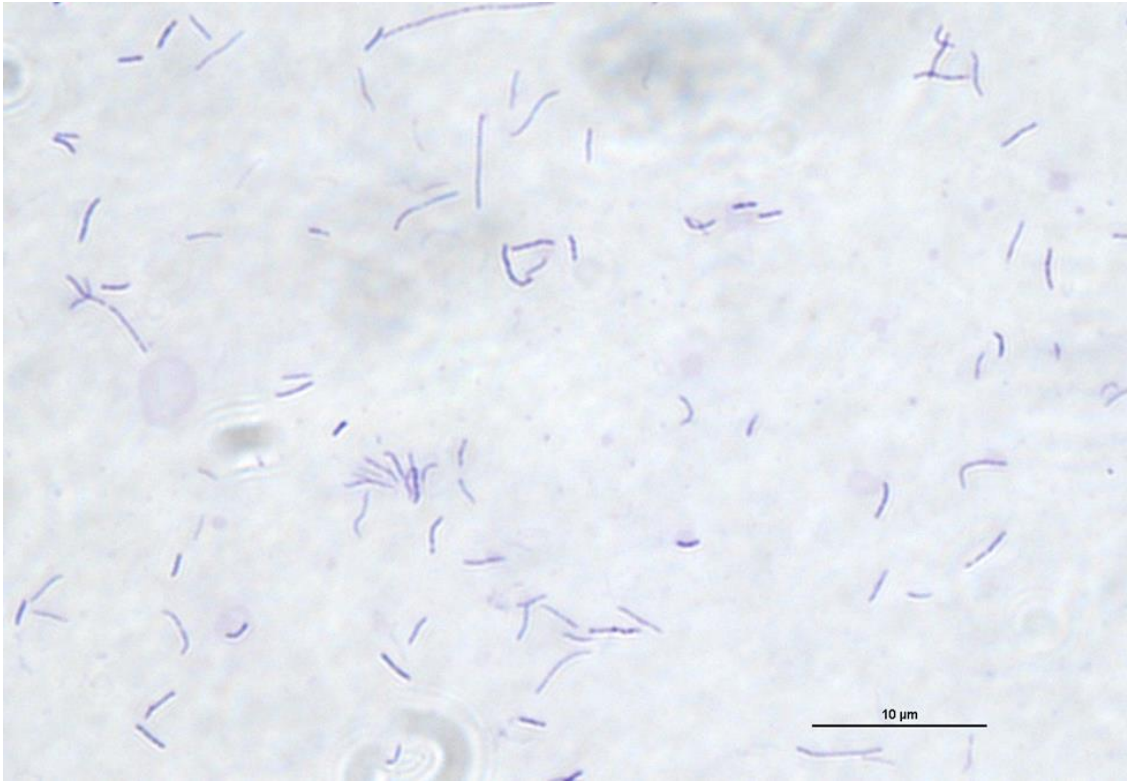


Figure 2-2. NY1 株の塩化ピナシアノール染色像

Table 2-1. 生化学性状試験結果

Characteristics	
Growth on Marine Agar (MA)	+
Length of cells (μm)	5 to 10
Motility	-
Color of cell mass	light yellow
Flexirubin reaction	-
Oxidase	+
Catalase	+
Growth polypepton in:	
20% SW(seawater)	-
40% SW	+
60% SW	+
80% SW	+
Growth at temperature on MA at:	
6° C	-
20° C	+
25° C	+
30° C	+
33° C	+
37° C	-
45° C	-
Degradation of	
agarose	-
cellulose	-
chitin	+
starch	-
casein	+
gelatin	+
DNA	+
tween 20	+
Production of H ₂ S	-
Production of indole	-
Reduction of nitrate	+

+, 陽性反応、-, 陰性反応

Table 2-2. MiSeq によるシーケンスによって得られたコンティグ

Contig measurements	
N75	345,151
N50	497,416
N25	650,247
G+C content	32.5%
Minimum length	1,258
Maximum length	1,071,729
Average length	173,810
Count	29

Table 2-3. キチナーゼ関連 (T9SS) 遺伝子一覧

	RAST annotation	BLASTP	E value
gene35	chitinase	T9SS C-terminal target domain-containing protein [Aquimarina amphilecti]	0.0
gene265	chitinase	T9SS C-terminal target domain-containing protein [Aquimarina amphilecti]	0.0
gene670	chitinase	T9SS C-terminal target domain-containing protein [Aquimarina megaterium]	9E-157
gene940	chitinase	T9SS C-terminal target domain-containing protein [Aquimarina megaterium]	0.0
gene1110	chitinase	T9SS C-terminal target domain-containing protein [Aquimarina atlantica]	0.0
gene1111	chitinase	T9SS C-terminal target domain-containing protein [Aquimarina megaterium]	0.0
gene1145	chitinase	T9SS C-terminal target domain-containing protein [Aquimarina sp. w01]	0.0
gene1656	chitinase	T9SS C-terminal target domain-containing protein [Aquimarina sp. MAR_2010_214]	0.0
gene1746	chitinase	T9SS C-terminal target domain-containing protein [Aquimarina megaterium]	0.0
gene1792	chitinase	T9SS C-terminal target domain-containing protein [Tenacibaculum sp. MAR_2009_124]	0.0
gene1793	chitinase	T9SS C-terminal target domain-containing protein [Aquimarina sp. l32.4]	0.0
gene1811	chitinase	T9SS C-terminal target domain-containing protein [Aquimarina megaterium]	0.0
gene1850	chitinase	T9SS C-terminal target domain-containing protein [Aquimarina muelleri]	0.0
gene1931	chitinase	T9SS C-terminal target domain-containing protein [Aquimarina longa]	0.0
gene2380	chitinase	T9SS C-terminal target domain-containing protein [Aquimarina sp. l32.4]	0.0
gene2381	chitinase	T9SS C-terminal target domain-containing protein [Tenacibaculum sp. MAR_2010_89]	0.0

Family: Flavobacteriaceae

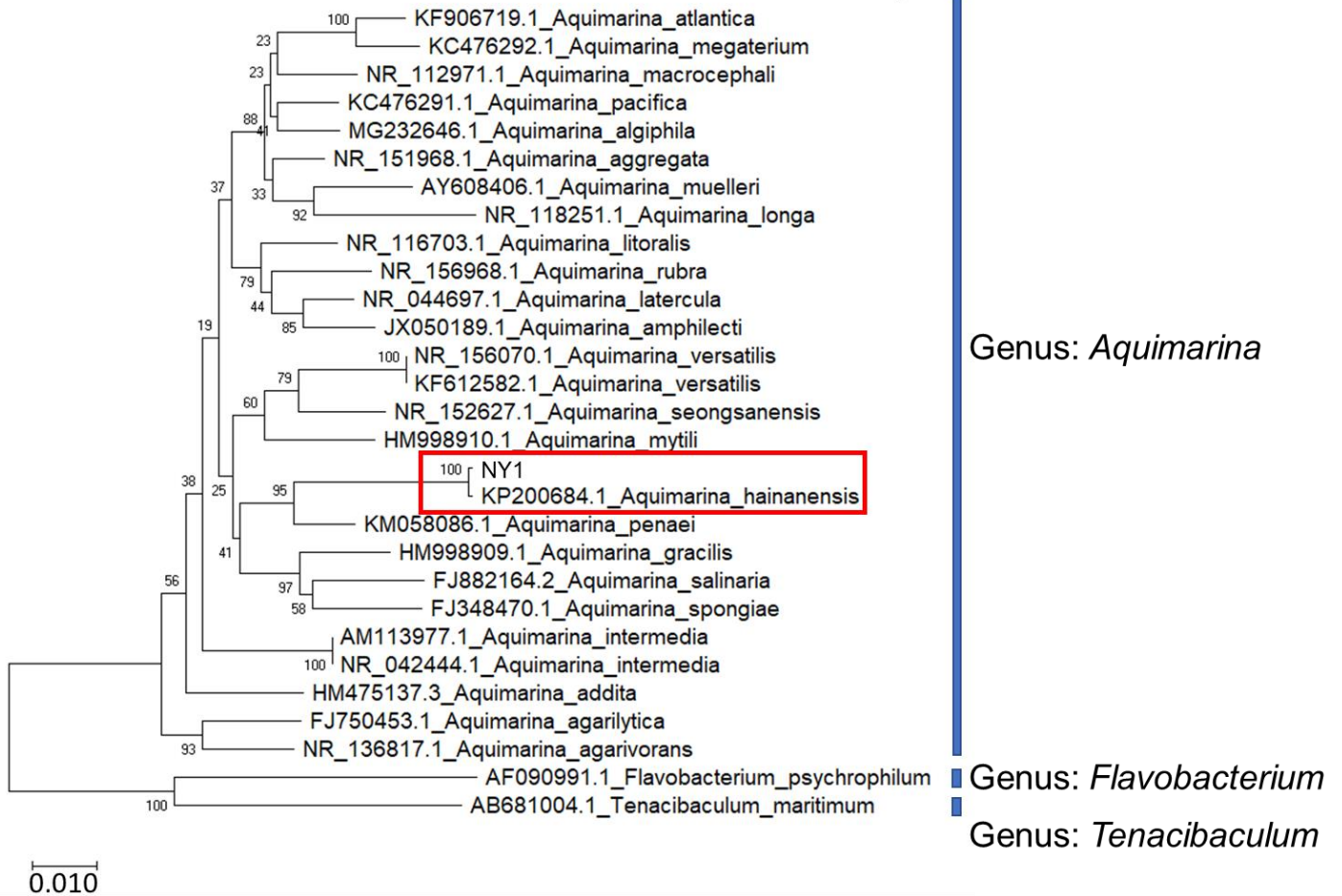


Figure 2-3. 16S rRNA を用いた分子系統解析

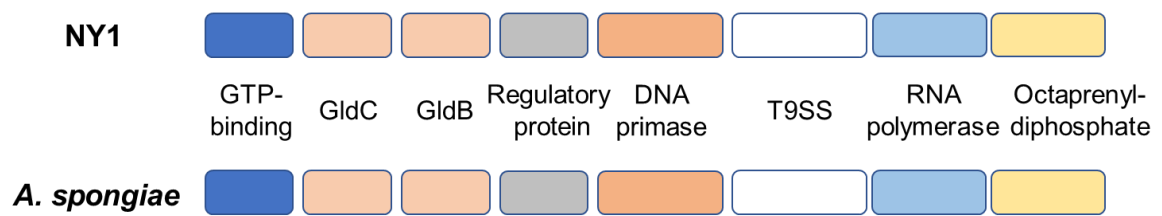


Figure 2-4. *Aquimarinina hainanensis* NY1 株を *Aquimarinina spongiae* のゲノムにおける T9SS 近傍の遺伝子配列の類似性

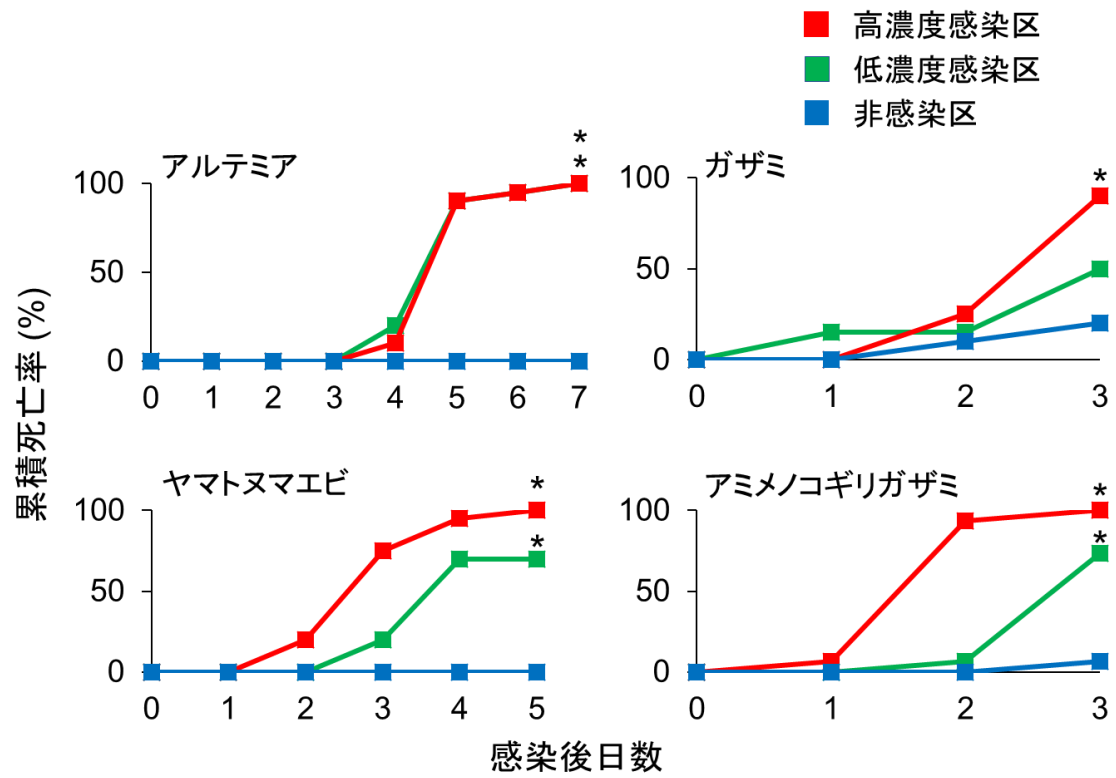


Figure 2-5. 4 種類の甲殻類幼生を用いた *Aquimarina hainanensis* NY1 株の感染実験

* : フィッシャーの正確確率検定を用いた統計解析の結果、非感染区に対して有意差あり ($p < 0.05$)

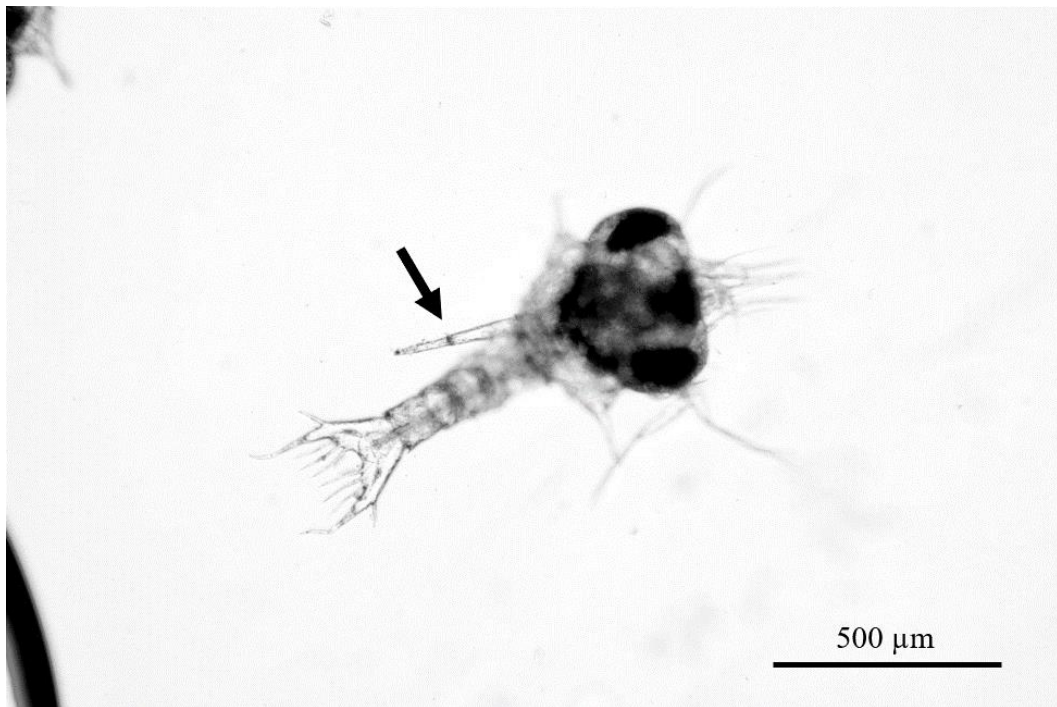


Figure 2-6. *Aquimarina hainanensis* NY1 株の感染実験中のアミノコギリガザミ

Scylla serrata 幼生に見られたメラニン色素沈着

矢印：メラニン色素沈着

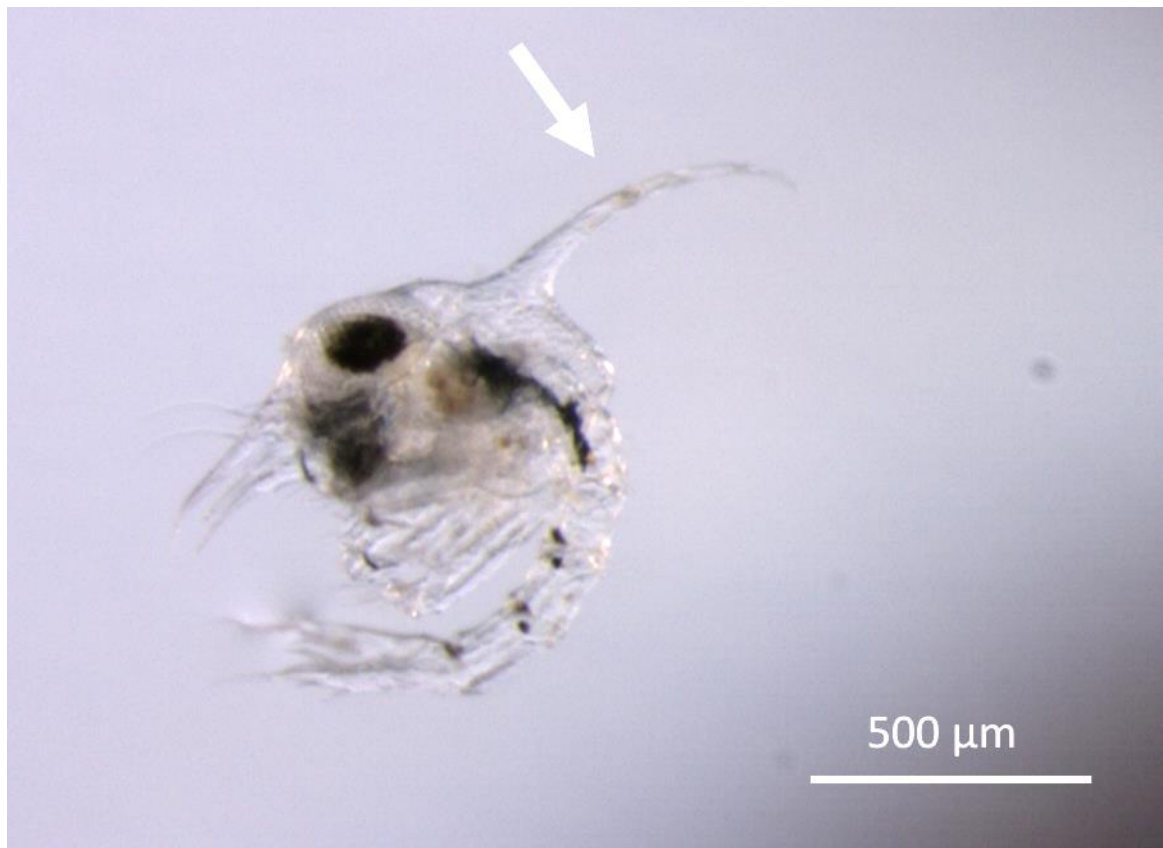


Figure 2-7. *Aquimarina hainanensis* NY1 株の感染実験中のガザミ *Portunus trituberculatus* 幼生に見られたメラニン色素沈着

矢印：メラニン色素沈着

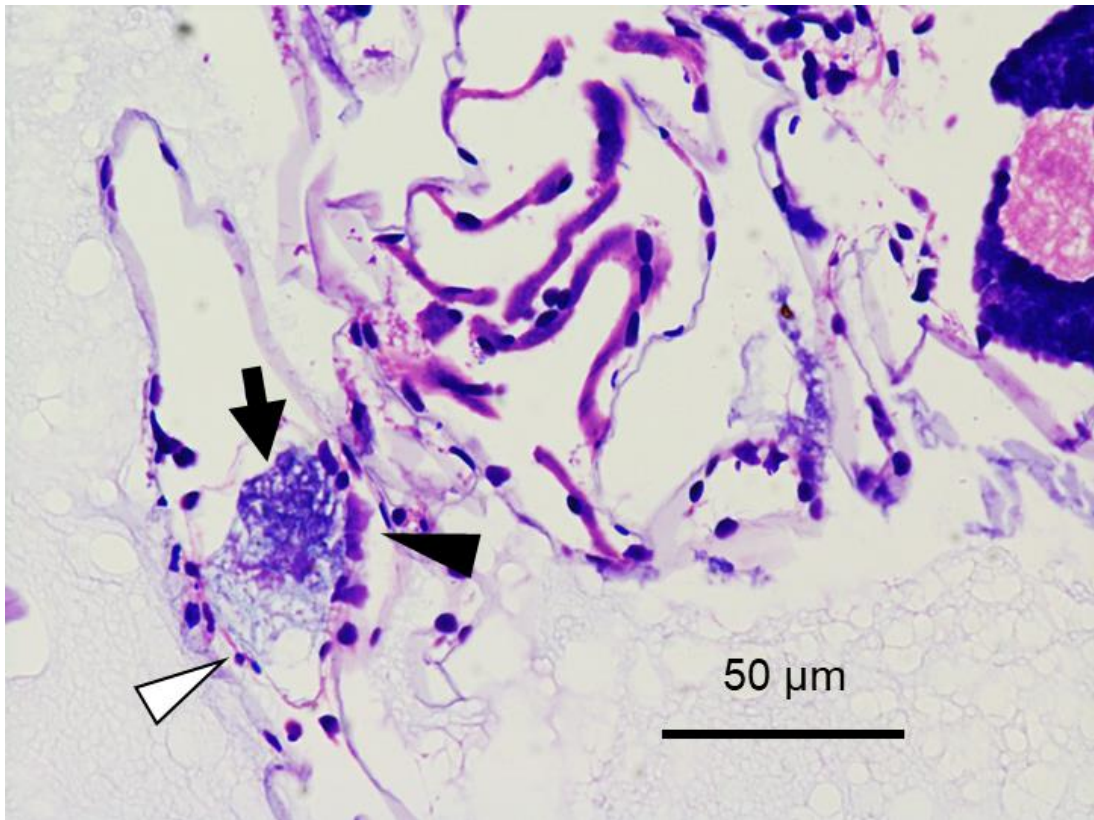


Figure 2-8. *Aquimarina hainanensis* NY1 株に感染させたアミメノコギリガザミ幼生
パラフィン切片のメイグリユンワルド-ギムザ染色像

矢印：接種菌の菌塊、黒矢頭：核の変性、白矢頭：核濃縮

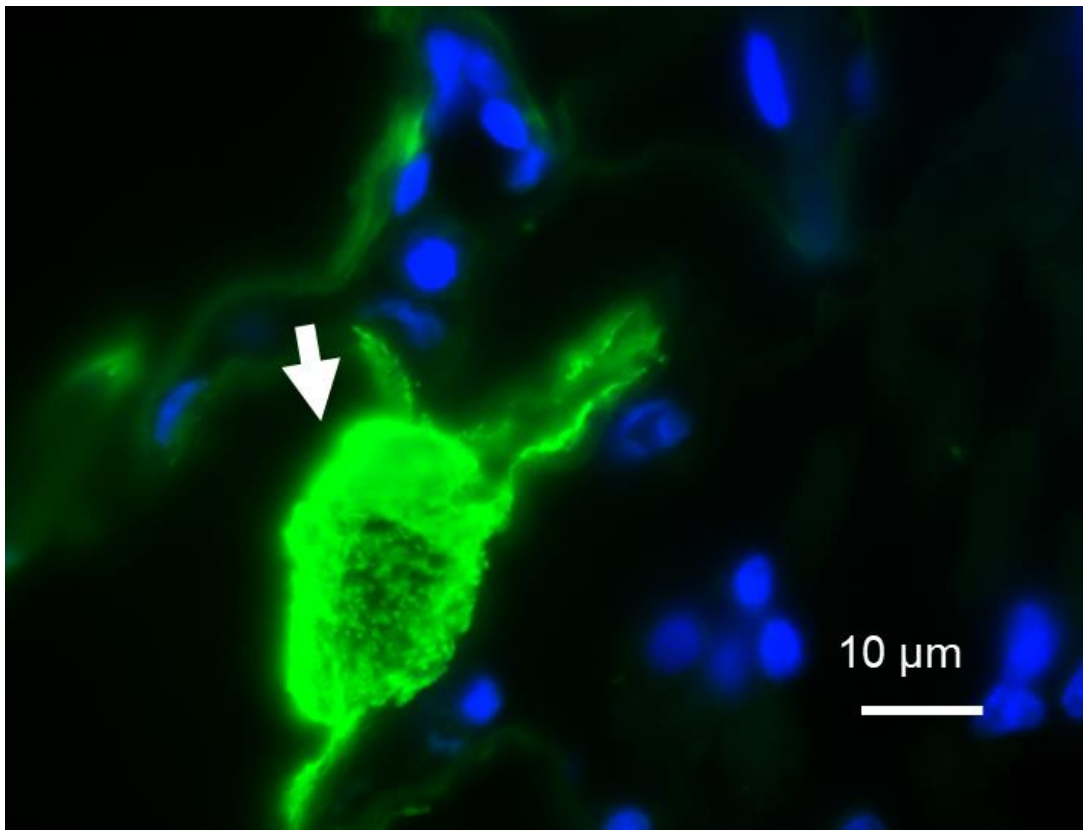


Figure 2-9. *Aquimarina hainanensis* NY1 株に感染させたアミメノコギリガザミ幼生
パラフィン切片の蛍光免疫染色像
矢印の緑色蛍光：接種菌の菌塊、青色蛍光：核

第3節 考察

16S rRNA を使った分子系統解析により、アミメノコギリガザミ幼生の壊死症原因細菌 NY1 株は *Aquimarina hainanensis* と同定された。*A. hainanensis* は中国の海南省のエビ養殖場において疾病に感染したバナメイエビ *Litopenaeus vannamei* 幼生から分離され 2016 年に新種登録されている[60]。*Flavobacteriaceae* 科 *Aquimarina* 属は 2005 年に最初に報告されて以来、現在まで 26 種が報告されている[30]。*Aquimarina* 属細菌の多くは海洋環境から分離がされており、一般にゼラチン、カゼイン、キチン、アガロースなどを分解するものが多く、G+C 含量は 31 から 38%と低いことが知られている[61-66]。これは本研究で得られた結果と矛盾せず、分子系統解析の結果を強く支持する。ゲノム解析により得られた合計 3.56 Mbp の DNA 塩基配列データについて、RAST によるアノテーションの結果、16 個のキチナーゼ関連遺伝子が得られた。BLAST を用いてアミノ酸の相同性検索を行ったところ、キチナーゼ関連遺伝子は *Aquimarina* 属または *Tenacibaculum* 属の Type IX Secretion System (T9SS) と相同性があった。T9SS は細菌の滑走運動やキチンの利用に必要な分泌装置であり、*Flavobacterium psychrophilum* においては病原性に関わることが報告されている[67, 68]。4 種類の甲殻類幼生を用いた感染実験の結果より、*A. hainanensis* NY1 株はアミメノコギリガザミ、アルテミア、ガザミ、ヤマトヌマエビに病原性を示したことから、分類階級の綱をまたいで感染することが示唆された。

また、*A. hainanensis* が疾病に感染したバナメイエビ幼生から分離されていることから考えても、本菌が甲殻類の幼生に対して広範な病原性を持つことが示唆された。メイグリュンワルド-ギムザ染色、蛍光免疫染色ともに *A. hainanensis* NY1 株が幼生の付属肢の内部に菌塊を形成している様子が確認でき、メイグリュンワルド-ギムザ染色において菌塊周辺の細胞の退行性病変がみられた。以上より、*A. hainanensis* は付属肢付近に付着し、外殻であるキチンを分解することで幼生内部に侵入し疾病を引き起こすものと考えられる。

第3章 アミメノコギリガザミ壊死症原因細菌検出法の開発

第1節 材料と方法

第1項 PCR法

- ・検出用プライマーの作製と特異性の検証

第2章にて *Aquimarina hainanensis* NY1 株の病原性関連因子だと考えられるキチナーゼ関連遺伝子が予測された。このキチナーゼ関連遺伝子の塩基配列を用いて Primer3Plus (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) で増幅産物長が 217 bp のプライマー、NY1_chitinase1-2 F : 5' -TAACCGATGTCTGCCATCAA-3' と NY1_chitinase1-2 R : 5' -GTTCTCTGCCTGTGGTCCTC-3' を作製した。

作製した NY1 株の検出用プライマーの特異性を検証するために 200 年に石垣島の種苗生産施設で分離された 3 株の *Aquimarina hainanensis* (NY1, NY6, NY110) およびリファレンスとなるタイプ菌株である *A. hainanensis* KCTC 42423 (Korean Collection for Type Cultures) 、 *Aquimarina litoralis* JCM 15974 (Japan Collection of Microorganisms) 、 *A. macrocephali* JCM 15542、 *A. intermedia* JCM 13506、 *A. addita* JCM 17106、 *A. gracilis* JCM 17453、 *A. mytili* JCM 17454、 *A. longa* JCM 17859、 *A. pacifica* JCM 18214、 *A. megaterium* JCM 18215、 *A. versatilis* JCM 19528、 *A. aggregata* JCM 30824、 *A. latercula* JCM 8515、 *Tenacibaculum discolor*、 *T. Mesophilum*、 *Flavobacterium*

psychrophilum の菌体を DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) で抽出した DNA を用いた。これらの DNA を Takara Ex Taq (Takara Bio) を用いて初期熱変性を 94°C, 2 分間、サイクルは熱変性を 94°C, 20 秒間、アニーリングを 60°C, 30 秒間、伸長反応を 72°C, 30 秒間で 40 サイクルとした。その後、2%のアガロースゲルを用いて 100V で電気泳動を行い、ミドリグリーンアドバンス (日本ジェネティクス) で染色し、増幅産物を確認した。

- ・ 生体からの NY1 株の検出法の検証

第 2 章で行った感染実験における感染個体から PCR による検出が行えるかどうか検証した。

アミメノコギリガザミの高濃度感染区において、観察用のプレート以外から経時的なサンプリングを行った。サンプリングは感染前、感染直後、感染 1 日後、感染 2 日後に 3 尾ずつ行った。採取された幼生の 3 尾はプールし、摩砕後に PCR による NY1 株の検出およびコロニー数 (CFU) の計数に用いた。アルテミアの高濃度感染区において観察用のプレート以外から感染前、感染直後、感染 1 日後、感染 2 日後、感染 3 日後に 3 尾ずつサンプリングを行った後、3 尾をプールし磨砕後に NY1 株の検出 PCR に供した。ガザミの高濃度感染区において観察用のプレート以外から感染前、感染 1 日後、感染 2 日後に 3 尾ずつサンプリングを行った後、3 尾をプールし磨砕後に NY1 株の検出 PCR に供した。ヤマトヌマエビの高濃度感染区

において観察用のプレート以外から感染前、感染 1 日後、感染 2 日後、感染 3 日後に 3 尾ずつサンプリングを行った後、3 尾をプールし磨砕後に NY1 株の検出 PCR に供した。

サンプルからの DNA 抽出は以下の方法で行った。サンプルはすべて 100 μ L の TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) とともに凍結保存した。ここに 400 μ L の Lysis buffer (0.1 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl, 0.1 M EDTA and 1% [w/v] sodium dodecyl sulfate, pH 8.0) 、10 μ L の Proteinase K (5 mg/mL) を加えて混合した。混合したサンプルを 55°C で 3 時間インキュベートしサンプルを溶解させた。インキュベート後にサンプルと等量の Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25:24:1) を加え室温下で 30 分間ロータリーシェーカーを用いて混合した。その後、12,000 rpm で 10 分間遠心分離し水層を回収した。回収した水層に Chloroform/Isoamyl alcohol (24:1) を加え室温下で 30 分間混合し同様に遠心分離後水層を回収した。その後、2-プロパノール沈殿を行い、ペレットを 20 μ L の TE buffer に溶出した。

PCR で使用した条件は次の通りである。Takara Ex Taq (Takara Bio) を使用し、初期熱変性を 94°C, 2 分間、サイクルは熱変性を 94°C, 20 秒間、アニーリングを 60°C, 30 秒間、伸長反応を 72°C, 30 秒間で 40 サイクルとした。

第2項 抗血清による検出法

50 mL のマリネブロスに NY1 株菌体を接種し、攪拌しながら 25°C で一晩培養した。培養液を 10,000 rpm、4°C で 10 分間遠心分離し上清を捨て、5 mL の滅菌人工海水に懸濁した。15 μ L のホルマリン (35%ホルムアルデヒド液) を加え、4°C で 2 日間静置した。その後、10,000 rpm、4°C で 10 分間遠心分離し上清を除いた後 5 mL の滅菌人工海水に懸濁した。遠心分離、再懸濁は 3 回繰り返した。14,000 rpm、4°C で 5 分間遠心分離し上清を除いた後湿重量を測定し PBS で 20 mg/mL に調整した。ウサギへの免疫および採血等はアーク・リソース株式会社へ委託し、抗 NY1 血清を得た。

当初は凝集反応を利用した検出方法を検討したが、*Aquimarina* 属細菌は自家凝集性が高く判別が困難であった。そこで、間接蛍光抗体 (IFA) を用いた方法の検討を行った。抗血清の段階希釈液を使用した蛍光抗体法を、NY1 株およびリファレンスとなるタイプ菌株である *Aquimarina* 属の細菌 7 株: *A. hainanensis* KCTC 42423、*A. addita* JCM 17106、*A. gracilis* JCM 17453、*A. intermedia* JCM 13506、*A. latercula* JCM 8515、*A. macrocephali* JCM 15542 および *A. megaterium* JCM18215 を用いて次のように試験を行った。細菌のコロニーを塗抹したスライドガラスをアセトンで固定し、2 倍ずつ段階希釈した抗 NY1 血清をスライドガラスにマウントし 37°C で 1 時間静置した後、二次抗体として Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (H&L; 1:500;

Abcam) と 37°C で 30 分間反応させた。その後、蛍光顕微鏡 (Nikon, Eclipse Ti-U) を用いて抗原特異的な蛍光を観察した。

第2節 結果

第1項 PCR法

- ・検出用プライマーの作製と特異性の検証

A. hainanensis を含む *Aquimarina* 属細菌 13 種と *Tenacibaculum* 属細菌 2 種、*F. psychrophilum* の DNA を用いて検出用 PCR 法の特異性を検証したところ *A. hainanensis* KCTC 42423 および石垣島分離株 NY1、NY6、NY110 のみを検出することができた (Figure 3-1)。

- ・生体からの NY1 株の検出法の検証

検出 PCR 法を用いて NY1 株に感染させたアミメノコギリガザミ、アルテミア、ガザミ、ヤマトヌマエビから NY1 株の検出を試みたところ、アミメノコギリガザミでは感染 1 日後から、アルテミアでは感染 2 日後から、ガザミでは感染 1 日後から、ヤマトヌマエビでは感染 1 日後から検出することができた (Figure 3-2)。また、アミメノコギリガザミを用いて CFU を測定した結果、 1.6×10^3 CFU/larva (感染直後)、 5.0×10^3 CFU/larva (感染 1 日後)、 5.8×10^4 CFU/larva (感染 2 日後) となり菌数の増加とともに PCR 法によって NY1 株が検出されていることが確かめられた。

第2項 抗血清による検出法

NY1 株に対する抗血清を用いた間接蛍光抗体法によって *A. hainanensis* である NY1 株では抗血清の希釈倍率が 1024 倍希釈まで、KCTC42423 株では 512 倍希釈まで特異蛍光による陽性反応が確認できた (Figure 3-3)。一方、*A. addita* JCM 17106、*A. gracilis* JCM 17453、*A. intermedia* JCM 13506、*A. latercula* JCM 8515、*A. macrocephali* JCM 15542、*A. megaterium* JCM 18215 において抗血清の希釈倍率が 4 倍以上では特異蛍光が確認できなかった。この結果から、血清学的にも NY1 株が *A. hainanensis* と同定された。

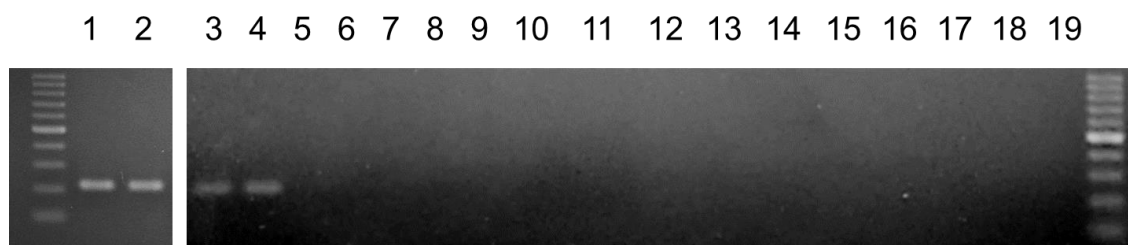


Figure 3-1. *Aquimarina hainanensis* 検出 PCR 法の特異性の検証

1 : *Aquimarina hainanensis* (NY1)、2 : *Aquimarina hainanensis* (KCTC42423)、3 :
Aquimarina hainanensis (NY6)、4 : *Aquimarina hainanensis* (NY110)、5-16 : *Aquimarina*
spp. (reference strains)、17 : *Tenacibaculum discolor*、18 : *Tenacibaculum Mesophilum*、
19 : *Flavobacterium psychrophilum*

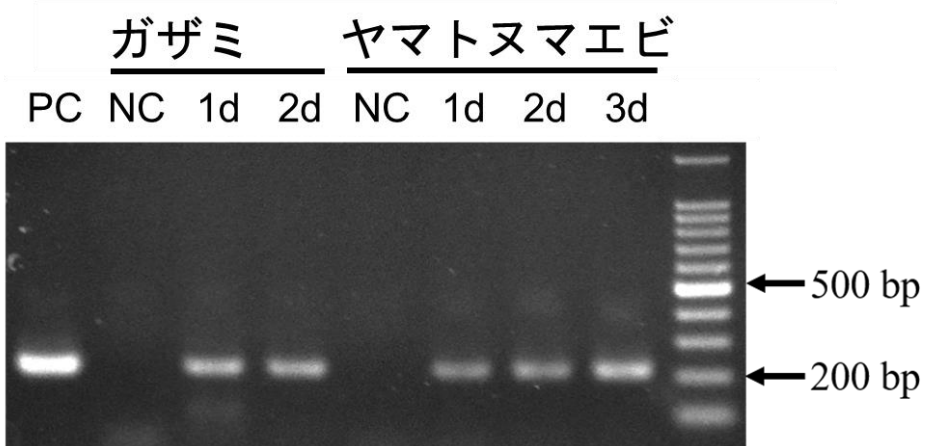
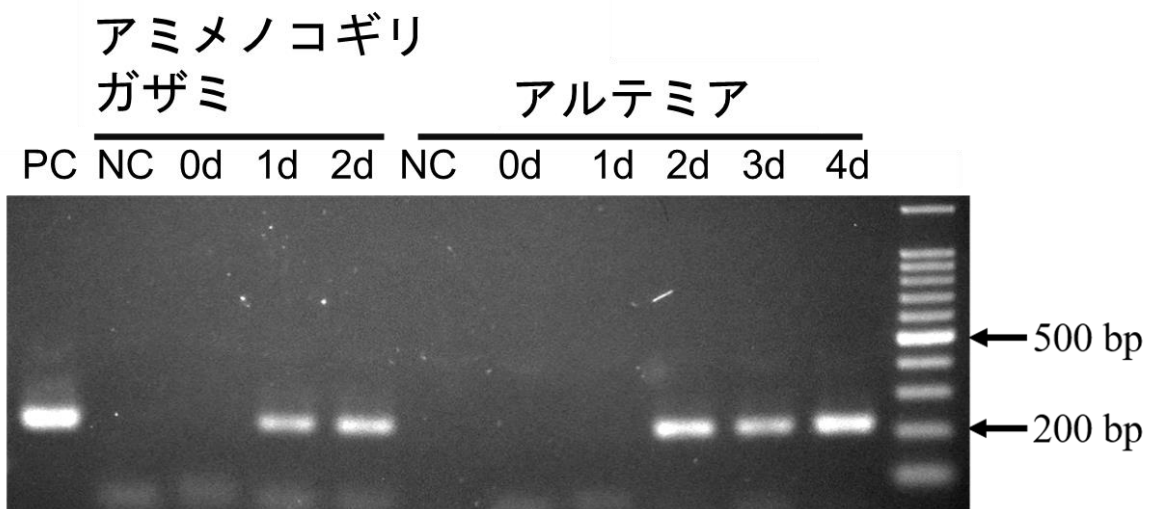
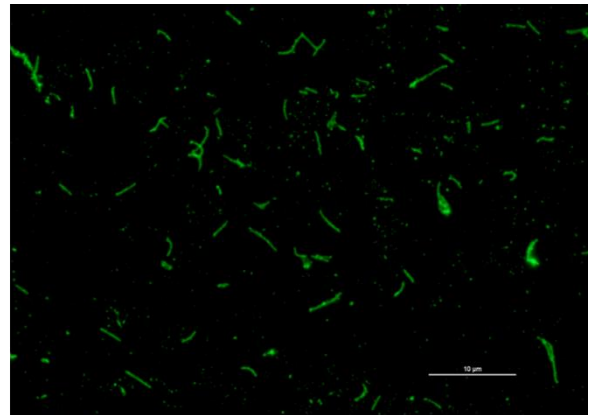


Figure 3-2.人工感染させた生体からの *Aquimarina hainanensis* 検出

	NY1
抗血清 希釈倍率	1024倍



	KCTC42423
抗血清 希釈倍率	512倍

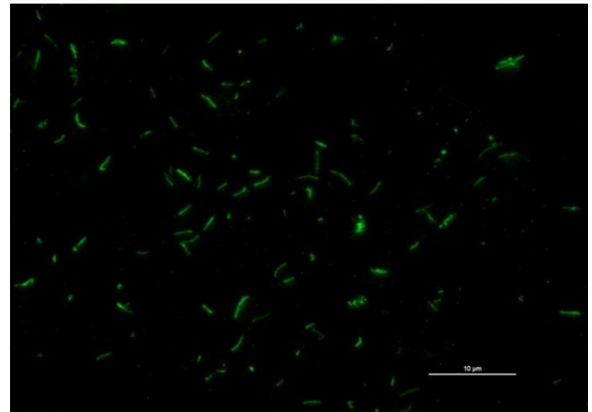


Figure 3-3. *Aquimarina hainanensis* の抗 NY1 血清による検出

第3節 考察

第2章で取得したNY1株のキチナーゼ遺伝子をターゲットとしてPCR用のプライマーを作製した。石垣島の種苗生産施設で分離された3株およびリファレンスとなる *A. hainanensis* 1株、*Aquimarina* 属細菌 12種、フラボバクテリア科の細菌 3種を対象にPCRを行い、*A. hainanensis* を特異的に検出できることが判明した。本検出法で、第2章で行った感染実験における経時サンプリングした個体から接種したNY1株を検出できた。もう一つの検出法としてNY1株に対するウサギ抗血清を得た。原因細菌NY1のホルマリン不活化菌体をウサギに免疫し、抗血清を作製した。*Aquimarina* 属細菌は自家凝集性があり、凝集反応による検出は困難であったため、間接蛍光抗体による検出法を検討したところ *A. hainanensis* のみを特異的に検出できた。また、NY1株が血清学的にも *A. hainanensis* に同定されることを示している。

第4章 アミメノコギリガザミ壊死症防除法の検討

第1節 材料と方法

アミメノコギリガザミの種苗生産において薬剤を用いずに壊死症の防除を行うためには壊死症の原因細菌である *A. hainanensis* を飼育環境から排除しなければならない。その方法として、バクテリオファージおよび拮抗細菌の飼育環境への投与が有効であると予測し、それぞれの分離、有効性の検討を行った。

第1項 バクテリオファージと拮抗細菌の分離

・採取場所

分離に用いた環境サンプルはアミメノコギリガザミ種苗生産施設のある沖縄県石垣島にて採取した。採取したサンプルの種類はアミメノコギリガザミ親ガニ飼育水、マングローブ水および底泥、沿岸海水、種苗生産施設排水、種苗生産施設内のオニヒトデ飼育水およびサンゴ飼育水とした。

・バクテリオファージ

採取したサンプルを 0.22 μ L Millex-HV フィルター (Millipore) を用いてろ過した。NY1 株の菌体を 10 mL のマリネブロスへ懸濁した。新しいマリネブロス 10 mL

に 0.5 mL の菌液と 1 mL のろ液を加え 25°C で一晩静置した。これを 0.45 μ L Millex-HV フィルター (Millipore) を用いて濾過した。MB と 0.35% Bacto Agar (Difco) で調製した 3 mL のソフトマリンアガーに NY1 株の菌液を 500 μ L 加え MA 上に流し込んだ。固化後、先ほど作製した濾液を 10 μ L 滴下し 25°C で培養した。分離されたバクテリオファージは 2、3 回プラークから継代することで純化させた。

・拮抗細菌

採取した環境サンプルを MA へ塗抹し 25°C で一晩培養した。コロニーを観察し、できるだけ形態や色の異なるものを新たな MA へ植え継ぎ拮抗細菌候補株とした。MA へあらかじめ培養しておいた NY1 株と拮抗細菌候補株を十字になるように塗抹し 25°C で 2 日間培養した。培養後、NY1 株の発育を阻害している候補株を拮抗細菌として保存した。

第 2 項 バクテリオファージおよび拮抗細菌の分類

・バクテリオファージ

精製したバクテリオファージを燐タングステン酸で染色し、透過型電子顕微鏡で観察した。その後、形態の異なるバクテリオファージを選抜した。

・拮抗細菌

培養した拮抗細菌を滅菌蒸留水に懸濁し、96°C, 2 分間、4°C, 5 分間で処理し熱抽出を行った。その後、Takara Ex Taq (Takara Bio) と primer pair : S-D-Bact-0341-b-S-17/S-D-Bact-0785-a-A-21 を用いて以下の条件で PCR を行った[69]。初期熱変性を 94°C, 2 分間、サイクルは熱変性を 98°C, 10 秒間、アニーリングを 55°C, 30 秒間、伸長反応を 72°C, 1 分間で 30 サイクルとした。PCR 産物を精製後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) でシーケンス PCR を行い、Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で配列を取得した。得られた配列に対して BLAST を用いて相同性検索を行った。

第 3 項 バクテリオファージ宿主域

MA で培養した 4 株の *Aquimarina hainanensis* (NY1, KCTC42423, NY6, NY110)、*Aquimarina litoralis* JCM15974、*A. macrocephali* JCM15542、*A. intermedia* JCM13506、*A. addita* JCM17106、*A. gracilis* JCM17453、*A. mytili* JCM17454、*A. longa* JCM17859、*A. pacifica* JCM18214、*A. megaterium* JCM18215、*A. versatilis* JCM19528、*A. aggregata* JCM30824、*A. latercula* JCM8515 をマリンプロスに懸濁した。溶解させた 3 mL のソフトマリンアガーに 500 μ L の菌懸濁液を加え、MA に流し込んだ。固化後、分離したバクテリオファージ (TJI1701P, TJI1707P) を 10 μ L 滴下し 25°Cで一晩培養した。その後、菌が溶菌されているか観察した。

第4項 バクテリオファージと拮抗細菌の *A. hainanensis* 増殖抑制効果

- ・バクテリオファージ

2 mL の滅菌海水中に 1.0×10^3 PFU/mL のバクテリオファージ(TJI1701P, TJI1707P) と 4.0×10^5 CFU/mL の NY1 株となるように 3 本ずつ調製し、25°C で振とう培養した。1 日ごとにミスラ法を用いて NY1 株のコロニー数を MA で測定した。

- ・拮抗細菌

2 mL の滅菌海水中に TJI1713B が 1.1×10^5 CFU/mL または TJI1717B が 1.4×10^5 CFU/mL、TJI1752B が 8.0×10^4 CFU/mL と 6.7×10^5 CFU/mL の NY1 株となるように 3 本ずつ調製し、25°C で振とう培養した。1 日ごとにミスラ法を用いて NY1 株のコロニー数を 100 µg/mL のカナマイシン硫酸塩を含んだ MA で測定した。

第5項 バクテリオファージと拮抗細菌の *A. hainanensis* 防除効果

- ・バクテリオファージ

生体は孵化から 1 日後のアルテミアを用いた。非感染コントロールとして 30 尾のアルテミアを滅菌海水に 25°C で 1 時間浸漬した。150 尾のアルテミアを 2.3×10^3 CFU/mL に調製した菌液に 25°C で 1 時間浸漬した。滅菌海水、 1.1×10^1 PFU mL⁻¹、 1.1×10^2 PFU/mL、 1.1×10^3 PFU/mL、 1.1×10^4 PFU/mL のバクテリオファージ液

(TJI1707P) を調製し、5 mL ずつ 6-well plate 分注した。1 試験区 30 尾として各 well に 5 尾ずつ 1 時間浸漬後のアルテミアを加えた。25°C で飼育し、アルテミアの死亡数を測定した。

・拮抗細菌

生体は孵化から 1 日後のアルテミアを用いた。非感染コントロールとして 120 尾のアルテミアを滅菌海水に 25°C で 1 時間浸漬した。120 尾のアルテミアを 9.3×10^3 CFU mL⁻¹ に調製した菌液に 25°C で 1 時間浸漬した。滅菌海水、 8.5×10^2 CFU/mL の TJI1713B 菌液、 1.9×10^3 CFU/mL の TJI1717B 菌液、 1.2×10^3 CFU/mL の TJI1752B 菌液を調製し、5 mL ずつ 6-well plate 分注した。1 試験区 30 尾として各 well に 5 尾ずつ 1 時間浸漬後のアルテミアを加えた。25°C で飼育し、アルテミアの死亡数を測定した。

第 6 項 統計解析

t 検定またはフィッシャーの正確確率検定を用いて $p < 0.05$ となった場合有意差ありと判定した。

第2節 結果

第1項 バクテリオファージと拮抗細菌の分離

NY1 株に溶菌性をもつバクテリオファージと拮抗細菌は種苗生産施設やマンダローブから分離できた (Table 4-1)。

第2項 バクテリオファージと拮抗細菌の分類

バクテリオファージの形態観察の結果、分離されたバクテリオファージは Podoviridae 科の TJI1701P と Myoviridae 科の TJI1707P の2種類に分類された (Figure 4-1)。

拮抗細菌は 16S rRNA の配列から *Pseudoalteromonas* sp. TJI1713B、TJI1717B と *Photobacterium* sp. TJI1752B に分類された。

第3項 バクテリオファージの宿主域

Aquimarina 属細菌に対する宿主域を調べたところ、分類群 TJI1701P 株は *A. hainanensis* のみに、分類群 TJI1707P 株は *A. hainanensis* を含む9種類の *Aquimarina* 属細菌に感染することが明らかとなった (Table 4-2)。

第4項 バクテリオファージと拮抗細菌の *A. hainanensis* 増殖抑制効果

・バクテリオファージ

実験開始時の NY1 株の菌数は 1.2×10^6 CFU/ml であった。その後、NY1 株のみ添加した試験区では1日後に 1.0×10^6 CFU/ml、2日後に 1.1×10^6 CFU/ml と推移した。NY1 株と TJI1701P 株を添加した試験区では1日後に 1.1×10^6 CFU/ml、2日後に 1.1×10^6 CFU/ml と推移した。NY1 株と TJI1707P 株を添加した試験区では1日後に 6.6×10^3 CFU/ml、2日後に 3.4×10^3 CFU/ml と他試験区と比べて大きく NY1 株の菌数が減少した。NY1 株のみを添加した区と TJI1707P を添加した区の2日後の結果から t 検定を用いて統計解析したところ有意差がみられた ($p < 0.05$) (Figure 4-2)。

・拮抗細菌

実験開始時の NY1 株の菌数は 6.7×10^5 CFU/ml であった。その後、NY1 株のみ添加した試験区では1日後に 1.4×10^6 CFU/ml、2日後に 1.6×10^6 CFU/ml、3日後に 9.2×10^5 CFU/ml、4日後に 5.2×10^5 CFU/ml、5日後に 5.1×10^5 CFU/ml と推移した。NY1 株と TJI1713B を添加した試験区では1日後に 6.6×10^5 CFU/ml、2日後に 8.6×10^5 CFU/ml、3日後に 5.3×10^5 CFU/ml、4日後に 2.4×10^5 CFU/ml、5日後に 1.1×10^5 CFU/ml と推移した。NY1 株と TJI1717B を添加した試験区では1日後に 3.3×10^5 CFU/ml、2日後に 7.8×10^5 CFU/ml、3日後に 4.1×10^5 CFU/ml、4日後に 2.4×10^5 CFU/ml、5日後に 2.1×10^5 CFU/ml と推移した。NY1 株と TJI1752B を添加した

試験区では1日後に 9.2×10^5 CFU/ml、2日後に 8.0×10^5 CFU/ml、3日後に 6.7×10^5 CFU/ml、4日後に 3.8×10^5 CFU/ml、5日後に 4.1×10^5 CFU/ml と推移した。拮抗細菌を添加した試験区では NY1 株の菌数が抑えられる傾向にあったが大きな差はみられなかった (Figure 4-3)。

第5項 バクテリオファージと拮抗細菌の *A. hainanensis* 防除効果

・バクテリオファージ

NY1 株に感染させた試験区では接種3日後から死亡がはじまった。NY1 株に感染させファージ未添加の試験区ではその後死亡率が増加し続け、7日後に死亡率が100%に達した。 1.1×10^2 PFU/ml のバクテリオファージを添加した試験区では最終的な死亡率は20%であった。 1.1×10^2 PFU/ml 以上のバクテリオファージを添加した試験区では死亡率は6.7%以下に抑えられ、ネガティブコントロール区と同水準であった (Figure 4-3)。フィッシャーの正確確率検定を用いて NY1 株に感染させファージ未添加の試験区とバクテリオファージを添加した試験区で統計解析を行ったところ、すべての試験区で有意な差がみられた ($p < 0.05$) (Figure 4-4)。

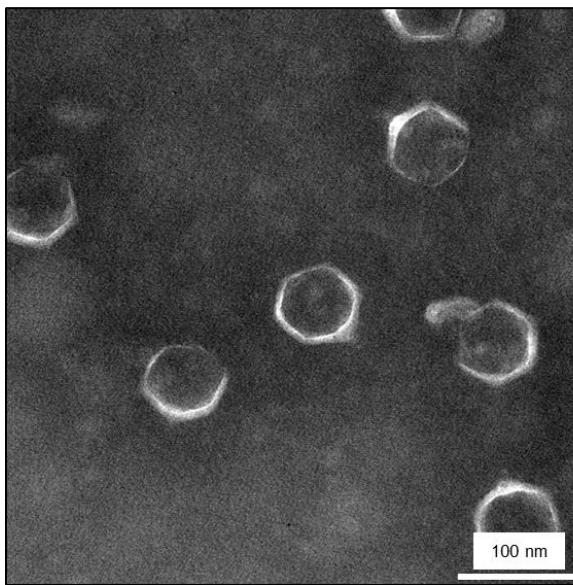
・拮抗細菌

NY1 株に感染させ拮抗細菌未添加の試験区では3日後から死亡がはじまり、その後死亡率が増加し続け5日後に死亡率が100%に達した。NY1 株に感染させ TJI1713B 株を添加した試験区では感染4日後から死亡がはじまり、最終的な死亡

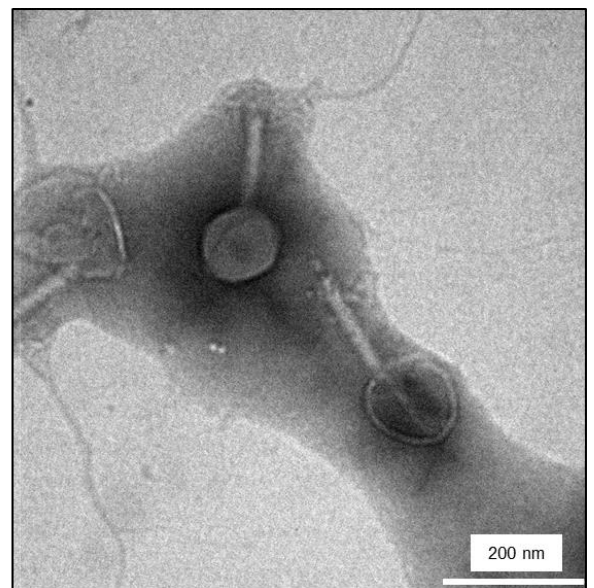
率は 67%であった。NY1 株に感染させ TJI1717B 株を添加した試験区では感染 2 日後から死亡がはじまり、最終的な死亡率は 87%であった。NY1 株に感染させ TJI1752B 株を添加した試験区では感染 3 日後から死亡がはじまり 5 日後には死亡率が 97%に達した。フィッシャーの正確確率検定を用いて NY1 株に感染させ拮抗細菌未添加の試験区と拮抗細菌を添加した試験区で統計解析を行ったところ、TJI1713B 株を添加した試験区で有意な差がみられた ($p < 0.05$)。また、非感染かつ拮抗細菌を添加した試験区では最終的な死亡率が、TJI1713B : 8%、TJI1717B : 40%、TJI1752B : 17%となり、非感染かつ拮抗細菌未添加のネガティブコントロール区の 7%を上回った (Figure 4-5)。

Table 4-1. バクテリオファージと拮抗細菌分離サンプル

	分離場所
バクテリオファージ	アミメノコギリガザミ親ガニ飼育水槽 種苗生産施設排水 オニヒトデ飼育水槽 サンゴ飼育水槽 マングローブ水
拮抗細菌	アミメノコギリガザミ親ガニ飼育水槽 マングローブ底泥



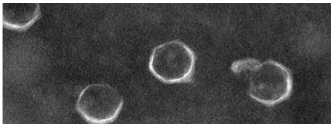
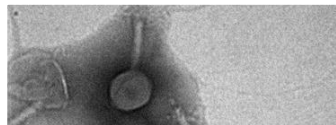
TJI1701P
Podoviridae



TJI1707P
Myoviridae

Figure 4-1. バクテリオファージのリンタングステン酸によるネガティブ染色の電子顕微鏡像

Table 4-2. 分離した2株のバクテリオファージの宿主域

宿主菌		
	TJI1701P	TJI1707P
<i>A. hainanensis</i>	○	○
<i>A. megaterium</i>	×	○
<i>A. gracilis</i>	×	○
<i>A. longa</i>	×	×
<i>A. intermedia</i>	×	×
<i>A. litoralis</i>	×	○
<i>A. macrocephali</i>	×	○
<i>A. aggregata</i>	×	○
<i>A. pacifica</i>	×	○
<i>A. versatilis</i>	×	×
<i>A. addita</i>	×	×
<i>A. latercula</i>	×	○
<i>A. mytili</i>	×	○

○, 溶菌性あり、×, 溶菌性なし

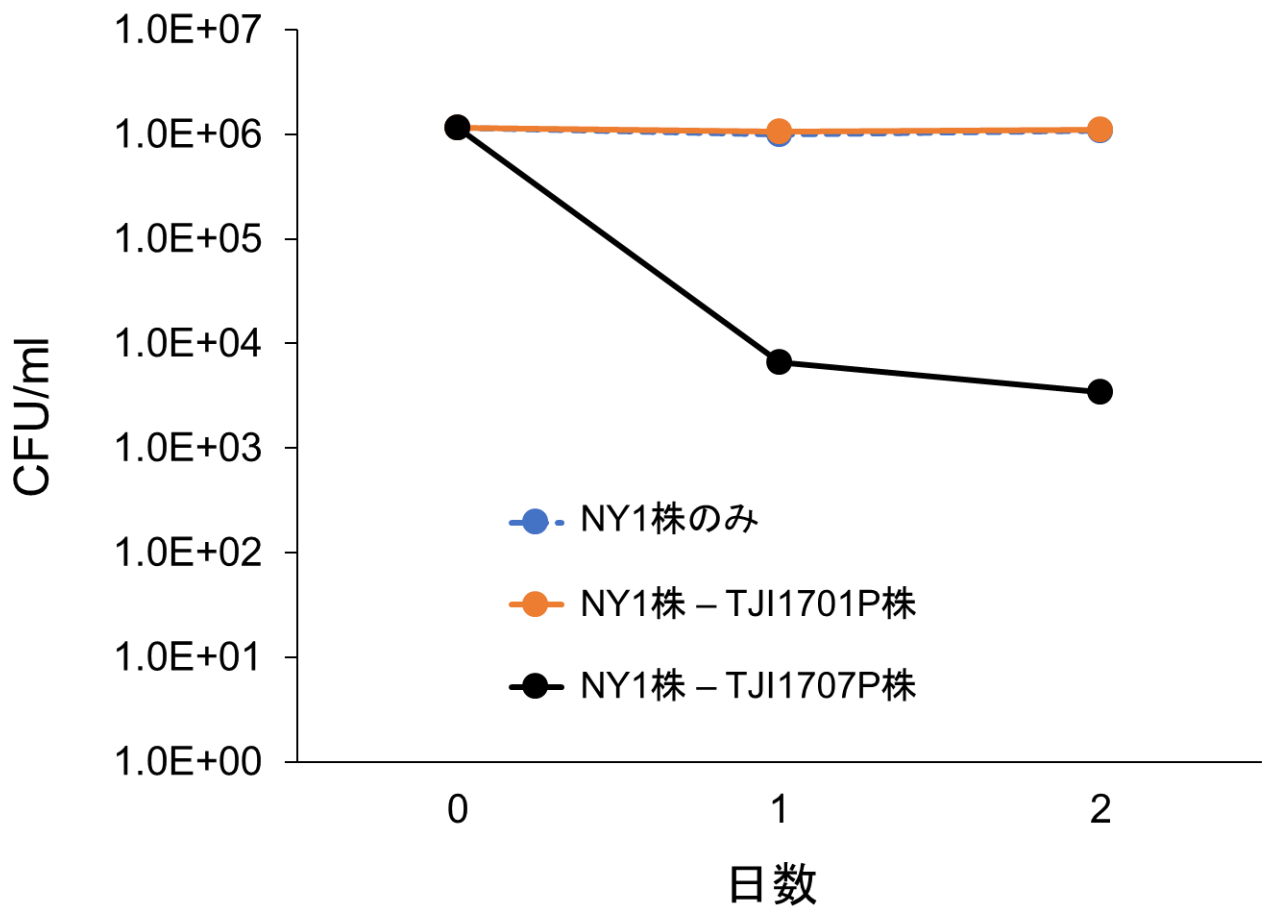


Figure 4-2. 分離した2株のバクテリオファージの *Aquimarina hainanensis* 殺菌効果

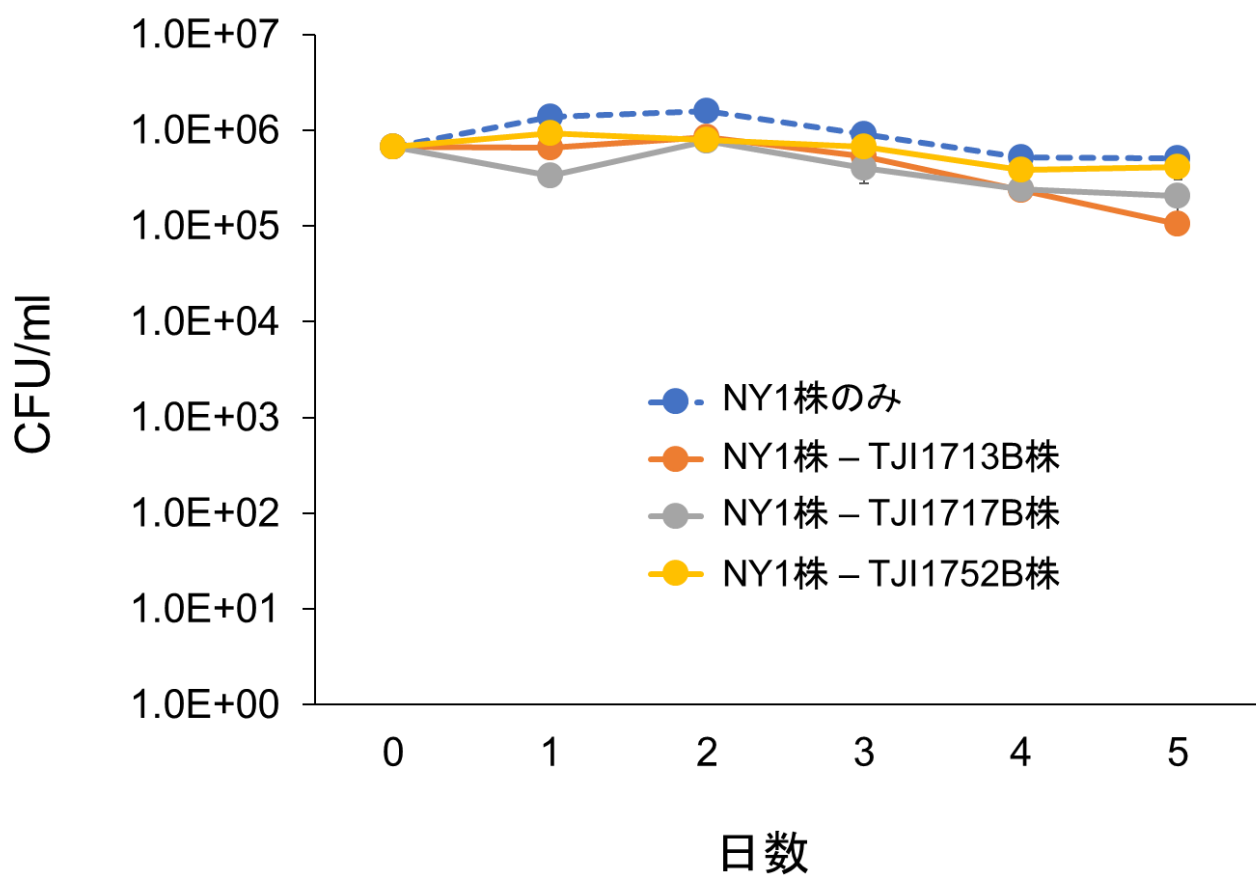


Figure 4-3. 分離した 3 株の拮抗細菌の *Aquimarina hainanensis* 増殖抑制効果

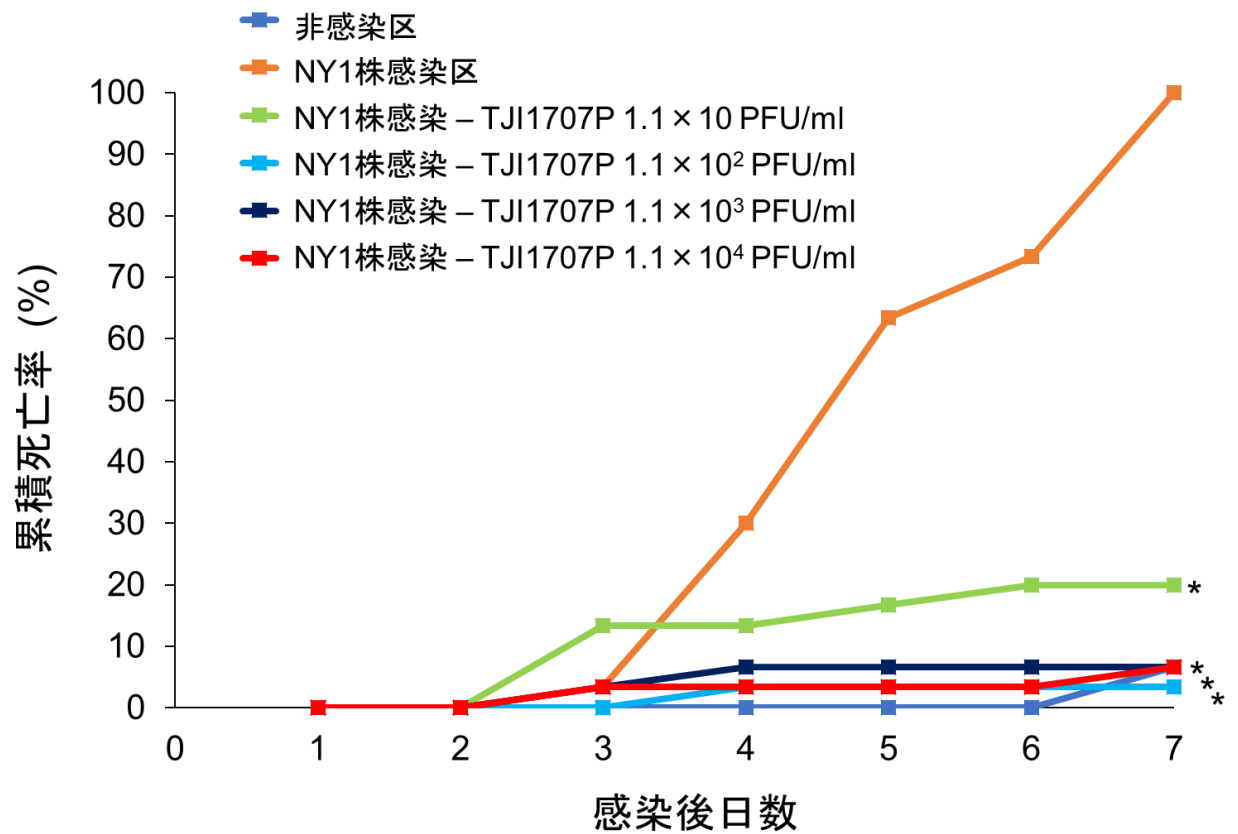


Figure 4-4. *Aquimarina hainanensis* 感染アルテミアに対するバクテリオファージの防除効果

*: フィッシャーの正確確率検定を用いた統計解析の結果 NY1 株感染区に対して有意差あり ($p < 0.05$)

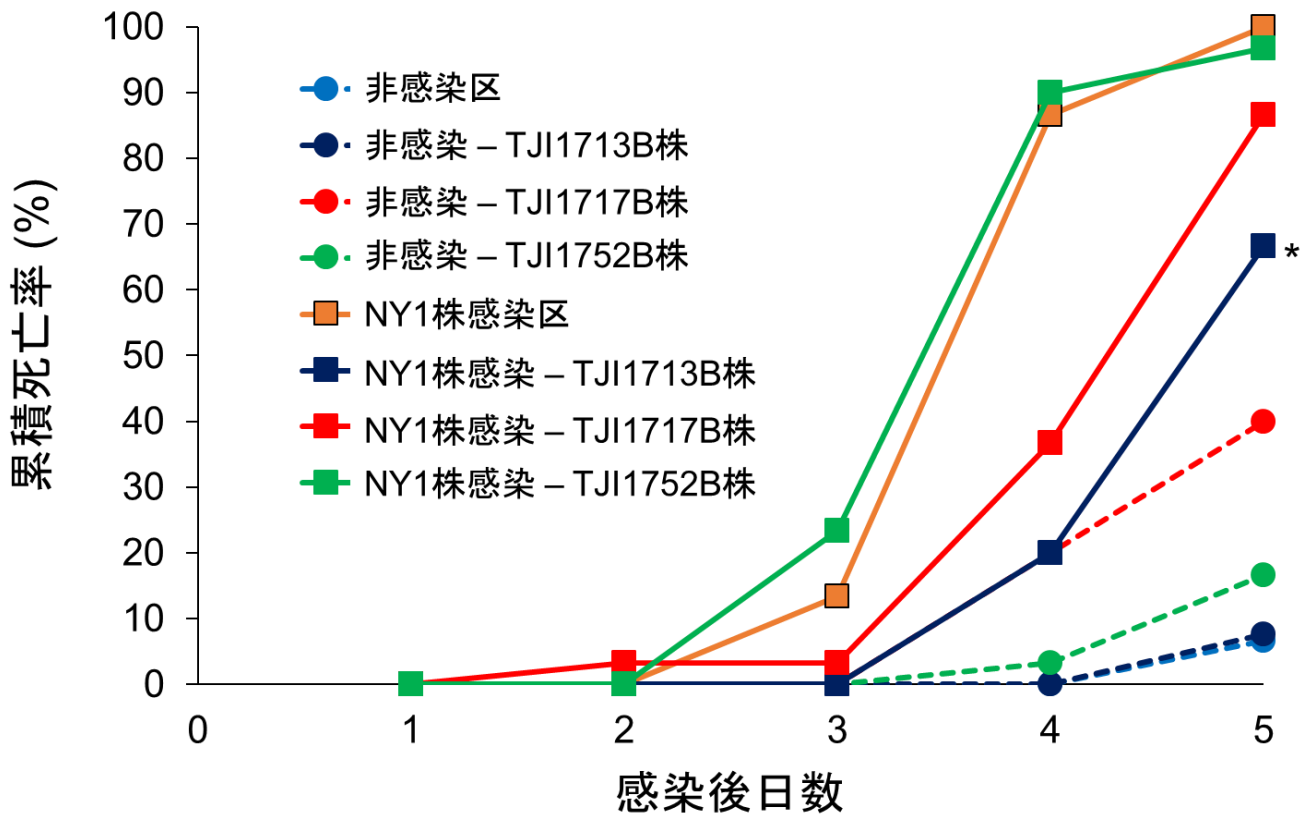


Figure 4-5. *Aquimarina hainanensis* 感染アルテミアに対する分離した3株の拮抗細菌

防除効果

*: フィッシャーの正確確率検定を用いた統計解析の結果 NY1 株感染区に対して有

意差あり ($p < 0.05$)

第3節 考察

食に供する生物の種苗生産において疾病制御に用いるツールとして薬剤を用いることができないため、自然由来の溶菌性バクテリオファージと拮抗細菌の使用を検討した。バクテリオファージと拮抗細菌はアミメノコギリガザミ飼育槽、沿岸海水、マングローブ、種苗生産施設排水、オニヒトデ・サンゴ水槽から分離した。分離されたバクテリオファージは形態の観察から 2 種類に分けられた (TJI1701P、TJI1707P)。*A. hainanensis* 由来のバクテリオファージがアミメノコギリガザミ親ガニ水槽や種苗生産施設の排水、同施設内のオニヒトデ飼育水槽、サンゴ飼育水槽、施設外のマングローブから分離されたことから *A. hainanensis* を親ガニが外部から持ち込んでいる場合や、種苗生産施設の給水や環境中で共生している甲殻類に感染している場合などが考えられた。

拮抗細菌は 3 株 (TJI1713B、TJI1717B、TJI1752B) 分離され、16S rRNA の配列から *Pseudoalteromonas* 属、*Photobacterium* 属細菌であることが判明した。2 種類のバクテリオファージを用いて *in vitro* で *A. hainanensis* NY1 株に対する溶菌力を試験したところ、TJI1707P がより溶菌性が高いことが示された。そこで TJI1707P を用いてアルテミアを用いた感染防除試験を行ったところ、飼育水に対して 1.12×10^2 PFU/mL のバクテリオファージを添加することで非感染区と同程度まで死亡を抑えることができた。また、拮抗細菌 3 種を用いて NY1 株の増殖抑制試験を行った

が、病原細菌の菌数は大きな差がみられなかった。また、NY1 株のみを添加した試験区においてもほとんど増殖していないことから、NY1 株が海水中で増殖できる上限は 10^6 CFU/mL 程度であると考えられた。バクテリオファージと同様にアルテミアを用いて感染防除試験を行ったところ、拮抗細菌を添加することで死亡が抑えられる傾向にあったが TJI11717B および TJI1752B において長期間の拮抗細菌への暴露による影響が懸念された。Dan&Hamasaki (2015) によってアミメノコギリガザミの種子生産における、拮抗細菌を用いた細菌性壊死症の制御法が検討された[22]。プロバイオティクス細菌の投与は *A. hainanensis* を原因とする死亡を抑える効果があるものの、長期間拮抗細菌を飼育環境で維持することが困難であることが示されている。本研究の結果と合わせると、拮抗細菌を投与した場合 *A. hainanensis* による死亡を抑えつつ幼生が死亡しない濃度に拮抗細菌をコントロールすることは困難である。そのため、バクテリオファージ TJI1707P 株の添加は幼生へ直接影響を与えず、殺菌性も高いため疾病の防除に適していると考えている。

第5章 総合考察

第2章において、アミメノコギリガザミ壊死症の病原細菌NY1株が *A. hainanensis* であることが判明し、広範な宿主域が明らかとなった。Flavobacteriaceae 科に分類される *Aquimarina* 属は2006年に新属として登録された[61]。*Aquimarina* 属は、グラム陰性長桿菌であり、従属栄養、好気性、海洋環境から分離されるという特徴を持っている[60]。甲殻類から分離された *Aquimarina* 属細菌として *A. hainanensis* と *A. penaei* が報告されている。これらはそれぞれ、中国の種苗生産施設において疾病に罹患したバナメイエビ *Litopenaeus vannamei* 幼生と中国のエビ養殖場において疾病に罹患したバナメイエビの腸管から分離された[60, 70]。本研究および先行研究で得られたNY1株の特徴は一般的な *Aquimarina* 属細菌の報告と一致していた。一方で、NY1株と *A. hainanensis* の生化学的特性の不一致は、37°Cでの発育とカゼインの分解能のみであり、株の違いによるもとだと考える[60]。第3章において本病原細菌の病原性関連遺伝子であるキチナーゼ遺伝子をターゲットとして検出用PCRプライマーを作製した。特異性、検出感度、生体からの検出の有無が確かめられた。ウサギ抗NY1血清を作製し、間接蛍光抗体による検出法の検討を行った。この方法でも *A. hainanensis* を特異的に検出することができた。これらの検出法は今後アミメノコギリガザミの種苗生産現場で本疾病の診断に用いることが出来ると考えられる。第4章にて薬剤を用いない防除法に用いるツールとしてバクテリオ

ファージと拮抗細菌について、分離培養および有効性の試験を行った。その結果、バクテリオファージのうち TJI1707P 株が最も有効に病原細菌の排除を行えることが示された。

現在ノコギリガザミ *Scylla spp.*をはじめとした甲殻類の種苗生産は世界中で行われ、減少した甲殻類の野生資源量の回復や養殖に用いられている。種苗生産過程ではしばしば感染症が発生し甚大な被害を与えることが問題となる。現時点ではアミメノコギリガザミ以外では *A. hainanensis* を原因とした被害は確認されていないが、*A. hainanensis* は広範な宿主域が予測されることから今後、*A. hainanensis* を原因とする疾病が発生する可能性がある。日本のガザミ *P. trituberculatus* 種苗生産施設における大量斃死時に、MA 上で *A. hainanensis* と似た黄色のコロニーが分離されており、この事例も *A. hainanensis* が原因である可能性が高いと考えている。現在はアミメノコギリガザミのみで確認されている *A. hainanensis* による感染症が他の甲殻類種苗生産において発生した場合、本研究で作製した検出ツールが有効であると期待される。種苗生産過程では、幼生の初期段階で自然に死亡する個体がみられ、これまでは寒天平板上で細菌分離をする以外に診断方法がなかった。本研究で開発された PCR 法と抗 NY1 株血清による検出方法は甲殻類の種苗生産において *A. hainanensis* の感染を明らかにし、種苗生産に貢献できることが期待される。ホルマリンや抗生物質などを使用しない疾病防除方法として、バクテリオファージと拮抗細菌の添加による方法を検討した。実際の種苗生産現場においては、外部から原因

細菌の持ち込みを防ぐために、供給される海水の消毒（紫外線殺菌等）と親ガニの搬入時のバクテリオファージによるトリートメントを行う。その後は産卵前の養成時、産卵後、幼生孵化直前に分けてバクテリオファージを飼育水に添加し、*A. hainanensis* を排除する。幼生孵化後はバクテリオファージの耐性菌出現を抑えるためにバクテリオファージの添加を控え、*A. hainanensis* の増殖が弱まる 60%程度に希釈した海水を用いて幼生飼育を行うことで *A. hainanensis* を原因とした疾病を抑えつつ種苗生産を行うことができると考えている。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、始終寛大に御指導、御鞭達下さり、更に、研究一般に対する理念を御教授下さいました東京海洋大学水族病理学研究室教授佐野元彦博士に厚く御礼申し上げます。また、研究を進める上で始終有益かつ適切な御助言と御指導を頂いた東京海洋大学水族病理学研究室助教加藤豪司博士に心より感謝申し上げます。さらに、厳密なる御校閲を賜った東京海洋大学増殖生態学研究室教授濱崎活幸博士、同准教授團重樹博士、ならびにゲノム科学研究室教授近藤秀裕博士に御礼申し上げます。さらに共同研究先としてアミメノコギリガザミ幼生の提供およびご助言を賜った水産研究・教育機構西海区水産研究所亜熱帯研究センター清水智仁氏、同三田哲也氏に御礼申し上げます。

最後に、常に討議に加わり、貴重な助言を惜しまなかった東京海洋大学水族病理学研究室の大学院生ならびに学部学生に対し深く感謝致します。

参考文献

- [1] Keenan, C. P. (1999). Aquaculture of the Mud Crab, Genus *Scylla* - Past, Present and Future. *ACIAR Proceedings*, 78 9–13.
- [2] Azra, M. N., & Ikhwanuddin, M. (2016). A review of maturation diets for mud crab genus *Scylla* broodstock: Present research, problems and future perspective. *Saudi Journal of Biological Sciences* 23, 257–267. doi: 10.1016/j.sjbs.2015.03.011.
- [3] Hamasaki, K., Obata, Y., Dan, S., & Kitada, S. (2011). A review of seed production and stock enhancement for commercially important portunid crabs in Japan. *Aquaculture International*, 19, 217–235. doi: 10.1007/s10499-010-9387-7
- [4] Hamasaki, K., Suprayudi, M. A., & Takeuchi, T. (2002). Mass mortality during metamorphosis to megalops in the seed production of mud crab *Scylla serrata* (Crustacea, Decapoda, Portunidae). *Fisheries Science*, 68, 1226–1232. doi: 10.1046/j.1444-2906.2002.00559.x

[5] Otta, S. K., Shubha, G., Joseph, B., Chakraborty, A., & Karunasagar, I. I. (1999). Polymerase chain reaction (PCR) detection of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured and wild crustaceans. *Diseases of Aquatic Organisms*, 38, 67–70. doi: 10.3354/dao038067

[6] Rajendran, K. V., Vijayan, K. K., Santiago, T. C., & Krol, R. M. (1999). Experimental host range and histopathology of white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp, prawns, crabs and lobsters from India. *Journal of Fish diseases*, 22, 183–191. doi: 10.1046/j.1365-2761.1999.00162.x

[7] Sahul Hameed, A. S., Balasubramanian, G., Syed Musthaq, S., & Yoganandhan, K. (2003). Experimental infection of twenty species of Indian marine crabs with white spot syndrome virus (WSSV). *Diseases of Aquatic Organisms*, 57, 157–161. doi: 10.3354/dao057157

[8] Kiatpathomchai, W., Jaroenram, W., Arunrut, N., Gangnonngiw, W., Boonyawiwat, V., & Sithigorngul, P. (2008). Experimental infections reveal that common Thai crustaceans are potential carriers for spread of exotic Taura syndrome virus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 79, 183–190. doi: 10.3354/dao01903.

- [9] Longyant, S., Sattaman, S., Chaivisuthangkura, P., Rukpratanporn, S., Sithigorngul, W., & Sithigorngul, P. (2006). Experimental infection of some penaeid shrimps and crabs by yellow head virus (YHV). *Aquaculture*, 257, 83–91. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.07.043
- [10] Jithendran, K. P., Poornima, M., Balasubramanian, C. P., & Kulasekarapandian, S. (2010). Diseases of mud crabs (*Scylla* spp.): an overview. *Indian Journal of Fisheries*, 57, 55–63.
- [11] Lavilla-Pitogo, C. R., & de la Peña, L. D. (2004). *Diseases in farmed fish and mud crabs, Scylla spp.: Diagnosis, prevention, and control*. Tigbauan: Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.
- [12] Bian, B. Z., Hatai, K., Po, G., & Egusa, S. (1979). Studies on the fungal diseases in crustaceans I. *Lagenidium scyllae* sp. nov. isolated from cultivated ova and larvae of the mangrove crab (*Scylla serrata*). *Quarterly Research Reports*. 3, 10–13.

- [13] Bian, B. Z., & Egusa, S. (1980). *Atkinsiella hamanaensis* sp. nov. isolated from cultivated ova of the mangrove crab, *Scylla serrata* (Forsskål). *Journal of Fish Diseases*, 3, 373–385. doi: 10.1111/j.1365-2761.1980.tb00422.x
- [14] Lio - Po, G. D., Sanvictores, M. E. G., Baticados, M. C. L., & Lavilla, C. R. (1982). *In vitro* effect of fungicides on hyphal growth and sporogenesis of *Lagenidium* spp. isolated from *Penaeus monodon* larvae and *Scylla serrata* eggs. *Journal of Fish Diseases*, 5, 97–112. doi: 10.1111/j.1365-2761.1982.tb00463.x
- [15] Leano, E. M. (2002). *Haliphthoros* spp. from spawned eggs of captive mud crab, *Scylla serrata*, broodstocks. *Fungal Diversity*, 9, 93–102
- [16] Nakamura, K., Nakamura, M., Hatai, K., & Zafran. (1995). *Lagenidium* infection in eggs and larvae of mangrove crab (*Scylla serrata*) produced in Indonesia. *Mycoscience*, 36, 399–404. doi: 10.1007/BF02268623
- [17] Quintio, E. T., Parado-Esteba, F. D., & Rodriguez, E. (2002). Seed Production of Mud Crab *Scylla* spp. *Aquaculture Department*, 7, 29–31.

- [18] Shaji, M., Qunitio, E., Samraj, T. S., Kandan, K., Kumar, D., Arulraj, S., & Pandiarajan, S., Shajina, I. K. (2006). Seed production of mud crab *Scylla serrata* at the Rajiv Gandhi Centre for Aquaculture, Tamil Nadu, India. *Aquaculture Asia*, 11, 17–21.
- [19] De Pedro, J. B., Qunitio, E. T., & Parado-Esteba, F. D. (2007). Formalin as an alternative to trifluralin as prophylaxis against fungal infection in mud crab *Scylla serrata* (Forsskål) larvae. *Aquaculture Research*, 38, 1554–1562.
- [20] Hudson, D. A., & Lester, R. J. G. (1994). Parasites and symbionts of wild mud crabs *Scylla serrata* (Forskål) of potential significance in aquaculture. *Aquaculture*, 120, 183–199.
- [21] Kvingedal, R., Owens, L., & Jerry, D. R. (2006). A new parasite that infects eggs of the mud crab, *Scylla serrata*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93, 54–59. doi: 10.1016/j.jip.2006.06.002
- [22] Dan, S., & Hamasaki, K. (2015). Evaluation of the effects of probiotics in controlling bacterial necrosis symptoms in larvae of the mud crab *Scylla serrata* during mass seed production. *Aquaculture International*, 23, 277–296. doi: 10.1007/s10499-014-9815-1

- [23] Cisek, A. A., Dąbrowska, I., Gregorczyk, K. P., & Wyzewski, Z. (2017). Phage Therapy in Bacterial Infections Treatment: One Hundred Years After the Discovery of Bacteriophages. *Current microbiology*, 74, 277–283. doi:10.1007/s00284-016-1166-x
- [24] Abedon, S. T., Kuhl, S. J., Blasdel, B. G., & Kutter, E. M. (2011). Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*, 1, 66–85. doi: 10.4161/bact.1.2.15845
- [25] Sulakvelidze, A., & Kutter, E. (2005). Bacteriophage therapy in humans. In: Kutter E., & Sulakvelidze A., (Eds.), *Bacteriophages: Biology and Application* (pp. 381–436). Boca Raton, FL: CRC Press.
- [26] Marcuk, L. M., Nikiforov, V. N., Scerbak, J. F., Levitov, T. A., Kotljarova, R. I., Naumsina, M. S., Davydov, S. U., Monsur, K. A., Rahman, M. A., Latif, M. A., Northrup, R. S., Cash, R. A., Hug, I., Dey, C. R., & Phillips, R. A. (1971). Clinical studies of the use of bacteriophage in the treatment of cholera. *Bull World Health Organ*, 45, 77–83.
- [27] Monsur, K. A., Rahman, M. A., Huq, F., Islam, M. N., Northrup, R. S., & Hirschhorn, N. (1970). Effect of massive doses of bacteriophage on excretion of vibrios,

duration of diarrhoea and output of stools in acute cases of cholera. *Bull World Health Organ*, 42, 723–732.

[28] Barrow, P., Lovell, M., & Berchieri, A., Jr (1998). Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 5(3), 294–298.

[29] Berchieri Jr, A., Lovell, M. A., & Barrow, P. A. (1991). The activity in the chicken alimentary tract of bacteriophages lytic for *Salmonella typhimurium*. *Research in Microbiology*, 142, 541–549.

[30] Merrill, C. R., Biswas, B., Carlton, R., Jensen, N. C., Creed, G. J., Zullo, S., & Adhya, S. (1996). Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 3188–3192. doi: 10.1073/pnas.93.8.3188

[31] Ramesh, V., Fralick, J. A., & Rolfe, R. D. (1999). Prevention of *Clostridium difficile* -induced ileocectitis with bacteriophage. *Anaerobe*, 5, 69–78.

- [32] Soothill, J. S. (1994). Bacteriophage prevents destruction of skin grafts by *Pseudomonas aeruginosa*. *Burns*, 20, 209–211.
- [33] Soothill, J. S. (1992). Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages. *Journal of Medical Microbiology*, 37, 258–261. doi: 10.1099/00222615-37-4-258
- [34] Soothill, J. S. (2013). Use of bacteriophages in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 11, 909–915. doi: 10.1586/14787210.2013.826990
- [35] Nakai, T., Sugimoto, R., Park, K. H., Matsuoka, S., Mori, K., Nishioka, T., Maruyama, K. (1999). Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail, *Diseases of Aquatic Organisms*, 37, 33–41.
- [36] Park, S. C., Shimamura, I., Fukunaga, M., Mori, K., & Nakai, T. (2000). Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1416–1422.

- [37] Nakai, T., & Park, S. C. (2002). Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Research in Microbiology*, 153, 13–18.
- [38] Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., & Peterson, S. B. (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews, Microbiology*, 8, 15–25. doi: 10.1038/nrmicro2259
- [39] Jack, R. W., Tagg, J. R., & Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological reviews*, 59, 171–200.
- [40] Boer, Wd., Folman, L. B., Summerbell, R. C., & Boddy, L. (2005). Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 795–811.
- [41] Riley, M., & Chavan, M. (2007). *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Berlin: Springer-Verlag.

- [42] Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., & Peterson, S. B. (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature reviews. Microbiology*, 8, 15–25. doi: 10.1038/nrmicro2259
- [43] Procópio, R. E., Silva, I. R., Martins, M. K., Azevedo, J. L., & Araújo, J. M. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16, 466–471. doi: 10.1016/j.bjid.2012.08.014
- [44] Mota-Meira, M., LaPointe, G., Lacroix, C., & Lavoie, M. C. (2000). MICs of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44, 24–29. doi: 10.1128/aac.44.1.24-29.2000
- [45] Choi, A. R., Patra, J. K., Kim, W. J., & Kang, S. S. (2018). Antagonistic Activities and Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Derived From a Plant-Based Fermented Food. *Frontiers in microbiology*, 9, 1963. doi: 10.3389/fmicb.2018.01963

- [46] Grosch, R., Faltin, F., Lottmann, J., Kofoet, A., & Berg, G. (2005). Effectiveness of 3 antagonistic bacterial isolates to control *Rhizoctonia solani* Kühn on lettuce and potato. *Canadian Journal of Microbiology*, 51, 345–353.
- [47] Balcázar, J. L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Cunningham, D., Vendrell, D., & Múzquiz, J. L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 31, 173–186.
- [48] Fuller, R. (1989) Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365–378.
- [49] Irianto, A., & Austin, B. (2002) Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases*, 25, 633–642.
- [50] Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J., & Gibson, L. (2008) Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 272, 1–14.

[51] Gatesoupe, F. J. (1999) The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180, 147–165

[52] Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 64, 655–671. doi: 10.1128/membr.64.4.655-671.2000

[53] Bernardet, J. F., Nakagawa, Y., & Holmes, B. (2002). Proposed minimal standards for describing new taxa of the family Flavobacteriaceae and emended description of the family. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1049–1070. doi: 10.1099/00207713-52-3-1049

[54] Hsu, S. C., & Lockwood, J. L. (1975). Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Applied Microbiology*, 29, 422–426. PMID: PMC186990

[55] Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.

- [56] Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111–120. doi: 10.1007/bf01731581
- [57] Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., & Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, 8, 9–75. doi: 10.1186/1471-2164-9-75.
- [58] Aaron, C. E. D., Bob, M., Frederick, R. B., & Nicole T. P. (2004). Mauve: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence With Rearrangements. *Genome Research*, 14, 1394–1403. doi: 10.1101/gr.2289704
- [59] Jones, M. V., & Calabresi, P. A. (2007). Agar-gelatin for embedding tissues prior to paraffin processing. *Biotechniques*, 42, 569–570.
- [60] Zheng, Y., Wang, Y., Liu, Y., Li, W., Yu, M., & Zhang, X. H. (2016). *Aquimarina hainanensis* sp. nov., isolated from diseased Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*

larvae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 70–75. doi: 10.1099/ijsem.0.000675.

[61] Nedashkovskaya, O. I., Vancanneyt, M., Christiaens, L., Kalinovskaya, N. I., Mikhailov, V. V., & Swings, J. (2006). *Aquimarina intermedia* sp. nov., reclassification of *Stanierella latercula* (Lewin 1969) as *Aquimarina latercula* comb. nov. and *Gaetbulimicrobium brevivitae* Yoon et al. 2006 as *Aquimarina brevivitae* comb. nov. and emended description of the genus *Aquimarina*, 56, 2037–2041. doi: 10.1099/ijs.0.64155-0.

[62] Yi, H., & Chun, J. (2011) *Aquimarina addita* sp. nov., isolated from seawater. *International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 61, 2445–2449. doi: doi: 10.1099/ijs.0.027433-0

[63] Yu, T., Yin, Q., Song, X., Zha,o R., Shi, X., & Zhang, X. H. (2013). *Aquimarina longa* sp. nov., isolated from seawater, and emended description of *Aquimarina muelleri*. *International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 63, 1235–1240. doi: 10.1099/ijs.0.041509-0

[64] Yu, T., Zhang, Z., Fan, X., Shi, X., & Zhang X. H. (2014). *Aquimarina megaterium* sp. nov., isolated from seawater. *International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 64:122–127. doi: 10.1099/ijs.0.055517-0

[65] Zhang, Z., Yu, T., Xu, T., & Zhang, X. H. (2014). *Aquimarina pacifica* sp. nov., isolated from seawater. *International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 64, 1991–1997. doi: 10.1099/ijs.0.062695-0

[66] Miyazaki, M., Nagano, Y., Fujiwara, Y., Hatada, Y., & Nogi Y. (2010). *Aquimarina macrocephali* sp. nov., isolated from sediment adjacent to sperm whale carcasses. *International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 60, 2298–2302. doi: 10.1099/ijs.0.018747-0

[67] Kharade, S. S., & McBride, M. J. (2014). *Flavobacterium johnsoniae* chitinase ChiA is required for chitin utilization and is secreted by the type IX secretion system. *Journal of Bacteriology*, 196, 961–970. doi: 10.1128/JB.01170-13.

[68] Pérez-Pascual, D., Rochat, T., Kerouault, B., Gómez, E., Neulat-Ripoll, F., Henry, C., Quillet, E., Gujjarro, J. A., Bernardet, J. F., & Duchaud, E. (2017). More Than Gliding:

Involvement of GldD and GldG in the Virulence of *Flavobacterium psychrophilum*.

Frontiers in Microbiology, 8, 2168. doi: 10.3389/fmicb.2017.02168

[69] Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41, e1. doi: 10.1093/nar/gks808

[70] Li, X., Wang, L., Huang, H., Lai, Q., & Shao, Z. (2014). *Aquimarina penaei* sp. nov., isolated from intestinal tract contents of Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106, 1223–1229. doi: 10.1007/s10482-014-0292-3.