

# FISH 法を用いた活性汚泥内に存在する Candidate division 細菌群の可視化

広島大学大学院 非会員 ○西村 恭平  
広島大学大学院 正会員 金田一 智規  
広島大学大学院 正会員 尾崎 則篤  
広島大学大学院 正会員 大橋 晶良

## 1. はじめに

Candidate division 細菌群は海水、淡水、帯水層、活性汚泥など様々な環境に存在する。これらは塩基配列からのみ存在が示唆される門レベルで分類された細菌群であり、代表的な分離株が存在しない。そのため培養に必要な有機物の種類、濃度、培養温度、pH 等の最適培養パラメータ及びその組み合わせが不明のままである。

一方で東広島下水処理場の活性汚泥に対し、次世代シーケンサーによる菌相の網羅解析の結果、Table 1 に示すように Candidate division 細菌群が存在することが明らかになった。

そこで東広島下水処理場の活性汚泥内に存在する Candidate division 細菌群の中でも既往の研究により多くの知見を得た<sup>(1)</sup>、TM7 を除いた上位二種である SR1 門と BD1-5 門の二種類の細菌群に着目した。まず活性汚泥内に存在する Candidate division の系統学的位置関係を明らかにした。得られた塩基配列に基づいて FISH プロブを設計し、in situ での可視化を試みた。最終的にはこの二種類の細菌群を集積培養するための最適培養条件を提案することを目的とした。

## 2. 実験方法

本実験では採取した東広島下水処理場の活性汚泥に対して、採取した活性汚泥サンプルから DNA 抽出し、SR1 門に対しては既往の文献より 27F と 1380R のプライマーセット<sup>(2)</sup>を、BD1-5 門に対しては 27F と 1208R のプライマーセット<sup>(2)</sup>を用いて PCR による目的配列の増幅を行い、クローニングによる塩基配列解析を行った。解析された塩基配列をもとに ARB ソフトにインポートした SR1 門、BD1-5 門それぞれの系統樹を作成した。次に ARB ソフトを用いて活性汚泥から検出されたクローンとその近縁種を標的とした FISH プロブを設計した。設計されたプロブは 16S rRNA に対する accessibility と熱力学に基づく mathFISH によるハイブリタイゼーション効率、ARB 内データベース近縁種のカバー率の三つの観点から評価した。Candidate division は純粋培養株が存在していないため、設計したプロブごと clone-FISH を用いて、プロブ解離曲線を求め、最適ホルムアミド濃度を算出し、最終的に活性汚泥サンプルに対して FISH 観察を行った。

## 3. 実験結果

解析した、192 クローンのうち 156 クローンが SR1 門に属することが判明した。それに基づき ARB ソフトを用いて系統樹を作成した(Fig.1)。その系統樹を用いて活性汚泥から検出されたクローンとその近縁種を網羅するような FISH プロブを 7 つ設計した。SR1 門はこれらのプロブの候補のうち、accessibility が高い、ハイブリタイゼーション効率が 1.0 に近く、推定ホルムアミド濃度も 20%前後でカバー率も 100%に近い値となった SR1-334、SR1-833、SR1-622、SR1-853 の 6 つのプロブ(Fig.1)を用いることで、活性汚泥から検出されたクローンとその近縁種を対象とする FISH プロブを作成した。

キーワード (活性汚泥、分子生物学的手法、Candidate division、FISH、クローニング)

連絡先 〒739-8527 東広島市鏡山 1-4-1 広島大学大学院工学研究科 社会基盤環境工学専攻 事務室

TEL : 082-424-7819・7828

Table 1 Detection frequency of bacterial phylum in activated sludge

| Taxonomy                 | percent |                           |       |
|--------------------------|---------|---------------------------|-------|
| Bacteroidetes            | 41.34%  | Planctomycetes            | 0.27% |
| Proteobacteria           | 31.04%  | Cyanobacteria             | 0.25% |
| Candidate division TM7   | 13.09%  | Fusobacteria              | 0.17% |
| Chlorobi                 | 3.75%   | Candidate_division_OD1    | 0.11% |
| Firmicutes               | 2.51%   | Candidate_division_TM6    | 0.09% |
| Chloroflexi              | 2.19%   | Candidate_division_TA06   | 0.09% |
| Acidobacteria            | 1.76%   | Tenericutes               | 0.08% |
| Fibrobacteres            | 1.11%   | Gemmatimonadetes          | 0.07% |
| Verrucomicrobia          | 0.74%   | Candidate_division_SM2F11 | 0.05% |
| Actinobacteria           | 0.62%   | Candidate_division_OP11   | 0.04% |
| Elusimicrobia            | 0.48%   | Candidate_division_GOUTA4 | 0.03% |
| Spirochaetes             | 0.47%   | Synergistetes             | 0.01% |
| Nitrospirae              | 0.44%   | Lentisphaerae             | 0.01% |
| Candidate_division_SR1   | 0.43%   | Candidate_division_OP3    | 0.01% |
| Candidate_division_BD1-5 | 0.36%   | 0.1%以下のもの                 | 5.12% |
| Armatimonadetes          | 0.28%   |                           |       |

同様に BD1-5 も解析した 192 クローンのうち 162 クローンが BD1-5 門に属することが判明し、それに基づき ARB ソフトを用いて系統樹を作成した(Fig.2)。BD1-5 も系統樹から FISH プロブを 2 つ設計した。BD1-5 は accessibility が高い、ハイブリタイゼーション効率が 1.0 に近く、推定ホルムアミド濃度も 20%前後でカバー率も 100%近い値となった BD-680、BD-95 の二つの FISH プロブ(Fig.2)を作成することができた。

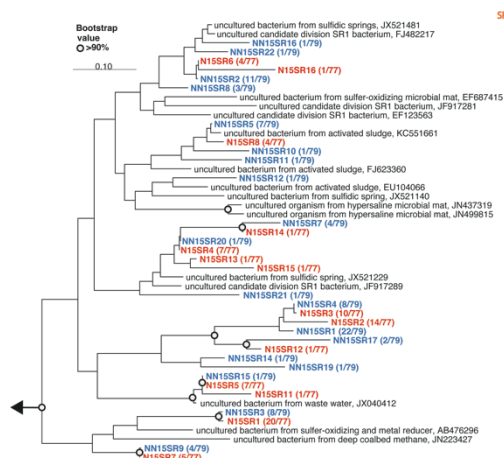


Fig. 1 Phylogenetic tree of SR1 and candidate FISH probes designed.

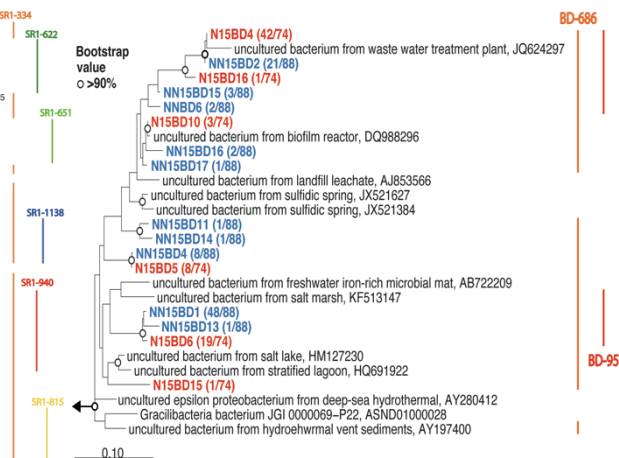


Fig.2 Phylogenetic tree of BD1-5 and candidate FISH probes designed.

まず、プローブ候補の少ない BD1-5 に対して最適化を図った。設計した BD-686 のプローブに対して、clone-FISH より最適ホルムアミド濃度を算出した。Fig.3 より全体の細菌中の赤色で蛍光している細菌が 5%~10%は存在しており、BD1-5 である可能性が高い。BD1-5 はとても小さな形状をしている細菌で、分散せず同じ種同士集まって存在していた(Fig.3)。設計した BD-95 のプローブに対して、clone-FISH より最適ホルムアミド濃度を算出した。Fig.4 より全体の細菌中の赤色に蛍光している細菌の割合は 1%程度であった。これは、この BD-95 プローブは本研究により検出された細菌群のみを標的としているためであり、活性汚泥中の存在量は少ないことが考えられる。

BD1-5 を対象とする二つのプローブを用いて東広島下水処理場の活性汚泥中の BD1-5 を可視化することができた。SR1 についても 6 つの FISH プロブの設計を完了した。

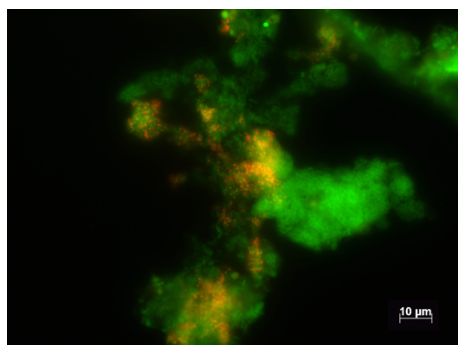


Fig.3 FISH observantion of BD-686

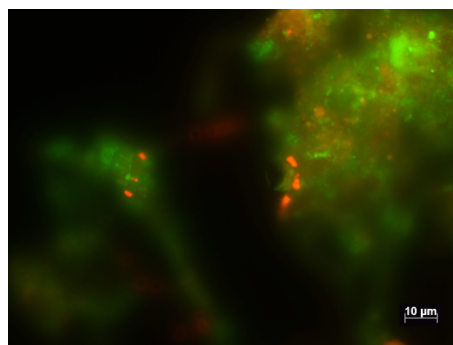


Fig.4 FISH observantion of BD-95

#### 4. まとめと今後の展開

BD1-5 の BD-686 と BD-95 の 2 つのプローブに対して最適化することに成功した。今後の展開として SR1 に対しても、設計した 6 つのプローブの中から SR1-334 と SR1-940 の 2 つのプローブに対して clone-FISH を用いて最適ホルムアミド濃度を決定し、プローブの最適化を行い、FISH 観察を行う。さらに、MAR-FISH を行い、基質取り込みパターンを確認し、集積培養へ向けた最適培養条件の提案を行う。

#### 5. 参考文献

- (1) Borrel *et al.*, (2010) *Arch Microbiol.* Vol. 192, pp. 559 - 567
- (2) Hanke *et al.*, (2014) *Frontiers in microbiology*, Vol. 5, Article231, pp.1-17