

# 2004年度 修士論文

アミノ酸を主要炭素源として馴養した

生学的リン除去プロセスに出現する主要細菌の挙動解析

Analysis of Dominant Bacteria in Enriched Biological Phosphorus Removal Process  
Fed with Amino Acid as a Main Carbon Source

大江 華

Oe, Hana

東京大学大学院新領域創成科学研究科

環境学専攻 社会文化環境コース

## 目次

1章	はじめに	
1.	1 背景と目的	1
2章	既往の研究	
2.	1 生物学的処理	2
2. 1.	1 生物学的処理法 (活性汚泥法)	
2. 1.	2 生物学的リン除去処理プロセス (嫌気好気活性汚泥法)	
2. 1.	3 生物学的リン除去処理プロセスの悪化	
2.	2 微生物の分類	7
2. 2.	1 微生物の分類	
2. 2.	2 真正細菌の分類	
2.	3 微生物群集解析手法	10
2. 3.	1 DGGE 法	
2. 3.	2 PCR-cloning-sequencing 法	
2. 3.	3 FISH 法	
3章	実験方法	
3.	1 ラボスケールリアクターの運転	17
3. 1.	1 リアクターの概要	
3. 1.	2 運転条件	
3. 1.	3 測定項目	
3.	2 微生物群集解析	20
3. 2.	1 微生物性群集解析の概要	
3. 2.	2 PCR-Cloning-Sequencing 法	
3.	3 オリゴヌクレオチドプローブの設計	25
3. 3.	1 ARB での設計	
3. 3.	2 プローブのスクリーニング・Hybridization の検討	
3.	4 顕微鏡観察	28
3. 4.	1 FISH 法	
3. 4.	2 面積定量	
4章	細菌群集構造解析結果	
4.	1 DGGE バンド画像	30
4.	2 全長塩基配列の解読	34
4.	3 系統解析	37
5章	オリゴヌクレオチドプローブの設計	
5.	1 プローブの設計	48
5.	2 プローブのスクリーニング・Hybridization 条件の検討	50
6章	顕微鏡観察による形態と空間分析	
6.	1 顕微鏡観察	53
6.	2 PAOmix プローブとの2重染色による空間分布解析	61
6. 2.	1 ZOGL0828 プローブとの2重染色	
6. 2.	2 OFASPS465 プローブとの2重染色	
7章	FISH 法による細菌群集構成の定量 -DGGE 法による細菌群集解析との比較-	
7.	1 アスパラギン酸リアクター (Run8) の定量	64
7.	2 各構成細菌の挙動	70
7. 2.	1 アスパラギン酸リアクター (Run8)	
7. 2.	2 グルコースリアクター (Run9) における TM7	
8章	総括	

8. 1 本研究のまとめ	73
8. 2 今後の展望	74
謝辞	75
参考文献	76
付録 V3 領域塩基配列	
得られたクローンにおける V3 領域の相同性検索結果	

# 1章 はじめに

## 1. 1 背景と目的

昨今、湖沼や内海・湾における閉鎖性水域における富栄養化が問題となっている。富栄養化とは、水が長時間滞留する水域に窒素やリンなどの栄養塩が、多量に流入することにより、藻類が光合成を行いながら異常に繁殖し、有機性汚濁物質となって水質汚濁が進行する現象である。栄養塩である窒素は各種の細菌や藍藻類によって空気中から固定され、最終的にはアミノ酸やタンパク質に変換されるが、リンは自然界での濃度は低く生物学的に増加させることができないために、各環境における光合成生物の増殖の律速物質となっていることが多い。さらには水域に存在するリンは一般に下排水由来のものが多い。したがって、富栄養化を解決するには、排水中のリンを除去することが重要であるといえる。

リンを除去する方法として、微生物の代謝を利用した生物学的リン除去プロセス (EBPR process : Enhanced Biological Phosphorus Removal Process) がある (図 2.1)。このプロセスは既に実下水処理場にて実用段階にある。しかし、リン除去を担っていると予想される細菌の単離には成功しておらず、基礎的な生物学的知見を未だ欠いているのが現状である。このため、リン除去活性が突然低下、消失するといった不安定性など未解決の問題も残っている。

近年では、分子微生物学的手法の導入により、生物学的リン除去処理プロセス内における構成細菌の解析が再び活発に行われている。そして分子生物学的手法を用いてリン除去を担う細菌がいくつか提案され始めている。しかし、それらのリン除去細菌が、多種多系統の細菌なのかや、それらの基質利用はどうなっているかなどに関しては、未解明な部分が多い。また、リン蓄積細菌以外の細菌である、競合細菌や共生細菌がどのような働きをしているかなど、細菌群集の全体像も未解決である。

故に本研究では細菌の基質特異性に着目し、投与する主要基質をかえて生物学的リン除去プロセスの実験室スケールリアクターを運転し、リアクター内の主要な細菌群をとらえることを目的とした。そしてこれら主要細菌の構成の定量的把握と汚泥内の空間分布を明らかにすることによって、生物学的リン除去処理プロセス内の全体像を解明することを試みた。最終的にはプロセス内でのこれら構成細菌に関する知見の集約によって、プロセスの向上に繋げることを目的とした。

## 2章 既往の研究

本章では、2.1 節にて生物学的リン除去処理プロセスの概略を、2.2 節にて微生物の分類を、2.3 節にて本研究に用いた実験手法について詳述する。

### 2. 1 生物学的処理

本節では生物学的処理法と、それを応用した生物学的リン除去処理プロセスの概要について述べる。

#### 2. 1. 1 生物学的処理法（活性汚泥法）

生物学的処理法または活性汚泥法とは、好気性微生物の酸化分解能を積極的に利用した方法である。この方法は図 2.1 に示すように、微生物による有機物の酸化分解に必要な酸素を大量に供給するための曝気装置を付属させた処理槽と処理槽内の微生物（活性汚泥）濃度を高く保ち処理速度を高めるための汚泥沈澱槽と汚泥返送系から構成されている。

排水中の有機物は、曝気槽中で活性汚泥を構成している微生物群集によって除去される。有機物の除去を担う微生物は、取りこんだ有機物のうち約半分を酸化分解し、残りの半分を微生物の菌体合成に利用する。したがって除去された有機物の半分程度が汚泥に変換され、これが余剰汚泥として沈澱槽から引き抜かれる。通常余剰汚泥は脱水されたり、さらに焼却されたりして処分される。

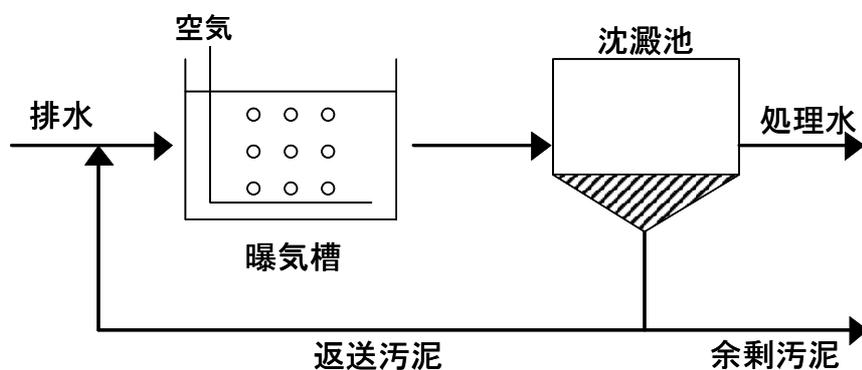


図 2.1 活性汚泥法

## 2. 1. 2 生物学的リン除去プロセス（嫌気好気活性汚泥法）

嫌気好気活性汚泥法は 1970 年代に開発された。生物学的リン除去プロセス(EBPR Process : Enriched Biological Phosphorus Removal Process) (図 2.2)ともいわれるこのプロセスは活性汚泥法の前段に嫌気槽を設けたものである。嫌気・好気条件を導入することによって菌体内にリンをポリリン酸の形で蓄積する微生物、すなわちポリリン酸蓄積細菌(PAOs : Polyphosphate Accumulating Organisms)が他の細菌と比較して優先的に増殖し、最終的に好気条件下でポリリン酸を多く蓄積している PAOs を余剰汚泥として引き抜くことによって排水中からリンを除去することができる(Barnard(1975))。

PAOs が嫌気好気条件下で優先的に増殖するのはなぜか。それは通常の微生物の増殖に必要な炭素源およびエネルギー源としての有機物と菌体合成成分として窒素とリンが必要であるが、窒素、リン除去を必要とする排水中には窒素とリンに対して有機物量が相対的に少ないことになり、このような排水微生物の増殖の律速因子となるのは有機物になる。すなわち PAOs はこのような排水中の中で優先的に増殖できる細菌、つまり炭素元としての有機物を優先的に取りこみ利用できる細菌であるからである。

一方、一般的な好気性細菌は嫌気条件下では有機物が存在してもエネルギー生成系が働かず、嫌気条件下で有機物を摂取できない。好気条件下になっても既に PAOs によって有機物はほぼ取り尽くされ、有機物はほとんど残っていない。このようにして汚泥返送によって循環させながら嫌気条件と好気条件が繰り返される環境は、PAOs にとって有利な環境となり、系内に PAOs が優占する。そして汚泥のリン含有率が増加することから、より効率よくリンを排水中から除去することができる。

PAOs の典型的な代謝プロセスについて詳述する(図 2.3, 2.4)。PAOs は嫌気条件下で有機物を摂取し、ポリリン酸を加水分解することによって得られたエネルギーを利用して、細胞外にある有機物を細胞内に蓄積物質(酢酸を基質としたときには PHA (Polyhydroxyalkanoate: ポリヒドロキシ脂肪酸))に変換して蓄積する。そして好気条件下では蓄積物質を酸化分解することによって ATP を生成し、ポリリン酸の再合成と菌体増殖を行うと共に、次の嫌気工程に備えてグリコーゲンを蓄積する。ここで加水分解時に上澄み中へ放出された以上の量のリン酸が取り込まれるので上澄みからリンを除去することができる。

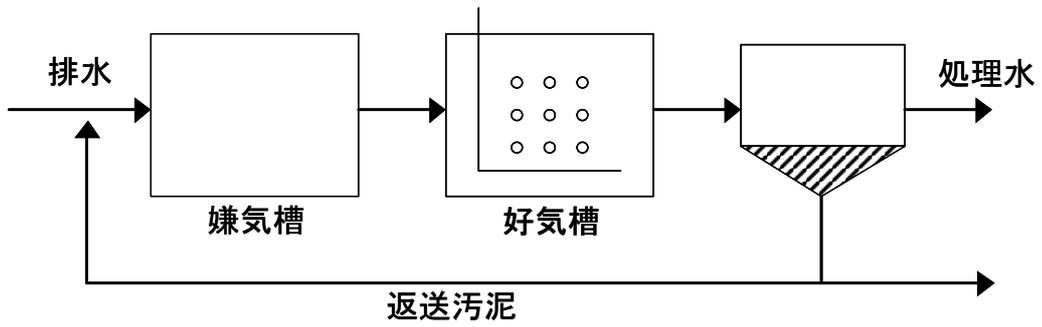


図 2.2 嫌気好気活性汚泥法のフロー

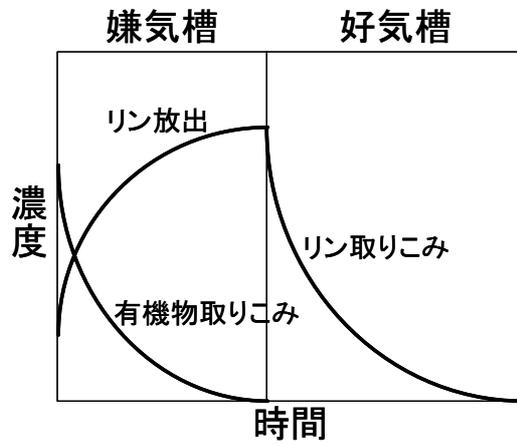


図 2.3 ポリリン酸を高濃度に含む活性汚泥によるリン放出と取りこみ

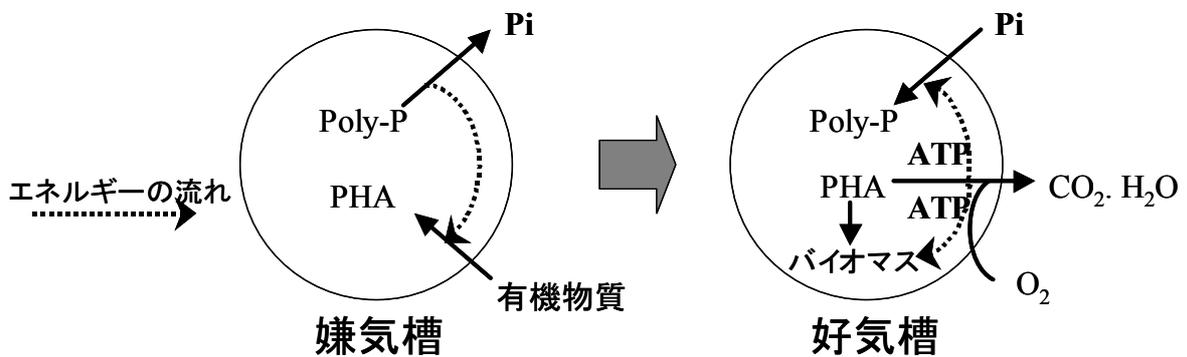


図 2.4 PAOs の代謝

## 2. 1. 3 生物学的リン除去プロセスの悪化

生物学的リン除去プロセスはプロセス内の生物学的知見が乏しいために、リン除去活性が低下することがある。リン除去活性の低下のケースとして、2つのケースが挙げられる。本節ではそれら2つのケースについて述べる。

### 1) グリコーゲン蓄積細菌 (GAOs) が競合するケース

嫌気条件下で有機物の摂取が見られるが、リンの吐出し取りこみが見られないケースがある。このケースを説明するものとして、好気条件下でポリリン酸を蓄積するかわりに、グリコーゲンを蓄積し、嫌気条件下でグリコーゲンをエネルギー源および還元力供給源として有機物摂取を行う細菌の存在が提案された。このような代謝をする細菌を Mino *et al.*(1995)はグリコーゲン蓄積細菌 (GAOs : Glycogen Accumulating Organisms)と命名した。以後 GAOsは単離はされていないものの、生物学的リン除去プロセスにおいて悪化させる要因の一細菌群として受け入れられている。

生物学的リン除去プロセスにおいて GAOs と PAOsが競合し、GAOs が優先化した時の挙動を図 2.5 に示す。

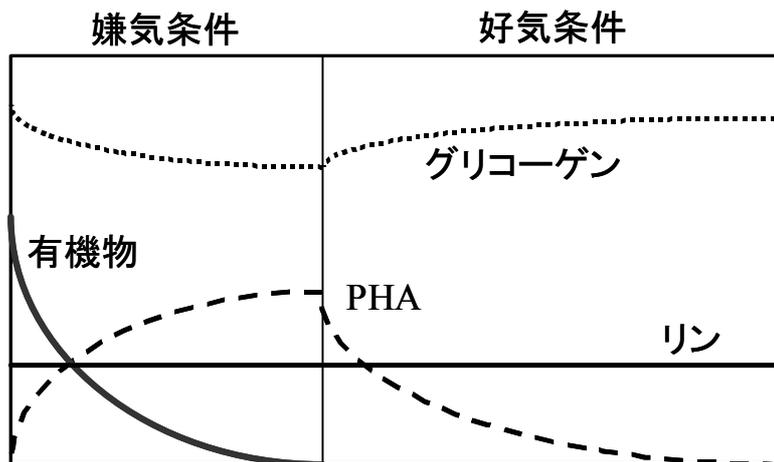


図 2.5 グリコーゲン蓄積細菌 (GAOs) が競合

## 2) 嫌気槽で有機物が摂取されないケース

嫌気状態で有機物の摂取が行われず、リンの放出、摂取も見られないというケースである。これは PAOs や GAOs といった嫌気条件下で有機物を摂取する細菌が存在しなくなり、有機物が嫌気条件下で摂取されず、好気条件下で従属栄養細菌が摂取するという状態にあるためである。このような状態では、リンは従属栄養細菌の増殖に微量に使われるだけである。

この代謝のパターンは実験室スケールリアクターの実験で頻繁に見られたケースである(小貫、福島、岡本)が、あまり研究はなされておらず、どのような微生物が関与しているかはよく知られていない。

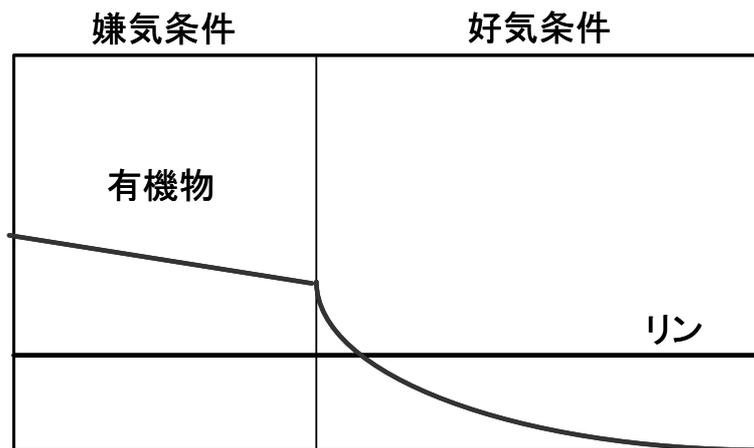


図 2.6 嫌気槽で有機物が摂取されないケース

## 2. 2 微生物の分類

本節では、今日扱われている微生物の分類と、本研究で扱った細菌が属する真正細菌の分類についてまとめた。

### 2. 2. 1 微生物の分類

新しい生物の系統分類では古細菌 (Archea)、真正細菌 (Eubacteria)、真核生物 (Eukaryote) に大きく分けられる。それまでは自然界に存在する生物は原核生物 (prokaryotes)、真核生物 (eukaryotes) に分けられて考えられていたが、そこに古細菌の存在が入ってきた。古細菌は原核生物であるにもかかわらず、他の細菌とは大きくかけ離れ、真核生物とも同程度離れることが分かり、古細菌は独立した一群とみなされるようになった。古細菌には、メタン生成細菌や高度好塩性細菌、超高熱細菌などが含まれ、大気に酸素が存在しなかった時代から生息していたことから古細菌と呼ばれている。

また、細胞進化共生説によれば、真核生物は古細菌の祖先を宿主として真正細菌の祖先が共生を始めて進化してきたのではないかと考えられている。このようにして、古細菌、真正細菌、真核生物の三つの分野に大別することが提案され今日に至っている。

## 2. 2. 2 真正細菌の分類 木村(1999)

2.2.1 で述べたように原核生物は古細菌と真正細菌の 2 つに分けることができる。真正細菌は、古細菌と違ってあらゆる自然界に生息できるように多様化した生物である。それゆえ地球上の多彩な物質を分解したり、空気中の炭素を固定したり、菌体外の高分子基質を分解する酵素タンパク質を分泌したり、といった様々な能力を持つためには、基本となる遺伝子の変化が必要となる。真正細菌は真核生物と系統樹中で対極にあることから系統樹末端にある真正細菌は原核生物としてもっとも進化したものといえる。

真正細菌の分類には、表現形質を重んじる *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* の伝統的な手法と、R.C.Woese (1987) が唱えた DNA の配列に着目した 2 つの方法がある。

前者は、はじめに細胞の形などに見られる表現型を見る。つぎに、グラム染色法による陰性・陽性、細胞に含まれる化学物質(核酸、脂肪酸、キノ系、細胞壁など)の性状と栄養源の利用性、エネルギー獲得様式、生態高分子有機物質の分解性などの生理学的あるいは生化学的性状を既存の基準株と比較する。各株(strain)について、類縁性の高い種(species)を属(genus)にまとめ、関連性が高いと判断される属を科(family)として階層化した古典的な分類法である。

それに対し後者は、16Sr RNA をゲノム DNA 上の配列で調べて系統分類する方法である。この遺伝子情報をもとに系統分類する分子生物学的手法については後の 2.3 に詳述する。

現在、この 2 つの分類法は、分類する用語すら統一されていない。Woese の系統的分類法は細胞の生命現象を考慮していないために、表現形質による分類と矛盾が起きる可能性がある。今後は *Bergey's Manual* の古典的な方法との併用と、統一性に課題が残る。

表 2.1 に真正細菌の 16S rRNA による分類と代表的な細菌の属と本研究で扱う細菌についてまとめた。太字は本研究で扱った属を示す。

表 2.1 真正細菌の 16S rRNA による分類と代表的な細菌の属

属名	代表的な細菌の属と本研究で扱った属
紅色細菌 (purple bacteria) またはプロテオバクテリア (proteobacteria)	<b>α subdivision</b> <i>Acetobacter</i> <i>Agrobacterium</i> * <i>Gluconobacter</i> (根粒菌) <i>Rhizobium</i> <i>Zymomonas</i>
	<b>β subdivision</b> <i>Acidovorax</i> <i>Alcaligenes</i> <b><i>Comamonas</i></b> <b><i>Dechloromonas</i></b> <b><i>Rhodocyclus</i></b> * <i>Spirillum</i> <i>Zoogloea</i>
	<b>γ subdivision</b> <i>Aeromonas</i> <i>Enterobacter</i> <i>Escherichia coli</i> (大腸菌) <i>Pseudomonas</i> <b><i>Xanthomonas</i></b> 紅色硫黄細菌* <i>Legionella</i> 滑走細菌 <i>Haemophilus</i>
	<b>δ subdivision</b> <i>Desulfovibrio</i> <i>Myxobacterium</i> *
グラム陽性細菌	高(G+C)含有 (>55%) <i>Bifidobacterium</i> <i>Cellulomonas</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Mycobacterium</i> <i>Propionibacterium</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Thermomonospora</i> <i>Streptomyces</i> <b><i>Actinomyces</i></b>
	低(G+C)含有 (<50%) <i>Bacillus</i> <i>Clostridium</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Mycoplasma</i> <i>Streptococcus</i>
	光合成できる系列 <i>Heliobacterium</i> *
シアノバクテリア (ラン藻)*	<i>Synechococcus</i> <i>Synechocystis</i>
バクテロイド	<b>Bacteroides</b> <b><i>Bacteroides</i></b>
フラボバクテリア	Flavobacterium グループ <i>Flavobacterium</i> <i>Cytophaga</i>
緑色硫黄細菌*	<i>Chlorobium</i>
緑色非硫黄細菌	<b><i>Chloroflexus</i></b> * <i>Thermomicrobium</i>
プランクトマイセス	<i>Planctomyces</i>
ダイノコッカス-サーマス	<i>Dinococcus</i> <i>Thermus</i>
クラミジア	<i>Chlamydia</i>
スピロヘータ	<i>Spirochaeta</i> <i>Borrelia</i> <i>Treponema</i>
サーモトーガ	<i>Thermotoga</i>

太字は本研究で扱った属を示す。

\*光合成能力を持つ

## 2. 3 微生物群集解析手法 中村(1998)

近年の分子生物学の急速な進歩によって生物の遺伝情報の解析が進み、遺伝情報をもとに微生物を分類する道が開けた。遺伝情報としてゲノム DNA や rRNA、mRNA、tRNA、などが挙げられる。微生物の遺伝子の中には、例えば染色体外のプラスミド遺伝子のように他の生物種に伝搬したり欠落したりするような遺伝子や染色体内の遺伝子の中にも外部の環境に応じて変化しやすい遺伝子などがある。しかし、生物が生きていくために本質的に必要な遺伝子は変異が起こると致命的になる場合が多い。それゆえ変化の速度が遅く特定の生物種内での保存性が極めて高い遺伝子としてあらゆる生物に必要なタンパク質合成器官であるリボソーム RNA (rRNA) がある。リボソームは饅頭を2つ積み上げたような形をしており、大きい方は 50S サブユニット、小さい方は 30S サブユニットである。大きい方のサブユニットには 23S と 5S の RNA が、小さい方のサブユニットには 16S の RNA が含まれている(図 2.7)。rRNA の塩基配列は長い進化の歴史の中でも比較的保存性が高いことからその基本的な構造が保持されている。しかしその中でも少しずつ変化してきていることから塩基配列にも少しずつ違いがある。塩基配列の違いが多ければ多いほど生物進化学的に遠い関係にあり、この違いを比較することにより、色々な生物種の進化系統を考察できると共に種の同定に利用することができる。中でも rRNA のうち全長が約 1500base 程度で最も扱いやすかった 16S rRNA の塩基配列情報が微生物分類に用いられるようになった。そして純菌株コレクションの 16S rRNA の配列が決定され、データベースが構築された。これにより純菌株の性状試験だけでは決定することができなかった細菌種同士の類縁関係が明らかになり、微生物分類の再構築が進んでいる。

原核生物の分類階級については明確な概念(基準)がないという事態は依然として変わらないが、現在は 16S rRNA の塩基配列と化学分類の情報に基づいて属のアウトラインを決め、属内については DNA-DNA 交雑と表現型の差異に基づいて菌種を定義するのが主流である。また 16S rRNA の相同性が 97%以下であれば別種であることが明確であるから DNA-DNA 交雑は必要無しとの提案がなされている。このように 16S rRNA 配列のデータベースの拡充により、微生物は単離しなくとも 16S rRNA の配列情報さえ分かれば既知の微生物との比較が可能となった。既知の微生物に同じ配列が見つからなくても、配列さえ決定しておけば、その配列を分類・命名することで特定することができる。微生物群集が持つ遺伝情報を解析することが微生物群集解析をすることに直結するようになったのである。

分子生物学的微生物群集解析手法においても培養法と同様に、それぞれのバイアスが存在することが明らかになってきている。この手法はあくまでも遺伝子型を調べているだけであり、新規の遺伝子型の発見により、新しい微生物が存在することは明らかにできてもその新規微生物が持つ機能については何も分からない。その微生物の機能を知るには単離するなどの更なる工夫が必要である。しかしこの手法がこれまでの手法と比べて明らかに優れている点は分離培養が困難な微生物の分類学的な位置付けを行うこともできる点でありその重要度が増していることは確かである。

分子生物学的微生物群集解析手法には様々なものがある。本節では本研究で用いた DGGE

法、PCR-Cloning-Sequencing 法、FISH 法を以下に詳述する。

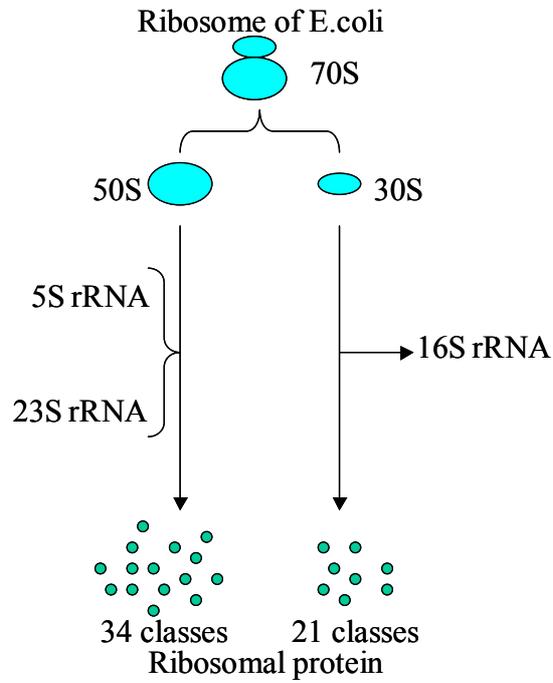
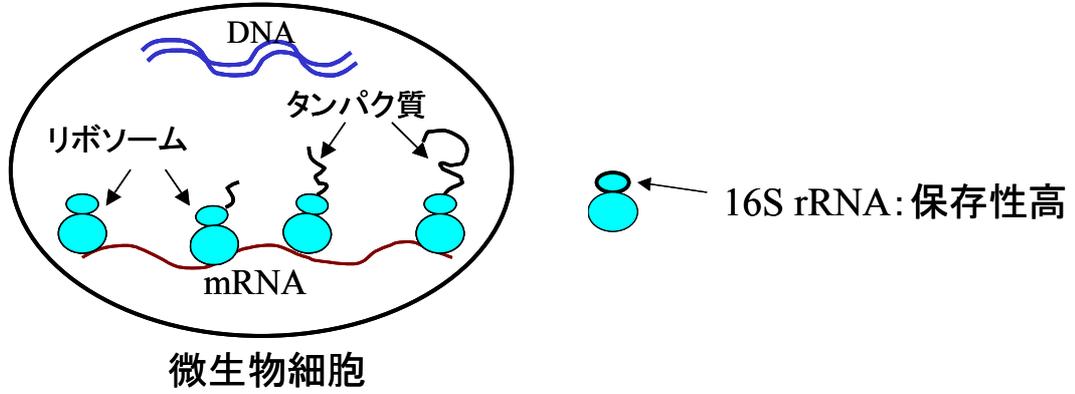


図 2.7 リボソームRNA

## 2. 3. 1 DGGE 法

変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(DGGE:denaturing gradient gel electrophoresis)は元来染色体 DNA の点変異検出に用いられた技術である。しかし、Mayzer *et al.*(1993)によって微生物生態分野にも DGGE 法が適応可能であることが紹介され、この方法はヨーロッパにおいて急速に普及した。DGGE 法は、PCR(2.3.2)法と組み合わせることで、微量のサンプルから環境中に存在する微生物の遺伝子を培養過程を経ずに検出することができる。また、DGGE 法は培養できない微生物の遺伝子でも検出できるという点ではクローニングと似ているが、バンドとして可視化出来るため、環境中にどれくらいの種類の微生物が存在するのかを容易に判断することが出来るという利点も持っている。

DGGE の原理を図 2.8 に示す。DGGE は、DNA 変性剤(尿素とホルムアルデヒド)の濃度勾配をつけたポリアクリルアミドゲル中で DNA 電気泳動を行うことにより、長さのそろった複数種の2本鎖 DNA(例えば PCR 産物)を、塩基配列の違いにより分離できる方法である。GC クランプ(GC に富む配列)付きのプライマーセットを用いて、PCR で増幅した2本鎖 DNA を変性剤の濃度勾配をつけたポリアクリルアミドゲルで電気泳動すると、DNA 変性剤の濃度上昇とともに2本鎖 DNA 間の水素結合が切断され、二重らせん構造から1本鎖 DNA に変性する。しかし、GC クランプ部分は結合力が強いいため、DNA は3方向に伸びた形になる。このように変性した DNA は、ゲルを移動する速度が著しく小さくなるため、ある場所に集まり、バンドを形成する。配列の異なる複数の2本鎖(異なる微生物)の DNA は A-T、G-C 間の水素結合の数および配列の違いにより、異なる DNA 変性剤濃度で解離するため、異なる位置にバンドが形成され、その結果、微生物を種類ごとに分離することができる。このようにして、サンプルごとにバンドプロファイルが得られ、そのパターンにより群集を評価することが出来るということになる。

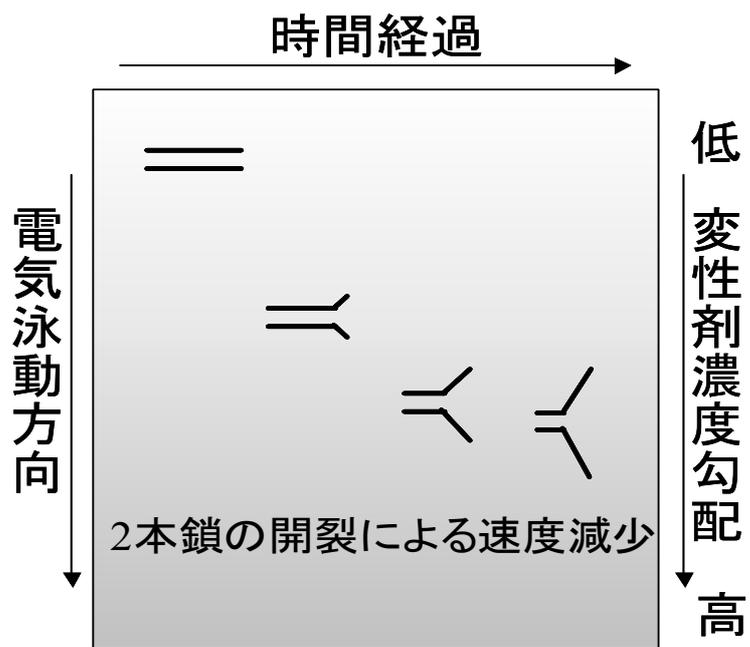


図 2.8 DGGE 法の原理

## 2. 3. 2 PCR-Cloning-Sequencing 法

### PCR 法

PCR は、polymerase chain reaction の略であり、抽出した微量 DNA のある特定部位を増幅する方法である。PCR 法の原理は、鋳型となる DNA 2本鎖を加熱して変性し、1本鎖にする(変性)。増幅したい特定部位の DNA の両端に相補的なプライマーを、反応系に過剰に加えた状態で温度を下げ、DNA 鎖とプライマーの2本鎖を形成させる(結合)。

この状態で、DNA 合成基質と DNA ポリメラーゼを作用させると、ポリメラーゼがプライマー部位から DNA 相補鎖を合成する(伸長)。これらの操作を繰り返すことにより DNA 断片を指数的に増幅させることができる。

### Cloning 法

複合微生物系からある微生物の遺伝子を単離する方法のひとつとしてクローニング法が挙げられる。図 2.9 にクローニングの流れを示す。以下にクローニング法の原理について述べる。

クローニングにはライゲーションと形質転換(トランスフォーメーション)の 2 つの行程がある。ライゲーションとは、プラスミドベクターにインサート(特定の遺伝子産物(PCR 産物))を組み込む操作である。クローニングに用いられるプラスミドベクターは、インサートを組み込む必要があるため、制限酵素で切断されるクローニングサイトを持つ必要がある。また、最終的にプラスミドを大腸菌に感染させて、大腸菌を増やすことでプラスミドに組み込まれた PCR 産物を増やすので、プラスミドベクターは大腸菌に認識される複製開始点を持ち、さらにプラスミドを持つ大腸菌を選択的に増殖させるために薬剤耐性遺伝子を持つ必要がある。プラスミドベクターの調整は自分でも行うことは出来るが、調整済みのベクターも市販されている。

ライゲーションの際には、PCR 産物の末端の修飾方法やベクター/インサート比に注意が必要である。末端の修飾方法にはいくつかあるが、比較的良く行われているのは、PCR での DNA 合成の際に付加されるデオキシアデノシン(dA)を利用した TA クローニングという方法である。また、ベクター/インサート比については、効率よくライゲーションが行われるように通常は 1/1~1/10 程度にする必要がある。

形質転換(トランスフォーメーション)とは、ライゲーションを行ったプラスミドを、DNA の取り込む能力のある大腸菌のコンピテント細胞に感染させる操作である。トランスフォーメーションした細胞を薬剤の含んだプレート上にまくことにより、薬剤耐性を持つ大腸菌つまりプラスミドを含む大腸菌が選択的に増殖してコロニーを形成する。一つのコロニーは一種類のみのインサートを含む大腸菌からなっていて、複合微生物系において微生物ごとに遺伝子を分けることが出来る。

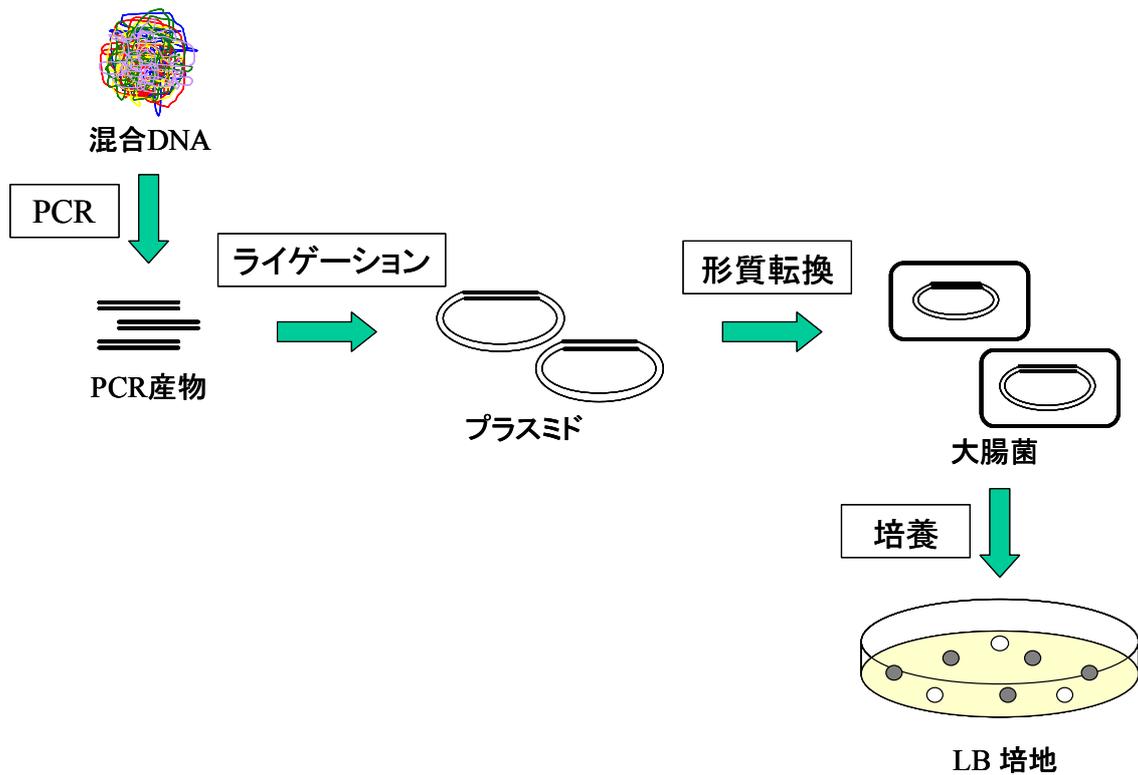


図 2.9 クローニング法の流れ

## Sequencing 法

シーケンシングとは塩基配列の決定のことである。塩基配列を決定することにより、既知遺伝子との相同性検索等の様々な解析や検討を行うことができる。

## PCR-Cloning-Sequencing 法

DGGE 法で扱うことのできる塩基配列は 500base 程度であるので、細菌の 16S rRNA 全長塩基配列を解読することができない。一方、この PCR-Cloning-Sequencing 法は Cloning 法によって、各細菌の遺伝子を単離した後、コロニーダイレクト PCR によってクローンの全長塩基配列 16S rDNA を解読することができる。

### 2. 3. 3 F I S H 法

FISH 法 (Amann *et al.*(1995)) とは Fluorescent *in situ* Hybridization の略である。FISH 法の原理を図 2.10 にしめす。標的とする核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列をもつ核酸 (プローブ) を蛍光色素や放射性物質などで標識したものをを用いる。この蛍光標識プローブを単離株や複合微生物系等のサンプルに加えることで、標的核酸にのみ Hybridize させ、サンプルを蛍光顕微鏡で観察すると、目的微生物を蛍光によって検出することができる。FISH 法を微生物の検出の用いる場合、リボソームにある rRNA を標的とし、プローブにはオリゴヌクレオチドを用いて行う。リボソームは 1 つの細胞に  $10^3$ - $10^5$  存在しており、プローブもそれだけの量の菌体に入ることになる為、菌体一つ当たりの蛍光が大きくなり、顕微鏡下で蛍光が観察可能になる。

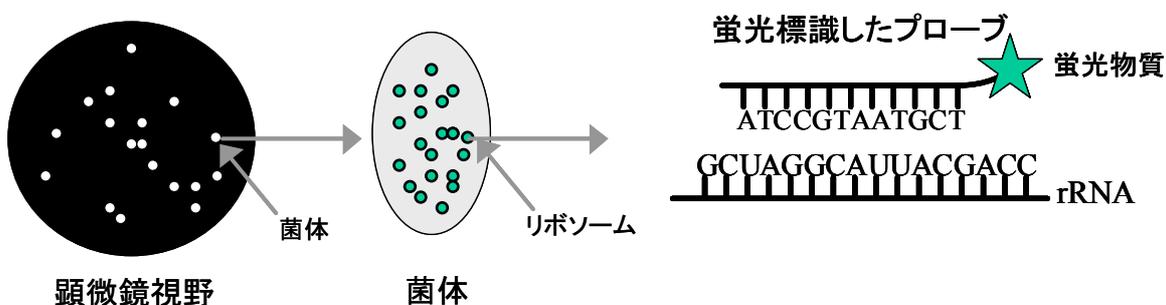


図 2.10 rRNA 標的 FISH 法

## 3章 実験方法

本章では、本研究室で運転されてきた嫌気好気式のラボスケールリアクター内に存在する主要細菌を特定、把握するまでの研究の流れについて示す。

### 3. 1 ラボスケールリアクターの運転

本研究室では、生物学的リン除去プロセスのラボスケールリアクターが運転されてきた。本節では、その概要と運転条件について述べる。

#### 3. 1. 1 リアクターの概要

実際の下水処理場は様々な物質を処理しているために、活性汚泥中の細菌種は非常に複雑である。そこで細菌種を単純化するために主要炭素源による人工下水を投入した嫌気好気式ラボスケールリアクターが運転されてきた(画像 3.1、図 3.1)(小貫(2001)、福島(2003)、岡本(2004))。このとき種汚泥として嫌気好気法でリン除去を行っている実下水処理場の返送汚泥が用いられた。

これは 1 槽式のリアクターである。時間によって流入工程・嫌気工程・好気工程・沈殿工程に区切られており連続回分式と呼ばれている。実下水処理場においては嫌気槽・好気槽・沈殿槽と別々の処理槽を流下していく方式(連続式)を採用していることが一般的であるが、ラボスケールリアクターにおいては連続回分式リアクターの方が運転が安定しているため、この方式が採用された。



画像 3.1 ラボスケールリアクターの写真

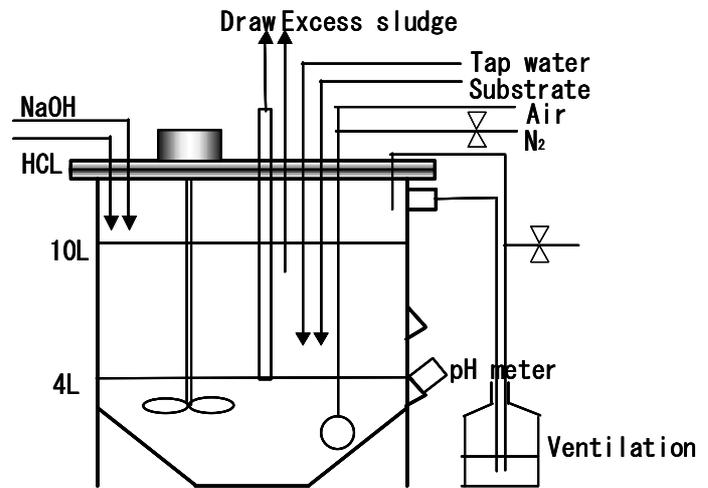


図 3.1 リアクター模式図

### 3. 1. 2 運転条件

#### タイムシーケンス（岡本）

OMRON 社のプログラマブルコントローラ SYSMAC によって自動制御した。図 3.2 に示すように 1 サイクルを 6 時間とし、排水 30 分、水道水流入 20 分、基質流入 10 分、嫌気工程 90 分、好気工程 150 分、沈殿 60 分で運転した。水道水流入と基質流入の 30 分間に窒素パージを行って溶存酸素を除去した。pH は pH コントローラーによって 7.0~7.2 に調整した。調整には塩酸及び水酸化ナトリウムを用いた。各サイクルの排水工程において 6L の上澄みを排水することによって HRT(水理的滞留時間)を 10 時間に調整した。同様に各サイクルの好気工程の最後の 30 分で約 300ml の汚泥混合液を引き抜くことによって SRT(生物学的滞留時間)を約 8 日に調整した。

放流	流入	嫌気	好気	沈殿
0.5	0.5	1.5	2.5	1
N <sub>2</sub> パージ 基質流入				汚泥引き抜き

(h)

図 3.2 タイムシーケンス

‘99年～’02年に、これまでに主要基質を変えた9つのリアクターが運転された。基質を以下に各リアクターの主要基質、運転期間、運転者を表 3.1 に示す。

表 3.1 各リアクターにおける基質と運転期間

Run	基質	運転期間	日数	運転者
1	酢酸	99/12/14 - 00/02/25	73	小貫
2	プロピオン酸	00/08/21 - 01/01/22	144	小貫
3	グルタミン酸	01/04/04 - 01/04/20	16	小貫
4	グルタミン酸	01/04/25 - 01/06/26	62	小貫
5	ペプトン・酵母エキス	01/07/12 - 01/11/05	116	福島
6	グルタミン酸	01/07/12 - 02/02/11	214	福島
7	酢酸	01/11/15 - 02/02/12	90	福島
8	アスパラギン酸	02/10/15 - 02/11/27	48	福島・岡本
9	グルコース	02/10/15 - 02/11/27	48	岡本

### 3. 1. 3 測定項目

測定項目は、DOC(溶存有機炭素)、溶存イオン、T-N(全窒素)、NH<sub>4</sub>-N(Run8のみ)、T-P(全リン)、D-P(溶存態リン)、MLSS、MLVSS、リン含有率、乳酸(Run9のみ)、全糖量、PHA(ポリβヒドロキシ脂肪酸)であった。

### 3. 2 微生物群集解析

#### 3. 2. 1 微生物群集解析の概要

各リアクターの活性汚泥中を対象とした細菌の 16S rDNA V3 領域の DGGE 法による解析の結果は福島(2003)、岡本(2004)によって既に報告されている。系統解析をより厳密なものにするためには V3 領域だけではなく、その細菌の 16S rDNA 全長塩基配列を得ることが必要である。そこで、同じ DNA 抽出液をテンプレートとして、16S rDNA の全長を PCR 法で増幅し、クローニングを行った(QIAGEN PCR cloning plus kit)。得られたクローンから DGGE 法で分離されたバンドの 16S rDNA の V3 領域の塩基配列を含むものを選び出し、その塩基配列の全長を主要細菌群の候補のもつ 16S rDNA 全長塩基配列として決定した。当該細菌を標的とする遺伝子 FISH プロブがすでに存在する場合にはそれを用い、また、存在しない場合には、ARB(Ludwig(2004))を用い、系統学的な情報を参考にしつつ、FISH プロブを作成した。それら FISH プロブを活性汚泥試料に適用し、もとの全細菌群集に対して、どの程度の割合を把握することができるのかを調べた。

図 3.3 に全長塩基配列の解読までの略図を、図 3.4 に細菌群集構造解析の概要を示す。

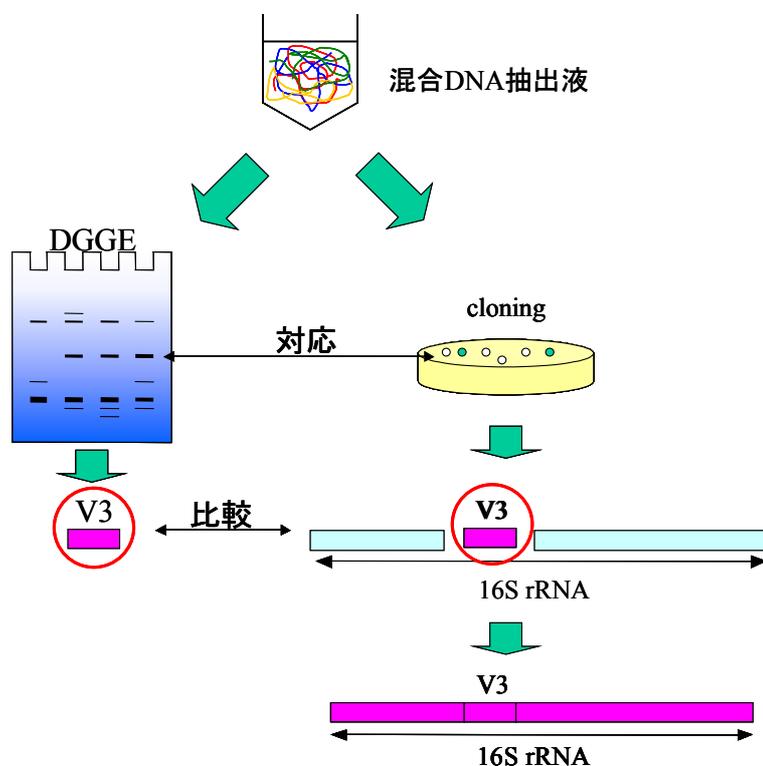


図 3.3 細菌の全長塩基配列解読の概略図

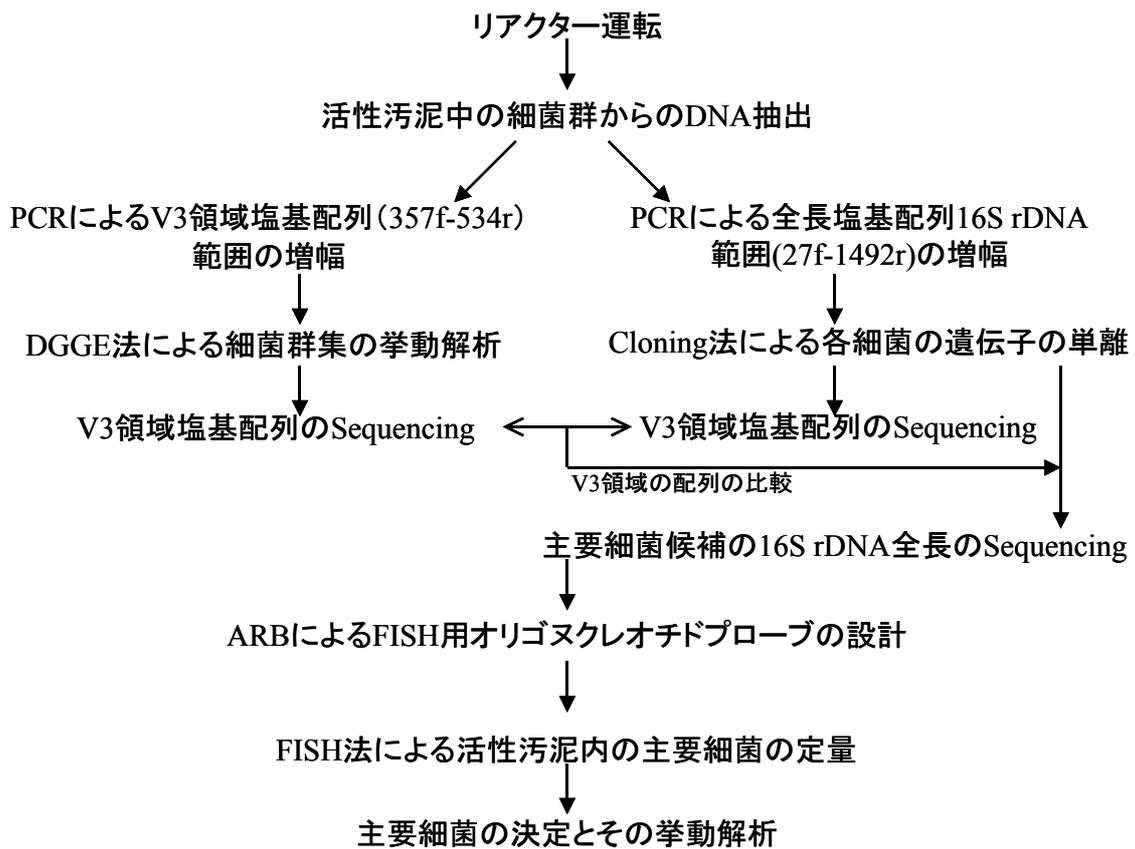


図 3.4 細菌群集構造解析の概要

### 3. 2. 2 PCR-Cloning-Sequencing 法

図 3.5 に PCR-Cloning-Sequencing 法の流れを示す。各リアクターの活性汚泥から FAST DNA Kit を用いて抽出された混合 DNA 抽出液を 27f-1492r プライマー(表 3.2)を用いて全長(16S rDNA)に近い領域を PCR 法で増幅した(PCR 30 サイクル:変性 94°C 30 秒-会合 50°C 30 秒-伸長 72°C 2 分)。QIAquick PCR purification kit(QIAGEN)によって PCR 産物を精製した。クローニングを行うために分光光度計を用いて PCR 産物の DNA 量を定量した。

PCR 産物のクローニングには QIAGEN PCR Cloning<sup>plus</sup> Kit(QIAGEN)を用いマニュアルに従って行った。PCR 産物をベクターに組み込み(insert & ligation)、これを QIAGEN EZ Competent Cell に導入した。菌体をアンピシリン(100mg/L)、X-gal(80mg/L)、IPTG(50mM)を含む寒天培地(LB:Luria Bertani 培地)上で 15~18 時間培養し、青色コロニーと白色コロニーのうち PCR 産物が組み込まれている白色コロニーのみを滅菌済み爪楊枝でピッキングし、新たな寒天培地(アンピシリン、X-gal、IPTGを含む)に植え替え、さらに 15~18 時間培養した。そして白色コロニーのみを滅菌済み爪楊枝でピッキングし、SP6-T7 プライマーを用いてコロニーダイレクト PCR で増幅させた(PCR 35 サイクル:変性 94°C 30 秒-会合 53°C 30 秒-伸長 72°C 30 秒)。このときピッキングした楊枝は直接 PCR 溶液に軽く浸すだけである。PCR 産物が得られたどうかをアガロースゲル電気泳動により確認した。

V3 領域の塩基配列の解読には、まず得られたクローンを Montage PCR  $\mu$  96 プレート(Millipore 社)で精製した後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit とプライマー(357f、534r)を用いてシーケンス反応を行った。そして Montage SEQ96 プレート(Millipore 社)で精製した。そしてサンプルを ABI310 または ABI3100(PE Applied Biosystem 社)によって解読した。基本的には各マニュアルに従った。これによって得られた各クローンの V3 領域の塩基配列と既に DGGE band から得られている V3 領域塩基配列を比較した。比較には DDBJ(DNA Date Bank of Japan : <http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html>)の BLAST(Basic local alignment search tool) (Altschul *et al*(1990))を用いた。V3 領域の塩基配列が一致したクローンを 16S rDNA 全長配列を解読する主要細菌候補として選定した。

16S rDNA 全長配列の解読は V3 領域の塩基配列の解読と使用するプライマーが異なる以外はすべて同じ方法である。既に Montage  $\mu$  96 プレートで精製されてあるクローンを BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit と 8 つのプライマー(27f, 357f, 517f, 1099f, 534r, 907r, 1114r, 1492r) (表 3.2) (Lane (1991))を用いてシーケンス反応を行った。そして同様にサンプルの精製を行い、このサンプルを ABI310 または ABI3100 で解読し、AutoAssmber2.1 を使ってより確からしい配列に修正し塩基配列を決定した。

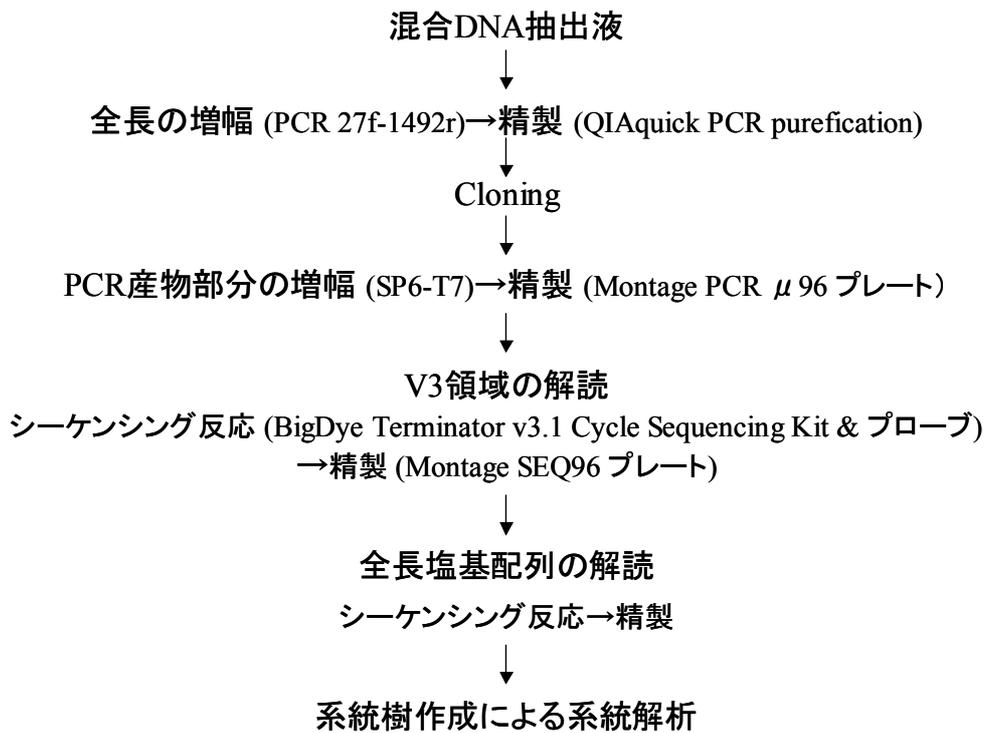


図 3.5 PCR-Cloning-Sequencing 法の流れ図

表 3.2 PCR-Cloning-Sequencing 法で用いたプライマー

Name	16S rRNA target site (E. coli numbering)	Probe Sequence (5'-3')	Reference
27f	8-27	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Lane (1991)
357f	341-357	CCTACGGGAGGCAGCAG	Muyzer <i>et al.</i> (1993)
517f	517-533	GCCAGCAGCCGCGGTAA	Lane (1991)
1099f	1099-1114	GYAACGAGCGCAACCC	Lane (1991)
534r	518-534	ATTACCGCGGCTGCTGG	Lane (1991)
907r	907-926	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT	Lane (1991)
1114r	1099-1114	GGGTTGCGCTCGTTRC	Lane (1991)
1492r	1492-1513	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	Lane (1991)
SP6	SP6 region	CATTTAGGTGACACTATAG	
T7	T7 region	GTAATACGACTCACTATAG	

M=C,A Y=C,T K=G,T R=A,G S=G,C W=A,T を表す

### 3. 3オリゴヌクレオチドプローブの設計

#### 3. 3. 1 ARBでの設計

図 3.6 にプローブ作成の流れを示す。プローブの作成は塩基配列データベースツール ARB (Ludwig *et al.*)を用いた。設計方法は、得られた全長塩基配列の rRNA を入力し ARB に登録されてある既知の種のデータベース上加えた。そして既知の種と加えた全長塩基配列の系統樹を作成した。そして標的細菌に対する特異的な塩基配列に相補的な塩基配列、すなわちプローブの候補は Probe Design ツールを用いて決定した。このときの設定条件として、プローブの長さは一般的に用いられている長として 18mer とした。また、GC 含有率が低すぎて変性温度 Td が低くなり、非標的細菌との区別が付きにくくなるように、GC 含有率が 50%以上となるように設定した。

次に非標的細菌とプローブ候補との1ミスマッチ、2ミスマッチのときのミスマッチの位置を確認した。そしてミスマッチの位置がプローブの塩基配列の両端に来ないかどうかを確認した。これは両端にミスマッチがあると非標的細菌と結合しやすくなり、標的細菌との区別が付きにくくなるためである。さらにプローブの自己相補結合は3塩基までを許容し4塩基以上あるものは候補から外した。

このようにして得たプローブ候補を、次に RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>) の Check Probe 機能にかけた。これにより標的種と完全に相補的であるか、標的種がどの程度特異的であるか、非標的種がどの程度あるかを確認した。

プローブの発注・合成は Proligo Japan (<http://proligo.bioweb.ne.jp/>)で行い、蛍光標識はすべて Cy3 とした。

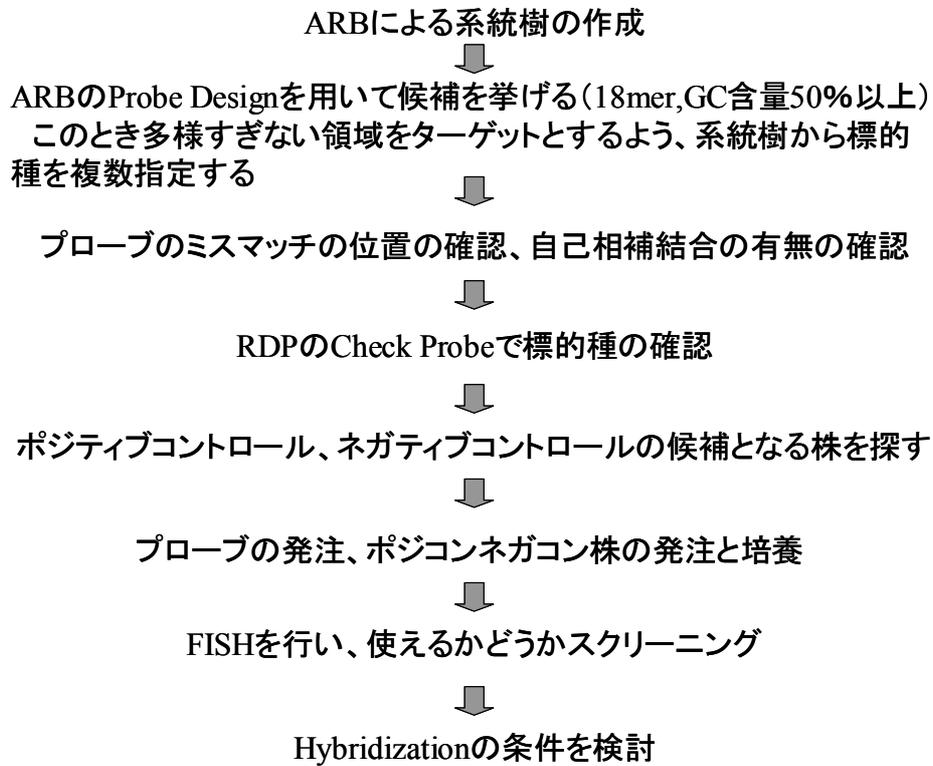


図 3.6 プローブ設計の流れ

### 3. 3. 2 プローブのスクリーニング・Hybridization の検討

核酸の Hybridization はホルムアミド濃度が低い方が条件が弱く、Hybridize しやすい。プローブのスクリーニングは一般に、ポジティブコントロールとネガティブコントロールの株を使用する。ネガティブコントロール株が光らず、ポジティブコントロール株の蛍光が最大となる条件を見つけるのだが、今回は標的細菌が非常に特異的であり、ポジティブコントロールを含まないプローブもあった。そこで今回は、標的細菌が DGGE 法によって相対的に濃く現れていたときの汚泥を使用してプローブの Hybridization の検討を行った。そして、ホルムアミドの濃度をまずは 5%、20%、50%とし、さらに濃度を絞り込んでいき、汚泥サンプルでプローブの蛍光が最大になるホルムアミド濃度を検討した。グラム陽性球菌に対しては必要に応じてリゾチーム処理が行われている(Liu *et al.*(2001))が、今回の研究においては岡本(2004)の研究により必要無いことが分かっており行わなかった。

### 3. 4 顕微鏡観察

#### 3. 4. 1 FISH (Fluorescent *in situ* Hybridization) 法

基本的に Amann *et al.* (1995) に従って行った。

##### 汚泥のスライドガラスへの固定

- (1) 液体窒素中または $-80^{\circ}\text{C}$ で保存しておいた汚泥サンプルを常温で解凍後、4%パラホルムアルデヒド溶液(PBSに溶解(pH 7.2))を汚泥サンプルの3倍量加えて(これで3%パラホルムアルデヒド溶液となる)1.5時間、 $4^{\circ}\text{C}$ でサンプルを固定した。
- (2) 遠心分離で固定液を取り除いた後、PBSと同量のエタノールで再懸濁した。
- (3) サンプルを使用用途に応じて超音波分散を行い汚泥の塊(フロック)を分解する。
- (4) この固定サンプルをゼラチンコートしたスライドガラス上に各ウェルに $2\mu\text{L}$ ずつ滴下し乾燥させた。
- (5) 乾燥させたスライドガラスを50%、80%、100%エタノール溶液に順に3分ずつ浸してエタノール脱水した。(出来たスライドガラスは半永久的に保存可能)

##### Hybridization

- (1) Hybridization Buffer(hybridization bufferの組成は $0.9\text{MNaCl}$ 、 $20\text{mMTris/HCl}$ (pH 7.2)、 $0.01\%\text{SDS}$ 、ホルムアミド(ホルムアミド濃度は使用するプローブによって異なる。))で湿らせた紙を入れた $50\text{ml}$ チューブを $46^{\circ}\text{C}$ で数分インキュベーションする。
- (2) プローブは滅菌した超純水で $10\text{pmol}/\mu\text{L}$ に調整しておき、1:8の割合で hybridization buffer と混合してスライドガラス上に定着されたサンプル上の各ウェルに $9\mu\text{L}$ ずつ滴下した。  
(1)で準備しておいた気液平衡を保ったチャンバー内に $46^{\circ}\text{C}$ で2時間放置し、hybridization を行った。
- (3) hybridization 終了後、スライドガラスを washing buffer で素早く洗い流し、さらに washing buffer 中に $48^{\circ}\text{C}$ で20分間浸すことで余剰のプローブを洗い流した。washing buffer は hybridization buffer をそのまま用いることも可能であるが、NaCl濃度をコントロールすることでホルムアミドを用いずに hybridization buffer と同じ Stringency を持つように計算されている(栗栖(1998))ので、ホルムアミドの環境影響を考慮し NaCl濃度をコントロールした washing buffer を作成した。
- (4) 超純水で washing buffer を洗い流し、即座に自然乾燥させた。

##### 顕微鏡観察

検鏡するまで暗所に保存しておき、顕微鏡観察の直前にスライドガラスに退色防止剤(Slow Fade Light、Molecular Probes社)を添加しカバーガラスをかぶせた。観察には蛍光顕微鏡 BX51(Olympus社)を用いて行った。

### 3. 4. 2 面積定量

顕微鏡観察による面積定量の多くは共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM: Confocal Laser Scanning Microscope) が用いられているが、本研究では位相差の蛍光顕微鏡で撮像した。1つのサンプルにつき 20 視野以上写像した。

面積定量には Leica の画像解析アプリケーションソフト Qwin を用いた。これは細菌の面積として認識するかどうかを Red、Green、Blue の各色調に付き 256 段階をマニュアルで指定できる。自家蛍光を含まないようにかつ細菌からの蛍光を全て網羅できる範囲を各視野について調整し求めた。

全細菌中に標的細菌がどの程度の割合でいるかを調べるときには、蛍光色素を FITC (緑色) とした全細菌に特異的なプローブである EUBmix (EUB338、EUB338-II、EUB338-III を混合したもの) (Amann, R.I., *et al* (1990)、Daims, H., *et al* (1999)) と、蛍光色素を Cy3 (赤色) とした標的細菌のプローブを使用した。表 3.3 に EUBmix プローブの詳細を示す。

表 3.3 EUBmix プローブ

Probe name	Sequence (5'-3')	rRNA target site	Specificity	Formamide(%)	Reference
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S, 338-355	Eubacteria	20-35	Amann <i>et al.</i> (1990)
EUB338-II	GCAGCCACCGTAGGTGT	16S, 338-355	Eubacteria Planctomycetales	35	Daims <i>et al.</i> (1999)
EUB338-III	GCTGCCACCGTAGGTGT	16S, 338-355	Eubacteria Verrucomicrobiales	35	Daims <i>et al.</i> (1999)

## 4章 細菌群集構造解析

プローブを作成するためには標的細菌の系統解析を行うことが必要であり、その系統解析をより厳密なものにするためにはV3領域塩基配列だけではなく16S rDNA全長塩基配列を得ることが必要である。そこで、本章では既にDGGE法から得ているV3領域の塩基配列をもつ細菌の全長塩基配列を解読し、その系統解析をおこなった。

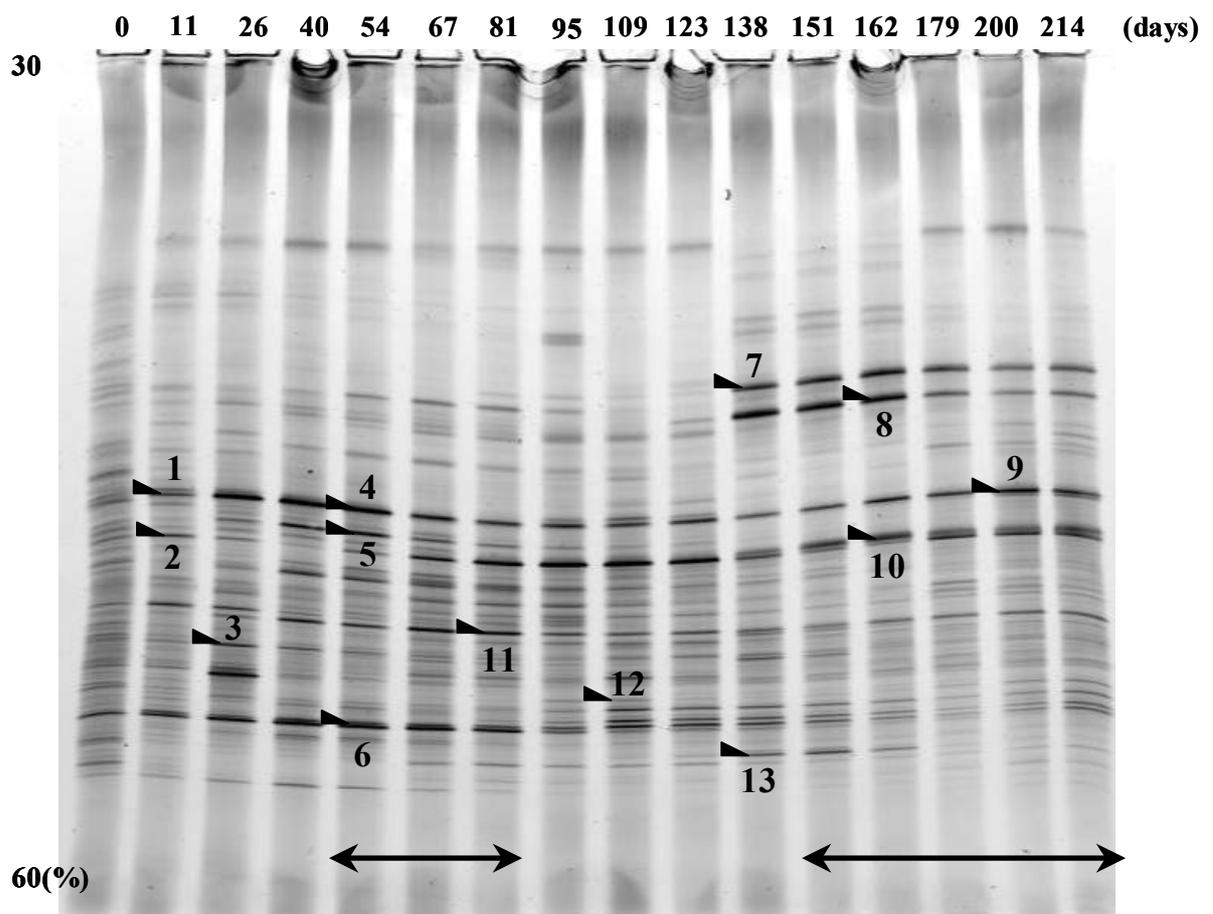
### 4. 1 DGGEバンド画像

Run6(グルタミン酸リアクター)、Run8(アスパラギン酸リアクター)、Run9(グルコースリアクター)のDGGE法による解析結果を画像4.1, 4.2, 4.3に示す。これは各リアクターの活性汚泥中の細菌群集より抽出したゲノムDNAのうち16S rDNAの341-534領域(V3領域)を解析したものである。番号をふってあるバンド(細菌)については、DNA断片を回収し、その塩基配列の解析が福島・岡本によって既に解析されていることを示す。番号がふられていないバンドは、V3領域が読めなかったバンドである。これはバンドをゲルから切り出すことが困難であったという技術的な要因と、バンドは切り出せたが塩基配列が何らかの原因で読めなかったからである。

表4.1に各リアクターのリン除去活性が良好であった時期を示す。なお画像4.1, 4.2, 4.3の矢印はリン除去が良好であった期間を示す。

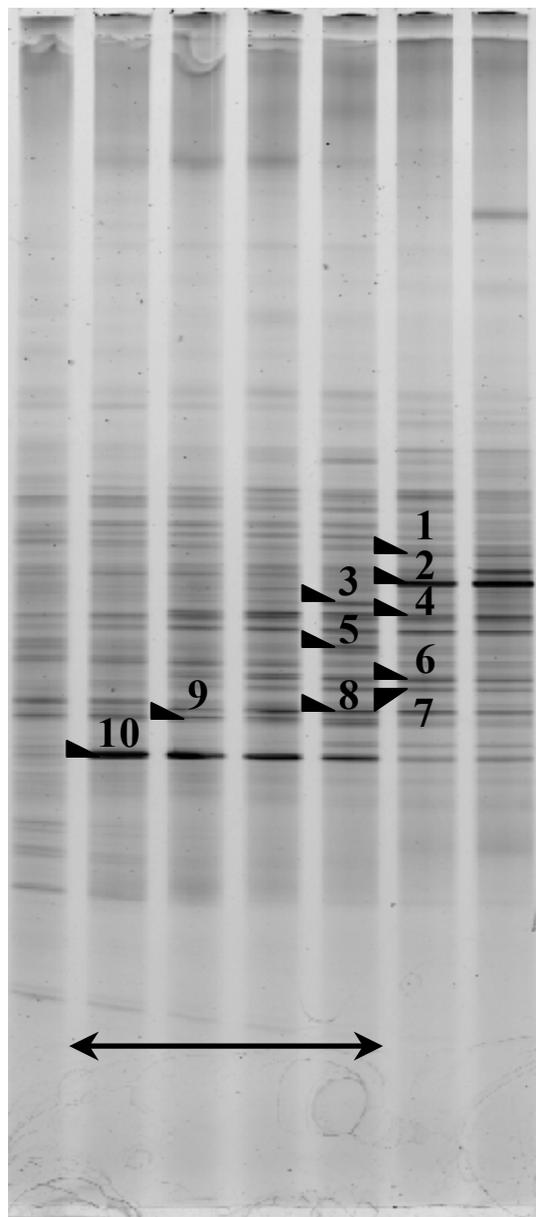
表 4.1 各リアクターのリン除去活性が良好な時期

Run	基質	リン除去活性が良好な期間(days)
6	グルタミン酸	40~81, 151~214
8	アスパラギン酸	8~29
9	グルコース	8~22

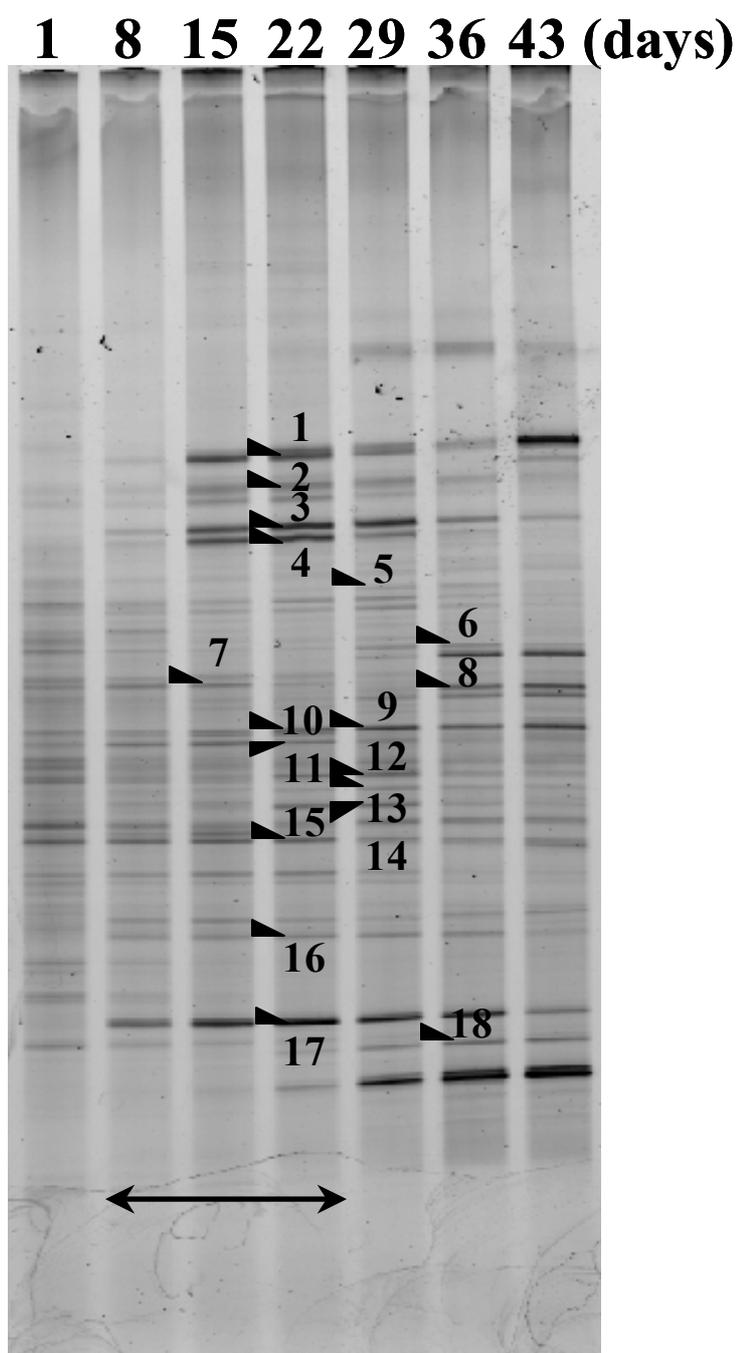


画像 4.1 グルタミン酸リアクター (Run6) の DGGE 画像

**1 8 15 22 29 36 43 (days)**



画像 4.2 アスパラギン酸リアクター (Run8) の DGGE 画像



画像 4.3 グルコースリアクター (Run9) の DGGE 画像

## 4. 2 全長塩基配列決定

1999 年から計 9 つのリアクターが運転されてきた(3.1)。各リアクターのモニタリングと PCR-DGGE-Sequencing 法によって得られた V3 領域の塩基配列の情報から、細菌の群集解析が行われた。図 4.1(小貫)にこれまでに得た V3 領域の系統樹を示す。系統解析と FISH 法に用いるオリゴヌクレオチドプローブ作成のためには、細菌の 16S rDNA 全長塩基配列を知る必要がある。つまり、各リアクターの活性汚泥中で、標的細菌と同じ V3 領域塩基配列を持っている細菌をみつけ出すことが必要である。そこで、活性汚泥から抽出した混合 DNA 抽出液を用いて、クローニングを行うことによって遺伝子を個々に分け、その個々のクローンの V3 領域塩基配列を PCR-Cloning-Sequencing 法(3.2.2)によって解読した。そして、DGGE 法から既に得ている V3 領域塩基配列と同じ配列を持つクローンの全長塩基配列を解読した。本節では、その全長塩基配列解読結果と系統解析結果について述べる。

### 全長塩基配列解読結果

Run6 (グルタミン酸リアクター)、Run8 (アスパラギン酸リアクター)、Run9 (グルコースリアクター)の3つのリアクターについてクローニングを行った。そのさい全長塩基配列が知りたいバンドが DGGE 画像上に比較的濃く現れていた日にちの活性汚泥の混合 DNA 抽出液を選んだ。

表 4.2 にクローニングに使用したサンプルと得られたクローン数(アガロースゲルチェック後)、そのうちについて V3 領域が読めたクローンの数を示す。V3 領域が得られたクローン数はそれぞれ、Run6 の 151 日からは 53 個、Run8 の 22 日目からは 19 個、Run8 の 36 日目からは 68 個、Run9 の 22 日目からは 52 個、Run9 の 43 日目からは 32 個となった。

得られたクローンの塩基配列の相同性を DDBJ を利用して調べた。その相同性検索結果から、目的の V3 領域塩基配列を含むクローンを選定し、そのクローンの全長塩基配列の解読を行った。得られた全長塩基配列は計 16(異なる種では 15)個となった。そして得られた全長塩基配列は DDBJ に登録した。

表 4.3 に DGGE band とそれに対応するクローン名と Accession No'を示す。なお V3 領域塩基配列結果とその相同性検索結果は付録に載せてある。

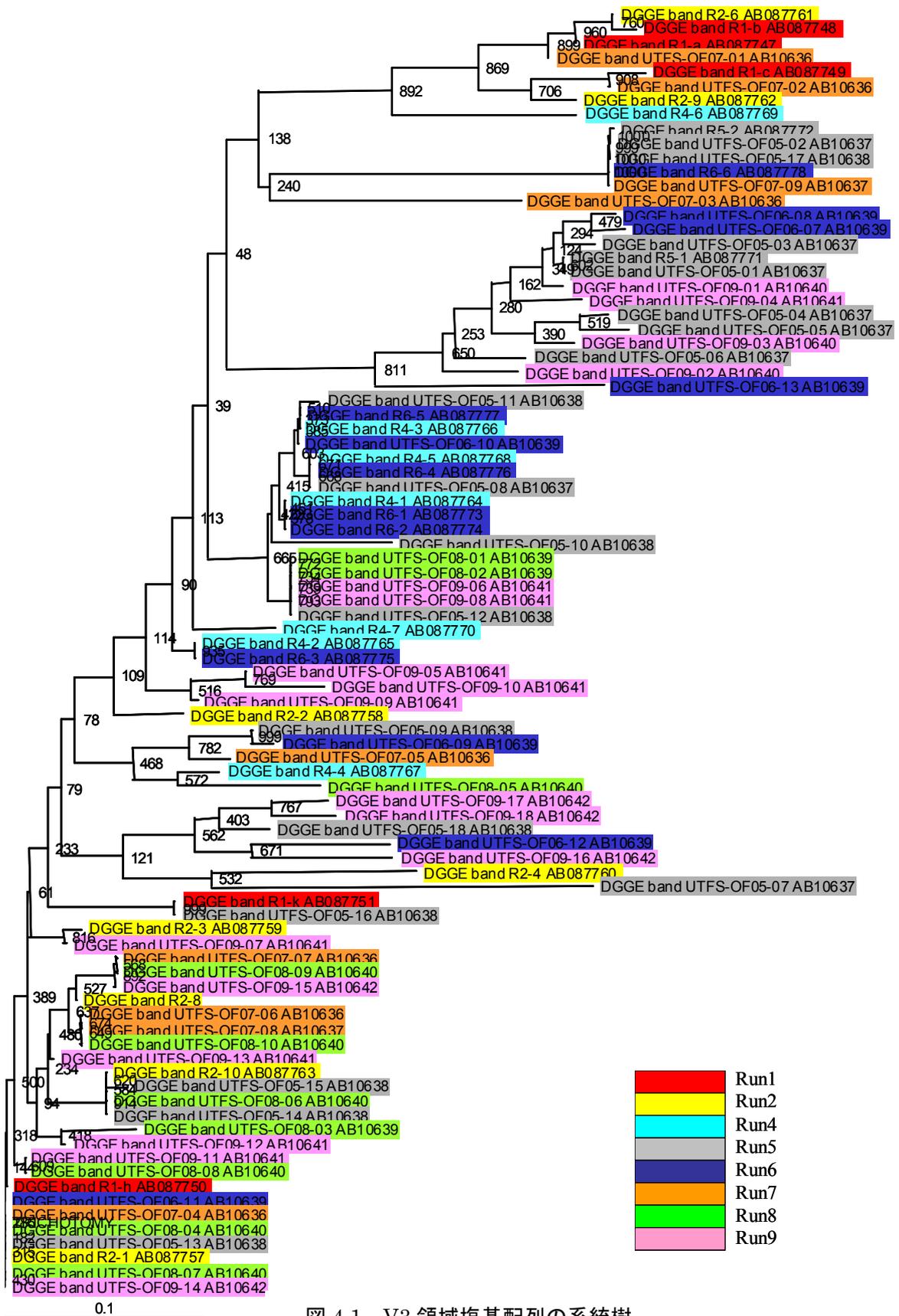


図 4.1 V3 領域塩基配列の系統樹

表 4.2

## Run6 をサンプルとした PCR-DGGE-Sequencing 法結果

使用した DNA 抽出液	得られたクローン数	→	V3 領域が読めたクローン数
Run6-151 日目 1 回目	8		7
Run6-151 日目 2 回目	63		46
合計			<b>53</b>

## Run8 をサンプルとした PCR-DGGE-Sequencing 法結果

使用した DNA 抽出液	得られたクローン数	→	V3 領域が読めたクローン数
Run8-22 日目	24		<b>19</b>
Run8-36 日目	112		<b>68</b>

## Run9 をサンプルとした PCR-DGGE-Sequencing 法結果

使用した DNA 抽出液	得られたクローン数	→	V3 領域が読めたクローン数
Run9-22 日目	99		<b>52</b>
Run9-43 日目	42		<b>32</b>

表 4.3 DGGE バンドとそれに対応するクローン

リアクター	DGGE band Name	Accession No'	Clone Name
Run5	UTFS-OF05-09	AB200289	R6-d151-26
	UTFS-OF06-07	AB200291	R6-d151-61
Run6	UTFS-OF06-08	AB200292	R6-d151-01
	UTFS-OF06-10	AB200290	R6-d151-02
Run8	UTFS-OF08-02	AB200293	R8-d36-85
	UTFS-OF08-03	AB200294	R8-d22-06
	UTFS-OF08-04	AB200295	R9-d22-93
	UTFS-OF08-05	AB200296	R8-d36-35
	UTFS-OF08-06	AB200297	R8-d36-08
	UTFS-OF08-08	AB200298	R8-d22-17
	UTFS-OF09-01	AB200299	R9-d22-24
Run9	UTFS-OF09-02	AB200301	R9-d22-03
	UTFS-OF09-03	AB200302	R9-d22-37
	UTFS-OF09-04	AB200303, AB200304	R9-d22-22, R9-d22-29
	UTFS-OF09-14	AB200300	R9-d43-33

\*UTFS-OF(RunNo')-(バンド No'), (RunNo')-(使用サンプル日目)-(クローン No')

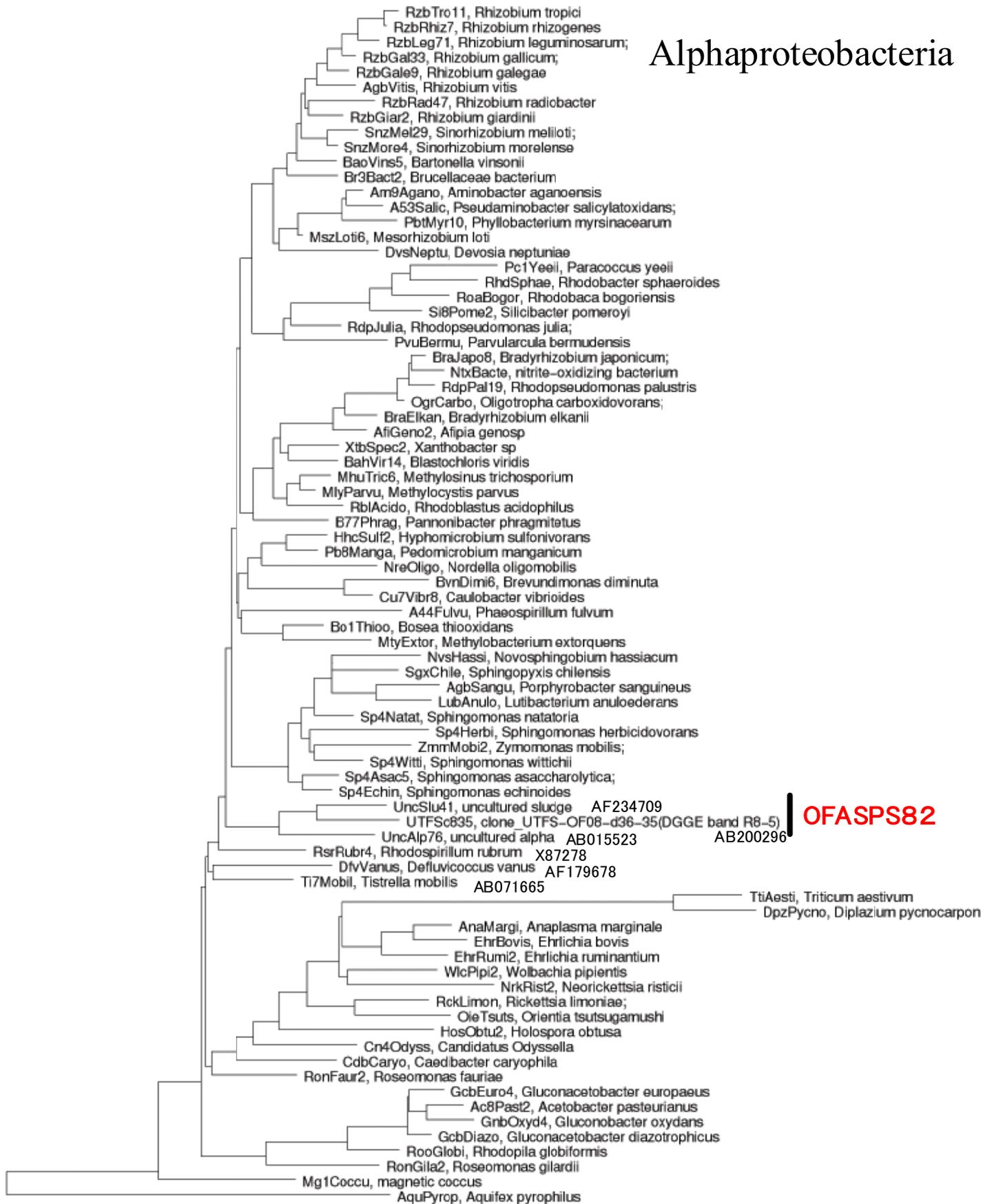
#### 4. 3 系統解析

より正確な系統解析を行うには細菌の全長配列を知る必要があり、プローブを設計するためには、より正確な系統解析の結果が必要である。そこで、4.2 節で得た細菌の全長塩基配列を系統解析ソフト (ARB) を使って系統樹 (アルゴリズムはパルシモニーを使用) を作成した。作成した *Alphaproteobacteria*, *Acidovorax & Comamonas*, *Dechloromonas & Rhodocyclus*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *TM7*, *Xanthomonas*, *Zoogloea* の各系統樹を本章の最後に示す。各系統樹に属する各細菌名を表 4.4 に示す。なお、表 4.4 において本研究で解読した以外の全長塩基配列は小貫・岡本によって解読されたものである。

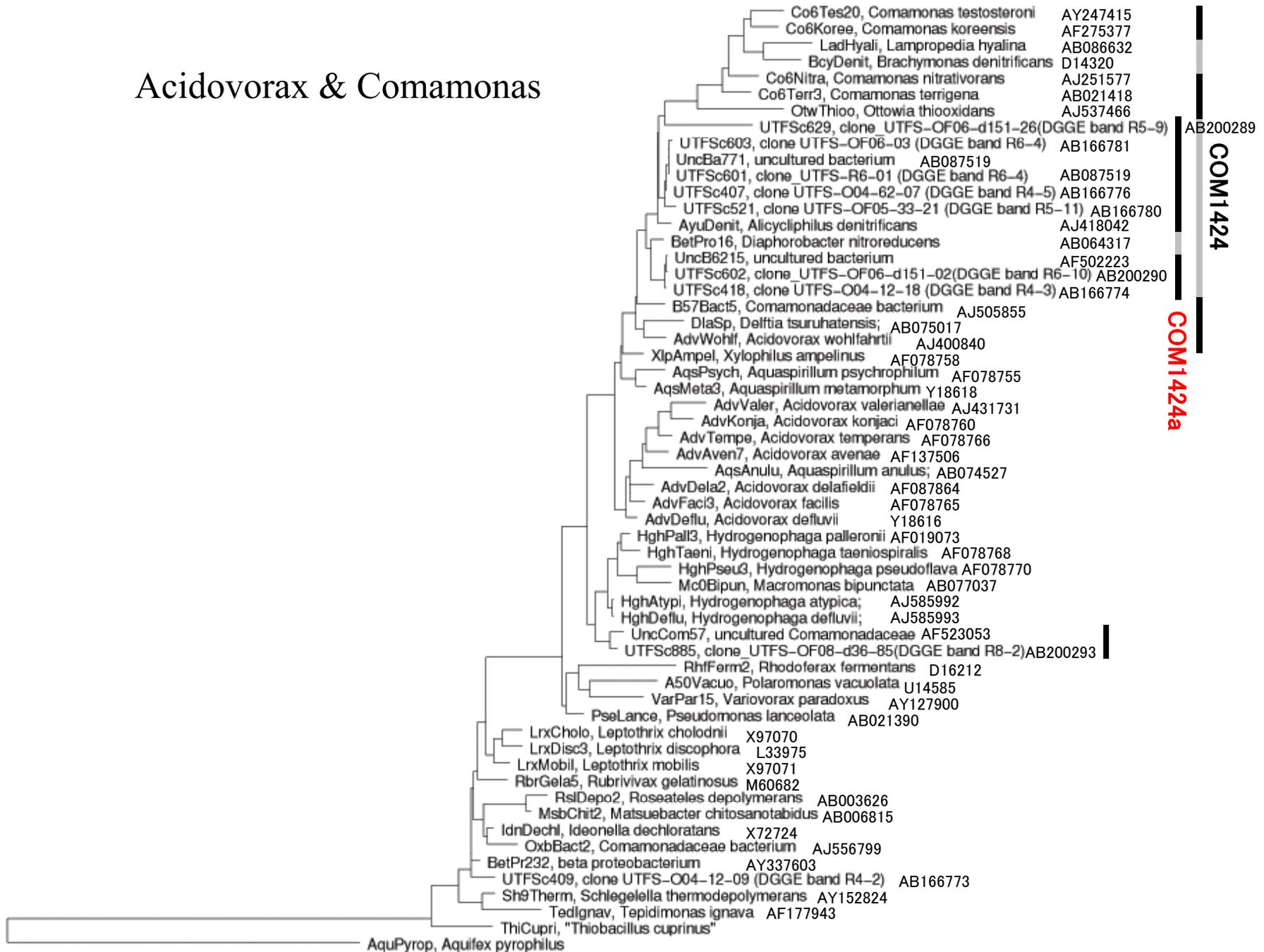
表 4.4 各細菌の系統解析

属名	クローン名 (DGGE バンド名)
<i>Alphaproteobacteria</i>	UTFS-OF08-d36-35 (DGGE band R8-5)
<i>Betaproteobacteria ; Acidovorax</i>	UTFS-OF08-d36-85 (DGGE band R8-2) UTFS-O04-12-19 (DGGE band R4-2)
<i>Betaproteobacteria ; Comamonas</i>	UTFS-OF06-d151-26 (DGGE band R5-9) UTFS-OF06-03 (DGGE band R6-4) UTFS-R6-1 (DGGE band R6-4) UTFS-O04-62-07 (DGGE band R4-5) UTFS-OF05-33-21 (DGGE band R5-11) UTFS-OF06-d151-02 (DGGE band R6-10) UTFS-O04-12-18 (DGGE band R4-3)
<i>Betaproteobacteria ; Dechloromonas</i>	UTFS-OF08-04 (DGGE band R8-9) UTFS-OF09-22-46 (DGGE band R9-15) UTFS-O02-42-08 (DGGE band R2-8) UTFS-OF08-18 (DGGE band R8-10)
<i>Betaproteobacteria ; Rhodocyclus</i>	UTFS-O02-12-40 (DGGE band R2-1) UTFS-O01-02 (DGGE band R1-h) UTFS-OF09-d22-93 (DGGE band R8-4) UTFS-O02-12-23 (DGGE band R2-3) UTFS-OF08-d22-17 (DGGE band R8-08) UTFS-OF09-d43-33 (DGGE band R9-14)
<i>Betaproteobacteria ; Zoogloea</i>	UTFS-OF08-d36-08 (DGGE band R8-6) UTFS-OF08-d22-06 (DGGE band R8-03)
<i>Actinobacteria</i>	UTFS-OF05-33-30 (DGGE band R5-18) UTFS-OF09-d36-04 (DGGE band R9-17) UTFS-OF09-d36-43 (DGGE band R9-18)
<i>Bacteroidetes</i>	UTFS-O04-62-15 (DGGE band R4-6)
<i>Chloroflexi</i>	UTFS-OF05-33-02 (DGGE band R5-2) UTFS-OF06-31 (DGGE band R6-11) R6-06 (DGGE band R6-11)
<i>TM7</i>	UTFS-OF09-d22-22 (DGGE band R9-4) UTFS-OF09-d22-29 (DGGE band R9-4) UTFS-OF09-d22-24 (DGGE band R9-1) UTFS-OF09-d22-37 (DGGE band R9-3) UTFS-OF06-d151-01 (DGGE band R6-8) UTFS-OF06-d151-61 (DGGE band R6-7) UTFS-OF09-d22-03 (DGGE band R9-2)
<i>Xanthomonas</i>	UTFS-O04-d12-02 (DGGE band R4-4)

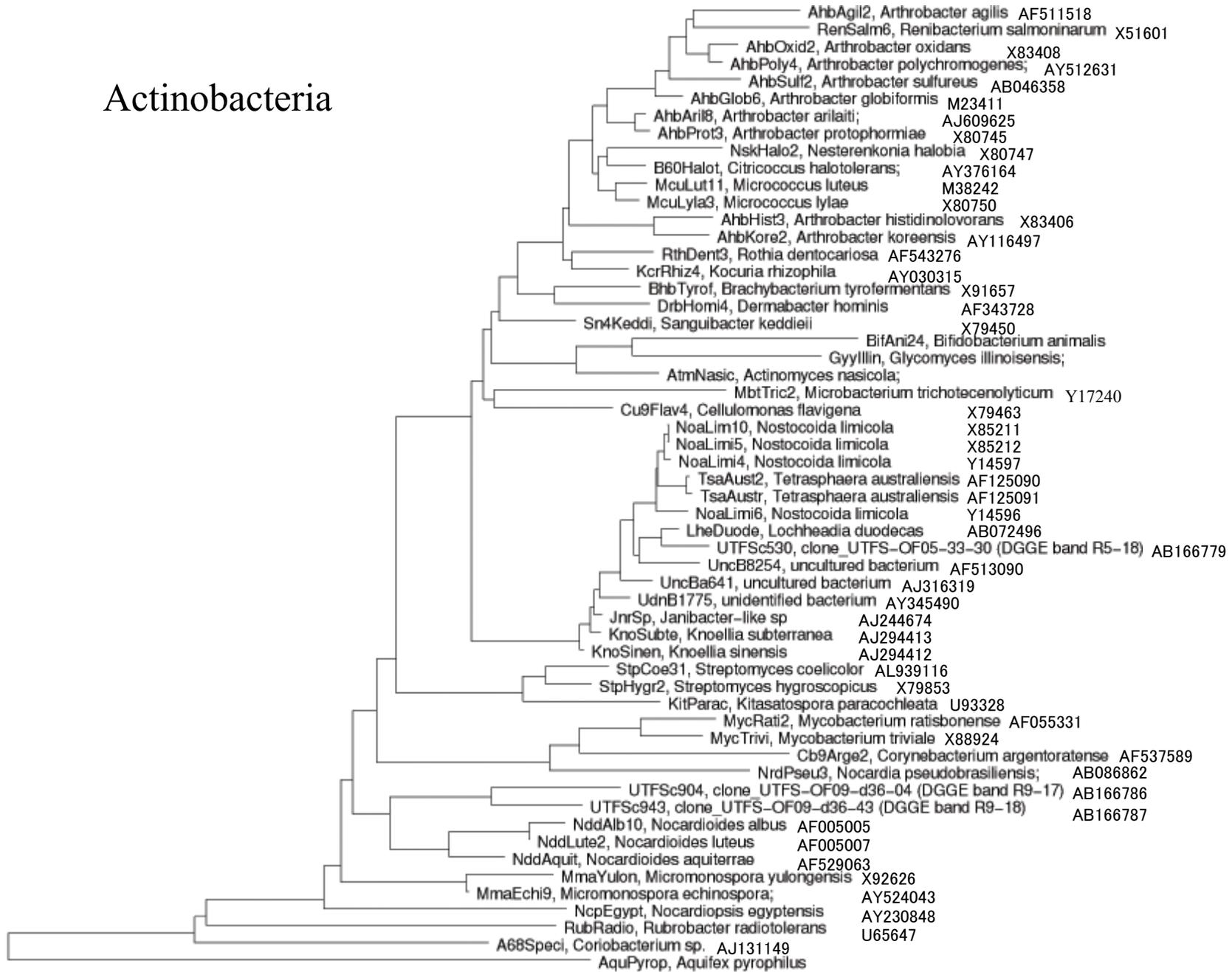
# Alphaproteobacteria



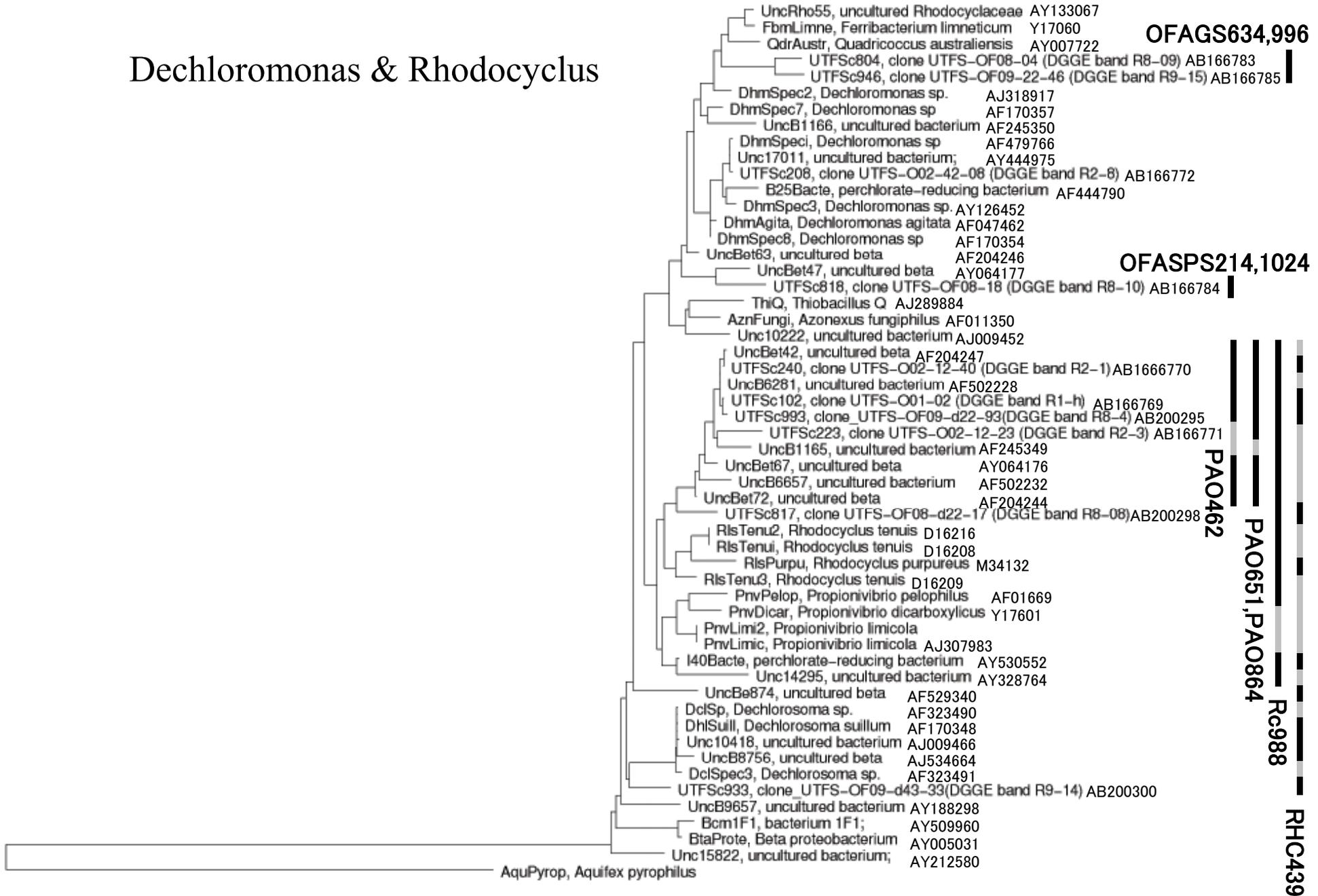
# Acidovorax & Comamonas



# Actinobacteria



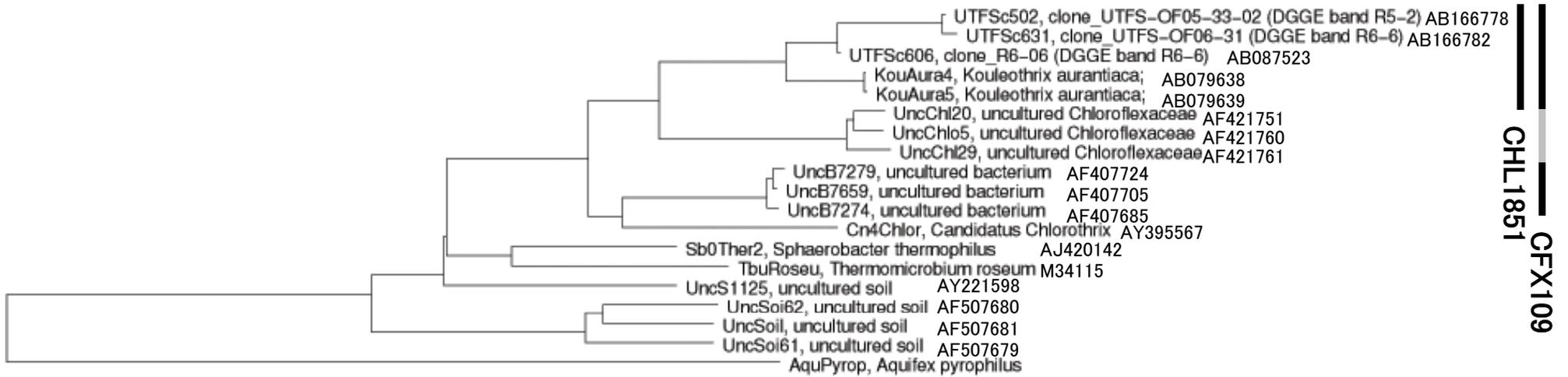
# Dechloromonas & Rhodocyclus



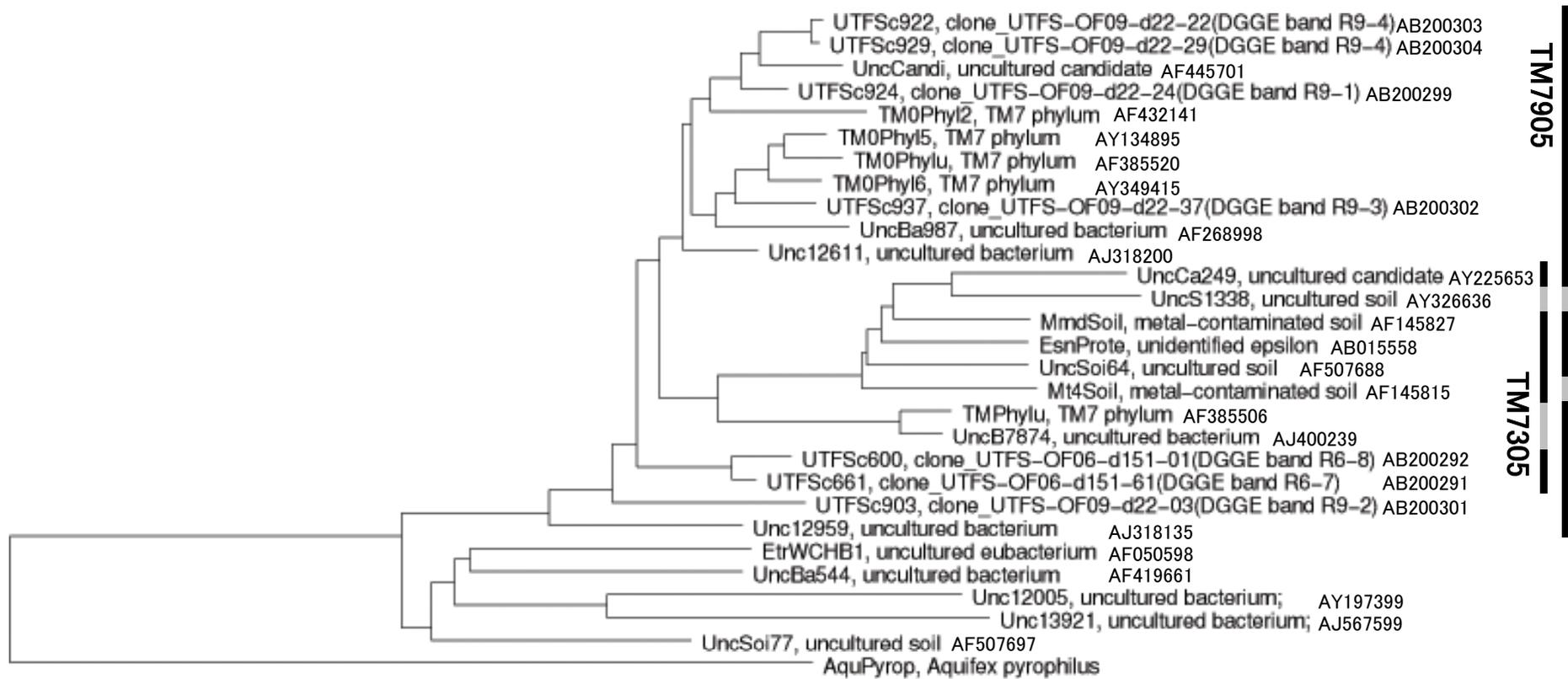
# Bacteroidetes



# Chloroflexi

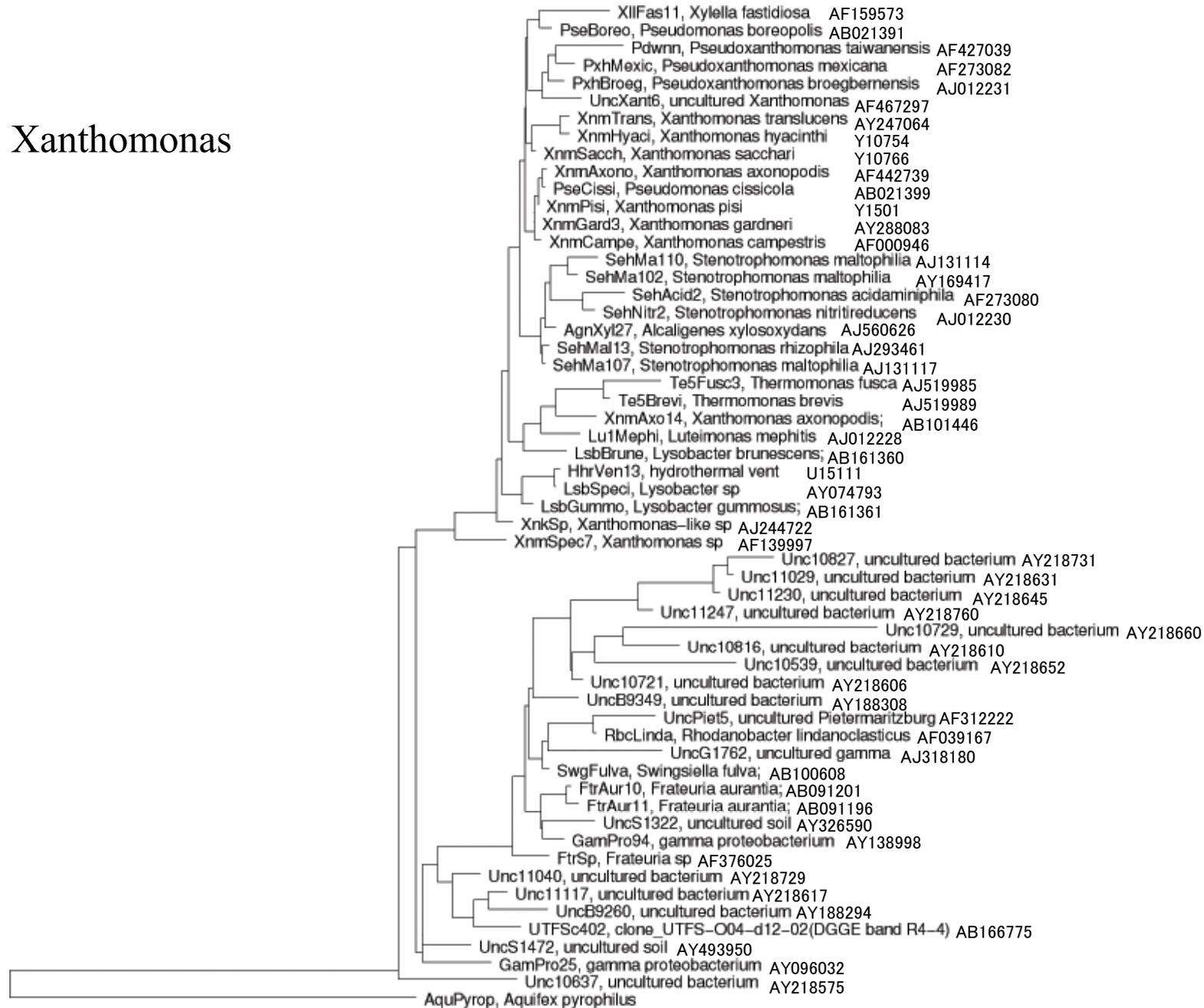


# TM7

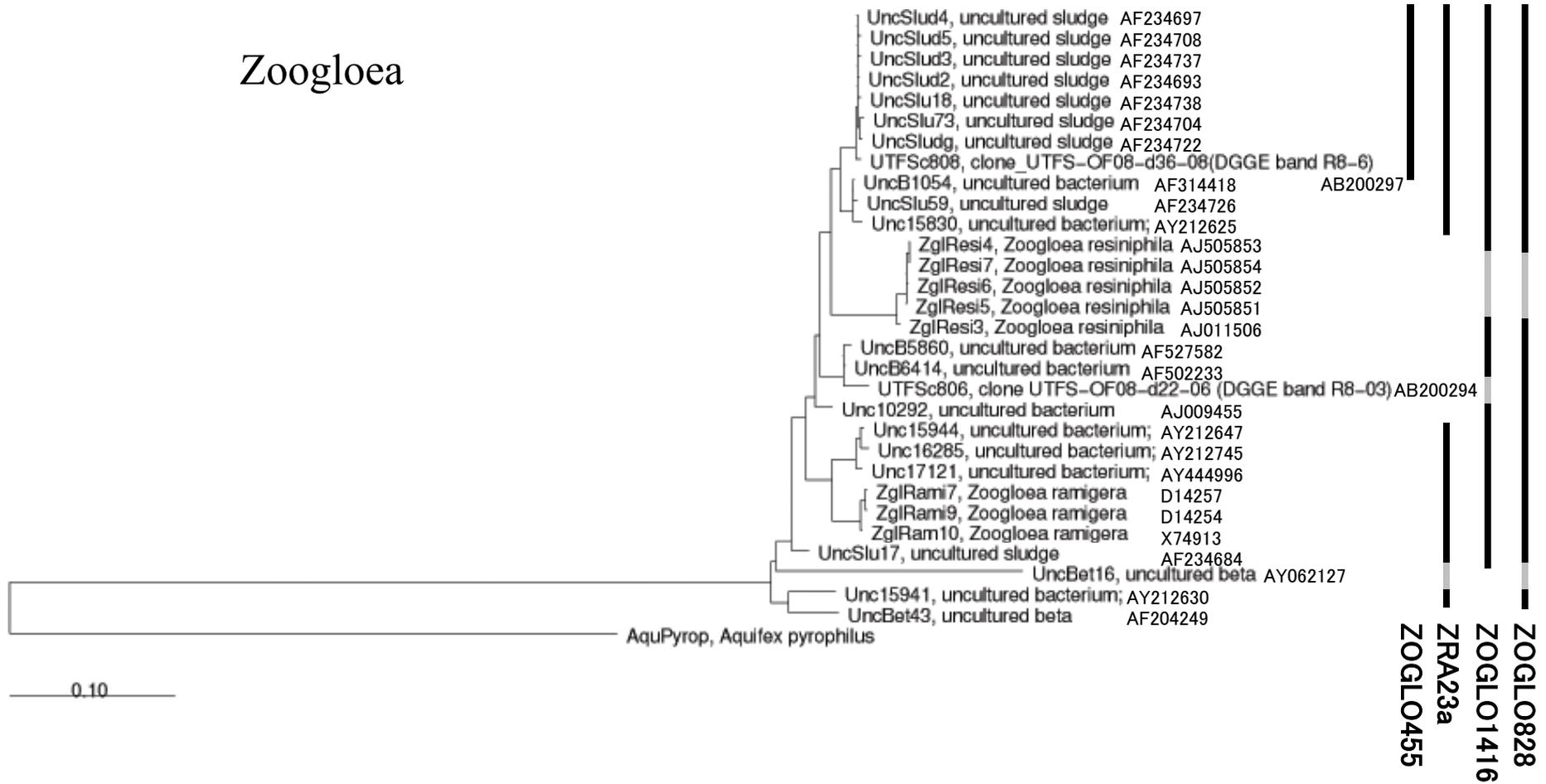


0.10

# Xanthomonas



# Zoogloea



## 5章 オリゴヌクレオチドプローブの設計

### 5. 1 プローブの設計

当該細菌を標的とする遺伝子 FISH プローブが既に存在する場合にはそれを用いた。また、存在しない場合には、ARB を用い、系統学的な情報を参考にしつつ、FISH プローブを作成した。まずは、既存のプローブが各系統樹上のどの細菌を検出するかを調べた。4 章の各系統樹に既存のプローブと今回作成したプローブ(赤文字)が把握する範囲を黒線で示している。なお線がグレーの部分は検出できない個所を示している。

以下に設計したプローブについて述べる。表 5.1 に設計したプローブの配列を示す。

#### *Alphaproteobacteria*

UTFS-OF08-d36-35 (DGGE band R8-5)を標的とするプローブ OFASPA82 を作成した。

#### *Acidovorax*

UTFS-OF08-d36-85 (DGGE band R8-2)を標的とするプローブ OFASPS465 を作成した。この際 Competitor も作成した。

#### *Comamonas*

既存のプローブ COM1424(Amann(1996))では、ターゲットとする細菌とすべて同じポジションで1塩基ミスマッチがあり把握できなかった。そこで、そのプローブを参考にして、ミスマッチのポジションを変えることにより COM1424a を作成した。そこで、プローブの特異性を調べる為に RDP にこのプローブの配列の検索をかけたところ、*Comamonas* を検出することが分かった。なお、このプローブを用いる際には、COM1424 を Competitor とするとより確実に *Comamonas* の中で範囲を絞れることができる。

ターゲットは、UTFS-OF06-d151-26 (DGGE band R5-9)、UTFS-OF06-03 (DGGE band R6-4)、UTFS-R6-1 (DGGE band R6-4)、UTFS-O04-62-07 (DGGE band R4-5)、UTFS-OF05-33-21 (DGGE band R5-11)、UTFS-OF06-d151-02 (DGGE band R6-10)、UTFS-O04-12-18 (DGGE band R4-3) の7つである。

表 5.1 作成したプローブの配列

Probe name	Probe sequence(5'-3')	rRNA target site (E. coli numbering)	Target sequence(5'-3')
OFASPS82	TGCGCCACTCCCTATTGC	82-99	GCAATAGGGAGTGGCGCA
OFASPS465	GTCATGAACCCCCTGTAT	465-482	ATACAGGGGGTTCATGAC
competiter	GTCATGAACCCCCTTTAT		
COM1424a	ACCCACTTCTGGCGAGA	unknown	TCTGCCAGAAGTGGGT

## 5. 2 プローブのスクリーニング・Hybridization 条件の検討

アスパラギン酸リアクター (Run8) の定量を目的としたので、OFASPS82、OFASPS465、ZOGLO828 (Loy A. *et al.* (“ProbeBase”<http://131.130.66.201/probebase/>)) の最適化をおこなった。なお ZOGLO828 は設計されているが、ホルムアミド濃度の情報なかったため検討した。

実際は、ネガティブコントロール株もしくはポジティブコントロール株が必要だが、設計したプローブの範囲が非常に特異的でポジティブコントロール株を含まない配列であったり、純菌の入手が困難であった。そこで Hybridization 条件の検討の際には、標的種が DGGE バンド上で比較的最も濃く現れていた活性汚泥を使用し、標的細菌の属する細菌の形態を検討しながら標的細菌のみが発光ようになる適切な Hybridization 条件について検討した。

OFASPS82 の検討結果を表 5.2 に示す。Run8 (アスパラギン酸リアクター) の 29 日目の活性汚泥を用いた。ホルムアミド濃度が 5%、20% のとき、あらゆる細菌が蛍光はなっていた。30%、40% では蛍光を放つ細菌の数は減ったが、それでも蛍光を放つ細菌の形態にばらつきが見られた。50% になると顆粒状の粒が集まったような細菌のみが光るようになった。そこでホルムアミド濃度 50% を Stringency とした。

OFASPS465 の検討結果を表 5.3 に示す。Run8 (アスパラギン酸リアクター) の 43 日目の活性汚泥を用いた。ホルムアミド濃度が 5%、10% のとき、あらゆる細菌が蛍光はなっていた。40%、50% では自家蛍光しか見えなかった。20%、30% のとき、桿菌状の細菌が光るようになった。よって非標的細菌が Hybridize しにくいホルムアミド濃度の高い方の 30% を Stringency とした。

ZOGLO828 の検討結果を表 5.4 に示す。Run8 (アスパラギン酸リアクター) の 29 日目の活性汚泥を用いた。5% では標的細菌以外の形態の細菌がたくさん光っていた。20%、30% では顆粒状が集まった大きな塊がみられた。40% ではその大きな顆粒状の塊は非常に薄くなり判別がつきにくかった。50% では自家蛍光しか見えなかった。そこで 20%、30% のうちホルムアミド濃度の高い 30% を Stringency とした。

表 5.5 に 5 章で扱ったオリゴヌクレオチドプローブについてまとめた。

表 5.2 OFASPS82 の Hybridization 条件の検討結果

ホルムアミド濃度 (%)	5	20	30	40	50
	++	++	+	+	+-

表 5.3 OFASPS465 の Hybridization 条件の検討結果

ホルムアミド濃度 (%)	5	10	20	30	40	50
	++	++	+	+-	-	-

表 5.4 ZOGLO828 の Hybridization 条件の検討結果

ホルムアミド濃度 (%)	5	20	30	40	50
	+	+	+-	-	-

- ++ あらゆる細菌が光っている
- + ほぼ標的細菌が光っている
- +- 標的細菌が弱い光で光っている
- 自家蛍光のみ

表 5.5 5章で扱ったプローブリスト

Probe name	Probe sequence (5' -3' )	Specificity	Formamide%	Reference
OFASPS82	TGCGCCACTCCCTATTGC	R8-band5	50	This study
OFASPS465	GTCATGAACCCCTGTAT	R8-band2	30	This study
Competiter	GTCATGAACCCCTTTAT			
COM1424a	ACCCACTTCTGGCGAGA	R5-band9, R6-band4, R4-band5, R5-band11, R6-band10, R4-band3	ND*	This study
COM1424	ACCTACTTCTGGCGA GA	<i>Comamonas spp.</i>	25	Amann R. <i>et al.</i> (1996)
OFAGS634	AGCCTTCCAGTCACAAGCG	R8-band9, R9-band15	20	岡本ら (2004)
OFAGS996	CTCTTCAGGATTCCAGACA	R8-band9, R9-band15	20	岡本ら (2004)
OFASPS214	ACATCGGCCGCTCAATCA	R8-band10	30	岡本ら (2004)
OFASPS1024	GTTCAGATTCCTTTTCGGGC	R8-band10	35	岡本ら (2004)
PAO462	CCGTCATCTACWCAGGTATTAAC	<i>Candidatus "Accumulibacter phosphatis"</i>	35	Crocetti G.R. <i>et al.</i> (2000)
PAO651	CCCTCTGCCAAACTCCAG	Most members of the <i>Candidatus "Accumulibacter"</i> cluster	35	Crocetti G.R. <i>et al.</i> (2000)
PAO864	GTTAGCTACGGCACTAAAAGG	<i>Candidatus "Accumulibacter phosphatis"</i>	35	Crocetti G.R. <i>et al.</i> (2000)
Rc988	AGGATTCTGACATGTCAAGGG	<i>Rhodocyclus spp.</i> , <i>Candidatus "Accumulibacter phosphatis"</i> , and <i>related bacteria</i>	ND	Crocetti G.R. <i>et al.</i> (2000)
RHC439	GNATTTCTTCCCGCCGA	<i>Rhodocyclus spp.</i> , most member of the <i>Candidatus "Accumulibacter"</i> cluster, <i>Azospira lineage</i>	30	Hesselmann R. P. X. (1999)
CHL1851	AATCCACGAACCTCTGCCA	filamentous bacterium Eikelboom Type 1851	ND	Beer M. (2002)
CFX109	CACGTGTTCTCAGCCGT	<i>Chloroflexi</i> (green nonsulfur bacteria) subdivisions 1a and b	30	Björnsson L (2002)
TM7305	GTCCAGTCTGGCTGATC	subdivision 1 of candidate division <i>TM7</i>	30	Hugenholz P. (2000)
TM7905	CCGCAATTCTTTATGTTTT A	candidate division <i>TM7</i>	20	Hugenholz P. (2000)
ZOGL0455	AGAGTATTATCCTGCGCG	Some members of the <i>Zoogloea lineage</i> , not <i>Z. ramigera</i> and <i>Z. resiniphila</i>	ND	Loy A. (2004)
ZRA23a	CTGCCACTCTAGTTAT	Most members of the <i>Zoogloea lineage</i> , not <i>Z. resiniphila</i>	35	Roselló-Mora R. A. (1995)
ZOGL01416	TCTGGTAAACCCACTCC	<i>Zoogloea spp.</i>	ND	Loy A. (2004)
ZOGL0828	TCTCTCACCGA ACA ACT	<i>Zoogloea spp.</i>	30**	Loy A. (2004)

\*ND, not determined

\*\*determined in this study

## 6章 顕微鏡観察による形態と空間分布

本章では、5章で設計したプローブと既存のプローブの標的細菌とポリリン酸蓄積細菌として知られている *Candidatus "Accumulibacter"* との汚泥内の空間分布について検討した。

### 6. 1 顕微鏡観察

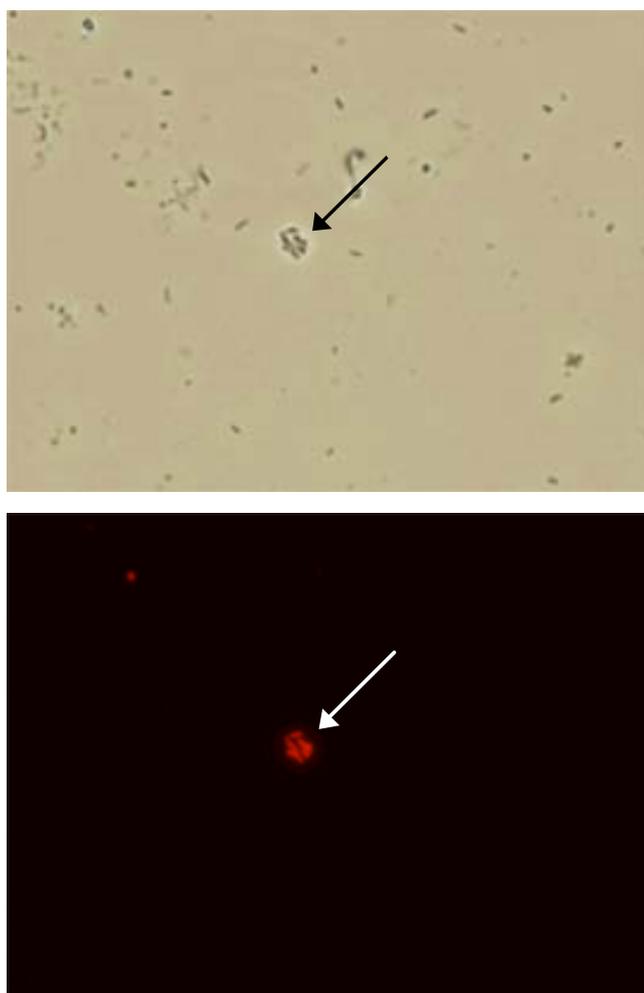
顕微鏡を使用して細菌の定量を行うには、まずはその標的細菌の形態を知っておく必要がある。そこで本節では、5章で設計したプローブと既存のプローブを用いて FISH 法による顕微鏡観察を行った。標的細菌の形態を観察したプローブを表 6.1 にまとめた。(各プローブの詳細は表 5.5 を参照)なお顕微鏡の対物レンズの倍率は画像 6.4 の倍率×40 以外は、すべて倍率×100 倍である。

表 6.1 標的細菌の形態について観察したプローブ

Probe Name	Target
OFASPS465      Run8 DGGE band2	<i>Comamonas</i>
ZOGL0828      Run8 DGGE band3,6	<i>Zoogloea</i>
OFASPA82      Run8 DGGE band5	<i>Alphaproteobacteria</i>
TM7905          Run9 DGGE band1,2,3,4	<i>TM7</i>
PAOmix          Run8 DGGE band4	<i>Candidatus "Accumulibacter"</i>
RHC439          Run8 DGGE band4, 8	<i>Rhodocyclus</i>

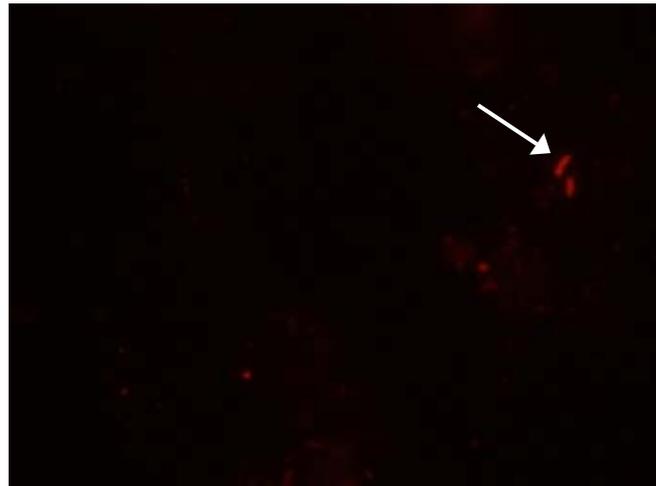
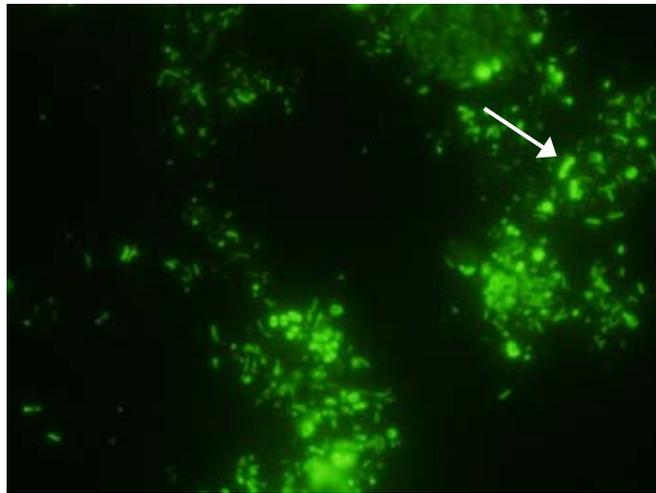
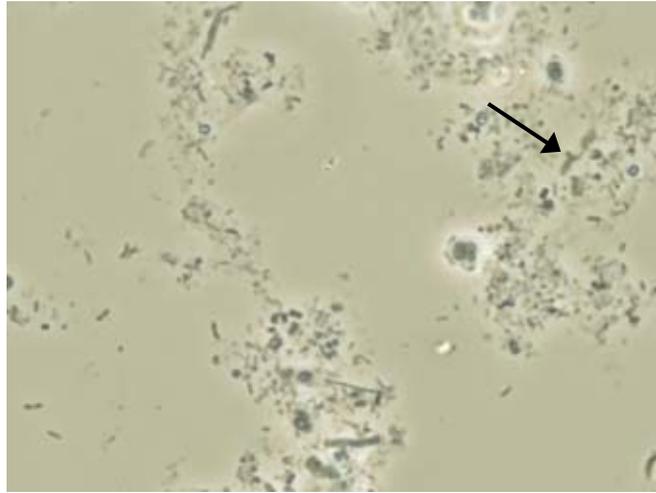
### OFASPS465 (Run8 DGGE band2: *Comamonas*)

OFASPS465 は、アスパラギン酸リアクター(Run8)の DGGE band2 (*Comamonas* に属する)を検出するプローブである。OFASPS465 プローブを用いた FISH 法による顕微鏡写真を画像 6.1、6.2 に示す。画像 6.1、6.2 から、桿菌であることが観察された。また写真では示さないが、汚泥のフロックの中でも個々に点在していることが確認でき、この細菌同士は密集した塊を形成しないことがわかった。



画像 6.1 OFASPS465 (Cy3 (赤)) プローブを用いた FISH 法による標的細菌  
(上：明視野、下：標的細菌)

矢印はプローブ OFASPS465 の標的細菌を示す。

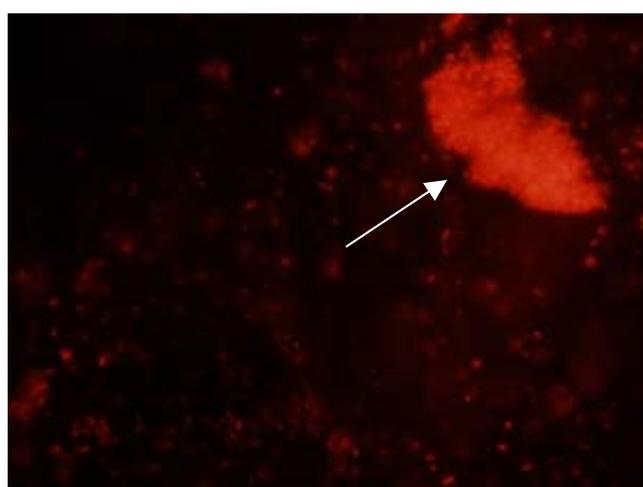
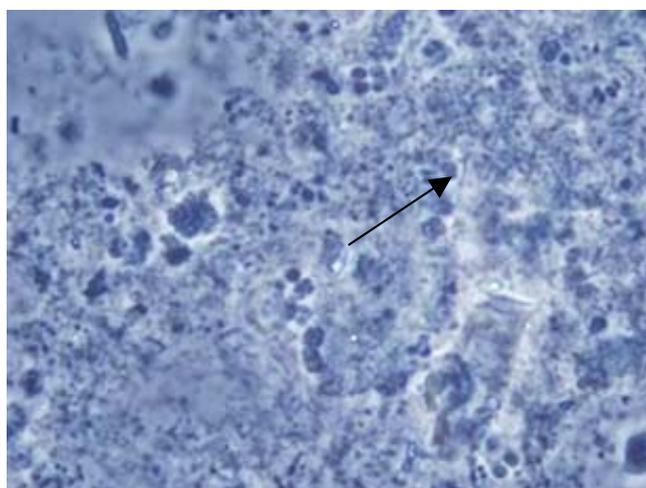


画像 6.2 OFASPS465 (Cy3 (赤)) プローブを用いた FISH 法による標的細菌  
(上 : 明視野、中 : 全細菌、下 : 標的細菌)

### ZOGL0828 (Run8 DGGE band3,6: *Zoogloea*)

ZOGL0828は、アスパラギン酸リアクター(Run8)の DGGE band3, 6 (*Zoogloea*に属する)を検出するプローブである。ZOGL0828プローブを用いた FISH 法による顕微鏡写真を画像 6.3 に示す。*Zoogloea* の典型的な形態は、枝分かれしたゼラチン状の塊の中で蓄積する、いわゆる「*Zoogloea* fingers」といわれるものである。*Zoogloea* は成長する過程で塊を形成することが観察されていた。しかし、今日ではこの塊の形態は多くの微生物で観察されるように当てにならない形態判断基準であると認識されている(Rosselló-Mora R. A *et al.*(1995))。

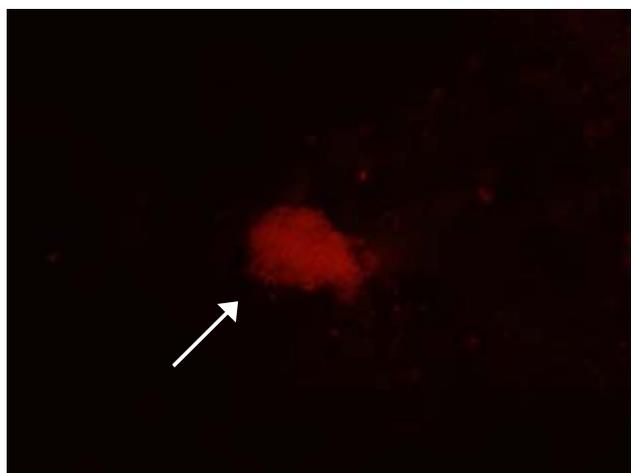
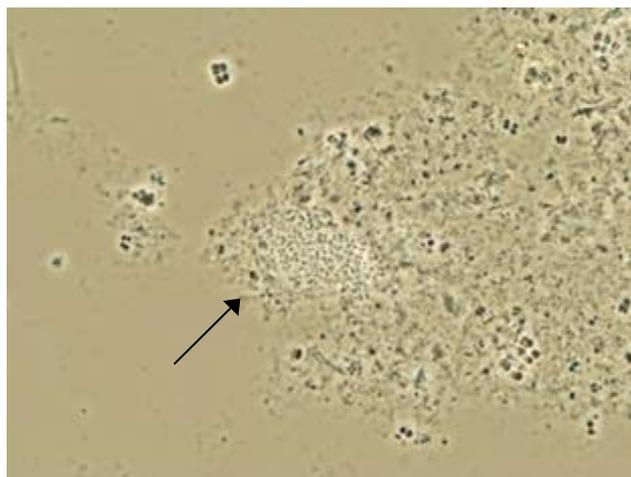
上記の典型的な *Zoogloea* の形態を画像 6.3 で観察することができた。顆粒状のものが囊に入っているかのような塊になって存在しているのが観察できた。



画像 6.3 ZOGL0828 (Cy3 (赤)) プローブを用いた FISH 法による標的細菌  
(上：明視野、下：標的細菌)

### OFASPA82 (Run8 DGGE band5: *Alphaproteobacteria*)

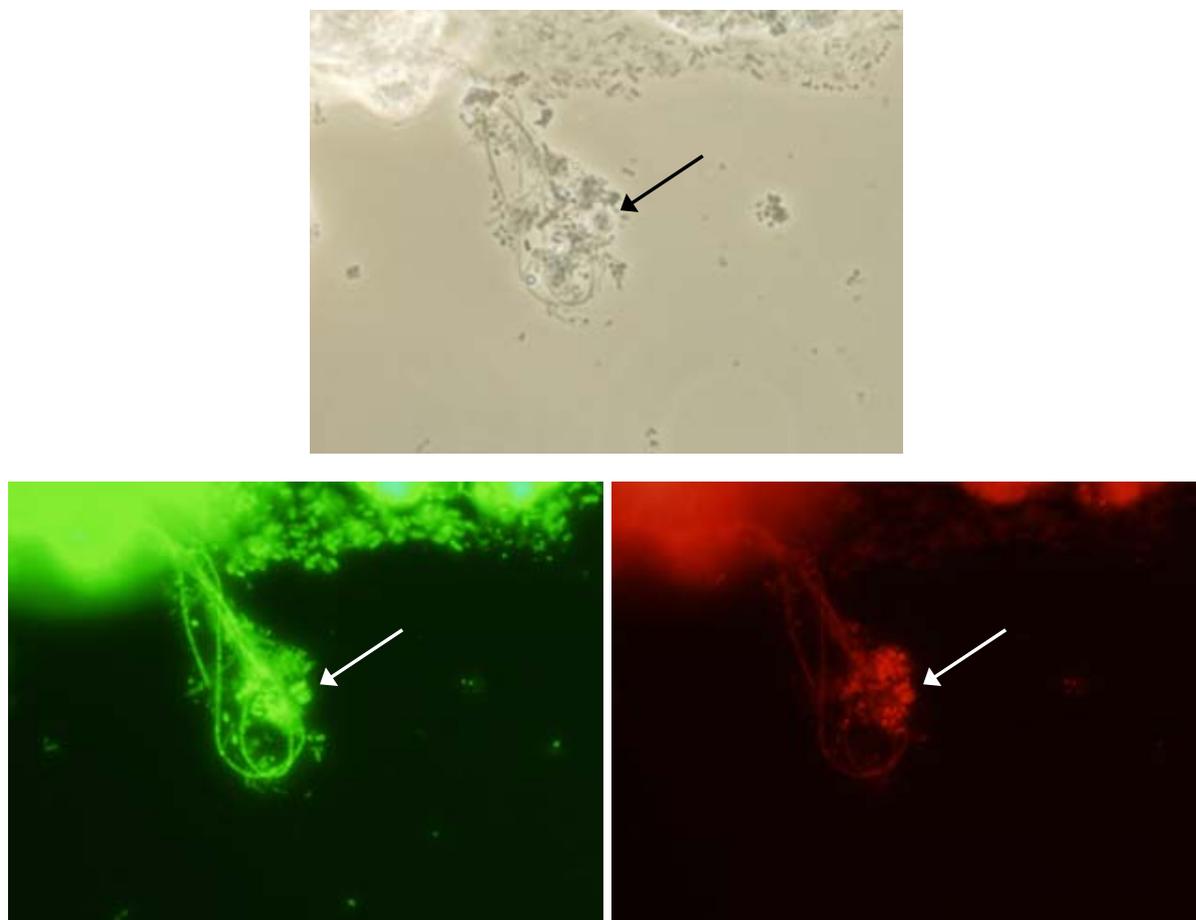
OFASPS82 は、アスパラギン酸リアクター(Run8)の DGGE band5 (*Alphaproteobacteria* に属する)を検出するプローブである。OFASPS82 プローブを用いた FISH 法による顕微鏡写真を画像 6.4 に示す。汚泥のフロック内で 1 箇所密集して存在していた。囊の中のようなものは見られなかった。



画像 6.4 OFASPS82 (Cy3 (赤)) プローブを用いた FISH 法による標的細菌  
(上：明視野、下：標的細菌) (倍率×40)

### TM7905 (Run9 DGGE band1,2,3,4: *TM7*)

TM7905 は、グルコースリアクター(Run9)の DGGE band1,2,3,4 (*TM7*に属する)を検出するプローブである。TM7905 プローブを用いた FISH 法による顕微鏡写真を画像 6.5 に示す。4 章の *TM7*の系統樹で示されるように、TM7905 プローブは TM7305 プローブよりも *TM7*の広い領域を標的とし、粒状とフィラメント状の形態の細菌をとらえることが知られている (Hugenholtz(2001))。画像 6.5 から細菌の形態が粒状であることが確認できた。また、画像には示さないが、フィラメント状の標的細菌も確認することができた。福島(2003)によっても、グルタミン酸リアクター (Run6)、グルコースリアクター (Run9)にてフィラメント状の *TM7*の存在が確認されている。



画像 6.5 TM7905 プローブを用いた FISH 法による標的細菌  
(上：明視野、下左：全細菌、下右：標的細菌)  
矢印はプローブ TM7905 の標的細菌を示す。

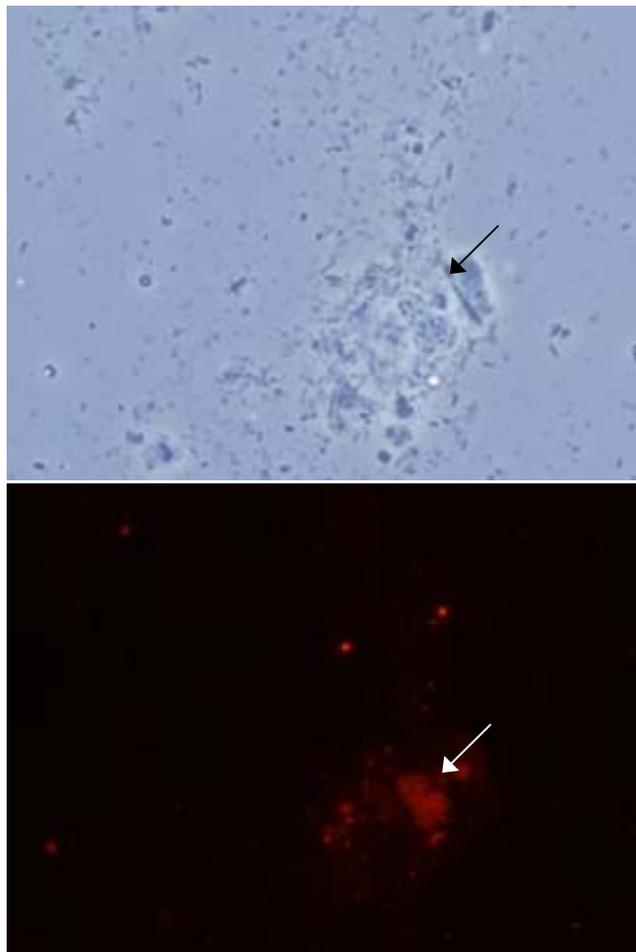
**PAOmix (Run8 DGGE band4: *Candidatus "Accumulibacter"*)**

**RHC439 (Run8 DGGE band4, 8: *Rhodocyclus*)**

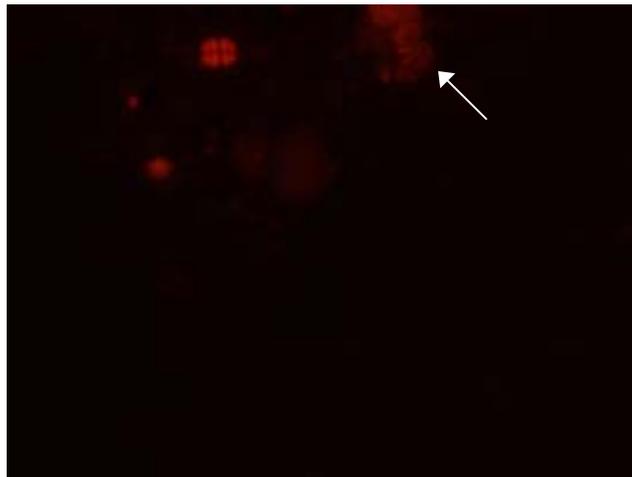
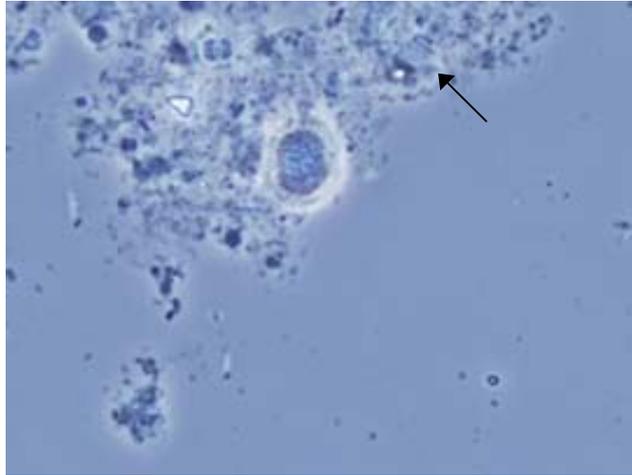
PAOmix は、アスパラギン酸リアクター (Run8) の DGGE band4 (*Candidatus "Accumulibacter"* に属する) を検出するプローブである。PAOmix プローブを用いた FISH 法による顕微鏡写真を画像 6.6 に示す。

RHC439 は、アスパラギン酸リアクター (Run8) の DGGE band4,8 (*Rhodocyclus* に属する) を検出するプローブである。RHC439 プローブを用いた FISH 法による顕微鏡写真を画像 6.7 に示す。

*Dechloromonas* & *Rhodocyclus* の系統樹より、PAOmix プローブと RHC439 プローブの標的細菌は系統学的に近くに位置し、一部共通している。どちらの形態も粒が汚泥ブロックの中で密集しているのが観察された。形態が非常に似通っているため、顕微鏡で判断することはできなかった。



画像 6.6 PAOmix プローブを用いた FISH 法による標的細菌  
(上：明視野、下：標的細菌) 矢印は PAOmix プローブの標的細菌を示す。



画像 6.7 RHC349 プローブを用いた FISH 法による標的細菌  
(上：明視野、下：標的細菌)  
矢印は RHC349 プローブの標的細菌を示す。

## 6. 2 PAOmix プローブとの 2 重染色による空間分布解析

本節では、リン除去を担っている細菌と、主要細菌が同じ活性汚泥中でどのような空間を形成しているかを知ることによって、リン除去活性とどのような関係があるか検討することを目的とした。そこで、本研究で用いたプローブの標的細菌と、ポリリン酸蓄積細菌との空間分布について検討をおこなった。リン除去を担う細菌を標的とするプローブには、形態が良く知られている *Candidatus “Accumulibacter”* を標的細菌とする PAOmix プローブを使用した。そして、PAOmix プローブと本研究で用いたプローブとの FISH 法による 2 重染色によって顕微鏡観察を行った。

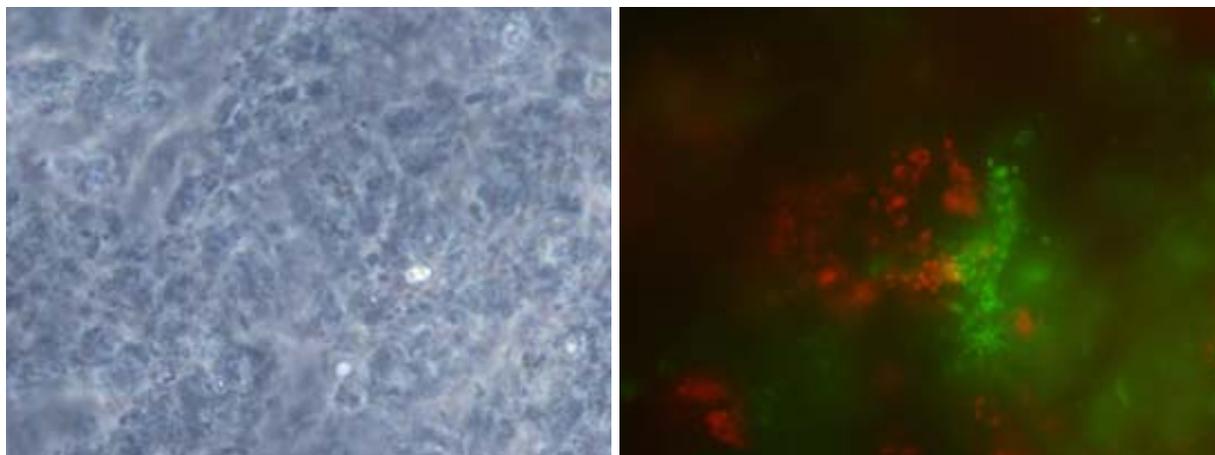
### 6. 2. 1 ZOGLO828 プローブとの 2 重染色

アスパラギン酸リアクター (Run8) DGGE band3, 6 の *Zoogloea* は DGGE 画像上でリン除去活性良好期から衰退期にかけて現れたバンドである。この band3, 6 を標的とする ZOGLO828 プローブ (標識: Cy3(赤)) と PAOmix プローブ (標識: FITC(緑)) との 2 重染色を行った。その結果を画像 6.8、6.9 に示す。PAOmix プローブの標的細菌である、*Candidatus “Accumulibacter”* は緑色で、ZOGLO828 プローブの標的細菌は赤色で示す。活性汚泥はアスパラギン酸リアクター (Run8) の 29 日目 (リン除去活性良好期) を使用した。なお活性汚泥は、超音波分散は行わずボルトティックスによる分散のみである。

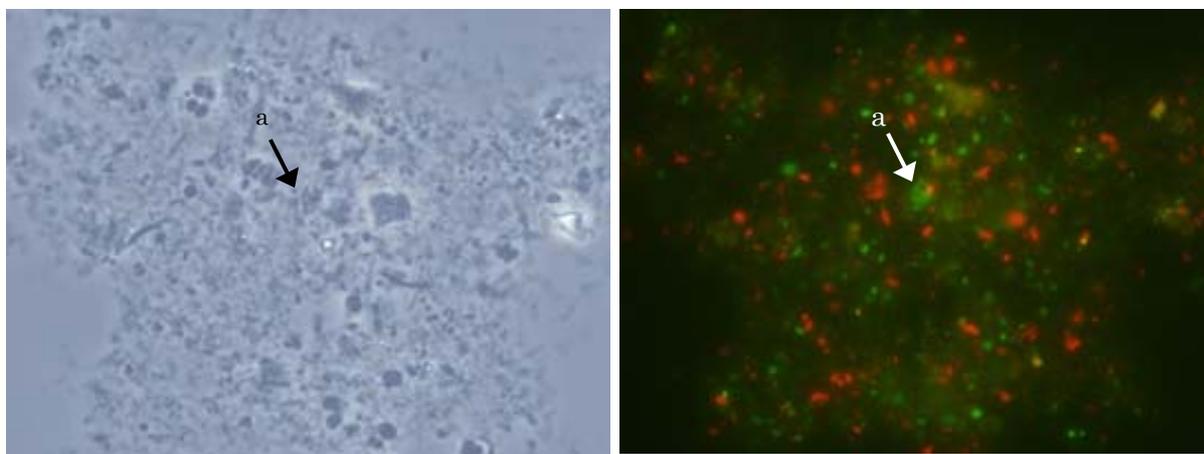
画像 6.8 から、汚泥のフロック中で粒が密集した塊を形成している *Candidatus “Accumulibacter”* と、6 章で述べた *Zoogloea* の典型的な形としての *Zoogloea fingers* を観察することができた。

また画像 6.9 からは、*Candidatus “Accumulibacter”* (矢印 a) と、*Zoogloea* が点在しているのを観察することができた。

画像 6.8、6.9 から、同じフロックの中で存在する場合であっても、双方の細菌群が必ずしも隣り合っているわけでもないことから、これらが成す空間形成には規則性が無いことが分かった。



画像 6.8 PAOmix プローブと ZOGLO828 プローブの 2 重染色  
(左：明視野、右：緑 PAOmix プローブ 赤 ZOGLO828 プローブ)

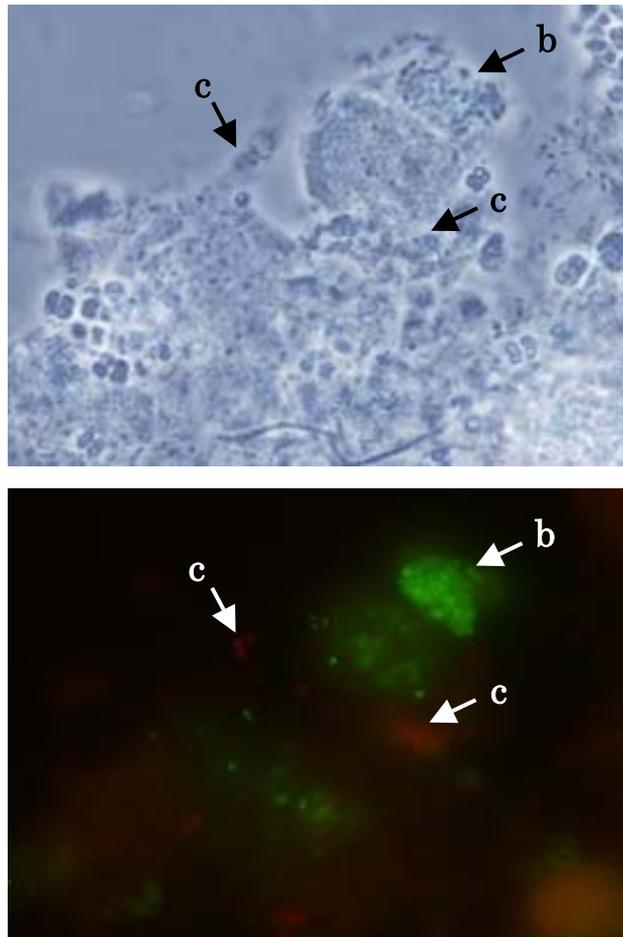


画像 6.9 PAOmix プローブと ZOGLO828 プローブの 2 重染色  
(左：明視野、右：緑 PAOmix プローブ 赤 ZOGLO828 プローブ)  
矢印 a は PAOmix プローブの標的細菌を示す。

## 6. 2. 2 OFASPS465 プローブとの 2 重染色

アスパラギン酸リアクター (Run8) DGGE band 2 の *Comamonas* はリン除去活性悪化時に顕著に現れたバンドである。この band2 を標的とする OFASPS465 (標識: Cy3(赤)) と PAOmix プローブ (標識: FITC(緑)) との 2 重染色の結果を画像 6.10 に示す。活性汚泥はアスパラギン酸リアクター (Run8) の 43 日目 (リン除去活性衰退期) を使用した。なお活性汚泥は、超音波分散は行わずボルティックスによる分散のみである。PAOmix プローブの標的細菌である、*Candidatus "Accumulibacter"* は緑色で、OFASPS465 プローブの標的細菌は赤色で示す。

OFASPS465 プローブの標的細菌は、6.1 節より稗菌であることが分かっている。画像 7.3 より、汚泥のフロック中で粒が密集した塊を形成している *Candidatus "Accumulibacter"* (矢印 b) と稗菌である OFASPS465 プローブの標的細菌 (矢印 c) を確認することができた。OFASPS465 プローブの標的細菌はフロック内で個々に点在しており、*Candidatus "Accumulibacter"* とは空間的に関係がないことがわかった。



画像 6.10 PAOmix プローブと OFASPS465 プローブの 2 重染色 (左:明視野、右:緑 PAOmix プローブ 赤 OFASPS465 プローブ)  
矢印 b: *Candidatus "Accumulibacter"*、c: *Comamonas* を示す

## 7章 FISH 法による細菌群集構成の定量

### —DGGE 法による細菌群集解析との比較—

本章では、系内の主要な細菌をすべて特定・把握するために、作成したプローブと既存のプローブを用いて、各バンドに対応する細菌の定量評価をおこなった。

#### 7. 1 アスパラギン酸リアクター (Run 8) の定量

##### 7. 1. 1 実験方法

本節ではアスパラギン酸リアクター (Run8) の定量方法について述べる。作成した FISH プローブと既存のプローブをアスパラギン酸リアクターの活性汚泥試料に適用した。そして、全細菌に対して標的細菌が占める割合について調べた。定量には、8 日目 (馴致期)、29 日目 (リン除去活性良好期)、43 日目 (リン除去活性衰退期) の汚泥を使用した。全細菌を検出するプローブである EUBmix の蛍光色素を FITC (緑色) で標識し、標的細菌のプローブは蛍光色素を Cy3 (赤色) で標識した。5章で示したプローブのうち Run8 の DGGE バンドを検出するプローブを表 7.1 に示す。これらのプローブの詳細は表 3.3、表 5.5 に示す。

表 7.1 Run8 の定量で使用したプローブのリスト

Probe name	Target
EUBmix	全真正細菌
OFASPS465	DGGE band2 : <i>Comamonas</i>
ZOGL0828	DGGE band3, 6 : <i>Zoogloea</i>
PAOmix	DGGE band4 : <i>Candidatus "Accumulibacter"</i>
RHC439	DGGE band4, 8 : <i>Rhodocyclus</i>
OFASPS82	DGGE band5 : <i>Alphaproteobacteria</i>
OFAGS996	DGGE band9 : <i>Dechloromonas</i>
OFASPS214	DGGE band10 : <i>Dechloromonas</i>

## Run8 DGGE band4, 8の定量方法

Run8 DGGE band4 は *Candidatus "Accumulibacter"* に属し、Run8 DGGE band8 は *Rhodocyclus* 近縁種に属する。RHC439 プローブはバンド 4, 8 を検出するため、RHC439 で検出した細菌の内、DGGE band4, 8 がそれぞれどの程度の割合であるかを知ることを目的とした。*Rhodocyclus* の系統樹から、PAOmixon プローブ(PAO462, 651, 846)とRHC439 プローブの標的細菌は一部が共通している。各標的細菌とプローブの関係を図 7.1 に示す。RHC439 プローブによって検出された細菌の内、Run8 DGGE band4, 8 はそれぞれどの程度しめるかを以下の方法で求めた。なお、これはアスパラギン酸リアクター (Run8) の汚泥を用いているのでDGGE band4、DGGE band8を多く含んでいる細菌群集であることを想定した方法である。

(1) RHC439 の定量には、RHC439 プローブの蛍光色素を Cy3 (赤色) とし、PAOmixon プローブの蛍光色素を FITC (緑色) として定量した。これにより PAOmixon プローブの標的細菌に対する RHC439 の割合を得た。

$$\text{RHC439(Cy3)} / \text{PAOmixon(FITC)} \cdots \textcircled{1}$$

(2) アスパラギン酸リアクターにおける全細菌 EUBmix プローブ (FITC) に対する PAOmixon プローブ (Cy3) の 8, 22, 43 日目の定量は福島(2002)が既に行っている。そこで本実験で必要な 29 日目の全菌に対する PAOmixon の値を求め、DGGE band4 の値を求めることができる。

$$\text{PAOmixon(Cy3)} / \text{EUBmix(FITC)} \cdots \textcircled{2}$$

(3) そして①の割合に②の割合をかけることによって全細菌に対する RHC439 の割合を求めた。

$$\text{RHC439(Cy3)} / \text{EUBmix(FITC)} \cdots \textcircled{3}$$

(4) ③-②より、DGGE band8 の細菌を含む割合を求める。

画像 7.1 に PAOmixon (FITC(緑)) と RHC439 (Cy3(赤)) の両方で検出することができた細菌を示す。活性汚泥はアスパラギン酸リアクター (Run8 の 29 日目) を用いているので、DGGE band R8-4 を検出している可能性が高い。

一方、画像 7.2 に PAOmixon (FITC(緑)) で検出することができず、RHC439 (Cy3(赤)) で検出することができた細菌を示す。上記と同様に、Run8 リアクターの活性汚泥を用いているので DGGE band R8-8 を検出している可能性が高い。

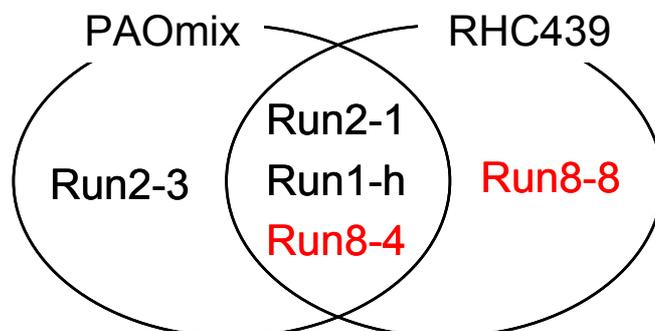
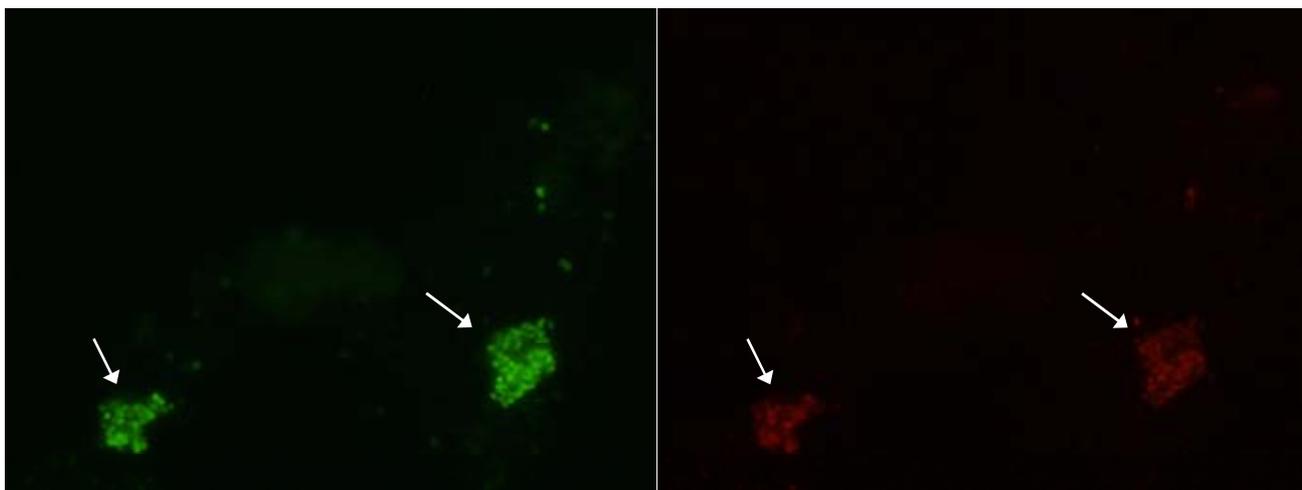
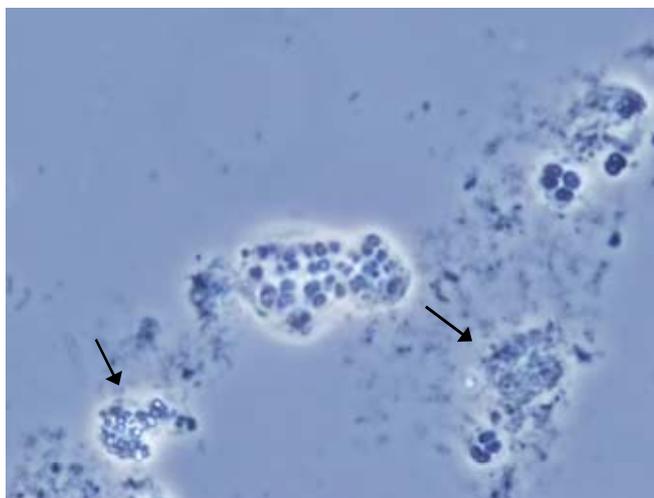
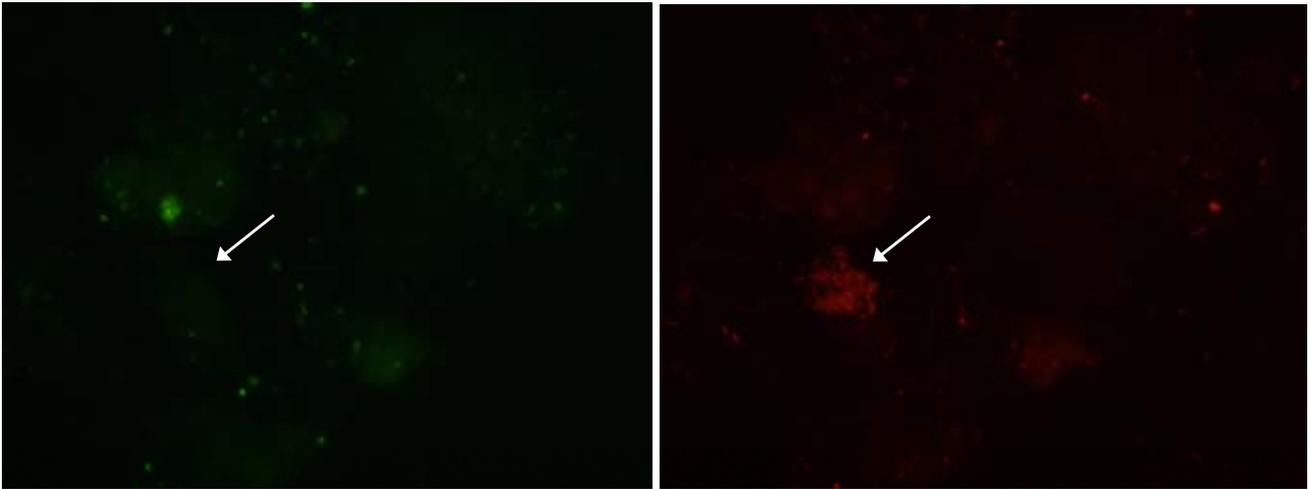
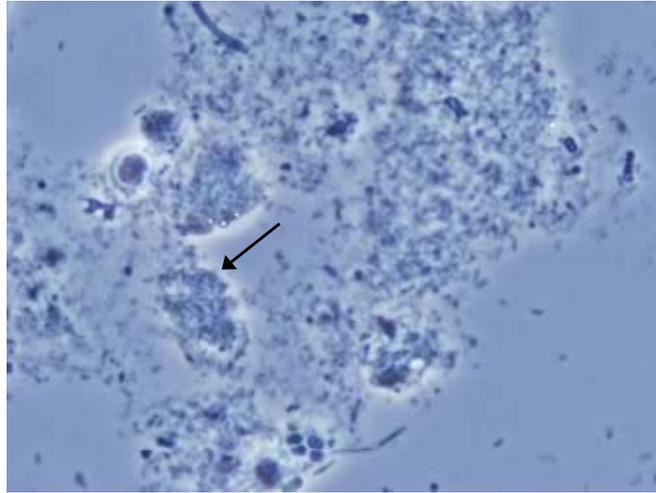


図 7.1 PAOmixon プローブと RHC439 プローブが捕らえる標的細菌



画像 7.1 アスパラギン酸リアクター (Run8) 29 日目汚泥の FISH 画像  
(上 : 明視野、左下 : PAOmix プローブ、右下 : RHC439 プローブ)  
PAOmix プローブ、RHC439 プローブの両方で検出できた標的細菌



画像 7.2 アスパラギン酸リアクター (Run8) 29 日目汚泥の FISH 画像  
(上 : 明視野、左下 : PAOmix プロブ、右下 : RHC439 プロブ)  
RHC439 プロブで検出できた標的細菌

## 7. 1. 2 アスパラギン酸リアクター (Run8) の定量結果

8 日目、29 日目、43 日目の汚泥試料について各バンドを標的とするプローブを適応し、FISH 法による全細菌に対する標的細菌の定量をおこなった。その結果を図 7.2, 表 7.2 に示す。

主要な細菌群は RHC439 で捕らえた最大時(29 日目)で全菌の 25%を占めた *Rhodocyclus* 近縁種であった (band4, 8)。そのうち *Rhodocyclus* 近縁種に含まれる PAOmix プローブの標的細菌 *Candidatus "Accumulibacter"*(band4)は全細菌の 10~15%程度と大きな割合を占めた。DGGE バンド上には *Candidatus "Accumulibacter"*に属する band4 は顕著に現れていないが、FISH 法による定量で最も高い割合を占め、*Candidatus "Accumulibacter"*が主要な細菌群の一つであることが確認された。酢酸を主要基質としたリアクターで Hesselmann *et al.* (1999)や Crocetti *et al.* (2000)は *Rhodocyclus* 近縁種に属する *Candidatus "Accumulibacter"*が主要な役割を果たしていると報告しており、*Candidatus "Accumulibacter"*がアスパラギン酸を主体とするプロセスの中でも主要な役割を果たしている可能性があるといえる。

対応するバンドについて、DGGE 画像より(画像 4.2)バンド強度の変化は FISH の割合の変化と同じような傾向を示した。一方、DGGE バンドから設計したプローブで把握できた細菌は全菌に対して 40%程度であった。このため DGGE バンドを切り出して系統解析をするという方法では、検出できなかった細菌が無視できないことが示唆された。

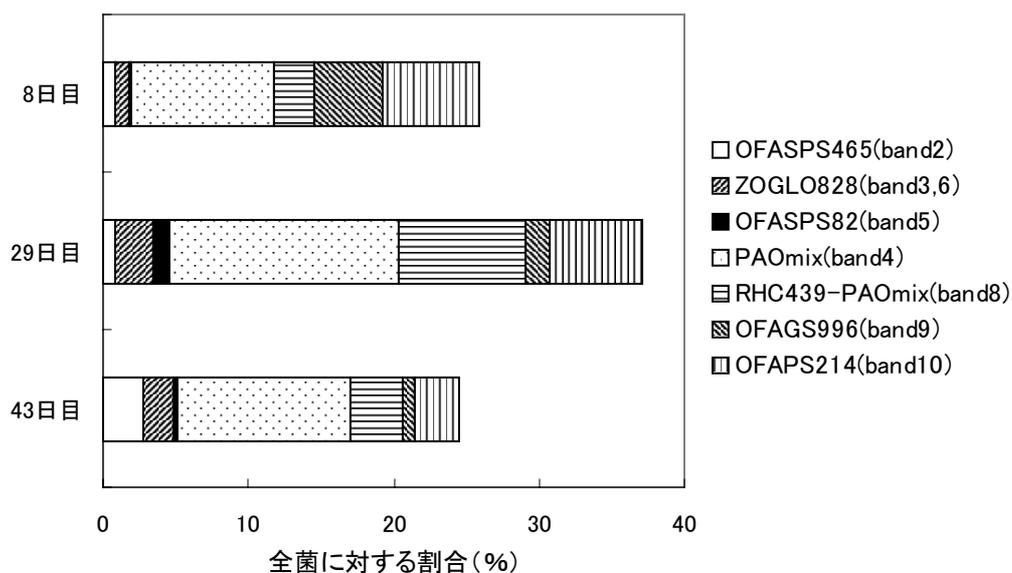


図 7.2 アスパラギン酸リアクター (Run8) における細菌群集構造

表 7.2 全細菌に対する各プローブの標的細菌の割合 (%)

Probe name	OFASPS465	ZOGLO828	OFASPS82	PAOmixon	RHC439	OFAGS996	OFAPS214	RHC439- PAOmixon*
Target band	band2	band3,6	band5	band4	Band4,8	band9	band10	band8
8日目	0.85	0.95	0.13	9.85	12.56	4.76	6.60	2.71
29日目	0.77	2.64	1.13	15.79	24.56	1.59	6.42	8.77
43日目	2.78	2.11	0.17	12.01	15.63	0.80	3.08	3.62

\* RHC439-PAOmixonの詳細は7.1.1に示す。

## 7. 2各構成細菌の挙動

本研究では DGGE バンドから設計したプローブで系内の主要細菌群をとらえることを目的としてきた。そこで、本節では DGGE 法によって得られる系内の構成細菌の視覚的挙動すなわちバンド強度の変化と FISH 法によって得られる実際の挙動との関係について検討した。なお DGGE バンド強度の解析には DGGE 画像解析ソフト(Image QUANT)を利用した。

### 7. 2. 1 アスパラギン酸リアクター (Run8)

図 7.3 に FISH 法により得られた全細菌に対する標的細菌の割合と、合計バンド強度に対する各バンド (band2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10) 強度の割合を示す。合計のバンド強度の割合は FISH 法による定量の合計よりも高い割合を占めた。各バンド強度の挙動について、FISH 法と同じ挙動を示すバンドは band2, 3, 6, 5, 8, 9, 10 であった。同じ挙動を示さなかったバンドは band4 であった。さらに band4 は FISH の定量において高い割合を占めていたが、バンド強度はそれよりも低い割合であった。DGGE 法によって細菌群集の挙動をある程度把握できることが示唆されたが、一方で PCR バイアスによって挙動が追えないケースも確認されたため、正確に挙動を把握するためには FISH 法による定量が欠かせないことがわかった。

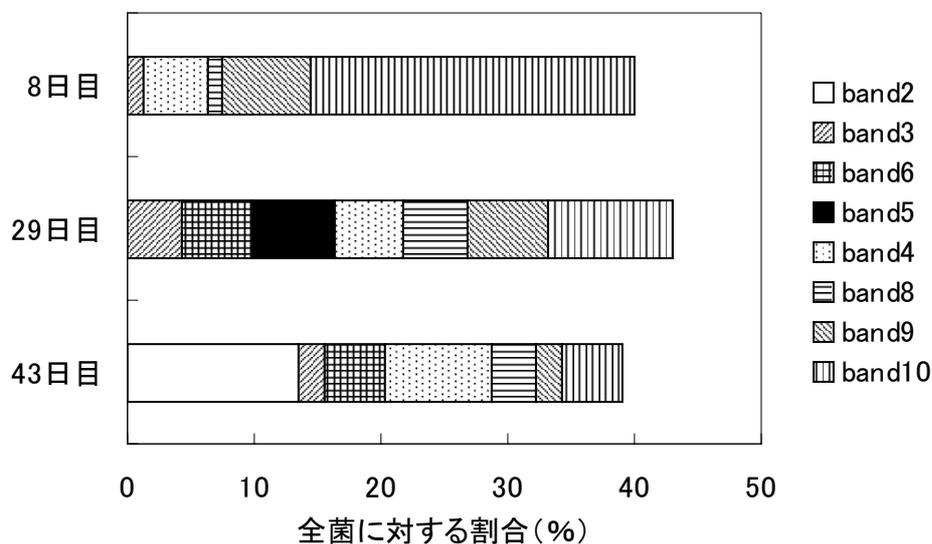


図 7.3 Run8 における全バンド強度に対する標的バンドの割合

## 7. 2. 2 グルコースリアクター (Run 9) における *TM7*

### *TM7*の定量

DGGE 法と FISH 法で得うる各細菌の挙動変化を比較、検討するため、主要基質の異なるグルコースリアクター (Run9) における *TM7* の定量を行った。*TM7* に属する DGGE band1, 2, 3, 4 を標的細菌とする *TM7905* プローブをグルコースリアクターの活性汚泥試料に適用した。リン除去活性の変化にともない、全細菌に対して標的細菌が占める割合とその割合の変化を調べた。定量には、8 日目 (馴致期)、22 日目 (リン除去活性良好期)、43 日目 (リン除去活性衰退期) の汚泥を使用した。表 7.3 に Run9 の定量で使用するプローブを示す。

図 7.4 に FISH 法により得られた全細菌に対する標的細菌の割合と、合計バンド強度に対する標的としたバンド (band1,2,3,4) 強度の合計の割合を示す。

22 日目のリン除去活性が最も高いときに約 16% という非常に高い割合を占めた。グルタミン酸リアクター (Run6) でも *TM7* (DGGE band7, 8) がリン除去活性の復活期間に顕著に現れており、リン除去活性の変化と相関があることから、一見リン除去を担っているように考えられるが福島 (2002) によってポリリン酸を蓄積しないことが証明されている。したがって、リン除去に直接関わっていないが、リン除去活性が高くなる条件を作り出している細菌群の一つである可能性があるといえる。

岡本 (2003) によって 22 日目の汚泥を用いてグループレベルによる定量が行われている。それによると、グラム陽性高 GC 群が約 30%、*Alphaproteobacteria* が約 26%、*Betaproteobacteria* が約 22%、*Gammaproteobacteria* が約 4%、*Cytophaga* が約 4%、その他が 14% であったと報告されている。FISH 法による面積定量は汚泥の状態や観察者の違いなどによって若干の誤差が生じる可能性がある。このことを踏まえると、その他の大部分を占めるのは *TM7* であるということになる。

### DGGE 法における *TM7* の挙動

図 7.4 から FISH 法と DGGE 法で全細菌に対する *TM7* の割合を比較検討した。アスパラギン酸リアクターと同様に、DGGE 法は FISH 法に比べて高い割合を示した。また、DGGE バンドの挙動と FISH による定量の挙動は同じであった。

Run8 と *TM7* の結果より、DGGE 法によって細菌群集の挙動をある程度把握できることが示唆されたが、一方で PCR バイアスによって挙動が追えないケースも確認されたため、正確に挙動を把握するためには FISH 法による定量が欠かせないことがわかった。

表 7.3 グルコースリアクター (Run9) の定量で使したプローブのリスト

Probe name	Target
EUBmix	全真正細菌
TM7905	DGGE band1,2,3,4: <i>TM7</i>

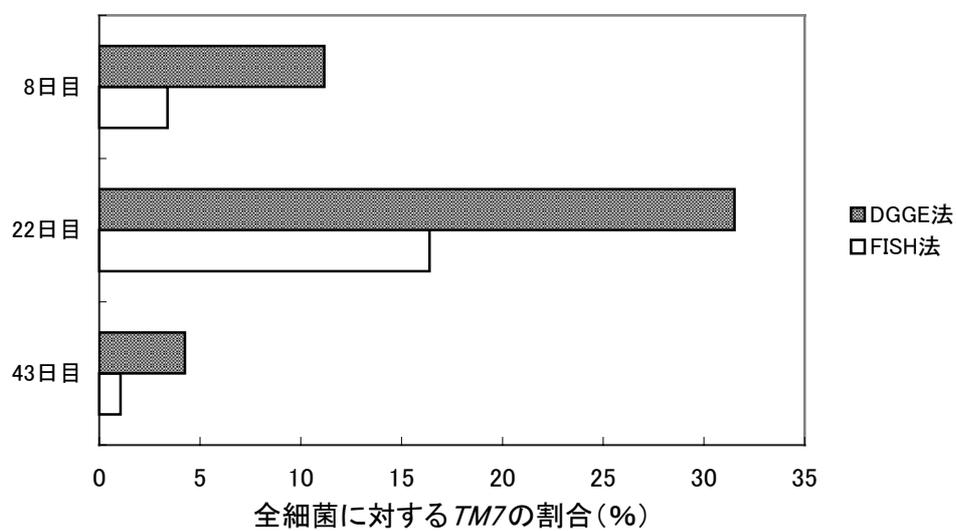


図 7.4 全細菌に対する *TM7* の割合

## 8章 総括

### 8. 1 本研究のまとめ

以下に本研究で得られた成果をあげていく。

- DGGE 法によって V3 領域塩基配列が既に解読されていた細菌の 16S rDNA 全長塩基配列の解読を試み、解読できたものに関しては系統樹を作成し系統解析を行うことができた。
- 解読した細菌を標的とするプローブを作成した。*Alphaproteobacteria* に属する UTFS-OF08-d36-35 (DGGE band R8-5) を標的とするプローブ OFASPA82、*Acidovorax* に属する UTFS-OF08-d36-85 (DGGE band R8-2) を標的とするプローブ OFASPS465、*Comamonas* の一部分をターゲットとする COM1424a を作成した。
- ポリリン酸蓄積細菌である *Candidatus "Accumulibacter"* と標的細菌との空間分布について検討をおこなった。その結果、*Zoogloea* に属する Run8 DGGE band3,6 を標的細菌とする ZOGLO828 プローブと *Comamonas* に属する Run8 DGGE band 2 を標的細菌とする OFASPS465 との 2 重染色の結果、*Candidatus "Accumulibacter"* とこれらの標的細菌が成す空間分布には規則性が無いことがわかった。
- アスパラギン酸リアクター (Run8) を対象とした、各 DGGE バンドを標的とするプローブを用いて定量を行った。その結果、DGGE バンド上には *Candidatus "Accumulibacter"* に属する band4 は顕著に現れなかったが、FISH 法による定量で最も高い割合を占め、*Candidatus "Accumulibacter"* が主要な細菌群の一つであることが確認された。
- DGGE バンドから設計したプローブで把握できたのは全細菌に対して 40% 程度であった。このため DGGE バンドを切り出して系統解析をするという方法では検出できなかった細菌が無視できないことが示唆され、DGGE 法から細菌群集を把握するには限界があることがわかった。
- DGGE 法によって得られる構成細菌の視覚的挙動と、FISH 法によって得られる構成細菌の挙動との関係について検討した。DGGE 法によって細菌群集の挙動をある程度把握できることが示唆されたが、一方で PCR バイアスによって挙動が追えないケースも確認されたため、正確に挙動を把握するためには FISH 法による定量が欠かせないことがわかった。

## 8. 2 今後の展望

生物学的リン除去活性汚泥プロセスにおけるリン除去を担うポリリン酸蓄積細菌(PAOs)について、分子生物学的手法により徐々に明らかになりつつある。しかし、同プロセス中の細菌群集構造についての知見はまだ限られている。そこで本研究ではプロセス内の全体像を把握するために、特定の実験室スケールリアクターに焦点を定め、主要な細菌群をとらえることを目指してきた。

定量の対象として、アスパラギン酸を主体基質とするリクター(Run8)とした。それにより、把握できた細菌は全菌に対して40%に満たないことがわかり、DGGE法からでは未だ把握できない主要細菌の存在を明らかにすることができた。

また顕微鏡観察から、同じプローブでも、*TM7*のように標的細菌が様々な形態をもつ場合があり、FISH法からの形態や汚泥内における空間分布からの情報だけでは限界があることがいえる。

その解決策として、分子生物学的手法を用いて、その細菌がどのような代謝をおこなっているのかを知る手法がある。例えば、MAR (Microautoradiography) 法と FISH 法との併用 FISH/MAR 法 (Lee *et al.*(1999)) によって細菌がどの基質を摂取しているのかを解明することができる。

また、PAOsやGAOsなどが単離されることによって、詳細な生育条件、遺伝子情報を得ることができ、より深くリン除去プロセスを把握することが可能となる。

このように今後は新たな解析手法を加えて細菌構造を解明していくことが、生物学的リン除去処理プロセス内における微生物群集構造の全体像を解明に繋がる。また、本研究ではラボスケールリアクターを対象としたが、本研究室で蓄積してきた知見と手法を実下水処理場へフィードバックする必要がある。

## 謝辞

本研究の執筆にあたり、様々な方々の御指導と御協力に支えられ本研究を進めることができました。これに感謝し、この場を借りてお礼を申し上げたいと思います。

指導教官の味埜俊教授(東京大学大学院新領域創成科学研究科環境学専攻)には研究会やグループミーティングや個人ミーティングを通じて大変お世話になりました。佐藤弘泰助教授(本学新領域創成科学研究科環境学専攻)にも研究会やグループミーティングや個人ミーティングで貴重なアドバイスを頂き感謝しています。

小貫元治助手(本学新領域創成科学研究科研究科環境学専攻)は、本研究の創始者であり、貴重な時間を割いて研究の細かいアドバイスをして下さったことに大変感謝しています。

片山浩之講師(本学工学系研究科)には修士1年時に研究会やグループミーティングなどで助言を頂けたこと、本修士論の副査を引き受けて下さったことに感謝致します。

9号館メンバーの新田見匡(現横浜国立大学助手)さん、博士過程の3年春日郁朗さん、には9号館で研究をするうえで様々なアドバイスを頂きました。道中敦子さんにはクローニング法を、博士過程1年の末岡一男さんにはシーケンサーの使いかたなどを教えていただき本研究に多いに役に立てることができました。大変感謝しています。

リングループのメンバーである Adeline Chua Seak May さん、Gulsum Emel Zengin さん、宇田直樹君とは研究に対する様々な意見交換や助言を頂くことができ大変嬉しく思います。また福島寿和さんからは本研究のリアクターを運転していた観点から様々な貴重な意見を頂けたことに大変感謝します。今後のリングループの研究の成果を期待しています。

岡本真由子さん(現西原環境テクノロジー)には修士1の時に実験方法を1から全てを教わり大変お世話になりました。忙しい時も親身になっておしえていただけただけに大変感謝しています。

同期の、荒生遵君、上條絵美子さん、木塚健太君、高崎由紀さんとは、公私共々お世話になりました。苦しいときもお互いに励まし合い、おかげで楽しい2年間を過ごすことができたことに感謝します。

そして、プレハブメンバー、その他の研究室のメンバー、都市工学専攻の諸先輩方、同期、後輩など様々な人に支えられてここまでやってこることができました。

最後に2年間私を支えてくださった親友そして両親、兄達に深く感謝致します。

2005年1月31日

## 参考文献

### 英文

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, 215 : 403-410

Amann, R.I., David, L.K., and Stahl, A. (1990) Fluorescent-Oligonucleotide Probing of Whole Cells for Determinative, Phylogenetic, and Environmental Studies in Microbiology. *J. bacteriol.* **171**(2), 762-770.

Amann, R.I., Ludwig, W. Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microb. Reviews.* **59**, 143-169.

Amann R., Ludwig W., Schulze R., Spring S., Moore E. and Schleifer K.-H. (1996). rRNA-targeted oligonucleotide probes for the identification of genuine and former pseudomonads. *Syst. Appl. Microbiol.* 19: 501 - 509.

Barnard, J.L. (1975) Biological Nutrient Removal without The Addition of Chemicals. *Wat. Res.* **9**, 485-490.

Beer M., Seviour E., Kong Y., Cunningham M., Blackall L. and Seviour R. (2002). Phylogeny of the filamentous bacterium Eikelboom Type 1851, and design and application of a 16S rRNA targeted oligonucleotide probe for its fluorescence in situ identification in activated sludge. *FEMS Microbiol. Lett.* 207: 179-183.

Björnsson L., Hugenholtz P., Tyson G. W. and Blackall L. L. (2002). Filamentous Chloroflexi (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. *Microbiology.* 148: 2309-2318

Crocetti G.R., Hugenholtz P., Bond P.L., Schuler A., Keller J., Jenkins D. and Blackall L.L. (2000). Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantification. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1175-1182

Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K.-H. and Wagner, M. (1999) The Domain-Specific Probe EUB338 is Insufficient for The Detection of All Bacteria:

Development and Evaluation of a More Comprehensive Probe Set. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**, 434-444.

Hesselmann R. P. X., Werlen C., Hahn D., van der Meer J. R. and Zehnder A. J. B. (1999). Enrichment, phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**: 454-465.

Hugenholz P., Tyson G. W., Webb R. I., Wagner A. I. and Blackall L. (2000). Investigation of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the domain bacteria with no known pure-culture representatives. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 411-419.

Lane, D.J.(1991) 16S/23S/ rRNA sequencing, p.115-147. *In* E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, Academic Press, Chichester, England.

Lee, N., Nielsen, P.H., Andreasen, K. H., Juretschko, S., Nielsen, J. L., Schleifer, K. H., Wagner M. (1999) Combination of Fluorescent In Situ Hybridization and Microautoradiography a New Tool for Structure-Function Analyses in Microbial Ecology, *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 1289-1297

Liu, W.-T., Nielsen, A.T. Wu, J.-H., Tsai, C.-S., Matsuo, Y., and Molin, S. (2001) *In situ* Identification of Polyphosphate- and Polyhydroxyalkanoate- Accumulating Traits for Microbial Populations in a Biological Phosphorus Removal Process. *Environ. Microbiol.* **3**(2), 110-122.

Loy A., Schulz C., Lücker S., Schöpfer-Wendels A., Stoecker K., Baranyi C., Lehner A. and Wagner M. (2004). 16S rRNA gene-based oligonucleotide microarray for environmental monitoring of the betaproteobacterial order "Rhodocyclales". *In press*.

Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A. W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lüßmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A., Schleifer, K.-H., (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* **32**(4):1363-1371.

Mino, T., Lui, W.-T., Krisu, F., and Matsuo, T. (1995) Modelling glycogen storage and denitrification capability of microorganisms in enhanced biological phosphate removal process, *Water Sci. Tech.*, **31**(2) : 25-34

Muyzer, G., Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 695-700.

R. C. Woese, (1987) Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews.* **51**(2), 221-271

Roselló-Mora R. A., Wagner M., Amann R. and Schleifer K.-H. (1995). The abundance of *Zoogloea ramigera* in sewage treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 702-707.

## 和文

岡本真由子(2003), 生物学的リン除去を担う微生物の探索及び同定, 東京大学大学院新領域創成科学研究科研究科環境学専攻修士論文

岡本真由子ら(2004), 環境工学研究論文集, 41. 301-309

小貫元治(2001), PCR-DGGE 法を中心とする微生物群集解析手法を用いた生物学的リン除去を担う微生物の探索, 東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻博士論文

木村光(1999)ゲノム微生物学, シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社

栗栖太(1997), 高温接触酸化排水処理における微生物群集構造の解析, 東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻博士論文.

福島寿和(2002), 生物学的リン除去プロセスにおける微生物群集解析 炭素源の種類による群集構造の差異に関する検討, 東京大学大学院新領域創成科学研究科研究科環境学専攻修士論文

中村和憲(1998), 環境と微生物ー環境浄化と微生物生存のメカニズムー, 産業図書株式会社

松尾友矩, 田中修三, 安田正志, 田中和博, 長岡祐(1999), 大学土木水環境工学, オーム社

### V3 領域塩基配列

#### R6(グルタミン酸リアクター) 151日目サンプル

clone\_UTFS-0F08-d151-01

CCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATCTCCACAATGGGGCAACCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGCAGGATGAAGGCTTCGGGTCGTAAACTGCTTTTATAA  
GTGAGGAATATGACGGTAACCTTATGAATAAGGATCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGCAT

clone\_UTFS-0F06-d151-02

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTGTAC  
GGAACGAAAAGACTCTGGTTAATACCTGGGGTCCATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F06-d151-03

CCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATCTCCACAATGGGGCAACCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGCAGGATGAAGGCTTCGGGTCGTAAACTGCTTTTATAA  
GTGAGGAATATGACGGTAACCTTATGAATAAGGATCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGCAT

clone\_UTFS-0F06-d151-04

CCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATCTCCACAATGGGGCAACCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGCAGGATGAAGGCTTCGGGTCGTAAACTGCTTTTATAA  
GTGAGGAATATGACGGTAACCTTATGAATAAGGATCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGCAT

clone\_UTFS-0F06-d151-06

CCTACGGGGGCAGCAGCAAGGAATTTTCGGCAATGGGCGAAGCCTGACCGAGCAACGCCGCGTGGAGGATGACGGCTCTGGGTTGTAAACTCCTTTGGGG  
GGGACGATAATGACGGTACCCTCCGAATCAGGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F06-d151-07

CCTACGGGGGCAGCAGCAAGGAATTTTCGGCAATGGGCGAAGCCTGACCGAGCAACGCCGCGTGGAGGATGACGGCTCTGGGTTGTAAACTCCTTTGGGG  
GGGACGATAATGACGGTACCCTCCGAATCAGGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F06-d151-08

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTG  
GGGAAGAAAACCTCGCGTTAATACCTGGCGGAATGACGGTACCGAAAGAATAAGCACCGGTAACCTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F06-d151-09

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTTTTCAGCC  
GGAAGAAAACCGCGCAGGATAATACTCTGCGTGGATGACGGTACCGAAGAAGAAGCACCGGTAACCTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F06-d151-11

CCTACGGGAGGCAGCAGTGAAGGAATTTTCCACAATGGGGCAACCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGCAGGATGAAGGCTTCGGGTCGTAAACTGCTTTTATAAG  
TGAGGAATATGACGGTAACCTTATGAATAAGGATCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGCAT

clone\_UTFS-0F06-d151-12

CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAATTTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACTCCCGTGCAGGATGAATGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTATCT  
GTGACGAAATATGACGGTAGCAGATGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGCAT

clone\_UTFS-0F06-d151-16

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTGTAC  
GGAACGAAAAGACTCTGGTTGATACCTGGGGTCCATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F06-d151-19

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCGCAATACCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTGCGGTTGTAAAGCACTTTTAGTA  
GGGAAGATAATGACGTTACCTACAGAAAAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F06-d151-21

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATCTTAGACAATGGGCGAAGCCTGATCTAGCCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTCGTGG  
GGGAAGATAATGACTGTACCCCAAGAAGAAGCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone-UTFS-0F06-d151-23

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTGTAC  
GGAACGAAAAGTCTCTCCTAATACGAAGGGTGTGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F06-d151-24

CCTACGGGGGAGCAGCAAGGAATTTTCGGCAATGGGCGAAGCCTGACCGAGCAACGCCGCGTGGAGGATGACGGCTCTGGGTTGTAAACTCCTTTGGGG  
GGGACGATAATGACGGTACCCTCCGAATCAGGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F06-d151-26

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATACCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTGCGGGTTGTAAAGCACTTTTAGTA  
GGGAAGATAATGACGTTACCTACAGAAAAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F06-d151-27

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTGTAC  
GGAACGAAAAGACTCTGGTTAATACCTGGGGTCCATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F06-d151-28

CCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATCTCCACAATGGGGGCAACCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTCGTAAACTGCTTTTATAA  
GTGAGGAATATGACGGTAACTTATGAATAAGGATCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTCAT

clone\_UTFS-0F06-d151-29

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGTCAATGGACGAAAGTCTGAACCAGCAGCCGCGTGGGCGAAGAAGGTTCTCGGATCGTAAAGCCCTTTCTGA  
GTGACGAGAAAGGACGGTAGCTCAGGAAAAAGTGTGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F06-d151-31

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTGTAC  
GGAACGAAAAGTCTCTCCTAATACGAAGGGTGTGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F06-d151-32

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGACCCAGCAATACCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTGCGGGTTGTAAAGCACTTTTAGTA  
GGGAAGATAATGACGTTACCTACAGAAAAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F06-d151-33

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTGTAC  
GGAACGAAAAGTCTCTCCTAATACGAAGGGTGTGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-OF06-d151-34

CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATATTGGGCAATGGATGCAAGTCTGACCCAGCCATGCCCGGTGGAGGAAGAAGTCTCTGGATTGTAAACTCCTTTTGTC  
GGGAAGAATAGTTCTCTTTCGCGAGGAAAGTGACGGTACCCGATGAATAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-OF06-d151-35

CCTACGGGGGAGGCAGCAGCAAGGAATTTTCGGCAATGGGCGAAGCCTGACCGAGCAACGCCCGGTGGAGGATGACGGCTCTTGGGTTGTAAACTCCTTTGGGG  
GGGACGATAATGACGGTACCCCGAATCAGGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-OF06-d151-36

CCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATCTTCCACAATGGGGCAACCCTGATGGAGCAACGCCCGGTGCAGGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTGCTTTTATAA  
GTGAGGAATATGACGGTAACTTATGAATAAGGATCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTCAT

clone\_UTFS-OF06-d151-37

CCTACGGGAGGCAGCAGTCGGGAATATTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCAATACCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTGCCGGTTGTAAGCACTTTTAGTA  
GGGAAGATAATGACGTTACCTACAGAAAAGCACCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-OF06-d151-38

CCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATCTTCCACAATGGGGCAACCCTGATGGAGCAACGCCCGGTGCAGGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTGCTTTTATAA  
GTGAGGAATATGACGGTAACTTATGAATAAGGATCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTCAT

clone\_UTFS-OF06-d151-39

CCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATATTGGTCAATGGAGGCAACTCTGAACCAGCCATGCCCGGTGGAGGATGAAGTCTCTGGATTGTAAACTCCTTTTATA  
TGGGACGAAAAAGGACTTTCTAGTTCAACTGACGGTACCATATGAATAAGCACCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-OF06-d151-40

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGACTCTTTCAGCC  
GGAAAGAAATCGCGCAGGATAATACTCTGTGTGGATGACGGTACCGGAAGAAGAAGCACCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-OF06-d151-42

CCTACGGGAGGCAGCAGTCGGGAATATTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCAATACCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTGCCGGTTGTAAGCACTTTTAGTA  
GGGAAGATAATGACGTTACCTACAGAAAAGCACCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-OF06-d151-44

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGCAGGATGAAGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTGTAC  
GGAACGAAAAGTCTCTCCTAATACGAAGGGTGATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-OF06-d151-46

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTG  
GGGAAGAAAACCTGCCGGTTAATACCTGGCGGAAAGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-OF06-d151-48

CCTACGGGAGGCAGCAGTCGGGAATATTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCAATACCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTGCCGGTTGTAAGCACTTTTAGT  
AGGAAGATAATGACGTTACCTACAGAAAAGCACCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-OF06-d151-49

CCTACGGGGGGCAGCAGCAAGGAATTTTCGCAATGGGCGAAGCCTGACCGAGCAACGCCGCGTGGAGGATGACGGCTCTTGGGTTGTAAACTCCTTTGGGG  
GGGACGATAATGACGGTACCCTCCGAATCAGGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-0F06-d151-50

CCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATCTTCCACAATGGGGCAACCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGCAGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTG  
GGAAAGAAATCCTGTGATTAATACTCGGTGGGATGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-0F06-d151-51

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTCAGC  
CGGAAAGAAATCGCGCAGGATAATACTCTGTGTGATGACGGTACCGGAAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-0F06-d151-53

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCAACGCCGCGTGAAGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCACTT  
CTGACGAAGCCCTCTTGGGGGTGACGGTAGGTTGAGAAGAAGCACCGGCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-0F06-d151-54

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCAATACCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTGCGGGTTGTAAAGCACTTTTAGTA  
GGGAAGATAATGACGTTACCTACAGAAAAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone-UTFS-0F06-d151-55

CCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATCTTCCACAATGGGCGAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGCAGGACGAAGCTTCGGGTCGTAAACTGCTTTTATAAG  
TGAAGAATATGACGGTAACCTTATGAATAAGGATCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTCAT

clone-UTFS-0F06-d151-56

CCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATCTTCCACAATGGGGCAACCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGCAGGATGAAGCTTCGGGTCGTAAACTGCTTTTATAAG  
TGAGGAATATGACGGTAACCTTATGAATAAGGATCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTCAT

clone\_UTFS-0F06-d151-57

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTG  
GGGAAGAAAACCTGCCGTTAATACCTGGCGGAATGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-0F06-d151-58

CCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATCTTCCACAATGGGGCAACCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGCAGGACGAAGGCCTTCGGGTCGTAAACTGCTTTTATAA  
GTGAAGAATATGACGGTAACCTTATGAATAAGGATCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTCAT

clone\_UTFS-0F06-d151-59

CCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATCTTCCACAATGGGGCAACCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTCGTAAACTGCTTTTATAA  
GTGAGGAATATGACGGTAACCTTATGAATAAGGATCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTCAT

clone\_UTFS-0F06-d151-60

CCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATCTTCCACAATGGGGCAACCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTCGTAAACTGCTTTTATAA  
GTGAGGAATATGACGGTAACCTTATGAATAAGGATCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTCAT

clone\_UTFS-0F06-d151-61

CCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATCTTCCACAATGGGGCAACCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGCAGGACGAAGGCCTTCGGGTCGTAAACTGCTTTTATAA

GTGAAGAATATGACGGTAACTTATGAATAAGGATCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT CAT

clone\_UTFS-0F06-d151-62

CCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATCTTCCACAATGGGGCAACCCTGATGGAGCAACGCCGCTGCAGGATGAAGGCTTCGGGTCGTAAACTGCTTTTATAA  
GTGAGGAATATGACGGTAACTTATGAATAAGGATCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT CAT

clone\_UTFS-0F06-d151-63

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTGTAC  
GGAACGAAAAGACTCTGGTTAATACCTGGGTCATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F06-d151-64

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTGTAC  
GGAACGAAAAGACTCTGGTTAATACCTGGGTCATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F06-d151-65

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCAGCC  
GGAAGAAATCGCGCAGGATAATACTCTGCGTGGATGACGGTACCGAAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F06-d151-67

CCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATATTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCCATCCCGCTGCAGGATGAATGCCCTATGGGTTGTAAACTGCTTTTATA  
TGAGAAGAAACCCCTGGACTTGCTGGGCTGACGGTACCATATGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F06-d151-68

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTG  
GGGAAGAAATCGTACGGTGAATATCCCGTCCGGATGACGGTACCGAAGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F06-d151-69

CCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATCTTCCACAATGGGGCAACCCTGATGGAGCAACGCCGCTGCAGGATGAAGGCTTCGGGTCGAAACTGCTTTTATAAG  
TGAGGAATATGACGGTAACTTATGAATAAGGATCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT CAT

clone\_UTFS-0F06-d151-70

CCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATATTGGTCAATGGACGGAAGTCTGAACCAGCCATCCCGCTGCAGGATGAAGTCTATGGATTGTAAACTGCTTTTAGC  
AGAGACGAAACGCTTTCATTTATGGGAGTCTGACGGTATCTGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

## R8(アスパラギン酸リアクター) 22日目サンプル

clone\_UTFS-0F08-d22-02

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCAGAC  
GGAAGAAATCTCTCAGGATAATACCTTGGGAGGATGACGGTACCGTAAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d22-03

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCTGGGTGAAGACGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTGGGTG  
GGGAAGAACGGCGGGCGCAACAGCGGCCTGTTTTGACATTACCCACGAAACAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d22-04

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCTGCGGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTAGTCC

GGAAAAAGGGGTGCGAGGATAATACCCTCGTGCTTTGATGGTACTGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d22-05

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTCGGCG  
GGGAAGAAATTGCACCTCTAATACAGGGTGTAGATGACGGTACCCGCATAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d22-06

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTCAGGT  
GGAAAGAAAACGCATGGGTCAATACCCTGTGTGGATGACGGTACCATCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d22-07

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGCGGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTAGTCC  
GGAAAAAGGGGTGCGAGGATAATACCCTCGTGCTTTGATGGTACTGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d22-09

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTCAGCC  
GGAAAGAAATCGCGCAGGATAATACTCTGCGTGGATGACGGTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d22-10

CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTGTCC  
GGAAAGAAAAGCACTGGGTTAATACCCTGTGCGGATGACGGTACCCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d22-11

CCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATATTGGTCAATGCCCGCAAGGCTGAACCAGCCATTCCGCGTGAGGATGAAGGCCATGGGTTGTAAACTCTTTTAGA  
TGGGAAGAAAATGCTAGATTTTCTGGTACTGACGGTACCATCAGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d22-12

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTCGGCC  
GGGAAGAAATCGCATGGGTTAATACCCTGTGCGGATGACGGTACCCGCATAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d22-13

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTCAGGT  
GGAAAGAAAACGCATAGGTTAATACCTTGTGCGGATGACGGTACCATCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d22-17

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTCGGCG  
GGGAAGAAATGGTTTCGGTTAATACCCGGAGCTGATGACGGTACCCGCATAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d22-18

CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATCCCAGGTAAGGATGAAGTCTCTGGATTGTAAACTCTTTTCTT  
CGGAATAAAAAGTGGGGTTCTCCTCAGCTTGAAGTACCGAAGGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d22-19

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTCAGAC  
GGAAAGAAATCTCTCAGGATAATACCTTGGGAGGATGACGGTACCGTAAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d22-20

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTCGGCG  
GGGAAGAAATTGCACTCTCTAATACAGGGTGTAGATGACGGTACCCGCATAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d22-21

TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTCGGy  
GGGAAGAAATTGCACTCTCTAATACAGGGTGTAGATGACGGTACCCGCATAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d22-22

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTCGGTG  
GGGAAGAAATGGCAGGGGAATATCCCGTGTGATGACGGTACCCGAAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d22-23

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTCGGTCC  
GGAAAGAAAAGCACTGGGTTAATACCCCGTGTCTGACGGTACCCGAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d22-24

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTCAGCC  
GGAAAGAAATCGGCAGGATAATACTCTGCGTGGATGACGGTACCCGAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

## R8(アスパラギン酸リアクター) 36日目サンプル

clone\_UTFS-0F08-d36-05

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTATCA  
GGAAAGAAAAGCGTTGGATTAATACTCTGACGTGCTGACGGTACCTGAGGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-08

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTCAGCC  
GGAAAGAAATCGGCAGGATAATACTCTGCGTGGATGACGGTACCCGAAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-09

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGTCAATGGTCCGAAGACTGAACCAGCCATGCCGCGTGACAGGATGAAGCATCTATGGTGTAAACTGCTTTTGTG  
CGGAAGAAAACCTCTTCGTGAAGAGGCTTGACGGTACCGTAAGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-10

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTCAGCC  
GGAAAGAAATCGGCAGGATAATACTCTGCGTGGATGACGGTACCCGAAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-11

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCGGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTAGTCC  
GGGAAAAGGGGTGCGAGGATAATACCTCGTGTGATGGTACTGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-12

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGATGAAGCCCTAGGGTTGTAAAGCACTTTCGTTG  
GGGATGATAATGACCGTACCCAAAGAAGAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTF8-0F08-d36-13

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTCAGCC  
GGAAAGAAATCGCGCAGGATAATACTCTGCGTGGATGACGGTACCGGAAGAAGAAGCACC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTF8-0F08-d36-15

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCTT GCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTCGGCG  
GGGAAGAAATGACAGCGGTAATACCTGTGTAGATGACGGTACCGAATAAGAAGCACC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTF8-0F08-d36-16

CCTACGGGAAGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTG CAGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTGTAC  
GGAGCGAAAAGGCCTCTCTAATACAGGGGCTCATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTF8-0F08-d36-17

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTCAGA  
CGGAAGAAATCTCTCAGGATAATACCTTGGGAGGATGACGGTACCGTAAGAAGAAGCACC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTF8-0F08-d36-19

CCTACGGGAGGCAGCAGTGAAGGAATTTGGTCAATGGTGGAAAGACTGAACCAGCCATGCCGCGTG CAGGAAGAAGCATCTATGGTGTGTAAACTGCTTTTGT  
CGGAAGAAACTCTCTTGTGAAGGAGCTTACGGTACCGTAAGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTF8-0F08-d36-21

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGTCAATGCCGCGTG CAGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTGT  
CGGAGCGAAAAGCTCTCTAATACAGGGGCTCATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTF8-0F08-d36-22

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTCC  
GGAAAGAAAAGCACTGGATTAATACTTCGGTGTCTGACGGTACCGGAAGAATAAGCACC GGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTF8-0F08-d36-23

CCTACGGGAGGCAGCAGTGAAGGAATTTGGTCAATGGAGGAAACTCTGAACCAGCCATGCCGCGTGGAGGATGAAGTCTCTGGATTGTAAACTCCTTTTATA  
AAAGAAGAAACCCATTTTCTAATGGGTTGACGGTACTTTATGAATAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTF8-0F08-d36-24

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGTGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTCAGCCG  
GAAAGAAATCGCGCAGGATAATACTCTGCGTGGATGACGGTACCGGAAGAAGAAGCACC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTF8-0F08-d36-26

CCTACGGGAGGCAGCAGTGAAGGAATTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGTGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCGACG  
GGGATGATAATGACCGTACCGTAGAAGAAGCCACGGCTAAATTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTF8-0F08-d36-27

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTG CAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTGTAC  
AGAGCGAAAAGGTCTCTTCTAATACAGGGGCTCATGACGGTACTGTAAGAATAAGCACC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTF8-0F08-d36-28

CCTACGGGAGGCAGCAGTAAAGGAATTTGGTCAATGGACGGAAGTCTGAACCAGCCATCCCGCGTGCAGGATGAAGTCTATGGATTGTAAACTGCTTTTAGC  
AGAGACGAAACGCTTTCATTTATGGGAGTCTGACGGTATCTGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-31

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGCAGGAAGAAGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTAGTCC  
GGGAAAAAGGGGTACGAGGATAATACCCTCGTCTTTGATGGTACTGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-32

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGAGTGAAGAAGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCGGCG  
GGGAAGAAATGGTTTCGGTTAATACCGGAGCTGATGACGGTACCGCATAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-33

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCAATGCCCGGTGCAGGAAGAAGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTGTAC  
GGAGCGAAAAGGCCCTCTCTAATACAGGGGCTCATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-34

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGAGTGAAGAAGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCGGCT  
GGGAAGAAATCGCATCTCCTAATACGGGTGTGGATGACGGTACCGCATAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-35

CCTACGGGAGGCAGCAGTAAAGGAATTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGTGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCACTTTCTGTG  
GGGATGATAATGACCGTACCCAAAGAAGAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-36

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCAATGCCCGGTGCAGGAAGAAGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTGTAC  
GGAGCGAAAAGGCTCTCTAATACAGGGGCTCATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-37

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCAATGCCCGGTGCAGGAAGAAGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTGTAC  
GGAGCGAAAAGGCTCTCTAATACAGGGGCTCATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-38

CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAATTTGGGCAATGGGTGCAAGCCTGACCCAGCCATGCCCGGTGGAGGAAGAAGTCTCTGGATTGTAAACTCCTTTGTG  
GGGAAGAAGAGTCATCTTGCAGGTGATGTGACGGTACCGATGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-40

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGAGTGAAGAAGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCAGGT  
GGAAAGAAAACGCATGGTCAATACCCTGTGTGGATGACGGTACCATCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-44

CCTACGGGAGGCAGCAGTAAAGGAATTTGGACAATGCTCGCAAGAGTATCCAGCCATGCCCGGTGCAGGAAGACGGCCCTATGGGTTGTAAACTGCTTTTGAA  
CTAGAGAAAACCCCTTCGTGAAGGGGCTGATAGTATAGTTAGAATAAGCATCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-c36-45

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGAGTGAAGAAGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCAGGT  
GGAAAGAAAACCTCCGGTGAATACCCGGGAGGCTGACGGTACCATCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-OF08-d36-46

CCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTGGTCAATGGACGAAAGCTGAACCAGCCATGCCCGGTGGAGGATGAAGTCTCTGGATTGTAACTCTTTTATA  
TGGGACGAAAAAGGATTTTCTAACTCGTCTGACGGTACCATATGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-OF08-d36-47

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCAGCC  
GGAAAGAAATCGCGCAGGATAAATACTCTGCGTGGATGACGGTACCGGAAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-OF08-d36-48

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCCGGTGCAGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTGTAC  
GGAGCGAAAAGGCTTCCCTAATACGGGAGGCTGATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-OF08-d36-51

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCGCG  
GGAAAGAAATGGTTTCGGTTAATCCCGGAGCTGATGACGGTACCGCATAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-OF08-d36-54

CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAATTTGGACAATGGGTGAGAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGCAGGAAGAAGGCCTTATGCGTTGTAAACTGCTTTGCC  
AGGGGATAAAACGGTTCGCGGAATAATTGAAGGTACCTGGTGAATAAGCCAGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-OF08-d36-55

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCAGCC  
GGAAAGAAATCGCGCAGGATAAATACTCTGCGTGGATGACGGTACCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-OF08-d36-56

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGCGGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCGTTAGTCC  
GGAAAAAGGGTTCGAGGATAAATACCTCGTGCTTTGATGGTACTGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-OF08-d36-58

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCAGCC  
GAAAGAAATCTCTCAGGATAAATACCTTGGGAGGATGACGGTACCGTAAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-OF08-d36-59

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATTCCCGGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTGTAC  
GGAAACGAAACGGTCTGCCCTAATACGGCGGGCTAATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-OF08-d36-60

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCAGCC  
GGAAAGAAATCGCGCAGGATAAATACTCTGCGTGGATGACGGTACCGGAAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-OF08-d36-61

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCGGTG  
GGAAAGAAATGCATAGGCTAATACCTGTGTAGATGACGGTACCTGGAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-OF08-d36-62

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTAGTCC  
GGGAAAAGGGGTGCGAGGATAATACCCTCGTGCTTTGATGGTACTGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-63

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGGAAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCAAGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTGTAC  
GGAACGAAAAGGCTCTCTAATACAGAGGGCTCATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-c36-66

CCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTGGTCAATGGACGAAAGTCTGAACCAGCCATGCCGCGTGAGGATGAAGTCTCTGGATTGTAAACTTCTTTTATA  
TGGAGCGAAAAAGGCTTTCTAGCTCGTCTGACGGTACCATATGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-67

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTCAGAC  
GGAAAGAAATCGCATCTTCTAATACAGGGTGTGGATGACGGTACCGTAAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-68

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGCAAGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTGTAC  
AGAGCGAAAAGGCTCTTCTAATACAGGGGGCTCATGACGGTACTGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-69

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGGAAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTCGGGT  
AGGACGATGATGACGGTACTACCAGAAGAAGCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-70

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGAAGAAGGCCTGCCGGTTGTAAAGCACTTTTGT  
CGGGAAGAAATCATGCTGGTAAATACCTGGTATGGATGACGGTACCGAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-71

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTCGGG  
GGGAAGAAATCGCATCTCTAATACGGGGTGTGGATGACGGTACCGAAATAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-72

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGCAAGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTAGTCC  
GGGAAAAGGGGTGCGAGGATAATACCCTCGTGCTTTGATGGTACTGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-73

CCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTGGTCAATGGACGGAAGTCTGAACCAGCCATCCCAGCGTGCAAGATGAAGTCTATGGATTGTAAACTGCTTTTAGC  
AGAGACGAAACGCTTTCATTTATGGAGTCTGACGGTATCTGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-74

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGGAAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCAAGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTGTAC  
GGAACGAAAAGGCTCTTCTAATAAAGAGGGCTCATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-75

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTAGTCC

GGGAAAAAGGGGTGCGAGGATAATACCCTCGTGCTTTGATGGTACTGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-76

CCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATATTGGTCAATGGACGCAAGTCTGAACCAGCCATGCCGCGTGAAGGATGAAGTCTCTGGATTGTAACTCTTTTATA  
TGGGACGAAAAAGGGCATTCTTGCTCACTTGACGGTACCATAGGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-78

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCGGCG  
GGGAAGAAATTGCACTCTCTAATACAGGGGTGTAGATGACGGTACCCGCATAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-79

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGACAGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTGTAC  
GGAGCGAAAAAGGCTCTCTAATACAGGGGGCTCATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-80

CCTACGGGAGGCAGCAGTTAGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCACTTCGTTG  
GGGATGATAATGACCGTACCCAAAGAAGAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-81

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCAGCC  
GGAAAGAAATCGCGCAGGATAATACTCTGCGTGGATGACGGTACCGGAAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-82

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCAGCC  
GGAAAGAAATCGCGCAGGATAATACTCTGCGTGGATGACGGTACCGGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-83

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCGGTG  
GGGAAGAAATTGCATAGGCTAATACCCTGTGTAGATGACGGTACCTGGAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-84

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATCTTGGACAATGGGGAAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGATCGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGATCTTCAGCT  
GGGAAGATAATGACGGTACCAGCAGAAGAAGCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-85

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGACAGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTGTAC  
GGAGCGAAAAAGGCTCTCTAATACAGGGGGTTCATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-86

CCTACGGGAGGCAGCAGTTAGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCACTTCGTTG  
GGGATGATAATGACCGTACCCAAAGAAGAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-87

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTATCA  
GGAACGAAAAAGCGTTGGATTAATACTCTGACGTGCTGACGGTACCTGAGGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-88

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCAGAC  
GGAAAGAAATCGCATCTCTAATACAAGGTGTGGATGACGGTACCGTAAGAAGAAGCACCGGGTAACACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-90

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGACAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTGTAC  
GGAAAGAAAAGACTCCTCTAATAAAGGGGGTCCATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGGTAACACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-91

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGACAGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTGTAC  
GGAGCGAAAAGGCTCTCTAATACAGGGGGCTCATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGGTAACACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-92

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGACAGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTGTAC  
GGAGCGAAAAGGCTCTCTAATACAGGGGGCTCATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGGTAACACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F08-d36-93

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCGGCG  
GGGAAGAAATGGTTTCGGTAATACCGGAGCTGATGACGGTACCGCATAAGAAGCACCGGGTAACACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

## R9(グルコースリアクター) 22日目サンプル

clone\_UTFS-0F09-d22-03

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAATGCCGCGTGACAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTATAT  
GAGAAGACTATGACGGTAACATATGAATAAGGACCGGCTAACACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTCAT

clone\_UTFS-0F09-d22-11

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCGGCG  
GGGAAGAAATCGCATCTCTAATACGGGGTGTGGATGACGGTACCGAATAAGAAGCACCGGGAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d22-12

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCGGCT  
GGGAAGAAATCGCATCTCTAATACGGGGTGTGGATGACGGTACCGCATAAGAAGCACCGGGTAACACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d22-14

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTCCACAATGGGGCAACCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGACAGGATGAAGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTATTTG  
TGAGGAATATGACGGTAACAAATGAATAAGGGTCGGTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTCAT

clone\_UTFS-0F09-d22-15

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGACAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTGTAC  
GGAAAGAAAAGCTCTCTAATACAGGGGGTGAATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGGTAACACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d22-18

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGACAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTATAA  
GTGAGGAATATGACGGTAACCTTATGAATAAGGATCGGTAACACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTCAT

clone\_UTFS-0F09-d22-19

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCCGGTGCGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCGCTTTCACCA  
GGGGCGAATTTGGACGGTACCTGGGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGGTGAT

clone\_UTFS-0F09-d22-20

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGCTCTTCGGCT  
GGGAAGAAATCGCATCTCCTAATACGGGGTGTGGATGACGGTACCAGCATAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d22-21

CCTACGGGAGGCAGCAGTAAAGGAATTTGGTCAATGGACGAAAGTCTGAACCAGCCATGCCCGGTGAAGGATGAAGTCTCTGGATTGTAAACTCTTTTATA  
TGGGACGAAAAAGGGATTCTTCTCAGTTGACGGTACCATAGGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d22-22

CCTACGGGAGGCAGCAGTGAAGGAATCTTCCACAATGGGGCAACCCTGATGGAGCAACGCCCGGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTGTAAACTGCTTTTATT  
GTGAGGAATATGACGGTAACAAATGAATAAGGGTCCGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGGTCAT

clone\_UTFS-0F09-d22-23

CCTACGGGAGGCAGCAGTAAAGGAATTTGGTCAATGGACGAAAGTCTGAACCAGCCATGCCCGGTGAGGATGAAGTCTCTGGATTGTAAACTCTTTTATA  
TGGGACGAAAAAGGGTTTTCTAACTCGTCTGACGGTACCATATGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d22-24

CCTACGGGAGGCAGCAGTGAAGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCCGGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTGTAAACTGCTTTTATA  
GTGAGGAATATGACGGTAACTTATGAATAAGGATCCGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGGTCAT

clone\_UTFS-0F09-d22-25

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGCACTTTTGTG  
GGGAAGAAACCGCCGGTTAATACCCTGTTGAATGACGGTACCCAAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d22-27

CCTACGGGAGGCAGCAGTGAAGGAATCTTCCACAATGGGGCAACCCTGATGGAGCAACGCCCGGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTGTAAACTGCTTTTATT  
GTGAGGAATATGACGGTAACAAATGAATAAGGGTCCGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGGTCAT

clone\_UTFS-0F09-d22-29

CCTACGGGAGGCAGCAGTGAAGGAATCTTCCACAATGGGGCAACCCTGATGGAGCAACGCCCGGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTGTAAACTGCTTTTATT  
GTGAGGAATATGACGGTAACAAATGAATAAGGGTCCGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGGTCAT

clone\_UTFS-0F09-d22-30

CCTACGGAAGGCAGCAGTGAAGGAATCTTCCACAATGGGGCAACCCTGATGGAGCAACGCCCGGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTGTAAACTGTTTTATT  
GTGAGGAATATGACGGTAACAAATGAATAAGGGTCCGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGGTCAT

clone\_UTFS-0F09-d22-31

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGCGGGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAACCGCTTAGTCC  
GGGAAAAAGGGTGCAGGATAATACCCTCGTCTTGTGGTACTGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d22-32

CCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTATTT  
GTGAAGAATATGACGGTAACAAATGAATAAGGATCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAT

clone\_UTFS-0F09-d22-34

CCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTATAT  
GAGAAGACTATGACGGTAACATATGAATAAGGACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAT

clone\_UTFS-0F09-d22-35

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCGGCC  
GGGAAGAAATCGTGTCTCTAACATAGGACATGGATGACGGTACCGGACTAAGAAGCACCAGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d22-36

CCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATCTTCCACAATGGGGCAACCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTATTT  
GTGAGGAATATGACGGTAACAAATGAATAAGGTCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAT

clone\_UTFS-0F09-d22-37

CCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTCTTTTATGA  
GTGAAGAATATGACGGTAACTCATGAATAAGCACCAGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAT

clone\_UTFS-0F09-d22-40

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCGGCC  
GGGAAAAAATCGCTCTCCTAATACGGGGGTGGATGATGGTACCGGACTAAGAAGCACCAGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d22-42

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCGGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTAGTCC  
GGGAAAAAGGGTGCAGGATAATACCTCGTCTTTGATGGTACTGGAAGAATAAGCACCAGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d22-43

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCGGCC  
GGGAAGAAATCGCATCTCCTAATACGGGGTGTGGATGACGGTACCGGAATAAGAAGCACCAGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d22-44

CCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTCTTTTATGA  
GTGAAGAATATGACGGTAACTCATGAATAAGCACCAGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAT

clone\_UTFS-0F09-d22-45

CCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTATAT  
GAGAAGACTATGACGGTAACATATGAATAAGGACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAT

clone\_UTFS-0F09-d22-48

CCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATCTTCCACAATGGGGCAACCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTATTT  
GTGAGGAATATGACGGTAACAAATGAATAAGGTCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAT

clone\_UTFS-0F09-d22-51

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGGAAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTG

GGGAGGAAGGGGTGATGCCTAATACGCATCATATTGACGTTACCCACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d22-52

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCGGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTGTCA  
GGGAAGAAATCTTTTGGGCTAACACCTCGGAAGGATGACGGTACCTGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d22-53

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAAGGATGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAACTCTTTTATGA  
GTGAAGAATATGACGGTAACTCATGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTCAT

clone\_UTFS-0F09-d22-54

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCGCAATGGGCGAAGCCTGACGCAGCAACGCCGCGTGCGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTCAGCA  
GGGACGAAACTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTGAT

clone\_UTFS-0F09-d22-55

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATCTTCCACAATGGGGCAACCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGACAGGATGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTATT  
GTGAGGAATATGACGGTAACTCATGAATAAGGGTTCGGTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTCAT

clone\_UTFS-0F09-d22-56

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCGGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTAGTCC  
GGGAAAAGGGGTGCGAGGATAATACCTCGTCTTTGATGGTACTGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d22-58

CCTACGGGAGGCAGCAGTAAAGGAATATTGGTCAATGGAGCAAGCTGAACCAGCCATGCCGCGTGAAGGATGAAGGTCTCTGATTGTAAACTCTTTTATA  
TGGGACGAAAAAGGCATTCTTGCTCACTTACGGTACCATAGGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d22-59

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGACAGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTGCC  
AGGGGATAAAAACACTTTGCGAAGTGATTTGAAGGTACCTGGTGAATAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d22-60

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCGGCC  
GGGAAAAAATCGCCTCTCCTAATACGGGGGTGGATGATGGTACCGGACTAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d22-66

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGTCAATGGTCGGAAGACTGAACCAGCCATGCCGCGTGACAGGAAGAAGCATCTATGGTGTAACTGCTTTTGTAC  
GGGAAGAAACTCCTTCGTGAAGGAGCTTGACGGTACCGTAAGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d22-67

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTCCACAATGGGCGAAGCCTGATGGAGCAATGCCGCGTGACAGGATGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTATAT  
GAGAAGACTATGACGGTAACTATGAATAAGGACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTCAT

clone\_UTFS-0F09-d22-68

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGTCAATGGGCGAAGCCTGAACCAGCCATGCCGCGTGACAGGAAGACGGTCTATGATTGTAAACTGCTTTTGTGA  
CGGGAAGAAGCCTCCCTCGTGAGGGAGTTGACGGTACCGTAAGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d22-70

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCGGCC  
GGGAAAAATCGCCTCTCCTAATACGGGGGTGGATGATGGTACCGGACTAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d22-71

CCTACGGGAGGCAGCAGTGAAGAAATCTCCACAATGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCCGGTGAAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAACCTAATTTATGAG  
TGAAGAATATGACGGTAACCTCATGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTCAT

clone\_UTFS-0F09-d22-72

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGACAATGGGGAAACCCTGATGCAGCCATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTG  
GGGAGGAAGGGTTGATGTCTAATACGCATCAACATTGACGTTACCCACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d22-75

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCGGCC  
GGGAAGAAATCGCATCTCCTAATACGGGGTGTGGATGACGGTACCCGAATAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d22-77

CCTACGGGAGGCAGCAGTGAAGAAATCTCCACAATGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCCGGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTCGTAACTGCTTTTATA  
AGTGAGGAATATGACGGTAACCTATGAATAAGGATCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTCAT

clone\_UTFS-0F09-d22-79

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGACAATGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCCGGTGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTAAGTG  
GGGAGGAACCGGGATGCGAACAGTGTCTGCTCTGACGTTACCCACAGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d22-80

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATTCGGGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTGCTTTTGTAC  
GGAACGAAACCGGAGCTCTAATACAGTTTGTCTAATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d22-86

CCTACGGGAGGCAGCAGTGAAGAAATCTCCACAATGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCCGGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTGCTTTATTT  
GTGAAGAATATGACGGTAACAAATGAATAAGGGTTCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTCAT

clone\_UTFS-0F09-d22-87

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCGGCTG  
GGAAGAATCGCATCTCCTAATACGGGGTGGTGGATGACGGTACCAGCATAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d22-88

CCTACGGGAGGCAGCAGTGAAGAAATATTGGTCAATGGACGAAAGCTGAACCAGCCATGCCCGGTGGAGGATGAAGGTCTCTGATTGTAAAGCTCTTTTATA  
TGGGACGAAAAAGGGTTTTCTAACTCGTCTGACGGTACCATATGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d22-92

CCTACGGGAGGCAGCAGTGAAGAAATCTCCACAATGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCCGGTGAAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTTATGA  
GTGAAGAATATGACGGTAACCTCATGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTCAT

clone\_UTFS-0F09-d22-93

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTCGGCG  
GGGAAGAAATGCACGGGTAATACCCTGTGTAGATGACGGTACCCGAATAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

### R9 (グルコースリアクター) 43 日目サンプル

clone\_UTFS-0F09-d43-01

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTCAGCC  
GGAAAGAAATCGCACAGGCTAATACTTTGTGTGGATGACGGTACCCGAAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d43-02

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGGCAACCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTCGGCC  
GGGAAAAAATCGCCCTCCTAATACGGGGGTGGATGATGGTACCGGACTAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d43-03

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTnATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTCACG  
GAAAGAAATCTCTCAGGATAATACCTTGGGAGGATGACGGTACCGTAAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d43-04

CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTCTGTCTTTC  
TGTGAAGAACCACCATGTGCAGAGAAAGCTCATGGCCTGACGGTAACAGAGGAGGAAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d43-05

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGACAGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTGTAC  
GGAGCGAAAAGGCTCTCTAATACAGGGGGTTCATGACGGTACCGTAAGAATAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d43-06

TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGACGGATGAAGGCCTTCGGGTCGTAAACTGCTTTTATT  
TGTGAAGAATATGACGGTAACAATGAATAAGGATCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTCAT

clone\_UTFS-0F09-d43-07

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGGCAACCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTCGGCC  
GGGAAGAAATCGCTTAGGTTAATACCCTGAGTGGATGACGGTACCCGAATAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d43-08

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGACAGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTGTTA  
CGGAGCGAAAAGGCTCTCTAATACAGGGGGTTCATGACGGTACCGTAAGAATAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d43-10

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGACAGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTATTT  
GTGAAGAATATGACGGTAACAATGAATAAGGATCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTCAT

clone\_UTFS-0F09-d43-16

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATTCGCGTGACAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTCTTTTGT  
GGAAAGAAATCTGGGTCATTTATGAGCAGTTGACGGTACCTTACGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d43-17

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTCAGCC  
GGAAAGAATTCGCACAGGCTAATACTTTGTGTGGATGACGGTACCGGAAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d43-18

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTCAGCC  
GGAAAGAATTCGCACAGGCTAATACTTTGTGTGGATGACGGTACCGGAAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d43-19

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGGCAATCCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTAG  
TGGGAAGAAGGCTCAAGGCTAATACTTTGAGCGTTGACGTTATCCACGAAAAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGCTAAT

clone\_UTFS-0F09-d43-20

CCTACGGGAGGCAGCAGTGAAGAAATCTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGACAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTATTA  
GTGAGGAATATGACGGTAACTAATGAATAAGGATCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAT

clone\_UTFS-0F09-d43-21

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGACAGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTGTAC  
GGAGCGAAAAGGCCTCTAATACAGGGGCTCATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d43-22

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGCGGGATGACGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTACCAGG  
GGCGAATTTGGACGGTACCTGGGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAT

clone\_UTFS-0F09-d43-24

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGGAAACCCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGTGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTGGG  
GGGACGATGATGACGGTACCACCAGAATAAGATCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d43-25

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGCGGGATGACGCCTTCGGGTTGAAAACCGCTTTCACCA  
GGGGCGAATTTGGACGGTACCTGGGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAT

clone\_UTFS-0F09-d43-26

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGACAGGAAAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTGTACG  
GAGCGAAAAGGCTCTCTAATACAGGGGCTCATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d43-27

CCTACGGGAGGCAGCAGTAAAGAAATTTGGTCAATGGAGGCAACTCTGAACCAGCCATGCCGCGTGGAGGAAGAAGGCCTATGCGTTGTAAAGCTCTTTGGG  
TGGGAAGAAAATGGTCAATTTATTGACAAGTACGGTACCATCAGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d43-28

CCTACGGGAGGCAGCTAGTAAGGAATTTGGTCAATGGACGCAAGTCTGAACCAGCCATGCCGCGTGAAGGATTAAGGTCTCTGGATTGTAAAGCTCTTTTAT  
TTGGGACGAAAAGGCTCTTCTAGACCAACTGACGGTACCAGATGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d43-29

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGACAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTGTAC

GGAGCGAAAAGGTACTCTAATACAGGGTGCTCATGGCGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d43-30

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCGGCC  
GGGAAGAAATCGCATGGGCTAATACCCTGTGCGGATGACGGTACCGGCATAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d43-31

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATCTTAGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGATCGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGATCTTCAGAT  
GGGAAGATAATGACGGTACCATCAGAAGAAGCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d43-32

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCAGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTG  
GGGAAAGAAATCCTGTGCTAATACTCGGTGGGATGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d43-33

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCGGCG  
GGGAAGAAATCGCATCTCCTAATACGGGTGTGGATGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d43-34

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCAGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTG  
GGAAAGAAATCCTGTGCTAATACTCGGTGGGATGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d43-35

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATCTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGACAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTATTA  
GTGAGGAATATGACGGTAACTAATGAATAAGGATCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTCAT

clone\_UTFS-0F09-d43-36

CCTACGGGAGGCAGCAGTAAAGGAATTTGGTCAATGGACGAAAGTCTGAACCACCATGCCGCGTGGAGGATGAAGGTCTCTGATTGTAAACTCTTTTATAT  
GGGACGAAAAAGGGTTTTCTAACTCGTCTGACGGTACCATATGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d43-37

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATTGCCGCGTGACGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTGT  
CGGAAGCGAAAAGGCTCTCTAATACAGGGGTTGATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTACATGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d43-41

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCAGCC  
GGAAAGAAATCGCGCAGGATAATACTCTGCGTGGATGACGGTACCGGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

clone\_UTFS-0F09-d43-42

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCAGAC  
GGAAAGAAATCTTTGGCGAATACCCTGGGAGGATGACGGTACCGTAAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT

## 得られたクローンにおける V3 領域の相同性検索結果

Run6-151day

Clone No'	Accession	Name	Score	Identity	Gaps
1	AB106391	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF06-08	323	163/163 (100%)
	AF445701	uncultured candidate division TM7 bacterium		319	167/169 (98%)
2	AF527581	uncultured bacterium		385	194/194 (100%)
	AB166774	uncultured bacterium	clone:UTFS-O04-12-18	385	194/194 (100%)
	AB106393	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF06-10	385	194/194 (100%)
	AB087766	uncultured bacterium	DGGE band R4-3	385	194/194 (100%)
	Y18617	Acidovorax sp. BSB421		369	192/194 (98%)
3	AB106391	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF06-08	323	163/163 (100%)
	AF445701	uncultured candidate division TM7 bacterium		319	167/169 (98%)
4	AB106391	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF06-08	323	163/163 (100%)
	AF445701	uncultured candidate division TM7 bacterium		319	167/169 (98%)
6	AB079642	Herpetosiphon sp. OSI-B2		287	161/169 (95%)
7	AB079642	Herpetosiphon sp. OSI-B2		287	161/169 (95%)
8	AJ518603	unidentified bacterium		329	187/194 (96%)
	AY635897	Pseudoxanthomonas sp. AMS6		313	185/194 (95%)
9	AF234738	uncultured sludge bacterium S21		385	194/194 (100%)
	AF234722	uncultured sludge bacterium H27		385	194/194 (100%)
	AF234708	uncultured sludge bacterium H11		385	194/194 (100%)
	AF234697	uncultured sludge bacterium H22		385	194/194 (100%)
	AF234693	uncultured sludge bacterium H10		385	194/194 (100%)
	AB106402	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-06	385	194/194 (100%)
	AY689093	uncultured Rhodocyclaceae bacterium		377	193/194 (99%)
11	AB106391	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF06-08	280	160/164 (97%), Gaps = 3/164 (1%)
	AF445701	uncultured candidate division TM7 bacterium		276	164/170 (96%), Gaps = 3/170 (1%)
12	AF269000 X84557	uncultured bacterium SBR2013		303	165/169 (97%)
16	AF527581	uncultured bacterium		377	193/194 (99%)
	AB166774	uncultured bacterium	clone:UTFS-O04-12-18	377	193/194 (99%)

	AB106393	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF06-10	377	193/194 (99%)
	AB087766	uncultured bacterium	DGGE band R4-3	377	193/194 (99%)
	Y18617	Acidovorax sp. BSB421		361	191/194 (98%)
19	AY676016	uncultured Thiothrix sp.		327	168/169 (99%)
	AB106380	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF05-09	327	168/169 (99%)
21	AJ504515	uncultured bacterium		335	169/169 (100%)
	AB077986	Rhodobacter gluconicum		335	169/169 (100%)
23	AB166781	uncultured bacterium	clone:UTFS-OF06-03	385	194/194 (100%)
	AB166776	uncultured bacterium	clone:UTFS-O04-62-07	385	194/194 (100%)
	AB087776	uncultured bacterium	DGGE band R6-4	385	194/194 (100%)
	AB087768	uncultured bacterium	DGGE band R4-5	385	194/194 (100%)
	AB087519	uncultured bacterium	clone:R6-01	385	194/194 (100%)
	AB076846	beta proteobacterium NOS8		329	187/194 (96%)
24	AB079642	Herpetosiphon sp. OSI-B2		287	161/169 (95%)
26	AY676016	uncultured Thiothrix sp.		335	169/169 (100%)
	AB106380	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF05-09	335	169/169 (100%)
27	AF527581	uncultured bacterium		385	194/194 (100%)
	AB166774	uncultured bacterium	clone:UTFS-O04-12-18	385	194/194 (100%)
	AB106393	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF06-10	385	194/194 (100%)
	AB087766	uncultured bacterium	DGGE band R4-3	385	194/194 (100%)
	Y18617	Acidovorax sp. BSB421		369	192/194 (98%)
28	AB106391	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF06-08	323	163/163 (100%)
	AF445701	uncultured candidate division TM7 bacterium		319	167/169 (98%)
29	AY221049	uncultured bacterium		242	158/170 (92%)
31	AB166781	uncultured bacterium	clone:UTFS-OF06-03	369	193/194 (99%), Gaps = 1/194 (0%)
	AB166776	uncultured bacterium	clone:UTFS-O04-62-07	369	193/194 (99%), Gaps = 1/194 (0%)
	AB087776	uncultured bacterium	DGGE band R6-4	369	193/194 (99%), Gaps = 1/194 (0%)
	AB087768	uncultured bacterium	DGGE band R4-5	369	193/194 (99%), Gaps = 1/194 (0%)
	AB087519	uncultured bacterium	clone:R6-01	369	193/194 (99%), Gaps = 1/194 (0%)

	AB076846	beta proteobacterium NOS8		313	186/194 (95%), Gaps = 1/194 (0%)
32	AY676016	uncultured Thiothrix sp.		327	168/169 (99%)
	AB106380	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF05-09	327	168/169 (99%)
33	AB166781	uncultured bacterium	clone:UTFS-OF06-03	385	194/194 (100%)
	AB166776	uncultured bacterium	clone:UTFS-O04-62-07	385	194/194 (100%)
	AB087776	uncultured bacterium	DGGE band R6-4	385	194/194 (100%)
	AB087768	uncultured bacterium	DGGE band R4-5	385	194/194 (100%)
	AB087519	uncultured bacterium	clone:R6-01	385	194/194 (100%)
	AB076846	beta proteobacterium NOS8		329	187/194 (96%)
34	M62786 M27799	Runella slithyformis		311	177/184 (96%)
35	AB079642	Herpetosiphon sp. OSI-B2		287	161/169 (95%)
36	AB106391	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF06-08	323	163/163 (100%)
	AF445701	uncultured candidate division TM7 bacterium		319	167/169 (98%)
37	AY676016	uncultured Thiothrix sp.		335	169/169 (100%)
	AB106380	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF05-09	335	169/169 (100%)
38	AB106391	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF06-08	323	163/163 (100%)
	AF445701	uncultured candidate division TM7 bacterium		319	167/169 (98%)
39	AJ619076	uncultured bacterium		375	189/189 (100%)
	AY214823	uncultured Bacteroidetes bacterium		335	184/189 (97%)
40	AB106385	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF05-14	385	194/194 (100%)
	AY689093	uncultured Rhodocyclaceae bacterium		369	192/194 (98%)
42	AY676016	uncultured Thiothrix sp.		335	169/169 (100%)
	AB106380	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF05-09	335	169/169 (100%)
44	AB166781	uncultured bacterium	clone:UTFS-OF06-03	385	194/194 (100%)
	AB166776	uncultured bacterium	clone:UTFS-O04-62-07	385	194/194 (100%)
	AB087776	uncultured bacterium	DGGE band R6-4	385	194/194 (100%)
	AB087768	uncultured bacterium	DGGE band R4-5	385	194/194 (100%)
	AB087519	uncultured bacterium	clone:R6-01	385	194/194 (100%)
	AB076846	beta proteobacterium NOS8		329	187/194 (96%)

46	AJ518603	unidentified bacterium		329	187/194 (96%)
	AY635897	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. AMS6		313	185/194 (95%)
48	AY676016	uncultured <i>Thiothrix</i> sp.		321	169/170 (99%), Gaps = 1/170 (0%)
	AB106380	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF05-09	321	169/170 (99%), Gaps = 1/170 (0%)
49	AB079642	<i>Herpetosiphon</i> sp. OSI-B2		287	161/169 (95%)
50	AF273082	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>		266	179/194 (92%)
51	AB106385	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF05-14	357	194/196 (98%), Gaps = 2/196 (1%)
	AY689093	uncultured <i>Rhodocyclaceae</i> bacterium		341	192/196 (97%), Gaps = 2/196 (1%)
53	AB106395	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF06-12	307	174/178 (97%), Gaps = 3/178 (1%)
	U61298	<i>Nocardioides</i> sp. OS4		260	171/183 (93%), Gaps = 1/183 (0%)
54	AY676016	uncultured <i>Thiothrix</i> sp.		335	169/169 (100%)
	AB106380	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF05-09	335	169/169 (100%)
55	AB106390	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF06-07	307	162/163 (99%), Gaps = 1/163 (0%)
	AY154391	uncultured epsilon proteobacterium		274	160/166 (96%), Gaps = 1/166 (0%)
56	AB106391	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF06-08	307	162/163 (99%), Gaps = 1/163 (0%)
	AF445701	uncultured candidate division TM7 bacterium		303	166/169 (98%), Gaps = 1/169 (0%)
57	AJ518603	unidentified bacterium		337	188/194 (96%)
	AY635897	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. AMS6		321	186/194 (95%)
58	AB106390	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF06-07	309	163/164 (99%), Gaps = 1/164 (0%)
	AF269022	uncultured bacterium NoosaAW89		297	166/170 (97%), Gaps = 1/170 (0%)
59	AB106391	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF06-08	309	163/164 (99%), Gaps = 1/164 (0%)
	AF445701	uncultured candidate division TM7 bacterium		305	167/170 (98%), Gaps = 1/170 (0%)
60	AB106391	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF06-08	309	163/164 (99%), Gaps = 1/164 (0%)
	AF445701	uncultured candidate division TM7 bacterium		305	167/170 (98%), Gaps = 1/170 (0%)
61	AB106390	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF06-07	323	163/163 (100%)
	AF269022	uncultured bacterium NoosaAW89		311	166/169 (98%)
62	AB106391	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF06-08	323	163/163 (100%)
	AF445701	uncultured candidate division TM7 bacterium		319	167/169 (98%)
63	AF527581	uncultured bacterium		385	194/194 (100%)

	AB166774	uncultured bacterium	clone:UTFS-O04-12-18	385	194/194 (100%)
	AB106393	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF06-10	385	194/194 (100%)
	AB087766	uncultured bacterium	DGGE band R4-3	385	194/194 (100%)
	Y18617	Acidovorax sp. BSB421		369	192/194 (98%)
64	AF527581	uncultured bacterium		385	194/194 (100%)
	AB166774	uncultured bacterium	clone:UTFS-O04-12-18	385	194/194 (100%)
	AB106393	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF06-10	385	194/194 (100%)
	AB087766	uncultured bacterium	DGGE band R4-3	385	194/194 (100%)
	Y18617	Acidovorax sp. BSB421		369	192/194 (98%)
65	AF234738	uncultured sludge bacterium S21		385	194/194 (100%)
	AB106402	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-06	385	194/194 (100%)
	AY062127	uncultured beta proteobacterium		377	192/194 (98%)
67	AY171323	uncultured bacterium		327	183/189 (96%)
	AF445721	uncultured Bacteroidetes bacterium		287	178/189 (94%)
68	AY242725	uncultured soil bacterium		377	193/194 (99%)
	AJ318183	uncultured gamma proteobacterium		361	191/194 (98%)
69	AB106391	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF06-08	307	162/163 (99%), Gaps = 1/163 (0%)
	AF445701	uncultured candidate division TM7 bacterium		303	166/169 (98%), Gaps = 1/169 (0%)
70	AF255645	uncultured bacterium		375	189/189 (100%)
	AF255639	uncultured bacterium		375	189/189 (100%)
	AJ318142	uncultured Bacteroidetes bacterium		295	179/189 (94%)

#### Run8-22day

Clone No'	Accession	Name	Score	Identity	Gaps
2	AJ505854	Zoogloea resiniphila	381	194/195 (99%)	
	AJ505853	Zoogloea resiniphila	381	194/195 (99%)	
	AJ505852	Zoogloea resiniphila	381	194/195 (99%)	
	AJ505851	Zoogloea resiniphila	381	194/195 (99%)	

3	AJ504523	uncultured bacterium		266	180/195 (92%)
	AY098900	uncultured proteobacterium		258	179/195 (91%)
	AF441927	uncultured gamma proteobacterium		258	179/195 (91%)
4	AF314445	uncultured bacterium PHOS-HC06		387	196/196 (100%)
	AB106411	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-05	387	195/195 (100%)
	AY150279	uncultured beta proteobacterium		339	190/196 (96%)
5	AJ630275	bacterium str. 51885		353	191/195 (97%)
	AY082472	uncultured beta proteobacterium		353	191/195 (97%)
	AB111104	proteobacterium Core-1		353	191/195 (97%)
6	AF527582	uncultured bacterium		385	195/195 (100%)
	AF204249	uncultured beta proteobacterium		385	195/195 (100%)
	AB106399	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-03	385	194/194 (100%)
7	AF314445	uncultured bacterium PHOS-HC06		387	195/195 (100%)
	AB106411	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-05	387	195/195 (100%)
	AY150279	uncultured beta proteobacterium		339	189/195 (96%)
	AB106415	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-09	327	190/196 (96%), Gaps = 3/196 (1%)
	AB106416	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-10	323	188/195 (96%), Gaps = 1/195 (0%)
9	AF234738	uncultured sludge bacterium S21		377	193/194 (99%)
	AF234722	uncultured sludge bacterium H27		377	193/194 (99%)
	AF234708	uncultured sludge bacterium H11		377	193/194 (99%)
	AF234697	uncultured sludge bacterium H22		377	193/194 (99%)
	AF234693	uncultured sludge bacterium H10		377	193/194 (99%)
	AB106402	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-06	377	193/194 (99%)
	AY689093	uncultured Rhodocyclaceae bacterium		369	192/194 (98%)
10	AY095402	uncultured yard-trimming-compost bacterium		361	191/194 (98%)
	AJ300185	Thermomonas haemolytica		161	191/194 (98%)
	AB087758	uncultured bacterium	DGGE band R2-2	361	191/194 (98%)
11	AY038774	uncultured Bacteroidetes bacterium		280	179/189 (94%), Gaps = 2/189 (1%)
12	AY265880	perchlorate-reducing bacterium INS		385	194/194 (100%)

	AY265867	perchlorate-reducing bacterium ABL2		385	194/194 (100%)
	AJ422172	uncultured beta proteobacterium		385	194/194 (100%)
	AF170357	Dechloromonas sp. MissR		385	194/194 (100%)
	AB166784	uncultured bacterium	clone:UTFS-OF08-18	385	194/194 (100%)
	AB106406	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-10	385	194/194 (100%)
	AB106370	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF07-08	385	194/194 (100%)
	AB106368	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF07-06	385	194/194 (100%)
13	AF314418	uncultured bacterium PHOS-HC20		385	194/194 (100%)
	AF234726	uncultured sludge bacterium A16		385	194/194 (100%)
	AY212625	uncultured bacterium		377	193/194 (99%)
	AF527582	uncultured bacterium		345	189/194 (97%)
	AF204249	uncultured beta proteobacterium		345	189/194 (97%)
	AB106399	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-03	345	189/194 (97%)
17	AB106404	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-08	385	194/194 (100%)
	AY297809	beta proteobacterium pACH94		329	187/194 (96%)
18	AF432756	uncultured bacterium		250	175/190 (92%), Gaps = 1/190 (0%)
	AJ289963	bacterium AH47		220	174/191 (91%), Gaps = 3/191 (1%)
19	AJ505854	Zoogloea resiniphila		381	193/194 (99%)
	AB106402	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-06	313	185/194 (95%)
	AB106385	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF05-14	313	185/194 (95%)
20	AJ630275	bacterium str. 51885		353	190/194 (97%)
	AY082472	uncultured beta proteobacterium		353	190/194 (97%)
21	AY082472	uncultured beta proteobacterium		352	189/194 (97%)
	AY691423	Rhodocyclus sp. HOD 5		344	188/194 (96%)
22	AY062125	uncultured beta proteobacterium		321	186/194 (95%)
	AF502230	uncultured bacterium		321	186/194 (95%)
	AF281119	unidentified bacterium sp. sbr-gs29		321	186/194 (95%)
	AB166770	uncultured bacterium	clone:UTFS-O02-12-40	321	186/194 (95%)
	AB106400	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-04	321	186/194 (95%)

23	AY095402	uncultured yard-trimming-compost bacterium	361	191/194 (98%)	
	AJ300185	<i>Thermomonas haemolytica</i>	361	191/194 (98%)	
24	AF234738	uncultured sludge bacterium S21	377	193/194 (99%)	
	AF234722	uncultured sludge bacterium H27	377	193/194 (99%)	
	AF234708	uncultured sludge bacterium H11	377	193/194 (99%)	
	AF234697	uncultured sludge bacterium H22	377	193/194 (99%)	
	AF234693	uncultured sludge bacterium H10	377	193/194 (99%)	
	AB106402	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-06	377	193/194 (99%)
	AY689093	uncultured Rhodocyclaceae bacterium	369	192/194 (98%)	

#### Run8-36day

Clone No'	Accession	Name	Score	Identity	Gaps
5	A.I504519	uncultured bacterium	385	194/194 (100%)	
	AF431359	uncultured gamma proteobacterium	313	185/194 (95%)	
8	AF234738	uncultured sludge bacterium S21	385	194/194 (100%)	
	AF234722	uncultured sludge bacterium H27	385	194/194 (100%)	
	AF234708	uncultured sludge bacterium H11	385	194/194 (100%)	
	AF234697	uncultured sludge bacterium H22	385	194/194 (100%)	
	AF234693	uncultured sludge bacterium H10	385	194/194 (100%)	
	AB106402	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-06	385	194/194 (100%)
	AY689093	uncultured Rhodocyclaceae bacterium	377	193/194 (99%)	
9	AF538743	bacterium CAGY1	343	185/189 (97%)	
	AJ318198	uncultured Bacteroidetes bacterium	327	183/189 (96%)	
10	AF234738	uncultured sludge bacterium S21	385	194/194 (100%)	
	AF234722	uncultured sludge bacterium H27	385	194/194 (100%)	
	AF234708	uncultured sludge bacterium H11	385	194/194 (100%)	
	AF234697	uncultured sludge bacterium H22	385	194/194 (100%)	
	AF234693	uncultured sludge bacterium H10	385	194/194 (100%)	

	AB106402	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-06	385	194/194 (100%)
	AY689093	uncultured Rhodocyclaceae bacterium		377	193/194 (99%)
11	AF314445	uncultured bacterium PHOS-HC06		387	195/195 (100%)
	AB106411	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-05	387	195/195 (100%)
	AY150279	uncultured beta proteobacterium		339	189/195 (96%)
12	AB106401	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-05	335	169/169 (100%)
	AB100409	alpha proteobacterium Shinshu-ah2		272	161/169 (95%)
13	AF234738	uncultured sludge bacterium S21		385	194/194 (100%)
	AF234722	uncultured sludge bacterium H27		385	194/194 (100%)
	AF234708	uncultured sludge bacterium H11		385	194/194 (100%)
	AF234697	uncultured sludge bacterium H22		385	194/194 (100%)
	AF234693	uncultured sludge bacterium H10		385	194/194 (100%)
	AB106402	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-06	385	194/194 (100%)
	AY689093	uncultured Rhodocyclaceae bacterium		377	193/194 (99%)
15	AF502230	uncultured bacterium		377	193/194 (99%)
	AF281119	unidentified bacterium sp. sbr-gs29		377	193/194 (99%)
	AB166770	uncultured bacterium	clone:UTFS-O02-12-40	377	193/194 (99%)
	AB106400	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-04	377	193/194 (99%)
	AB106384	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF05-13	377	193/194 (99%)
	AB106366	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF07-04	377	193/194 (99%)
	AB087757	uncultured bacterium	DGGE band R2-1	377	193/194 (99%)
	BD356904	unidentified	Probes and Primers for PAOs	373	192/194 (98%)
	AF204247	uncultured beta proteobacterium		373	192/194 (98%)
16	AY444995	uncultured bacterium		369	192/194 (98%)
	AY212561	uncultured bacterium		369	192/194 (98%)
	AB174879	uncultured bacterium		369	192/194 (98%)
	AY133071	uncultured beta proteobacterium		361	191/194 (98%)
17	AJ505854	Zoogloea resiniphila		359	192/195 (98%), Gaps = 1/195 (0%)
19	AB106364	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF07-02	345	187/190 (98%), Gaps = 1/190 (0%)

	AF414444	Cytophaga sp. SA1		343	185/189 (97%)
27	AY444995	uncultured bacterium		371	194/195 (99%), Gaps = 1/195 (0%)
	AY133071	uncultured beta proteobacterium		363	193/195 (98%), Gaps = 1/195 (0%)
22	AR261333	unknown		385	194/194 (100%)
	AR255939	unknown		385	194/194 (100%)
	AB161360	Lysobacter brunescens		385	194/194 (100%)
23	AF314457	uncultured bacterium PHOS-HE99		287	178/189 (94%)
	AY509327	uncultured Bacteroidetes bacterium		256	174/189 (92%)
24	AF234738	uncultured sludge bacterium S21		361	192/194 (98%), Gaps = 1/194 (0%)
	AF234722	uncultured sludge bacterium H27		361	192/194 (98%), Gaps = 1/194 (0%)
	AF234708	uncultured sludge bacterium H11		361	192/194 (98%), Gaps = 1/194 (0%)
	AF234697	uncultured sludge bacterium H22		361	192/194 (98%), Gaps = 1/194 (0%)
	AF234693	uncultured sludge bacterium H10		361	192/194 (98%), Gaps = 1/194 (0%)
	AB106402	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-06	361	192/194 (98%), Gaps = 1/194 (0%)
	AY689093	uncultured Rhodocyclaceae bacterium		353	191/194 (98%), Gaps = 1/194 (0%)
26	AF255640	uncultured alpha proteobacterium		295	164/169 (97%)
27	AB074527	Aquaspirillum anulus		353	190/194 (97%)
28	AF255645	uncultured bacterium		375	189/189 (100%)
	AF255639	uncultured bacterium		375	189/189 (100%)
	AJ318142	uncultured Bacteroidetes bacterium		295	179/189 (94%)
31	AF314445	uncultured bacterium PHOS-HC06		371	193/195 (98%)
	AB106411	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-05	371	193/195 (98%)
	AY150279	uncultured beta proteobacterium		323	187/195 (95%)
32	AB106404	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-08	385	194/194 (100%)
	AY297809	beta proteobacterium pACH94		329	187/194 (96%)
33	AY444995	uncultured bacterium		377	193/194 (99%)
	AY212561	uncultured bacterium		377	193/194 (99%)
	AB174879	uncultured bacterium		377	193/194 (99%)
	AY133071	uncultured beta proteobacterium		369	192/194 (98%)

34	AB106418	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-12	385	194/194 (100%)
	AY540769	uncultured bacterium		369	192/194 (98%)
	AB106420	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-14	361	192/194 (98%)
	AY005031	Beta proteobacterium sp. oral strain A08KA		355	193/195 (98%), Gaps = 2/195 (1%)
35	AB106401	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-05	335	169/169 (100%)
	AB100409	alpha proteobacterium Shinshu-ah2		373	161/169 (95%)
36	AY444995	uncultured bacterium		385	194/194 (100%)
	AY133071	uncultured beta proteobacterium		377	193/194 (99%)
37	AY444995	uncultured bacterium		385	194/194 (100%)
	AY133071	uncultured beta proteobacterium		377	193/194 (99%)
38	AF392703	uncultured bacterium		311	181/189 (95%)
	M62786 M27799	Runella slithiformis		264	171/184 (92%)
40	AF527582	uncultured bacterium		385	194/194 (100%)
	AF204249	uncultured beta proteobacterium		385	194/194 (100%)
	AB106399	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-03	385	194/194 (100%)
44	AJ504560	uncultured bacterium		287	178/189 (94%)
	AY509370	uncultured Bacteroidetes bacterium		272	176/189 (93%)
45	AY628667	uncultured beta proteobacterium		313	185/194 (95%)
46	AJ252591	rhizosphere soil bacterium RSI-24		367	188/189 (99%)
	AF314430	uncultured bacterium PHOS-HE31		367	188/189 (99%)
47	AF234738	uncultured sludge bacterium S21		385	194/194 (100%)
	AF234722	uncultured sludge bacterium H27		385	194/194 (100%)
	AF234708	uncultured sludge bacterium H11		385	194/194 (100%)
	AF234697	uncultured sludge bacterium H22		385	194/194 (100%)
	AF234693	uncultured sludge bacterium H10		385	194/194 (100%)
	AB106402	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-06	385	194/194 (100%)
	AY689093	uncultured Rhodocyclaceae bacterium		377	193/194 (99%)
48	Z93972	unidentified bacterium		385	194/194 (100%)
	AB106383	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF05-12	385	194/194 (100%)

	AJ001325	uncultured beta proteobacterium		369	192/194 (98%)
51	AB106404	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-08	377	193/194 (99%)
	AY297809	beta proteobacterium pACH94		321	186/194 (95%)
54	AJ318145	uncultured bacterium		359	188/189 (99%), Gaps = 1/189 (0%)
	AB106365	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF07-03	359	188/189 (99%), Gaps = 1/189 (0%)
	AF532191	monochloroacetic-acid-degrading bacterium 'Band C'		305	154/154 (100%)
55	AF234738	uncultured sludge bacterium S21		377	193/194 (99%)
	AF234722	uncultured sludge bacterium H27		377	193/194 (99%)
	AF234708	uncultured sludge bacterium H11		377	193/194 (99%)
	AF234697	uncultured sludge bacterium H22		377	193/194 (99%)
	AF234693	uncultured sludge bacterium H10		377	193/194 (99%)
	AB106402	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-06	377	193/194 (99%)
	AY689093	uncultured Rhodocyclaceae bacterium		369	192/194 (98%)
56	AF314445	uncultured bacterium PHOS-HC06		387	195/195 (100%)
	AB106411	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-05	387	195/195 (100%)
	AY150279	uncultured beta proteobacterium		339	189/195 (96%)
58	AJ505854	Zoogloea resiniphila		357	191/194 (98%), Gaps = 1/194 (0%)
59	AJ416187	uncultured bacterium		385	194/194 (100%)
	AF431271	uncultured beta proteobacterium		361	191/194 (98%)
60	AF234738	uncultured sludge bacterium S21		385	194/194 (100%)
	AF234722	uncultured sludge bacterium H27		385	194/194 (100%)
	AF234708	uncultured sludge bacterium H11		385	194/194 (100%)
	AF234697	uncultured sludge bacterium H22		385	194/194 (100%)
	AF234693	uncultured sludge bacterium H10		385	194/194 (100%)
	AB106402	uncultured bacterium	UTFS-OF08-06	385	194/194 (100%)
	AY689093	uncultured Rhodocyclaceae bacterium		377	193/194 (99%)
61	AB166771	uncultured bacterium	clone:UTFS-O02-12-23	385	194/194 (100%)
	AB087759	uncultured bacterium	DGGE band R2-3	385	194/194 (100%)
	AF447793	uncultured beta proteobacterium		353	190/195 (97%), Gaps = 1/195 (0%)

62	AF314445	uncultured bacterium PHOS-HC06		387	195/195 (100%)
	AB106411	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-05	387	195/195 (100%)
	AY150279	uncultured beta proteobacterium		339	189/195 (96%)
63	AB021330	unidentified bacterium		377	193/194 (99%)
	AY695072	beta proteobacterium 8.1		353	190/194 (97%)
66	AF255635	uncultured bacterium		375	189/189 (100%)
	AF540038	uncultured Bacteroidetes bacterium		359	187/189 (98%)
67	Y13222	Azoarcus sp. 22Lin		329	187/194 (96%)
68	AB074527	Aquaspirillum anulus		345	189/194 (97%)
69	AF524863	bacterium 26-4b1		287	163/169 (96%)
	AF524861	bacterium K-5b5		287	163/169 (96%)
	AF524855	bacterium 26-4b9		287	163/169 (96%)
	AF524854	bacterium 26-4b1		287	163/169 (96%)
	AJ401208	Roseospira thiosulfatophila		272	161/169 (95%)
70	AY651791	uncultured bacterium		331	189/195 (96%), Gaps = 1/195 (0%)
	S55000	Burkholderia mallei		283	183/195 (93%), Gaps = 1/195 (0%)
71	AB106420	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-14	385	194/194 (100%)
	AB106418	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-12	361	191/194 (98%)
	AY084085	beta proteobacterium JDS4		345	189/194 (97%)
72	AF314445	uncultured bacterium PHOS-HC06		363	192/195 (98%)
	AB106411	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-05	363	192/195 (98%)
	AY150279	uncultured beta proteobacterium		315	186/195 (95%)
73	AF255645	uncultured bacterium		375	189/189 (100%)
	AF255639	uncultured bacterium		375	189/189 (100%)
	AJ318142	uncultured Bacteroidetes bacterium		295	179/189 (94%)
74	AY695072	beta proteobacterium 8.1		385	194/194 (100%)
	AY212638	uncultured bacterium		385	194/194 (100%)
	AY212632	uncultured bacterium		385	194/194 (100%)
	AB076845	beta proteobacterium NOS3		385	194/194 (100%)

75	AF314445	uncultured bacterium PHOS-HC06		387	195/195 (100%)
	AB106411	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-05	387	195/195 (100%)
	AY150279	uncultured beta proteobacterium		339	189/195 (96%)
76	AY509345	uncultured Bacteroidetes bacterium		335	184/189 (97%)
	AY509317	uncultured Bacteroidetes bacterium		335	184/189 (97%)
	AY095437	uncultured yard-trimming-compost bacterium		335	184/189 (97%)
68	AJ630275	bacterium str. 51885		353	190/194 (97%)
	AY082472	uncultured beta proteobacterium		353	190/194 (97%)
	AB111104	proteobacterium Core-1		353	190/194 (97%)
79	AY444995	uncultured bacterium		385	194/194 (100%)
	AY212561	uncultured bacterium		385	194/194 (100%)
	AB174879	uncultured bacterium		385	194/194 (100%)
	AY133071	uncultured beta proteobacterium		377	193/194 (99%)
80	AB106401	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-05	335	169/169 (100%)
	AB100409	alpha proteobacterium Shinshu-ah2		272	161/169 (95%)
81	AF234738	uncultured sludge bacterium S21		385	194/194 (100%)
	AF234722	uncultured sludge bacterium H27		385	194/194 (100%)
	AF234708	uncultured sludge bacterium H11		385	194/194 (100%)
	AF234697	uncultured sludge bacterium H22		385	194/194 (100%)
	AF234693	uncultured sludge bacterium H10		385	194/194 (100%)
	AB106402	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-06	385	194/194 (100%)
	AY689093	uncultured Rhodocyclaceae bacterium		377	193/194 (99%)
82	AF234738	uncultured sludge bacterium S21		377	193/194 (99%)
	AF234722	uncultured sludge bacterium H27		377	193/194 (99%)
	AF234708	uncultured sludge bacterium H11		377	193/194 (99%)
	AF234697	uncultured sludge bacterium H22		377	193/194 (99%)
	AF234693	uncultured sludge bacterium H10		377	193/194 (99%)
	AB106402	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-06	377	193/194 (99%)
	AY689093	uncultured Rhodocyclaceae bacterium		369	192/194 (98%)

83	AB166771	uncultured bacterium	clone:UTFS-O02-12-23	385	194/194 (100%)
	AB087759	uncultured bacterium	DGGE band R2-3	385	194/194 (100%)
	AY062125	uncultured beta proteobacterium		353	190/194 (97%)
84	Y09610	Tetracoccus cechii		335	169/169 (100%)
	Y09609	Tetracoccus cechii		335	169/169 (100%)
	U88042	Amaricoccus macauensis		335	169/169 (100%)
85	Z93977	unidentified bacterium		385	194/194 (100%)
	Z93974	unidentified bacterium		385	194/194 (100%)
	Z93973	unidentified bacterium		385	194/194 (100%)
	Z93969	unidentified bacterium		385	194/194 (100%)
	Z93968	unidentified bacterium		385	194/194 (100%)
	X95838	unidentified bacterium		385	194/194 (100%)
	AB106414	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-08	385	194/194 (100%)
	AB106412	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-06	385	194/194 (100%)
	AB106398	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-02	385	194/194 (100%)
	AB106397	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-01	385	194/194 (100%)
	AY133071	uncultured beta proteobacterium		369	192/194 (98%)
86	AB106401	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-05	335	169/169 (100%)
	AB100409	alpha proteobacterium Shinshu-ah2		272	161/169 (95%)
87	AJ504519	uncultured bacterium		385	194/194 (100%)
	AF431359	uncultured gamma proteobacterium		313	185/194 (95%)
88	Y13222	Azoarcus sp. 22Lin		337	188/194 (96%)
90	AY676018	uncultured Acidovorax sp.		385	194/194 (100%)
	AY345397	bacterium G14		385	194/194 (100%)
	AY250096	uncultured bacterium		385	194/194 (100%)
	AY093698	Acidovorax sp. 'smarlab 133815'		385	194/194 (100%)
	AJ514429	uncultured bacterium		385	194/194 (100%)
	AB179671	uncultured bacterium		385	194/194 (100%)
91	AY444995	uncultured bacterium		385	194/194 (100%)

	AY212561	uncultured bacterium		385	194/194 (100%)
	AB174879	uncultured bacterium		385	194/194 (100%)
	AY133071	uncultured beta proteobacterium		377	193/194 (99%)
92	AY444995	uncultured bacterium		385	194/194 (100%)
	AY212561	uncultured bacterium		385	194/194 (100%)
	AB174879	uncultured bacterium		385	194/194 (100%)
	AY133071	uncultured beta proteobacterium		377	193/194 (99%)
93	AB106404	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-08	385	194/194 (100%)
	AY297809	beta proteobacterium pACH94		329	187/194 (96%)

#### Run9-22day

Clone No'	Accession	Name		Score	Identity Gaps
3	AB106408	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-02	329	166/166 (100%)
	AY154391	uncultured epsilon proteobacterium		266	158/166 (95%)
11	AB106420	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-14	377	193/194 (99%)
	AY084085	beta proteobacterium JDS4		337	188/194 (96%)
12	AB106418	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-12	377	193/194 (99%)
	AY005031	Beta proteobacterium sp. oral strain A08KA		347	192/195 (98%), Gaps = 2/195 (1%)
14	AB106410	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-04	313	165/166 (99%)
	AF385568	TM7 phylum sp. oral clone BU080		303	166/169 (98%), Gaps = 1/169 (0%)
15	AY491594	uncultured bacterium		385	194/194 (100%)
	AF384190	Aquaspirillum sp. TG27		385	194/194 (100%)
	AB163897	uncultured bacterium		385	194/194 (100%)
	AB087773	uncultured bacterium	DGGE band R6-1	385	194/194 (100%)
	AB087764	uncultured bacterium	DGGE band R4-1	385	194/194 (100%)
18	AY037717	uncultured earthworm cast bacterium		335	169/169 (100%)
	AY005446	uncultured bacterium sp. oral clone BE109		331	168/169 (99%)
	AY675970	uncultured bacterium		329	166/166 (100%)

	AB106407	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-01	329	166/166 (100%)
	AY144356	uncultured candidate division TM7 bacterium		327	168/169 (99%)
19	AB166787	uncultured bacterium	clone:UTFS-OF09-36-43	331	167/167 (100%)
	AB106424	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-18	315	165/167 (98%)
	AF512840	Rhodococcus rhodnii		276	160/167 (95%)
20	AB106418	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-12	385	194/194 (100%)
	AY540769	uncultured bacterium		369	192/194 (98%)
	AB106420	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-14	361	191/194 (98%)
	AY005031	Beta proteobacterium sp. oral strain A08KA		355	193/195 (98%), Gaps = 2/195 (1%)
21	AY509345	uncultured Bacteroidetes bacterium		335	184/189 (97%)
	AY509317	uncultured Bacteroidetes bacterium		335	184/189 (97%)
	AY095437	uncultured yard-trimming-compost bacterium		335	184/189 (97%)
	AY218676	uncultured bacterium		327	183/189 (96%)
	AY218647	uncultured bacterium		327	183/189 (96%)
	AY211072	uncultured Bacteroidetes bacterium		327	183/189 (96%)
	AY211071	uncultured Bacteroidetes bacterium		327	183/189 (96%)
	AJ252666	agricultural soil bacterium SC-I-91		327	183/189 (96%)
	AF502209	uncultured bacterium		327	183/189 (96%)
	AF495451	uncultured eubacterium		327	183/189 (96%)
	AF491659	uncultured Bacteroidetes bacterium		327	183/189 (96%)
	AF368190	uncultured Haliscomenobacter sp.		327	183/189 (96%)
22	AB106410	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-04	329	166/166 (100%)
	AF385568	TM7 phylum sp. oral clone BU080		319	167/169 (98%)
23	AJ252591	rhizosphere soil bacterium RSI-24		375	189/189 (100%)
	AF314430	uncultured bacterium PHOS-HE31		375	189/189 (100%)
	AY217509	uncultured bacterium		359	187/189 (98%)
	AF255635	uncultured bacterium		359	187/189 (98%)
	AY509305	uncultured Bacteroidetes bacterium		351	186/189 (98%)
	AJ548891	uncultured bacterium		351	186/189 (98%)

	AF527580	uncultured bacterium		351	186/189 (98%)
	AF540038	uncultured Bacteroidetes bacterium		343	185/189 (97%)
	AY596150	uncultured bacterium		343	185/189 (97%)
	AY509277	uncultured Bacteroidetes bacterium		343	185/189 (97%)
	AY509284	uncultured Bacteroidetes bacterium		335	184/189 (97%)
	AB118935	uncultured bacterium		335	185/189 (97%), Gaps = 1/189 (0%)
	AY038773	uncultured Bacteroidetes bacterium		319	182/189 (96%)
24	AY037717	uncultured earthworm cast bacterium		335	169/169 (100%)
	AY005446	uncultured bacterium sp. oral clone BE109		331	168/169 (99%)
	AY675970	uncultured bacterium		329	166/166 (100%)
	AB106407	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-01	329	166/166 (100%)
	AY144356	uncultured candidate division TM7 bacterium		327	168/169 (99%)
25	AB166775	uncultured bacterium	clone:UTFS-O04-12-02	385	194/194 (100%)
	AB087767	uncultured bacterium	DGGE band R4-4	385	194/194 (100%)
	AF392659	uncultured bacterium		377	193/194 (99%)
	AF379029	uncultured bacterium		377	193/194 (99%)
	AY188294	uncultured bacterium		337	188/194 (96%)
	AJ504510	uncultured bacterium		329	187/194 (96%)
	AY218617	uncultured bacterium		321	186/194 (95%)
	AB087525	uncultured bacterium	clone:R6-09	319	161/161 (100%)
	AF523338	uncultured bacterium		313	185/194 (95%)
	AB087522	uncultured bacterium	clone:R6-04	311	160/161 (99%)
	AJ519662	uncultured gamma proteobacterium		305	184/194 (94%)
27	AB106410	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-04	329	166/166 (100%)
	AF385568	TM7 phylum sp. oral clone BU080		319	167/169 (98%)
29	AB106410	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-04	329	166/166 (100%)
	AF385568	TM7 phylum sp. oral clone BU080		319	167/169 (98%)
30	AB106410	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-04	313	164/166 (98%)
	AF385568	TM7 phylum sp. oral clone BU080		303	165/169 (97%)

31	AF314445	uncultured bacterium PHOS-HC06		387	195/195 (100%)
	AB106411	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-05	387	195/195 (100%)
	AY150279	uncultured beta proteobacterium		339	189/195 (96%)
32	AJ619028	uncultured bacterium		311	166/169 (98%)
	AF385568	TM7 phylum sp. oral clone BU080		311	166/169 (98%)
34	AB106408	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-02	321	165/166 (99%)
	AY331416	candidate division TM7 genomosp. P1		272	161/169 (95%)
35	TSE17591	<i>Thauera selenatis</i>		385	194/194 (100%)
	AJ315678	<i>Thauera phenylacetica</i>		385	194/194 (100%)
	AF204254	uncultured beta proteobacterium		385	194/194 (100%)
	AF204253	uncultured beta proteobacterium		385	194/194 (100%)
36	AB106410	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-04	329	166/166 (100%)
	AF385568	TM7 phylum sp. oral clone BU080		319	167/169 (98%)
37	AF513102	uncultured bacterium		335	169/169 (100%)
	AB106409	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-03	329	166/166 (100%)
	AY349415	TM7 phylum sp. oral clone HD027		327	168/169 (99%)
40	AB166785	uncultured bacterium	clone:UTFS-OF09-22-46	385	194/194 (100%)
	AB106421	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-15	385	194/194 (100%)
	AB106369	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF07-07	385	194/194 (100%)
	AB166783	uncultured bacterium	clone:UTFS-OF08-04	355	193/195 (98%), Gaps = 2/195 (1%)
	AB106405	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-09	341	191/195 (97%), Gaps = 2/195 (1%)
	AY212697	uncultured bacterium		329	187/194 (96%)
	AY540769	uncultured bacterium		321	186/194 (95%)
	AY265871	perchlorate-reducing bacterium EAB3		313	185/194 (95%)
	AF170355	<i>Dechloromonas</i> sp. NM		313	185/194 (95%)
42	AF314445	uncultured bacterium PHOS-HC06		387	195/195 (100%)
	AB106411	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-05	387	195/195 (100%)
	AY150279	uncultured beta proteobacterium		339	189/195 (96%)
43	AB106420	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-14	385	194/194 (100%)

	AB106418	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-12	361	191/194 (98%)
	AY540769	uncultured bacterium		345	189/194 (97%)
	AY084085	beta proteobacterium JDS4		345	189/194 (97%)
44	AF513102	uncultured bacterium		335	169/169 (100%)
	AB106409	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-03	329	166/166 (100%)
	AY349415	TM7 phylum sp. oral clone HD027		327	168/169 (99%)
45	AB106408	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-02	329	166/166 (100%)
	AY037717	uncultured earthworm cast bacterium		272	161/169 (95%)
	AY005446	uncultured bacterium sp. oral clone BE109		268	160/169 (94%)
	AY675970	uncultured bacterium		266	158/166 (95%)
	AY154391	uncultured epsilon proteobacterium		266	158/166 (95%)
48	AB106410	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-04	329	166/166 (100%)
	AF385568	TM7 phylum sp. oral clone BU080		319	167/169 (98%)
51	X92889	<i>Tolomonas auensis</i>		349	189/194 (97%)
52	AF431288	uncultured beta proteobacterium		369	192/194 (98%)
53	AF513102	uncultured bacterium		335	169/169 (100%)
	AB106409	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-03	329	166/166 (100%)
	AY349415	TM7 phylum sp. oral clone HD027		327	168/169 (99%)
54	AB166786	uncultured bacterium	clone:UTFS-OF09-36-04	329	166/166 (100%)
	AB106423	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-17	329	166/166 (100%)
	AB012607	<i>Micropruina glycogenica</i>		321	169/170 (99%), Gaps = 1/170 (0%)
	AJ504579	uncultured bacterium		305	163/166 (98%)
	AF128723	uncultured soil bacterium C042		301	161/164 (98%)
	AY360643	uncultured actinobacterium		297	162/166 (97%)
55	AB106410	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-04	329	166/166 (100%)
	AF385568	TM7 phylum sp. oral clone BU080		319	167/169 (98%)
56	AF314445	uncultured bacterium PHOS-HC06		387	195/195 (100%)
	AB106411	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-05	387	195/195 (100%)
	AY150279	uncultured beta proteobacterium		339	189/195 (96%)

58	AY509345	uncultured Bacteroidetes bacterium		319	183/189 (96%), Gaps = 1/189 (0%)
	AY509317	uncultured Bacteroidetes bacterium		319	183/189 (96%), Gaps = 1/189 (0%)
	AY095437	uncultured yard-trimming-compost bacterium		319	183/189 (96%), Gaps = 1/189 (0%)
	AF491659	uncultured Bacteroidetes bacterium		319	183/189 (96%), Gaps = 1/189 (0%)
59	AY037743	uncultured earthworm cast bacterium		301	179/188 (95%)
	AJ622888	Bacteroidetes bacterium Mo-0.2plat-K3		270	175/188 (93%)
60	AB166785	uncultured bacterium	clone:UTFS-OF09-22-46	385	194/194 (100%)
	AB106421	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-15	385	194/194 (100%)
	AB106369	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF07-07	385	194/194 (100%)
	AB166783	uncultured bacterium	clone:UTFS-OF08-04	355	193/195 (98%), Gaps = 2/195 (1%)
	AY265871	perchlorate-reducing bacterium EAB3		313	185/194 (95%)
	AF170355	Dechloromonas sp. NM		313	185/194 (95%)
66	AB106364	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF07-02	329	186/190 (97%), Gaps = 2/190 (1%)
	AF414444	Cytophaga sp. SA1		327	184/189 (97%), Gaps = 1/189 (0%)
67	AB106408	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-02	329	166/166 (100%)
	AY154391	uncultured epsilon proteobacterium		266	158/166 (95%)
68	AB154307	uncultured bacterium		335	184/189 (97%)
	X85210	Cytophaga sp.		327	183/189 (96%)
70	AB166785	uncultured bacterium	clone:UTFS-OF09-22-46	385	194/194 (100%)
	AB106421	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-15	385	194/194 (100%)
	AB106369	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF07-07	385	194/194 (100%)
	AB166783	uncultured bacterium	clone:UTFS-OF08-04	355	193/195 (98%), Gaps = 2/195 (1%)
	AB106405	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-09	341	191/195 (97%), Gaps = 2/195 (1%)
	AY265871	perchlorate-reducing bacterium EAB3		313	185/194 (95%)
	AF170355	Dechloromonas sp. NM		313	185/194 (95%)
71	AF513102	uncultured bacterium		303	166/169 (98%), Gaps = 1/169 (0%)
	AB106409	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-03	297	163/166 (98%), Gaps = 1/166 (0%)
	AY349415	TM7 phylum sp. oral clone HD027		295	165/169 (97%), Gaps = 1/169 (0%)
	AY144355	uncultured candidate division TM7 bacterium		295	165/169 (97%), Gaps = 1/169 (0%)

	AY134895	TM7 phylum sp. oral clone EW086		295	165/169 (97%), Gaps = 1/169 (0%)
72	AY345546	bacterium H4		353	190/194 (97%)
	AY528758	uncultured Tolomonas sp.		345	183/186 (98%)
75	AB106420	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-14	385	194/194 (100%)
	AY084085	beta proteobacterium JDS4		345	189/194 (97%)
77	AY037717	uncultured earthworm cast bacterium		313	168/170 (98%), Gaps = 1/170 (0%)
	AY005446	uncultured bacterium sp. oral clone BE109		309	167/170 (98%), Gaps = 1/170 (0%)
	AY675970	uncultured bacterium		307	165/167 (98%), Gaps = 1/167 (0%)
	AB106407	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-01	307	165/167 (98%), Gaps = 1/167 (0%)
	AY144356	uncultured candidate division TM7 bacterium		305	167/170 (98%), Gaps = 1/170 (0%)
79	AY098900	uncultured proteobacterium		331	190/195 (97%), Gaps = 2/195 (1%)
80	AF236004	beta proteobacterium A0637		369	192/194 (98%)
86	AJ619028	uncultured bacterium		319	167/169 (98%)
	AF385568	TM7 phylum sp. oral clone BU080		303	165/169 (97%)
87	AB106418	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-12	355	193/195 (98%), Gaps = 2/195 (1%)
	AY005031	Beta proteobacterium sp. oral strain A08KA		325	192/196 (97%), Gaps = 4/196 (2%)
88	RSO252591	rhizosphere soil bacterium RSI-24		375	189/189 (100%)
	AF314430	uncultured bacterium PHOS-HE31		375	189/189 (100%)
92	AF513102	uncultured bacterium		335	169/169 (100%)
	AB106409	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-03	329	166/166 (100%)
	AY349415	TM7 phylum sp. oral clone HD027		327	168/169 (99%)
93	AF502230	uncultured bacterium		385	194/194 (100%)
	AF281119	unidentified bacterium sp. sbr-gs29		385	194/194 (100%)
	AB166770	uncultured bacterium	clone:UTFS-O02-12-40	385	194/194 (100%)
	AB106400	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-04	385	194/194 (100%)
	AB106384	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF05-13	385	194/194 (100%)
	AB106366	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF07-04	385	194/194 (100%)
	AB087757	uncultured bacterium	DGGE band R2-1	385	194/194 (100%)
	BD356904	unidentified	Probes and Primers	381	193/194(99%)

AF204247 uncultured beta proteobacterium 381 193/194 (99%)

**Run9-43day**

Clone No'	Accession	Name	Score	Identity	Gaps
1	AY212743	uncultured bacterium	369	192/194 (98%)	
	AY212630	uncultured bacterium	361	191/194 (98%)	
	AY062127	uncultured beta proteobacterium	363	190/194 (97%)	
2	AB166785	uncultured bacterium	clone:UTFS-OF09-22-46	377	193/194 (99%)
	AB106421	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-15	377	193/194 (99%)
	AB106369	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF07-07	377	193/194 (99%)
	AY265871	perchlorate-reducing bacterium EAB3	305	184/194 (94%)	
3	AJ505854	Zoogloea resiniphila	351	190/194 (97%), Gaps = 1/194 (0%)	
	AJ505853	Zoogloea resiniphila	351	190/194 (97%), Gaps = 1/194 (0%)	
	AJ505852	Zoogloea resiniphila	351	190/194 (97%), Gaps = 1/194 (0%)	
	AJ505851	Zoogloea resiniphila	351	190/194 (97%), Gaps = 1/194 (0%)	
4	AJ518575	unidentified bacterium	341	191/196 (97%), Gaps = 1/196 (0%)	
	AF432251	Bacillus sp. Ellin427	244	142/147 (96%), Gaps = 1/147 (0%)	
5	AB106414	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-08	371	194/195 (99%), Gaps = 1/195 (0%)
	AB106412	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-06	371	194/195 (99%), Gaps = 1/195 (0%)
	AB106398	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-02	371	194/195 (99%), Gaps = 1/195 (0%)
	AB106397	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-01	371	194/195 (99%), Gaps = 1/195 (0%)
	AY133071	uncultured beta proteobacterium	355	192/195 (98%), Gaps = 1/195 (0%)	
6	AJ619028	uncultured bacterium	321	168/170 (98%)	
	AF385568	TM7 phylum sp. oral clone BU080	305	166/170 (97%)	
7	AF245350	uncultured bacterium SA35	363	193/195 (98%), Gaps = 1/195 (0%)	
	AF479766	Dechloromonas sp. HZ	355	192/195 (98%), Gaps = 1/195 (0%)	
8	AB106414	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-08	371	194/195 (99%), Gaps = 1/195 (0%)
	AB106412	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-06	371	194/195 (99%), Gaps = 1/195 (0%)

	AB106398	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-02	371	194/195 (99%), Gaps = 1/195 (0%)
	AB106397	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-01	371	194/195 (99%), Gaps = 1/195 (0%)
	AY133071	uncultured beta proteobacterium		355	192/195 (98%), Gaps = 1/195 (0%)
10	AF385568	TM7 phylum sp. oral clone BU080		256	159/169 (94%)
14	AY168729	uncultured bacterium		202	171/190 (90%), Gaps = 3/190 (1%)
	AY651926	Comamonadaceae bacterium MPsc		194	101/102 (99%)
17	AY212743	uncultured bacterium		361	191/194 (98%)
	AY062127	uncultured beta proteobacterium		345	189/194 (97%)
18	AY212743	uncultured bacterium		361	191/194 (98%)
	AY212630	uncultured bacterium		353	190/194 (97%)
	AB106385	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF05-14	353	190/194 (97%)
	AY062127	uncultured beta proteobacterium		345	189/194 (97%)
19	AY309106	uncultured bacterium		272	182/193 (94%), Gaps = 3/193 (1%)
	D84559	Coxiella sp.		248	178/192 (92%), Gaps = 4/192 (2%)
20	AY037717	uncultured earthworm cast bacterium		319	167/169 (98%)
	AY144356	uncultured candidate division TM7 bacterium		311	166/169 (98%)
21	AY444995	uncultured bacterium		377	193/194 (99%)
	AY212561	uncultured bacterium		377	193/194 (99%)
	AB174879	uncultured bacterium		377	193/194 (99%)
	AY133071	uncultured beta proteobacterium		369	192/194 (98%)
22	AB166787	uncultured bacterium	clone:UTFS-OF09-36-43	299	165/167 (98%), Gaps = 2/167 (1%)
	AB106424	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-18	283	163/167 (97%), Gaps = 2/167 (1%)
	AF512840	Rhodococcus rhodnii		244	158/167 (94%), Gaps = 2/167 (1%)
24	AF524863	bacterium 26-4b1		280	162/169 (95%)
	AY475196	uncultured alpha proteobacterium		270	160/168 (95%)
25	AB166787	uncultured bacterium	clone:UTFS-OF09-36-43	323	166/167 (99%)
	AB106424	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-18	307	164/167 (98%)
	AF512840	Rhodococcus rhodnii		268	159/167 (95%)
26	AY444995	uncultured bacterium		369	193/194 (99%), Gaps = 1/194 (0%)

	AY212561	uncultured bacterium		369	193/194 (99%), Gaps = 1/194 (0%)
	AB174879	uncultured bacterium		369	193/194 (99%), Gaps = 1/194 (0%)
	AY133071	uncultured beta proteobacterium		361	192/194 (98%), Gaps = 1/194 (0%)
27	AF087087	uncultured bacterium MK09		367	188/189 (99%)
	AF087081	uncultured bacterium MK24		367	188/189 (99%)
	AY038774	uncultured Bacteroidetes bacterium		202	172/190 (90%), Gaps = 4/190 (2%)
28	AJ290007	uncultured bacterium FukuN54		353	188/190 (98%), Gaps = 1/190 (0%)
	AB127780	bacterium PE03-6G1		329	185/190 (97%), Gaps = 1/190 (0%)
29	AB183858	uncultured bacterium		353	190/194 (97%)
	AY133071	uncultured beta proteobacterium		353	190/194 (97%)
30	AY543680	uncultured beta proteobacterium		385	194/194 (100%)
31	AY168740	uncultured bacterium		335	169/169 (100%)
	AJ548916	uncultured Rhodobacter sp.		335	169/169 (100%)
32	AF273082	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>		371	194/195 (99%), Gaps = 1/195 (0%)
33	AB106420	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-14	385	194/194 (100%)
	AB106418	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-12	361	191/194 (98%)
	AY084085	beta proteobacterium JDS4		345	189/194 (97%)
34	AF273082	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>		385	194/194 (100%)
35	AY037717	uncultured earthworm cast bacterium		319	167/169 (98%)
	AY144356	uncultured candidate division TM7 bacterium		311	166/169 (98%)
36	AJ252591	rhizosphere soil bacterium RSI-24		345	188/190 (98%), Gaps = 2/190 (1%)
37	Z93977	unidentified bacterium		333	192/196 (97%), Gaps = 3/196 (1%)
	Z93974	unidentified bacterium		333	192/196 (97%), Gaps = 3/196 (1%)
	Z93973	unidentified bacterium		333	192/196 (97%), Gaps = 3/196 (1%)
	Z93969	unidentified bacterium		333	192/196 (97%), Gaps = 3/196 (1%)
	Z93968	unidentified bacterium		333	192/196 (97%), Gaps = 3/196 (1%)
	X95838	unidentified bacterium		333	192/196 (97%), Gaps = 3/196 (1%)
	AB106414	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-08	333	192/196 (97%), Gaps = 3/196 (1%)
	AB106412	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF09-06	333	192/196 (97%), Gaps = 3/196 (1%)

	AB106398	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-02	333	192/196 (97%), Gaps = 3/196 (1%)
	AB106397	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-01	333	192/196 (97%), Gaps = 3/196 (1%)
	AY133071	uncultured beta proteobacterium		317	190/196 (96%), Gaps = 3/196 (1%)
41	AF234738	uncultured sludge bacterium S21		377	193/194 (99%)
	AB106402	uncultured bacterium	DGGE band UTFS-OF08-06	377	193/194 (99%)
	AY689093	uncultured Rhodocyclaceae bacterium		369	192/194 (98%)
42	AY689093	uncultured Rhodocyclaceae bacterium		369	192/194 (98%)