

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

平成 17 年度

修士論文

活性汚泥中の PHA 蓄積細菌群集の

分子生物学的手法による解析

Molecular analysis of microbial community structure of
PHA-accumulating organisms in activated sludge

2006 年 1 月提出

指導教員 佐藤 弘泰 助教授

46820 押木 守

第一章 序論	5
1-1 下水道整備のこれまでの歩み	5
1-2 本研究の背景と目的	6
1-3 本研究の論文構成	8
第二章 既往の知見の整理	9
2-1 PHA の定義と基本構造	9
2-2 生物による PHA の合成(純菌系での研究)	11
2-2-1 PHA の生体内での役割および PHA 合成代謝経路	11
2-2-2 PHA 蓄積細菌の種類	14
2-3 活性汚泥における PHA の蓄積	14
2-3-1 活性汚泥とは	14
2-3-2 標準活性汚泥法、嫌気好気法(AO 法)、嫌気無酸素好気法(A2O 法)	15
2-3-3 活性汚泥における PHA の蓄積	17
2-3-4 活性汚泥中の PHA 蓄積細菌	19
2-4 群集構造解析	21
2-4-1 単離培養法	22
2-4-2 分子生物学的手法	23
2-4-2-1 micromanipulation	24
2-4-2-2 密度分離法	26
2-4-2-3 FISH(Fluorescent in-situ hybridization)法	27
2-4-2-4 PCR(Polymerase Chain Reaction)法	29
2-4-2-5 DGGE-sequencing 法	30
2-4-2-6 Cloning-sequencing 法	32
第三章 活性汚泥の有する PHA 合成能の評価	38
3-1 実験方法	38
3-1-1 バッチ試験条件	38
3-1-2 PHA 定量法	39
3-1-3 DOC(溶存有機炭素)	41
3-1-4 イオンクロマト	41
3-1-5 MLSS および MLVSS	41
3-2 実験結果	42

3-3 考察	46
3-4 まとめ	48
第四章 二重染色法および FISH 法による活性汚泥中の PHA 蓄積細菌の群集構造解析	49
4-1 予備実験:Nile blue A と DAPI の二重染色法の最適化	49
4-1-1 Nile blue A 染色法	49
4-1-2 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) 染色法	50
4-1-3 検討結果	50
4-1-4 まとめと考察	51
4-2 実下水処理場の嫌気槽内における PHA 蓄積細菌の存在割合の評価および FISH 法を用いた群集構造解析	53
4-2-1 実験方法	54
4-2-1-1 試料準備	54
4-2-1-2 FISH 法およびプローブ陽性細菌に対する Nile blue A の二重染色法	55
4-2-2 実験結果と考察	57
4-2-3 まとめ	59
4-3 酢酸を炭素源として馴養した活性汚泥中の PHA 蓄積細菌の存在割合の評価および FISH 法を用いた群集構造解析	59
4-3-1 実験方法	59
4-3-2 実験結果と考察	59
4-3-3 まとめ	63
第五章 Micromanipulation を用いた PHA 蓄積細菌の分子生物学的同定	64
5-1 実験方法	64
5-1-1 予備実験	65
5-1-1-1 PCR における増幅下限の評価と最適な細胞壁処理法の検討	65
5-1-1-2 Nile blue A 染色が PCR に及ぼす影響の評価	67
5-1-2 活性汚泥試料	68

5-1-3 懸濁状態における Nile blue A 染色	69
5-1-4 Micromanipulation による PHA 蓄積細菌の分取	69
5-1-5 分取した細胞の 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR	71
5-1-6 PCR 産物を用いた cloning、sequencing 反応	71
5-1-7 系統樹の作成と特異的なオリゴヌクレオチドプローブの設計、適用	72
5-2 実験結果と考察	75
5-2-1 PCR における増幅下限の評価と最適な細胞壁処理法の検討	75
5-2-2 Nile blue A 染色が PCR に及ぼす影響の評価	78
5-2-3 活性汚泥試料からの PHA 蓄積細菌の分取と 16S rRNA 遺伝子に基づいた系統解析	78
5-2-4 特異的なオリゴヌクレオチドプローブの設計と活性汚泥試料への適用	80
5-2-5 Micromanipulation を用いた解析法の問題点	82
5-3 まとめ	87
第六章 Percoll を用いた PHA 蓄積細菌の分離および細菌種の分子生物学的同定	88
6-1 実験方法	88
6-1-1 密度分離法を成功させるために必要とされる PHA 含有率の計算	88
6-1-2 活性汚泥試料	92
6-1-3 バッチ試験	92
6-1-4 バッチ試験後の活性汚泥試料における PHA 蓄積細菌の存在割合の評価	92
6-1-5 活性汚泥試料の分散	93
6-1-5-1 分散に用いる機材の検討と条件検討	94
6-1-5-2 分散処理法の違いが細胞へ及ぼす影響の評価	98
6-1-5-3 分散媒の違いが及ぼす影響の評価	98
6-1-6 Percoll を用いた密度分離法の最適化	100
6-1-6-1 密度溶液に加える浸透圧調整剤が分離効率に及ぼす影響	100
6-1-6-2 密度分離を行う回数と分離効率の関係の評価	102
6-1-6-3 密度分離を行う際の試料サイズの違いが分離効率へ及ぼす影	

響	103
6-1-7 密度分離によって得られた試料における FISH を用いた、門レベルでの 群集構造解析	103
6-1-8 核酸抽出	104
6-1-9 DGGE 解析ならびに DGGE バンドの sequencing	107
6-1-10 塩基配列データの系統解析	109
6-2 実験結果及び考察	111
6-2-1 密度分離法を成功させるために必要とされる PHA 含有率の計算	111
6-2-2 密度分離に用いる活性汚泥試料の調整	114
6-2-3 分散処理方法の最適化	116
6-2-3-1 分散処理に用いる機材、処理条件の最適化	116
6-2-3-2 分散処理が細胞へ及ぼすダメージの評価	117
6-2-3-3 分散媒の最適化	117
6-2-3-4 分散処理法のまとめ	118
6-2-4 Percoll を用いた密度分離法による活性汚泥試料中の PHA 蓄積細菌の 分離・濃縮	118
6-2-4-1 Percoll を用いた密度分離法の最適化	119
6-2-4-2 バッチ試験後に採取した活性汚泥試料中の PHA 蓄積細菌の分 離・濃縮	119
6-2-5 FISH 法を用いた密度分離法によって得られた試料中の細菌叢解 析	121
6-2-6 DGGE-sequencing 法による密度分離法によって得られた試料中の細菌 叢解析	124
6-3 まとめ	144
第七章 総括	1146
参考文献	151
塩基配列一覧	162
謝辞	179

第一章 序論

本章では、まず 1-1 節において研究背景として下水道の歴史を簡略に説明した。続く 1-2 節においては、本研究の背景および目的を説明し、本研究において活性汚泥における PHA 蓄積細菌に関して研究する必要性を述べた。最後に 1-3 節で論文構成を説明することで、本研究の全体像を述べた。

1-1 下水道整備のこれまでの歩み

我々が日々排出する生活排水や、し尿が下水処理場へ集められて、浄化された後に放流するといった仕組みが整備され始めたのは 20 世紀に入ってからのことであった。下水道整備が求められた背景としては、まず都市部における衛生問題を解決するためであった。19 世紀に入って本格化した産業革命を背景に、都市部における人口集中問題が悪化するにつれて、都市部における衛生問題が取りざたされるようになった。19 世紀に欧州の都市部でコレラなどの伝染病が流行したことを皮切りに、都市部における衛生問題の解決が強く望まれるに至った。

このような衛生問題の解決を図るために、まず都市部における下水道の整備が開始されたが、当時の下水道はし尿などを集積し、河川などへ放流する役目は持っていたものの、現在の下水処理場のような浄化設備を設けていなかった。

そのため、衛生問題の次に取りざたされるようになった問題が、河川や湖沼などにおける水質汚濁である。水質汚濁問題の解決にむけて、19 世紀に散水ろ床法を用いて下水処理を行う方法が適用されるようになったが、本法では広大な施設面積を必要としたため、散水ろ床法よりも高効率な処理法が望まれていた。そのような中で 20 世紀に、汚水に空気を吹き込むことで飛躍的にその浄化能が高まることを見いだされ、これが現在なお一般的に用いられている活性汚泥法の原型となり、1914 年に活性汚泥法を用いた世界で初の下水処理場がイギリスに建設された。

日本で下水処理場が初めて建設されたのは 1922 年のことであり、三河島処理場が日本で初めて稼働されてから、1994 年には東京での下水道普及率はほぼ 100%に達し、現在では、上水道を含めて、下水道は重要な社会インフラ施設の

一つとして認識されるに至っている。

下水の浄化が進められる一方で、さらなる環境負荷の低減が望まれるようになった。これは、窒素・リンなどが閉鎖性水域へ放出されることにより富栄養化問題を引き起こすことが知られてきたためであり、下水中から有機物だけでなく、窒素やリンといった栄養塩の除去も望まれるようになり、都市部では栄養塩除去を目的とした処理方法で稼働する下水処理場も登場するようになり、その活躍の幅を広げている。

1-2 本研究の背景と目的

ある種の微生物は摂取した有機物を PHA の形態で細胞内に貯蔵する機能を有していることが知られており、この PHA は細胞が増殖する際に炭素源やエネルギープールとして用いられることが知られている。そして、活性汚泥にも PHA 合成能があることが知られており、本研究では活性汚泥における PHA 蓄積細菌の群集構造ならびに PHA 蓄積細菌の分子生物学的同定を行うことを目的としている。活性汚泥における PHA 蓄積細菌の微生物学的知見が求められている背景には以下のようなものが上げられる。

生物学的リン除去プロセスにおいては、リン除去を担う細菌(ポリリン酸蓄積細菌)が PHA を代謝することにより活性汚泥中で有利な生存戦略を図ることが知られている。そして、近年ではポリリン酸蓄積細菌と競合して増殖していると考えられる競合細菌の存在が確認されるようになり、このような競合細菌が活性汚泥中で有占することでリン除去能が失われるケースも報告されている。ポリリン酸蓄積細菌と同様に、競合細菌も PHA を代謝することが知られていることから、生物学的リン除去プロセスの活性汚泥における PHA 蓄積細菌にはポリリン酸蓄積細菌とその競合細菌が属すると考えられるが、ポリリン酸蓄積細菌や競合細菌には具体的にどのような細菌種が属するのかは現在なお全体像が明らかにされていない。ここで、生物学的リン除去プロセスの活性汚泥におけるポリリン酸蓄積細菌とその競合細菌の全体像を把握し、活性汚泥中での動態をモニタリングする技術を確立することができれば、ポリリン酸蓄積細菌とその競合細菌のポピュレーションを下水処理場におけるリン除去能を評価するための指標として利用することができる。

また、下水処理場において得られる放流水の水質予測手段として、活性汚泥プロセスを生物学的モデルとして記述した ASM(Activated Sludge Model)の利用

が進められつつある。ASM の歴史は IWA(国際水学会)が 1986 年に ASM1 を発表したところから始まり、これまでに様々な改良が加えられ、現在では ASM3 まで発表されている。1999 年に最新版である ASM3 が発表された際に加えられた改良点の一つに、活性汚泥の示す「有機物の貯蔵」が ASM 中のプロセスに加えられた点が上げられる。この貯蔵物質としては主に PHA が相当し、この成分が加えられたことにより ASM3 では活性汚泥が有機物を摂取し PHA などの形態で蓄積した後に、貯蔵物質を増殖に利用する現象が表現されるようになった。しかし、前述したように活性汚泥における PHA 蓄積細菌群集の全体像が把握されておらず、活性汚泥に PHA 蓄積能を有する細菌が何割存在するのかといった基礎的な情報も不足しているため、ASM3 において有機物の貯蔵能を有する細菌が活性汚泥中に占める割合は仮定値を用いていた。ASM3 を実務利用する場合を考えた場合には、この値は何らかの手段により評価されたものが入力されるべきであり、そのような知見が集積されることで更なる ASM の性能向上が図れる可能性がある。

また、PHA は活性汚泥からの有機物回収としても注目を浴びている。PHA は生分解性プラスチックとしての性質を有しており、将来的に予測される石油資源の枯渇に伴う石油系プラスチックの不足に対して、生分解性プラスチックの利用促進は有効な改善策であると考えられる。活性汚泥を用いた PHA の生産では、PHA 合成のための有機物は流入してくる下水中から供給されるため、安価に PHA の合成を行うことができることがメリットであるが、現在は生産した PHA の抽出・精製工程におけるコスト問題や、需要の少なさが原因となり、実現化には至っていない。しかし、石油資源の枯渇に伴い、将来的にはこのようなプロセスが実現化する可能性も十分に考えられる。また、実現化を視野にいれ、汚泥の有する PHA の生産性ならびに費用評価を行った研究報告もこれまでになされている。しかし、活性汚泥中の PHA 蓄積細菌に関する微生物学的な知見は依然として欠如したままであり、「どのような細菌種の PHA 蓄積細菌の PHA 合成能が優れているのか」といった議論はこれまでにないなかった。活性汚泥中から優れた PHA 合成能を有する PHA 蓄積細菌を同定し、そのような細菌を利用することができれば、高効率の PHA 生産システムが実現化される可能性がある。

ここまで述べてきた「ポリリン酸蓄積細菌とその競合細菌の全体像の把握」、「ASM3 の検討」、「PHA 合成能の優れた細菌種の特異性」といったこれらの明らかにされるべき要素に加え、別の側面から活性汚泥における PHA のような中間生成物の重要性が認識され始めている。従来考えられてきた活性汚泥における有機物除去のメカニズムは、有機物が微生物によって酸化分解され、その一部が細胞に同化されるというものであった。しかし、近年では有機物の摂取から分解までの過程において PHA のような中間生成物が生じることが認識されつつあり、このような中間生成物が活性汚泥の微生物群集の種構成に影響を及ぼし、さらには活性汚泥の機能(リン除去や脱窒素反応)にも影響を及ぼしていると認識され始めている。そのため、活性汚泥における有機物分解の過程を詳細に記述し、理解するためにも PHA のような中間生成物に関する更なる理解が必要不可欠であると考えられる。

そこで、本研究ではそのような目標に向けて、活性汚泥における PHA 蓄積細菌群集の構造ならびに全体像を明らかにし、活性汚泥中の主要な PHA 蓄積細菌を同定することを目指した。このような研究から PHA 蓄積細菌に関する微生物学的な知見が充実に、得られた知見を元に上記の問題解決に向けた新しい研究が展開できれば幸いである。

1-3 本研究の論文構成

本研究では活性汚泥の有する PHA 合成能、および PHA を蓄積する細菌叢の群集構造解析を行なった。以下に本論文の構成を述べる。

第二章では、PHA に関する既往の知見を整理した。

第三章では、活性汚泥に対してバッチ試験を行い、活性汚泥の有する PHA 合成能を評価する実験を行った。

第四章では、活性汚泥における PHA 蓄積細菌の存在割合を定量評価した。また、FISH 法を適用し、PAO mix、GB プローブ陽性細菌が PHA 蓄積細菌群集においてどの程度の存在割合を有しているのかを評価した。

第五章、第六章では、活性汚泥中の PHA 蓄積細菌の細菌種を同定するために、それぞれ micromanipulation、あるいは密度分離法を用いて PHA 蓄積細菌を活性汚泥から分離し、分子生物学的手法による細菌種の同定を試みた。

第七章では、第三章から第六章で得られた実験結果のまとめと、今後必要な研究に関して記述した。

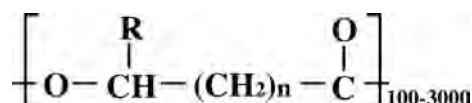
第二章 既往の知見の整理

本章では PHA に関する既往の知見を整理した。まず 2-1 節では PHA とはどのような化学物質なのかを説明した。2-2 節では PHA が微生物の細胞内でどのように合成されるのかを記述し、PHA 蓄積能を有することが知られている細菌種を整理した。2-3 節では活性汚泥プロセスに関する説明および、活性汚泥プロセスにおける PHA 蓄積細菌の知見を整理した。2-4 節では微生物群集構造解析の手法を整理した。

2-1 PHA の定義と基本構造

PHA は”PolyHydroxyAlkanoates”の略称であり、ヒドロキシル基が付随したアルカン酸を構成モノマーとし、それらがエステル結合してポリマーを形成したものである。

PHA モノマーの構造は図 2.1.1 の通りであり、構造の違いにより様々な種類の PHA モノマーが存在することが知られており、91 種類もの PHA モノマーが存在することが知られている(Steinbuchel A. *et al.*(1995))。微生物によって合成される代表的な PHA モノマーは 3HB(3-ヒドロキシ酪酸)、3HV(3-ヒドロキシ吉



	R基	名称	略称
n=1	hydrogen	poly(3-hydroxypropionate)	P(3HP)
	methyl	poly(3-hydroxybutyrate)	P(3HB)
	ethyl	poly(3-hydroxyvalerate)	P(3HV)
	propyl	poly(3-hydroxycaproate)	P(3HC)
	butyl	poly(3-hydroxyheptanoate)	P(3HH)
	pentyl	poly(3-hydroxyoctanoate)	P(3HO)
	hexyl	poly(3-hydroxynonanoate)	P(3HN)
	heptyl	poly(3-hydroxydecanoate)	P(3HD)
	octyl	poly(3-hydroxyundecanoate)	P(3HUD)
	nonyl	poly(3-hydroxydodecanoate)	P(3HDD)
n=2	hydrogen	poly(4-hydroxybutyrate)	P(4HB)
n=3	hydrogen	poly(5-hydroxyvalerate)	P(5HV)

図 2.1.1 微生物により合成される PHA の化学構造 (Wu HA. *et al.* (2003))

草酸)、4HB(4-ヒドロキシ酪酸)が上げられる。また、PHA モノマーは炭素数 3～6 の短鎖 PHA と、炭素数 7 以上の長鎖 PHA に大別される場合もある。

PHA モノマーが連結してポリマーを形成するが、同一の種類モノマーが連結したホモポリマーと、異なる種類の PHA モノマーが連結したコポリマーが存在することが知られている。微生物によって合成されるコポリマーとしては、3HB と 3HV がランダムに結合した P(3HB-co-3HV)が知られている。

PHA の分子量は合成する微生物種や、環境条件により変化するが、一般的に 50,000～1,000,000 Da の範囲であることが知られている。(Madison L.L. et al.(1999))。

PHA は細胞内ではグラニールの形態で合成されるが、PHA グラニールは図 2.1.2 のように合成される。細胞内で合成された PHA モノマー(図 2.1.2:A)は PHA syntase の働きにより連結されオリゴマーを生成する(図 2.1.2:B)。オリゴマーの鎖長と存在割合が一定値を超えると、オリゴマー同士が連結し、PHA syntase が外側になるようなミセルを形成する。ミセル同士の連結が生じると、グラニールが形成され(図 2.1.2:C)、細胞内でグラニール同士が結合して更に巨大な PHA グラニールを形成する(図 2.1.2:E)。細胞内でのグラニールの大きさや、数は細菌種によって異なり、*Wautersia eutropha* では直径 0.2～0.5 μ m の PHA グラニールが 8～13 個ほど蓄積されることが知られている(Lee S.Y. et

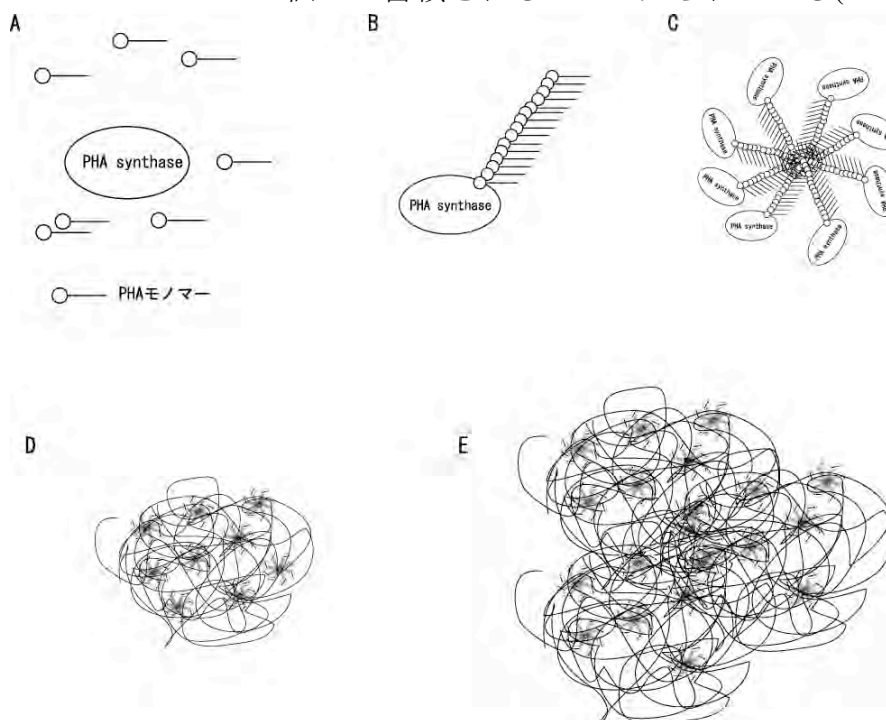


図 2.1.2 PHA グラニールの構造と、その形成過程

al.(1996)。

2-2 生物による PHA の合成(純菌系での研究)

2-2-1 PHA の生体内での役割および PHA 合成代謝経路

細胞内で合成された PHA は炭素源やエネルギーのプールとして利用されるだけでなく、余剰な還元力を相殺するためにも PHA が合成されることが知られている(Lee S.Y. *et al.*(1996))。

PHA の合成経路に関しては、*Wautersia eutropha*(旧名:*Ralstonia eutropha*、*Alcaligenes eutropha*)において最も研究されている。

一般的に PHA 合成能を有する細菌は、増殖に好ましくない環境下で炭素源が過剰に存在する場合に PHA の合成を行うことが知られている。「増殖に好ましくない環境」とは、ある種の栄養塩が枯渇した状態、あるいは利用できる電子受容体が限られている状態のことであり、そのような栄養塩としてはリンや窒素などが上げられる。以下に *Wautersia eutropha* を例に上げて、細胞内における PHA 合成反応を説明する。

Wautersia eutropha は摂取した有機物を Entner-Doudoroff 回路へ投入し、ピルビン酸を精製するが、ピルビン酸は脱水素反応によってアセチル CoA に変換され、このアセチル CoA が PHA 合成の前駆体となる。

細胞が積極的に合成を進行させている場合には、アセチル CoA は CoASH の放出を伴いながら TCA 回路(トリカルボン酸サイクル)へ流用され、そこで部分酸化を受けることで ATP の合成(実際には GTP の形で生産される)が行われる。しかし、炭素源以外の栄養素が枯渇し、細胞の増殖が制限されるような環境下では PHA の合成が進行し始める。なお、*Wautersia eutropha* では窒素、リン、酸素、マグネシウム、硫黄が PHA 合成のための制限栄養素として知られている。そのような環境下ではタンパク質の合成が停止するため、細胞内で NADH や NADPH が高濃度で存在するようになり、これらはクエン酸、イソクエン酸脱水素酵素の合成を阻害してしまう。すると、TCA 回路の効率が低下し、TCA 回路へ流用されていたアセチル CoA が PHA 合成経路へ流入するようになる。つまり、クエン酸合成酵素(Citrate synthase)の活性によって、細胞内での PHA 合成反応が調整されており、クエン酸合成酵素の活性には NADPH の存在が影響しているのである。そして、細胞内の NADPH の濃度、あるいは NADPH/NADP

の比が acetoacetyl-CoA 還元酵素や PHA 合成酵素の活性に及ぼす影響が大きく、結果的には PHA の生産性に大きく影響を及ぼすことが確認されている。

なお、摂取した有機物の種類(吉草酸など)によっては PHA 合成の前駆体としてアセチル CoA 以外の物質が合成され、それらが PHA 合成回路に流入し、PHA モノマーが合成される。

Wautersia eutropha の PHA 合成経路を図 2.2.1 に示した。3HB モノマーはアセチル CoA から合成され、3-ketothiolase、acetoacetyl-CoA reductase、PHA synthase の酵素が合成反応を触媒している(回路 I)。3-ketothiolase は 2 分子のアセチル CoA から acetoacetyl-CoA を合成し、本酵素の活性は高濃度の CoASH によって阻害されることが知られている。なお、CoASH はアセチル CoA が TCA 回路に流入している場合に放出される物質であり、TCA 回路が効率的に進行している場合には 3-ketothiolase の活性は抑えられている。NADPH 依存型の acetoacetyl-CoA reductase は R-3-hydroxybutyryl-CoA に還元する反応を触媒し、PHA モノマーの合成反応を担っている。合成された PHA モノマーを PHA synthase が鎖状に連結する。

回路 II では、3HB モノマーがアセチル CoA を経ずに生成された acetoacetyl-CoA から合成され、この反応は PHA 合成の基質に酪酸を用いた場合に進行することが知られている。

回路 III においては、3-ketothiolase が 1 分子の propionyl-CoA と 1 分子のアセチル CoA から 3-ketovaleryl-CoA を合成し、3-ketovaleryl-CoA が 3HV モノマーに還元された後に PHA synthase によってポリマーが合成される。このような回路の基質としてはプロピオン酸が上げられる。なお、プロピオン酸のみを用いた場合には 3HV モノマーだけでなく、3HB モノマーも同時に生産され、3HB と 3HV のコポリマーが生産される。3HB と 3HV のコポリマーを生産する際には、プロピオン酸とアセチル CoA の基質となる炭素源の比を調整することで、コポリマー中の 3HV の組成比を変化させることができる。

回路 IV に流入する炭素源としては吉草酸が上げられ、吉草酸を炭素源とした場合も 3HV モノマーの合成が進行する。吉草酸を基質とした場合には、酪酸を基質とした場合よりもコポリマー中の 3HV モノマーの組成比を高めることができることが知られており、吉草酸を唯一の炭素源として *Wautersia eutropha* に PHA を合成させた場合には、3HV が 90%含まれるコポリマーが合成されたことが報告されている。

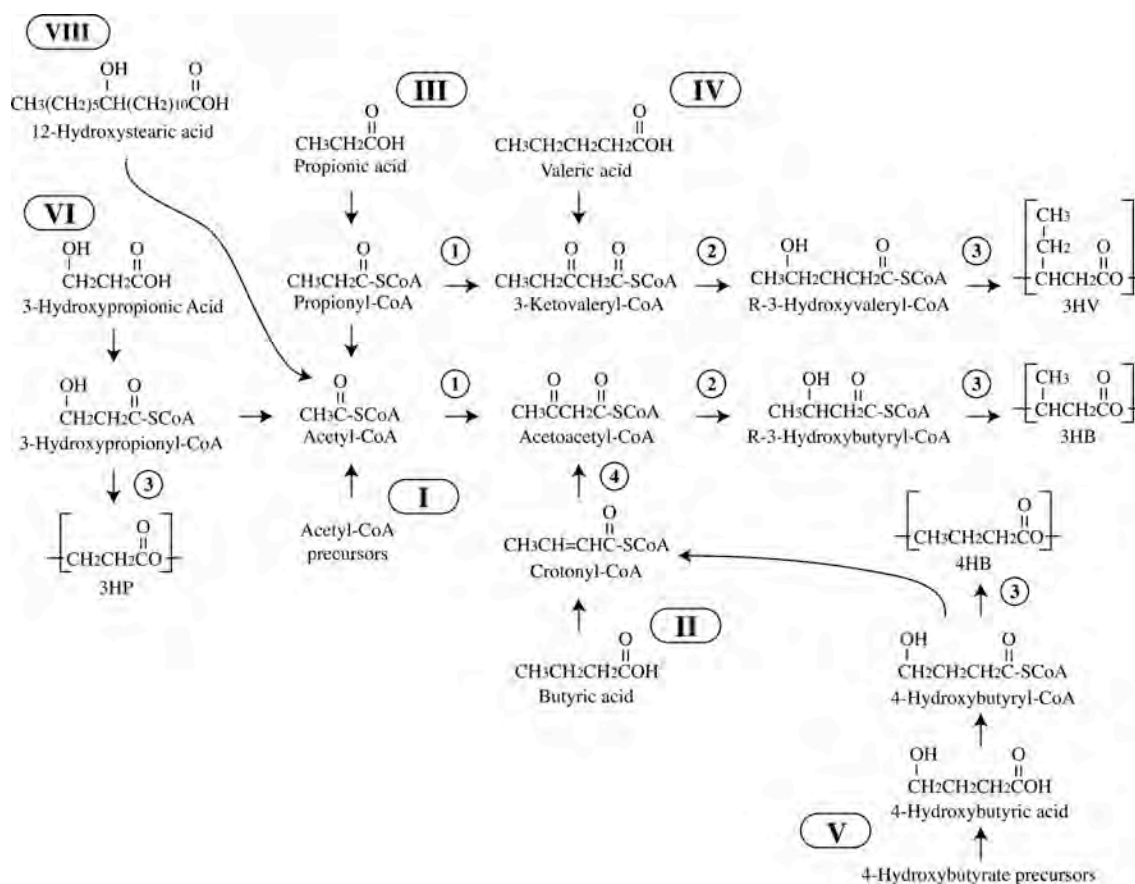


図 2.2.1 *Wautersia eutropha* における PHA 合成経路 (ただし VII 経路は *Alcaligenes AK201* に由来するものである。)また、①の経路には 3-ketothiolase、②には NADPH 依存型 acetoacetyl-CoA reductase、③には PHA synthase、④の経路には NADH 依存型 acetoacetyl-CoA reductase が関与している。Braunegg G. *et al.* (1998) より引用した。

回路 V は 4-hydroxybutyric acid から 4HB モノマーが合成される回路である。ここでは、4-hydroxybutyryl-CoA がまず合成され、PHA synthase の触媒作用によりポリマーが合成される。また、hydroxyacyl-CoA の一部は脱水反応を受けて enoyl-CoA が生成され、R-3-hydroxybutyryl-CoA を経て、3HB の合成回路へ流入する。

回路 VI、VIII はそれぞれ 3HP、2-hydroxyoctanoic acid が唯一の炭素源として存在する場合に作用することが知られており、一般的な有機物ではこの回路は進行しない。

ここまで説明した PHA 合成経路は短鎖 PHA を合成する回路である。長鎖

PHA の合成経路は長鎖脂肪酸の β 酸化が含まれている以外は、短鎖 PHA の合成経路と類似している。

2-2-2 PHA 蓄積細菌の種類

Lee S.Y. *et al.*(1996)はこれまでに PHA 蓄積能が確認されている細菌種の数 は 300 種に及ぶことを報告している。Babel W. *et al.*(2003)はこれまでに PHA 蓄積能が確認されている細菌の属をまとめており、それを表 2.2.1 に示した。ただし、この表で示されている属は、その属に含まれるある単離株が PHA 蓄積能を示したにすぎず、その属に属する全ての細菌が PHA 蓄積能を有していることを保証するものではない。事実、Ralstonia 属には株違いで PHA 蓄積能が欠如した細菌が存在する事が知られており、Solaiman D.K.Y. *et al.*(2000)の報告においても、株違いで PHA 蓄積能を損なった細菌が検出されている。

表 2.2.1 PHA 蓄積細菌が検出されている属

Achromobacter	Beggiatoa	Erwinia	Lyngbya	Oceanospirillum	Spirulina
Acidovorax	Beijerinckia	Escherichia	Mastigocladus	Oscillatoria	Staphylococcus
Acinetobacter	Benechea	Ferrobacillus	Methanomonas	Paracoccus	Stella
Actinomyces	Blastobacter	Flavobacterium	Methylobacterium	Paucispirillum	Streptomyces
Aeromonas	Bordetella	Fisherella	Methylobrevibacter	Pedomicrobium	Synechococcus
Agrobacterium	Bradyrhizobium	Gamphosphaeria	Methylococcus	Photobacterium	Synechocystis
Alcaligenes	Burkholderia	Gloeobacter	Methylocystis	Prosthecomicrobium	Syntrophomonas
Alteromonas	Calothrix	Gloeocapsa	Methylomicrobium	Pseudomonas	Telluria
Aminobacter	Caryophanon	Gloeotheca	Methylomonas	Rhizobium	Thiobacillus
Amoebobacter	Caulobacter	Gloeotrichia	Methylophilus	Rhodobacillus	Thiocapsa
Anabena	Chloroflexus	Hemophilus	Methylosinus	Rhodobacter	Thiocystis
Anaenaopsis	Chlorogloea	Halobacterium	Methylovibrio	Rhodococcus	Thiodictyon
Anacystis	Chromatium	Haloferax	Micrococcus	Rhodocyclus	Thiopodia
Aphanizomenon	Chromobacterium	Hydroclathratus	Microcoleus	Rhodomicrobium	Thiosphaera
Aphanocapsa	Clostridium	Hydrogenomonas	Microcystis	Rhodopseudomonas	Thiospirillum
Aphanotheca	Comamonas	Hydrogenophaga	Moraxella	Rhodospirillum	Tolypothrix
Aquaspirillum	Corynebacterium	Hyphomicrobium	Mycobacterium	Rubrivivax	Trichodesmium
Asticaulus	Derxia	Labrys	Mycoplasma	Schizothrix	Variovorax
Azomonas	Desulfococcus	Lactococcus	Nitrobacter	Scytonema	Vibrio
Azorhizobium	Desulfonema	Lamprocystis	Nitrococcus	Seliberia	Xanthobacter
Azospirillum	Desulfosarcina	Lampropedia	Nocardia	Sphaerotilus	Xanthomonas
Azotovacter	Desulfovibrio	Legionella	Nodularia	Sphingomonas	Zoogloea
Bacillus	Ectothiorhodospira	Leptothrix	Nostoc	Spirillum	

2-3 活性汚泥における PHA の蓄積

2-3-1 活性汚泥とは

活性汚泥とは下水に空気を吹き込み、攪拌しながら馴養した際に、増殖してくる生物集団のことを示す単語である。活性汚泥には様々な種類の微生物に加えて、古細菌と呼ばれる細菌群や、原生生物に属する生物も存在しており、複

雑な群集構造が形成されている。また、群集構造は定常的なものではなく、流入下水の変動(Crocetti G.R. *et al.*(2002)、Kong Y.H. *et al.*(2002)、Liu W.T. *et al.*(2000))、季節変動(中村ら(2004))、運転法の違い(Wagner M. *et al.*(2002))などによって変化することが知られている。

活性汚泥という複合微生物系の群集がどの程度の細菌種によって構成されているのかを調査した Wagner M. *et al.*(2002)の報告によれば、活性汚泥を構成する微生物種は平均で 94 種類(OUT:Operational Taxonomic Units)である事を報告しており、比較的単純な培地組成で馴養した活性汚泥の最も単純なもので 17 種類(OUT)、逆に実下水処理場では最大 268 種類(OUT)からなる群集構造が存在していたことが知られている。

下水の浄化には活性汚泥中の生物群が主に関与しており、生物群が下水中の有機物や栄養塩を摂取することで浄化が進行している。逆に述べるならば、生物群は有機物や栄養塩を摂取することで増殖を行っており、生物群はお互いが有機物や栄養塩を巡る競合関係にあると捉えることができる。標準的な活性汚泥の運転法においては、活性汚泥が増殖してから系外へ排出されるまでの日数(Sludge Retention Time:SRT)は 3~6 日と設定されているため、この程度の日数で増殖が可能な倍加速度を持つ生物のみが定着できることになる(衛生工学 第2版)。

2-3-2 標準活性汚泥法、嫌気好気法(AO 法)、嫌気無酸素好気法(A2O 法)

ここでは活性汚泥法の運転法として標準活性汚泥法、嫌気好気法(以後、AO 法)、嫌気無酸素好気法(以後、A2O 法)を例にあげて説明する(図 2.3.2)。

標準活性汚泥法では流入する下水はスクリーンで大型の固形物を除いたあとに、曝気槽へ送られる。曝気槽に流入した下水はエアレーションによって活性汚泥と混合攪拌され、活性汚泥中の微生物群が好気条件下で下水中の有機物を酸化分解することで下水中の有機物の除去を行う。なお、曝気槽における活性汚泥濃度(MLSS)は約 1000mg/L 程度で調整されている。続いて汚泥混合液は沈殿槽へ送られ、静置によって活性汚泥と処理水の固液分離を行う。処理水は塩素消毒等を施した後に河川へ放流され、沈殿槽で沈殿した活性汚泥の一部は曝気槽へ返送され、残りの活性汚泥は余剰汚泥として処分される。

標準活性汚泥法は有機物の除去能は優れているものの、リン除去能はそれほど高くはなく、リン除去を行う目的で運転されているものが AO 法である。AO

法では反応槽は嫌気槽と曝気槽から構成されており、流入水中の溶存態リンを好気槽でポリリン酸蓄積細菌が過剰に摂取し、そのポリリン酸蓄積細菌を余剰汚泥として引き抜くことで、リン除去を行っている。なお、ポリリン酸蓄積細菌の代謝に関しては次節で詳しく述べる。

AO 法に窒素除去能を付加させたものが A2O 法であり、反応槽は嫌気槽、無酸素槽、曝気槽から構成されており、沈殿槽で固液分離を終えた処理水の一部を無酸素槽へ返送している。これは曝気槽におけるアンモニア酸化反応により生じた硝酸態窒素を無酸素槽へ送り、無酸素条件下で脱窒素反応を進行させ、硝酸態窒素を窒素ガスの形態で系外へ排出させるためである。なお、A2O 法に

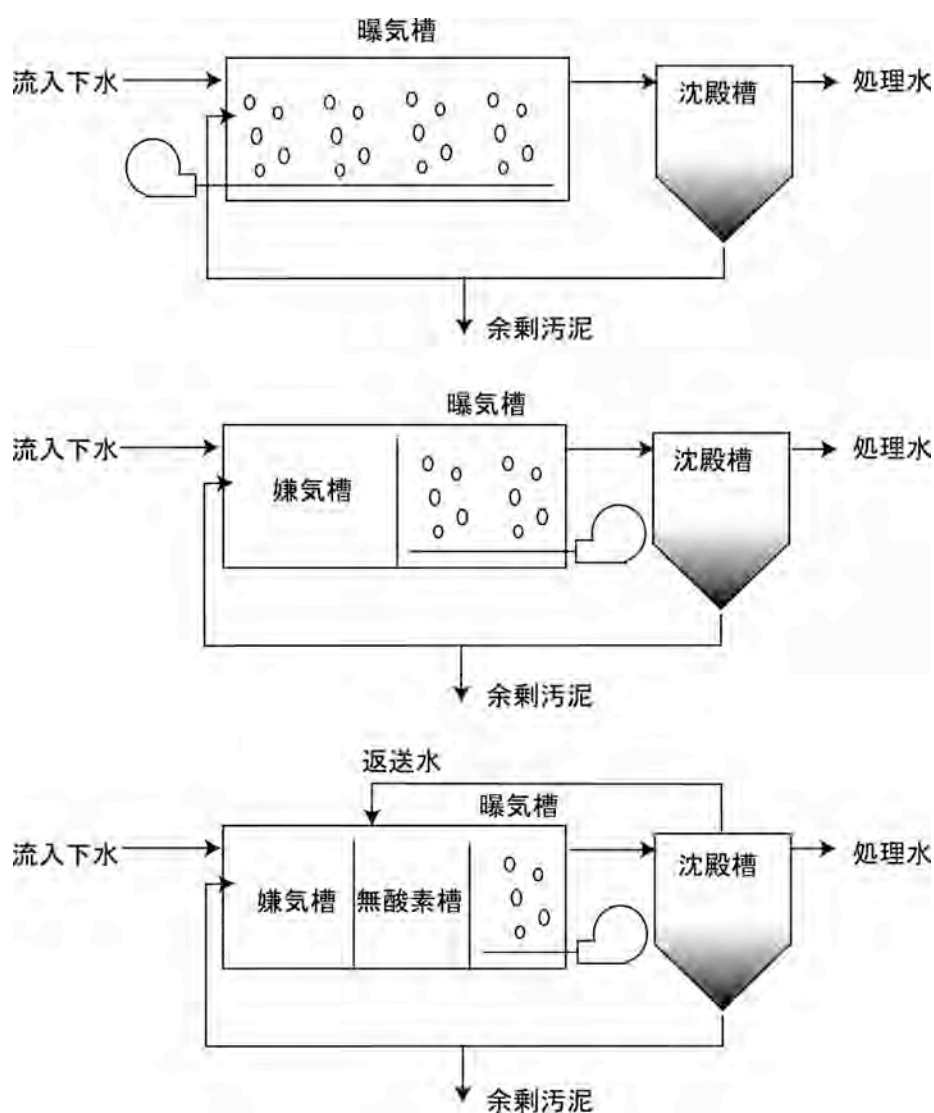


図 2.3.2 標準活性汚泥法(上)、嫌気好気法(AO 法)(中央)、嫌気無酸素好気法(A2O 法)(下)の概略図

おけるリン除去反応の原理は AO 法とほぼ同じである。

2-3-3 活性汚泥における PHA の蓄積

活性汚泥における PHA の代謝を調査した報告は、AO 法、A2O 法といったリン除去プロセスにおける代謝物質として PHA に注目して研究を行った内容と、活性汚泥を用いて可能な限り大量の PHA を合成させる PHA 生産プロセスとして注目して研究が行われたものに大別される。

まず、リン除去プロセスにおける PHA の研究が行われた理由であるが、AO 法、A2O 法のようなプロセス内ではリン除去反応を担う微生物が PHA を代謝することで活性汚泥における生存競争に勝ち残れることが知られているためである。AO 法、A2O 法では流入してきた下水は最初に嫌気槽に流入するが、嫌気槽では利用できる電子受容体(O_2 や NO_3 など)が存在しないため、一般細菌は有機物を酸化分解できず、摂取することができない。しかし、ポリリン酸蓄積細菌を代表とする一群の細菌は嫌気槽で有機物を摂取し、PHA の形態で貯蔵することができるため、流入下水中の有機物の大半を他の細菌よりも先に摂取することができる。そして続く好気槽において、貯蔵した PHA を利用して増殖を行うことで、これらの細菌は活性汚泥中で有占的に増殖することができると考えられている(Mino T. (2000))。また、ポリリン酸蓄積細菌に類似した代謝様式を有する競合細菌の存在も確認されている(Liu WT. *et al.*(1996)、Crocetti G.R. *et al.*(2002))。競合細菌の代表例としてはグリコーゲン蓄積細菌が上げられ、このような細菌も反応槽内で PHA を介した有機物の摂取と増殖を行うことが知られており、ポリリン酸蓄積細菌とは有機物摂取を巡る競合関係にある(Oehmen A. *et al.*(2004、2005))。競合細菌はポリリン酸蓄積能を有していないため、このような細菌群が活性汚泥中で有占するとリン除去能が失われてしまうため、リン除去能悪化の一つの原因として考えられている。つまり、リン除去プロセスの処理性能に関与するポリリン酸蓄積細菌やグリコーゲン蓄積細菌を代表とする競合細菌が、いずれも PHA を代謝することがわかっていることから、リン除去プロセスにおいて PHA に注目した研究が行われてきたのである。

また、PHA の生産プロセスとして活性汚泥に注目して行われた研究報告も数多くなされており、これらは下水中の有機物を利用して安価に PHA を合成・回収することで、PHA を生分解性プラスチックとして利用することを将来的に目指す研究である。通常の嫌気好気法において、活性汚泥は数%の PHA 含有率

を示すにすぎないが、PHA 蓄積能の高い細菌種を活性汚泥中に有占化させ、酢酸などの有機物を用いて PHA を合成させることにより、PHA 含有率を数十%まで高めることができることが知られている。このような研究において明らかになった知見には次のようなものが含まれる。

1. 嫌気好気法で準用した活性汚泥に限らず、活性汚泥は PHA 蓄積能を有する。
2. PHA を合成させる際に用いる有機物としては酢酸のような低級脂肪酸が適している。
3. PHA 合成における環境要因によって、PHA 合成能が変化する。

高畠(2000)の報告では、嫌気好気法に限らず、標準活性汚泥法から採取した活性汚泥も PHA 合成能を有していることを報告しており、この結果から PHA 合成能を有する細菌が活性汚泥には広く分布していると考えられる。しかし、PHA 蓄積能が標準活性汚泥法のような系において、どのようなメリットを細菌に付与しているのかは不明である。

また、PHA 合成に用いる有機物として酢酸を用いた場合に最も高い PHA 含有率を示すことが確認されており(高畠 (2000)、Lemos P.C. *et al.*(2004))、炭素源の違いが PHA 含有率に及ぼす影響は Beccari M. *et al.*(2002)においても報告されている。嫌気好気法の反応槽においては流入する下水中の易分解性の成分を主に利用して PHA を合成することが知られており、遅分解性の成分は易分解性の成分に変換された後に PHA 合成の基質となることが知られている(Carucci A. *et al.* (2001))。

PHA 合成における環境要因により PHA 合成能が変化することは複数の研究者によって確認されており、Chua A.S.M *et al.*(2003)の報告では pH の影響が非常に大きい影響を及ぼすことが確認されており、Chinwetkitvanich S. *et al.*(2004)らはリン酸濃度と水温の及ぼす影響を報告している。

以上の知見から、活性汚泥は運転法に関わらず一般的に PHA 蓄積能を有しており、PHA を代謝する細菌がリン除去プロセスにおいては重要な役割を果たしていることがわかっている。また、PHA 生産プロセスにおいては PHA 合成能の高い細菌種を活性汚泥中に有占化させることが、大量の PHA を獲得するには重要であると考えられる。

2-3-4 活性汚泥中の PHA 蓄積細菌

活性汚泥が PHA を蓄積することは知られているものの、細菌種の同定はあまり行われておらず、活性汚泥における PHA 蓄積細菌の群集構造には未知の部分が多く残されている。本節ではこれまでに活性汚泥中で PHA 蓄積能が確認されている細菌種に関して整理する。

1) ポリリン酸蓄積細菌:特に *Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*”に関して

ポリリン酸蓄積細菌は、リン除去プロセスにおいてリン除去反応に関与する細菌群である。ポリリン酸蓄積細菌に属する細菌で、リン除去プロセスにおいて重要な細菌として考えられている細菌種が *Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*”と、Actinobacteria 門に属する uncultured bacterium である(Seviour R.J. *et al.*(2000))。この中で Actinobacteria 門に属する uncultured bacterium は PHA の蓄積を行わないが(Kong Y *et al.*(2005)、*Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*”は PHA を蓄積することが Liu WT. *et al.*(2001)によって確認されている。

残念ながら、*Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*”の単離培養は未だ進んでおらず、リン除去プロセスにおけるポリリン酸蓄積細菌の PHA の代謝は *Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*”の純菌系からではなく、*Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*”を含む活性汚泥から得られた結果である。現在までに考えられている、リン除去プロセスにおけるポリリン酸蓄積細菌の PHA 代

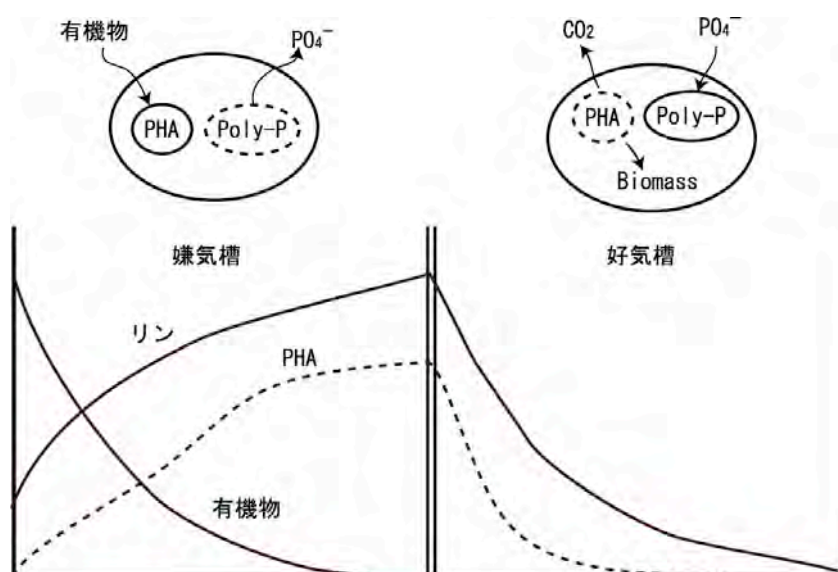


図 2.3.3 リン除去プロセスにおけるポリリン酸蓄積細菌の代謝

謝反応を図 2.3.3 にまとめた。ポリリン酸蓄積細菌は前段の嫌気槽において細胞内に蓄積していたポリリン酸(Poly-P)を加水分解しながら、有機物を摂取し、PHA を合成する。この際にポリリン酸を分解してリン酸を放出するため、嫌気槽におけるリン濃度は増加する。続く好気槽では PHA を炭素源としたバイオマスの合成を行い、この際に水溶液中のリン酸を過剰に摂取し、ポリリン酸として細胞内に蓄積する(Mino T. (2000))。

細胞内で PHA はバイオマス合成のための炭素源としてでなく、リン酸摂取のためのエネルギープールとしても利用されている。リン除去プロセスの悪化の一つの原因として降雨が上げられるが、これは降雨によって流入する下水水量が増加し、ひいては嫌気槽に持ち込まれる流入下水中の溶存酸素も多くなるため、嫌気槽で嫌気状態が保てず、細胞内の PHA 含有率が低下することにより引き起こされると考えられている(Brdjanovic D. *et al.*(1998))。

2) グリコーゲン蓄積細菌: 特に *Candidatus “Competibacter phosphatis”* に関して

グリコーゲン蓄積細菌はポリリン酸蓄積細菌に類似した代謝様式を持ち、嫌気槽での有機物の獲得を巡って、ポリリン酸蓄積細菌とは競合関係にあるとされている。ポリリン酸蓄積細菌が嫌気槽において有機物を摂取するためにポリリン酸を主なエネルギー源として使用しているのに対して、グリコーゲン蓄積細菌は有機物摂取のエネルギー源をグリコーゲンの分解によって得ている点が、ポリリン酸蓄積細菌とグリコーゲン蓄積細菌の主な違いである。なお、グリコーゲン蓄積細菌は好気槽では PHA を消費しながら、バイオマスの合成とグリコーゲンの蓄積を行っている。グリコーゲン蓄積細菌はポリリン酸蓄積能を有していないため、グリコーゲン蓄積細菌が有占した活性汚泥ではリン除去能が著しく低下してしまい、リン除去プロセスの悪化の要因になりうると考えられている。

グリコーゲン蓄積能を有する細菌種は複数種知られているが、ポリリン酸蓄積細菌との競合を起こしている細菌としては *Candidatus “Competibacter phosphatis”* が知られている。この細菌の PHA 蓄積能は Crocetti G.R. *et al.*(2002) において確認されており、実処理場に広く分布していることが知られている(Wong M.T. *et al.*(2004))。また、*Candidatus “Competibacter phosphatis”* とポリリン酸蓄積細菌である *Candidatus “Accumulibacter phosphatis”* の摂取できる基質の種類が極めて類似していることが Kong Y.*et al.*(2006、online early issue)において確

認されており、この報告は *Candidatus* “*Competibacter phosphatis*”がポリリン酸蓄積細菌と有機物を巡る競合細菌であることを裏付けている。

Candidatus “*Competibacter phosphatis*”以外のグリコーゲン蓄積としては *Amaricoccus* 属細菌(Falvo A. *et al.*(2001)、Kong Y.H. *et al.*(2002))、*Defluvicoccus* 属細菌(Kong Y.H. *et al.*(2002)、Wong M.T. *et al.*(2004))、*Micropruina* 属細菌(Shintani T. *et al.*(2000)、Kong Y.H. *et al.*(2002))、*Sphingomonas* 属細菌(Beer M. *et al.*(2004))などが知られている。

3) その他の PHA 蓄積細菌

活性汚泥中には前述したようなポリリン酸蓄積細菌やグリコーゲン蓄積細菌以外にも PHA 蓄積能を有する細菌種が存在すると考えられる。なぜならば、これまで活性汚泥における PHA 蓄積細菌の群集構造を解明しようとする目的で研究が積極的になされなかったためである。そのため、これまでに活性汚泥から同定された PHA 蓄積細菌の多くに関しては、単離培養後に生理学的特徴を調べる際に偶然 PHA を蓄積する事が確認されたことによって PHA 蓄積細菌であることがわかったという場合が多く(例えば Gumaelius L. *et al.*(2001))、活性汚泥中の PHA 蓄積細菌を標的として単離培養を試みた報告は限られている(Liu WT. *et al.*(2000))。

また、ポリリン酸蓄積細菌やグリコーゲン蓄積細菌が有占していないと考えられる標準活性汚泥法においても PHA の合成能があることが知られていることから、このような活性汚泥中にはこれまでに知られていない PHA 蓄積細菌が多く存在していることが推察される。

2-4 群集構造解析

本研究の目的の一つは、活性汚泥のような複雑な細菌種で構成される細菌叢の中で PHA を蓄積する細菌種を特定しようとするものである。すなわち、群集構造解析の目的は「複雑な種類の生物がいる中でだれが何をしているのか？」を特定することであると言える。本節では群集構造解析に用いられてきた手法を単離培養法と分子生物学的手法に大別し、それぞれの知見を整理した。

2-4-1 単離培養法

単離培養法は最も古くに用いられた群集構造解析の手法であり、生物群をしかるべき培地で培養し、単一な細菌種に分離することで特定の生物を獲得し、その生理学的特徴を決定することにより、生物群にどのような細菌が存在し、どのような機能を有しているのかということを明らかにすることを目指すものである。

単離培養法は Robert Koch が 19 世紀終わりに初めて寒天培養法を考案してから、様々な微生物研究者により用いられてきた実績があり、長年に渡って微生物学では単離培養法は非常に重宝されてきた。

しかし、単離培養法の問題も近年明らかとなっており、Amann R.(1995) は単離培養法を活性汚泥に適用した場合に、単離培養法によって特定できる細菌の割合は全菌中の 1~15% であるとしており、大半の微生物は単離培養法では特定できないことを報告している。これには様々な原因が寄与しているものと考えられるが、主な原因として考えられるものは「最適な培養条件が設定できない」ということである。すなわち、培養に用いた培地が不適切なため、ある種の生物が成育できなかったことや、寒天培養法や試験管培養では環境条件を微細に設定できないことなどが原因の一つになっていると考えられる。

大部分の細菌が培養困難であるという問題に加えて、細菌の倍加速度の違いも群集構造解析の結果に影響を及ぼすことが知られている。すなわち、細菌叢において非常に少数の存在割合しかない細菌種が、単離培養法の結果では主要な細菌種として検出される場合がある。これは単離培養に用いた培地が、特定の細菌を生育するのに最適であったため、特定の細菌の倍加速度が非常に高くなったことが原因となって生じるものである。そのため、単離培養後に得られた菌種が元々の菌叢において、主要な構成種であったかどうかは単離培養法だけでは結論づけることは困難である。

ここまでに述べた単離培養法の問題点は群集構造の全体像を漏れなく把握しようとする際には致命的であるが、注目したい細菌種が定まっており、その細菌が培養可能な見込みがあるならば、単離培養法は極めて優れた手法であることは間違いない。なぜならば単離培養法では生物を生きた状態で獲得できることから、バッチ実験によって代謝様式の特徴付けが極めて容易に行えるためである。この後に述べる分子生物学的手法はおおまかに言うてしまえば、培養困難な微生物が存在するために登場してきた手法であり、培養可能ならば分

子生物学的手法を適用すべき必要性も減じられてしまう。

2-4-2 分子生物学的手法

分子生物学的手法は主に遺伝子情報を利用する手法であり、遺伝子情報、すなわちゲノム DNA などの核酸上の塩基配列から、細菌種や代謝機能を解析する手法である。

分子生物学的手法が本分野に持ち込まれ広まった背景には、前述した培養困難な細菌の存在があり、分子生物学的手法が培養に依存することなく解析を行うことが可能であることが理由として上げられる。

分子生物学的手法を用いた解析を行うに当たって、注目される遺伝子マーカーとしては 16S rRNA 遺伝子や特定の代謝機能をコードする機能遺伝子がよく用いられる。16S rRNA 遺伝子は種間保存性が高く、生物の進化速度を比較的反映していることが知られているため、細菌種の推定によく用いられる遺伝子マーカーである。特定の代謝機能をコードする機能遺伝子としては、例えばアンモニア酸化酵素をコードする *amoA* 遺伝子などを上げることができ、代謝機能に注目して群集構造解析を行いたい場合に汎用されるマーカーである。

16S rRNA 遺伝子マーカーはそのデータベースがきわめて充実しているために細菌種の推定を行うには適しているが、検出された細菌種が特定の代謝機能を有していたかどうかを断定するには、別途の解析によって確認されなければならない。対して、代謝機能をコードする機能遺伝子をマーカーとした場合には、代謝機能に注目して細菌種の特定を行える点が優れているが、注目した機能遺伝子のデータベースが不足している場合には細菌種の特定が困難である点や、16S rRNA 遺伝子のように種間保存性の高い遺伝子でない場合には細菌種ごとに塩基配列が大きく異なり、そのような塩基配列を網羅的に検出することが機能遺伝子の場合には困難である点などが問題点として上げられる。

本研究では、分子生物学的手法を用いて PHA 合成能を有する細菌種の特定を目指しているが、同様の目的で、PHA の合成に関与する酵素をコードする遺伝子を遺伝子マーカーとして群集構造解析を行った例がこれまでに報告されている(Yilmaz S. *et al.*(2005)、道中 (2006))。活性汚泥のような複合微生物系から PHA 蓄積細菌の細菌種を同定する場合において、PHA 合成に関与する機能遺伝子に注目する利点は次の 2 点があげられるであろう。まず、PHA 蓄積細菌は表 2.2.1 のように系統学的に多岐に分布しているということと、もう一点は PHA

蓄積細菌の場合には株レベルでの細菌種の違いにも関わらず PHA 蓄積能が確認されない場合があるという点である(Sheu D.S. *et al.*(2000))。このような場合には PHA 合成能に直接関与する機能遺伝子に注目することは有効な手段であると考えられ、上述した研究では PHA synthase をコードする *phaC* 遺伝子に注目した研究を行っており、活性汚泥中にこれまでに知られていないタイプの *phaC* 遺伝子が存在していることが確認されている。

しかし、*phaC* 遺伝子のデータベースが比較的不足しているため、これらの研究において検出された PHA 蓄積細菌の細菌種を *phaC* の塩基配列から厳密に推定することはできていなかった。また、これらの研究では後述する PCR 法を用いており、PCR 法において表 2.2.1 のような幅広い細菌種の *phaC* 遺伝子を検出できる PCR プライマーが必要であったが、*phaC* 遺伝子を標的とする PCR プライマーの設計は Sheu D.S. *et al.*(2000)、Hai T. *et al.*(2001、2004)、Yilmaz S. *et al.*(2005)によって行われているものの、既知の PHA 蓄積細菌の *phaC* 遺伝子を全て検出対象とするような PCR プライマーは設計できないことが明らかとなっている。そのため *phaC* 遺伝子に注目した研究の問題点は、活性汚泥のような複合微生物系においては PHA 蓄積細菌の群集構造の全体像を検出できていない恐れがあることと、検出された細菌種の特定が困難である点である。

対して、本研究では 16S rRNA 遺伝子マーカーに注目して活性汚泥中の PHA 蓄積細菌を同定することを目指した。上述した理由により 16S rRNA 遺伝子だけでは PHA 蓄積細菌を同定することは困難であると考えられるため、活性汚泥中の PHA 蓄積細菌のみを分離し、分離された PHA 蓄積細菌の 16S rRNA 遺伝子を解析することをめざした。以降の節では活性汚泥から PHA 蓄積細菌を分離するために本研究で用いた、micromanipulation と密度分離法に関する既往の知見を整理し、続いて本研究で用いた 16SrRNA 遺伝子の解析手法に関して記述した。

16SrRNA 遺伝子の解析手法は後述する PCR 法を介在しないものと、そうでないものに大別することができ、PCR 法を介在しない手法として FISH 法を、PCR を介在する方法として DGGE 法と cloning 法に関して原理を説明する。

2-4-2-1 micromanipulation

本研究では micromanipulation によって PHA 蓄積細菌を活性汚泥中から分離することを目指した。Micromanipulation とは先端径の非常に小さいキャピラリー

一などを用いて、目的とする細胞を操作しようとするものである。

Micromanipulation において細胞を操作するための装置は大別して機械的な装置を用いるものと、レーザーのような光学系装置を用いるものに大別することができる(Brehm-Stecher B.F. *et al.*(2004))。機械的な装置による操作において最も一般的に用いられるものはガラスキャピラリーであり、顕微鏡観察下でキャピラリーを用いて細胞に対して操作を行う手法である。

これに対してレーザーのような光学系装置を用いて細胞の操作を行う手法も開発されており、高エネルギーなレーザーを利用することで細胞のトラップや移動、分離を行うことが可能である。しかし、このような方法では細胞がレーザーなどのエネルギーを吸収し、加熱されてしまうため、機械的な装置を用いる方法よりも細胞に対するストレスが高い手法であるとされている(Brehm-Stecher B.F. *et al.*(2004))。

ガラスキャピラリーを用いて複合微生物中に存在する特定の微生物を操作しようとする試みは、単離培養を行う前処理として用いられたのが原点であり、micromanipulation と培養法を組み合わせることにより新規に単離された細菌も多く存在する。例えば、Maszenan A.M. *et al.*(1997)は活性汚泥中において観察された tetrad-forming bacteria を micromanipulation により分取し、通常の寒天培地へ移動させた後に培養した結果、Amaricoccus 属に属する新規な細菌を単離することに成功している。

また、近年では興味のある細菌を micromanipulation により分取した後に、その細胞を PCR の鋳型として用い、分取した細菌の細菌種を特定する試みも用いられており、培養困難な細菌の細菌種を特定するための手法として利用され始めている。

Frohlich J. *et al.*(1999)は、原虫である *Pentarihomonoides scroa* の細胞をガラスキャピラリーを用いて分離した後に、*Pentarihomonoides scroa* の細胞内に共生する細菌の SSU rDNA 配列を Nested PCR により増幅し、その塩基配列を特定することで、この共生細菌が *Cryptotermes domesticus* と相同性の高い細菌であること確認している。彼らは他にも腸内に生育する鞭毛虫の細胞を分取し、SSU rDNA を Nested PCR により増幅することで、この鞭毛虫が *Koruga bonita* と相同性の高い種であることを特定することに成功している。

Snaidr J. *et al.*(2002)は活性汚泥に存在する糸状菌をガラスキャピラリーを用いて分取し、これらの糸状菌の単離培養は成功しなかったものの、分取した細胞

の 16S rRNA 遺伝子を解析することで、糸状菌が α -proteobacteria に属する *Nostocoida limicola* II に近縁な細菌であることを確認している。

また、Thomsen T.R. *et al.*(2004)は活性汚泥に FISH を行った後に、 β -proteobacteria に特異的なオリゴヌクレオチドプローブの蛍光を有する細菌をガラスキャピラリーで分取した後、16S rRNA 遺伝子を解析することで、この細菌が *Aquaspirillum* 属と相同性が高いことを確認することに成功した。そして、さらに検出した細菌に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを設計し、放射性同位体を用いた実験を行うことで、この細菌が脱窒素細菌であることを確認している。

このように micromanipulation は単離培養のためだけではなく、現在では興味のある細菌の細菌種を特定するための手法としても普及しつつある。なお、Frohlich J. *et al.*(1999)や Snaidr J. *et al.*(2002)は細菌の形態的な違いに基づき細胞の分取を行い、Thomsen T.R. *et al.*(2004)はオリゴヌクレオチドプローブの蛍光に基づいて細胞の分取を行っているが、本研究のように Nile blue A という化学染色を施した後に、細胞を分取し、その 16S rRNA 遺伝子を解析する試みはこれまでに報告されていない。

2-4-2-2 密度分離法

シヨ糖や Percoll といった比重の高い溶液に試料を懸濁させ、浮遊密度で分離しようとするものが密度分離法である。

密度分離で目的とする細菌を分離するために必要な条件は、目的とする細菌とその他の細菌の間に浮遊密度の差が存在することである。ここで活性汚泥内に存在する細菌叢の持つ浮遊密度の範囲は複数の研究者によって調査されており、Mueller *et al.*(1967)の報告では $1.08 \sim 1.10 \text{g/cm}^3$ の範囲であり、Dammel E.E. *et al.*(1991)の報告では $1.02 \sim 1.06 \text{g/cm}^3$ の範囲とされている。

また、細胞の浮遊密度は一定なものではなく、生育条件(Nishino T. *et al.*(2003))や細胞内蓄積物質の存在によって変化することが報告されている。活性汚泥中で代謝される細胞内蓄積物質としては 1.ポリリン酸、2.PHA、3. Glycogen が代表的なものであるが、これまでに報告されているそれぞれの浮遊密度を表 2.4.1 に示した。これらの細胞内蓄積物質を細胞内に有する事によって細胞の浮遊密度が変化することは Guerrero R. *et al.*(1984)、Mas J. *et al.*(1985)、Pedros-Alio C. *et al.*(1985)によって確認されており、特に純菌に PHA を蓄積させた場合は最大で

表 2.4.1 ポリリン酸、グリコーゲン、PHA の浮遊密度 (Kondo *et al.* (2005) をもとに作成)

対象		浮遊密度	密度分離法	参照
ポリリン酸	Acineto bacter with polyP	1.01-1.08	Percoll密度勾配	Suresh N. <i>et al.</i> (1985)
	Pseudomonas vesicularis with polyP	1.13	Percoll密度勾配	Suresh N. <i>et al.</i> (1985)
	PolyP	1.23	ショ糖密度勾配	Friedberg I <i>et al.</i> (1968)
グリコーゲン	Glycogen	1.26-1.29	Percoll密度勾配	Mas J <i>et al.</i> (1985)
PHA	PHB	1.23-1.25	乾燥重量	Dawes E.A. <i>et al.</i> (1973)
	PHB	1.19-1.23	NaBr	Nickerson K.W. (1982)
	PHB	1.15	Percoll密度勾配	Mas J <i>et al.</i> (1985)

0.02g/cm³ の浮遊密度の変化が報告されている。

活性汚泥において密度分離法を適用し、細菌の単離培養あるいは細菌種の群集構造解析を行った報告がこれまでになされている。

Scherer P. *et al.*(1983)はメタン発酵を行っている活性汚泥に対して Percoll を用いた密度勾配遠心分離法を適用し、活性汚泥中の細菌を浮遊密度の差で分離できることを確認している。

Nakamura K. *et al.*(1991)はポリリン酸蓄積細菌が高い浮遊密度を持つことを利用して、ショ糖による密度分離により活性汚泥からポリリン酸蓄積細菌を分離し、ポリリン酸蓄積細菌 *Microthrix phosphovorax* を得る事に成功している。

また、Zilles J.L. *et al.*(2002)は活性汚泥中のポリリン酸蓄積細菌を Percoll により濃縮し、得られた試料から clone library を作成して系統解析を行っており、密度分離法が単離培養を目的とした実験以外にも利用価値があることを報告している。

2-4-2-3 FISH(Fluorescent in-situ hybridization)法 (Amann R. *et al.*1995)

FISH 法は簡単に述べるならば「蛍光物質を検出対象と交雑させ、その蛍光を検出する」という技術である。我々が行う通常行う FISH 法においては「蛍光物質」が蛍光物質を付加したオリゴヌクレオチドプローブであり、「検出対象」が細胞内でプールされている 16S rRNA となり、光学顕微鏡により蛍光の観察を行う。

FISH 法において重要となるものがオリゴヌクレオチドプローブである。オリゴヌクレオチドプローブとは人工的に合成した短鎖の核酸であり、オリゴヌクレオチドプローブは検出したい細菌の 16S rRNA にのみ相補的になるように設計がなされる。

FISH 法の優れた点は、核酸抽出や PCR におけるバイアスを受けることのない” *in-situ*”な解析であることが上げられる(*in-situ* とはラテン語で「その場での」という意味)。すなわち、PCR 法によってある細菌種が試料中において主要な細菌種であると同定されたとしても、それは核酸抽出や PCR の工程を経ることによって得られた誤った結果である恐れがあるため、その細菌種が試料中において主要な細菌種であったかを結論づけるためには FISH 法によって同定されなければならない。ただし FISH 法にも以下のような短所があり、これらの問題点を把握した上で利用されるべきである。

1. 全菌中の 1%程度の存在割合を有していない細菌の細胞は観察が非常に困難になる。
2. 16S rRNA の部位によってはオリゴヌクレオチドプローブの *accessibility* が非常に低くなり、検出が困難となる。
3. 細菌の生育条件によっては細胞内の 16S rRNA の転写量が少ないために検出が困難となる。
4. 細胞壁処理が適切に行われていない場合には、オリゴヌクレオチドプローブが細胞内へ浸透できないために検出ができない。

FISH 法で細菌の細胞を検出するため工程は大きく分けて 3 工程に分割される。すなわち、1. 細胞壁処理(固定、場合によっては酵素処理も加える)、2. *hybridization*、3. 観察である。

細胞壁処理の目的はオリゴヌクレオチドプローブが細胞内に浸透できるように細胞壁に穴を空けることである。そのような処理を固定処理というが、一般的な固定方法はパラホルムアミドかエタノールを用いたものである。パラホルムアミド固定は比較的温和な固定法であるので、細胞壁の厚いグラム陽性細菌には不適な方法であり、グラム陽性細菌の検出を行う場合にはエタノール固定を行う場合が多い。また、グラム陽性細菌の中にはエタノール固定だけでは不十分なものも存在し、そのような細菌には酵素処理(*Lysozyme*、*Proteinase K* など)により更に細胞壁処理を行う。

Hybridization においてはプローブを細胞内に浸透させ、目的としている細菌の 16S rRNA に特異的に結合させることが目的である。オリゴヌクレオチドプローブは目的とする細菌の 16S rRNA にのみ結合するような塩基配列で設計されているが、類似した塩基配列を持つ 16S rRNA に対して非特異的な結合を生

じる場合がある。そのため、hybridization ではホルムアミド濃度を適切に調整したバッファーにより、オリゴヌクレオチドプローブが標的とする塩基配列にのみ結合する条件を作りだすことが重要である。Hybridization を終えた後に、結合していない余剰なオリゴヌクレオチドプローブを洗浄によって除去することで、検出した細菌の 16S rRNA にのみ特異的にオリゴヌクレオチドプローブが結合した状態にすることができる。

観察にはオリゴヌクレオチドプローブに標識した蛍光物質の励起・蛍光波長を観察するのに最適な光学系フィルターを装着した顕微鏡を用い、試料中から細菌が検出されるかどうかを確認する。

2-4-2-4 PCR(Polymerase Chain Reaction)法

PCR 法は目的とする遺伝子を増幅し、増幅産物をしかるべき方法によって検出することを主たる目的として用いられる。前述した FISH 法では存在割合が 1% 以下の細菌は検出が困難であることを問題点として上げたが、PCR 法は原理上では 1 copy の遺伝子も検出可能であり、非常に検出感度の高い手法であると言える。また、FISH 法において、検出したい対象の細菌の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列情報がデータベースに登録されていない場合にはオリゴヌクレオチドプローブが設計できないため、そのような場合にはその細菌種の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列情報を獲得する必要がある。

PCR 法に必要なものは増幅したい遺伝子に特異的な塩基配列を持つプライマーセットと、DNA polymerase、遺伝子増幅において基質となる dNTP、鋳型となる試料である。これらを混合した後に温度変化を加えることで遺伝子増幅を行うが、まず高温(95℃程度)で鋳型 DNA を二本鎖から一本鎖へ熱変成させ、続いてプライマーセットが目的遺伝子上の結合部位に特異的に結合できる温度まで低下させ、プライマーの結合部位を起点とした伸長反応を行うために再度加熱(72℃程度)する。この一連の反応により一本の鋳型 DNA が二本となり、反応を繰り返すことで目的遺伝子は指数的に増加する。

PCR 法は高感度で目的遺伝子を検出できる優れた手法であるが、PCR 法を介して、細菌叢の群集解析、または細菌種の推定を行う場合に、いくつかの問題が生じる場合があることが知られている。Wintzingerode F.V. *et al.*(1997)はそのような問題点を整理しており、問題は以下の要素に起因することを報告している。

1. 核酸抽出における細胞破碎処理と、核酸の抽出工程
2. PCR 増幅における反応阻害物質の存在
3. PCR における鋳型ごとの増幅効率の差
4. キメラ DNA の生成
5. 試料汚染
6. マルチプルオペロンに起因する問題

PCR を介した細菌叢の群集構造解析を行う場合には、上の問題を把握した上で結果を解釈すべきであり、これらの影響を最小にするべく操作を行うことが重要である。

2-4-2-5 DGGE-sequencing 法

環境試料中の細菌叢がどのような細菌種によって構成されているのかを簡便に推測する方法にはいくつかの方法があるが、DGGE 法もその一つである。同じ 16S rRNA 遺伝子でも細菌種ごとに塩基配列に違いがあるため、細菌種ごとに 16S rRNA 遺伝子の GC 含量に違いがあるが、DGGE 法ではこの GC 含量の違いに基づいた分離を行い、細菌種の違いを評価する。

DGGE 法が複合微生物系の群集構造解析に用いたのは *Muyzer et al.*(1993)の報告に始まり、これまでに様々な研究者によって用いられてきた。DGGE 法では GC クランプと呼ばれる GC-rich な塩基配列を forward primer の 5'側に付加したプライマーセットで増幅し、続いてホルムアミドの変成勾配のついたポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行うことによって増幅産物を分離する。この際に増幅産物は図 2.4.1 のような構造をしており、この増幅産物は変成剤濃度の低いところでは二本鎖を保っているが(1.の状態)、変成剤濃度が高くなってくると、GC クランプ以外の箇所が解離をはじめ(2.の状態)、最終的には GC クランプの部分以外は完全に解離する(3.の状態)。3.の状態になると、増幅産物の泳動速度が鈍り、ある位置で固定されてしまう。環境試料に対して DGGE を適用すると、GC 含量の違いによって解離を生じる位置が細菌種ごとに異なるため、それぞれの細菌種に由来した DGGE バンドとして検出されることになる。DGGE 法ではこのようにして環境試料中の群集構造を把握することが可能である。

DGGE 法により分離された DGGE バンドを有する細菌種を特定したい場合には、対象となる DGGE バンドをゲル上から切り出し、塩基配列を特定する操作を加えて行う。

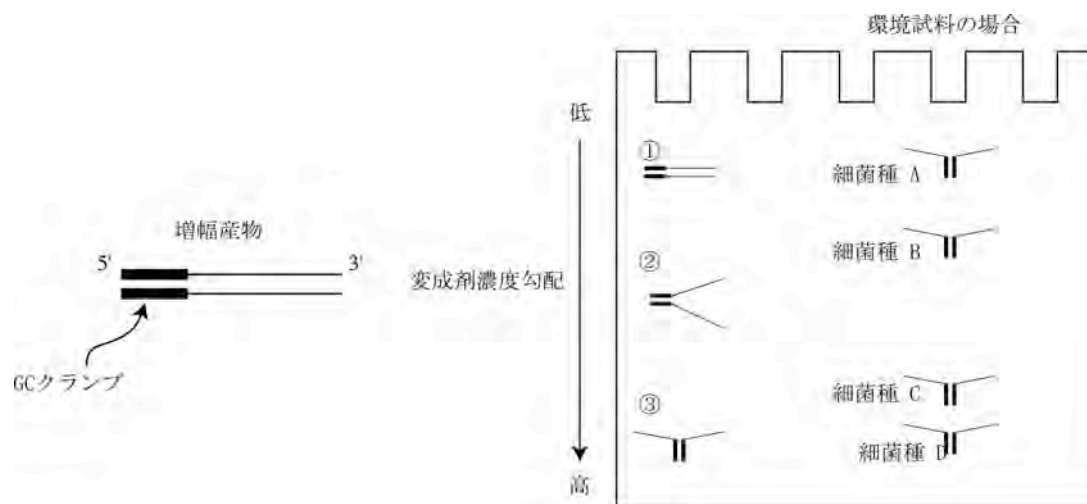


図 2.4.1 DGGE 法の原理

群集構造解析を目的とした手法として DGGE 法の優れた点は、結果を得るまでに要する時間が約 1 日と短時間であり、試料中の細菌叢の複雑さ(complexity)を素早く把握することが出来る点である。

逆に DGGE 法の短所は 1.解析に供する際の増幅産物の長さ、プライマーセットに制限があること、2.増幅対象とした領域における GC 含量の分布、3.塩基配列を解読するまでに要する時間などがあげられる。

まず、DGGE 法を行う際には増幅産物の塩基長を 500bp 以下にすることにより解析能が向上することが報告されており(Myers R. M. *et al.*(1985))、かつ、プライマーが混合塩基を含まないことが求められるため(Kowalchuk G.A. *et al.*(1997))、使用するプライマーセットに制限が生じてしまう。また、16S rRNA 遺伝子配列から細菌種の推定を行い、その後のプライマーセットの設計などを行う場合には、全長に近い領域を解析することが望ましいが、そのような場合にも 500bp という制限は短所となってしまう。

DGGE 法では雑多な塩基配列を GC 含量の違いに基づいて分離しているが、異なる細菌種にも関わらず同程度の GC 含量を有するような塩基配列を分離するには DGGE 法は不向きである。原理的には DGGE 法で解析する領域において細菌種ごとの GC 含量の分布が大きいほど解析能は高まるとされ、16S rRNA 遺伝子においては解析に適さない領域があることが知られている(Yu Z. *et al.*(2004))。

そして、DGGE-sequencing 法により塩基配列の解読を行った場合には、全て

DGGE バンドから塩基配列を解読するまでに行う精製操作に時間を要するだけでなく、精製を行っても解読することが難しい DGGE バンドが存在することが経験的に知られている。そのため、DGGE バンドを切り出し、塩基配列を解読する作業までを含めて考えた場合には、DGGE 法は必ずしも迅速な解析手法とは言えない。

最後にこれまでに生物学的リン除去プロセスの活性汚泥から回収した 16S rRNA 遺伝子配列に対して DGGE 法を適用して解析した報告を表 2.4.2 にまとめた。なお、表 2.4.2 では本研究室の成果は含めなかった。

2-4-2-6 Cloning-sequencing 法

Cloning によりクローンライブラリを作成し、そのクローンを解析する方法も群集構造解析を目的として広く用いられる手法である。DGGE 法と同じく、cloning も雑多な塩基配列をそれぞれの種類に分別するために用いられる。図 2.4.2 に cloning 法の原理を示した。

まず、PCR によって得られた増幅産物と、Vector と呼ばれる一部が解離した環状 DNA を混合し、適切な酵素処理により、増副産物が挿入した環状 DNA を作成する。この環状 DNA は一般にプラスミドと呼ばれ、続いてこのプラスミドを大腸菌などの宿主細胞内へ挿入させる。ここで、種類の異なるプラスミドが同じ細胞内に保有されることはない。続いて、細胞を平板培養すると、1 細胞から 1 個のコロニーが形成されるため、それぞれのコロニーは異なるプラスミドを有しており、それぞれのコロニーを別途回収することで、元々は雑多な塩基配列が混じっていた試料からそれぞれの種類の塩基配列を得る事ができる。

Cloning においてプラスミドへ適切に増幅産物が挿入されたかを確認するために、これまでに様々な改良が加えられており、アンピシリンを併用したブルーホワイトカラーセクションなどが一般的に用いられている。

回収したコロニーは”クローン”と呼ばれ、このクローンが持つ塩基配列を解読することで細菌種の推定を行うことが可能である。

Cloning 法の短所は群集構造を網羅的に解析するためには、相当数のクローンの塩基配列を解読するために必要となる時間と費用が上げられる。しかし、クローニングでは配列長の制限を受けることなく解析ができるなどの長所もあるため、目的によって cloning 法を使い分けることが重要であると言える。

最後にこれまでに生物学的リン除去プロセスの活性汚泥から回収した 16S

表 2. 4. 2 生物学的リン除去活性汚泥に対して DGGE 法を適用した研究報告の整理

リアクターの条件	馴養に用いた基質	解析した領域	DGGEプライマーセット	検出された細菌種	参照
嫌気好気SBR(SRT=7day) 炭素源の摂取のみ良好 リン除去能悪化	合成排水(酢酸、酵母エキス)	V6-V8	968f-1392r	全6バンドを解析した中で、 5バンド γ -proteobacteria 1バンド α -proteobacteria γ -proteobacteria 5バンドの中で、 4バンド <i>Candidatus competibacter phosphatis</i>	Nielsen A.T. et al.(1999)
嫌気好気SBR P/C比の設定により リン含有率の高い(12%)リアクター リン含有率の低い(2%)リアクター	合成排水(酢酸、ペプトン)	V6-V8	968f-1392r	リン含有率12%から5バンドを解析し、 2バンド α -proteobacteria 1バンド γ -proteobacteria 2バンド Actinobacteria リン含有率2%から4バンドを解析し、 1バンド α -proteobacteria 1バンド γ -proteobacteria 1バンド 非緑色硫黄酸化細菌 1バンド Actinobacteria	Liu WT. et al.(2000)
嫌気好気SBR(SRT=8~10day)	合成排水(酢酸、グルコース)	V6-V8	968f-L1401	全6バンドを解析した中で 2バンド β -proteobacteria 4バンド Actinobacteria	Kong Y.H. et al.(2001)
嫌気好気SBR	合成排水(酢酸)	V6-V8	968f-1392r	バンドの特定は行っていない	Fang H.H.P. et al.(2002)
窒素・リン除去SBR	合成排水(酢酸、硝酸)	V3-V5	357f-907r	全15バンドの2バンドを解析 2バンド β プロテオバクテリア その内の1バンドはPAO mix陽性細菌	Ahn J. et al.(2002)
1.嫌気好気連続式リアクター(SRT=10day) 2.嫌気好気連続式リアクター(SRT=10day) 3. 2のリアクターを二ヶ月運転したもの 4. 嫌気好気SBR(SRT=8day)	合成排水,低P/C比 合成排水,高P/C比 合成排水,高P/C比 初沈越流水	V6-V8	968f-139r	全12バンドを解析した中で、 3バンド α -proteobacteria 1バンド β -proteobacteria 5バンド γ -proteobacteria 1バンド Cyanobacter 1バンド Chlamydiales γ -proteobacteria 5バンドの中で、 2バンド <i>Candidatus competibacter phosphatis</i>	Schuler A.J. et al.(2002)
Kong Y.H. et al.(2001)と同じ		V3-V5	ALF1F-907r	全9バンドを解析 9バンド α -proteobacteria	Beer M. et al.(2004)

rRNA 遺伝子配列から全菌を増幅対象とした PCR を行い、クローンライブラリを作成した報告を表 2.4.3 にまとめた。なお、表 2.4.3 では本研究室の成果は含まなかった。

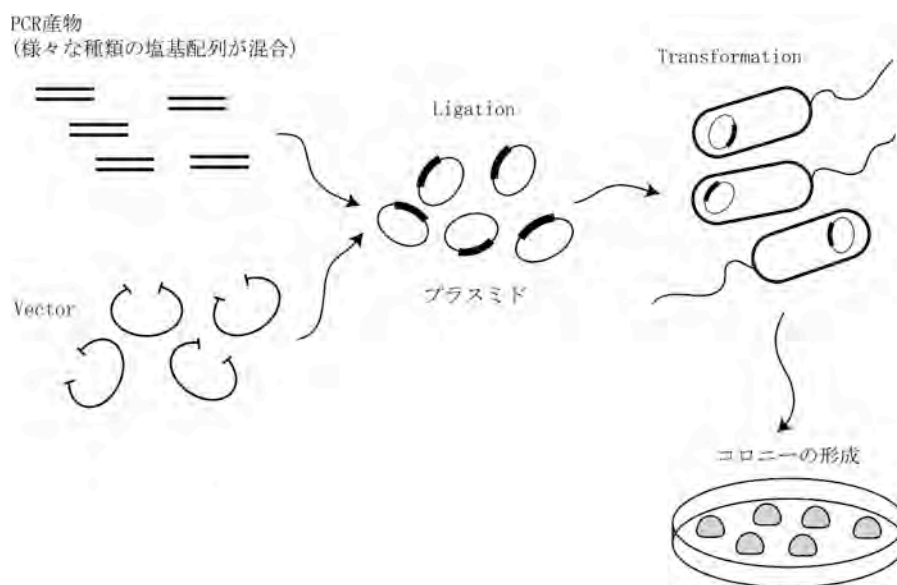


図 2.4.2 Cloning 法の原理

表 2.4.3 生物学的リン除去プロセスに対してクローンライブラリ法を適用した報告例

リアクターの条件	プライマーセット	活性汚泥のリン除去能および検出された細菌種	参照
嫌気好気SBR 生下水	27f AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 1492r TACGGYTACCTTGTTACGACTT	SBR1:リン除去良好 (生下水に酢酸を加えて添加、 リン除去良好) SBR2:リン除去悪化 (生下水のみ)	α -proteobacteria(SBR1(11/97clone)、SBR2(14/91clone)) β -proteobacteria(SBR1(30/97clone)、SBR2(21/91clone)) Rubrivivax(SBR1(14/30clone)、SBR2(16/21clone)) Rhodocyclus(SBR1(12/30clone)、SBR2(3/21clone)) γ -proteobacteria(SBR1(4/97clone)、SBR2(3/91clone)) Planctomyces(SBR1(11/97clone)、SBR2(8/91clone)) CFB group(SBR1(4/97clone)、SBR2(10/91clone))
連続式リン除去リアクター SRT=12day 合成排水(酢酸)	27f(Blackall C.C. et al.(1994)) 1492r(Blackall C.C. et al.(1994))	リン除去良好 TP=10%	α -proteobacteria(9/51clone) β -proteobacteria(4/51clone) γ -proteobacteria(4/51clone) δ -proteobacteria(1/51clone) Actinobacteria(19/51clone) Planctomyces(5/51clone) Flexibacter(5/51clone) other(4/51clone)
嫌気好気SBR SRT=7day 合成排水 (酢酸、酵母エキス)	6f GGAGAGTTAGATCCTGGCTCAG 1510r GTGCTGCAGGTTACCTTGTTACGACT	リン除去良好	ライブラリの解析結果の詳細は無し RHC439プローブ(targeting Rhodocycles-relating PAO)陽性細菌が全菌 の89%を占めていたにも関わらず、ライブラリからは検出されず。
嫌気好気SBR 合成排水(酢酸)	プライマーは明記されていない	リン除去良好 A sludge TP=15% B sludge TP=17% GRC sludge TP=7%	α -proteobacteria(A(38/281clone)、B(32/250clone)、P(5/89clone)) β -proteobacteria(A(13/281clone)、B(44/250clone)、P(15/89clone)) Actinobacteria(A(67/281clone)、B(22/250clone)、P(8/89clone)) CFB groupA(83/281clone)、B(52/250clone)、P(45/89clone))
Lab scale 連続式リン除去リアクター SRT=7day 合成排水 (酢酸、ペプトン プロピオン酸)	EUB008f TGAGCCAGGATCAAACTCT EUB1512r TACCTTGTTACGACTT	リン除去良好、TP \approx 10%	α -proteobacteria(7/150clone) β -proteobacteria(21/150clone) {Candidatus "Accumulibacter phosphatis"(21/21 clone)} γ -proteobacteria(11/150clone) δ -proteobacteria(2/150clone) CFB group(75/150clone) {Cytophaga-Flavobacterium(65/75clone)} {Flexibacter(7/75clone)} {Bacteroides(3/75clone)} Actinobacteria(14/150clone) {Actino_1101プローブ陽性細菌(14/14clone)} Actinobacteria(7/150clone) Fibrobacter(13/150clone)
嫌気好気SBR SRT=30day 合成排水(酢酸)	27f GAGTTTGATCMTGGCTCAG 1491r GNTACCTTGTTACGACTT	リン除去良好	α -proteobacteria(4/92clone) β -proteobacteria(16/92clone) {Candidatus "Accumulibacter phosphatis"(4/16clone)} γ -proteobacteria(5/92clone) δ -proteobacteria(3/92clone) Cytophagales(35/92clone) other(29/92clone)

リアクターの条件	プライマーセット	活性汚泥のリン除去能および検出された細菌種	参照
嫌気好気SBR(SRT=9day)	8f	pH7.0で運転した期間	Zhang T. et al.(2005)
SRT=9day	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	リン除去良好	
合成排水(酢酸)	1501r		
	GGTTACCTTGTTACGACTT		
		α -proteobacteria(35/108 clone)	
		{Defluviococcus近縁種(11/35clone)}	
		β -proteobacteria(48/108 clone)	
		{Candidatus "Accumulibacter phosphatis"(19/48 clone)}	
		{Dechloromonas近縁種(16/48clone)}	
		γ -proteobacteria(1/108 clone)	
		Bacteroidetes(2/108 clone)	
		Chlorobi group(17/108 clone)	
		{uncultured bacterium clone EBPR4(17/17clone)}	
		Actinobacteria(5/108 clone)	
		pH6.5で運転した期間	
		リン除去悪化、炭素源摂取良好	
		α -proteobacteria(36/103clone)	
		{Sphingomonas近縁種(10/36clone)}	
		β -proteobacteria(35/103clone)	
		{Janthinobacterium近縁種(11/35clone)}	
		{Dechloromonas近縁種(10/35clone)}	
		γ -proteobacteria(18/103clone)	
		Bacteroidetes(2/103clone)	
		Chlorobi group(12/103clone)	

第三章 活性汚泥の有する PHA 合成能の評価

本章では実下水処理場より採取した活性汚泥の持つ PHA 合成能、ならび PHA 転換率を評価するために酢酸を唯一の炭素源としたバッチ試験を行った。活性汚泥の持つ PHA 合成能、PHA 転換率を評価する因子としては、1. バッチ試験時の電子受容体の違い、2. 活性汚泥試料が馴致されていた運転法の違い、3. 活性汚泥試料を採取した処理場の違いに注目し、それぞれの因子が PHA 合成能、PHA 転換率に及ぼす影響を評価した。

3-1 実験方法

3-1-1 バッチ試験条件

実下水処理場の好気槽末端部より活性汚泥を採取し、氷上冷却しながら実験室へ持ち帰った。なお、バッチ試験は汚泥採取から 3 時間以内に開始した。表 3.1.1 の組成の培地 1 および 2 をそれぞれ等量混合し、混合液を更に 100 倍希釈した培地を作成し、採取した活性汚泥を調整した培地で 3 回洗浄した(2,800g、5 分間、4℃)。活性汚泥試料の MLSS が約 500mg/L 以下となるように培地で希釈し、1L のバッチ試験容器へ移した。電子受容体として亜硝酸、あるいは硝酸を用いるもの、嫌気条件下でバッチ試験を行う系においては、バッチ試験を通して窒素ガスを流入させ、好気条件ではエアープンプによるエアレーションを行った。DO メーターにて亜硝酸、硝酸、嫌気の系の DO 濃度が 0mg/L となったことを確認してから酢酸を添加し、2 時間のバッチ試験を開始した。バッチ試験時の pH は 1N H_2SO_4 と 1N NaOH を用いて 7.8～8.3 で維持した。バッチ試験の概要を図 3.1.1 に示す。

培地 1	[g/10L]	培地 2	[g/10L]
$\text{CaCl}_2(2\text{H}_2\text{O})$	8.8	K_2HPO_4	18.0
$\text{MgCl}_2(6\text{H}_2\text{O})$	90.7	KH_2PO_4	14.0
KCl	42.0		
NH_4Cl	17.6		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	21.6		

表 3.1.1 バッチ試験に用いた培地の組成(なお、リン酸の析出・沈殿を防ぐために培地は 1 および 2 に分けて調整した。)

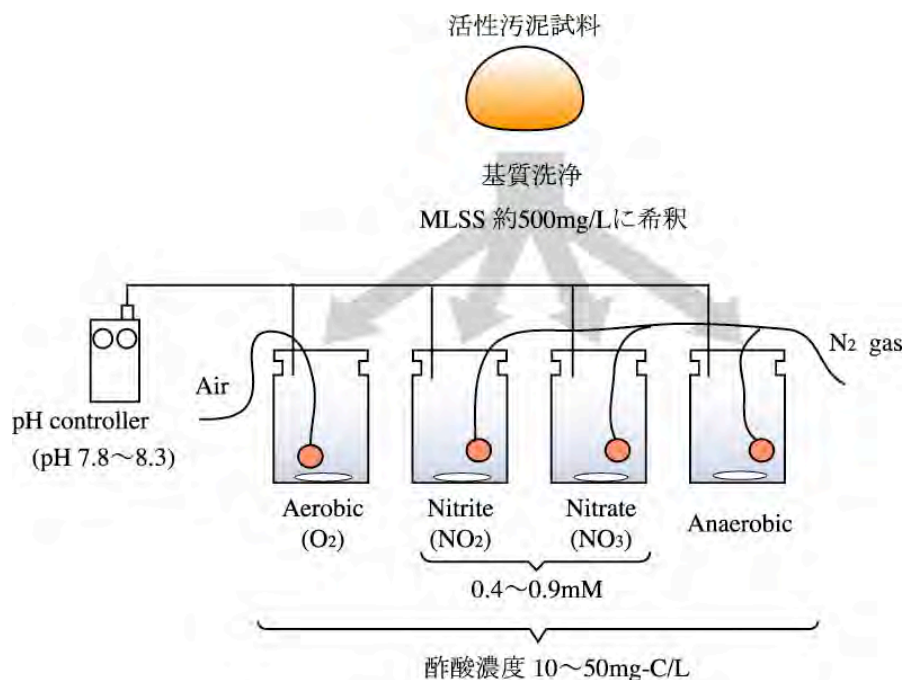


図 3.1.1 バッチ試験の概要

高濃度の亜硝酸、硝酸は炭素源の取り込みを阻害することが知られているため(Saito *et al.* (2004))、バッチ試験を通して亜硝酸、硝酸が低濃度で存在するように、バッチ試験中に適宜添加する必要があった。そこで、亜硝酸、硝酸の系では Kong *et al.* (2004)のバッチ試験条件を参考にして、亜硝酸、硝酸濃度が 0.4~0.9mM を維持するように亜硝酸ナトリウム、硝酸ナトリウム溶液を 1 時間ごとに添加した。

今回は PHA を合成させるための炭素源として酢酸を用い、バッチ試験を通して 10~50-mg-C/L を維持し、枯渇することがないように 1 時間ごとに添加した。

なお、今回用いた酢酸 CH_3COOH は、分子中に 4 個ある水素原子[H]を重水素で置換したものをを用いた。これは第六章で述べる PHA 蓄積細菌を他の細菌と密度差を利用して分画しようとする際に、重水素で置換した酢酸から PHA を合成させ、合成された PHA の密度を更に高める狙いがあったためである。

3-1-2 PHA 定量法

2 時間のバッチ試験前後の活性汚泥中の PHA 含有率を評価した。佐藤らの方法(1993)を基本として、定性・定量を行なった。

まず、活性汚泥サンプル 10ml を遠心分離(2,150g、5 分、室温)し、上澄みを除去し、残った汚泥ペレットを冷凍庫の中で予備凍結させた。凍結した活性汚泥ペレットを凍結乾燥させ、ミクロスパーテル等で凍結乾燥汚泥を粉末状に破碎した。内部標準物質として 200mg/L の安息香酸を含んだ 10%硫酸酸性メタノール 2mL とクロロホルム 2mL を加えて激しく攪拌した後、105℃のオーブンに 24 時間整地させることで汚泥中の PHA 構成モノマーのメチルエステル(HA メチルエステル)を生じさせた。サンプルを室温まで冷ました後、28%アンモニア水 0.5mL を加えて激しく攪拌し、遠心分離(2150g、5 分、室温)した後に、サンプルは 3 層に分離し、下から硫酸アンモニウムの固体層、クロロホルム層、水メタノール層である。クロロホルム層のみをパスツールピペットで 1.5mL バイアルに回収し、純水 0.5mL を加えて激しく攪拌した後、遠心分離(2150g、5 分、室温)を行なった。試料中のクロロホルム層のみをガスクロマトグラフィー(GC)に注入し、ピークの分離・同定・定量を行なった。3-ヒドロキシ酪酸(3HB)の標準物質として市販の 3-ヒドロキシ酪酸ナトリウムを 500mg-C/L の水溶液としたもの、3-ヒドロキシ吉草酸(3HV)の標準物質として *Ralstonia eutropha* から抽出・精製された PHA コポリマーP(3HB-co-19%(w/w)3HV)を用い、活性汚泥試料サンプルと同様の処理を施した。

GC には島津 14A/FID を用いた。カラムには GL サイエンス社の Neutrabond-1(カラム長 30m、内径 250 μ m、膜厚 0.4 μ m)を使用した。検出器および注入口の温度をそれぞれ 250℃および180℃で保持し、カラム温度は以下の昇温プログラムに従った。初期設定温度60℃で4分保持し、その後12℃/分で220℃まで昇温し、220℃で6分間保持した。試料は島津オートインジェクターAOC-14Aを用いて、1 μ L をスプリット注入(スプリット比 1:40)した。

得られたクロマトグラムから、各 PHA 成分の濃度を計算した。計算方法は下の計算式を用いた。

$$\text{HA濃度} = k_{\text{HA}} \cdot \frac{\text{HAのピーク面積}}{\text{内標準のピーク面積}}$$

ここで、各 PHA 成分の感度定数(k_{HA})は、各標準物質のクロマトグラムから計算した。すなわち、 $k_{3\text{HB}}$ および $k_{3\text{HV}}$ は、それぞれ 3HB 及び 3HV の標準物質のクロマトグラムから次のように計算した。

$$k_{3HB} = 500 \cdot \frac{86}{48} \cdot \frac{\text{内標準のピーク面積}}{3HB\text{のピーク面積}}$$

$$k_{3HV} = k_{3HB} + \frac{19}{81} \cdot \frac{3HB\text{のピーク面積}}{3HV\text{のピーク面積}}$$

3-1-3 DOC(溶存有機炭素)

溶存有機炭素(Dissolved Organic Carbon、以下 DOC)は下水試験法(1997)に従い、上澄み中の全有機炭素濃度(Total Organic Carbon、以下 TOC)と定義し、島津 TOC-500 を用い、測定した。

採取した試料を遠心分離(2150g、5 分、室温)し、上澄みを 0.25 μ m Cellulose Acetate フィルターで濾過した試料を採取した。試料中の DOC が 80mg-C/L 以下になるように上澄みを Milli-Q で希釈し、TOC-500 測定用バイアルへ移し、測定を行なった。また、全炭素(TC)、無機態炭素(IC)の標準物質にはそれぞれフタル酸水素カリウム溶液(80mg-C/L)および炭酸水素ナトリウム溶液(80mg-C/L)を用いた。TC および IC の測定は同一サンプルで 2 回以上行ない、その平均値を測定結果とした。

3-1-4 イオンクロマト

TOC-500 を用いた DOC のモニタリングに加えて、イオンクロマトによる水質モニタリングも行った。イオンクロマトの装置には 761 Compact IC(Metrohm 社)を用い、使用したカラムは Packed column for HPLC(Shodex 社)である。

標準液にはアニオン(6 種)混合標準液(岸田化学:890-93414)と、酢酸の標準液として酢酸ナトリウム水溶液を使用した。本装置で解析した場合に、検出される標準液の各イオンとその検出時間の関係はおおよそ以下の通りである：
CH₃COO⁻ 3.52 分、Cl⁻ 4.47 分、NO₂⁻ 5.14 分、Br⁻ 6.17 分、NO₃⁻ 6.81 分、PO₄⁻ 10.38 分、SO₄⁻ 12.18 分。

3-1-5 MLSS および MLVSS

下水試験法(1997)に基づき、分析を行なった。分析の手順は以下の通りである。

600℃のオーブンで 30 分間加熱し、110℃の乾燥機で 1 時間、デシケーター

で 30 分以上冷ました蒸発皿の重量を測定した(1)。試料を 25mL 採取し、遠心分離(2,150g、5 分、室温)した後、汚泥ペレットにイオン交換水を加えて混合し、再び遠心分離(2,150g、5 分、室温)を行った。上澄みを捨て、汚泥ペレットを蒸発皿へ移し、ウォータバスで水分を蒸発させた後、蒸発皿を 110℃の乾燥機で 2 時間、デシケーターで 30 分以上乾燥させ、蒸発皿の重量を測定した(2)。続いて、600℃のオーブン内で蒸発皿を 30 分乾燥させ、110℃の乾燥機およびデシケーターで放冷した後の重量を測定した(3)。以上の結果から $\{(2)-(1)\} \times 40$ が MLSS(mg/L)であり、 $\{(2)-(3)\} \times 40$ が MLVSS(mg/L)となる。

3-2 実験結果

今回解析した活性汚泥試料の種類を表 3.2.1 に示す。三カ所の異なる処理場(M、N、K 処理場)から活性汚泥試料を採取し、M、N 処理場では 3 種類の異なる運転法(擬似嫌気好気法(CAS 法)、嫌気好気法(AO 法)、嫌気無酸素好気法(A2O 法))から活性汚泥試料を採取した。M 処理場から採取した活性汚泥試料に対しては、バッチ試験において異なる電子受容体(好気、亜硝酸、硝酸、嫌気)の条件を設定し、電子受容体の違いが PHA 合成能へ及ぼす影響を評価した。

なお、AO 法、A2O 法は生物学的リン除去を狙って運転されているが、試料採取時のリン除去能は M 処理場 A2O 法の試料を除いて全て良好であった。これは、M 処理場 A2O 法の試料を採取する 2 日前に雨天であったことが影響したものと考えられる。

バッチ試験において、M 処理場の試料では亜硝酸、硝酸、嫌気のパッチ試験の系を設けたが、亜硝酸の系では亜硝酸のみがバッチ試験を通して検出され、嫌気の系では亜硝酸、硝酸のいずれの成分も検出されなかった。しかし、硝酸の系においては硝酸に加えて、亜硝酸の成分も検出された。これは硝酸が脱窒反応により窒素ガスまで還元される際に、一部の脱窒菌が窒素ガスまでの完全

表 3.2.1 バッチ試験に供した活性汚泥試料の一覧

下水処理場名	運転方式	試料採取日	バッチ試験で用いた電子受容体の種類	活性汚泥試料採取時のリン除去能	コメント
M処理場	Pseudo-aeration CAS (擬似嫌気好気法)	2005. 10. 14	O ₂ , NO ₂ , NO ₃ , anaerobic	-	三河島処理場は合流式で下水が流入する。
	AO (嫌気好気法)	2005. 8. 11	O ₂ , NO ₂ , NO ₃ , anaerobic	良好(<0.1mg-P/L)	
	A2O (嫌気無酸素好気法)	2005. 10. 12	O ₂ , NO ₂ , NO ₃ , anaerobic	不良(≒0.5mg-P/L)	
N処理場	Pseudo-aeration CAS (擬似嫌気好気法)	2005. 11. 21	O ₂	-	AO法の余剰汚泥をCAS法の活性汚泥に1%混合している。 中川処理場は分流式で下水が流入する。
	AO (嫌気好気法)	2005. 11. 21	O ₂	良好(<0.1mg-P/L)	
	A2O (嫌気無酸素好気法)	2005. 11. 21	O ₂	良好(<0.1mg-P/L)	
K処理場	AO (嫌気好気法)	2005. 11. 17	O ₂	良好(<0.1mg-P/L)	-

脱窒ではなく、亜硝酸までの部分脱窒を行っていたためであると推察される。よって、硝酸の系においては、硝酸ではなく亜硝酸のみを利用する細菌種が活動し影響も結果に含まれている恐れがあるが、今回の分析項目ではこの問題がどの程度の影響を結果に及ぼしたかは評価できなかった。

図 3.2.1 にバッチ試験における累積酢酸消費量を、表 3.2.2 に MLSS、バッチ試験終了時の PHA 含有率および PHA 転換率(活性汚泥中の PHA の重量:mg-PHA/累積酢酸消費量:mg-C)を、試料ごとに整理した結果を示した。バッチ試験開始時はいずれの活性汚泥試料においても PHA 含有率が 0%であったが、酢酸を炭素源とした馴養を行うことにより活性汚泥中で PHA が合成されたことがわかる。

しかし、M 処理場 A2O 法、CAS 法より採取した試料を用いた嫌気条件でのバッチ試験では、酢酸の摂取がほぼ見られず、逆に増加する傾向が観察された。これは活性汚泥試料中の細菌が死滅し、そのような細胞由来の成分であると推察される。このような影響のため、これらの試料においては PHA 含有率は評価できたが、PHA 転換率を評価することができなかった。

電子受容体の違いが累積酢酸消費量、PHA 合成能、PHA 転換率に及ぼした影響を見ると、累積酢酸消費量、PHA 含有率の値は、好気条件において最も大きく、続いて硝酸、亜硝酸、嫌気の順に小さくなっていく傾向が確認された。好気条件でバッチ試験を行った場合には、酢酸消費速度は約 20~30mg-C/g-SS/hr であり、類似した酢酸消費速度の値が高畠(2000)によって報告されている。また、PHA 転換率は M 処理場 AO 法の試料では 14.6~24.2%、A2O 法の試料では 21.4~38.1%、CAS 法の試料からは 27.3~38.5%の間で得られた。電子受容体の違いにより PHA 転換率に影響が生じていることは確認されたが、一貫した傾向は観察されなかった。よって、電子受容体の違いは PHA 合成能に大きく影響するものの、PHA 転換率には影響を及ぼす場合とそうではない場合があることがわかった。

続いて、運転方法の違いが PHA 合成能、PHA 転換率に及ぼした影響を、好気条件でバッチ試験を行った試料から得られた結果を用いて評価する。M 処理場(AO、A2O、CAS 法)、N 処理場(AO、A2O、CAS 法)の試料を比較すると、N 処理場では AO、A2O、CAS 法の全ての試料が同程度の PHA 含有率(1.4~1.6%)を示していたのに対して、M 処理場においては、AO、CAS 法の PHA 含有率が 3.7~3.9%であるのに対して、A2O 法(好気条件)の試料では PHA 含有率 2.5%と、

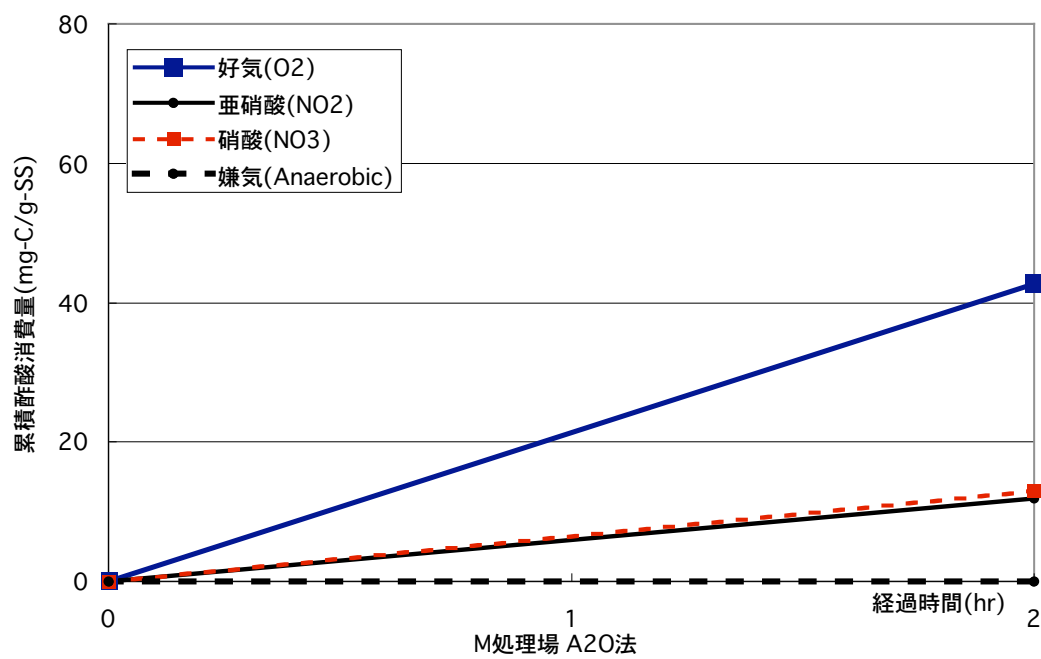
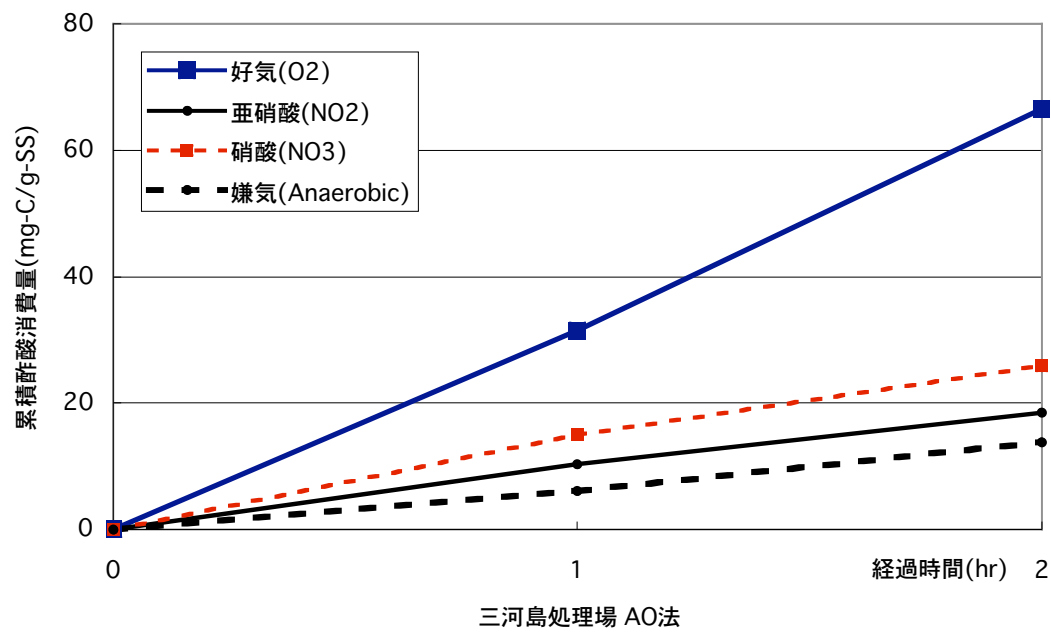
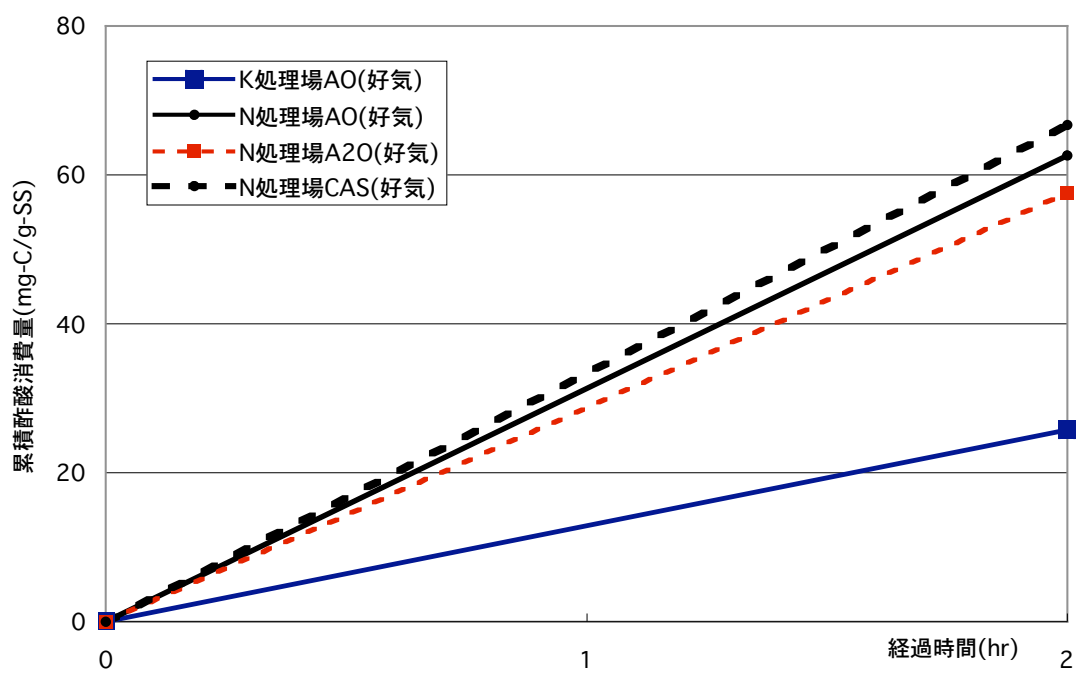
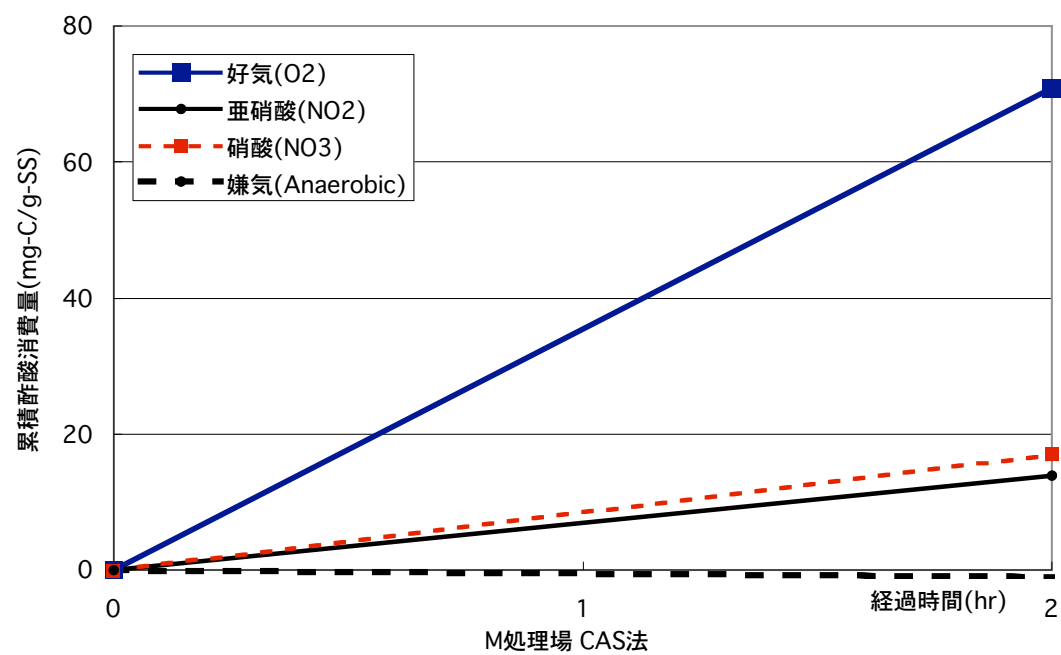


図 3.2.1 バッチ試験における累積酢酸消費量の比較



続-図 3. 2. 1 バッチ試験における累積酢酸消費量の比較

低い PHA 含有率を示した。また、PHA 転換率に注目して比較を行うと、PHA 転換率は M 処理場で 21.4～27.3%、N 処理場では 7.7～9.8%の間であり、運転法の違いは特に顕著な PHA 転換率の違いを生じていなかったことがわかる。

最後に、処理場の違いが PHA 合成能、PHA 転換率に及ぼした影響を、好気条件でバッチ試験を行った試料から得られた結果を用いて評価する。M 処理場の試料では K、N 処理場よりも高い PHA 含有率(2.5～3.9%)が達成され、K、N 処理場は両者共に同程度の PHA 含有率(1.4～1.8%)であった。ところが、PHA 転換率で比較すると M 処理場、K 処理場、N 処理場はそれぞれ約 20、50、10%であり、K 処理場において非常に高い PHA 転換率が確認された。よって、処理場の違いが PHA 合成能、PHA 転換率に及ぼす影響は大きいと評価された。

表 3.2.2 バッチ試験後の PHA 含有率および PHA 転換率

処理場名	運転法	電子受容体の種類	バッチ試験時の MLSS(mg/L)	バッチ試験終了時の PHA 含有率	PHA 転換率([mg-PHA/mg-C](%))
M 処理場	AO 法	好気(O ₂)	414	3.9%	24.2%
		亜硝酸(NO ₂)	270	1.0%	14.6%
		硝酸(NO ₃)	322	1.9%	23.8%
		嫌気(N ₂)	370	0.7%	19.6%
	A2O 法	好気(O ₂)	366	2.5%	21.4%
		亜硝酸(NO ₂)	366	1.0%	30.0%
		硝酸(NO ₃)	366	1.4%	38.1%
		嫌気(N ₂)	366	0.0%	-
	CAS 法	好気(O ₂)	526	3.7%	27.3%
		亜硝酸(NO ₂)	526	0.9%	33.8%
		硝酸(NO ₃)	526	1.2%	38.5%
		嫌気(N ₂)	526	0.4%	-
N 処理場	AO 法	好気(O ₂)	350	1.4%	7.7%
	A2O 法	好気(O ₂)	378	1.5%	9.8%
	CAS 法	好気(O ₂)	338	1.6%	8.3%
K 処理場	AO 法	好気(O ₂)	766	1.8%	53.6%

3-3 考察

今回のバッチ試験において得られた結果から、1) 電子受容体、2) 処理場における運転方法、3) 処理場の違いが PHA 合成能(PHA 含有率)、PHA 転換率に及ぼす影響を評価した結果をまとめたものを表 3.3.1 に示す。

電子受容体の違いが及ぼした影響は PHA 合成能に対しては顕著に認められた。M 処理場 AO 法、A2O 法、CAS 法より採取した試料を用いた、いずれの

表 3.3.1 電子受容体、運転法および処理場の違いが、活性汚泥の PHA 合成能、PHA 転換率に及ぼす影響の評価

影響因子	PHA合成能		PHA転換率
	1. 電子受容体	強 (好気>硝酸≒亜硝酸>嫌気)	強 or 弱(試料に依存)
	2. 運転法	弱	弱
	3. 処理場	強(三河島>小菅≒中川)	強(小菅>三河島>中川)

バッチ試験の系においても好気、硝酸、亜硝酸、嫌気の順で PHA 含有率が高かった。しかし、これに対して PHA 転換率は電子受容体の違いに対して前述したような傾向は認められず、試料によって観察される場合と観察されない場合が観察された。電子受容体の違いにより PHA 合成能が変化することが明らかとなったが、はたしてこれが電子受容体の違いにより単位細胞あたりの PHA 合成能が低下した結果なのか、あるいは単位細胞あたりの PHA 合成能は各電子受容体の条件で変化しないものの、一部の PHA 蓄積細菌が亜硝酸、硝酸や嫌気条件下では呼吸を行うことができないため PHA を蓄積できず、それら活動できない細菌が存在したために PHA 合成能が低下したのかは、本章の実験結果のみでは判断できない。

採取した試料の運転法が PHA 合成能、PHA 転換率へ及ぼした影響はいずれも小さいことが明らかとなった。従来、PHA の代謝様式は嫌気好気法のような環境下において、ある種の細菌が有占的に炭素源を摂取し、増殖を行うために重要な代謝であると考えられてきたが、今回の結果では標準活性汚泥法のような環境下で馴養された活性汚泥からも同程度の PHA 合成能、PHA 転換率が得られた。すなわち、PHA の代謝は標準活性汚泥法のような反応層内でも行われている可能性が示唆されており、活性汚泥に広く分布する代謝様式であることが明らかとなった。

処理場の違いが PHA 合成能、PHA 転換率に及ぼした影響はいずれも大きいことが明らかとなった。PHA 含有率で比較すると M 処理場が他の処理場のものよりも大きく、K、N 処理場が同程度の PHA 含有率を有していた。一方、PHA 転換率では K 処理場が大きく、続いて M、N 処理場の順に高かった。活性汚泥の有する PHA 合成能が各処理場によって異なることが明らかとなったが、このような影響を生み出す原因としては処理場の環境条件、流入する下水の違いなどが上げられ、ひいてはそのような下水を栄養源として増殖した細菌叢の違いによって生み出されたことを示唆しており、各処理場ごとに異なった PHA

蓄積細菌の群集構造が存在している可能性が示唆された。すなわち、今回の結果から推測するならば、M 処理場には PHA 合成能の高い PHA 蓄積細菌が存在しており、K 処理場には酢酸の摂取速度は低いものの、高い PHA 転換率を発揮する代謝様式を有する PHA 蓄積細菌が存在していると考えられる。よって、将来的に PHA 生産プロセスの実現を目指すならば、PHA 合成能の優れた活性汚泥を用いることが重要であり、そのような活性汚泥中に存在する PHA 合成能の高い PHA 蓄積細菌を同定することが必要であると考えられる。

3-4 まとめ

実処理場より採取した活性汚泥試料を用い、酢酸を唯一の炭素源として PHA を合成させ、その際に電子受容体の違い、運転法の違い、処理場間の違いが PHA 合成能、PHA 転換率に及ぼす影響を評価した。

その結果、電子受容体の違いと処理場の違いが PHA 合成能、PHA 転換率に影響を及ぼすことが確認された。また、同一の処理場内で異なる運転法より採取した活性汚泥では、PHA 合成能、PHA 転換率にはあまり差がないことがわかった。

また、処理場の違いが PHA 合成能、PHA 転換率に違いを生じることが明らかとなり、各処理場において特異的な PHA 蓄積細菌の群集構造が存在している可能性が示唆された。

第四章 二重染色法および FISH 法による活性汚泥中の PHA 蓄積細菌の群集構造解析

本章では活性汚泥中に占める PHA 蓄積細菌の存在割合を定量評価することを目指した。現在までに活性汚泥中に占める PHA 蓄積細菌の存在割合を定量評価した報告はされておらず、これは活性汚泥の生物学的モデルにおいて必要とされている情報である。ここでは PHA を特異的に染色する Nile blue A と核酸染色剤である DAPI を組み合わせて、全菌中に占める PHA 蓄積細菌の割合を評価した。また、FISH 法を用いて、PHA 蓄積細菌の群集内において、PAO mix、GB プローブ陽性細菌が占める割合を定量評価した。

4-1 予備実験: Nile blue A と DAPI の二重染色法の最適化

活性汚泥における PHA 蓄積細菌の存在割合を評価するにあたって、Nile blue A と DAPI を組み合わせた二重染色法は報告例が無かったため、染色法の最適化を検討した。

4-1-1 Nile blue A 染色法

細胞内に蓄積された PHA を特異的に染色するために Nile blue A 染色を行った。染色剤には Kodak 社より購入した Nile blue A (Cert), dye content 81%(#C8679)を使用した。

Nile blue A 染色を行う試料は以下のように前処理を施した。まず適量の菌体をゼラチンコーティングしたスライドガラスへ塗布し、風乾させた後にスライドガラスを 50、80、97% EtOH に 3 分ずつ浸し、脱水処理を施した。

Nile blue A のシグナルを観察する場合には、しばしばバックグラウンドのシグナルが問題となる場合がある。これは、菌体内の PHA 含有率が低い場合には Nile blue A の蛍光も弱く、PHA を蓄積していない細胞との区別が困難となるためである。そのため、スライドガラス上に観察したい試料とは別に、PHA を蓄積していない細菌の細胞を配置し、Nile blue A の蛍光を観察する際のネガティブコントロールとして用いた。このような細菌種として *Escherichia coli* K12 を選択し、対数増殖期から採取した細胞を 3%パラホルムアミドで 2 時間固定

したものを用いた。

Anthony G. O. *et al.* (1982)の染色法を用いる場合には以下の手順で染色を行った。あらかじめ 1% (w/v) Nile blue A 水溶液を調整し、染色液を 55°C のウォーターバスで保温しておき、菌体を塗布したスライドグラスを染色液に浸した。10 分間染色した後に水道水でスライドグラスを洗浄した。更に 8%(v/v)酢酸溶液に 1 分間浸し、Milli-Q で洗浄した。スライドグラスに退色防止剤である Slow Fade-Light Antifade Kit(Molecular Probes 社)をマウントし、カバーグラスで封入した後に顕微鏡観察を行った。

Kitamura *et al.*(1994)の染色法を用いる場合には以下の方法を用いた。まず、Nile blue A を 0.1%(w/v)となるように 97% EtOH に溶解させた染色液を用意した。スライドグラスを調整した染色液中に浸し、室温で 30 分間染色した。染色を終えたスライドグラスを約 500mL の Milli-Q に浸け、余分な染色液を除去した。最後に 8%(v/v)酢酸溶液に 1 分間浸し、Milli-Q で洗浄した後に風乾させた。スライドグラスに退色防止剤である Slow Fade-Light Antifade Kit(Molecular Probes 社)をマウントし、カバーグラスで封入した。

観察には Olympus model BX-51 を使い、WIG フィルター(赤励起)を通して観察を行なった。観察時に斑紋状のノイズ信号が観察される場合があったが、そのような場合には 97% EtOH に数秒間浸し、洗浄する操作を加えた。

4-1-2 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride)染色法

試料中の全菌数を評価するために、核酸染色剤である DAPI を用いた染色を行なった。スライドグラス上に菌体を塗布し、50, 80, 97% EtOH に 3 分ずつ浸し、風乾させた試料を染色に用いた。染色液(2 μ g/mL)を試料にマウントさせ室温、暗所で 5 分間染色を行なった。スライドグラスを Milli-Q で洗浄し、風乾させた。スライドグラスに退色防止剤である Slow Fade-Light Antifade Kit(Molecular Probes 社)をマウントし、カバーグラスで封入した。

観察には Olympus model BX-51 を使い、WU フィルター(青励起)を通して観察を行なった。

4-1-3 検討結果

まず、これまでに報告されている Nile blue A 染色法の二種類を比較した。Anthony G. O. *et al.* (1982)、あるいは Kitamura *et al.*(1994)の方法を用いて PHA

を蓄積している活性汚泥を染色した結果、両者のシグナル強度には大きな違いは無いことがわかった。

続いて、両者の染色法を施した試料に DAPI 染色を行った結果を比較した。その結果、Kitamura *et al.*(1994)の方法を用いた場合には DAPI 染色のシグナルを明瞭に得ることができ、WIG フィルターと WU フィルターを切り替えることで Nile blue A と DAPI のシグナルを同一視野において観察することができた(図 4.1.1)。ところが、Anthony G. O. *et al.* (1982)の方法を DAPI 染色と組み合わせた場合には DAPI シグナルを観察することができなかった。

また、Nile blue A の蛍光は波長 600nm 付近で最大となるが、DAPI の蛍光波長である 400nm 付近でも若干の蛍光を発する恐れがある(図 4.1.2)。そこで、Nile blue A 染色のみを施した試料を WU フィルターで観察した。その結果、微弱な蛍光シグナルが観察されるものの、DAPI 由来のシグナルが青色であるのに対して、このシグナルは弱い赤色を有しており、シグナルを区別することが可能であった。

また、DAPI 染色を先に施し、続いて Kitamura *et al.*(1994)の方法で Nile blue A 染色する方法も検討したが、DAPI を先染めした場合には、DAPI シグナルを観察することが困難であった。

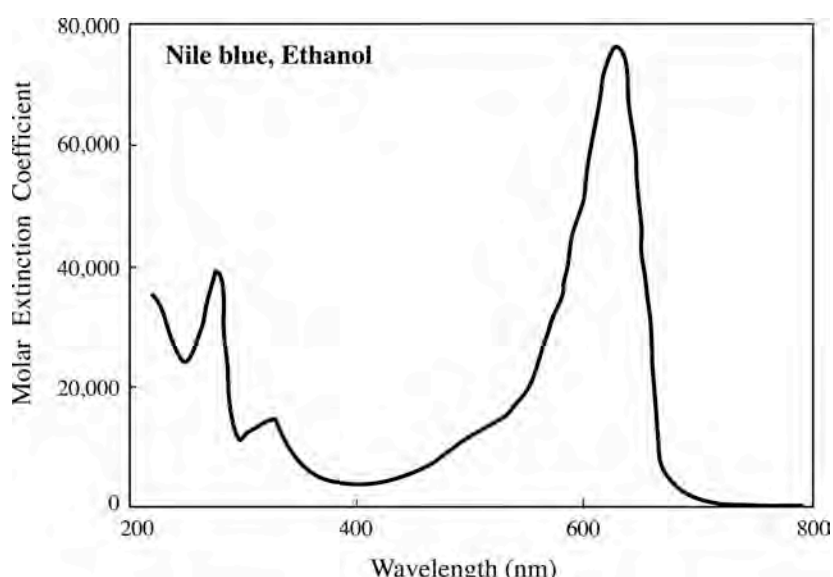


図 4.1.2 Nile blue A の蛍光波長とシグナルの関係

4-1-4 まとめと考察

4-1 節において Nile blue A と DAPI の二重染色の最適化を行った結果、Nile blue

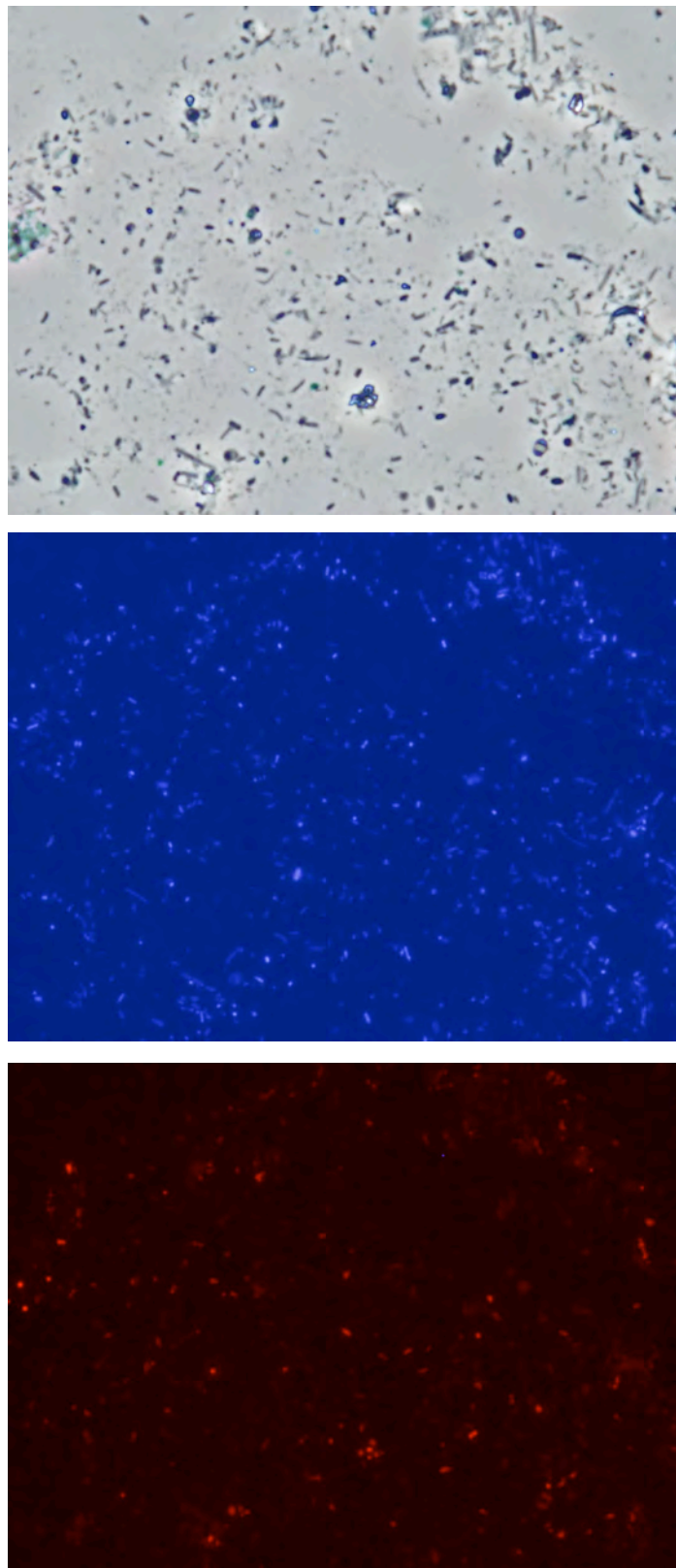


図 4.1.1 Nile blue A と DAPI の二重染色観察結果(上:位相差、中央:DAPI、
下:Nile blue A)

A 染色には Kitamura *et al.*(1994)の方法を用い、後染めで DAPI 染色を行う方法を確立した。

Anthony G. O. *et al.* (1982)らの染色法では、後染めの DAPI シグナルの観察が困難だったが、この原因としては本染色法では 55℃という比較的高温で染色反応を行うため、その間に細胞内の核酸が DNase 様の物質が作用することで、核酸が分解されてしまい、DAPI の蛍光が得られなかった恐れがある。

Nile blue A シグナルの観察においてノイズシグナルが強い場合には 97% EtOH で洗浄する工程を加えたが、この操作はノイズシグナルだけでなく、PHA 蓄積細菌に由来するシグナルも同様に弱めてしまうことがわかった。細胞内の PHA 含有率が低いほど、Nile blue A のシグナルも弱くなってしまうため、PHA 含有率の低い細胞に対してこの 97% EtOH 洗浄を行った場合、本来陽性である細菌が陰性であるように観察されてしまう恐れがある。そのため、この洗浄操作は可能な限り短く行われるべきである。

4-2 実下水処理場の嫌気槽内における PHA 蓄積細菌の存在割合の評価および FISH 法を用いた群集構造解析

本節にて行う実験内容に関して図 4.2.1 に示した。まずは 3-1 節にて確立した Nile blue A と DAPI の二重染色法を用いて、生物学的リン除去法で運転されている実下水場の反応槽内において、PHA を蓄積している細菌がどの程度の存在割合を有しているのかを定量評価した。また、活性汚泥内において PHA の蓄積が確認されている *Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*”と *Candidatus* “*Competibacter phosphatis*”をそれぞれ標的細菌種として含む、PAO mix、GB プローブを用いた FISH 法を適用し、それぞれのプローブの陽性細菌が活性汚泥中にどの程度存在しているかを評価した。

最後に先の Nile blue A と DAPI の二重染色によって推定された「全菌中の PHA 蓄積細菌の存在割合」と、FISH 法により推定された「全菌中の既知の PHA 蓄積細菌(PAO mix、GB プローブ陽性細菌)の存在割合」を比較することで、これまでに知られていない PHA 蓄積細菌が PHA 蓄積細菌の群集においてどの程度の存在割合を占めるのかを推察した。

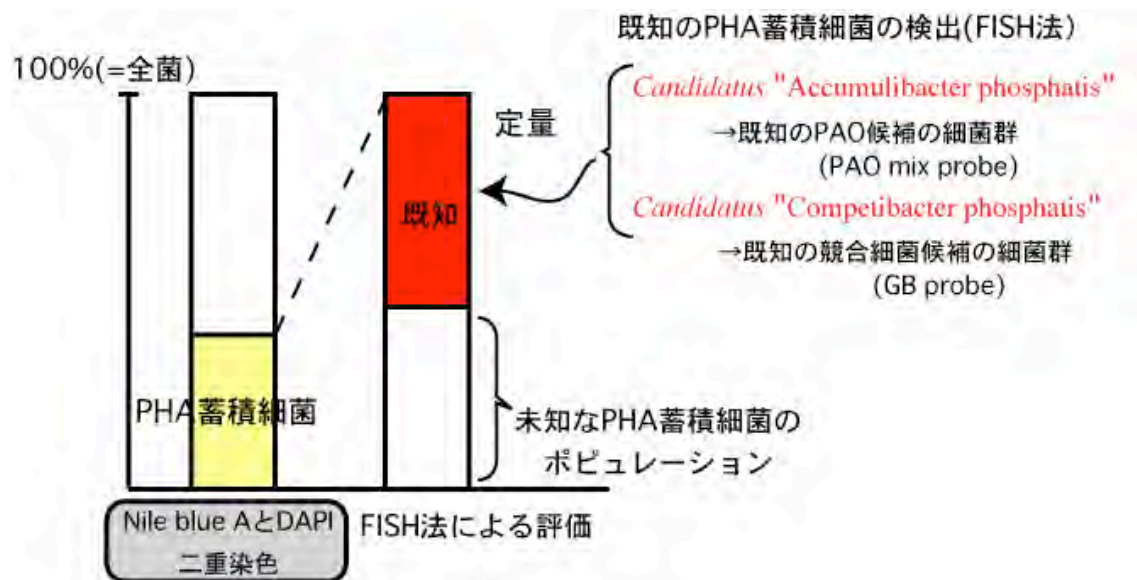


図 4.2.1 活性汚泥における PHA 蓄積細菌の存在割合の評価、および PAO mix、GB プローブ陽性細菌が PHA 蓄積細菌の中に占める割合の評価方法

4-2-1 実験方法

4-2-1-1 試料準備

都内の三ヶ所の下水処理場より活性汚泥試料を採取した。それらは 1. N 処理場、2. NN 処理場、3. M 処理場であり、AO 法で運転されている処理系の嫌気槽末端部より採取した。採取した日時は 2004. 9.19～ 9. 20 であった。顕微鏡観察に供する試料は、メタノールとドライアイスによって作成した寒剤により、採取した現場で凍結させた後に実験室へ持ち帰り、液体窒素中で保存した。

採取した活性汚泥のリン除去能を評価するために、同時に好気槽の末端より活性汚泥を 100mL 程度採取し、氷上で実験室まで運搬し、当日中に活性汚泥中のリン含有率の測定を行った。測定にはペルオキシ二硫酸カリウム分解法を用いた。詳細は下水試験方法(1997)に従った。

Nile blue A と DAPI の二重染色を行うために、試料を解凍し、1×PBS buffer(137mM NaCl、8.1mM Na₂HPO₄ 7H₂O、2.68mM KCl、1.47mM KH₂PO₄、pH 約 7.3)洗浄を一度行った後、3%パラホルムアルデヒドで 2 時間固定処理を行った。固定液を洗い流した後、1×PBS buffer:97% EtOH=1:1 混合液に試料を懸濁させた。二重染色法は 4-1 節にて決定した方法を用いた。

4-2-1-2 FISH 法およびプローブ陽性細菌に対する Nile blue A の二重染色法

FISH 法は Amann R.(1995)の方法に従った。

観察後に定量を行う場合には試料を超音波分散処理し(10W、約 4 分 : Vibracell、Sonic 社)、スライドガラスへ塗布した。本説の実験に用いたオリゴヌクレオチドプローブの一覧を表 4.2.1 に示した。これらのオリゴヌクレオチドプローブの 5'末端を Fluorescein isothiocyanate(FITC)あるいは Cyanine 3(Cy3)で標識したものを購入して用いた。また、EUB338、338-II、338-III と PAO462、651、846 プローブはそれぞれ混合したもの(以後 EUB mix、PAO mix)を用いた。ハイブリダイゼーションを終えた後、スライドガラスに Slow Fade-Light Antifade Kit(Molecular Probes 社)をマウントして、Olympus model BX-51 で観察した。FITC、Cy3 の観察にはそれぞれ WIB、WIG フィルターを用いた。

DAPI 染色を行う場合には、ハイブリダイゼーションを終えた試料に DAPI 染色液(2 μ g/mL)をマウントさせ室温、暗所で 5 分間染色を行なった。スライドガラスを Milli-Q で洗浄し、風乾させた後、同様の方法で観察した。

また、Nile blue A と FISH 法の二重染色を行い、FISH 法により検出した細菌が PHA を蓄積していたかを確認する操作を行った。この場合には Cy3 標識した PAO mix あるいは GB プローブのみでハイブリダイゼーションを行い、顕微鏡観察を行った。観察した視野の位置を顕微鏡ステージ上のスケールで記録しておき、スライドガラスからカバーガラスを外した後、Slow Fade-Light Antifade を除去するために Milli-Q でスライドガラスを洗浄した。風乾した後、Nile blue A 染色を施し、先に観察した視野を再び観察した。この際に Nile blue A の蛍光シグナルは WIB フィルターを用いて観察した。Nile blue A と FISH 法を用いた二重染色法は同様の方法で複数の研究者によって行われている(Crocetti G.R. *et al.*(2002)、Kong Y.H. *et al.*(2002)、Beer M. *et al.*(2004)、Wong M.T. *et al.*(2004))。

細菌数の定量は直接計数法で行った。顕微鏡観察の際に 10 視野をランダムに選び撮影し、その視野内に存在する陽性細菌の数を計数した。定量を行う場合には、10 視野における全菌数の合計が少なくとも 1000 個を超える条件で顕微鏡観察を行った。なお、Nile blue A と FISH の二重染色を行った場合の陽性細菌を計数する場合には、100 個以上の FISH プローブ陽性細菌を計数することとした。

表 4. 2. 1 第四章において用いたオリゴヌクレオチドプローブ一覧

なお、各オリゴヌクレオチドプローブの 5'末端に Cy3、あるいは FITC 標識を施したものを使用した。

Probe name	Specificity	Sequence(5'-3')	Formamide (%)	Reference
EUB338	Most Bacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	35	Amann R. <i>et al.</i> (1995)
EUB338-II	Planctomycetales and other Bacteria not detected by EUB338	GCAGCCACCCGTAGGTGT	35	Daims H. <i>et al.</i> (1999)
EUB338-III	Verrucomicrobiales and other Bacteria not detected by EUB338	GCTGCCACCCGTAGGTGT	35	Daims H. <i>et al.</i> (1999)
PAO462	Rhodocyclus-related PAO including member of <i>Candidatus</i> "Accumulibacter phophstis"	CCGTCATCTACWCAGGGTATTAAC	35	Crocetti G.R. <i>et al.</i> (2000)
PAO651	Rhodocyclus-related PAO including member of <i>Candidatus</i> "Accumulibacter phophstis"	CCCTCTGCCAACTCCAG	35	Crocetti G.R. <i>et al.</i> (2000)
PAO846	Rhodocyclus-related PAO including member of <i>Candidatus</i> "Accumulibacter phophstis"	GTTAGCTACGGCACTAAAAGG	35	Crocetti G.R. <i>et al.</i> (2000)
GB	GAO-group GB including member of <i>Candidatus</i> "Competibacter phosphatis"	CGATCCTCTAGCCCACT	35	Kong Y.H. <i>et al.</i> (2002)

4-2-2 実験結果と考察

採取した際の処理場のリン除去能を評価するために好気槽より採取した活性汚泥中のリン含有率を評価したところ、N、NN、M 処理場ではそれぞれ 3、5、4%であり、良好なリン除去能を有していたことがわかった。

それぞれの試料において Nile blue A と DAPI の二重染色を行い、全菌中の PHA 蓄積細菌の割合を評価した結果を表 4.2.2 に示した。その結果、いずれの活性汚泥試料においても、全菌の約 1 割(8~11%)の細菌が PHA 蓄積能を有していることがわかった。

FISH 法を用いて定量解析した結果、PAO mix プローブ陽性細菌、GB プローブ陽性細菌の存在割合が明らかとなった。いずれの試料からも PAO mix プローブ陽性細菌が検出されているが、NN 処理場において GB プローブ陽性の存在割合は非常に低く、定量評価を行うことは困難であった。PAO mix プローブ陽性細菌、GB プローブ陽性細菌が PHA を蓄積することはそれぞれ Liu WT. *et al.*(2001)、Crocetti G.R. *et al.*(2002)によって報告されており、今回の Nile blue A と FISH を用いた二重染色の結果でも、これらの細菌群が PHA を蓄積していることが確認された。しかし、興味深いことに M 処理場では二重染色の結果、PAO mix、GB プローブ陽性細菌のそれぞれ 5 割、2 割からしか PHA の蓄積が確認されなかった。この結果は以下の二通り解釈が可能である。まず、「それらの PHA を蓄積していない細菌は、反応槽内で既に死菌であった。」と、いう解釈である。しかし、FISH プローブで検出されている以上、ある程度の 16S rRNA 遺伝子が細胞内に残存していたことは確かであり、このことから死菌であったとは考えにくい。もう一方では、FISH プローブで検出している細菌群の中に多様性が存在し、PHA を蓄積能を有する細菌種と、そうではない細菌種が混在しているとも考えることができる。事実、PHA 蓄積細菌として研究が進められている *Ralstonia eutropha* には株違いで PHA 蓄積能を有するものと、そうでないものが存在することが知られており、Solaiman D.K.Y. *et al.*(2000)の研究においても株違いで PHA 蓄積能を示す細菌と示さない細菌が存在していたことを報告している。この要因を考えると PAO mix や GB プローブ陽性細菌の中に株違いで PHA 蓄積能を示さない細菌が存在していても不思議ではない。

今回解析した試料は生物学的リン除去プロセスである嫌気好気法(AO 法)より採取したものである。FISH 法により検出された PAO mix プローブ陽性細菌群、GB プローブ陽性細菌群はそれぞれポリリン酸蓄積細菌、グリコーゲン蓄積細

菌として認識されている。そして、生物学的リン除去プロセス内でポリリン酸蓄積細菌あるいはグリコーゲン蓄積細菌が系内において有占するために PHA の蓄積は重要な代謝であると考えられているが、PAO mix、GB プローブ陽性細菌以外の PHA 蓄積細菌(未知の PHA 蓄積細菌種)が占める割合を推測した結果、このような細菌種が PHA 蓄積細菌の群集内に占める割合は N、NN、M 処理場の試料でそれぞれ 3 割、7 割、8 割程度であると推測された。すなわち、活性汚泥中において、*Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*”、*Candidatus* “*Competibacter phosphatis*”以外の PHA 蓄積細菌が多く存在していることが NN、M 処理場の試料において強く示唆されている。このような未知の PHA 蓄積細菌が新たなポリリン酸蓄積細菌あるいはグリコーゲン蓄積細菌である可能性もあるため、どのような細菌種であるか興味深いところである。ただし、これら未知の細菌種が PHA を嫌気槽内で摂取した炭素源から合成したのかは不明であり、単に好気槽で蓄積した PHA を嫌気槽へ持ちこしてきたということも考えられる。

今回解析した試料は、処理場で凍結させて持ち帰ったものを凍結保存したものである。これは試料を実験室へ運搬する際に嫌気状態を維持できず、細胞

表 4.2.2 実下水処理場嫌気槽内の活性汚泥における PHA 蓄積細菌の存在割合、および PHA 蓄積細菌の中に PAO mix、GB プローブ陽性細菌が占める割合

		N処理場(AO法, 嫌気槽)		NN処理場(AO法, 嫌気槽)		M処理場(AO法, 嫌気槽)		実験室リアクター (SBR)	
		測定値	SD	測定値	SD	測定値	SD	測定値	SD
(1)	全菌中のPHA蓄積細菌の割合 [Nile Blue A染色陽性細菌/DAPI]	9%	±2%	11%	±4%	8%	±2%	23.5%	±3.7%
(2)	PAO mix probe陽性細菌の割合 [PAO mix probe陽性細菌/EUB]	6%	±2%	5%	±3%	3%	±3%	5.0%	±2.5%
(3)	細菌の割合[(Nile blue A陽性かつPAO mix probe陽性)/PAO mix probe陽性細菌]	90%	±1%	60%	±35%	45%	±38%	未測定	
(4)	GB probe陽性細菌の割合 [GB probe陽性細菌/EUB]	2%	±14%	<1.0%	-	2%	±2%	5.2%	±2.0%
(5)	PHAを蓄積していたGB probe陽性細菌の割合[Nile blue A陽性かつGB probe陽性/GB probe陽性細菌]	82%	±38%	-	-	17%	±29%	未測定	
(6)	全菌に対する真正細菌 [EUB/DAPI]	90%	±1%	88%	±2%	88%	±4%	96.9%	±2.3%
推測される未知のPHA蓄積細菌の存在量 $\{(1)-\{(2) \times (3)\} + \{(4) \times (5)\} \times (6)\} / (1)$		33%		75%		80%		55%	

内に蓄積されていた PHA が消費される恐れがあったためである。しかし、本法では解凍した試料を PBS 洗浄し、その後にパラホルムアミド固定を行っているため、その間に PHA の消失が起こり、PHA 蓄積細菌の存在割合を過小評価している可能性もある。そのため、処理場で採取した試料を直ぐにパラホルムアミド固定して持ち帰る方法が最も好ましい方法であると考えられる。

4-2-3 まとめ

実処理場の嫌気槽内における PHA 蓄積細菌の群集構造を、Nile blue A と DAPI 染色の二重染色法と、Nile blue A 染色と FISH 法の二重染色を組み合わせた方法で定量解析を行った。その結果、解析した全ての処理場において全菌の約 1 割が PHA を蓄積していることが確認された。PAO mix、GB プローブ陽性細菌は広く試料中から検出されたが、これらの細菌種以外の PHA 蓄積細菌が存在することが強く示唆された。

4-3 酢酸を炭素源として馴養した活性汚泥中の PHA 蓄積細菌の存在割合の評価および FISH 法を用いた群集構造解析

前節では実下水処理場の反応槽内における PHA 蓄積細菌の群集構造を解析したが、本節では実下水処理場より採取した活性汚泥を実験室に持ち帰り、酢酸を唯一の炭素源としてバッチ試験を行うことにより生じた PHA 蓄積細菌の群集構造を明らかにすることを目指した。

4-3-1 実験方法

本節で解析した試料は第三章にて解析した試料と同一のものである(表 3.2.1 参照)。M、K、N 処理場より採取した活性汚泥を用いて、酢酸を炭素源とした 2 時間のバッチ試験を行い、バッチ試験終了時の活性汚泥に対して Nile blue A と DAPI の二重染色法、PAO mix、GB プローブを用いた FISH 法により PHA 蓄積細菌の群集構造の解析を行った。それぞれの方法は 4-1-1、4-2-1 節に従った。

4-3-2 実験結果と考察

図 4.3.1 に全菌中の全菌中の PHA 蓄積細菌、PAO mix プローブ陽性細菌、GB プローブ陽性細菌の存在割合を定量評価した結果をまとめたものを示した。定量評価は直接計数法を用いており、直接計数法では測定誤差が若干大きくなっ

てしまうため(±2%程度)、小さな違いを評価することは困難であった。

バッチ試験を好気条件で行った K、N、M 処理場の試料では、全菌中の約 1 割が PHA 蓄積細菌であったことがわかる。また、N、M 処理場の CAS 法より採取した試料においても同程度の PHA 蓄積細菌が存在していたことが判明した。活性汚泥の有する PHA 合成能は以前から知られていたが、「活性汚泥中に PHA 蓄積細菌がどの程度いるのか?」といった情報はこれまで報告がなかった。すなわち、活性汚泥の有する PHA 合成能を微生物学的な知見で説明した報告は少なく、これまでは「活性汚泥」という一括りで説明がなされていた。本研究成果において、活性汚泥中にどの程度の PHA 蓄積細菌が存在するのかを定量評価することができた。

PAO mix、GB プローブ陽性細菌はほとんど全ての試料から検出されており、PAO mix プローブ陽性細菌は K 処理場で最も多く検出され($3.5 \pm 1.5\%$)、GB プローブ陽性細菌は N 処理場 A2O 法で最も多く($0.8 \pm 0.3\%$)と評価された。Wong M.T. *et al.*(2005)が東京都内 9 カ所の実下水処理場から採取した 13 種類の活性汚泥試料中の PAO mix、GB プローブ陽性細菌の存在割合を定量評価したところ、それぞれ(4~18%)、(3~31%) 存在していたことを報告している。今回得られた値は彼らの値よりも小さいものであるが、このような結果となった原因として、直接計数法と面積定量法の違いが上げられる。Wong M.T.(2005)は撮影した

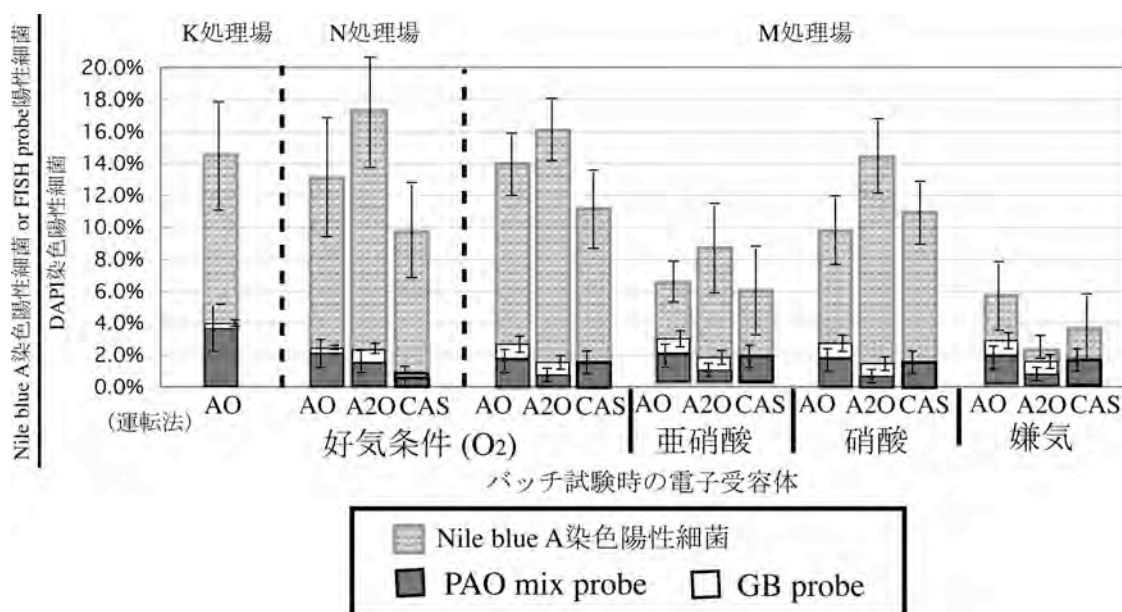


図 4.3.1 Nile blue A と DAPI の二重染色法、および FISH 法によるバッチ試験後の活性汚泥における PHA 蓄積細菌の群集構造解析

写真において標的細菌の占める面積を画像解析ソフトで計算して評価しているが、この方法では撮影時の露光時間によって面積が大きく変化してしまうことと、計測面積を定義する際に設定する閾値によって定量値が変化することが問題となる。撮影時の露光時間、定量時の閾値の設定は実験者の経験に基づいて定められるため、面積定量法の定量値は実験者に依存する場合が多い。また、面積定量法では菌体が大い細菌は、単純にその分だけ存在割合(菌数)も多いものとして評価されてしまう。一般的に GB プローブ陽性細菌は比較的大型の球菌、または双球菌であることが知られており(Nielsen *et al.* (1999)、Kong *et al.* (2002))、このような細菌を標的とした面積定量を行った場合には必然的に定量値は大きくなってしまう。しかし、直接計数法の問題は一種類の試料を解析するための時間と労力が大きいため、定量する際の労力を低減するために定量に用いる視野数を 10 視野程度に抑えており、これらの視野が試料全体を正しく反映しているか否かによって定量値が変わってしまう。すなわち、標的細菌が高密度に集合しているような場所で撮影を行った場合には、標的細菌の存在割合は非常に大きくなってしまう。このような誤差は定量を行う視野数を多く取れば小さくなるが、労力を減らすために視野数を少なくしているため、直接計数法においてはこの影響を低減することが難しいとされている。

また、活性汚泥中の菌叢は季節変動などを常に起こしており、恒常的なものではないことから Wong M.T.(2005)の PAO mix、GB プローブ陽性細菌の定量値と今回の得られた結果を単純に比較することは困難であると考えられる。

バッチ試験における実験条件の違いが PHA 蓄積細菌の群集構造へ及ぼした影響を 1)電子受容体の違い、2)運転法の違い(AO、A2O、CAS 法)、3)処理場の違い(K、N、M)でそれぞれ考察する。まず、電子受容体の違いが及ぼした影響であるが、全菌中に占める PHA 蓄積細菌の存在割合は好気、硝酸、亜硝酸、嫌気の順に大きくなる傾向が観察された。これは好気以外にも脱窒環境下でも摂取した酢酸から PHA を合成していたことを示しており、脱窒素反応を行いながら PHA を蓄積する興味深い代謝様式を有する PHA 蓄積細菌が存在することが確認された。

ポリリン酸蓄積細菌やグリコーゲン蓄積細菌は嫌気条件下でポリリン酸やグリコーゲンを消費して、他の細菌よりも優先的に炭素源を摂取し、PHA を合成する代謝様式を有しているため、リン除去プロセス中で有占できると考えられてきた。しかし、酸素や硝酸イオンと言った電子受容体が存在する環境下では、

他の多くの PHA 蓄積細菌も酢酸の摂取に関与し、PHA を合成することが今回の実験で示された。実下水処理場の嫌気槽は処理場ごとに異なった設計になっている場合が多く、機械攪拌によるものや、制限曝気法などの異なる方法によって嫌気条件を設定している。つまり、厳密な嫌気状態が保たれず、好気条件や硝酸イオンが嫌気槽内で混在する状況が実下水処理場において生じていることが考えられ、そのような場合にはポリリン酸蓄積細菌以外の細菌も炭素源の摂取、PHA の蓄積へと積極的に関与していることが今回の結果から推測することができる。ポリリン酸蓄積細菌の競合細菌としてはグリコーゲン蓄積細菌が注目されているが、嫌気槽内の環境によってはグリコーゲン蓄積細菌のような特殊な代謝様式を持たない、一般の従属栄養細菌もポリリン酸蓄積細菌の競合細菌に成りうるということが考えられる。

続いて運転法の違いが PHA 蓄積細菌の群集構造に及ぼした影響を考察する。一般的に嫌気好気法のプロセスにおいては PHA 蓄積能を有する細菌が炭素源を巡る競合に有利であり、有占して増殖することができると言われている。そのため、このような運転法(AO 法、A2O 法)では全菌に占める PHA 蓄積細菌の割合は標準活性汚泥法((CAS 法)の試料に比べて高くなることが予想された。しかし、今回の定量結果では AO 法、A2O 法における PHA 蓄積細菌の存在割合が顕著に高い、あるいは CAS 法において顕著に低いといった傾向は確認されなかった。これは、標準活性汚泥法の反応槽内でも PHA 蓄積能が細菌の生存競争に対して有利に働いている可能性を示唆している。運転法の違いが PHA 合成能に及ぼす影響は小さいという同様の傾向が 3-2 節において活性汚泥の有する PHA 合成能を評価した結果においても確認されている。

最後に異なった処理場から採取した試料中の PHA 蓄積細菌の群集構造を比較し、考察する。誤差範囲の影響から細部を比較することは困難であるが、全菌中に占める PHA 蓄積細菌の割合は K、N、M 処理場の試料においてほぼ同程度であった。また、これらの試料中における PAO mix、GB プローブ陽性細菌の割合もほぼ同程度であった。興味深い点は、3-2 節においてこれらの試料の PHA 合成能と PHA 転換率を評価、比較した結果、PHA 合成能では(M>K≒N)の順に高く、PHA 転換率では(K>M>N)の順に高いという傾向が見られていた点である。これらの結果の違いから推測すると、全菌中に占める PHA 蓄積細菌の割合(PHA 蓄積細菌の群集のサイズ)やその中に占める PAO mix、GB プローブ陽性細菌の割合といった点では三カ所の処理場の試料は共通していたものの、

PAO mix、GB プローブ陽性細菌以外の PHA 蓄積細菌の群集構造がそれぞれ異なっていたと考えられる。それらの PHA 蓄積細菌の有する PHA 合成能、あるいは PHA 転換率の違いが 3-2 節において観察された結果に寄与していたのではないかと考えられるが、結論を述べるためには更なる詳しい解析が必要である。

また、PHA 蓄積細菌の群集の中で PAO mix、GB プローブ陽性細菌以外が占める割合、すなわち未知の PHA 蓄積細菌が占める割合を考えると、嫌気以外の試料でその割合は非常に大きいことが観察された。PHA 蓄積能は系統的に広く細菌に分布していることが知られているが、活性汚泥中で活躍する PHA 蓄積細菌の細菌種はほとんどが同定されていない。これら未知の PHA 蓄積細菌がどのような細菌種に属するのかは非常に興味深い点であり、今後の更なる回解析が期待される部分である。

4-3-3 まとめ

実下水処理場より採取した活性汚泥を用いて、酢酸を唯一の炭素源としたバッチ試験を行い、PHA 蓄積細菌の群集構造へ及ぼす影響を Nile blue A と DAPI の二重染色、および FISH 法によって定量評価した。

その結果、活性汚泥中の約 1 割の細菌が PHA 蓄積能を有していることが判明し、その群集構造へ及ぼす影響因子として電子受容体、運転法、処理場の違いが及ぼす影響を評価した。表 4.3.1 からわかるように PHA 蓄積細菌の群集構造へ大きく影響を及ぼす因子はバッチ試験時の電子受容体の違いであることがわかった。また、標準活性汚泥法より採取した活性汚泥においても、嫌気好気法から採取した活性汚泥と同程度の PHA 蓄積細菌が存在していることがわかった。活性汚泥中の PHA 蓄積細菌として PAO mix、GB プローブ陽性細菌が広く検出されたが、これまでに知られていない PHA 蓄積細菌種が活性汚泥中に多く存在することが確認され、これらの細菌の細菌種の特정에興味を持たれる。

表 4.3.1 第四章において得られた結果のまとめ

影響因子	PHA蓄積細菌の群集サイズ	
	1. 電子受容体	強 (好気>硝酸>亜硝酸>嫌気)
	2. 運転法	弱
	3. 処理場	弱

第五章 Micromanipulation を用いた PHA 蓄積細菌の 分子生物学的同定

前章までの結果において、活性汚泥中には PAO mix、GB プローブ陽性細菌以外の PHA 蓄積細菌が存在していることが強く示唆された。本章ではこれらの PHA 蓄積細菌を同定するための試みとして micromanipulation と分子生物学的手法を組み合わせた手法を適用した。

5-1 実験方法

図 5.1.1 に実験の全体像を示した。まず、活性汚泥試料を用意し、EtOH 固定を施した後に、Nile blue A 染色液中で染色する。続いて、顕微鏡観察下で Nile blue A 染色陽性の細胞のみを micromanipulation により分取し、分取した細菌の持つ 16S rRNA 遺伝子断片を Nested PCR 法により増幅した。Micromanipulation の操作において、目的以外の細胞も混入して分取している恐れがあり、得られた増幅産物は複数種の細菌種に由来したものである可能性があるため、cloning 法により複数種から単一種の塩基配列へと分離した。塩基配列を解読した後に、特異的なオリゴヌクレオチドプローブの設計を行うが、設計する候補を半定量 PCR により絞り込みを行った。最終的に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを作成・適用し、試料中から検出される細菌が

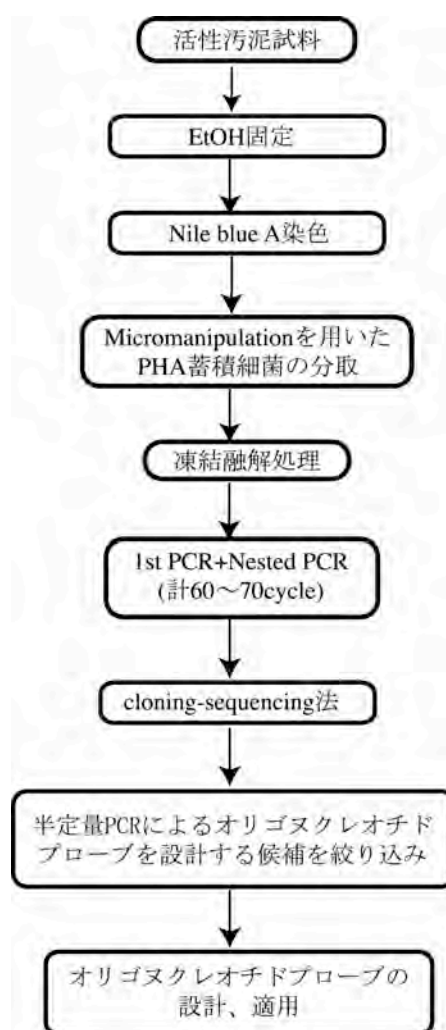


図 5.1.1 第五章の実験方法の全体像

PHA を蓄積しているかどうかを確認する操作までを一連の実験とした。以下の節でそれぞれの項の実験方法について詳細を説明する。

5-1-1 予備実験

Micromanipulation を用いた解析では以下の点において予備検討が必要であると考えられた。

- 1) 分取した数個～数百個程度の細胞から PCR を用いて遺伝子増幅が可能であるのか。
- 2) 分取した細胞から核酸抽出の工程を経ずに PCR を行うに当たって、最適な細胞壁処理法は何か。
- 3) Nile blue A 染色が PCR に何らかの影響を及ぼさないか。

上の3点を評価するために以下の実験を行った。

5-1-1-1 PCR における増幅下限の評価と最適な細胞壁処理法の検討

実験は *Escherichia coli* K12 株(以下 *E. coli* K12)と *Microlunatus phosphovorus* を用いて行った。これらの菌を LB 培地あるいは B-147 培地(表 5.1.1 参照)を用いて好気培養し、培養液の細胞濃度をバクテリア計数板(萱垣医理科工業)にて測定した。細胞濃度が $10^2 \sim 10^0$ cells/ μ L となるように培養液を 1×PBS buffer(137mM NaCl, 8.1mM Na₂HPO₄ 7H₂O, 2.68mM KCl, 1.47mM KH₂PO₄, pH 約 7.3)にて希釈し、PCR チューブに $10^3 \sim 10^1$ cells/tube となるように細胞懸濁液を分注した。続いて、以下の細胞壁処理を行った。

1. 凍結融解法

細胞の入ったチューブを液体窒素に浸して冷凍した後、60℃に保温しておいたウォーターバス、あるいはヒートブロックを用いて急速解凍する。この操作を3回繰り返した。

表 5.1.1 純菌の培養培地

LB培地		B-147培地(IAM)	
	g/1L		g/1L
Tryptone	10.0	Glucose	0.5
Yeast extract	5.0	Peptone	0.5
NaCl	5.0	Yeast extract	0.5
		Monosodium glutamate	0.5
		KH ₂ PO ₄	0.44
		(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1
		MgSO ₄ 7H ₂ O	0.1
	pH 7.5		pH 7.0

2. Proteinase K 処理

表 5.1.2 に反応時の組成を示す。
混合液を作成した後、55℃で 1 時間 30 分反応させた。

3. Lysozyme 処理

試料中に Lysozyme を終濃度 9mg/mL となるように添加し、室温で 5 分反応させた。

4. Hot-SDS 法

SDS を終濃度 1%となるように添加し、70℃で 10 分間加熱した。

5. 電子レンジ処理

SDS を終濃度 3%となるように添加し、70℃で 30 分間反応させた後、電子レンジを用いてマイクロ波処理を行った(700W、2 分間×2 繰り返し)。

表 5.1.2 Proteinase K の反応液組成

	添加量	終濃度
ProteinaseK (20mg/mL)	2.5uL	0.5mg/mL
10% SDS	5uL	0.5%
0.5M EDTA	2uL	10mM
1M Tris HCl	1uL	10mM
滅菌蒸留水	79.5uL	
Sample	10uL	
Σ 100uL		

以上の細胞壁処理を行った後の反応液を鋳型として PCR を行った。PCR では 16S rRNA 遺伝子を標的とし、27f-1492r(表 5.1.3)をプライマーセットとした。PCR 条件は表 5.1.4 に従った。

上記の PCR 後に 2% agarose 電気泳動を行い、Ethidium bromide(EtBr)染色を行った後、PCR 産物の有無を確認した。増幅産物が確認されなかった試料に対しては Nested PCR を行い、増幅産物が確認されるかどうかを確認した。Nested PCR では一度 PCR を行った試料を DDW にて 1/10 希釈したものを鋳型として用い

表 5.1.3 本章で使用した PCR プライマー一覧

Primer Name	Sequence(5'-3')
27f	agagtttgatcMtggtcag
35f	cctggctcaggatgaacg
357f	cctacgggaggcagcag
518r	attaccgcggtgctgg
907r	ccgtcaattcMttRagttt
968f	aacggaagaaccttac
1099f	gYaacgagcgcaaccc
1114r	gggttgctgctggtRc
1390r	ggtgtgtRcaaggccc
1392r	acgggcggtgtgtac
1492r	tacggYtacctgttacgact
1500r	ggttacctgttacgactt
SP6	catttagtgacactatag
T7	gtaatacgtactactatag

た。プライマーセットには 357f-514r(表 5.1.3)を用い、反応液組成は表 5.1.4 と同じものを用いた。PCR 条件は(95℃ 10 分、[94℃ 30 秒、53℃ 30 秒、72℃ 30 秒]×35cycle、72℃ 10 分)とした。

表 5. 1. 4 27f-1492r プライマーセットの PCR 条件

	/tube		
10×PCR buffer	1	95℃	10min
2mM dNTPs	1		
T7 primer(10uM)	0.2	94℃	30sec
SP6 primer(10uM)	0.2	50℃	30sec
DMSO	0.2	72℃	2min
DDW	6.35	× 30cycle	
AmpliTaq Gold(5units/uL)	0.05		
Template	1		
Σ	10uL	72℃	10min
		4℃	∞

5-1-1-2 Nile blue A 染色が PCR に及ぼす影響の評価

Micromanipulation では、Nile blue A 染色のシグナルが陽性の細菌(PHA 蓄積細菌)のみを分取するが、Nile blue A 染色が PCR を阻害するののかどうかに関しては報告がなかった。そのため、*Ralstonia eutropha* H16(IAM 12567)に PHA を蓄積させ、Nile blue A 染色を行った細胞と、行わなかった細胞を鋳型とした Real-time PCR を行い、Nile blue A 染色が PCR に及ぼす影響を定量評価した。

まず、*R. eutropha* H16 を(Yeast extract 10g、Polypepton 10g、Beef extract 5g、(NH₄)₂SO₄ 5g、1L 当たり、pH7.0)の培地で好気培養し、培養液を(13,500g、5 分、4℃)で遠心し、集菌を行った。菌体ペレットを 1×PBS buffer にて 3 度洗浄した後、エタノール固定(Roller *et al.* (1994))を 2 時間行った。エタノール固定は、1×PBS buffer で菌体を洗浄後、1×PBS buffer : 97%EtOH=1:1 混合液に懸濁させる方法で行い、固定後の試料は-20℃で保存した。エタノール固定後の菌体を適量の 1×PBS buffer に懸濁させ、細胞濃度をバクテリア計数板にて測定し、細胞懸濁液を等量ずつ 2 本のチューブへ分注した。

一方の試料に対して Nile blue A 染色を行うため、200μL の 0.1% Nile blue A in EtOH 染色液に菌体を懸濁させ、20 分間染色を行った。染色後、(10,000rpm、1 分、室温)の遠心分離を行い、上澄みを除去した。余分な染色液を除去する目的で Milli-Q 200μL に菌体を懸濁させ、再度遠心を行い、上澄みを除去した。最後に菌体ペレットを染色する前の懸濁液と同量の 1×PBS buffer に懸濁させた。

続いて、Nile blue A 染色を行った試料と未染色の試料を鋳型とした Real-time

PCR を、Light Cycler を用いて行った。PCR 反応液の組成は(1×KOD buffer、0.2mM dNTPs、20 mg MgSO₄、5μg BSA、2.5% DMSO、0.3μM each primer、0.4 units KOD plus、0.4μL SYBR Green I(1/100 希釈済)、10.2μL DDW、2μL Template、Total 20μL) とした。PCR の鋳型として 1 チューブあたり 1×10⁵ cells 入るように試料を希釈して用いた。PCR 条件は(94℃:5 分、[94℃:15 秒、X℃:20 秒、68℃:40 秒])とし、アニーリング温度(X℃)を 2cycle ごとに 1℃ずつ 56℃から 51℃まで低下させる Touch down PCR を行った。

5-1-2 活性汚泥試料

予備実験の検討を終えた後は、実処理場の活性汚泥を試料として実験を開始した。

活性汚泥試料としては 4-2 節で用いた試料と、本研究室にて運転されていた嫌気好気リアクターより採取した活性汚泥を用いた(表 5.1.5)。4-2 節において用いた試料は、N、NN、M 処理場の AO 法で運転されている系の嫌気槽末端部より採取した活性汚泥を凍結して実験室に持ち帰り、液体窒素中で保存したものである。本研究室にて運転されていた嫌気好気リアクターは、プロピオン酸と酢酸を主とした炭素源で運転されていた SBR リアクターで、嫌気工程終了時に活性汚泥を採取し、液体窒素にて凍結保存した。それぞれの試料中の PHA

表 5.1.5 Micromanipulation によって PHA 蓄積細菌の分取を行った試料一覧

		N処理場(AO法, 嫌気槽)		NN処理場(AO法, 嫌気槽)		M処理場(AO法, 嫌気槽)		実験室リアクター (SBR)	
		測定値	SD	測定値	SD	測定値	SD	測定値	SD
(1)	全菌中のPHA蓄積細菌の割合 [Nile Blue A染色陽性細菌/DAPI]	9%	±2%	11%	±4%	8%	±2%	23.5%	±3.7%
(2)	PAO mix probe陽性細菌の割合 [PAO mix probe陽性細菌/EUB]	6%	±2%	5%	±3%	3%	±3%	5.0%	±2.5%
(3)	細菌の割合[(Nile blue A陽性かつPAO mix probe陽性)/PAO mix probe陽性細菌]	90%	±1%	60%	±35%	45%	±38%	未測定	
(4)	GB probe陽性細菌の割合 [GB probe陽性細菌/EUB]	2%	±14%	<1.0%	-	2%	±2%	5.2%	±2.0%
(5)	PHAを蓄積していたGB probe陽性細菌の割合[Nile blue A陽性かつGB probe陽性/GB probe陽性細菌]	82%	±38%	-	-	17%	±29%	未測定	
(6)	全菌に対する真正細菌 [EUB/DAPI]	90%	±1%	88%	±2%	88%	±4%	96.9%	±2.3%
推測される未知のPHA蓄積細菌の存在量 $\{(1)-\{(2) \times (3)\} + \{(4) \times (5)\} \times (6)\} / (1)$		33%		75%		80%		55%	

蓄積細菌の存在割合と、PAO mix、GB プローブ陽性細菌の存在割合を Nile blue A と DAPI の二重染色と定量 FISH 法にて評価した結果を参考として表 5.1.5 に示す。

Micromanipulation に供する試料はあらかじめエタノール固定(Roller *et al.* (1994))を 2 時間行った。活性汚泥を 1×PBS buffer により 1 度洗浄した後、1×PBS buffer : 97%EtOH=1:1 混合液に懸濁させ-20℃で保存を行った。Micromanipulation には可能な限り新鮮な試料を供し、エタノール固定を行ってから 3 週間以内の試料を用いた。なお、パラホルムアミド固定した細胞を PCR の鋳型に直接用いた場合には、遺伝子増幅が困難になることが知られているため(Thomsen *et al.* (2004))、パラホルムアミド固定は行わなかった。

5-1-3 懸濁状態における Nile blue A 染色

Micromanipulation を行なう際には菌体をスライドグラス等に固定せず、細胞が浮遊した状態で染色する必要があった。そこで、PBS 洗浄済みの菌体を 200μL 程度の 0.1%[w/v] Nile blue A in EtOH 染色液に懸濁させ、20 分間の染色を行った。Nile blue A 染色後、(10,000rpm、1 分、室温)の遠心操作を行い、上澄みを除去した。余分な染色液を除去する目的で Milli-Q 200μL に菌体を懸濁させ、再度遠心操作を行い、上澄みを除去した。最終的に菌体は TE buffer(1mM EDTA、10mM Tris-HCl、pH 7.5)に懸濁させた。

5-1-4 Micromanipulation による PHA 蓄積細菌の分取

Micromanipulation を行う前に Nile blue A 染色後の試料を超音波分散し(10W、10 秒程度)、分取に適した細胞濃度まで TE buffer で希釈した。

Micromanipulation における一連の操作を図 5.1.2 に示す。まず、試料をカバーグラス(Matunami 社)へ滴下し、カバーグラスを倒立顕微鏡(Olympus IX-70、対物レンズ UPlan Apo 20×、40×)のステージに配置する。分取に適した細胞を探し、マニピュレーターの先端に取り付けたガラスキャピラリーをその細胞の近くへ移動させる(図 5.1.2 写真 1)。続いてインジェクターを用いて、細胞をキャピラリー内へ吸引させる(図 5.1.2 写真 2)。キャピラリーを空中へと移動させ(図 5.1.2 写真 3)、あらかじめステージ上に用意しておいた PCR チューブ内の RNase-free water に細胞を移す(図 5.1.2 写真 4)。最後にキャピラリーを PCR チューブから抜き取り、細胞が PCR チューブ内に適切に移動されたかを確認した。

(図 5.1.2 写真 5)。

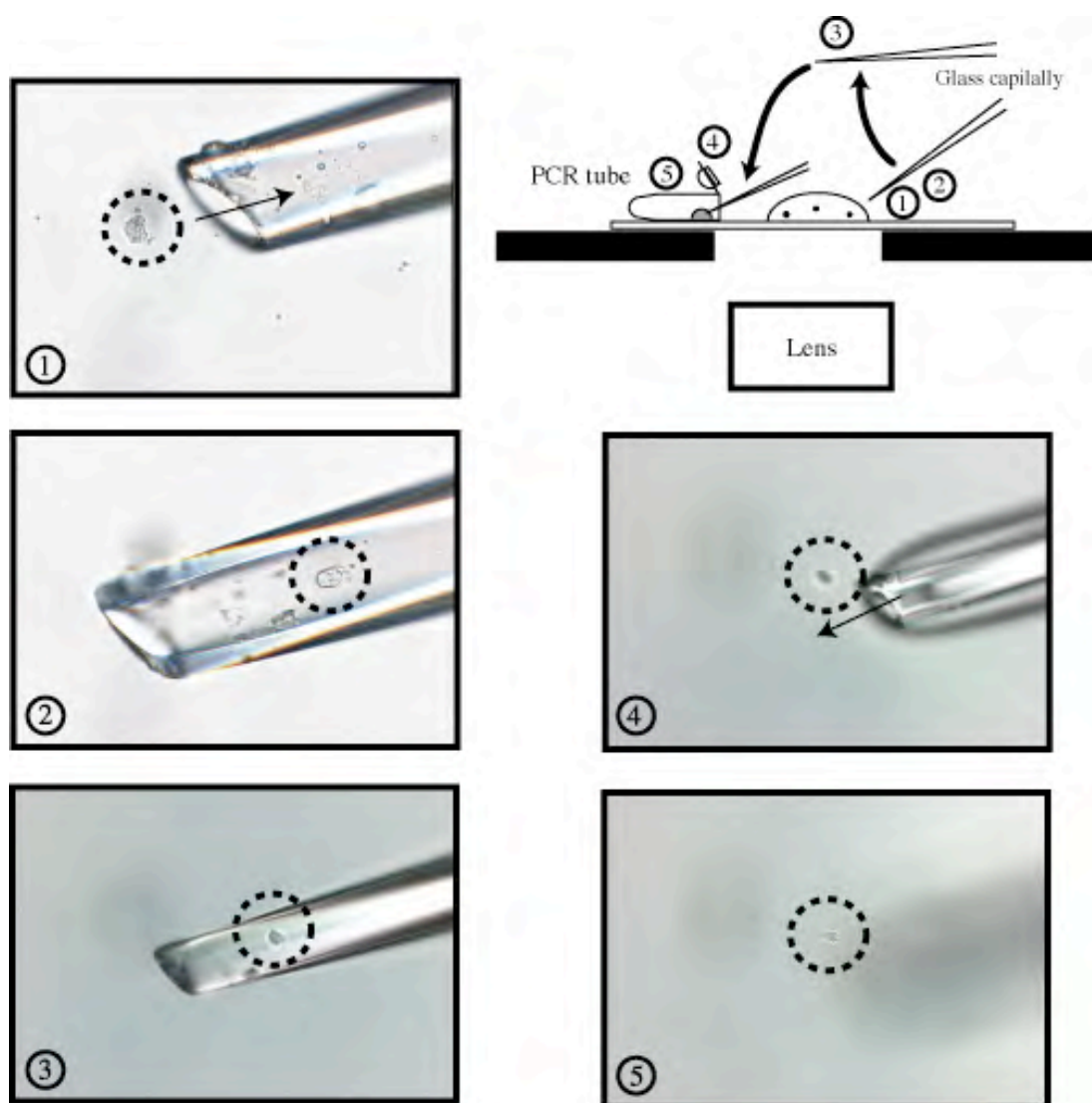


図 5.1.2 Micromanipulation を用いた微小フロックの分取における一連の流れ

Micromanipulation を行うインジェクターには IM-6(Narishige 社)を用いた。インジェクターとガラスキャピラリーの間はテフロンチューブ(CT-1、内径 0.9mm、Narishige 社)で連結し、内部を流動パラフィン溶液にて満たした。インジェクターには、マイクロキャピラリー製作器 PB-7(Narishige 社)を用いて先端径を約 10~20 μ m に加工したガラスキャピラリー(G-1 ガラス管、Narishige 社)を装着した。なお G-1 ガラス管は超音波洗浄済みのものであり、オートクレーブ等の滅菌操作は行わなかった。インジェクターの操作は粗動マニピュレーターMM-87(Narishige 社)を用いて行った。

5-1-5 分取した細胞の 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR

PCR チューブ内に分取した細胞に対して、まずは凍結融解処理を行った。凍結融解処理では、PCR チューブを液体窒素に浸して凍結させ、60℃のウォーターバスにて解凍する操作を三度繰り返した。

PCR の反応液の組成は(1×PCR buffer、0.2 mM dNTPs、0.2μM each primer、AmpliTaq Gold 0.75units、DDW 7.65μL、Template 15μL、Total 30μL)とし、プライマーセットには 27f-1500r(表 5.1.3)を用いた。PCR 条件は表 5.1.6 に従った。35cycle 程度の PCR では agarose 電気泳動後に PCR 産物を確認できなかったため、Nested PCR を行った。その際、プライマーセットには 35f-1390r(表 5.1.3)を用い、PCR 条件は表 5.1.6 に従った。

表 5. 1. 6 分取した微小フロックに対する Nested PCR の条件

1st PCR				Nested PCR			
	/tube				/tube		
10×PCR buffer	3	94℃	10min	10×PCR buffer	1	94℃	10min
2mM dNTPs	3			2mM dNTPs	1		
27f primer(10uM)	0.6	94℃	30sec	35f primer(10uM)	0.2	94℃	30sec
1500r primer(10uM)	0.6	50℃	30sec	1390r primer(10uM)	0.2	50℃	30sec
DDW	7.65	72℃	2min	DMSO	0.2	72℃	2min
AmpliTaq Gold(5units/uL)	0.15	×35cycle		DDW	6.35	×35cycle	
Template	15			AmpliTaq Gold(5units/uL)	0.05		
		72℃	10min	Template(1/10希釈済)	1	72℃	10min
		4℃	∞			4℃	∞
Σ	30uL			Σ	10uL		

5-1-6 PCR 産物を用いた cloning、sequencing 反応

Cloning には Qiagen PCR cloning kit(Qiagen 社)を用い、操作は付属の説明書に従った。X-gal と IPTG を用いたブルーホワイトセクションを行なった後、コロニーダイレクト PCR を行い、PCR 産物のインサートを確認した。コロニーダイレクト PCR には SP6-T7 プライマーセット(表 5.1.3)を用い、PCR 条件は表 5.1.7 に従った。

表 5. 1. 7 コロニーダイレクト PCR の条件

	/tube		
10×PCR buffer	3	94℃	10min
2mM dNTPs	3		
SP6 primer(10uM)	0.6	94℃	30sec
T7 primer(10uM)	0.6	52℃	30sec
DDW	22.65	72℃	2min
AmpliTaq Gold(5units/uL)	0.15	×30cycle	
Template	-		
		72℃	10min
Σ	30uL	4℃	∞

PCR 産物のインサートを確認したクローンから ABI3100 avant GeneticAnalyzer(Applied Biosystems 社)を用いて塩基配列の解読を行った。まず、コロニーダイレクト PCR 後の PCR 産物を Montage™ PCR_{μ96} (Millipore 社)にて精製した。Sequence 反応は表 5.1.8 に従って行った。1/8 BigDye Version 3.1(Applied Biosystems 社)の調整では、5×SQ buffer(400mM Tris-HCl、10mM MgCl₂、pH9.0)を用いて、BigDye Version 3.1 の原液を 5×SQ buffer で 8 倍希釈して使用した。Sequence primer には表 5.1.3 のものを用いた。Sequence 反応後、反応液を Montage™ SEQ₉₆(Millipore 社)にて精製を行い、精製した鋳型を Sequence injection solution に懸濁させ、この懸濁液 10μL と Hi-Di Formamide 10μL を混合させたものを ABI3100 avant GeneticAnalyzer にて解析した。泳動には 3100 POP6(Applied Biosystems 社)を用い、解析条件は[Mobility file:DT3100POP6{Bdv3}v1.mob, Run Module:StdSeq50_POP6DefaultModule,AnalysisModule:BC3100APOP6SR_SeqOffFt Off.saz]とした。

表 5.1.8 Sequencing 反応の条件

	/tube	96℃	30sec	
1/8 BigDye Version 3.1	4			
Sequence Primer (10uM)	0.32	96℃	10sec	
DDW	4.68	50℃	5sec	
Template	1	60℃	4min	×26cycle
Σ	10uL			
		4℃	∞	

5-1-7 系統樹の作成と特異的なオリゴヌクレオチドプローブの設計、適用

解読した塩基配列データを AutoAssembler V2.1(Applied Biosystems 社)を用いて整理した後に、塩基配列を Arb(Ludwig W. *et al.*(2004))のデータベースへ挿入した。その際に、Arb の”Integrated Aligner”プログラムを用い、*E.coli* の 16S rRNA 遺伝子配列と比較しながら挿入した塩基配列データのアライメントを行った。アライメントを行った塩基配列は”Parsimony”アルゴリズムにより進化距離を計算し、系統樹内の適切な位置へ配置した。

本来ならば、得られた 16S rRNA 遺伝子の塩基配列全てに対して特異的なオリゴヌクレオチドプローブを設計することが望ましいが、Cyanine 3(Cy3)や Fluorescein isothiocyanate(FITC)などで化学修飾するオリゴヌクレオチドプローブは比較的高価であるため、得られた塩基配列種全てに対して作成することは難しかった。そこで得られた塩基配列種の中からいくつかの候補に絞り込むこ

表 5.1.9 半定量 PCR 用に設計した PCR プライマー

検出対象	Primer Sequence(5'-3')	E.coli position	Tm	Primer set*
N floc5	GACAGCGGAAGTTCGAGT	666	58	SP-1492r
N floc7 No1	GAGCGGTAAGGCCCTTC	63	60	SP-1390r
N floc7 No2	GGACGAAGCCACTCGGGT	445	60	SP-1390r
N floc10	ATGGGGTTTGCTTGACCT	1268	54	27f-SP
N W10+NNfloc3 No1	GCAGCGTTCTCGTGTATG	994	56	27f-SP
M floc4 No1	CTTAAGCCAGCCACACCT	827	56	SP-1390r
M floc5	CGACCGGTCCCGACATG	994	62	35f-SP
M floc7	GGCGGATCACTTCACGCG	865	60	35f-1390r
M floc8 No1	CCTGTGCCAGATTCTT	1030	56	35f-SP
M floc8 No2	AACTGGACACGTCAAGG	988	54	35f-SP
M floc9 No1	GGTGGCTAACTTAACGGT	865	54	35f-SP
M floc9 No2	AGTGTATCGCTGATGTCG	827	54	35f-SP
実験室リアクター f18 No2	TCTGTGAGCAGGAAAGCG	182	56	SP-1492r
実験室リアクター floc21 No2	AGACATGTCAAACGTGGG	983	54	27f-SP
N W3 cloNe N W8 cloNe NN floc1 cloNe NN floc2 cloNe NN W5 cloNe 実験室リアクター f20 cloNe 実験室リアクター f18 No1 cloNe N W5 cloNe	St. mal 125f CGGAATCTACTCTGTCGT St. mal 584r ACGGACTTAAACGACCAC	125 584	54 54	St. mal 125f -St. mal 584r
NN W10 cloNe M f4 No2 cloNe M f6 cloNe 実験室リアクター f21 No2 cloNe	Brevi.casei 600f GCTGTGGAAACGCAACGC Brevi.casei 1252r CTCACGGGTTCGCCTCTC	600 1252	58 60	Brevi.casei 600f -Brevi.casei 1252r
NN f3 No2 cloNe NN f5 cloNe 実験室リアクター W13 cloNe	Propi.acnes 196f AGTTTCGGCGGTTGGGGA Propi.acnes 995r TGAGCACTCCCGATCCAT	196 995	58 56	Propi.acnes 196f -Propi.acnes 995r

*Primer setのSPは設計したプライマーを用いたことを示す

とが必要であった。そこで以下のような半定量的な PCR を行うことで絞り込みを行った。

まず、各塩基配列に特異的な PCR プライマーを Arb の”Design Probe”プログラムを用いて設計した。Design Probe プログラムにより設計した PCR プライマーの一覧と PCR 条件を表 5.1.9 に示した。設計したプライマーの特異性は Ribosomal database project-II release 9(Cole J.R. *et al.*(2005)の”Probe match”を用いて確認した。PCR プライマーセットは表 5.1.9 の最右列に示した。なお、PCR 時のアニーリング温度は設計した PCR プライマーの Tm 値を用いたが、設計した PCR プライマー同士で PCR を行う場合の PCR のアニーリング温度は、用いた PCR プライマーの Tm 値の低い方に設定した。

続いて、微小ブロックの分取を行った活性汚泥から核酸抽出を行い、得られた核酸を鋳型とし、設計した特異的な PCR プライマーを用いた PCR を行った。この際に既知量のコピー数を鋳型とした試料も同時に PCR を行い、PCR 後に agarose 電気泳動を行い、増幅産物の量を目視で比較することで、特異的な PCR プライマーの標的とされる細菌種が活性汚泥試料中にどの程度のオーダーで存在するのかを確認した。概念図は図 5.1.3 の通りであり、少ない PCR サイクル数では、初期鋳型量の多い試料から順に PCR 産物は確認されるはずであり、これらの PCR 産物と活性汚泥試料より抽出した核酸を鋳型とした試料の PCR 産物を比較することで半定量的な比較を行った。

既知量の鋳型の調整は以下の通り行った。塩基配列の解読に用いたクローンを鋳型として、設計した PCR プライマーを利用して PCR を行い、得られた PCR 産物を Qiagen PCR purification kit(Qiagen)を用いて精製した後、核酸濃度を測定した。核酸濃度と PCR の際に用いた PCR プライマーセットの増幅産物長から以下の式を用いてコピー数の計算を行った。

$$\text{Copies}/\mu\text{L} = \text{OD}_{260} \times 50 \text{ (ng}/\mu\text{L}) \times 10^{-9} \times 6 \times 10^{23} / (\text{産物長(bp)} \times 660)$$

ここで活性汚泥より抽出した核酸 1ng 中にどの位のゲノムコピー数があるかを推察すると、活性汚泥を構成する様々な細菌が有するゲノムサイズが大腸菌の 4.64Mbp(Blattner FR *et al.*(1997))と同じであると仮定し、上式を用いて計算すると、 1.96×10^5 copies 含まれていることになる。オリゴヌクレオチドプローブを用いた FISH 法において、標的細菌を検出するためには、標的細菌が全菌中の約 1%の存在比を有することが必要であるとされている。よって、活性汚泥試料中で 1.96×10^3 (10^3 オーダー)copies/ng の存在比を有している細菌種に対して特異的なオリゴヌクレオチドプローブを設計し、適用すれば、活性汚泥試料中より検出できる可能性がある。

半定量 PCR により絞り込まれた細菌種に対しては、塩基配列を基にオリゴヌクレオチドプローブを設計し、オリゴヌクレオチドプローブの 5'側を Cy3 に

鋳型量		PCRサイクル数		
		35cycle	30cycle	25cycle
既知量の鋳型	10^5	○	○	○
	10^4	○	○	○
	10^3	○	○	ND
	10^2	○	ND	ND
	10^1	ND	ND	ND
活性汚泥試料より抽出した核酸1ng		○	○	ND

図 5.1.3 半定量 PCR の概念図

で標識した。設計したオリゴヌクレオチドプローブに対して、0miss、1miss match の配列を持つ細菌が入手可能な場合には分譲機関を通して入手し、これらをコントロールとして用いた。設計したオリゴヌクレオチドプローブの最適な hybridization の条件を検討するため、ホルムアミド濃度を 10% 刻みで変化させた条件で hybridization を行い、非特異的な結合が生じているかを確認した。この際の FISH 条件は 4-2-1-2 節と同じものを用いた。また、いくつかのプローブに対してはヘルパーオリゴ(Bernhard M. F. *et al.* (2000))を設計し、プローブと混合して使用した。今回使用したオリゴヌクレオチドプローブ、ヘルパーオリゴの一覧を表 5.1.10 に示す。オリゴヌクレオチドプローブにより活性汚泥試料から検出できた場合には 4-2-1-2 節と同じ方法で FISH 法と Nile blueA 染色を組み合わせ、検出された細菌が PHA を蓄積しているかどうかを確認した。

5-2 実験結果と考察

5-2-1 PCR における増幅下限の評価と最適な細胞壁処理法の検討

表 5.2.1 に *E.coli* K12 と *Microrunatus phosphovor*us を用いた PCR における増幅下限の評価と、最適な細胞壁処理法の検討を行った結果を示す。なお、検討は各試料において 2 繰り返しで行った。Nested PCR を行うことで、グラム陽性菌である *Microhunatus phosphovor*us を 10⁰ オーダーからも検出できることがわかった。

5 種類の細胞壁処理を試みたが、凍結融解処理以外の処理を行った試料からは増幅産物を確認できなかった。未処理の試料からは増幅が得られていることから、これらの処理を行った結果、何らかの原因で PCR が阻害されたものと考えられる。Rossen L. *et al.*(1992)は様々な化学物質が PCR 反応を阻害する濃度の閾値を報告している。彼らの報告によれば、Lysozyme は 0.5mg/mL で PCR を阻害し、Proteinase K は 0.5mg/mL でも PCR に及ぼす阻害の影響は確認されず、SDS は 0.005%で阻害を示すことを報告している。Lysozyme、Proteinase K、Hot-SDS 法でそれぞれ細胞壁処理を行った鋳型を PCR に用いたが、PCR 反応液中での終濃度はそれぞれ Lysozyme 0.9mg/mL、Proteinase K 0.05mg/mL、Hot-SDS 0.01mg/mL であり、Lysozyme、Hot-SDS の系では細胞壁処理に用いた試薬が PCR を阻害していた可能性が高いことがわかった。しかし、細胞壁処理の際に用いる酵素あるいは試薬濃度を低くすると、それだけ細胞壁処理も温和な条件にな

表 5. 1. 10 使用したオリゴヌクレオチドプローブ、ヘルパーオリゴの一覧および、オリゴヌクレオチドプローブに
対するミスマッチを有する細菌種

検出対象	Probe Name*	Probe Sequence(5'-3')	E.coli position	0ミス	1ミス
N f7_No1 clone	N7-N1(63)	GAAGGGGCTTACCGCTC	63	<i>Kribbella flavida</i> NBRC 14399T	-
	N_f7_No1_Cy3	GGCACAAAGGACgtGGAAt	840	-	-
	Nf7_N1(592)	TTTTCACTCCCGACGCGA	592	<i>Pimelobacter(Nocardioides) simplex</i> IAM1660	-
	Nf7_helper822	GTCCTCACACCTAGCGC	822	N_f7_No1_Cy3プローブのヘルパーオリゴ N_f7_No1_Cy3プローブのヘルパーオリゴ	
	Nf7_helper859	CGCTTAATGCGTTAGCTGC	859		
N f10 clone	N_f10_Cy3	TCACTGTTGAACCATGCGG	184	<i>Staphylococcus capitis</i> ; JCM 2420	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ; IAM12013
M f4_No4、 M f9 clone	CFB719	AGCTGCCCTTCGCAATCGG	719	Weller R. et al. (2000)	
M f8_No2 clone	Mf8_no2(988)	AAACTGGACACGTCAAGG	988	-	-
	MKMS_f8_No2(II-18)	TGTGTTCCAGCCACCCGA	1029	-	<i>Hyphomonas polymorpha</i> ; IAM14246
	Mf8_no2(227)	AATCTCACGCGGGCTAAT	227	-	-
	Mf8_988_Helper_970	CCTGGTAAGGTTCTTCGC	970	Mf8_no2(988)プローブのヘルパーオリゴ Mf8_no2(988)プローブのヘルパーオリゴ Mf8_No2(II-18)プローブのヘルパーオリゴ Mf8_no2(227)プローブのヘルパーオリゴ Mf8_no2(227)プローブのヘルパーオリゴ	
	Mf8_988_Helper_1006	AAGCCATCTCTGGCGATC	1006		
	Mf8_1029_Helper_1047	CGACAGCCATGCAGCACC	1047		
	Mf8_227_Helper_207	CGTTTAGCGATAAAATCTTTC	207		
	Mf8_227_Helper_245	TTACCCACCAACTACCT	245		
実験室リアクターf18_No2 clone	Arou_f18_No2(II-18)	TCACGAACCCACCGTGG	1465	<i>Comamonas badia (Gloemonas mucosa)</i> ; IAM 14839	<i>Comamonas terrigena</i> ; IAM 12052T
	A_f18(830)	GGTTTTACCCACCAACA	830	None(92)	-
	A_f18_830_Helper_811	CCTAGTTGACATCGTTTAG	811	A_f18(830)プローブのヘルパーオリゴ A_f18(830)プローブのヘルパーオリゴ	
	A_f18_830_Helper_850	CGTTAGCTACGGTACTAAAT	850		
実験室リアクターf21_No2 clone	A_f21_(1152)	CTTGCCACCCGGCAGTTCCA	1152	None	<i>Azospirillum brasilense</i> ; IAM12400
	A_f21(596)	CGGGATTTCACCCCAAC	596	<i>Paracoccus denitrificans</i>	-
	A_f21(983)	AGACATGTCAAACGTGGG	983	None	-
	A_f21_983_Helper_965	TAAGGTTCTTCGCGTTGC	965	A_f21(983)プローブのヘルパーオリゴ A_f21(983)プローブのヘルパーオリゴ A_f21(596)プローブのCompetitorとして使用	
	A_f21_983_Help_1001	ATCTCTGACGACCATACT	1001		
	A_f21_596_Competitor	CGGGATTTCACCCCGAC	596		
Stenotrophomonas relating clone	XAN818	CAACATCCAGTTCGCATC	818	Friedrich U. et al. (1999)	

*Probe Nameに"helper"を含むものはヘルパーオリゴを示す

表 5.2.1 *E. coli* K12、*Microlunatus phophovorus* を用いた最適な細胞壁処理法の検討

<i>E. coli</i> K12		細胞数 (cells/tube)		
		10 ²	10 ¹	10 ⁰
細胞壁処理法	未処理	○	○	ND
	凍結融解法	○	○	○(Nested PCR)
	Proteinase K処理	ND	ND	ND
	Lysozyme処理	ND	ND	ND
	Hot-SDS法	ND	ND	ND
	電子レンジ処理	ND	ND	ND

<i>Microrunatus phosphovorus</i>		細胞数 (cells/tube)		
		10 ²	10 ¹	10 ⁰
細胞壁処理法	未処理	○	ND	ND
	凍結融解法	○	○(Nested PCR)	○(Nested PCR)
	Proteinase K処理	ND	ND	ND
	Lysozyme処理	ND	ND	ND
	Hot-SDS法	ND	ND	ND
	電子レンジ処理	ND	ND	ND

○	増幅産物確認
ND	Not Detected

ってしまうため、PCR の阻害を起こさないように酵素、試薬濃度を低下させることは実試料に適用する場合には好ましくなく、よってこれらの細胞壁処理法は用いることはできないと判断した。また、Snaidr J. et al.(2002)はエタノール固定をした細胞に凍結融解処理を施すことで、環境試料中からグラム陽性細菌である *Nostocoida limicola* の 16S rRNA 遺伝子断片を得る事に成功しており、エタノール固定と凍結融解処理を組み合わせる方法がグラム陽性細菌にも有効な手段であることを報告している。

以上の検討から、凍結融解を行った細胞に対して Nested PCR を行うことで、わずか数個の細胞から 16S rRNA 遺伝子断片を得る事ができることがわかった。よって、micromanipulation を用いて活性汚泥試料から細胞を分取し、その細胞から 16S rRNA 遺伝子断片を得る事が可能であることがわかった。

5-2-2 Nile blue A 染色が PCR に及ぼす影響の評価

Nile blue A 染色を行った細胞と、行わなかった細胞を鋳型として Real-time

PCR を行った結果を示す(図 5.2.1)。それぞれの反応チューブには同じ量の細胞を添加しており、Nile blue A 染色が PCR に対して阻害等の影響を及ぼさないならば、両者の増幅曲線は類似したものになるはずである。図 5.2.1 からわかるように、両者の増幅曲線は非常に類似しており、よって Nile blue A 染色が PCR に及ぼす影響は無視できるものと考えられる。

本節の結果と 5-2-1 節の結果をふまえて考えると、活性汚泥試料に対して Nile blue A 染色を施した後に、micromanipulation を用いて PHA 蓄積細菌の細胞を分取し、その細胞から 16S rRNA 遺伝子断片を得る事が可能であることがわかった。

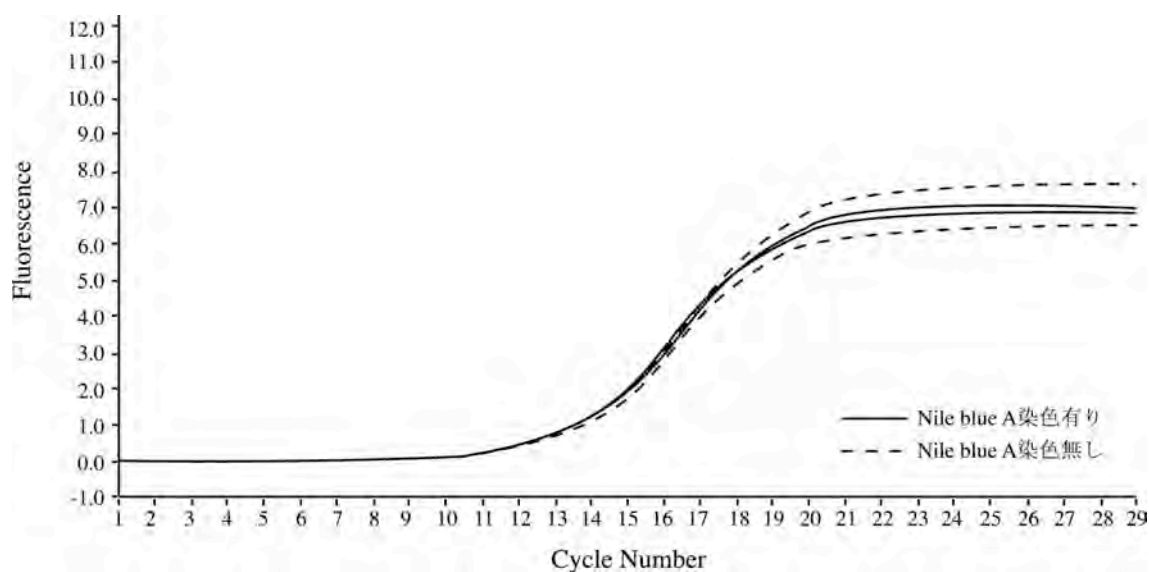


図 5.2.1 Nile blue A 染色の有無が PCR に及ぼす影響の評価

5-2-3 活性汚泥試料からの PHA 蓄積細菌の分取と 16S rRNA 遺伝子に基づいた系統解析

三カ所の実下水処理場と、本実験室で稼働していた嫌気好気リアクターより、micromanipulation を用いて PHA 蓄積細菌の分取を行った。図 5.2.2 に分取した細胞の例を示す。約 10~100 個の細胞が集合し、PHA 蓄積細菌以外の細胞が付着していない微小ブロックを分取した。

分取した微小ブロックに対して凍結融解処理を行った後、Nested PCR を行っ

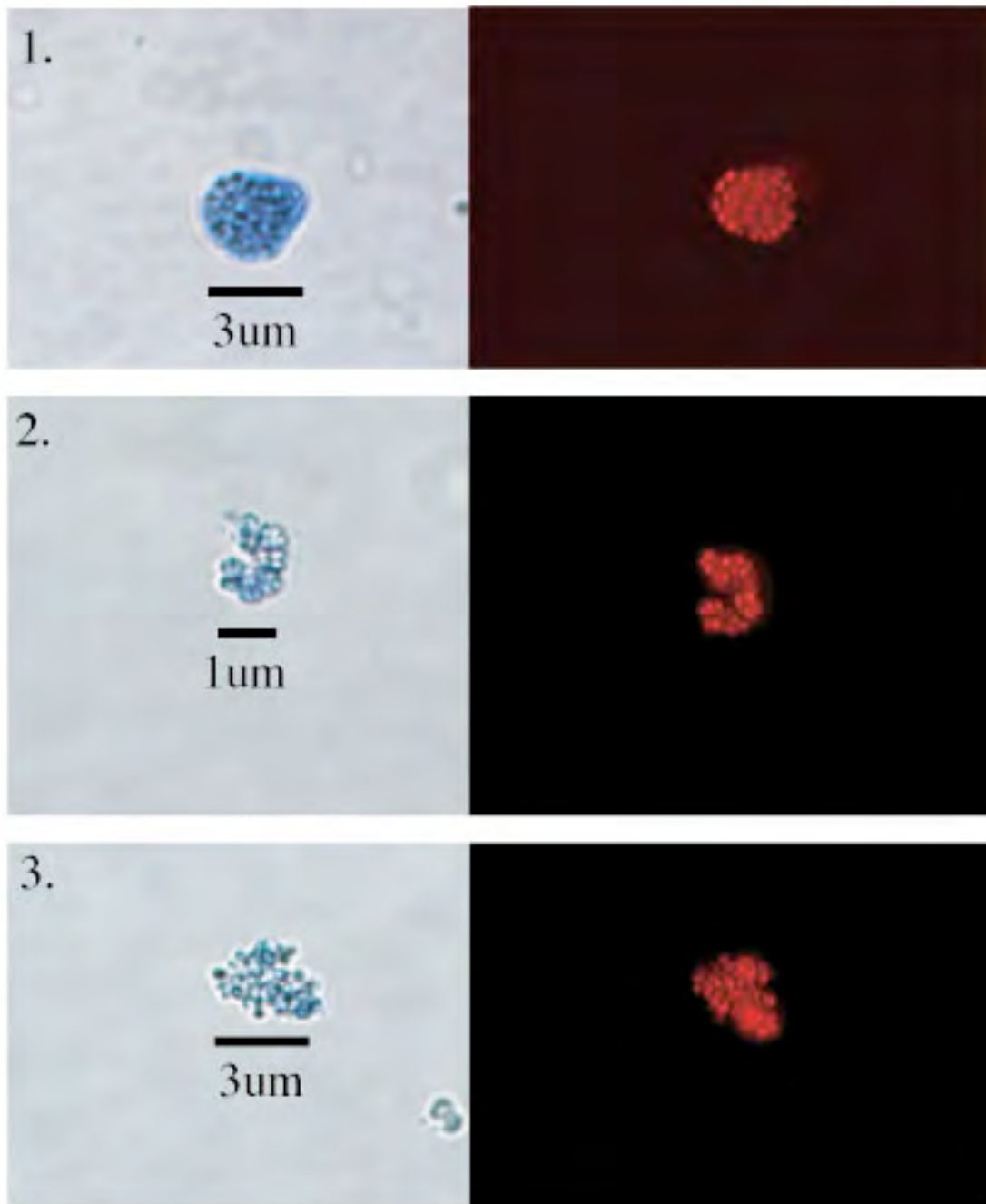


図 5.2.2 Micromanipulation によって活性汚泥中より分取した微小フロックの例 (左: 位相差、右: WIG フィルター (Nile blue A 陽性細菌は赤いシグナルを示す))

た。分取した微小フロックの数は N、NN、M 処理場、実験室リアクターでそれぞれ 17 個、16 個、11 個、33 個であり、Nested PCR により増幅産物が得られた試料の数は N、NN、M 処理場、実験室リアクターでそれぞれ 7 個、6 個、6 個、4 個であった。

得られた増幅産物の塩基配列を解読し、系統樹を作成した結果(図 5.2.3)、得られた塩基配列は門レベルで α -、 β -、 γ -proteobacteria、Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides、Gemmatimonadetes、Chloroflexi、Actinobacteria、Firmicutes に帰属し、大別して 19 種の塩基配列が得られたことがわかった。また、いくつかの微小フロックからは複数種の 16S rRNA 遺伝子に由来する塩基配列が得られた。

Nested PCR を用いて増幅産物を得る事に失敗した原因は以下の二種類である。1) Nested PCR 後にも増幅産物が確認されない試料、2) PCR 時のコンタミネーション。今回の解析では Nested PCR を行い、計 60~70cycle 程度の PCR を行っているため、本来は増幅が確認されないはずの、ネガティブコントロールから増幅が確認されてしまう場合があり(図 5.2.4)、これらの試料を除いた結果、16S rRNA 遺伝子断片が得られた試料の数は前述の通りとなった。

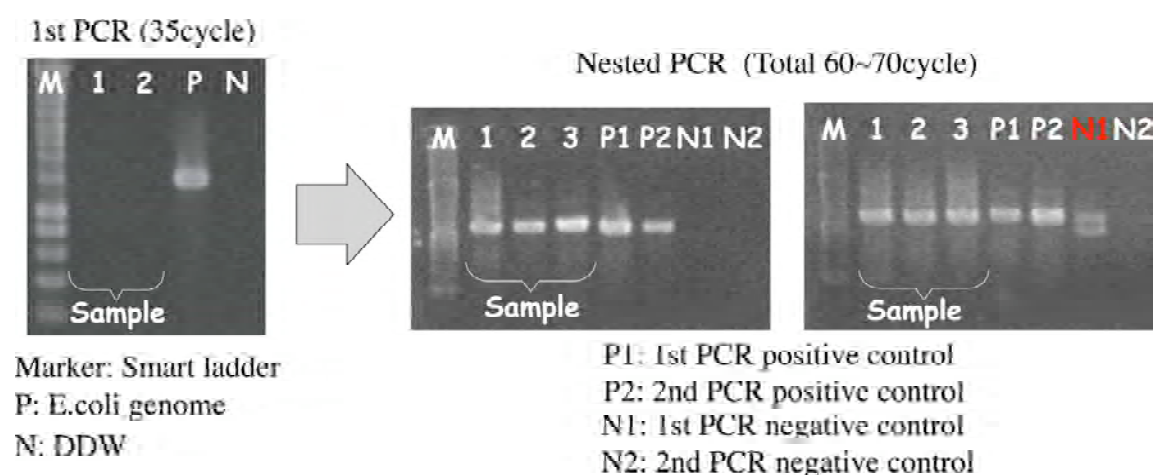


図 5.2.4 Nested PCR におけるネガティブコントロールからの増幅産物の発生(左: 1st PCR、中央: Nested PCR 成功例、右: Nested PCR でネガティブコントロールから増幅産物が確認された場合)

5-2-4 特異的なオリゴヌクレオチドプローブの設計と活性汚泥試料への適用

前節において得られた 16S rRNA 遺伝子断片を有する細菌種は PHA 蓄積細菌である可能性を持っているが、PHA 蓄積細菌であるか否かは特異的なオリゴヌ

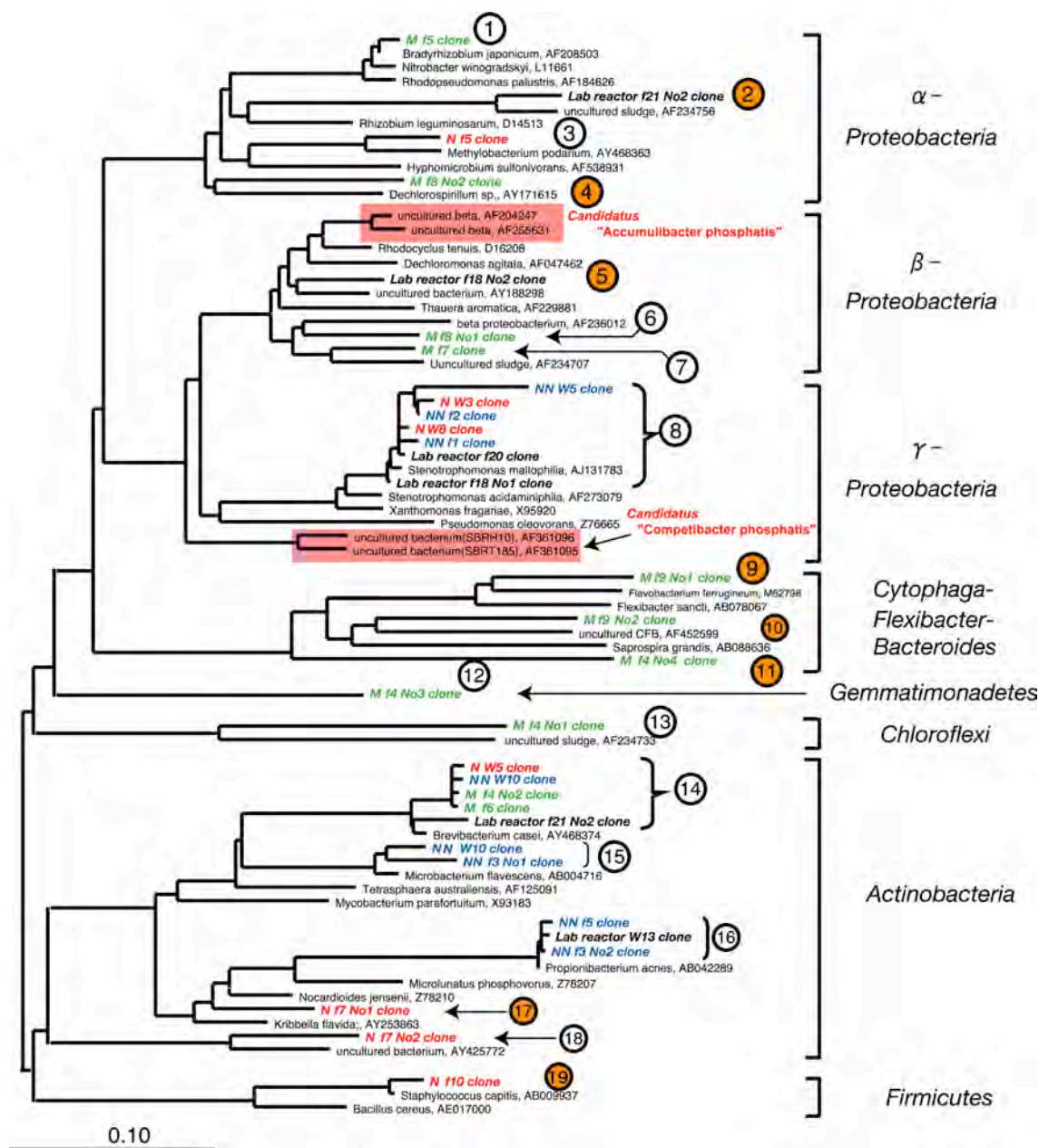


図 5.2.3 Micromanipulation により分取した微小ブロックから得られた増幅産物の塩基配列より作成した 16S rRNA 遺伝子の系統樹: なお、Lab reactor (実験室 SBR リアクター) と表記した。

一つの微小ブロックから複数種の塩基配列が得られた試料には "No1 or 2" と示してある。

微小ブロックの右に 1~18 までグループ番号を表示し、グループ番号が色づけされているものは、半定量 PCR によりオリゴヌクレオチドプローブの設計候補となったグループを示す。

クレオチドプローブを設計・適用し、その細菌が PHA を蓄積しているかどうかを Nile blue A 染色を用いて証明する必要がある。

特異的な PCR プライマーを用いた半定量 PCR を行った結果、グループ 2、4、5、9、10、11、17、19 の細菌種を対象とした特異的なオリゴヌクレオチドプローブを設計することを決定した。半定量 PCR の結果とは別に γ -proteobacteria 門の *Stenotrophomonas* 属に帰属される塩基配列(グループ 8)が多数得られていたため、*Stenotrophomonas* 属を含む *Xanthomonas* 科の細菌を標的とした XAN818 プローブ(Friedrich U. *et al.* (1999))も適用した。微小フロックを分取した活性汚泥試料に対して、これらのオリゴヌクレオチドプローブを適用した結果を表 5.2.2 に示す。その結果、グループ 5、9、10、11 を活性汚泥試料中から検出することに成功した。続いて、FISH 法と Nile blue A 染色を組み合わせ、検出された細菌が PHA を蓄積しているかどうかを確認した。その結果、グループ 5、9、10、11 の細菌は PHA を蓄積していないことが明らかとなった(表 5.2.2)。そのため、今回の micromanipulation を用いた活性汚泥中の PHA 蓄積細菌を同定する試みは失敗に終わってしまった。

表 5.2.2 オリゴヌクレオチドプローブによる各グループの細菌の検出と、PHA 蓄積能の確認

検出対象	グループ番号	FISH観察結果	Nile blue A二重染色
実験室リアクターf21_No2 clone	2	ND	-
M f8_No2 clone	4	ND	-
実験室リアクターf18_No2 clone	5	○	negative
M f4_No4、MKWS f9 clone	9, 10, 11	○	negative
N f7_No1 clone	17	ND	-
N f10 clone	19	ND	-
<i>Stenotrophomonas</i> relating clone	8	ND	-

5-2-5 Micromanipulation を用いた解析法の問題点

Micromanipulation を用いた手法で PHA 蓄積細菌を同定することに失敗してしまったが、その原因を以下で考察する。Micromanipulation を用いて活性汚泥試料から PHA 蓄積細菌によって構成されている微小フロックを分取する段階までは、目視で PHA 蓄積細菌を分取していることを確認しながら行っていたため、この段階までは問題はないと考えられる。それ以降の操作課程で失敗の原因として疑われる要素は以下の 4 点である(図 5.2.5 参照)。

- 1) 分取した微小フロックの損失

- 2) コンタミネーション: エアロゾル、ガラスキャピラリー、PCR 試薬
- 3) 不十分な細胞壁処理
- 4) PCR バイアス: 用いたプライマーの標的範囲、増幅効率の差

1) に関しては微小フロックの分取には成功したものの、PCR チューブへ微小フロックを移す際に微小フロックが失われてしまった、あるいは微小フロックがチューブの管壁に付着してしまったことがなどが考えられ、微小フロック以外の細胞から増幅産物を得てしまった可能性が示唆される。

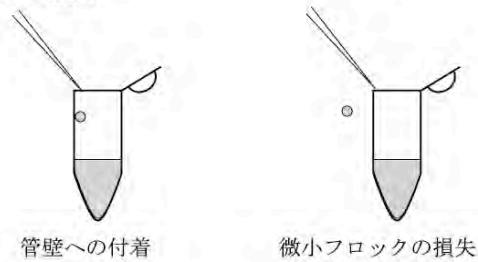
2) に関しては空気中の浮遊細菌(エアロゾル)、あるいはガラスキャピラリーに付着していた細菌が混入してしまい、それらの細菌の 16S rRNA 遺伝子断片を検出してしまったことが原因となったのではないかと考えられる。当然のことであるが、micromanipulation で分取する細胞は数 10~100 個程度であるためコンタミネーションが及ぼす影響は通常の解析時よりも大きくなる。Tanner M.A. *et al.* (1998)らは PCR を介した微生物群集構造の解析を行う際のコンタミネーションの影響を報告しており、彼らの解析において混入したと考えられる塩基配列を特定した結果、今回の解析において頻繁に検出された *Stenotrophomonas* 属に帰属される塩基配列であったことを報告している。

別の影響として用いた PCR 試薬が汚染されていた可能性も考えられる。Goto M. *et al.* (2005)は企業に依頼して合成した PCR primer が使用前から既に汚染されていたことを報告している。また、Taq polymerase は好熱細菌などの宿主から抽出されて生産されているが、この際に宿主のゲノムが混入してしまい PCR において検出されてしまうことが報告されている(Gale J. M. *et al.* (2003))。

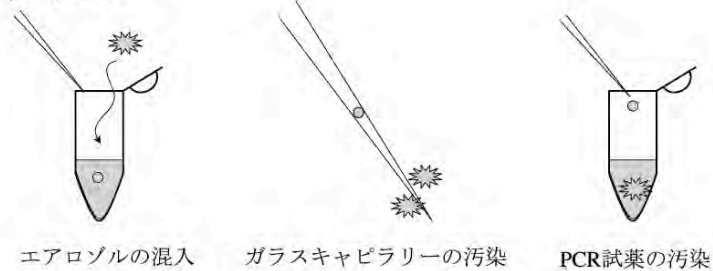
特に今回は広範囲の細菌種の 16S rRNA 遺伝子を標的とする PCR プライマーセットを使用していたため、混入した細菌の 16S rRNA 遺伝子も区別なく増幅されてしまう恐れが高い。このようなコンタミネーションの問題は特に 16S rRNA 遺伝子を対象とする場合に問題となりやすい(Corless C.E. *et al.* (2000))。

3) に関しては、分取した微小フロック中の PHA 蓄積細菌の細胞壁を破壊し、核酸を PCR 反応液中に放出させるための処理として、今回用いた凍結融解処理では不十分であった可能性が考えられる。しかし、今回の解析では、細胞壁が強固なグラム陽性細菌が属するグループ(Actinobacteria、Firmicutes)に帰属され

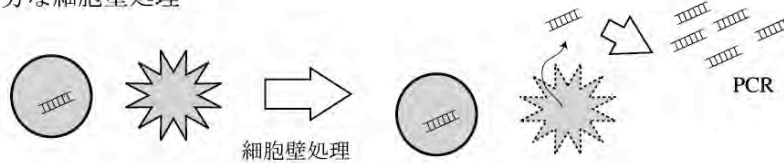
1) 微小フロックの損失



2) コンタミネーション



3) 不十分な細胞壁処理



4) PCRバイアスの影響

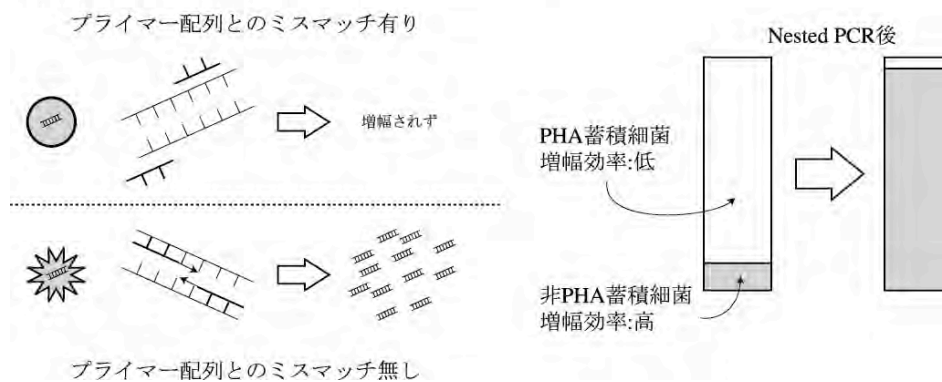


図 5.2.5 Micromanipulation により PHA 蓄積細菌を同定することに失敗した原因の考察

る塩基配列も得られていることから細胞壁処理が極度に不足していたとは考えにくい。

4)に関しては PCR を介した細菌叢の群集構造解析を行う場合には常に問題と

クレオチドプローブを設計・適用し、その細菌が PHA を蓄積しているかどうかを Nile blue A 染色を用いて証明する必要がある。

特異的な PCR プライマーを用いた半定量 PCR を行った結果、グループ 2、4、5、9、10、11、17、19 の細菌種を対象とした特異的なオリゴヌクレオチドプローブを設計することを決定した。半定量 PCR の結果とは別に γ -proteobacteria 門の *Stenotrophomonas* 属に帰属される塩基配列(グループ 8)が多数得られていたため、*Stenotrophomonas* 属を含む *Xanthomonas* 科の細菌を標的とした XAN818 プローブ(Friedrich U. *et al.* (1999))も適用した。微小フロックを分取した活性汚泥試料に対して、これらのオリゴヌクレオチドプローブを適用した結果を表 5.2.2 に示す。その結果、グループ 5、9、10、11 を活性汚泥試料中から検出することに成功した。続いて、FISH 法と Nile blue A 染色を組み合わせ、検出された細菌が PHA を蓄積しているかどうかを確認した。その結果、グループ 5、9、10、11 の細菌は PHA を蓄積していないことが明らかとなった(表 5.2.2)。そのため、今回の micromanipulation を用いた活性汚泥中の PHA 蓄積細菌を同定する試みは失敗に終わってしまった。

表 5.2.2 オリゴヌクレオチドプローブによる各グループの細菌の検出と、PHA 蓄積能の確認

検出対象	グループ番号	FISH観察結果	Nile blue A二重染色
実験室リアクターf21_No2 clone	2	ND	-
M f8_No2 clone	4	ND	-
実験室リアクターf18_No2 clone	5	○	negative
M f4_No4、MKWS f9 clone	9, 10, 11	○	negative
N f7_No1 clone	17	ND	-
N f10 clone	19	ND	-
<i>Stenotrophomonas</i> relating clone	8	ND	-

5-2-5 Micromanipulation を用いた解析法の問題点

Micromanipulation を用いた手法で PHA 蓄積細菌を同定することに失敗してしまったが、その原因を以下で考察する。Micromanipulation を用いて活性汚泥試料から PHA 蓄積細菌によって構成されている微小フロックを分取する段階までは、目視で PHA 蓄積細菌を分取していることを確認しながら行っていたため、この段階までは問題はないと考えられる。それ以降の操作課程で失敗の原因として疑われる要素は以下の 4 点である(図 5.2.5 参照)。

- 1) 分取した微小フロックの損失

るはずである。すなわち、理論式は下式になる。

$$\text{鋳型量} = \text{初期鋳型量} \times \text{増幅効率} \times 2^n$$

ここで n は PCR サイクル数である。ここで細菌種 A に由来する 16S rRNA 遺伝子配列 A に対する PCR の増幅効率が 100%、細菌種 B に由来する 16S rRNA 遺伝子配列 B に対する PCR の増幅効率を 90%とする。今回の解析では Nested PCR で最大 70cycle の遺伝子増幅を行ったが、等量の初期鋳型量 A、B に対して上の条件で PCR を行った場合に最終的な鋳型量がどの程度異なるかを計算すると、 10^3 copies という極めて大きな差が生じることがわかる。増幅効率が対象となる塩基配列ごとにどの程度異なっていたかを定量的に評価することは不可能であるが、今回のような PCR サイクル数を非常に多く設定した Nested PCR を行った場合にはその影響が大きいことがうかがえる。

これまでの考察により、PCR サイクル数を減らすことが重要であると述べる事ができるが、これまでに活性汚泥のような環境サンプルから micromanipulation を用いて細胞を分取し、分取した細胞から 16S rRNA 遺伝子断片を得る事に成功している報告をまとめてみると以下のようなになる。

1. Snaidr J. *et al.* (2002) RT-PCR と Nested PCR を組み合わせ、計 75cycle を要している
2. Thomsen T.R. *et al.* (2004) RT-PCR だけで 16S rRNA 遺伝子断片を得る事に成功しており、要したサイクル数は 25cycle 程度であった(サイクル数に関しては個人的に尋ねた情報であり、論文中の記載は無い)。
3. 伊藤ら(2005) RT-PCR だけで 16S rRNA 遺伝子断片を得る事に成功しており、要したサイクル数は 25cycle 程度であった。

少なくとも 1、2 の研究において用いられている方法と本研究で用いた方法は類似した方法を用いており、試料に対してエタノール固定を施す操作や凍結融解処理を行う点なども同じである。異なる点は上の 1～3 の研究では RT-PCR を用いていることである。細胞内で $10^3 \sim 10^6$ copies/cell 程度のオーダーでプールされている 16S rRNA を鋳型とした場合には初期鋳型量が多い分だけ、PCR 産物を得るまでに要する PCR サイクル数を抑えることができる。本研究も初期の段階では Thomsen T. R. *et al.*(2004)と同一の条件の RT-PCR を行っていたが、増幅産物を確認するには結局は Nested PCR を行わなければならない、ゲノムをターゲットとした場合と大きく差のある結果を得る事ができなかった。理論的には $10^3 \sim 10^6$ copies/cell 程度の 16S rRNA を逆転写し、cDNA に変換して PCR の鋳型

として用いた場合にはサイクル数を 12 ~24 サイクル程度抑えることが出来るはずであるが、そのような改善は見られなかった。そのため、本研究では煩雑な RT-PCR ではなく、ゲノムを鋳型とした Nested PCR を行っていた。なぜ、2、3 の研究ではわずか 25cycle 程度で PCR 産物を得る事ができたのか不明であるが、本研究では PCR サイクル数を多く必要としてしまったために、得られた結果が不十分なものになってしまった可能性が示唆された。

5-3 まとめ

本章では micromanipulation を用いて活性汚泥試料中の PHA 蓄積細菌を分取し、分取した細胞の 16S rRNA 遺伝子配列を特定することで、PHA 蓄積細菌の細菌種を特定することを目指した。その結果、Nested PCR を用いることで 16S rRNA 遺伝子断片を増幅することに成功した。更に得られた塩基配列をもとに特異的なオリゴヌクレオチドプローブを設計し、活性汚泥試料に適用したが、PHA 蓄積細菌を検出するには至らなかった。

第六章 Percoll を用いた PHA 蓄積細菌の分離および 細菌種の分子生物学的同定

第 5 章では micromanipulation と Nested PCR 法を用いて活性汚泥中の PHA 蓄積細菌を特定することを目指したが、結果は芳しいものではなかった。本章では Percoll を用いた密度分離法で活性汚泥中の PHA 蓄積細菌を分離・濃縮した後、得られた試料に対して 16S rRNA 遺伝子に注目した群集構造解析を行った。

密度分離法を用いる利点は、micromanipulation で分取した試料に比べて、密度分離後に得られる菌体量が多いため、市販のキットを利用した核酸抽出が行うことができる点である。また、得られる核酸量が多いため、Nested PCR を行う必要が無く、PCR バイアスを第五章よりも抑えられる点も利点として上げられる。

6-1 実験方法

実験の各手順を説明する前に、PHA 蓄積細菌を分離するためにはどの程度の浮遊密度差が必要となり、その浮遊密度差を生じるためにはどの位の PHA 含有率が必要とされるのかを理論値を用いて計算した。

続いて、図 6.1.1 に第六章で行う実験方法の全体の流れを示した。第五章との大きな違いは 1. 密度分離法による PHA 蓄積細菌の分離・濃縮を行う点、2. 核酸抽出を行う点、3. PCR サイクル数を 16~22cycle に抑える点である。以下に各操作過程の実験方法を説明する。

6-1-1 密度分離法を成功させるために必要とされる PHA 含有率の計算

まず、Percoll を用いた密度分離法ではどの程度の浮遊密度の差が生じていれば分離できるのかを既往の知見から検討した。

続いて、PHA 含有率の変化に伴う細胞浮遊密度の変化を Mas J. *et al.*(1985)らの理論式を用いて計算した。以下に計算方法を説明する。

PHA 蓄積細菌の細胞をモデル化すると、図 6.1.2 にあるような I の PHA を蓄

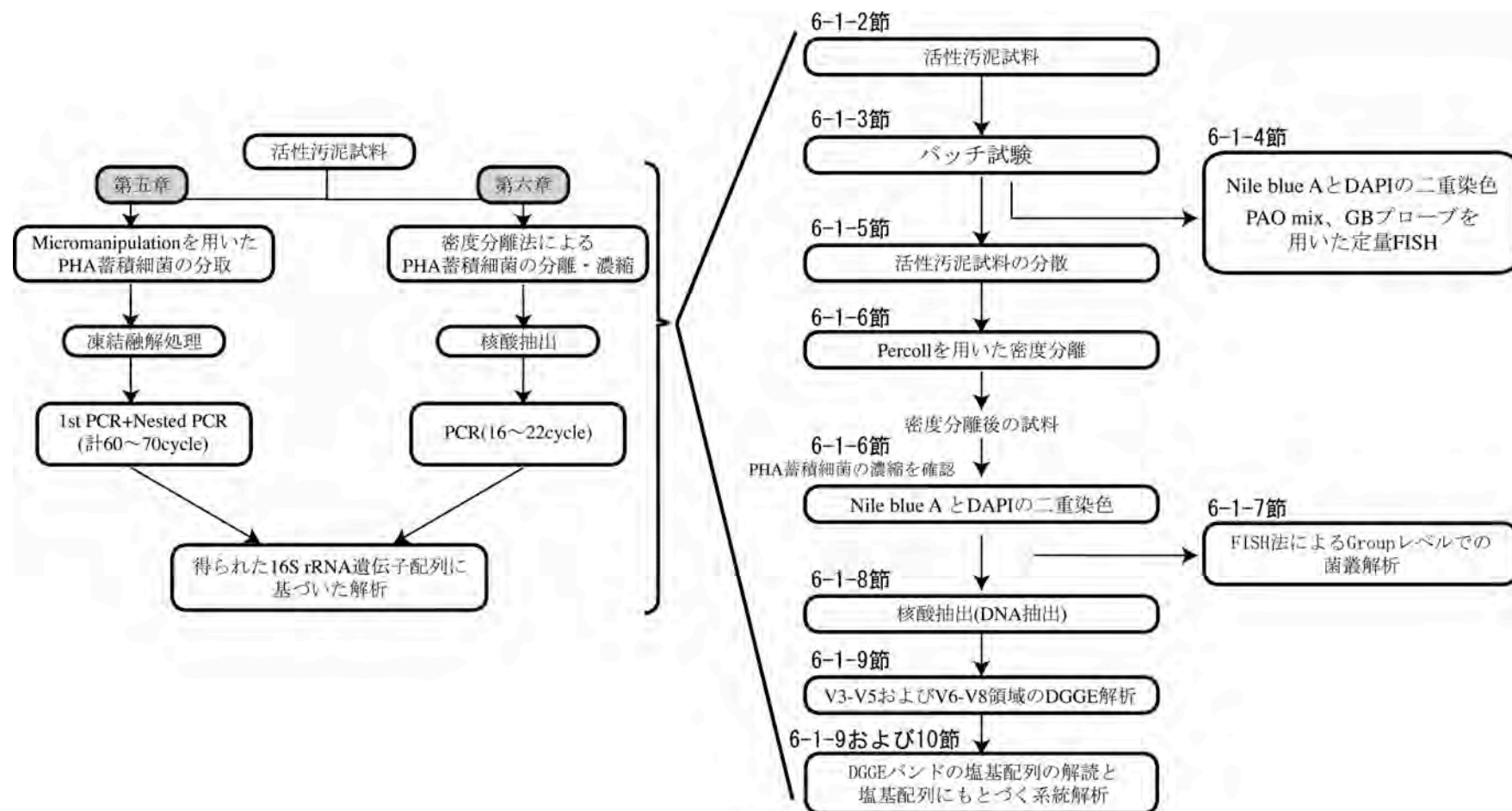
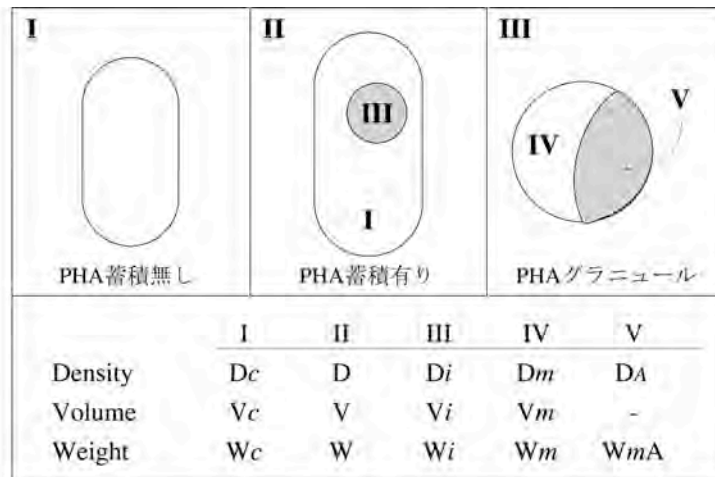


図 6.1.1 第六章における実験の全体像、なお右側フローの各チャートに付与してある節の番号は実験方法を説明している節番号を示す。



$$V = \frac{W_c}{D_c} + \frac{(A+1)}{D_i} W_m \quad \dots(1)式$$

$$D = D_i + V_c(D_c - D_i) \frac{1}{V} \quad \dots(2)式$$

記号		入力値
A (constant)	PHAグラニュール内に含まれる水の割合	0.669
D (variable)	PHA蓄積細菌の比重[pg/um ³]	-
Da (constant)	水の比重[pg/um ³]	1.0000
Dc (constant)	PHAを蓄積していない場合の細胞の比重[pg/um ³]	1.1120
Di (constant)	水和したPHAグラニュールの比重[pg/um ³]	1.1535
Dm (constant)	PHAの比重[pg/um ³]	1.2783
V(variable)	PHA蓄積細菌の細胞の体積[um ³]	-
Vc (constant)	PHAを蓄積していない場合の細胞の体積[um ³]	0.7410
Vi (variable)	水和したPHAグラニュールの体積[um ³]	-
Vm (variable)	PHAの体積[um ³]	-
W(variable)	PHA蓄積細菌の細胞重量[pg]	-
Wc (constant)	PHAを蓄積していない場合の細胞重量[pg]	0.823
Wi (variable)	水和したPHAグラニュールの重量[pg]	-
Wm (variable)	PHAの重量[pg]	任意の値

図 6.1.2 PHA 蓄積細菌の PHA 含有率と浮遊密度の関係式 (Mas J. *et al.* (1985) を参照)

積していない状態(PHA 含有率 0%)と、II の PHA を蓄積している状態に分けてモデル化することができる。ここで、II の細胞体積は PHA 含有率に伴い、増減する。また、細胞内に蓄積された PHA グラニュール(III)はそれ自体が水を含むものであるため、PHA のみで構成されている部分(IV)と、水によって構成されている部分(V)として表現される。ここで I～V に関連した比重、体積、重量を図 6.1.2 の通り記号化する。ここで、PHA 含有率の変化に伴う PHA 蓄積細菌の

図6.1.2の関係より

$V = V_c + V_i$ であり、これは以下のようにも書ける。

$$V = \frac{W_c}{D_c} + \frac{W_i}{D_i} \quad \cdots(a)$$

ここで図6.1.2より $W_i = W_m + W_m A$ であり、すなわち

$$W_i = W_m (A + 1) \quad \cdots(b)$$

(b)式を(a)式へ代入すると

$$V = \frac{W_c}{D_c} + \frac{(A+1)W_m}{D_i} \quad \cdots(1)式$$

この(1)式は細胞内のPHA含有率の変化に伴う細胞体積の増減を表している。

続いて(2)式の証明を行う。

あるPHA含有率における細胞重量を W_i 、PHA含有率0%の時の細胞重量を W_c とした場合に、 $n = W_i / W_c$ と定義する。この式を変形すると、

$$W_i = n W_c \quad \cdots(c)$$

(c)右辺を(b)左辺へ代入すると、

$$W_c n = W_m (A + 1) \quad \cdots(d)$$

(d)右辺を(1)式の右辺へ代入すると、

$$V = \frac{W_c}{D_c} + \frac{W_c n}{D_i} \quad \cdots(e)$$

(e)の n について展開すると、

$$n = \frac{V D_i}{W_c} - \frac{D_i}{D_c} \quad \cdots(f)$$

この n を後に導入する(n)式の n 項に代入すると、

$$1 + \frac{V D_i}{W_c} - \frac{D_i}{D_c} = \frac{1}{D_c} + \frac{1}{D_i} \left(\frac{V D_i}{W_c} - \frac{D_i}{D_c} \right) \quad \cdots(g)$$

これを展開すると、

$$1 + \frac{V D_i}{W_c} - \frac{D_i}{D_c} = \frac{D V}{W_c} \quad \cdots(f)$$

これを更に以下のように変形する。

$$\frac{D V}{W_c} = \frac{D_c - D_i}{D_c} + \frac{D_i}{W_c} V \quad \cdots(g)$$

(g)式の左辺を D 項のみにすると、

$$D = \left(\frac{D_c - D_i}{D_c} \right) \left(\frac{1}{V} \right) \left(\frac{W_c}{1} \right) + \left(\frac{D_i}{W_c} \right) (V) \left(\frac{W_c}{V} \right) \quad \cdots(h)$$

(h)式を計算して簡単にすると、

$$D = \frac{W_c}{D_c} (D_c - D_i) \frac{1}{V} + D_i \quad \cdots(i)$$

$W_c / D_c = V_c$ であるので(i)式は、

$$D = D_i + V_c (D_c - D_i) \frac{1}{V} \quad \cdots(2)式$$

ところで $D = W / V$ であるから、以下のような関係が存在する。

$$D = \frac{W_c + W_i}{V_c + V_i} = \frac{W_c + W_i}{\frac{W_c}{D_c} + \frac{W_i}{D_i}} \quad \cdots(j)$$

ここで、 $W_i = n W_c$ $\cdots(c)$ であるから(j)式は、

$$D = (W_c + n W_c) / (W_c D_i + n W_c D_c) / (D_c D_i) \quad \cdots(k)$$

(h)式を整理すると、

$$D = \frac{(1+n) D_c D_i}{D_i + n D_c} \quad \cdots(l)$$

(1+n)項を左辺へ移動させ、両辺の分子分母を逆にすると、

$$\frac{(1+n)}{D} = \frac{D_i}{D_c D_i} + \frac{D_c}{D_i D_c} n \quad \cdots(m)$$

つまり、

$$\frac{(1+n)}{D} = \frac{1}{D_c} + \frac{1}{D_i} n \quad \cdots(n)$$

図 6.1.3 PHA 蓄積細菌の浮遊密度と PHA 含有率の関係式の証明

細胞体積の変化を(1)式にて計算し、(1)式によって得られた値を(2)式へ代入することで PHA 蓄積細菌の比重(=浮遊密度)を求めることが可能である。この計算を行う際に初期入力する任意の値は W_m 項だけであり、 W_m 項は PHA 蓄積細菌の蓄積した PHA の重量[pg]を示す項である。その他の計算を行うために必要な初期値は図 6.1.2 の値を用い、これらの値は Mas J. *et al.*(1985)の報告しているものである。なお、(1)、(2)式の証明は図 6.1.3 の通りである。

ここで、上の計算によって得られた PHA 蓄積細菌の浮遊密度の変化と、PHA 含有率の関係を図示する際には、PHA 含有率の計算方法を定義する必要があるが、PHA 含有率の定義は第三章においてガスクロマトグラフィーを用いて PHA 含有率を評価した際と同じ「[PHA の重量]÷[MLSS(=乾燥細胞重量)]」とし、

この関係を図 6.1.2 の記号で表すと $[W_m \div (W_m + W_c)]$ となる。

6-1-2 活性汚泥試料

本章では実下水処理場の好気槽末端より採取した活性汚泥試料を解析に供した。活性汚泥を採取した処理場は M 処理場と N 処理場で、M 処理場では AO、A2O 法から、N 処理場からは擬似嫌気法、AO 法、A2O 法から採取した。なお、これらの試料は第三章にてバッチ試験に供した試料と同じものである(第三章の表 3.2.1 を参照)。

6-1-3 バッチ試験

採取した活性汚泥試料に対して、PHA を蓄積させる目的でバッチ試験を行った。PHA を合成するための炭素源としては酢酸を唯一の炭素源として添加し、3-1-1 節と同様の方法でバッチ試験を行った。その際、M 処理場 A2O 法より採取した活性汚泥に対しては、1.好気、2.亜硝酸、3.硝酸のそれぞれ異なる電子受容体存在下で PHA を合成させた。

なお、第三章ではバッチ試験を 2 時間で終了していたが、本章で用いる活性汚泥試料に対してはバッチ試験を 2~15 時間に延長した。バッチ試験の時間を延長した理由は、PHA 蓄積細菌の PHA 含有率を高めるためである。続いて行う密度分離法では、PHA 蓄積細菌と非 PHA 蓄積細菌の浮遊密度の差が大きいほど分離が容易になるため、PHA 蓄積細菌の PHA 含有率を高めることは密度分離法における分離能の向上につながると考えられる。今回扱った活性汚泥試料の中には、2 時間のバッチ試験では PHA 含有率が十分に高くないものがあったため、活性汚泥試料によって 2~15 時間とバッチ試験の時間を変更した。

バッチ試験を終了後、約 1L の活性汚泥試料を遠心分離(2,800g、5 分、4℃)によって 30mL 程度まで濃縮し、濃縮汚泥懸濁液を 1.7mL チューブに分注し、ディープフリーザー(-80℃)で試料の保存を行った。

6-1-4 バッチ試験後の活性汚泥試料における PHA 蓄積細菌の存在割合の評価

バッチ試験を終了した活性汚泥試料において、PHA 蓄積細菌が全菌中にどの程度の存在割合を有しているのかを評価するために、Nile blue A と DAPI の二重染色を行い、直接係数法により定量評価を行った。

活性汚泥試料を解凍した後、1×PBS buffer(137mM NaCl、8.1mM Na₂HPO₄ 7H₂O、

2.68mM KCl、1.47mM KH_2PO_4 、pH 約 7.3)洗淨を一度行った後、3%パラホルムアルデヒドで 2 時間固定処理を行った。固定液を洗い流した後、1×PBS buffer:97% EtOH=1:1 混合液に試料を懸濁させた。二重染色法は 4-1 節にて決定した方法を用いた。直接係数では、顕微鏡観察の際に 10 視野をランダムに選び撮影し、その視野内に存在する陽性細菌の数を計数した。定量を行う場合には、10 視野における全菌数の合計が少なくとも 1000 個を超える条件で顕微鏡観察を行った。

続いて、PAO mix(Crocetti G. R. *et al.* (2000))、GB プローブ(Kong Y. H. *et al.* (2002))を用いた定量 FISH 法を行い、PHA 蓄積細菌の群集内でこれらの細菌種が占める割合を定量評価した。実験方法は 4-2-1 節と同じ方法を用いた。得られた結果から、活性汚泥中に未知の PHA 蓄積細菌がどの程度占めているかを評価した。

6-1-5 活性汚泥試料の分散

密度分離法を行い、PHA 蓄積細菌を高効率で分離・濃縮するためには、活性汚泥試料中の PHA 蓄積細菌を 1) 個々の細胞に分散させ、2) 分散処理が細胞へ与える影響を可能な限り抑えることが重要となる。

まず、細胞が凝集して形成するブロックを個々の細胞まで分離することは、密度分離を高効率で行うためには不可欠な操作である。密度分離では、目的細菌の細胞と非標的細菌の細胞との間の浮遊密度の差が大きいほど分離・濃縮を高効率で行うことができるが、この浮遊密度の差は細胞同士の吸着によって容易に減じられてしまう(図 6.1.4)。このような吸着を起こしている状態では浮遊密度の差が小さくなり密度分離が困難になるばかりでなく、その後の解析において標的細菌以外の細菌が混入することによるコンタミネーションの原因にもつながってしまう。そのため、密度分離を行う前に試料に対して適切な分散処理を行い、個々の細胞が密度溶液中で浮遊した状態を生み出すことが重要である。

しかし、過剰の分散処理は別の問題を引き起こしてしまう。それは分散処理が及ぼす細胞へのダメージである。図 6.1.5 によって説明すると、分散処理後にダメージを受けていない細胞では、細胞壁によって外部と仕切られた環境が細胞内部に保たれているため、密度溶液中に細胞を浸しても細胞内部の水溶液が外部に漏れることはない。そのため、この細胞の浮遊密度は ρ'_{Intact} として表

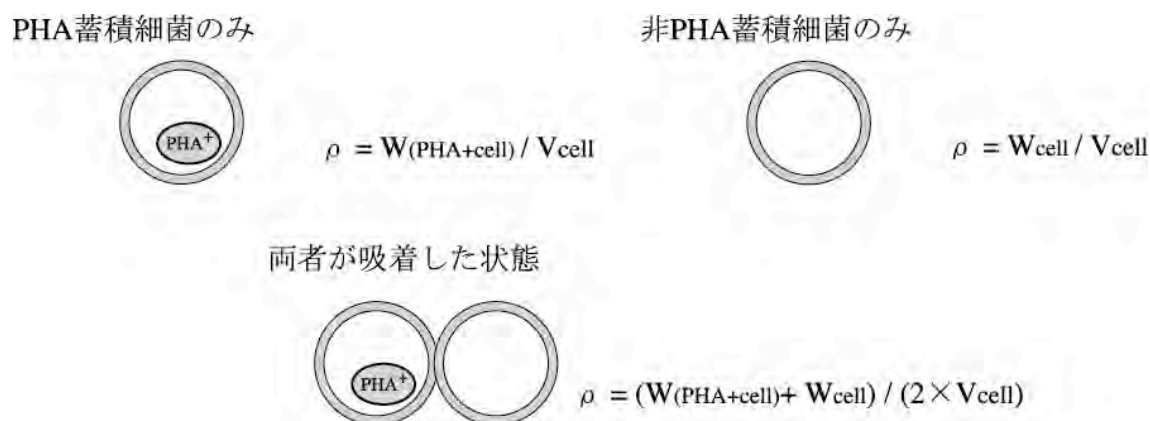


図 6.1.4 細胞同士の吸着によって減じられる浮遊密度の差

される。これに対して、過剰の細胞壁処理により細胞膜に亀裂が生じてしまった場合には、細胞内部が外部の密度溶液によって置換されてしまうため、細胞の浮遊密度は細胞膜(タンパク質)の浮遊密度ということになる(ρ'_{Damaged})。ここで *E.coli* の細胞を対象として、細胞壁の浮遊密度(ρ_{wall})を計算すると、 $\rho_{\text{wall}}=2.34\text{g/cm}^3$ となり、無傷の状態での細胞浮遊密度 $\rho'_{\text{Intact}}1.139\text{g/cm}^3$ と比較するときわめて大きい値であることがわかる。つまり、非 PHA 蓄積細菌であっても、過剰の細胞壁処理により細胞壁に亀裂を生じてしまった細胞は密度分離により下層に分離され、その後の解析に供することになってしまう。これは PHA 蓄積細菌のみ分離・濃縮するという今回の目的に対して大きな問題となりかねない。先に細胞を個々の浮遊細胞になるまで分散することの重要性を述べたが、その際に用いる分散処理法が細胞へ与えるダメージを最小に留める事も重要であることがわかる。

本節ではこのような背景を元に最適な分離条件を検討するために以下の実験を行った。

6-1-5-1 分散に用いる機材の検討と条件検討

細胞の分散処理には一般的に超音波分散が用いられている。超音波分散器は大別してチップを直接試料中に浸す方法と、試験管等にいった試料を超音波容器に浸して、間接的に超音波処理を行う方法があり、用いる機材によってその出力等は様々である。本研究では以下の 4 種類の超音波装置を用いて検討を行った。

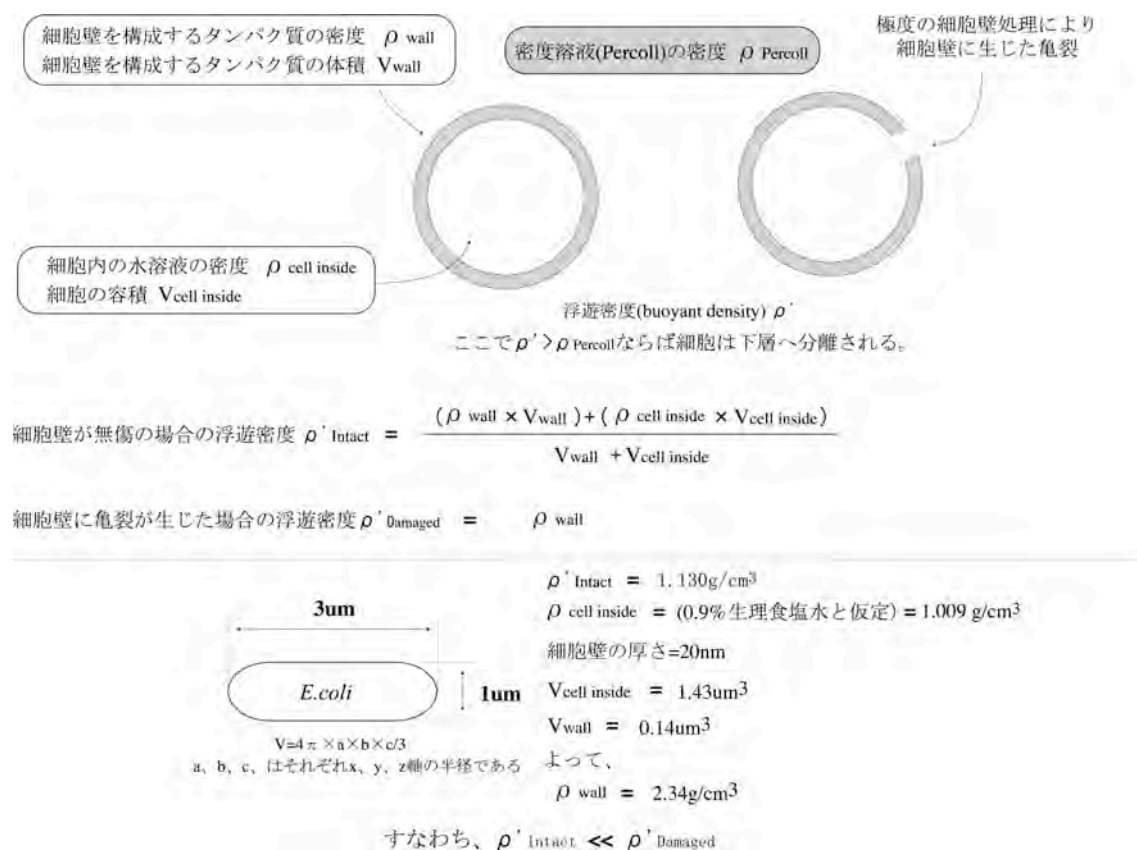


図 6. 1. 5 細胞壁処理が及ぼす細胞へのダメージとそれによる浮遊密度の変化

a. IKA Science U200S

解凍した活性汚泥試料を 1×PBS buffer 5mL に懸濁させ、ねじ口試験管に移し、Amplitude 20%、パルス間隔 0.5 で 3～6 分間超音波分散を行った。なお分散時は試料を氷水中で冷却しながら行った。

b. Branson Sonifier 450 (Branson 社)

解凍した活性汚泥試料を 1×PBS buffer 20mL に懸濁させ、ガラス瓶に移し、チップ先端を 2cm 程度浸し、output 1、パルス間隔一定で 1～3 分間超音波分散を行った。なお分散は氷水中で冷却しながら行った。

c. Silent sonic UT104 (SHARP 社)

試料懸濁液 1mL を 1.7mL プラスチックチューブへ分注し、出力最大で 15 分間連続処理を行った。

d. VP-60S ultra homogenizer (TAITEC 社)

試料懸濁液 5mL をねじ口試験管にいれ、duty cycle を 50%に設定し、出力 1 で 4 分、出力 5 で 6 分、出力 10 で 2 分間の処理を行った。

分散処理能の良否は自動粒度分布測定装置 CAPA-300(堀場)を用いて評価した。粒度分布の測定原理を以下に説明する。粒径の大きい物質と小さい物質が水溶液中に懸濁しており、両者は同一の強度の重力場にある時、粒径が大きい方が下層まで沈降するのに要する時間は短く、粒径の小さい物質を沈降させるためには長い時間が必要となる。

ある測定面を考え、水溶液中の濁度を時系列的に測定していった場合、粒径の大きい物質が含まれている場合と、粒径の細かい物質からなる場合では濁度の時系列での変化は図 6.1.6 のように異なる。ここで「粒径が大きい物質が多い場合」とは分散処理が不十分で活性汚泥中のフロック構造を十分に分散できていない場合として捉えることができる。このように、分散処理法の良否を評価するために分散処理後に粒度分布を評価する方法は Jorand F. *et al.* (1995)も行っている。

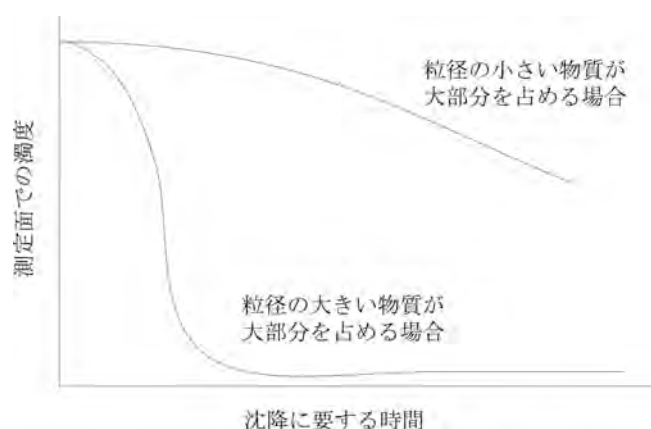


図 6.1.6 粒径の違いが懸濁液中の濁度変化に及ぼす影響

密度(ρ_0)、粘性係数(η_0)をもつ溶媒中に存在する直径(D)、密度(ρ)の粒子は、重力の影響によって一定の速度で沈降するが、この現象は Stokes の沈降式に従う事が知られており、この式を用いる事で粒子径と沈降時間の関係を表すことが可能である。遠心操作により粒子を沈降させた場合の Stokes の沈降式を表 6.1.1 に示した。

図 6.1.6 の説明では粒子の沈降具合を「濁度」で評価していたが、この濁度を評価する方法とし本装置では一定光度の光を照射し、透過する光量を測定する方法を用いており、このような測定法は光透過法と呼ばれる。重力場において粒子が沈降する現象を時系列に見た場合には図 6.1.6 のような濁度の変化が観察されるが、ある測定時間における吸光度の値と粒子の大きさおよびその量

表 6.1.1 粒度分布計による測定結果と懸濁液中の粒子サイズの関係式
および測定時の設定値一覧

$$D = \left[\frac{18\eta_0 \ln(X_2 \div X_1)}{(\rho - \rho_0)\omega^2 t} \right]^{\frac{1}{2}}$$

記号	記号
D 粒子径(cm)	t 沈降時間(sec)
η_0 分散媒粘性係数(p)	X_1 回転中心より沈降面までの距離(cm)
H 沈降距離(cm)	X_2 回転中心より測定面までの距離(cm)
ρ 試料密度(g/cm ³)	ω 回転角速度(rad/sec)
ρ_0 分散媒密度(g/cm ³)	g 自然重力加速度(cm/sec ²)

$$\log I_0 - \log I_i = K \sum_{i=1}^n k_i N_i D_i^2$$

記号	記号
I_0 入射光強度	K 光学系、セル及び粒子形状による係数
I_i 透過光強度	N_i 粒子 D_i の個数
k_i 粒子 D_i の吸光係数	D_i 粒子径

	設定値
分散媒粘性係数(cp)	0.89
分散媒密度(g/cm ³)	1.17
試料密度(g/cm ³)	1.23
測定粒子の最小径(um)	1～2
粒子径の測定間隔(um)	2～10
測定粒子の最大径(um)	20～100
遠心速度(rpm)	1000～1500

は表 6.1.1 の式で求める事が可能である。

前述の超音波分散機にて分散処理を行った試料を測定セルに移し、vortex により均一に懸濁させた後に測定を開始した。測定を行う際には分散媒粘性係数などをあらかじめ設定しておく必要があり、今回測定の際に設定した値は表 6.1.1 の範囲のものをを用いた。測定結果から、a～4 の四種類の超音波装置において、分散能が優れている超音波装置を評価した。

6-1-5-2 分散処理法の違いが細胞へ及ぼす影響の評価

細胞の分散効率を高めるには超音波処理の出力数を高め、処理時間を延長するなどの方法が取られるが、前述したように過剰の分散処理により細胞にダメージを与えることは好ましくない。本節では細胞壁処理が細胞へ及ぼすダメージを評価し、最適な分散条件の検討を行った。

細胞壁処理が細胞へ及ぼすダメージを評価する方法は Lindahl V.(1996)に従った。過剰の細胞壁処理が細胞にダメージを与えてしまった場合には、その細胞は死菌となってしまうため、試料中の生菌数はその分減少することになる。ここで試料中の生菌数はプレート培養を用いた MPN 法で評価することが可能である。初期菌体量が等しい試料に対して二種類の分散処理を行い、分散処理後の生菌数(CFU)を評価した場合、細胞に対してダメージの少ない分散処理法を用いた試料の方が生菌数(CFU)は高くなるはずであり、そのような分散処理法を選択することが好ましいと言える。そこで、本研究では以下のような実験を行い CFU の評価を行った。

まず *E.coli* DH5 α を 300mL の標準 LB 培地に摂取し、37℃で培養した。培養した細胞を(2,150g、5 分、室温)で集菌し、菌体ペレットを 0.15% NaCl 溶液で洗浄した。洗浄した菌体を 0.15% NaCl 溶液に懸濁させ、分散容器へ移し、分散処理を行った。分散処理後の菌体液を 0.15% NaCl 溶液で段階希釈し、それぞれの希釈段階の菌体液 100 μ L を LB agar プレートへ摂取し、スプレッダーで均一に広げた。菌体を摂取した LB agar プレートは 37℃で培養し、培養後に 1 枚のプレートあたりに出現したコロニー数を係数した。生菌数(CFU)は計数されたコロニー数から以下のように計算した。

生菌数(CFU: cells/mL)

$$= (\text{計数したコロニーの数}) \times (\text{コロニーを計数した希釈倍率}) \times 10$$

同様の方法により分散処理が菌体の及ぼす影響を評価した報告が、Khammar N. *et al.* (2004)、Salhani N. *et al.* (1998)によってなされている。

6-1-5-3 分散媒の違いが及ぼす影響の評価

活性汚泥中の細菌は一般的にフロックと呼ばれる集合体を形成しており、個々の細胞は互いに吸着した状態で存在している。外力を加えることにより、このような集合体を分散させることは可能であるが、一度分離した細胞同士が再び互いに吸着する現象(再凝集)が知られている。ここで細胞同士の吸着、す

なわち再凝集は図 6.1.7 のようなメカニズムで生じると考えられている。つまり、細胞外多糖類(Exocellular polymers)を介在したものと、カルシウムやマグネシウムイオンなどの 2 価の陽イオンを介在した凝集である。このような細胞同士の吸着を抑え、分散効率を高めるためには分散媒の検討が有効である。例えば EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid)のようなキレート試薬を分散媒として用いた場合には、前述したカルシウムやマグネシウムといった 2 価の陽イオンが EDTA に吸着されて沈殿・除去されるため、細胞の再凝集を抑えることができることが知られている。本節ではこれまでに報告されている様々な分散媒の効果を検討し、最適な分散媒の検討を行った。

本研究で検討を行った分散媒の種類は以下の通りである。

- a. TE buffer (1mM EDTA、10mM Tris-HCl、pH7.5) … 道中(2001)
- b. EDTA buffer (250mM EDTA、100mM Tris HCl、pH7.8) … Matias V.R.F *et al.* (2003)
- c. Urea buffer (5.5M Urea、0.01 M Na_2HPO_4 、0.01M NaH_2PO_4 、pH7.6) … Matias V.R.F *et al.* (2003)
- d. 0.05 M Pyrophosphate buffer pH8.0 … Lindahl V. *et al.* (1996)
- e. Phosphate buffer (7mM Na_2HPO_4 、3mM NaH_2PO_4 、0.13M NaCl、pH6.2) … Khammar N *et al.* (2004)
- f. Methanol … Lunau M *et al.* (2005)

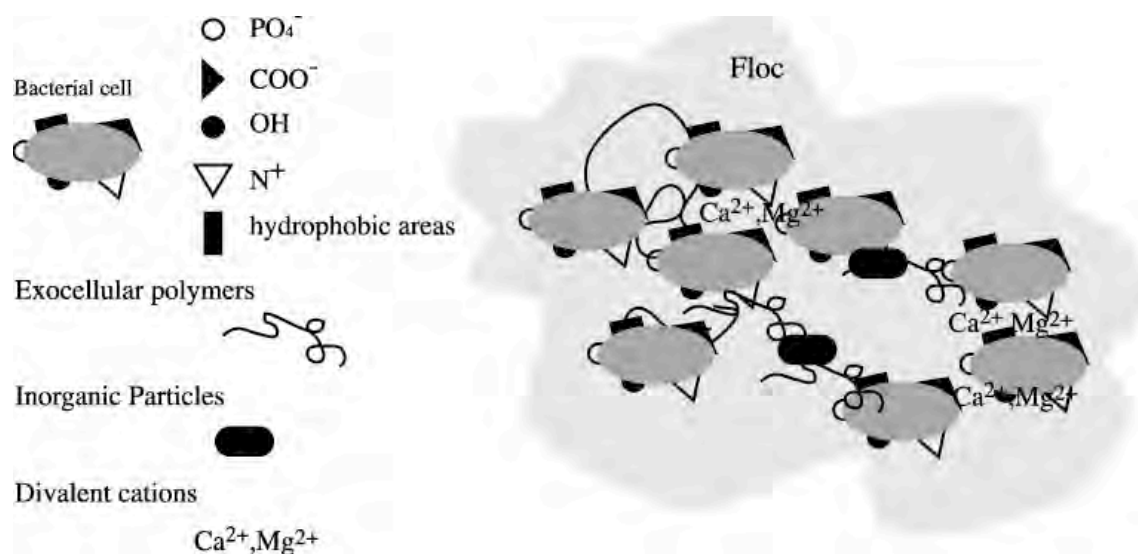


図 6.1.7 活性汚泥における細胞の凝集メカニズム

解凍した活性汚泥試料を(17,000g、5分、4℃)で遠心し、1×PBS buffer による菌体洗浄を一度行った後に、上の分散媒に菌体を懸濁させた。分散処理には IKA Science U200S を用い、Amplitude 20%、パルス間隔 0.5 で 4 分間超音波分散を行った。なお、分散時は試料を氷水中で冷却しながら行った。各分散媒における分散効率の良否は 6-1-5-1 節で述べた自動粒度分布測定装置 CAPA-300 を用いて評価した。

6-1-6 Percoll を用いた密度分離法の最適化

本研究では Percoll を密度溶液として密度分離を行ったが、PHA 蓄積細菌を高効率で分離・濃縮するためには密度分離法の最適化を行う必要がある。そこで本節では以下の 3 種の要素に関して検討を行った。

1. 密度溶液に加える浸透圧調整剤が分離効率に及ぼす影響の評価
 2. 密度分離を行う回数と分離効率の関係の評価
 3. 密度分離を行う際の試料サイズの違いが分離効率に及ぼす影響
- 上の 3 点に関して、次からそれぞれの節で説明する。

6-1-6-1 密度溶液に加える浸透圧調整剤が分離効率に及ぼす影響

菌体試料を Percoll のみの密度溶液に浸した場合、密度溶液と菌体内での浸透圧が異なるため、細胞の大きさが変化してしまう。ここで細胞内部が縮小してしまった際の細胞浮遊密度の変化を計算し、この問題の影響を考えてみる。モデル細胞として大腸菌(1×3μm)を想定し、細胞内部の体積が減少した場合の細胞浮遊密度の変化を下の式にて計算すると図 6.1.8 のようになる。後述するが、

$$\rho_{cell} = \frac{(\rho_{cell\ wall} \times V_{cell\ wall}) + (\rho_{cell\ inside} \times V_{cell\ inside})}{V_{cell\ wall} + V_{cell\ inside}}$$

記号	値
$\rho_{cell\ inside}$	1.009 [g/cm ³]
$V_{cell\ inside}$	Variable
ρ_{wall}	2.34 [g/cm ³]
V_{wall}	0.14 [μm ³]

Percoll を用いた密度分離で分離できる浮遊密度差の下限は 0.01g/cm³ であり、この問題で生じる密度変化はこの値に比べて非常に大きいものである。

PHA 蓄積細菌以外の細胞が縮小を起こし、細胞浮遊密度が大きくなった場合にはそれらの細胞も分離されてしまうため、この問題の影響を抑える必要があった。Percoll の付属説明書では NaCl あるいは Sucrose を浸透圧調整剤として用

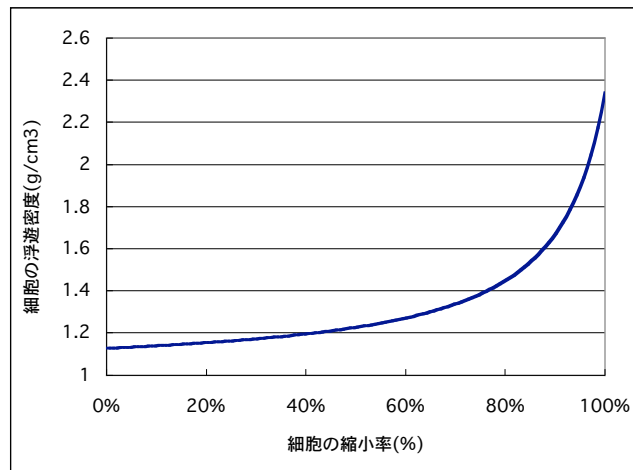


図 6.1.8. 細胞が縮小した場合の浮遊密度の変化

いることが推奨されており、ここではそれぞれの浸透圧調整剤を用いた場合の分離効率を評価し、どちらの浸透圧調整剤が好ましいかを評価した。

なお、一般的には NaCl が浸透圧調整剤として用いられるが、NaCl のような塩が存在する環境下で凝集し易い物質を分離する場合(細胞成分や Virus など)には Sucrose の使用が推奨されている。

密度分離は以下の手順で行った。まず、解凍した活性汚泥試料を(17,000g、5 分、4℃)で遠心し、汚泥ペレットを 1×PBS buffer に懸濁させた。(17,000g、5 分、4℃)で遠心した後、汚泥ペレットを 5mL の TE buffer (1mM EDTA、10mM Tris-HCl、pH7.5)に懸濁させ、ガラス試験管へ移した。汚泥懸濁液に対して IKA Science U200S を用い分散処理を行った。分散条件は Amplitude 20%、パルス間隔 0.5 で 4 分間の処理とした。分散した汚泥懸濁液 380μL を 1.7mL チューブへ分注し、密度分離を行う溶液を表 6.1.2 の組成で調整した。反転混合させた後、1.7mL チューブを(6,000g、5 分、4℃)で遠心し、上層に分離された汚泥を除去しながら密度溶液を除去した。なお、分離中に用いた試薬は予備冷却したものを使用し、操作は全て氷上で行った。浸透圧調整剤の濃度は NaCl が終濃度 0.15M、Sucrose が 0.25M となるように設定した。

分離方法の良否の評価は、Nile blue A と DAPI の二重染色を用いて PHA 蓄積細菌が全菌に対して占める割合を評価することで行い、比較する試料としては密度分離を行う前の活性汚泥試料と、1.7mL チューブの底部に沈殿した汚泥ペレットを用いた。分離が良好に行われたならば、分離後に得られた試料中で PHA 蓄積細菌が有占しているはずである。

表 6.1.2. Percoll を使用した密度溶液の組成と、調整した密度溶液の比重

Percollの終濃度	10%	20%	30%	40%	50%	60%	約70%
Percoll(uL)	150	300	450	600	750	900	1050
浸透圧調整剤(uL)	150	150	150	150	150	150	150
分散済み汚泥懸濁液(uL)	380	380	380	380	380	380	380
Milli-Q(uL)	820	670	520	370	220	70	-
Total(uL)	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1580
密度溶液の比重*	1.019	1.032	1.045	1.058	1.071	1.084	1.091 (NaClの場合)
	1.043	1.056	1.070	1.083	1.096	1.109	1.116 (Sucroseの場合)

*密度溶液の比重は以下の式で計算した。

$$\rho_{\text{density solution}} = \frac{(\rho_{\text{Percoll}} \times V_{\text{Percoll}}) + (\rho_{\text{NaCl or Sucrose}} \times V_{\text{NaCl or Sucrose}}) + (\rho_{\text{sample}} \times V_{\text{sample}}) + (\rho_{\text{Milli-Q}} \times V_{\text{Milli-Q}})}{(V_{\text{Percoll}} + V_{\text{NaCl or Sucrose}} + V_{\text{sample}} + V_{\text{Milli-Q}})}$$

記号	値
$\rho_{\text{density solution}}$ 調整した密度溶液の比重	Variable
ρ_{Percoll} Percollの比重	1.130±0.005[g/cm ³]
$\rho_{\text{NaCl or Sucrose}}$ 浸透圧調整剤(1.5M NaClあるいは2.5M Sucrose)の密度	1.5M NaCl=1.058、2.5M Sucrose=1.316[g/cm ³]
ρ_{sample} サンプルを懸濁させた溶媒の比重	0.99823[g/cm ³] (本来ならばTE bufferの比重を入れるべきであるが、水の比重で近似した。)
$\rho_{\text{Milli-Q}}$ Milli-Qの比重	0.99823[g/cm ³] (20℃、純水の比重)
V_{Percoll} 添加したPercollの量	表による
$V_{\text{NaCl or Sucrose}}$ 添加した浸透圧調整剤の量	表による
V_{sample} 添加した試料の量	表による
$V_{\text{Milli-Q}}$ 添加したMilli-Qの量	表による

密度分離を行う前の活性汚泥試料と、1.7mL チューブの底部に沈殿した汚泥ペレットを、まず 3%パラホルムアルデヒドで 2 時間固定し、続いて 4-1 節の方法で染色を行い、直接計数法で PHA 蓄積細菌が全菌に占める割合を評価した。

6-1-6-2 密度分離を行う回数と分離効率の関係の評価

Schuler A.J. *et al.* (2002)では分離効率を高めるために、Percoll 濃度の低い密度溶液で分離を行った後に、Percoll 濃度の高い密度溶液で再度分離を行っている。この方法では操作ステップが増えるために煩雑になるだけでなく、操作過程においてコンタミネーションが生ずる恐れがある。そこで密度分離を繰り返すことにより分離効率がどの程度向上されるのかを検討した。

2 段階で密度分離を行う場合には、Percoll 終濃度 40%の密度溶液で分離した後に得られたペレットを、Percoll 終濃度 70%を用いた密度分離に再度供した。これに対し、一回の密度分離しか行わない場合には、Percoll 終濃度 70%の密度溶液を用いて密度分離を行った。密度分離は 6-1-6-1 節と同様の方法を用い、浸透圧調整剤には NaCl を用いた。分離効率の良否は 6-1-6-1 節と同様の方法で評価した。

6-1-6-3 密度分離を行う際の試料サイズの違いが分離効率へ及ぼす影響

これまでの密度分離では、試料を 1.7mL チューブに分注して行っていたが(表 6.1.2 参照)、この方法では多検体を扱わねばならず、操作が煩雑になってしまいう。また、密度分離の操作において得られた試料から次の工程では核酸抽出を行うが、核酸抽出を成功させるためにはある程度の菌体量が必要である。

全菌中に PHA 蓄積細菌が占める割合が 10%の試料から密度分離を行い、PHA 蓄積細菌が全て分離・回収できたと仮定した場合、密度分離後に得られる菌体量は分離前の試料の 10%となる。すなわち、密度分離によって得られた菌体から核酸抽出を成功させるためには、通常の核酸抽出に供する 10 倍量の試料を密度分離し、分離後の試料を回収する必要がある。そのため、今回のように密度分離によって得られた試料から核酸抽出を行なう場合には、密度分離に多量の試料を供する必要がある、1.7mL チューブのような容器で密度分離を行うよりも、大型の容量で密度分離を行った方が良い。しかし、密度分離に供する試料の量を増やすことが、分離効率に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで、同一の汚泥濃度の試料を 1.7mL チューブ、あるいは 50mL チューブで密度分離を行い、分離効率に差が生じるかどうかを検討した。

密度分離法(Percoll 終濃度 70%)、分離効率の評価法は 6-1-6-1 節に従い、浸透圧調整剤には NaCl を用いた。50mL チューブで密度分離を行う場合も同様に密度溶液を調整し、密度分離を行った。密度分離の際の遠心条件は 1.7mL チューブと同じく(6,000g、5 分、4℃)とした。

6-1-7 密度分離によって得られた試料における FISH を用いた、門レベルでの群集構造解析

密度分離によって得られた試料中の群集構造を、まずは FISH 法を用いて解析した。FISH 法は PCR と異なり、微生物群集構造を解析する際に問題となりやすい「核酸抽出」、「PCR」などの操作過程を含まない *in-situ* な解析である。また、本研究では密度分離法によって得られた試料から FISH 法とは別に、DGGE-Sequencing 法で群集構造解析を行うが、DGGE-Sequencing 法で得られた結果の妥当性を評価する際に、FISH 法の群集構造解析の結果が重要になると考えられる。すなわち、FISH 法で主要な細菌種として確認されていない系統学的グループに帰属される塩基配列が DGGE-Sequencing 法の解析結果から得られた

場合には、なんらかの原因により DGGE-Sequencing 法において誤った結果が得られるのではないかと推測することができる。

本節で用いた FISH 法では門レベルでの特異性を有するオリゴヌクレオチドプローブを用いて解析を行った(表 6.1.3)。また、密度分離前後の試料に対して PAO mix(PAO462+PAO651+PAO846)、GB プローブを用いた定量 FISH 法解析を行い、密度分離によって PHA 蓄積細菌が濃縮されていることを確認する実験を行った。

密度分離によって得られた試料に対して、3%パラホルムアミド、あるいはエタノールを用いて 2 時間の固定処理を行った。固定液を洗い流した後、1×PBS buffer:97% EtOH=1:1 混合液に試料を懸濁させ、10W で約 2 分間氷上において超音波分散処理を行った。超音波分散処理後の試料をゼラチンコーティング済みのスライドガラスへ塗布し、風乾させた後に 50、80、97% EtOH で脱水処理を行った。FISH 法は Amann R.(1995)の方法に従って行い、表 6.1.3 のプローブに対して 5'末端を Fluorescein isothiocyanate(FITC)あるいは Cyanine 3(Cy3)で標識したものをを用いた。表 6.1.3 のプローブで EUB、LGC、PAO プローブに関しては三種類のプローブを混合して使用し、BET42a、GAM42a プローブに対しては蛍光標識していない competitor と混合して使用した。ハイブリダイゼーションを終えた後、スライドガラスに Slow Fade-Light Antifade Kit(Molecular Probes 社)をマウントして、Olympus model BX-51 で観察した。撮影した画像に対して直接計数法を用いて定量を行い、FISH において検出された細菌種の存在量を評価した。直接計数法の条件は最低 10 視野、1,000 個以上の細胞数を計数することとした。

6-1-8 核酸抽出

密度分離法によって得られた試料から核酸抽出を行った。現在、生物学的リン除去プロセスから採取した活性汚泥試料から核酸抽出を行う方法は以下の 2 種が広く用いられている。

1. Fast DNA SPIN Kit for Soil (Bio101)を用いる方法(Yeates C. *et al.* (2003)、Ginige M.P. *et al.*(2004)、Kong Y. *et al.* (2005)など)
2. 酵素処理とビーズビーディングによって核酸を抽出し、PCI(Phenol-Chloroform-Isoamylalcohol)、CIA(Chloroform-Isoamylalcohol)によって精製・回収する方法(Liu WT. *et al.*(1997)、Nielsen A.T. *et al.*(1999)、Kong Y.H. *et*

表 6. 1. 3. 第六章において使用したオリゴヌクレオチドプローブ一覧

Probe name	Specificity	Sequence(5'-3')	E.coli position	Formamide (%)	Reference
EUB338	Most Bacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S rRNA 338 - 355	35	Amann R. <i>et al.</i> (1995)
EUB338-II	Planctomycetales and other Bacteria not detected by EUB338	GCAGCCACCCGTAGGTGT	16S rRNA 338 - 355	35	Daims H. <i>et al.</i> (1999)
EUB338-III	Verrucomicrobiales and other Bacteria not detected by EUB338	GCTGCCACCCGTAGGTGT	16S rRNA 338 - 355	35	Daims H. <i>et al.</i> (1999)
ALF1b	Alphaproteobacteria, some Deltaproteobacteria, Spirochaetes	CGTTCGYTCTGAGCCAG	16S rRNA 19 - 35	20	Manz R. <i>et al.</i> (1992)
BET42a	<i>Beta-proteobacteria</i>	GCCTTCCCACTTCGTTT	23S rRNA 1027 - 1043	35	Manz R. <i>et al.</i> (1992)
GAM42a	<i>Gamma-proteobacteria</i>	GCCTTCCACATCGTTT	23S rRNA 1027 - 1043	35	Manz R. <i>et al.</i> (1992)
HGC69a	<i>Actinobacteria</i>	TATAGTTACCACCGCGT	23S rRNA 1901 - 1918	35	Roller C. <i>et al.</i> (1994)
LGC354A	<i>Firmicutes</i>	TGGAAGATTCCCTACTGC	16S rRNA 354 - 371	35	Meier H. <i>et al.</i> (1999)
LGC354B	<i>Firmicutes</i>	CGGAAGATTCCCTACTGC	16S rRNA 354 - 371	35	Meier H. <i>et al.</i> (1999)
LGC354C	<i>Firmicutes</i>	CCGAAGATTCCCTACTGC	16S rRNA 354 - 371	35	Meier H. <i>et al.</i> (1999)
PAO462	Rhodocyclus-related PAO including member of <i>Candidatus</i> "Accumulibacter phosphatis"	CCGTCATCTACWCAGGGTATTAAC	16S rRNA 462 - 485	35	Crocetti G.R. <i>et al.</i> (2000)
PAO651	Rhodocyclus-related PAO including member of <i>Candidatus</i> "Accumulibacter phosphatis"	CCCTCTGCCAACTCCAG	16S rRNA 651 - 668	35	Crocetti G.R. <i>et al.</i> (2000)
PAO846	Rhodocyclus-related PAO including member of <i>Candidatus</i> "Accumulibacter phosphatis"	GTTAGCTACGGCACTAAAAGG	16S rRNA 846 - 866	35	Crocetti G.R. <i>et al.</i> (2000)
GB	GAO-group GB including member of <i>Candidatus</i> "Competibacter phosphatis"	CGATCCTCTAGCCCACT	16S rRNA 612 - 628	35	Kong Y.H. <i>et al.</i> (2002)

al(2001)、Beer M. *et al.*(2004)、Wong M.T. *et al.*(2004)など)

本節では密度分離を行う前の試料に対して上の二種類の方法で核酸抽出を行い、どちらが好ましい処理方法であるかを検討した。評価方法としては核酸抽出を終えた菌体に対して DAPI 染色を行い、顕微鏡観察を行った際に菌体からシグナルが観察されるかどうかを確認した。核酸抽出が不十分で特定の細菌種から核酸が抽出できていない際には、細胞内に核酸が残存しているため DAPI のシグナルがで出されるはずである。同様の評価方法は Zhou *et al.*(1996)、Frostergard A. *et al.*(1999)、Miller D.N. *et al.*(1999)によっても行われている。

1 の方法を用いて核酸抽出を行う場合には付属の説明書の手順に従い、ビーズビーディングを終えた後の菌体を回収した。

2 の方法を用いて核酸抽出を行う場合には Kong Y.H. *et al.*(2001)の方法を用いた。密度分離によって得られた菌体ペレットを EDTA buffer(0.15M NaCl, 0.1M EDTA)で洗浄後、(17,000g、5 分、4℃)で遠心し、再度菌体ペレットにした。菌体ペレットを 1mL の Lysis buffer(Lysozyme 2mg/mL、Proteinase K 2mg/mL、SDS 0.5%(v/v)、RNase 0.1mg/mL)に懸濁させ、55℃で一時間静置した。続いて、0.5mm 径と 0.1mm 径のガラスビーズ(1M 硝酸洗浄、オートクレーブ滅菌済み)をそれぞれ 0.25g 加え、2500rpm で 5 分間ビーズビーディングを行った。なお、ビーズビーディング中は 1 分間処理を行なうごとに 2 分間の氷上冷却を行った。ビーズビーディングを終えた試料に 10% CTAB(Hexadecyltrimethyl ammonium bromide、終濃度 1% w/v)150μL、5M NaCl 210μL(終濃度 0.7M)、EDTA buffer 130μL を加え、65℃で 20 分間静置した。その後 PCI、CIA を用いて核酸の精製を行った。PCI、CIA 処理では試料に対して等量の PCI あるいは CIA を加え、vortex で混合した後に(8,000g、5 分、室温)で遠心し、核酸の含まれる層を回収した。回収した試料に等量のイソプロパノールを加え、(1,000g、10 分、室温)で遠心し、得られた核酸ペレットを 70% EtOH で洗浄した後、滅菌蒸留水(DDW)に溶解させた。一連の過程において、ビーズビーディングを終えた後の菌体を回収した。

回収した菌体をゼラチンコーティングしたスライドガラスに塗布し、風乾させた後、2μg/mL の DAPI 染色液を試料にマウントし、5 分間室温で染色を行った。染色後、Milli-Q で染色液を洗い流し、風乾させ、Slow Fade-Light Antifade Kit(Molecular Probes 社)をマウントして、Olympus model BX-51 で DAPI のシグナルが観察されるかどうか確認した。

6-1-9 DGGE 解析ならびに DGGE バンドの sequencing

核酸抽出によって得られた核酸をもとに微生物の群集構造解析を試みた。核酸抽出によって得られた核酸を鋳型として群集構造解析を行うための方法としては、DGGE-sequencing 法、clone library-sequencing 法などが一般的であるが、今回は DGGE-sequencing 法を用いた。DGGE-sequencing 法は clone library-sequencing 法に比べて、群集構造解析の全体像を容易に捉えることができる反面、最終的に得られる塩基配列データは短くなってしまう。これは DGGE 法で解析できる塩基配列長は最大 500bp 程度であるため、ほぼ全長の 16S rRNA 遺伝子断片を解析に供することができないためである。

まず、得られた核酸を鋳型として 16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅した。PCR 反応液の組成は表 6.1.4 の通りである。なお、今回の DGGE 解析では同一の鋳型に対して、357fGC-907r(V3-V5 領域)と 968fGC-1392r(V6-V8 領域)のそれぞれ異なるプライマーセット(Forward primer の 5'側には GC クランプを付加してある)で PCR を行ない、DGGE 解析を行った。なお、本章で用いているプライマーの塩基配列は全て表 5.1.3 と同一のものを使用した。生物学的リン除去プロセスより採取した試料に対してこれらの 16S rRNA 遺伝子領域に注目して DGGE 解析を行った報告としては、V3-V5 領域では Ahn J. *et al.*(2002)、Kondo T. *et al.*(2005)が、V6-V8 領域では Schuler A.J *et al.*(2002)、Nielsen A.T. *et al.*(1999)がある。

表 6.1.4 DGGE に供する PCR 産物を得るための PCR 条件

	/tube	357fGC-907r		968fGC-1392r	
10×PCR buffer	3	94℃	5min	94℃	5min
2mM dNTPs	3				
Foward primer(10uM)	0.6	94℃	1min	94℃	45sec
Reverse primer(10uM)	0.6	53℃	1min	38℃	45sec
DMSO	0.6	72℃	1min	72℃	1min
DDW	19.05	~22cycle			
AmpliTaq Gold(5units/uL)	0.15				
Template*	3	72℃	2min	72℃	5min
		4℃	∞	4℃	∞
Σ	30uL				

*Templateの最終濃度が1ng/uLと成るように調整した。

PCR 後、試料 5μL を 2% agarose 電気泳動に供し、目的産物長の PCR 産物が得られていることを確認し、試料 20μL を DGGE 解析に供した。DGGE 解析の方法は Muyzer *et al.*(1993)に準じた。DGGE 法で使用する変成勾配ゲルの作成、ならびに電気泳動には Bio-Rad 社の Dcode システムの機材を用いた。作成した変成勾配ゲルは 8% polyacrylamide ゲルであり、変成勾配は 30~60%とした。

DGGE 解析における電気泳動の条件は、V3-V5 領域の試料に対しては 130V で 7 時間、V6-V8 領域の試料に対しては 130V で 6 時間とした。

DGGE における電気泳動が終了した後、変成勾配ゲルを 1×Vistra Green(Amersham Biosciences 社)で 15 分間染色した。余剰な染色液を除去した後、変成勾配ゲルを蛍光イメージアナライザー (FluorImager595、Amersham Biosciences 社)で撮影し、DGGE バンドを観察した。

観察結果から、興味のある DGGE バンドに対しては、DGGE バンドの切り出しと Sequencing を行った。撮影した画像から切り出す DGGE バンドを決めた後に、再度 PCR-DGGE 解析を行い、2 回目の観察結果においても同一の DGGE バンドが観察されることを確認した後に DGGE バンドの切り出しを行った。なお、DGGE バンドの切り出しを行う場合には、PCR サイクル数を 2cycle 間隔で減じた一連の試料を DGGE 解析し、最も PCR サイクル数の少ない試料のレーンから DGGE バンドの切り出しを行った。

切り出した DGGE バンドは DDW 50μL に浸し、液体窒素と 60℃のヒートブロックを用いた 3 回の凍結融解処理を行うことで、ポリアクリルアミドゲル断片から核酸の回収を行った。切り出した DGGE バンドは単一の DGGE バンドに見えるものの、複数種の DGGE バンドが混在していることが頻繁にあるため、再度 PCR 増幅を表 6.1.4 の条件で行った後、DGGE 解析を行い、DGGE バンドを切り出すことで精製を行った。精製を 3 回程度行った試料に対して GC クランプを付加しないプライマーセットで増幅し、Sequencing 反応の鋳型とした。

Sequencing 反応は表 6.1.5 に従って行った。1/8 BigDye Version 3.1(Applied Biosystems 社)の調整には 5×SQ buffer(400mM Tris-HCl、10mM MgCl₂、pH9.0)を用いて、BigDye Version 3.1 の原液を 5×SQ buffer で 8 倍希釈して使用した。Sequence primer には 357f、907r あるいは 968f、1392r を用いた。Sequence 反応後、反応液を MontageTMSEQ₉₆(Millipore 社)にて精製し、精製した鋳型を Sequence injection solution に懸濁させ、この懸濁液 10μL と Hi-Di Formamide 10μL を混合

表 6.1.5. Sequencing 反応の条件

	/tube	96℃	30sec	
1/8 BigDye Version 3.1	4			
Sequence Primer (10uM)	0.32	96℃	10sec	
DDW	4.68	50℃	5sec	
Template	1	60℃	4min	×26cycle
Σ	10uL			
		4℃	∞	

したものを ABI3100 avant GeneticAnalyzer にて解析した。泳動には 3700 POP6 を用い、解析条件は [Mobility file:DT3100POP6{Bdv3}v1.mob, Run Module:StdSeq50_POP6DefaultModule,AnalysisModule:BC3100APOP6SR_SeqOffFt Off.saz]とした。

DGGE 法による DGGE バンドの精製を繰り返しても、複数種の塩基配列が混在しているために、塩基配列の解読に失敗する場合があったが、そのような場合には切り出した DGGE バンドから増幅した PCR 産物を cloning した後に解読を行った。

Cloning は Qiagen PCR cloning kit(Qiagen 社)を用いて行い、操作は付属の説明書に従った。X-gal と IPTG を用いたブルーホワイトセレクションを行なった後、コロニーダイレクト PCR を行い、PCR 産物のインサートを確認した。コロニーダイレクト PCR には SP6-T7 プライマーのセットを用い、条件は表 6.1.6 に従った。

表 6.1.6 コロニーダイレクト PCR の条件

	/tube	
10×PCR buffer	3	94℃ 10min
2mM dNTPs	3	
T7 primer(10uM)	0.6	94℃ 30sec
SP6 primer(10uM)	0.6	52℃ 30sec
DDW	22.65	72℃ 2min
AmpliTaq Gold(5units/uL)	0.15	×30cycle
Template	-	
Σ	30uL	72℃ 10min
		4℃ ∞

続いて、インサートが確認されたクローンに対して 357fGC-907r あるいは 968fGC-1392r を用いて PCR を行い、増幅産物を DGGE 解析した。DGGE 解析の結果から、解読できなかった DGGE バンドと同一の位置に出現する DGGE バンドを有するクローンを選定した。上と同様の方法を用いて、選定したクローンの PCR 産物(SP6-T7)から塩基配列の解読を行った。Sequence primer には SP6 あるいは T7 を用いた。

6-1-10 塩基配列データの系統解析

切り出した DGGE バンドのセンス鎖、アンチセンス鎖の塩基配列を解読した後に Auto Assembler Ver2.1(Applied Biosystems 社)を用いて塩基配列データの整理を行なった。得られた塩基配列に対する最近縁種を blastn プログラム(Altschul

S.F. *et al.* (1997))でデータベースより検索した。続いて、特定された最近縁種の属する系統学的グループ(門レベル)と、6-1-7 節における門レベルで特異性を有するオリゴヌクレオチドプローブを用いた FISH 法の解析結果を比較した。

続いて、塩基配列データから Arb(Ludwig W. *et al.*(2004))を用いて系統樹の作成を行った。”Integrated Aligner”プログラムを用いて既知種の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列と比較しながら挿入した塩基配列データのアライメントを行ったのち、”Parsimony”アルゴリズムにより進化距離を計算し、系統樹内の適切な位置へ配置した。

6-2 実験結果及び考察

6-2-1 密度分離法を成功させるために必要とされる PHA 含有率の計算

密度分離を実際に行う前に、目的とする細菌種とその他を密度分離で分離するためには、両者の間にどの程度の浮遊密度の差が必要であるのかを既存の研究報告から調査した。続いて、必要とされる浮遊密度の差を生じるためには PHA 蓄積細菌が細胞内にどの程度の PHA を蓄積すればよいのかを理論式から計算した。

まず、密度分離を成功させるために必要とされる浮遊密度の差を既往の知見より調査し、結果を表 6.2.1 にまとめた。一般的に用いられる密度分離法では、均一な濃度の Percoll 溶液を遠心分離し、Percoll 内に密度勾配を作成してから密度分離を行う(密度勾配遠心分離法)。これに対して、Schuler A. J. *et al.*(2002)は活性汚泥中の特定の細菌群を分離・濃縮する場合には、均一な濃度の Percoll 溶液で密度分離 (非密度勾配遠心分離法)を行った方が分離能が優れていたことを報告しており、今回我々が用いた密度分離法はこの非密度分離法である。分離方法の違いを区別せず、浮遊密度の差がどの程度必要とされるかを調査したところ、 $0.01\sim0.04\text{g/cm}^3$ の浮遊密度差があれば分離可能であると推測された。なお、密度勾配遠心分離法における「分取可能な浮遊密度差」とは、密度勾配溶液中で1cm以上の移動距離の差を生じさせるために必要な浮遊密度の差とした。

続いて、PHA 含有率と PHA 蓄積細菌の浮遊密度の差の関係を Pedros-Alio C. *et al.* (1985)の理論式を用いて計算した結果を図 6.2.1 に示す。PHA 含有率0%の PHA 蓄積細菌と非 PHA 蓄積細菌の細胞が有する浮遊密度が同一であったと仮定し、両者が混在した状態から PHA 蓄積細菌を密度分離法によって分離する事を考えると、先ほどの調査結果から密度分離において特定の細菌種を分離するために必要な最小の浮遊密度差は 0.01g/cm^3 であることがわかっているため、PHA 蓄積細菌を分離するためには PHA 含有率を 17%まで高めればよいことがことがわかる。

表 6.2.1 既往の研究において密度分離を行うために必要とされた浮遊密度差

著者	密度分離法	適用試料	密度分離された試料を区別するため
			に必要な浮遊密度の差 $[\text{g/cm}^3]$
Scherer P.(1983)	密度勾配遠心分離法	嫌気性消化リアクターより採取した活性汚泥	0.05
Pedros-Alio C. <i>et al.</i> (1985)	密度勾配遠心分離法	<i>Alcaligenes eutrophus</i> N9A	0.01
MAS J. <i>et al.</i> (1985)	密度勾配遠心分離法	<i>Alcaligenes eutrophus</i> N9A	0.025
Dammel E.E. <i>et al.</i> (1991)	密度勾配遠心分離法	生物学的リン除去プロセスを含む実下水処理場の活性汚泥	0.04
Guerrero. R. <i>et al.</i> (1984)	密度勾配遠心分離法	<i>Chromatium Waramingii</i> , <i>C. vinosum</i>	0.01
Schuler A. J. <i>et al.</i> (2002)	非密度勾配遠心分離法	生物学的リン除去プロセスの好気槽より採取した活性汚泥	0.04

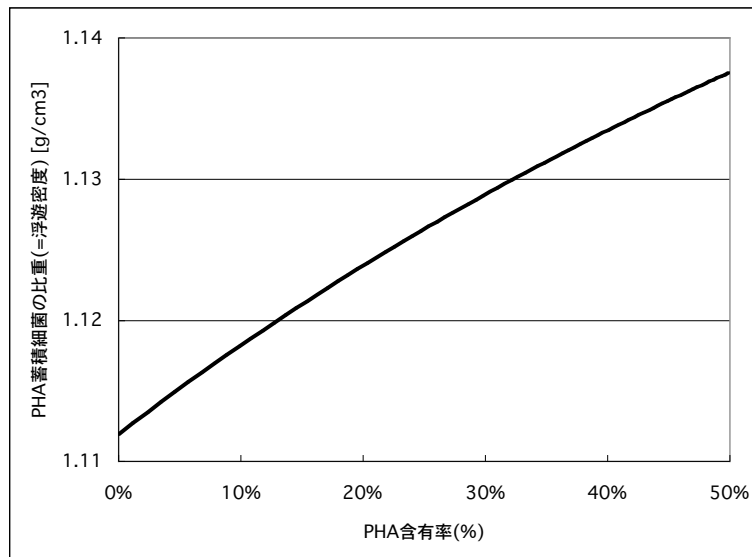


図 6. 2. 1 PHA 含有率の変化に伴う PHA 蓄積細菌の浮遊密度の変化

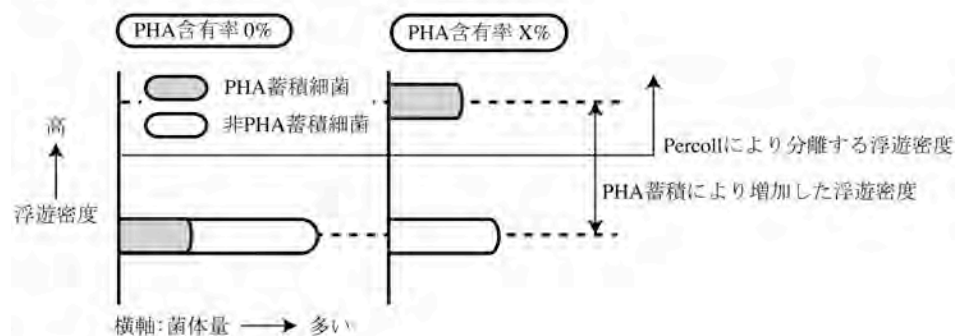
本節では密度分離により PHA 蓄積細菌を活性汚泥中から分離・濃縮するために必要とされる PHA 含有率を理論式より計算し、PHA 含有率 17%以上が好ましいことが示されたが、実際に使用する活性汚泥試料では PHA 蓄積細菌の持つ浮遊密度だけでなく、非 PHA 蓄積細菌の持つ浮遊密度の分布範囲が分離効率に大きく影響すると考えられる。ここで理想的な分離試料とは図 6.2.2 の I のような試料であり、PHA 含有率 0%の際には PHA 蓄積細菌、非 PHA 蓄積細菌の細胞浮遊密度は同一であり、浮遊密度の差は PHA 含有率によってのみ生じるという仮定をしている。このような試料に対して適切な濃度の Percoll 溶液を用いた密度分離を行えば、高濃度の PHA 蓄積細菌を得る事ができる。

しかし、活性汚泥試料中には浮遊密度の分布(1.04~1.10g/cm³ (Dammel E.E. *et al.*(1991)),あるいは 1.08~1.10g/cm³ (Mueller *et al.*(1967))が存在するため、実際には II のように PHA 含有率 0%の PHA 蓄積細菌よりも高い浮遊密度を持つ非 PHA 蓄積細菌が存在するような試料を扱うことになる。このような試料を分離した場合には、PHA 蓄積細菌のみを分離することは困難であり、斜線部のように非 PHA 蓄積細菌が混入してしまい、分離効率は低下してしまう。

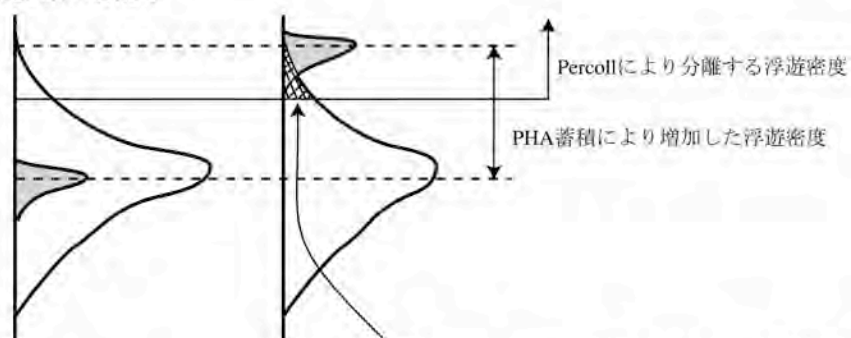
また、III の場合のように、PHA 含有率 0%における PHA 蓄積細菌の浮遊密度が非 PHA 蓄積細菌のそれよりも大きく低い範囲を占める場合には、PHA を相当に十分量蓄積させない限りは分離がきわめて困難となってしまう。

つまり、PHA 含有率を高めることで細胞浮遊密度を高めることは可能である

I. 理想的な分離試料



II. 活性汚泥試料の分離時



III. 分離が困難な試料

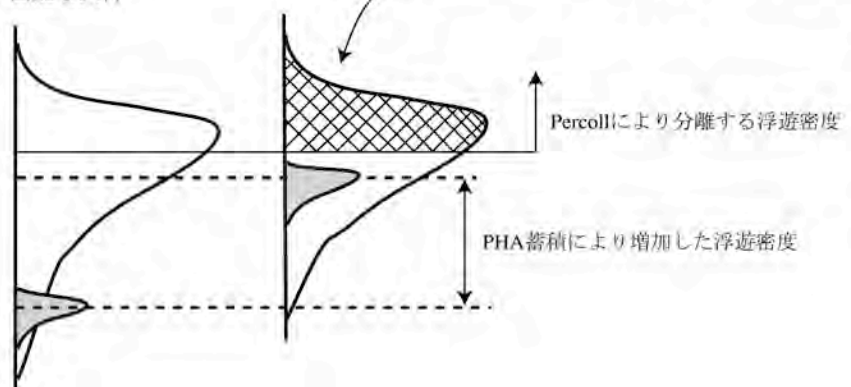


図 6.2.2 密度分離法に供する試料中の浮遊密度の分布が分離能に及ぼす影響の考察

が、試料中での非 PHA 蓄積細菌の細胞浮遊密度の分布状態によっては、PHA 蓄積細菌を高濃度に濃縮することは困難である場合があると考えられる。

以上より、Percoll を用いて PHA 蓄積細菌を高効率で分離・濃縮するためには以下の条件が必要であると言える。

1. PHA 蓄積細菌と非 PHA 蓄積細菌間での浮遊密度差 0.01g/cm^3 以上が望ましい。

なお、 0.01 g/cm^3 の浮遊密度差を生じるために必要とされる PHA 含有率は 17% であると評価された。

2. PHA 非蓄積時の PHA 蓄積細菌の細胞浮遊密度が、非 PHA 蓄積細菌の持つ細胞浮遊密度の分布の中で比較的高い範囲に占める。

6-2-2 密度分離に用いる活性汚泥試料の調整

実下水処理場の好気槽末端より採取した活性汚泥に対して、酢酸を唯一の炭素源としたバッチ試験を行い、活性汚泥に PHA を蓄積させた。活性汚泥試料の一覧を表 6.2.2 に示す。バッチ試験の時間は 2~15 時間とし、活性汚泥試料に応じて変化させた。これは短時間のバッチ試験では、MA2O 法、N 処理場の活性汚泥が十分量の PHA を蓄積しなかったためであり、それらの活性汚泥試料ではバッチ試験の時間を 6~15 時間に延長した。また、MA2O 法より採取した活性汚泥試料では好気条件だけでなく、亜硝酸、硝酸条件でもバッチ試験を行った。

バッチ試験が終了した活性汚泥の PHA 含有率ならびに全菌中に占める PHA 蓄積細菌の存在割合を評価することで「活性汚泥における PHA 蓄積細菌の PHA 含有率」を計算した。その結果、M 処理場の試料では PHA 蓄積細菌の PHA 含有率は 9.4~27.7%と評価された。

また、PAO mix、GB プローブを用いて、試料中の PAO mix、GB プローブ陽性細菌が全菌中に占める割合を定量評価し、これらの細菌種が PHA 蓄積細菌の菌叢内に占める割合を推測した。その結果、PHA 蓄積細菌の菌叢内に PAO mix、GB プローブ陽性細菌が占める割合は 8~15%であり、よってこれらの細菌種以外の PHA 蓄積細菌が占める割合は 82~92%であると評価され、今回の活性汚泥試料には新規な PHA 蓄積細菌が多く存在することが示唆された。

6-2-1 節において、同一の浮遊密度を有する PHA 蓄積細菌と非 PHA 蓄積細菌を Percoll を用いて密度分離するために必要とされる浮遊密度の差を評価した結果、少なくとも 0.01 g/cm^3 程度の浮遊密度の差が必要であると推測され、そのために必要とされる PHA 含有率は 17%以上という計算がなされた。今回、バッチ試験終了時における PHA 蓄積細菌の PHA 含有率は 9.4~27.7%であると評価された。しかし、今回評価した PHA 蓄積細菌の PHA 含有率とは「活性汚泥中の PHA 蓄積細菌の PHA 含有率は全て均一である」と仮定した場合の値であり、実際にはこの値よりも高い PHA 含有率を有する PHA 蓄積細菌が存在して

表 6.2.2 第 6 章で解析した活性試料の種類、バッチ試験条件およびバッチ試験後の活性汚泥に占める PHA 蓄積細菌、PAO mix、GB プローブ陽性細菌の存在割合の評価。

処理場名	運転方式	試料採取日	バッチ試験で用いた電子受容体の種類	バッチ試験の時間	バッチ試験終了時の活性汚泥のPHA含有率(mg-PHA/MLSS×100)	1. 活性汚泥中にPHA蓄積細菌が占める割合(Nile blue A染色陽性細菌数/全菌数(DAPI))	PHA蓄積細菌のPHA含有率(mg-PHA/(MLSS*[Nile blueA/DAPI])×100)
M処理場	AO (嫌気好気法)	2005. 8. 11	O ₂	2hr	3.9%	14.0%(±1.9%)	27.7%
			O ₂	15hr	9.5%	16.2%(±2.0%)	15.4%
	A2O (嫌気無酸素好気法)	2005. 10. 12	NO ₂	15hr	2.6%	8.4%(±2.8%)	11.7%
			NO ₃	15hr	2.9%	14.4%(±2.3%)	9.4%
N処理場	Pseudo-aeration CAS (擬似嫌気好気法)	2005. 11. 21	O ₂	6hr	5.0%	未実施	-
	AO (嫌気好気法)	2005. 11. 21	O ₂	6hr	4.5%	未実施	-
	A2O (嫌気無酸素好気法)	2005. 11. 21	O ₂	6hr	4.2%	未実施	-

処理場名	運転方式	試料採取日	1. 活性汚泥中にPHA蓄積細菌が占める割合(Nile blue A染色陽性細菌数/全菌数(DAPI))	2. 全菌中のPAO mixプローブ陽性細菌の存在割合(%)	3. 全菌中のGBプローブ陽性細菌の存在割合(%)	PHA蓄積細菌の群集内でPAO mix、GBプローブ陽性細菌以外のPHA蓄積細菌が占める割合((1-(2+3))/1)×100
M処理場	AO (嫌気好気法)	2005. 8. 11	14.0%(±1.9%)	1.7%(±0.5%)	0.8%(±0.5%)	82%
			16.2%(±2.0%)	0.6%(±0.4%)	0.7%(±0.5%)	92%
	A2O (嫌気無酸素好気法)	2005. 10. 12	8.4%(±2.8%)	0.6%(±0.4%)	0.7%(±0.5%)	85%
			14.4%(±2.3%)	0.6%(±0.4%)	0.7%(±0.5%)	91%
N処理場	Pseudo-aeration CAS (擬似嫌気好気法)	2005. 11. 21	未実施	2.0%(±0.9%)	0.2%(±0.1%)	-
	AO (嫌気好気法)	2005. 11. 21	未実施	1.4%(±0.8%)	0.8%(±0.3%)	-
	A2O (嫌気無酸素好気法)	2005. 11. 21	未実施	0.6%(±0.6%)	0.2%(±0.1%)	-

いると考えられる。また、PHA 含有率 0%における PHA 蓄積細菌の浮遊密度が他の細菌と比較して高い場合には、PHA 含有率が不十分でも PHA 蓄積細菌を分離することが可能であると考えられたことから、これらの活性汚泥を以降の解析に供した。

6-2-3 分散処理方法の最適化

6-2-3-1 分散処理に用いる機材、処理条件の最適化

バッチ試験後の活性汚泥試料に対して 4 種類の超音波分散機を用いて超音波分散を行い、分散の良否を自動粒度分布測定装置 CAPA-300(堀場)にて評価した結果を図 6.2.3 に示す。IKA Science U200S、Branson sonifier 400 で分散した試料に比べて、Silent sonic や VP60S ultraomogenizer で分散処理した試料の粒度分布では、30 μ m 以上の比較的大きい粒径の範囲で多量の粒子が計測された。これは、Silent sonic や VP60S ultraomogenizer の処理法では試料を十分に分散できていないことを示している。よって、以降の検討には IKA Science U200S と Branson sonifier 400 を用いることとした。

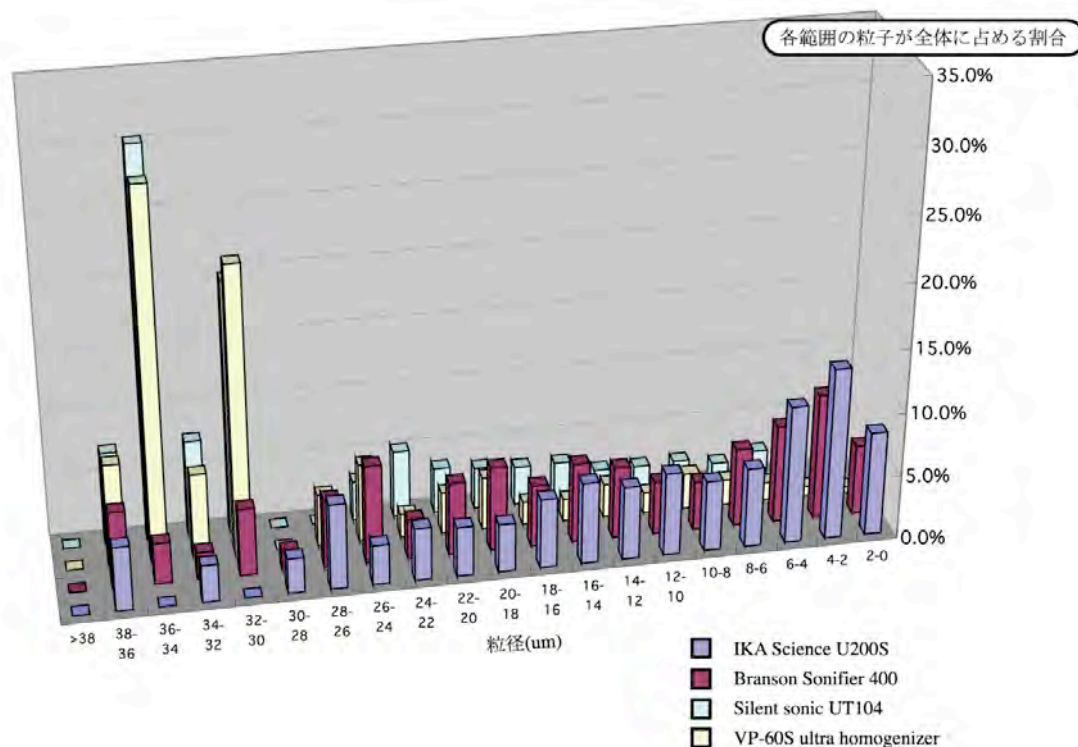


図 6.2.3 分散処理に用いた機材における分散能の比較

続いて、最適な分散時間を検討するために IKA Science U200S では 3、4、6 分間、Branson sonifier 400 では 1、2、3 分間分散処理を行い、分散処理後の試料の粒度分布を同様に測定した。その結果、IKA Science U200S では 4 分、Branson Sonifier 400 では 3 分が最適な分散条件であり、その分散条件で得られた試料の粒度分布は両者で類似したものであった。

IKA Science U200S や Branson Sonifier400 が、Silent sonic や VP60S ultraomogenizer よりも分散能が優れていた理由としては、IKA Science U200S や Branson Sonifier400 は試料懸濁液に対して直接チップを浸すタイプの分散機であるためであると考えられる。Silent sonic や VP60S ultraomogenizer は分散を行う容器に対して間接的に超音波を与えるバスタイプの超音波発生装置であるため、試料に十分な超音波処理を施すことができなかったものと考えられる。

6-2-3-2 分散処理が細胞へ及ぼすダメージの評価

続いて、IKA Science U200S あるいは Branson Sonifier 400 で分散した場合。どちらの分散方法が細胞に与えるダメージが少ないかを *E.coli* DH5 α を用いて評価した。

超音波分散処理を行わなかった菌体培養液の CFU が 3.3×10^9 cells/mL であったのに対して、IKA Science U200S、Branson Sonifier 400 で分離した菌体培養液からはそれぞれ 3.7×10^9 cells/mL、 1.6×10^9 cells/mL の CFU が確認された。超音波分散処理を行わなかった場合の CFU と比較して、分散処理後に減少した CFU が細胞へ与えたダメージであると評価することができ、よって IKA Science U200S の方が細胞に与えるダメージの少ない処理法であると判断することができる。

なお、IKA Science U200S を用いた場合には CFU は逆に増加しているが、これは凝集していた細胞が分散処理によって崩され、菌体培養液中にシングルセルの状態で存在する細胞数が増加した、生じたコロニー数も増加したと考えられる。

6-2-3-3 分散媒の最適化

活性汚泥試料を 6 種類の分散媒に懸濁させ、IKA Science U200S を用い、Amplitude 20%、パルス間隔 0.5 で 4 分間の分散処理を行った後に粒度分布を測定した結果を図 6.2.4 に示す。

その結果、TE、EDTA、Urea、Pyrophosphate buffer で得られた粒度分布は類似したものであり、この4種類の中で最も良好な結果の得られた TE buffer を分散媒として用いる事とした。

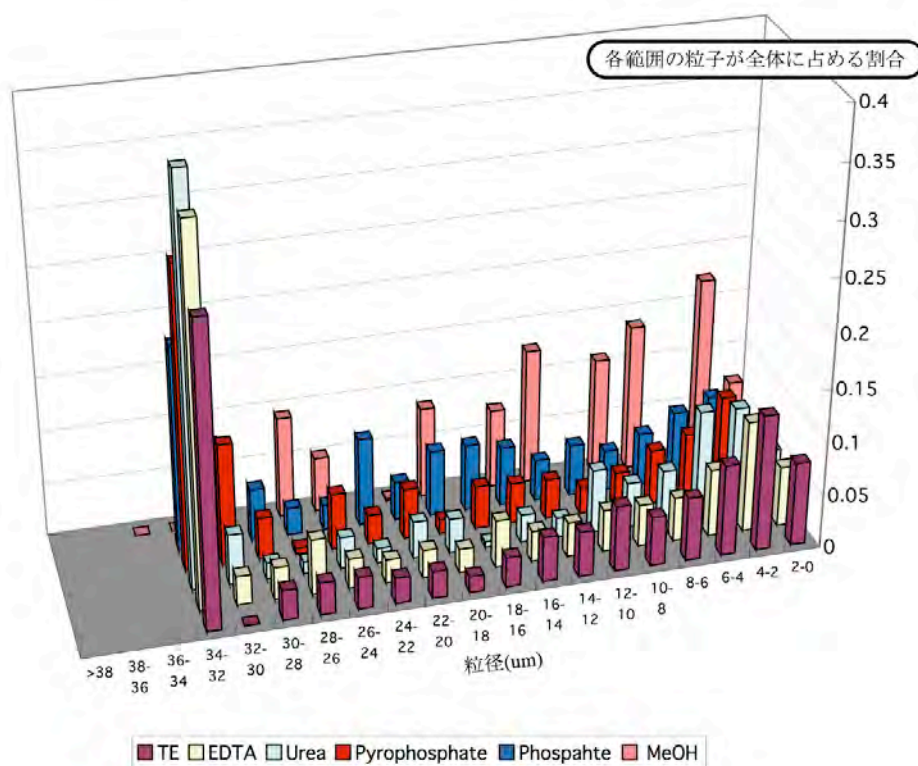


図 6. 2. 4 分散媒の違いが分散能に及ぼす影響の評価

6-2-3-4 分散処理法のまとめ

以上の検討結果より、今回解析する活性汚泥試料を分散するための条件は以下の通りとなった。

TE buffer(1mM EDTA、10mM Tris-HCl、pH7.5) に懸濁させた活性汚泥試料 5mL に対して、IKA Science U200S を用いて Amplitude 20%、パルス間隔 0.5 の設定で 4 分間の分散処理を行う。

6-2-4 Percoll を用いた密度分離法による活性汚泥試料中の PHA 蓄積細菌の分離・濃縮

6-2-4-1 Percoll を用いた密度分離法の最適化

まず、密度分離時に加える浸透圧調整剤の違いが分離能に及ぼす影響を評価する実験を行った。バッチ試験後に採取した試料に対して Percoll(終濃度 70%)を用いた密度分離を行ない、この際に浸透圧調整剤として NaCl を終濃度 0.15M、あるいは Sucrose を 0.25M 加えた系で実験を行い、分離能に差が生じるのかを検討した。分離能の良否は分離後に得られた試料において PHA 蓄積細菌が全菌に占める割合を Nile blue A と DAPI の二重染色で評価した。

その結果、分離前の試料において PHA 蓄積細菌が全菌に占める割合が $14 \pm 1.9\%$ であったのに対して、NaCl を添加して分離した系では $72 \pm 5\%$ 、Sucrose を添加して分離した系では $57 \pm 10\%$ が得られた。この結果から、Percoll を用いた密度分離法により活性汚泥試料中の PHA 蓄積細菌を分離・濃縮することが可能であることが示された。また、NaCl を用いて密度分離を行った方が良好な分離能が得られたため、以降の密度分離には NaCl を浸透圧調整剤として用いることにした。

続いて、Shuler A. J. et al.(2002)が用いた低濃度(40%)と高濃度(70%)の Percoll 分離を行うことで分離能を向上させることができるかを評価した。二段階分離後に得られた試料において PHA 蓄積細菌が全菌に占める割合は $72 \pm 7\%$ であり、これは一度だけ密度分離して得られた試料における値($72.1 \pm 4.5\%$)とほぼ同一のものであった。よって以降の実験では二段階分離法は用いなかった。

最後に密度分離を行う際の試料サイズが分離能へ及ぼす影響を評価した。これまでは 1.7mL チューブ(全量 1.5mL)を用いて密度分離を行っていたのに対して、50mL チューブ(全量 40mL)で密度分離を行い、分離能を評価した。顕微鏡観察の結果、1.7mL チューブで分離した試料中では PHA を蓄積している球菌が有占していたのに対して、50mL チューブで分離した試料中には PHA を蓄積していない桿菌が有占していることが確認され、50mL チューブで分離した場合には良好な密度分離の結果を得る事が出来なかった。

以上の検討結果から Percoll を用いた密度分離法の最適条件は以下の通りとした。分離溶液には 70% Percoll 溶液(NaCl 0.15M)を用い、分散済みの試料を加えて全量を 1.5mL にした後に(6,000g、5 分、4°C)で遠心分離を行う。

6-2-4-2 バッチ試験後に採取した活性汚泥試料中の PHA 蓄積細菌の分離・濃縮

前節にて最適化した密度分離法を表 6.2.2 に示した試料に対して適用し、分離後に得られた試料において PHA 蓄積細菌が全菌に占める割合を評価した結

果を表 6.2.3 に示す。最適化した密度分離法の条件で分離を行った結果、PHA 蓄積細菌が全菌に占める割合を 48～89%まで高めることに成功した。

活性汚泥内に存在する PHA 蓄積細菌の PHA 含有率を M 処理場の試料で評価したところ、9.4～27.7%であると評価されていた。6-2-1 節において、この PHA 含有率の細胞を用いて密度分離が成功するかを推測した際には、密度分離を成功させる最低限の PHA 含有率にすぎないため、密度分離がこれほど成功するとは予測されていなかった。今回密度分離に成功した理由として、活性汚泥内の細菌が有する浮遊密度の分布において、PHA 蓄積細菌が元々比較的高い浮遊密度を有していたために、低い PHA 含有率においても PHA 蓄積細菌が分離されたのではないかという要因が推測される。また、6-2-1 節において評価した値は「様々な PHA 蓄積細菌が有する PHA 含有率の平均値」であるため、実際にはより高い PHA 含有率を有する PHA 蓄積細菌が活性汚泥内に存在しており、これらの細菌が分離・濃縮された可能性も考えられる。

表 6.2.3 密度分離後における試料中の PHA 蓄積細菌の存在割合

処理場名	運転方式	バッチ試験で用いた電子受容体の種類	PHA蓄積細菌のPHA含有率(mg-PHA/(MLSS*[Nile blueA/DAPI])×100)	Percollを用いた密度分離後に得られた試料内でPHA蓄積細菌が全菌に占める割合(%)	
				測定値(%)	SD
M処理場	AO (嫌気好気法)	O ₂	27.7%	72	5
		O ₂	15.4%	74	1
	A2O (嫌気無酸素好気法)	NO ₂	11.7%	60	5
		NO ₃	9.4%	57	7
N処理場	Pseudo-aeration CAS (擬似嫌気好気法)	O ₂	-	73	2
	AO (嫌気好気法)	O ₂	-	89	2
	A2O (嫌気無酸素好気法)	O ₂	-	48	12

今回は分離能の良否を分離後に得られた試料に対して Nile blue A と DAPI の二重染色を行い、その測定値から評価した。しかし、Percoll 分離後に得られた試料から Nile blue A の陽性シグナルは良好に得られるものの、DAPI 染色のシグナルがほぼ全ての細胞から得られない場合が確認された。この問題は DAPI 染色を Nile blue A 染色と組み合わせずに、DAPI だけを用いて染色した場合にも解消されず、DAPI 以外の核酸染色剤として 1×Vistragreen(Amersham Biosciences 社)を用いた場合にも問題の解消はできなかった。核酸染色剤で細胞が検出されない原因としては 1)細胞が死滅し、さらに核酸も分解されてしまった、2)細胞内に核酸はあるものの核酸染色剤が細胞内に入る事ができず、陽性シグナルを得る事ができない。などが考えられる。

1)の死菌である可能性に関して考察する。Percoll 分離後の試料から DAPI のシグナルは得られないものの、Nile blue A の陽性シグナルが得られていること

と、バッチ試験開始前の試料では Nile blue A の陽性シグナルは全菌からほぼ観察されていないことから、これらの細菌はバッチ試験のある時点までは PHA の蓄積を行っていた生菌であったと考えられる。するとバッチ試験の間に何らかの因子でこれらの細菌が死滅したと考えられるのだが、そのような場合にはバッチ試験のある段階で酢酸摂取速度が低下するはずである。しかし、バッチ試験中における 1 時間当たりの酢酸摂取速度はバッチ試験を通してほぼ一定であり、PHA 蓄積細菌の死滅が生じたとは考えにくい。

次に考えられる因子はバッチ試験後の試料の保存時に核酸が分解された可能性であるが、活性汚泥試料は直ちに -80℃ で凍結保存し、保存を開始してから一週間以内の試料を密度分離に供していることから、試料保存の間に核酸の分解が生じていたとは考えづらい。

最後に考えられる要素は密度分離の操作過程において核酸の分解が急速に進行した可能性であるが、密度分離の操作を全て氷上で行い、使用する試薬も冷却済みのものを用いており、このような操作の過程で DNase 様の物質が急激に作用したとも考えづらく、1) の可能性に関しては不明な点が残された。

2) の可能性に関して考察すると、DAPI 染色に供する試料は 3% パラホルムアミド固定を二時間行ったものであり、通常はこのような試料を用いて DAPI 染色を行なった際には DAPI シグナルが確認されることから、細胞壁処理が不十分であったとは考えづらい。

この問題の原因を特定することはできなかったが、試験時間を短縮したバッチ試験を再度行ない、新たに得られた試料を用いた場合にはそのような問題が生じない場合があったため、そのようにして得られた試料を密度分離法に供し、以降の解析へ進んだ。

6-2-5 FISH 法を用いた密度分離法によって得られた試料中の細菌叢解析

PHA 蓄積細菌を高濃度に分離・濃縮することに成功した活性汚泥試料中の細菌叢を、FISH 法を用いて解析した。FISH 法では細菌種を門レベルで検出できる特異性を有するオリゴヌクレオチドプローブを使用し、検出された細菌が全菌中に占める割合を定量評価した。定量 FISH 法により解析した試料は、N 処理場 AO 法と M 処理場 A2O 法(好気条件)の活性汚泥試料を密度分離に供し、分離後に得られた試料である。定量 FISH 法の解析結果を図 6.2.5 および図 6.2.6 に示す。

N 処理場 AO 法の試料は主に β -、 γ -*proteobacteria*、*Actinobacteria* の三種のグループから構成されており、ALF1b、LGC mix からは特異的なシグナルは得られなかった(図 6.2.5)。検出された 3 種のグループ内では β -*proteobacteria* が占める割合が 57%と最も高く、続いて *Actinobacteria*、 γ -*proteobacteria* がそれぞれ 28%、14%であった。全菌中に PAO mix 陽性細菌 (*Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*”)が占める割合は 18%であり、 β -*proteobacteria* 内にこれらの細菌種が占める割合は 38%であった。

なお、密度分離法に供する前の試料からは PAO mix 陽性細菌が全菌に対して 2%の存在割合で検出されており、密度分離後には存在割合が 18%まで増加したことから、PAO mix 陽性細菌が密度分離法によって分離・濃縮されていたことが明らかとなった。そして、PAO mix 陽性細菌が PHA 蓄積能を有することは Liu WT. *et al.*(2001)によって確認されていることから、密度分離法によって PHA 蓄積細菌が濃縮されていることが、FISH 法の解析結果からも確認された。

密度分離後に得られた N 処理場 AO 法の試料では、PHA 蓄積細菌が全菌に占める割合が 89%であるという表 6.2.3 の結果から、 β -、 γ -*proteobacteria*、*Actinobacteria* グループの中に主要な PHA 蓄積細菌が含まれている可能性が高いと考えられる。

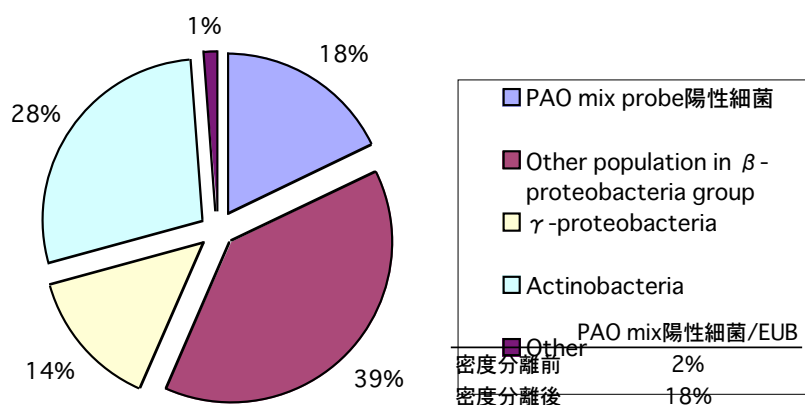


図 6.2.5 密度分離後に得られた試料に対する FISH 解析の結果

試料:N 処理場 AO 法、バッチ試験条件:6 時間、好気条件

密度分離後の Nile blueA 染色陽性細菌/DAPI は 89%

ただし、今回の FISH 法では全菌の評価を EUB プローブで検出された細菌で

評価しているのに対して、Nile blue A と DAPI を組み合わせた二重染色では全菌を DAPI で評価しており、一般に EUB よりも DAPI の方が多くの細胞を検出することが報告されていることから、DAPI を用いて全菌評価を行った結果と今回の FISH 法の結果を比較する場合、図 6.2.5 の結果は過大評価になっている恐れがある。なお、既存の報告では活性汚泥中において EUB プローブで検出できる細胞は DAPI の 8 割(Snaidr J. *et al.* (1997))程度であるされている。

M 処理場 A2O 法(好気条件)の試料を解析した結果(図 6.2.6)は、N 処理場の解析結果と類似しており、主に β -、 γ -*proteobacteria*、*Actinobacteria* の三種のグループから構成されていることが明らかとなった。なお、ALF1b、LGC mix からは特異的なシグナルは得られなかった。M 処理場の試料においては β -*proteobacteria* が 55%と最も多く、続いて *Actinobacteria*、 γ -*proteobacteria* がそれぞれ 28%、9%の存在割合で検出された。 β -*proteobacteria* 内で PAO mix 陽性細菌が占める割合は 9%(全菌に対して 5%)であり、密度分離前の存在割合がわずかに 0.6%であったことと比較すると、PAO mix 陽性細菌が密度分離法によって濃縮されていることが明らかとなった。

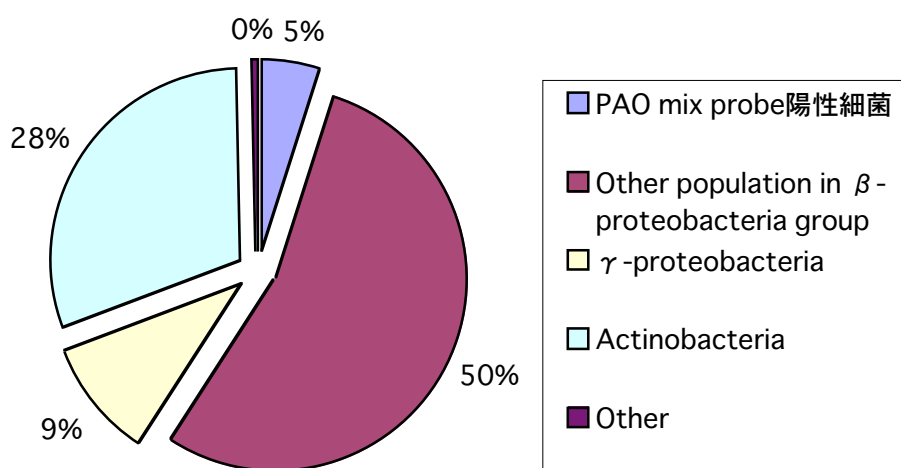


図 6.2.6 密度分離後に得られた試料に対する FISH 解析の結果

試料:M 処理場 A2O 法、バッチ試験条件:15 時間、好気条件

密度分離後の Nile blueA 染色陽性細菌/DAPI は 74%

以上の FISH 解析の結果から、密度分離後に得られた試料中に存在する PHA 蓄積細菌は β -、 γ -*proteobacteria*、*Actinobacteria* に属する細菌種であることが示唆された。

6-2-6 DGGE-sequencing 法による密度分離法によって得られた試料中の細菌叢解析

密度分離法により得られた試料から核酸を抽出し、16S rRNA の V3-V5 領域あるいは V6-V8 領域を増幅し、DGGE-sequencing 法により解析した。

まず、核酸抽出法として Fast DNA SPIN Kit for Soil を用いる方法と Kong Y.H. *et al.*(2001)を用いる方法のどちらが優れているかを、抽出後の菌体に対して DAPI 染色を行い顕微鏡観察を行うことで評価した。その結果、Fast DNA SPIN Kit for Soil で核酸抽出を行った後の菌体からは DAPI 染色の陽性シグナルが全く得られなかったのに対して、Kong Y.H. *et al.*(2001)ではブロック内部の一部の菌から DAPI シグナルが確認された。これは Kong Y.H. *et al.*(2001)の方法では全細菌から核酸が抽出されていないことを示しており、よって本研究では Fast DNA SPIN Kit for Soil を核酸抽出法として選択した。

Fast DNA SPIN Kit for Soil を用いて密度分離後に回収した試料から核酸抽出を行った。また、特定の細菌種が密度分離法によって濃縮されていることを DGGE 法において確認するために、N 処理場 AO 法の試料では密度分離を行う前の試料と、密度分離後に上層に分配された試料からも核酸抽出を行った。核酸抽出の結果、密度分離後に得られた試料からは約 500~1,500ng の核酸が得られ、これらを PCR の鋳型として供した。

PCR を行うに当たって、今回用いるプライマーセット(357fGC-907r(V3-V5 領域)、968fGC-1392r(V6-V8 領域))で特異的な増幅産物が得られるかを確認する必要があった。ここで、968fGC-1392r を用いた PCR における PCR 条件として Nielsen A. T. *et al.*(1999)と Shuler A.J. (2002)では異なる PCR 条件を用いていたため、どちらの条件で特異的な増幅産物が得られるかを確認した。PCR 後にアガロース電気泳動により増幅産物を確認した結果を図 6.2.7 に示す。

いずれの PCR から目的産物長の位置に増幅産物が確認され、968fGC-1392r を用いた PCR では、Nielsen A. T. *et al.*(1999)と Shuler A.J. (2002)のいずれの PCR 条件においても目的産物長の増副産物を得る事が出来たため、よりアニーリング温度の低い Nielsen A. T. *et al.*(1999)の条件を用いることにした。

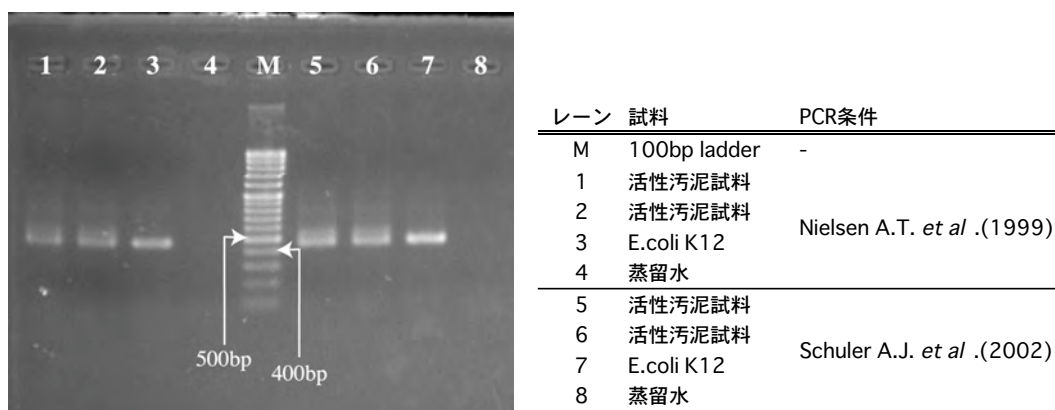
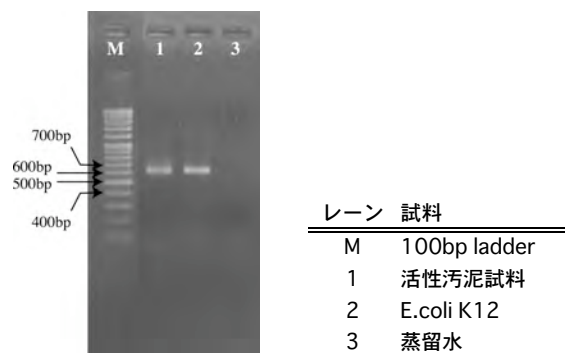


図 6.2.7 V3-V5 または V6-V8 領域を標的とした PCR における増幅産物の確認

続いて、増幅産物を得るまでに要する PCR サイクル数を抑えるために初期鋳型量をどこまで増加させることができるかを確認した。1 チューブ当たり、30～0.1ng/μL となるように鋳型を加えて、357fGC-907r にて PCR を行った。図 6.2.8 の結果より 10ng/μL 以下の鋳型量において目的長の増幅産物が得られている。そこで、本研究では PCR の鋳型量を 1ng/μL とした。

まず、N 処理場 AO 法の 1)分離前、2)分離後上層、3)分離後下層の試料を DGGE 解析にて比較した結果を図 6.2.9 に示す。357fGC-907r、968fGC-1392r のいずれの増幅産物を解析した結果においても、分離後に出現する DGGE バンドの存在が確認された。

357fGC-907r で解析した場合には、分離前後に共通して出現する DGGE バンドが多く確認されている。これらの DGGE バンドに由来する細菌種は「密度分離後のレーンから検出されている」という観点から考えれば PHA 蓄積細菌である可能性があるものの、PHA 蓄積細菌が優先していない試料(分離前、分離

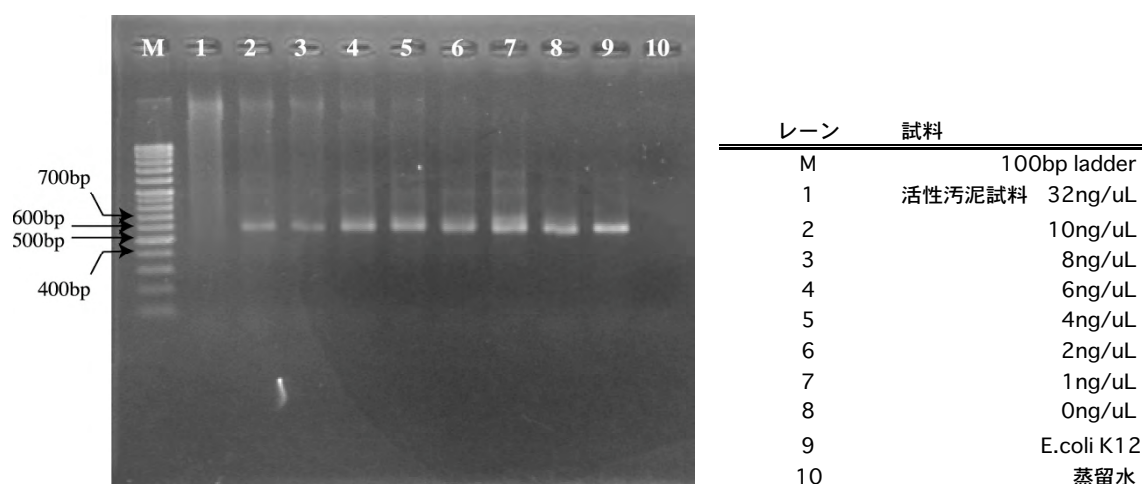


図 6. 2. 8 PCR に供する鑄型量の上限の確認

後:上層)からも検出されている点から考えると PHA 蓄積細菌ではない可能性もある。

968fGC-1392r で解析した場合に出現する DGGE バンドの数は 357fGC-907r で解析した場合よりも少なかった。Schmalenberger A. *et al.*(2001)は 16S rRNA 遺伝子の一部の保存領域を用いた DGGE 解析において、注目した保存領域ごとで解析結果が異なることが報告しており、Yu Z. *et al.*(2004)は V3-V5 領域の方が 357fGC-907r(V3-V5領域)

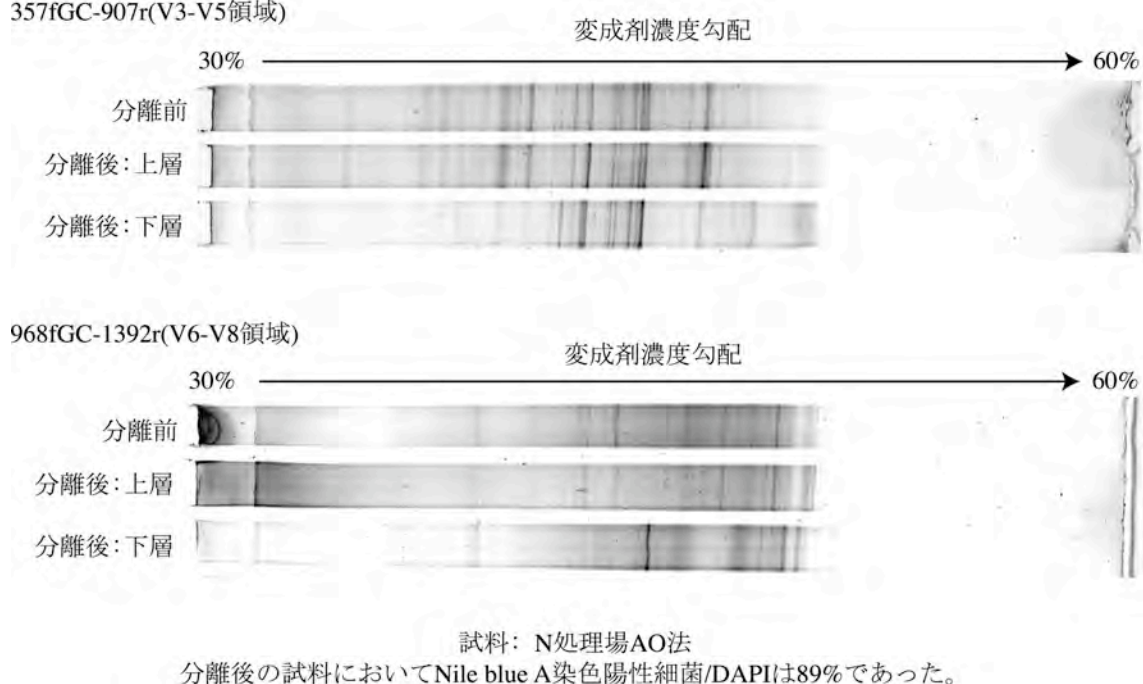


図 6. 2. 9 密度分離前後および密度分離後に上層と下層に分配された試料における菌叢の比較

V6-V8 領域よりも解析に適した領域であることを報告している。このような問題はあつものの、本研究ではより網羅的な解析を行うためにどちらの領域でも解析を行うことにした。

続いて、表 6.2.2 の全ての試料に対して DGGE 解析を行った結果を図 6.2.10 に示す。DGGE 解析の結果において、活性汚泥を採取した処理場や運転法、またはバッチ試験の際に使用した電子受容体の違いに関係なく出現する DGGE バンドが確認された。ここで本来ならば DGGE パターンに関する考察を先にすべきであるが、6-4-3 節における FISH 解析において試料中での存在が確認された細菌種(β -、 γ -proteobacteria、Actinobacteria グループ)にこれらの DGGE バンドの塩基配列が帰属されるのかこの段階では不明であるため、DGGE パターンに関する考察は DGGE バンドの塩基配列の解読を終えた後に行った。

続いて、興味のある DGGE バンドの切り出し、精製を行った後に塩基配列の特定を行った。DGGE ゲルより切り出したバンドについて図 6.2.11 および図 6.2.12 に示した。切り出す対象とした DGGE バンドは図 6.2.9 において、各レーンで共通して観察された DGGE バンドが主なものである。各レーンで共通して出現した DGGE バンドを切り出した理由としては、これらの DGGE バンドが「処理場の違い」、「運転法の違い」、または「電子受容体の違い」といった影響を受けることなく PHA を蓄積するような代謝様式を有する細菌種に由

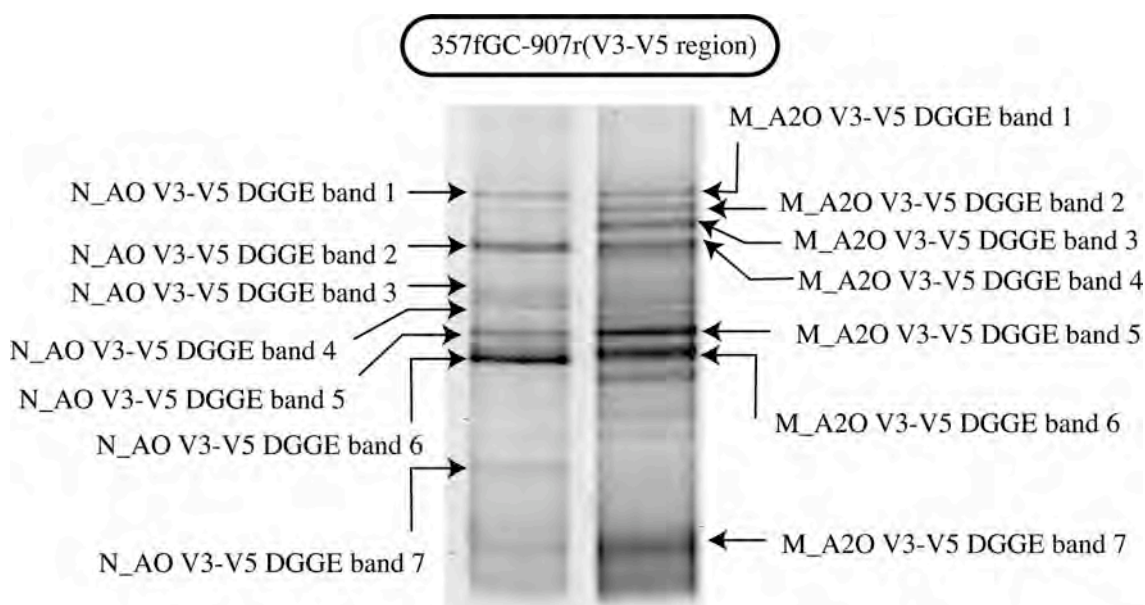
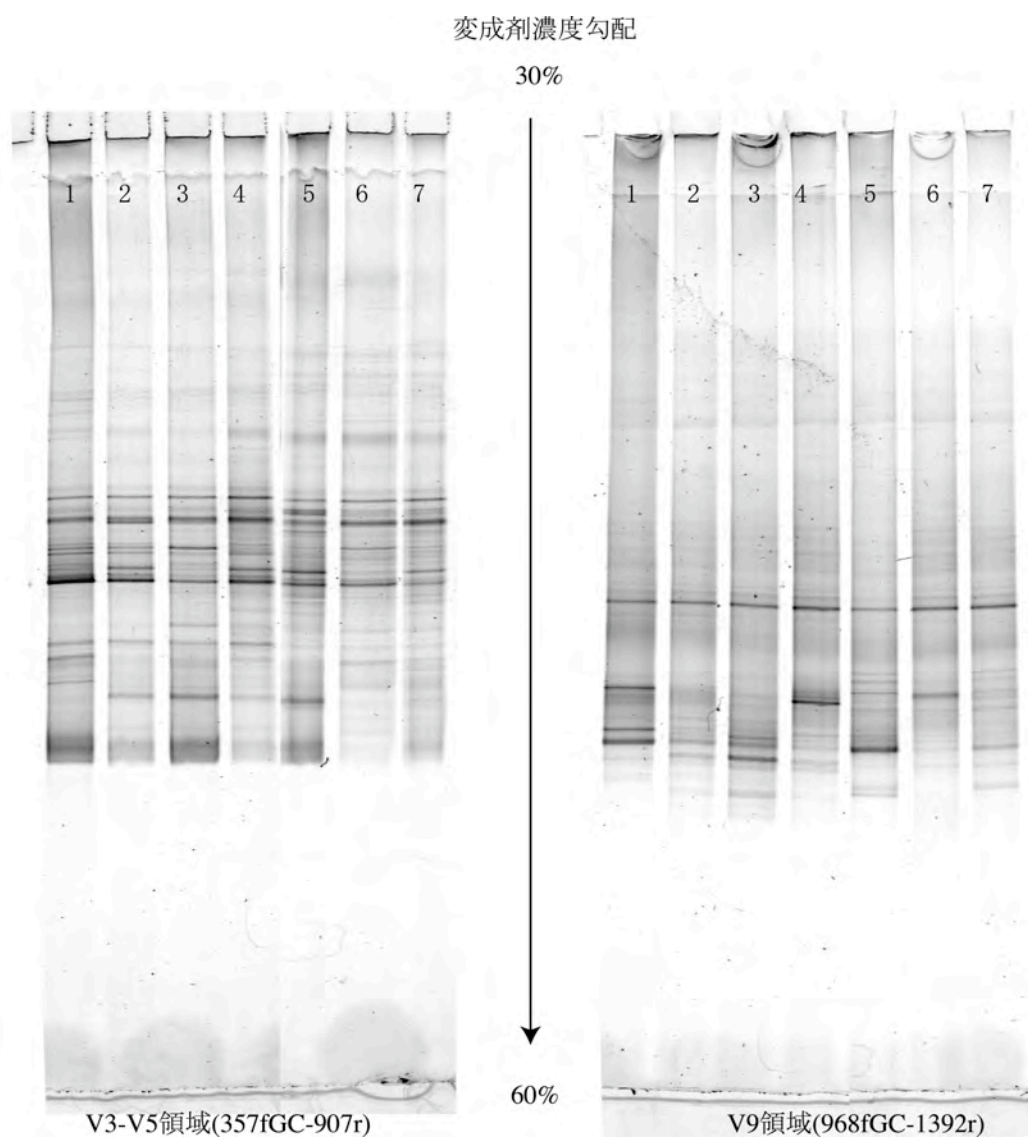


図 6.2.11 V3-V5 領域における DGGE バンドの切り出し

試料は左:N 処理場 A0 法、右:M 処理場 A20 法 O₂



レーン	試料	密度分離後の試料におけるPHA 蓄積細菌の存在割合(表6.2.3)	
1	M処理場	AO法(O_2)	72%
2	N処理場	AO法	89%
3	N処理場	A2O法	43%
4	N処理場	CAS法	78%
5	M処理場	A2O法(O_2)	74%
6	M処理場	A2O法(NO_2)	60%
7	M処理場	A2O法(NO_3)	57%

図 6.2.10 密度分離によって得られた試料に対する DGGE 結果

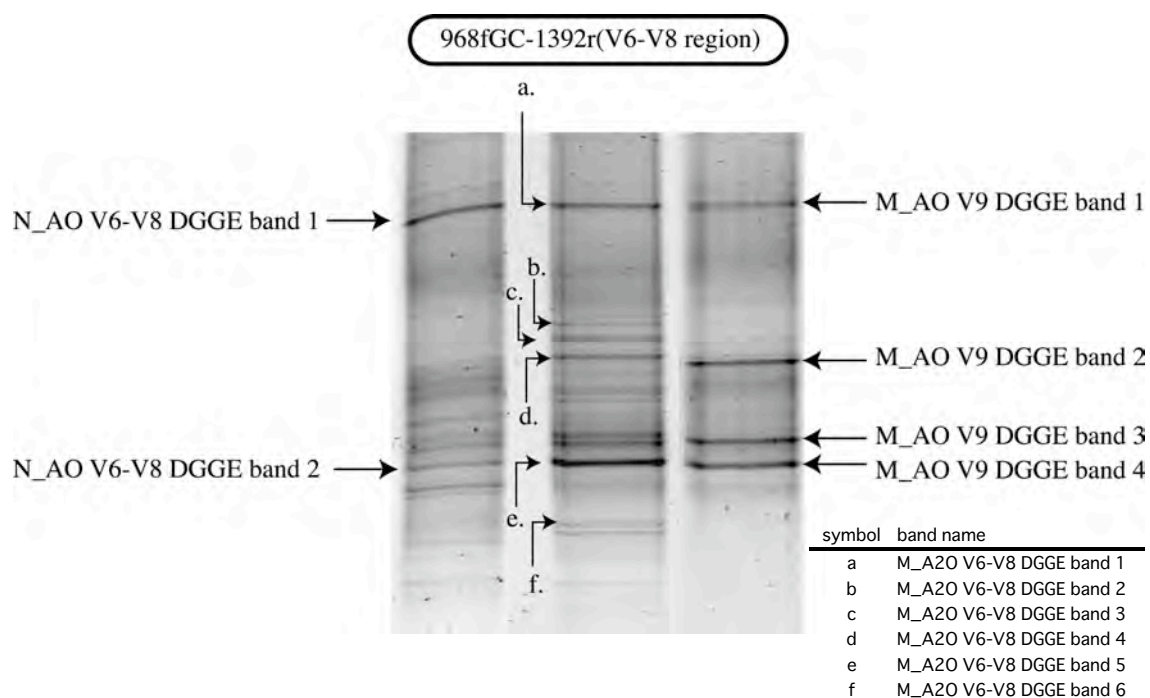


図 6. 2. 12 V6-V8 領域における DGGE バンドの切り出し

試料は左:N 処理場 A0 法、中央:M 処理場 A20 法 O₂、右:M 処理場 A0 法

来することを示唆していることが上げられる。そして、そのような処理場に広く分布し、幅広い外環境の条件において PHA を蓄積することのできる PHA 蓄積細菌を特定することができれば、極めて重要な知見と考えられる。

逆に各レーンにおいて特異的に検出される DGGE バンドに由来する細菌はある条件下のみで PHA を蓄積する興味深い代謝様式を有している可能性がある。しかし、今回の解析では各レーンで特異的に検出される DGGE バンドの切り出しは積極的には行わなかった。なぜならば、密度分離後に得られた試料中には PHA 蓄積細菌以外の細菌も存在しており、あるレーンにおいてそのような細菌種が検出されているにすぎないという可能性が考えられるためである。よって、各レーンに特異的に検出される DGGE バンドに関しては少数に対してのみ塩基配列の決定を行った。

なお、DGGE バンドの精製を 3 回繰り返した後も塩基配列が解読できない DGGE バンドに対しては、DGGE ゲルの変成剤濃度勾配を 30-60%から 35-55%に変更して同一の条件で電気泳動を行った後、切り出した DGGE バンドから塩基配列の解読を行った。この際に、30-60%の変成剤濃度勾配の際には一本の

DGGE バンドだったものが、35%-55%の変成剤濃度勾配では複数の DGGE バンドになる場合があり、その場合にはどちらも切り出して塩基配列の解読に供した(N_ AO V3-V5 DGGE band 2、3、M_ A2O V6-V8 DGGE band 2、M_ AO V6-V8 DGGE band 1、2)。35%-55%の変成剤濃度勾配の DGGE ゲルを使って精製を行っても塩基配列を解読できない DGGE バンド(M_ A2O V3-V5 DGGE band4、N_ AO V6-V8 DGGE band1、M_ A2O V6-V8 DGGE band 1、2-2、M_ AO V6-V8 DGGE band 1-1)に対しては cloning を介して DGGE バンドの精製を行い、塩基配列の解読を行った。

DGGE sequencing により得られた塩基配列の相同性検索の結果を表 6.2.4 に示した。なお、6-4-3 節の定量 FISH の結果から、門レベルで存在が確認されていたグループ(*β*,*γ*-*proteobacteria*、*Actinobacteria*)に属する DGGE バンドに対しては色付けをして示した。

相同性検索の結果、FISH 法で存在が確認されていた PAO mix、GB プローブ陽性細菌が属する細菌種に帰属される以下の配列を得る事ができた。

PAO mix プローブ陽性細菌: N_ AO V3-V5 DGGE band6

GB プローブ陽性細菌:

MKW A2O V3-V5 DGGE band 7、 N_ AO V6-V8 DGGE band1、

M_ A2O V6-V8 DGGE band 5、6、M_ AO V6-V8 DGGE band3、4

これらの塩基配列と PAO mix プローブ、GB プローブとの組み合わせを調べたところ、N_ AO V3-V5 DGGE band6 は PAO462、PAO651 プローブとの間にミスマッチは無く、MKW A2O V3-V5 DGGE band 7 と GB プローブとの間にもミスマッチは無かった。プローブの結合部位と解読した塩基配列の領域が重ならないため、これら以外の DGGE バンドについては確認できなかった。

PAO mix プローブ陽性細菌以外で *β*-*proteobacteria* に属する塩基配列としては N_ AO V3-V5 DGGE band2-1、3-1、4、5、6、M_ A2O V3-V5 DGGE band 2、3、4、5、6、M_ AO V6-V8 DGGE band 1-2 から得られた。また、GB プローブ陽性細菌以外で *γ*-*proteobacteria* に属する塩基配列は今回の解析では得られておらず、FISH 解析において試料中での存在が確認されていた *Actinobacteria* に帰属される塩基配列も特定されなかった。

逆に FISH 解析において、密度分離後の試料中では主要な細菌種として検出されなかった *α*-*proteobacteria*(M_ A2O V6-V8 DGGE band2-2、4、M_ V6-V8 DGGE band 2-2)、*Firmicutes*(N_ AO V3-V5 DGGE band 1、2-2、3-2、M_ A2O V3-V5 DGGE

表 6.2.4 塩基配列を特定した DGGE バンドの相同性検索の結果

なお、FISH 法で検出された β -、 γ -、Actinobacteria に帰属される DGGE バンドは色付けで示した。

V3-V5領域解析結果

DGGEバンドの名前		最近縁配列 (Accession No. 配列名 (相同性))	系統学的分類	最近縁単離株 (Accession No. 配列名 (相同性))
N_AO V3-V5 DGGE band	1	AF371932 Uncultured bacterium clone p-4936-6Wb2(100%)	Firmicutes	Y18176 Clostridium disporicum (100%)
	2-1*	DQ232862 Uncultured Thiobacillus sp. clone N37 (100%)	β -proteobacteria	DSP318917 Dechloromonas denitrificans ED1T (98%)
	2-2*	AY985135 Uncultured bacterium clone BB58(100%)	Firmicutes	AY604562 Clostridium bifermentans strain HAW-1(97%)
	3-1*	DSP318917 Dechloromonas denitrificans ED1T (100%)	β -proteobacteria	-
	3-2*	AB185006 Uncultured bacterium geneclone:TH-127(97%)	Firmicutes	AJ251214 Pelospora glutarica strain WoG13.
	4	AY707597 Uncultured organism clone D117(98%)	β -proteobacteria	AY126452 Dechloromonas sp. PC1 (97%)
	5	DSP318917 Dechloromonas denitrificans ED1T (99%)	β -proteobacteria	-
	6	AB231430 Uncultured bacterium gene(99%)	β -proteobacteria	D16209 Rhodocyclus tenuis DSM110 (95%)
	7	AB196116 Uncultured bacterium gene TB127-34	Nitrospirae	NSPY14637 Nitrospira sp.RC14 (99%)
M_A2O V3-V5 DGGE band	1	AF371932 Uncultured bacterium clone p-4936-6Wb2(100%)	Firmicutes	Y18176 Clostridium disporicum (100%)
	2	AB205805 Uncultured bacterium gene for 16S rRNA(100%)	β -proteobacteria	CP000091 Ralstonia eutropha JMP134 (96%)
	3	AY578169 Uncultured Comamonadaceae bacterium clone ID19(96%)	β proteobacteria	AM084011 Acidovorax sp. R-24607(95%)
	4	AF234687 Uncultured sludge bacterium H21 (98%)	β proteobacteria	AM084015 Alicyclophilus sp. R-24604 (97%)
	5	AF170357 Dechloromonas sp. MissR(98%)	β -proteobacteria	-
	6	AJ009455 uncultured bacterium SJA-21 (97%)	β -proteobacteria	D14257 Z.ramigera (96%)
	7	UBA504486 Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene(97%)	γ -proteobacteria	AJ868426.11 Methylocaldum sp. E10a (88%)

V6-V8領域解析結果

DGGEバンドの名前		最近縁配列 (Accession No. 配列名 (相同性))	系統学的分類	最近縁単離株 (Accession No. 配列名 (相同性))
N_AO V6-V8 DGGE band	1	AF193566 Uncultured Clostridium a12r(99%)	Firmicutes	AF191245 Clostridium sp. 48(99%)
	2	AF093781 Uncultured bacterium Band6-426(100%)	γ -proteobacteria	AJ401211 Thiococcus sp. AT2204 (-)**
M_A2O V6-V8 DGGE band	1	AF193566 Uncultured Clostridium a12r(99%)	Firmicutes	AF191245 Clostridium sp. 48(99%)
	2-1*	AY321200 Uncultured bacterium clone SM-OTU11(88%)	OUT-11	unknown
	2-2*	Y13826 Paracoccus solventivorans(99%)	α -proteobacteria	-
	3	AY345504.11 Unidentified bacterium clone W4-B19(91%)	Unknown	AY999963 Methylocaldum szegediense UCM B-3032
	4	AF428713.11 Uncultured bacterium clone CRP99-59 (96%)	α -proteobacteria	BIN563930 Beijerinckia indica subsp. indica ATCC 9039(95%)
	5	AF093781 Uncultured bacterium Band6-426(100%)	γ -proteobacteria	AY298904 Ectothiorhodospinus mongolicum strain M9 (94%)
M_AO V6-V8 DGGE band	6	AF361095.11 Uncultured bacterium clone SBRT185(97%)	γ -proteobacteria	AF170419 Halothiobacillus kellyi BII-1 (95%)
	1-1*	AJ715410 Parachlamydia sp. UV-7(95%)	Firmicutes	-
	1-2*	AF204254 Uncultured beta proteobacterium SBR1022(94%)	β -proteobacteria	AB066262 Thauera sp. DNT-1(94%)
	2-1*	CNS09SAQ Uncultured planctomycete partial CY0ARA032F0(98%)	Planctomycetes	AJ231193 planctomycete str. 563 (90%)
	2-2*	AF452106 Rhodobacter massiliensis (93%)	α -proteobacteria	-
	3	AY098897 uncultured proteobacterium clone SBRL1_22	γ -proteobacteria	AJ401211 Thiococcus sp. AT2204 (-)**
	4	AF093781 Uncultured bacterium Band6-426(100%)	γ -proteobacteria	AY298904 Ectothiorhodospinus mongolicum strain M9 (94%)

*DGGEバンドの番号に-1および-2がついているものは、精製およびcloning法を適用した結果、切り出したDGGEバンドから複数の細菌種が特定されたことを示している。

**単離株との相同性が極めて低い場合には(-)で示した。

band 1、N_ AO V6-V8 DGGE band 1、M_ A2O V6-V8 DGGE band 1、M_ AO V6-V8 DGGE band1-1)、*Nitropirae*(N_ AO V3-V5 DGGE band 7)、*Planctomycetes*(M_ AO V6-V8 DGGE band 2-1)、OUT-11(M_ A2O V6-V8 DGGE band2-1)といったグループに帰属される塩基配列が得られた。

試料中における主要な細菌種であると考えられる β,γ -*proteobacteria* に帰属された塩基配列をもとに作成した系統樹を図 6.2.13 に示す。 β -*proteobacteria* に帰属された塩基配列を大別すると 1. *Dechloromonas-Ferribacterium-Azonexus* lineage、2. *Rhodocyclus-Propionivibrio-Accumulibacter* lineage、3. *Thauera* lineage、4. *Zoogloea* lineage、5. Putative novel β -*proteobacteria*、6. *Comamonas-Acidovorax* lineage の六種類のクラスターから成ることが明らかとなった。

続いて、 β -、 γ -*proteobacteria* に帰属される塩基配列を持つ DGGE バンドのバンドパターンを図 6.2.14 および図 6.2.15 から比較する。DGGE ゲル上では 1、2 レーンを比較することで「処理場間の違い」を、2~4 レーンを比較することで「運転法の違い」を、5~6 レーンを比較することで「バッチ試験時に用いた電子受容体の違い」をそれぞれ比べる事が可能となっている。

なお、V3-V5 領域における N_ AO V3-V5 DGGE band 2、3 と、V6-V8 領域における M_ AO V6-V8 DGGE band 1 からは β -*proteobacteria* に帰属される塩基配列が得られているものの、これらの DGGE バンドからは変成剤濃度勾配を 35-55%に変更した場合に複数の DGGE バンドが得られており、図 6.2.14 における DGGE パターンの変化が β -*proteobacteria* に帰属される塩基配列を持つ細菌種に由来するものであるか不明であったので、これらの DGGE バンドに関しては考察を行わなかった。

また、DGGE パターンを比較する前に注意すべき点は、比較する DGGE バンドが β -、 γ -*proteobacteria* に属する塩基配列を有していたからといって、これらの DGGE バンドが PHA 蓄積細菌に由来していたかは現段階では確認できていないため、あくまで「PHA 蓄積細菌の可能性が高いもの」として認識されるべきである。

V3-V5 領域で DGGE パターンを解析した結果を以下に示す。

- a. (N_ AO V3-V5 DGGE band 4) …*Dechloromonas-Ferribacterium-Azonexus* lineage
に帰属

このバンドは N 処理場 AO 法(1 レーン)、M 処理場 AO 法(2 レーン)から共

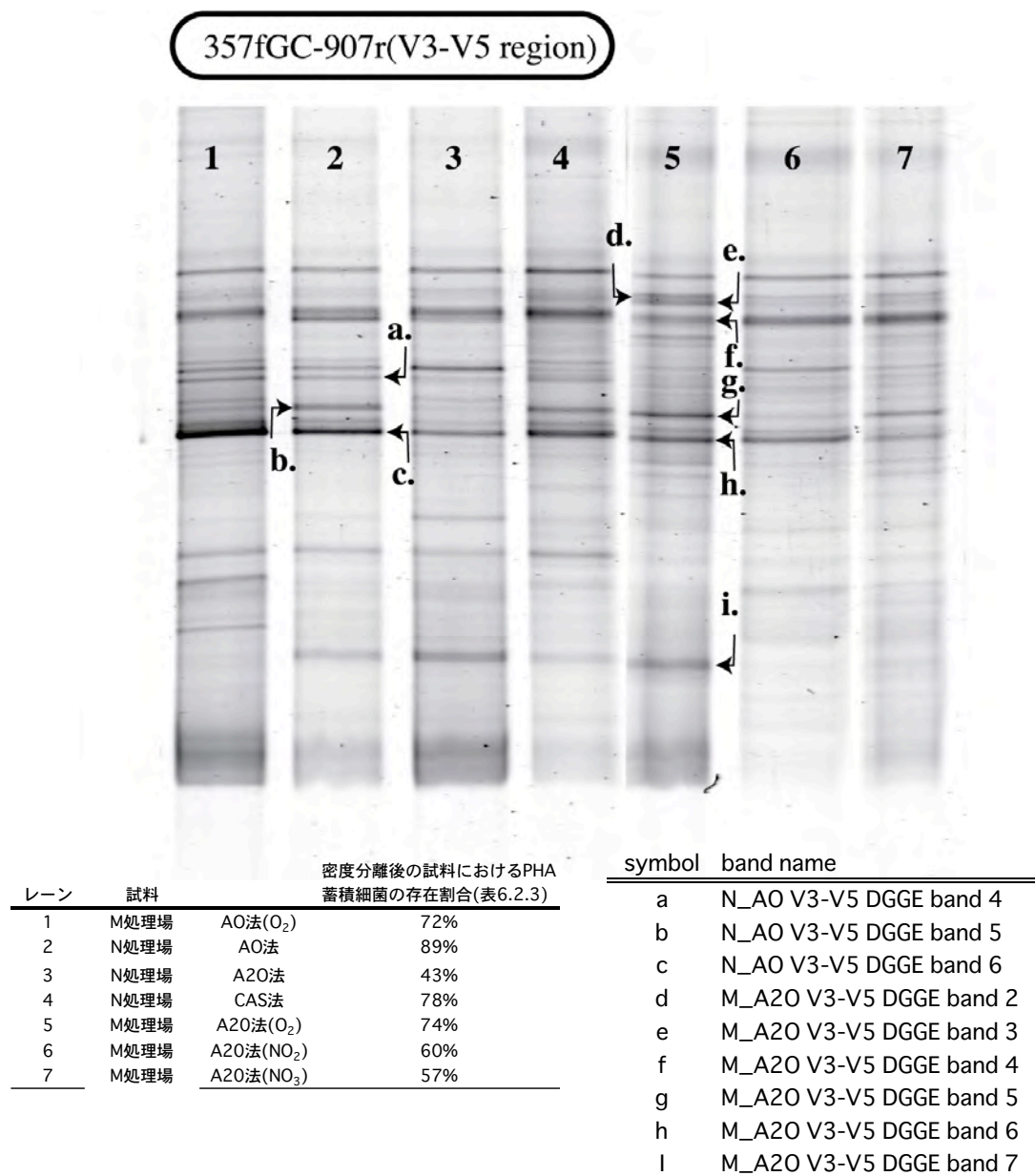


図 6. 2. 14 β -proteobacteria に帰属される塩基配列を持つ DGGE バンドのバンドパターンの比較 (V3-V5 領域)

通して検出されているが、その他のレーンではバンドは確認されないか、輝度が弱いものであった。すなわち、処理場の違いに関係無く AO 法で運転されている反応槽に広く分布する細菌である可能性が示唆される。

b. および g. (N_AO V3-V5 DGGE band5 および M_ V3-V5 DGGE band5)

…Dechloromonas-Ferribacterium-Azonexus lieage に帰属

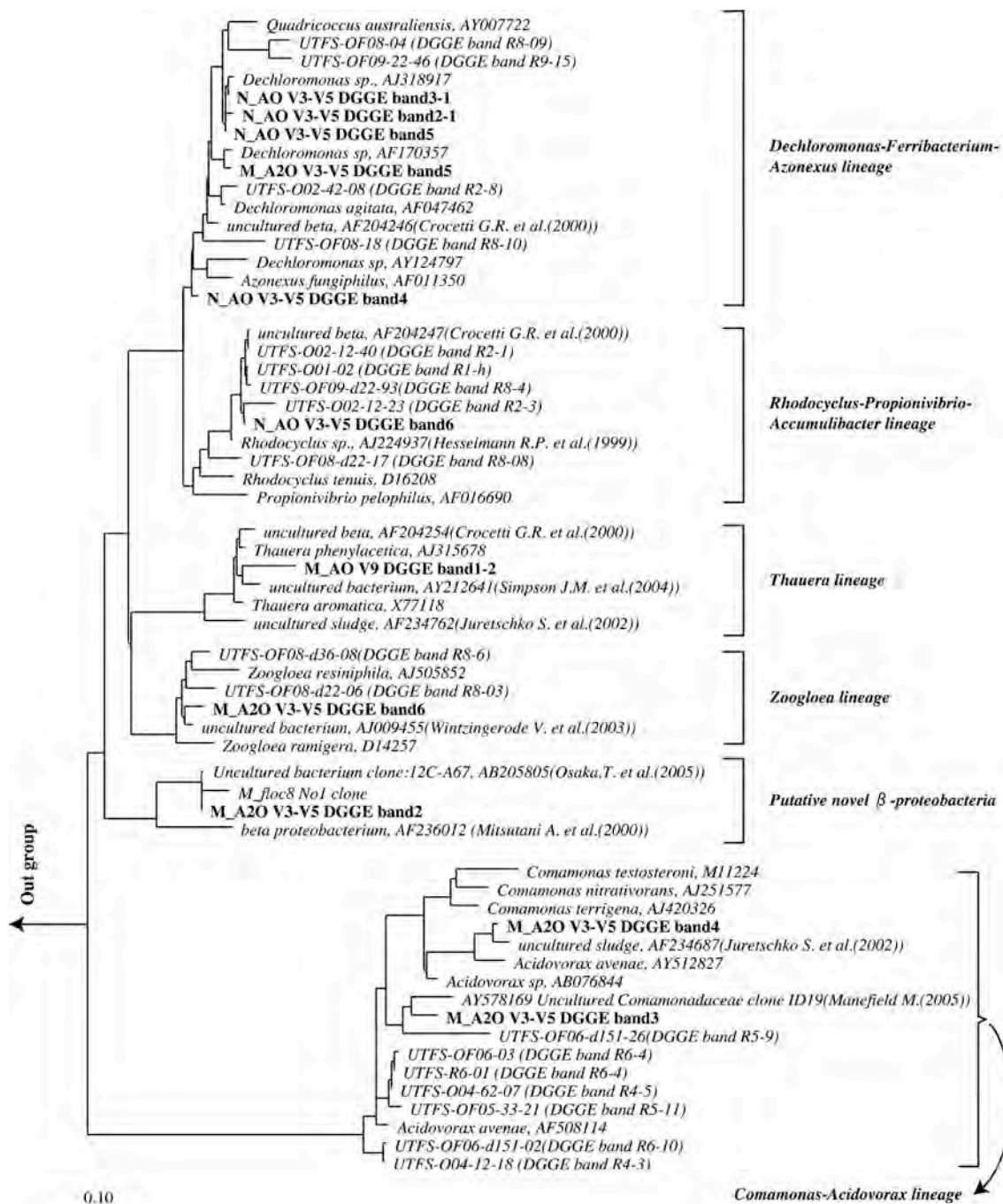


図 6.2.13 β -proteobacteria に帰属された塩基配列をもつ
DGGE バンドを含む β -proteobacteria の系統樹

これらのバンドの位置に明確な DGGE バンドが確認されるのは 2、4、5 および 7 レーンである。これらのレーンの間に明確な関連付けはできず、処理場や運転法の違いにより特異的に出現する細菌種である可能性がある。また、この細菌種は 5、7 レーンで明確に検出されていることから、硝酸を利用した脱窒反応を行う代謝様式を有している可能性が示唆された。

c. および h.(N_ AO V3-V5 DGGE band6 および M_ A2O V3-V5 DGGE band 6)

… Rhodocyclus-Propionivibrio-Accumulibacter lineage および、Zoogloea lineage にそれぞれ帰属

DGGE バンド c.(MKGW AO V3-V5 DGGE band6)からは PAO mix プローブ陽性細菌のグループに帰属する塩基配列が得られており、これは PAO mix プローブ陽性細菌が FISH 法においても検出されていた結果と類似するものであった。しかし、DGGE ゲル上では DGGE バンド c.と 5 レーンの DGGE バンド h.(M_ A2O V3-V5 DGGE band6)は同じ位置に観察されているものの、DGGE バンド h.から検出された塩基配列は PAO mix 陽性細菌とは異なる細菌種 (Zoogloea 属)に帰属される配列であった。

PAO mix プローブ陽性細菌と Zoogloea 属に帰属される塩基配列が同一の位置に DGGE バンドとして検出されてしまっているため、これらの細菌種が処理場、運転法、電子受容体などの違いによりどのような影響を受けているのかを明確に観察することはできなかった。しかし、この位置の DGGE バンドは全てのレーンから観察されていることから、広く分布する細菌種であることが示唆された。

図 6.2.14 の 5~7 レーンの DGGE バンドのパターンから、PAO mix プローブ陽性細菌の電子受容体の利用性に関しては前述の理由により明確に調査できなかったが、PAO mix プローブ陽性細菌の利用する電子受容体および有機物の種類に関しては Kong Y *et al.*(2004)にて詳しい報告があり、彼らは PAO mix プローブ陽性細菌が酢酸を摂取しながら亜硝酸、硝酸を利用する脱窒性呼吸を行えることを証明している。

PAO mix プローブ陽性細菌は、処理場の嫌気槽でリンを放出しながら有機物を PHA の形態で貯蔵し、連続する好気槽で PHA を消費しながらリンを過剰摂取すると考えられている。そのため、好気条件や亜硝酸呼吸、硝酸呼吸を行う環境下では PHA は消費されるものであり、貯蔵されるものではないという考え方が一般的であった。Kong Y *et al.*(2004)の研究では前述した電子受

容体の利用性は調べられているものの、それらの電子受容体存在下で摂取した有機物が PHA の形態で貯蔵されるかは検討しておらず、この点に関する検討はきわめて興味深い。

d. および e. (M_ A2O V3-V5 DGGE band2、3) …Putative novel β -proteobacteria

および、Comamonas-Acidovorax lineage にそれぞれ帰属

これらのバンドが観察された位置には他のレーンでは明確な DGGE バンドを確認することはできなかった。そのため、これらの細菌種は M 処理場 A2O 法の好気槽にのみ特異的に存在し、かつ好気条件下でのみ PHA の蓄積を行う細菌種である可能性が示唆された。

f. (M_ A2O V3-V5 DGGE band4) … Comamonas-Acidovorax lineage に帰属

この位置の DGGE バンドはすべてのレーンから検出されているものの、レーン 2 の位置の DGGE バンドからは Dechloromonas、Clostridium 属に帰属される塩基配列が検出されていることから、この位置の DGGE バンドが処理場、運転法、電子受容体などの違いによりどのような影響を受けているのかを明確に観察することはできなかった。

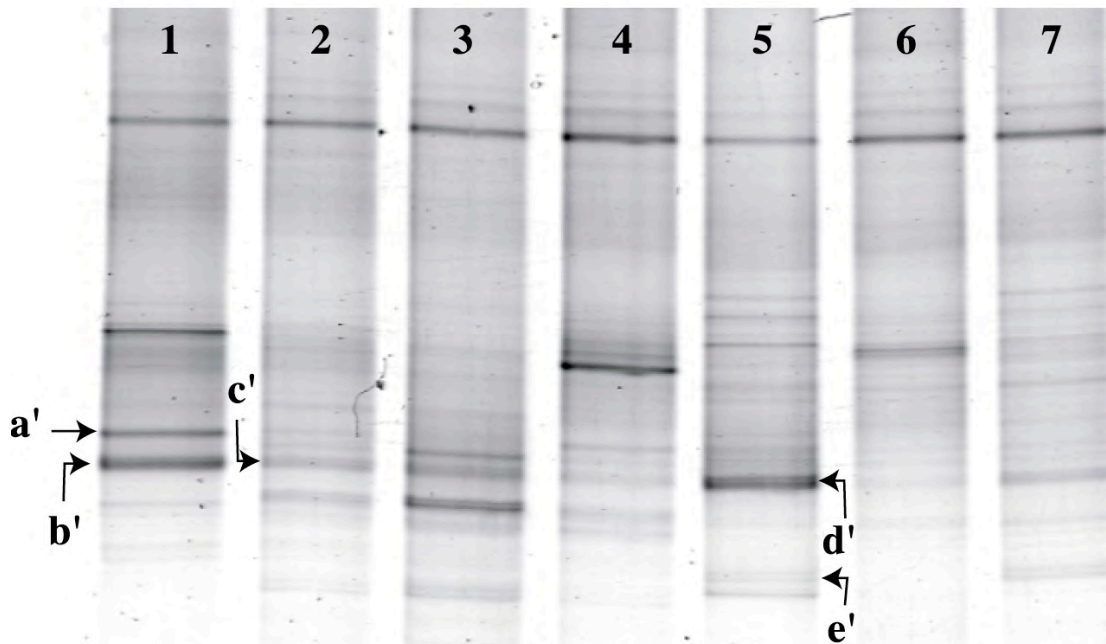
続いて V6-V8 領域で解析した DGGE バンドのバンドパターンの比較を行う(図 6.2.15)。

i. (M_ A2O V3-V5 DGGE band7) …novel γ -proteobacteria に帰属

この位置の DGGE バンドはレーン 2~5 において明確に観察されており、この細菌種は N 処理場では運転法に関係無く検出されているが、M 処理場においては A2O 法では検出されているものの(5 レーン)、AO 法では検出されていない(1 レーン)。また、電子受容体の違いを比較すると好気条件下でのみ検出されていることから、好気条件下で PHA を蓄積する細菌種である可能性が示唆された。

V6-V8 領域の DGGE バンド(a'~e')は全て novel γ -proteobacteria に帰属されている。GB プローブ陽性細菌が属するこの novel γ -proteobacteria 内には広い多様性があることが知られており、subgroup1~7 までは報告されている(Kong Y.H. *et al.*(2002))。DGGE バンド a'~e'の塩基配列を相同性検索し、検索結果中の GB プローブ陽性細菌の中で最も上位に示される塩基配列と、Kong Y.H. *et al.*(2002)の報告している系統樹を比較し、DGGE バンド a'~e'がそれぞれの subgroup に属するのかを推測した。その結果、DGGE バンド a'は subgroup2 に、DGGE バ

968fGC-1392r(V6-V8 region)



レーン	試料	密度分離後の試料におけるPHA蓄積細菌の存在割合(表6.2.3)		symbol	band name
1	M処理場	AO法(O ₂)	72%	a'	M_AO V6-V8 DGGE band 3
2	N処理場	AO法	89%	b'	M_AO V6-V8 DGGE band 4
3	N処理場	A2O法	43%	c'	N_AO V6-V8 DGGE band 2
4	N処理場	CAS法	78%	d'	M_A2O V6-V8 DGGE band 5
5	M処理場	A2O法(O ₂)	74%	e'	M_A2O V6-V8 DGGE band 6
6	M処理場	A2O法(NO ₂)	60%		
7	M処理場	A2O法(NO ₃)	57%		

図 6. 2. 15 γ -proteobacteria に帰属される塩基配列を持つ DGGE バンドのバンドパターンの比較 (V6-V8 領域)

ンド b' と c' は subgroup 4 に、DGGE バンド d' は subgroup 6 に、DGGE バンド e' は subgroup 1 に属すると推測された。

DGGE バンド a' ~ e' の位置の DGGE バンドは、4、6 レーン以外では全てから検出されていることから、subgroup での違いはあるものの、novel γ -proteobacteria に属する GB プローブ陽性細菌が処理場には広く分布していることが確認された。また、DGGE バンド d' と e' は 5、7 レーンから検出されているが、6 レーンからは検出されていない。そのため、硝酸を利用した脱窒素反応を行えるものの、亜硝酸は電子受容体として利用できない細菌種であると推測された。

GB プローブ陽性細菌の利用する電子受容体に関しては Kong Y. *et al.*(online

early issue)によって研究がなされており、彼らは GB プローブ陽性細菌内に存在する subgroup ごとで電子受容体の利用性が異なることを報告している。今回の DGGE 解析において電子受容体の比較が可能なのは 5~7 レーンの DGGE バンド d' と e' であるが、これらの DGGE バンドの塩基配列は相同性検索の結果、それぞれ GB プローブ陽性細菌の subgroup6 と 1 に帰属された。これらの DGGE バンドは 5 と 7 レーン、すなわち好気条件と硝酸が電子受容体として存在する条件下で観察されているが、Kong Y. *et al.*(online early issue)によれば Subgroup6 に帰属される細菌種(DGGE バンド d')は亜硝酸、硝酸を共に利用でき、Subgroup1 に帰属される細菌種(DGGE バンド e')は硝酸のみを電子受容体として利用できることを報告している。よって DGGE バンド d' は 6 レーンにおいても観察されるべきであるが、そのような結果は得られなかった。この原因としては、DGGE バンド d' の細菌種は亜硝酸存在下で酢酸を摂取できたものの、その代謝は好気条件や硝酸条件と比べて活発ではなく、PHA 含有率もそれほど高まらなかったため、密度分離にて分離・濃縮されなかったという仮説が考えられる。しかし、PAO mix プローブ陽性細菌を含め、これらの細菌種がある電子受容体存在下で PHA を蓄積していたかどうかを明言するためには、DGGE のバンドパターンの比較ではなく、FISH 法と Nile blue A の二重染色により確認する必要がある。

DGGE-sequencing 法による解析では、先の FISH 解析では試料中での存在が確認できなかった *α-proteobacteria*、*Firmicutes*、*Nitrospirae*、*Planctomycetes*(M_AO V6-V8 DGGE band 2-1)、OUT-11 といった細菌種に帰属される塩基配列が得られた。DGGE 解析に供した試料において有占していなかったこれらの細菌種が特定された理由としては以下の 4 点が考えられる。それらは、1.試料汚染、2.核酸抽出、3.PCR primer の検出範囲、4.DGGE の解析条件である。

まず、1 に関してであるが、密度分離後に得られる菌体量が少ないため、密度分離の操作過程において生じる試料汚染の影響を受けやすくなってしまうことが上げられる。また、密度分離後に遠心容器の底部に付着した菌体のみを回収するために、上層に分配された菌体を除去する操作を行うが、その際に除去しきれなかった上層の菌体が混入する場合もあり、このような操作においても試料汚染が生じた可能性が考えられる。

2.の核酸抽出の工程であるが、グラム陽性細菌の属する *Actinobacteria* グループに帰属される塩基配列が今回できなかった原因として、核酸抽出がこれらの

細菌種に対して不十分であったことが考えられる。しかし、同じくグラム陽性細菌の属する Firmicutes グループに帰属される塩基配列が今回の解析で得られていることと、今回用いた Fast DNA SPIN kit for Soil によって Actinobacteria グループに属する塩基配列が得られている報告(例えば、Kong Y. *et al.*(2005))がなされていることから考えると、核酸抽出の工程が及ぼした影響が大きいとは考えづらい。

3.の PCR プライマーの検出範囲の問題に関しては、今回用いた PCR プライマーセット 357fGC-907r と 968fGC-1392r の塩基配列(GC クランプ部は除く)の塩基配列と、データベース上にある PAO mix 陽性細菌に帰属される塩基配列あるいは GB プローブ陽性細菌に帰属される塩基配列を用いてアライメントを行い、比較した。

PAO mix 陽性細菌の塩基配列としては(Accession No.:AF204244、AF204245、AF204247、AF204248、AJ224937)を、GB プローブ陽性細菌の配列としては Kong Y.H. *et al.*(2001)の中で用いられていた塩基配列を用いた。ただし、Kong Y.H. *et al.*(2001)の塩基配列の中には、プライマー結合部位の塩基配列を含んでいないものをあり、それらは解析の対象外とした。

まず、PAO mix プローブ陽性細菌におけるアライメントの結果を説明すると、今回解析に用いた塩基配列と 357f、907r、1392r とはパーフェクトマッチを示したものの、968f は全ての塩基配列と 1 ミスマッチを持っていることが明らかとなった(図 6.2.15)。また、GB プローブ陽性細菌においては、907r、1392r に対してはミスマッチがないものの、357f、968f に対しては図 6.2.15 のようなミスマッチが確認された。これらの結果から、今回用いた 357fGC-907r、968fGC-1392r プライマーセットでは活性汚泥中の全ての細菌種の 16S rRNA 遺伝子配列に均一にアニーリングしているとは考えづらく、これらのプライマーセットで得られた結果が試料中の菌叢を完全に反映することは難しいと考えられる。

4.の DGGE の解析条件に関しては、用いた DGGE の泳動条件が不適切であったため、本来観察されるべき DGGE バンドが損なわれてしまった可能性がある。Nielsen A.T. *et al.*(1999)の報告では、適切なバンドパターンを得るためには電気泳動条件を適切に設定する必要があることを報告している。今回我々が用いた泳動条件(V3-V5 領域:130V、7 時間、V6-V8 領域 130V、6 時間)は厳密に泳動条件を検討した結果に設定した値ではないため、少なからずこの要因が及ぼした影響はあるものと考えられる。

968f と PAO mix プローブ陽性細菌

AF204245_Crocetti_G.R._2000_	GCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTT
AF204248_Crocetti_G.R._2000_	GCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTT
AF204244_Crocetti_G.R._2000_	GCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTT
AJ224937_Hesselmann_R.P._1999_	GCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTT
AF204247_Crocetti_G.R._2000_	GCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTT
968f	-----AACGCGAAGAACCTT

AF204245_Crocetti_G.R._2000_	ACCTACCCCTTGACATGTCAGGAATCCTGGAGAGATTGGGAGTGCTCGCA
AF204248_Crocetti_G.R._2000_	ACCTACCCCTTGACATGTCAGGAATCCTGGAGAGATTGGGAGTGCTCGCA
AF204244_Crocetti_G.R._2000_	ACCTACCCCTTGACATGTCAGGAATCCTGGAGAGATTGGGAGTGCTCGCA
AJ224937_Hesselmann_R.P._1999_	ACCTACCCCTTGACATGTCAGGAATCCTGGAGAGATTGGGAGTGCTCGCA
AF204247_Crocetti_G.R._2000_	ACCTACCCCTTGACATGTCAGGAATCCTGGAGAGATTGGGAGTGCTCGCA
968f	AC-----
	**

357f と GB プローブ陽性細菌

gi 24270586 gb AY098897.1	CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGC-ACAAGCCTGA
gi 24270591 gb AY098902.1	CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGC-GCAAGCCTGA
gi 24270587 gb AY098898.1	CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGC-GCAAGCCTGA
gi 19550361 gb AF361096.1	CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGC-GCAACCTGA
gi 19550360 gb AF361095.1	CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGC-GCAAGCCTGA
gi 19550355 gb AF361090.1	CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGC-GCAAGCCTGA
gi 19550354 gb AF361089.1	CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGC-GCAAGCCTGA
gi 19550359 gb AF361094.1	CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGC-GCAAGCCTGA
gi 19550356 gb AF361091.1	CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGC-GCAAGCCTGA
gi 19550358 gb AF361093.1	CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGC-GCAAGCCTGA
gi 19550357 gb AF361092.1	CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGC-GCAAGCCTGA
gi 24270585 gb AY098896.1	CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGC-GCAAGCCTGA
357f	CCTACGGGAGGCAGCAG-----
gi 24270589 gb AY098900.1	CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGC-GCAAGCCTGA
gi 24270600 gb AY098911.1	CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGC-GCAAGCCTGA
gi 24270598 gb AY098909.1	CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGC-GCAAGCCTGA
gi 24270599 gb AY098910.1	CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGC-GCAAGCCTGA
gi 24270595 gb AY098906.1	CNTACGGGAGGCAGCAGNNGGGAATATTGGACAATGGGC-GCAAGCCTGA
gi 24270594 gb AY098905.1	CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGC-GCAAGCCTGA
gi 24270588 gb AY098899.1	CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGC-GCAAGCCTGA
gi 24270602 gb AY098913.1	CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGC-GCAAGCCTGA
gi 24270593 gb AY098904.1	CNTACGGGAGGCAACAGTGGGGAATATTGGACAATGGGC-GCAAGCCTGA
gi 24270597 gb AY098908.1	CCT-CCGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGC-GCATGTCTGA
gi 24270592 gb AY098903.1	CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGC-GCAAGCCTGA
gi 24270596 gb AY098907.1	CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGCCAATGGGC-GCAAGCNTGA
gi 24270601 gb AY098912.1	CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGC-GCAAGCCTGA
	* * * * *

968f と GB プローブ陽性細菌

gi 19550361 gb AF361096.1	GGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGCAGAACCTTACCTGGCCTTG
gi 19550360 gb AF361095.1	GGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGCAGAACCTTACCTGGCCTTG
gi 19550358 gb AF361093.1	GGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGCAGAACCTTACCTGGCCTTG
gi 19550356 gb AF361091.1	GGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGCAGAACCTTACCTGGCCTTG
gi 19550357 gb AF361092.1	GGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGCAGAACCTTACCTGGCCTTG
gi 19550359 gb AF361094.1	GGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGCAGAACCTTACCTGGCCTTG
gi 19550355 gb AF361090.1	GGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGCAGAACCTTACCTGGCCTTG
968f	-----AACGCGAAGAACCTTAC-----

図 6.2.16 今回用いたプライマーの中で PAO mix、GB プローブ陽性細菌に帰属される塩基配列とミスマッチがあるプライマーのアライメント結果

以上の 4 点の要因がそれぞれどの程度結果に影響を及ぼしたのかは定かではないが、FISH 法により検出されていなかった細菌種がこれらの影響により DGGE-sequence 法において検出された可能性が示唆された。

今回の密度分離法と DGGE-sequencing 法を組み合わせた解析により、PHA 蓄積細菌の有力な候補として、 β -proteobacteria で 1.Dechloromonas-Ferribacterium-Azonexus lineage、2.Rhodocyclus-Propionivibrio-Accumulibacter lineage、3. Thauera lineage、4. Zoogloea lineage、5.Putative novel β -proteobacteria、6.Comamonas-Acidovorax lineage のグループに帰属する塩基配列を得る事ができた。これらの細菌種の活性汚泥からの検出例、および PHA 合成能に関して既存の報告を以下にまとめた。

まず、1.Dechloromonas-Ferribacterium-Azonexus lineage に帰属された塩基配列を有する細菌種に関して考察を行う。Dechloromonas 属の PHA 合成能に関しては、これまでのところ単離株を用いては確認されていない(Maszenan A. M. *et al.*(2002))。しかし、Dechloromonas 属に近縁である Quadricoccus australiensis や Ferribacterium 属の単離株からは PHA 蓄積能が確認されていることから(Maszenan A. M. *et al.*(2002))、Dechloromonas 属の中に PHA 蓄積能を有する細菌が存在していてもなんら不思議はない。

また、岡本(2003)はアスパラギン酸を主な炭素源とする SBR リアクターを運転し、リン除去能が良好な際に得られた塩基配列 UTFS-OF08-18(DGGE band R8-10)が Dechloromonas 属に帰属され、この塩基配列をもとに特異的なオリゴヌクレオチドプローブ(OFASPS214、OFASPS1024)を設計、適用したところ、プローブで検出された細菌がポリリン酸は蓄積していないものの、PHA を蓄積していたことを報告している。同時に、岡本は UTFS-OF08-04(DGGE band R8-09)と UTFS-OF09-22-46(DGGE band R9-15)に対しても特異的なオリゴヌクレオチドプローブを設計し、適用しているが、PHA の蓄積を確認する実験は行っており、PHA 蓄積能に関しては未確認である。

Kong Y.H. *et al.*(2001)の報告では、リン除去能が悪化していく過程で Dechloromonas 属に帰属される塩基配列を持つ DGGE バンド(Accession Number:AF170354)を特定しており、この結果から、Dechloromonas 属に近縁な細菌種がリアクター内で有機物の摂取に関与していたことが推測される。

Crocetti G.R. *et al.*(2000)は酢酸を主たる炭素源として運転された SBR リアク

ターのリン除去が良好な時期に採取した活性汚泥試料から作成した clone library(27f-1492r プライマーセットを使用)から *Dechloromonoans* 属に近縁な配列 (Accession Number :AF204246)を検出している。

Zhang T. *et al.*(2005)は酢酸を主たる炭素源として運転する SBR リアクターのリン除去能が良好な系と、悪化した系の両方の活性汚泥試料から clone library(EUB8f-EUB1501r プライマーセットを使用)を作成し、解析したところ、いずれの系においても *Dechloromonas* 属に帰属される塩基配列が全体の約 1 割を占めていたことを報告している。

Ginige M. P. *et al.* (2005)は実下水処理場の活性汚泥から、酢酸を利用する脱窒素細菌を DNA-SIP 法で特定しており、検出された細菌種の中に *Dechloromonas* 属も含まれており、彼らは *Dechloromonas* 属の細菌が実下水処理場において重要な脱窒素細菌であることを報告している。

以上のことから *Dechloromonas* 属に属する細菌種は、窒素やリンなどの栄養塩除去を目的として運転される反応槽の活性汚泥内に幅広く分布する細菌であり、脱窒能を有し、摂取した酢酸から PHA を合成する能力を有する可能性が示唆された。

Thauera lineage に帰属された塩基配列を有する細菌種に関して考察すると、このグループには他に Crocetti G.R. *et al.*(2000)(Accession Number:AF204254)や Juretschko S. *et al.*(2002)(Accession Number:AF234762)により報告された塩基配列が含まれている。

Anders H.J. *et al.*(1995)は *Thauera aromatica* が PHA 蓄積能を有することを報告しているが、*Thauera phenylacetica* に関しては PHA を蓄積するかは不明である (Mechichi T. *et al.*(2002))。

Thauera 属の細菌は脱窒能を有している事が報告されており (Anders H.J. *et al.*(1995))、Juretschko S. *et al.*(2002)は窒素除去を目的とした実下水処理場の活性汚泥内において、*Thauera* 属の細菌が主要な脱窒素細菌であることを示唆している。

以上より、*Thauera* lineage 内に帰属された塩基配列を有する細菌種は脱窒能と PHA 蓄積能を有している事が示唆され、かつ実下水処理場に存在するのではないかと考えられる。

Zoogloea 属に関して考察すると、Juretschko S. *et al.*(2002)の報告によれば、Zoogloea 属の細菌は活性汚泥で脱窒反応を担っていると推測され、窒素除去を主たる目的とする実下水処理場の活性汚泥から Zoogloea 属の細菌が FISH 法により検出されている。

Crocetti G.R. *et al.*(2000)は酢酸を主たる炭素源として運転された SBR リアクターのリン除去が良好な時期に採取した活性汚泥試料から作成した clone library(27f-1492r プライマーセットを使用)から、同様に Dabert P. *et al.*(2001)は酢酸を主たる炭素源として運転された SBR リアクターの活性汚泥試料から作成した clone library(27f-1492r プライマーセットを使用)から、Zoogloea 属に帰属される塩基配列(それぞれ、Accession Number:AF204249、AF314418)を得ている。

岡本(2003)も Zoogloea lineage に帰属される塩基配列 UTFS-OF08-d36-08(DGGE bandR8-6)と UTFS-OF08-d22-06(DGGE bandR8-03))を検出しているが、これらの DGGE バンドとリン除去能とを関連づけることができなかったため、これらの DGGE バンドに由来する細菌種が持つ代謝特性を明らかにすることはできなかった。また、Madison L.L.(1999)によれば Z.ramigera は PHA 蓄積能を有することが報告されている。これらのことから、Zoogloea 属の細菌が脱窒能を有し、実下水処理場に存在する細菌であり、PHA 蓄積能を有している可能性が示唆された。

Putative novel β -proteobacteria においては周囲に近縁な単離株は存在しなかった。しかし、今回検出された塩基配列に最も相同性の高い塩基配列(Accession Number:AB205805 は Osaka *et al.*(2005, Direct submission))によって報告されており、酢酸あるいはメタノールを添加した脱窒リアクターから SIP 法により検出された塩基配列である。また、興味深いことに第五章において micromanipulation を用いて解析した際に得られた塩基配列(M_floc8 No1 clone)も、このクラスターに帰属されている。このグループが PHA 蓄積能を有するかは推測することができないが、その代謝特性を解明することに興味をもたれる。

最後に Comamonas-Acidovorax lineage に関して考察する。Holt *et al.*(1994)によれば、Comamonas 属に属する細菌は絶対好気性の細菌で、発酵を行うための代謝様式を有さない従属栄養細菌であり、PHA 蓄積能を有する事が報告されている。

Fang H. H. P. *et al.*(2002)はリン除去能が低下した際の活性汚泥試料から核酸抽出を行い、16S rRNA 遺伝子の V6-V8 領域について DGGE 法で解析したところ、 α -、 β -、 γ -proteobacteria に帰属される塩基配列を特定しており、これらの細菌がリン除去能低下の原因細菌であると推測し、その細菌種の中には *Comamonas* 属に帰属されるものも報告されている。Liu Y. *et al.*(2005)の報告においても、*Comamonas* 属に近縁な細菌種が検出されており、これらの細菌種が活性汚泥中でリン除去に関与している可能性が示唆されている。

Acidovorax 属に属する細菌種の PHA 蓄積能に関しては生分解性プラスチックの分解菌として詳しく研究がなされているものの(Khan S.T. *et al.*(2002)や Wang Y. *et al.*(2002))、PHA 蓄積能を有しているかどうかは確認されていない。

Melasniemi H. *et al.*(1998)は *Acidovorax* 属に属する単離株をリン除去能が良好あるいは悪化したリアクターのいずれからも検出しており、生物学的リン除去を目的として運転されている実処理場の活性汚泥中に *Acidovorax* 属の細菌が広く存在していることが推測されるが、彼らは PHA 蓄積能の検証を行っていないため、これらの細菌が PHA 蓄積能を有しているかは不明である。

以上のことから、今回特定された細菌が PHA 蓄積能を有しているのか、あるいは活性汚泥中に存在するのかといった疑問に対して明確に結論を下すことは難しいと考えられる。

ここまで説明したように今回の解析では β -proteobacteria に属する PHA 蓄積細菌候補を複数特定することができた。今後はこれらの細菌種に対して特異的なオリゴヌクレオチドプローブが設計、適用され、PHA 蓄積能を有しているかどうかを確認するための実験に興味を持たれる。

6-3 まとめ

本章では密度分離法により PHA 蓄積細菌を活性汚泥から分離・濃縮し、得られた試料に対して 16S rRNA 遺伝子の V3-V5 あるいは V6-V8 領域を標的とした DGGE-sequencing 法を用いて解析し、PHA 蓄積細菌の候補を探索することを目的とした。

まず、密度分離法では全菌に対して PHA 蓄積細菌を最大で 9 割まで分離・濃縮することに成功した。PHA 蓄積細菌を高濃度に含む試料に対して FISH 法を適用したところ、PHA 蓄積細菌は β 、 γ -proteobacteria、Actinobacteria のグルー

プに属する細菌種であることが示唆された。

続いて、DGGE-sequencing 法による解析を行った結果、PAO mix、GB プローブ陽性細菌以外の細菌種として、 β -proteobacteria の 1.Dechloromonas-Ferribacterium-Azonexus lineage、2.Rhodocyclus-Propionivibrio-Accumulibacter lineage、3. Thauera lineage、4. Zoogloea lineage、5.Putative novel β -proteobacteria、6.Comamonas-Acidovorax lineage といったグループに帰属される PHA 蓄積細菌の候補が得られた。これらのグループに属する細菌種には PHA 蓄積能が確認されているものや、活性汚泥からの検出報告がなされているものが含まれていることから、今回得られた PHA 蓄積細菌の候補が PHA 蓄積能を有している可能性は高いと考えられる。

これらの PHA 蓄積細菌の候補となっている DGGE バンドの DGGE バンドのパターンを比較した結果、ある DGGE バンドに関しては処理場や、運転法、あるいは電子受容体の違いに関係せずに観察され、別の DGGE バンドにおいては特定の試料のみから検出された。すなわち、「処理場」、「運転法」、「電子受容体の違い」といった影響に対しては、PHA 蓄積能を有する細菌種それぞれが異なる応答を示しており、PHA 蓄積細菌の群集内でも代謝様式に多様性があることが明らかとなった。

第七章 総括

本章では本研究によって得られた成果と、今後の展望について説明する。

第三章では、実下水処理場より採取した活性汚泥に対して、酢酸を唯一の炭素源として PHA を合成させ、以下の 3 点の要素が PHA 合成能、PHA 転換率に及ぼす影響を比較した: 1. バッチ試験時に用いた電子受容体の違い、2. 同一の下水処理場内において異なる運転法で馴致された活性汚泥、3. 活性汚泥試料を採取した実下水処理場の違いである。

N、K、M 処理場より採取した活性汚泥を用いて実験を行ったところ、電子受容体の違いが PHA 合成能へ及ぼす影響は大きく、活性汚泥の PHA 合成能は好気条件で最も高く、次いで硝酸、亜硝酸、嫌気の順に小さかった。また、電子受容体の違いは PHA 転換率には顕著な影響を及ぼさず、PHA 合成能の場合とは異なり、両者の間に明確な傾向は観察されなかった。2. の異なる運転法で馴致された活性汚泥の有する PHA 合成能を評価したところ、嫌気好気法で馴致された活性汚泥が顕著に高い PHA 合成能を有することはなく、よって運転法の違いが PHA 合成能へ及ぼす影響は小さいと評価された。また、PHA 転換率に及ぼす影響も同様の結果が得られた。最後に異なる実下水処理場から採取した活性汚泥の PHA 合成能を比較した結果、M 処理場の活性汚泥が高い PHA 合成能を示したのに対して、K、N 処理場の活性汚泥の PHA 合成能は低いものであった。また、PHA 転換率の観点から評価すると、K 処理場の活性汚泥の示した PHA 転換率が最も高く、続いて M 処理場、N 処理場という順となった。

これらの結果から、PHA 蓄積能を有する細菌は運転法に関わらず、活性汚泥中にある程度の割合で存在し、処理場間で異なる PHA 蓄積細菌の群集構造が存在することが示唆された。また、バッチ試験に電子受容体として用いた亜硝酸や硝酸を利用した呼吸を行いながら、摂取した有機物を PHA として貯蔵する代謝様式を有する PHA 蓄積細菌の存在が確認された。

第四章では、PHA 染色法である Nile blue A 染色と、全菌染色のために DAPI 染色を用い、活性汚泥中の PHA 蓄積細菌の存在割合を評価することを目指した。これまでに活性汚泥が PHA 合成能を有することは報告されていたが、「活

性汚泥中に存在する何割の細菌がそのような能力を有しているのか？」と、いった基礎的な情報がこれまでに報告されておらず、PHA 蓄積細菌の群集構造を明らかにする第一歩として、この問題を解決することを目指した。

Nile blue A と DAPI の二重染色法を最適化し、実下水処理場、実験室 SBR リアクターの嫌気工程から採取した活性汚泥試料、または実下水処理場の好気槽から採取した活性汚泥に対して酢酸を唯一の炭素源としてバッチ試験を行い、PHA を合成させた後の活性汚泥試料に対して本染色法を適用した結果、活性汚泥中に存在する細菌の約 1 割が PHA 蓄積能を有している事が明らかとなった。

バッチ試験の結果を用いて、1.電子受容体、2.運転法、3.処理場間の違いが全菌中に占める PHA 蓄積細菌の存在割合に及ぼす影響を評価した結果、運転法、処理場の違いが及ぼす影響は顕著に観察されなかった。しかし、バッチ試験に用いる電子受容体の違いが及ぼす影響は大きく、好気条件でバッチ試験を行った際に PHA 蓄積細菌の存在割合は最も大きく(全菌に対して約 1 割)、続いて硝酸、亜硝酸、嫌気の順に存在割合は小さくなった。

第三章では処理場間で異なる PHA 蓄積細菌の群集構造が存在することが示唆されていたが、本章において全菌に占める PHA 蓄積細菌の存在割合を評価したところ、各処理場間で顕著な違いは観察されなかった。これらの結果から、活性汚泥中に占める PHA 蓄積細菌の存在割合は活性汚泥ごとにそれほど違いはないものの、PHA 蓄積細菌の群集構造を構成する細菌種がそれぞれの処理場で異なるのではないかと推測された。

また、PHA 合成能が電子受容体の違いにより大きく影響を受けることを第三章で明らかにしていたが、本章では電子受容体の違いにより PHA 蓄積細菌のポピュレーションサイズも大きく変化することを明らかとした。第三章では、電子受容体の違いが PHA 合成能へ影響を及ぼすことはわかっていたものの、電子受容体の違いにより PHA 蓄積細菌の単位細胞当たりの PHA 合成能が低下したのか、存在する電子受容体を利用できない PHA 蓄積細菌が存在するために PHA 合成能が低下したのかを区別することはできなかった。本章では、PHA 蓄積細菌の中には、ある電子受容体を利用できる細菌と、そうでないものが存在することを観察することができ、この結果から存在する電子受容体を利用できない PHA 蓄積細菌が存在するために活性汚泥の PHA 合成能が低下したということが証明された。

本章では PAO mix、GB プローブを用いた FISH 法を適用し、PHA 蓄積細菌

の群集の中で PAO mix、GB プローブ陽性細菌がどの程度の存在割合を有しているのかも評価した。その結果、好気条件でバッチ試験を行った活性汚泥試料において、PHA 蓄積細菌の約 2 割が PAO mix、GB プローブ陽性細菌であり、処理場や運転法の違いに関係なく幅広く検出されていることから、PAO mix、GB プローブ陽性細菌が活性汚泥中に普遍的に存在する PHA 蓄積細菌であることが示唆された。同時に、PAO mix、GB プローブ陽性細菌以外の細菌で PHA 蓄積能を有するものが活性汚泥中に多く存在することが確認された。

第五章では、活性汚泥中の PHA 蓄積細菌の細菌種を同定するために micromanipulation と分子生物学的手法を組み合わせた手法を適用した。活性汚泥試料に Nile blue A 染色を施した後に、Nile blue A 染色陽性を示す微小フロックを micromanipulation により分取し、その後に分取した細菌の 16S rRNA 遺伝子断片を得るために Nested PCR を行い、塩基配列の解読を行った。系統解析を行った結果、得られた塩基配列は α -、 β -、 γ -proteobacteria、Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides、Gemmatimonadetes、Chloroflexi、Actinobacteria、Firmicutes に帰属することがわかった。得られた塩基配列の中から特異的なオリゴヌクレオチドプローブを作成する候補を半定量 PCR により選択した後に、オリゴヌクレオチドプローブの適用ならびに Nile blue A 染色との二重染色を行った。その結果、オリゴヌクレオチドプローブで検出される細菌も存在するものの、それらの細菌から PHA の蓄積が確認されず、PHA 蓄積細菌の同定には至らなかった。このような失敗に至った原因として試料汚染や PCR バイアスなどが考えられたが、原因の特定には至らなかった。

第六章では、Percoll を用いた密度分離法により活性汚泥中の PHA 蓄積細菌を分離・濃縮し、核酸抽出を行った後に、DGGE-sequencing 法により細菌種の同定を試みた。

実下水処理場の好気槽から採取した活性汚泥に対して、酢酸を唯一の炭素源としたバッチ試験を行い、PHA を合成させた後に密度分離法に供した。密度分離法を行うことにより、分離前には全菌中に約 1 割の存在割合を有していた PHA 蓄積細菌を最大で約 9 割まで分離・濃縮することに成功した。

密度分離後に得られた試料に対して FISH 法を適用したところ、試料中の細菌叢は β -、 γ -proteobacteria、Actinobacteria によって構成されていることが明ら

かとなり、これらのグループに帰属する細菌種が主要な PHA 蓄積細菌であることが強く示唆された。

続いて、密度分離後に得られた試料から核酸抽出を行い、16S rRNA 遺伝子の V3-V5 および V6-V8 領域を PCR 増幅した後に DGGE 解析し、興味のある DGGE バンドの塩基配列の解読を行った。その結果、PAO mix(β -proteobacteria)、GB プローブ(γ -proteobacteria) 陽性細菌に帰属する塩基配列を含め、 β -proteobacteria 内の 1.Dechloromonas-Ferribacterium-Azonexus lineage、2.Rhodocyclus-Propionivibrio-Accumulibacter lineage、3. Thauera lineage、4. Zoogloea lineage、5.Putative novel β -proteobacteria、6.Comamonas-Acidovorax lineage に帰属される塩基配列が得られた。しかし、GB プローブ陽性細菌以外で γ -proteobacteria に帰属される塩基配列、あるいは Actinobacteria に帰属される塩基配列は得ることはできなかった。

今回検出された β -proteobacteria に帰属される 6 種類のグループに属する細菌の活性汚泥からの検出報告ならびに PHA 蓄積能に関して既往の知見から調査したところ、前述した β -proteobacteria 内の 6 種類のグループに帰属される塩基配列を有する細菌が PHA 蓄積能を有している可能性が高いことがわかった。

Actinobacteria に帰属される塩基配列が得られていないことから、DGGE-sequencing 法によって得られた結果が試料中の菌叢を完全に反映していると言えない問題があるものの、DGGE バンドの輝度と因子(処理場の違い、運転帆の違い、バッチ試験時の電子受容体の違い)の関係を評価したところ、DGGE バンドごとで環境因子に対してそれぞれ異なる応答を示したことから、PHA 蓄積能を有する細菌種ごとに異なる代謝様式を有している事が示唆された。また、全ての試料から観察される DGGE バンドもあることから一部の PHA 蓄積細菌は処理場に広く分布している可能性があることも明らかとなった。

一連の実験結果から、PHA 合成能、PHA 転換率および PHA 蓄積細菌の群集構造に及ぼす因子(処理場の違い、運転帆の違い、バッチ試験時の電子受容体の違い)の影響を整理したものを表 7.1.1 に示す。

本研究で得られた成果の利用および今後の展開に関しては以下のように考えられる。まず、本研究では活性汚泥の種類に関係なく、PHA 蓄積細菌の群集が全菌の約 1 割を占めることを明らかにした。これは非常に基礎的な知見である

表 7.1.1 電子受容体・運転法・処理場の違いが PHA 合成能、PHA 転換率
および PHA 蓄積細菌の群集構造へ及ぼす影響の評価

	評価項目			
	第三章の成果		第四章の成果	第六章の成果
	PHA合成能	PHA転換率	PHA蓄積細菌のポピュレーションサイズ	活性汚泥中で活躍するPHA蓄積細菌
1.電子受容体の違い	強(好気>硝酸≒亜硝酸>嫌気)	強 or 弱	強(好気>硝酸>亜硝酸>嫌気)	それぞれの細菌種ごとに異なる影響を受ける
2.運転法の違い	弱	弱	弱	
3.処理場の違い	強(三河島>小菅≒中川)	強(小菅>三河島>中川)	弱	

がこれまでに実験で明らかにされておらず、本研究において初めて報告されるものである。今後はこの値を用いて ASM3 の計算を行い、ASM3 の妥当性や改善点に関して考察すべきであろう。

また、本研究では PAO mix、GB プローブ陽性細菌以外の細菌種が活性汚泥中で PHA を蓄積しており、その存在割合が比較的大きいことを明らかにした。また、この細菌種は β -、 γ -proteobacteria および Actinobacteria に属する可能性が高いことを密度分離法と FISH 法により明らかにした。今後、期待される研究の方向性であるが、まず第六章において PHA 蓄積細菌の候補として上げられた六種類のグループに帰属する細菌種が、活性汚泥試料中で PHA を蓄積しているかを特異的なオリゴヌクレオチドプローブの適用によって確認する必要がある。続いて、特定した細菌種が生物学的リン除去プロセスにおいてポリリン酸蓄積細菌と競合する細菌種であるのかを確認し、重要な細菌種である場合にはその動態をモニタリングする手法を考案すべきである。

今回の研究では個々の細菌種の PHA 合成能は評価することができなかったが、今後は個々の細菌種の PHA 合成能に注目した研究にも興味を持たれる。

今回の研究では活性汚泥における PHA 蓄積細菌群集の基礎的知見が主な仕事であったが、今後は上に述べたような研究がなされることにより活性汚泥における PHA 蓄積細菌の網羅的な解析が進められることに期待する。

参考文献(英語)

- Ahn J., Daidou T., Tsuneda S. and Hirata A.** 2002. Characterization of Denitrifying Phosphate-Accumulating Organisms Cultivated under Different Electron Acceptor Conditions Using Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient gel Electrophoresis Assay. *Water Res.* **36**:403-412.
- Altschul S.F. , Madden T.L. , Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. and Lipman D.J..** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new Generation of Protein Database Search Programs. *Nucleic Acid Research.* **25(17)**:3389-3402.
- Amann, R.** 1995. In situ identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. *Molecular Ecology Manual.* **3.3.6**:1-15.
- Amann R.I., Ludwig W. and Schleifer KH.** 1995. Phylogenetic Identification and InSitu Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *MICROBIOLOGICAL REVIEWS.* **59(1)**:143-169.
- Amersham Biosciences.** 2002. Data file cell separation ``Redigrad, Percoll and Density Marker Beads''. **18-1156-33**:1-4.
- Anders H.J., Kaetzke A., Kampfer P., Ludwig W. and Fuchs G.** 1995. Taxonomic Position of Aromatic-Degrading Denitrifying Pseudomonad Strains K172 and KB740 and Their Description as New Members of the Genera Thauera, as Thauera Aromatica sp. nov., and Azoarcus, as Azoarcus Evansii sp. nov., Respectively, Members of the Beta Subclass of the Proteobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol..* **45(2)** :327-333.
- Babel W. and Breuer U.** 2003. Entwicklung Eines Innovativen Biotechnologischen Verfahrens zur Herstellung Bioabbaubarer Polymere Durch Erstmaligen Einsatz Rekombinanter Hefen. Abschlussbericht zum DBU-Forschungsprojekt Az: 13048. ISBN:0948-9452.
- Beccari M., Dionisi D., Giuliani A., Majone M. and Ramadori R.** 2002. Effect of different CARBON SOURCES on aerobic storage by activated sludge. *Water Sci. Technol.* **45(6)**:157-168.
- Beer M., Kong Y.H. and Seviour R.J.** 2004. Are Some Putative Glycogen Accumulating Organisms (GAO) in Anaerobic : Aerobic Activated Sludge Systems Members of the a-Proteobacteria?. *Microbiology.* **150**:2267-2275.
- Blackall L.L.** 1994. Molecular identification of activated sludge forming bacteria. *Water Sci. Technol.* **29**:35-42.
- Blattner F., Plunkett G., Bloch C., Perna N., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J., Rode C., Mayhew G., Gregor J., Davis N., Kirkpatrick H., Goeden M., Rose D., Mau B. and Shao Y.** 1997. The Complete Genome Sequence of Escherichia Coli K-12. *Science.* **277(5331)**:1453-1474.
- Bond P.L., Hugenholtz P., Keller J. and Blackall L.L.** 1995. Bacterial Community Structures of Phosphate-Removing and Non-Phosphate-Removing Activated Sludges from Sequencing Batch Reactors.

Appl. Environ. Microbiol. **61**(5):1910-1916.

Brdjanovic D., Slamet A., Van Loosdrecht M.C.M., Hooijmans C.M., Alaerts G.J. and Heijnen J.J. 1998. Impact of excessive aeration on biological phosphorus removal from wastewater. *Water Res.* **32**(1):200-208.

Carucci A., Dionisi D., Majone M., Rolle E. and Smurra P. 2001. AEROBIC STORAGE BY ACTIVATED SLUDGE ON REAL WASTEWATER. *Water Res.* **35**(16):3833-3844.

Chinwetkitvanich S., Randall C.W. and Panswad T. 2004. Effects of Phosphorus Limitation and Temperature on PHA Production in Activated Sludge. **50**(8):135-143.

Christensson M., Blackall L.L. and Welander T. 1998. Metabolic Transformations and Characterisation of the Sludge Community in an Enhanced Biological Phosphorus Removal System. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**:226-234.

Chua A.S.M., Takabatake H., Satoh H. and Mino T. 2003. Production of Polyhydroxyalkanoates (PHA) by Activated Sludge Treating Municipal Wastewater: Effect of pH, Sludge Retention Time (SRT), and Acetate Concentration in Influent. *Water Res.* **37**:3602-3611.

Cole J.R., Chai B., Farris R.J., Wang Q., Kulam S.A., McGarrell D.M., Garrity G.M. and Tiedje J.M. 2005. The Ribosomal Database Project (RDP-II): Sequences and Tools for High-Throughput rRNA Analysis. *Nucleic Acid Research.* **33**:D294-296.

Corless C.E., Guiver M., Borrow R., EDWARDS-JONES V., Kaczmarek E.B. and Fox A.J. 2000. Contamination and Sensitivity Issues with a Real-Time Universal 16S rRNA PCR. **38**(5):1747-1752.

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 Quantitation. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(3):1175-1182.

Crocetti G.R., Banfield J.F., Keller J., Bond P.L. and Blackall L.L. 2002. Glycogen-Accumulating Organisms in Laboratory-Scale and Full-Scale Wastewater Treatment Processes. *Microbiology.* **148**:3353-3364.

Dabert P., Sialve B., Delgenes J.P., Moletta R. and Godon J.J. 2001. Characterisation of the Microbial 16S rDNA Diversity of an Aerobic Phosphorus-Removal Ecosystem and Monitoring of its Transition to Nitrate Respiration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**:500-509.

Daims, H. and Bruhl, A. and Amann, R. and 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. *System Appl. Microbiol.* **22**:434-444.

Dammel E.E. and Schroeder E.D. 1991. Density of activated sludge solids. *Water Res.* **25**(7):841-846.

Dawes E.A. and Senior P.J. 1973. The Role and Regulation of Energy Reserve Polymers in Micro-

Organisms. Adv. Microb. Physiol. **10**:135-266.

Falvo A., Levantesi C., Rossetti S., Seviour R.J. and Tandoi V. 2001. Synthesis of Intracellular Storage Polymers by *Amaricoccus Kaplicensis*, a Tetrad Forming Bacterium Present in Activated Sludge. **91**:299-305.

Fang H.H.P., Zhang T. and Liu Y. 2002. Characterization of an Acetate-Degrading Sludge without Intracellular Accumulation of Polyphosphate and Glycogen. Water Res. **36**:3211-3218.

Friedberg I. and Avigad G. 1968. Structures Containing Polyphosphate in *Micrococcus Lysodeikticus*. J. Bacteriol. **96**(2):544-553.

Friedrich U., Naismith M.M., Altendorf K. and Lipski A. 1999. Community Analysis of Biofilters Using Fluorescence in situ Hybridization Including a new Probe for the *Xanthomonas* Branch of the Class Proteobacteria. Appl. Environ. Microbiol. **65**(8):3547-3554.

J. Frohlich and H. Konig. 1999. Rapid isolation of single microbial cells from mixed natural and laboratory populations with the aid of a micromanipulator. Sytem. Appl. Microbiol. **22**:249-257.

FROSTEGARD A., Courtois S., Ramisse V., Clerc S., Bernillon D., Gall F.L., Jeannin P., Nesme X. and Simonet P. 1999. Quantification of Bias Related to the Extraction of DNA Directly from Soils. Appl. Environ. Microbiol. **65**(12):5409+5420.

Fuchs B.M., GLOCKNER F.O., Wulf J. and Amann R. 2000. Unlabeled Helper Oligonucleotides Increase the In Situ Accessibility to 16S rRNA of Fluorescently Labeled Oligonucleotide Probes. Appl. Environ. Microbiol. **66**(8):3603-3607.

Ginige M.P., Hugenholtz P., Daims H., Wagner M., Keller J. and Blackall L.L. 2004. Use of Stable-Isotope Probing, Full-Cycle rRNA Analysis, and Fluorescence In Situ Hybridization-Microautoradiography To Study a Methanol-Fed Denitrifying Microbial Community. Appl. Environ. Microbiol. **70**(1):588-596.

Ginige M.P., Keller J. and Blackall L.L. 2005. Investigation of an Acetate-Fed Denitrifying Microbial Community by Stable Isotope Probing, Full-Cycle rRNA Analysis, and Fluorescent In Situ Hybridization-Microautoradiography. Appl. Environ. Microbiol. **71**(12):883-8691.

Goto M., Ando S., Hachisuka Y. and Yoneyama T. 2005. Contamination of Diverse nifH and nifH-Like DNA Into Commercial PCR Primers. FEMS Microbiol. Lett. **246**:33-38.

Guerrero R., Mas J. and Pedros-Alio C. 1984. Buoyant density changes due to intracellular content of sulfur in *Chromatium warmingii* and *Chromatium vinosum*. Arch. Microbiol. **137**:350-356.

Gumaelius L., Magnusson G., Pettersson B. and Dalhammar G. 2001. *Comamonas Denitrificans* sp. nov., an Efficient Denitrifying Bacterium Isolated from Activated Sludge. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **51**:999-1006.

- Hai T., Lange D., Rabus R. and Steinbuchel A.** 2004. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Accumulation in Sulfate-Reducing Bacteria and Identification of a Class III PHA Synthase (PhaEC) in *Desulfococcus Multivorans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70(8)**:4440-4448.
- Hai T., Hein S. and Steinbuchel.** 2001. A. Multiple Evidence for Widespread and General Occurrence of Type-III PHA Synthases in Cyanobacteria and Molecular Characterization of the PHA Synthases from Two Thermophilic Cyanobacteria : *Chlorogloeopsis Fritschii* PCC 6912 and *Synechococcus* sp. Strain MA19. *Microbiology.* **147**:3047-3060.
- Hesselmann R.P., Werlen C., Hahn D., Roelof van Der Meer J. and Zhender 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**:454-485.
- Madison L.L. and Huisman G.W.** 1999. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS.* **63(1)**:21-53.
- Jorand F., Zartarian F., Thomas F., Block J.C., Bottero I.J.Y., Villemain G., Urbain V. and Manem J.** 1995. Chemical and Structural (2D) Linkage between Bacteria within Activated Sludge Flocs. *Water Res.* **29(7)**:1639-1647.
- Juretschko S., Loy A., Lehner A. and Wagner M.** 2002. The Microbial Community Composition of a Nitrifying-Denitrifying Activated Sludge from an Industrial Sewage Treatment Plant Analyzed by the Full-Cycle rRNA Approach. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**:84-99.
- Khammar N., Malhautier L., Degrange V., Lensi R. and Fanlo J.L.** 2004. Evaluation of Dispersion Methods for Enumeration of Microorganisms from Peat and Activated Carbon Biofilters Treating Volatile Organic Compounds. *Chemosphere.* **54**:243-254.
- Khan S.T., Horiba Y., Yamamoto M. and Hiraishi A.** 2002. Members of the Family Comamonadaceae as Primary Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate)-Degrading Denitrifiers in Activated Sludge as Revealed by a Polyphasic Approach. *Appl. Environ. Microbiol.* **68(7)**:3206-3214.
- Kitamura S. and Doi Y.** 1994. Staining method of poly(3-hydroxyalkanoic acids) producing bacteria by Nile blue. *Biotechnology techniques.* **8(5)**:345-350.
- Kondo T., Ebie Y., Tuneda S., Hirata A. and Inamori Y.** 2005. Characterization of active members in EBPR process by using MAR-FISH combined with buoyant density separation. 4th IWA Activated Sludge Population Dynamics Specialist Conference (July, 2005) Gold coast, Australia.
- Kong Y.H., Beer M., Seviour R.J., LINDREA K. and Rees G.N.** 2001. Structure and Functional Analysis of the Microbial Community in an Aerobic: Anaerobic Sequencing Batch Reactor (SBR) with no Phosphorus Removal. *Syst. Appl. Microbiol.* **24**:597-609.
- Kong Y.H., Beer M., Rees G.N. and Seviour R.J.** 2002. Functional Analysis of Microbial Communities

in Aerobic-Anaerobic Sequencing Batch Reactors fed with Different Phosphorus/Carbon (P/C) Ratios. *Microbiology*. **148**:2299-2307.

Kong Y.H., Ong S.L.O., Ng W.J. and Liu WT. 2002 Diversity and Distribution of a Deeply Branched Novel Proteobacterial Group Found in Anaerobic--Aerobic Activated Sludge Processes. *Environ. Microbiol.* **4(11)**:753-757.

Kong Y., Nielsen J.L. and Nielsen P.H. 2004. Microautoradiographic Study of Rhodocyclus-Related Polyphosphate- Accumulating Bacteria in Full-Scale Enhanced Biological Phosphorus Removal Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **70(9)**:5383-5390.

Kong Y., Nielsen J.L. and Nielsen P.H. 2005. Identity and Ecophysiology of Uncultured Actinobacterial Polyphosphate-Accumulating Organisms in Full-Scale Enhanced Biological Phosphorus Removal Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **71(1)**:4076-4085.

Kong Y., Xia Y., Nielsen J.L. and Nielsen P.H. 2006. Ecophysiology of a Group of Uncultured Gammaproteobacterial Glycogen-Accumulating Organisms in Full-Scale Enhanced Biological Phosphorus Removal Wastewater Treatment Plants. *Environ. Microbiol.* Online early issue.

Kowalchuk G.A., Stephen J.R., Boer D.B., Prosser J.I., Embley T.M. and Woldendorp J.W. 1997. Analysis of Ammonia-Oxidizing Bacteria of the Subdivision of the Class Proteobacteria in Coastal Sand Dunes by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Sequencing of PCR-Amplified 16S Ribosomal DNA Fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* **63(4)**:1489-1497.

Holtand J.G., Krieg N.R., Sneath P.H., Staley J.T. and Williams S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th Edition. The Williams & Wilkins Co.

Lane D.J. 1996. 16S/23S rRNA Sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. **6**:115-175.

Lee S.Y. 1996. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*. **49**:1-14.

Lemos P.C., Serafim L.S. and Reis M.A.M. 2004. Polyhydroxyalkanoates Production by Activated Sludge in a SBR Using Acetate and Propionate as Carbon Sources. *Water Sci. Technol.* **50(10)**:189-194.

Lindahl V. 1996. Improved Soil Dispersion Procedures for Total Bacterial Counts, Extraction of Indigenous Bacteria and Cell Survival. *J. Microbiol. Methods*. **25**:279-286.

Liu WT., Marsh T.I., Cheng H. and Forney L.J. 1997. Characterization of Microbial Diversity by Determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of Genes Encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63(11)**:4516-4522.

Liu WT., 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**:110-122.

Liu WT., Mino T., Matsuo T. and Nakamura K. 2000. Isolation, characterization and identification of

polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria from activated sludge. *J. Bioscience and Bioengineering*. **90**(5):494-500.

Liu WT, Linning K.D., Nakamura K., Mino T., Matsuo T. and Forney L.J. 2000. Microbial Community Changes in Biological Phosphate-Removal Systems on Altering Sludge Phosphorus Content. **146**:1099-1107.

Liu WT., Mino T., NAKAMURA K. and Matsuo T. 1996. GLYCOGEN ACCUMULATING POPULATION AND ITS ANAEROBIC SUBSTRATE UPTAKE IN ANAEROBIC-AEROBIC ACTIVATED SLUDGE WITHOUT BIOLOGICAL PHOSPHORUS REMOVAL. *Water Res.* **30**(1):75-82.

Liu Y., Zhang T. and Fang H.H.P. 2005. Microbial Community Analysis and Performance of a Phosphate-Removing Activated Sludge. *Bioresource and Technology*. **96**:1205-1214.

Ludwig, W., O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, A. Buchner, T., Lai, S. Steppi, G. Jobb, W. Fo'rster, I. Brettske, S. Gerber, A. W. Ginhart, O., Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. Ko'nig, T. Liss, R. Lu" mann, M., May, B. Nonhoff, B. Reichel, R. Strehlow, A. P. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode, and K.-H. Schleifer. 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* **32**:1363–1371.

Lunau M., Lemke A., Walther K., Martens-Habbena W. and Simon M. 2005. An Improved Method for Counting Bacteria from Sediments and Turbid Environments by Epifluorescence Microscopy. *Environ. Microbiol.* **7**(7):961-969

Madigan M.T., Martinko J.M. and Parker J. Brock biology of microorganisms 10th edition. Prentice hall.

Madison L.L. and Huisman G.W. 1999. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. **63**(1):21-53.

Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M. and Schleifer K.H. 1992. Phylogenetic Oligodeoxynucleotide Probes for the Major Subclasses of Proteobacteria: Problems and Solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**:593-600.

Mas J., PEDR6S-ALI C. and Guerrero R. 1985. Mathematical Model for Determining the Effects of Intracytoplasmic Inclusions on Volume and Density of Microorganisms. *J. Bacteriol.* **164**(2):749-756.

Maszenan A.M., Seviour R.J., Patel B.K.C. and Schumann P. 2002. *Quadricoccus Australiensis* gen. nov., sp. nov., a beta-Proteobacterium from Activated Sludge Biomass . *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:223-228.

Matias V.R.F., Cammarota M.C. and Sant'Anna Jr. G.L. 2003. Extraction of Activated Sludge Bacteria Exopolymers by Ultrasonication. *Biotechnology Letters*. **25**:1351-1356.

- McMahon K.D., Dojka M.A., Pace N.R., Jenkins D. and Keasling J.D.** 2002. Polyphosphate Kinase from Activated Sludge Performing Enhanced Biological Phosphorus Removal. *Appl. Environ. Microbiol.* **68(10)**:4971-4978.
- Mechichi T., Stackebrandt E., Gad'on N. and Fuchs G.** 2002. Phylogenetic and Metabolic Diversity of Bacteria Degrading Aromatic Compounds under Denitrifying Conditions, and Description of *Thauera Phenylacetica* sp. nov., *Thauera Aminoaromatica* sp. nov., and *Azoarcus Buckeli* sp. nov.. *Arch. Microbiol.* **178(1)**:26-35.
- Meier H., Amann R., Ludwig W. and Schleifer K.H.** 1999. Specific Oligonucleotide Probes for in situ Detection of a Major Group of Gram-Positive Bacteria with Low DNA G+C Content. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**:186-196.
- Melasniemi H., Hernesmaa A., Pauli AS-L., Rantanen P. and Salkinoja-Salonen M.** 1998. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **21**:300-306.
- Miller D.N., Bryant J.E., Madsen E.L. and Ghiorse W.C.** 1999. Evaluation and Optimization of DNA Extraction and Purification Procedures for Soil and Sediment Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **65(11)**:4715-4724.
- Mino T.** 2000. Microbial Selection of Polyphosphate-Accumulating Bacteria in Activated Sludge Wastewater Treatment Processes for Enhanced Biological Phosphate Removal. *Biochemistry(Moscow).* **65(3)**:341-348.
- Mueller J.A., Morand J. and Boyle W.C.** 1967. Flocc sizing techniques. *Appl. Microbiol.* **15** :125-134.
- Muyzer G., Waal I.E.C.D. and Uitertlinden 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(3)**:695-700.
- Myers R.M., Fischer S.G., Lermani L.S. and Maniatis T.** 1985. Nearly all Single Base Substitutions in DNA Fragments Joined to a GC-Clamp can be Detected by Denaturing Gradient gel Electrophoresis. *Nucleic Acids Research.* **13(9)**:2131-3145.
- Nakamura K., Masuda K. and Mikami E.** 1991. Isolation of a New Type of Polyphosphate Accumulating Bacterium and Its Phosphate Removal Characteristics. *J. Fermentation and Bioengineering.* **71(4)**:258-263.
- Nickerson E.A. and Senior P.J.** 1973. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* **10**:135-266.
- Nickerson K.W.** 1982. Purification of Poly-beta-hydroxybutyrate by density gradient centrifugation in sodium bromide. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**:1208-1209.
- Nielsen A.T., Liu W.T., Filipe C., Grady JR. L., Molin S. and Stahl D.A.** 1999. Identification of a

Novel Group of Bacteria in Sludge from a Deteriorated Biological Phosphorus Removal Reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(3):1251-1258.

Nishino T., Nayak B.B. and Kogure K. 2003. Density-dependent sorting of physiologically different cells of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(6):3569-3572.

Oehmen A., Vives M. T., Lu H., Yuan Z. and Keller J. 2005. The Effect of pH on the Competition between Polyphosphate-Accumulating Organisms and Glycogen-Accumulating Organisms. *Water. Res.* **39**:3727-3737.

Oehmen A., Yuan Z., Blackall L.L. and Keller J. 2004. Short-Term Effects of Carbon Source on the Competition of Polyphosphate Accumulating Organisms and Glycogen Accumulating Organisms. *Water Sci. Technol.* **50**(10):139-144.

Ostle A.G. and Holt J.G. 1982. Nile Blue A as a Fluorescent Stain for Poly-3- Hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**(1):238-241.

Pedros-Alio C., Mas J. and Guerrero R. 1985. The influence of poly- β -hydroxybutyrate accumulating on cell volume and buoyant density in *Alcaligenes eutrophus*. *Arch. Microbiol.* **143**:178-184.

Roller C., Wagner M., Amann R., Ludwig W. and Schleifer KH. 1994. In situ probing of gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology.* **140**:2849-2858.

Rossen L., Norskov P., Hoimstrom K. and Rasmussen O.F. 1992. Inhibition of PCR by Components of Food Samples, Microbial Diagnostic Assays and DNA-Extraction Solutions. *Int. J. Food. Microbiol.* **17**:37-45.

Salhani N. and Uelker-Deffur A. 1998. Improved Quantification of Aggregated Bacteria by Combined Enzymatic and Mechanical Treatment of Flocs and Biofilm from a Rotating Drum Bioreactor. *Water Res.* **32**(4):1287-1295.

Scherer P. 1983. Separation of bacteria from a methanogenic waste water population by utilizing a self-generating Percoll gradient. *J. Appl. Bacteriol.* **55**:481-486.

Schmalenberger A., Schwieger F. and Tebbe C.C. 2001. Effect of Primers Hybridizing to Different Evolutionarily Conserved Regions of the Small-Subunit rRNA Gene in PCR-Based Microbial Community Analyses and Genetic Profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(8):3557-3563.

Schuler A.J., Onuki M., Satoh H. and Mino T. 2002. Density separation and molecular methods to characterize enhanced biological phosphorus removal system populations. *Water Sci. Technol.* **46**(1-2):195-198.

Seviour R.J., Mino T. and Onuki M. 2003. The Microbiology of Biological Phosphorus Removal in Activated Sludge Systems. *FEMS. Microbiol. Review.* **27**:99-127.

- Sheu DS., Wang YT. and Lee CY.** 2000. Rapid Detection of Polyhydroxyalkanoate-Accumulating Bacteria Isolated from the Environment by Colony PCR. **146**:2019-2025.
- Shintani T., Liu WT., Hanada S., Kamagata Y., Miyaoka S., Suzuki T. and Nakamura K.** 2000. *Micropruina Glycogenica* gen. nov., sp. nov., a new Gram-Positive Glycogen-Accumulating Bacterium Isolated from Activated Sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:201-207.
- Snaird J., Beimfohr C., Levantesi C., Rossetti S., van der Waarde J., Geurkink B., Eikelboom D., Lemaitre M. and Tandoi V.** 2002. Phylogenetic analysis and in situ identification of "Nostocoida limicola" -like filamentous bacteria in activated sludge from industrial wastewater treatment plants. *Water. Sci. Technol.* **46(1-2)**:99-104.
- Solaiman D.K.Y., Ashby R.D. and Foglia T.A.** 2000. Rapid and Specific Identification of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate Synthase Gene by Polymerase Chain Reaction. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**:690-694.
- Suresh N., Warburg R., Timmerman M., Wells J., Coccia M., Roberts M.F. and Halvorson H.** 1985. New Strategies for the Isolation of Microorganisms Responsible for Phosphate Accumulation.. *Water Sci. Technol.* **17**:99-111.
- Thomsen T.R., Nielsen J.L., Ramsing N.B. and Nielsen P.H.** 2004. Micromanipulation and Further Identification of FISH- Labelled Microcolonies of a Dominant Denitrifying Bacterium in Activated Sludge. *Environ. Microbiol.* **6(5)**:470-479.
- URBAN V. and Block J.C. and Manem J.** 1993. BIOFLOCCULATION IN ACTIVATED SLUDGE: AN ANALYTIC APPROACH. *Water Res.* **27(5)**:829-838.
- Wagner M. and Loy A.** 2002. Bacterial Community Composition and Function in Sewage Treatment Systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**:218-227.
- Wang Y., Inagawa Y., Saito T., Kasuya K., Doi Y. and Inoue Y.** 2002. Enzymatic Hydrolysis of Bacterial Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate)s by Poly(3-hydroxyalkanoate) Depolymerase from *Acidovorax* Sp.TP4. *Macromolecules.* **3**:828-834.
- Weller R., Glockner F. and Amann R.** 2000. 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes for the in situ Detection of Members of the Phylum Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides.. *Syst. Appl. Microbiol.* **23(1)**:107-114.
- Wong M.T., Tan F.M, Ng W.J. and Liu WT.** 2004. Identification and Occurrence of Tetrad-Forming Alphaproteobacteria in Anaerobic-Aerobic Activated Sludge Processes. *Microbiology.* **150**:3741-3748.
- Wong M.T., Mino T., Seviour R.J., Onukib M. and Liu WT.** 2005. In situ Identification and Characterization of the Microbial Community Structure of Full-Scale Enhanced Biological Phosphorous Removal Plants in Japan. *Water Res.* **39**:2901-2914.

- Wu HA, Sheu DS. and Lee CY.** 2003. Rapid Differentiation between Short-Chain-Length and Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate-Accumulating Bacteria with Spectrofluorometry. *J. Microbiol Methods*. **53**:131-135.
- Yeates C., Saunders A.M., Crocetti G.R. and Blackall L.L.** 2003. Limitations of the Widely Used GAM42a and BET42a Probes Targeting Bacteria in the Gammaproteobacteria Radiation. *Microbiology*. **149**:1239-1247.
- Yilmaz S., Jenkins D. and Keasling J.D.** 2005. Identification of a Novel PHA Synthase from a Mixed Culture Performing Enhanced Biological Phosphorus Removal. 4th IWA Activated Sludge Population Dynamics Specialist Conference.
- Yu Z. and Morrison M.** 2004. Comparisons of Different Hypervariable Regions of rrs Genes for Use in Fingerprinting of Microbial Communities by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(8):4800-4806.
- Zhang T., Liu Y. and Fang H.H.P.** 2005. Effect of pH Change on the Performance and Microbial Community of Enhanced Biological Phosphate Removal Process. *Biotechnology and Bioengineering*. **92**(2):173-182.
- Zhou J., Bruns M.A. and Tiedje J.M.** 1996. DNA Recovery from Soils of Diverse Composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(2):316-322.
- Zilles J.L., Peccia J., Kim MW., Hung CH. and Noguera D.R.** 2002. Involvement of Rhodocyclus-Related Organisms in Phosphorus Removal in Full-Scale Wastewater Treatment Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(6):2763-2769.

参考文献(日本語)

伊藤 司、ヘルト ドゥイ アリエスヤディ、吉口 和美、岡部 聡(2005): MAR-FISH 法と RNA-SIP 法を用いた嫌気性消化汚泥内におけるプロピオン酸酸化細菌の多様性解析、第 21 回 日本微生物生態学会 講演要旨集 p84.

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、社会文化環境コース修士論文

高畠 寛生(2000):活性汚泥による生分解性プラスチック(PHA)生産の影響因子に関する検討およびその実用性評価、東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻博士論文

佐藤 弘泰(1993): PHA の測定とその意味、環境微生物工学研究 土木学会衛生工学委員会編技報堂出版

社団法人 日本下水道協会(1997): 下水道試験法 1997 年版

中村 好宏、胡 洪宮、藤江 幸一、馬場 康維(2004):クラスター分析によるキノンプロファイルデータのスクリーニング、統計数理 52 巻 2 号 p.343-352.

道中 敦子(2001):生分解性プラスチック生産菌の群集解析手法の検討、社会文化環境コース修士論文

道中 敦子(2005): 活性汚泥中に存在するポリヒドロキシアルカン酸合成遺伝子(phaC)の多様性とその挙動、社会文化環境コース博士論文.

徳平 淳(1994):衛生工学 第 2 版 森北出版

第五章において得られた塩基配列一覧

>Lab_reactor_f18_No1_clone

```
AGTGAACGCTGGCGGTAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGAGGAGCTTGCTCCTTGGGT
GGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTCTGTCGTGGGGGATAACGTAGGGAACTTA
CGCTAATACCGCATACGACCTACGGGTGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCGATTGAATGAGCCGA
TGTCGGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGA
TCAGCCCACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATG
GGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGG
AAAGAAATCCAGCTGGCTAATACCCGTTGGGATGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTG
CCAGCGGCTACACACGTAACGAAGGGTGCAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGTG
GTCGTTTAAGTCCGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAACTGCAGTGGATACTGGGCGACTAGAGT
GTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCCTGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATCAAGAGGAACATCCATGGCG
AAGGCAGCTACCTGGACCAACACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAAGCTAACG
CGTTAAGTTTCGCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAC
AAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCGAGAAGT
TTCCAGAGATGGATTGGTGCTTCGGGAACCTCGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTCG
TGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAA
CTCTAAGGAGACCGCCGTTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACG
GCCAGGGCTACACACGTAACATAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAAGCGCGGACGCGTAAGCCAATCCC
AGAAACCTTATCTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCA
GATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGT
TGCACCAGAAGCAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTGCCACGGTGTGGCCGATGACTGGGGTG
```

>Labreactor_f18_No2_clone

```
ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGGATTGAGGGGCTTGCTCCTCAATTTAGTG
GCGAACGGGTGAGTAAAGCATCGGAACGTACCCAGGAGTGGGGGATAACGTAGCGAAAGTTACGCTAATA
CCGCATATTCTGTGAGCAGGAAAGCGGGGGATCGCAAGACCTCGCGCTTCTGGAGCGGCCGATGTCGGA
TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCA
CACTGGGACTGGGACACGGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGGGC
AACCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTCGGCGGGGAAG
AAAGCGCACCCGTTAATACCGGGTGTGGATGACGGTACCCGCATAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCA
GCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTT
TTGTAAGACAGGCGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAATGGCGCTTGTGACTGCAAGGCTAGAGTACG
GCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAG
GCAGCCCCCTGGGCCGATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGGTGTTGGGTGGGTAACCATTAGTACCGTAGCTAACGCG
TGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAA
GCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTCAGGAACCTTC
CAGAGATGGATTGGTGCCCGAAAGGGAGCCTGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTCG
TGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCTTAGTTCGCCATCATTTAGTTGGGCACTC
TAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTA
GGGCTTCACACGTCATACAATGGTCGGTACGGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCTCAGAA
AGCCGATCGTAGTCCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGAT
CAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGCGGGTCCCA
CCAGAAGTAGGTAGCCTAACCGCAAGGGGGGCGCTTACCACGGTGGGGTTCGTGACTGGGGTG
```

>Lab_reactor_f20_clone

```
AGTGAACGCTGGCGGTAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGAGGAGCTTGCTCCTTGGGT
GGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTCTGTCGTGGGGGATAACGTAGGGAACTTA
CGCTAATACCGCATACGACCTACGGGTGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGATTGAATGAGCCGA
TGTCGGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGA
TCAGCCCACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGGATATTGGACAAT
GGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGG
GAAAGAAACAGCTGGTTAATACCCGTTGGGATGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTG
```

CCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTACTCGGAATTACGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGTG
GTCGTTTAAGTCCGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAACTGCAGTGGATACTGGACGACTAGAGT
GTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCCTGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAGGAACATCCATGGCG
AAGGCAGCTACCTGGACCAACACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAAGCTAACG
CGTTAAGTTCCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCA
CAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCGAGAAC
TTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTC
GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGA
ACTCTAAGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCGAAGTCATCATGGCCCTTAC
GGCCAGGGCTACACACGTACTACAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAAGCCGCGACGGTAAGCCAATCC
CAGAAACCCTATCTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC
AGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTG
TTGCCACGAAGCAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTGCCACGGTGTGGCCGATGACTGGGGTG

>Lab_reactor_f21_No2_clone

AACGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACACGCAAGTCAACGCCCGCAAGGGGAGTGGCAGACGGGTG
AGTAACACGTGGGAACATGCCCAAAGGTACGGAATATTCTCGGGAACTGGGAGCAATACCGTATGTGCC
GAAAGGGGAAAGATTTATCGCCTTTGGATTGGCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGCCTAC
CAAGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGT
GATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAACTCTTTCTGGGGGACGATAATGACGGTACCCCAAGAAGAAGCTCC
GGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTGGATTACTGGGCGTAAA
GCGCGTGTAGGCGGACTGGAAGTTGGGGGTGAAATCCCGAGGCTCAACCTCGGAAGTGCCTCCAAAAC
TTCCAGTCTGGAAGCAAGCAGAGGCAAGTGAATTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAGG
AACACCAGTGGCGAAGGCGACTTGCTGGGCTTGTAAGTACGCTGAGACGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAGAGCTAGTTGTGGCACGCATGCGTGTCCGT
GACGCAGCTAACGCATTAAGCTCTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGAAATTGAC
GGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCCACGTTTGA
CATGTCTAGTATGGTTCGTGAGAGATGACTTCCTTCAGTTCCGCTGGCTAGAACACAGGTGCTGCATGGCTG
TCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCTATTAGTTGCCATC
AGGTTAAGCTGGGCACTCTAATGGAAGTCCCGGTGGCAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTC
CTCATGGCCCTTACGCGTGGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGAGGGATAATCCCTAAAAGC
CATCTCAGTTTCGATTGTCTCTGCAACTCGAGGGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA
TGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTCTACCCGA
AGGCGCTGCGCTAACCGCAAGGGGGCAGGCGACCACGGTAGGGTCAGCGACTGGGGTG

>Lab_reactor_W13

>M_f4_No3_clone

CAGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCACGGGGGGCCCGCAAGGGTAACCGGCGAACGGGTGCGTAACA
CGTGAGCAATCTGCCGTGATTCTGGGGGATAGCCGGCCCAACGGCCGGGTAATACCGCATGCGCTCGTTG
AGTGGCATCACTTGACGAGGAAACCTCCGGGGGATCACGAGGAGCTCGCGGCCTATCAGCTAGTTGGTG
GGGTAACGGCCTACCAAGGCAATGACGGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGGCCAGCCACATTGGGACTGAG
ATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGCCGAAAGACTGACGCAGC
GACGCCGCGTGGGGGATGAAGCATTTCGGTGTGTAAACCCCTGTTGCTCGGGACGAACAAGCGATTTCGA
TCGCTTCTGACGGTACCGGGTGAGGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGG
GTGCGAGCGTTGTCCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTCTGCTAAGCGTGCGGTGAAAG
CCTGGGGCTCAACCCAGGTCTGCCGTGCGAACTGGTGGACTAGAGCACTGTAGAGGCGAGTGGAATTC
CGGGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGAGATCCGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTCGCTGGGCGAT
AGCTGACGCTGATGCGCGACAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC
GATGGGAACTAGGTGCTTGGGGGAGCGACCCCTCGAGTGCCGGCGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCGCTG
GGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTG
GTTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCCTACCCAGGCTTGACATGGATGGGAAAGCCTCTGGAACAGGG
GCCCCCTCTCGGAGCTCATTCACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGCCCTTAGTTACCAGCGGGTAAAGCCGGGGACTCTAGGGGGACTG

CCGGTGCCAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGTCCTTACGTCTGGGGCTACACA
CGTGCTACAATGGCCAGTACAGAGGGCTGCGAAGTGCGAACACGGAGCCAATCCCTAAAGCTGGCCTCA
GTTTCGATTGTCGTCTGCAACTCGACGGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCGACGCCG
CGGTGAATACGTTCCC

>M_f4_No1_clone

CTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGGCCTCTTCGGAGGTCACTGGCAAACGGGTGCGTAA
CACGTAGGTAATCTACCCAGGAGATGGGGACAACGGATGGAAACGTCCGCTAATACCCGATGGCGTCGCG
AGACGAAAAGGCGCAAGCCGCTACTGGAGGAGCCTGCGGCCTATCAGGTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTA
CCAAGCCGACGACGGGTAGGGGGTGTGAGAGCATGACCCCCACACGGGGACTGAGACACGGCCCCGA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGGATCTTGGGCAATGGGCGCAAGCCTGACCCAGCGACGCCGCGTG
GAGGACGAAGGGCTTCGGCTCGTAAACTCCTTTCCCGTGGACGAGAGAAGGACGGTACACGGGGAATA
AGTCTCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAAACTAGGAGGCGAGCGTTATCCGGAATCACTGGG
CGTAAAGGGCGTCTAGGCGGCACGACAAGCGAGGTGTGAAGGCTTCTGGCTCAACCAGGAGAGTGCGCT
TCGGACTGTGAGCTTGGAGGGCAGGTGAAGGGGGTGGAAATTCCTGGTGGAGTGGTGGAATGCGTAGA
GATCGGGAGGAACACCAAGTGGCGAAAGCGGCCCCCTGGCCTGTTGCTGACGCTGAAGCGCGAAAGCGT
GGGGAGCAAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGTGAAGTAGGTGTGGCTGGCTT
AAGGGCTGGTCTGTCGGAAGCCAACGCGATAAGTCACCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAAC
TCAAAGGAATTGACGGGGGCGCCGACAAAGCAGCGGAGCGTGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAAC
CTTACCTGGGATTGACATGACGGTGGTAGAAGGGTGAAGCCCCGACGACCCGCAAGGGGAGCCGCCACAG
GTGCTGCATGGCTGTCGTGCTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCT
GTCGCCAGTTTCAGGTGTCTGGCGAGACTGCCCCTGCAAGCGGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGT
CAGCATGGCCTTTATATCCAGGGCGACACACGCTACAATGGCTGGGACAATAGGACGCAAGACCGAGA
GGTGGAGCCAATCCGTAAACCCAGTCTCAGTTTCGATTGGGGGCTGCAACTCGCCCCCATGAAGGCGGA
GTTGCTAGTAACCGCGCGTCAGCCATAGTGCGGTGAATACGTTCCC

>M_f4_No2_clone

CTGGCTGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGCTGAAGCCCCAGCTTGCTGGGGTGGATGAGTGGCGA
ACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGACTTCGGGATAAGCCCCGGGAACTGGGTCTAATACCG
GATACGACTGTGCGACGCATGTCTGGTGGTGGAAAGTTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGCCCTATCA
GTTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGACGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACA
CTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAAC
CCTGATGCAGCGACGCAGCGTGCGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTCAGCAGGGAAGAAG
CCTCACGGTGACGGTACCCGCGAGAAGAAGTACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
GTACGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTGGTCACGTCTGCTGTGGAAC
GCAACGCTTAACGCTGCGCGTGAGTGGGTACGGGCTGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGTCTGGAATTCCT
GGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGACGGGACTCTGGGCTGTAAC
TGACACTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTT
GGGCACTAGGTGTGGGGGGCATTCCACGTTCTCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGG
GAGTACGGTCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCGCCGACAAAGCGGCGGAGCATGCGGAT
TAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCAGACCGTCTTGAAACAGGTCTCT
TCTTTGAAGCTGGTGTACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
CGCAACGAGCGCAACCCCTCATTCTATGTTGCCAGCACGTGATGGTGGGAACTCATAGGAGACTGCCGGGG
TCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTTATGTCTTGGGCTTCACGCATGCTAC
AATGGCTGGTACAGAGAGAGGCGAACCCGTGAGGGCAAGCGAATCCCTTAAAGCCAGTCTCAGTTTCGGAT
CGTAGTCTGCAATTCGACTACGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATA
CGTTC

>M_f4_No4

CTAGCGGAGGCGCTAATACATGCAAGTCGAGGGGACGCGGGAATAGCAATATTTGCCGGCGACCGGCGCA
CGGGTGCGTAACACGTGTACAATCTGCCCATATCAGGGGGATAGCCCGGAGAAATCCGGATTAATACCCCA
TAATAGTCGAGGAGGCATCTTCTTGATTTGAAAGCTACGGCGGATATGGATGAGTATGCGTCTGATTAGTTA
GTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGACCACGATCAGTAGGGGATCTGAGAGGATTAACCCCCACACGGAT
ACTGAGACACGGATCCGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATATTGGACAATGCCCGCAAGGGTGAT
CCAGCCATGCCGCGTGCAGGAAGAAGGCCCTATGGGTGCTAAACTGCTTTTACACCGGAGAAAACCCCT
TACGTGTAAGGGGCTGATAGTATGGTGAGAATAAGCATCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGAC

GAAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGGTTTAAAGGGAGCGTAGGTGGCCTTATAAGTCAGTGGTGA
AAGACTGTGCTTAACGACGGAACCTGCCATTGATACTGTAGGGCTTGAGTATAGTTGCTGTGGGCGGAATA
TGACATGTAGTGGTGAAATACTTAGAGATGTCATAGAACACCGATTGCGAAGGCAGCTCACAAAATAAAC
TGACACTGAGGCTCGAAAGTGCAGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCGCACTGTAAACGAT
GATTACTCGTTGCTGGGGAGCAATTCTCAGTGACTAAGCGAAAGCGATAAGTAATCCACCTGGGGAGTACG
CCGGCAACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCTGCACAAGCGGAGGAGCATGTGGTTTAATTCG
ATGATACGCGAGGAACCTTACCAGGGCTTGAAAGTTAGTGACCGACTCTGAAAGGAGTCTTTCCGCAAGG
ACACGAGACTAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGCCGTGAGGTGTTGGGTAAAGTCCCGCAACG
AGCGCAACCCCTACCATTAGTTGCCAGCGAGTCATGTCGGGGACTCTAGTGGAAGTGGCCGCGCAAGCG
GTGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCACGGCCCTTACGTCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG
CTATTACAGAGGGCAGCTACATAGTAATATGATGCTAATCTTCAAAAATAGTCTCAGTTCGGATTGAGGTCTG
CAACTCGACCTCATGAAGCTGGATTGCTAGTAATCGCGCATCAGCAATGGCGCGGTGAATACGTTCCC

>M_f5_clone

CTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGGCGTAGCAATACGTCAGCGGCAGACGGGTGAGTAA
CGCGTGGGAACATACCTTTTGGTTCGGAACAACACAGGGAACTTGCTGCTAATACCGGATAAGCCCTTACG
GGGAAAGATTATCGCCGAAAGATTGGCCCGCTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
GCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCCAACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGCGCAAGCCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGA
AGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTGTGCGGGAAGATAATGATGGTACCGCAAGAATAAGCCCCGGCTAA
CTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGTG
CGTAGGCGGGTCTTTAAGTCAGGGGTGAAATCCTGGAGCTCAACTCCAGAACTGCCTTTGATACTGAAGAT
CTTGAGTTCGGGAGAGGTGAGTGGAAGTGCAGGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAAGAACACC
AGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCCGATACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCCAGCCGTAGTGGGTTTACTCACTAGTGGCGCAG
CTAACGCTTTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGACGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGTCC
GGGACCGGTGCGAGAGACGTGACCTTCTCTTCGGAGTCCGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAG
CTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCCGTCTTAGTTGCTACCATTTAGT
TGAGCACTCTAAGAGTGCCTGGTGATAAGCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTGACGTCCTCATGGC
CCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAATGGGATGCAAAGGCGCAAGCCCCAGC
AAATCTCAAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGGGCTCTGCAACTCGAGCCCATGAAGTTGGAATCGCTAGTA
ATCGTGGATCAGCACGCCACGGTGAATACGTTCCC

>M_f6_clone

CTGGCTGCGTGCTTAACACGTGCAAGTCGAACGCTGAAGCCCCAGCTTGCTGGGGTGGATGAGTGGCGA
ACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCCGACTTCGGGATAAGCCCCGGGAACTGGGTCTAATACCG
GATACGACTGTGCGACGCATGTCTGGTGGTGAAAGTTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTGTCA
GTTTGTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGACGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACA
CTGGGACTGAGACACGGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAAC
CCTGATGACGCGCAGCGAGCGTGCGGGATGACCGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTCAGCAGGGAAGAAG
CCTCACGGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGTACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
GTACGAGCGTTGTCGGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTGGTCACGTCTGCTGTGGAAC
GCAACGCTTAACGTTGCGCGTGCAAGTGGGTACGGGCTGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGTCTGGAATTCCT
GGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGACTCTGGGCTGTAAC
TGACACTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTT
GGGCACTAGGTGTGGGGGGCATTCCACGTTCTCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTCCCCGCCTGGG
GAGTACGGTCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGAT
TAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCAGACCGTCCTGGAAACAGGTCCTCT
TCTTTGAAGCTGGTGATGAGGTGGTGTGCTGCTCGGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
CGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTCTATGTTGCCAGCACGTGATGGTGGGAAGTCAAGGAGAGTCCCGG
GTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTTATGTCTTGGGCTTCACACATGCTA
CAATGGCTGGTACAGAGAGAGGCGAACCCGTGAGGGCAAGCGAATCCCTTAAAGCCAGTCTCAGTTCGG
ATCGTAGTCTGCAATTCGACTACGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAA
TACGTTCCC

>M_f7_clone

CTGGCGGCATGCTTTACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGCGGGGGCAACCCTGGCGGCGAGCGGGCGAA
CGGGTGAGTAATACATCGGAACGTACCCTGGAGTGGGGGATAACGCCGCGAAAGCGGCGCTAATACCGCA
TATGCTCTGAGGAGGAAAAGTGGGGGACCGCAAGGCCTCACGCTCTGGGAGCGGCCGATGTCCGATTAGC
TAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTG
GGA CTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGGGCAACCCT
GATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTTGGCCGGGAAGAAAAGGAT
CCTGCCTAATACGTGGGGTCGTTGACGGTACCGGCAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCTG
CGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTGGTTAAG
TCTGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATGGCATTGGAAACTGGCCAGCTGGAGTGTGGCAGAG
GGGGGTGGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAAC
CCCCGTTGGGCAACACTGACGCTCAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCCCTAAACGATGATCACTGGGTGTTGGGGAAGCGATTTCCTTGGTACCGTAGCTAACGCGTGAAGT
GATCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAAGTCAAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTG
GATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAACAACCTTACCTACCCTTGACATGTCCGGAACCCTGCTGAG
AGGTGGGGGTGCCCGAAAGGGATCGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGAT
GTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGGGCACTCTAGGGAGACT
GCCGGTGACAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACA
CGTCATACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCCAATCCAGAAAAGCCGGTCTG
AGTCCGGAATCGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCC
GCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACC

>M_f8_No1_clone

CTGGTGGCATGCTTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCGCGGGGGCAACCCTGGCGGCGAGTGGCGAA
CGGGTGAGTAATGCATCGGAACGTATCCTGTAATGGGGGATAACGTAGCGAAAGTTACGCTAATACCGCATA
CGCTCGAGAGAGGAAAAGTGGGGGATCGCAAGACCTCACGTTATAGGAGCGGCCGATGTCCGATTAGCTAG
TTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGG
ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGA
TCCAGCCATGCCGCGTGCGGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTATGTCGGGAAAAAGGGGTG
CGAGGATAATACCCTCGTCTTTGATGGTACTGGAAGAATAAGCACACCGGCTAACTACGTGCCAGACCGCG
GGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTCTTGTAAGA
CAGTCGTGAAAGCCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCGATTGTGACTGCAAGGCTAGAGTGTGTCAGAGG
GGGGTGGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGCC
CCCTGGGATAACACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
ACGCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTTGGAAGGGTAACCTTTTAGTAACGAAGCTAACGCGTGAAGTTGA
CCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAAGTCAAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAT
GATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACACTTGACATGCCAGAAATCCTGCAGAGATGT
GGGAGTGCCGCAAGGAATCTGGGCACAGGTGCTGCATGGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCACTAGTTGCTACATTTAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTG
CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGTGTAAGGCTACACAC
GTCATACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCTCACAAGCCGATCGTAG
TCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTTGATCAGCATGTCACGG
TGAATACGTTCCC

>M_f8_No2_clone

CTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGTAGCAATACATAGTGGCGCACGGGTGAGTAACGC
GTGGGAATATACCGTTTGTGGGGAATAACTTTGGGAACTAAAGCTAATACCGCATACGCCCGAGAGGGG
AAAGATTTATCGCTAAACGATTAGCCCCGCGTGAGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGCCGA
CGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTGGGGAATATTGGGCAATGGAGGAACTGACCCAGCCATGCCGCGTGAGTGTGAAGGC
CTTAGGTTGTAAAGCTCTTTTCGCGGATGAAGATAATGACGGTAGTCGGAGAAGAAGCCCCGCTAACTTC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGAGCGTA
GGTTGCTCGATAAGTCAGTGGTGAAAGCCAGAGCTCAACTCTGGAACCTGCCATTGAACTGTGAGCTG
GAATCTCAGAGGGGATAGCGGAATTCCAAATGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTTGGAGGAACACCGGTG
GCGAAGGCGGCTATTTGGATGAGTATTGACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAATGCTAGTTGTTGGGGGTTCCCCCTCAGTGACGAAGCTAACG

CATTAAGCATTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAAGAAATTGACGGGGACCCGCACA
AGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAGGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACGTGTCCAGTTTG
ATCGCCAGAGATGGCTTTCTTCACTTCGGGTGGCTGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGT
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTCGTCCTTAGTTGCCATCATTAGTTGGG
AACTCTAAGGAACTGCCCGTGATAAGCGGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTAC
GGCCTGGGCCACACAGTGTACAATGGCGGTTACAATGGGCAGCAAACCCGCGAGGGCAAGCTAATCT
CTAAAACCGTCTCAGTTCGGATTGTACTCTGCAACTCGAGTACATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTAG
ATCAGCATGCTACGGTGAATACGTTCCC

>M_f9_No1_clone

CTAGCGGGAGGCTTAATACATGCAAGTCGCACGGCAGCATTATTGTAGTGATATAATAGATGGCGAGTGGCG
CACGGGTGAGTAACGCGTACACAACCTACCCTTAAGAGGGGGATAACTCAGAGAAATTTGGGATAATACCG
CATAAGATCTTAAGATTGCATGATTTAGAGATTAAAGTTAAGGCGCTTAAGGATGGGTGTGCGTTAGATTAGG
TAGTTGGTAGGGTAACGGCCTACCAAGCCGACGATCTATAAGGGGCGTGAGAGCGTGATCCCTCACACGG
GTACTGAGACACGGACCCGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATATTGGACAATGCCCGCAAGGGTG
ATCCAGCCATTCCGCGTGCAGGAAGACTGCCCTATGGGTTGTAAACTGCTTTTATTAGGGAAGAAACCCCT
TGACGAGATTGAGGGTTGACGGTACCTGATGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TACGGAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATCACTGGGTTTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTTGATAAGTCAGAG
GTGAAAGGCTACGGCTTAACTGTGGGATTGCCTTTGATACTGTTGGACTGGAATTGAGTTGAAGTTAGTGG
AATCGGGCATGTAGCGGTGAAATGCATAGATATGTCGTAGAACACCGATTGCGAAGGCAGCTAACTGGGCT
TAAATTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGATCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAAC
CGATGCTAACTCGATGTGTGGCAGAGATGTTGCGCGTCTAAGGGAAACCGTTAAGTTAGCCACCTGGGGA
GTACGTTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGTCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA
TTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCTGGGCTATAATGCGACCGCGATACTGGGAAACTGGTAGTTCCCTTC
GGGACGGTCAGCAAGGTGCTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGCCGTGGAGGTGTTGGGTTAAGTCCCGC
AACGAGCGCAACCCCTATTGTTAGTTACCAAGCTTGAGAGATCAAGAGGGGACTCTAACGAGACTGCCGGC
GTAAGCCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGGCCTTTATGTTTACGGGCGACACACGTGCT
ACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGAAGCTGGAAGGTGGAGCTAATCTCAGAAAGCCGGTCTCAGTTCCG
GATTGAAGTCTGAAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGCATTACGCCATGGCTCGGTG
AATACGTTCCC

>M_f9_No2_clone

CTAGCGGCAGGCTTAATACATGCAAGTCGAGGGGTAACATGGGGTAGCAATACTCTGATGACGACCGGCAA
ACGGGTGCGGAACACGTACGCAACTTTCCAAAACCTGGTGAATAGCCCTCCGAAAGGAGGATTAATACACC
GTAACATATAGAGGTGGCATCGCCTTTATATTATAGCTCCGGCGGTTTTGGATGGGCGTGCGCCTGATTAGG
TAGTTGGTGTGGTAACGGCTACCAAGCCTACGATCAGTAAGTGGTGTGAGAGCACGACCAGTCACACGG
GCACTGAGACACGGGCCCGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATATTGGTCAATGGACGAAAGTCTG
AACCAGCCATGCCGCGTGAAGGATGAGGGCCCTCTGGGTTGTAACTTCTTTTATAGGGGACGAAAAAAG
GGAATTCCTTCCCACTTGACGGTACCCTAGGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TACGGAGGGTGCAAGCGTTATCCGGATTCACTGGGTTTAAAGGGTGCGTAGGTGAGCAGTTAAGTCAGTG
GTGAAATCTCCGGGCTTAACCCGGAACCTGCCATTGATACTATCTGTCTTGAATATCCTGGAGGTGAGCGG
AATATGTCATGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATGACATAGAACACCGATTGCGAAGGCAGCTCGCTACGGGA
TTATTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAAC
GATGGATACTCGACATCAGCGATACACTGTTGGTGTCTGAGCGAAAGCATTAAAGTATCCACCTGGGAAGT
ACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGTCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAAT
CGATGATACGCGAGGAACCTTACCTGGGCTAGAATGCTGGGAGACCGAGGGTGAAAGCTCTCTTTGTAGC
AATACTGCCAGTAAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTTGGGTTAAGTCCCGC
AACGAGCGCAACCCCTATCACTAGTTGCCATCAGGTAATGCTGGGAACCTCTGGTGAAGTGGCCCGGTAA
GGCGTGAGGAAGGAGGGGATGATGTCAAGTCATCATGGCCTTTATGCCAGGGCTACACACGTGCTACAA
TGGCGAGTACAAAGGGCAGCTACCTGGTAACAGGATGCTAATCTCAAAAACTCGTCTCAGTTCGGATTGG
GGTCTGCAACTCGACCTCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTATATCAGCAATGATACGGTGAATACGTT
CCC

>N_f5_clone

AGCGAACCCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGGCCCTTCGGGGTCAGCGGCAGACGG
GTGAGTAACGCGTGGGAACGTGCCCTTCGGTTCGGAATAACTCAGGGAACTTGAGCTAATACCGGATAC

GCCCTTATGGGGAAAGGTTTACTGCCGAAGGATCGGCCCGCTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTTACGG
CTCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCG
TGAGTGATGACGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTCTCCGGGACGATAATGACGGTACCGGAGGAATAAG
CCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATCACTGGGC
GTAAAGGGCGCGTAGGCGGCTGATTTAGTCGAGGGTGAAAGCCCCGTGGCTCAACCACGGAATGGCCTTC
GATACTGATTGGCTTGAGACCGGAAGAGGACAGCGGAACCTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTC
GCAAGAACACCACTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCCGGTTCTGACGCTGAGGCGCGAAAAGCGTGGGGA
GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAATGCTAGCCGTTGGGGTGCATGCACC
TCAGTGGCGCCGCTAACACTTTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCACAAGATTA AAACTCAAAGGAAT
TGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCATCCC
TTGACATGGCATGCGAGCCGAGAGATCCGGTGTTCCTTCGGGGACGTGCACACAGGTGCTGCATGGC
TGTCGTCAGCTCGTGTCTGTAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCCTCAGTTGCC
ATCATTGAGTTGGGCACTCTGGGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGT
CCTCATGGCCCTTACGGGATGGGCTACACGCGTGCTACAATGGCGGTGACAATGGGCAGCGAAGGGGCG
ACCTGGAGCGAATCCCCAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGGGTGCATGAAGGCGGA
ATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACA
CCATGGGAGTTGGTCTTACCCGACGGCGCTGCGCCAACCGCAAGGGGGGCAGGCGACCACGGTAGGGT
CCAGACTGGGGTG

>N_f7_No1_clone

CTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTTTCGAGCGGTAAAGGCCCTTCGGGGGTACACGAGCGGCGAACG
GGTGAGTAACACGTGAGCAATCTGCCCTTCACATCGGAATAACCTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATA
CGACCACCGAAGGCATCTTCTGGTGGTGGAAAAGTTCCGGCGGTGAGGGATGAGCTCGCGGCCTATCAGC
TAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGAACCGGCCACAC
TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAAGC
CTGATCCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGC
GAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGT
GCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGCGTAAAGGGCTCGTAGGCGGTCCATCGCGTCGGGAGTGA AAAAGCT
GGGGCTTAACCCCGATCCTGCTTCCGATACGGGTGGACTAGAGGTAGGTAGGGGAGAACCGAATTCCTGG
TGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGTTCTCTGGGCCTTACCTGA
CGCTGAGGAGCGAAAAGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGG
CGCTAGGTGTGAGGGACATTCCACGTCCTTTGTGCCGACGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGT
ACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAAT
TCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGATTTGACATATAGGGAAATCTCCTGGAGACAGGAGGTCCGCAA
GGGCTCTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTGAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
AGCGCAACCCCTCGTCCTATGTTGCCAGCACGTGATGGTGGGGACTCATAGGAGACTGCCGGGGTAACTCG
GAGGAAGGTGGGGATGAGGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCC
GGTACAAAGGGCTGCGAAAACCGCAAGGTAGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGT
CTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCC

>N_f7_No2_clone

CTGGCGGCGCGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAGAACCCAGGCTTCGGCCTGGGGGAAAGCGGCGAA
CGGGTGAGTATCAAGTGGGTAACTGCCCTCGACATCGGGATAGCCCGGGGAAACCCGGATTAATACCGA
ATGGCCCATCTGCTCCTCGGAGCGGCTGGAAAAGGTAGCTTCGGCCTCCGGTCGAGGAGGAGCCCGCG
GCGGATTAGCTTGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCTCCGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATC
AGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTGCGCAATGG
GCGAAAAGCCTGACCGCAGCGACGCGCGGTGAGGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGGAG
GGACGAAGCCACTCGGGTTAATAGCCAGAGGGTGACGGTACCTCCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTACG
TGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCTAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGAGCGTGTAGG
CGGCCAGGTAGGTCTGCTGTGAAAACCTCGAGGCTCAACCTCGAGACGTGCGCGGAAACCATCTGGCTAG
AGTCCGGAAGAGGAGAGTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAAGAACACCCGTG
GCGAAGGCGGCTCTCTGGGACGGTACTGACGCTGAGACGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGGTGCTAGGTGTGGGCGGTGTGCACTCCGTCCGTGCCGAAG
CTAACGCATTAAGCACCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGC

CCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGTTCAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCGAGACTTGACATGCA
CTGGAATGTCGTAGAAATACGCCAGCCCTTCGGGGCTAGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTC
GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCCTATGTTGCCAGCGAGTTATGT
CGGGGACTCATAGGAGACTGCCGGTGACAAATCGGAGGAAGGTGGGGATGATGTCAAGTCATCATGCCCC
TTACGTCTCGGGCTACACACGTGCTACATTGGCCGGTACAGAGGGTTGCAAACCCGTGAGGGGGAGCGA
ATCCCAAAAAGCCGGTCCCGGTTCCGATTGGAGGCTGAAACTCGCCTCCATGAAGGCGGAGTTGCTAGTA
ATCGCGGATCAGCAATGCCGCGGTGAATACGTTCTC

>N_f10_clone

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGACGAGGAGCTTGCTCCTCTGACGT
TAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGAATAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAG
CTAATACCAGATAACATGTTGAACCGCATGGTTCAACAGTGAAAGACGGTCTTGCTGTCACTTATAGATGGA
TCCGCGCCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGG
GTGATCGGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGGGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCG
CAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTA
TTAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAAGTATGCACGTCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTA
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTA
GGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAGTGGAAACTT
GAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCGGAGATATGGAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGAT
ACCTGAGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGC
TAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTCTG
ACCCCTCTAGAGATAGAGTTTTCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTC
GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTAAGCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGG
GCACTCTAAGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTA
TGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAATACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTCAAGCAAACCC
CATAAAGTTGTTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTATATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTAG
ATCAGCATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAC
ACCCGAAGCCGGTGGAGTAACCTTTTGAGCTAGCCGTCGAAGGTGGGACAAATGATTGGGGTG

>N_W3_clone

CTGGCGGTAGCGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGTAAGAGCTTGCTCTTACGGGTGGCGAT
GGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTCTGTGCTGGGGGATAACGTAGGGAAACTTACGCTAATA
CCGCATACGACCTACGGGTGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGATTGAATGAGCCGATGTCGGAT
TAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCGGTCTAAGAGGATGATCAGCCACA
CTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGCGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAG
CCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAAT
CCAGCTGGTTAATACCCGGTTGGGATGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGTGGTCGTTT
AAGTCCGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAAGTGCAGTGGATACTGGACGACTAGAGTGTGGTAG
AGGGTAGCGGAATTCTGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAGGAACATCCATGGCGAAGGCAG
CTACCTGGACCAACACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCCCTAAACGATGCGAACTGAATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAG
TTCGCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGT
GGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGCCTTGACATGTCGAGAAGTTTCCAGA
GATGGATTGGTGCCCTTCGGGAAGTCAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATG
TTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGCTCTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAAGTCTAAG
GAGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGG
CTACACAGTACATAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAAGCCGCGACGGTAAGCCAATCCCAGAAACCC
TATCTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCA
TTGCTGCGGTGAATACGTTCCC

>N_W5_clone

CTGGCTGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGCTGAAGCCCCAGCTTGCTGGGGTGGATGAGTGGCGA
ACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGACTTCGGGATAAGCCCGGGAAACTGGTCTAATACCGG

ATACGACTGTCTGGACGCATGTCTGGTGGTGGAAAGTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCATCAG
TTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGACGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACAC
TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACC
CTGATGCAGCGACGCAGCGTGCGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTCAGCAGGGAAGAAGC
CTCACGGTGACGGTACCTGCAGAAGAATACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGT
ACGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTGGTCACGCCTGCTGTGGAAACGCA
ACGCTTAACGTTGCGCGTGCAGTGGGTACGGGCTGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGTCTGGAATTCCTGGT
GTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGACTCTGGGCTGTAAGTGA
CACTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGG
CACTAGGTGTGGGGGGCATTCCACGTTCTCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAAGTCCCCCGCTGGGGAG
TACGGTCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAAT
TCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCAGACCGTCCTGGAAACAGGTCTCTTCTT
TGAAGCTGGTGTACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCCCTCGTTCTATGTTGCCAGCACGTGATGGTGGGAACTCATAGGAGACTGCCGGGGTCAA
CTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTTATGTCTTGGGCTTCACGCATGCTACAATG
GCTGGTACAGAGAGAGGCGAACCCTGAGGGCAAGCGAATCCCTTAAAGCCAGTCTCAGTTCGGATCGTA
GTCTGCAATTCGACTACGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTT
CCC

>N_W8_clone

AGTGAACGCTGGCGGTAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACAGCAGCACAGAGGAACCTGCTCCTTGGGT
GGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTCTGTCGTGGGGGATAACGTAGGGAAACTTA
CGCTAATACCGCATACGACCTACGGGTGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGC GCGATTGAATGAGCCGA
TGTCGGATTAGCTAGTTGGCGGGTAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAT
CAGCCACACTGGAAGTGGGACACGCTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATG
GGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCCCTTTTGTGGG
AAAGAAATCCAGCTGGTTAATATCCCGGTTGGGATGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAAGTTCGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGT
GGTCGTTTAAAGTCCGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAACTGCAGTGGATACTGGACGACTAGAG
TGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCTGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAGGAACATCCATGGC
GAAGGCAGCTACCTGGACCAACACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAAGTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAAGCTAA
CGCGTTAAGTTCGCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGC
ACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCGAGAA
CTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCCTTCGGGAAGTCAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTGAGTCTGT
CGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGCTCTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGG
AACTCTAAGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTAC
GGCCAGGGCTACACACGTAATGATAGGAGACAGAGGGCTGCAAGCCGGCGACGGTAAGCCAATCC
CAGAAACCCTATCTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC
AGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTCACACCTGGGAGTTTGT
TGCACCAGAAGCAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTGCCACGGTGTGGCCGATGACTGGGGTG

>N_W10_clone

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTGAAGGTGGAGCTTGCTCCACCGGATC
AGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAATCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCGCTGGAAACGGCGT
CTAATACCGGATACGAGCTGCGAAGGCATCTTCAGCAGCTGGAAAGAATTCGGTCAGGGATGAGCTCGC
GGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGA
CCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAT
GGGCGCAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGACGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTTTTTTAGCA
GGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAGCGCCGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAA
TACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTCTGTGCGCTGTCT
GTGAAAACCCGAGGCTCAACCTCGGGCCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCGGTAGGGGAGATT
GGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGG
GCCGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGGGGAGCAAACAGGCTTAGATACCCTGGTAGTCCACCCC
GTAAACGTTGGGAACTAGTTGTGGGGTCCATTCCACGGATTCCGTGACGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCC
GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGCGGAGC

ATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGACATACACGAGAACGCTGCAGAAATG
TAGAACTCTTTGGACACTCGTGAACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCTATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCATGGGATACTG
CCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATgACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTCACGC
ATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCAATACCGTAAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCCCAG
TTCGGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGC
GGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCATGAAAGTCGGTAACACCTGAAGCCGG
TGGCCCAACCCTtGTGGAGGGAGCCGTGCAAGGTGGGATCGGTAATTAGGACT

>NN_f1_clone

AGTGAACGCTGGCGGTAGGCCCTAACACATTGCAAGTCAACGGCAGCACAGAGGAGCTTGCTCCTTGGGT
GGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTCTGTCTGTTGGGGGATAACGTAGGGAACTTT
CGCTAATACCGCATACGACCTACGGGTGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGATTGAATGAGCCGA
TGTCGGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAAGGATG
ATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACCCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAAT
GGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTAGG
AAAGAAATCCAGCTGGTTAATACCCGGTTGGGAAGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTG
CCAGCAGCCGCGGTAAATACGAAGGGTGCAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGTG
GTCGTTTAAAGTCCGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAACTGCAGTGGATACTGGACGACTAGAGT
GTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCCTGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAGGAACATCCATGGCG
AAGGCAGCTACCTGGACCAACACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAAGCTAACG
CGTTAAGTTCGCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAC
AAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGCCTTGACATGTCGAGAACT
TTCCAGAGATGGATTGGTGCTTCGGGAACCTCGAACCAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTG
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAAC
TCTAAGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGG
CCAGGGCTACACACGTACTACAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAAGCCGGCGACGGTAAGCCAATCCCA
GAAACCCTATCTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAGCTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAG
ATACGATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTCACACCATTGGGAGTTGTT
GCACCAGAAGCAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTGCCACGGTGTGGCCGATGACTGGGGTG

>NN_f2_clone

CTGGCGGTAGGCCCTAACACATGCAAGTCAACGGCAGCACAGTAAGAGCTTGCTCTTACGGGTGGCGAGT
GGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTCTGTCTGTTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATA
CCGCATACGGCCTACGGGTGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGATTGAATGAGCCGATGTCGGA
TTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCA
CACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCA
AGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAA
ATCCAGCTGGTTAATACCCGGTTGGGATGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCA
GCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGTGGTCTGTT
TAAGTCCGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAACTGCAGTGGATACTGGACGACTAGAGTGTGGTA
GAGGGTAGCGGAATTCCTGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAGGAACATCCATGGCGAAGGCA
GCTACCTGGACCAACACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAG
TCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAA
GTTCCGCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCG
GTGGAGTATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGCCTTGACATGTCGAGAACTTTCCA
GAGATGGATTGGTGCTTCGGGAACCTCGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAG
ATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCTA
AGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAG
GGCTACACACGTACTACAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAAGCCGGCGACGGTAAGCCAATCCAGAAAC
CCTATCTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAG
CATTGCTGCGGTGAATACGTTCCC

>NN_f3_No1_clone

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCAACGGTGAAGGTGGAGCTTGCTCCACAGGATCA

GTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAATCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCGCTGGAACGGCGTC
TAATACCGGATACGAGCTGCGAAGGCATCTTCAGCAGCTGGAAAGAATTTCCGGTCAGGGATGAGCTCGCG
GCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGAC
CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATG
GGCGCAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGACGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTAGCAG
GGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGTAGGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTCTGCTG
GGAAAAACCGAGGCTCAACCTCGGGCCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCGGTAGGGGAGATTG
GAATTCCTGGTGAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGG
CCGTAAC TGACACTGAGGAGCGGAAGGGTGGGGAGCAGACAGGCTTAGATACCCTGGTAGTCCACCCCG
TAAACGTTGGGAAGTAGTTGTGGGGTCCATTCCACGGATTCCGTGACGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCG
CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAGCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGCGGAGCAT
GCGGATTAATTGCATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGACATACACGAGAACGCTGCAGAAATGTA
GAACTCTTTGGACACTCGTGAACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTCTATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAAGTTCATGGGATACTGC
CGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTCACGCA
TGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCAATACCGTAAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCCAGT
TCGGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCG
GTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCCGCCGTCAAGTCATGAAAGTCGGTAACACCTGAAGCCGGT
GGCCAACCCCTGTGGAGGGAGCCGTCAAGGTGGGATCGGAATTAGGACT

>NN_f3_No2_clone

GACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAGGCCCTGCTTTTGTGGGGTGCTCG
AGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTGACTTTGGGATAACTTCAGGAACTGGGGC
TAATACCGGATAGGAGCTCCTGCTGCATGGTGGGGGTTGGAAAGTTTCGGCGGTTGGGGATGGACTCGCG
GCTTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAGTGGCTTACCAAGGCTTTGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACC
GGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGG
GCGGAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGCGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTCGCCTGT
GACGAAGCGTGAGTGACGGTAATGGGTAAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTGATA
CGTAGGTGCGGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGTGGTTGATCGCGTCGGAAGT
GTAATCTTGGGGCTTAACCTGAGCGTGCTTTTGATACGGGTTGACTTGAGGAAGGTAGGGGAGAATGGA
ATTCTGGTGGAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGTTCTCTGGGC
CTTTCCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGCTTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTA
AACGGTGGGTACTAGGTGTGGGGTCCATTCCACGGGTTCCGTGCCGTAGCTAACGCTTTAAGTACCCCGC
CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAGCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGCGGAGCATG
CGGATTAATTCGATGCAACGCGTAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGGATCGGGAGTGCTCAGAGATGGGT
GTGCCTCTTTTGGGGTCCGTTTACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTT
AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTTCACTGTTGCCAGCACGTTATGGTGGGGACTCGGTGGAGACC
GCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCAC
GCATGCTACAATGGCTGGTACAGAGAGTGGCGGAGCCTGTGAGGGTGAGCGAATCTCGGAAAGCCGGTCT
CAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCTCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGC
TGCGGTGAATACGTTCCCGGGGCTTGTACACACCCGCCGTCAAGTCATGGAAGTTGGTAACACCCGAAGC
CGGTGGCCTAACCGTTGTGGGGGAGCCATCGAAGGTGGGACTGGTGATTAGGACT

>NN_f5_clone

GACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAGGGCCCTGCTTTTGTGGGGTGCTCG
AGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTGACTTTGGGATAACTTCAGGAACTTGGGG
CTAATACCGGATAGGAGCTCCTGCTGCATGGTGGGGGTTGGAAAGTTTCGGCGGTTGGGGATGGACTCGC
GGCTTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAGTGGCTTACCAAGGCTTTGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGA
CCGCGACATTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTCGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATG
GGCGGAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGCGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTCGCCTG
TGACGAAGCGTGAGTGACGGTAATGGGTAAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTGATAC
GTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGTGGTTGATCGCGTCGGAAGTG
TAATCTTGGGGCTTAACCCCTGAGCGTGCTTTTGATACGGGTTGACTTGAGGAAGGTAGGGGAGAATGGAAT
TCCTGGTGGAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGTTCTCTGGGCCT
TTCCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGCTTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAA

CGGTGGGTACTAGGTGTGGGGTCCATTCCACGGGTTCCGCGCCGTAGCTAACGCTTTAAGTACCCCGCCT
GGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGC
GGATTAATTTCGATGCAACGCGTAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGGATCGGGAGTGCTCAGAGATGGGTG
TGCCTCTTTTGGGGTCGGTTCACAGGTGGTGAATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTTCACTGTTGCCAGCACGTTATGGTGGGGACTCAGTGGAGACCG
CCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACG
CATGCTACAATGGCTGGTACAGAGAGTGGCGAGCCTGTGAGGGTGAGCGAATCTCGGAAAAGCCGGTCTC
AGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCTCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCT
GCGGTGAATACGTTCCCGGGGCTTGACACACCGCCCGTCAAGTCATGAAAGTTGGTAACACCCGAAGCC
GGTGGCCTAACCGTTGTGGGGGAGCCGTCAAGGTGGGACTGGTGATTAGGACT

>NN_W5_clone

CTGGCGGTAGGCCTATACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGTAAGAGCTTGCTCTTACGGGTGGCGAG
TGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTCTGTCTGTTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAAT
ACCGCATACGACCTACGGGTGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGATTGAATGAGCCGATGTCCG
ATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCCAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCC
ACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGGACAAATGGGCGC
AAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGA
AATCCAGCTGGTTAATAACCCGGTTGGGATGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTACTCGGAATTACTGGCGTTAAAGCGTGCGTAGGTGGTCTG
TTAAGTCCGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAAGTGCAGTGGATACTGGACGACTAGAGTGTGGT
AGAGGGTAGCGGAATTCCTGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAGGAACATCCATGGCGAAGGC
AGCTACCTGGACCAACACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAAGTATCGAAGCTAACGCGTTA
AGTTCCGCCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCG
GTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTGCGAAGCTTTCCA
GAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAG
ATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGCTCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAAGTCTA
AGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAG
GGCTACACACGCTACGAATGGTAGGACAGAGGGCTGCAAGCCGGCGACGGTAAGCCAAATCCAGAAAC
CCTATCTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAG
CATTGCTGCGGTGAATACGTTCCC

>NN_W10_clone

GACGAACGCTGGCTGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGCTGAAGCCCCAGCTTGCTGGGGTGGATG
AGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGACTTCGGGATAAGCCCGGAACTGGGT
CTAATACCGGATACGACTGTCTGGACGCATGTCTGGTGGTGGAAAGTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGC
GGCCTATCAGTTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGACGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGA
CCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGCACAAT
GGGGAAACCTGATGCAGCGACGACGCTGCGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTCAGCA
GGGAAGAAGCCTCACGGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGTACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTAGGGTACGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTGGTCACGTCTGC
TGTGGAACACGCAACGCTTAACGTTGCGCGTGCAAGTGGGTACGGGCTGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGTC
TGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGACTCT
GGGCTGTAAGTGAACACTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGC
CGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGGGCATTCCACGTTCTCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTGCC
CCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGCGGA
GCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCAGACCGTCTGGAAA
CAGGATTTCTTTGAAGCTGGTGTACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGG
GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTCTATGTTGCCAGCAGTGATGGTGGGAAGTATAGAGA
CTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTTATGTCTTGGGCTTCA
CGCATGCTACAATGGCTGGTACAGAGAGAGGCGAACCCGTGAGGGCAAGCGAATCCCTTAAAGCCAGTCT
CAGTTCGGATCGTAGTCTGCAATTCGACTACGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCT
GCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCAAGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCC
GGTGGCCTAACCCCTTGTTGGGAGGGGGCCGTCTAAGGTGGGACTGGTGATTGGGACT

第六章において得られた塩基配列一覧

>N_AO_V3_V5_band1

TTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAATACTTAATGCGTTAGCGGCGGCACAGAGGTCATGACAACC
CCTACACCTAGTATTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTC
GAGCCTCAGCGTCAGTTACAGTCCAGAGAATCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTAATCTCTACGCATTT
CACCGCTACACTAGGAATTCCATTCTCCTCTCCTGCACTCTAGACTTCCAGTTTGAAATGCAGCACCCAAGT
TGAGCCCGGGTATTTACATCTCACTTAAAAGTCCGCCCTACGCTCCCTTTACGCCCAGTAAATCCGGACAA
CGCTCGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCCTCCTCAGGTACCGTC
ATTATCGTCCCTGAAGACAGAGCTTTACAACCCCGAAGGCCGTCACTACGCGGCGTTGCTGCATCA
GGTTTCCCCCATTTGTGCAATATTCCTCA

>N_AO_V3_V5_band2_1

CCCACCCAACACCTAGTTGACATAGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCAC
GCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTATCGACCCAGGGGGCTGCCTTCGCCATTGGTGTTCCTCCACATCTCTAC
GCATTTCACTGCTACACGTGGAATTCACCCCCCTCTGCCGTACTCTAGTCTTGCAAGTCACAAACGCAGTT
CCCAGGTTAAGCCCGGGGATTTACGCGCTGTCTTACAAAACCGCCTGCGCACGCTTTACGCCCAGTAATTC
CGATTACGCTCGCACCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTCTTATCCGGT
ACCGTCATCCACACAGGGTATTAACCCATGCGATTTCTTCCCGGCCGAAAGAGCTTTACAACCCGAAGGCC
TTCTTCACTACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTGTCCAAAATTCCTCA

>N_AO_V3_V5_band2_2

TCACTCTTGCGAGCGTACTTCCCAGGCGGAGTACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACCGAAGGGGGTAACCT
CCGACAGCTAGTACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTT
CGTGCCTCAGTGTCAGTTACAGTCCAGAGAGCCGCCTTCGCAACTGGTGTTCCTCCTAATATCTACGCATT
TCACCGCTACACTAGGAATTCACCTCTCCTCTCCTGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCAAAGGCTTACTACGGT
TGAGCCGTAGCCTTTACCTCTGACTTAAGAAACACCTACGCACCCCTTTACGCCCAGTAATTCGGGATAAC
GCTAGCCCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGGGCTTCCTCCTCAAGTACCGTCA
TTATCTTCTTGAGGACAGAGCTTTACGACCCGAAGGCCCTTCATCGCTACGCGGCGTTGCTGCATCAGG
CTTTCGCCCATTGTGCAATATTCCTCA

>N_AO_V3_V5_band3_1

TAAATGGTTTTACCCACCCAACACCTAGTTGACATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGT
TTGCTACCCACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTATCGACCCAGGGGGCTGCCTTCGCCATTGGTGTTCCT
CCACATCTCTACGCATTTCACTGCTACACGTGGAATTCACCCCCCTCTGCCGTACTCTAGCCTTGCAAGTC
ACAAGCGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACGCGCTGTCTTACAAAACCGCCTGCGCACGCTTTA
CGCCAGTAATTCGGATTAACGCTCGCACCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTG
TTCTTATGCCGGTACCGTCATCCGCACAGGGTATTAACCCATGCGATTTCTTCCCGGCCGAAAGAGCTTTAC
AACCCGAAGGCCTTCTTCACTACGCGGCATGGCTGG

>N_AO_V3_V5_band3_2

GATACCTCTACACCTAGTATCCATCGTTTACGGCGTGGACTACCGGGGTATCTAATCCCGTTTGCTACCCA
CGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGGAACATCCCAGACAGTCGCCTTCGCCACTGGTATTCCTCCCGATATCTA
CGCATTTACCGCTACACCGAGAATTCTACTGTCCCCTGATATCCTCAAGAACCGCAGTATCCGAGAAAGC
CCCAAAGTTGAGCCTTGAGATTTCTCTCGGACTTACGGTCCCGCCTACGAGCTCTTACGCCCAGTAATT
CCGGACAACGCTTGCTCCCTACGTCTTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGAAGCTTCCTCAGTGG
GTACCGTCCATTCTCTCCCCACTGACAGGAGTTTACAACCCGAGGGCCTTCATCCTCCACGCGGCGTGC
CTGCGTCAGGCTTTC

>N_AO_V3_V5_band4

CAGGCGGTCAACTTCACGCGTTAGCTACGGTACTAAATGGTTTTACCCACCCAACACCTAGTTGACATCGTT
TAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTATTGG
CCCAGGGGGCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTCACTGCTACACGTGGAATTCC
ACCCCCCTCTGCCATACTCTAGCCTTGCAAGTCACAAACGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACG
CCTGTCTTACAAAACCGCCTGCGCACGCTTTACGCCCAGTAATTCGGATTAACGCTCGCACCCCTACGTATTA
CCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTCTTAGTCCGGTACCGTCATCCACACAGGGTATTAACCT

GTGCGATTTCCTCCCGGCCGAAAGAGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCACTCACGCGGCATGGCTGGA
TCAGGGTTGCCCCATTGTCCAAAATCCCCA

>N_AO_V3_V5_band5

GGTACTAAATGGTTTTACCCACCCAACACCTAGTTGACATCGTTTAGGGCGTGGA CTACCAGGGTATCTAAT
CCTGTTTGCTACCCACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTATCGACCCAGGGGGCTGCCTTCGCCATTGGTG
TTCCTCCACATCTCTACGCATTTCACTGCTACACGTGGAATTCACCCCCCTCTGCCGTACTCTAGCCTTGC
AGTCACAAGCGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACGCCTGTCTTACAAAACCGCCTGCGCACG
CTTTACGCCCAGTAATTCCGATTAAACGCTCGCACCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCC
GGTGCTTCTTATTCCGGTACCGTCATCCACACAGGGTATTAACCCATGCGATTTCTTCCCGGCCGAAAGAG
CTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTC

>N_AO_V3_V5_band6

TTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTCACGCGTTAGCTACGGCACTAAAAGGTTTAACCCCT
CCCAACACCTAGTTGACATCGTTTAGGGCGTGGA CTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTT
TCGTGCATGAGCGTCAGTATTGGCCCAGGGGGCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCTCCACATCTCTACGCA
TTTCACTGCTACACGTGGAATTCACCCCCCTCTGCCAACTCCAGCTTGGCAGTCTCAAATGCAGTTCCC
AGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCTGACTTACCAAACCGCCTGCGCACGCTTTACGCCCAGTAATTCCGA
TTAACGCTCGCACCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTCTTATTCCGGGTACC
GTCTCTACACAGGGTATTAACCCGTGCAATTTCTTCCCCACCGAAAGAGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCT
TCACTCACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTGTCCAAAATCCCCA

>N_AO_V3_V5_band7

ACCGGCGGTAACCCGCCGACACTTAGTATCCATAGTTTAGGGCGTGGA CTACCAGGGTATCTAATCCTGTT
TGCTCCCCACGCTTTCGTGTCTCAGCGTCAGGTATGTTCCAGAGCGCCGCCTTCGCCACCGGCCTTCCTC
CCGATCTCTACGCATTTACCCGCTACACCGGGAATTCCGCGCTCCTCTCCACCCCTCTAGCCTGGCAGTAC
CCTCTGCGCTTTCGGGTTGGGCCGGAAGCTTTAACAAGAAGGCTTACCAAACCGCCTACACACCCTGTAC
GCCCAGTGAATCCGAACAACGCTTGCCACCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTGGCCGTGGC
TGCTTCTGGAGGTACCGTCCGAACGATTGCTCGCTCCATCTTCCCTCCCGAAAGGGGTTTACAATCCGAAG
ACCTTCATCCCCACGCGGCGTCGCTGCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGCAATATTC

>MKWS_A2O_V3_V5_band1

TTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAATACTTAATGCGTTAGCGGCGGCACAGAGGTCATGACAACC
CCTACACCTAGTATTCATCGTTTACGCGTGGA CTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTC
GAGCCTCAGCGTCAGTTACAGTCCAGAGAATCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCTAATCTCTACGCATTT
CACCGCTACACTAGGAATTCCATTCTCCTCTCCTGCACTCTAGACTTCCAGTTTGAAATGCAGCACCCAAAGT
TGAGCCCGGGTATTTACATCTCACTTAAAAGTCCGCCTACGCTCCCTTTACGCCCAGTAAATCCGGACAA
CGCTCGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTCCTCAGGTACCGTC
ATTATCGTCCCTGAAGACAGAGCTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCACTCACGCGGCGTTGCTGCATCAG
GGTTTCCCCCATTTGTGCAATATTCCCCA

>M_A2O_V3_V5_band2

CCTTCCAACAACCAGTTGACATCGTTTAGGGCGTGGA CTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACG
CTTTCGTGCATGAGCGTCAGTGTTATCCAGGGGGCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCTCCACATCTCTACG
CATTTCACTGCTACACGTGGAATTCACCCCCCTCTGACACACTCTAGCCTTGCAATCGCAGTTTC
CCAGGTTAAGCCCGGGGCTTTACGACTGTCTTACAAGACCGCCTGCGCACGCTTTACGCCCAGTAATTC
CGATTAAACGCTCGCACCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTCCAGT
ACCATCAAAGCACGAGGGTATTATCCTCGCACCCCTTTTCCCGGACTAAAGCGGTTTACAACCCGAAGGC
CTTCTTCCCGCACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAAAATCCCCA

>M_A2O_V3_V5_band3

CGTACTGAGTAAATTAATACCCAACAACCAGTTGACATCGTTTAGGGCGTGGA CTACCAGGGTATCTAATC
CTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTGACAGGCCAGGGGATTGCCTTCGCCATCGGTGT
TCCTTCGCATATCTACGCATTTCACTGCTACACGCGAAATTCATCCCCCTCTGCCGCACTCCAGCCTTGCA
GTCACAATGGCCGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACCACTGTCTTGCAAACCGCCTGCGCACGCT

TTACGCCCAGTAATTCCGATTAACGCTCGCACCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGG
TGCTTATTCTTACGGTACCGTCATATGCCCCACGTATTAGGCAGGACCCTTTCGCTCCGTACAAAAGCAGTT
TACAACCCGAAGGCCTTCGTCCTGCACGCGGAATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTGTCCAAAATTCC
CCA

>M_A2O_V3_V5_band4

GTACTCCCCAGGCGGTCAACTTCACGCGTTAGCTTCGTTACTGAGAAAATGAATTCCCAACAACCAGTTGA
CATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCATGAGCGTCA
GTGCAGGCCAGGGGATTGCCTTCGCCATCGGTGTTCCCTCCGCATATCTACGCATTTCACTGCTACACGCG
GAATTCATCCCCCTCTGCCGCACTCCAGCCTTGACGTCACAAAGGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGG
ATTTACCTCTGTCTTACAAAACCGCCTGCGCACGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCT
ACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGTCTATTCTTACGGTACCGTCATGGGCCCTCTGT
ATTAGAGAAGACCTTTTCGTTCCGTACAAAAGCAGTTTACAACCCGAAGGCCTTCGTCCTGCACGCGGAAT
GGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTGTCCAAAATTCCCCA

>M_A2O_V3_V5_band5

TTACCCACCAACACCTAGTTGACATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCC
ACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTATTGGCCCAGGGGGCTGCCTTCGCCATTGGTGTTCCCTCCACATCTC
TACGCATTTCACTGCTACACGTGGAATTCACCCCCCTCTGCCATACTCTAGCCTTCAGTCACAAGCGCA
GTTCCAGGTTGAGCCCCGGGATTTACAGnCTGTCTTAAAAAACCGCCTGCGCACGCTTTACGCCAGTA
ATTCCGATTAACGCTCGCACCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGTCTTTATGC
CGGTACCGTCATCCGCACAGGGTATTAGCCCATGCGATTTCTCCCGGCCGAAAGAGCTTTACAACCCGAA
GGCCTTCTTCACTACGCGGCATGGCTGGATCAGGGTTGCCCCCATTGTCCAAAATTCCCCA

>M_A2O_V3_V5_band6

TTAACCTTGCGGCCGTAACCTTCACGCGTTAGCTGCGGTAATGAGTCTCCTCA
CCGAACAACCTAGTTGACATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTT
TCGTGCATGAGCGTCAGTACTGGCCCAGGAGGCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCCCTCCACATCTCTACGCA
TTTCACTGCTACACGTGGAATTCACCTCCCTCTGCCGTAAGTATGATGCAGTCACAAACGCAGTTCCC
AGGTTGAGCCCCGGGATTTACATCTGTCTTACATCACCGCCTGCGCACGCTTTACGCCAGTAATTCCGA
TTAACGCTCGCACCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGTCTTCTTACGGTACC
GTCATCCACGC

>M_A2O_V3_V5_band7

TACGACACCGAAAAGTCACCCCCCGGCGTCTAGTGTTTCATCGTTTACTGCGTGGACTACCAGGGTATCTA
ATCCTGTTTGCTCCCCACGCCGTCTGTGCTCAGCGTCAGTGTGGCCCCAGACCGCTGCCTTCGCCATCG
GTGTTCTTCCCGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCGGGAGTTCCACGATCCTCTAGCCCACTCTAGCC
CAACCGTCTCAACCGCCATTCCCAGGTTAAGCCCCGGGGCTTTCACGGCTGACTGATTGCGCCGCCTACGC
ACGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTCGACCCCCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTA
GCCGGTGCTTATTCTGCGGGTAACGTCACCCCGAGGCGCTATTACACCCCGGCTTTCCTCCCGCTTAA
AGGGCTTTACAACCCGCAGGCCTTCTTACCCACGCGGCATTGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTGTCCA
ATATTCCCCA

>N_AO_V9_band1

TTACCTGGCCTTGACATCCGGGGAACATCCAGAGATGGATGGTGCCGCAAGGAGCCCCGAGACAGGTGG
TGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCGACCCTTGCCTT
TAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAGAGGGACTGCCAGGGATAACCTGGAGGAAGGTGGGGATGAC
GTCAAATCATCATGCCCTTATGCTTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGGTGGTACAGAGGGCAGCCAAG
TCGTGAGGCGGAGCTAATCCCTTAAAGCCATTCTCAGTTTCGGATTGTAGGCTGAAACTCGCCTACATGAAG
CTGGAGTTACTAGTAATCGCAGATCAGAATGCTGCGGTGAATGCGTTCCCGGGTCTT

>N_AO_V9_band2

AAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCG
GGTTGCAGACTCCAATCCGACTACGAGCGGCTTTTTGGGATTGGCTTCCCCTCGCGGGTTGCGGACCCT
TTGTACCGCCATTGTAGCACGTGTGTGGCCCTGGCCATAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACC
TTCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCCTAGAGTTCCCGGCCGAACCGCTGGCAACTAGGGACAAGGGT

TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTC
GGGGCTCCTTGCGGCACCGTCCATCTCTGGACGTTCCCCGGATGTCAAGGCCAG

>M_A20_V9_band1

AAGACCCGGGAACGCATTACCGCAGCATTCTGATCTGCGATTACTAGTAACCTCCAGCTTCATGTAGGCGA
GTTTCAGCCTACAATCCGAACCTGAGAATGGCTTTAAGGGATTAGCTCCGCCTCACGACTTGGCTGCCCTCT
GTACCACCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTAAGCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTT
CCTCCAGGTTATCCCTGGCAGTCCCTCCAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAAAGGCAAGGGTTGC
GCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCTCGGG
GCTCCTTGCGGCACCTCCCATCTCTGGGAGTTCCCCGGATGTCAAGGGCCAGGTAA

>M_A20_V9_band2_1

AAGACCCGGGAACGTATTACGGCGCTATGCTGACGCGCCATTACTAGCGATTCCAACCTTCAAGAGGGCG
AGTTTCAGCCCTCTATCCGAACCTGGGGGTAGTTTTGATGGGATTTGCTCCACCTTACGGTTTGGCTGCCCA
TTGTACTACCCATTGTAGGACGTGTGTAGCCCGAGGCGTAAGGGCCATGCTGACCAGACGTCATCCCCAC
CTTCCTCCCGGTTGGCCCCGGGCGGTCTCGTATGAAAAGACAACATACGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGG
GACTTAACCCAACATCTCACGGCACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGCGGCAGCCTCGAAGG
CCTCCGATCTTTCGACCGGCATCCAGCCGCATGTCAAGCCCAGGTAA

>M_A20_V9_band2_2

AAGGCCCGGGAACGTATTACCGCGTCATGCTGTTACGCGATTACTAGCGATTCCAACCTTCATGCCGTGCA
GTTGCAGACGACAATCCGAACCTGAGATGGCTTTTGGGGATTAAACCCATTGTCACCACCATTGTAGCACGTG
TGTAGCCCAACCCGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCACACCTTCCTCCGACTTATCATCGGCAGT
TTCCACAGAGTGCCCAACCGAATGCTGGCAACTGGGGACGTGGGTTGCGCTCGTTGCCGGACTTAACCG
AACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCACCCGGCCACCGAAGTGGAACCGC
ATCTCTGCGGCGGTCCGGGGATGTCAAGGGTTGGTAA

>M_A20_V9_band3

TGGGATCGTTTTGGGGATTAGCTCCACCTCGCGGTCTTGCATCCTTCTGTACCGATCATTGTAGCACGTG
TGCAGCCCTGGACATAAGGACCATACTGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCTGCTTATCACAGGCAGT
CTGGCTAGAGTACCGCCTTTCAGCGGGCAACTAGCCACAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAA
CACC

>M_A20_V9_band4

GAGTTGCAGAGTAACAATCCGAACCTGAGACGGCTTTTTGAGATTTGCCAGGGTCGCCCCCTTCGCATCCC
ATTGTCACCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGCCTGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCA
CCTTCCTCGCGGCTTATCACCGGCAGTCCCCCTAGAGTGCCCAACTGAATGATGGCAACTAAGGGCGAGG
GTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTG
TTCGCGCCAGCCGAACCTGAAGGAAGCCATCTCTGGCGACCATACGCGACATGTCAAAGGCTG

>M_A20_V9_band5

CAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTC
GGGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGAGCGGCTTTTTGGGATTGGCTTCCCCTCGCGGGTTGCGGACC
CTTTGTACCGCCATTGTAGCACGTGTGTGGCCCTGGCCATAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCA
CCTTCCTCCGTTTATCACCGGCAGTCTCCCTAGAGTTCCCGGCCGAACCGCTGGCAACTAGGGACAAGG
GTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTG
TCGGGGCTCCTTGCGGCACCTCCCATCTCTGGAAGTTCCCCGGATGTCAAGGCCAG

>M_A20_V9_band6

AAGGCCCGGGAACGTATTACCGCCGCAATGCTGATCGGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTC
GGGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGAGCGGCTTTTTGGGATTGGCTTCCCCTCGCGGGTTGCGAGCC
CTTTGTACCGCCATTGTAGCACGTGTGTGGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCC
ACCTTCCTCCGTTTATCACCGGCAGTCTCCCTAGAGTTCCACCCGAAGTGCTGGCAACTAGGGACAAG
GGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGT
CTCGGGGCTCCTTGCGGCACTGCCCATCTCTGAGCATCCCCCGGATGTCAAGGCCAG

>M_AO_V9_band1_1

AAGACCCGGGAACGTATTCACGGCGATGTAGCTGACTCGCCATTACTAGCAATTCCAACCTTCATGTAGTCG
AGTTGCAGACTACAATCTGAACTGAGGCCGGCTTTTTTAGGATTTGCTCCACCTCGCGGGCTCGCTGCCTT
CTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTAGGCATAAGGGCCATGCTGACTTGACGTCATCCTCACC
TTCCTCCTGGTTAACCCAGGCAGTCTCGTTAGAGTTCCACCTTCACGTGTTGGCAACTAACGATAAGGGT
TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACACCTCACGGCACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGC
AGAGACTCTTACGAGAGGCACCATTTCTGGTGCTGTCCTCTGCATGTCAAGCCTAGGTAA

>M_AO_V9_band1_2

TTACCTACCCTTGACATGTCTGGAACCTTGCTGAGAGGCGAGGGTGCCCTTCGGGAGCCAGAACACAGGTG
CTGCATGGCTGTCTGCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTC
CTAGTTGCCATCATTTGGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA
CGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTACATAATGGTTGGTACAGAGGGCAGCCAA
GTCGTGAGGCGGAGCTAATCCCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGAAACTCGCTACATGAA
GCTGGAGTTACTAGTAATCGCAGATCAGAATGCTGCGGTGAATGCGTTCCCGGGTCTT

>M_AO_V9_band2_1

AACTGGGGGACGGTTTTTGCATTGCTCCaCCTCGCGGTCTTGCGTCGCTTTGTCCGGCCCATTGTAGTA
CGTGTGCAGCCCTAGGCATAAGGGCCATGATGACTTGACGTCTCCCGCCTTCTCCGGTTTAATACCG
GCGGTCTGTCCAGAGTCCCGCCTTTACGCGCTGGCAACTGGACACAAGGGNTTCGCTCGTTACGGGAC
TTAaCCCAACACCTCACGGCACGAGtGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGCAGATTCCACCTTGCGGCG
TCACCGACGTTTCCGCCGGCTAATCCTGCATGTCAAGCCTAGGTAAGGTTCTTCG

>M_AO_V9_band2_2

GTCGAGTTGCAGACGACAATCCGAACCTGAGATGGCTTTTTGGGGATTAAACCCACTGTCACCACCATTGTAGC
ACGTGTGTAGCCCAACCCGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCTACACACCTTCTCCGACTTATCATCG
GCAGTTCTCCAGAGTGCCAGCTTGACCTGCTGGCAACTGGGAGTGTGGGTTGCGCTCGTTGCCGGAC
TTAACCGAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTGGCGTCCAGCCGAACCTGA
AGGATACCGTCTCCGGTAACCGCGACGCCCATGTCAAGGGTTG

>M_AO_V9_band3

TACGAGCGGCTTTTTGGGATTGGCTTCCCCTCGCGGGTTCGCGACCCTTTGTACCGCCCATTGTAGCACG
TGTGTGGcCCTGGCCATAAGGGCCATGATGACTTGACGTcTCCCCACCTTCTCCGGTTTATCACCGGcA
GTCTCCCTAGAGTTCCCGGcCGAACCGCTGGCAACTAGGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAC
CCAACATCTCACGACACGAGTTGaTGACAGCCATGCAGCAcCTGTCTCGGGGCTCCTTGCGGCACCGcCC
ATCTCTGGAAGTTCCCCGGATGTCAAGGCCaGGTAAGGTTCTTCGc

>M_AO_V9_band4

AAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCG
GGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGAGCGGCTTTTTGGGATTGGCTTCCCCTCGCGGGTTTCGCGACCCT
TTGTACCGCCCATTGTAGCACGTGTGTGGCCCTGGCCATAAGGGCCATGATGACTTGACGTCTATCCCCACC
TTCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCCTAGAGTTCCCGGCCGAACCGCTGGCAACTAGGGACAAGGGT
TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTC
GGGGCTCCTTGCGGCACCGTCCATCTCTGGACGTTCCCCGGATGTCAAGGCCAG

謝辞

修士課程の二年間の結果を本論文にまとめるにあたり、様々な方々からご指導、助言を頂くことが出来た事に対してこの場を借りて御礼申し上げたいと思います。

指導教官である味埜俊教授、佐藤弘泰助教授(新領域創成科学研究科環境学専攻社会文化環境コース)からは本研究を進めるにあたり様々な助言を頂き、深く感謝致します。気がつく和研究の舵取りをあらぬ方向へ向けてしまいがちな私に的確な助言を与え、研究の方向性を正して頂きました。また、PHA に関しては無知に等しかった私を見捨てずに様々な知見を与えてくれたことに感謝致します。

小貫元治講師(サステナビリティ学連携研究機構)には実験計画ならびに実験方法に関して詳細な助言を頂きました。深くお礼を申し上げます。

浦川秀敏助教授(先端海洋システム研究センター)には本論文の副査を快く引き受けて頂いた上、ディスカッションの場を提供して頂き、深く感謝致します。

金川貴博、川原崎守博士(産業技術総合研究所生物機能工学研究部門)には産業総合研究所において micromanipulation を用いた研究を行う場を提供して頂き、深く感謝致します。奥貫優さん(筑波大学生命科学研究科博士課程)には、micromanipulation の具体的な操作法および、その後の研究活動に対して様々な助言を頂きました。三ヶ月の短い期間でありましたが、産業総合研究所での研究活動は様々な意味で新鮮であり、魅力的なものでした。修士課程において、このような経験をすることができたことを非常にうれしく思います。

本研究の実験は 9、14 号館にまたがって行いましたが、実験に当たって様々な方々の助言やサポートを頂きました。特に本研究室のメンバーである道中敦子博士(サステナビリティ学連携研究機構・研究員)、AdelineChua Seak May さん、小田和賢一さん、末岡一男さん、福島寿一さん(新領域創成科学研究科博士課程)には、本研究の方向性や、具体的な実験方法に関してディスカッションおよび「盃」を交えさせて頂きました。深く感謝致します。

技官である中川博之さん、唐沢祥嗣さんには実験室の使い方から物品の発注まで様々なサポートを頂きました。本当にありがとうございました。

また、都内の処理所の職員の方々には活性汚泥採取を快く引き受けて頂きました。深く感謝致します。

そして、修士課程において私の精神的な支えとなった父と姉に心の底より感謝致します。また、ここには書ききることのできなかった様々な方々のサポートなしには、この論文を書き上げることはできませんでした。ありがとうございます。

平成 18 年 1 月 31 日