

表3. つくば市水の試験結果

条件	経過日数 (Days)	0	2	7	14	21
	検査項目					
45°C 水	A T P (RLU)	4	38	17	710	199
	一般細菌 (CFU/mL)	0	3	3	10	0
	従属栄養細菌 (CFU/mL)	24	1	0	36000	19000
	レジオネラ (CFU/100mL)	<10	<10	<10	<10	<10
50°C 水	A T P (RLU)	4	8	54	270	158
	一般細菌 (CFU/mL)	0	0	6	4	1
	従属栄養細菌 (CFU/mL)	24	0	20	3 (真菌 5個)	0
	レジオネラ (CFU/100mL)	<10	<10	<10	<10	<10
55°C 水	A T P (RLU)	4	42	171	176	132
	一般細菌 (CFU/mL)	0	12	0	0	0
	従属栄養細菌 (CFU/mL)	24	0	0	1	20
	レジオネラ (CFU/100mL)	<10	<10	<10	<10	<10
45°C シリコン板	A T P (RLU)	0	NT	13	150	496
	一般細菌 (CFU/mL)	0	NT	0	35	71
	従属栄養細菌 (CFU/mL)	0	NT	10	220000	8 (広がるコロニー)
	レジオネラ (CFU/mL)	<10	NT	<10	<10	<10
50°C シリコン板	A T P (RLU)	0	NT	17	17	6
	一般細菌 (CFU/mL)	0	NT	3	1	0
	従属栄養細菌 (CFU/mL)	0	NT	4	0	1
	レジオネラ (CFU/mL)	<10	NT	<10	<10	<10
55°C シリコン板	A T P (RLU)	0	NT	8	7	4
	一般細菌 (CFU/mL)	0	NT	1	0	0
	従属栄養細菌 (CFU/mL)	0	NT	0	0	2
	レジオネラ (CFU/mL)	<10	NT	<10	<10	<10

表4. 茨城県温泉水の試験結果

条件	経過日数 (Days)	0	2	7	14	21	22 追加1日目	24	28
検査項目									
45°C 水	A T P (RLU)	14	12	3	18	16	39	11	14
	一般細菌 (CFU/mL)	20	19	4	3	9	31	4	1400
	従属栄養細菌 (CFU/mL)	3100	7	38	3	20	30	26	2000
	レジオネラ (CFU/100mL)	<10	<10	<10	<10	<10	30	<10	<10
50°C 水	A T P (RLU)	14	6	13	16	19	9	4	9
	一般細菌 (CFU/mL)	20	0	1	3	1	0	2	1
	従属栄養細菌 (CFU/mL)	3100	0	13	0	0	2	1	0
	レジオネラ (CFU/100mL)	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
55°C 水	A T P (RLU)	14	8	5	8	53	47	18	201
	一般細菌 (CFU/mL)	20	0	0	3	0	0	2	0
	従属栄養細菌 (CFU/mL)	3100	1	10	5	0	2	0	1
	レジオネラ (CFU/100mL)	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
45°C シリコン板	A T P (RLU)	0	NT	32	42	54	NT	NT	793
	一般細菌 (CFU/mL)	0	NT	5	160	270	NT	NT	250
	従属栄養細菌 (CFU/mL)	0	NT	14	330	2	NT	NT	450
	レジオネラ (CFU/mL)	<10	NT	<10	<10	<10	NT	NT	<10
50°C シリコン板	A T P (RLU)	0	NT	33	8	10	NT	NT	108
	一般細菌 (CFU/mL)	0	NT	50	5	4	NT	NT	4
	従属栄養細菌 (CFU/mL)	0	NT	40	20	17	NT	NT	9
	レジオネラ (CFU/mL)	<10	NT	<10	<10	<10	NT	NT	<10
55°C シリコン板	A T P (RLU)	0	NT	41	30	88	NT	NT	92
	一般細菌 (CFU/mL)	0	NT	14	14	15(真菌)	NT	NT	43
	従属栄養細菌 (CFU/mL)	0	NT	12	27	57	NT	NT	47
	レジオネラ (CFU/mL)	<10	NT	<10	<10	<10	NT	NT	<10

表5. 汚染した浴槽水（1回目）の試験結果

条件	経過日数 (Days)	0	2	7	14
40°C 水	検査項目				
	A T P (RLU)	14	136	319	280
	一般細菌 (CFU/mL)	6500	32000	3300	3700
	従属栄養細菌 (CFU/mL)	120000	110000	450000	600000
50°C 水	レジオネラ (CFU/100mL)	<10	160	34000	>100000
	A T P (RLU)	14	158	49	14
	一般細菌 (CFU/mL)	6500	17	28	39
	従属栄養細菌 (CFU/mL)	120000	19 (広がるコロニ)	30	48
55°C 水	レジオネラ (CFU/100mL)	<10	<10	150	<10
	A T P (RLU)	14	164	111	143
	一般細菌 (CFU/mL)	6500	13	0	0
	従属栄養細菌 (CFU/mL)	120000	10	4	0
40°C シリコン板	レジオネラ (CFU/100mL)	<10	<10	<10	<10
	A T P (RLU)	0	2177	669	774
	一般細菌 (CFU/mL)	0	47000	70000	40000
	従属栄養細菌 (CFU/mL)	0	180000	130000	600000
50°C シリコン板	レジオネラ (CFU/mL)	<10	20	32000	89000
	A T P (RLU)	0	10	82	16
	一般細菌 (CFU/mL)	0	77	300	65
	従属栄養細菌 (CFU/mL)	0	100	370	210
55°C シリコン板	レジオネラ (CFU/mL)	<10	<10	230	50
	A T P (RLU)	0	9	30	11
	一般細菌 (CFU/mL)	0	140	210	120
	従属栄養細菌 (CFU/mL)	0	190 (広がるコロニ)	370	15
	レジオネラ (CFU/mL)	<10	<10	20	50

表6. 汚染した浴槽水（2回目）の試験結果

条件	経過日数 (Days)	0	2	7	14	21
	検査項目					
50°C 水	A T P (RLU)	10	158	101	46	18
	一般細菌 (CFU/mL)	4000	28	1	0	0
	従属栄養細菌 (CFU/mL)	140000	15	0	0	1
	レジオネラ (CFU/100mL)	880	<10	10	<10	<10
55°C 水	A T P (RLU)	10	132	217	57	113
	一般細菌 (CFU/mL)	4000	12	1	0	0
	従属栄養細菌 (CFU/mL)	140000	7	0	0	1
	レジオネラ (CFU/100mL)	880	<10	<10	<10	<10
60°C 水	A T P (RLU)	10	42	171	176	132
	一般細菌 (CFU/mL)	4000	12	0	0	0
	従属栄養細菌 (CFU/mL)	140000	0	0	1	20
	レジオネラ (CFU/100mL)	880	<10	<10	<10	<10
50°C シリコン板	A T P (RLU)	0	7	14	5	4
	一般細菌 (CFU/mL)	0	64	19	20	14
	従属栄養細菌 (CFU/mL)	0	60	29	13	180
	レジオネラ (CFU/mL)	<10	<10	<10	<10	<10
55°C シリコン板	A T P (RLU)	0	18	11	7	5
	一般細菌 (CFU/mL)	0	200	350	9	3
	従属栄養細菌 (CFU/mL)	0	220	560	10	26
	レジオネラ (CFU/mL)	<10	<10	<10	<10	<10
60°C シリコン板	A T P (RLU)	0	7	19	19	11
	一般細菌 (CFU/mL)	0	5	410	10	31
	従属栄養細菌 (CFU/mL)	0	10	230	24	20
	レジオネラ (CFU/mL)	<10	<10	<10	<10	<10

(6) 試験結果の要約

今回の試験結果について、微生物層が安定してきたと考えられる、試験開始14日目についてデータを抽出したものを、表7と表8に示す。

表7は、水中の細菌数などの値を、表8はシリコン板の細菌数などの値を示している。

表7. 試験開始14日目の水中の細菌数などのデータ(空欄は試験未実施)

条件	経過日数(Days)		水道水	茨城温泉水	汚染浴槽水 (1)	汚染浴槽水 (2)
	検査項目					
40℃ 水	A T P (RLU)				280	
	一般細菌 (CFU/mL)				3700	
	従属栄養細菌 (CFU/mL)				600000	
	レジオネラ (CFU/100mL)				>100000	
45℃ 水	A T P (RLU)		710	18		
	一般細菌 (CFU/mL)		10	3		
	従属栄養細菌 (CFU/mL)		36000	3		
	レジオネラ (CFU/100mL)		<10	<10		
50℃ 水	A T P (RLU)		270	16	14	46
	一般細菌 (CFU/mL)		4	3	39	0
	従属栄養細菌 (CFU/mL)		3(真菌5個)	0	48	0
	レジオネラ (CFU/100mL)		<10	<10	<10	<10
55℃ 水	A T P (RLU)		176	8	143	57
	一般細菌 (CFU/mL)		0	3	0	0
	従属栄養細菌 (CFU/mL)		1	5	0	0
	レジオネラ (CFU/100mL)		<10	<10	<10	<10
60℃ 水	A T P (RLU)					176
	一般細菌 (CFU/mL)					0
	従属栄養細菌 (CFU/mL)					1
	レジオネラ (CFU/100mL)					<10

- ・40℃ではレジオネラ属菌も含めて細菌類が著しく増殖する。
- ・45℃では、水道水で従属栄養細菌数が高く、茨城温泉水は増殖の程度は小さい。
- ・50℃では著しい細菌類の増殖は認められないが、55℃以上の場合、より一層増殖抑制していると考えられる。

表 8. 試験開始 1 4 日目のシリコン板の細菌数などのデータ (空欄は試験未実施)

条件	経過日数 (Days) 検査項目	水道水	茨城温泉水	汚染浴槽水	
				(1)	(2)
40℃ シリコン 板	A T P (RLU)			774	
	一般細菌 (CFU/mL)			40000	
	従属栄養細菌 (CFU/mL)			600000	
	レジオネラ (CFU/mL)			89000	
45℃ シリコン 板	A T P (RLU)	150	42		
	一般細菌 (CFU/mL)	35	160		
	従属栄養細菌 (CFU/mL)	220000	330		
	レジオネラ (CFU/mL)	<10	<10		
50℃ シリコン 板	A T P (RLU)	17	8	16	5
	一般細菌 (CFU/mL)	1	5	65	20
	従属栄養細菌 (CFU/mL)	0	20	210	13
	レジオネラ (CFU/mL)	<10	<10	50	<10
55℃ シリコン 板	A T P (RLU)	7	30	11	7
	一般細菌 (CFU/mL)	0	14	120	9
	従属栄養細菌 (CFU/mL)	0	27	15	10
	レジオネラ (CFU/mL)	<10	<10	50	<10
60℃ シリコン 板	A T P (RLU)				19
	一般細菌 (CFU/mL)				10
	従属栄養細菌 (CFU/mL)				24
	レジオネラ (CFU/mL)				<10

- ・シリコン板の微生物の定着度合いは、50℃以上で少なくなっていると判断する。
- ・汚染浴槽水の試験において、レジオネラ属菌が、50℃、55℃でも検出されている。

#### D. 結論

貯湯槽、原泉貯槽を模擬した試験装置を用いて、貯留水の温度を変化させて、水中の微生物類、およびシリコン板を用いた壁面への付着微生物等の調査を行った結果、以下の結論を得た。

- ①水温が 45℃以下の場合、水中及び壁面に微生物が定着する危険性が高い。
- ②水温が 50℃、55℃の場合は、水中の微生物量は少なくなるが、シリコン板には水質によっては微生物類が付着して存在する。レジオネラ属菌が検出される場合もある。
- ③水温が 60℃の場合も 55℃と同様の挙動である。
- ④水温を 50℃以上とすることで、水中及び付着性の微生物量は著しく抑制される。  
従って、貯湯槽の水温を 50℃以上に維持することは微生物の増殖抑制に有効である。
- ⑤条件によっては 50℃及び 55℃でバイオフィーム中からレジオネラ属菌が検出される場合があるので注意が必要である。

E. 文献

なし

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金(地域健康危機管理研究事業)  
掛け流し式温泉における適切な衛生管理手法の開発等に関する研究

分担研究報告書

PCR-DGGE 法による掛け流し式浴槽等環境中の細菌叢の解析

分担研究者 遠藤卓郎 (国立感染症研究所寄生動物部)  
黒木俊郎 (神奈川県衛生研究所)  
烏谷竜哉 (愛媛県立衛生環境研究所)  
研究協力者 関根 寛 (国立感染症研究所寄生動物部)  
泉山信司 (国立感染症研究所寄生動物部)

概要

掛け流し式の浴槽内の細菌叢は配管系と異なり、浴槽独自に発達することが示唆されている。当該研究では PCR-DGGE 法を用いて浴槽水の細菌叢を質的に捉えることを目的に詳細な解析を行い、管理への反映について考察した。新たに4施設の湯口と浴槽水を対象とした PCR-DGGE 法による細菌叢の解析により、1施設では湯口と浴槽水のバンドパターンに変化が認められなかったものの、他の3施設では浴槽水において新たに強いバンドが出現しており、浴槽中で細菌の相転移が確認された。前者は浴槽水の換水・洗浄が徹底されている施設と考えられ、後者は浴槽水に固有の DGGE パターンが出現していることから浴槽の清掃不備が指摘される。なお、施設間の比較では、湯口、浴槽水を問わずバンドに共通性が低くそれぞれの施設で固有の細菌叢が増殖しているものと考えられた。浴槽水における DGGE のバンドパターンも複雑化するばかりではなく単純化する場合もあり、浴槽によっては特定の細菌由来のバンドが泳動像のレーン内強度の 40%以上を占める場合も観察された。なお、コロニーPCR 法では *Sphingomonas* 属の配列が最も高頻度に得られた(27/127 回、21%)。

湯口水から各種細菌が分離されており、掛け流し式浴槽施設においては貯湯槽・配管の管理の必要性が指摘される。

A. 目的

掛け流し式浴槽は循環式と異なり浴槽水を再利用しないことからレジオネラ属菌汚染は少ないと考えられてきたが、循環式に比べて掛け流し式浴槽がより高率に汚染されている実態が明らかとなっている。掛け流し式浴槽では、貯湯タンクあるいは配管系のレジオネラ汚染が問題と考えられる。当該研究では掛け流し式施設の貯湯タンク、配管、湯口、浴槽より試料水を得て

PCR-DGGE 法を用いた細菌叢を解析した。

掛け流し式における貯湯槽配管汚染の問題を受け、湯口付近に紫外線照射装置を設置することでレジオネラ対策が試みられたが(遠藤ら、平成17年度)、導入後も浴槽水からのレジオネラ属菌の検出が続き、浴槽内でのレジオネラ発生が改めて指摘された。これに加えて、浴槽水の細菌叢が湯口より上流の配管系とは全く異なる事例も報告されている(遠藤ら、平成17年



度)。

当該研究では複数の掛け流し式浴槽より試料を得て、浴槽内の細菌叢が湯口・配管とは独立して発生することの確認と、その微生物汚染を質的に捉えることを目的として PCR-DGGE 法による細菌叢の解析を実施した。PCR-DGGE 法は GC クランプつきユニバーサルプライマーを用いて PCR を行い、得られた増幅産物を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE 法) により塩基配列の GC 含有量の違いにより分別・同定する方法である (Muyzer et al., 1995)。

## B. 方法

PCR-DGGE 法に用いた試料水は 5 自治体の協力を得て計 5 施設より、源泉タンク、湯口、UV 殺菌装置の前後、並びに浴槽等より各 500ml を採取した。一部施設では過去に調整した DNA 試料も経年変化の検討に使用した。試料水は孔径 0.22 $\mu$ m 直径 47mm の PTFE フィルター (Millipore) でろ過濃縮後、ハイブリバッグを用いて TE 緩衝液中で濃縮物を剥離回収し、室温条件下 7000 $\times$ g で 10 分間遠心濃縮した。濃縮物 (沈さ) に対して 20mg/ml の Lysozyme を添加し、40 $^{\circ}$ C で 15 分間の溶解処理後、0.2mg/ml の Proteinase K と、0.15M NaCl、0.1% TritonX-100 を含む TE 緩衝液を添加し、60 $^{\circ}$ C で 30 分間溶解処理を行った。溶解後は PMSF を 0.1mM となるよう添加し、これを鋳型 DNA とした。PCR 阻害物質が多く含まれる場合はカラム精製 (Qiagen) を実施した。

PCR-DGGE 法は Muyzer ら (1995) の方法に従った。すなわち、PCR プライマーに原核生物の 16S rRNA の一部領域を標的とした GC クランプ付きの GC-341F (5'- CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC GCC TAC GGG AGG CAG CAG - 3') 並びに 907R (5'- CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT - 3', R=A or G) を用いた。アンダーラインで示した GC クランプは、DGGE 泳動の際に 2 本鎖 DNA が 1 本鎖 DNA に完全解離して流れ去ることのない様に付加された配列である。PCR 試薬は Ex Taq Hot Start version (Takara) を使用し、Ex Taq Buffer (5 $\mu$ l)、0.2mM each dNTP Mixture、250 $\mu$ M Forward/Reverse Primer、2.5U Ex Taq 酵素、鋳型

DNA 1 $\mu$ l を含む 50 $\mu$ l の反応液で行った。PCR のプログラムはタッチダウン PCR とし、65 $^{\circ}$ C から 55 $^{\circ}$ C まで 1 サイクル毎にアニール温度を 0.5 $^{\circ}$ C 低下させた。サイクル数は良好な増幅産物が得られるように鋳型量に合わせて計 30 サイクルから 40 サイクルの間で調整した。PCR 産物は 2% アガロースで電気泳動を行い、増幅を確認した。

DGGE 法には D-Code システム (BioRad) を用いた。ポリアクリルアミドゲルの濃度は 6% で、ホルムアミド濃度勾配は 20 から 60% とした。泳動条件は 1 $\times$ TAE 緩衝液 (BioRad) 中で 60 $^{\circ}$ C、70V 定電圧とし、13 時間泳動した。泳動マーカーとしてレジオネラ属菌 (*Legionella pneumophila* SG1 環境分離株)、温泉細菌用マーカー (H 温泉水から分離作成したもの、平成 17 年度当該研究) を使用した。泳動後は 1 $\times$ SYBRGold を用いて染色後、VisiBlue トランスイルミネーターで観察・撮影を行った。得られたバンドは必要に応じて個々に解析を行った。すなわち、バンドをカッターの刃で小さく切り出し、滅菌水で 1 回すすいでホルムアミドを除去した後、再度滅菌水に懸濁し、これを鋳型に PCR を行い再増幅した。再増幅産物は単一のバンドになったことを DGGE 法で確認後、直接塩基配列決定を行った。バンド強度の測定に Scion Image (Scion corporation) を使用した。

塩基配列決定では、ABI PRISM BigDye Terminator V1.1 (Applied Biosystems) ならびに ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を使用した。PCR 産物は QIAquick PCR purification キット (Qiagen) を用いて残留プライマーを除去した。塩基配列決定用のプライマーには 341F の 3' 末より 20 残基と、907R を用い、両鎖の配列を取得した。得られた塩基配列は Blast 検索により DDBJ/GenBank/EMBL に登録されている既存の塩基配列との比較を行った。検索結果では培養されていない配列に一致することが多いことから、一致率が最も高かった配列の情報、並びに 98% の一致率を目安として種名を有する配列の情報を列挙した。アライメントの作成は PileUp (GCG Wisconsin Package Version 10.3, Accelrys) を使用した。系統樹の作成は MEGA2 (Kumar et al., 2001) を用いて近接結合法 (NJ 法) で行なった。

浴槽水の従属栄養細菌は R2A 寒天平板培地を用いて 42°C で 7 日間培養した。一般細菌は標準寒天培地を用いて 36°C で 48 時間培養した。コロニーをチューブに取って溶解処理を行い、これを鋳型として PCR を行なった。プライマーには 341F の 3' 末より 20 残基と、907R を用いた。PCR 産物は 2% アガロースで電気泳動を行って増幅を確認し、直接塩基配列決定を行なった。

### C. 結果および考察

掛け流し式浴槽の細菌叢は貯湯槽、配管の汚染による細菌叢を反映すると考え、配管の汚染を DGGE パターンの変化として捉えてきた(図 1、レーン 1、2)。ここで、バンドの増加は微生物種の増加、バンドの本数は細菌叢の多様性、バンドの強弱の変化は優先種の交代を表す。バンドの消長は細菌叢の入れ替わりを意味する。これまでの報告では湯口と浴槽で異なったパターンが得られ、浴槽に固有の細菌の増殖が示唆されていた。これを受けて当該研究では独立した 4 箇所の掛け流し式温泉より採取し、浴槽水と湯口の細菌叢を DGGE パターンとして比較した。Y 温泉では浴槽の DGGE パターンが湯口のパターンをよく反映しており(レーン 3 と 4)、浴槽の清掃が適切に行われていたものと判断された。一方、I 温泉では湯口のパターンに比べて浴槽水の DGGE パターンは主要バンドの位置が異なった位置に出現していた(レーン 5-7 と 8)。M 温泉では湯口のバンドが薄れて浴槽において新たなバンドが出現した(レーン 11 と 12)。K 温泉では I 温泉同様に、湯口のバンドを残したまま複数のバンドの集中する領域が上方に生じていた(レーン 15 と 16)。なお、昨年度のパターンとの比較では強弱の変化と多少の菌種の増減が認められたが、主たるバンドの位置に変化が無く、細菌叢の経時的変化は少ないことが確認された(レーン 2 と 3、ならびにレーン 6 と 7)。

浴槽に固有の細菌叢が発達することが確認された H 温泉に集中して、質的な検討を行なった(図 2)。当該施設の DGGE パターンは湯口より上流の貯湯槽、配管で共通のパターンが得られている(レーン 1、2、4、5、6、9、12)。一方、浴槽の細菌叢は湯口とは異なっていた(レーン 3、7、8、10、11)。浴槽は露天と内湯の 2

つがあり、日をかえて複数回試料を採取したが、ほぼ共通のパターンを示していた。H 温泉施設はレジオネラ属菌の発生に苦慮していたことから、高濃度塩素と物理洗浄による徹底的な浄化を行い、その前後で DGGE パターンの変化を追跡した(図 2B)。洗浄前の浴槽のパターン(レーン 13)は、徹底的な消毒洗浄により、湯口(レーン 15)と同じパターン(レーン 14 洗浄直後)へと改善された。ところが洗浄から 1 日経過後(レーン 16)は最も強かったバンドがまず回復し、2 日経過後(レーン 18)には他のバンドが回復し、3 日経過後は(レーン 20)は洗浄前(レーン 13)とパターンの強弱がほぼ揃った状態に戻ってしまった。すなわち、浴槽の細菌叢は短時間で復元される事が明らかとなった。3 日経過後の試料水からはレジオネラ属菌も検出された(data not shown)。この浴槽はタイル張りであったが一部に木製の構造があり、温度を均一にするための配管も設備され、日常の清掃管理では手の届かない場所が存在した。掛け流し式浴槽であっても適切な設備の設置と管理を行なわなければ浴槽は容易にレジオネラ属菌の発生を招くものと考えられた。なお、浴槽の DGGE パターンで最も強いバンドは、*Tepidimonas* に近縁の配列(99%一致、543/548bp)であった。泳動像のデンストグラフによる定量ではレーン内(レーン 16)の相対強度として 43% を占め、当該施設の浴槽では常に優先してこのバンドが現れていた。

H 温泉浴槽水では PCR-DGGE 法と平行して、R2A ならびに標準寒天培地を用いた培養を行い、コロニー PCR/直接塩基配列決定により培養で検出される菌種を確認した(表 1)。日を変えて採取した 9 試料を培養した 31 枚の R2A 培地より 106 コロニー、9 枚の標準寒天培地より 21 コロニーの計 127 コロニーの配列を決定した。R2A 培地と標準寒天培地では同じ傾向の分離頻度が得られた。最も高頻度な検出は *Sphingomonas* 属の 22% (23/106 コロニー、R2A 培地上)で、DGGE 法でも検出されていた(図 2、レーン 3 のバンド 2、レーン 13 のバンド 3 等)。ちなみに、*Sphingomonas* 属はグラム陰性菌で、リポ多糖を含まず、その代わりにスフィンゴ糖脂質を外膜に含む変わった細菌のグループとして知られる(White et al., 1996)。環境汚染物質(例えば高分子 PEG、PCB、原油、ダイオキシン、芳香族化

合物その他)の分解に強く、バイオレメディエーションの切り札と期待されている。

DGGE 法で同定された細菌類には *Tepidimonas*、*Luteococcus*、*Pseudomonas*、*Mycobacterium*、*Staphylococcus* など病原種を含む属も含まれていた。しかしながら、多くは環境分離株の配列と一致していたが、ヒトとの関連性については今後とも注意していく必要があると考える。

DGGE 法並びにコロニーPCR 法から当該研究で得た配列のアライメントを図3に、系統樹を図4に示した。*Tepidimonas*と*Sphingomonas*は浴槽から高い割合で分離されるが湯口から分離されることはほとんど無いなど、浴槽から分離される細菌叢は湯口より上流から分離されるグループと系統的に異なる傾向があるものと考えられた。

#### D. 結論

浴槽では貯湯槽、配管とは異なる独自の細菌叢が発生することを複数の施設で確認した。DGGE 法とコロニーPCR 法で *Tepidimonas*、*Sphingomonas* など浴槽水中における優占種が存在する一方で細菌叢の多様性が示された。また、一旦浴槽内に細菌類が定着するとその除去は容易でなく、日々の洗浄の重要性が改めて認識される。終日流し続けるいわゆる見なし換水では希釈効果は期待できても除去には至らず、その意味では循環式浴槽と同じ問題を抱えていると言える。掛け流し式浴槽における管理上の選択は循環式浴槽の管理方法と大きく変わるところはなく、徹底した浴槽の洗浄・消毒か塩素の注入のいずれかである。

#### E. 参考文献

1 Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 1993 Mar;59(3):695-700.

2 Ko KS, Lee NY, Oh WS, Lee JH, Ki HK, Peck KR, Song JH. *Tepidimonas arfidensis* Sp. Nov., a Novel Gram-negative and thermophilic bacterium isolated from the bone marrow of a patient with leukemia in Korea. *Microbiol Immunol.* 2005;49(8):785-8.

3 遠藤卓郎ら、PCR-DGGE 法による給湯配管系等水環境中の細菌叢の解析、厚生労働科学研究費補助金(健康科学総合研究事業)「掛け流し式温泉における適切な衛生管理手法の開発等に関する研究」(主任研究者:井上博雄)平成17年度研究報告書

4 遠藤卓郎ら、紫外線殺菌装置の有効性評価、厚生労働科学研究費補助金(健康科学総合研究事業)「掛け流し式温泉における適切な衛生管理手法の開発等に関する研究」(主任研究者:井上博雄)平成17年度研究報告書

5 White DC, Sutton SD, Ringelberg DB. The genus *Sphingomonas*: physiology and ecology. *Curr Opin Biotechnol.* 1996 Jun;7(3):301-6.

6 Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics.* 2001 Dec;17(12):1244-5.

#### G.F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

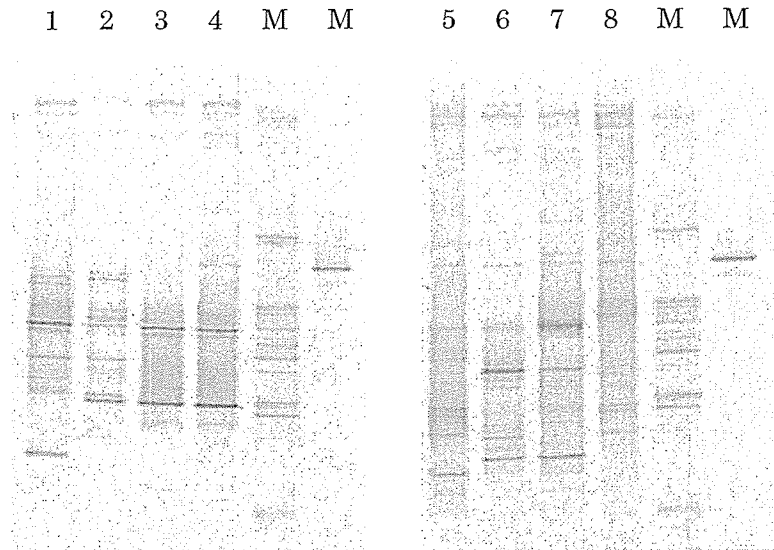
##### 2. 学会発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

A) Y 温泉、I 温泉



B) M 温泉、K 温泉

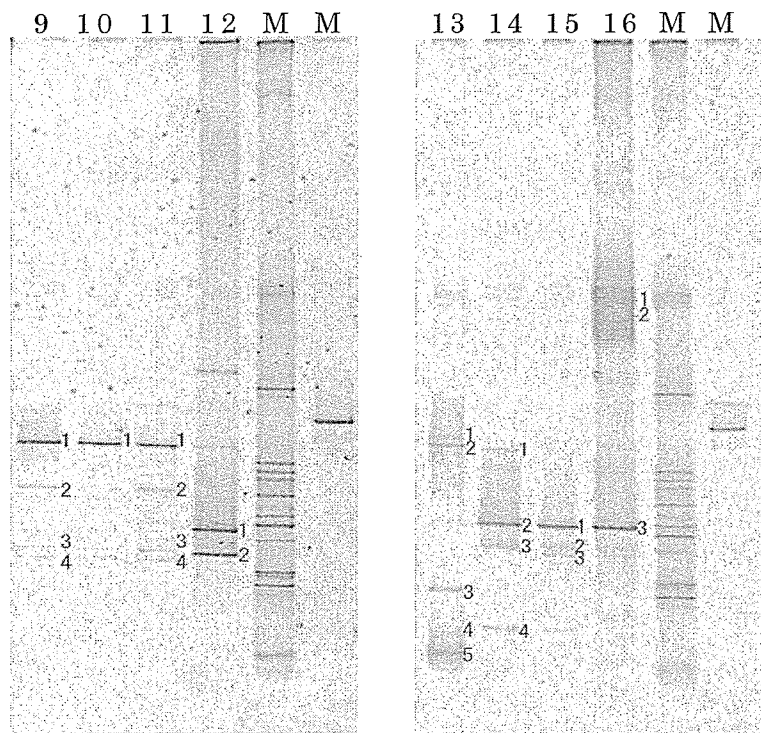
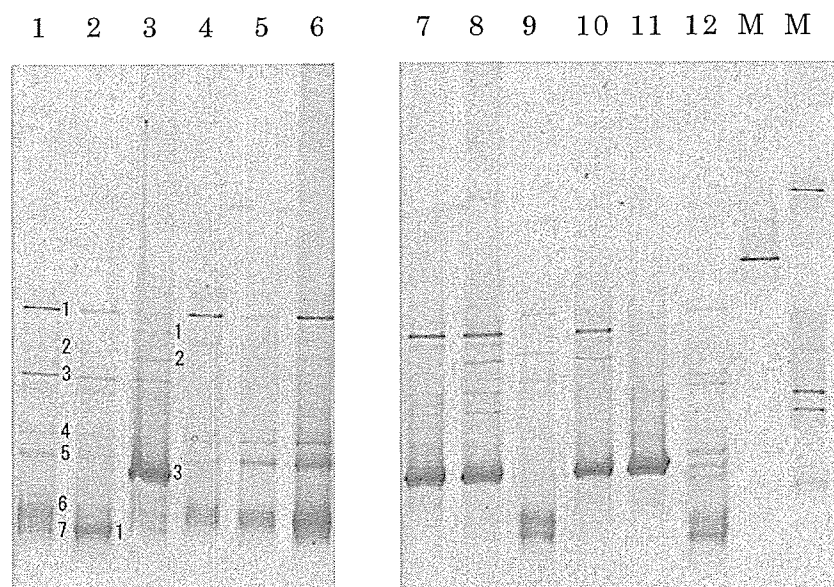


図1 4つの温泉における浴槽水の DGGE パターン

- A) レーン 1: Y 温泉貯湯槽 2005 年、2: 同湯口 2005、3: 湯口 2006、4: 浴槽水 2006、M: マーカー、  
 レーン 5: I 温泉貯湯槽 2005 年、6: 湯口 2005、7: 湯口 2006、8: 浴槽水 2006
- B) レーン 9: M 温泉源泉 (数字は塩基配列を決定したバンド、配列の名称は eh11~eh14 に対応する)、  
 10: 貯湯槽 (eh21)、11: 湯口 (eh3n、n は 1~4 の数字)、12: 浴槽水 (eh4n)、M: マーカー、  
 レーン 13: K 温泉源泉 (ka1n)、14: 貯湯槽 (ka2n)、15: 湯口 (ka3n)、16: 浴槽水 (ka4n)、  
 M: マーカー。

A) H 温泉



B) H 温泉洗浄前後

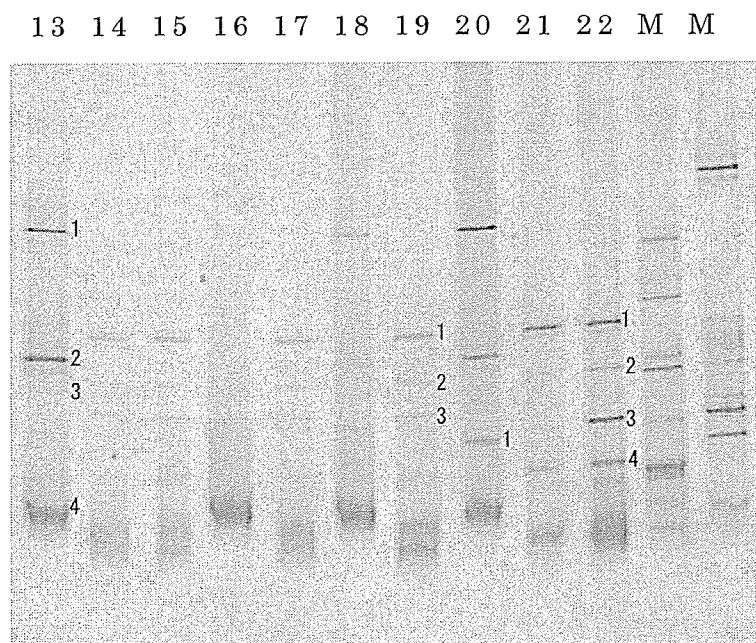


図 2 H 温泉の DGGE パターン

- A) レーン 1: 貯湯槽底 (バンド横の数値は塩基配列を決定したバンドで、図 3、4 の配列 yo3ix、x は 1~4 の数字、と対応する)、2: 湯口、3: 露天浴槽 (yo3hax)、4: 貯湯沈殿、レーン 5: 配管内壁、6: 配管内壁、7: 露天浴槽、8: 内湯浴槽、9: 湯口、10: 内湯浴槽、11: 露天浴槽、12: 湯口、M: マーカー
- B) 13: 洗浄前浴槽 (yo511x)、14: 洗浄直後浴槽、15: 湯口、16: 1 日後浴槽、17: 湯口、18: 2 日後浴槽、19: 湯口 (yo517x)、20: 3 日後浴槽 (yo5181)、21: 貯湯槽、22: 水位計 (yo520x)、M: マーカー。

表 1 コロニーPCR による浴槽水中の細菌の配列と頻度

属	コロニー分離数		配列一致率	備考
	R2A 培地	標準寒天培地		
<i>Sphingomonas</i>	23 (22%)	4 (19%)	100%	
<i>Caldimonas</i>	12 (11%)	2 (10%)	100%	
<i>Pelomonas</i>	10 (9%)	2 (10%)	100%	
<i>Porphyrobacter</i>	8 (8%)		100%	
<i>Pseudomonas</i>	3 (3%)	4 (19%)	100%	(環境)
<i>Microbacterium</i>	4 (4%)	2 (10%)	100%	(ヒト口腔分離株)
<i>Silanimonas</i>	5 (5%)		99%	
<i>Caulobacter</i>	2 (2%)	2 (10%)	99%	
<i>Tepidimonas</i>	4 (4%)		99%	(環境・ヒト骨髄分離株)
<i>Hydrogenophaga</i>	2 (2%)	1 (5%)	100%	
<i>Schlegelella</i>	3 (3%)		99%	
<i>Kaistobacter</i>	2 (2%)		100%	
<i>Methyloversatilis</i>	2 (2%)		99%	
<i>Nocardioides</i>	2 (2%)		100%	
<i>Bacillus cereus</i> group		1 (5%)	100%	(他種区別不能)
<i>Bacillus megaterium</i>	1 (1%)		100%	
<i>Agrobacterium</i>	1 (1%)		99%	
<i>Dietzia</i>	1 (1%)		100%	
<i>Luteococcus</i>		1 (5%)	100%	(ヒト血液分離株)
<i>Mycobacterium</i>	1 (1%)		99%	(環境)
<i>Pannonibacter</i>		1 (5%)	99%	
<i>Staphylococcus</i>	1 (1%)		100%	(環境・ヒト口腔)
unknown	19 (18%)	1 (5%)		
計	106 (100%)	21 (100%)		

		20	40	60	80														
yold3	TCCG	AGC	ATGC	GCCTGCA	GA	CT	GTTGT	ATGC	TATCT	GAATAAAA-ACCCGTGC	90								
yo212	TCCG	AGC	ATGC	GCCTGCA	GA	CT	GTTGT	ATGC	TATCT	GAATAAAA-ACCCGTGC	90								
yo5172	TCCG	AGC	ATGC	GCCTGCA	GA	CT	GTTGT	ATGC	TATCT	GAATAAAA-ACCCGTGC	90								
yo1d2	TCCG	AGC	ATGC	GCCTGCA	GA	CT	GTTGT	ATGC	TATCT	GAATAAAA-ACCCGTGC	90								
yo5202	TCCG	AGC	ATGC	GCCTGCA	GA	CT	GTTGT	ATGC	TATCT	GAATAAAA-ACCCGTGC	90								
y107h6-2-255	CGGG	AGC	ATGC	GCCTGCA	GA	C	AT	GTTGT	ATGC	TGTTG	GAAGAATAAGGGGCACGT	91							
yo111	CGGG	AGC	ATGC	GCCTGCA	GA	C	AT	GTTGT	ATGC	TGTTG	GAAGAATAAGGGGCACGT	91							
yo112	CGGG	AGC	ATGC	GCCTGCA	GA	C	AT	GTTGT	ATGC	TGTTG	GAAGAATAAGGGGCACGT	91							
yo5112	CGGG	AGC	ATGC	GCCTGCA	GA	C	AT	GTTGT	ATGC	TGTTG	GAAGAATAAGGGGCACGT	91							
ka41	AGC	CT	AGC	ATGC	GCCTGCA	GA	C	AT	GTTGT	ATGC	TGTAC	GAAGAACCCTCTACGT	91						
yo5111	ACA	GT	CG	AGC	ATGC	GCCTGCA	GATT	C	AT	GTTGT	ATTC	TGTATA	GAATAAACCCCTGTTCTGT	92					
yo1d8	CA	G	CTGA	GC	G	C	T	C	A	G	C	CGGAG	AAGATGGAGCGG	85					
yo1d9thermus	C	G	R	CTGA	GG	G	C	T	H	G	A	G	C	GT	CTCCTGAACCTG-G	84			
y27h7-0-252noc	C	G	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	T	C	CAGACA	73	
y108h6-3-252noc	C	G	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	CAGACA	73	
y93hst-7-051ute	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	CAGACA	73	
y32h7-0-254micr	C	O	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	CAGACA	73	
y95hst-7-05micr	C	O	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y94hst-7-04micr	C	O	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y115h7-0-255mac	C	O	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y33h8-1-251	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y38h9-2-251micr	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y10h3-0-253diet	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y18h5-3-251myco	G	O	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	CAGTAG	73	
y13h3-3-252sphi	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y30h7-1-251kais	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y82h8-2-422sphi	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y110h6-3-254sph	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y123h9-3-423sph	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y126h9-3-421sph	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
yo113sphingomon	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
yo3ha2sphingomo	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
yo5113sphingomo	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y40h9-3-251sphi	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y120h9-2-253sph	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y36h8-1-254sphi	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y43h1-0-421sphi	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y61h3-0-424sphi	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y1h1-0-251sphin	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y2h1-0-252sphin	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y4h2-0-251sphin	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y6h2-1-251sphin	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y8h3-0-251sphin	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y11h3-1-251sphi	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y14h4-0-251sphi	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y16h4-1-251sphi	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y49h1-1-1-423sp	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y55h2-1-422sphi	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y58h3-0-421sphi	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y60h3-0-423sphi	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y63h3-1-421sphi	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y88hst-2-11sphi	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y90hst-3-11sphi	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y91hst-4-11sphi	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y86hst-1-01sphi	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	65	
y50h2-0-421sphi	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y52h2-0-423porp	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y56h2-1-423porp	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y62h3-0-425	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y72h6-3-421	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y76h7-1-421porp	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y119h8-1-422por	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
yo114porphyroba	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y84h9-3-421	CG	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	68		
y25h6-3-251porp	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y3h1-0-253caulo	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y89hst-2-12caul	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y5h2-0-252caulo	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y87hst-1-02caul	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y104h5-2-253agr	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y137hst-6-14pan	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
y34h8-1-252	G	O	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	CGCAGC	73
y39h9-2-252	G	O	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	CGCAGC	73
y122h9-3-422	G	O	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	CGCAGC	73
y81h8-2-421	G	O	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	CGCAGC	73
y65h3-1-423	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
yo241	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
yo1d4	G	A	C	CG	G	C	AGG	GAG	A	T	C	A	G	A	C	CTCCG	CAGTGG	73	
yo5173	G	A	C	CG	G	C	AGG	GAG	A	T	C	A	G	A	C	CTCCG	CAGTGG	73	
ka14	C	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
ka15	CA	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	G	T	C	C	T	AGCAG	73	
ka11lactococcus	CA	A	GTCTGA	GG	A	C	AGG	GAG	A	T	C	A	G	A	C	CTCTG	TGGTAGA	AAGAACGTTGGTGGAGTGGAA	94
ka12lactococcus	CA	A	GTCTGA	GG	A	C	AGG	GAG	A	T	C	A	G	A	C	CTCTG	TGGTAGA	AAGAACGTTGGTGGAGTGGAA	94
y26h7-0-251baci	CA	A	GTCTGA	GG	A	C	AGG	GAG	A	T	C	A	G	A	C	CTCTG	TGGTAGA	AAGAACGTTGGTGGAGTGGAA	93
y96hst-8-02baci	CA	A	GTCTGA	GG	A	C	AGG	GAG	A	T	C	A	G	A	C	CTCTG	TGGTAGA	AAGAACGTTGGTGGAGTGGAA	94
y28h7-0-253stap	CA	A	GTCTGA	GG	A	C	AGG	GAG	A	T	C	A	G	A	C	CTCTG	TGGTAGA	AAGAACGTTGGTGGAGTGGAA	94
ka13	CO	A	GTCTGA	GG	A	C	AGG	GAG	A	T	C	A	G	A	C	CTCTG	TGGTAGA	AAGAACGTTGGTGGAGTGGAA	94
yo211	CA	A	GTCTGA	GG	A	C	AGG	GAG	A	T	C	A	G	A	C	CTCTG	TGGTAGA	AAGAACGTTGGTGGAGTGGAA	93
yo5171	CA	A	GTCTGA	GG	A	C	AGG	GAG	A	T	C	A	G	A	C	CTCTG	TGGTAGA	AAGAACGTTGGTGGAGTGGAA	93
yo5201	CA	A	GTCTGA	GG	A	C	AGG	GAG	A	T	C	A	G	A	C	CTCTG	TGGTAGA	AAGAACGTTGGTGGAGTGGAA	93
y92hst-5-12pseu	CA	A	GTCTGA	GG	A	C	AGG	GAG	A	T	C	A	G	A	C	CTCTG	TGGTAGA	AAGAACGTTGGTGGAGTGGAA	93
y124h9-3-424pse	CA	A	GTCTGA	GG	A	C	AGG	GAG	A	T	C	A	G	A	C	CTCTG	TGGTAGA	AAGAACGTTGGTGGAGTGGAA	93
y135hst-6-12pse	CA	A	GTCTGA	GG	A	C	AGG	GAG	A	T	C	A	G	A	C	CTCTG	TGGTAGA	AAGAACGTTGGTGGAGTGGAA	93
y139hst-9-22pse	CA	A	GTCTGA	GG	A	C	AGG	GAG	A	T	C	A	G	A	C	CTCTG	TGGTAGA	AAGAACGTTGGTGGAGTGGAA	93
y97hst-8-03pseu	CA	A	GTCTGA	GG	A	C	AGG	GAG	A	T	C	A	G	A	C	CTCTG	TGGTAGA	AAGAACGTTGGTGGAGTGGAA	93









	200	*	220	*	240	*	260	*	280	*
yo1d3	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
yo212	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
yo5172	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
yo1d2	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
yo5202	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y107h6-2-255	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
yo111	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
yo112	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
yo5112	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
ka41	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
yo5111	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
yo1d8	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
yo1d9thermus	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y27h7-0-252noca	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y108h6-3-252noc	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y93hst-7-03lute	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y32h7-0-254micr	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y95hst-7-05micr	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y94hst-7-04micr	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y115h7-0-255mcc	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y33h8-1-251	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y38h9-2-251micr	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y10h3-0-253diet	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y18h5-3-251myco	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y13h3-3-252sphi	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y30h7-1-251kals	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y82h8-2-422sphi	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y110h6-3-254sph	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y123h9-3-423sphi	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y126h9-3-421sphi	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
yo113sphi ngomom	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
yo3ha2sphi ngomom	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
yo5113sphi ngomom	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y40h9-3-251sphi	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y120h9-2-253sph	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y36h8-1-254sphi	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y43h1-0-421sphi	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y61h3-0-424sphi	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y1h1-0-251sphin	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y2h1-0-252sphin	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y4h2-0-251sphin	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y6h2-1-251sphin	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y8h3-0-251sphin	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y11h3-1-251sphi	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y14h4-0-251sphi	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y16h4-1-251sphi	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y49h1-1-1-423sp	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y55h2-1-422sphi	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y58h3-0-421sphi	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y60h3-0-423sphi	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y63h3-1-421sphi	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y88hst-2-11sphi	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y90hst-3-11sphi	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y91hst-4-11sphi	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y86hst-1-01sphi	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y50h2-0-421sphi	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y52h2-0-423porp	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y56h2-1-423porp	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y62h3-0-425	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y72h6-3-421	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y76h7-1-421porp	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y119h8-1-422por	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
yo114porphyroba	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y84h9-3-421	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y25h6-3-251porp	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y3h1-0-253caulo	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y89hst-2-12caul	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y5h2-0-252caulo	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y87hst-1-02caul	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y104h5-2-253agr	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y137hst-6-14pan	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y34h8-1-252	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y39h9-2-252	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y122h9-3-422	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y81h8-2-421	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y65h3-1-423	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
yo241	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
yo1d4	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
yo5173	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
ka14	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
ka15	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
kallactococcus	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
ka12lactococcus	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y26h7-0-251baci	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y96hst-8-02baci	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y28h7-0-253stap	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
ka13	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
yo211	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
yo5171	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
yo5201	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y92hst-5-12pseu	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y124h9-3-424pse	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y135hst-6-12pse	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y139hst-9-22pse	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG
y97hst-8-03pseu	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG	CCGCTT	AGG

