

分担研究報告書 2

高度処理における微生物再増殖に関わる  
栄養源の低減条件の検討

研究分担者 春日 郁朗

研究協力者 Suwat Soonglerdsongpha

厚生労働科学研究（健康安全・危機管理対策総合研究事業）  
「水道の配水過程における水質変化の制御および管理に関する研究」

平成 22 年度分担研究報告書  
高度処理における微生物再増殖に関わる栄養源の低減条件の検討

研究分担者 東京大学大学院工学系研究科 春日 郁朗  
研究協力者 東京大学大学院工学系研究科 Suwat Soonglerdsongpha

**研究要旨**

生物活性炭の生物学的浄化機能の一つとして、同化性有機炭素（AOC：Assimilable Organic Carbon）の除去がある。AOCは、細菌再増殖の基質となりうることから、効率的な除去が求められている。除去機構を解明し、処理性能を記述するためには、処理に関与している細菌群を同定する必要がある。昨年度は、ギ酸、酢酸、シュウ酸をモデル物質として取り上げ、安定同位体プロービング法を用いて、これらを同化する細菌群を同定する手法の検討を行った。今年度は、昨年度確立した手法に準じて、異なる2種類の生物活性炭試料を分析し、同化能を有する細菌群の多様性を比較した。その結果、酢酸を同化する細菌の多様性は、生物活性炭によって差異が見られたが、ギ酸およびシュウ酸を同化する細菌の多様性には大差がなかった。また、通性メチロトロフである *Hyphomicrobium* 属に近縁な細菌群は、3種類のカルボン酸をすべて同化することが示された。この細菌群は、双方の生物活性炭から検出されたことから、生物活性炭における低級カルボン酸の除去能を診断する上で有用な指標になりうることを示唆された。

**A. 研究目的**

オゾン-生物活性炭処理は、大都市を中心に導入が進められている高度浄水処理法である。しかし、その運用方法は経験的に確立されてきた部分が多く、生物学的な処理機構はブラックボックスとして扱われているのが現状である。処理機構が概念的な理解に留まっている要因としては、生物活性炭の「生物」、すなわち生物活性炭に定着し、処理に関与する微生物の実体がほとんど明らかになっていないことが挙げられる。生物処理の機構を理解し、運転因子あるいは水質因子が生物活性にどのような影響を与えるのかを把握するためには、ブラックボックスの構成要素である微生物の生理・生態に関する詳細な情報が必要不可欠である。

これまで、本研究では、生物活性炭の硝化作用、同化性有機炭素（AOC：Assimilable Organic Carbon）の除去能の機構解明を進めてきた。昨年度は、特に同化性有機炭素の除去に関与する細菌群の同定を目的として、安定同位体プロービング法（Stable Isotope Probing法：SIP法）の適用を試み、培養時間、基質濃度などの検討を行った。今年度は、昨年度確立したSIP法を異なる生物活性炭試料にも適用し、AOCの代表的な成分である低級カルボン酸の除去に関与している細菌群の比較、系統解析を行うことを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 安定同位体プロービング法(SIP法)による低級カルボン酸利用細菌の特定

#### 1-1 生物活性炭試料

SIP法の条件検討で昨年度に分析した浄水場Cの生物活性炭(BAC-C)に加え、新たに浄水場Dの生物活性炭(BAC-D)をSIP法により分析した。浄水場Cおよび浄水場Dは、同じ河川から原水を取水しており、処理プロセスも「凝集沈殿→オゾン→生物活性炭→急速砂ろ過」と全く同様である。浄水場Dからの生物活性炭のサンプリングは2010年4月に行った。また、BAC-Dは約3年間連続使用されているものを採取した。

#### 1-2 SIP法

$^{13}\text{C}_2$ -酢酸塩(99atom%, Cambridge Isotope Lab.)、 $^{13}\text{C}$ -ギ酸塩(99atom%, Cambridge Isotope Lab.)、 $^{13}\text{C}_2$ -シュウ酸塩(99atom%, Sigma-Aldrich)をAOCのモデル物質として選択した。BAC-D 3gを1Lのガラス瓶に入れ、そこに0.5mgC/Lに調製したこれらの基質10Lを別々に連続的に供与した(滞留時間3時間となるように流量を調整)。培養温度は20°Cである。計算上、投与した炭素量は、生物活性炭上のバイオマス(炭素換算)の6.6倍量に相当する。なお、対照系として $^{12}\text{C}$ の基質を用いた同条件の培養系も対照系として準備した。培養終了後、生物活性炭よりDNAを抽出し、4.9mlポリアロマーチューブを用いて、抽出DNAの超遠心分離処理をNVT65.2 Beckman rotor(Beckman)で行った。遠心条件は20°C、45000rpm(178,000g)68時間である。超遠心にあたっては、4.75ml塩化セシウムストック液(1.720g/cm<sup>3</sup>、0.1M Tris-HCl, pH 8.0, 0.1M KCl, 1mM EDTA)とDNA抽出液0.15mlを混合して供した。遠心分離終了後、20画分(約250 $\mu$ l)を採取し、各画分の比重をデジタル屈折計(AR200, Reichart)で測定した。ポリエチレングリコールを用いてDNAを精製した後、真正細菌の16S rRNA遺伝子に特異的なプライマーでPCRを行い、Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism(T-RFLP)によって16S rRNA遺伝子の多様性を解析した。制限酵素にはHhaIを用いた。同じ比重画分の $^{12}\text{C}$ 基質添加系のT-RFLPプロファイルと比較することにより、 $^{13}\text{C}$ 基質を摂取した細菌に由来する可能性があるフラグメントを選出した。また、各画分に含まれる真正細菌の16S rRNA遺伝子濃度を、定量PCRによって測定した。

#### 1-3 クローニング・系統解析

ギ酸、酢酸、シュウ酸を同化する細菌に由来すると推定されるフラグメントについて、制限酵素で消化する前のPCR産物をクローニングした。個々のクローンが含む16S rRNA遺伝子を同様にT-RFLPで解析し、それぞれのフラグメントを生成するクローンのスクリーニングを行った。スクリーニングしたクローンについては、16S rRNA遺伝子全長の配列を決定し、系統解析を行った。

## C. 研究結果

### 1. BAC-D の安定同位体プロービング法 (SIP 法) による解析

#### 1.1 ギ酸

図 1 に、ギ酸を対象物質として投与した際の、16S rRNA 遺伝子の比重分布を示す。0.5mgC/L という低濃度での基質投与であるが、 $^{12}\text{C}$  基質系と  $^{13}\text{C}$  基質系の 16S rRNA 遺伝子の比重分布を比較すると、 $^{13}\text{C}$  基質系の方が若干、高比重側にシフトしていることが読み取

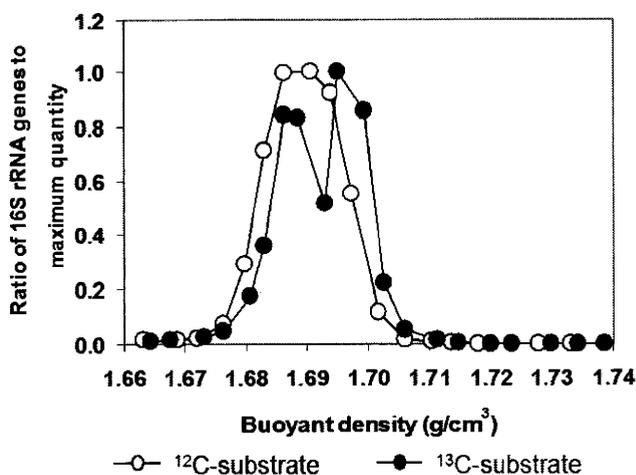


図 1 ギ酸: 16S rRNA 遺伝子の比重分布

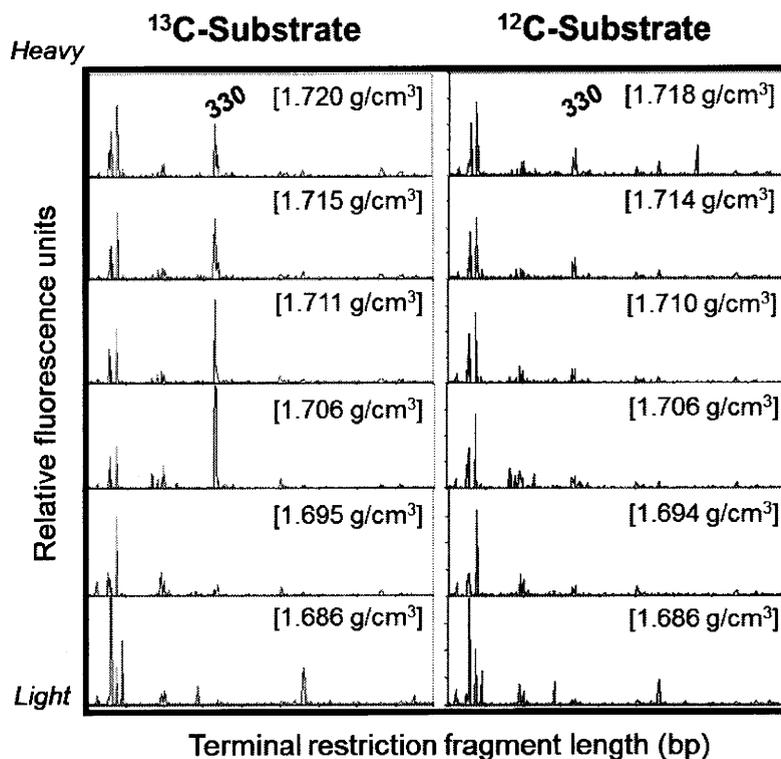


図 2 ギ酸: 各画分の T-RFLP の結果

れる。比重画分 1.686-1.720g/cm<sup>3</sup> の画分に着目し、T-RFLP で分析した結果を図 2 に示す。各フラグメントの相対強度を計算し、<sup>12</sup>C 基質系と <sup>13</sup>C 基質系のプロファイルと比較したところ、断片長 330bp のフラグメントが、<sup>13</sup>C 基質系の高比重画分で優占していることが明らかになった。

## 1.2 酢酸

図 3 に、酢酸を対象物質として投与した際の、16S rRNA 遺伝子の比重分布を示す。<sup>12</sup>C 基質系と <sup>13</sup>C 基質系の 16S rRNA 遺伝子の比重分布を比較すると、<sup>13</sup>C 基質系の方が高比重

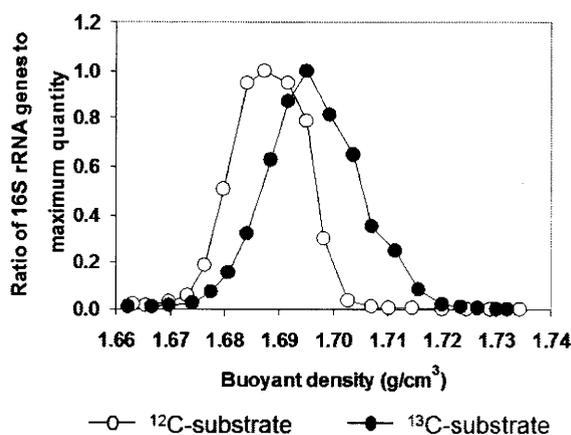


図 3 酢酸:16S rRNA 遺伝子の比重分布

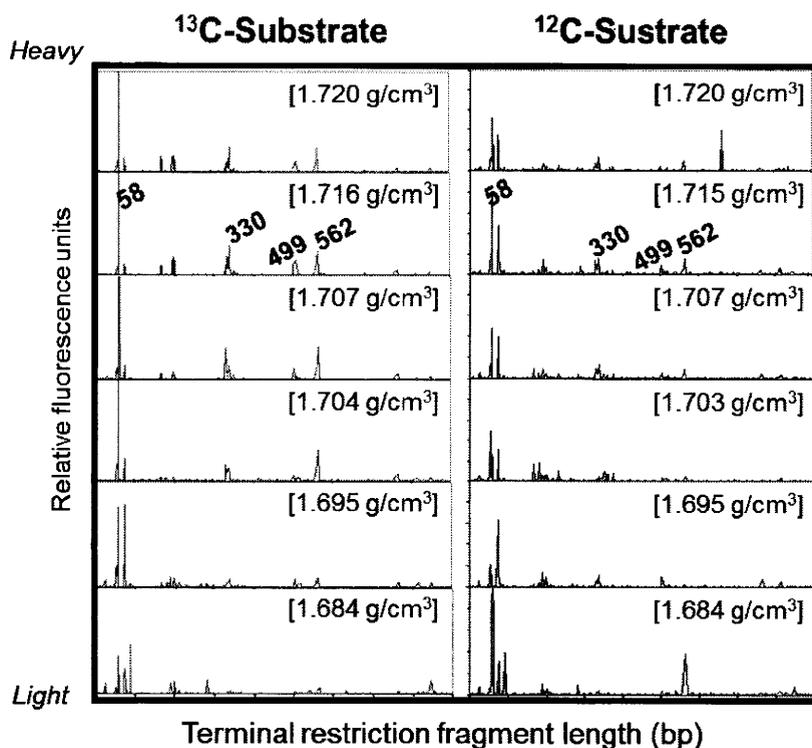


図 4 酢酸:各画分の T-RFLP の結果

側にシフトしていることが読み取れる。比重画分 1.684-1.720g/cm<sup>3</sup> の画分に着目し、T-RFLP で分析した結果を図 4 に示す。ギ酸と同様に各フラグメントの相対強度に着目して比較を行ったところ、断片長 58, 330, 499, 562bp のフラグメントが、<sup>13</sup>C 基質系の高比重画分で特に優占していることが明らかになった。

### 1.3 シュウ酸

図 5 に、シュウ酸を対象物質として投与した際の、16S rRNA 遺伝子の比重分布を示す。

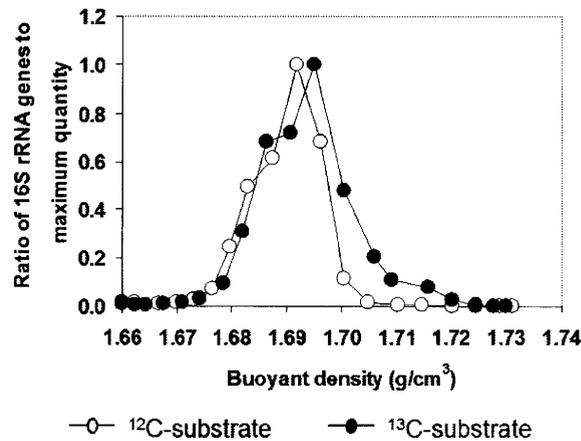


図 5 シュウ酸:16S rRNA 遺伝子の比重分布

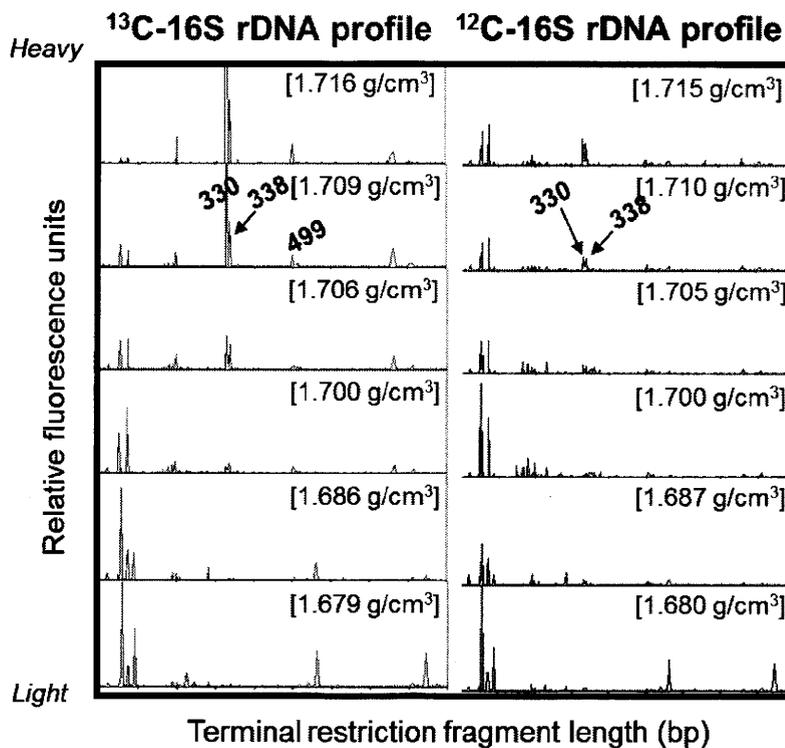


図 6 シュウ酸:各画分の T-RFLP の結果

$^{12}\text{C}$  基質系と  $^{13}\text{C}$  基質系の 16S rRNA 遺伝子の比重分布を比較すると、酢酸ほど顕著ではないが、 $^{13}\text{C}$  基質系の方が若干高比重側にシフトしていることが読み取れる。比重画分 1.679-1.716g/cm<sup>3</sup> の画分に着目し、T-RFLP で分析した結果を図 6 に示す。各フラグメントの相対強度に着目して比較を行ったところ、断片長 330, 338, 499 bp のフラグメントが、 $^{13}\text{C}$  基質系の高比重画分で優占していることが明らかになった。特に 330 bp のフラグメントは、高比重画分で顕著に優占していた。

## 2. クローニングによる各フラグメントの系統解析

### 2.1 候補フラグメントの系統解析

昨年度解析した BAC-C の結果と、今回解析した BAC-D の結果から、ギ酸、酢酸、シュウ酸を同化する細菌に由来すると推定されるフラグメントを表 1 に整理した。BAC-C は、330bp, 338bp (ギ酸)、330bp (酢酸)、330bp (シュウ酸) と選出されたフラグメント数は少ない。一方、BAC-D については、ギ酸、シュウ酸については選出されたフラグメント数は BAC-C と同様であったが、酢酸については、7 フラグメントが選出され、酢酸資化性の細

表 1 ギ酸、酢酸、シュウ酸を同化する細菌に由来すると推定されるフラグメント

Substrate	BAC	Particular T-RFs (bp)						
		58	197	200	330	338	499	562
Formate	C				+	+		
	D				++			
Acetate	C				++			
	D	++	+	+	++	+	+	++
Oxalate	C				++			
	D				++	++		

表 2 表 1 のフラグメントの相同性検索の結果

The closest relatives	Phylogeny	Identity (%)	T-RF	Substrate
<i>Burkholderia glathei</i>	$\beta$ -Proteobacteria	91	58	Ac
<i>Methylobium aquaticum</i>	$\beta$ -Proteobacteria	98-99	197	Ac
<i>Aquamonas fontana</i>	$\beta$ -Proteobacteria	94-96	200	Ac
<i>Hyphomicrobium</i> sp. Ellin112	$\alpha$ -Proteobacteria	94-95	330	Fm, Ac, Ox
<i>Bradyrhizobium</i> sp. II-47		98		
<i>Afipia broomeae</i>	$\alpha$ -Proteobacteria	99	338	Fm, Ac, Ox
<i>Nordella oligomobilis</i>		99		

菌の多様性が、BAC-C よりも高いことが推察される。また、330bp のフラグメントはすべての基質について、BAC-C および BAC-D から検出されているという特徴が見られた。

SIP 法によってスクリーニングされたフラグメントの系統情報を得るために、クローニングを行った。各フラグメントの相同性検索の結果を表 2 に示す。クローニングの結果、16S rRNA 遺伝子全長が得られたのは、断片長 58bp (*Burkholderia glathei* に近縁)、197bp (*Methylibium aquaticum* に近縁)、200bp (*Aquamonas fontane* に近縁)、330bp (*Hyphomicrobium* sp. に近縁)、338bp (*Bradyrhizobium* sp. などに近縁) であった。すべて、系統的には  $\alpha$ 、 $\beta$ -Proteobacteria に属していた。

## 2.2 断片長 330bp のフラグメントの系統と定量系の開発

表 1 から、*Hyphomicrobium* 属に近縁な 330bp のフラグメントは、BAC-C、BAC-D 双方から検出されているだけでなく、ギ酸、酢酸、シュウ酸のすべてに応答している細菌に由来していると理解できる。図 7 に、330bp のフラグメントの 16S rRNA 遺伝子を用いた系統樹を示す。*Hyphomicrobium* 属には、Cluster I と Cluster II が知られている。本研究で検出された *Hyphomicrobium* 属に近縁なクローンは、Cluster I により近いものの、系統的には既存の *Hyphomicrobium* 属とは異なる系統に属する可能性も示唆された。

330bp のフラグメントの 16S rRNA 遺伝子配列に基づき、該当クローンのみを特異的に検出可能な定量 PCR プライマー (Hyp298f/Hyp717r) を設計した。実際に 330bp に相当する細菌が、ギ酸、酢酸、シュウ酸を同化しているかどうかを確認するため、設計した定量 PCR プライマーを用いて、各比重画分における断片長 330bp が由来する遺伝子量を定量した (図 1,3,5 で示しているのは全細菌の 16S rRNA 遺伝子の分布である)。図 8 に結果を示す。図 8 の結果より、BAC-C のギ酸を除き、他のすべてのケースにおいて、 $^{13}\text{C}$ -基質系における断片長 330bp が由来する 16S rRNA 遺伝子の分布は、 $^{12}\text{C}$ -基質系に比べて高比重側にシフトして

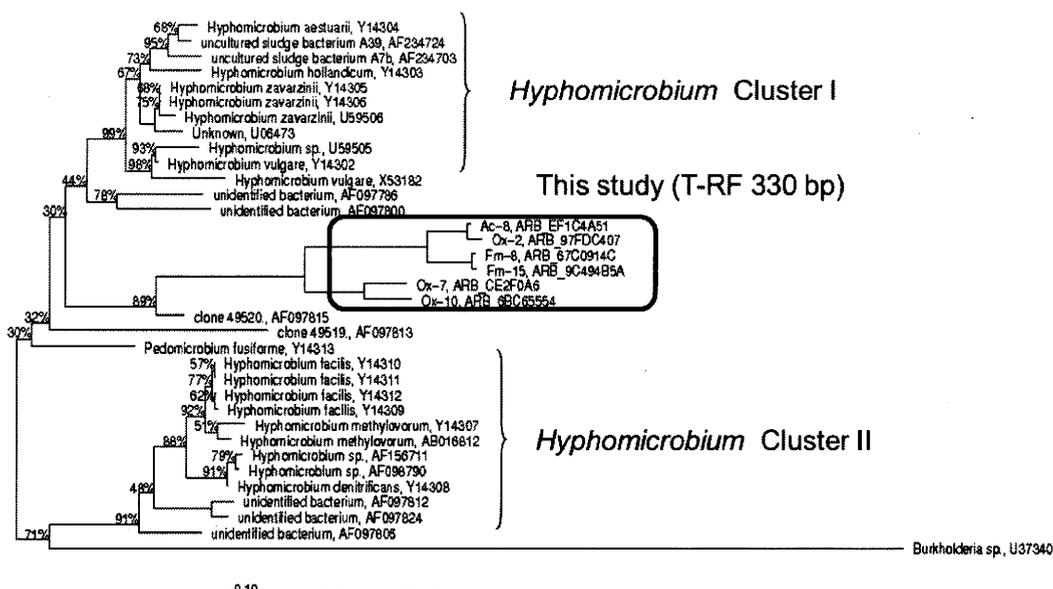


図 7 断片長 330bp の 16S rRNA 遺伝子系統樹

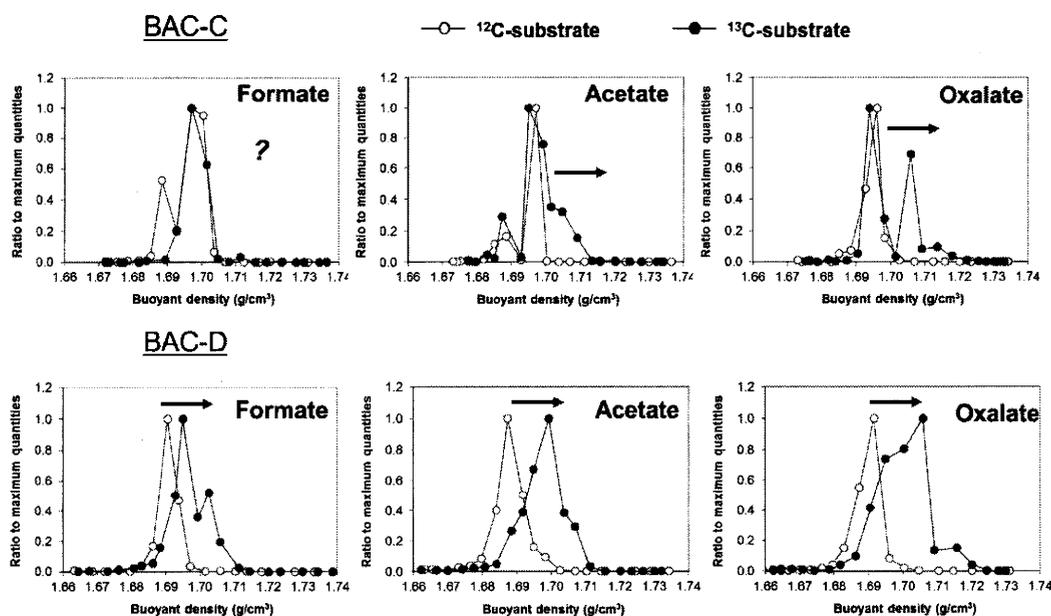


図 8 断片長 330bp が由来する 16S rDNA 遺伝子の比重分布

おり、*Hyphomicrobium* 属に近縁な細菌がギ酸、酢酸、シュウ酸を実際に同化していることが確認された。

#### D. 考察

原水、処理プロセスが同一の 2 つの浄水場から採取した BAC-C、BAC-D を対象として、ギ酸、酢酸、シュウ酸を同化する細菌の多様性を比較した。酢酸については、BAC-D の方が多様な細菌の関与が推定されたが、ギ酸およびシュウ酸については同化能を有する細菌の多様性に大差は見られなかった。特に興味深いのは、断片長 330bp のフラグメントである。このフラグメントは、ギ酸、酢酸、シュウ酸のすべてを同化する細菌に由来することが推定される。また、BAC-C および BAC-D の双方から検出されている。通常、酢酸は TCA サイクルで好氣的に代謝されるのに対し、ギ酸、シュウ酸は C1 化合物の経路であるセリン経路で代謝されることが知られている。セリン経路を有する細菌としては、C1 化合物を同化するメチロトロフなどが挙げられる。今回の結果より 330bp が由来する細菌は、ギ酸、シュウ酸を利用できることからメチロトロフであること、また酢酸も同化できることから、通性のメチロトロフであることが推察される。系統解析の結果、330bp のフラグメントは *Hyphomicrobium* 属に由来することが示された。*Hyphomicrobium* 属は、C1 化合物だけでなく、複数の炭素を含む基質を利用可能であることが知られており、その基質利用特性は今回の SIP の結果と整合していた。

330bp のフラグメントに特異的なプライマーを設計することで、実際にこの細菌がギ酸、酢酸、シュウ酸を同化しているかどうかを確認した。SIP 法では、 $^{12}\text{C}$ -DNA と  $^{13}\text{C}$ -DNA を比重の差異に基づいて分離することから、その分離能が制限となることが欠点として挙げられる。また、今回、ポスト解析で採用した T-RFLP も半定量的な分析方法であるため、SIP 法と T-RFLP を組み合わせた解析は、あくまでスクリーニング法としてみなすのが妥

当であると考えられる。基質を同化している細菌に由来するフラグメントを選出した後、本研究で示したように、該当フラグメントの DNA の比重分布を特異的に定量し、再確認することが重要であると考えられる。

今後は、開発した定量 PCR プライマーを用いて、他の生物活性炭における *Hyphomicrobium* 属の存在量を評価すると共に、生物活性炭の AOC 除去能とこの細菌群の存在量との間の関係性について議論を深める必要がある。仮に、両者の間に相関があることが明らかになれば、*Hyphomicrobium* 属を指標として、生物活性炭の AOC 除去能を診断することも可能になると推察される。一方、今回の SIP 法では基質濃度を 0.5mgC/L に設定している。実際の条件下では、単一の基質が 0.5mgC/L も存在していることはなく、基質濃度の条件がバイアスをもたらしている可能性についても注意する必要がある。本研究の結果、生物活性炭において、ギ酸、酢酸、シュウ酸のすべてを同化可能な細菌が存在していることは確かであるが、*Hyphomicrobium* 属が *in situ* でどのような役割を果たしているのか、どの程度 AOC の除去に寄与しているのか、更なる検討が必要である。

## E. 結論

生物学的に安定な水道水を供給するためには、オゾン処理によって生成する AOC を生物活性炭によって効率的に処理する必要がある。本研究では、代表的な AOC 成分としてギ酸、酢酸、シュウ酸を取り上げ、SIP 法によって、これらの低級カルボン酸を同化する細菌群の同定を行った。2つの浄水場の生物活性炭を対象として解析を行った結果、複数の細菌群がこれらの同化に関与していることが示された。特に、*Hyphomicrobium* 属に近縁な細菌群は3種類のカルボン酸のすべてを同化する能力を持ち、2つの生物活性炭の両方から検出されることが示された。低級カルボン酸の処理性能を評価する上で、この細菌群の存在量、活性などが指標となる可能性がある。実際の環境条件下において、どのような生理特性を有し、AOC 除去に関与しているのか、更なる検討が必要である。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Ikuro Kasuga, Hirotaka Nakagaki, Futoshi Kurisu, and Hiroaki Furumai (2010) Abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria on biological activated carbon in a pilot-scale drinking water treatment plant with different treatment processes, *Water Science and Technology*, Vol.61, No.12, 3070-3077.

Ikuro Kasuga, Hirotaka Nakagaki, Futoshi Kurisu, Hiroaki Furumai (2010) Predominance of Ammonia-Oxidizing Archaea on Granular Activated Carbon Used in a Full-scale Advanced Drinking Water Treatment Plant, *Water Research*, Vol.44, No.17, pp.5039-5049.

Suwat Soonglerdsongpha, Ikuro Kasuga, Futoshi Kurisu, and Hiroaki Furumai (2011) Comparison of assimilable organic carbon removal by biological activated carbon in different advanced drinking water treatment plants, Sustainable Environment Research, Vol.21, No.1, pp.59-64.

## 2. 学会発表

Ikuro Kasuga, Hirotaka Nakagaki, Futoshi Kurisu, Hiroaki Furumai (2010) Predominance of Ammonia-Oxidizing Archaea on Granular Activated Carbon Used in a Full-scale Advanced Drinking Water Treatment Plant, Water Research Conference.

Suwat Soonglerdsongpha, Ikuro Kasuga, Futoshi Kurisu, Hiroaki Furumai (2010) Application of stable isotope probing to identify carboxylic acids assimilating bacteria associated with biological activated carbon used in drinking water treatment, 13<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology, PS06.091.

Suwat Soonglerdsongpha, Ikuro Kasuga, Futoshi Kurisu, Hiroyuki Katayama, Hiroaki Furumai (2010) Application of stable isotope probing to evaluate AOC assimilating bacteria attached on BAC in drinking water treatment plant, Proceedings of the 44<sup>th</sup> Annual Conference of JSWE, p.169.

Suwat Soonglerdsongpha, 春日郁朗, 栗栖太, 片山浩之, 古米弘明 (2010) Evaluation and enrichment of biological activity of carboxylic acids removal by biological activated carbon in continuous column reactors, 第 61 回全国水道研究発表会, pp.622-623.

春日郁朗, Suwat Soonglerdsongpha, 栗栖太, 古米弘明, 片山浩之 (2011) 生物活性炭における低級カルボン酸利用細菌群の安定同位体プロービング法による同定, 第 45 回日本水環境学会 (発表予定)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

分担研究報告書 3

消毒技術に関する検討  
(消毒による微生物再増殖の制御方法の検討)

研究分担者 大瀧 雅寛

平成 22 年度 分担研究報告書  
分担研究テーマ： 消毒技術に関する検討  
(消毒による微生物再増殖の制御方法の検討)

研究分担者： 大瀧雅寛 (お茶の水女子大学)

#### 研究要旨

本分担研究では、配水過程での生物膜形成といった再増殖が問題となる微生物を対象として、各種消毒処理方法（塩素、紫外線照射など）において、不活化および再増殖を抑制させるための条件を、明らかにすることを目的とし、多種の細菌の集合である従属栄養細菌の処理耐性等の評価を一度に行う手法として T-RFLP 法を応用する手法について検討した。水道水および生物活性炭から単離した株 5 種について、単離株にて塩素および紫外線処理を行って、予めそれぞれの処理耐性を把握しておき、その後、混合株試料について、不活化処理および、その後 2 日間の培養過程を挟むことで、T-RFLP 法にて複数種の細菌の不活化耐性・再増殖能を一度に評価した。結果として T-RFLP 法を用いて複数種の微生物群の消毒処理耐性やその後の増殖能力を一度に解析することが可能であることが示唆された。

塩素処理においては、処理前後の各株の T-RFLP プロファイルのエリア相対値を比較すると、耐性の高い株のエリア相対値は増加し、耐性の低い株のエリア相対値は減少したことから、T-RFLP 法を用いて複数種の細菌の塩素耐性を一度に評価することは可能であると考えられたが、処理前の段階で蛍光強度の低い株においては評価は難しいことがわかった。また塩素処理後に培養過程を挟むことによって、塩素処理耐性の低い株のエリア相対値の減少が見られ、増殖量に関しても抑制されていることがわかった。また処理直後（培養なし）では減少したものの、処理後培養すると増加した株も見られ、処理耐性が低いがその後の増殖能力が高い株であると判断できた。従って、T-RFLP 法と液体培養を組み合わせることで、塩素処理後の再増殖性の評価を行うことができると考えられた。

紫外線処理においては、処理前後の各株のエリア相対値を比較しても、処理耐性を示す一定の傾向は見られず、処理耐性を直接評価することはできないと考えられた。ただし紫外線処理後、培養過程を挟んだ場合には、耐性の高い株のエリア相対値に著しい増加が見られ、耐性の低い株は変化しなかった。このことから、処理後に液体培養を行うことで、群集試料中の耐性の高い株を顕著に示すことができ、処理後の再増殖性も評価することが可能であることが分かった。

#### A. 研究目的

本分担研究では、配水過程での生物膜形成といった再増殖が問題となる微生物を対象として、各種消毒処理方法（塩素、紫外線照射など）において、不活化および再増殖を抑制させるための条件を、明らかにすることを目的としている。本研究では配水管中で増殖が問題となる従属栄養細菌を対象微生物としており、前年までは単種の *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) を対象とし、塩素や紫外線処理についての、耐性や処理における損傷部位の推定などミクロな視点で検討してきた。これに加えて従属栄養細菌全体を対象とし、どの種の消毒処理耐性が高いのか、また増殖能が高いのかについて把握することは重要な情報となると考えている。しかし、多種の細菌の集合である従属栄養細菌を一つ一つ調べるのは大変な労力と手間がかかる。そこで今回は、これらの評価を一度に行う手法として T-RFLP 法を応用する手法について検討することにした。T-RFLP 法は広範な細菌群集を検出できる方法として近年幅広く利用されている分子生物学的手法の一つであるが、この方法に不活化処理後に培養過程を挟むことで、複数種の細菌の不活化耐性・再増殖能を一度に評価する解析手法を提案した。

#### B. 研究方法

まず水道水や生物活性炭（浄水場にて稼働中の処理槽から採取）からの単離株を用い、それぞれの消毒処理耐性や増殖性を確認し、その後それらの混合種溶液を作成して、T-RFLP 法を用いた解析を行い、単離株にて確認してある処理耐性、増殖性を一斉に把握出来るか検討した。

##### B.1 対象とした従属栄養細菌株について

###### 1) 細菌株の単離について

水道水及び国内の浄水場で使用された生物活性炭から R2A 寒天培地を用いて従属栄養細菌の単離を行った。

水道水はお茶の水女子大学総合研究棟7階の水道水を用いた。ISO-GRID (Neogen社)法で水道水を10 mL, 1 mL吸引濾過し, R2A寒天培地上にて20°Cで培養した。培地上に形成されたコロニーの中で, 色・形状の異なるものを選び, 新たなR2A培地上に画線・培養し, 単一のコロニーになるまで画線を2~3回繰り返した。

生物活性炭からの生物の単離については, 国内の浄水場(生物活性炭処理導入)で使用された生物活性炭を50 mL遠心チューブにとり Milli-Q水を加えた。十分に攪拌後その上澄み液0.1 mLをR2A寒天培地上に塗布し20°Cで培養した。培地上に形成されたコロニーの中で, 色・形状の異なるものを選び, 新たなR2A培地上に画線・培養した。単一のコロニーになるまで画線を2~3回繰り返した。

## 2) 単離株のT-RFLP解析について

得られた単離株のコロニーを滅菌した楊枝で採取し, コロニーを直接PCR溶液に加えた。プライマーとして27f(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')と907r(5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3')を用いた。なお, T-RFLPの解析用にフォワードプライマー27fの5'末端を蛍光色素6-FAM(6-carboxyfluorescein)で標識した。DNAポリメラーゼにはTaKaRa Ex Taq(TaKaRa)を用い, 付属の試薬を用いてPCR反応液を調整した。温度条件は(94°C:30秒→52°C:30秒→72°C:1分)×30サイクル→72°C:10分とし, 反応容量は51 µLとした。PCR増幅産物をアガロース電気泳動で確認した後, QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN)を用いて精製を行った。その後, NanoDrop® ND-1000(NanoDrop Technologies)を用いてDNA濃度を測定し, PCR産物100 ngを, 制限酵素Hha I(TaKaRa)を用いて消化した(37°C, 6時間)。この消化産物2 µLにHi-Di Formamide(Applied Biosystems)17 µL, サイズマーカーGeneScan 1200LIZ 1 µLを加え, 95°Cで2分間熱変性させた後, 氷冷した。キャピラリー電気泳動は, ABI PRISM®310 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)を使用し, GeneMapper™v3.0(Applied Biosystems)を用いてフラグメント解析を行った。

## 3) 単離株の同定について

得られた単離株のコロニーを滅菌した楊枝で採取し, コロニーを直接PCR溶液に加え, 16S rDNA断片の増幅を行った。プライマーは27f(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')と1492r(5'-GGTTACCTTGTT ACG ACTT-3')を用いた。DNAポリメラーゼにはTaKaRa Ex Taq(TaKaRa)を用い付属の試薬を用いてPCR反応液を調整した。温度条件は(94°C:30秒→53°C:30秒→72°C:2分)×30サイクル→72°C:10分とし, 反応容量は51 µLとした。得られたPCR産物をアガロース電気泳動で確認した後, QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN)を用いて精製し, 30 µLに濃縮した。これをオートシーケンサーABI PRISM® 310 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)を用いて, 増幅断片の5'末端側の配列を決定した。相同性検索には, 日本DNAデータベース(DDBJ)の提供する相同性検索プログラムBLASTN(<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>)を用いて, 得られた配列に相同性の高い既知配列を検索した。

## B.2 単離株の消毒耐性試験

得られた単離株の塩素および紫外線処理耐性を調べるため, R2A寒天培地を用いて実験を行った。

### 1) 塩素による不活化実験

R2A寒天培地上にて20°C, 7~14日間培養してできた単離株のコロニーをループで釣菌し, 滅菌済みリン酸緩衝液100 mLに懸濁して初期試料溶液とした。ここで濃度は約 $1.0 \times 10^7$  CFU/mLとなった。1分後遊離塩素濃度が約0.2 mg/Lとなるよう次亜塩素酸ナトリウム溶液を投入し, 所定時間攪拌後, 10 mL採水した。採水用試験管に3%チオ硫酸ナトリウム0.1 mLを入れておき脱塩素処理を行い, その後R2A寒天培地を用いて濃度測定を行った(20°C, 7~14日間培養)。遊離塩素濃度の測定は, ポータブル吸光光度計DR/890(HACH社製)を用いてDPD法により測定した。

### 2) 紫外線による不活化実験

単離株のそれぞれの初期試料溶液100 mLを作成した。滅菌ピペットを用いて試料21 mLを滅菌シャーレに入れ, 低圧UVランプで紫外線を照射した。照射線量率は,  $0.3 \text{ mW/cm}^2$ とした。照射後, 試料を採水し, R2A寒天培地を用いて濃度測定を行った(20°C, 7~14日間培養)。

## B.3 T-RFLPによる細菌群集の解析

### 1) 初期群集試料の作成

R2A寒天培地上にて培養してできた各単離株のコロニー(y3, r1, w1, w6, w7)をループで釣菌し, R2A液体培

地 12 mL に懸濁して 5~6 日間 25°C で振とう培養した。4°C, 15,000 rpm で 10 分間遠心分離を行い、上澄みを捨てて 2 回遠心洗浄後、滅菌済みリン酸緩衝液 8 mL で懸濁した。これを 10 倍希釈した溶液の 600 nm 吸光度を測定して濃度推定を行い、適当倍希釈したものを滅菌済みリン酸緩衝液 95 mL にそれぞれ 1 mL 投入し、攪拌したものを初期群集試料とした。

## 2) 塩素消毒実験

初期群集試料溶液 100 mL に、1 分後遊離塩素濃度が約 0.2 mg/L となるよう次亜塩素酸ナトリウム溶液を投入し、所定時間攪拌後 3 %チオ硫酸ナトリウムで脱塩素処理を行った。その後 1 つはそのまま DNA 抽出に用い、もう一つは 10 倍濃度の R2A 液体培地を 11 mL 投入し、2 日間 25°C で振とう培養後 DNA 抽出を行った。また、未消毒の試料においても同様に 2 日間 25°C で振とう培養後 DNA 抽出を行った。

## 3) 紫外線消毒実験

初期群集試料 21 mL を滅菌シャーレに入れ、低圧 UV ランプで紫外線を照射し、照射後 1 つはそのまま DNA 抽出に用い、もう一つは 10 倍濃度の R2A 液体培地を 2 mL 投入し、2 日間 25°C で振とう培養後 DNA 抽出を行った。また、未消毒の試料においても同様に 2 日間 25°C で振とう培養後 DNA 抽出を行った。

## 4) DNA 抽出法, PCR, T-RFLP 解析

ISOPLANT を用いて DNA 抽出を行った。PCR の反応条件、T-RFLP 解析の手順は上述のとおりである。実験手順の概要を図 1 に示した。

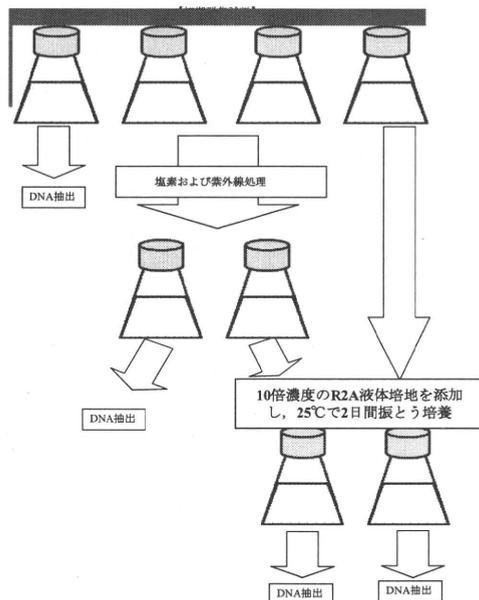


図 1 実験手順の概要

## C. 研究結果

### 1) 従属栄養細菌の単離・T-RFLP 解析・同定結果

表 1 に水道水および生物活性炭から単離した株の 16S rDNA の相同性検索結果と制限酵素 *Hha I* で処理した際の T-RFLP 解析結果を示した。水道水および生物活性炭から単離した株のうち *Hha I* で処理した際、異なる T-RF をもつ株が 6 種類得られた。相同性検索を行った結果、そのほとんどが  $\alpha$ -*Proteobacteria* に近縁であることがわかった。

*Proteobacteria* は全てグラム陰性細菌で rRNA 配列に基づいて  $\alpha$ -*Proteobacteria* ~  $\gamma$ -*Proteobacteria* に大別されている。今回単離された  $\alpha$ -*Proteobacteria* に近縁な株は、*Sphingomonas* 属、*Methylobacterium* 属、*Bosea* 属に属する細菌に近縁であった。また、 $\beta$ -*Proteobacteria* に近縁な株は *Collimonas* 属の細菌に近縁であり、*Actinobacteria* に近縁な株も得られた。

表 1 単離株の 16S rDNA の相同性検索結果と T-RFLP 解析結果

単離株	試料	Accession No.	最近縁配列	分類	相同性(%)	Identities	T-RF(bp)
y3	水道水	AJ746104	<i>Sphingomonas</i> sp. MG47	$\alpha$ -proteobacteria	100	494/494	75
r1	水道水	Z23160	<i>Methylobacterium</i> sp. BF15	$\alpha$ -proteobacteria	100	453/453	338
r2	水道水	FJ267581	<i>Methylobacterium</i> sp. I_GA_A_3_1	$\alpha$ -proteobacteria	100	458/458	137
w1	水道水	EF551403	<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	Actinobacteria	100	459/459	170
w6	生物活性炭	AY281149	<i>Collimonas</i> sp. NCCB 100025	$\beta$ -proteobacteria	99	175/176	58
w7	生物活性炭	FJ898313	<i>Bosea</i> sp. RA62	$\alpha$ -proteobacteria	100	437/437	508

## 2) DNA 抽出・PCR 増幅に最低限必要となる細菌濃度の確認実験結果

溶液中の細菌濃度を  $10^6$  倍希釈した希釈列を作り、それぞれの試料から DNA 抽出を行った結果を図 2 に、抽出後 PCR 増幅を行った結果を図 3 に示した。表 1 に各希釈列試料中の微生物濃度を示した。

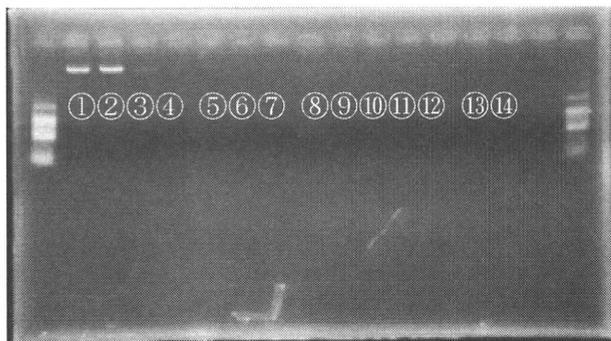


図 2 電気泳動結果 (DNA 抽出後)

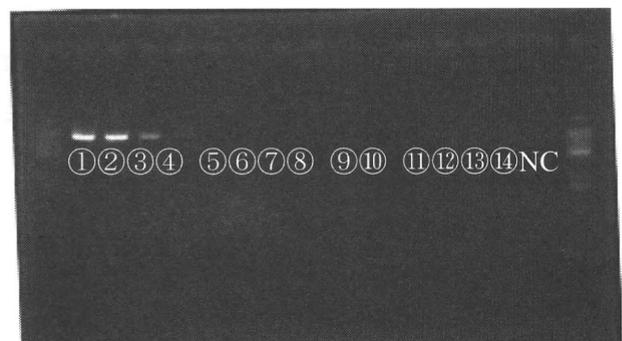


図 3 電気泳動結果 (PCR 増幅後)

表 1 図 2 および図 3 の各試料中の微生物濃度

濃度		濃度	
①②	$8.9 \times 10^6$ CFU/mL	⑨⑩	$8.9 \times 10^2$ CFU/mL
③④	$8.9 \times 10^5$ CFU/mL	⑪⑫	$8.9 \times 10$ CFU/mL
⑤⑥	$8.9 \times 10^4$ CFU/mL	⑬⑭	8.9 CFU/mL
⑦⑧	$8.9 \times 10^3$ CFU/mL		

図 2 および図 3 より DNA 抽出後、PCR 増幅後ともに  $8.9 \times 10^5$  CFU/mL までしか DNA が確認されず、これより低濃度になると解析に十分な DNA 量が得られないことが分かった。この実験結果を踏まえ、T-RFLP 法を用いた実験で使用する群集試料の濃度を定めることとした。

## 3) 単離株の不活化実験結果

単離株についてそれぞれに塩素処理を施した場合の濃度変化を図 4 に示した。横軸は CT 値、縦軸は単離株の残存率を表す。

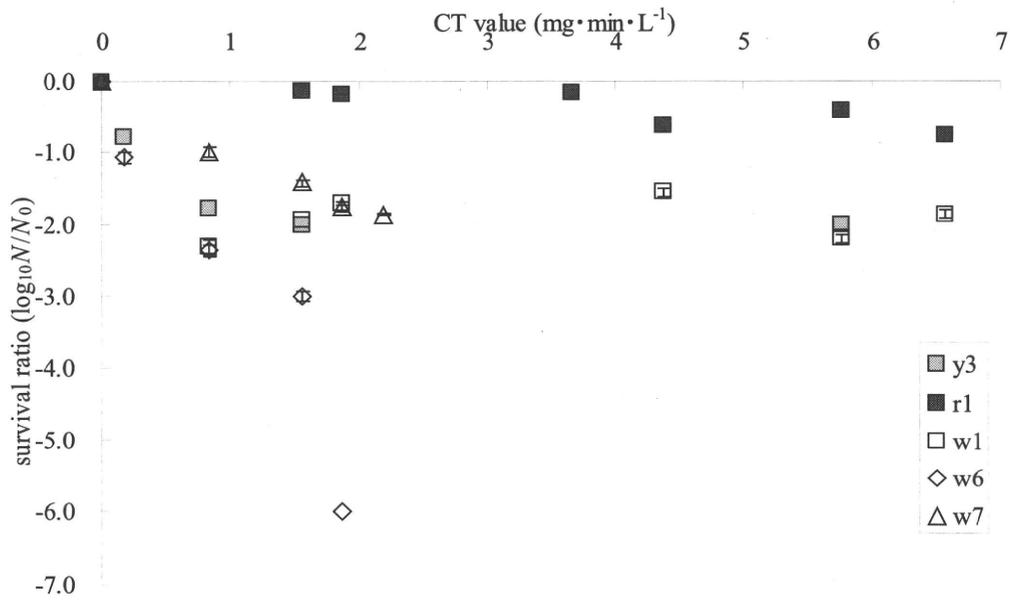


図4 塩素処理による単離株の濃度測定結果

図5には紫外線照射処理による単離株の濃度変化を示した。横軸は紫外線線量、縦軸は単離株の残存率を表す。

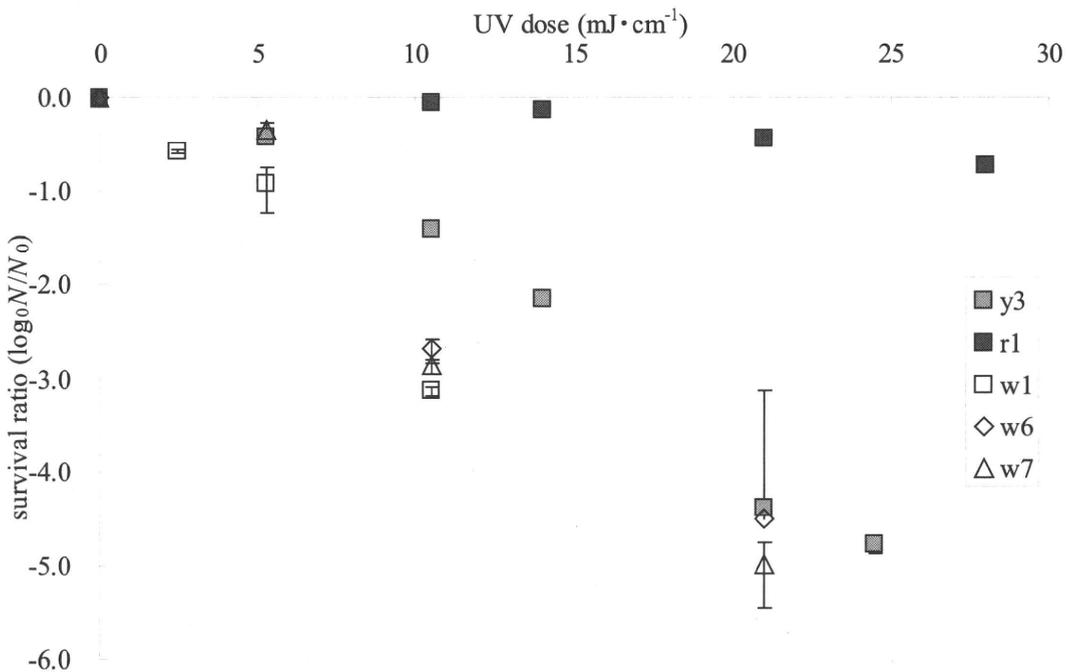


図5 紫外線処理による単離株の濃度測定

#### 4) T-RFLP 法による細菌群集の解析結果

##### 4-1) 未処理試料における培養前後の比較

図6に未処理の混合株試料の T-RFLP プロファイルをしめす。また図7に未処理の混合株試料を2日間液体培養した後の T-RFLP プロファイルを示す。これらのプロファイルを基に、未処理の試料（ブランク）における培養前と2日間液体培養を行った後の各株のエリア相対値を求め培養前後で比較した結果を図8に示す。

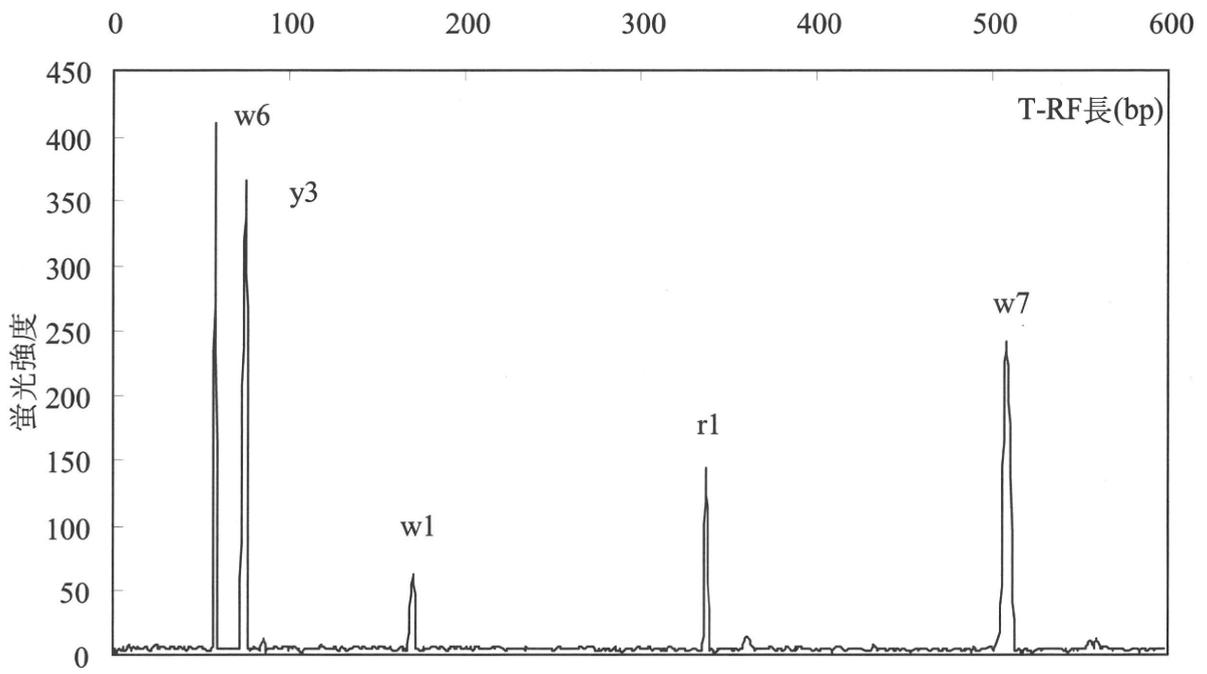


図6 未処理の混合株試料の T-RFLP プロファイル

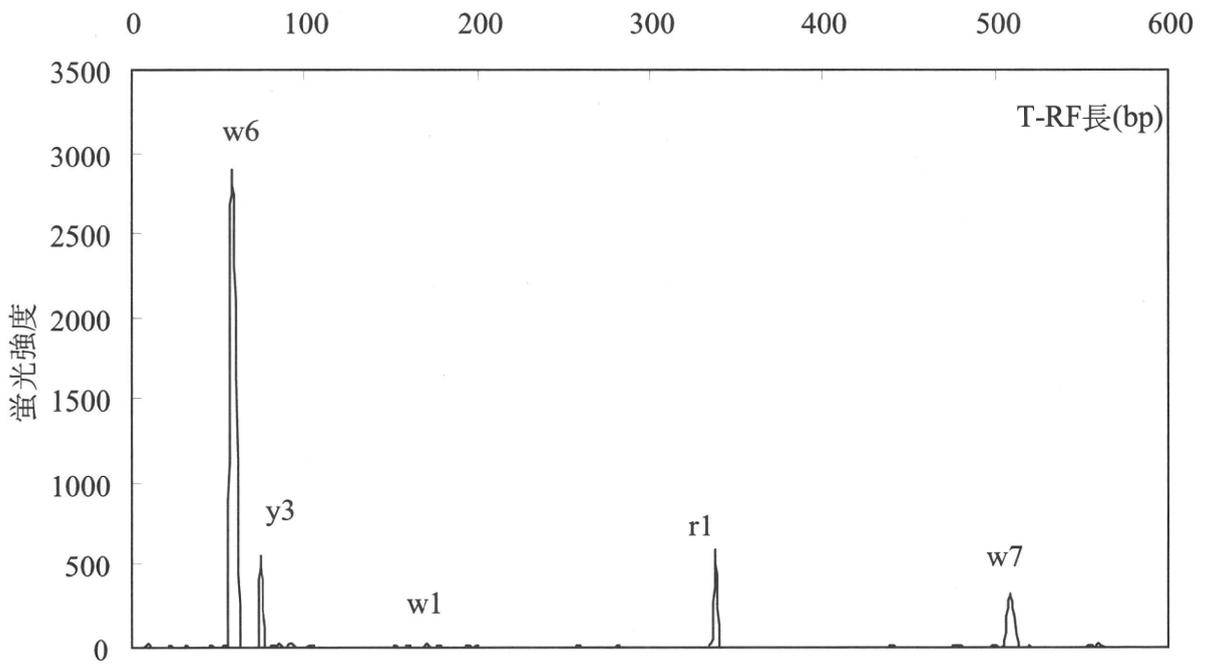


図7 未処理の混合株試料を2日間液体培養した後の T-RFLP プロファイル

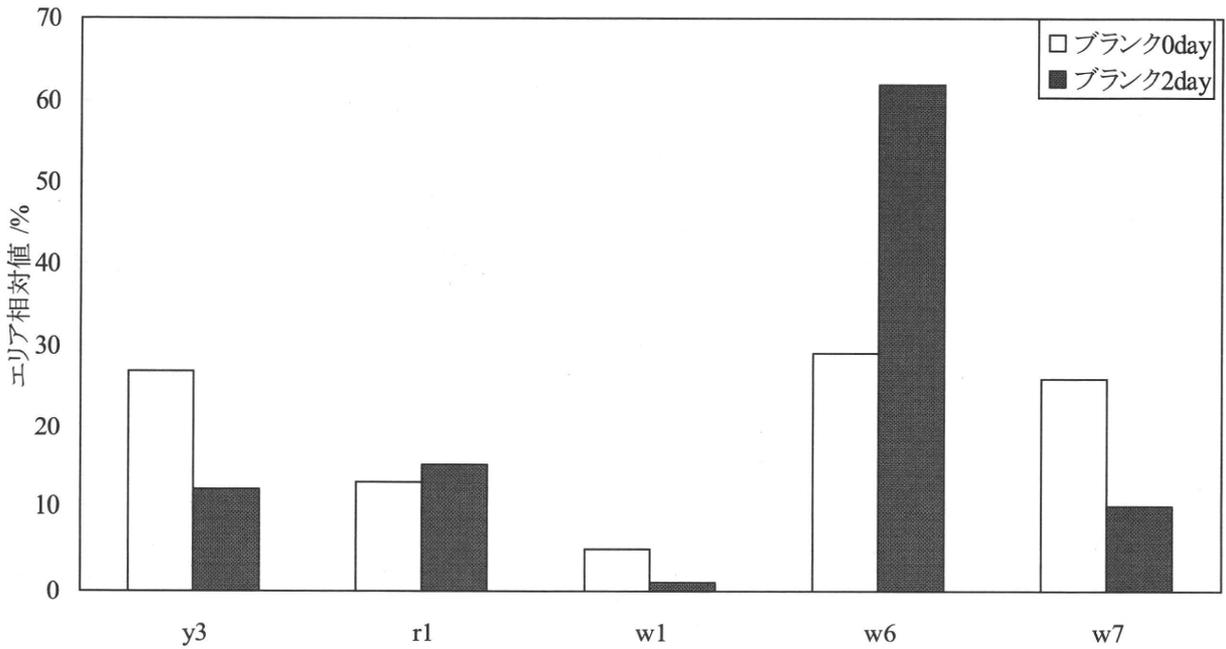


図8 空白の培養前後のエリア相対値

4-2) 塩素処理に関する解析結果

塩素処理（接触時間 1, 10, 60 min.）後と処理前試料（空白）について、上記と同様に T-RFLP プロファイルを得た後、各株についてのエリア相対値を求め図9に示した。図10に塩素処理後に培養過程（2日間）を加えた場合の、各株のエリア相対値を示す。比較として処理前の試料に培養過程（2日間）を加えた場合を空白として示した。

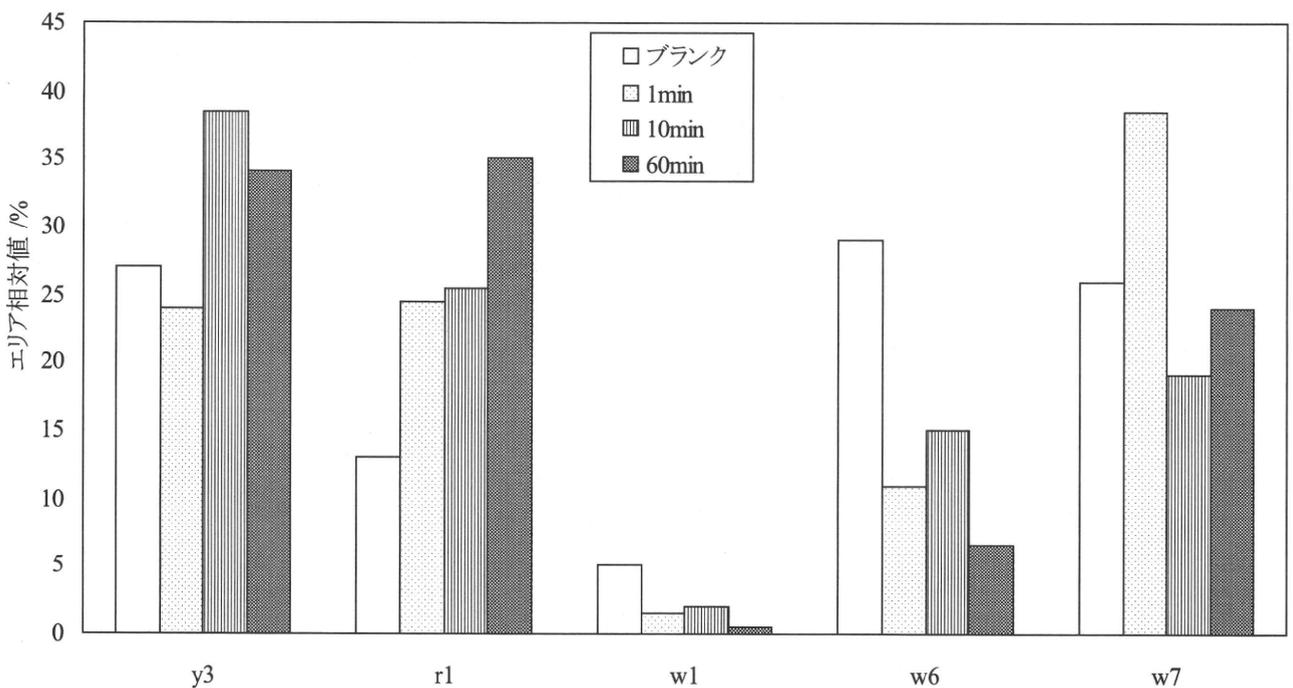


図9 塩素処理前後の各株のエリア相対値

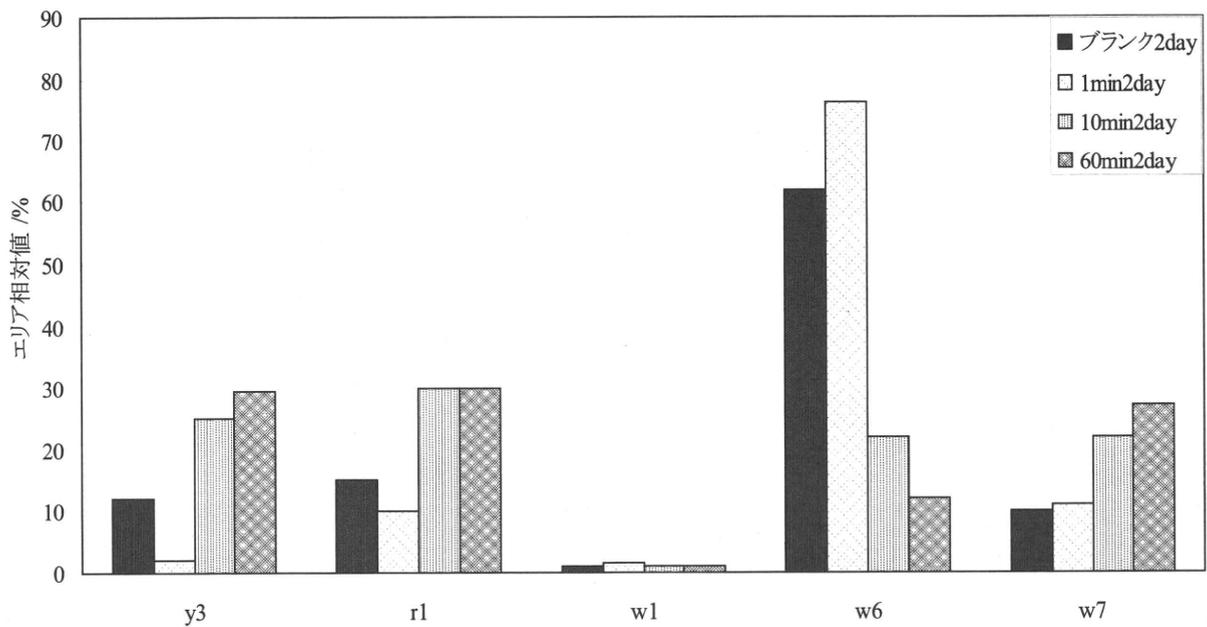


図 10 塩素処理前後の培養（2日間）後における各株のエリア相対値

#### 4-3) 紫外線処理に関する解析結果

紫外線処理（照射時間 15, 45, 75 sec.; それぞれ 4.5, 13.5, 22.5 mJ/cm<sup>2</sup> に相当）後と処理前試料（blank）について、上記と同様に T-RFLP プロファイルを得た後、各株についてのエリア相対値を求め、図 11 に示した。また図 12 に紫外線処理後に培養過程（2日間）を加えた場合の、各株のエリア相対値を示す。比較として処理前の試料に培養過程（2日間）を加えた場合をblankとして示した。

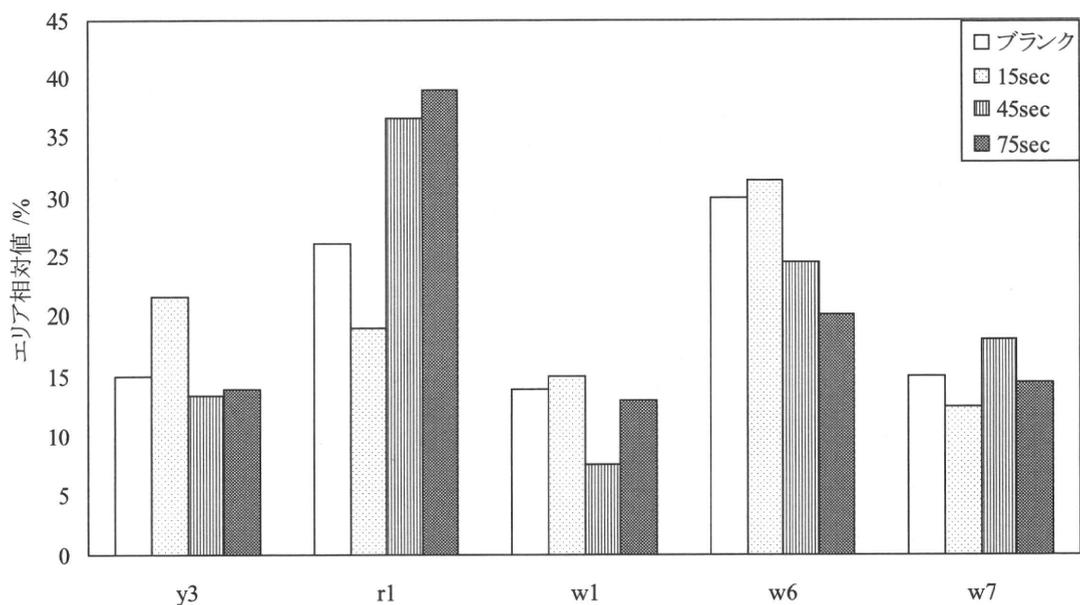


図 11 紫外線処理前後の各株のエリア相対値