

201134027A

厚生労働科学研究費補助金

健康安全・危機管理対策総合研究事業

貯水槽水道における水の滞留の長期化や  
不適切な管理による水質悪化とその対策  
に関する研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 早川哲夫

平成 24 (2012) 年 3 月

## 目次

### I. 総括研究報告書

- 貯水槽水道における水の滞留の長期化や不適切な管理による  
水質悪化とその対策に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1  
早川哲夫

### II. 分担研究報告書

1. 貯水槽水道における水の滞留の長期化や不適切な管理による  
水質悪化とその対策に関する研究  
（貯水槽中の残留塩素の変動と、それに伴う従属栄養細菌の増殖  
に関する研究）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7  
古畑勝則  
（資料）文献
2. 貯水槽水道における水の滞留の長期化や不適切な管理による  
水質悪化とその対策に関する研究  
（貯水槽水道の管理に関する自治体アンケート調査の結果について）・・・・・・ 73  
奥村明雄  
（資料）貯水槽水道の管理に関する自治体アンケート調査について

### III. 研究報告書細目次

1. はじめに・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 81  
研究の趣旨・目的・研究方法  
麻布大学 生命・環境科学部 教授 早川哲夫
2. 東京都特定建築物（建築物における衛生的環境の確保に関する法律）  
における事務所の飲料水等の使用量の実態・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 83  
（資料）飲料水等使用量調査（年度集計用）
3. 貯水槽水道水における汚染状況・リスク低減化の基礎調査・・・・・・・・・・ 91  
東京顕微鏡院 理事 伊藤 武
4. 結果・考察・今後の方向・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 107  
麻布大学 生命・環境科学部 教授 早川哲夫

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）

I. 総括研究報告書

貯水槽水道における水の滞留の長期化や不適切な管理による水質悪化とその対策に関する  
研究

研究代表者 早川哲夫 麻布大学教授

研究要旨 貯水槽水道の滞留時間と遊離残留塩素との関連について調査し、滞留時間が長いものほど、残留塩素濃度が低いことが判明。保健所へのアンケート調査では、滞留による水質悪化への認識は少なく、滞留時間が長くても残留塩素があればよいとの認識であった。文献調査により、多種類の従属栄養細菌が我が国の水道水中に生息していることが判明。またモデル貯水槽による実験や実プラントでの調査により、滞留時間と残留塩素などの関係を調べ、滞留時間が長いと残留塩素が低下し細菌の増殖がみられることを定量的に明らかにした。

研究分担者

古畑 勝則 麻布大学准教授

奥村明雄 一般社団法人全国給水衛生検査協会会長

A 研究目的

貯水槽内の水が滞留する事例が増加している。これは、残留塩素減少の原因となり、貯水槽水中に存在する細菌や原虫などの増加を引き起こす。貯水槽管理については、半日分程度の滞留を前提にしていたため、これまで長期滞留に伴う最近増殖が問題を引き起こすリスクについては考慮されてこなかった。本研究では、実プラントでの調査やモデル貯水槽を用いて、長期滞留に伴うリスクの実態とメカニズムを明らかにするとともに、貯水槽の設備、装置の改善による適切な管理システムの構築を研究し、行政としてどのように指導していくべきか

の指針策定を行おうとするものである。

B 本研究は3か年計画で行う。まず、貯水槽水道の滞留時間の長期化の実態を調査するとともに、自治体が水の滞留に伴う水質悪化の問題についてどのような対応を取っているかを調査する。またモデル貯水槽や実プラントにより滞留時間と水質悪化の関係について研究する。次に水質悪化によって引き起こされる衛生上の問題点について研究する。最後にこれらの成果に基づき装置の改善による滞留の改善方法や、行政による指導指針の策定に関する研究を行う。本研究は3人の研究者のもとに日本タンク工業会、全国給水衛生検査協会、高層住宅

管理業協会、東京都衛生局、東京都水道局からの専門家による委員会を設けて研究する。

(倫理面への配慮) 特になし

## C 研究結果・考察

### 3-1 東京都貯水槽水道調査

近年、ライフスタイルの変化や洗面所・トイレ等での節水器具の普及により、ビル内での使用水量は以前に比べて低下している。そのため、30年以上前の調査に基づく空気調和・衛生工学便覧(第14版4給排水衛生設備編; (社)空気調和・衛生工学会、2010 以下、便覧という。)に記載されている事務所での使用水量60~100L/人・日を参考にすると、現在では受水槽等の容量が過大となる懸念がある。東京都では平成22年4月から23年10月までの立入検査において、残留塩素濃度不足による不適件数が飲料水で883件中22件(2.5%)、雑用水で331件中104件(31.4%)であった。

そこで、適正な容量の受水槽の設置や維持管理を指導するため、事務所ビルにおける設計水量、受水槽の回転数、使用水量及び飲用と雑用の使用割合の実態を調査した。

(調査概要)

調査は、主用途が事務所であり、都が所管する特別区内の延べ床面積10,000㎡を超える特定建築物(建築物における衛生的環境の確保に関する法律第2条に規定する施設)において実施した。(調査期間:平成22年4月~23年10月)

(結果・考察)

(1)ビルの建設時において、一人当たりの使用水量は平均 $68.5 \pm 15.9$  L/人・日で設計されていた。この値は便覧記載の60~100

L/人・日に近い値であり、厨房や冷却塔を除く使用水量の実態 $50.0 \pm 22.2$  L/人・日とは約20 L/人・日の差がある。したがって、建設時の設計水量を現状よりも少ない算定としなければ、竣工後に受水槽の容量が過大となることが明確になった。

(2)飲用系受水槽の回転数は、調査したビルの約7割で1.5回/日を下回っており、受水槽の容量が過大となっていた。十分な残留塩素を確保し、衛生的で安全な水を供給するためには、有効容量を減少させる等の対応が必要である。

(3)使用水量(飲用+雑用)の平均値は $50.0 \pm 22.2$  L/人・日、50 L/人・日未満のビルは56件(59%)だった。便覧記載の60~100 L/人・日と比較すると、使用される水量が非常に少なくなっている。また、飲用系の割合も約20%に減少していた。

(4)東京都では、平成15年度にも同様の調査を実施しているが、今回の調査でも飲料水の使用水量が減少していることが明確になった。使用水量の実態は設計値を下回っており、適正な容量の受水槽を設置することで、水槽内の停滞水を低減させ、末端水栓において残留塩素濃度を確保することができるものと考えている。

(5)今回の調査は、事務所用途のみを対象としたものであるため、ホテル、映画館などの状況は不明である。また、集合住宅など貯水槽水道の大部分を占める用途についての実態は、本法による検査対象となっていないため、検針データ等の解析

からでしか把握することが出来ない。適正な貯水槽設置と衛生的な有効容量を維持するためには、今後、集合住宅における1世帯あるいは居住者1人あたりの水道使用量の実態調査が、不可欠と思われる。

### 3-2 貯水槽水道の管理に関する自治体アンケート調査結果

- (1) 回答を得たのは、34保健所中26保健所で、回答率は、76.5%であった。
- (2) 問い1は、「貯水槽の水の滞留による水質悪化の問題について実態を調査し、把握しているか」についてである。
  - ① この結果は、「調査し、把握している」が35%（9保健所）で、「調査していない」が62%（16保健所）、回答なしが4%（1保健所）であった。新しい問題であるにもかかわらず、ある程度の期間が問題意識を持って対応していることが分かり、興味深い。
  - ② 「調査している」と回答したところは、いずれも一斉検査時、立ち入り検査時に「水の使用量調査」、「回転数」の把握を行っている。
  - ③ 「調査していない」「回答なし」と回答したところでも、「ある程度は行っている」、「回転数の低い場合は指導している」、「苦情相談のあった場合は調査してい

る」、「異常があれば調査している」等の自由記載があり、かなりの保健所で問題意識を持っていることがうかがえた。

(3) 問い2は、「何らかの指導をしているか」どうかの問いである。

- ① この結果は、「始めている」が54%（14保健所）、「始めていない」が42%（11保健所）「回答なし」が4%（1保健所）であった。半数を超える保健所が問題意識を持ち、何らかの指導を行っているとの結果となった。問い1の「実態を調査し、把握している」より大きな割合となっているが、全体の調査、把握に先行して、必要に応じ、個別に対応を行っていることが読み取れる。
- ② 「始めている」の回答した機関では、「適正な回転数になるよう要領の見直し」、「水位を下げての使用」、「水位制御装置の設置」、「必要に応じ、給水停止、清掃、水質検査の実施」、「有効容量を減少させる対策」、「直結給水化」等の指導が行われている。

### 3-3 貯水槽中の残留塩素の変動とそれに伴う従属栄養細菌の消長に関する文献調査

貯水槽中の残留塩素の変動と、それに伴う従属栄養細菌の増殖に関する文献を検索した。

方法

「水道水」、「残留塩素」、「細菌」、「従属栄養細菌」、「増殖」などをキーワードとして、「J Dream II」、「医中誌」、「Pub Med」などを利用して検索を行った。

## 結果

検索した結果、関連のある文献を表1にまとめ、全文を添付した。貯水槽中の残留塩素の変動に伴う従属栄養細菌の増殖に関する文献は、まったく見つからなかった。

一方、我が国の水道水中に生息する従属栄養細菌に関する文献として以下の文献が検索された。

- 1) Identification of heterotrophic plate count bacteria isolated from drinking water in Japan by DNA sequencing analysis (2009)
- 2) 水道水中の従属栄養細菌の同定における DNA 塩基配列解析法と表現性状試験との比較 (2008)
- 3) Identification of yellow-pigmented bacteria isolated from hospital tap water in Japan and their chlorine resistance (2007)
- 4) Isolation and identification of *Methylobacterium* species from the tap water in hospitals in Japan and their antibiotic susceptibility (2006)
- 5) 病院内水道水からの貧栄養細菌の分離状況 (2006)

これらの文献から、残留塩素が存在する水道水中において、グラム陽性菌では *Micrococcus* spp. や *Staphylococcus* spp.、

*Mycobacterium* spp. など、グラム陰性菌では、*Sphingomonas* spp. (*Blastomonas* spp.、*Erythromonas* spp.)、*Methylobacterium* spp.、*Pseudomonas* spp. など多種類の従属栄養細菌が生息していることが明らかになった。

これらの菌種は、貧栄養細菌が多いことから、水道水中での増殖は可能であると考えられる。したがって、水道水の滞留などにより残留塩素が消失した場合には、これらの従属栄養細菌が増殖する可能性が考えられた。

## 3-4 貯水水道水における従属細菌の汚染状況並びにリスク低減化の基礎調査

貯水槽に水道水が滞留することにより飲料水に汚染している従属栄養細菌が増殖するリスクが推察されているが、使用されている貯水槽での実態調査がないことからモデル実験と実地調査を行った。特に従属栄養細菌の汚染菌量と滞留時間や残留塩素濃度などとの関わりについて調査した。

### 1. モデル実験における従属栄養細菌の汚染菌量と経日的変動

#### 1) 実験モデル貯水槽

1m<sup>3</sup> の大きさの貯水槽 (材質: FRP、ガラス繊維強化プラスチック) を立川市内の (財)東京顕微鏡院の敷地内に設置した。

#### 2) 実験用の飲料水

モデルの貯水槽に立川市水道水を 1m<sup>3</sup> 入れ、1ヶ月間に渡り経日的に検査を実施した。

#### 3) 調査期間

本調査は平成 24 年 1 月 18 日から 2 月 17 日までの期間

## 結果

1. モデル実験における従属栄養細菌の汚染菌量は 10cfu/10ml 以下であり、経日的に検討したが、従属栄養細菌の増殖は認められなかった。ただし、実験が 1 月の冬季であったことから、水温が 10℃前後であり、長期間の観察でも菌の増殖が認められなかったと推察される。今後は気温の高い夏季や秋季での検討が必要であろう。

2. 実地調査では貯水槽 31 件中 29 件 (93.5%) から従属栄養細菌が検出され、本菌は飲料水に広く汚染していると判断された。ただし、汚染菌量は 86.2% が 100cfu/10ml 以下の少数菌であった。

実地調査も冬季であったことから気温の高い夏季での調査が必要である。また、調査対象が飲食店に偏っており、今後は集合住宅や感染症に抵抗性の低い高齢者施設、病院などを対象とすべきである。

3. アンケート調査から一日の回転数を算出したが、回転数の少ないものが多く、全体の 62.5% が東京都の指導基準以下であり問題であることが分かった。今回は対象施設数が 25 と少ない為今後はさらに調査件数を増やし調査することが必要である。また貯水槽の一日の回転数と従属栄養細菌数とは明確な成績が得られていないので、さらに調査数を増やして検討すべきである。

4. 検出された従属栄養細菌はグラム陰性の桿菌が 65%、グラム陽性桿菌が 29%、少数のグラム陽性球菌で、グラム陰性球菌は検出されなかった。これらの菌については生化学的性状試験を実施したが、生物活性が低く分類することができなかった。今後は 16S r DNA 塩基配列などの遺伝子による

菌属や菌種の解析が必要である

5. 検出された従属栄養細菌の各種温度条件での増殖態度や塩素抵抗性についての詳細な実験が従属栄養細菌のリスク評価の基礎的資料の提供となろう。

## D 今後の研究の方向

平成 24 年度は、貯水槽中の滞留時間が長期化しているかどうかの実態や、それに伴って引き起こされる水質悪化の実態について地域を広げて、また小規模のものを含めて対象を拡大し、調査件数を増やしてアンケート調査をおこなう。これによってより広範な地域における滞留時間の長期化の実態を把握する。また長期化に伴ってよって引き起こされる衛生上の問題点について、実プラントを対象に調査し、研究する。平成 23 年度の結果では、冬季であったにも関わらず 93.5% の貯水槽から従属栄養細菌が検出されるなど汚染が進行していることが判明した。24 年度には増殖が促進される夏季に、集合住宅や感染症に抵抗性の低い高齢者施設、病院などを対象に調査を行う予定である。また遺伝子解析を行い菌属、菌種を特定することも行っていく予定である。平成 25 年度は装置の改善による滞留の改善方法、行政による指導指針の策定に関する研究を行う。貯水槽水道はそのすべてが適切に管理されているわけではなく、一定規模以上のもののみが水道法で管理が義務付けられているだけである。その検査は年に 1 回行えばよく、検査内容には、滞留時間は含まれてはいない。滞留時間が長くなった場合には、塩素を追加添加することによって対処している例があるが、塩素に対して耐性のある細菌の不活化は困難であ

る。最後に、現在の管理者の意識を前提に、費用負担をできる限り少なくし、技術レベルの現状も踏まえながら、装置の改善を行

い、滞留を改善するため衛生行政担当者が利用できる指導指針の案を策定する。



II. 分担研究報告書

1. 貯水槽水道における水の滞留の長期化や不適切な管理による水質悪化とその対策に関する研究（貯水槽中の残留塩素の変動と、それに伴う従属栄養細菌の増殖に関する研究）

研究分担者 古畑勝則 麻布大学准教授

研究要旨 貯水槽における滞留時間の長期化により残留塩素が減少し、それに伴い従属栄養細菌が増加する可能性がある。従属栄養細菌はこれまで貯水槽水中において十分にはその実態が明らかになっておらず今年度は文献により貯水槽中の残留塩素の変動とそれに伴う従属栄養細菌の消長に関する調査をおこない、我が国の貯水槽水中に従属栄養細菌の存在を確認した

A 研究目的

文献により、貯水槽中の残留塩素の変動とそれに伴う従属栄養細菌の消長に関し調査する

B 研究方法

「水道水」、「残留塩素」、「細菌」、「従属栄養細菌」、「増殖」などをキーワードとして、「J Dream II」、「医中誌」、「Pub Med」などを利用して検索を行った。

（倫理面への配慮）特になし

C 研究結果

検索した結果、関連のある文献を表1にまとめ、全文を添付した。貯水槽中の残留塩素の変動に伴う従属栄養細菌の増殖に関する文献は、まったく見つからなかった。

一方、我が国の水道水中に生息する従属栄養細菌に関する文献として以下の文献が

検索された。

- 1) Identification of heterotrophic plate count bacteria isolated from drinking water in Japan by DNA sequencing analysis (2009)
- 2) 水道水中の従属栄養細菌の同定における DNA 塩基配列解析法と表現性状試験との比較 (2008)
- 3) Identification of yellow-pigmented bacteria isolated from hospital tap water in Japan and their chlorine resistance (2007)
- 4) Isolation and identification of *Methylobacterium* species from the tap water in hospitals in Japan and their antibiotic susceptibility (2006)
- 5) 病院内水道水からの貧栄養細菌の分離

状況 (2006)

D・E 考察・結論

これらの文献から、残留塩素が存在する水道水中において、グラム陽性菌では *Micrococcus* spp. や *Staphylococcus* spp.、*Mycobacterium* spp. など、グラム陰性菌では、*Sphingomonas* spp. (*Blastomonas* spp.、*Erythromonas* spp.)、*Methylobacterium* spp.、*Pseudomonas* spp. など多種類の従属栄養細菌が生息していることが明らかになった。

これらの菌種は、貧栄養細菌が多いことから、水道水中での増殖は可能であると考えられる。したがって、水道水の滞留などにより残留塩素が消失した場合には、これらの従属栄養細菌が増殖する可能性が考えられた。

表1 文献一覧

1) 微生物汚染実態に関する文献

No.	著者	所属	タイトル	掲載誌	巻、号	ページ	発行年
1	Inomata, A	東京都健康安全研究センター	Identification of heterotrophic plate count bacteria isolated from drinking water in Japan by DNA sequencing analysis (日本の飲料水から単離された従属栄養細菌のDNAシーケンシングによる同定)	Biocontrol Science	14(4)	139-145	2009
2	猪又明子	東京都健康安全研究センター	水道水中の従属栄養細菌の同定におけるDNA塩基配列解析法と表現性状試験との比較	水環境学会誌	31(10)	609-614	2008
3	Furuhata, K	麻布大学	Identification of yellow-pigmented bacteria isolated from hospital tap water in Japan and their chlorine resistance (病院水道水から単離した黄色色素細菌の同定)	Biocontrol Science	12(2)	39-46	2007
4	Furuhata, K	麻布大学	Isolation and identification of <i>Methylobacterium</i> species from the tap water in hospitals in Japan and their antibiotic susceptibility (日本の病院における水道水からの <i>Methylobacterium</i> 属細菌の分離同定と抗生物質感受性)	Microbiology and Immunology	50(1)	11-17	2006
5	古畑勝則	麻布大学	病院内水道水からの貧栄養細菌の分離状況	防菌防黴	34(6)	323-328	2006
6	山本啓之	岐阜大学	<i>Legionella</i> 属細菌の水道水汚染とその non-culturable form について	岐阜大学医学部紀要	38(5)	767	1990

2) 残留塩素に関する文献

No.	著者	所属	タイトル	掲載誌	巻、号	ページ	発行年
7	大坪秀樹	町田保健所	マンション受水槽での残留塩素消失事例への対応について	東京都福祉保健医療学会誌		46-47	2005
8	露木敏勝	東京女子医科大学看護短大	水道水中の残留塩素について	東京女子医科大学看護短大研究紀要	19	109-114	1997

3) 従属栄養細菌に関する文献

No.	著者	所属	タイトル	掲載誌	巻、号	ページ	発行年
9	Allen, MJ		Heterotrophic plate count bacteria- what is their significance in drinking water ?	Int J Food Microbiol	92	265-274	2004
10	Sartory, DP		Heterotrophic plate count monitoring of treated drinking water in the UK: a useful operational tool.	Int J Food Microbiol	92	297-306	2004

Original

## Identification of Heterotrophic Plate Count Bacteria Isolated from Drinking Water in Japan by DNA Sequencing Analysis

AKIKO INOMATA\*, TAKASHI CHIBA, AND MITSUGU HOSAKA

*Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, Hyakunin-cho 3-24-1,  
Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan*

Received 19 March, 2009/Accepted 20 June, 2009

Heterotrophic plate count (HPC) test has been employed to indicate the effectiveness of water treatment processes and the microbiological condition of the distribution system. In Japan, because the majority of HPC bacteria are supposed to be harmless and all tap water should maintain residual chlorine, there are few studies of the virulence of HPC bacteria. In this study, we examined HPC bacteria isolated from finished and tap water for hemolytic activity to determine their virulence potential. 34 of 39 colonies expressing hemolytic activity were identified by partial 16S rDNA sequencing, but some of their percent identity were relatively low. This may have been due to the mismatching of the primer pair with some strains, or these strains may be unidentified new species. A total of 30 of 34 isolates identified have been reported to be opportunistic pathogens or food poisoning bacteria. To control the growth of these opportunistic pathogens among HPC bacteria, appropriate water quality control must always be done and residual chlorine must be maintained in every tap for a safe water supply.

*Key words* : HPC bacteria/Drinking water/Hemolysis assay/16S rDNA sequencing/Opportunistic pathogen.

### INTRODUCTION

The heterotrophic plate count (HPC) test has been considered to be a good indicator of the effectiveness of water treatment processes and the microbiological condition of the drinking water distribution system because the number of HPC bacteria in drinking water is greater than coliforms or standard plate count bacteria, and also HPC bacteria increase in the cases of the loss of residual disinfectant or the stagnation of water in the distribution system. In Japan, there have been few studies on the virulence of HPC bacteria because all tap water is regulated to maintain residual chlorine by law and, the majority of HPC bacteria found in tap water are supposed to be harmless

(Japan Water Works Association, 2001). However, in Europe, United States, and South Africa, many studies on the virulence of HPC bacteria have been carried out. In those studies, some virulence factors were researched. To produce disease, bacteria must often attach to, penetrate, and multiply in epithelial cells or produce toxins or other substances that disrupt the normal metabolism of the attacked cells. In these countries, HPC bacteria expressing virulence factors such as hemolysis, cytotoxicity, invasiveness, and adherence, were isolated from drinking water (Lye and Dufour, 1994; Payment, Coffin and Paquette, 1994; Edberg et al., 1997; Pavlov et al., 2002; Stelma et al., 2004; Lye and Dufour, 2006). To evaluate the health risks of HPC bacteria, individual virulent HPC bacterium isolated from drinking water should be identified accurately. Nonetheless, in these previous studies, various phenotypic tests could not successfully identify most of the virulent HPC bacteria at the

\*Corresponding author. Tel: +81-3-3363-3231; Fax: +81-3-3368-0088. E-mail: Akiko\_inomata(a)member.metro.tokyo.jp

species level (Payment, Coffin and Paquette, 1994; Edberg et al., 1997; Pavlov et al., 2002). It is considered that the scale of the database from phenotypic tests used is insufficient for identification of HPC bacteria in the environment because phenotypic tests have been developed for the identification of pathogenic bacteria.

Recently, 16S rDNA sequencing analysis has been applied as an easy and reliable tool for the identification and classification of bacteria (Furuhata et al., 2007; Ultoc et al., 2004; Williams et al., 2004; Tokajian et al., 2005; Singh et al., 2003). In the present study, we examined the growth ability at 37°C and hemolytic activity of isolated HPC bacteria to determine the virulence potential of HPC bacteria in finished and tap water. Then, we identified hemolytic HPC bacteria by partial 16S rDNA sequencing. We also considered the health effects of HPC bacteria isolated from drinking water.

## MATERIALS AND METHODS

### Water Samples

Finished water (28 samples) and tap water (9 samples) from a small water supply utility in the Tokyo metropolitan area were collected from their water purification plants and water supply area, respectively. At the sampling point, the concentration of residual chlorine (free or combined) was measured. The water was then sampled in a sterile plastic bottle (200ml volume) containing sodium thiosulfate for neutralization of residual chlorine in drinking water.

### Heterotrophic plate count (HPC) test

The HPC test was performed according to the established method in our laboratory (Hosaka and Maki, 2001). Briefly, a 1ml water sample was spread onto R2A agar (MERCK, Darmstadt, Germany). Then, it was incubated at 25°C, and colonies were counted after 7 days.

### Virulence potential assay

We examined the 1) growth ability at 37°C, 2) growth ability at 44.5°C, and 3) hemolytic activity of HPC bacteria to determine their virulence potential. All HPC colonies showing morphological differences were selected. They were inoculated onto R2A agar again and incubated at 37°C and 44.5°C. After 24 hours, growth ability at 37°C and 44.5°C was evaluated. Each strain grown at 37°C was then inoculated into sheep blood agar (Poa Media, Fiken Chemical, Tokyo, Japan) to assay hemolytic activity. After 24 hours incubation at 37°C, the type of hemolysis was recorded as alpha, beta, or negative.

### Identification of hemolytic HPC bacteria

HPC bacteria isolates expressing alpha or beta hemolysis were identified by partial 16S rDNA sequencing. Genomic DNA was extracted by alkali dissolution method according to Jiwa et al. (1989). Using the extracted DNA solution as the template for PCR, the 5' end partial region of 16S rRNA gene (about 500 bp) was amplified with MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The PCR products were purified with Montage PCR Centrifugal Filter Devices (Millipore, Bedford, MA, USA). The sequencing reaction of the PCR products was performed using MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Identification sequencing Kit (Applied Biosystems) and the reaction products were purified with Centri-Sep Spin Column (Applied Biosystems). A model ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) was used for sample electrophoresis and data collection. The obtained sequence data were compared with reference data from NCBI/EMBL/DBJ. The closest matching sequences in NCBI/EMBL/DBJ were identified by using basic local alignment search tool (BLAST).

## RESULTS and DISCUSSION

### HPC bacteria in water samples

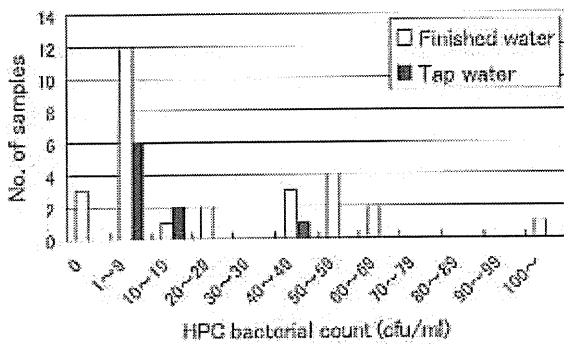
HPC bacteria have been added to the water quality management target items since 2008, and the target level is 2,000 colonies or less in 1 ml. Microbiological and Biological Standard Methods for Examination of Water Investigative Committee of Japan Water Works Association (2006) performed the national survey of HPC bacteria in drinking water. In the report, the ratio of HPC bacteria positive samples was 46% in finished water at 0 to 89 cfu/ml and 64% in tap water at 0 to 600 cfu/ml.

The results of HPC bacteria detection and residual chlorine concentration of water samples are shown in TABLE 1. HPC bacteria were detected from 25 of 28 (89%) finished water samples ranging at 0 to 180 cfu/ml (average 27.9 cfu/ml) and from all 9 tap water samples at 2 to 42 cfu/ml (average 11.1 cfu/ml). The positive rates and the level of HPC bacteria in this study are almost same as those in the 2006 report. HPC bacteria in drinking water in Japan therefore seems to be found at  $10^0$  to  $10^2$  cfu/ml.

FIG. 1 shows the distribution of the number of HPC bacteria in finished and tap water. HPC bacteria at 1 to 9 cfu/ml were most frequently found in our study, which agrees with other reported results (Microbiological and Biological Standard Methods for Examination of Water Investigative Committee of

**TABLE 1.** Distribution of HPC bacteria isolated from finished and tap water and the free or combined residual chlorine concentration of the water samples.

Type of water	No. of sample examined	Positive sample		Heterotrophic bacteria count		Residual chlorine concentration (mg/l)						
		No.	(%)	range	(average)	Free					Combined	
						0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.5 <	1.5
Finished water	28	25	(89.3)	0 - 180	(27.9)	0	8	5	8	2	1	1
Tap water	9	9	(100)	2 - 42	(11.1)	2	2	3	0	1	1	0
Total	37	34	(91.9)	0 - 180	(23.8)	2	10	8	8	3	2	1



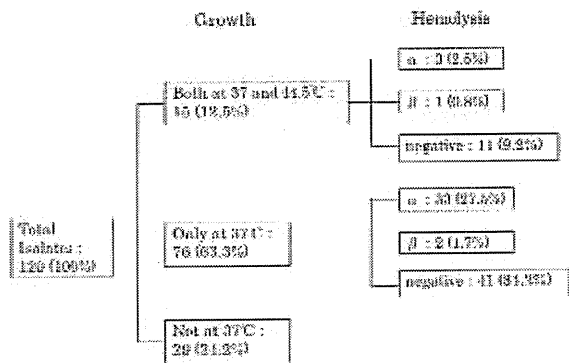
**FIG. 1.** Number of HPC bacteria in finished and tap water.

Japan Water Works Association, 2006; Furuhashi and Fukuyama, 2006).

Because all water samples in which HPC bacteria were isolated contained residual chlorine, those isolated HPC bacteria are thought to be resistant to chlorine disinfection. It is suggested that HPC bacteria can increase in biofilms on the surface of drinking water distribution systems because the positive rate of HPC bacteria in tap water was higher than in finished water.

**Virulence potential assay**

It is important to study the ratio of HPC bacteria showing virulence potential to evaluate their effects on health. FIG. 2 shows the growth ability at 37 and 44.5°C and the hemolytic activity of isolated HPC bacteria. 91 isolates of 120 examined could grow at 37°C. This means the majority of HPC bacteria which were thought to prefer relatively low temperatures can multiply at body temperature. Among the isolates that grew at 37°C, 36 isolates revealed alpha hemolytic activity and 3 isolates revealed beta. The ratio of hemolytic isolates among all isolated HPC bacteria was 32.5%, which agrees with a previously reported ratio (36%) (Lye and Dufour, 2006). In reported results for another virulence potential cytotoxic assay, the ratio of cytotoxic isolates was extremely low such as 0.2%, 0.8%, and 1% (Lye and Dufour, 1994; Payment, Coffin and Paquette, 1994.; Lye and Dufour,



**FIG. 2.** Growth ability at 37 and 44.5°C and hemolytic activity of isolated HPC bacteria.

2006). Therefore, the hemolytic assay is a useful tool to determine virulent HPC bacteria.

On the other hand, thermotolerant HPC bacteria that grew at 44.5°C were limited (12.5%) and hemolytic isolates were only 3.3% of all isolates. Iosaka and Maki (2001) showed that HPC bacteria isolated on oligotrophic media (R2A or PGY) are more numerous than those isolated on tryptone-glucose-yeast extract agar even if the incubation temperature is low. Therefore, HPC bacteria might be a different bacterial group from Enterobacteriaceae in terms of their thermotolerance and minimum nutrient requirements.

**Identification of hemolytic HPC bacteria**

Identification results from the 16S rDNA sequencing analysis and their hemolysis type are summarized in TABLE 2. Recently, the advances of DNA sequencing technology have enhanced the identification of bacteria, and especially 16S rDNA sequencing analysis has been applied to the identification and classification of bacteria (Furuhashi et al., 2007; Ultee et al., 2004; Williams et al., 2004; Tokajian et al., 2005; Singh et al., 2003). 16S rDNA sequencing analysis is superior to phenotypic tests in terms of its objectivity and reproductivity. Furthermore, as the sequence data recorded in public database are numerous, 16S rDNA sequencing analysis can be a useful tool for identification of bacteria to the species level.

We used the MicroSeq 500 kit to amplify the first 500 bp fragment that is most variable region of the 16S rDNA, but some isolates (i.e. No.2, No.3, No.6, No.8, No.12, No.23, No.32, No.33, and No.35) could not be identified to the species level. Furthermore, 5 of 39 isolates (i.e. No.5, No.7, No.16, No.22, and No.36) could not be amplified. Furuhashi et al. (2007) reported several strains had been given 2 species name when using the MicroSeq 500 kit to identify yellow pigmented bacteria isolated from drinking water. We experienced that some *Legionella* isolates could not be amplified by MicroSeq 500 kit. In addition, the percent identity of 17 isolates was lower than 97%. Stackbrandt and Goebel (1994) proposed that 16S rDNA sequences with less than 97% identity were most likely to belong to different species. According to this hypothesis, the results of identified isolates with less than 97% identity were questionable. There are many unidentified species among the HPC bacteria, so these strains may be new species. Also, the MicroSeq 500 primer pair might not be matched with these isolates showing a low percent identity. Though the MicroSeq 500 kit has those shortcomings, this kit can perform 16S rDNA sequencing analysis simply and quickly. In this way, this kit is useful in analyzing many samples such as in a field survey. If some isolates cannot be amplified or identified by the MicroSeq 500 kit, then these isolates might be amplified by using another universal primer pair, or another gene (e.g. *hsp66*) or DNA gyrase B that shows more rapid evolution than 16S rDNA.

In our study, the obtained sequence data were compared with the reference data from NCBI/EMBL/DBJ. The closest matching sequences in NCBI/EMBL/DBJ were identified by using BLAST. However, there was not enough sequence data for HPC bacteria in NCBI/EMBL/DBJ compared with that for pathogenic bacteria. For pathogenic bacteria, numerous sequences of known species such as ATCC strains have been recorded in NCBI/EMBL/DBJ, and it is easy to get the closest matching species sequences. In the cases of HPC bacteria, the closest matching sequences are occasionally unidentified bacteria sequences. For example, strain No.38 and No.39 were most closely matched with 'Uncultured alpha proteobacterium'. Furthermore, some recorded sequences were identified at the genus level (i.e. No.1, No.9, No.10, No.13, No.14, No.19, No.21, and No.27).

Though the classification of bacteria has changed as the DNA sequencing analysis has progressed, some sequences and species registered in NCBI/EMBL/DBJ have not been changed yet. That is why the same sequence is sometimes recorded as

different species. For example, the sequence of No.6 isolate showed the closest matching with *Bacillus simplex* and *B. macroides*. Heyrman et al. (2005) found that the strains identified as *B. macroides* in different collections do not belong to the same species. He suggested that some strains should be allocated to the species *B. simplex*. Thus, the sequence of No.6 isolate had the closest matching with these two species. In the same way, the sequence of No.33 isolate had the closest matching with *Mycobacterium fortuitum* subsp. *fortuitum* and *M. porcinum*. *M. porcinum* was described in 1983 as a causative agent of submandibular lymphadenitis in swine (Tsukamura, Nemoto and Yugi, 1983). Because of almost complete phenotypic and molecular similarity in identity between *M. fortuitum* ATCC49404 and *M. porcinum*, Wallace Jr. et al. (2004) suggested that they belong to the same species. They reported 100% identity of the first 500 bp beginning at the 5' end between *M. porcinum* and *M. fortuitum*. Therefore, it was a natural result that the sequence of No.33 isolate showed the closest matching with these two species. To enhance the effectiveness of 16S rDNA sequencing analysis to identify HPC bacteria, many researchers should register the DNA sequence data of environmental bacteria.

#### Evaluation of the health effects of identified hemolytic HPC bacteria

We identified 34 isolates of hemolytic HPC bacteria. As far as we know, this is the first report on an isolation and identification trial of hemolytic HPC bacteria from finished and tap water in Japan. To evaluate the presence of HPC bacteria in drinking water, we must discuss the health effects and occurrence of identified hemolytic HPC bacteria.

The most frequently found genus was *Sphingomonas* (total 13 isolates). *Sphingomonas* species can act as opportunistic pathogens and have caused meningitis, bacteremia, septicemia, peritonitis, and neonatal infections in intensive care units (Yabuuchi and Kosako, 2005).

The second most frequently found genus was *Staphylococcus* (6 isolates). Identified species were *S. pasteurii*, *S. wareneri*, *S. cohnii*, and *S. hominis*, which are coagulase-negative staphylococci. They are commonly found on human skin, can cause bacteremia related to indwelling devices, central nervous system shunt infections, infective endocarditis, urinary tract infections, and endophthalmitis (Huebner and Goldmann, 1999).

The third most frequently found genus was *Mycobacterium* (4 isolates). Identified species were *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* (or *M. porcinum*), *M.*

TABLE 2. Identification of hemolytic HPC bacteria.

Isolate No.	Type of hemolysis	16S rDNA sequence	Accession No.	Identity (%)
1	$\beta$	Uncultured <i>Staphylococcus</i> sp.	EF547991	84
2	$\alpha$	<i>Sphingomonas ursicola</i>	AB024289	96
		<i>Sphingomonas natatoria</i>	AB024288	96
3	$\beta$	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	AJ717376	100
		<i>S. warneri</i>	AY186059	100
4	$\beta$	<i>Bacillus cereus</i>	AY138271	99
5	$\alpha$	Not amplified		
6	$\alpha$	<i>Bacillus simplex</i>	FF690433	96
		<i>B. macroides</i>	AF501367	96
7	$\alpha$	Not amplified		
8	$\alpha$	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	AJ717376	95
		<i>Staphylococcus warneri</i>	EF442317	95
9	$\alpha$	<i>Sphingomonas</i> sp.	AB033949	93
10	$\alpha$	<i>Brevibacterium</i> sp.	EU099374	96
11	$\alpha$	<i>Sphingomonas xenophaga</i>	AY611716	93
12	$\alpha$	<i>Sphingomonas ursicola</i>	AB024289	95
		<i>Sphingomonas natatoria</i>	AB024288	95
13	$\alpha$	<i>Sphingomonas</i> sp.	DQ340653	96
14	$\alpha$	<i>Mycobacterium</i> sp.	AM990744	88
15	$\alpha$	<i>Acidovorax deluvii</i>	EU434539	90
16	$\alpha$	Not amplified		
17	$\alpha$	<i>Mycobacterium cosmeticum</i>	AY449729	94
18	$\alpha$	<i>Staphylococcus cohnii</i>	AB009938	99
19	$\alpha$	<i>Sphingomonas</i> sp.	AB033949	100
20	$\alpha$	<i>Micrococcus luteus</i>	AF501366	99
21	$\alpha$	<i>Caulobacter</i> sp.	FF433789	93
22	$\alpha$	Not amplified		
23	$\alpha$	<i>Sphingomonas ursicola</i>	AB024289	97
		<i>Sphingomonas natatoria</i>	AB024288	97
24	$\alpha$	<i>Staphylococcus warneri</i>	AY126244	100
25	$\alpha$	<i>Staphylococcus hominis</i>	AJ717375	99
26	$\alpha$	<i>Bacillus idriensis</i>	EF010751	95
27	$\alpha$	<i>Sphingomonas</i> sp.	CU071484	97
28	$\alpha$	<i>Cupriavidus metallidurans</i> *	AY860234	98
29	$\alpha$	<i>Micrococcus luteus</i>	AJ309917	99
30	$\alpha$	<i>Micrococcus luteus</i>	FF187229	99
31	$\alpha$	<i>Mycobacterium mucogenum</i>	AM884316	97
32	$\alpha$	<i>Sphingomonas ursicola</i>	AB024289	95
		<i>Sphingomonas natatoria</i>	AB024288	95
33	$\alpha$	<i>Mycobacterium porcinum</i>	AY012581	99
		<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>	AY457068	99
34	$\alpha$	<i>Sphingomonas xenophaga</i>	X94098	98
35	$\alpha$	<i>Sphingomonas macrogoltabida</i>	AB372254	95
		<i>Sphingomonas chilensis</i>	EF203909	95
36	$\alpha$	Not amplified		
37	$\alpha$	<i>Sphingomonas xenophaga</i>	X94098	97
38	$\alpha$	Uncultured alpha proteobacterium	EF702819	90
39	$\alpha$	Uncultured alpha proteobacterium	AF446303	95

\*: Synonym of *Halstonia metallidurans*.

*cosmeticum*, *M. mucogenum*, which are nontuberculous mycobacteria. *M. fortuitum* can cause intractable pulmonary disease (Mangione et al., 2001), as well as surgical wound infections, osteomyelitis, and catheter-related infections (Wallace Jr. et al., 2004). *M. cosmeticum* has been

isolated from footbath drains and a sink, and from a granulomatous subdermal lesions (Cooksey et al., 2004). Nontuberculous mycobacteria have high chlorine resistance and are capable of biofilm formation, so they are frequently isolated worldwide from water distribution systems (Primm, Lucero, and I-alkinham



Ili, 2004; Furuhashi et al., 2007; Williams et al., 2004; Tokajian et al., 2005; September, Brozof, and Venter, 2004).

Three strains of *Micrococcus luteus* were isolated. *Micrococcus* species were regarded as non-pathogenic skin commensals, but *M. luteus* has been reported as the causative agent of intracranial abscesses, meningitis, pneumonia, and septic arthritis in immunosuppressed or immunocompetent hosts (Altuntas et al., 2004). *Micrococcus* species also have high chlorine resistance. Mir, Morato, and Ribas (1997) demonstrated that *M. luteus* was inactivated only by 0.79 log after 60 minutes of 0.5 mg/l free chlorine treatment.

Three strains of *Bacillus* species were isolated; *B. cereus*, *B. simplex*, and *B. idriensis*. *B. cereus* is distributed in the environment in the soil and air, and known as a causative agent of food poisoning. *B. simplex* is also reported as a causative agent of food poisoning (Taylor et al., 2005). *B. idriensis* was isolated from the blood of newborn child with sepsis (Ko et al., 2006).

One isolated strain, *Cupriavidus metallidurans* (Synonym *Ralstonia metallidurans*), has been reported as a causative agent of pulmonary infections for cystic fibrosis patients (Goris et al., 2001).

As a result, 30 of 34 isolates identified have been reported to be opportunistic pathogens or food poisoning bacteria. We think that the existence of these bacteria in drinking water does not necessarily mean danger for human health, because the number of HPC bacteria can be extremely low when drinking water retains residual chlorine. However, HPC bacteria can increase when residual chlorine concentration is decreased, or disappears because of their high chlorine resistance and ability to form biofilm. Actually, Hirata et al. (1993) reported that the number of HPC bacteria in first flush of tap water with low residual chlorine concentration is 10~100 times higher than in tap water after being run for 2~5 minutes. In addition, though the number of HPC bacteria was usually  $10^4$  cfu/ml in appropriately controlled tap water, the number of HPC bacteria in the water of a polluted receiving tank sometimes exceeded  $10^6$  cfu/ml (Hosaka and Maki, 2001). To control the growth of these opportunistic HPC bacterial pathogens, appropriate water quality control must always be done and residual chlorine must be maintained to keep a safe water supply. The significance of opportunistic HPC bacteria is still uncertain, so further studies should be performed.

#### REFERENCES

- Altuntas, F., Yildiz, O., Esor, B., Gundogan, K., Sumerkan, B., and Celin, M. (2004) Catheter-related bacteremia due to *Kocuria rosea* in a patient undergoing peripheral blood stem cell transplantation. *BMC Inf. Dis.*, **4**, doi: 10.1186/1471-2334-4-62.
- Cooksey, R. C., de Waard, J. H., Yakrus, M. A., Rivera, I., Chopito, M., Toney, S. R., Morlock, G. P., and Butler, W. II. (2004) *Mycobacterium cosmeticum* sp. nov., a novel rapidly growing species isolated from a cosmetic infection and from a nail salon. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 2385-2391.
- Edberg, S. C., Kops, S., Kontniok, C., and Escarzano, M. (1997) Analysis of cytotoxicity and invasiveness of heterotrophic plate count bacteria (HPC) isolated from drinking water on blood media. *J. Appl. Microbiol.*, **82**, 455-461.
- Furuhashi, K., and Fukuyama, M. (2006) Isolation of oligotrophic bacteria from hospital tap water (in Japanese). *Nokin Bobai*, **34**, 323-328.
- Furuhashi, K., Kato, Y., Goto, K., Saitou, K., Sugiyama, J., Hara, M., and Fukuyama, M. (2007) Identification of yellow-pigmented bacteria isolated from hospital tap water in Japan and their chlorine resistance. *Biocontrol Science*, **12**, 39-46.
- Goris, J., De Vos, P., Coenye, T., Hoste, B., Janssens, D., Brim, H., Diels, L., Mergaoy, M., Kersters, K., and Vandamme, P. (2001) Classification of metal resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp. nov., *Ralstonia metallidurans* sp. nov. and *Ralstonia basiflensis* Stele et al. 1998 emend. *Int. J. Syst. Evol. Micro.*, **51**, 1773-1782.
- Heyman, J., Logan, N. A., Rodriguez-Diaz, M., Scholdeman, P., Lebba, L., Swings, J., Heyndrickx, M., and De Vos, P. (2005) Study of mural painting isolates, leading to the transfer of '*Bacillus macrococcus*' and '*Bacillus carotatum*' to *Bacillus simplex*, emended description of *Bacillus simplex*, reexamination of the strains previously attributed to '*Bacillus macroides*' and description of *Bacillus muralis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Micro.*, **55**, 119-131.
- Hirata, T., Tosa, K., Kawamura, K., Nakajima, J., Kanoko, M., and Taguchi, K. (1993) Heterotrophic bacteria in chlorinated drinking water distribution: detection and identification. *Wat. Sci. Techn.*, **27**, 155-158.
- Hosaka, M., and Maki, T. (2001) Examination of media and culture condition for enumeration of heterotrophic bacteria in water samples (in Japanese). *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.*, **52**, 245-249.
- Huebner, J., and Goldman, D. A. (1999) Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu. Rev. Med.*, **50**, 223-236.
- Japan Water Works Association (2001) *Standard Methods for Examination of Water Commentary Edition* (in Japanese), pp827, JWWA, Tokyo.
- Jiwa, N. M., Van Gemert, G. W., Raap, A. K., Van de Rijke, F. M., Mulder, A., Lens, P. F., Salimans, M. M., Zwaan, F. E., Van Dorp, W., and Van der Ploeg, M. (1989) Rapid detection of human cytomegalo-virus DNA in peripheral blood leukocytes of viremic transplant recipients by the polymerase chain reaction. *Transplantation*, **48**, 72-75.
- Ko, K. S., Oh, W. S., Lee, M. Y., Lee, J. H., Lee, H., Peck, K. R., Lee, N. Y., and Song, J. H. (2006) *Bacillus infantis* sp. nov. and *Bacillus idriensis* sp. nov., isolated from a patient with neonatal sepsis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **56**, 2541-2544.
- Kumar, S., Tamura, K., and Nei, M. (2004) MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics

- analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.*, **5**, 150-163.
- Lye, D. J., and Dufour, A. P. (1994) A membrane filter procedure for assaying cytotoxic activity in heterotrophic bacteria isolated from drinking water. *J. Appl. Bacteriol.*, **70**, 89-94.
- Lye, D. J., and Dufour, A. P. (2006) Virulence characteristics of heterotrophic bacteria commonly isolated from potable water. *Env. Tox. Wat. Qual.*, **8**, 13-23.
- Mangione, E. J., Hult, G., Lenaway, D., Beebe, J., Bailoy, A., Figoski, M., Rau, M. P., Albrocht, K. D., and Yakrus, M. A. (2001) Nontuberculous mycobacterial disease following hot tub exposure. *Emerg. Infect. Dis.*, **7**, 1039-1042.
- Microbiological and Biological Standard Methods for Examination of Water Investigative Committee of Japan Water Works Association (2006) The result of national survey of HPC bacteria in drinking water in summer in Japan (in Japanese). *J. J. W. W. A.*, **75**, 139-141.
- Mir, J., Morato, J., and Ribas, F. (1997) Resistance to chlorino of freshwater bacterial strains. *J. Appl. Microbiol.*, **82**, 7-18.
- Pavlov, D., de Wet, C. M. E., Grabow, W. O. K., and Ehlers, M. M. (2002) Determinations of cytotoxicity and invasiveness of heterotrophic plate count bacteria isolated from drinking water. *Water Supply*, **2**, 115-122.
- Payment, P., Coffin, F., and Paquette, G. (1994) Blood agar to detect virulence factors in tap water heterotrophic bacteria. *Appl. Env. Microbiol.*, **60**, 1179-1183.
- Primm, T. P., Lucero, C. A., and Falkinham III, J. O. (2004) Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.*, **17**, 98-106.
- September, S. M., Drozd, V. S., and Venter, S. N. (2004) Diversity of nontuberculoïd *Mycobacterium* species in biofilms of urban and semiurban drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 7571-7573.
- Singh, R., Stine, O. C., Smith, D. L., Spltznägel, J. K., Labib, Jr., M. E., and Williams I. N. (2003) Microbial diversity of biofilms in dental unit water systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 3412-3420.
- Stackebrandt, E., and Goebel, B. M. (1994) A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **44**, 846-849.
- Stolma, G. N. Jr., Lye, D. J., Smith, B. G., Messer, J. W., and Payment, P. (2004) Rare occurrence of heterotrophic bacteria with pathogenic potential in potable water. *Int. J. Food Microbiol.*, **92**, 249-254.
- Taylor, J. M., Sutherland, A. D., Aldoo, K. E., and Logan, N. A. (2005) Heat-stable toxin production by strains *Bacillus cereus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex* and *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **242**, 313-317.
- Uokajärvi, S. T., Hashwa, F. A., Hancock, I. C., and Zalloua, P. A. (2005) Phylogenetic assessment of heterotrophic bacteria from a water distribution system using 16S rDNA sequencing. *Can. J. Microbiol.*, **51**, 325-335.
- Tsukamura, M., Nemoto, H., and Yagi, H. (1983) *Mycobacterium porcinum* sp. nov., a porcine pathogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **33**, 162-165.
- Ultee, A., Souvatzi, N., Maniadi, and K., König, H. (2004) Identification of the culturable and nonculturable bacterial population inground water of a municipal water supply in Germany. *J. Appl. Microbiol.*, **96**, 560-568.
- Wallace Jr., R. J., Brown-Elliott, B. A., Wilson, R. W., Mann, I., Hall, I., Zhang, Y., Jost Jr., K. C., Brown, J. M., Kabani, A., Schinsky, M. T., Stoigerwalt, A. G., Crist, C. J., Roberts, G. D., Blacklock, Z., Tsukamura, M., Silcox, V., and Turenne, C. (2004) Clinical and laboratory features of *Mycobacterium porcinum*. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 5689-5697.
- Williams, M. M., Domingo, J. W. S., Meckes, M. C., Kelty, C. A., and Rochon, H. S. (2004) Phylogenetic diversity of drinking water bacteria in a distribution system simulator. *J. Appl. Microbiol.*, **96**, 954-964.
- Yabuuchi, E., and Kosako, Y., (2005) Family I. Sphingomonadaceae Genus I. Sphingomonas. In *Bergey's manual of systematic bacteriology second edition volume two the Proteobacteria part C the alpha, beta, delta, and epsilonproteobacteria*. pp. 234-258, Springer Science, New York.

水環境学会誌 Journal of Japan Society on Water Environment Vol.31, No.10, pp.609-614 (2008)  
 (論文—Original Paper)

## 水道水中の従属栄養細菌の同定における DNA塩基配列解析法と表現性状試験との比較

猪又明子\* 千葉隆司\* 保坂三継\*

### Comparison of DNA Sequencing Analysis with Phenotypic Test for Identification of Heterotrophic Bacteria Isolated from Drinking Water

Akiko INOMATA \*, Takashi CHIBA \* and Mitsugu HOSAKA \*

\* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, Hyakunin-cho 3-24-1, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

#### Abstract

Heterotrophic bacteria isolated from finished and tap water samples were examined for hemolysis activity to determine their virulence factors. Eleven colonies expressing hemolysis activity were identified by partial 16S rDNA sequencing and phenotypic test using Biolog<sup>TM</sup>. All eleven strains were identified at the genus level and eight strains were identified at the species level by 16S rDNA sequencing. On the other hand, phenotypic test could identify only two strains at the genus level and four strains at the species level. Furthermore, three of four strains identified at the species level by phenotypic test might have been misidentified. Therefore, it was suggested that phenotypic test is inadequate identifying heterotrophic bacteria in drinking water, whereas 16S rDNA sequencing is a useful identification tool for them. The eleven strains identified have been reported to be food poisoning bacteria or opportunistic pathogens. Since these opportunistic pathogens exist in heterotrophic bacteria, both appropriate water quality control and further study should be continued for safe tap water supply.

Key words: heterotrophic bacteria, drinking water, hemolysis assay, 16S rDNA sequencing, opportunistic pathogen

#### 1. はじめに

平成 20 年 4 月 1 日から従属栄養細菌が水質管理目標設定項目に追加された<sup>1)</sup>。その目的は「水道施設の健全性を判断するため、また、わが国における従属栄養細菌の存在量等必要な情報、知見の收拾を図るため<sup>2)</sup>」であり、当面の目標値として「1 ml の検水で形成される集落数として 2,000 以下 (暫定)<sup>3)</sup>」が示された。従属栄養細菌は水道水中に一般細菌よりも著しく多く存在することから、浄水処理過程や消毒過程での細菌の挙動を知る上で一般細菌よりも優れており、また配水施設内での水の滞留や塩素の消失に伴って増加することから、配水施設における水質管理上の指標としても利用できる<sup>4)</sup>。

このように従属栄養細菌の量に着目した水質指標性については、従来から一定の意義付けがされているが、質的な面に関しては情報が極めて乏しい。従属栄養細菌の中には日和見感染菌が含まれることが示唆されている<sup>5)</sup>が、従属栄養細菌のヒトへの健康影響を評価するためには、病原性状だけでなく、菌種名の同定が必要である。米国、ヨーロッパ、南アフリカ等では従属栄養細菌の病原性に関する調査が数多く行われており、溶血性、細胞毒性、細胞凝集性、細胞侵襲性を持つ細菌の分離が報

告されている<sup>6-10)</sup>。これらの研究においては、病原因子を持つ菌の同定に種々の表現性状試験が用いられたが、種まで分類できない菌が多く報告されている<sup>6-10)</sup>。また、わが国では水道水中の従属栄養細菌に関する研究はきわめて少ないことから、Hirata ら<sup>11)</sup>は水道水中の従属栄養細菌を調査し、それらの分離株を表現性状試験に基づいて属までの分類を試みた。その結果、一部の菌株において日和見感染菌を含む属が同定されたが、大部分の株が同定不能であったため、従属栄養細菌を分類する試験法の必要性を指摘した。

従属栄養細菌は低温、低栄養条件下で生育する菌が多く、表現性状を用いた市販同定キットによる正確な同定が困難であるものが多い。これは、同定に用いた表現性状試験の多くが病原細菌検出用に開発されたものであり、環境由来の非病原性細菌や日和見感染菌のデータベースが不十分であるためと考えられる。細菌の厳密な同定には、DNA-DNA 相同性、DNA の GC %、細胞壁のペプチドグリカン組成、菌体脂肪酸組成等を調べる必要がある。しかし、分離した菌株すべてについてこれらのデータを得るには、煩雑な作業と膨大な時間が必要となり、実用的でない。一方、近年細菌の 16S rDNA 塩基配列を利用した分類や同定手法が適用され始めており、特

\* 東京都健康安全研究センター 〒169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

に変異の高い領域である上流側 500 塩基対を対象とした塩基配列解析が数多く行われている<sup>14-16)</sup>。

そこで、本研究では浄水場の浄水及び給水栓水から分離した従属栄養細菌について、病原因子の指標として 37 °C での生育能力及び溶血性の有無を検査し、これらの因子保有状況を調査した。また、溶血性を示した菌の簡便な同定法として、市販キットを用いた 16S rDNA 塩基配列解析法と表現性状試験とを比較、検討した。さらに、同定された菌種について、ヒトへの健康影響等を考察した。

## 2. 方法

### 2.1 試料採取

平成 18 年 5～6 月に都内小規模浄水場の浄水 28 検体、給水栓水 9 検体を採取し、調査に用いた。採水時に現場で残留塩素濃度（遊離又は結合）を測定した。

### 2.2 細菌試験

1) 一般細菌：標準寒天培地（榮研化学）を用いて上水試験方法<sup>17)</sup>に従って試験した。

2) 従属栄養細菌：R2A 寒天培地（MERCK）を平板固化し十分に乾燥させた後、検水 1 ml を塗布し、25 °C で 7 日間培養<sup>18)</sup>後、形成された集落数を計数した。

### 2.3 病原因子調査

1) 体温下、高温下増殖能：従属栄養細菌の集落を目視による色・大きさで分類・計数し、各分類群から 1 集落を鉤菌して再度 R2A 培地に画線し、37 °C（体温下）及び 44.5 °C（高温下）で 24 時間培養し、増殖能の有無を調べた。

2) 溶血性試験：37 °C で増殖した菌を羊血液寒天培地（榮研化学）に穿刺し、37 °C で 24 時間培養後、溶血性（ $\alpha$ ,  $\beta$ ）の有無を判定した。

### 2.4 細菌の同定

溶血性を示した菌株について、下記の 2 方法により同定を試みた。

1) 16S rDNA 塩基配列解析：Hwa らの報告<sup>19)</sup>に準拠したアルカリ溶解法で菌体から DNA を抽出した。16S rDNA の上流側 500 塩基対を対象とする MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit (Applied Biosystems) を用いて反応液を調整後、DNA サーマルサイクラー (GeneAmp 9600: Perkin-Elmer) を用いて PCR を行った。PCR 産物の精製は Montage PCR Centrifugal Filter (Millipore) を用いた限外ろ過により行った。精製した PCR 産物を MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Identification Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてシーケンス反応を行った後 ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems) を用いて塩基配列の決定を行った。決定した塩基配列について Genbank を利用した BLAST (basic local alignment

search tool) 解析を行い、最も高い一致率を示したものを種として決定した。

2) 表現性状試験：生化学的性状試験には、Biolog システム (Biolog Inc) を用い、マニュアルにしたがって試験した。羊血を加えた Biolog Universal Growth Agar で 37 °C、24 時間前培養した後、菌体を所定の濃度に懸濁し、グラム陰性菌は GN2 プレート、グラム陽性菌は GP 2 プレートに接種した。24 時間後の測定で種または属を決定した。

3) 16S rDNA 塩基配列解析と表現性状試験結果の比較：2 種類の同定法で菌種名が異なった場合には、表現性状試験結果により同定された菌種の 16S rDNA 塩基配列を GenBank から取得し、MEGA3<sup>20)</sup>を用いた多重アライメントを行い、16S rDNA の塩基配列解析により得られた塩基配列と比較した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 従属栄養細菌と一般細菌の検出状況

水道水中の従属栄養細菌の実態については、日本水道協会水質試験方法等調査専門委員会微生物・生物部会による全国規模の調査報告がある<sup>21)</sup>。この報告によると、一般細菌の検出率は浄水で 4%、給水栓水で 2% であった。従属栄養細菌の検出率は浄水で 46%、給水栓水で 64% であり、その菌数は浄水で 0～89 cfu・ml<sup>-1</sup>、給水栓水で 0～600 cfu・ml<sup>-1</sup> であった。

本研究では、一般細菌は浄水 28 検体中 1 検体（検出率 3.6%）から 1 cfu・ml<sup>-1</sup> 検出され、給水栓水 9 検体からは全て不検出であり、上記の調査報告と同様の結果であった。

従属栄養細菌の検出率は Table 1 に示すように、浄水で 89%、給水栓水で 100% と上記の報告値よりも高い値であった。検出された細菌数は、浄水で 0～180 cfu・ml<sup>-1</sup>、給水栓水で 2～42 cfu・ml<sup>-1</sup> であり、上記の報告値

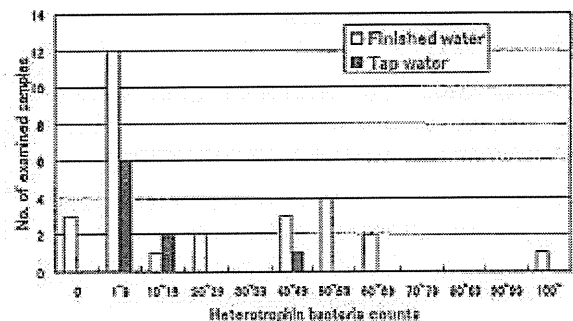


Fig. 1 Number of heterotrophic bacteria in finished and tap water.

Table 1 Distribution of heterotrophic bacteria isolated from finished and tap water and the free or combined residual chlorine concentration of the water samples.

Type of water	No. of sample examined	Positive sample No. (%)	Heterotrophic bacteria count range (average)	Residual chlorine concentration (ng・l <sup>-1</sup> )						
				0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.5<	1.5
Finished water	28	25 (89.3)	0 - 180 (27.9)	0	8	5	8	2	1	1
Tap water	9	9 (100)	2 - 42 (11.1)	2	2	3	0	1	1	0
Total	37	34 (91.9)	0 - 180 (23.8)	2	10	8	8	3	2	1