

水道管内の付着物生成機構に影響を与える細菌の分析

宇都宮大学地域デザイン科学部 学生会員 ○馬場春華

宇都宮大学地域デザイン科学部 正会員 山岡 暁

宇都宮大学工学部技術部 六本木美紀, 宇都宮大学工学部 荷方稔之

1. 背景・目的

水道管の内面劣化は、赤水や黒水などの水質障害や、水道管の断面積減少による流量低下を引き起こす可能性がある。これらの原因として、水道水中への懸濁物質の混入や、水道管の内壁の腐食などが挙げられており、水道事業において大きな問題となっている。

水道管内の堆積物・付着物については、既に研究されているが、水道管内の付着物に細菌が与える影響については明らかになっていない。

そこで、本研究では付着物生成のメカニズムを解明する基盤を構築するために、水道管内の懸濁物質中の細菌を特定すること、また、細菌による懸濁物質の付着を予防する方法を提案することを目的とする。

2. 方法

導水管内の洗浄排水から全 DNA を抽出した。

(1) 採取方法

水道管の洗浄中に排出された水を採取した。採取地域は国内 H 町, S 市を対象としており、H 町は導水管、S 市は配水管である。

H 町の水道管内状況を写真-1 に示す。

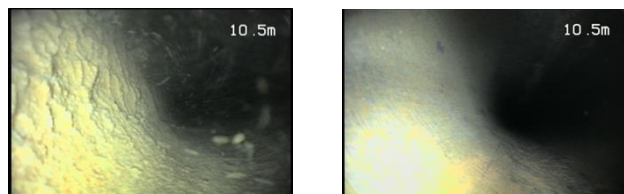


写真-1 H町管内状況(左:洗浄前 右:洗浄後)

(2) 分析方法

採取した H 町の洗浄排水を対象に、全 DNA の抽出を行った。対象とした洗浄排水を写真-2 に示す。遠心分離器を使用して、洗浄排水を液体部分と汚泥部分に分離させたのち、汚泥部分のみを使用した。抽出した全 DNA を鋳型として、細菌種に固有の塩基配列を持つ 16S rRNA 遺伝子の一部を PCR で増幅した。この増幅 DNA 産物を、変性剤濃度勾配ポリアクリルアミドゲル電気泳動(DGGE)により分離・検出することで、PCR により目的の DNA が増幅されたことが確認できたため、

標的 DNA バンドを切り出した。切り出したバンドから再度 DNA を抽出し、PCR 増幅を行った後、塩基配列を決定する。決定した塩基配列を国際 DNA データベースに対して相溶性検索することで、細菌種を特定する。さらに、H 町, S 市の DNA について次世代シーケンサー(NGS)による菌叢解析を行う。



写真-2 使用した洗浄排水

3. 結果

(1) DGGE

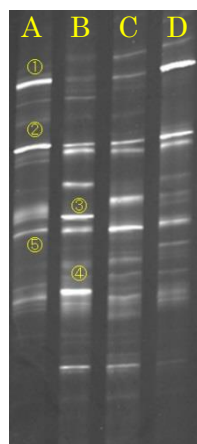


写真-3 DNA バンド

各レーン中に認められたバンドの数が、試料中に存在する細菌の種類、DNA バンドの明るさ・太さが、細菌種の存在割合の目安となる。なお、切り出しの標的とした DNA バンドを写真-3 に示す。

【レーン番号：試料詳細】

A : 1 日目洗浄中-1

B : 1 日目洗浄中-2

C : 2 日目洗浄中-1

D : 2 日目洗浄中-2

各レーンには多数の DNA バンドが観察されたことから、比較的多種類の細菌種が存在していることが分かった。また、中には明度が高く太い DNA バンドも見られたため、優占化している細菌が存在している可能性も考えられる。

(2) 塩基配列の相溶性検索

写真-3 に示す①～⑤の DNA バンドから決定された塩基配列を相溶性検索し、細菌を属レベルで特定した。最も相溶性の高い細菌と、相対率(%)を次に示す。

- ① : *Massilia* 属 (99.1%)
- ② : *Duganella* 属 (96.9%)
- ③ : *Vodesella* 属 (94.2%)
- ④ : *Geothrix* 属 (94.7%)
- ⑤ : *Roseateles* 属 (97.3%)

(3) NGS による菌叢解析

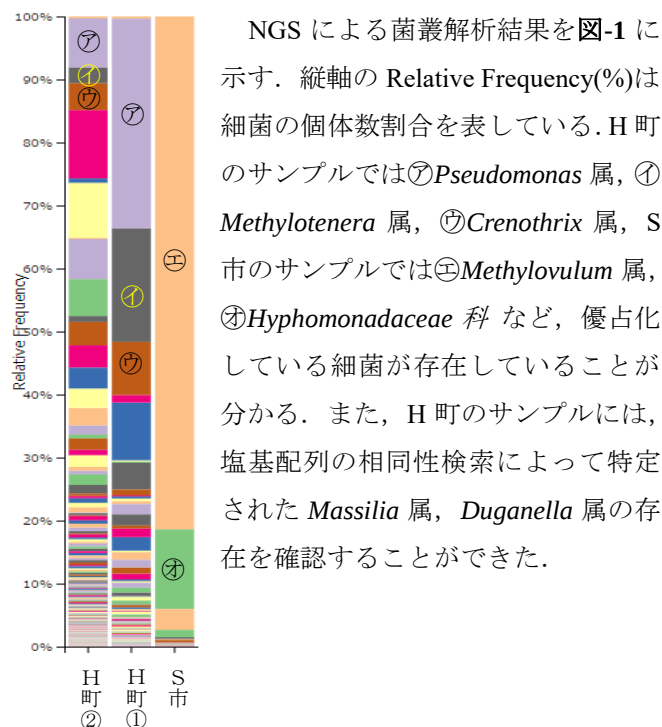


図-1 次世代シーケンサーによる菌叢解析結果

4. まとめ

これらの結果をもとに、優占化していると考えられる細菌について以下にまとめる。

(1) DGGE と NGS 両方で検出された細菌

- ・ *Massilia* 属：グラム陰性，カタラーゼ・オキシターゼ陽性，好気性の非運動性桿菌。25~37℃，pH7.0，NaCl 非存在下が増殖に最適である。

- ・ *Duganella* 属：グラム陰性，好気性の運動性桿菌。

(2) NGS 解析結果で個体数割合が大きい細菌

- ・ *Pseudomonas* 属：環境中に偏在しており，好気環境下では酸素を用いた呼吸で，嫌気環境下では脱窒を行って生育する。また，嫌気脱窒条件下では，細胞伸長や抗生物質耐性能の上昇などの好気条件下とは異なった形質及び遺伝子発現を示す。高いバイオフィーム形成機能を持つことからバイオフィーム研究のモデル微生物のひとつとなっている。バイオフィームの形成過程としては，まず鞭毛及び繊毛を介した付着により，物質表面に付着し，増殖に伴い凝集体を形成する。その後，細胞外多糖や細胞外 DNA などの EPS を分泌しながら

らマイクロコロニーから成熟したバイオフィームを形成する。やがて，菌体がバイオフィーム状態から脱離して浮遊状態に移行するが，浮遊菌は新たな環境をみつけて付着し，またバイオフィームを形成する。このようなライフサイクルをもってバイオフィーム状態と浮遊状態を行き来しながら生育している。

- ・ *Methylovulum* 属：土壌・湿地・堆積物・湖・污泥湿原に生息するグラム陰性の非運動性球菌。メタンとメタノールが唯一の利用可能な炭素源であり，大気中へのメタン放出を減らすバイオフィルターとして働く。20~32℃，pH6.0~7.0 が増殖に最適である。

5. 付着物の生成を予防する方法の提案

付着物の生成を予防する方法として，以下の方法が提案できる。

- ・ 水質調査を行うことで，バイオフィームを形成している細菌とその栄養素となっている物質を特定する。
- ・ 水道管の定期的な洗浄を行い，細菌が浮遊物として存在している段階で除去する。
- ・ 既存のバイオフィームまで到達するように，次亜塩素酸ナトリウムよりも殺菌効果の持続性が高い消毒剤の使用を検討する。

6. 今後の課題

水道管への付着物生成メカニズムを解明し，予防するために，以下の課題に取り組む必要がある。

- ・ 水道管内の状況を再現して実験を行い，バイオフィームが形成される過程を観察し，明らかにする。
- ・ 様々な地点の DNA サンプルの解析を行い，バイオフィームを形成する細菌と管内状況の関係を分析する。

謝辞：本研究を行うにあたり，データを提供していただいた中里建設㈱の皆様に深甚なる謝意を表します。

参考文献：

- 1) Peter Kämpfer, etc. : Revision of the genus *Massilia* La Scola et al. 2000, with an emended description of the genus and inclusion of all species of the genus *Naxibacter* as new combinations, and proposal of *Massilia consociata* sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2011), 61, 1528–1533
- 2) 清川達則, 他:嫌気脱窒環境下における緑膿菌の Biofilm 形成メカニズムの解析, 環境バイオテクノロジー学会誌, Vol.12, No.2, 123-128, 2012
- 3) Igor Y. Oshkin, etc. : *Methylovulum psychrotolerans* sp. nov., a coldadapted methanotroph from low-temperature terrestrial environments, and emended description of the genus *Methylovulum*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2016), 66, 2417–2423