

雨水タンク内の微生物の解析 (微生物の解析方法の検討と微生物の同定について)

矢部 希見子^{*1}, 村岸 真帆^{*2}, 笠井 利浩^{*1}

Investigation of Microorganisms in Rainwater Tanks (Analytical Methods for Microorganisms and Their Identification)

Kimiko YABE ^{*1}, Maho MURAGISHI ^{*2}, and Toshihiro KASAI ^{*1}

Department of Environmental and Food Sciences

Storage of rainwater in tanks has been recognized to be useful for sustainable supply of water. Especially, heavy rains are frequently caused by typhoons in Japan. Although rainwater is clean when it is newly formed, little information has been obtained about the quality of rainwater during its storage in water tanks. Investigation of microorganisms in the tank is important in using the water for toilet flush, shower, drinking water, and so on if possible. In the current study, as the first trial, we collected six samples stored in two connected rainwater tanks in Higashi-ago Elementary School, Fukui, Japan, and then investigated microorganisms in each sample. We could finally identify six kinds of microorganisms based on their rDNA sequences. We also measured total numbers of bacteria in each fraction.

Key Words : Rainwater, Rainwater Storage Tank, Microorganisms, DNA Sequence, Quantification of Microorganisms

1. 緒 言

雨水の利用とは、雨水を一時的に雨水タンク等に貯留し、適宜貯水を有効に活用することをいう。また、雨水の貯留は水資源の確保に有効であるとともに、健全な水循環を維持するうえで重要な取り組みとして近年注目されている。それに応じて、2014年4月に「雨水の利用の推進に関する法律」が公布され、2016年には日本建築学会から「雨水活用技術規準」が刊行された⁽¹⁾。

雨水の活用については、水洗便所の水として、または散水など、あるいは、消火のための使用やその他の災害時における使用が想定されている。しかし、家畜等への供給や軟水としての飲用など、水分の有効利用範囲の可能性は大きく、高度利用が期待されている。「雨水利用・排水再利用設備計画基準」⁽²⁾においては、「雨水利用水の水質は、用途に応じ、衛生、環境、機能等を阻害しないものとし、関係法令等に適合するものとする。」と記載されている。したがって、蓄積した雨水の利用のためには、水質を確認するとともに、それに含まれる生物、特に微生物の検討が必要である。

雨水タンクには建物の屋根などを通じて多くの有機物、無機物が混入し、さらに環境中の多くの微生物を含めて小型生物が混入してきている。雨水タンクの水質については、その有効利用を目指して、多くの水質検査がなされている。雨水タンク中には、多くの微生物が流入してくることは容易に想像が付き、微生物叢を解析した成果も報告されているが⁽³⁾⁻⁽⁶⁾、タンク内の局在性を調べたものはほとんどない。そのため、実際に流入した微生物が、タンク内のどこに存在するのか、また、実際に、どの程度の数の微生物がいるのかなど、タンク内の微生物の生態についてはほとんどわかっていない。そこで、本研究では、雨水タンク内の微生物の生態解明を目指して、福井市立東安居小学校(〒918-8076 福井市本堂町第4号12番地)に設置された雨水タンク中の微生物について、その解析手法の確立及び基礎的知見の蓄積を試みた。

* 原稿受付 2017年2月28日

^{*1} 環境情報学部 環境・食品科学科

^{*2} 工学部 環境生命化学科 4年

E-mail: yabek@fukui-ut.ac.jp

2. 試料と実験方法

2.1 培養条件

雨水タンク内の微生物の培養には、GY 寒天培地（2%グルコース，0.5%酵母エキス，2%寒天），ジクロラングリセロールローズベンガルクロラムフェニコール寒天培地（DRBC 寒天培地；Difco Laboratories 社），または，標準寒天培地（Standard Method Agar；日水製薬（株））を用いた。培養は28℃，暗所で行った。

2.2 雨水タンクからのサンプリング

福井市立東安居小学校の雨水タンクは，小学校の体育館の屋根に繋がれた3 t タンクと，そのタンクに連結された2 t タンクから構成される（Fig. 1）。同タンクは2013年11月に設置され，2年7か月間使用を続けていたが，2016年6月25日にタンク内部を洗浄するのを機会に，貯留雨水試料を合計6カ所〔3 t タンク内部の水面から約10cmの深さの水（3t 10cm 中間水），底にたまった沈殿物（3t 底），タンク内部の壁の沈着物（3t 壁面），及び2 t タンク内部の表面水（2t 表面水），水面から約20cmの水（2t 20cm 中間水），底の沈殿物（2t 底）〕から，それぞれ50mL ファルコンチューブ2本に採取した。各サンプルを直接，2.3に記載したように寒天培地に接種・培養するとともに，残りを3つに分けて，それぞれ-20℃及び5℃で保存した。さらに，グリセロールストックを作製し，-80℃に保存した。

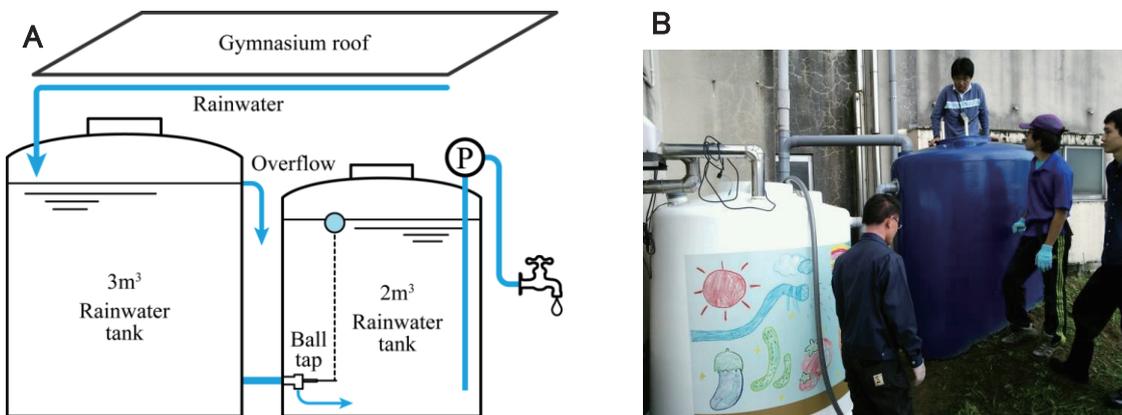


Fig.1 Rainwater collected from the gymnasium roof enters to a 3 t tank through a downpipe. (A) Outline of the tanks. A part of the water in the 3 t tank flows into a 2 t tank that is connected to the 3 t tank by a pipe between the two tanks. A ball tap is set at the inlet of the 2 t tank, and it regulates total amount of water in the 2 t tank. When both tanks become full, the excess water is thrown away through a drain bulb. (B) Photo of the 3 t tank (left) and the 2 t tank (right).

2.3 雨水サンプルの前処理，培養，及び顕微鏡観察

各サンプル1mL（沈殿物の場合は1g）を1.5mL滅菌遠心管に移して，15,000rpm，2分間遠心した後，上清950μLを新しいチューブに移し，残った沈殿物を含む液（50μL）は懸濁後，以下の実験に用いた。

上清画分（上記記載）は50μLをGY培地及びDRB培地にそれぞれコンラージ棒で広げ，28℃で2日間培養した。3t 10cm 中間水，2t 表面水，2t 20cm 中間水，2t 底の沈殿画分については，懸濁後，20μLを寒天培地の端に滴下し，白金耳で全面に広げて，同様に培養した。3t 底及び3t 壁面は固形分がほとんどなため，白金耳で一回すくい取って，寒天培地の端に置き，白金耳で全面に広げて，培養した。2t 底，3t 底，3t 壁の沈殿物については，さらに，光学顕微鏡（400倍）で観察した。

2.4 菌の単離

GY培地及びDRBC寒天培地でコロニーを形成した微生物を純化し，得られた微生物（51株）について，グリセロールストックを作製し，-80℃で保存した。

2.5 DNA シーケンスによる微生物の同定

2.5.1 DNA 抽出

蓋つき 2mL 微量遠心チューブに Tris-EDTA 緩衝液(TE)と TE 飽和フェノールを 100 μ L ずつ加え、ジルコニアビーズを少量加えた後、寒天培地上の菌体を滅菌爪楊枝で加えて、蓋をした。その微量遠心チューブを細胞破碎装置 FastPrep FP100A (Q-BIO 101) にセットし、speed 6.5, time 45seconds の条件で細胞破碎を行った。チューブを 4 $^{\circ}$ C で 15,000rpm, 15 分間遠心し、上清 65 μ L を 0.5mL チューブに移した。上清の一部 (10 μ L) を滅菌水で 4 倍に希釈し、PCR に供した。

2.5.2 Taq 酵素による PCR

DNA (4 倍希釈), rRNA 塩基配列のプライマー (Table 1), 及び Master Mix (Promega 社) を用いて PCR を行った。反応液を、1kb DNA マーカー (Promega 社) とともに 1%アガロース電気泳動で PCR 産物を検出することにより、調製 DNA がテンプレートとして働くことを確認した。

Table 1 PCR primers (#1,2 for bacterium, #3,4 for fungus)

No.	Name	Gene	Sequence
#1	Com1-F	16S	CAGCAGCCGCGGTAATAC
#2	Com2-Ph-R	16S	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT
#3	LROR	18S	ACCCGCTGAACTTAAGC
#4	LR5	18S	TCCTGAGGGAAACTTCG

2.5.3 KOD 酵素による PCR

同 DNA を用いて、より高精度の PCR 酵素 KOD-Plus (TOYOBO 社) を用いて、PCR を行った。PCR 産物を、Gene Ladder 100 (ニッポンジーン社) とともに 1%アガロース電気泳動を行い、同マーカーのバンドの濃さを比較することにより、PCR 産物の濃度を推定した。

2.5.4 Exo-SAP 処理及び発注

PCR 反応液中の未反応の dNTPs やプライマーを除去するため Exo-SAP (Affymetrix 社) を用いた。指示書に従い、PCR 産物の長さに対応する濃度範囲になるよう濃度を調整して、Exo-SAP とサンプルを混ぜ、PCR 機器を用いて、37 $^{\circ}$ C 60min 反応後、80 $^{\circ}$ C で 15 分間処理することで酵素を失活させた。そのサンプルをシーケンスのため Eurofins Genomics 社に発注した。

2.5.5 微生物の同定及び性状検討

Eurofins Genomics 社から送られてきた波形データを基に、同社から送られてきた遺伝子配列データを確認・修正した後、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) の BLAST 相同検索により、候補となる微生物を選抜した。さらに、同微生物を GY 培地接種して、コロニーの形態や色を観察し、文献との比較により、微生物の同定を行った。

2.6 一般細菌検査

採取時に作成した 6 サンプルのグリセロールストックを流水で溶かし、その一部を、生理食塩水で 1 倍, 10 倍, 100 倍, 1000 倍, または 10000 倍に希釈した。各希釈サンプル 100 μ L を、標準寒天培地上にコンラージ棒で広げ、28 $^{\circ}$ C で 2 日間培養後、それぞれの希釈倍数に含まれる微生物数をカウントした。なお、本実験では、カウントする際の根拠として、コロニーの大きさを指標に、小 (直径 1~1.5mm)・中 (1.5~2.5mm)・大 (小 (2.5~4mm), 中 (4~7mm), 大 (7~10mm))・極大 (10mm 以上) の 7 段階に分けてカウントし、1mm 以下 (極小) のコロニーは菌数にカウントしないものとした。

3. 実験結果

3.1 微生物の単離

3 t タンク及び 2 t タンク内の 6 か所（3t 10cm 中間水, 3t 底, 3t 壁面, 2t 表面水, 2t 20cm 中間水, 2t 底）からサンプルを採取し, GY 培地及び DRBC 寒天培地で培養したところ, 寒天培地上, 様々な形態の微生物コロニーが検出された (Fig. 2) . このことから, 透明に見える水画分にも, わずかではあるが微生物が含まれていることが確認された. ここでは, 3t 10cm 中間水から 4 株, 3t 底から 11 株, 3t 壁面から 12 株を単離した. また, 2t 表面水から 4 株, 2t 20cm 中間水から 9 株, 2t 底から 11 株を単離し, 合計 51 株を単離することができた.

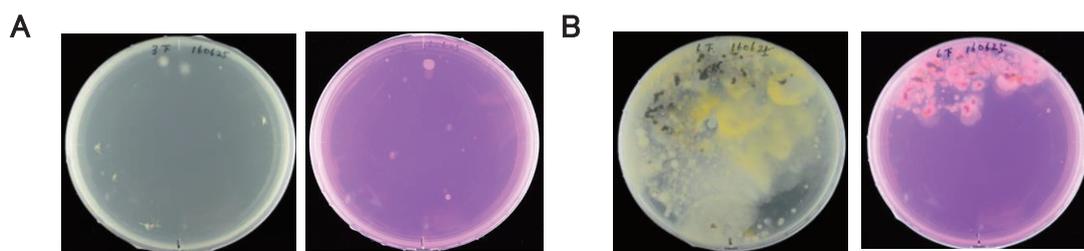


Fig. 2 Microorganisms in the water tanks. Colonies of microorganisms from 3t-10cm-middle water (A) or 3t-wall (B). GY agar plate (left), DRBC agar plate (right). Undersides of the plates were observed.

沈殿物について顕微鏡観察（400 倍）を行ったところ, 沈殿物は, 植物片と思われるもの, また色素成分を多く含む花粉と思われるものなど, 様々な固形成分が観察された. 特に, 2t 底の沈殿物には, ボルボックスと推定される運動性微生物が観察された（不表示）. 以上のことから, 当然予想されるように, 雨水タンクには多様な植物片や微生物が流れ込み, タンク内に蓄積及び増殖しているものと考えられる.

3.2 DNA シーケンスと形態観察による微生物の同定

多くの微生物について, 簡便かつ短時間で安定した DNA シーケンス結果が得られる方法を検討した. カビの場合, 寒天培地のコロニーから直接菌糸を採取し, フェノール及びジルコニアビーズ存在下に, 細胞破碎装置で破碎し, ゲノム DNA を回収後, 安価な Master Mix で PCR を行った結果, ほとんどのすべてのサンプルについて目的とする PCR バンドが得られ, ゲノム DNA がテンプレートとして機能することが確認された (Fig. 3) . 細菌についても寒天培地のコロニーから十分量の菌体を採取して, 同様にゲノム DNA を調製できた.

これらのゲノム DNA について, KOD plus 酵素を用いて同様の PCR を行い, その PCR 産物を用いてシーケンスを行ったところ, 明瞭な波形データ及び DNA 配列が得られた（非表示）. 一方, 安価な Master Mix の PCR 産物を用いた際には, 波形データ中, 顕著なバックグラウンドピークが出現し（非表示）, シーケンス解読の妨げとなった.

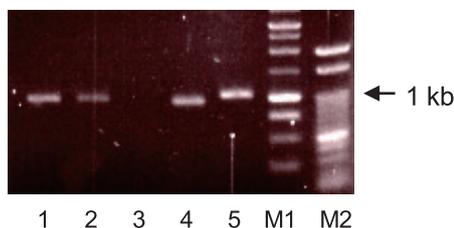


Fig. 3 PCR products of the fungi (lanes 1-5) isolated from the tanks were analyzed by agarose electrophoresis. PCR were done using Master Mix enzyme. PCR product was not obtained from the microorganisms corresponding to lane 3. M1, 1kb DNA marker ; M2, Gene Ladder 100 marker.

以上、異なる PCR 酵素を用いて、テンプレートチェック用とシーケンス用の 2 回の PCR 反応を行い、後者で得られた PCR 産物を用いてシーケンスを行うこととした。また、シーケンスには PCR 産物の濃度調整が必要であるが、吸光度計の利用は操作が煩雑になることから、PCR 産物の電気泳動の際に、100bp~2,000bp までをカバーする DNA サイズマーカーおよびマスマーカーである Gene Ladder 100 マーカーと一緒に流すことで、PCR 産物の量を見積もることとした。これにより、特段の操作を加えることなく量を見積もることができ、簡便かつ迅速なサンプル調製が可能となった。

本研究では、任意に選んだ 5 種類の微生物について DNA シーケンスに成功した。相同検索により、それらは、*Rhizopus* sp, *Alternaria alternate*, *Cladosporium* sp, *Penicillium* sp, *Penicillium oxalicum*, *Bacillus* sp であることが示唆された。また、寒天培地上の各コロニーの形態的特徴から、DNA 配列から推定される微生物のそれらと矛盾しないことが確認された (Fig. 4)。

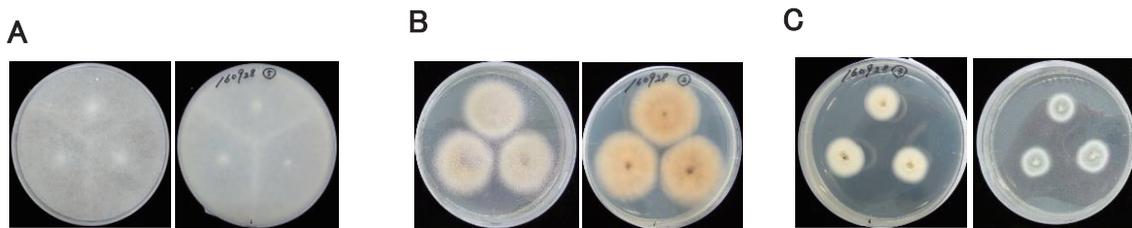


Fig. 4 Colonies of the fungi identified based on their DNA sequences. (A) *Rhizopus* sp, (B) *Alternaria alternate*, (C) *Cladosporium* sp. Colonies were observed from the upper side (left) or the underside (right) of each plate.

3.3 一般細菌検査

6 種のグリセロールストックサンプル (3t 10cm 中間水, 3t 底, 3t 壁面, 2t 表面水, 2t 20cm 中間水, 2t 底) について、10 倍希釈を繰り返し、標準寒天培地を用いて、28°C で 2 日間培養した (Fig. 5)。その後、生じたコロニーの数をカウントした。コロニー数は、サンプリング部位により顕著に異なり (Table 2)、水層部分においても微生物が検出されたことから、無処理で飲用として利用するのは安全性の点で問題があると考えられた。一方、沈殿物には、多くの微生物が存在することが明らかになり、これら微生物の安全性も検討が必要であると考えられる。今回の測定で、2t タンクの細菌数の方が、3t タンクに比べて顕著に少なかった。屋根に降った雨水がまず 3t タンクに蓄積され、液体部分が一定量を超えた時に初めて 2t タンクへの蓄積が始まることから、雨水が含むほとんどの沈殿物や微生物は 3t タンクに沈殿したと推定される。複数の雨水タンクを直列に並べた際には、それぞれのタンクの清浄度に基づいて、個別の利用目的を持たせる可能性が示唆された。

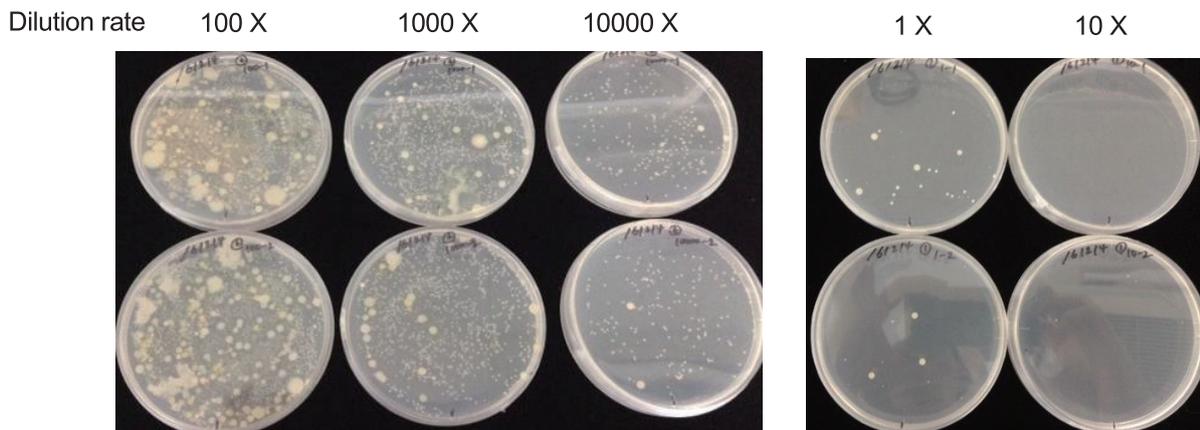


Fig. 5 General bacteriological examination. Each fraction of the tank was diluted as shown, and 100 μ L aliquot was inoculated onto a General bacteriological agar plate. Left, 3t-wall (left), 2t-surface water (right)

Table 2 Total numbers of bacteria in each fraction.

	Fraction	Total numbers of bacteria / 100 μ L
2 t tank	Surface water	13
	Middle water (20cm from the surface)	3
	Bottom	4500
3 t tank	Middle water (10cm from the surface)	240
	Bottom	90,000
	Inside of wall	1,400,000

4. 考 察

本研究では、実際に使用されている雨水タンクについて、内部の微生物の単離と同定方法の確立、及び微生物数の測定方法を検討した。微生物の同定においては、コロニー菌体から直接 DNA を簡便に単離できる方法が確立され、さらに、精度の異なる 2 種の酵素を用いて、2 段階の PCR を進めることで、極めて効率的、かつ安定的に DNA 配列の決定が可能となった。また、標準寒天培地の利用により、多様なコロニーが検出でき、予備的実験として有効な結果が得られた。本研究では、2 t タンク内の微生物数の方が、3 t タンクのそれより、顕著に少ないことが確認された。そのことから、複数のタンクを設置する際には、雨水タンクを直列に連結することで、後に位置するタンクの水は、微生物的には前に位置するタンクの水よりは有意に清浄となると推定される。このことは、雨水利用を考慮する際には重要な情報であり、さらに、複数のタンクの設置を検討する際に参考になると思われる。

本実験では、微生物総数の測定のために、標準寒天培地を用いて一般細菌検査を行ったが、この方法ではカビや酵母などの真核微生物の総数を調べるには適していない。それに対して、抗生物質が添加された DRBC 寒天培地はこれらの微生物の検出に適している。また、雨水中の沈殿物を顕微鏡で観察した際には、微細藻類の存在が確認され、また多様な植物片が検出された、したがって、雨水に含まれる多様な生物を総合的に解析するには、各種培養条件とともに測定方法を組み合わせることが必要と思われる。一方、多くの手法を組み合わせることで手法が複雑になることは、研究実施の妨げになりうる。したがって、各種情報の重要性において順番付け等が必要になると推定される。

2 種の雨水タンクのいずれにおいても、水層部分で、微生物の存在が確認された。採取日は晴天であり、また、サンプリングの際には波を立てないように慎重に採取したことから、沈殿物からの混入の可能性は低いと思われる。したがって、水層部分には、常時わずかながら微生物が存在する可能性が高く、水層部分を滅菌することなく飲用・食用に利用することは控えたほうが良いと思われる。また、雨水タンクの水中部分は表面部分に比べて、ある程度嫌氣的であると予想していたが、本研究で多くの好気性微生物が観察された。タンク中においても多くの微生物が存在し、特に壁付着物や底沈着物の中にはバイオフィームなど生存に有利な環境を構築している可能性がある。詳細な検討は今後の課題である。

環境には人や動物の健康に影響を与える微生物も存在することから、雨水タンク内にもそれらの生物が混入する可能性がある。本研究で任意に同定した微生物の中には、健康被害をあたえる病原性を有する物は検出されなかった。例えば、*Rhizopus* は湿った有機物表面や空中など、環境に一般的に検出されるカビである⁽⁹⁾。成長が極めて速いのが特徴であり、モモなどの果実の腐敗を早めるなど、腐生菌と分類される。*Alternaria alternate* も日本全国に分布し、様々な植物の葉上から頻繁に分離される菌で、たばこ赤星病菌、イチゴ黒斑病菌などとしても知られ植物病原菌として分類される⁽¹⁰⁾。*Cladostorium* もいろいろな環境で検出されるカビで、人の病気の原因になることは極めてまれである⁽¹¹⁾。*Penicillium oxalicum* は、腐生菌であり、同菌によるトマトの病害が報告されている⁽¹²⁾⁽¹³⁾。以上、本研究では、健康被害を引き起こすカビは得られなかったが、これは、小学校に設置されたタンクであることが関係しているのかもしれない。

農地や工業地帯など、様々な環境に設置されている雨水タンクでは、含まれる成分が大きく異なり、また、環境に依存して様々な微生物が混入することが示唆されている⁽⁹⁾。例えば、病原性細菌である *Legionella* 細菌類は雨

水で良く検出されており、注意が必要である。したがって、雨水タンクの水利用については、個別のタンクにおける検討が必要である。現在、我々は、標準寒天培地を用いた一般細菌検査で得られた主要な細菌について、さらに同定を試みており、その結果が得られれば、環境と雨水タンク内の微生物叢の関係について基礎的知見が得られるものと期待される。

5. 結 言

雨水タンク内部の微生物の単離方法と同定方法及び微生物数の測定方法を検討した。培地上にコロニーを形成する微生物においては、コロニーから直接 DNA が単離でき、さらに、精度の異なる 2 種の酵素を用いた 2 段階の PCR を行うことで、DNA 配列決定に適した PCR 産物の生成が可能となった。また、標準寒天培地を用いて、微生物数の測定が可能となった。今後、微生物の測定及び主たる微生物の同定を行うことにより、雨水タンク内の微生物の種類及び局在、また環境との関係について、解析を進めることが可能である。

謝 辞

本研究は、福井工業大学平成 28 年度学内特別研究費の補助を受けて行ったものであり、深謝を表します。DNA 解析についてのご助言をいただいた加山基様に感謝いたします。また、雨水タンクからの採取においてご支援いただきました神能 理乃様及び笠井研究室の皆さまに感謝いたします。

文 献

- (1) 日本建築学会：日本建築学会環境基準「雨水活用技術規準（AIJES-W0003-2016）」(2017)
- (2) 国土交通省大臣官房官庁営繕部設備・環境課：雨水利用・排水再利用設備計画基準 (2016)
- (3) The Environmental Health Committee of the Australian Health Protection Committee, “Guidance on use of rainwater tanks”, (2004), [https://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/0D71DB86E9DA7CF1CA257BF0001CBF2F/\\$File/enhealth-raitank.pdf](https://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/0D71DB86E9DA7CF1CA257BF0001CBF2F/$File/enhealth-raitank.pdf)
- (4) Doug Pushard: “Is rainwater really safe – one sample case”, (2017), http://www.harvesth2o.com/rainwater_safe.shtml
- (5) Richard Hill: “Bacterial activity in harvested rain water”
- (6) Hans-Otto Wack: 住宅における雨水利用, <http://www.rainworld.jp/02drotto.html>
- (7) NSW Government “Rainwater treatment guide”
- (8) Anne Marie Helmenstine, Ph.D.: “Can You Drink Rain Water?” <https://www.thoughtco.com/can-you-drink-rain-water-609422> (2017)
- (9) Center for disease control and prevention “Cladosporium” <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/other/cladosporium.html> (2015)
- (10) C.J. Alexopoulos, C.W. Mims, M. Blackwell: INTRODUCTORY MYCOLOGY 4th edition, 1996, John Wiley & Sons, Inc. Rhizopus
- (11) 柘植尚志： *Alternaria alternata* の宿主特異的毒素と病原性に関する研究 Ann. Phytopath. Soc. Japan 53: 290 (1987)
- (12) Yao et al.: Redesigning the regulatory pathway to enhance cellulase production in *Penicillium oxalicum* Biotechnology for Biofuels (2015) 8:71
- (13) 小坂橋基夫： *Penicillium oxalicum* による日本新発生のトマト青かび病 微探収報 24, 71–74, 2011

(平成 29 年 3 月 31 日受理)