

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）
「大規模災害および気候変動に伴う利水障害に対応した環境調和型水道システムの構築に関する研究」
分担研究報告書

研究課題：ろ過漏出障害原因微生物の同定技術の開発と存在実態調査

研究分担者 藤本 尚志 東京農業大学応用生物科学部醸造科学科 教授

研究分担者 岸田 直裕 国立保健医療科学院 主任研究官

研究要旨

近年、浄水場においてピコ植物プランクトンによるろ過漏出障害が発生し問題となっている。原因となる生物種は明らかとなっていないことから、浄水場の各処理工程水について、次世代シーケンサーを用いて微生物相の調査を行った。その結果、川崎市上下水道局長沢浄水場のろ過水において Alphaproteobacteria 綱、Betaproteobacteria 綱、Gammaproteobacteria 綱が主に検出され、主要な綱は時期によって異なった。また沈澱処理水とろ過水の微生物相を比較したところ、多くの月で主要となる綱は大きく異なった。リード数が多く検出頻度の高い微生物は、5 門 17 属に分類された。これらの中には原水、沈澱処理水におけるリード数は少なく、ろ過水において 5% 以上に高まるものもあった。さらに相同性が低く未培養の系統と考えられる微生物も検出され、次世代シーケンサーによる評価の有用性が示された。千葉県水道局栗山浄水場のろ過水においても長沢浄水場と同様に Proteobacteria 門の割合が大きく、Proteobacteria 門に占める Alphaproteobacteria 綱、Gammaproteobacteria 綱の割合はそれぞれ、60%、34%であった。従属栄養細菌による濁度への影響が大きいことが示唆されたため、水道水源である草木湖において次世代シーケンサーによる真正細菌の群集構造解析を行った。その結果、表層、中層、底層ともに Proteobacteria 門、Actinobacteria 門、Bacteroidetes 門で微生物群集が構成され、その構造は水深、時期により異なることが明らかとなった。草木湖を水源とする浄水場においてろ過漏出障害を引き起こす真核ピコ植物プランクトンの生物相を明らかにすることを目的として緑藻綱の 18S rRNA 遺伝子を増幅するプライマーを用いて草木湖の生物相を解析した。これまで用いてきたプライマーでは、従属栄養性の真核生物も検出され、緑藻綱が検出できないこともあったが、年間を通して緑藻綱 *Mychonastes* 属を検出することができ、緑藻綱の生物相を評価する上で有用な手法であることが明らかとなった。

A. 研究目的

近年、湖沼・貯水池を水源とする浄水場においてピコ植物プランクトンによるろ過漏出障害が発生し問題となっている¹⁾。これまでクローニング法により浄水場処理工程水の生物相を解析し、ろ過水中から緑藻綱の *Mychonastes* 属や藍藻綱の *Synechococcus* 属が検出され^{2),3)}、ろ過水の濁度上昇に関与すると考えられた。さらに次世代シーケンサーによる真正細菌をターゲットとした 16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析において、Cyanobacteria 門のリード数は最大 2 割程度であり、従属栄養細菌も濁度への影響が大きいことが示唆された³⁾。しかしこれらの知見は 6 ヶ月程度の結果であり、更なるデータの集積が必要である。そこで本研究では、16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシングにより各工程における細菌相とその変化、ろ過水に含まれる主要な細菌を属レベルで評価した。また、従属栄養細菌のろ過漏出障害への関与が示唆されたため、水道水源における化学合成生物の群集構造解析を行った。さらに従来真核ピコ植物プランクトンの生物相解析に

用いられてきたプライマーは原生動物といった従属栄養生物の 18S rRNA 遺伝子も増幅し⁴⁾、真核ピコ植物プランクトンの生物相を正確に評価することが困難であることから緑藻綱の 18S rRNA 遺伝子を増幅させるプライマー⁵⁾を用いて生物相解析を行った。

B. 研究方法

B-1 浄水場処理工程水の生物相評価

1) 川崎市上下水道局長沢浄水場

2013 年、2014 年において、月 1 回の頻度で着水井、沈澱池の出口、ろ過池の出口よりそれぞれ採水した原水、沈澱処理水、ろ過水を用いた。沈澱処理水、ろ過水は流達時間を考慮して採水した。この期間におけるろ過水の濁度は 0.00 ~ 0.03 度で推移し、浄水の水質に問題はなかった。

ナノプランクトンを除去するために孔径 3 μm もしくは 5 μm のメンブレンフィルターにより吸引ろ過を行い、そのろ液を孔径 0.2 μm のポリカーボネート製メンブレンフィルターによりろ過し集菌を行った。次に CTAB 法によりゲノム DNA の抽出を行い、真正細菌の 16S rRNA 遺伝子を増

幅させるプライマー515F, 806R を用いて Tailed PCR を行った。増幅産物を精製後、Illumina 社の MiSeq によりアンプリコンシーケンシングを行い、QIIME を利用して解析を行った。

2) 千葉県水道局栗山浄水場

2014年8月7日に採水した濁度上昇の起きた試料について、次世代シーケンサーによる解析を行った。試料は矢切取水場より採水した原水、栗山浄水場より採水した沈澱水、ろ過水を用いた。この時のろ過水の濁度は0.05度であった。長沢浄水場の試料と同様に次世代シーケンサーによる解析を行った。

B-2 草木湖の微生物群集構造解析

2015年4月~9月の各月において群馬県草木ダム堰堤200m沖で採水した表層水(水深0.5m)、中層水(水深40m)、底層水(水深60~80m)を用いた。試料約2Lを孔径0.2 μ mのポリカーボネート製メンブレンフィルターにより吸引濾過し集菌した。集菌したフィルターを回収し、PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.)を用いてゲノムDNAの抽出を行った。真正細菌の16S rRNA 遺伝子を増幅させるプライマー(515F, 806R)を使用し、PCRを行った。増幅産物を確認後、AMpure XP kit (Beckman Coulter, Inc.)により精製した。その後、NEBNext® UltraTM DNA Library Prep Kit for Illumina® (New England BioLabs Inc.)を用いてライブラリーを作成し、Illumina社のMiSeqによりアンプリコンシーケンシングを行った。各試料について、得られた10万リードについてQIIMEを利用して解析を行った。

B-3 真核ピコ植物プランクトンの生物相解析

群馬県草木湖から2015年1月~12月に採水した表層水を用いた。試料1Lを孔径3 μ mのメンブレンフィルターで吸引ろ過し、そのろ液を孔径0.2 μ mのポリカーボネート製メンブレンフィルターを用いてろ過し集菌した。その後CTAB法によりゲノムDNAを抽出し、緑藻綱の18S rRNA 遺伝子の特異的に増幅させるプライマー-chloroF, chloroR⁵⁾を用いてPCRに供した。このPCR産物を精製した後、TOPO TA クローニングキットによりクローニングを行った。得られた約50クローンについて制限酵素を用いてRFLP法によるグルーピングを行った。各グループから選別したクローンについて塩基配列の解析を行った。1年間得られた塩基配列について塩基配列間の相同性が97%以上の場合同一のOTU (Operational Taxonomic Unit) とした。

C. 研究結果およびD. 考察

C-1 浄水場処理工程水の生物相評価

1) 川崎市上下水道局長沢浄水場

1 試料あたりの総リード数は15万~42万リードであった。原水において Actinobacteria 綱、

Betaproteobacteria 綱が多く検出された(図1)。沈澱処理水においては Betaproteobacteria 綱が主要となるが多かったが、Gammaproteobacteria 綱が多く検出される月もあった。ろ過水においては Alphaproteobacteria 綱、 Betaproteobacteria 綱、 Gammaproteobacteria 綱が主に検出され、主要な綱は時期によって異なった。また沈澱処理水とろ過水の微生物相を比較したところ、2013年9月、11月、2014年1月、5月、7月、8月、10月、11月において主要となる綱は大きく異なった。とくに沈澱処理水より検出される割合の低かった Alphaproteobacteria 綱が、ろ過水において主要となることがあった。

総リード数の5%以上を占めた OTU (Operational Taxonomic Unit) を主要な微生物としたところ、5門17属に分類された(表1)。これらのうち *Pseudarcicella* 属、*Sphingomonas* 属、*Moraxella* 属は、検出された回数が6~8回と多かった。*Synechococcus* 属、*Methylobacterium* 属、*Rhizobium* 属、*Azorhizobium* 属、*Janthinobacterium* 属、*Undibacterium* 属、*Ralstonia* 属、*Acinetobacter* 属、*Moraxella* 属、*Deinococcus* 属等10属の原水、沈澱処理水におけるリード数は少なく、ろ過水において5%以上に高まった。また *Candidatus Planktophilia limnetica*, *Pseudarcicella* 属および *Rhizobium* 属等については、既知種との相同性が低く未培養の系統と考えられ、次世代シーケンサーによる評価の有用性が示された。

2) 千葉県水道局栗山浄水場

2014年8月7日の試料採取時における濁度は原水17度、沈澱水0.86度、ろ過水0.05度であった。ピコシアノバクテリアとしては PC-type が主要であり、細胞数は原水93000 cells/ml 沈澱水13000 cells/ml であった。ろ過水は自家蛍光の退色により定量出来なかった。次世代シーケンサーにより解析した結果、各工程水より得られた総リード数は16万~22万リードであった。原水、沈澱処理水、ろ過水において Proteobacteria 門の割合が最も大きく、特にろ過水では70%以上を占めた(図2)。このことから Proteobacteria 門に着目し、綱レベルでの評価を行った。原水においては Betaproteobacteria 綱が Proteobacteria 門に対し80%を占め、沈澱水においては Alphaproteobacteria 綱が37%、Betaproteobacteria 綱が43%を占めた(図3)。ろ過水においては Alphaproteobacteria 綱が60%を占めた。ろ過水において5000リード以上が検出された OTU について属レベルで評価したところ、Proteobacteria 門より3 OTUs、Planctomycetes 門より1 OTU 得られた。Proteobacteria 門のうち2 OTUs は *Sphingomonas* 属に、1 OTU は *Enhydrobacter* 属に近縁であった。*Sphingomonas* 属と *Enhydrobacter* 属はろ過水において11~22%を占め、主要な微生物であることが明らかとなっ

た。各処理工程水から検出された *Synechococcus* 属は 11 OTUs に分けられた(表 2)。原水では PC-type である *Synechococcus* sp. PCC9005 に近縁なリード数が *Synechococcus* 属の全リード数に対して 90% を占めた。落射蛍光顕微鏡観察において PC-type の細胞が多く観察されたため、整合性が得られた。沈澱処理水、ろ過水からは原水ではほとんど検出されなかった *Synechococcus* sp. MH305 や *Synechococcus* sp. MW6B4 が検出され、ろ過漏出障害の原因の一つである可能性が示唆された。またろ過水に占める *Synechococcus* 属のリード数は総リード数の 1% 程度であり、栗山浄水場におけるろ過漏出障害の原因生物として、従来ピコシアノバクテリアが考えられてきたが、従属栄養細菌による影響も大きいことが示唆された。

C-2 草木湖の微生物群集構造解析

4 月の表層、5 月の底層は PCR の増幅がみられず、解析することが出来なかった。7 月、8 月、9 月の表層において Cyanobacteria 門が多く検出された(図 4)。この時顕微鏡観察において、ピコシアノバクテリアの PE-type(7 月)、*Pseudanabaena* 属(8 月)、ピコシアノバクテリアの PE-type および *Pseudanabaena* 属(9 月)が優占していた。化学合成生物では Proteobacteria 門および Actinobacteria 門が多く検出された。綱レベルで見ると、Proteobacteria 門では Betaproteobacteria 綱、Actinobacteria 門では Actinobacteria 綱が主要であった。中層、底層では Cyanobacteria 門の割合が低下し、化学合成生物で微生物群集が構成されていた。中層は全ての層の中で最も多様性に富んでおり(rarefaction curve による評価)、Proteobacteria 門と Actinobacteria 門で総リード数の 55~68% を占めた。綱レベルでは、Proteobacteria 門では Betaproteobacteria 綱が、Actinobacteria 門では Actinobacteria 綱が主要であった。底層は、4~8 月は中層と同様に Proteobacteria 門と Actinobacteria 門の割合が大きかったが、9 月において Bacteroidetes 門の割合が高まった。綱レベルにおいては、中層と同様に Proteobacteria 門では Betaproteobacteria 綱が、Actinobacteria 門では Actinobacteria 綱が主要であった。9 月の Bacteroidetes 門の中では Flavobacteriia 綱が主要であった。

UniFrac により化学合成生物の群集構造の評価を行ったところ、表層は月ごとに異なる位置にプロットされ、季節による群集構造の変化が大きいことが示唆された。中層は全ての月において近い位置にプロットされ、群集構造の変化が小さいことが明らかとなった。4~7 月は中層と底層が近い位置にプロットされ、8、9 月は中層と底層のプロットが離れていた。8 月以降躍層が水深 50m 付近に形成され、中層と底層が混合していないことが群集構造の違いの一つの要因として示唆された。

草木湖の微生物群集構造が水深、時期によって異なることが明らかとなった。

C-3 真核ピコ植物プランクトンの検出技術

真核ピコ植物プランクトン(CH-type)の細胞数は春季と 7 月に 10^4 cells/ml 程度に高まった(図 5)。1~12 月の試料から得られたクローンについて、塩基配列間の相同性が 97% 以上を同一の OTU としたところ 5 OTUs に分かれた。相同性検索を行ったところ *Mychonastes* 属および *Chlamydomonas* 属に近縁であった(表 3)。過去 2 年間に検出された緑藻綱は、*Mychonastes homosphaera*、*Chlamydomonas noctigama* のみであったが、今年度はこれまで検出されなかった種も検出された。以上より緑藻綱の生物相を評価する上で、本年度用いたプライマーの有用性が明らかになった。また、*Mychonastes* 属に近縁な OTU の検出頻度、検出割合が高く、今回検出された緑藻綱の中で $2\mu\text{m}$ 程度の細胞サイズのものは *Mychonastes* 属のみであった。以上の結果から草木湖における主要な緑藻綱の真核ピコ植物プランクトンは *Mychonastes* 属であることが明らかになった。

E. 結論

次世代シーケンサーにより、浄水場処理工程水の微生物相および主要な細菌を評価した。工程水間、とくに沈澱処理水とろ過水間で微生物相が異なることが明らかとなった。微生物相の異なる要因、ろ過水において主要な微生物の濁度への影響および検出されるメカニズムについて今後検討する必要がある。

次世代シーケンサーを用いて草木湖の微生物群集構造の解析を行い、水深、時期によって異なることが明らかとなった。

緑藻綱の 18S rRNA 遺伝子を実験的に増幅させるプライマーにより緑藻綱の生物相を評価することができた。緑藻綱 *Mychonastes homosphaera* に近縁なクローンの検出頻度が高く、草木湖における $0.2\sim 3\mu\text{m}$ のサイズの主要な真核生物であると考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

Fujimoto N., Mizuno K., Yokoyama T., Ohnishi A., Suzuki M., Watanabe S., Komatsu K., Sakata Y., Kishida N., Akiba M. and Matsukura S., Community analysis of picocyanobacteria in an oligotrophic lake by cloning 16S rRNA gene and 16S rRNA gene amplicon sequencing, J. Gen. Appl. Microbiol., 2015, 61, pp. 171-176.

学会発表

渡邊英梨香, 藤本尚志, 大西章博, 鈴木昌治, 藤瀬大輝, 岸田直裕, 秋葉道宏. 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシングによる浄水処理工程水の細菌相の評価. 平成 27 年度全国会議(水道研究発表会); 2015 年 10 月, さいたま市. 同講演集 pp. 630-631.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む。) 該当なし

I. 参考文献

1) 矢澤秀行, ピコプランクトンによる浄水処理障害とその対策, 用水と廃水, 2002, 44(9), pp. 15-21.

2) 藤本尚志, 村田昌隆, 大西章博, 鈴木昌治, 矢島修, 岸田直裕, 秋葉道宏. 分子生物学的手法による浄水場における濁度障害原因生物の解明、水道協会雑誌, 2013, 82(5), pp.2-10.

3) 藤本尚志, 大西章博, 鈴木昌治, 藤瀬大輝, 岸田直裕, 秋葉道宏. クローニング法および次世代シーケンサーによるろ過漏出障害原因生物の評価. 平成 26 年度全国会議(水道研究発表会); 2014 年 10 月; 名古屋. 同講演集 pp. 540-541.

4) Fujimoto N., Matsuo E., Murata M., Nomura K., Ohnishi A., Suzuki M., Enmoto K., Yamaguchi S., Yanagibashi Y., Kishida N. and Akiba M., Evaluation of the Small-Eukaryote Community Composition in a Mesotrophic Lake by Sequencing the 18S rRNA Genes, Japanese Journal of Water Treatment Biology, 2014, 50(2), pp. 85-94.

5) Moro C. V., Crouzet O., Rasconi S., Thouvenot A., Coffe G., Batisson I. and Bohatieret J., New Design Strategy for Development of Specific Primer Sets for PCR-Based Detection of Chlorophyceae and Bacillariophyceae in Environmental Samples, Appl. Environ. Microbiol., 75, 5729-5733 (2009).

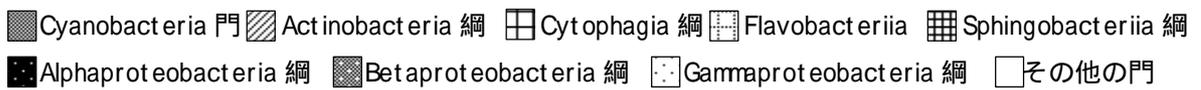
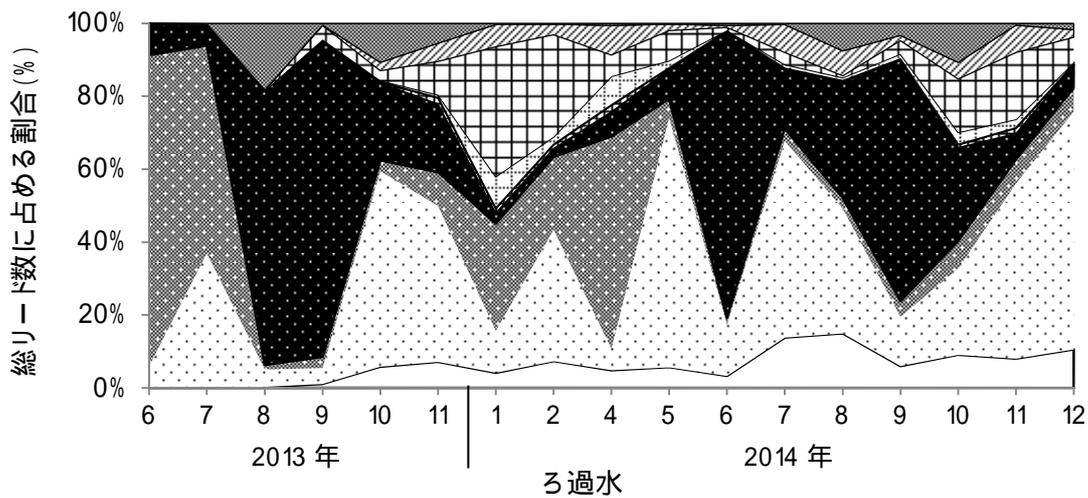
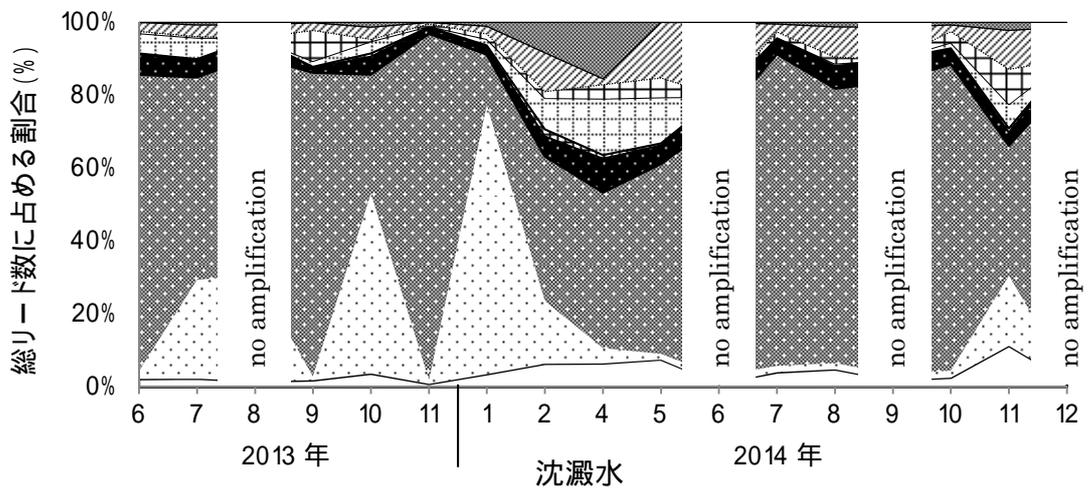
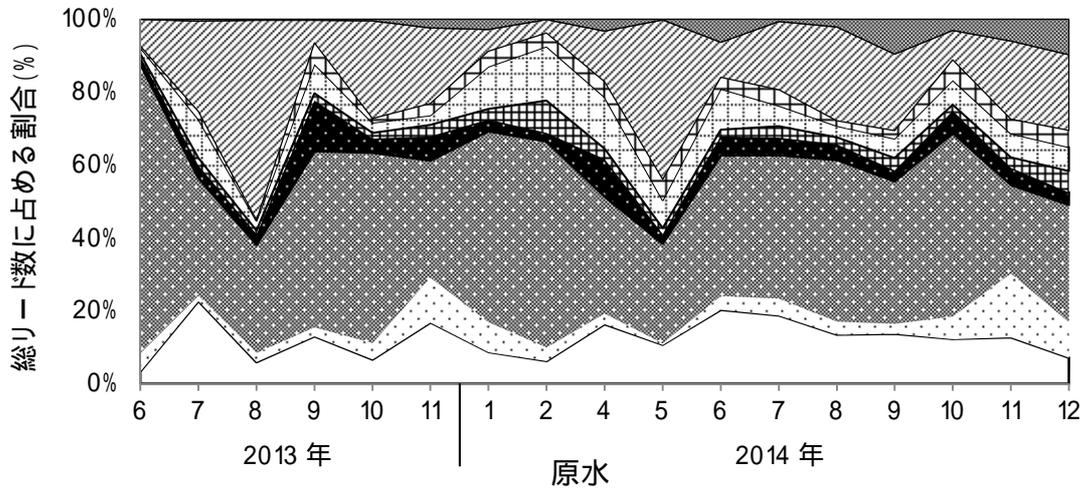


図1 長沢浄水場処理工程水の綱レベルにおけるリード数の割合

表1 る過水より検出された主要な微生物

分類(門/綱)	近縁種(属)	相同性(%)	
Cyanobacteria	Synechococcophycideae Synechococcus	98-100	
Actinobacteria	Actinobacteria Ca. Planktophila limnetica	92.9-97.6	
Bacteroidetes	Cytophagia Pseudarcicella	93	
	Flavobacteriia Flavobacterium	97.2-100	
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonas	100
		Methylobacterium	100
		Rhizobium	93
		Azorhizobium	94
	Betaproteobacteria	Limnohabitans	100
		Janthinobacterium	96.0-100
		Undibacterium	100
		Ralstonia	100
	Gammaproteobacteria	Methylobacter	100
		Pseudomonas	100
		Acinetobacter	100
		Moraxella	100
Deinococcus- Thermus	Deinococci Deinococcus	100	

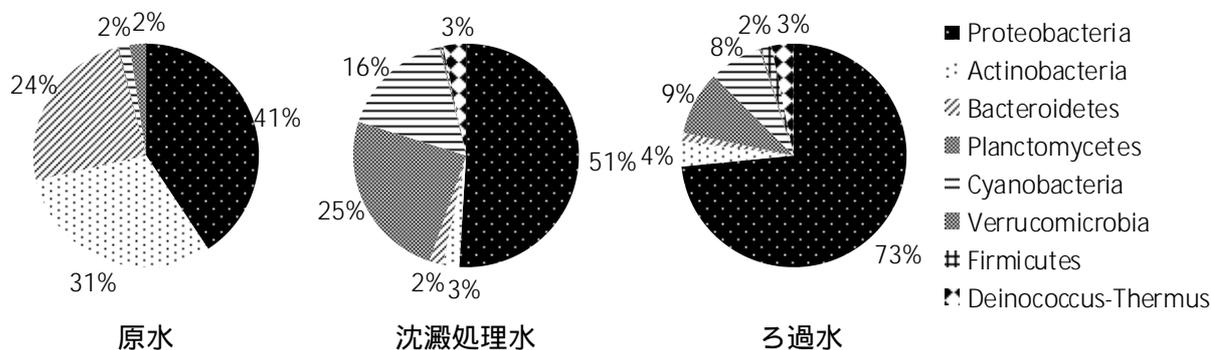


図 2 栗山浄水場処理工程水の門レベルにおけるリード数の割合

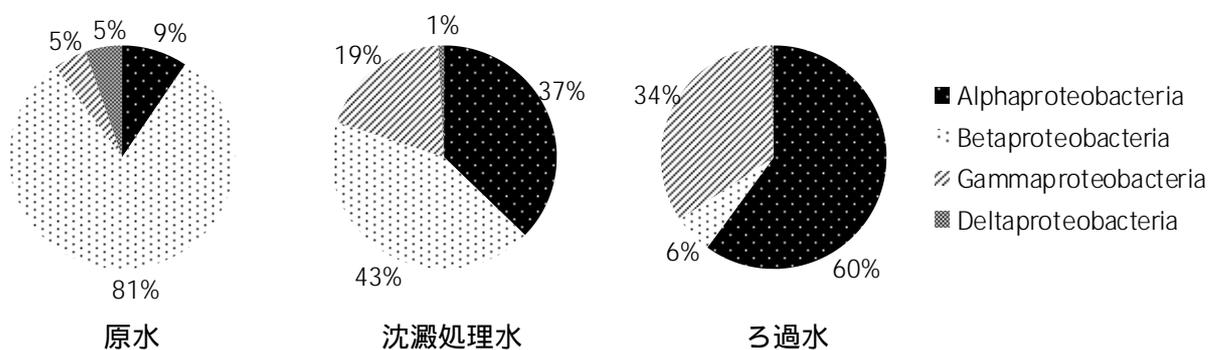


図 3 栗山浄水場処理工程水の Proteobacteria 門における綱レベルのリード数の割合

表 2 栗山浄水場処理工程水から検出された *Synechococcus* 属に近縁な OTU の近縁種と各工程水におけるリード数

OTU	近縁種	相同性(%)	原水	沈澱処理水	ろ過水
OTU1	<i>Synechococcus</i> sp. PCC9005	100.0	2388	3114	23
OTU2	<i>Synechococcus</i> sp. MH305	100.0	0	671	1296
OTU3	<i>Synechococcus</i> sp. MW6B4	100.0	4	706	303
OTU4	<i>Synechococcus</i> sp. LBB3	100.0	94	1472	28
OTU5	Uncultured <i>Synechococcus</i> sp. clone LS51	100.0	3	367	0
OTU6	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7009	100.0	99	0	0
OTU7	<i>Synechococcus rubescens</i> SAG 3.81	100.0	0	59	87
OTU8	<i>Synechococcus</i> sp. MA0607A	100.0	36	46	0
OTU9	<i>Synechococcus</i> sp. MA0607K	99.2	0	0	36
OTU10	<i>Synechococcus</i> sp. MA0607A	98.0	0	10	0
OTU11	<i>Synechococcus</i> sp. UBR	98.4	41	678	26
	<i>Synechococcus</i> 属の合計リード数		2665	7123	1799

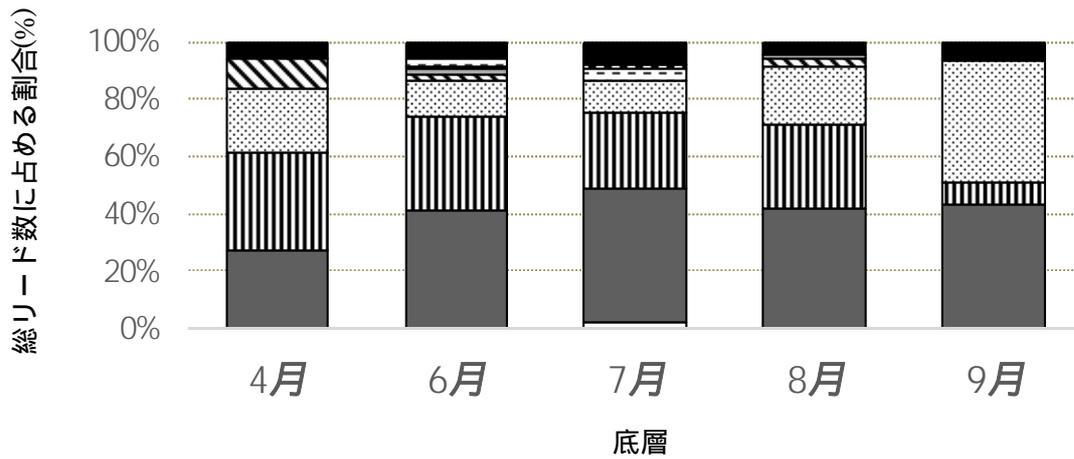
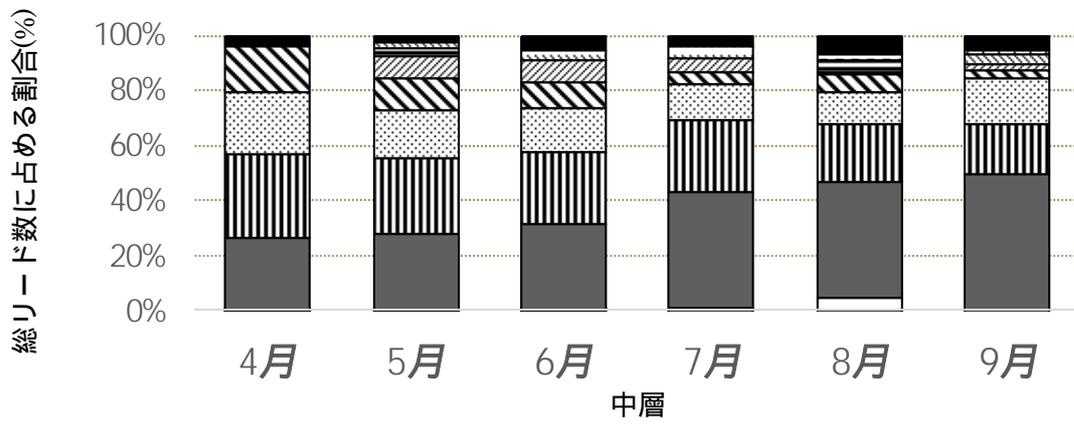
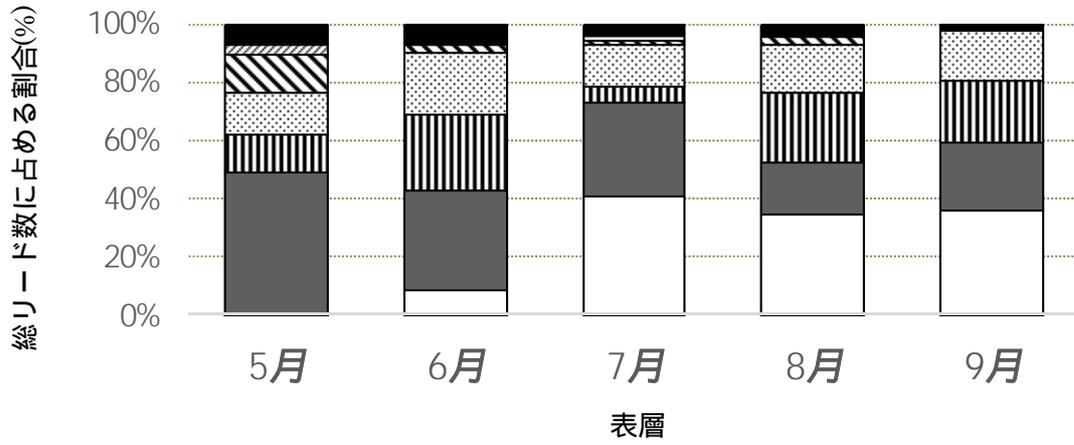


図4 草木湖の各水深における門レベルにおけるリード数の割合

- | | | |
|--------------------------|-------------------|------------------|
| □ Cyanobacteria | ■ Proteobacteria | ▨ Actinobacteria |
| ▤ Bacteroidetes | ▧ Verrucomicrobia | ▩ Planctomycetes |
| ▥ Armatimonadetes | ▦ Acidobacteria | ▪ Nitrospirae |
| ▣ Candidate_division_OD1 | ▤ Archaea | ■ Other |

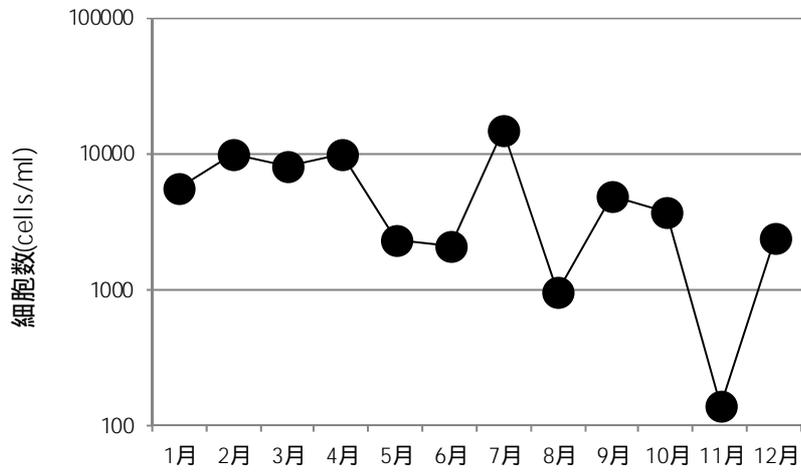


図5 草木湖の真核ピコ植物プランクトン細胞数の推移(2015年)

表3 草木湖の緑藻綱をターゲットとした生物相解析結果(2015年)

OTU	近縁種	相同性(%)	クローン数											
			1月	2月	3月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	
1	<i>Mychonastes homosphaera</i>	100	36	36	48	45	3	42	40	21	12	34	28	
2	<i>Chlamydomonas noctigama</i>	99.3	4			3	45	6	2	27	8	7	8	
3	<i>Chlamydomonas baca</i>	98.8	4	4						4		26	7	8
4	<i>Chlamydomonas fasciata</i>	99.8										2		4
5	<i>Chlamydomonas</i> sp. NIES-2315	100	4							2				