

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

研究代表者 秋葉 道宏 国立保健医療科学院 統括研究官  
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  
研究協力者 藤瀬 大輝 川崎市上下水道局水管理センター水道水質課 担当係長

研究要旨

近年、浄水場においてピコ植物プランクトンに起因したろ過水濁度の上昇（ろ過漏出障害）が報告されている。これまでクローニング法といった分子生物学的手法により、ろ過漏出障害原因微生物について検討を行い、真核ピコ植物プランクトンでは緑藻綱の *Mychonastes* 属、ピコシアノバクテリアでは複数の系統の *Synechococcus* 属がろ過漏出障害の原因となることが明らかとなった。さらに、従属栄養性の微生物も濁度への影響が大きいことが明らかになってきた。そこで次世代シーケンサーにより川崎市上下水道局長沢浄水場処理工程水の真正細菌の生物相を評価し、本解析手法の有用性およびろ過漏出障害の原因生物について検討を行った。

約 3 年間の結果に基づいて評価したところ、原水では Betaproteobacteria 綱、Actinobacteria 綱の占める割合が高いことが明らかとなった。沈澱処理水では Betaproteobacteria 綱の割合が高く、Actinobacteria 綱、Gammaproteobacteria 綱、Cytophagia 綱の割合が高まる時期もあった。ろ過水の生物相は原水、沈澱処理水とは大きく異なり、3 年間を通して Gammaproteobacteria 綱の占める割合が高く、夏から秋にかけて Alphaproteobacteria 綱、冬から春にかけて Cytophagia 綱の割合が高まる傾向がみられた。ろ過水から検出される主要な微生物は Cytophagia 綱 *Pseudarcicella* 属、Gammaproteobacteria 綱 *Crenothrix* 属、*Enhydrobacter* 属、*Acinetobacter* 属、Actinobacteria 綱 *Ca. Planktophila limnetica*、Alphaproteobacteria 綱 *Methylobacterium* 属、*Sphingomonas* 属、*Azorhizobium* 属、Cyanobacteria 綱 *Synechococcus* 属等であった。

ろ過漏出障害原因微生物の評価法として本手法の有用性が示された。沈澱処理水とろ過水の微生物相が大きく異なる傾向がみられ、ろ過水中の主要な微生物の種類が時期によって変化することが明らかとなった。

A. 研究目的

近年、浄水場においてピコ植物プランクトンに起因したろ過水濁度の上昇（ろ過漏出障害）が報告されている<sup>1)</sup>。ピコ植物プランクトンが水源の湖沼において増殖すると、取水後、浄水場ろ過水に漏出することがある。ピコ植物プランクトンとは真核ピコ植物プランクトンと、ピコシアノバクテリアに分かれ、落射蛍光顕微鏡観察における蛍光の色調によって 3 タイプ（CH-type, PE-type, PC-type）に識別されている。顕微鏡観察における形態的特徴に乏しく、形態から障害の原因生物を特定することは困難である。これまで、ろ過漏出障害原因微生物を明らかにすることを目的として、湖沼や浄水場を対象に、クローニング法といった分子生物学的手法を用いてピコ植物プランクトンの生物相評価を行ってきた。草木ダムを水源とする桐生市水道局元宿浄水場ではろ過水から緑藻綱の *Mychonastes* 属と黄金色藻綱の *Spumella* 属に近縁なクローンが検出され、ろ過漏出障害の原因となる可能性が示唆された<sup>2)</sup>。

川崎市上下水道局長沢浄水場において、原水、

沈澱処理水、ろ過水について、16S rRNA 遺伝子のクローニング法による生物相解析を行ったところ、ピコシアノバクテリアは 7 OTUs (Operational Taxonomic Unit) に分かれた<sup>3)</sup>。2013 年 6 月から 9 月の原水、沈澱処理水からは PC-type のピコシアノバクテリアである *Synechococcus* sp. 0BB26S03 に近縁なクローンが多く検出された。ろ過水では PE-type である *Synechococcus* sp. MH305 に近縁なクローンの割合が多かった。これらの結果から *Synechococcus* 属の種類によって砂ろ過による除去特性が異なる可能性が示唆された。同浄水場の各処理工程水について、真正細菌の 16S rRNA 遺伝子を対象に次世代シーケンサーを用いて微生物相の評価を行ったところ、従属栄養細菌の割合が大きく、従属栄養細菌の濁度に対する影響が大きいことが示唆された<sup>3)</sup>。このように次世代シーケンサーを適用して、真正細菌全体について各処理工程水を調査した報告はこれまで行われていない。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を用いて、川崎市上下水道局長沢浄水場の各処理工程水について微生物

相の評価を行った。

## B. 研究方法

### B-1 供試試料

川崎市上下水道局長沢浄水場の着水井から採水した原水と、凝集沈澱処理後の沈澱処理水、急速砂ろ過池の出口より採水したろ過水を用いた。ろ過池は、30cmのアンスラサイト層と50cmの砂層で構成されている。以下の採水日におけるろ過水の濁度は0.00~0.03度であり、水質に問題はなかった。沈澱処理水およびろ過水は次亜塩素酸ナトリウムを含んでいることから、塩素による細胞への影響を抑えるため、採水時にチオ硫酸ナトリウムで中和を行った。試料の採水は2013年6月21日、7月17日、8月21日、9月18日、10月16日、11月20日、2014年1月22日、2月19日、4月14日、5月21日、6月18日、7月23日、8月20日、9月17日、10月22日、11月19日、12月17日、2015年1月22日、2月18日、3月18日、4月28日、5月27日、6月24日、7月29日、8月26日、9月30日、10月28日、11月25日、12月22日、2016年1月27日、2月24日、3月10日、3月23日、4月27日に行った。原水の組成は、相模湖100%であった。

### B-2 生物相解析

2014年の原水、沈澱処理水は孔径3 $\mu$ m、2014年のろ過水と、2015年、2016年の全処理工程水は孔径5 $\mu$ mメンブレンフィルターを用いて吸引濾過を行い、ナノプランクトンを除去した。そのろ液を孔径0.2 $\mu$ 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吸引濾過し集菌を行った。集菌したフィルターを裁断し、50ml容ファルコンチューブに回収した。回収したフィルターからCTAB法に従って、ゲノムDNAの抽出を行った。精製後TE bufferに溶解させ、アガロースゲル電気泳動によりゲノムDNAの確認を行った。Caporasoら<sup>4)</sup>に従い、16S rRNA遺伝子のV4超可変領域を増幅するように設計されたプライマー515Fと806Rを用いてPCRを行った。反応液20 $\mu$ lは、AmpliTaq Gold-LD (Applied Biosystems Inc.) 0.1 $\mu$ l、dNTPs (Applied Biosystems Inc.) 1.6 $\mu$ l、10X Buffer 2 $\mu$ l、MgCl<sub>2</sub> 1.2 $\mu$ l、プライマー(10 $\mu$ M) 各2 $\mu$ l、nuclease-free water 9.1 $\mu$ l、DNA 2ngから構成された。反応は、600 $\mu$ l容チューブおよびサーマルサイクラー(PTC-200、MJ Research Inc.)を用いて95.0 $^{\circ}$ C $\cdot$ 9分、[95.0 $^{\circ}$ C $\cdot$ 45秒、50.0 $^{\circ}$ C $\cdot$ 45秒、72.0 $^{\circ}$ C $\cdot$ 1分] $\times$ 30サイクル、72.0 $^{\circ}$ C $\cdot$ 5分の条件で行った。各試料につき3つのリアクションで増幅を行い、PCR終了後、1.5ml容チューブに混合したものをライブラリーとした。

PCR産物をAgencourt AMPure XP (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA)を用いて精製した。精製したPCR産物は、株式会社ファスマックに依

頼して、2 $\times$ 250-bp paired-end protocolを用いてMiSeq Sequencer (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA)により配列決定を行った。得られた塩基配列はQIIMEにより解析し、97%以上の相同性を基準にOTU分けを行った。

### 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(綱レベル)

各試料より得られた配列は、6万~41万リードであった。原水では、Betaproteobacteria綱が総リード数の20~80%、Actinobacteria綱が20~60%を占め主要となった(図1)。

第4沈澱処理水では主にBetaproteobacteria綱が多く、最大95%を占め、原水の微生物相に似ていた。Betaproteobacteria綱が総リード数の50%を超えた月が、原水では6試料あったのに対し、第4沈澱処理水では12試料であった。また採水時期によってはActinobacteria綱が20~40%、Gammaproteobacteria綱が20~30%、Cytophagia綱が20%程度を占めた。前塩素処理を行った系と行わなかった系では、綱レベルの微生物相に大きな違いはみられず、主要な綱はBetaproteobacteria綱であった。

北ろ過水においては多くの月でGammaproteobacteria綱が20~70%を占め主要となった。Actinobacteria綱とBetaproteobacteria綱の占める割合の大きい原水と第4沈澱処理水の微生物相とは大きく異なった。特に第4沈澱処理水と北ろ過水間で微生物相が大きく変化することが示された。また、夏から秋にかけてAlphaproteobacteria綱の占める割合が20~90%になり、冬から春にかけてCytophagia綱が20~50%に高まり主要となる傾向がみられた。

#### C-2 浄水場処理工程水の生物相評価(属レベル)

総リード数の5%以上を占めた属を、各処理工程水における主要な微生物として評価した。原水の主要な微生物は18属であった。Betaproteobacteria綱のLimnhabitans属は7~26%、Actinobacteria綱のCandidatus Planktophila limneticaは5~53%を占め、Limnhabitans属は全試料において、Ca. Planktophila limneticaは3試料を除いて主要であった。Flavobacteriia綱のFlavobacterium属は5~18%を占め、半数の試料において主要となった。また、Cytophagia綱のPseudarcicella属は10月~3月、Gammaproteobacteria綱のCrenothrix属は11月~1月に主要となる傾向がみられた。

第4沈澱処理水の主要な微生物は21属であった。微生物相に占めるLimnhabitans属の割合が最も多く、調査期間の多くの月で主要となった。また原水よりも高い割合で検出された月が多かった。次いでCa. Planktophila limneticaとSaprospirae綱のSediminibacterium属の主要となる回数が多かった。総リード数に占めた割合はCa.

*Planktophila limnetica* が 6~40% と高かったのに対し、*Sediminibacterium* 属は 10% 程度であった。また、*Gammaproteobacteria* 綱が主要となる月には *Crenothrix* 属と、*Pseudomonas* 属もしくは *Enhydrobacter* 属、*Actinobacteria* 綱の割合が高まる月には *Ca. Planktophila limnetica*、*Cytophagia* 綱の割合が高まる際には *Pseudarcicella* 属の割合が高まった。

北ろ過水の主要な微生物は 25 属であった。*Pseudarcicella* 属、*Crenothrix* 属、*Enhydrobacter* 属、*Ca. Planktophila limnetica* の主要となる回数が多かった。*Pseudarcicella* 属と *Crenothrix* 属が主要な微生物として検出される時期は秋から春であり、原水における傾向と同様であった。*Enhydrobacter* 属は春から秋に主要となり、夏季には *Alphaproteobacteria* 綱の *Methylobacterium* 属が主要となった。また、藍藻綱の *Synechococcus* 属は 6 試料において主要となり、季節性はみられず 5~18% を占めた。*Synechococcus* 属は凝集効果が低いことが報告されており<sup>5)</sup>、長沢浄水場においても同様に凝集沈澱による除去効果が低く、ろ過水に漏出したと考えられる。

原水、第 4 沈澱処理水、北ろ過水において主要となった回数が 5 回以上の微生物について評価した (表 1)。*Curvibacter* 属、*Limnohabitans* 属、*Ca. Planktophila limnetica*、*Flavobacterium* 属は、おもに原水、第 4 沈澱処理水において主要となった微生物である。処理工程が進むにつれて、第 4 沈澱処理水、北ろ過水において主要となる回数は減少したことから、これらの微生物は、塩素処理や凝集沈澱処理、砂ろ過処理によって除去されやすい可能性が示唆された。特に *Curvibacter* 属は、北ろ過水において主要となった月はなかったことから、砂ろ過により除去されているものと考えられた。*Sediminibacterium* 属は、原水、北ろ過水においても主要となったが、第 4 沈澱処理水において主要となった回数が特に多く、第 4 沈澱処理水における特徴的な微生物であった。

*Pseudarcicella* 属、*Crenothrix* 属は、原水、第 4 沈澱処理水においても主要となったが、主要となった回数および、総リード数に占める割合が北ろ過水の方が高く、砂ろ過による除去効率が低いことが示唆された。

*Methylobacterium* 属、*Sphingomonas* 属、*Azorhizobium* 属、*Enhydrobacter* 属、*Acinetobacter* 属、*Synechococcus* 属は、特に北ろ過水において主要となった回数が多かった。特に *Acinetobacter* 属は 5~46%、*Azorhizobium* 属は 6~28% を占め、北ろ過水においてのみ主要となったことから、砂ろ過による除去効果が低いこと、砂ろ過層で増殖している可能性が示唆された。

## E. 結論

長沢浄水場の原水、第 4 沈澱処理水、北ろ過水について、16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシングを用いて、約 3 年間にわたり微生物相について評価を行った結果、本手法がろ過漏出障害原因微生物を詳細に評価する上で有用であることが明らかとなり、以下の知見が得られた。

1) 原水は *Betaproteobacteria* 綱および *Actinobacteria* 綱が主要となった。*Betaproteobacteria* 綱の *Limnohabitans* 属および *Actinobacteria* 綱の *Ca. Planktophila limnetica* は、多くの月で主要な微生物であった。

2) 第 4 沈澱処理水は主に *Betaproteobacteria* 綱の占める割合が高かった。採水時期によっては *Actinobacteria* 綱、*Gammaproteobacteria* 綱、*Cytophagia* 綱の割合が高まった。属レベルでは *Limnohabitans* 属が多くの月で主要となった。次いで *Ca. Planktophila limnetica* と *Saprospirae* 綱の *Sediminibacterium* 属が主要となった。

3) 北ろ過水は多くの月で *Gammaproteobacteria* 綱が主要となった。また、夏から秋にかけて *Alphaproteobacteria* 綱が主要であった。冬から春にかけて *Cytophagia* 綱が高まり主要となった。秋から春にかけて *Gammaproteobacteria* 綱の *Pseudarcicella* 属と *Crenothrix* 属、春から秋にかけて *Gammaproteobacteria* 綱の *Enhydrobacter* 属、夏季には *Alphaproteobacteria* 綱の *Methylobacterium* 属が主要となった。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 論文発表

渡邊英梨香, 藤本尚志, 大西章博, 鈴木昌治, 藤瀬大輝, 秋葉道宏. 培養法および 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシングによる浄水場ろ過水の細菌相の評価, 用水と廃水, 2017, 59(3), 197-203.

### 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, 秋葉道宏. 培養法と 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシングによる浄水場ろ過水の細菌相の評価. 平成 28 年度全国会議 (水道研究発表会); 2016 年 11 月, 京都市. 同講演集 pp. 758-759.

渡邊英梨香, 藤本尚志, 大西章博, 鈴木昌治, 藤瀬大輝, 松倉智子, 秋葉道宏. 浄水場処理工程水における微生物相の長期的評価. 第 51 回日本水環境学会年会; 2017 年 3 月, 熊本市. 同講演集 pp. 204.

## 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) Caporaso, J G., Lauber, C. L, Walters, W. A, Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S. M, Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J. A, Smith, G. and Knight, R., 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*, 6, 1621-1624.
- 5) Aktas, S. T., Takeda, F., Maruo, C., Chiba, N., Nishimura, O., 2012. A comparison of zeta potentials and coagulation behaviors of cyanobacteria and algae. *Desalination and Water Treatment*, 48, 294-301.

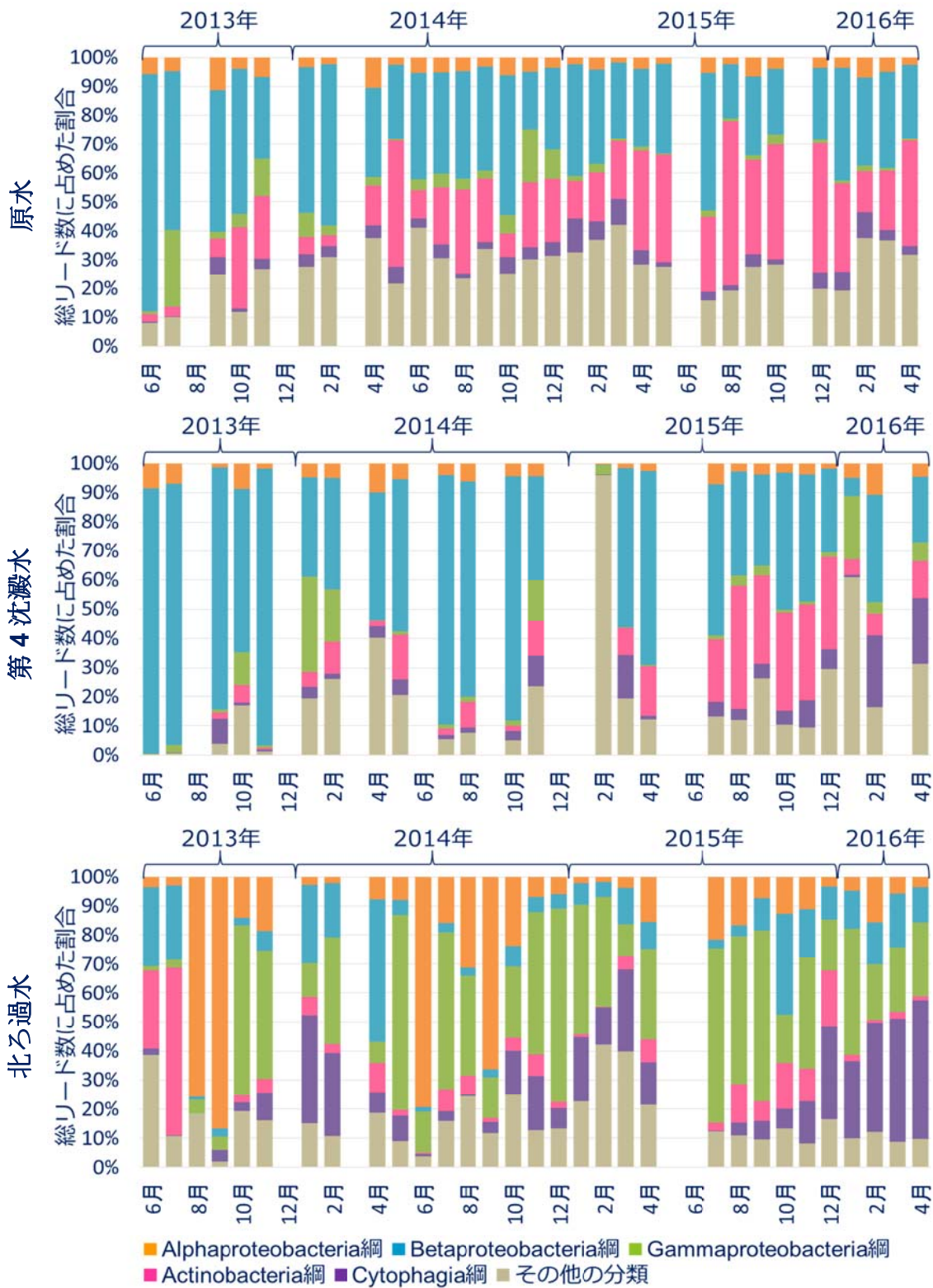


図1 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシングによる長沢浄水場  
処理工程水の微生物相（綱レベル）

表 1 長沢浄水場の各処理工程水に含まれる主要な微生物

分類	属	原水	第4沈澱処理水	北ろ過水
Alphaproteobacteria	<i>Methylobacterium</i>	0 (0-4%)	1 (0-6%)	7 (5-63%)
	<i>Sphingomonas</i>	0 (0-1%)	1 (0-6%)	5 (5-67%)
	<i>Azorhizobium</i>	0 (0-1%)	0 (0-0.1%)	5 (6-28%)
Betaproteobacteria	<i>Limnolobus</i>	30 (7-26%)	21 (7-58%)	8 (5-22%)
	<i>Curvibacter</i>	5 (5-8%)	5 (6-11%)	0 (0-4%)
	<i>Rhodospirillum</i>	4 (6-40%)	5 (6-12%)	2 (5%)
Gammaproteobacteria	<i>Crenothrix</i>	4 (7-17%)	4 (13-19%)	16 (5-62%)
	<i>Enhydrobacter</i>	0 (0-1%)	1 (0-6%)	12 (9-38%)
	<i>Acinetobacter</i>	0 (0-1%)	0 (0-1%)	5 (5-46%)
Actinobacteria	<i>Ca. Planctomyces limneticus</i>	27 (5-53%)	14 (6-40%)	11 (6-55%)
Cytophagia	<i>Pseudarcicella</i>	8 (5-12%)	7 (7-25%)	19 (6-47%)
Saprospirae	<i>Sedimentibacterium</i>	6 (6-11%)	11 (5-11%)	1 (0-6%)
Flavobacteria	<i>Flavobacterium</i>	17 (5-18%)	5 (6-16%)	3 (7-9%)
Cyanobacteria	<i>Synechococcus</i>	0 (0-1%)	1 (36%)	6 (5-18%)

数値は総リード数の5%以上を占めた回数を，%は総リード数に占めた割合の範囲を示した。