

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
研究分担者	藤本	尚志
研究協力者	藤瀬	大輝



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。これま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い、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。さらに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。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の結果、長沢浄水場のろ過水で主要であった細菌が実際のダム湖においてどのような消長を示しているのか検討を行った。長沢浄水場ろ過水から 18 属が主要な細菌として検出された。*Flavobacterium* 属、*Sediminibacterium* 属、*Limnohabitans* 属、*Crenothrix* 属、*Methylocaldum* 属は宮ヶ瀬湖において総リード数に占める割合が 1% を超え、細菌群集における主要な構成細菌と考えられた。浄水場ろ過水における主要な細菌の実湖沼における分布は、表層に分布するもの、中層・底層に分布するもの、全層に分布するものと、細菌の種類によって深度方向の分布が異な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>。さらに長沢浄水場の原水、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、原水は Betaproteobacteria 綱および Actinobacteria 綱が主要となった<sup>4)5)</sup>。Betaproteobacteria 綱の *Limnohabitans* 属および Actinobacteria 綱の *Ca. Planktophilia limnetica* は、多

くの月で主要な微生物であった。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. Planktophilia limnetica* と Saprospirae 綱の *Sediminibacterium* 属が主要となった。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。このようにろ過水中の主要な細菌の消長には季節性がみられる傾向にあるものの、ダム湖における消長は明らかとなっていない。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の結果、長沢浄水場で主要であった細菌が実際のダム湖においてどのような消長を示しているのか検討を行った。

## B. 研究方法

### B-1 供試試料

2016年4月～2017年3月に宮ヶ瀬ダム中央地点より採水した表層水(水深0.5m)、中層水(水深約40m)、底層水(水深約80m)を用いた。

### B-2 生物相解析

孔径  $0.2\mu\text{m}$  のポリカーボネート製メンブレンフィルターを用いて試料を吸引濾過し集菌を行った。ゲノム DNA を抽出後、真正細菌・古細菌の 16S rRNA 遺伝子をターゲットとするプライマー 515F、806R を用いて PCR を行い、NEBNext® Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina® (New England BioLabs Inc.)によりライブラリーを作成、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 8万～10万リードについて QIIME を利用して解析を行った

## C. 研究結果および D. 考察

長沢浄水場ろ過水における主要な細菌(ろ過水において総リード数の5%以上占めたことのある細菌)の宮ヶ瀬湖における割合を示した(表1)。長沢浄水場ろ過水から18属が主要な細菌として検出された。*Flavobacterium* 属、*Sediminibacterium* 属、*Limnohabitans* 属、*Crenothrix* 属、*Methylocaldum* 属は総リード数に占める割合が1%を超え、宮ヶ瀬湖の細菌群集における主要な構成細菌と考えられた。

*Crenothrix* 属は5～8月に底層で割合が高まることが明らかとなった(図1)。長沢浄水場ろ過水では11月～2月に割合が高まる。*Sediminibacterium* 属は表層から底層にかけて分布することが明らかとなった(図2)。長沢浄水場ろ過水における検出に季節性は見られなかった。*Methylocaldum* 属は中層・底層で割合が高まることが明らかとなった(図3)。長沢浄水場ろ過水では8月～10月に割合が高まる傾向がみられている。*Flavobacterium* 属は春季に表層で割合が高まることが明らかとなった(図4)。長沢浄水場ろ過水においても春季に割合が高まる。*Limnohabitans* 属は年間にわたって表層に分布することが明らかとなった(図5)。長沢浄水場ろ過水における検出に季節性は見られなかった。

## E. 結論

水源におけるろ過漏出障害原因微生物の季節的な推移、分布を評価する上で次世代シーケンサーによる16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析は有用である。浄水場ろ過水における主要な細菌の実湖沼における分布を調べたところ、表層に分布するもの、中層・底層に分布するもの、全層に分布するものと、細菌の種類によって深度方向の分布が異なることが明らかとなった。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 論文発表

藤本尚志, 山崎雄佑, 遠藤沙紀, 渡邊英梨香, 蔣紅与, 大西章博, 藤瀬大輝, 三浦尚之, 秋葉道宏. 16S rRNA 遺伝子の解析による浄水場処理工程水のピコシアノバクテリア生物相の評価, 用水と廃水 59(9), 667-674, 2017.

### 学会発表

該当なし

## 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) 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.

5) 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.

表 1 長沢浄水場ろ過水の主要な細菌の宮ヶ瀬湖における割合  
 (ろ過水において総リード数の 5%以上占めたことのある細菌、平均は表層、中層、底層の 1 年間のデータすべての平均値を示す)

門 or 綱	属	最小 (%)	最大 (%)	平均 (%)
Actinobacteria	<i>Candidatus_P lanktophila</i>	0.04%	0.50%	0.12%
Bacteroidetes	<i>Flavobacterium</i>	0.03%	23.02%	1.53%
Bacteroidetes	<i>Sedimentibacterium</i>	0.36%	14.54%	3.79%
Cyanobacteria	<i>Synechococcus</i>	0.00%	0.90%	0.15%
Deinococcus-Thermus	<i>Deinococcus</i>	0.00%	0.00%	0.00%
Planctomycetes	<i>Gemmata</i>	0.00%	0.26%	0.06%
Alphaproteobacteria	<i>Methylobacterium</i>	0.00%	0.03%	0.00%
Alphaproteobacteria	<i>Methylobaculum</i>	0.00%	0.02%	0.00%
Alphaproteobacteria	<i>Azorhizobium</i>	0.00%	0.00%	0.00%
Alphaproteobacteria	<i>Sphingobium</i>	0.00%	0.02%	0.00%
Betaproteobacteria	<i>Limnochlamydomonas</i>	0.05%	7.15%	1.63%
Gammaproteobacteria	<i>Crenothrix</i>	0.00%	12.58%	2.58%
Gammaproteobacteria	<i>Methylobaculum</i>	0.00%	6.01%	1.32%
Gammaproteobacteria	<i>Acinetobacter</i>	0.00%	1.80%	0.06%
Gammaproteobacteria	<i>Enhydrobacter</i>	0.00%	0.02%	0.00%
Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	0.00%	0.26%	0.03%
Verrucomicrobia	<i>Opitutus</i>	0.01%	0.92%	0.45%
Verrucomicrobia	<i>Candidatus_Xiphinematobacter</i>	0.00%	0.01%	0.00%

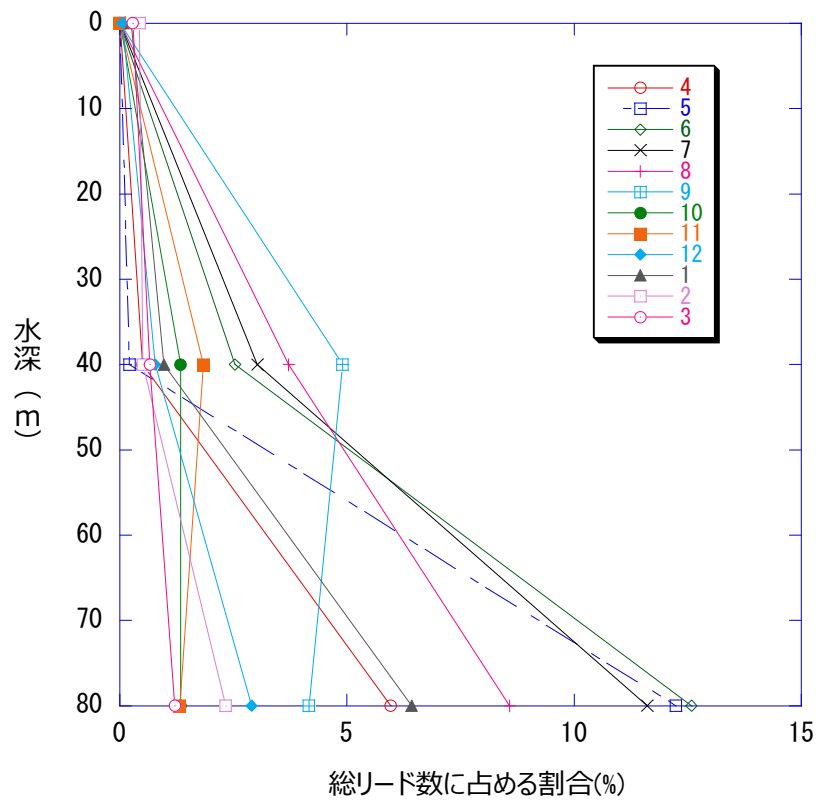


図1 Gammaproteobacteria 綱 *Crenothrix* 属の鉛直分布

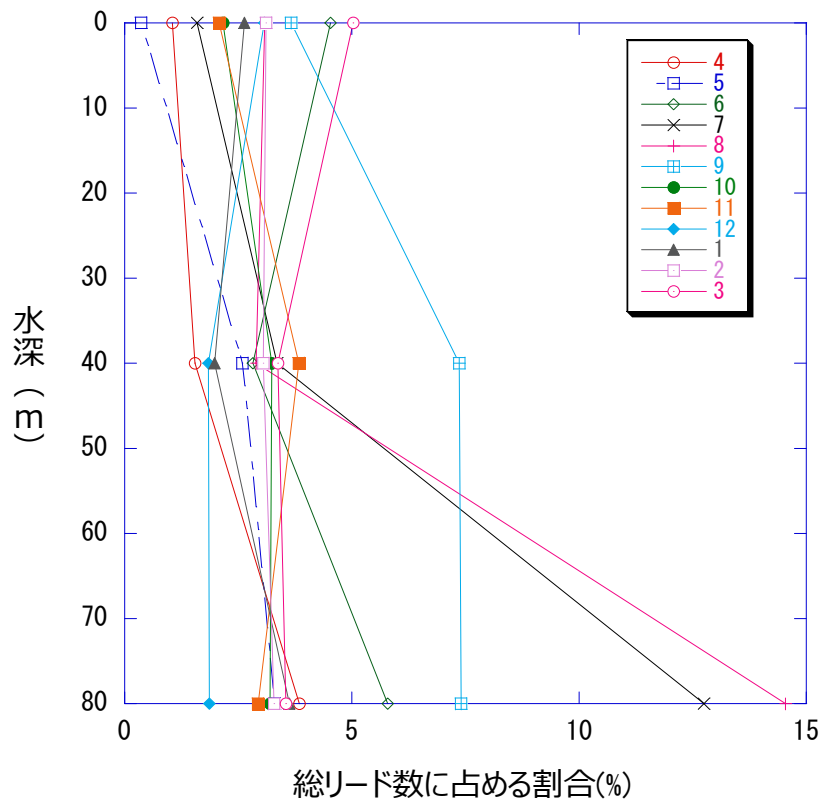


図2 Bacteroidetes 門 *Sediminibacterium* 属の鉛直分布

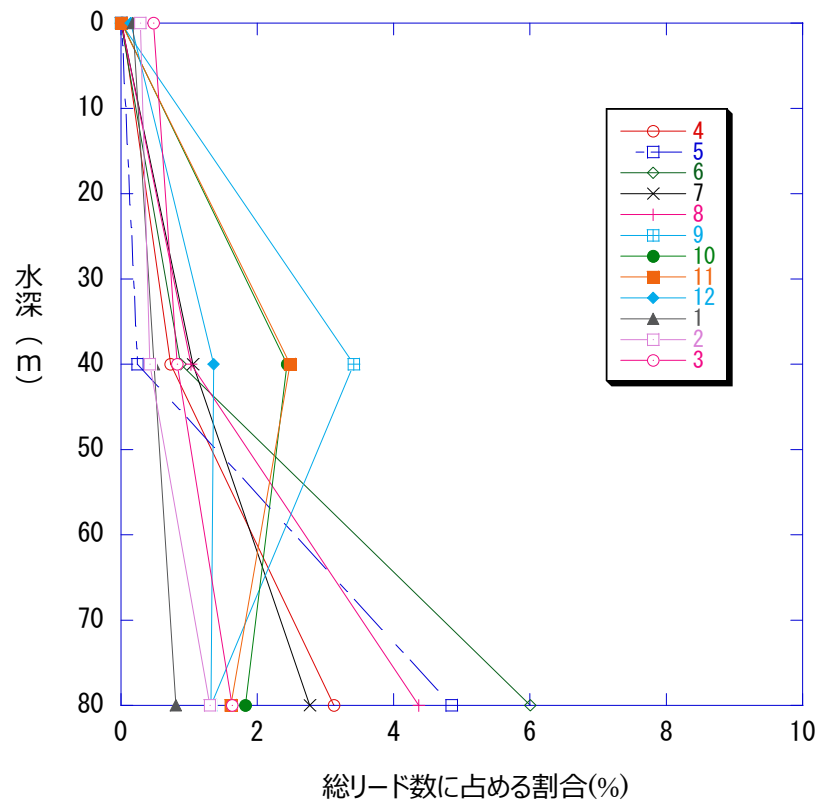


図3 Gammaproteobacteria 綱 *Methylocaldum* 属の鉛直分布

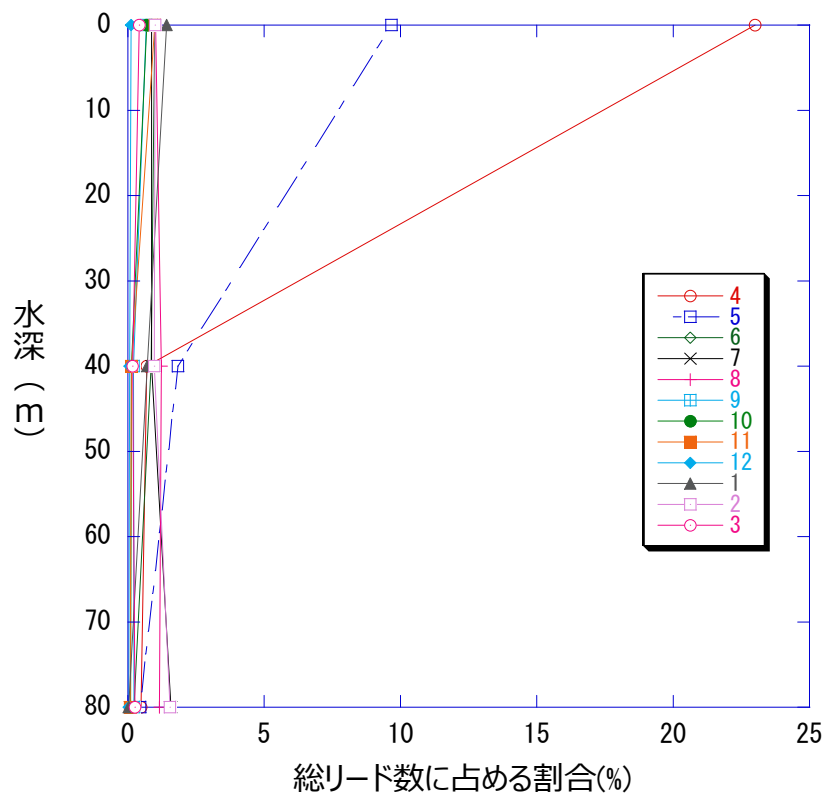


図4 Bacteroidetes 門 *Flavobacterium* 属の鉛直分布

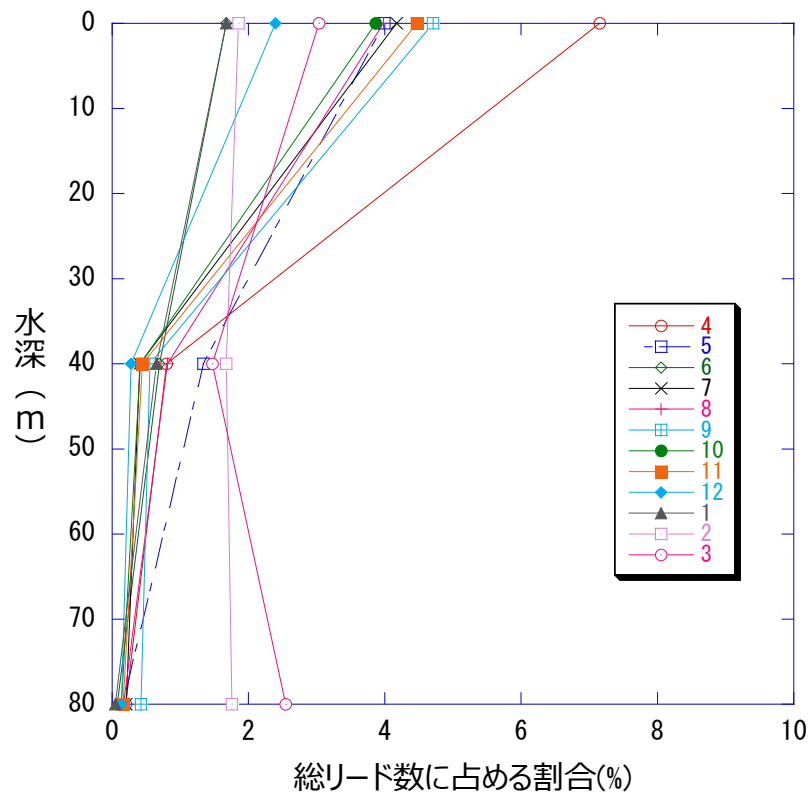


図5 Betaproteobacteria 綱 *Limnohabitans* 属の鉛直分布