

次世代シーケンサーによるろ過漏出障害
原因微生物の給配水系での挙動

| | | |
|-------|----|----|
| 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：次世代シーケンサーによるろ過漏出障害原因微生物の給配水系での挙動

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

これまで、浄水処理施設の生物障害であるろ過漏出障害原因微生物について水源から浄水処理工程水にかけての挙動について調査し多くの知見が得られた。しかし、浄水場から送水された給配水系統での挙動については、海外での事例についての文献はいくつか見られるが、国内での事例報告は乏しい。そこで、次世代シーケンサーを用いたろ過漏出障害原因微生物の同定技術を給水栓水に適用し、ろ過漏出原因微生物の給配水系での挙動を1年間にわたり調査し、以下の知見が得られた。

門レベルの解析では、時期により比率が異なるが、Proteobacteria が高い割合を示した。また、Cyanobacteria(植物プランクトンの葉緑体を含む)が一定割合検出されている。

門レベルの解析で優占した Proteobacteria 門について綱レベルの解析を行ったところ、Alphaproteobacteria 綱(Rhizobiales 目)が優占した。

給水栓水から検出された細菌の水道システム内の遷移を解析したところ、特徴的に沈澱池で割合が増える細菌、ろ過池で割合が増える細菌などを見つけることができた。水道施設内でそれぞれの細菌が局在し場所によって増減していることが示唆された。

A. 研究目的

浄水施設における生物障害を類別すると、凝集沈殿障害、ろ過閉塞障害、漏出障害、異臭味障害、その他の生物障害が挙げられる。その中で、凝集沈殿障害および漏出障害の原因の一つにピコプランクトンが関与していると考えられていた。

先の研究で、浄水場処理工程水の次世代シーケンサーの解析結果から総リード数に占めるピコプランクトンの割合は10%程度で、80-100%を従属栄養細菌が占めており、従属栄養細菌の濁度へ影響が大きいことが示唆された。また、これまで一般細菌や従属栄養細菌と一括りに評価してきた細菌類について、その細菌相は、水道システムの中で時期や浄水処理工程で大きく変遷しており、種や株によって浄水処理工程での除去性に違いがあることがわかった。¹⁾

しかしながら、浄水場から送水された給配

水系統でのこれらの挙動についての知見はほとんどなく、海外での事例についての文献はいくつか見られるが、国内での事例報告は乏しい。これらの調査には次世代シーケンサーが有効なツールであると考えており、給配水系で発生するバイオフィルムや再増殖を引き起こす微生物について、水源から給水栓までの水道システム全体から、発生メカニズムを捉えることができると思われる。

本研究は、次世代シーケンサーを用いたろ過漏出原因微生物の同定技術を給水栓水に適用し、ろ過漏出原因微生物の給配水系での挙動を1年間にわたり実態調査を行い、給配水系統の細菌相を評価し、国内での事例報告とすることを目的とした。

B. 研究方法

1) 採水地点および試料の採取

採水地点は近傍の水質検査定点で、従属栄

養細菌が検出されている、浄水場から遠く、比較的夏場の残留塩素が低い、水質自動測定装置が設置されている、という条件に合った川崎市上下水道局京町ポンプ所水質自動測定装置脇給水栓を選定した。

試料の採取は、給水栓を開放し5分間放流後、100 L 採水した。採取期間は2015年7月から2016年7月までである。

比較試料として、給水栓水採水と同日の浄水場工程水（原水、沈殿処理水、ろ過水）を採水し試料に供した。

2) 次世代シーケンサーによる群集構造解析

試料は、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、集菌し、CTAB 法を用いてゲノム DNA の抽出を行った。抽出試料は、真正細菌の 16S rRNA 遺伝子 V4 領域（超可変領域）を増幅させるプライマー 515F, 806R を用いて Tailed PCR を行い、増幅産物を精製後、Illumina 社の MiSeq によるアンプリコンシーケンシングを行い、QIIME を用いた解析を行った。

C. 研究結果および D. 考察

図 1 に遺伝子の増幅に成功した給水栓水の2015年7月から2016年7月までの総リード数に占める各門レベルの割合を示した。時期により比率が異なるが、Proteobacteria 門が 77-99%と高い存在割合を示した。また、Cyanobacteria 門（植物プランクトンの葉緑体を含む）が 0.1-5.7%検出されており、濾過漏出をしたピコプランクトンを含む植物プランクトンが給水栓水に存在していることが示唆された。

門レベルの解析で優占していた Proteobacteria 門について、綱レベルの解析を行ったところ、Alphaproteobacteria 綱（Rhizobiales 目）が 50-100%を占め、優占していた。

給水栓水で検出された細菌について原水、沈殿処理水、ろ過水給水栓水でそれぞれ総リード数に対する割合の年間平均値を表に示した。総じて原水での存在割合の大きい細菌は、処理工程が進むにしたがって、割合が低下している一方、沈澱池で割合が上昇する細菌、ろ過池で割合が上昇する細菌、給水栓水で割合が上昇する細菌も検出され、それぞれの施設で、特有の細菌が局在している可能性が示唆された。

E. 結論

本研究より、給水栓水の細菌叢を網羅的に解析（メタゲノム解析）することに成功した。

調査した試料は、Proteobacteria 門 Alphaproteobacteria 綱（Rhizobiales 目）が優占し Cyanobacteria 門（真核藻類葉緑体を含む）が 10%程度存在した。

ろ過水より給水栓水で高い比率占める細菌が存在し再増殖、バイオフィームの可能性を示唆された他、特有の細菌が浄水施設毎に局在している可能性が示唆された。

ろ過漏出障害原因微生物の給配水系における挙動について知見が得られると共に、微生物の再増殖の可能性を示唆する結果も得られた。

本手法を用いることで、水道システム全体の細菌の動態を網羅的にとらえることができ、水道における微生物学的研究の様々な場面に活用できると考えている。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1) 論文発表

該当なし

2) 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。）

1) 特許取得

該当なし

2) 実用新案登録

該当なし

3) その他

該当なし

I. 参考文献

1) 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 28 年度全国会議
 (水道研究発表会) 講演集 p. 618 (2014)

表 給水栓水から検出された細菌の水道システム内の推移

| 界 | 門 | 綱 | 目 | 科 | 原水 | 沈殿 | ろ過 | 給水 | 傾向 | |
|----------|------------------|----------------------|------------------|---------------------|------------------|-------|-------|-------|------|--|
| Bacteria | Actinobacteria | Actinobacteria | Actinomycetales | ACK-M1 | 29.9% | 18.3% | 3.7% | 2.6% | | |
| | Bacteroidetes | Cytophagia | Cytophagales | Cytophagaceae | 3.7% | 10.1% | 23.1% | 0.5% | | |
| | | Flavobacteriia | Flavobacteriales | Cryomorphaeae | 3.4% | 1.3% | 0.9% | 0.3% | | |
| | | | | Flavobacteriaceae | 0 | 1.2% | 1.1% | 0.3% | | |
| | [Saprosirae] | [Saprosirales] | Chitinophagaceae | 6.3% | 6.2% | 2.3% | 0.7% | | | |
| | Cyanobacteria | 4C0d-2 | MLE1-12 | | 0.0% | 0.0% | 0.2% | 0.8% | | |
| | | Chloroplast | Cryptophyta | | 0.4% | 1.0% | 0.5% | 1.1% | | |
| | | | Stramenopiles | | 0.1% | 9.0% | 1.1% | 1.2% | | |
| | | Nostocophycideae | Nostocales | Nostocaceae | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 0.4% | | |
| | | Synechococophycideae | Synechococales | Synechococcaceae | 0.0% | 0.5% | 0.3% | 0.9% | | |
| | Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Rhizobiales | Other | 0.0% | 0.0% | 0.4% | 0.1% | | |
| | | | | | 0.2% | 0.2% | 1.8% | 55.8% | | |
| | | | | Hyphomicrobiaceae | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 0.3% | | |
| | | | | Methylobacteriaceae | 0.0% | 0.4% | 0.7% | 0.8% | | |
| | | Betaproteobacteria | Burkholderiales | Comamonadaceae | 24.9% | 25.9% | 10.6% | 2.7% | | |
| | | | | Methylophilales | Methylophilaceae | 2.2% | 0.4% | 0.2% | 0.2% | |
| | | | | Rhodocyclales | Rhodocyclaceae | 0.7% | 1.8% | 0.3% | 0.2% | |
| | | Gammaproteobacteria | Pseudomonadales | Moraxellaceae | 0.3% | 2.0% | 15.7% | 14.1% | | |
| | Pseudomonadaceae | | | 0.0% | 0.1% | 0.9% | 0.3% | | | |

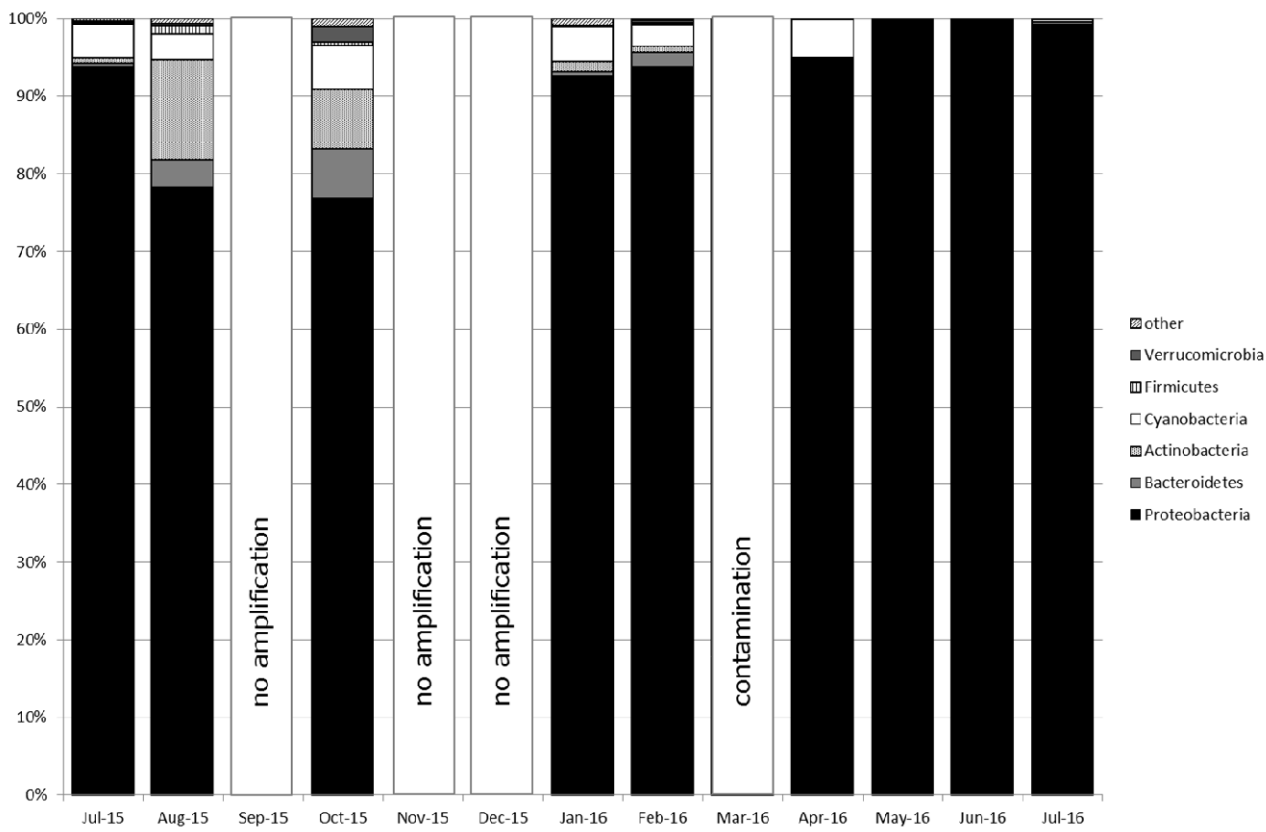


図1 給水栓水における細菌相の推移

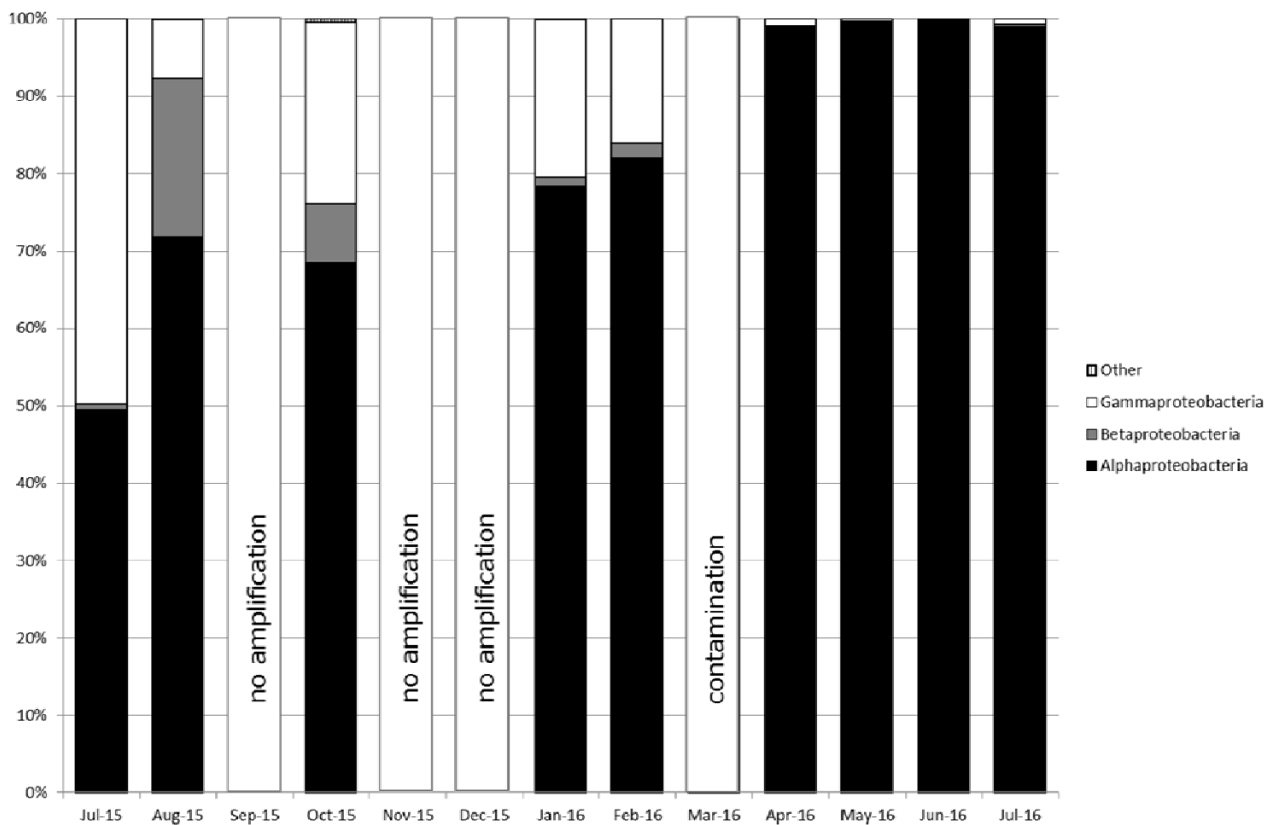


図2 給水栓水におけるProteobacteria門の細菌相の推移

