

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23360210

研究課題名(和文) 水源安全性評価への水文解析・微生物解析の適用

研究課題名(英文) Application of Hydrological and Microbiological Analyses to Assessment of Water Resource Safety

研究代表者

坂本 康 (SAKAMOTO, Yasushi)

山梨大学・医学工学総合研究部・教授

研究者番号：80126648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000円、(間接経費) 1,320,000円

研究成果の概要(和文)：将来の気候変動に伴う水循環の変化が水源の安全性に与える影響を予測するために、水循環を扱う水文学と微生物学とを融合させた新たな微生物水文学手法の開発を最終目的として、富士川流域やネパールカトマンズ盆地などを対象とした研究を行った。その結果、水文解析で用いるマルチスケール分布型流出モデル、および微生物解析で用いる水系感染症関与病原微生物の測定手法の開発を行った。また、これらの手法を実際の河川、地下水に適用して、DNAを用いた微生物群集解析と同位体解析の結果の関連性、降雨や土地利用が微生物の出現に与える影響などを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In order to predict the influence of the water cycle change accompanying a future climate change on the safety of water resources, research in the Fujikawa basin, Nepal Katmandu basin, etc. was conducted aiming at a final purpose of development of the new microbiological-hydrology technique in which hydrology and microbiology were united. As a result, the multi-scale distributed-parameter runoff model used in hydrological analysis and the measurement technique for the pathogenic microbe used in microbiological analysis were developed. Moreover, these techniques were applied to an actual river and groundwater, and we found the relationship between the results of DNA analysis of microbial community structure and isotope analysis, and also found the influence of both rainfall and land use on the behavior of pathogenic microbes.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・水工学

キーワード：水質水文学

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化は水移動(水文過程)・水環境の変化を起こし、病原微生物の蔓延を引き起こす可能性がある。これに対処するために、水による病気を防ぐための水文学が必要になっている。しかし、水文学・微生物学の両者の視点を十分に取り入れた研究は、今までなかった。その原因として、微生物計測が水文研究者にとって扱いにくい培養法によっていたこと、自然由来と人間由来の微生物の判定が難しかったことが挙げられる。ところが、培養法で検出できる微生物は全体の数%にすぎないことが分かり、微生物学では培養法に代わる遺伝子工学的手法が主流になってきたこと、水や化学成分の由来や微生物反応の解析に有効な同位体の分析が容易になってきたことなどにより、両者の結合の道が開けた。また、同位体分析、遺伝子解析に必要な機器の価格も、一般的な研究室で導入可能な水準に下がってきた。このような状況で、水文学も微生物汚染解析に対して積極的にのりだす機が熟したといえ、本研究はその先駆けを目指した。

2. 研究の目的

地球温暖化の影響で世界の水文環境が変化することが予想されている。この変化に対し、洪水の頻発化などの治水面での影響の研究は多数行われているが、利水の質の面での影響の研究は多くはない。しかし、水文循環は物質の移動を駆動するシステムとしても重要であり、水文循環の変化は病原菌などの移動を通して水資源の質的变化を引き起こすおそれがある。そこで、本研究では、水源安全性評価の分野での水文学の応用範囲を広げるといふ全体構想の下で、同位体、分布型水文モデルなどを使った水文解析と病原微生物の解析を結合し、水文循環の変化が水源の安全性に与える影響を予測するために必要な微生物水文学手法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、水文解析、微生物解析を結合した手法で、水資源の質の面での安全性のアセスメントに活用できる手法を開発するために、研究メンバーの得意とする3分野に絞って、下記の方法で研究を行った。

- 1) 降雨時の病原微生物流出機構の解析：降雨時の水文現象が病原微生物濃度変化とどのように関係するかを定量的に評価し、モデル化を行なうために、降雨時の河川水の採取と分析、さまざまな条件での化学成分、微生物の濃度の測定とその結果の比較、および変動原因の検討を行った。
- 2) 地下水微生物汚染の同位体水文学・水質統計学的解析：地下水理・水文情報と水の同位体、水質、微生物量に関する情報を結合

し、微生物汚染の特徴を明らかにするために、微生物汚染の観測されたカトマンズ盆地の地下水の採取と微生物・化学成分・同位体の同時測定を、季節を変えて行い、水質指標相互の関係、水文過程の影響などを検討した。

- 3) 自然由来と人間由来の判別に役立つ微生物指標の開発：自然由来の汚染の指標として、植物にとっての病原微生物に着目し、その動態を調べるために、流域の土地利用の異なる河川で、森林・農地からの流出の特徴となり、それらの寄与の判定に役立つ微生物の探索を行った。また、微生物指標は環境中でその量と内容が変化することが予想されるために、植物の近傍での微生物の変化を、根圏を主な対象として検討した。

4. 研究成果

分担して行った3つの分野の研究で、下記の研究成果が得られた。なお、本研究は、平成23年度後半に、追加採択課題として開始されたため、実際の研究期間は2年半である。

1) 降雨時の病原微生物流出機構の解析

1年目には、微生物検出法最適化の目的で、新たに考案した陰電荷膜破砕型濃縮法の濃縮操作条件を種々変化させて、水系感染症に關与する主要な3種類の病原微生物(ウイルス、原虫、細菌)の同時濃縮・検出がうまくできる条件を見出した。これにより、自然環境水での微生物危険度がより簡易に測定できるようになった。また、微生物流出解析に使う数値計算モデルでは、よりきめの細かいモデルが必要と考えられるため、富士川流域を対象として、対象地域の高解像度数値地形情報に基づく擬河道網の作成、長期の水文・気象データの収集などの基盤情報の整備を行った。

2年目には、1年目に開発した微生物測定方法により、平水時および降雨出水時の河川水の微生物量を観測し、降雨出水イベントが与える影響を検討した。対象は、健康に影響する水道水源を有する荒川とした。その結果、平水時および降雨出水時に経日的な採水調査を行ったデータにより、降雨時には健康関連微生物の濃度が最大で25倍以上に上昇することを見いだした。

3年目には、水道水源河川水で、大腸菌や嫌気性芽胞菌等の指標微生物の測定を多くの試料で行い、これらの検出に成功するとともに、これらの濃度変動への降水の影響を明らかにした。また、病原ウイルスについては、大腸菌などとは異なり、降水があっても明確な濃度変動がないことを確認した。一方、微生物流出解析に用いることができる数値計算モデルの開発では、新たにマルチスケールの分布型流出モデルを構築し、富士川、ネパールカトマンズ盆地の河川においてその有効性を確認した。このモ

デルの開発によって、流域源頭部の小溪流から下流域の本川までの様々なスケールにおける流出現象の再現が可能となった。

これらの2年半の研究成果を通じて、水源河川の汚染解析に関して、水系感染症に關与する主要な3種類の病原微生物(ウイルス、原虫、細菌)の同時濃縮・検出方法の開発、これらの微生物の濃度に降雨出水イベントが与える影響の解明、および、水源河川の流出現象を再現でき、病原微生物の解析に役立つ、マルチスケールの分布型流出モデルの開発という成果を得られた。

2) 地下水微生物汚染の同位体水文学・水質統計学的解析

1年目には、一般水質と同位体を用いた水質統計学的地下水水文解析を行い、水の成分の同位体の特徴を示す指標であるd値が地下水の涵養過程の解析に有効であること、Nの同位体と水の同位体を合わせて使う手法が硝酸性窒素による汚染の解析に有効であることを示した。また、地下水微生物汚染解析によって、カトマンズ盆地の地下水で想定された下水流入の影響を、水質等を用いて解析する手法を提案した。

2年目には、地下水の季節変化について、同位体と一般水質の両者を用いた解析を行い、両者を組み合わせることが汚染機構解析に有効であることを示した。また、ネパールのカトマンズ盆地地下水の微生物汚染について、大腸菌濃度と硝酸イオンの同位体比とに關係が見られること、雨季の水文過程が大腸菌濃度を高めていること、下水流入の影響が下水設備からの距離に依存していることを明らかにした。

3年目には、この年までに複数年継続した調査の結果を総合・整理し、糞便汚染指標微生物、安定同位体比、溶存化学成分等の多角的指標により、浸透現象と地下水微生物汚染との關係を解析できることを示した。

これらの2年半の研究成果を通じて、水源地下水の汚染機構に関して、水と窒素化合物の同位体を用いた解析法を開発し、同位体指標と汚染微生物指標の關係を解明でき、下水浸透の影響の解析手法の開発ができた。

下記の図-1は、成果の一例として、地下水のNO₃-N濃度が変化するにつれて、Nの同位体比も変化することを示した図である。

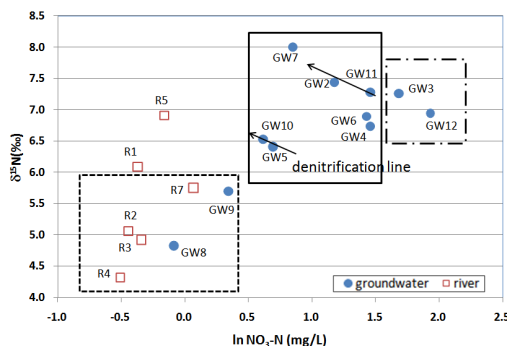


図-1 地下水の硝酸イオンの濃度と同位体比

3) 自然由来と人間由来の判別に役立つ微生物指標の開発

植物にとっての病原微生物を指標とする研究では、病原微生物を森林・農地という土地利用の異なる流域からの微生物負荷の解析に役立てることを目指して、1年目には、河川水試料から効率良くDNAを抽出できる方法を、種々の条件による抽出結果の比較により検討し、化学的溶菌法に基づいたDNA抽出試薬であるCellEaseの使用が効果的であることを見出した。

2年目には、農地が流域全体の0-3%となる溪流河川を対象に、森林域河川の微生物群集解析を行った。その結果、各微生物種の分布率を用いたクラスター分析の結果と硝酸イオンの同位体比との対応を見だし、微生物群集解析と同位体分析を組み合わせることで、土地利用状況だけでは把握できない農地等からの微生物流出プロセスの推定が可能であることを示した。

3年目には、溪流河川水から抽出したDNAをターゲットとし、PCR法により、山梨県内の農地からの流出の指標となりうるモモの植物病原菌の一種を検出した。また、細菌の遺伝子レベルの特徴と硝酸イオンの同位体比との關係を見出した。

植物の近傍での微生物の変化を調べる研究では、1年目には、水耕栽培植生系の微生物動態の解析として、水生植物4種(ヨシ、ミソハギ、キショウブ、ホタルイ)の根圏微生物群集の解析を行い、すべての植物間で根圏に生息する微生物の群集構造が異なることを明らかにするとともに、それらの多くは系統的に新規な微生物で構成されることを示した。

2年目には、季節により根圏に分布する微生物群集に変化が見られるかどうかを、公園内人工池のウキクサを対象に、遺伝子レベル(T-RFLP法)で解析し、微生物種の数と分布率を用いたクラスター分析により8月(夏)と10月(秋)とで微生物群集が異なることを示した。

3年目には、ウキクサを対象に、葉圏と根圏の微生物解析を行い、根圏と葉圏では微生物群集が異なること、葉圏にも根圏と同様に分解菌が生息することなど、流出解析に役立つ植物関連微生物の特徴を明らかにした。

これらの2年半の研究成果を通じて、水源汚染機構の解析に役立つ新たな微生物指標に関して、DNAを用いた解析手法の開発、農地からの流出の影響の解析に役立つ微生物群集解析手法の開発、流出解析に役立つ植物関連微生物としての根圏微生物群集の特徴・動態の解明を行った。

下記の図-2は、成果の一例として、流域の土地利用で農地が多いか少ないかによって河川水の微生物が異なることを示した図である。

御勅使川扇状地に流入する溪流河川に分布する微生物群集

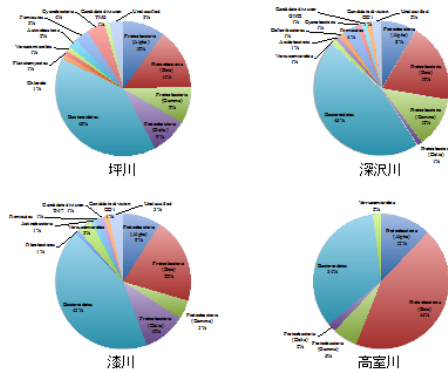


図-2 土地利用の異なる河川の微生物群集構造

また、図-3は、微生物の種類によって河川を分類すると、その分類結果は、Nの同位体比による分類結果と一致することを示した図である。

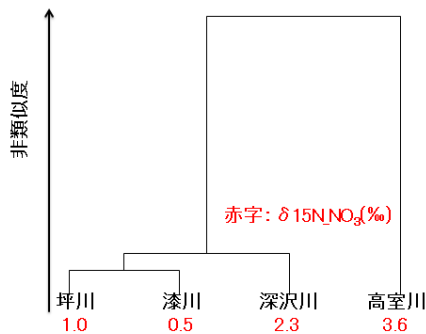


図-3 微生物群集構造のクラスター分析結果と同位体比

4)まとめと課題

本研究により、水資源の安全性評価のための次世代水質水文指標について、貴重なデータを得ることができ、新たな発見も生まれ、指標の測定方法や指標間の関係などの基礎的部分の研究・開発はできた。しかし、自然を相手にする研究のため、さらに多様な流域での長い期間の調査により種々のデータを蓄積することと、種々のデータを水文学の視点で統合・整理することが課題となる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

1) Risky Ayu Kristanti, Tadashi Toyama, Tony Hadibarata, Yasuhiro Tanaka, Kazuhiro Mori (2014), Sustainable Removal of Nitrophenols by Rhizoremediation Using Four Strains of

Bacteria and Giant Duckweed (*Spirodela polyrhiza*). *Water, Air, & Soil Pollution* 225, 1928 (査読有)

2) Risky Ayu Kristanti, Tadashi Toyama, Tony Hadibarata, Yasuhiro Tanaka and Kazuhiro Mori (2014), Bioaugmentation involving a bacterial consortium isolated from the rhizosphere of *Spirodela polyrhiza* for treating water contaminated with a mixture of four nitrophenol isomers. *RSC Advances* 4, 1616-1621. (査読有)

3) Yan LI, Tadashi TOYAMA, Takeshi FURUYA, Kaiji IWANAGA, Yasuhiro TANAKA, Kazuhiro MORI (2014) Sustainable Biodegradation of Bisphenol A by *Spirodela polyrhiza* in Association with *Novosphingobium* sp. FID3. *Journal of Water and Environment Technology* 12, 43-54. (査読有)

4) Salina SHRESTHA, Sadhana S. MALLA, Yoko AIHARA, Naoki KONDO and Kei NISHIDA (2013), Water quality at supply source and point of use in the Kathmandu Valley *Journal of Water Environment Technology* Vol.11(4), 331-340 (査読有)

5) Wijayanti, Y., Nakamura T., Nishida K., Haramoto E. and Sakamoto Y. (2013), Seasonal differences and source estimation of groundwater nitrate contamination, *Journal of Water Environment Technology*, Vol.11(3), 163-174 (査読有)

6) Wijayanti, Y., Nakamura T., Nishida K., Haramoto E. and Sakamoto Y. (2013), Groundwater nitrate contamination in small agriculture area: assessing the source and process using isotopes and ions., *Journal of Japan Society of Civil Engineering, Ser.B1 (Hydraulic Engineering)*, Vol.69, No.4, I_217-I_222 (査読有)

7) Y. Tanaka, H. Tamaki, H. Matsuzawa, M. Nigaya, K. Mori and Y. Kamagata (2012), Microbial community analysis in the roots of aquatic plants and isolation of novel microbes including an organism of the candidate phylum OP10, *Microbes and Environments*, 27, 149-157 (査読有)

8) Y. Tanaka, K. Nishida, T. Nakamura, S. K. Chapagain, D. Inoue, K. Sei, K. Mori, Y. Sakamoto and F. Kazama (2012), Characterization of microbial communities distributed in the groundwater pumped from deep tube wells in the Kathmandu Valley in Nepal, *Journal of Water and Health*, 10, 170-180 (査読有)

9) Yureana WIJAYANTI, Takashi NAKAMURA, Kei NISHIDA, Eiji HARAMOTO and Yasushi SAKAMOTO (2012), IDENTIFICATION OF GROUNDWATER RECHARGE AND NITRATE POLLUTION IN THE KANEGAWA ALLUVIAL FAN OF

THE KOFU BASIN, JAPAN, USING STABLE ISOTOPES AND IONS, Journal of Japan Society of Civil Engineers, Ser.B1 (Hydraulic Engineering), Vol. 68,199-204 (査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1)古屋崇志, 渡辺亮, 原本英司, 岸田直裕, 籠田大介, 荒井勉, 北島正章, 秋葉道宏、河川水中における健康関連微生物の濃度変動調査、第 47 回日本水環境学会年会,2013 年 03 月 13 日大阪工業大学(大阪府)
- 2) Shimura S., Malla S. S., Sakamoto A., Nakamura T., Tanaka Y., Matsuzawa H., Haramoto E., Kondo N., Kazama F., Sakamoto Y., Inoue D., Sei K., Nishida K., Analyzing faecal contamination of shallow groundwater in the Kathmandu Valley, Nepal, The Water and Environmental Technology Conference, 2012 年 06 月 30 日東京大学(東京都)
- 3)高瀬晶弘, 田中靖浩, 松澤宏朗, 西田継, 井上大介, 清和成, 中村高志, 森一博, 坂本康, 風間ふたば、カトマンズ盆地の地下水中に分布する微生物群集の解析、第 46 回日本水環境学会、2012 年 3 月 14 日～16 日、東洋大学(東京都)

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂本 康 (SAKAMOTO, Yasushi)
山梨大学・医学工学総合研究部・教授
研究者番号：8 0 1 2 6 6 4 8

(2)研究分担者

西田 継 (NISHIDA, Kei)
山梨大学・医学工学総合研究部・准教授
研究者番号：7 0 2 9 3 4 3 8

森 一博 (MORI, Kazuhiro)
山梨大学・医学工学総合研究部・准教授
研究者番号：9 0 2 9 4 0 4 0

石平 博 (ISHIDAIRA, Hiroshi)
山梨大学・医学工学総合研究部・准教授
研究者番号：8 0 2 9 3 4 3 9

田中 靖浩 (TANAKA, Yasuhiro)
山梨大学・医学工学総合研究部・助教
研究者番号：5 0 3 7 7 5 8 7

原本 英司 (HARAMOTO, Eiji)
山梨大学・医学工学総合研究部・助教
研究者番号：0 0 4 0 1 1 4 1

(3)連携研究者

なし