

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06231

研究課題名(和文)微生物情報・同位体情報による応用水文学の展開のための基礎研究

研究課題名(英文)Fundamental researches for development of the applied hydrology by the microbe information and the isotope information

研究代表者

坂本 康 (SAKAMOTO, Yasushi)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：80126648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：水文学を新しい分野に展開するために、実際の流域水文流出過程の環境水について、微生物指標の測定方法・解析方法の検討、微生物指標および同位体指標のデータの蓄積とその解析を行った。対象は、(1) 土壌浸透水での微生物指標、(2) 河川水での微生物指標、(3) 地下水での同位体指標、(4) 地下水での微生物指標である。その結果、農法による病原性微生物群分布率の相違、大腸菌の土壌浸透特性、河川水・地下水での病原微生物の存在特性、地下水での同位体比の存在特性と硝酸性窒素との関係、および、これらの測定に適した方法などを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：As fundamental researches for development of the applied hydrology, waters from several hydrological processes were examined for their microbe information and the isotope information. Targets are (1) microbiological index of soil penetration water, (2) microbiological index of river water, (3) isotope index of groundwater, and (4) microbiological index of groundwater. Results showed the difference in pathogenic germ group distribution dependent on agricultural methods, the transport characteristics of Escherichia coli through soil, the existence characteristics of the pathogenic microbe in river water and groundwater, the existence characteristics of the groundwater isotope relating to nitrate and methods suitable for these measurements.

研究分野：水工学、水環境学

キーワード：水文指標 微生物指標 同位体比 地下水汚染

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初の背景には、量のみを扱う水文学の限界、水質を水文学に取り入れる既存研究の限界が、水文学の活用範囲の拡大を妨げているという認識があった。については、水道・農業水質、地球温暖化の水環境への影響など今後ますます重要になる水資源保全の観点での活用を妨げており、については、観測不能な地圏での動態解析という観点での活用を妨げている。以上の限界に対し、応用水文学をより広く展開するために、次世代水情報として有力と考えた微生物情報と同位体情報を取りあげた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、水文学を新しい分野に展開するために、微生物情報・同位体情報を水文学に取り入れることがどの程度有効か、およびその限界を明らかにすることである。水道、農業・畜産分野などで重要な微生物の移動解析への展開、微生物情報・同位体情報の水文解析への展開の可能性を探り、水文学を新しい課題へ展開するための知見を得る。これらの情報は水文学・水工学以外の分野では決して新しいものではないが、水文・水資源学分野での利用のためには、あらためて基礎的なことから一つずつ確かめていく必要がある。

3. 研究の方法

研究は、微生物指標の測定方法・解析方法の検討、実際の流域の水での微生物指標および同位体指標のデータの蓄積とその解析という手順で行った。対象とした水は、河川水、地下水、およびこれらの涵養水となる土壤浸透水である。以下、本報告書では、本研究の趣旨に沿って行った各種の研究を、(1) 土壤浸透水での微生物指標、(2) 河川水での微生物指標、(3) 地下水での同位体指標、(4) 地下水での微生物指標という、4つのカテゴリーについて整理して述べる。

4. 研究成果

以下では、4つのカテゴリーについて、それぞれの成果を述べる。あわせて、1) 微生物情報・同位体情報を水文学研究に利用するメリット、利用してみようという人のための研究アイデア、および2) 微生物情報・同位体情報を使う場合の測定法・解析方法の注意点などについてのコメントも付記する。

(1) 土壤浸透水での微生物指標

農地での微生物の土壤浸透

土地の農業利用に関する微生物指標を想定して、山梨県総合農業技術センター内ライシメータを用いて、有機農法(植物を鋤き込む緑肥法)および慣行農法の農地からそれぞれ採取した土壌と浸透水の微生物相を培養法と非培養法(遺伝子情報)で解析し、比較した。培養法では、土壌は平板培養法を用い、

土壌浸透水はコリラート法を用いた。非培養法では、土壌および土壌浸透水からのDNA抽出液を用いてリアルタイムPCRにより16S rRNA濃度を定量した。また、次世代シーケンス解析を外注し、微生物の種類とその分布率も得た。その結果、指標となりうる47種の病原性細菌(植物病原菌:8種、動物病原菌:39種)の全細菌に対する分布率は浸透水の方が土壌よりも大きいこと、図1-1のように微生物属のShannonの多様度指数は慣行農法区(化学肥料区)より有機農法区(ヘアリーベッチ区)において高いことが分かった。

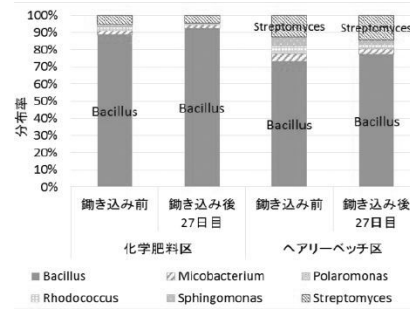


図1-1 非培養法における病原性微生物群分布率

次に、浸透現象を支配している土壌の物理特性が土壌微生物相に与える影響を調べるために、河川近傍と雑木林内の2つの土壌を用いて、土壌と浸透水の微生物相の違いを検討した。微生物測定には、1%土壌懸濁水、および飽和状態の土壌から遠心分離機で回転速度を段階的に変えて取り出した土壌水を用いた。その結果、大腸菌K12株溶液(濃度 5.6×10^7 CFU/mL)を添加した飽和土壌では、図1-2のように、大きなpFに相当する遠心力を用いると、土壌からより多くの大腸菌が除去できることを示せた。

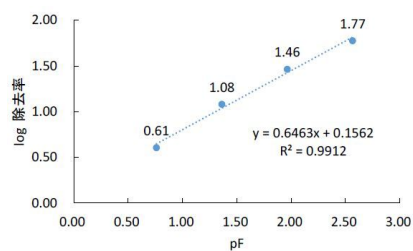


図1-2 大腸菌の除去率

実験室での大腸菌の土壤浸透

土壌浸透水の微生物指標を検討する基礎実験として、大腸菌について、定水位土壌浸透・流出実験を行った。大腸菌量の測定には、培養計数法、吸光度法、遺伝子測定法の三つの方法を用いた。その結果、大腸菌の土壌中での蓄積と溶出により、図1-3のような浸透量の増減が起こること、この変化には温度と栄養物の影響が大きいこと、図1-4のように、流出大腸菌の測定結果(流入大腸菌に対する比率)が、土壌中での微生物現象を反映して、測定方法により異なることを示した。また、

3つの方法を用いることで、水文学的に微生物浸透を評価する実験方法も整理できた。

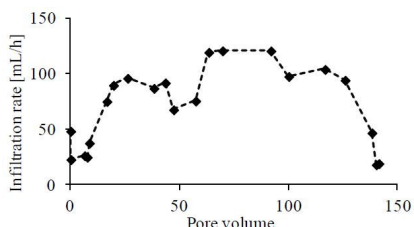


図 1-3 大腸菌の蓄積・溶出による流出水量変化

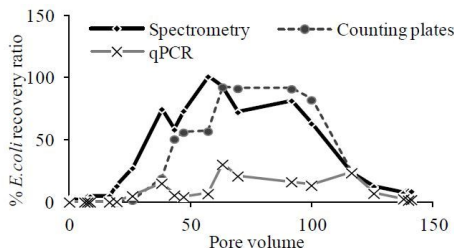


図 1-4 測定法ごとの流出大腸菌量変化

(コメント)

- ・同じ作物を生育している農地でも、農法によって浸透水の微生物群集が異なることから、農地と森林などでの相違はさらに大きく、微生物指標が土地利用毎の水質指標となりうる可能性がある。
- ・土壌水はどのような pF に相当する水かによって微生物量が異なる。このことから、大きさなどの特性の異なる複数の微生物を、異なる空隙を流れる水の微生物指標として使える可能性がある。
- ・途上国では、管理の不十分な下水管や廃棄物埋立処分場から地下水に微生物が浸透することによって起こる汚染が存在する。水文解析でそのような問題を扱うときには、1)微生物の活動により浸透水量が時間的に大きく上下すること、2)微生物そのものだけでなく、微生物の棲息環境として微生物と一緒に移動する有機物等を考慮する必要があること、3)水温の高い下水・廃棄物浸出水などでは水温影響が重要になることに留意する必要がある。
- ・微生物の測定方法は複数あるが、それらを組み合わせることで、土壌中で起こっている微生物反応、増殖と死滅とその浸透量への影響を検討できる可能性がある。一方、微生物の土壌浸透の実験・解析では、どういった測定法によるのかに注意を払う必要がある。

(2) 河川水での微生物指標

表流水を水道水源とするときへの水文学の活用を想定して、河川水中の大腸菌と大腸菌群の測定法の適用性を比較した。山梨県内において採水した河川水 64 試料を、クロモカルト・コリフォーム培地法 (Merck Millipore) とコリラート法 (Idexx Laboratories) の 2 種類の測定法に供した。図 2-1 に示すように、両測定法による大腸菌

の濃度には高い相関 (相関係数 0.630) が認められたが、64 試料中 50 試料 (78%) においてクロモカルト・コリフォーム培地法よりもコリラート法の方が高い濃度を示していた。この原因として、クロモカルト・コリフォーム培地法ではコロニーの形成が十分ではなく、大腸菌群のコロニーとの判別が難しい場合があるために過小評価されている可能性や、コリラート法の方が環境試料中の大腸菌の増殖に適している可能性等が考えられる。コリラート法で大腸菌陽性と判定された QT トレイウェルの一部に対し、リアルタイム PCR 法によって大腸菌 DNA を検出した結果、大部分のウェルは陽性であり、偽陽性率は高くはなかった。

また、細菌指標に加えて、ウイルス指標を用いることの有効性を検討するために、ヒト糞便中に高濃度で排出されるトウガラシ微斑ウイルスの検出を、リアルタイム PCR を用いて試みた。人為汚染のない河川源流域におけるトウガラシ微斑ウイルスの陽性率は 33% (3/9) と低く、野生動物の糞便に由来している可能性が示唆された。一方、浄化槽排水を受容する山間部の河川や、下水処理水を受容する都市河川における陽性率は 100% (54/54) となり、特に上流に下水処理場が立地する地点において濃度が高い傾向にあった。

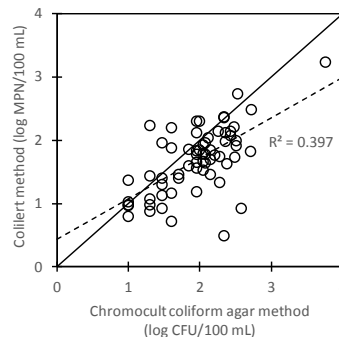


図 2-1 クロモカルト・コリフォーム培地法とコリラート法による河川水中の大腸菌濃度の比較

(コメント)

- ・大腸菌の測定では、コリラート法がクロモカルト・コリフォーム培地法に比べて操作が簡便である。このため、コリラート法で測定した大腸菌を、水文学研究の微生物指標として取り入れることは比較的容易であると期待される。ただし、クロモカルト・コリフォーム培地法との相関や偽陽性率は研究対象とする流域によって異なる可能性があるため、実際の適用に先立って十分な検討を行うことが望まれる。
- ・本研究により、細菌指標のみならず、ウイルス指標も流域の特性を強く反映して河川水中に存在していることが示唆された。この存在濃度データに微生物の水中での減衰や、流量等の水文データを組み合わせることで、河川水の微生物汚染を予測できるようになることが期待される。

(3) 地下水での同位体指標

ネパール・カトマンズ盆地内において、2016年の乾季および雨季の広域調査により採取した浅層地下水の水の水素および酸素安定同位体比ならびに硝酸イオン中の窒素および酸素安定同位体比のデータを用い、地下水涵養源と窒素汚染プロセスおよび地下水中における窒素動態の解析を実施した。

水の水素および酸素安定同位体比の分布から、浅層地下水は主にその地域にもたらされた降水の浸透により形成されていると考えられた。ただし、盆地内の主要河川の近傍に位置する井戸から採取された地下水については、別途行った溶存イオン濃度の解析により、河川水との交流が示唆された。

カトマンズ盆地の全域にわたり、浅層地下水の著しい窒素汚染を確認した。硝酸イオンの窒素および酸素安定同位体比を解析したところ、硝酸イオンによる汚染の原因としては、下水漏洩と、この地域に分布する湖底堆積物（旧カトマンズ湖堆積物）のどちらの可能性も残された。同時に、これらの硝酸イオンについては、帯水層中で脱窒反応により自然浄化されている傾向も確認できた。

以上のように、浅層地下水の硝酸イオン濃度と安定同位体比を詳細に解析した結果、硝酸イオンは人為由来と自然由来の異なる窒素負荷源で発生し、水文学的な条件が支配する移流・拡散と、生物地球化学的な条件が支配する窒素代謝（硝化・脱窒）の影響を複合的に受けながら、その濃度と同位体比が時空間的に変動していると考えられた。

(コメント)

- ・地下水の起源、河川水との交流を検討するときには、水の水素および酸素安定同位体比指標と一般水質指標をあわせた水文解析が必要と考えられる。
- ・地下水の硝酸イオン汚染の水文解析では、起源、窒素代謝に加え、窒素代謝を支配する土壌の諸条件を解析することが望まれる。

(4) 地下水での微生物指標

水文微生物指標の候補として、病原微生物による地下水汚染が深刻なカトマンズ盆地で採取した水試料（浅層・深層地下水、湧水および河川水）中における病原細菌の汚染実態を解析した。その結果、細菌 16S rRNA 遺伝子を対象とした次世代シーケンシング解析により、2014年に採取した16試料と2015年に採取した15試料から、それぞれ525属、444属の細菌が同定され、そのうち81属および86属はヒトへの病原性を有する種を含んでいた（推定病原細菌）。*Acinetobacter* 属や *Arcobacter* 属、*Clostridium* 属、*Flavobacterium* 属および *Pseudomonas* 属に含まれる病原性細菌種が多く、水試料から検出され、これらの病原細菌による感染症がカトマンズ盆地において流行し、地下水への浸透汚染が生じていることが示唆された。

これらのうち、検出率の高かった *Acinetobacter* 属と *Arcobacter* 属に対し、リアルタイム PCR 法を用いてカトマンズ盆地全域で採取した地下水をはじめとする水試料中の汚染状況を調査した。表 4-1 に示すように、*Acinetobacter* 属の多剤耐性遺伝子である *bla*_{OXA23} 様遺伝子は 2014 年に採取した 37 試料中 13 試料（35%）から検出された。*Arcobacter* 属に対しては、既存の種を幅広く検出可能なリアルタイム PCR 用（SYBR Green 系）の特異プライマーを新たに設計し、それを用いることで、2015 年に採取した 48 試料中 13 試料（27%）から 16S rRNA 遺伝子を検出することに成功した。さらに、*Arcobacter* 属の主要な病原遺伝子である *ciaB* 遺伝子を検出対象としたリアルタイム PCR 法により、48 試料中 10 試料（21%）が陽性となり、これら 10 試料はすべて 16S rRNA 遺伝子に対しても陽性であった。

試料別では、多剤耐性 *Acinetobacter* 属（39%、9/23）病原性 *Arcobacter* 属（32%、9/28）共に丸井戸から高い陽性率で検出され、浅層地下水を汚染している重要な病原細菌であることが明らかとなった。また、河川水からは 10⁷ copies/L 以上の高濃度で検出されていたことから、河川水から地下水への病原細菌の混入も生じていることが示唆された。

表 4-1 カトマンズ盆地の水試料からの *Acinetobacter* 属と *Arcobacter* 属の検出結果

水試料	陽性試料数/測定試料数		
	<i>Acinetobacter</i> 属 (<i>bla</i> _{OXA23} 様 遺伝子)	16S rRNA 遺伝子	<i>ciaB</i> 遺伝子
浅層地下水 (丸井戸)	9/23	11/28	9/28
浅層地下水 (掘抜井戸)	0/1	0/6	0/6
深層地下水 (掘抜井戸)	1/5	1/5	0/5
公共水場	1/3	0/5	0/5
湧水	0/3	0/3	0/3
河川水	2/2	1/1	1/1
計	13/37	13/48	10/48

(コメント)

- ・本研究で対象とした病原細菌は、現行の細菌指標である大腸菌とは異なる挙動を示していた。このことから、1) 水環境指標としてこれらの病原細菌自体を検出することと、2) 複数の微生物を検出対象とし、それらの微生物指標の関係の検討により、水の起源やその水文学的・微生物学的挙動を明らかにすることが、ともに重要であることが考えられる。

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 2件)

Luis ALFARO1, Eiji HARAMOTO and Yasushi SAKAMOTO, LABORATORY-SCALE EXPERIMENT MEASURING ESCHERICHIA COLI INFILTRATION IN SATURATED SOIL COLUMNS, Journal of Japan Society of Civil Engineers, Ser.B1 (Hydraulic Engineering), 査読有、 Vol.74, No.4, pp.(I-31)-(I-36), Feb.20, 2018

Rajani Ghaju Shrestha, Yasuhiro Tanaka, Bikash Malla, Dinesh Bhandari, Sarmila Tandukar, Daisuke Inoue, Kazunari Sei, Jeevan B. Sherchand, and Eiji Haramoto. Next-generation sequencing identify-cation of pathogenic bacterial genes and their relationship with fecal indicator bacteria in different water sources in the Kathmandu Valley, Nepal, Science of the Total Environment, 査読有、 Vol.601-602, pp.278-284, December 2017

DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.05.105

〔学会発表〕(計 3件)

Rajani Ghaju Shrestha, Yasuhiro Tanaka, Bikash Malla, Sarmila Tandukar, Dinesh Bhandari, Daisuke Inoue, Kazunari Sei, Jeevan B. Sherchand, and Eiji Haramoto. Quantitative PCR detection of 16S rRNA and ciaB genes of Arcobacter spp. in human and animal fecal source samples in the Kathmandu Valley, Nepal. 5th International Young Researchers' Workshop on River Basin Environment and Management, p.81, Oct 28, 2017, Kuantan, Malaysia

Rajani Ghaju Shrestha, Yasuhiro Tanaka, Bikash Malla, Dinesh Bhandari, Sarmila Tandukar, Daisuke Inoue, Kazunari Sei, Jeevan B. Sherchand, and Eiji Haramoto. Development of a quantitative PCR assay for 16S rRNA gene of Arcobacter spp. and its application to different water sources in the Kathmandu Valley, Nepal, ASM Microbe 2017, Poster No. 744, June 2, 2017, New Orleans, Louisiana, USA

Rajani Ghaju Shrestha, Yasuhiro Tanaka, Bikash Malla (UY), Dinesh Bhandari, Sarmila Tandukar (TU-IOM), Daisuke Inoue, Kazunari Sei (Kitasato Univ), Jeevan B. Sherchand (TU-IOM), Eiji Haramoto (UY), Characterization of bacterial community by next generation sequencing in different sources of water in the Kathmandu Valley, Nepal、 Water and Environment Technology Conference 2016、 2016.08.28.

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂本 康 (SAKAMOTO, Yasushi)
山梨大学・大学院総合研究部・教授
研究者番号：80112264

(2)研究分担者

西田 継 (NISHIDA, Kei)
山梨大学・大学院総合研究部・教授
研究者番号：70293438

原本 英司 (HARAMOTO, Eiji)
山梨大学・大学院総合研究部・准教授
研究者番号：00401141

田中 靖浩 (TANAKA, Yasuhiro)
山梨大学・大学院総合研究部・准教授
研究者番号：50377587