

平成22年 5月26日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19360221
 研究課題名（和文） 水源汚染リスク評価のための微生物水文学的手法の開発
 研究課題名（英文） Development of Bio-Hydrological Methods for Risk Assessment of Supply Water Pollution
 研究代表者
 坂本 康（SAKAMOTO YASUSHI）
 山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授
 研究者番号：80126648

研究成果の概要（和文）：アジア諸国などの途上国では、水源の病原微生物による汚染が一般的に起こっている。この問題を解決するためには、水の移動を扱う水文学に、微生物汚染を評価する方法を取り入れた「汚染リスク評価のための微生物水文学的手法」の開発が必要である。そこで、微生物汚染を評価・解析する手法を開発し、汚染源になりうる廃棄物層や河川・地下水に適用した。その結果、汚染の現状が明らかとなり、手法の有効性が確認できた。

研究成果の概要（英文）：In the developing country in Asian nations etc. , drinking water pollution by the pathogenic microbe has been happening generally. To solve this problem, it is necessary to develop “Bio-Hydrological Methods for Risk Assessment of Supply Water Pollution” that introduce assessment technique for microbial contamination into the hydrology that treats the movement of water. Therefore, the technique for the evaluation and analysis of the microbial contamination was developed and applied to the solid waste layer that was a potential polluter, the river water and the groundwater. The results showed the current state of pollution and the effectiveness of the technique.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
総計	11,500,000	3,450,000	14,950,000

研究分野：水質水文学

科研費の分科・細目：土木工学・水工学

キーワード：水源汚染リスク、微生物水文学、大腸菌、環境分析、土木環境システム

1. 研究開始当初の背景

アジアでは現在も安全な飲み水を手でできる人は限られており、水系伝染病、水道水源汚染などの人間の健康に関する課題が最優先課題であるといえる。たとえば、カンボジアでは5歳未満児死亡率は12%（日本は

0.4%、1999年）になっており、その原因の一つである水源汚染問題は重要といえる。一方、途上国で病気から人命を守るためには、資金・時間・人材というリソースをどのように配分するかが、先進国以上にクリティカルな課題といえる。日本の援助計画がこの点で

不十分なことは従来から指摘されている。この現状は、一部には政治的背景にもよるが、大部分は総合的リスク評価の科学的な基盤が確立されていないことによる。特に水源汚染対策については、水の移動の把握が不十分なために、水源汚染リスクアセスメントに必要な「病原微生物や化学物質による水源汚染の可能性を評価するための効果的曝露アセスメント手法」が確立していないことが問題である。そこで、本研究は「水文学に基盤を置く水源汚染リスクの評価」を可能にするための知見を得ることを目的とした。

2. 研究の目的

応用水文学の分野で「水源汚染リスク評価のための水質水文学」の研究基盤を形成することを最終目標として、「微生物水文学的手法」の開発に必要な基礎的な知見として、1) 廃棄物層からの微生物流出、2) 河川での微生物流下の解析とモデル化、3) 河川水の微生物汚染、4) 地下水の微生物汚染に関する新たな知見を得ることを研究目的とした。

3. 研究の方法

本研究で行ったサブ課題の主な方法・手法を課題名の後に記す。

(1) 廃棄物層からの微生物流出

酸素利用速度 (OUR) と硝酸還元速度 (NUR) の比及び水質成分濃度の解析、降雨時・晴天時の浸出水のキノプロファイル解析などにより研究を行った。

(2) 河川での微生物流下の解析とモデル化

降雨時の水文観測、モデル微生物 (大腸菌) と浮遊粒子の流出観測、1次元河道内輸送モデルなどにより研究を行った。

(3) 河川水の微生物汚染

河川水の水質観測、レジオネラ属菌の計測、F-DNA フェージの検出と同定などにより研究を行った。

(4) 地下水の微生物汚染

地下水の水文・水質データ解析、DNA 抽出及びリアルタイム PCR による測定、微生物群集構造解析などにより研究を行った。

4. 研究成果

各サブ課題についての主な成果は下記である。

(1) 廃棄物層からの微生物流出

水源原水に対する微生物汚染の汚染源として、廃棄物埋立処分場が考えられる。そこで、処分場の廃棄物層からの微生物流出が、処分場の経過年数によりどう変化するかを検討した。埋立開始後の経過年数が3年~28年と異なる7ヶ所の一般廃棄物処分場において、浸出水中に含まれる微生物群の酸素利用

速度 (OUR)、硝酸還元速度 (NUR) を調べた。その結果、NUR/OUR 比によって大きく2つのグループに分類された。そこで、浸出水の一般水質の測定値も含めてクラスター解析を行ったところ、この比が低かった5ヶ所の処分場は、さらに2つのグループに分類された。すなわち、7ヶ所の処分場は、安定化の進行に応じて、合計3つのグループに分類された。次に、各処分場の浸出水中の微生物群集構造を評価するために、化学分析のみで定量が可能であり、実務者にも利用しやすいキノバイオマーカーを用いた。キノンは、微生物の電子伝達鎖に存在し、水素キャリアーとして機能する補酵素である。好気呼吸をする微生物群が持つユビキノ (Q-n)、嫌気呼吸をする微生物群が持つメナキノ (MK-n (HX)) に大別される。そして検出されたキノン種の構成割合、すなわち、キノプロファイルを調べることで、微生物群集構造を評価することができる。各グループの処分場について浸出水中のキノプロファイルの類似性に基づいて解析を行ったところ、各グループ毎にキノプロファイルは概ね類似しており、安定化の進行過程でキノプロファイルが変化する可能性が示された。また、Q-8、Q-9 を含有する微生物群は、安定化の進行に係わる重要な微生物群であることも見出された。

次に、ある一般廃棄物最終処分場の浸出水を雨天時、晴天時に連続的に採水し、キノンを解析することで、微生物群の流出量や組成の変動を調べた。その結果、晴天時では5日間にわたり4回調査を行ったが、キノンの流出量や組成には明らかな違いは認められなかった。一方、雨天時では、浸出水流量のピーク前後で、おもに Q-10 の流出が相対的に増加したことにより、キノン組成が明確に変化した。そして、流量のピークに遅れて、キノン流出量が著しく上昇した。粒子状成分には、Q-10 を含有する *Alphaproteobacteria* が相対的に多く吸着しており、それがこの間の流出に寄与していた可能性が考えられた。その後は、流量の減少にともない、降雨前の状態に近づいた。

これらの研究により、廃棄物処分場からの微生物汚染の評価にキノプロファイルが有効であること、廃棄物処分場の微生物リスクの評価には水についての流出解析と微生物解析、粒子状物質の流出解析を組み合わせることが必要であることが分かった。

(2) 河川での微生物流下の解析とモデル化

微生物汚染の基本的な原因を解明するため、自然環境に存在する微生物をモデルとし、河川を通じて拡散する微生物を正確に把握・予測するための基礎的知見を得ることを3年間にわたって行った。

2007年度は、河川中の微生物は土砂等の浮遊粒子と吸着関係を保ちながら流下するという過去の報告に注目し、洪水時に水文観測を行うとともに、上流から流出するモデル微生物（大腸菌）と浮遊粒子の流出の変化を観測した。その結果、洪水時の河川中大腸菌と懸濁粒子の濃度の非線形関係を得た。これは、水道原水中の微生物を管理するために濁度との線形関係を仮定してモニタリングすることの危うさを示唆している。さらに、大腸菌の浮遊粒子に対する吸着率は洪水規模と洪水ステージにより系統的に変化することを現地観測により初めて確認した。これは、従来の微生物流出計算で用いられている「吸着率一定」という仮定を「吸着率可変」という仮定に変更する必要があることを示唆している。

2008年度は、河川上流での野外観測データと室内での吸着実験データを用いて、大腸菌の1次元河道内輸送モデルの作成に着手した。まず大腸菌と浮遊粒子のそれぞれについて移流分散方程式に沈降/再懸濁項を加えた基礎構造を作成し、次に両者を吸着式で連結して定常流条件下での計算を行った。その結果、大腸菌と堆積物粒子との吸脱着関係および水中-河床間の移動過程を含む点で新規性が高く、従来よりも計算精度のよいモデルで、観測結果を再現することに成功した。この成功は、上述の吸着率可変という仮定を支持するものでもあった。また、モデル式中の各係数の感度を解析した結果、最大吸着量比と吸着係数は大腸菌のピーク濃度の計算結果に影響を及ぼすことが判明し、本モデルの実用的な適用範囲を抽出することができた。

2009年度は、上記モデルを非定常型に改良するのに必要な実測データを取得するため、さらに時間解像度を上げて洪水期間中の河川水を連続採水し、新たに、浮遊粒子吸着型と非吸着型の大腸菌を分別定量した。その結果、大腸菌の吸着率と吸着量が洪水期間中に時間単位で大きく変化すること、洪水流出が大規模であるほどそれらのピーク時期が早まることを初めて明らかにした。また、吸着量と流量の関係解析から、小粒径の浮遊粒子ほど大腸菌を吸着し易く、浮遊粒子の粒径分布と貯留量を把握することが大腸菌の動きを再現する上で重要であることを示した。

これらの研究により、微生物汚染の解析には水文流出解析とともに浮遊粒子の流出解析、浮遊粒子への吸着の評価も重要であることを示した。また、これらの研究を通じて、水文解析と微生物解析を合わせて行える極めて貴重かつ有益な実測データを獲得でき、今後、洪水期間の大腸菌河川流出モデルを完成させる準備が十分整ったといえる。

(3)河川水の微生物汚染

水系の微生物汚染を解析する手法の開発と環境水への適用のために、山梨県内の河川について、レジオネラ属菌及び大腸菌ファージを対象とした解析を行った。

レジオネラ属菌については、山梨県内河川の20地点で一般水質項目とともに調査し、20地点中4地点でレジオネラ属菌を検出し、検出率は20%であった。検出された菌数は、28から112CFU/100mLと公衆浴場において使用する水の水質基準である「10CFU/100mL未滿」を超えていた。また、レジオネラ属菌が検出された河川のBODは、2mg/L以下であり、比較的良好であった。レジオネラ属菌が検出された地点の第一鉄イオン濃度は、0.14~0.31mg/Lであった。検出されなかった地点における第一鉄イオン濃度は、0.12~0.75mg/Lの範囲であった。第一鉄イオンの測定を行った20地点中、0mg/Lの地点はなかった。第一鉄イオンはレジオネラの生育に不可欠な物質とされるが、第一鉄イオンは、どの地点においてもレジオネラ属菌の生育に必要な量は概ね足りており、他の条件が満たされれば、環境水中にレジオネラ属菌が生育してくる可能性が考えられる。検出されたレジオネラ属菌のうち3株は、*L. steigerwaltii*であった。

大腸菌ファージについては、F-RNAファージの群別判定がヒトと動物の糞便汚染を解析する上で有効な手法になりうるかどうかという視点で研究を行った。研究は、2009年10月~2010年1月に計9回採水した下水処理場の流入水と処理水、3地点の河川水（笛吹川、釜無川、富士川）を対象とした。ブラック法で形成したFファージのブラックを単離し、2種類のリアルタイムPCR検出系によってF-RNAファージの検出に供した。さらに、F-DNAファージの検出に供した。その結果、単離したFファージのブラック132株のうち、123株（93%）の種類を同定することに成功した。F-RNAファージは、下水処理場流入水からはヒト由来群（II、III群）のみが検出され、動物由来群（I、IV群）は検出されなかったのに対し、処理水からはヒト由来群よりも動物由来群の方が多く検出され、最終沈殿池への鳥類による糞便汚染などの可能性が示唆された。また、河川水中ではヒト由来群が優占しており、主にヒト由来の糞便汚染を受けていることが示唆された。

これらの研究を通じて、微生物の環境として一般水質も重要であること、遺伝子解析の手法が汚染源の種別判定に有効であることを示した。このことから、潜在的汚染源（住宅系、農業系、畜産系など）毎に流出解析を行い、かつこの流出解析によって一般水質を説明できれば、水源の微生物汚染リスクの解析にも非常に役立つことが考えられる。

(4) 地下水の微生物汚染

アジア諸国などの開発途上国では、日本とは異なり、地下水までも病原微生物によって汚染されている。しかも、地下水を飲み水として使っていることが多い。そこで、微生物汚染リスク解析のための地下水水文解析の課題を明らかにし、水文解析との結合が容易な新たな微生物指標の開発を目指して、カトマンズ盆地の井戸水を対象とした解析を行った。

まず、水文環境も考慮して、大腸菌汚染を検討した。その結果、カトマンズ盆地では対象井戸で飲用に適する井戸（大腸菌が未検出）は少なく、深井戸でも 29%の井戸しか飲用に適さなかったこと、深井戸水は N、P、F の濃度が高い特徴があり、Cl⁻濃度が高いほど大腸菌数が多い傾向はなかったが、NH₄-N 濃度が高いと大腸菌数が少なめという傾向は見られたことを示した。また、深井戸を F 濃度の高い井戸と NH₄-N 濃度の高い井戸のグループに分けると 2 グループとも大腸菌とイオン濃度との相関はほとんどないが、わずかに NO₂-N 濃度と大腸菌数とに弱い相関が見られたこと、井戸が深いほど大腸菌が少ないという傾向は見られなかったこと、2 グループそれぞれのイオン濃度の主成分では F 濃度の高いグループでは F、NH₄-N 濃度の高いグループでは PO₄-P に関する主成分の得点と大腸菌数との相関係数が比較的大きかったことを示した。この研究全体を通して、カトマンズ盆地の深井戸水の大腸菌を定量的に水文環境、他の水質濃度と関連付けることは非常に困難であることが分かった。そこで、新たな指標による検討をおこなった。

上記の解析によっては、汚染源の推定まではいたらなかったが、これは大腸菌というくくりで検討した微生物の中にもいろいろな種類があり、複数の汚染源の複数の種類の大腸菌による汚染の解析は困難であるためと考えられた。そのため、水文解析と結びつけるためにはより細かい区分のある微生物指標による検討が必要であると判断した。そこで、DNA による解析を試みることにした。しかし、環境試料から DNA を抽出する場合、試料によって抽出効率が異なり、複数の試料間でそれらに含まれる微生物数を、リアルタイム PCR 法等の DNA をベースとした検出・定量法（非培養法）で比較するのは困難であった。そこで、まず①DNA 抽出効率算出法の開発と糞便汚染指標微生物の検出・定量を行い、次に②地下水中に分布する微生物群集の解析を行った。

①では内部標準法の考え方による新しい DNA 抽出効率算出法を開発し、カトマンズ盆地の地下水 11 種の糞便汚染指標微生物（大腸菌および大腸菌群）の検出・定量試験に適用し、従来の培養法による測定値と比較した。

その結果、ほとんどの試料において「生きていないが培養できない状態（VBNC 状態）」の細菌も測定対象とする非培養法の方が培養法よりも高い濃度の値が得られた。一般に環境中で VBNC 状態となった病原性細菌も宿主の体内では病原性を発現することが知られている。従って、培養法で大腸菌がほとんど検出されない場合も、当該細菌による汚染の影響が起りうる場合もあり、培養法のみでの検査では水系伝染病のリスクを過小評価してしまう可能性が示された。ただし、大腸菌に関しては、非培養法では検出されず培養法では検出されるケースも見られたため、汚染評価法としては両方法を併用するのが最善であることが示唆された。

次に②では、Tamaki らの方法（AEM 71, 2162-2169 (2005)）に従い、16S rRNA 遺伝子クローンライブラリーを構築・解析した。その結果、カトマンズ盆地由来の地下水 6 種からコレラ菌やレジオネラ菌等病原性の高い細菌は検出されなかったものの、5 種の試料において日和見感染菌の一種であるアシネトバクター属細菌の存在が確認された。本属細菌の多くは多剤耐性であり、院内感染菌として近年、注意喚起がなされている。カトマンズにおいては、病院やホテルなどの公共機関において深井戸の水が利用されており、近年、AIDS 患者（免疫低下・不全者）が増加傾向にある等の状態にある。従って、今回得られた結果は病院での院内感染を含めたカトマンズにおける日和見感染症発生・蔓延の危険性を示すとともに、今後、水質汚染指標微生物の一つとして当該微生物をモニタリングすることが必要であることを示す。

これらの研究を通じて、地下水の水文解析・流動解析で得られる流動方向などと組み合わせ、汚染リスク解析を可能にする新たな微生物学的手法を提案することができた。

(5) まとめ

全体を通じての成果は下記である。

- ①有望な「微生物水文学的手法」として、微生物流下のモデル、キノン・プロフェイル解析、F-DNA フェージの検出と同定、リアルタイム PCR による測定、微生物群集構造解析などを示した。
- ②上記手法により、廃棄物浸出水、河川水、地下水を解析し、微生物汚染に関して、従来にない種々の新しい知見を得ることができた。
- ③水源の微生物汚染リスクの解析のためには、水文流出解析、粒子状物質の流出解析、一般水質解析、遺伝子解析などの結合が必要であることを示した。

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 6 件)

- ① Tamaki, H., Hanada, S., Sekiguchi, Y., Tanaka, Y. and Kamagata, Effect of gelling agent on colony formation in solid cultivation of microbial community in lake sediment, *Environmental Microbiology*, 査読有, 11, 2009, pp.1827-1834
- ② Mollah, K., Nishida, K., Kondo, N. and Yamagata, Z., Children's Health Deficits due to Diarrhoea: Effects of Water Supply and Sanitation in Slums with Different Water Logging Conditions, *Journal of Water Environment Technology*, 査読有, 7(4), 2009, pp. 277-291
- ③ Jing AO, Kei NISHIDA et al. Modelling Sediment-associated *Escherichia coli* in a Natural River: Comparison of the Reversible and Irreversible Adsorption, *Annual Journal of Hydraulic Engineering*, 査読有, 53, 2009, pp.187-192
- ④ 坂本康, 西田継ら, カトマンズ盆地の井戸水の大腸菌汚染の解析, 水工学論文集, 査読有, 53, 2009, pp.535-540
- ⑤ 中野克則, 平山けい子, 金子栄廣, 平山公明, 環境水中のレジオネラ属菌の調査, 平成 19 年度山梨県・山梨大学連携研究公開事業研究内容要旨集, 査読無, 2007, p. 59
- ⑥ 藤田昌史, 今井健太郎, 辻幸志, 坂本康, 一般廃棄物処分場の安定化指標としてのキノンバイオマーカーの有効性, 環境工学研究論文集, 査読有, 44, 2007, pp.499-504

[学会発表] (計 11 件)

- ① 小田切美希栄, 原本英司, 西田継, 坂本康, F 特異 RNA 大腸菌フェージを用いた甲府盆地の水環境中の人獣由来汚染の解析, 第 44 回日本水環境学会年会 2010 年, 3 月 17 日, 福岡大学
- ② 山田馨, 坂本明子, 田中靖浩, 原本英司, 坂本康, 西田継, ネパール・カトマンズ盆地の地下水における微生物群集の解析, 第 44 回日本水環境学会年会, 2010 年 3 月 15 日, 福岡大学
- ③ 田中靖浩, 田中一也, 玉木秀幸, 松澤宏朗, 鎌形洋一, 森一博, ウキクサ-微生物共培養法を用いた新規微生物資源の開拓, 日本水処理生物学会第 46 回大会, 2009 年 11 月 12 日, 高知工業高等専門学校
- ④ 松澤宏朗, 田中靖浩, 玉木秀幸, 鎌形洋一, 森一博, 水生植物根圏に生息する微生物群集の解析, 日本水処理生物学会第 46 回大会, 2009 年 11 月 12 日, 高知工業高等

専門学校

- ⑤ 田中靖浩, 森一博ら, ウキクサ-微生物共培養法を用いたミソハギ根圏からの新規微生物の分離培養, 日本農芸化学会 2009 年度大会, 2009 年 3 月 28 日, 福岡市
- ⑥ 田中靖浩, 森一博ら, 水生植物キシノウブおよびホタルイ根圏からの新規微生物の分離・培養, 日本農芸化学会 2009 年度大会, 2009 年 3 月 28 日, 福岡市
- ⑦ 田中靖浩, 森一博ら, 抽水性植物根圏に生息する微生物群集: Candidate division OP10 に属する菌株の分離・培養, 日本微生物生態学会第 24 回大会, 2008 年 11 月 26 日, 札幌市
- ⑧ 田中靖浩, 森一博ら, ウキクサ-微生物共培養法を用いた未分離・難培養性微生物の分離培養, 第 60 回日本生物工学会年次大会, 2008 年 8 月 28 日, 仙台市
- ⑨ 西田継ら, 河川源流域から流出する糞便汚染指標微生物と浮遊粒子の吸着関係の解析, 第 42 回日本水環境学会年会, 2008 年 3 月 18 日-21 日, 名古屋
- ⑩ 藤田昌史, 今井健太郎, 辻幸志, 坂本康, キノンバイオマーカーを用いた一般廃棄物処分場の安定化指標の構築, 第 18 回廃棄物学会研究発表会, 2007 年 11 月 21 日, つくば国際会議場
- ⑪ K. Nishida et al. Modelling sediment-associated *Escherichia coli* in a natural river: comparing reversible and irreversible adsorption processes, 14th International Symposium on Health-Related Water Microbiology, 2007 年 9 月 9 日-15 日, 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 康 (SAKAMOTO YASUSHI)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授
研究者番号: 80126648

(2) 研究分担者

西田 継 (NISHIDA KEI)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准教授
研究者番号: 70293438
森 一博 (MORI KAZUHIRO)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准教授
研究者番号: 90294040
田中 靖浩 (TANAKA YASUHIRO)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教
研究者番号: 50377587
原本 英司 (HARAMOTO EIJI)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・

助教

研究者番号：00401141

(H20→H21)

平山 けい子 (HIRAYAMA KEIKO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・

助教

研究者番号：40111778

(H19)

藤田 昌史 (FUJITA MASAFUMI)

茨城大学・工学部・准教授

研究者番号：60362084

(H19)

(3)連携研究者

なし