

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：27401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25550017

研究課題名(和文) 黄砂粒子に付着している微生物の定量分析同定法の確立

研究課題名(英文) Development of methods for quantifying bacteria on dust particles

研究代表者

張 代洲 (Zhang, Daizhou)

熊本県立大学・環境共生学部・教授

研究者番号：90322726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、黄砂を介した微生物の拡散を評価できるアプローチを構築し、黄砂に関わる微生物の調査を行った。九州西岸で計測した結果、空気中に1立米あたりおよそ1万～10万セルの総菌数が常に存在していたが、高気圧時において、総細菌の約83%が単体で浮遊し、その生存率は74%であった。低気圧の前線前には、総細菌の約56%が単体で浮遊し、その生存率は88%であった。一方、大陸性寒気団においては72%の細菌が浮遊粒子の表面に付着し、その生存率は50%以下であった。このような九州西岸地域における細菌の濃度と生存率の変動は低気圧/高気圧の通過に伴う大陸性気団の入れ替わりが左右していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：An approach to quantify the airborne bacteria long-distance transported with dust was developed and applied to the observation on the Kyushu western coast. Results showed that the concentration of airborne bacteria was approximately stable in the range of 10000～100000 cells per cubic meters but the viability differed largely under different weather conditions. Under high pressures, about 83% of bacteria were isolated from particles and their viability was about 74%. In the prefrontal air of low pressures, the ratio of isolated bacteria was about 56% and their viability was 88%. In contrast, in dry and cold continentally-originated air, 72% of bacteria were associated with dust particles and their viability was less than 50%. These results indicate the close dependence of airborne bacteria on the synoptic weather at the coastal areas of Kyushu where the weather was governed by the alternative passage of low and high pressures in the northern hemisphere westerly winds.

研究分野：大気環境学

キーワード：環境変動 大気現象 バイオエアロゾル 黄砂 浮遊微生物 東アジア 陸間移動 微生物生態系

1. 研究開始当初の背景

(1) 大気を介した微生物の拡散は、隔離された生態系のかげ橋として、地球規模での微生物の地理的分布の特徴の維持と変遷に重要な役割を担っていることが指摘されている。浮遊微生物は、黄砂粒子と共に氷晶の核として機能し、氷雲の形成に深く関わっており、気候変動に大きな影響を及ぼしていることが最近の研究で分かった。微生物は黄砂粒子に付着することで環境ストレスから守られ、その生存状態を長期間維持できることが室内実験の検証によって示唆された。しかし、大気中に漂っている黄砂ブルーム中の微生物の濃度や黄砂粒子への付着実態及びその生死状態に関する情報は、適切な分析手法がないため、著しく乏しい。現状では微生物の環境への機能や影響を正確に評価することがほぼ不可能である。

(2) 研究代表者は長年に渡り、個別粒子の分析方法を用いて東アジアの多数の観測地点において黄砂研究を行ってきた。また、過去数年間に浮遊粒子中の微生物の存在量・生存率を調査するための方法(LIVE/DEAD 染色計数法)を開発し、それを利用して世界で初めて黄砂中の微生物の生と死を判別し、それぞれの個数濃度の測定を可能にした(Hara et al., 2011; Hara and Zhang, 2012)。この方法を発展して、粒子表面に付着している微生物をターゲットとする染色計数と遺伝子配列解析の融合により、浮遊粒子の粒径別に微生物の数濃度と生存状態及び遺伝子特性を測定する方法を構築すれば、黄砂粒子に付着している微生物の濃度と生存状態及び遺伝子特性を試験的に求め、分析方法の有効性を検証することが可能となる。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、黄砂に関わる微生物の定量評価を目的とし、黄砂粒子への微生物付着の有無、微生物の数濃度と生死状態を測定できる染色計数法を開発する。また、黄砂粒子のみのサンプルを作り出し、遺伝子配列分析を用いて、その中に含まれる微生物の遺伝子特性を同定する。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、黄砂粒子の表面に付着し、空中に拡散している微生物を定量的に評価する方法を開発して試験観測を行う。LIVE/DEAD 染色計数法を用いて、粒径別に採集された黄砂粒子サンプル中の微生物の付着実態との生死状態を定量評価する方法を開発する。また、黄砂粒子のみと個別黄砂粒子のサンプルを作りだし、遺伝子配列解析により黄砂に付着している微生物の遺伝子特性を解明する。これらの技法を用いて、中国北西部砂漠地域及び天草西海岸において、試験的な調査を行い、黄砂に伴って東アジアの広範囲に拡散している微生物の実態とメカニズムの解明への応用を検証し、黄砂を介

して広域に拡散している微生物の定量分析に正確で効率的なアプローチを確立する。

4. 研究成果

(1) 方法の開発においては、LIVE/DEAD 染色計数法を用いて粒径別黄砂粒子のフィルターサンプル中の微生物の付着実態とその生死状態を定量評価する染色計数法を確立した。当初では透析式染色法と計画したが、染色液の透過性を検証した結果、市販品には適用のフィルターがなかった。そのため、粒径別の粒子サンプルをバッファー液に下して、染色計数を実現した。従来の透過式フィルターサンプル(トータル粒子サンプル)をコントロールとして微生物の総数とその生死状態を照り合わせて検証した結果、ほぼ一致したことが確認され(図 1)、バッファー液を利用して粒径別粒子サンプル中の微生物の染色と計数が充分可能であることを立証した(図 2)。

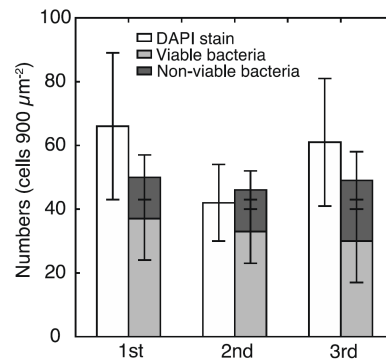


図 1 LIVE/DEAD 染色法と伝統的な DAPI 染色法による微生物検出率の比較

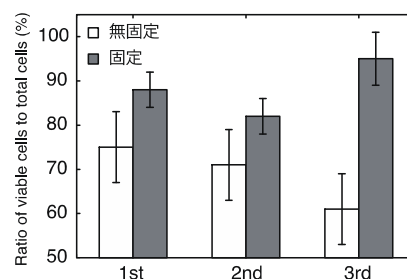


図 2 グルタルアルデヒドによる固定を使用したと使用しない微生物検出率の比較

(2) 上記の方法を利用して熊本市において熊本市内において試験調査を行った後、熊本県天草半島西岸、中国沿岸都市青島市、中国北西部テングリ砂漠において、黄砂などの浮遊粒子に関わる微生物の計測を行った。

(3) 高気圧・前線前・大陸性寒気団・高気圧接近の 4 つの天気パターンに分類し、浮遊粒子の粒径に対する生菌・死菌の分布を求めた。

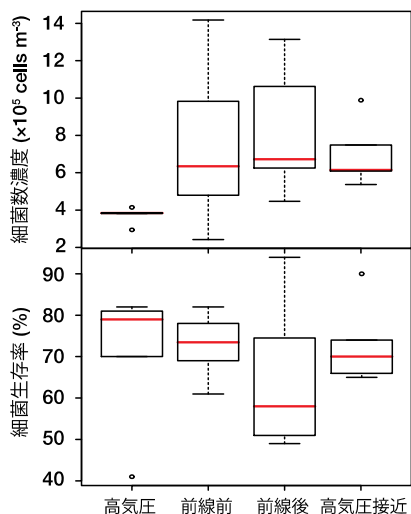


図 3 熊本市における観測された異なる天気条件の下に空中微生物の濃度と生存率

空気中にはおよそ $10^4 \sim 10^5$ cells m^{-3} の総菌数が常に存在していたが、高気圧において、総細菌の約 83% が単体で浮遊していると推察され、その生存率は 74% であった。また、前線前における総細菌の約 56% が単体で浮遊していると推察され、その生存率は 88% であった。一方、大陸性寒気団においては 72% の細菌が粒子状物質の表面に付着し、その生存率は 50% 以下であった。これらの結果から、高気圧や前線前においては、単体で浮遊している観測地周辺域由来の細菌、大陸性寒気団や高気圧接近時においては、粒子に付着して長距離輸送される細菌が主であることがわかった(図 3)。

(4) このような細菌濃度の変動は、より都市域である熊本市における観測でも得られており、九州西岸地域における細菌の生存率の

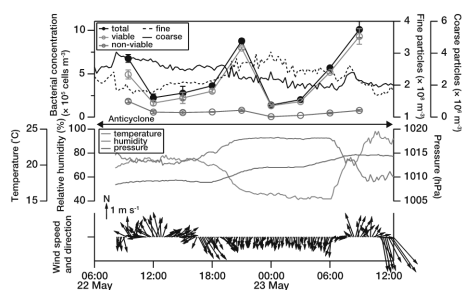


図 4 九州西岸において観測された海陸風の影響による生と死の空中バクテリアの濃度変動; 天気の変動と浮遊粒子の濃度も示している。

変化は低気圧 / 高気圧の通過に伴う大陸性気団の入れ替わりが左右していることが明らかになった。また、気団の動きが少ない高気圧時には沿岸域特有のローカルな気象現象である海陸風の形成が見られ(図 4)、この風の変化も細菌濃度の日変動に影響していることが示唆された。

< 引用文献 >

Kazutaka Hara, Daizhou Zhang, Maromu Yamada, Hiromi Matsusaki, Koji Arizono, A detection of airborne particles carrying viable bacteria in an urban atmosphere of Japan. *Asian Journal of Atmospheric Environment*, 5, 152-156, 2011.

Kazutak Hara, Daizhou Zhang, 2012 Bacterial abundance and viability in long-range transported dust. *Atmospheric Environment*, 47, 20-25, 2012.

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)

Kotaro Murata, Daizhou Zhang, Transport of bacterial cells toward the Pacific in Northern Hemisphere westerly winds. *Atmospheric Environment*, 査読有, 87, 2014, 138-145 DOI:10.1016/j.atmosenv.2013.12.038

Kazutaka Hara, Daizhou Zhang, Hiromi Matsusaki, Yasuhiro Sadanaga, Keisuke Ikeda, Sayuri hanaoka, Shiro Hatakeyama, UV-tolerant culturable bacteria in an Asian dust plume transported over the East China Sea. *Aerosol and Air Quality Research*, 査読有, 15, 2015, 591-599 DOI: 10.4209/aaqr.2014.03.0067

(学会発表)(計 3 件)

Daizhou Zhang, Kotaro Murata, and Kazutaka Hara, Bacterial Concentration and Viability Associated with Dust in Asian Continent Outflow at Southwestern Japan. 7th World Congress on Particle Technology, Beijing, May 19-22, 2014. (招待講演)

村田浩太郎, 瀬本大志, 向川萌, 安武里英, 張代洲, 異なる天気条件下のバイオエアロゾル濃度: 2012-2014 年春季の熊本西岸部における細菌数の観測. 日本気象学会 2014 年度秋季大会, 福岡市, 2014 年 10 月 21 日-23 日.

Kotaro Murata, Yuki Tsugehata, Ryutaro Matsuoka1, Rie Suzuki, and Daizhou Zhang, Airborne bacterial concentration on the western coast of Amakusa, Japan in spring 2012-2013. 2014 International Aerosol Conference, Busan, Aug.28-Sept.2, 2014.

(図書)(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

張 代洲 (Daizhou Zhang)
熊本県立大学・環境共生学部・教授
研究者番号：90322726

(2) 研究分担者

柿川 真紀子 (Makiko Kakikawa)
金沢大学学内共同利用施設等・助教
研究者番号：10359713

(3) 研究分担者

松崎 弘美 (Hiromi Matsusaki)
熊本県立大学環境共生学部・教授
研究者番号：30326491