

氏名	杉山 歩		
学位の種類	博 士 (環境学)		
学位記番号	博 甲 第 9495 号		
学位授与年月日	令和2年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	山地森林流域における地下水流動プロセスと微生物動態の関係		
主査	筑波大学教授	博士 (理学)	辻村 真貴
副査	筑波大学教授	博士 (農学)	野村 暢彦
副査	筑波大学教授	Ph.D.	浅沼 順
副査	筑波大学准教授	博士 (理学)	山中 勤

論 文 の 要 旨

本論文は、地下水流動系を明らかにするための新たなトレーサーとして環境中の微生物 DNA の有用性を検証することを大きな目的としたものである。既存の水文トレーサーは、地下水の涵養域や滞留時間を推定する上で有用であるが、地下水の流動経路に関する直接的な情報を得ることは難しい。また、水の混合等の過程により、履歴情報のシグナルが不明瞭になるという問題も存在する。一方で、微生物はあらゆる水圏環境に生息し、その分布が周辺環境と深く関係することから、地下水が流動過程においてどのような環境を通過してきたか、すなわち、地下水の流動経路について、検出された微生物の代謝様式や増殖条件をもとに評価できる可能性がある。しかしながら、地下水中の微生物動態と地下水流動プロセスの関係についての理解はいまだ十分とはいえない。そこで、著者は本論文において、水文プロセスに関わる基礎情報を取得可能な山地森林流域を対象に、環境中の微生物の時空間分布を評価し、地下水流動プロセスと微生物動態の関係を明らかにすることを目的とした。

著者は研究対象地域として、福島県伊達郡川俣町の森林小流域を選定した。流域面積は 0.045 km²、基盤地質は花崗岩類、地質構成は上部から表層土、強風化花崗岩、風化花崗岩である。対象地には計 7 本の観測井が設置されており、下流部に湧水が位置することから時空間的なデータの取得が可能な流域である。水文観測および環境パラメータの現地観測を行い、主要無機溶存成分、酸素・水素安定同位体比、六フッ化硫黄 (SF₆) 濃度、微生物数とその群集構成の解析を行った。Total direct counts (TDC) 法を用いて微生物数を計数し、16S rRNA 遺伝子を対象に次世代シーケンス (Next-generation sequencing; NGS) 法を用いた遺伝子解析から微生物群集構成を解析した。さらに、遺伝子解析結果を用いて統計解析を行い、微生物群集の多様性の評価を行った。観測期間は、2016 年 8 月から 2018 年 8 月である。

著者は水文観測結果により対象流域では、降水量の増加に伴い地下水位が上昇し、湧出量が増加する傾向を見いだしている。地下水および湧水の溶存酸素濃度は、1.6 ~ 12.1 mg/L、水温の変化は、湧水で最も大きく 8.0 ~ 13.6°C であった。SF₆濃度から推定した地下水および湧水の滞留時間は、0.7 ~ 28.8 年であり、

特に尾根部地下水では、6.9 ~ 28.8 年と広い変動幅を示した。地下水および湧水中の微生物数は、 $10^3 \sim 10^6$ cells/mL であり、時空間的にオーダーレベルで変動がみられた。次世代シーケンス法を用いた遺伝子解析により、10,071 ~ 37,547 の遺伝子配列が読みとられ、1,395 ~ 9,485 の OTU が検出された。一般的に表層環境に生息する *Proteobacteria* 門や *Verrucomicrobia* 門が優占していた一方で、絶対嫌気性の微生物を含む *Chloroflexi* 門や *Firmicutes* 門に含まれる嫌気性かつ好熱性の微生物が検出された。以上のことから著者は、地下水中の微生物動態の解釈に、地下水の流動を考慮する必要があることを指摘している。

さらに著者は、地下水中の微生物群集構成は、無降雨時において、斜面上方から下部に向かう方向に高い群集の類似性があることを示している。対象地の地下水流動を *Comamonadaceae* 科や *Oxalobacteraceae* 科の微生物が代表していると判断された。一方で、降雨時には降雨流出応答に対応し群集の類似性が高い傾向がみられた。尾根部の地下水は、降雨時、深層からの地下水の寄与が大きくなることで滞留時間が長く微生物数が少なくなる傾向を示した。この傾向は基底流出時の湧水においても認められた。尾根部における地下水の滞留時間が 26.3 年と特に長い傾向を示し、地形的な流域界を超える地下水の寄与が示唆された時期において、嫌気性かつ中温性もしくは好熱性の *Geothrix* 属や *Caloramator* 属が地下水中に検出されたことは、地形的流域界をこえる広域的な地下水流動の可能性を微生物情報が示唆し得る可能性を示すものと考えられた。また、流動域においては、地下水位が高いとき微生物数が多い傾向が示されており、水位上昇により土壌水が地下水に寄与することによって地下水中の微生物数が増加したと考えられる。そのとき、地下水から *Hymenobacter* 属を含む土壌微生物が特徴的に検出されたことは、土壌水の寄与を支持する結果であると考えられた。相対的に貧栄養環境にある地下圏における微生物数の変化は、地下水の流動プロセスの変化のシグナルであり、その群集構成は、流動プロセスの違いを反映するものと考えられる。このように著者は、検出された特定の微生物 DNA は、その代謝様式や増殖条件を考慮すると地下水の流動経路を示すトレーサーとなる可能性がある結論づけている。

審 査 の 要 旨

地下水中の微生物については、従来カルスト地形からなる鍾乳洞等を対象とした研究がある程度であり、地下水流動系と微生物動態との関係性に着目した研究はほとんどない。本論文は、山地源流域を対象とし、湧水、地下水、渓流水に関わる水文観測を行うとともに、各水を季節毎に採取し、六フッ化硫黄濃度、水素・酸素安定同位体比、微生物数、微生物群集構成等を分析し、湧水の流量、地下水位、湧水・地下水の滞留時間等からなる地下水流動系に関わる水文情報と、水の微生物 DNA 動態に関わるデータとの関係性を検討したものである。その結果、湧水においては湧出量が多いほど、微生物数が少ない傾向がみられた。また、尾根、斜面中部、および谷底において一部例外を除き、地下水位が高いほど微生物数が多い傾向がみられた。これらは、地下水面が上昇し斜面内の地下水フラックスが大きくなることにより、比較的浅層の土壌水帯に存在していた微生物が地下水流動に寄与すること等によるものと判断された。さらに、尾根、斜面、谷底、湧水と地下水流動系の涵養域から流出域に移行するのに伴い、微生物 DNA の多様性が顕著になる傾向がみられた。すなわち、湧水においては異なる流動経路からなる地下水が混合するため、微生物群集構成がより多様になるものと考えられる。以上のように、地下水、湧水中の微生物動態において、地下水流動プロセスが重要な役割を果たしていることが示された。

本論文は、微生物動態と地下水流動プロセスの関係性をフィールドにおいて詳細に評価した点に高い独自性がある。既存の水文トレーサーに微生物解析を加えることにより、地下水流動系の主要構成要素である地下水の起源、流動経路に関する情報を得られる可能性が示されたことは、地下水水文学のみならず、微生物生態学においても、ブレイクスルーになる研究成果であると評価される。

令和 2 年 1 月 23 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査および最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（環境学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。