

廃棄物処理等科学研究費補助金 総合研究報告書概要版

研究課題名・研究番号 = 廃棄物処分場のバイオ評価に関する研究

国庫補助金精算所要額 (円) = 64,930,000

研究期間 (西暦) = 2002 - 2005

研究年度 (西暦) = 2002 - 2004

代表研究者名 = 谷口初美 (産業医科大学)

共同研究者名 = 中野 勝之 (福岡大学資源循環環境制御システム研究所) 尾川 博昭

(九州工業大学大学院生命体工学研究科) 久原 哲 (九州大学大学院農学研究院)
金澤 保 (産業医科大学) 松本 哲朗 (産業医科大学) 古賀 洋介 (産業医科大学)
森井 宏幸 (産業医科大学) 水野 康平 (北九州工業高等専門学校) 石松 維
世 (産業医科大学) 平川 英樹 (九州大学大学院システム生命科学府) 福田 和正
(産業医科大学) 高田 智 (福岡県保健環境研究所) 世良 暢之 (福岡県保健環境
研究所) 堀川 和美 (福岡県保健環境研究所) 濱崎 光宏 (福岡県保健環境研究
所) 高橋 浩司 (福岡県保健環境研究所) 黒川 陽一 (福岡県保健環境研究所)、
林 正男 (財団法人日本環境衛生センター西日本支局)、坂中 一敦 (株式会社ク
ボタ)

研究目的 = 1999年福岡県の安定型最終処分場において発生した高濃度の硫化水素ガスによる従業員
の死亡事故を契機に、各地で多発している有害ガス発生対策を目的として、その原因究明のた
めの土壌微生物叢の網羅的な遺伝子工学的検査法の確立を目指した。この網羅的検査法の確立は
硫化水素ガスのみならず、メタンガス、アンモニアガスなどの有害ガス発生メカニズムの解明に
も寄与することができ、処分場の危険度予測、安全対策のための指標になり、さらに微生物によ
る浄化作用の効力や、処分場の早期安定化への指標になると考えられる。このことによって廃棄
物処分場における廃棄物の適正処理のための調査手法として資することを目的とする。

研究方法 =

(1) 土壌のサンプリング; 現場の管理職員の協力の元、重機 (パワーショベル等) による掘削、
山、畑の対照土壌に関しては手動掘削機 (ハンドオーガ) で、1地点につき表層、0.5m, 1.5m, 3.0m

の深度の異なるサンプルを採取した。得られた土壌サンプルはビニルバックに密閉し、可能な限り4℃で保存した。水は7~35mの深さの浸出水または内水ポンド水を現場の管理職員の協力によって採取した。(2) 理化学的検査；理化学試験として、溶出試験、含有量試験及び成分分析を22項目行った。ダイオキシン類の濃度の検査も行った。(3) 微生物学的検査；好気培養法（環境細菌用寒天培地による平板希釈法）により、菌数計測と16SrDNAの塩基配列決定による菌種の同定を行った。5種類の薬剤に対する耐性菌の菌数を計測した。硫酸還元菌とメタン細菌については、嫌気培養法の検討、菌数計測と16SrDNAの塩基配列決定による菌種の同定を行った。全菌数は蛍光染色法とreal-time PCR法により菌数の計測を行った。寄生虫の1種である環境線虫の生息状況の検査法を検討した。(4) 菌叢解析；遺伝子工学的検査法のため高純度DNAの調製法を検討した。ダイレクトPCRによる土壌細菌の16S rDNAの増幅及びクローニング、塩基配列の決定を行った。細菌の分類の基準となる各菌種の基準株の16S rDNA（4,386件）のデータベースを構築し、相同性検索を行い、菌種の分布および割合を調べた。(5) 土壌細菌叢解析用DNAチップの作成；約1万クローンの土壌細菌由来16S rDNA塩基配列情報を基に、DNAチップに張り付けるオリゴヌクレオチドを選定し、DNAチップを作成した。土壌サンプルより抽出したDNAを鋳型にしてPCRで増幅し、16S rDNA部分断片を蛍光色素で標識した。DNAチップとハイブリダイゼーションし、反応条件を検討した。

結果と考察 = (1) サンプル：不法投棄現場、安定型埋立処分場、一般廃棄物処分場、海面埋立処分場、畑、大学構内の山土の7都府県にわたり合計10箇所19地点85サンプルの土壌を採取した。水サンプルは4箇所35サンプルを採取した。(2) 理化学的検査：廃棄物処分場の深層部は強アルカリで、塩濃度が高かった。硫化水素ガス発生が問題になって1年後の復旧作業中の不法投棄現場では、深度の深いサンプルで硫酸イオン濃度が高く、他の多くの土壌でも同様であった。しかし海面埋立処分場では、深度の浅い土壌で硫酸イオン濃度が高く、表層が硫酸イオン濃度が高い海水の影響を受けていることが示唆された。非汚染土壌（畑、大学構内の山土）では、鉄及び硫酸イオンとも深度に無関係に低濃度であった。(3) 微生物学的検査：蛍光染色法による全菌数計測は、多くの土壌サンプルで $10^7 \sim 10^9$ cells/gが計測され、サンプル地点や、深さによる顕著な違いは見られなかった。好気培養により検出される菌数は蛍光染色法に比べて少なく、しかも、 $0 \sim 10^7$ cells/gとサンプルの地点や深度により大きく異なった。処分場土壌では過酷な条件でも生き残る芽胞形成菌の*Bacillus*属菌が多く検出された。嫌気培養による硫酸還元菌数計測法の検討の結果、mDSMZ培地による液体3本法（MPN法）が有用であると考えられた。また、培養法の実験の中で、寒天培地上で硫化水素を生成した証しである黒コロニーを形成するのは硫酸還元菌だけでなく、*Clostridium*属菌も含まれることが明らかになった。このことから*Clostridium*属菌も硫酸還元能を有する菌として評価する必要が示唆された。メタン生成菌は硫酸還元菌が検出されるサンプルで同時に検出される傾向が見られた。メタンガス発生が硫化水素ガス発生に伴うと

言う結果と一致するものであった。遺伝子工学的手法の基盤となる高純度の DNA を抽出する手法を考案し、幅広い汎用性を実証した。さらにその DNA を用いて real-time PCR 法による全菌数の計測が可能となった。蛍光染色法とならび、菌数計測手法としての利用が期待される。水サンプルの全菌数は土壌に比べ 1~2 桁少なく、硫酸還元菌数は培養法でも遺伝子レベルでも少なかった。土壌のほうが細菌叢を正確に反映する結果であった。水サンプルについては更なる解析が必要である。近年社会問題になっている薬剤耐性菌の検出頻度を調べた結果、ペニシリン系薬剤に耐性を示す菌がいずれの土壌にも約 1 割検出されたが、顕著な差は無かった。(4) 16S rDNA 塩基配列の解析: Bergey's Manual に記載されている phylum、class で約 70%、order、family で約 80%、属でも約 40%の細菌種が検出され、本研究で用いた遺伝子工学的手法により幅広い菌種を検出していることが明らかになった。Phylum のレベルでも菌叢の違いを見ることが可能であることや、その土壌を特徴付ける菌叢を見ることができることが明らかになった。硫化水素ガス発生においては硫酸イオンを硫化水素に還元する硫酸還元菌や *Clostridium* 属菌と、逆に硫化水素を硫酸イオンに酸化するイオウ酸化細菌および光合成菌や、それ以外の菌とのバランスが重要であると考えられる。ダイレクト PCR 法ではそれらの菌種の検出頻度が高いこと、検査に要する日数が短いこと、菌種の同定、全体に対する頻度も同時に算出できること、VBNC 状態の菌も検出できること等、培養法に比べての利点が明らかになった。また、不法投棄現場と廃棄物処分場では、硫化水素ガス発生に関わる硫酸還元菌の種類が異なることや、海面埋立処分場では、表土に多く含まれる硫酸イオンが硫酸還元菌の多い深層に流入すると、硫酸還元菌の割合が急激に増加し、硫化水素ガス発生が起きる危険性が極めて高いことを示唆する結果も得られた。この解析結果は、理化学検査に微生物学的評価を加えることによって、処分場における有毒ガスによる労災事故防止のための危険度予測のみならず、土壌の再利用の際の安定化評価に必須の情報を提供し得ることを強く示すものであった。水素、炭素、及び窒素循環に関与する菌種について解析を行なうことも可能であり、硫化水素ガス発生に関する菌叢解析手法にとどまらず、環境サンプルの解析手法として幅広く利用出来ると考えられた。非汚染土壌のサンプルについては、深度による菌叢の変化が汚染土壌よりも少なく、また全菌数に対する硫酸還元菌及びイオウ酸化細菌の割合が少ない特徴が見られた。この結果は、汚染土壌の浄化後の指標として有用になると考えられる。(5) DNA チップ: 科 (family) レベルで約 100 種類を検出可能であり、2 塩基以上のミスマッチを含む配列を検出しない反応条件を選定した。各土壌サンプルから調製した DNA を用いて反応を行った結果、各土壌サンプルを特徴付ける反応パターンを得ることが可能であった。土壌サンプルのような未知の菌種を含み、なおかつ多様な菌種を含むサンプルの菌叢を解析する為の DNA チップは例がなく、大量の土壌サンプルの菌叢について迅速にスクリーニングする為の手法として可能性が窺われた。

結論 = 平成 14 年度には 1 地点の深度の異なる 4 サンプルを用いて解析法全体の流れ(DNA 抽出法、

real-time PCR 法による全菌数計測、ダイレクト PCR 法による 16S rDNA 塩基配列による詳細な菌叢解析)を構築し、従来法(染色法による全菌数計測、培養法による生きた硫酸還元菌、メタン細菌の計測)により検証した。平成 15 年度にはこの手法を多サンプルに応用し、平成 16 年度には DNA チップの構築と、理化学性状と細菌叢との関係によりガス発生予測の可能性を検証した。硫化水素、メタン、アンモニアガスなどは微生物のうち、特に細菌が、混在する有機物や化学物質を栄養源として利用した代謝産物である。その生成反応は複数の細菌種の複雑な酸化還元反応によるものであり、その反応の不均衡によって大量のガスが発生する。そのためこれらのガス発生の原因究明のためには、多種の細菌の定性的、定量的検査を行わなければならない。硫化水素ガス産生に関与する細菌の研究は他のガスに比べ進んでおり、比較的単純である。この利点を用い、硫酸イオン濃度とその酸化還元に関与する細菌の検出率との関係を指標にし、検査法の精度がガス発生予測に十分有用であることを強く示唆する結果を得た。また細菌叢解析結果は、その土壤に特徴的な細菌叢を再現性良く捕らえており、細菌叢が土壤の性状の一つとして評価指標になり得ることを示した。さらに本研究はイオウ循環のみならず、他の元素循環に関与する多菌種を同時に網羅的に検出可能であった。本手法は、理化学検査結果と併用することで、硫化水素ガス発生を含む有害事象と菌叢の相関を考察する上で有益な情報を提供し、新たな土壤評価を可能にすると考える。