

令和元年6月19日現在

機関番号：87107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21716

研究課題名(和文)次世代シーケンサーによる微生物群集解析を用いた最終処分場の新たな評価法の開発

研究課題名(英文)Development of a new method of evaluating waste landfill sites using microbial community analysis by next-generation sequencing

研究代表者

平川 周作(Hirakawa, Shusaku)

福岡県保健環境研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：90527623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：廃棄物最終処分場では、埋立地内部の微生物反応が変化することにより、有害ガスの発生や浸透水の水質悪化に至ることがある。そこで、次世代シーケンサーを用いて浸透水の微生物群集構造を解析し、廃棄物最終処分場の評価手法への適用の可能性を探った。複数の異なる廃棄物最終処分場の浸透水を対象に微生物群集を解析した結果、優占する埋立廃棄物の種類や水質の有機物及び無機イオン成分が微生物群集構造に影響を与えると推測された。本研究により、廃棄物最終処分場における埋立地内部の状態や浸透水の水質変化を把握する指標として、微生物群集構造を利用できる可能性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、実際に稼働中の廃棄物最終処分場を対象として、浸透水の微生物群集構造を明らかにし、水質や埋立廃棄物の影響を受けて変化する可能性を示した。特に、掘削調査による埋立廃棄物の組成情報を利用できたことから、実際の環境をより良く反映した解析結果が得られたと考えられる。廃棄物最終処分場において、既に埋め立てられている内部の状態を把握することは極めて困難である。しかし、埋立地の内部を把握できれば、有害ガスの発生や浸透水の水質悪化による災害や汚染の防止に有効である。本研究は、浸透水を用いて埋立地内部の状態を把握する手段として、微生物を指標として活用するための基礎データを提供した。

研究成果の概要(英文)：Changes in microbial reactions within a landfill site can lead to the generation of harmful gases and to the deterioration of leachate quality. Therefore, we analyzed the microbial community structure of leachate by next-generation sequencing and explored the possibility of applying this technique to a method of evaluating waste landfill sites. From analyzing microbial communities in leachate at several different waste landfills, we estimated that the organic matter and inorganic ion components of leachate and the type of landfill waste both affect the microbial community structure. The present study has shown the possibility of using microbial community structure as an indicator of the condition of a landfill and the change in the quality of leachate.

研究分野：環境化学、環境毒性学

キーワード：微生物群集解析 次世代シーケンサー 廃棄物 最終処分場 浸透水 16S rRNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

現在、廃棄物最終処分場では、維持管理のために浸透水の水質基準が設定されているものの、化学分析に基づく水質基準項目だけでは、得られる情報が限られており、廃棄物最終処分場の状況を把握することは困難である。我々はこれまでに、複数の廃棄物最終処分場の浸透水を対象に生物化学的酸素要求量（BOD）の由来に着目して調査を実施した結果、炭素系有機物由来の BOD ではなく、本来意図していない硝化細菌由来の BOD の影響が大きい浸透水が存在することを明らかにした。また、別の廃棄物最終処分場の調査では、埋立地内部の嫌気化が進行し、浸透水の水質が悪化、同時に埋立地から高濃度の硫化水素ガス、メタンガスの発生が認められた。この事例では、硫酸塩還元菌やメタン生成菌が関与しているものと推察された。このように、廃棄物最終処分場では、埋め立てられる廃棄物の性質や埋め立て方法により、埋立地内部の微生物反応が変化し、浸透水の水質悪化や有害ガスの発生に至ることがある。そのため、廃棄物最終処分場の微生物の状況を把握することは、維持管理や災害防止に極めて重要であるが、微生物に着目した評価は実施されていない。

近年、生化学分野の技術発展により、次世代シーケンサーを用いることで遺伝子情報をもとに難培養性の菌も含めた細菌叢の解析ができるようになり、腸内の細菌叢と健康状態の関係を解析する手段などに用いられ始めている。しかし、模擬埋立層の微生物群集を調査した報告事例はあるものの、実際の廃棄物最終処分場の浸透水を対象とした微生物群集に関する知見は乏しい。

また、福岡県では、平成 25 年度から安定型産業廃棄物の最終処分場における処理の状況を把握するため、外部に委託して埋立廃棄物の組成調査を実施している。そのため、埋立許可品目だけでは通常わからない詳細な廃棄物の組成情報を活用することが可能になった。

これらの背景から、廃棄物最終処分場を生体に見立て、埋立廃棄物を食べ物、埋立地内部を体内、浸透水を排泄物として捉えることにより、浸透水の微生物群集構造を廃棄物最終処分場の健康診断のように利用できないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、微生物群集解析を用いた廃棄物最終処分場の新たな評価法を開発することである。具体的には、浸透水の微生物群集構造と水質および埋立廃棄物組成の関係を複合的に解析し、微生物群集構造に影響を与える要因を明らかにすることにより、廃棄物最終処分場における埋立地内部の状態を把握する手段として、その適用の可能性を探るものである。

3. 研究の方法

本研究の方法は、廃棄物最終処分場における浸透水の微生物群集解析と統計手法を用いた微生物群集構造と水質及び埋立廃棄物組成の解析である。しかし、稼働中の廃棄物最終処分場の浸透水を対象とした微生物群集解析については知見が乏しいため、微生物群集解析に係る操作手順の検討から実施した。また、浸透水の水質の特性を把握するため、同時に採取した浸透水について有機物指標と無機イオン成分の分析を実施した。安定型廃棄物の最終処分場の埋立廃棄物組成は、福岡県が外部に委託して実施している組成調査の結果を用いた。

(1) 微生物群集解析の操作手順の検討

廃棄物最終処分場の浸透水について、約 500 mL をメンブレンフィルターでろ過し、ビーズ破砕の工程を含むキットを用いて DNA を抽出した。本研究では、ろ過時のコンタミネーションを防止するため、ディスポーザブルのファンネル付きろ過デバイスを用いた。抽出した DNA について、微生物の 16S rRNA V3-V4 領域をターゲットとした PCR 増幅を行い、インデックス配列を付加したライブラリを調製した。塩基配列は、次世代シーケンサー Miseq System により取得した。塩基配列情報をもとに QIIME pipeline を用いて operational taxonomic unit (OTU) を作成し、微生物群集解析を実施した。

(2) 埋立廃棄物の組成による廃棄物最終処分場の分類

福岡県では、安定型廃棄物の最終処分場における処理の状況を把握するため、外部に委託して無作為に 2 箇所を掘削、埋立廃棄物の組成調査を実施し、その結果を福岡県のホームページで公表している。本研究ではこのデータを活用し、2 箇所の調査結果を平均して当該廃棄物最終処分場の埋立廃棄物組成とした。掘削調査を実施した 16 箇所の廃棄物最終処分場の埋立廃棄物組成を用いてクラスター分析を実施し、3 つのグループ (Group 1 : がれき類優占、Group 2 : 5 mm 以下の雑物優占、Group 3 : プラスチック類優占) に分類した。なお、掘削調査でガラス類・陶器類・石類と分類されたものは、がれき類とした。

(3) 浸透水の水質分析

廃棄物最終処分場の浸透水について、水質の特性を把握するため、化学分析を実施した。pH、電気伝導率 (EC)、BOD、化学的酸素要求量 (COD)、全有機炭素 (TOC)、ナトリウムイオン (Na⁺)、カリウムイオン (K⁺)、マグネシウムイオン (Mg²⁺)、カルシウムイオン (Ca²⁺)、塩化物イオン (Cl⁻)、硫酸イオン (SO₄²⁻) は JIS K0102 工場排水試験方法、重炭酸イオン (HCO₃⁻) は鉍泉分析法指針 (改訂) に準拠して分析した。

(4) 統計解析

微生物群集構造と水質及び埋立廃棄物組成の統計解析には、統計解析ソフト R を使い、パッケージ **vegan** をインストールして使用した。微生物群集構造の類似性を調査するため、サンプルあたりの総リード数を 74,000 に希釈化して **Bray-Curtis** 指数を算出し、関数 **metaMDS** を用いて非計量多次元尺度構成法 (**non-metric multidimensional scaling: NMDS**) により、試料を二次元平面上に配置した。また、関数 **envfit** を用いて、NMDS 平面上で環境変数である水質データ及び埋立廃棄物のグループに対応したベクトルと重心を計算し、微生物群集構造に影響する要因を解析した。また、浸透水の水質と埋立廃棄物組成の関係をみるため、統計解析ソフトエクセル統計を用いて水質の主成分分析を行い、主成分得点に基づく散布図を作成して埋立廃棄物組成のグループを表示した。

4. 研究成果

(1) 浸透水の微生物群集解析

廃棄物最終処分場の浸透水を対象とした DNA 抽出について、ディスポーザブルのファンネル付きろ過デバイスを検討した。その結果、超純水をコントロールとした試料では標的遺伝子の増幅産物は確認されなかったため、コンタミネーション防止及び操作性の向上の面で有用と考えられた。検討した操作手順を用いて、本研究では、廃棄物最終処分場 27 箇所から採取した延べ 36 検体の微生物群集データを得ることができた。

埋立廃棄物組成が明らかになっている廃棄物最終処分場 16 箇所、延べ 23 検体を代表試料として微生物群集構造を門レベルで比較したところ、全ての試料において最も優占していたのは *Proteobacteria* 門であり、平均で 52% 検出され、次いで *Bacteroidetes* 門が多く、平均で 10% 検出されていた (図 1、廃棄物最終処分場を A~P で表記、平成 28 年度採取は 1、平成 29 年度採取は 2 を付記)。一方、検出割合が少ないものを含めると、23 検体を統合した OTU 数は 120,000 を超えており、廃棄物最終処分場の浸透水には極めて多様な微生物が存在していることが示唆された。優占種ではなくても廃棄物最終処分場の状態把握に有効な微生物が存在する可能性があるため、今後、解析を進め、指標となり得る微生物を探索する予定である。

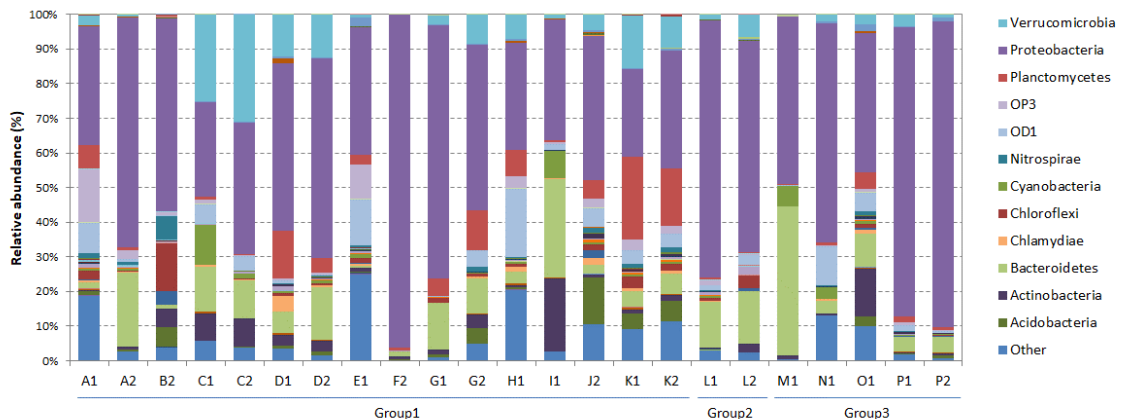


図 1 最終処分場の浸透水における微生物群集構造の比較 (門レベル、 $n = 23$)

(2) 微生物群集構造と埋立廃棄物組成の関係

廃棄物最終処分場の浸透水 23 検体の微生物群集構造の類似性を把握するため、OTU のリード数について NMDS を適用し、二次元平面上に配置した (図 2)。なお、本研究データの NMDS による低次元への縮約の指標となるストレス値 (< 0.1 : 良いあてはまり、 > 0.2 : あてはまりが悪い) は 0.15 であった。

NMDS では微生物群集構造の類似度が高いものほど近くに配置される。同じ廃棄物最終処分場から平成 28 年度と平成 29 年度に採取した浸透水は近傍に配置されたことから、当該廃棄物最終処分場では、採取時期によって微生物群集構造が大きく変化しないと考えられた。

また、図 2 において、優占する埋立廃棄物で分類したグループの重心を表示したと

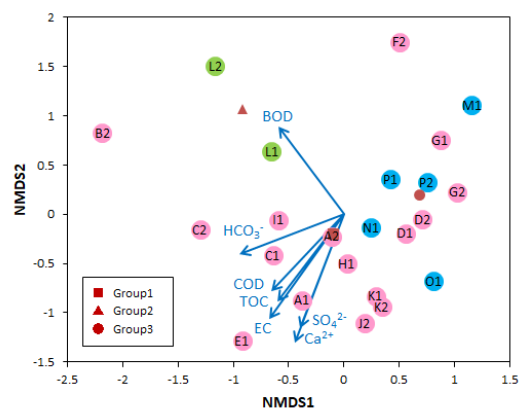


図 2 NMDS による浸透水の微生物群集構造の散布図 (微生物群集構造と有意な相関関係を示す水質項目を青字、優占する埋立廃棄物で分類したグループの重心を赤で表示)

ころ、離れて配置されたことから、浸透水の微生物群集構造が異なる要因の 1 つに埋立廃棄物が関係することが示唆された。

(3) 微生物群集構造と水質の関係

NMDS を用いた微生物群集解析の結果に関数 envfit を適用し、微生物群集構造と水質の相関解析を実施したところ、BOD、COD、TOC、EC、Ca²⁺、SO₄²⁻、HCO₃⁻ は微生物群集構造と有意な相関関係が認められた。図 2 に微生物群集構造と有意な相関関係が認められた水質項目を示し、ベクトルを表示した。ベクトルの向きは増加速度が最も大きくなる方向、ベクトルの長さは相関の強さを示している。しかし、水質が微生物群集構造に影響しているのか、微生物群集構造が水質に影響しているのかについては、今後さらなる解析が必要である。

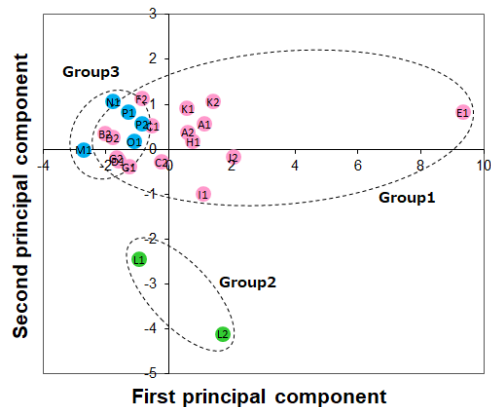


図 3 浸透水の水質に基づく主成分得点の散布図

(4) 水質と埋立廃棄物組成の関係

水質データを用いて主成分分析を実施したところ、第 1 主成分は有機成分及び無機イオン成分の汚濁総量、第 2 主成分は有機成分と無機イオン成分のバランスを示す解析結果が得られた。各浸透水について主成分得点の散布図を作成したところ、埋立廃棄物組成のグループによる傾向があり、埋立廃棄物と浸透水の水質に関連があることが推察された(図 3)。また、プラスチック類優占のグループ 3 は他と比較して汚濁総量が小さいことが示唆された。

(5) まとめと今後の展望

本研究により、浸透水の微生物群集構造は水質や埋立廃棄物の影響を受けることが示され、廃棄物最終処分場における埋立地内部の状態や浸透水の水質変化を把握する指標として、微生物群集構造を利用できる可能性を示すことができた。

今後は、本研究で得られたデータを活用し、水質と微生物群集構造を基にした埋立廃棄物の推定や埋立地内部の状態を良く反映している微生物指標の探索などに発展させていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Hirakawa S., Koga T., Shimizu N., Hori T., Kurokawa Y., Toba M., Nitrification-related factors involved in the biochemical oxygen demand of leachate from inert-waste landfill site, *Journal of Material Cycles and Waste Management*, peer-reviewed, (In press)
DOI : 10.1007/s10163-019-00885-7
- ② 平川 周作、志水 信弘、堀 就英、鳥羽 峰樹、有機物指標と無機イオン成分を用いた廃棄物最終処分場関連水の特性評価、*環境化学*、査読有、27 巻、2 号、2017、23-28
DOI : 10.5985/jec.27.23

[学会発表] (計 10 件)

- ① 平川 周作、古賀 智子、藤川 和浩、櫻井 利彦、飛石 和太、鳥羽 峰樹、最終処分場における埋立廃棄物組成と浸透水水質及び微生物群集構造の関係、第 1 回環境 DNA 学会、2018
- ② 古賀 智子、平川 周作、鳥羽 峰樹、レーダーチャートを用いた水質特性評価手法の安定型最終処分場への適用、第 45 回環境保全・公害防止研究発表会、2018
- ③ 平川 周作、古賀 智子、藤川 和浩、櫻井 利彦、飛石 和太、鳥羽 峰樹、廃棄物最終処分場の浸透水を対象とした微生物群集解析、第 27 回環境化学討論会、2018
- ④ 平川 周作、古賀 智子、志水 信弘、堀 就英、黒川 陽一、鳥羽 峰樹、安定型最終処分場の浸透水における水質変化と硝化細菌の関係、平成 30 年度廃棄物資源循環学会九州支部研究ポスター発表会、2018
- ⑤ 古賀 智子、平川 周作、鳥羽 峰樹、安定型最終処分場における埋立廃棄物組成と浸透水水質の関連について、平成 30 年度廃棄物資源循環学会九州支部研究ポスター発表会、2018
- ⑥ 平川 周作、古賀 智子、志水 信弘、堀 就英、黒川 陽一、大石 興弘、鳥羽 峰樹、廃棄物最終処分場における浸透水の水質変化と微生物群集構造の関係、第 44 回環境保全・公害防止研究発表会、2017
- ⑦ Hirakawa S., Shimizu N., Hori T., Kurokawa Y., Oishi O., Toba M., Involvement of microorganisms in fluctuation of biochemical oxygen demand in leachate water of inert-waste landfill site, 19th International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms, 2017
- ⑧ 古賀 智子、平川 周作、鳥羽 峰樹、レーダーチャートによる水質特性評価を用いた安定型最

終処分場の状態把握－硫化水素ガス濃度変化との比較－、平成 29 年度廃棄物資源循環学会九州支部研究ポスター発表会、2017

⑨平川 周作、志水 信弘、堀 就英、鳥羽 峰樹、廃棄物最終処分場関連水の水質特性評価手法の検討－有機物指標と無機イオン成分を用いた類型化と可視化－、平成 29 年度廃棄物資源循環学会九州支部研究ポスター発表会、2017

⑩平川 周作、志水 信弘、堀 就英、黒川 陽一、大石 興弘、鳥羽 峰樹、安定型最終処分場の浸透水における有機物指標の変動と微生物の関係、第 43 回環境保全・公害防止研究発表会、2016

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

無し

6. 研究組織

(1) 研究分担者

無し

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：古賀 智子

ローマ字氏名：Tomoko Koga

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。