

Title	亜熱帯・熱帯地域の廃棄物埋立地における微生物生態系の調査
Author(s)	澤村, 啓美; 山田, 正人; 宮城, 俊彦; 石垣, 智基; 池, 道彦
Citation	水環境学会誌. 30(11) P.621-P.628
Issue Date	2007
Text Version	publisher
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/3364">http://hdl.handle.net/11094/3364</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 亜熱帯・熱帯地域の廃棄物埋立地における微生物生態系の調査

澤村 啓美\* 山田 正人\*\* 宮城 俊彦\*\*\*  
 石垣 智基† 池 道彦\*

### Microbial Community Analysis in Waste Landfill in Tropical and Subtropical Climate Zones

Hiromi SAWAMURA\*, Masato YAMADA\*\*, Toshihiko MIYAGI\*\*\*,  
 Tomonori ISHIGAKI† and Michihiko IKE\*

\* Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

\*\* National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-0053, Japan

\*\*\* Okinawa Prefectural Institute of Health and Environment, 2085 Ozato, Nanjo, Okinawa, 901-1202, Japan

† Faculty of Science and Engineering, Ryukoku University, 1-5 Yokotani, Seta-Oe, Otsu, Shiga 520-2194, Japan

#### Abstract

To understand the behavior of waste degradation in landfills and landfill stabilization in tropical and subtropical climate zones, eubacterial community analysis using waste landfill leachate was conducted. Waste landfills in Thailand, Vietnam and Japan were investigated of the bacterial communities. The waste landfills in Hua Hin (Thailand) and Go Cat (Vietnam) had high concentrations of organics in the leachate and organics in these high amounts of gas generated, indicating the active degradation of organic waste, as well as the disposal of large amounts of landfills. The landfills in the Japanese subtropical zone were suggested to be under going a comparatively stable degradation because of the long-term use of the landfill and the preliminary mineralization of landfill materials. All the bacterial communities isolated from observed in the landfills showed the existence of bacteria phylogenically related to *Firmicutes* and *Bacteroidetes*, indicating a highly reducing condition of the waste layer in the landfills. On the other hand, bacteria related to CFB (Cytophaga-Flexibacter-Bacteroidetes) group and *ε-Proteobacteria* were specifically detected from the Hua Hin landfill and Go Cat landfill but not from the Japanese landfills. The presence of these bacterial groups indicates the regional specificity of waste degradation in landfills under active degradation. Some common bacterial groups such as *γ-Proteobacteria* in the Hua Hin landfill and Japanese subtropical landfills were also found, suggesting certain similarities between these landfills.

**Key words:** waste landfill leachate, microbial community, subtropical climate zone and tropical climate zone

#### 1. はじめに

亜熱帯・熱帯地域に位置する東南アジアのタイおよびベトナムは、経済の発展が目覚しく、都市では人口および産業の高度集積がすすみ、大気汚染や水域の汚濁などの環境問題がおこっている。都市の衛生問題を含めた廃棄物の適正管理も解決すべき重要な課題の一つである。急速な経済発展にともないタイやベトナムの大都市圏における廃棄物の発生量は増大の一途をたどり<sup>1)</sup>、その処理・処分のためのインフラ整備が追いつかず、社会問題になっている。オープンダンプで堆積されたごみでの火災や崩壊によって多くの人命が失われる事例はもちろん、汚濁浸透水による周辺水域の深刻な汚染の事例も報告されている。衛生面での生活環境問題に加えて、水

稲などの農業生産など主要産業に与える影響についての実害を考えると、廃棄物投棄は東南アジア地域において様々な二次的問題を引き起こすという点でも、重要な解決すべき問題となってきている。

以前は、衛生埋立構造や集排水・浸出水処理設備など埋立地そのもののインフラの高度化を含めて、その解決が図られてきたが、近年では、地域住民の衛生環境への意識の向上により、収集運搬システムの適正化、水環境への排出源としての施設立地と浸出水管理が推進されてきている。このように埋立地の構造の高度化から、適正管理のフェーズに移行しつつある東南アジア諸国において、次のターゲットは、埋立地の延命化とともに、埋立地から排出される環境負荷の低減にあると考えられる。そこで、埋立地浸出水や埋立地ガスが周辺環境に

\* 大阪大学大学院工学研究科 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1

\*\* 国立環境研究所 〒305-0053 茨城県つくば市小野川16-2

\*\*\* 沖縄県衛生環境研究所 〒901-1202 沖縄県南城市大里字大里2085

† 龍谷大学理工学部 〒520-2194 滋賀県大津市瀬田大江町横谷1-5

影響を与えないレベルに到達するまでの適切な管理が求められる。浸出水や埋立地ガスに環境負荷の要因が見られる限り、埋立地の重要な維持管理は継続して実施しなければいけない。その期間の長さおよび汚染のポテンシャルの大きさを知る上でキーワードとなるのが「廃棄物埋立地の安定化」プロセスである。

廃棄物埋立地の安定化メカニズムは、埋め立てられた廃棄物の微生物学的、および物理化学的な変化が深くかかわっている<sup>2)</sup>。特に、微生物による廃棄物の分解活動は、埋立地における廃棄物変成の主反応であり、微生物生態学的な分析は、その反応媒体を対象とすることから、長期的な廃棄物埋立地の変化およびその予測を通じ適切な維持管理を行う上で欠かせない情報である。浸出水や発生ガスの化学分析は、現状の水質汚濁および大気環境への負荷量を直接評価可能である反面、将来的な変化や予測には情報が不十分であることから、微生物生態系評価の有用性が期待されている。特に、浸出水は廃棄物層内を通過しているため、埋立層内の状況を知る上で代表性が高いサンプルのひとつといえる。

温帯地域では廃棄物埋立地の安定化モニタリングおよび微生物群集に関する調査事例<sup>3, 4)</sup>は報告されており、埋立地性状の予測に供することが可能であるが、東南アジア諸国の熱帯・亜熱帯地域における廃棄物埋立地に関する調査事例はほとんどなく、廃棄物管理、特に埋立地由来の環境汚染の状況を充分把握できていないのが現状である。埋立地ガスや浸出水中の汚染物質の濃度や種類は、埋立地に埋め立てられた廃棄物の種類、埋立地の構造、および気候条件に大きく依存することが知られている。すなわち、亜熱帯・熱帯地域の気温や降水量などの気候条件は、温帯地域と異なるため、廃棄物埋立層内の生物的環境の形成や、洗い出し等による物理化学反応に影響を及ぼすことが推測される。以上の観点から熱帯・亜熱帯地域で、埋立地の微生物生態系を評価することは、埋立地安定化のメカニズムを理解する上で重要な知見であり、こうした知見の集積により、廃棄物が引き起こす水環境の二次被害や埋立地から排出される環境負荷の低減に結び付けられると考えられる。

本研究では、東南アジア諸国の一例としてタイおよびベトナムを対象とし、廃棄物埋立地に存在する微生物生態系の調査を行った。当該地域の廃棄物管理の概要、および廃棄物埋立地の安定化の現況を踏まえ微生物群集構造から廃棄物層内の状況を判断することで、廃棄物埋立地の安定化プロセスに関する理解を深め、埋立地の適正管理手法の提案へと結びつけることを目的とした。そのため、埋立物や埋立地の管理方針に関する知見が比較的豊富である、我が国の亜熱帯地域における埋立地においても同様の調査を行った。

## 2. 調査地域の気候、廃棄物埋立地の概要及び現況

### 2.1 タイ・ホアヒン埋立地

タイはインドシナ半島の中央部に位置し、国土面積は約51.4万 km<sup>2</sup>で南北に2,500 km、東西に1,250 kmの長さを持ち、雨季と乾季が存在する。本研究で対象とするホアヒン群はバンコク市の180 km南方に位置する地方都市である。タイ中南部の海岸地域に多くのリゾート地が点在

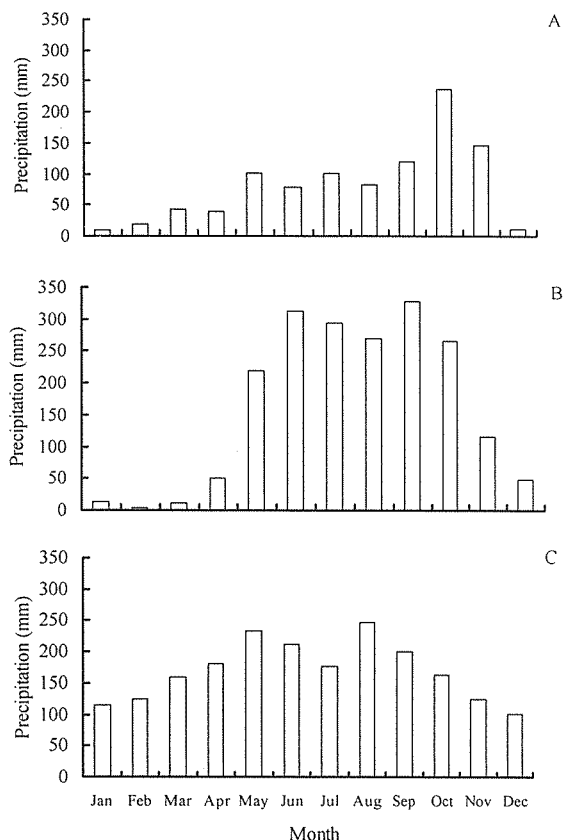


Fig. 1 Monthly mean precipitation in three objected area, A: Hua Hin, B: Ho Chi Minh City, C: N city in Japan

しているが、中でもホアヒン郡は王室関係者の保養地として古くから知られた土地である。現在も観光が主要産業であり、レストラン、ホテルなどから排出される廃棄物も含めて、多量の廃棄物の適正処理に関する問題を抱えている。ホアヒン郡における廃棄物調査のデータは乏しいが、バンコク市の固形廃棄物組成は食品(生ゴミ)、紙、およびプラスチック類が大部分を占めることが知られている。

ホアヒン埋立地は1996年に埋立てが開始した衛生埋立地であり、生活系廃棄物を一日あたり70 t受け入れている。2001年に埋め立てが終了した区画およびその後供用された区画を併せた埋立面積は44,160 m<sup>2</sup>である。当埋立地における安定化モニタリングの事例は、地表面からのガス発生量の調査がある。2005年に実施された調査では、乾季(冬季)のメタン排出量は10.3 (g・m<sup>-2</sup>・d<sup>-1</sup>)であり、雨季(夏季)の時期は51.8 (g・m<sup>-2</sup>・d<sup>-1</sup>)であった。すなわち、降雨量の増加する時期は、埋立層内部が湛水し嫌気化し、それに伴う嫌気性メタン発酵の活発化が推測される状況となっている。

### 2.2 ベトナム・ホーチミン市Go Cat埋立地

ベトナムはインドシナ半島の東側に南北に1,650 km伸びた細長い国である。本研究で対象とするホーチミン市は年間降水量1,800 mmで、雨季と乾季があり、雨季は5月から10月<sup>5, 6)</sup> (Fig.1)で熱帯モンスーン気候帯に位置する。発生する廃棄物量はベトナム全土で年間1,500万トンである<sup>7)</sup>。特に、近年開発が急速に進んでいるホーチミン市などの都市では、廃棄物の排出量は年間10-16%の割

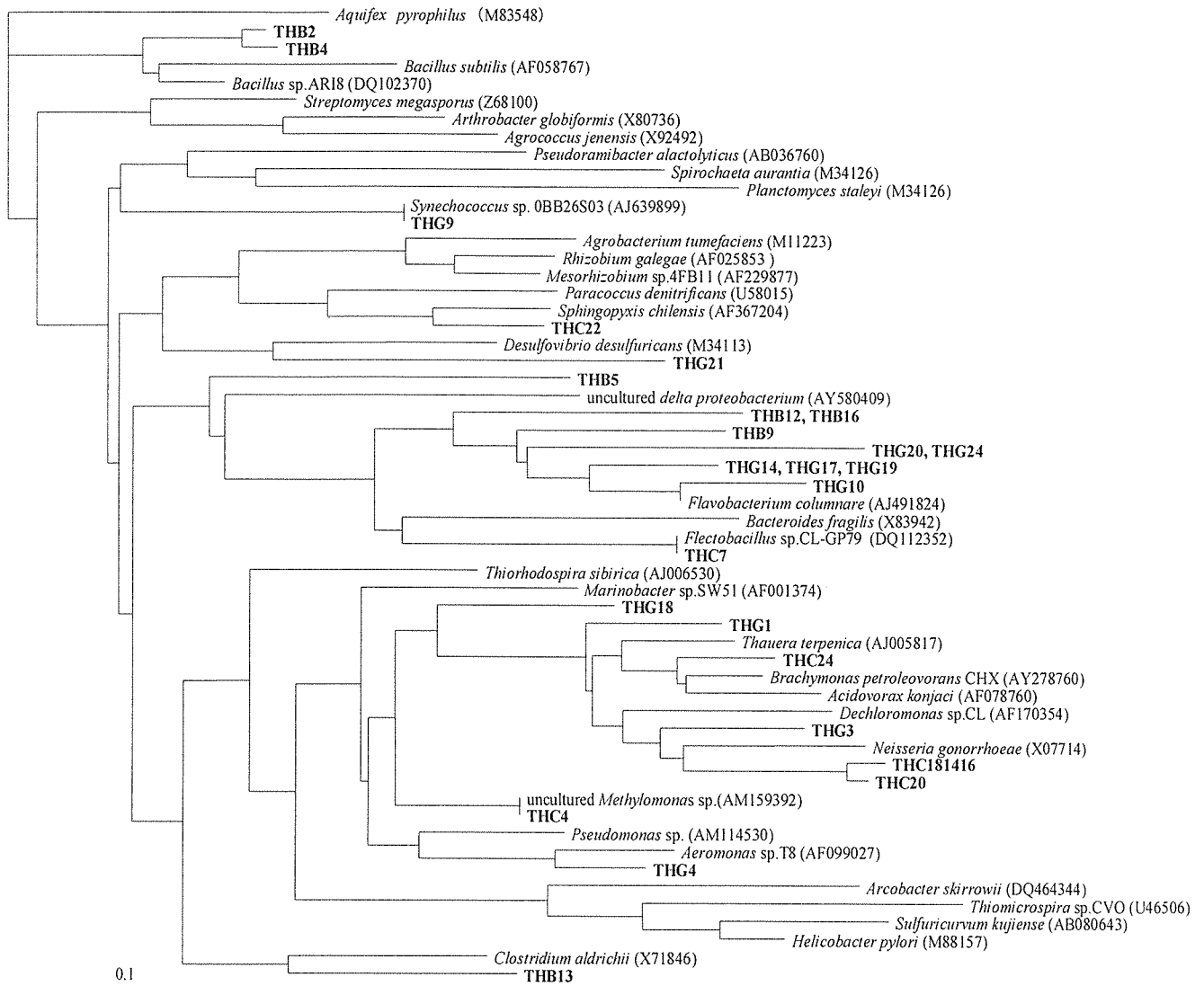


Fig.2 Phylogenetic tree based on eubacterial 16S rDNA for the clone sequence obtained from Hua Hin landfill and representative members of Eubacteria as determined by maximum likelihood method.

合で急激に増加し続けている。生活系廃棄物の排出量は一日あたり5,500 tであり、中間処理を経ずに直接埋め立てられている。生活系廃棄物組成は、厨芥類が約50%であり、紙類およびプラスチック類がそれぞれ10%ずつを占め、その他に数%ずつの金属類やブロック、石、セラミック、砂・砂利等を含んでいる。廃棄物は生活系廃棄物と建設系廃棄物をあわせて市内中心部から15 km付近に位置しているGo Cat埋立地、および50 km遠方に位置するPhuoc Hiep埋立地の二カ所にほぼ等量ずつ埋め立てられている。今回対象としたGo Cat埋立地は2001年から供用が開始されており、埋立面積250,000 m<sup>2</sup>の衛生埋立地である。埋立方法は平地への積み上げ式である。埋立が終了した区画では、覆土を施工した上で、表層にゴムシートを敷設するとともに、水平・垂直ガス管を設置し、埋立地ガスの回収および発電を実施している。また、浸出水の水質モニタリングの結果として、2003年から2004年の乾季にかけて、pHが5から6前後、およびBODが30,000-45,000 mg・l<sup>-1</sup>と、有機性廃棄物の嫌気性分解過程にある埋立地特有の水質特性を示したのに対して、同期間の雨季にはpHが7前後、およびBODは10,000-20,000

mg・l<sup>-1</sup>と若干の低減を示した<sup>8)</sup>。無機成分との比較から、有機物濃度の低下は、降雨に伴う表層シートの未敷設範囲からの浸透および洗い出しの進行により、浸出水質が一時的に変化したためであると結論づけられている<sup>8)</sup>。浸出水試料採水時の水質調査においても、pHは7、酸化還元電位は-322 mV、およびBODは14,000 mg・l<sup>-1</sup>であることから、雨季の終盤の水質性状を示しており、かつ還元的な雰囲気下にあることを示しており、埋立てられた廃棄物中の有機物成分が嫌氣的分解過程にあることは明らかな状況であると推測された。

### 2.3 日本国内の亜熱帯地域に位置する埋立地

日本の亜熱帯地域に属するN市およびH町の総人口35万人の地域から排出される一般廃棄物が搬入されている埋立地を調査対象とした。当該地域は、亜熱帯海洋性気候に属し、N市の降水量は年間約2,000 mm<sup>9)</sup>である(Fig.1)。この地域より発生する一般廃棄物量は、事業系および家庭系を合わせて一日あたり350 tであり、焼却残さおよび不燃物を中心に一日あたり約78 tが埋め立てられている。狭いこの地域で埋立地の不足は深刻な問題となっており、廃棄物減量化の取り組みとともに、埋立地

Table 1 Distribution of sequence types from the eubacterial 16S rDNA sequences isolated from the landfill leachate

clone name	Accession No.	Identities (%)	Genus	Phylum, Class	clone name	Accession No.	Identities (%)	Genus	Phylum, Class
OKN1 OKN1-15	Y17190		<i>Magnetocephallium</i>	Proteobacteria, α-Proteobacteria	THG			<i>β-proteobacterium</i> MWFLJhp1	Proteobacteria, β-Proteobacteria
OKN1-22	Y13403		<i>Agromicrobium</i>	Proteobacteria, α-Proteobacteria	THG2	AJ563421	96	<i>β-proteobacterium</i> MMFLJhp1	Proteobacteria, β-Proteobacteria
OKN1-5	AB025012		<i>Sphingomonas</i>	Proteobacteria, α-Proteobacteria	THG3	AJ65422	98	<i>β-proteobacterium</i> MWFLJhp1	Proteobacteria, β-Proteobacteria
OKN1-24	AB022428		<i>Sphingomonas</i>	Proteobacteria, α-Proteobacteria	THG4	AY79261	96	uncultured β-proteobacterium	Proteobacteria, β-Proteobacteria
OKN1-3	AY254692		<i>Sphingomonas</i>	Proteobacteria, α-Proteobacteria	THG5	X74684	99	uncultured β-proteobacterium	Proteobacteria, β-Proteobacteria
OKN1-16	EX079645		uncultured α-proteobacterium	Proteobacteria, α-Proteobacteria	THG6	AF113004	96	<i>Thiomargarita</i>	Proteobacteria, γ-Proteobacteria
OKN1-14	AF001645		uncultured α-proteobacterium	Proteobacteria, α-Proteobacteria	THG7	DX189650	99	uncultured <i>Vibrionaceae</i>	Proteobacteria, γ-Proteobacteria
OKN1-14	AY267367		<i>Pseudomonas</i>	Proteobacteria, γ-Proteobacteria	THG8	UNSR1019	92	uncultured <i>Vibrionaceae</i>	Proteobacteria, γ-Proteobacteria
OKN1-18	AY150184		exquisite LP2 of <i>Lysobacter pedicellatus</i>	Proteobacteria, γ-Proteobacteria	THG9	AB639899	99	<i>Synchromobium</i>	candidate division CP10
OKN1-2	AB148813		<i>Cellulomonas</i>	Proteobacteria, γ-Proteobacteria	THG10	AY038893	99	uncultured <i>Cyanobacterium</i>	<i>Cyanobacteria</i> , Chroococcales
OKN1-7	AF126549		<i>Thalassiosira</i>	Proteobacteria, γ-Proteobacteria	THG11	UD3441001	95	uncultured <i>Cyanobacterium</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OKN1-4	AY390409		uncultured α-proteobacterium	Proteobacteria, α-Proteobacteria	THG12	AY218761	94	<i>Anaerobic bacterium</i> R-903	environmental samples
OKN1-20	AF332367		Gram-positive bacterium WSP-3	Proteobacteria, β-Proteobacteria	THG13, THG16	AY491611	97	environmental samples	environmental samples
OKN1-1	DX642412		environmental samples	unclassified Bacteria	THG14, THG17, THG19, THG22, THG15	AY12682	97±99	environmental samples	environmental samples
OKN1-6	DX468068		environmental samples	environmental samples	THG18	AF428725	99	environmental samples	environmental samples
OKN1-8	DX064989		environmental samples	environmental samples	THG18	AY12614	96	environmental samples	environmental samples
OKN1-9	AY491564		environmental samples	environmental samples	THG20, THG24	DX065661	98	environmental samples	environmental samples
OKN1-10	AY121672		environmental samples	environmental samples	THG21	AY1218625	95	environmental samples	environmental samples
OKN1-11	DX337044		environmental samples	environmental samples	THG23	AF428720	98	environmental samples	environmental samples
OKN1-12	DX309372		environmental samples	environmental samples	THB	DX024209	99	uncultured <i>Treacher</i>	Proteobacteria, α-Proteobacteria
OKN1-17	DX480474		environmental samples	environmental samples	THB2	AF434345	95	<i>Lysofucillus</i>	Firmicutes, Bacillales
OKN1-19	DX376657		environmental samples	environmental samples	THB3	AF526913	98	<i>Bacillus</i>	Firmicutes, Bacillales
OKN1-21	DX256084		environmental samples	environmental samples	THB4	DX102370	94	<i>Bacillus</i>	Firmicutes, Bacillales
OKN1-23	AM936346		environmental samples	environmental samples	THB5	X84007	94	<i>Ferilimonella</i>	Firmicutes, Clostridia
OKO1 OKO1-3	AB009706		<i>Sphingomonas</i>	Proteobacteria, α-Proteobacteria	THB6	AY995756	97	uncultured <i>enrichment</i> AA08	Firmicutes, Clostridia
OKO1-7	AB025014		<i>Sphingomonas</i>	Proteobacteria, α-Proteobacteria	THB7	AF275917	97	uncultured <i>enrichment</i> AA08	Leitophyceae, Treballales
OKO1-18	AY275432		<i>Brachymonas</i>	Proteobacteria, β-Proteobacteria	THB8	AY570600	97	environmental samples	environmental samples
OKO1-4	AF019037		<i>Hydrogenophaga</i>	Proteobacteria, β-Proteobacteria	THB9	AJ408963	92	environmental samples	environmental samples
OKO1-5, OKO1-6	AY1760538		uncultured <i>Methylophilaceae bacterium</i>	Proteobacteria, β-Proteobacteria	THB10	AY1668383	97	environmental samples	environmental samples
OKO1-14, OKO1-15, OKO1-17, OKO1-18, OKO1-19	AY027498		uncultured <i>Methylophilaceae bacterium</i>	Proteobacteria, β-Proteobacteria	THB11	AB353256	95	environmental samples	environmental samples
OKO1-21	AF099027		<i>Aeromonas</i>	Proteobacteria, γ-Proteobacteria	THB12, THB16	AY239547	92	environmental samples	environmental samples
OKO1-19	AY902202		<i>γ-proteobacterium</i>	Proteobacteria, γ-Proteobacteria	THB13	AF371551	98	environmental samples	environmental samples
OKO1-8	AY136073		uncultured <i>Cytophaga bacterium</i>	Bacteroidetes, Sphingobacteriales	THB14	AB82200	99	environmental samples	environmental samples
OKO1-12	AB508943		<i>Limonaxia reideri</i>	<i>Cyanobacteria</i> , Oscillatoriales	THB15, THB19	AB219992	99	environmental samples	environmental samples
OKO1-13	AY211099		<i>Planococcus</i>	Firmicutes, Bacillales	THB17	AY1370581	95	environmental samples	environmental samples
OKO1-1	AY424824		environmental samples	environmental samples	THB18	AY168743	89	environmental samples	environmental samples
OKO1-2	AY328785		environmental samples	environmental samples	THC			Proteobacteria, α-Proteobacteria	
OKO1-4	AY338785		environmental samples	environmental samples	THC2	AY948904	93	uncultured α-proteobacterium	Proteobacteria, β-Proteobacteria
OKO1-9	AY197383		environmental samples	environmental samples	THC3	AF387907	99	uncultured β-proteobacterium	Proteobacteria, β-Proteobacteria
OKO1-10	AY187527		environmental samples	environmental samples	THC3	AF289159	95	uncultured β-proteobacterium	Proteobacteria, β-Proteobacteria
OKO1-11	AY102888		environmental samples	environmental samples	THC11	AF170154	94	<i>Dactylomonas</i>	Proteobacteria, β-Proteobacteria
OKO1-15	AB24157		environmental samples	environmental samples	THC6	AF150800	91	<i>Methylomonas</i>	Proteobacteria, γ-Proteobacteria
OKO1-16	AY756591		environmental samples	environmental samples	THC4	AM159392	99	uncultured <i>Methylomonas</i>	Proteobacteria, γ-Proteobacteria
OKO1-17	AY570563		environmental samples	environmental samples	THC5	AB096215	94	uncultured <i>Methylomonas</i>	Proteobacteria, γ-Proteobacteria
OKO1-22	AY102906		environmental samples	environmental samples	THC7, THC8	DX112352	97-98	<i>Flavobacillus</i>	Sphingobacteriales, Sphingobacteriales
OKO1-23	AY121702		environmental samples	environmental samples	THC9	AB867926	99	uncultured <i>actinobacterium</i>	environmental samples
OKN2 OKN2-2, OKN2-11, AY190138		96	<i>Sphingobium</i>	Proteobacteria, α-Proteobacteria	THC12	AY102906	98	environmental samples	environmental samples
OKN2-9	AJ585992		<i>Hydrogenophaga</i>	Proteobacteria, β-Proteobacteria	THC13, THC23	DX256348	99	environmental samples	environmental samples
OKN2-1	AM226310		<i>Smitticapsula</i>	Proteobacteria, β-Proteobacteria	THC14, THC20	AY546500	95	environmental samples	environmental samples
OKN2-6	DX235159		<i>Iribia</i>	Proteobacteria, γ-Proteobacteria	THC15	AY953247	97	environmental samples	environmental samples
OKN2-3	AY623816		<i>Pseudomonas</i>	Proteobacteria, γ-Proteobacteria	THC16, THC19	DX066396	95-97	environmental samples	environmental samples
OKN2-13	DX252929		<i>Pseudomonas</i>	Proteobacteria, γ-Proteobacteria	THC17	AY187454	98	environmental samples	environmental samples
OKN2-7	L40997		<i>Beggiatoa</i>	Proteobacteria, γ-Proteobacteria	THC18	AB154300	95	environmental samples	environmental samples
OKN2-8	CP000135		<i>Halobella</i>	Proteobacteria, γ-Proteobacteria	THC21	DX166482	99	environmental samples	environmental samples
OKN2-10	UG1848		<i>Marinobacter</i>	Proteobacteria, γ-Proteobacteria	THC22	DX018792	97	environmental samples	environmental samples
OKO2 OKO2-3	AY964889		<i>β-proteobacterium</i>	Proteobacteria, β-Proteobacteria	THC24	AB193737	96	<i>Comamonas</i>	Proteobacteria, β-Proteobacteria
OKO2-5	AY145573		<i>Comamonadaceae bacterium</i> BP-8	Proteobacteria, β-Proteobacteria	VE1, VE13, VE14, VE15, VE16, VE17, VE19, VE20, VE21, VE22	AY954288	97-100	<i>Pseudomonas</i>	Proteobacteria, γ-Proteobacteria
OKO2-2	AY429714		<i>Oxalobacteriaceae bacterium</i> HUC302	Proteobacteria, β-Proteobacteria	VE2	AY017062	95	<i>Pseudomonas</i>	Proteobacteria, γ-Proteobacteria
OKO2-6	AB193747		<i>Leanorea</i>	Proteobacteria, β-Proteobacteria	VE12	AP090048	99	<i>Escherichia</i>	Proteobacteria, γ-Proteobacteria
OKO2-19	CP000155		<i>Halobella</i>	Proteobacteria, γ-Proteobacteria	VE13	AY548775	92	<i>Dexiflavinus</i>	Proteobacteria, β-Proteobacteria
OKO2-1	DX252089		<i>Cyanothece</i>	Proteobacteria, γ-Proteobacteria	VE14	DX364344	98	<i>Archeobacter</i>	Proteobacteria, β-Proteobacteria
OKO2-18	AY124340		<i>Bacterium</i> CSS7	Bacteroidetes, Sphingobacteriales	VE15, VE17, VE18	AY113396	91	<i>Sulfirospirillum</i>	Proteobacteria, γ-Proteobacteria
OKO2-12, OKO2-1AF320093		89	<i>Halomonas</i>	<i>Cyanobacteria</i> , Oscillatoriales	VE16	CP000155	96	<i>Thiomargarita</i>	Proteobacteria, γ-Proteobacteria
OKO2-10	AB195760		aquatic bacterium RI-1828	unclassified Bacteria	VE16	ME2732	92	<i>Clostridium</i>	Firmicutes, Mollicutes
					VE23	DX350129	97	<i>Dactylomonas</i>	Firmicutes, Clostridia
					VE24	AY673390	91	<i>Planctomyces</i>	Planctomyces, Planctomyces
					VE25	AY049713	92	<i>Leitopharum</i>	Leitopharum, Leitopharum
					VE26	AB298736	92	<i>Rickettsiella</i>	Bacteroidetes, Bacteroidales
					VE29, VE121	DX375588	90	<i>Bacteroides</i>	Bacteroidetes, Bacteroidales
					VE127	AY454251	92	<i>same name put bacterium</i> PFC1	unclassified Bacteria

の延命化および新規埋立地の確保が長年重要な課題となってきた。1969年より供用されてきた当該地域の旧埋立地(OKO)は、面積が約100,000m<sup>2</sup>、および容積が約2,400,000m<sup>3</sup>という広大な敷地を有している。開始当初は収集ごみの多くが直接埋め立てられてきたが、二年後の清掃工場の完成とともに、焼却残さおよび不燃物主体の埋め立てへと移行し、2001年まで使用された。また、1993年からは、旧埋立地の隣接地に埋立て面積48,000 m<sup>2</sup>(10)の新埋立地(OKN)が供用開始され、旧埋立地と併用されてきた。OKNの埋立物は焼却残さ、不燃物、および破碎処理残さであり、内容はOKOとは若干異なる。

なお、浸出水の採水は異なる季節に2度行った(3.1節参

照)。いずれの採取時においても、水質はほぼ一定であり、OKO埋立地はpHが8.4、BODが60-80 mg・l<sup>-1</sup>、およびCODが90-100 mg・l<sup>-1</sup>であったのに対し、OKN埋立地ではpHが8.4、BODが20-30 mg・l<sup>-1</sup>およびCODが180-200 mg・l<sup>-1</sup>であった。東南アジア諸国と比較すると、有機性廃棄物を含んでいるOKO埋立地の浸出水であってもBOD濃度は低く、廃棄物分解が進行していることがうかがわれる。一方、OKN埋立地は埋立中であるがBOD濃度は低く、COD濃度が高いことから、中間処理による埋立物の無機化の影響を受けていることが示されている。

### 3. 実験材料および方法

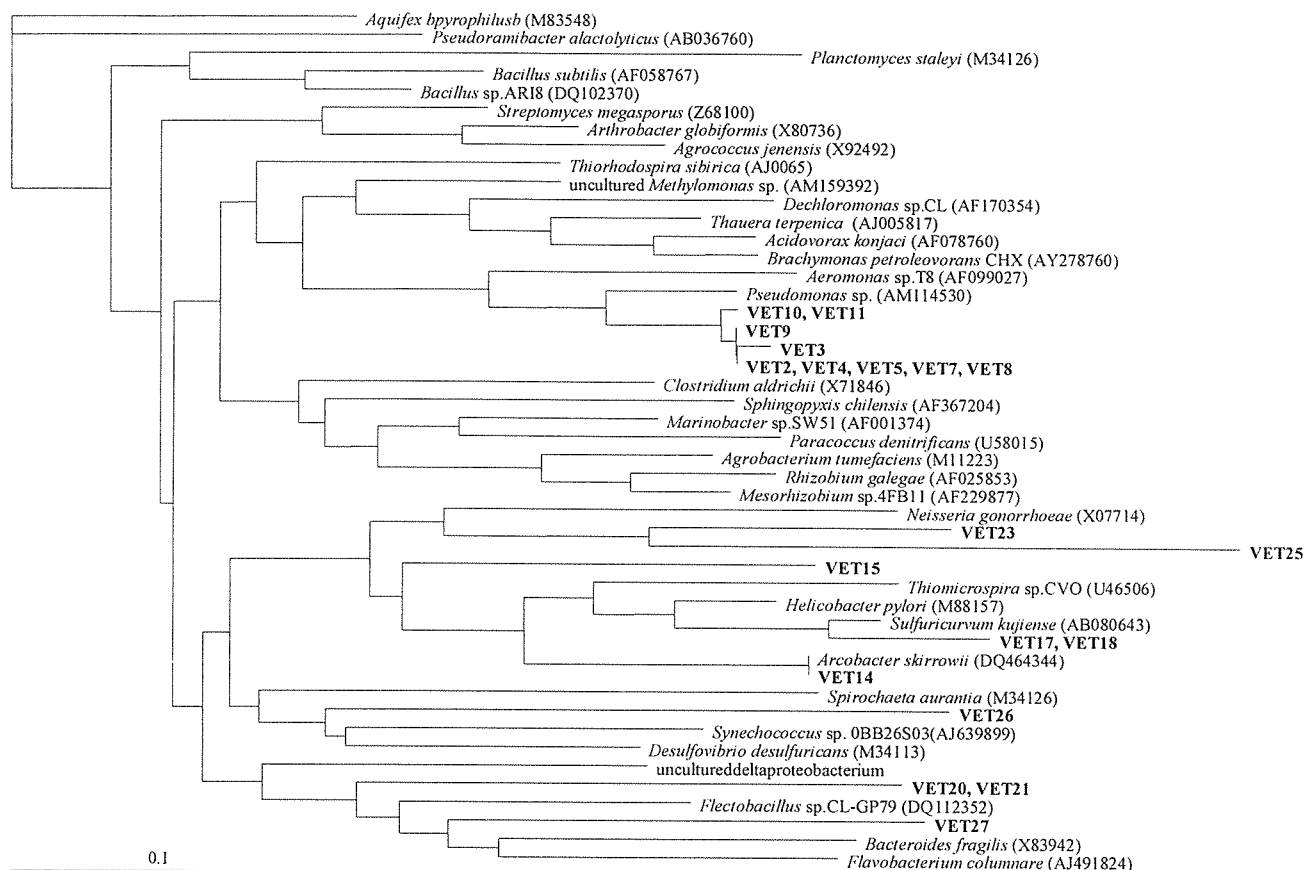


Fig.3 Phylogenetic tree based on eubacterial 16S rDNA for the clone sequence obtained from Go Cat landfill and representative members of *Eubacteria* as determined by maximum likelihood method.

### 3.1 浸出水試料

浸出水試料とし、以下の8種類を供試した。タイのホアヒン埋立地において2005年10月に採水した。この埋立地からの浸出水は埋め立てが終了した区画およびその後供用された区画から個別の浸出水の採水は構造上できず、両区画から発生した浸出水の混合物(THC)を採取した。現在供用中の区画において、埋立層内部から表層への湧出水 (THB) が確認された。これはTHCとは異なり、埋立直後の分解初期過程にある区画であり、かつ埋立層からの湧出水であることから深層部へ浸透していないなどの違いがあり、内部性状の評価に係る対照として実験に供された。浸出水処理の目的で安定化池が設置されており、その安定化池 (THG) から試料を採取した。ベトナムのホーチミン市にあるGo Cat埋立地にて2007年3月に、埋立層に設置された集水管出口より浸出水 (VET) を採取した。以上の熱帯地域の埋立地は、都市ゴミなどが埋め立てられている稼働中の埋立地である。

また、国内の亜熱帯地域に位置する閉鎖後の埋立地 (OKO) および現在埋め立て中 (OKN) の浸出水原水を1回目2006年6月と2回目2007年2月の計2回 (6月採水: OKO1およびOKN1, 2月採水: OKO2, OKN2) 採水を行った。1回目の浸出水採水時は、OKN埋立地は埋め立て中であり、2回目の採水時は埋め立てが完了する直前であった。

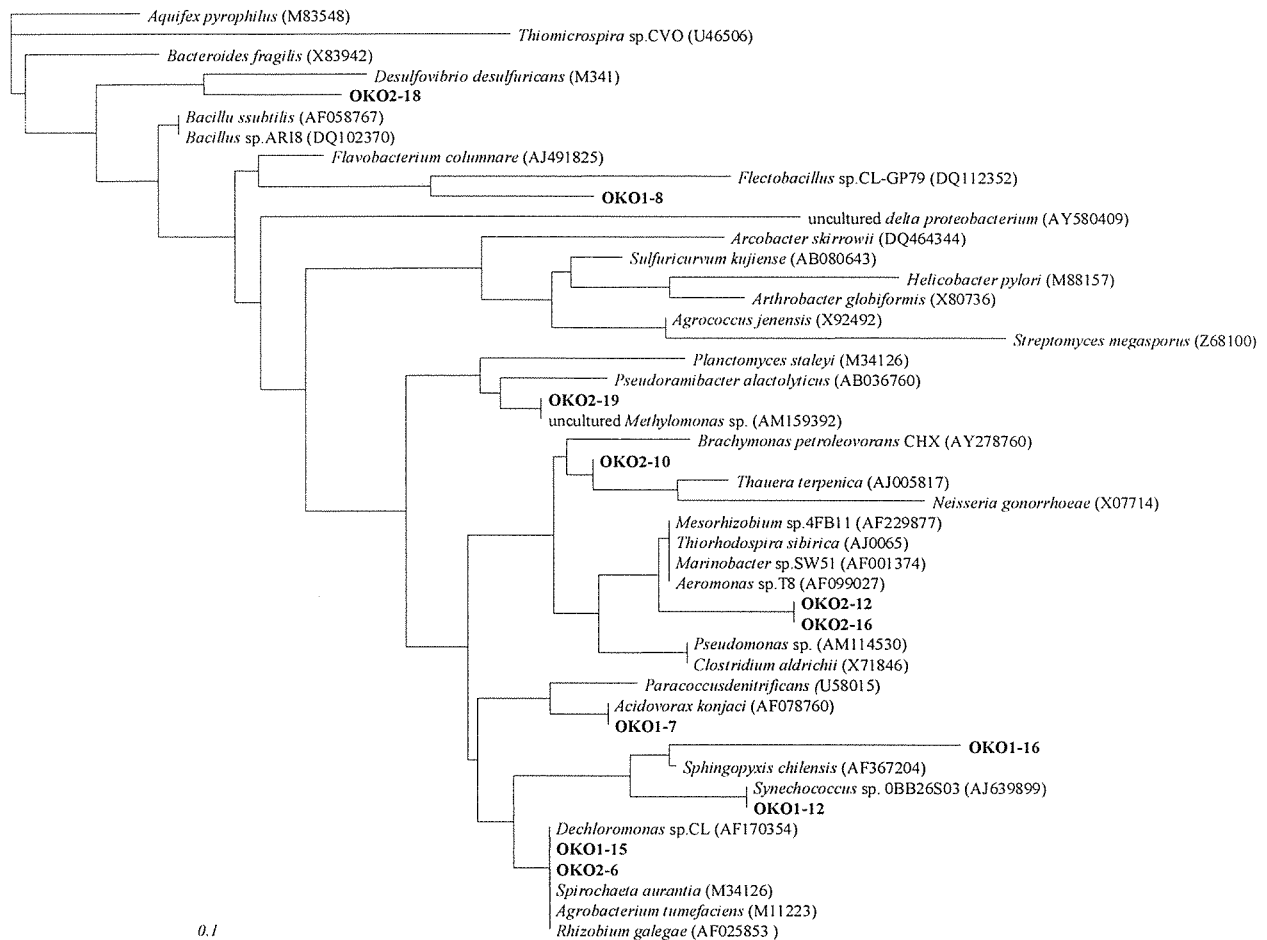
### 3.2 浸出水からのDNA回収

浸出水中の微生物菌体をMillipore Microfil (孔径0.22

μm)上に回収するとともにISOIL for Beads Beading (NIPPON GENE)により核酸を抽出した。得られたDNA溶液をMicrocon PCRにより精製した後、実験に供した。

### 3.3 16S rDNAによるクローン解析および相同性検索

上記で調製した核酸を、真正細菌の16S rRNA遺伝子を標的とするプライマーペア10F (5'-CAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3'), 1492r (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')を用いて増幅した。反応条件はAmpliTaq Gold Taq DNA polymerase (Roche) 1.5 U, dNTP 200 μM each, forward primer 1 μM, reverse primer 1 μM, DNA template 5 μl)とした。PCR産物をMicroSpin S-400 HR Columns (GE Healthcare)で生成し、TaKaRa ligation kitによりpT-7 Blue (Novagen) ligation 反応後、*E. coli* DH5α Competent Cells (TaKaRa)による形質転換させた。X-gal を塗布したLB培地にプレーティングし、37度で一晩培養後、白色のコロニーを無作為に採取した。採取したコロニーをPCR反応液に浸し、ベクターのM13を標的とするM13 -M4およびM13- RVプライマー(TaKaRa)を用いPCR反応を行った。得られたPCR産物は、アガロースゲル電気泳動によってインサートのサイズを確認した後、反応液をMicroSpin S-400 HR Columns (GE Healthcare)で精製した後、塩基配列自動解析装置CEQ8000(Beckman Coulter)を用いて塩基配列の決定を行った。得られた塩基配列について、アメリカ国立バイオテクノロジー情報センターのBlast検索<sup>11)</sup>によって既知種との相同性を評価した。



**Fig.4** Phylogenetic tree based on eubacterial 16S rDNA for the clone sequence obtained from OKO landfill and representative members of *Eubacteria* as determined by maximum likelihood method.

#### 4. 実験結果および考察

##### 4.1 タイ・ホアヒン埋立地浸出水の微生物群集解析

ホアヒン埋立地の浸出水 (THC) から得られた真正細菌 16S rDNA クローンの相同性解析の結果、 $\alpha$ -、 $\beta$ -および  $\gamma$ -*Proteobacteria* に高い類縁性を示すクローンが複数確認された (Table 1)。特に、脱塩素能力を有する嫌気性細菌である *Dechloromonas* 属および埋立地から発生するガスの主成分であるメタンを酸化分解可能な *Methylomonas* 属などは、これまでの我が国の埋立地浸出水からも検出されており<sup>12)</sup>、廃棄物埋立地の層内の強い還元的環境を反映していることが推測される。また、放線菌を含む *Actinobacteria* 門に類縁のクローンは、日本の埋立地では安定化が未進行な埋立地から検出されている<sup>12)</sup>。

浸出水処理のラグーン (THG) から得られた真正細菌 16S rDNA の相同性解析の結果、浸出水と同様に *Proteobacteria* 門に類縁のクローンが多く確認されたが、酸素発生型光合成細菌である *Cyanobacteria* 門などの検出は、浸出水の処理過程としての安定化池での長い滞留時間を反映しているものと推測される。埋立層からの湧出水 THB から得られた真正細菌 16S rDNA の相同性解析の結果、*Proteobacteria* 門は優占せず、*Firmicutes* 門に類縁のクローンが多く検出され、また菌種の大部分が絶対嫌気性の有機栄養細菌である  $\epsilon$ -*Proteobacteria* への高い類縁性が

示された。 $\epsilon$ -*Proteobacteria* は、深海や熱泉などの特殊環境<sup>13,14)</sup> からの検出が報告されており、国内の埋立地では有機物が多量に残存し、きわめて高温の廃棄物層からの検出例がわずかにある。*Firmicutes* 門に属すると考えられる細菌グループが検出されたことから、埋立層内が強度の嫌気的環境となっていることが推測された。湧出水が得られたサイトは埋立中の区画であり、埋立が終了した区画では、覆土の施行量が異なり廃棄物の分解過程あるいは埋立地内部の環境条件に影響を与え、異なる細菌群集を形成した可能性がある。有機成分を含有する廃棄物の分解初期過程において、THC とは異なる細菌群集を形成している可能性が示された。ホアヒン埋立地より得られたクローンの系統樹を Fig. 2 に示す。ここでは、得られたクローンのうち、系統分類上の位置が系統樹上に明確に表記可能なクローンを対象として示した。THC および THG より得られたクローンは、 $\beta$ -*Proteobacteria* の類縁にクラスターを形成している一方、THB と THG より得られたクローンは CFB (Cytophaga-Flexibacter-Bacteroidetes) グループの類縁にクラスターを形成した。安定化池には、浸出水および湧出水の双方が流入しており、各々由来の細菌群の共存が伺われる。欧米の温帯地域では、表層土壌での生物学的メタン酸化によって、メタン放出量は夏季に少なく、冬季に多い事が知られている<sup>15, 16)</sup>。しかしホアヒン埋立地は、熱帯地域の廃棄物埋立地でのガス発

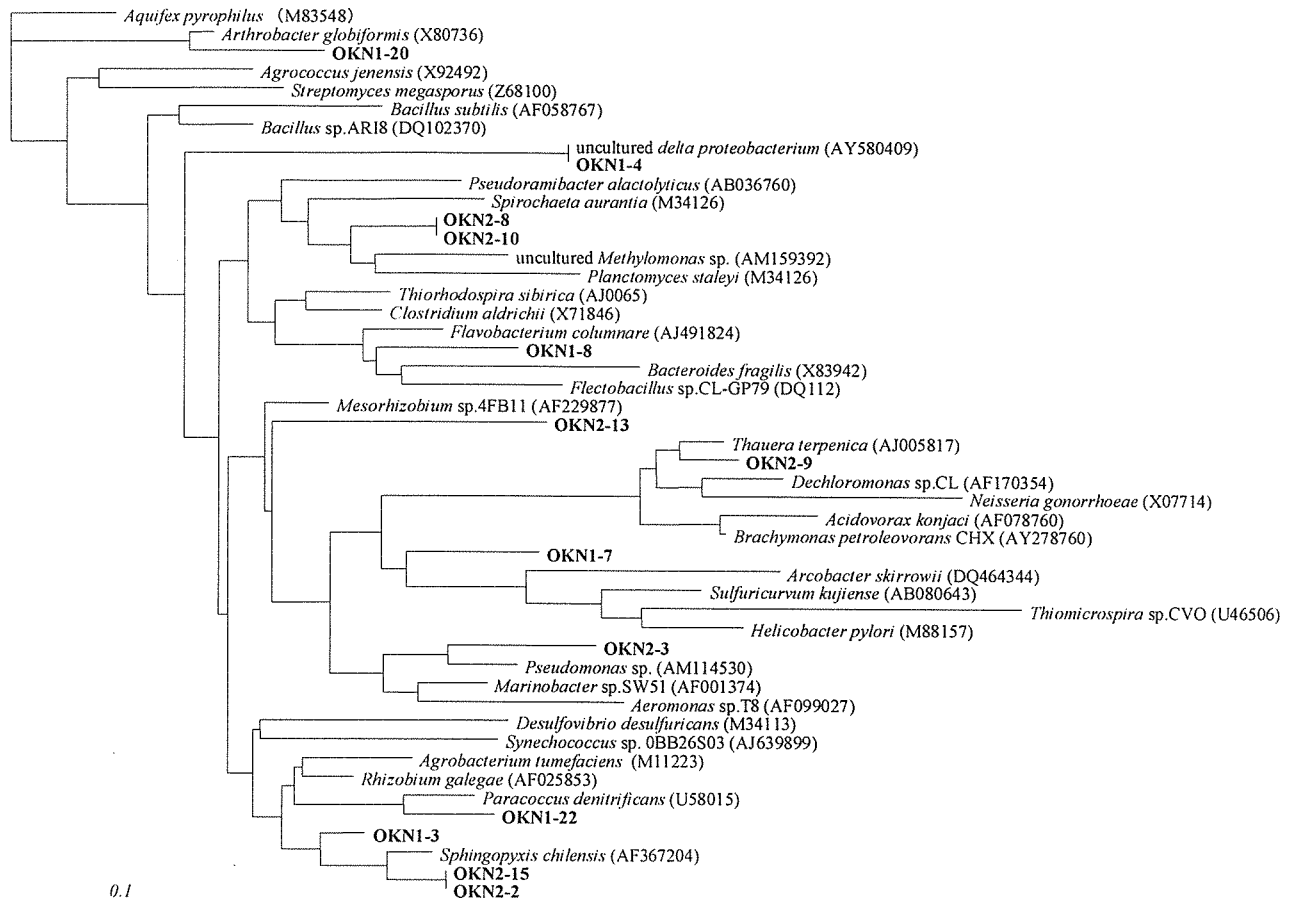


Fig.5 Phylogenetic tree based on eubacterial 16S rDNA for the clone sequence obtained from OKN landfill and representative members of *Eubacteria* as determined by maximum likelihood method.

生すなわち廃棄物分解の挙動が、温帯地域のそれとは異なることを示しており、数少ない事例が蓄積されたといえる。こうしたことを踏まえて、ホアヒン埋立地に存在する微生物群集に関する知見が得られたことは、熱帯地域の埋立地における安定化挙動の特殊性を検討する上で重要な因子といえる。

なお今回示したクローン数は微生物生態系を表現するには少ないと考えられ、十分な解析にはさらなる事例の集積が必要であると考えられる。一方で、日本の温帯地域の埋立地において同程度の真正細菌 16S rDNA クローン数に対する解析結果が、存在する微生物生態系の一定範囲を充分表現可能であることが T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 解析の結果をもって示されており<sup>17)</sup> 今回の浸出水より得られたクローンについても埋立地の微生物群集についてある程度は表現されているととらえられる。

#### 4.2 Go Cat埋立地浸出水の微生物群集解析

乾季(3月)にホーチミン市のGo Cat埋立地から採水した浸出水原水(VET) から得られた真正細菌 16S rDNA クローンは *Proteobacteria* 門に類縁のものが多く、同門の細菌の優占が示唆された。一方で、*Clostridium* 属および *Bacteroidetes* 門などの嫌気性細菌のグループに近縁のクローンもいくつか確認されており、埋立層内が強い嫌気的環境下にあることが推測される。特に、Go Cat埋立地は、埋立地ガス回収および発電を目的として表層にライナーを敷設しており、覆土を通じた外気との接触・交換が行われにくいことから、強い嫌気的環境にあることが、

一つの要因としてあげられる。また、 $\epsilon$ -*Proteobacteria* に分類される嫌気性細菌である *Sulfurospirillum* 属および硫黄酸化細菌である *Thiomicrospira* 属等、極限環境から検出される菌種に近縁のクローンも確認され、ホアヒン埋立地同様に還元的雰囲気、生物反応熱による高温、およびガス発生による高圧などの埋立層内環境の特殊性を反映している可能性が高いことが示唆された。得られたクローンの系統樹を Fig. 3 に示す。ホアヒン埋立地における THB および THG と同様に、CFB グループの近縁にクラスターを形成した他、 $\gamma$ -*Proteobacteria* 類縁のクラスターを形成していることが示された。一方で、クラスターを形成せず、系統分類分散したクローンがいくつか検出されていることも明らかであり、本埋立地に存在する微生物群集生態系の多様性を示していると考えられた。

#### 4.3 日本国内の埋立地浸出水の微生物群集解析

比較的雨量の多い2006年6月に採水した浸出水から得られた真正細菌 16S rDNA クローンのうち、埋立中の埋立地 (OKN1) 由来クローンの多くは、 $\alpha$ - および  $\gamma$ -*Proteobacteria* への高い類縁性が示唆された。一方、閉鎖後の埋立地 (OKO1) 由来クローンは、*Proteobacteria* に加え、*Bacteroidetes* および *Firmicutes* 門などに類縁であることが示された。OKO と OKN は近接した埋立地であり、気象条件は同等であることから、微生物群集の違いは、埋立物の差異ならびに埋立後の時間経過、すなわち廃棄物分解進行過程に依存すると推測される。

さらに、その8ヶ月後の雨量の少ない時期(2007年2月)に埋め立て中のOKN埋立地浸出水 (OKN2) から得られた



クローンの多くは、*Proteobacteria*に高い類縁性を示したが、同時に*Firmicutes*に類縁のクローンも検出されるなど、時間経過による微生物群集の変化が示唆される結果が得られた。また、同時期に採取された閉鎖後の埋立地浸出水(OKO2)から得られたクローンは、OKO1で得られたクローンと系統分類上近縁に位置しているものが多く、微生物生態的には急激な変化がなく安定した状態にあると考えられた。OKO埋立地は閉鎖されたサイトであり、埋立層内の廃棄物分解が緩慢にかつ長期間にわたって継続している過程にあり、微生物群集はこうした廃棄物埋立地特有の安定化挙動を反映していると推測された。得られたクローンの系統樹をFig. 4およびFig. 5に示す。OKO埋立地から検出されたクローンは、 $\gamma$ -*Proteobacteria*に近縁のクラスターを形成していること、ならびにOKN埋立地から検出されたクローンは*Cyanobacteria*,  $\alpha$ -*Proteobacteria* および $\gamma$ -*Proteobacteria*に近縁のクラスターを形成していることが示された。これは、年次の違いもしくは、埋立物の違いが原因としてあげられる。しかしOKN埋立地は、同じく埋立中であるホアヒン埋立地およびGo Cat埋立地とも異なる微生物群集を形成していることから、年次の違いよりも、むしろ埋立物の性状を要因とする微生物群集形成の差異が大きいことが推測される。

## 5. まとめ

東南アジア諸国においては、廃棄物埋立地の適正管理の上で必要となる安定化モニタリングの事例は、ほとんどないことから、廃棄物の分解過程については不明な点が多い。本研究で対象としたホアヒンおよびGo Cat埋立地についてこれまで明らかになっている事項としては、浸出水の有機物濃度が高くおよびガスの排出量が多いことなど、有機物が多量に埋め立てられた廃棄物埋立地と同様の特徴を示していた。一方で、気候や管理方法の違いから、埋立層内での廃棄物分解の状態を判断し、安定化の進行過程を予測することは困難であった。本研究では、埋立地での廃棄物分解を担う微生物生態系を調査することで、埋立地の安定化挙動を予測するための知見の集積を行った。今回対象としたいずれの埋立地においても、*Firmicutes* 門および*Bacteroidetes* 門と考えられる細菌グループが検出されたことから、埋立層内が強度の嫌気的環境となっていることが推測された。一方で、ホアヒンおよびGo Cat埋立地に共通して確認されたCFB群および $\epsilon$ -*Proteobacteria*に類縁の各細菌グループは、日本の亜熱帯における埋立地からは検出されなかったものの、東南アジア地域において検出された。一方で、Go Cat埋立地と、日本のOKO・OKN埋立地では、 $\gamma$ -*Proteobacteria*のクラスターを形成するなどの共通点もみられた。しかし、OKO埋立地とOKN埋立地の間では、群集の特徴には相違点の方が多く、埋立物の有機物含有率などの差異が、微生物群集の形成に影響していることが示唆された。現

状では、今回得られた熱帯・亜熱帯の埋立地に存在する微生物群集の情報に対して温帯地域での廃棄物埋立地の挙動を以て、予測せざるを得ない。今後は亜熱帯・熱帯地域の埋立地の浸出水中に存在する微生物群集の変動と埋立地における廃棄物の分解過程との関連についての理解を深めるとともに、埋立物の相違や気候による特徴などを視野に入れ、検討をすすめる必要がある。

(原稿受付 2007年 7月 5日)

(原稿受理 2007年10月10日)

## 参考文献

- Zurbrugg C. (2003) Urban solid waste management in low-income countries of Asia - how to cope with the garbage crisis, Sandecpublications. Available from: <<http://sandec.ch/Publications/PublicationsHome.htm#SWM>>.
- Christensen T.H., Cossu R. and Stegmann R. (1996) Landfilling of waste : bio gas, Taylor & Francis, 3.
- 澤村啓美, 石垣智基, 山田正人, 小野雄策, 長森正尚, 長谷隆仁, 池道彦 (2007) 廃棄物埋立地の浸出水中の微生物群集解析, 第41回日本水環境学会年会講演集, 597.
- Li-Nan H., Shuang Z., Hui Z. and Liang-Hu Q. (2005) Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with the leachate of a closed municipal solid waste landfill, *FEMS Microbiol. Lett.*, **242**, 297-302.
- People's Committee of Ho Chi Minh City: VIE/96/023 project (2002) Technical reports for the HCMC environmental quality management strategy, Section 2, Part 2 and Part 10.
- <http://www.hochiminhcity.gov.vn/eng>
- 国立環境研究所 (2006) 平成17年度アジア諸国の廃棄物フローデータの作成業務報告書, CD-ROM.
- Sang N. N., Soda S., Sei K., Ishigaki T., Triet L. M., Ike M. and Fujita M. (2007) Performance of lab-scale membrane bioreactor for leachate from Go Cat landfill in Ho Chi Minh City, Vietnam, *J. J. Water Treat. Biol.*, **43**, (1) 43-49.
- <http://www.jma.go.jp/jma/index.html>
- <http://www.env.go.jp/>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- Ishigaki T., Sawamura H., Yamada M., Inoue Y., Ono Y. and Ono Y. (2006) Microbiological community change during waste landfill stabilization, 4th Int. Landfill Symp. 102-103.
- Postec A., Urios L., Lesongeur F., Querellou J., Godfroy A. and Olliver B. (2005) Continuous enrichment culture and molecular monitoring to investigate the microbial diversity of thermophiles inhabiting deep-sea hydro thermal ecosystems, *Curr. Microbiol.*, **50**, (3), 138-144.
- Campbell B. J., Engel A. S., Porter M. L. and Takai K. (2006) The versatile  $\epsilon$ -*proteobacteria* key players in sulphidic habitats, *Nat. Rev. Microbiol.*, **4**, (6), 458-468.
- Christophersen M., Kjeldsen P., Holst H. and Chanton J. (2001) Lateral gas transport in soil adjacent to an old landfill: factors governing emissions and methane oxidation, *Waste Manag. Res.*, **19**, 126-143.
- Maurice C. and Lagerkvist A. (1997) Seasonal variation of landfill gas emissions, Proc Sardinia 97, 6th Int. Landfill Symp. 87-93.
- 石垣智基, 李泰鎬, 山田正人, 鎌形洋一 (2002) 廃棄物埋立地浸出水における微生物群集構造とその機能的役割, 日本水処理生物学会誌 別巻, **22**, 27.