

青森・岩手県境産業廃棄物不法投棄現場および その周辺における土壌細菌群集解析

鮎川 恵理*・大 嶋 倫 和**・小比類巻 孝幸***
村 中 健****・奥 田 慎 一*****

The Bacterial Community Structure in the Soils Sampled in the Area Illegally Disposed Industrial Waste, the Boundary Area between Aomori and Iwate Prefecture

Eri S. AYUKAWA*, Tomokazu OHSHIMA**, Takayuki KOHIRUIMAKI***,
Takeshi MURANAKA**** and Shinichi OKUDA*****

Abstract

The bacterial community structures in the soils sampled in the area where industrial waste were illegally disposed, the boundary area between Aomori and Iwate prefecture were studied by using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The soil samplings were held 6 times from Nov. 2004 to May, 2007. The DGGE profiles and principal-component analysis (PCA) demonstrated the bacterial community in the waste was apparently different from the other communities in the soils sampled around the area, nevertheless the dumping was more than 10 years before. The communities in the most of the sampled soils showed common pattern and this result had never changed through the sampling. These results suggest that the bacterial communities in the waste were apparently differed from the local communities, but these in the sampled soils were not affected by the illegal disposal.

Key words : DGGE, bacterial community, soil, illegal waste

1. はじめに

青森県田子町と岩手県二戸市にまたがる 27 ha の広大な土地に焼却灰、堆肥、汚泥、廃油、RDF などの推定 82 万 m³ もの産業廃棄物が不法に投棄され、大きな社会問題となっている。廃棄物からは主にテトラクロロエチレン、トリクロロエチレン、ジクロロメタンおよびベンゼンなどの揮発性有機化合物や、一部に鉛、ダイオキシン類が基準を超過して検出されるなど、複合汚染の状況を呈している¹⁾。さらには、注射器などの医療系廃棄物も不法に投棄されていた。この問題は 1998 年 12 月に発覚し、その後廃棄物の撤去が進められているが、本格撤去までの間は廃棄物表面に全面的に遮水シートを敷設しているに過ぎず、廃棄物の飛散などによる地域の土壌汚染が心配されている。

土壌細菌の分布や生育は土壌中の栄養塩濃度、化学物質などの影響により制限される²⁾ため、上述のような産

業廃棄物の不法投棄により、現場およびその周辺の土壌細菌群集に何らかの変化が生じている可能性が考えられる。近年、土壌微生物群集の解析には、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE; Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) が数多く用いられている。この方法は、土壌試料から直接 DNA の抽出を行うため、従来の平板培養法では検出不可能であった微生物を含めた解析が可能であり、群集を対象とした解析を行う上で有効な方法とされている³⁾。そこで本研究では、青森・岩手県境産業廃棄物不法投棄現場およびその周辺における土壌細菌群集について、DGGE 法を用いて明らかにし不法投棄の土壌細菌群集に対する影響を明らかにすることを目的とする。

2. 調査地および方法

2.1. 調査地

調査地は青森県田子町遠瀬の産業廃棄物不法投棄現場とその周辺の 6 地点とした (図 1)。採取は 2004 年 11 月 25 日, 2005 年 5 月 25 日, 11 月 24 日, 2006 年 5 月 25 日, 11 月 16 日, 2007 年 5 月 18 日の合計 6 回行った。調査点番号, 調査点名, 標高, 不法投棄現場からの距離を表 1 に示す。(1) 海上川は, 海上川沿いのスギの生育する斜面で, 水系も異なり不法投棄の影響がもっとも少ないと予

平成 20 年 1 月 7 日受理

* 生物環境化学工学科・異分野融合科学研究所・助教

** 循環型社会技術システム研究センター・研究員

*** 大学院工学研究科機械・生物システム工学専攻・生物環境化学工学科・准教授

**** 大学院工学研究科機械・生物システム工学専攻・生物環境化学工学科・異分野融合科学研究所・教授

***** 八戸工業大学名誉教授

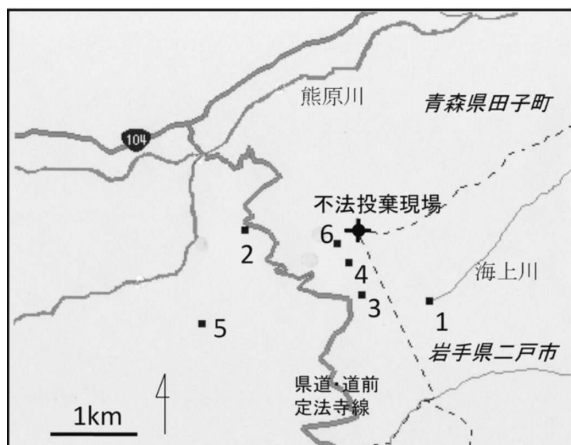


図1 調査地地図および土壌採取地点(青森県田子町)。各番号は表1の調査点番号に一致する。

表1 土壌採取を行った調査点, 調査点番号, 標高, 現場からの距離

調査点名	調査点番号	標高(m)	現場からの距離(m)
海上川	1	411	1,464
旧水源	2	237	1,964
ため池	3	440	357
場内	4	450	—
新水源	5	205	3,035
場内隣接森林	6	—	—

想される地点, (2) 旧水源は約 30 m ほどの距離をあけて畑のある草地で, 産業廃棄物の不法投棄が発覚するまで地域住民の水源として利用されていた場所であり, 調査期間を通じて, 定期的な草刈りが行われていた。(3) ため池は不法投棄現場から至近距離で, 10 m ほど離れたところに畑があり, 採取はため池にそそぐ, 沢近くのミズナラの根元で行った。(4) 場内は不法投棄現場内のことを示すが, 産廃の撤去にともない同じ場所からの採取が難しくなった。そのため, 2006 年 11 月 26 日, 2007 年 5 月 18 日の採取時には, 遮水シートに覆われていた褐色の泥状の廃棄物自体を採取し, 分析に用いた。(5) 新水源は不法投棄発覚後, 新たに設けられた水源で不法投棄現場から離れた場所で水系も異なり, 森林に囲まれた場所である。また, 2007 年 5 月 18 日の採取時には不法投棄現場に接する森林の土壌も採取し, (6) 場内隣接森林の試料とした。これらの調査点において, 表層から深さ約 5 cm までの土壌を滅菌済容器に採取し, DNA の抽出までは冷蔵庫 (5°C) で保管した。

2.2. 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE)

各試料土壌約 0.5 g を分取したのち, Fast Prep Kit for soil (BIO101, Ohio, USA) を用いて, キット付属のマニュアルに従い, 微生物群集由来の DNA を抽出した。抽出した DNA を鋳型として PCR 法により 16SrDNA の

約 200 bp (*Escherichia coli*, No. 341-534) を増幅した。その際に使用されたプライマーは表 2 の通りである。DNA ポリメラーゼには AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, CA, USA), サーマルサイクラーには Gene Amp System 9600 (Applied Biosystems, CA, USA) を用いた。PCR の条件は 94°C, 7 分 + (94°C, 60 秒 - 65 ~ 55°C, 60 秒 - 72°C, 120 秒) × 20 サイクル (2 サイクル毎にアニーリング温度が 1°C 下がるように設定) + (94°C, 60 秒 - 55°C, 60 秒 - 72°C, 120 秒) × 15 サイクル + 72°C, 10 分⁴⁾で行った。

PCR により目的配列が増幅されたことを確認するために, 2% アガロースゲルによる PCR 産物の電気泳動を行った。具体的には, 紫外線照射下でアガロースゲル中に電気泳動された増幅断片とマーカーである 100 bp DNA Ladder (TOYOBO, 大阪) を比較し, 目的の長さの増幅断片について確認を行った。

DGGE は Dcode DGGE コンプリートシステム (BIO RAD, CA, USA) を用いて行った。変性剤濃度勾配は電気泳動方向に 30% → 60% とし, ポリアクリルアミドゲル濃度は 10% とした。ゲル変性剤には尿素 (BIO RAD, CA, USA) とホルムアミド (BIO RAD, CA, USA) を用い, 泳動条件は電圧 200 V, 泳動時間 3.5 時間とした。

泳動後, 変性剤濃度勾配ゲルを Syber Green (タカラバイオ, 滋賀) で染色し, 染色された DNA が UV (310 nm) 照射下で発する励起光を CCD カメラで撮影した。撮影したゲルの画像は, 画像解析用ソフトウェアの ImageJ 1.38x (by Wayne Rasband) を用いてバンドの位置と有無の確認を行ったのち, 主成分分析 (principal component analysis; PCA) を行った。

2.3. DGGE により得られたバンドの塩基配列解析

2004 年 11 月 25 日, 2006 年 5 月 25 日, 2007 年 5 月 18 日に採取した試料においては, DGGE により得られたバンドの塩基配列解析を以下の方法で行った。DGGE 解析により得られたバンドをテンプレートとし, DGGE 用プライマー (表 2) を用いて 16SrDNA の約 200 bp を増幅した。PCR 条件は DGGE の際に行われた条件と同様とした。その後, PCR 産物を 2% アガロースゲル電気泳動を行い, 目的の長さと考えられる増幅断片を確認した。得られた PCR 産物を再度同様の方法で DGGE による泳動をし, バンドの純度を確認後バンド部分のゲルを切り出した。このバンドをテンプレートとし, PCR 増幅用プライマー (表 2) を用いて, 94°C, 10 分 + (94°C, 30 秒 - 48 分, 1 分 - 72°C, 90 秒) × 25 サイクル + 72°C, 10 分で PCR 反応を行い得られた産物を QIA quick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて精製, 塩基配列解析の試料とした。

精製した PCR 産物をテンプレートとし, シーケンシング反応に供した。シーケンシング反応は ABI

表2 使用プライマー

プライマー	方向性	塩基配列
DGGE 用		
GC-341f	Forward	5'-GC クランプ-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'
534r	Reverse	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'
PCR 増幅・シーケンス用		
341f	Forward	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'
534r	Reverse	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'

GC クランプ; CGCCCGCCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG

PRISM BigDye Terminator Kit (Applied Biosystems, CA, USA) とシーケンシングプライマー (表 2) を用い、Gene Amp PCR System 9600 (Applied Biosystems, CA, USA) 上で行った。反応生成物は DyeEx 2.0 Spin Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて精製し、ABI PRISM 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems, CA, USA) で配列解析を行った。得られたバンドの配列と類似の塩基配列を国際塩基配列データベース (GenBank/EMBL/DDBJ) から検索するため BLAST による相同性検索を行った。

3. 結果および考察

各調査点での DGGE パターン (2007 年 5 月 21 日採取分) を図 2 に示す。このような結果で得られた各調査点間のバンドパターンの相違を明らかにするために行った主成分分析の結果を図 3 に示す。主成分分析とは、バンドパターンの類似性を 2 次元のグラフを用いて視覚化する方法で、電気泳動ゲル上でバンドパターンの類似しているサンプル同士は近くに、似ていないサンプルほど遠くに離れてプロットされる。図 3 から、2006 年 5 月 25 日までに採取された 4 回の土壌細菌群集については、不法投棄現場 (場内, 調査点 4) のバンドパターンはその周辺の群集と顕著な相違はみられない。しかしながら、2006 年 11 月 16 日と 2007 年 5 月 18 日に採取された 2 回では、不法投棄現場 (場内, 調査点 4) のバンドパターンがその他の調査点と著しく異なる。この 2 回の採取時は、廃棄物撤去に伴い不法投棄現場において適切な土壌の採取が不可能であったため、褐色の泥状の廃棄物自体の細菌群集の解析をしたことによるものと考えられる。このように、産業廃棄物自体の細菌群集は、投棄からおよそ 10 年程度経た時点においても周辺土壌の細菌群集と顕著な相違がみられることが明らかになった。2007 年 5 月 18 日においては、不法投棄現場に隣接する森林の土壌を採取した (場内隣接森林, 調査点 6) が、そのバンドパターンは不法投棄の影響が最も少ないと予想された海上川 (調査点 1) と同様であることから、廃棄物を含んだ土壌の飛散による汚染の可能性は低いと考えられる。また、2004 年 11 月 25 日から 2006 年 5 月 25 日までの採取日

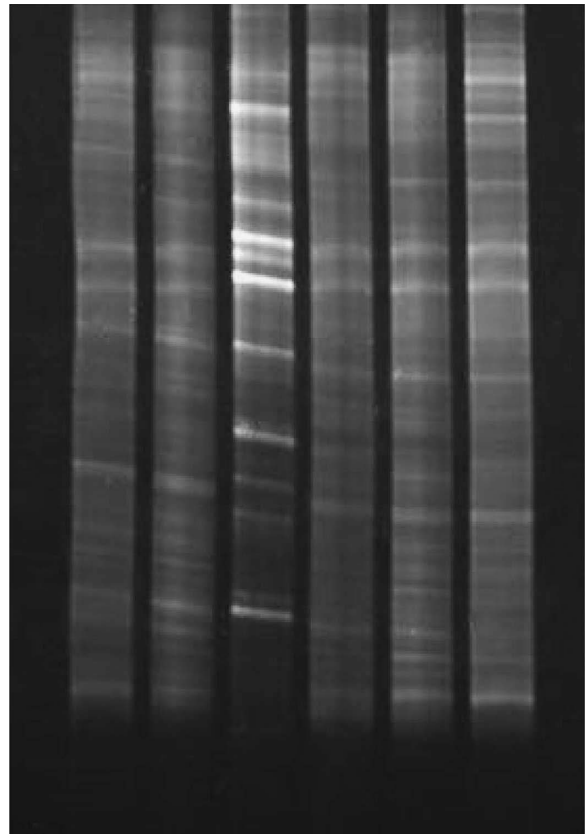


図2 2007年5月18日に採取された土壌細菌群集の DGGE バンドパターン。一番左のレーンより、旧水源(2)、ため池(3)、場内(4)、場内隣接森林、(6)海上川(1)、新水源(5)で採取された土壌サンプルのバンドパターンを示す。左から3番目のレーンのバンドパターンが著しく他とは異なっていることがわかる。

において、不法投棄現場内 (場内, 調査点 4) から採取された土壌の細菌群集のバンドパターンは周辺地域のものと顕著な違いがみられなかったことから、廃棄物による周辺の土壌微生物群集への影響は小さいと考えられる。

DGGE により得られたバンドの塩基配列配列解析により、すでに報告のある塩基配列とまったく同様の配列もみられた。そのうちのいくつかは、*Bosea thiooxidans*, *Microvirga subterranea* のように種名まで特定できたが、多くは不明であった。これは、解析されたバンドの塩基数が約 200 bp と短いことが一因であると考えられ

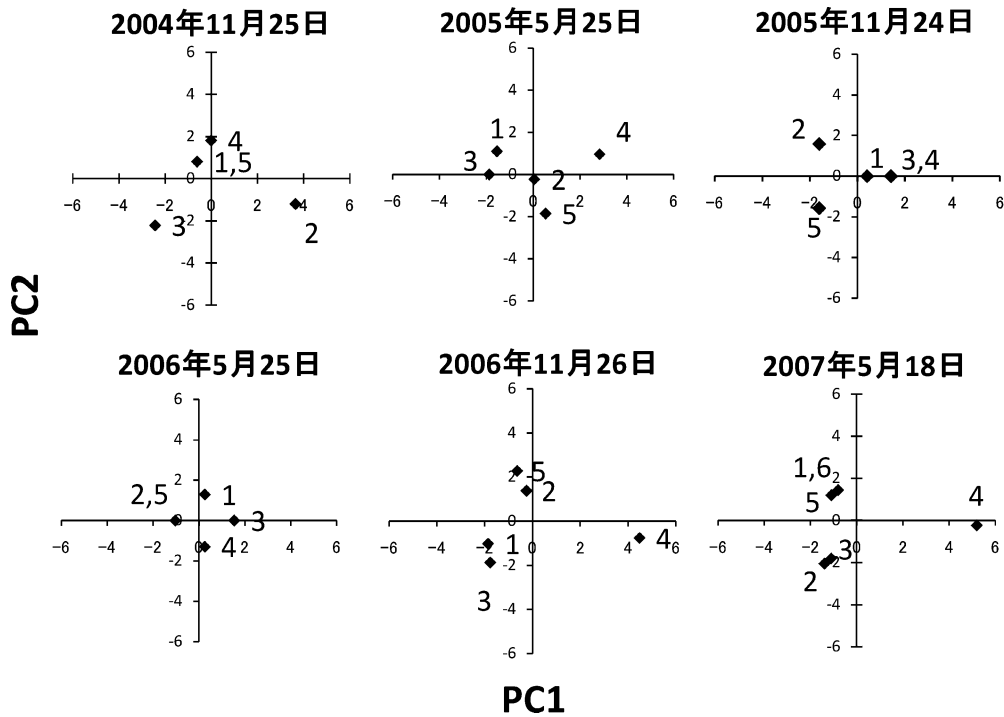


図3 DGGE バンドパターンの主成分分析結果。番号は調査点番号を示す。

る。不法投棄された廃棄物には、堆肥、医療系廃棄物などが混入していたが、今回の分析からは大腸菌群や病原性細菌の検出はみられなかった。

謝辞：本研究では、筑波大学大学院生命環境科学研究科内山裕夫教授に DGGE の方法についてご教示いただきました。ここに記して御礼申し上げます。

引用文献

1) 宇良直子, 則松 勇, 佐藤善栄, 船山重則 (2005) 青森・

岩手県境不法投棄対策における浸出水貯留池の土質遮水層の建設, 土と基礎 53, 5, 11-13.

2) Varnam A.H. and Evans M.G. (2000) Environmental Microbiology, Manson Publishing, London.
 3) 石井浩介, 中川達功, 福井 学 (2001) 技法シリーズ 微生物生態学への変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法の応用, 日本微生物生態学会誌 15, 59-73.
 4) Muyzer G., deWaal E.C. and Uitterlinden A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rDNA. Appl. Environ. Microbiol., 59, 695-700.