

・研究課題名・研究番号＝バイオマーカーを用いた途上国の廃棄物最終処分場の安定化診断手法の開発 (K 2 0 4 5)

・国庫補助金精算所要額 (円) = 8,612,000

・研究期間 (西暦) = 2007-2008

・代表研究者名 = 藤田昌史 (茨城大学)

・共同研究者名 = 坂本康 (山梨大学)

・研究目的＝アジアの途上国において、近い将来直面する廃棄物最終処分場の廃止・再生化・延命化の判断を支援することを目指して、埋立廃棄物の直接の担い手である微生物群のコンソーシアを反映していると考えられる浸出水中のバイオマーカーに着目することにより、途上国で広く普及しているオープンダンプ型、改良型衛生埋立型の廃棄物最終処分場の安定化診断手法を開発する。また、さまざまな定義が存在する安定化の概念に対し、バイオマーカーという新しい視点からの提言を行う。そのために、以下の3項目について検討する。

- 1) インドネシア、台湾で調査対象とする最終処分場の選定
- 2) 浸出水の水質、バイオマーカーの各種データの蓄積と解析
- 3) バイオマーカーを用いた安定化診断手法の検討

・研究方法 = (1) 調査地の概要および採水

インドネシアのオープンダンプ型 (3カ所)、台湾の改良型衛生埋立型 (7カ所) の合計10カ所の最終処分場を調査対象とした (表-1)。DL (2004年以降) や TP では焼却残渣が埋め立てられていたが、それ以外の施設では都市ゴミが埋め立てられていた。これらの施設から浸出水を 1L 程度採水し、後述する水質分析、キノン分析、T-RFLP 分析に供した。基本的に晴天日に採水したが、RI の採水するときだけは降雨時であった。

## (2) キノン分析

キノンは、微生物の電子伝達鎖に存在し、水素キャリアーとして機能する補酵素のことである。好気性呼吸をする微生物群が持つユビキノン (Q-n)、嫌気性呼吸をする微生物群が持つメナキノン (MK-n ( $H_x$ )) に大別される。ここで、n、 $H_x$  は、それぞれイソプレノイド側鎖数およびその水素飽和度 x を表す。一微生物種は、一つの優占キノンを持つことが知られていることから、検出されたキノンの構成割合を手掛かりにして、微生物群集構造を評価することができる<sup>1)</sup>。

採取した浸出水は、重量を測定後、孔径 0.3 $\mu$ m のガラス繊維ろ紙を用いてろ過し、得られたろ過残渣を分析に供した。キノンの抽出には、クロロホルム・メタノール溶液 (2 : 1、v/v)、ヘキサンを順次用いた。その後、ヘキサン抽出物を固相抽出カートリッジに吸着させ、2%、10% のジエチルエーテル・ヘキサンを用いて、メナキノン、ユビキノンをそれぞれ回収した。そして、アセトンに溶媒置換した。その後、移動相として、メタノール・ジイソプロピルエーテル

表-1 調査対象とした最終処分場

Country	Abbreviation of Sites	Structure	Operation Period	Landfilled Solid Wastes
Indonesia	CL	Open dumping	1992 ~	MSW
	BL		1992 ~	
	SL		1997 ~	
Taiwan	DS	Modified Sanitary Landfill	1984 ~1995	MSW
	SS		1992 ~ 2005	
	RI		1992 ~	1994 ~ 2004: MSW 2004 ~ : Ash
	DL		1994 ~	
	ZS		1997 ~	MSW
	NT		1998 ~	
	TP		2004 ~	Ash

溶液（9：2、v/v）を用いて、HPLCにより同定・定量した。

各処分場のキノプロファイルの類似性を平面図で視覚的に表現するために、多次元尺度構成法<sup>2)</sup>（MDS）による解析を行った。ここでは、類似性の指標としてユークリッド距離を用いた。また、各々のキノプロファイルを微生物群の多様性の観点で評価するために、多様性指数<sup>3)</sup>（DQ）を算出した。なお、DQの算出式を式-1に示した。

$$DQ = \left( \sum_{k=1}^n \sqrt{f_k} \right)^2 \quad (\text{式-1})$$

ここで、 $f_k$ はキノ種 $k$ の存在比、 $n$ は検出されたキノ種の総数を表す。DQが高いほどキノプロファイル、すなわち微生物群の多様性は高いことを表している。また、 $f_k < 1$ であるため、存在比の小さいキノ種ほど、より大きく見積もられ、DQが算出される。

・結果と考察 = (1) 浸出水の水質と各処分場の分類

各処分場の浸出水の溶存態有機炭素（DOC）、溶存態全窒素（DTN）、DOC/DTN比を図-1に示した。稼働年数とこれらの水質の間には、特に明確な関係は見られなかった。ここでは、各処分場のDOC、DTNのデータを用いて、これらの平均が0、分散が1となるように標準化した後、非類似度としてユークリッド距離を算出し、Ward法によるクラスター解析を行った。そして、各処分場を分類した。その結果、4つのグループ、Gr-1（DL、TP）、Gr-2（BL、SS、NT）Gr-3（RI、ZS）、Gr-4（CL、SL、DS）、に分類された。これらの水質や稼働年数などを総合的に判断すると、Gr-1、Gr-2、Gr-3、Gr-4の順に安定化が進行しているものと考えられる。

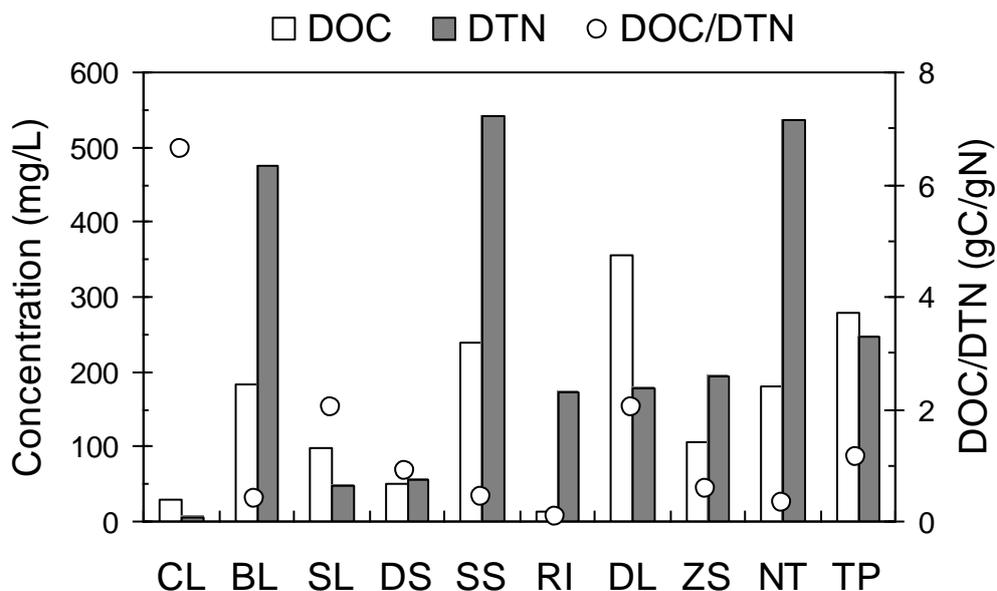


図-1 各処分場の浸出水の DOC、DTN、DOC/DTN 比

## (2) 浸出水中のキノプロファイル

各処分場における浸出水のキノプロファイルを図-2 に示した。DL (Gr-1)、BL、SS、NT (以上、Gr-2)、ZS (Gr-3)、DS、SL (以上、Gr-4) では Q-8、CL (Gr-4) では MK-8 (H2)、RI (Gr-3) では Q-10、TP (Gr-1) では MK-7 の存在比が最も高かった。Q-8 は *β-Proteobacteria*、Q-10 は *α-Proteobacteria*、MK-8 (H2) はグラム陽性高 GC、MK-7 はグラム陽性低 GC がそれぞれ優占キノ種として含有することが知られている<sup>1)</sup>。このような優占キノ種の違いは、異なる微生物群が優占していたことを示している。ただし、前述したように、RI では降雨時に採水したことから、流出しやすい微生物群が有するキノ種である Q-10<sup>4)</sup> の存在割合が卓越したものと考えられる。その意味では、これ以降の検討から除外する必要がある。また、CL も特徴的なキノプロファイルを示しているが、この処分場では、浸出水が流出せずに、地表面に滞留しているところから採水せざるを得なかったことから、これが関係しているのかも知れない。これも今後の検討から外すことにした。

好気性微生物群と嫌気性微生物群のおおよその存在比を調べるために、Q/MK 比を算出したところ、CL、BL、TP 以外の処分場では 1 を上回っていた、これは、潜在的に好気呼吸する微生物群がより多く生息していたことを表している。言い換えると、これらの 3 カ所の処分場では、潜在的に嫌気呼吸する微生物群がより多く存在していたことを示している。

各処分場間におけるキノプロファイルの違いを統計学的に評価するために、キノ存在比から非類似度を算出した。その結果、いずれも 0.1 を上回った。既報の判定基準<sup>1)</sup>を参考にすると、これらの処分場間の微生物群集構造は実質的な相違があると判断された。したがって、各処分場内部の環境条件は、明らかに異なっていたと解釈できる。

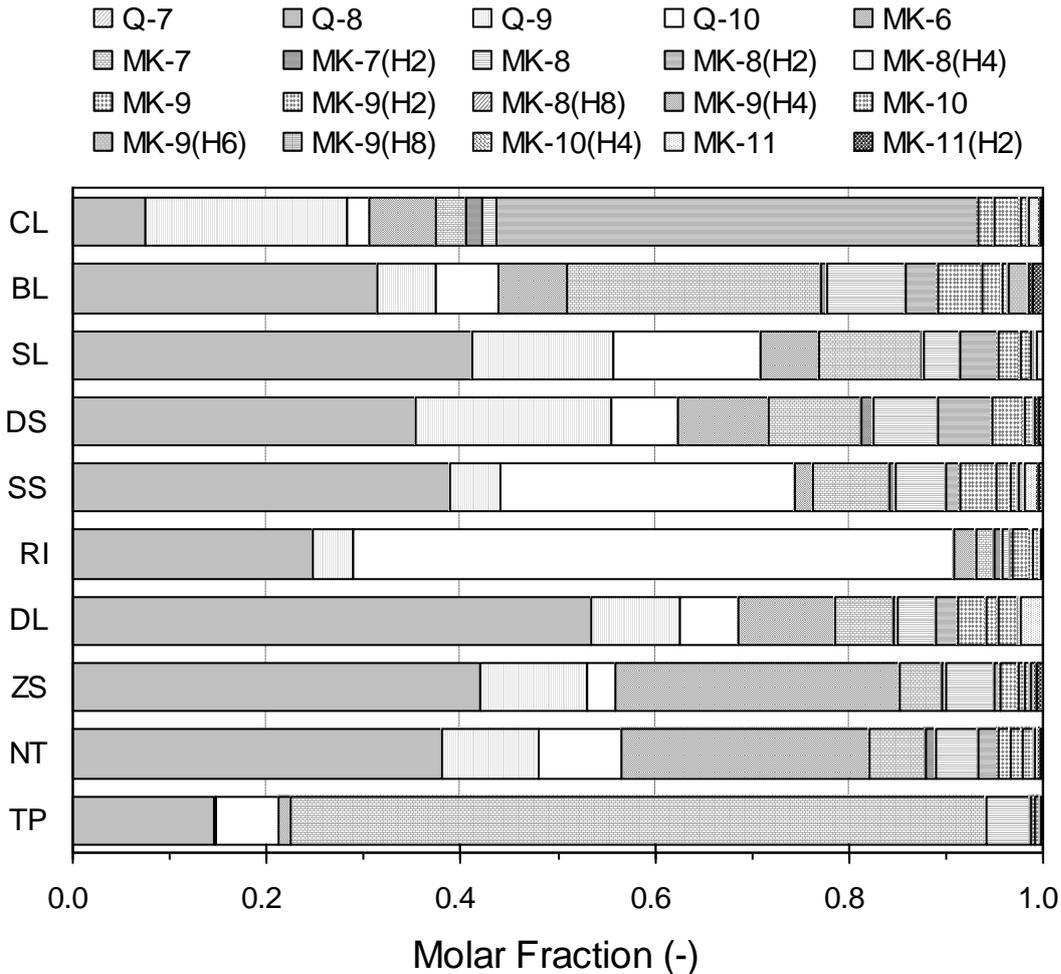


図-2 各処分場の浸出水のキノンプロファイル

(3) キノンバイオマーカーを用いた安定化診断

ここでは、参考のために三カ所の自然土壌（N-1、N-2、N-3）および我が国の7カ所の準好気性の処分場（1-FT、2-YZ、3-UF、4-OM、5-OT、6-NT、7-MA）も含めて、MDS解析を行い、各処分場を平面に布置した（図-3）に示した。各処分場は、浸出水中のキノンプロファイルの類似性に基づいて、平面上に付置されることから、処分場間の距離が長いほど、類似性が低いことを意味する。

既報<sup>4)</sup>では、7カ所の準好気性処分場のなかでは、6-NTが最も新しく、浸出水中の微生物呼吸活性や水質の観点でも、最も安定化が進んでいない処分場と見なされている。6-NTは比較的、自然土壌のそばに付置されているが、これよりも安定化が進行している処分場は自然土壌から離れたところに付置され、さらに安定化すると7-MAのように再び自然土壌に近づくことが明らかとなっている。今回の検討では、Gr-1のTPが最も離れたところに布置された。この処分場は焼却残渣を受け入れているにも係わらず、6-NTとの類似性は低かった。しかしながら、Gr-2、Gr-3の順にTPから離れ、Gr-4に分類されたDSは自然土壌に近づいた。つまり、準好気性の処分場と同様の布置結果が得られたことから、改良型衛生埋立型の処分場でも本手法が有効であることが示された。

前述したように、TPとDLは、浸出水の水質という観点では、同じグループ（Gr-1）に分類されたが、MDSの布置結果は大きく異なっている。つまり、水質指標よりもキノンバイオマー

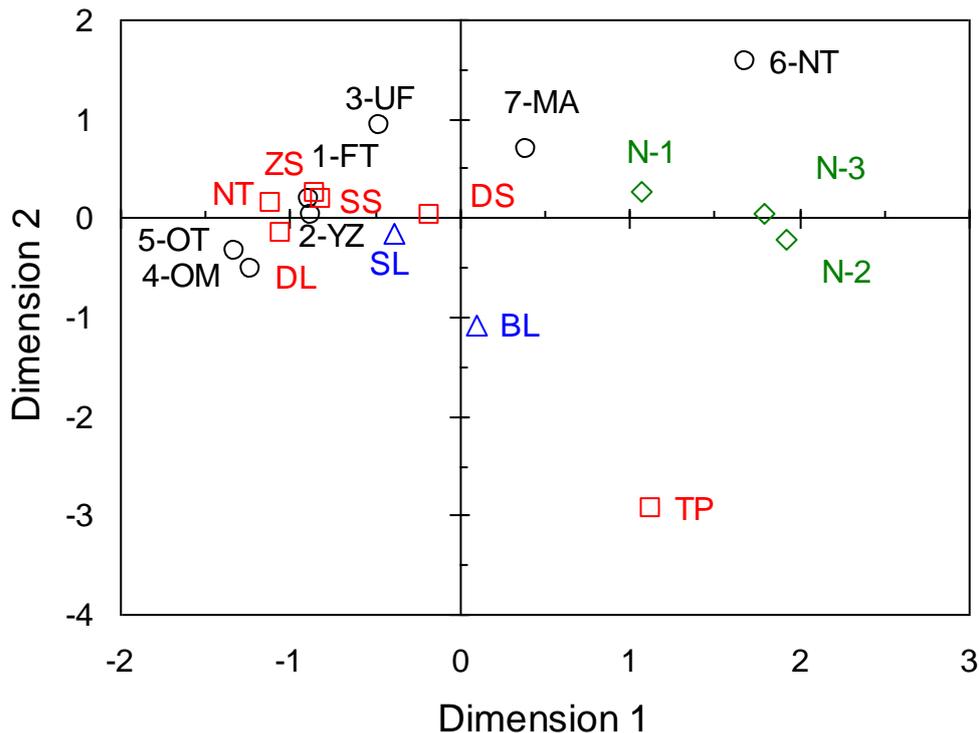


図-3 MDSによる各処分場の布置結果

カーの方が、安定化診断の解像度が高らかに高いことを示している。

MDS 平面では、Gr-2 や Gr-3 が近くに布置されることから、視覚的に安定化の進行状況を把握することが難しい。ただし、自然土壌を参照すると、Dimension 1 の軸は安定化の進行度が反映されているものと考えられる。また、既報<sup>5)</sup>では、DQ 値も安定化の進行度を表現できる可能性があることが示されている。そこで、Dimension 1 と DQ 値を利用することにより、安定化診断を視覚的に行う方法を検討した (図-4)。

その結果、Gr-1 (DL 以外)、Gr-2、Gr-3 の順に、Dimension 1 が減少するとともに、DQ 値が増加する傾向が見られた。そして、Gr-4 では、Dimension 1 が増加し、DQ 値はさらに増加した。我が国の準好気性の処分場も、安定化の進行状況を分類したとおりに布置された。しかし、DL だけはこの傾向には当てはまらなかった。これには留意する必要があるが、この方法で、改良型衛生埋立型や準好気性型の処分場の安定化診断ができるものと思われる。

オープンダンプ型は、DQ 値が比較的高いことから、安定化しているように判断されてしまう。インドネシアのオープンダンプ型の処分場は、浸出水を採水できる季節が非常に限定されることから、今回の検討ではサンプル数が限られている。今後、サンプル数を増やして、検討を進める必要がある。ただし、改良型衛生埋立型や準好気性型の処分場と同様に安定化診断を行うのは難しいかも知れない。

前述したように、微生物群集の解析手法として、キノプロファイル法以外に T-RFLP 法を適用した。ここでは、三種類の制限酵素 HaeIII、HpaII、HhaI を利用して、解析を行ったが、キノプロファイル法を用いたときのような安定化診断はできなかった。処分場の安定化の進行状況と内部の酸化還元状態との間には関連があるものと考えられるが、キノンは呼吸形態に基づく指標であることから、この観点での解析では 16S rDNA よりも有効であると考えられる。

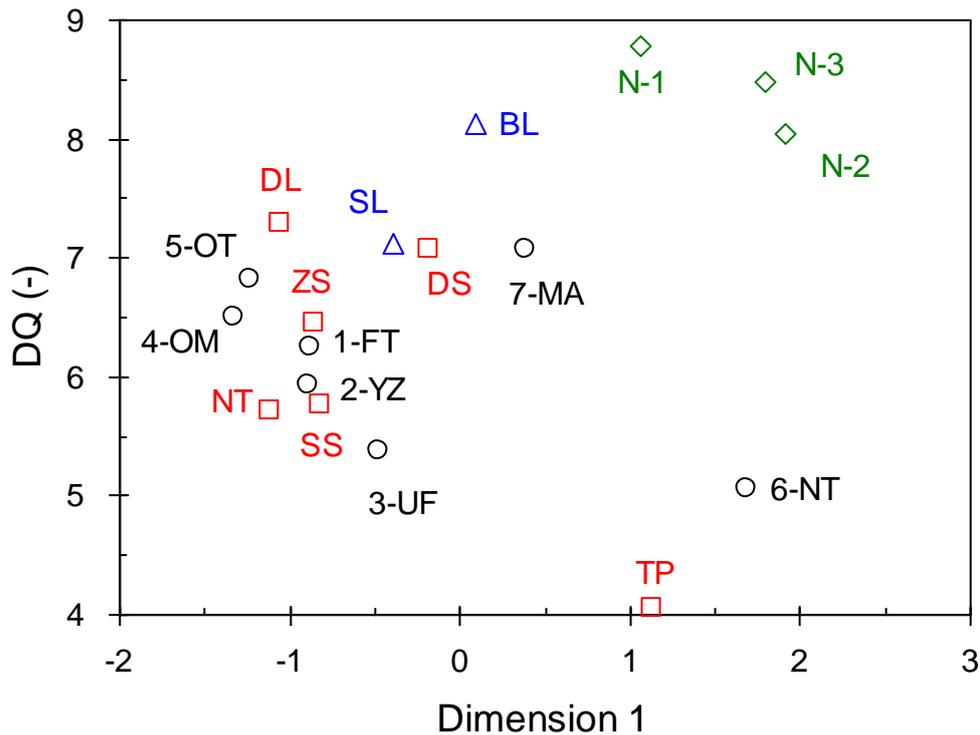


図-4 MDS の Dimension 1 と DQ 値を利用した処分場の安定化診断

水質指標は、分析が簡便であり、情報の蓄積も十分になされていることから、安定化を診断するうえで有用であるが、瞬間値であることに留意する必要がある。その意味では、微生物指標は、処分場内部の長い履歴が微生物コンソーシアとして反映されることから、水質指標にはない有効性を持つ。また、解析の解像度もはるかに高い。さらに、自然土壌などを含めて解析することにより、第一の安定化に加えて、第二（究極）の安定化<sup>5)</sup>の観点でも判定できる。したがって、微生物指標と既存指標を併用して、本研究で示したように多角的に安定化診断を行うことで、より短時間でより確実な診断が可能になるものと考えられる。その意味でも、今後、微生物指標の情報の蓄積が強く望まれる。

・結論＝浸出水のキノンプロファイルをもとに多次元尺度構成法による解析を行ったところ、Dimension 1 は、安定化の進行を強く反映していた。そこで、別途、多様性指標を算出し、統合して平面上に布置したところ、台湾の改良型衛生埋立型および我が国の準好気性型の処分場は、浸出水水質や稼働年数などの情報から判断した安定化の状況とよく対応していた。つまり、定量的かつ視覚的に安定化状況を判断する方法を見出すことができた。また、キノンバイオマーカーは、既存の水質指標よりもはるかに高い解像度で安定化診断ができることも明らかとなった。また、自然土壌などの情報を含めて解析することにより、第一の安定化に加えて、第二（究極）の安定化の観点でも判定できることも示された。ただし、オープンダンプ型等の処分場については、比較的高く多様性指標が算出されたことから、留意する必要がある。安定化診断をするうえで、キノンバイオマーカーは既存の指標にはない有効性を兼ね備えていることから、今後、その情報を蓄積することが期待される。

・参考文献=1) Hiraishi *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(4), 897-901, 1989. 2) 藤田ら：水工学論文集，49, 121-126, 2005. 3) Hu *et al.*: *Water Res.*, 33, 3263-3270, 1999. 4) 藤田ら：廃棄物学会論文誌，19 (5)，347-351，2008. 5) 藤田ら：環境工学研究論文集，44，499-504，2007. 6) 田中：土木学会論文集，720, 1-11, 2002.