【研究ノート】

一般廃棄物最終処分場における浸出水中の キノンバイオマーカーの動態

藤 田 昌 史*・今 井 健太郎**・辻 幸 志**・坂 本 康***

【要 旨】 キノンバイオマーカーを活用することにより、一般廃棄物最終処分場の安定化診断を行うことを想定して、晴天時、雨天時におけるキノンバイオマーカーの動態を調査した。晴天時では、5日間にわたり4回、調査を行ったが、キノンの流出量や組成には明らかな違いは認められなかった。一方、雨天時では、浸出水流量のピーク前後で、おもにQ-10の流出が相対的に増加したことにより、キノン組成が明確に変化した。そして、流量のピークに遅れて、キノン流出量が著しく上昇した。粒子状成分には、Q-10を含有するAlphaproteobacteriaが相対的に多く吸着しており、それがこの間の流出に寄与していた可能性が考えられた。その後は、流量の減少にともない、降雨前の状態に近づいた。

キーワード： 最終処分場、一般廃棄物、浸出水、キノン、安定化指標

1. は じ め に

2004年度末現在、一般廃棄物は年間に5.161万tonが排出され、その16.4%に相当する845万tonが、合計2,039ヶ所の一般廃棄物最終処分場に埋め立てられている¹⁾。一般廃棄物は、遮水工が施されており、浸出水の集水施設と水処理施設を併設した管理型に分類される処分場で最終処分されるが、この型の処分場は、「廃棄物の処理及び清掃に関する法律」(廃棄物処理法)の施行令の一部を改正する政令が成立した1977年以降に普及した。したがって、近い将来、これらの処分場が廃止されるときがやって来る。

現行の廃棄物処理法では、処分場を廃止するためには、事業者が廃止基準を満たしていることを示し、都道府県知事の確認を得る手順となっている²⁾。この廃止基準では、浸出水の水質、ガスの発生、処分場内部の温度などが規定されている。たとえば、水質の基準は、公共用水

域の水質汚濁防止の観点から定められた排水基準に基づいている。また、この水質を含めて、ガス、温度などの指標は、埋立廃棄物の生物化学的な反応の結果を顕すものである。その意味では、既存の指標に加えて、反応の主体に視点に置いた指標も含めて、多角的に安定化の現況を把握することができれば、より信頼性の高い診断ができるものと考えられる。

筆者らは、安定化指標として、微生物群を利用することを着想した^{3,4)}。微生物群は、埋立廃棄物の分解や変換に関与することから、その群集構造から処分場内部の状況を間接的に知ることができると考えた。解析手法としては、化学分析のみで定量が可能であり、実務者にも利用しやすいキノンバイオマーカー⁵⁾に着目した。

キノンとは、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である⁵⁾。好気呼吸をする微生物群が持つユビキノン(Q-n)、嫌気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の数や水素飽和度 X を表す。各微生物は、主要なキノン種を含有することから、検出されたキノン種の構成割合、すなわち、キノン組成を調べることにより、微生物群集構造を評価することができる。

処分場内部には、多種多様な廃棄物が不均一に埋め立てられていることから、そこに生息する微生物群は一樣

原稿受付 2007.10.24 原稿受理 2008.6.2

* 茨城大学工学部都市システム工学科

** 山梨大学大学院医学工学総合教育部

*** 山梨大学大学院医学工学総合研究部

連絡先：〒316-8511 茨城県日立市中成沢町4-12-1

茨城大学工学部都市システム工学科 藤田 昌史

E-mail: fujita@mx.ibaraki.ac.jp

には分布していないと予想される。したがって、処分場内部から直接、微生物試料を採取することは、処分場を代表する試料を確保するうえで、多大な労力を要すると考えられる。そこで、浸出水とともに流出する微生物群を解析対象とすることを考えた^{3,4)}。しかしながら、浸出水の水質や水量は降雨等の影響を受けて変動することが知られている。したがって、微生物群を対象にする場合も同様に採取した試料の代表性に懸念がある。これまでに、浸出水中の微生物群を調べた報告はあるが⁵⁻⁸⁾、安定化の観点からの調査例は非常に限られている⁹⁾。それゆえ、浸出水の採水方法を意識して、微生物群を解析した例は見あたらない。その意味では、降雨などの影響を受ける浸出水中の微生物群の動態を知ることが、有用であると考えられる。

そこで本研究では、一般廃棄物最終処分場の浸出水を対象として、雨天時、晴天時に連続的に採水し、キノンバイオマーカーを解析することで、微生物群の流出量や組成の変動を調べた。

2. 方 法

2.1 調査対象とした処分場の概要と採水

計画埋立年数 16 年のうち、調査時に 8 年が経過していた一般廃棄物最終処分場（山間埋立、準好気性埋立構造）を対象とした。おもに、焼却灰、破碎不燃物が埋め立てられている。浸出水は、流量調整槽を経て浸出水処理施設に流入する。本研究では、この流量調整槽の直前に、自動採水器（Model 3700, ISCO 社）を設置した。雨天時の調査では、2005 年 7 月 9 日 15 時から 7 月 10 日 9 時まで 3 時間毎に合計 7 回、浸出水 1 L 程度を採水した（Fig. 1）。7 月 9 日 17 時から 7 月 10 日 0 時まで、22 mm の降雨が観測された。調査前には、7 月 4 日、6 日、7 日に、それぞれ 64.5 mm、6.0 mm、7.5 mm の降

雨が観測されている。一方、晴天時の調査では、2005 年 9 月 14 日、15 日、17 日、18 日の 12 時に合計 4 回、同様に採水した。9 月 11 日には 11 mm の降雨が観測されているが、その 1 週間前までは降雨はなかった。いずれの調査でも、降雨量、浸出水流量（処理施設への流入量）は、当該処分場で観測しているデータを利用した。

2.2 キノンバイオマーカー

2.2.1 キノン分析

採取した浸出水は、重量を測定後、孔径 0.3 μm のガラス繊維ろ紙（GF-75, Advantech 社）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、二連結した固相抽出カートリッジ（Sep-Pak[®] Plus Silica, Waters 社）にヘキサン抽出物を吸着させ、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後、高速液体クロマトグラフィー（SCL-10A VP, Shimadzu 社）による分析に供した。移動相として、メタノール・ジイソプロピルエーテル溶液（9:2, v/v）を流量 1.0 mL/min で、カラム温度を 35℃ に設定した ODS カラム（Zorbax-ODS, $\phi 4.6 \times 250$ mm, Agilent 社）に流した。検出器には、フォトダイオードアレイ（SPD-M10A VP, Shimadzu 社）を用いた。ピークのリテンションタイムに加えて、吸収スペクトルや ENIU 値⁵⁾を参考にしながら、各キノン種を同定した。また、標準物質として市販の Q-10（ubiquinone-10 Standard, Wako 社）を用いて、275 nm、270 nm の吸光度からユビキノン、メナキノンをそれぞれ定量した。一般的に、キノン量は微生物量と対応することが知られている⁵⁾。また、キノン流出量は、キノン濃度に前述した浸出水流量を乗じることで求めた。

2.2.2 主成分分析による浸出水中のキノン組成の遷移過程の評価

雨天時における浸出水中のキノン組成の変化を追跡するために、主成分分析を行った。晴天時と比較するために、これらを含めた各試料のキノン存在割合を用いて、市販の統計解析ソフト（SPSS 10.0.5J, SPSS 社）により計算した。また、キノン組成の類似性を定量的に評価するために、別途、キノン存在割合を用いて、市街化距離に 0.5 を乗じた非類似度⁵⁾を算出し、Ward 法によるクラスター解析も行った。この非類似度が 0.1 以下の 2 試料間の微生物群集構造は、実質的な違いはないと判断できる⁵⁾。

Fig. 1 Precipitation and leachate flow rate on rainy-weather days

3. 結果と考察

3.1 雨天時、晴天時におけるキノン流出量

浸出水の流量とキノン流出量との関係を Fig. 2 に示した。晴天時の流量が $12.9 \pm 1.7 \text{ m}^3/\text{hr}$ であったのに対し、キノン流出量は $43.0 \pm 10.9 \mu\text{mol}/\text{hr}$ であった。

雨天時の調査にあたる 7 月 9 日 15 時の流量は $20.5 \text{ m}^3/\text{hr}$ であり、降雨前であったにもかかわらず、晴天時よりも高かった。前述した先行降雨の影響が残っていたものと予想される。このときのキノン流出量は晴天時と同程度であったが、流量が大きく増加した 18 時から 21 時にかけて、キノン流出量も $50.6 \mu\text{mol}/\text{hr}$ から $148 \mu\text{mol}/\text{hr}$ にまで上昇した。雨水が処分場の土層から下層にかけて、晴天時には通らなかった流出経路を辿ることにより、そこに生息する微生物群が輸送されたものと既存の知見¹⁰⁾から解釈できる。浸出水の流量がピークを越えた 0 時には、キノン流出量も減少したが、3 時にはキノン流出量が再び上昇し、採取したサンプルのなかで最も高い $222 \mu\text{mol}/\text{hr}$ に達した。微生物群は、懸濁した状態あるいは粒子状成分に吸着した状態で輸送されるが、前者はより早く、後者はより遅く輸送されるものと考えられる。それゆえ、時間の経過とともに微生物群の流出が前者から後者へと移行したと考えると、上述した流出経路の拡大にともないキノン流出量は上昇したものの、そのピークは流量のピークよりも遅れたことが説明できる。これ以降は、降雨前の状態に近づいた。この期間を超えても流量の二次ピークが観察されることはなかったことから、表面流の影響は無視でき、上述のような考察が成り立つと考えられる。

Fig. 2 Relationship between flow rate of leachate and amount of discharged quinone

3.2 浸出水量とキノン組成との関係

雨天時、晴天時における浸出水中のキノン組成を Fig. 3 に示した。晴天時では、優占キノンの上位二種は、 $Q-8 > Q-10$ の順序であった。一方、雨天時では、降雨前の 7 月 9 日 15 時から 7 月 9 日 21 時まででは、 $Q-8 > MK-6$ の順序であったが、流量のピークを過ぎてからは、 $Q-8 > Q-10$ であった。

雨天時に流出する微生物群のキノン組成の違いを調べるために、晴天時とあわせて主成分分析を行った (Fig. 4)。第一主成分、第二主成分の寄与率はそれぞれ 53%、

Fig. 3 Quinone profile in leachate on fine- and rainy-weather days

Fig. 4 Dynamic shift in quinone profile in leachate estimated with principal component analysis

24%, 累積寄与率は 77% であったことから, 雨天時, 晴天時の各試料が, 概ねキノン存在割合に基づいて布置されていると判断される。別途行ったクラスター解析により, 非類似度が 0.1 以下で連結された試料は, 図中に破線で囲んだ。

晴天時の 4 試料は, 非類似度が 0.1 以下であったことから, キノン組成に実質的な違いはないと判断された。一方, 雨天時は, 流量のピークを挟んだ 7 月 9 日 21 時から 7 月 10 日 0 時にかけて, 最もキノン組成が変化した。この間は, 前述したように, 流出する微生物群は, より輸送に時間を要する粒子状成分に吸着していたものへと次第に移行していったと考えられたが, このとき, 微生物群には粒子状成分への吸着特異性があることを想定すると, この間にキノン組成が大きく変化したものの, 7 月 10 日 0 時以降はそれほど変化が見られなかったことが説明できる。その後は, 次第に降雨前のキノン組成に近づいた。図中に示されているように, 7 月 10 日 9 時と降雨前の 7 月 9 日 15 時のキノン組成の非類似度が 0.1 以下であったことから, 降雨前の浸出水中のキノン組成に戻ったと解釈される。

この降雨前後の 2 試料と晴天時の 4 試料の非類似度は, 0.27 と算出されたことから, キノン組成には明らかな相違があったと判断された。雨天時から晴天時の調査までには, 約 3 ヶ月が経過しているが, 一般的に, 処分場が第一の安定化を迎えるまでには十数年要し, さらに土壤還元状態に至るまでには数百年かかるといわれている²⁾。したがって, このような短い期間に処分場内部の微生物群集構造が実質的に変化していたとは考えにくい。むしろ, 7 月 9 日 15 時は, 先行降雨の影響が残っており, 晴天時の流量よりも平均で 1.6 倍程度大きかったことから, これがキノン組成の違いに関与したものと推測される。言い換えると, 採水時に降雨がないときでも, 先行降雨の影響を十分に留意する必要があるといえる。

雨天時におけるキノン組成の変化に寄与の高かったキノン種を調べるために, 検出されたすべてのキノン種の第一主成分に対する相関係数, つまり因子負荷量を算出した (Table 1)。最も絶対値の高かったキノン種は, Q-10 であった。これは, 前述したように, 流量のピークが過ぎてから二番目に多く優占していたキノン種である。Q-10 は, Alphaproteobacteria が含有することが知られている⁵⁾。第一主成分に対して負の相関を示したことから, たとえば, キノン組成が最も変化した 7 月 9 日 21 時から 7 月 10 日 0 時にかけて, 最も顕著に存在割合が増したことを意味する。言い換えると, Alphaproteobacteria が顕著に流出したことが, キノン組成の違いに大きく影響したものと判断される。前述

Table 1 Loading factor of quinone species

Quinone species	Loading factor (—)
Q-10	-0.99
MK-6	0.64
MK-9 (H ₂)	0.52
Q-9	0.52
MK-9 (H ₆)	0.42
Q-8	0.39
MK-10	-0.37
MK-7	-0.29
MK-11	-0.20
MK-8	-0.17
Q-7	0.13
MK-9	0.06

したように, この間は, 粒子状成分に吸着していた微生物群の輸送が卓越していたことを前提とすると, Alphaproteobacteria は粒子状成分に吸着されやすいと判断される。

4. ま と め

一般廃棄物最終処分場における浸出水中のキノンバイオマーカーの動態を調べるために, 晴天時, 雨天時に調査を行った。その結果, 次のことが明らかとなった。

- (1) 晴天時の調査では, 5 日間にわたり 4 回, 調査を行ったが, キノンの流出量や組成には明らかな違いは認められなかった。
- (2) 雨天時の調査では, 浸出水流量のピーク前後で, おもに Q-10 の流出が相対的に増加したことにより, キノン組成が明確に変化した。そして, 流量のピークに遅れて, キノン流出量が著しく上昇した。粒子状成分には, Q-10 を含有する Alphaproteobacteria が相対的に多く吸着しており, それがこの間の流出に寄与していた可能性が考えられた。その後は, 流量の減少にともない, 降雨前の状態に近づいた。

[謝 辞]

当該処分場の関係者の方々には, 調査を快く許可していただいたうえに, 現場での採水等の作業や既存のデータの提供をご協力いただいた。また, 本研究は, 平成 17~18 年度環境省廃棄物処理等科学研究費補助金「廃棄物最終処分場内部の微生物コンソーシアに着目した安定化指標の構築」の助成を受けた。以上をここに記して, 深く謝意を表する。

参 考 文 献

- 1) 環境省：平成 18 年度版循環型社会白書，ぎょうせい (2006)
- 2) 田中信寿：環境安全な廃棄物埋立処分場の建設と管理，技報堂出版 (2000)
- 3) 今井健太郎，藤田昌史，坂本 康：一般廃棄物処分場における浸出水中のキノンバイオマーカーと微生物呼吸活性との関係，第 17 回廃棄物学会研究発表会講演論文集，pp.996-998 (2006)
- 4) 藤田昌史，今井健太郎，辻 幸志，坂本 康：一般廃棄物処分場の安定化指標としてのキノンバイオマーカーの有効性，環境工学研究論文集，第 44 巻，pp.499-504 (2007)
- 5) A. Hiraishi: Isoprenoid Quinones as Biomarkers of Microbial Populations in the Environment, J. Biosci. Bioeng., Vol. 88, pp. 449-460 (1999)
- 6) M. I. Van Dyke and A. J. McCarthy: Molecular Biological Detection and Characterization of *Clostridium* Populations in Municipal Landfill Sites, Appl. Environ. Microbiol., Vol. 68, pp. 2049-2053 (2002)
- 7) L. N. Huang, H. Zhou, S. Zhu and L. H. Qu: Phylogenetic Diversity of Bacteria in the Leachate of a Full-scale Recirculating Landfill, FEMS Microbiol. Ecol., Vol. 50, pp. 175-183 (2004)
- 8) L. N. Huang, S. Zhu, H. Zhou and L. H. Qu: Molecular Phylogenetic Diversity of Bacteria Associated with the Leachate of a Closed Municipal Solid Waste Landfill, FEMS Microbiol. Lett., Vol. 242, pp. 297-303 (2005)
- 9) 井上雄三：バイオ指標導入による最終処分場の安定化促進技術の評価，廃棄物処理等科学研究費補助金総合研究報告書概要版 (2005)
- 10) 藤田昌史，芳賀弘和，西田 継，坂本 康：山腹斜面流出過程におけるキノンバイオマーカーの動態解析，水工学論文集，第 49 巻，pp. 121-126 (2005)
- 11) G. Bratbak and I. Dundas: Bacterial Dry Matter Content and Biomass Estimation, Appl. Environ. Microbiol., Vol. 48, pp. 755-757 (1984)

Dynamic Behavior of a Quinone Biomarker in Leachate from a Final Landfill Site for Municipal Solid Waste

Masafumi Fujita*, Kentaro Imai**, Koji Tsuji** and Yasushi Sakamoto**

* Department of Urban and Civil Engineering, Faculty of Engineering, Ibaraki University

** Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi

† Correspondence should be addressed to Masafumi Fujita :
Department of Urban and Civil Engineering, Faculty of Engineering, Ibaraki University
(4-12-1 Nakanarusawa-cho, Hitachi, Ibaraki 316-8511 Japan)

Abstract

In order to investigate the dynamic behavior of a quinone biomarker in leachate from a final landfill site for municipal solid waste, leachate was collected continuously on fine and rainy days. Four samples from five fine-weather days did not have significant differences in quinone discharge and composition. On the other hand, on rainy-weather days, the quinone composition changed significantly before and after the peak flow of leachate, because bacteria containing Q-10, namely Alphaproteobacteria, was discharged in great amounts. Subsequently, quinone discharge increased remarkably. This increase can be explained as follows. Particulate matters had relatively more Alphaproteobacteria, resulting in the high contribution to the discharge. After the rain, the quinone discharge and composition returned to close to the original conditions before the rainfall.

Key words : final landfill site, municipal solid waste, leachate, quinone, stabilization index