

埋立地模擬カラムによる有機性廃棄物初期分解過程と温室効果ガス放出の挙動

水圏環境制御工学研究室 澤田浩介
指導教官 原田秀樹, 大橋晶良

1. はじめに

地球温暖化の影響は年々増大しており、環境問題の中で最も重要な対策課題の一つとして検討されている。IPCCによれば、メタンは二酸化炭素の23倍のGWP (Global Warming Potential)を有し、二酸化炭素に次ぐ温室効果ガスとである⁽¹⁾。メタンは、嫌気条件下においてメタン生成古細菌により有機物をメタンと二酸化炭素へと無機化する生物学的プロセスおよび化石燃料などの非生物学的プロセスによって大気中へ放出される。その放出量は吸収量を年間30~100 Mt上回り、大気中のメタン濃度は年1%の割合で増加している⁽⁷⁾。発生するメタンのうち、発生源の約60%が人為的起源と言われており、さらにそのうち約10%が廃棄物埋立地由来であると見積もられている⁽⁸⁾。一方、埋立地覆土は空気と接している好氣的な領域において、メタン酸化細菌の働きによるメタン放出抑制が近年報告されており^(12, 13, 18)、適正な埋立地の設計および管理概念を構築することは、メタンの発生を抑制し、その酸化を促進することにつながり地球温暖化抑制に大いに役立つ可能性がある。

これまでも実埋立地の現場調査や模擬実験はいくつか報告されており^(3, 14, 17)、発生ガス・浸出水および微生物の複雑な挙動や現象は個々に明らかにされつつある。しかし、温室効果ガスの観点からそれらの挙動について、1つの実験系の中で定量的にかつ総合的な研究はなされていない。そこで本研究では単純な埋立地現象を模擬カラムにより人為的に再現し、炭素および窒素量についての物質収支を基に、発生ガスおよび浸出水の挙動を把握することにより、異なる埋立地構造における廃棄物の分解メカニズムを明確にすることを目的とした。これに加え、主に16S rDNA/RNAを分子マーカーとした分子生物学的手法を用いることによりメタン生成とその抑制に関与する微生物群集の解析を行うこととした。

2. 実験方法

2.1 埋立地模擬カラムおよび運転条件

本研究では Fig.1 に示す、透明塩化ビニル製埋立地模擬カラムを用いた。実験は3つの条件で行い、酸素を全く注入しない嫌気(R1)、1週間に1回酸素2Lを上部から注入する上層好気(R2)および下部から1週間に1回酸素2Lを注入する準好気(R3)とすることにより、異なる埋立地構造を模擬した。廃棄物投入後、アルゴンガス(2L/min, 2hr)により3条件ともにカラム全体を嫌気状態にした後、蒸留水3Lをカラム気層部から注入して実験を開始した。模擬カラムは全体を不透明黒ビニルカーテンで覆い、室温20°Cの暗所で運転を行った。また降雨として500mlの蒸留水を週に1度カラム上部から注入した。

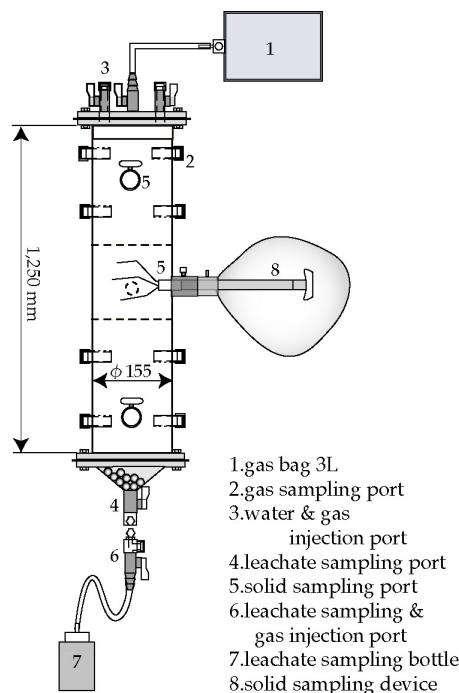


Fig.1 Simulated landfill column

Table 1 Gas, leachate and solid analysis methods

	detail	method	machine
Gas	volume composition	water displacement method gas chromatography (with TCD)	SIMADZU TCD GC-8A
Leachate	pH	electrometric method	HORIBA pH METER D-21
	BOD	azide modification	Titration
	COD _{Cr}	closed reflux, colorimetric method	HACH
	VFA	gas chromatography (with FID)	SIMADZU GC-14B
	TOC	high-temperature combustion method	SIMADZU TOC-V CSN
	TKN	kjeldahl method	HACH
	NH ₄ -N	indo-phenol blue method	SIMADZU UV-160A SPECTROPHOTOMETER
NO ₂ -N	colorimetric method		
NO ₃ -N	brucine method		
sulphate	barium chromate method		
sulfide	iodometric method	Titration	
Solid waste	pH	electrometric method	HORIBA pH METER D-21
	TS	standard method	ADVANTEC FC-610
	VS	standard method	YAMATO FM-48
	C/N	high-temperature combustion method	YANAKO CN CORDER MT-700
	fiver	neutral detergent method	
	COD _{Cr}	open reflux method	Titration SIMADZU UV-160A SPECTROPHOTOMETER
	carbohydrate	anthrone method	
protein	Lowry method		
lipid	extraction-titrimetric method (COD _{Cr})		

2.2 投入模擬廃棄物

投入模擬廃棄物は湿潤重量で生ゴミ60%、紙28%、木チップ4%、PVCチューブ5%、布2.5%および草0.5%を約10mm角以下に細かくしたものを混合し、有機性の高い埋立地を模擬した。廃棄物は3条件ともに湿潤重量で9kg、廃棄物上部・下部には山土をそれぞれ1kgずつ、合計11kg投入した。本投入模擬廃棄物のTS (Total Solid)は合計で5,949gで、そのうちVS (Volatile Solid)は4,610gである。また1カラム当たり炭素2,114g、窒素64g、さらにCODでは5,852gが投入されている。

2.3 ガス、浸出水および固形物の分析方法

ガス、浸出水および固形物の分析は Table 1 の方法により行った。ガスは週に 1 回、蒸留水および酸素を注入する前にカラム気層部のガス組成を、ガスクロマトグラフにて分析後、ガスバックに採取し、発生量を測定した。浸出水は週 1 回、蒸留水および酸素の注入前に採取し、採取量の測定と分析を行った。固形物は採取量を測定した後、ミキサーで粉碎し、各分析を行った。また固形物中の溶解性試料の分析には、粉碎した既知量の固形物に 10 倍量の蒸留水を加えて 1 時間攪拌し、φ0.4 mm のガラス繊維濾紙で濾過したものをを用いた。

2.4 FISH (fluorescence *in situ* hybridization) 法

FISH 法は Amann らの方法(1)に準拠して行った。FISH 法による菌数のダイレクトカウントは荒木らの方法(9)に従った。本研究に使用した 16S rRNA 標的 DNA プローブは、メタン生成古細菌を特異的に検出する ARC915(5'-CTTGCTCCCCGCCAATTCCT-3')プローブ(15)、またメタン酸化細菌は、セリン経路を持つ Methanotroph Type I には GM705(5'-CTGGTGTTCCTCAGATC-3')⁽⁹⁾を、RuMP 経路を持つ Methanotroph Type II には AM445(5'-CTTATCCAGGTACCGTCATTATCGTCCC-3')⁽⁹⁾を用いた。各 DNA プローブには Cy-3 あるいは FITC を蛍光標識として付加した。また全菌染色剤には DAPI あるいはエチジウムブロマイドを使用した。

3. 実験結果

本報告では、発生するガス、浸出水の挙動をもとに実験開始から 150 日目までを 1st Phase (酸生成期)、それ以降を 2nd Phase (酸生成・メタン生成期) と定義した。

3.1 投入廃棄物の挙動

Table 2 に実験開始時、2 ヶ月後および 7 ヶ月後にサンプリングした投入廃棄物の各成分を示す。実験開始から 7

Table 2 Characteristics of Solid waste

	Initial	2 month			7 month		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3
pH	6.7	3.9	3.9	3.9	4.0	4.5	4.3
TS : total solid (%) (g/gwet)	52	33	32	34	34	37	34
VS : volatile solid (%) (g/gwet)	94	95	94	93	95	96	95
Total carbon (%) (g/gdry)	42	44	43	48	40	41	51
Total Nitrogen (%) (g/gdry)	1.2	0.7	0.7	0.9	1.2	0.7	0.8
Fiver (%) (g/gdry)	74	73	77	73	87	87	90
Total COD (mg COD/gdry)	1,210	1,187	1,185	1,192	1,190	1,119	1,168
Soluble COD (mg COD/gdry)	109	86	90	110	N.A.	N.A.	N.A.
Total carbohydrate (mg COD/gdry)	766	698	682	692	696	651	645
Soluble carbohydrate (mg COD/gdry)	41	3	3	7	N.A.	N.A.	N.A.
Total protein (mg COD/gdry)	81	77	72	84	35	33	61
Soluble protein (mg COD/gdry)	22	14	13	15	N.A.	N.A.	N.A.
Total lipid (mg COD/gdry)	82	79	81	70	77	50	77
Soluble lipid (mg COD/gdry)	5	8	8	6	N.A.	N.A.	N.A.

N.A. : not analysis

ヶ月間において 3 条件に明確な違いは見られなかった。実験開始時と比べると、3 条件ともに pH は急激に低下し、TS も蒸留水の注入により低下したが、粗繊維は 74% から約 90% まで増加した。全炭素および全窒素の変動は大きくはないが、炭素の割合は上昇し、窒素は減少した。全 COD および炭水化物、蛋白質、脂質の割合も減少した。溶解性 COD においては炭水化物が 41 mg/g-dry から 3~7 mg/g-dry に大きく減少し、無機成分の割合が増加した。

3.2 発生ガスの挙動

a) 酸素消費プロファイル

上層好気(R2)、準好気(R3)の 218 日目における酸素消費プロファイルを Fig.2 に示す。上層好気(R2)は、No.3 ポートまで浸透し、2 日間で完全に消費された。準好気(R3)では、4 日間で消費されたが、その間に投入した酸素はカラム下部から気層部まで達しており、カラム全体に好気領域が広がっていることが確認された。

b) 累積ガス発生量および気層部ガス組成

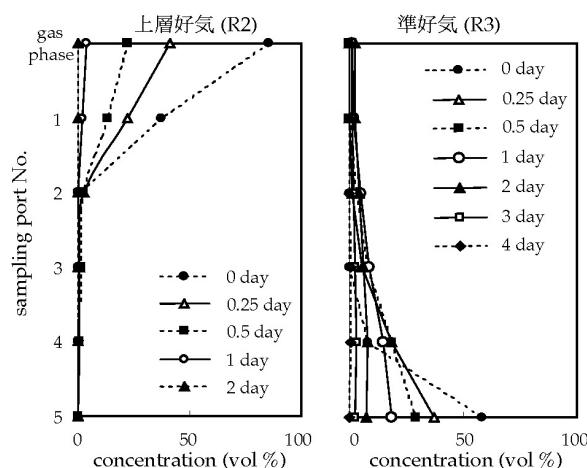


Fig.2 Profile of oxygen consumption over the column height left : upper-aerobic (R2), right : semi-aerobic (R3)

Fig.3 に累積ガス発生量およびカラム気層部ガス組成を示す。累積ガス発生量は 3 条件ともに実験開始直後 5 日間の発生が著しく、約 35 L 発生した。その後好気条件で活発に続き、準好気 (R3) が最も高い。

カラム気層部におけるガス組成は 3 条件ともに実験開始直後の 5 日間に二酸化炭素と水素が急激に発生し、それぞれ約 90%、約 2.5% まで達した。その後、1st Phase では各条件ともに二酸化炭素は 80~90% の高濃度を維持し、水素は減少した。メタンは嫌気(R1)では 120 日目頃から、上層好気 (R2)、準好気(R3)では 200 日目頃から水素の減少に伴い緩やかに発生した。428 日目には嫌気(R1)で 25% まで達し、メタン濃度の上昇に伴い二酸化炭素の濃度は減少した。窒素は 3 条件ともに約 20% まで緩やかに増加したが、その後は緩やかに減少した。

c) 高さ方向の水素およびメタン濃度プロファイル

Fig.4 に 319 日目における水素およびメタンのカラム高さ方向濃度プロファイルを示す。水素は、下層部ほど濃度が高く、最下層部において嫌気(R1)、上層好気(R2)およ

び準好気(R3)それぞれ 0.54, 0.24, 0.09%であった。逆にメタンは上層部ほど濃度が高い。

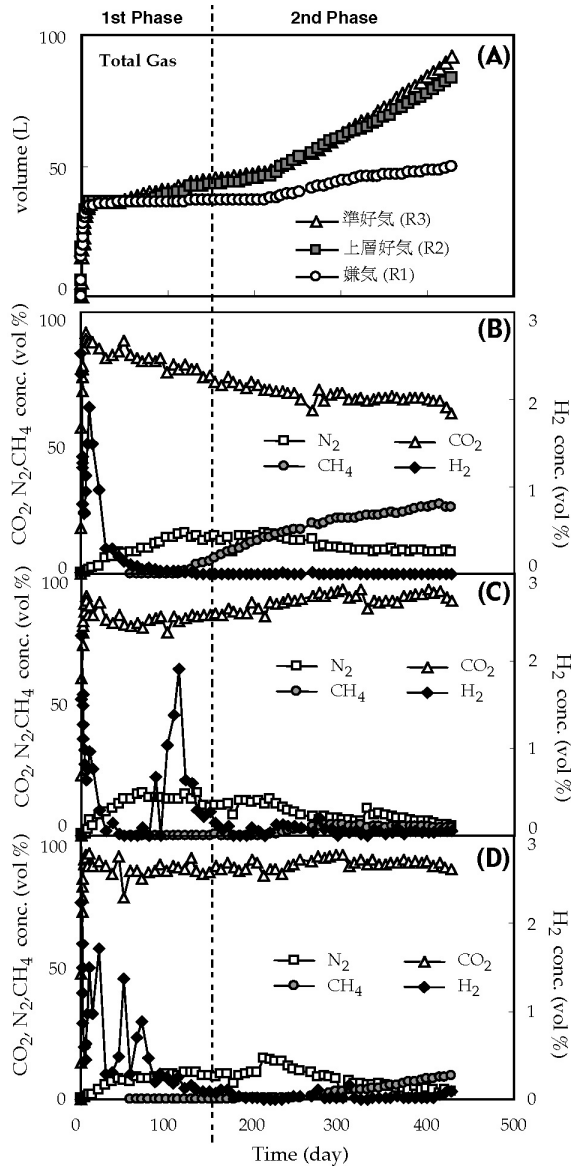


Fig.3 (A) : Cumulative total gas emission and gas composition at gas phase, (B) : 嫌気(R1), (C) : 上層好気(R2), (D) : 準好気(R3)

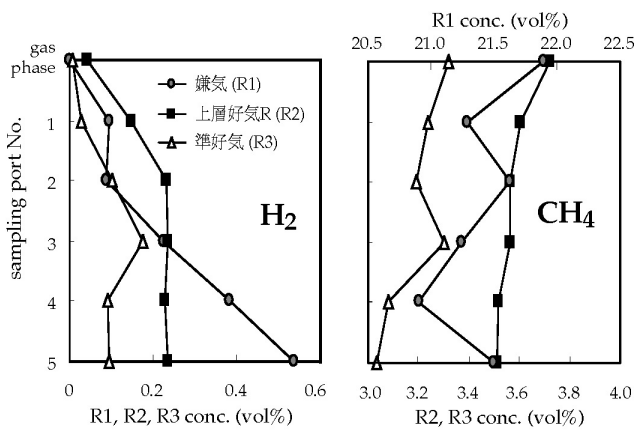


Fig.4 profile of H₂, CH₄ over the column height (after 319 day)

3.3 浸出水の挙動

a) COD・BOD・TOC・窒素および硫黄の挙動

Fig.5 に各条件における浸出水のCOD, BOD およびTOCの挙動を示す。3条件ともに1st Phaseでは高濃度で著しく発生した後急激に減少した。2nd Phaseでは各条件とも緩やかに減少し、好氣的領域が広い条件ほど浸出水中有機物濃度の低下が見られた。

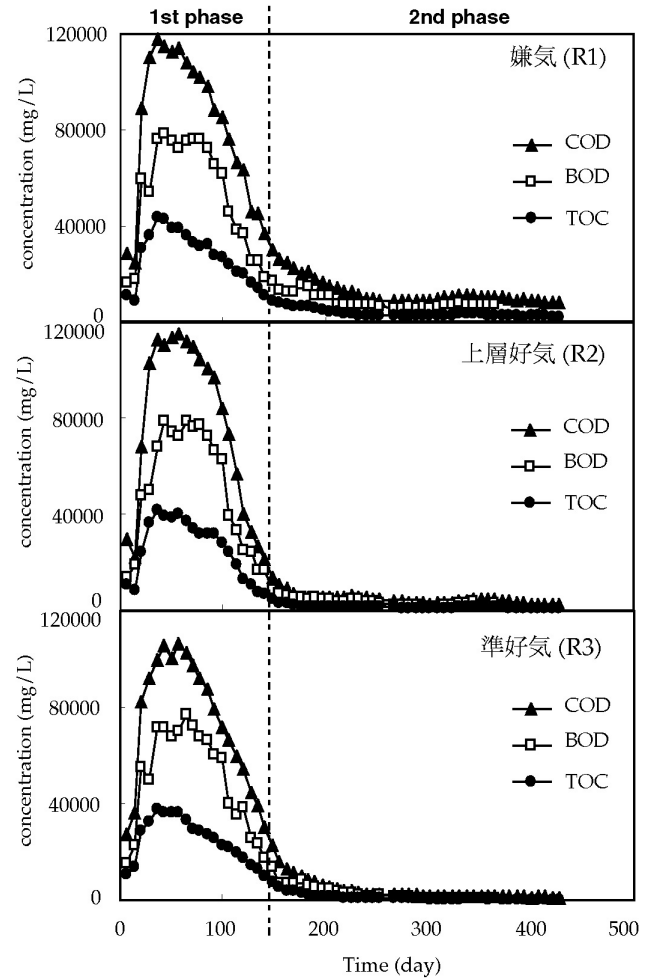


Fig.5 Characteristics of leachate COD, BOD, TOC

窒素および硫黄成分は3条件に明確な違いは見られなかった。Fig.6 に嫌気(R1)における各成分の挙動を示す。窒素成分は3条件ともに1st Phaseにおいて、TKNが約3,500 mg/Lを示したのに対し、NH₄-Nは約350 mg/Lと低く、NO₂-N および NO₃-N はほとんど検出されなかった。硫黄成分のうちSO₄²⁻は、他の成分よりもさらに急激な増加と減少を見せ、200日目以降は検出されなかった。また硫化物はSO₄²⁻の変動の間に全く検出されなかった。

b) 揮発性脂肪酸 (VFA: Volatile Fatty Acid) の挙動

Fig.7 に各条件における全VFA, pHの挙動、嫌気(R1)における各VFA成分の挙動を示す。全VFAは1st Phaseにおいて3条件ともに約5,000 mgCOD/Lと高濃度に蓄積し、pHは4以下の低い値を示した。2nd Phaseでは、嫌気(R1)は最高で15,000 mgCOD/Lとなり、428日目においても5,000 mgCOD/LとVFAの蓄積が続き、pHは4以下であった。上層好気(R2)のVFAは若干減少したが、増減を繰り返しながら1,500~3,000 mgCOD/L程度と高濃度を維持しており、pHは4.2を示した。準好気(R3)では一時的

に VFA は蓄積したものの、197 日目以降は 500 mgCOD/L まで減少し、それに伴って pH は 5.4 まで上昇した。

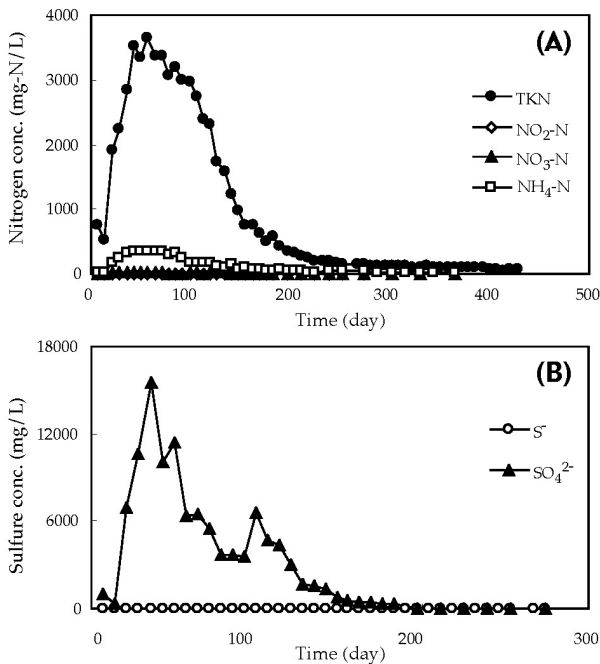


Fig.6 Characteristics of leachate of 嫌気(R1), (A) : Nitrogens, (B) : Sulfure

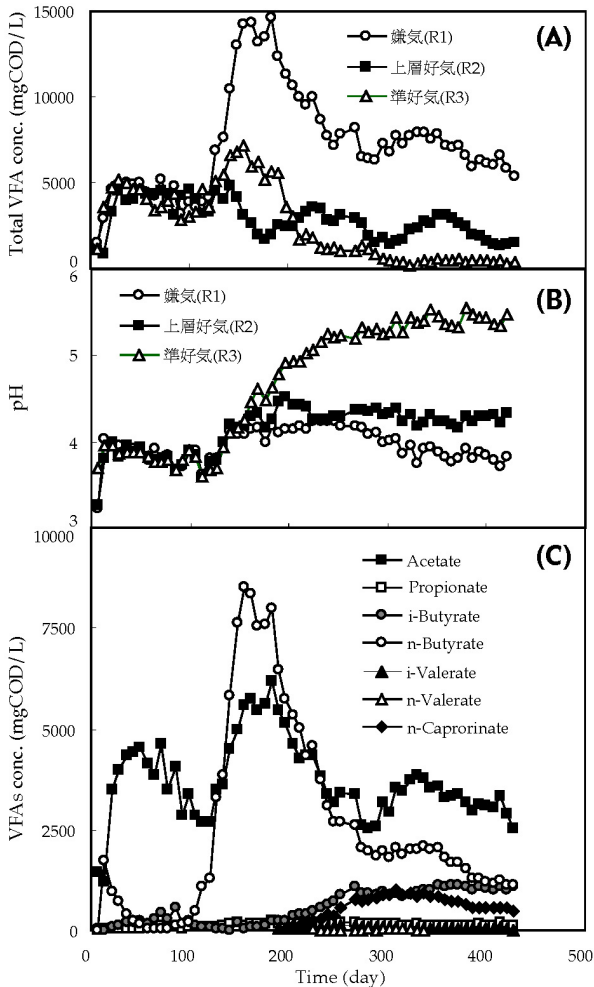


Fig.7 Characteristics of leachate, (A) : total VFA, (B) : pH, and (C) : VFAs of 嫌気(R1)

3.4 FISH 法によるメタン放出に関与する微生物の検出

FISH 法を用いて、実験開始から 8 ヶ月後の浸出水および 11 ヶ月後の廃棄物層上部と下部のメタン生成古細菌およびメタン酸化細菌の検出および定量を行った (Table 3)。

a) 浸出水中に存在する微生物の比較

メタン生成古細菌およびメタン酸化細菌 Type I は検出されなかったが、メタン酸化細菌 Type II は全ての条件で検出された。メタン酸化細菌 Type II の全菌数に対する存在比は、準好気(R3)では $19 \pm 6.1\%$ で最も多く、次いで上層好気(R2)で $13 \pm 3.1\%$ 、嫌気(R1)で $3 \pm 1.0\%$ であった。

b) 廃棄物中に存在する微生物の比較

廃棄物層上部では、嫌気(R1)および準好気(R3)においてメタン生成古細菌が確認できたが、全菌に対する存在率は 0.1%以下と極めて低く、定量不可能であった。メタン酸化細菌は浸出水と同様に全ての条件において Type II のみが検出され、上層好気(R2)が 1.3×10^9 cell/g-dry-waste と最も存在し、全菌に対する存在率は $12 \pm 5.7\%$ であった。しかし、廃棄物層下部からは 3 条件ともにメタン生成古細菌およびメタン酸化細菌は全く検出されなかった。

Table 3 Direct counts of cells, all cells and methanotroph Type II by FISH method

Sample		嫌気 (R1)	上層好気 (R2)	準好気 (R3)
Leachate (cell/ml)	all cells	$8.8 \pm 1.5 \times 10^6$	$3.5 \pm 1.4 \times 10^6$	$2.2 \pm 0.63 \times 10^7$
	Methanotroph Type II	$2.6 \pm 1.0 \times 10^5$	$4.6 \pm 1.1 \times 10^5$	$4.1 \pm 0.61 \times 10^6$
	Type II / all cells (%)	3 ± 1.0	13 ± 3.1	19 ± 6.1
Waste top port (cell/g-dry waste)	all cells	$7.8 \pm 0.75 \times 10^9$	$1.1 \pm 0.07 \times 10^{10}$	$5.9 \pm 0.61 \times 10^9$
	Methanotroph Type II	$8.3 \pm 3.3 \times 10^7$	$1.3 \pm 0.06 \times 10^9$	$4.1 \pm 1.6 \times 10^8$
	Type II / all cells (%)	$1 \pm$	12 ± 5.7	7 ± 2.6
Waste bottom port (cell/g-dry waste)	all cells	$1.8 \pm 0.15 \times 10^9$	$1.6 \pm 0.23 \times 10^9$	$2.4 \pm 0.44 \times 10^9$
	Methanotroph Type II	N.D.	N.D.	N.D.
	Type II / all cells (%)	N.D.	N.D.	N.D.

*N.D.: not detected

4. 考察

4.1 炭素収支

投入量に対する浸出水の COD および炭素の流出率 (Fig.8)は、嫌気(R1)が最も高かった。これらの流出の約 85% は 1st Phase に起きており、固形物中の易分解性有機物が初期の段階で浸出水とともに著しく流出したものと考えられる。ガス COD はメタン放出が最も多い嫌気(R1)でも 0.06%と依然少ないが、ガス炭素は二酸化炭素の発生が著しい好気条件、特に準好気(R3)が高く 1.33%である。また嫌気(R1)の炭素放出率の大部分は二酸化炭素由来であり、初期分解過程における廃棄物中の炭素の分解は、メタン発酵よりも酸発酵による二酸化炭素への無機化が優先的に行われた。

4.2 窒素収支

窒素投入量 64 g に対して、浸出水の窒素成分の流出率は嫌気(R1)48%、上層好気(R2)および準好気(R3)42%であり、炭素の流出に比べて著しかった。この窒素の流出は、廃棄物中の全蛋白質の減少に起因すると思われる。ガスの窒素は一般的に嫌気条件下における硝酸性窒素の脱窒

反応に由来するものであるが、本実験で用いた廃棄物中に含有する硝酸性窒素量を水抽出により分析したところ、発生する窒素量は 220 ml と推測された。そのため好気条件下における窒素の発生はアンモニアの硝化・脱窒反応によるものと考えられる。しかし、嫌気条件下では硝化反応は起こらないため、嫌気(R1)において発生している窒素は、投入した蒸留水中の溶存酸素および窒素の影響、あるいは実験開始時にアルゴンバージを 2 L/min で 2 時間十分に行ったが、充填物の間隙に残存していた窒素が徐々に放出している可能性が考えられた。

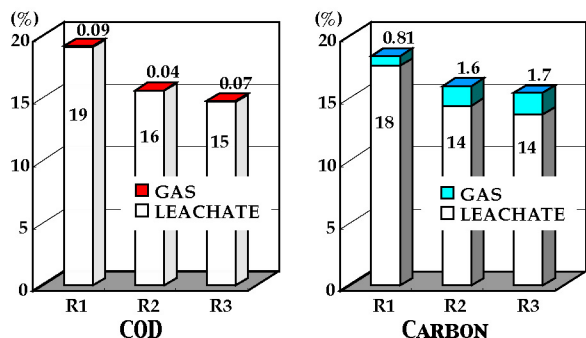


Fig.8 Mass balance of COD and carbon

4.3 メタン生成

固形物の可溶化による有機汚濁物質は、酸発酵により VFA まで分解され、好気条件下では生分解性有機物としてさらに二酸化炭素へ分解されているが、嫌気(R1)では浸出水中に蓄積し、大部分はメタンへ無機化されることなく系外へ流出した。これは至適 pH が 6~8 程度⁶⁾であるメタン生成古細菌の活性が、VFA の蓄積による pH の低下により阻害され、メタン生成が律速段階となっているためと思われる。一方、嫌気環境下では SO_4^{2-} 存在下においてメタン生成古細菌と硫酸還元細菌は水素の利用をめぐって競うと言われているが⁶⁾、本実験では硫化水素および硫化物は検出されなかったことから、硫酸還元はほとんど無視できると考えられる。従って、廃棄物層下部で発生した水素は、水素資化性メタン生成古細菌により消費されているものと思われる。

嫌気性の埋立地ではメタン濃度は最終的に約 50~70% に達すると言われており⁴⁾、本実験は現在メタン生成初期段階にあると思われる。他の埋立地模擬実験^{4, 16)}においては、下水汚泥の混合や緩衝溶液による pH 調節および嫌氣的浸出水循環などを行うことにより、メタン濃度が 50%に至るまでに要する時間が 10~50 日と非常に短い。しかし、埋立地からのメタン放出は主にセルロースおよびヘミセルロースの分解に依存すると言われており⁴⁾、本実験では粗繊維の割合が増加したことから依然紙の分解は進んでいないと考えられる。今後、セルロースおよびヘミセルロースを主成分とする紙の分解が進めばメタン生成がさらに活発になるものと思われる。

4.4 メタン放出に関与する微生物の挙動

嫌気(R1)では、メタン生成古細菌が廃棄物層上部において検出されたが、その存在率は低かった。これは VFA の蓄積と 4 以下の低 pH が影響し、メタン生成古細菌の増殖が抑制されたためと考えられる。加えて FISH 法では、活性が低く、増殖速度が遅い微生物の検出は困難となることから²⁾、FISH 法では検出できない低活性のメタン生成古細菌が存在する可能性も考えられる。一方、メタン酸化細菌は、3 条件ともに浸出水および廃棄物層上部において Type II のみ検出された。これは、メタン酸化細菌 Type I は高い酸素濃度および低メタン濃度において優占種となるのに対して、Type II は酸素濃度が低い環境において優占化するためと考えられる¹⁰⁾。メタン酸化細菌はこれまで培養法に依存した菌数計測により、実廃棄物埋立地では 3.4×10^7 cell/g-dry-soil¹²⁾、また埋立地模擬実験では 7.5×10^8 cell/g-dry-soil⁵⁾が報告されている。本実験は依然メタン生成初期段階にあり、メタン濃度が低いにも関わらず、上層好気(R2)ではすでにそれらを上回るメタン酸化細菌が観測され、嫌気(R1)および準好気(R3)よりも 1~2 オーダー多く存在していることが明らかとなった。加えて、428 日間におけるメタン発生量も上層好気(R2)が最も少なかった。これら結果から、埋立地の好気領域を拡大することによりメタン酸化細菌の活動を活発にし、メタン放出の抑制を促進できる可能性が強く示唆された。

4.5 温室効果の比較

実験開始から 428 日間に発生したガスについて温室効果の観点から評価を行った。二酸化炭素の 23 倍というメタンの GWP を考慮して、二酸化炭素換算した場合の初期分解過程における温暖化への寄与率は、準好気(R3)に対して嫌気(R1)0.72 倍、上層好気(R2)0.95 倍で、準好気(R3)が最も高い結果となった。これは 1) 嫌気(R1)では VFA の蓄積のためにメタン生成の律速段階となっていること、2) 上層好気(R2)では VFA の蓄積に加えて、表層付近におけるメタン酸化細菌によるメタン放出が抑制されていること、および発生メタンの好気分解が表層付近に限られ

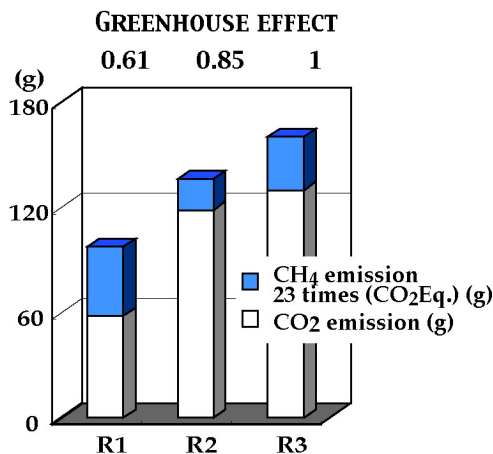


Fig.9 Greenhouse gas emission based on carbon dioxide equivalent

るため、3) 準好気(R3)では下部からの酸素の注入により好氣的領域がカラム全体に広がり、好気分解が加速しているために二酸化炭素の発生が著しいことに加えて、pHの上昇により一部の嫌気領域でのメタン生成も起こっているためである。しかし今後、時間の経過に伴い嫌気(R1)におけるVFAの蓄積が減少すればメタン生成が活発になることが予測される。従って、メタンおよび二酸化炭素の発生が終了し、埋立地が安定した段階で、最終的に発生ガスによる温室効果を比較する必要がある。

5. まとめ

本研究では廃棄物埋立地模擬カラムを用い、異なる埋立地構造における物質収支を基にした埋立地初期分解過程の詳細な観察・解析および温室効果ガスであるメタンの放出に関与する微生物生態についてFISH法による検出・定量を行った。

埋立地構造の違いに関わらず、実験開始から150日目までの酸生成期に有機汚濁物質の流出が著しく起こったが、150日目以降の酸生成・メタン生成期では急激に低下し、有機汚濁物質濃度は好気領域を広く有する準好気条件ほど低く安定した。従って埋立地に浸出水処理施設を設ける場合、好気領域の拡大および周知の浸出水循環と組み合わせた埋立地構造にすることにより、初期高濃度汚濁物質の低下を図り、酸生成・メタン生成期以降の浸出水濃度で処理施設を設計することが望ましい。

メタン放出量は嫌気条件が最も多く、上層好気条件では最も少なかった。そして上層好気条件では最も多いメタン酸化細菌が観測された。これらのことは埋立地表面層における好気領域拡大を図ることにより埋立地内部で生成されたメタンをメタン酸化細菌により抑制することが可能であることを示している。しかしながら、初期428日間の発生ガスを基にした温暖化寄与率を評価した場合、好気条件における二酸化炭素の発生が著しいため、準好気が最も温暖化寄与率が高い結果となった。

今後、さらに長期的に物質収支を基にした異なる埋立地構造における浸出水および温室効果ガス挙動の解明および16S rDNA/RNAを分子マーカーとした分子生物学的手法によるメタン生成古細菌およびメタン酸化細菌の解析が行われることを期待する。

【参考文献】

- 1) Amann, R. I. 1995. In Situ Identification of Micro-Organisms by Whole Cell Hybridization with rRNA-Targeted Nucleic Acid Probes. *MMEM* **3.3.6**:1-15.
- 2) Amann, R. I., W. Ludwig, and K. H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbio. Rev* **59**:143-169.
- 3) Barlaz, M. A. 1996. Microbiology of Solid Waste Landfill, p. 31-70. In A. C. Palmisano and M. A. Barlaz (ed.), *Microbiology of Solid Waste*, 3 ed. Bob Stern.
- 4) Barlaz, M. A., D. M. Schaefer, and R. K. Ham. 1989. Bacterial Population Development and Chemical Characteristics of Refuse Decomposition in a Simulated Sanitary Landfill. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:55-65.

- 5) Chiemchaisri, W., C. Visavanathan, and J. S. Wu. 1999. Biological Activities of Methane Oxidation in Landfill Cover Soils. *Proceedings of the 15th International Conference on Solid Waste Technology and Management*, Pt 1, 1999:125-132.
- 6) Christensen, T. H., and P. Kjeldsen. 1989. Basic Biochemical Processes in Landfill, p. 29-49. In T.H.Cristensen, R.Cossu, and R.Stegmann (ed.), *Sanitary Landfilling: Process, Technology and Environmental Impact*. Academic Press, London.
- 7) Cicerone, R. J., and R. S. Oremland. 1988. Biogeochemical Aspects of Atmospheric Methane. *Global Biogeochem. Cycles* **2**:299-327.
- 8) Crutzen, P. J. 1991. Methane's Sinks and Sources. *Nature* **350**:380-381.
- 9) Guldge, J., A. Ahmad, P. A. Steudler, W. J. Pomerantz, and C. M. Cavanaugh. 2001. Family- and Genus-Level 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes for Ecological Studies of Methanotrophic Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4726-4733.
- 10) Hanson, R. S., and T. E. Hanson. 1996. Methanotrophic Bacteria. *Microbio. Rev* **61**:439-471.
- 11) IPCC. 2001. Third Assessment Report. *Climate Change* 1995.
- 12) Jonse, H. A., and D. B. Nedwell. 1993. Methane Emission and Methane Oxidation in landfill Cover Soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **102**:185-195.
- 13) Kightley, D., D. B. Nedwell, and M. Cooper. 1995. Capacity for Methane Oxidation in Landfill Cover Soils Measured in Laboratory-Scale Soil Microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:592-601.
- 14) Pohland, F. G. 1975. Sanitary Landfill Stabilization with Leachate Recycle and Residual Treatment. *AIChE Symp Ser*:308-318.
- 15) Stahl, D. A., and R. I. Amann. 1991. Development and application of nucleic acid probes, p. 205-248. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Wiley, United Kingdom.
- 16) Stegman, R., and H.-H. Spendlin. 1989. Enhancement of degradation: German Experience, p. 61-82. In T.H.Cristensen, R.Cossu, and R.Stegmann (ed.), *Sanitary Landfilling: Process, Technology and Environmental Impact*. Academic Press, London.
- 17) Stegman, R., and H. H. Spendlin. 1986. Research Activities on Enhancement of Biochemical Processes in Sanitary Landfills. *Water Poll. Res.* **21**:572-591.
- 18) Whalen, S. C., W. S. Reebergh, and K. A. Sandbeck. 1990. Rapid Methane Oxidation in a Landfill Cover Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:3405-3411.
- 19) 荒木信夫, 大橋晶良, 原田秀樹, and I. Machdar. 1999. FISH法を適用した生物膜内硝化細菌の菌数計測と空間分布の観察. *水環境学会誌* **22**:152-159.