

## 塩素化エチレンを対象とした 嫌気性バイオレメディエーション技術の開発と現場適用

### Development and Practical Application of *in situ* Anaerobic Bioremediation of Soil and Groundwater Contaminated with Chloroethenes

上野 俊洋\*, 奥津 徳也, 水本 正浩, 石田 浩昭

TOSHIHIRO UENO, NORIYA OKUTSU, MASAHIRO MIZUMOTO and HIROAKI ISHIDA

栗田工業株式会社 〒329-0105 栃木県下都賀郡野木町川田五丁山1-1

Kurita Water Industries Ltd., 1-1 Gochoyama, Kawada, Nogi-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi 329-0105 Japan

\* TEL: 0280-54-2847 FAX: 0280-57-3317

\* E-mail: toshihiro.ueno@kurita.co.jp

キーワード: 土壌・地下水汚染, トリクロロエチレン, バイオレメディエーション, *Dehalococcoides* 属細菌, Real-Time PCR

Key words: Contamination of soil and groundwater, trichloroethene, bioremediation, *Dehalococcoides*, Real-Time PCR

(原稿受付 2010 年 11 月 5 日 / 原稿受理 2010 年 11 月 12 日)

#### 1. はじめに

テトラクロロエチレン (PCE) やトリクロロエチレン (TCE) 等の塩素化エチレンはドライクリーニングの溶剤や金属の洗浄剤として使用されてきたが, 発ガン性や肝機能障害を誘発する可能性が指摘されており, 土壌・地下水汚染が社会問題となっている。

土壌・地下水汚染対策としては, これまで, 掘削除去や揚水処理が多く用いられてきたが, 掘削除去への偏重は, ブラウンフィールド問題の深刻化や搬出汚染土壌の不適正処理につながりかねない。本年 4 月には, 掘削除去偏重の是正をひとつの目的として, 改正土壌汚染対策法が施行されている。

一方, 嫌気性バイオレメディエーションは, 揚水処理に比べて浄化期間が短く, 掘削除去よりも低コストであることなどの理由から近年適用されるケースが増えている。バイオレメディエーションは, バイオスティミュレーションとバイオオーグメンテーションに大別される。前者は有機物や栄養塩等の増殖基質を供給して土着微生物を活性化するものであり, 後者は外来微生物を導入するものである。現在適用されているのは主としてバイオスティミュレーションであるが, 2005 年, 経済産業省・環境省により「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」(以下利用指針と称する) が告示されたこともあり, バイオオーグメンテーションも徐々に普及しつつある。

当社は, 環境庁「平成 10 年度土壌汚染浄化新技術確立・実証調査」においてバイオスティミュレーションの現場実証を行い<sup>34)</sup>, その後数多くの現場で実浄化を行っている<sup>24,28,36,37)</sup>。また, 2008 年 6 月には, 複合微生物系

として初めて, 利用指針に対する適合確認を経済産業大臣・環境大臣から取得, 現在バイオオーグメンテーションの現場適用を進めているところである<sup>25)</sup>。

ここでは, 当社における嫌気性バイオレメディエーションの検討結果と現場適用事例について紹介する。

#### 2. 嫌気性バイオレメディエーションの概要

塩素化エチレン分解反応の概念図を図 1 に示す。嫌気条件下, PCE や TCE は, ジクロロエチレン (DCE), 塩化ビニル (VC) を経て, エチレンやエタンに脱塩素化される。脱塩素化反応において塩素化エチレンは電子受容体となるが, 電子供与体としては, 有機酸<sup>2)</sup> やアルコール<sup>6,9)</sup>, 糖類<sup>16)</sup>, 酵母エキス<sup>16)</sup>, 有機酸エステル<sup>15)</sup>, 植物油<sup>30)</sup> 等, 多くの有機物が, また, 水素<sup>7)</sup> が利用できる。

多くのバクテリアが塩素化エチレン分解菌として単離され, その分解能力が調べられている。例えば, *Dehalospirillum multivorans*<sup>22)</sup>, *Enterobacter agglomerans* MS-1<sup>27)</sup>, *Dehalobacter restrictus* PER-K23<sup>14)</sup> は PCE や TCE を DCE に脱塩素化して増殖できる。しかし, 筆者の知る限り, エチレンまで完全に脱塩素化できる微生物として単離されているのは *Dehalococcoides* 属細菌のみである。報告されている *Dehalococcoides* 属細菌の塩素化エチレン分解能を表 1 に示した。CBDB1 株を除き, いずれの *Dehalococcoides* 属細菌も塩素化エチレンの脱塩素化により増殖することができる。菌体収率は  $10^8$  copies/ $\mu$ mol-Cl 程度<sup>4)</sup> である。

*Dehalococcoides* 属細菌はそのリボソーム RNA<sup>19)</sup> や TCE 還元デハロゲナーゼ<sup>18)</sup>, VC レダクターゼ<sup>17,21)</sup> の遺

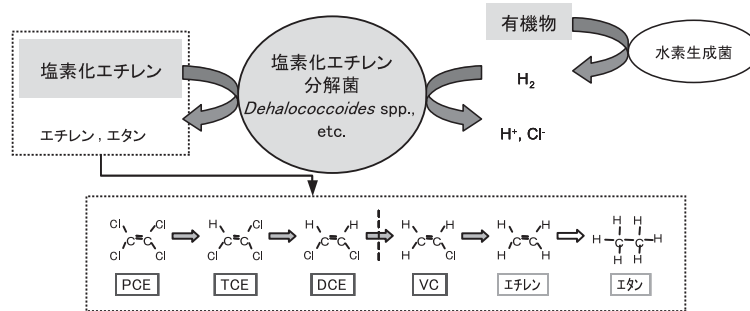


図1. 塩素化エチレン分解反応の概念図.

伝子配列が明らかにされており、特異的な配列部を利用して *Dehalococcoides* 属細菌<sup>13,23)</sup> あるいはその酵素の検出が行われている<sup>26)</sup>。

前述のように、多くの有機物が電子供与体として利用できるが、*Dehalococcoides* 属細菌が電子供与体として直接利用するのは分子状水素とされている。ただし、嫌気条件下、多くの有機物から水素が生成すること、現場の安全管理上水素ガスは取扱いにくいことなどの理由で、実際の現場では多くの場合、水素ではなく、有機物が電子供与体として用いられている。

嫌気性バイオレメディエーションとは地下環境を、上述した嫌氣的脱塩素化反応に適した条件に整えることにより塩素化エチレンを分解する技術であり、①供給する増殖基質（電子供与体、栄養塩類、その他の微量栄養素等）や微生物の種類、量および濃度の設定、②増殖基質や微生物の供給地点、深度、方法および頻度の設定が設計上重要となる。また、地下環境は土質分布等の不確実要素があるため、実際には浄化進捗をモニタリングし、適時設計諸元を微修正しながら浄化を進めることが多い。そのためモニタリング手法や頻度等の設定も重要となる。

増殖基質や微生物の供給方法はさまざまなものがある<sup>38)</sup>。例えば、①井戸からの注入や②ボーリング孔からの注入（ボーリングしながら注入）がある。この場合、地下水循環を行い、増殖基質の拡散を促進させることも可能である。また、③トレンチを設置し、そこに徐放性の増殖基質を充填し、地下水浄化壁とする場合もある。

浄化対策では、しばしば汚染源と拡散域を概念的に区分けして対策方法が論じられる。アメリカ空軍の資料<sup>32)</sup>によると、汚染源では汚染の除去や汚染拡散の抑制を、拡散域では汚染拡散の抑制を目的とし、例えば、汚染源では格子状に、拡散域では列状に注入地点を配置、嫌気性バイオレメディエーションを実施することが示されている（図2）。しかしながら、日本では汚染源と拡散域を含む汚染範囲全域の浄化（汚染の除去）を目指すことが多く、汚染拡散の抑制を目的として適用されることは少ないようである。

### 3. 嫌気性バイオレメディエーションの開発

以下に、嫌気性バイオレメディエーションの検討結果を紹介する。

表1. 報告されている *Dehalococcoides* 属細菌

菌株	PCE	TCE	cis-DCE	trans-DCE	1,1-DCE	VC	1,2-DCA
195 株 <sup>19)</sup>	○	○	○		○		○
VS 株 <sup>9)</sup>			○			○	
FL2 株 <sup>11)</sup>		○	○	○			
BAV1 株 <sup>12)</sup>			○	○	○	○	○
CBDB1 株 <sup>1,3)</sup>							
GT 株 <sup>31)</sup>		○	○		○	○	
MB 株 <sup>4)</sup>	○	○					

“○”は脱塩素化により増殖できることを示す。

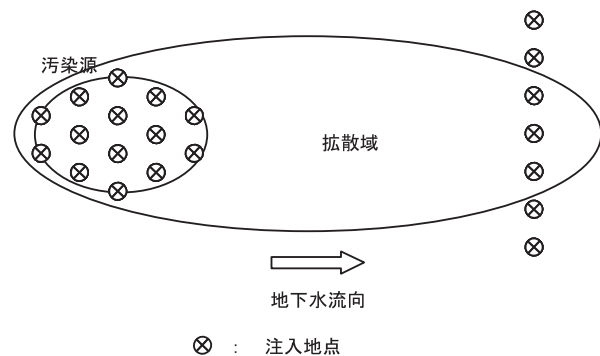


図2. 汚染源と拡散域における注入地点配置例.

#### 3.1. テトラクロロエチレン分解菌の集積培養<sup>33)</sup>

嫌気性バイオレメディエーションの検討を進めるにあたっては、まず PCE をエチレンに分解する系を確立する必要がある。そこで、流動床リアクターを用い、分離源として嫌気汚泥、活性汚泥、汚染土壌・地下水を添加しながら PCE で集積培養を行った。電子供与体は培養開始当初メタノールとしたが、349 日後からはスクロース、プロピオン酸、*n*-酪酸、メタノールおよびエタノールの混合物に変更した。

その結果、PCE は約 400 日後からエチレンに、約 500 日後からエタンに分解されるようになり、PCE をエチレンおよびエタンに分解する微生物群を取得することができた（図3）。そこで、培養体から DNA を抽出し、2 種の制限酵素 (*Bst*U1, *Hha*I) を用いて T-RFLP 解析を行った。図4には *Bst*U1 の結果を示す。エレクトロフェログラムには数多くのピークが認められたが、図中 B1

に *Dehalococcoides* 属細菌に相当するピークが認められ、PCE 集積培養体に *Dehalococcoides* 属細菌が存在していることが確認された。

### 3.2. cis-ジクロロエチレン分解菌の集積培養<sup>20)</sup>

バイオオーグメンテーションに利用するための分解微生物（以下「利用微生物群」と称する）を取得するため、さらに集積培養を行った。実際の現場では、自然状態で PCE や TCE が cis-DCE に変換され、cis-DCE が比較的高濃度に残留している場合が多く見受けられる。バイオオーグメンテーションの実用化には cis-DCE 以降の分解がより重要となるため、ここでは cis-DCE を確実にエチレンにまで脱塩素化する微生物群の取得を試みた。集積培養中、図 5 に示すように、cis-DCE で培養した場合に、しばしば VC の脱塩素化能が失われることがあったため、最終的には VC で集積培養を行った（電子供与体は有機酸）。

その結果、*Trichococcus pasteurii* を優占種とし、*Dehalococcoides* 属細菌を含む培養体が得られた。この培養体から DNA を抽出し、3 種の制限酵素 (*Bst*U1, *Hha*I, *Sau*96I) を用いて T-RFLP 解析を行ったところ、図 6 (*Bst*U1 を用いた結果) に示すようにエレクトロフェログラムは単純な形態となった。

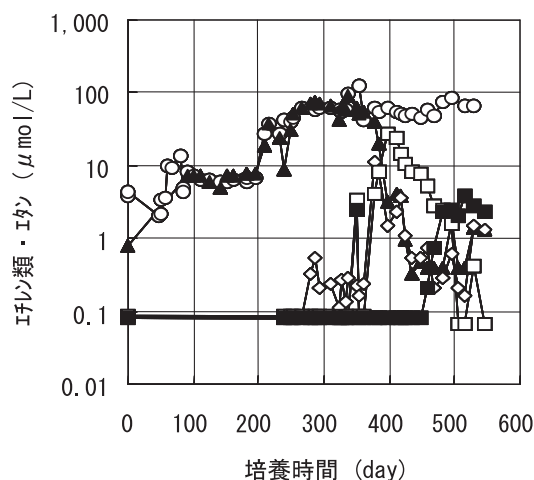
上記培養体においては、*T. pasteurii* が全バクテリアの約 98% を占め、塩素化エチレン分解菌である *Dehalococcoides* 属細菌の存在率は 1% 程度と小さい。そこで、実際のバイオオーグメンテーションでは、集積培養液中の *Dehalococcoides* 属細菌を特異的に濃縮して存在率を 50% 以上にあげたものを利用微生物群として使用している。利用微生物群の電子顕微鏡写真を図 7 に示す。

### 3.3. 電子供与体、および硫酸イオンの影響の検討<sup>33)</sup>

嫌気性バイオレメディエーションでは、有機物を地下に供給し、水素生成菌の作用により、間接的に水素を供給する。一方、*Dehalococcoides* 属細菌は、メタン生成菌や硫酸還元菌など、水素を消費する微生物と水素をめぐって競合する。*Dehalococcoides* 属細菌の水素に対する飽和定数はメタン生成菌や硫酸還元菌に比べて低く、親和度が高い<sup>10,29,39)</sup>。そのため、プロピオン酸など、エネルギー論上、生成する水素濃度が低く抑えられる物質が、上記競合において *Dehalococcoides* 属細菌に有利とされる<sup>8)</sup>。

そこで、この点を実用面で検証するため、前述 (3.1.) の PCE 分解菌を種菌とし、土壌充填カラムに電子供与体として様々な有機物を通水し、また、硫酸を添加して、PCE 分解に与える影響を調べた。

### A. 流入水および出口流出水



### B. 出口排出ガス

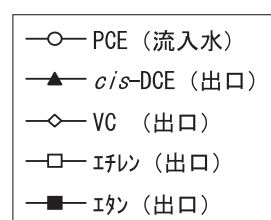
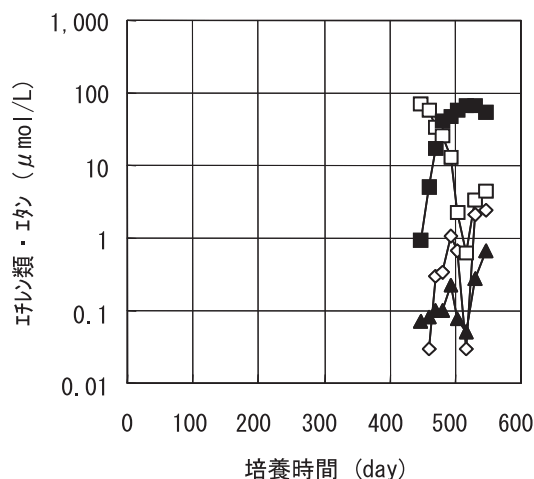


図 3. PCE 分解菌集積培養におけるエチレン類およびエタンの濃度変化。

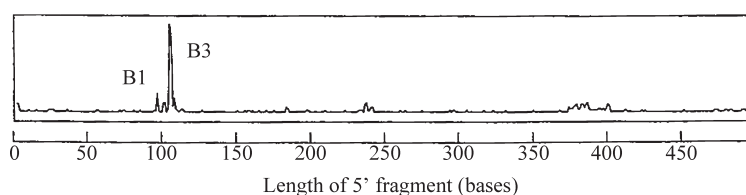
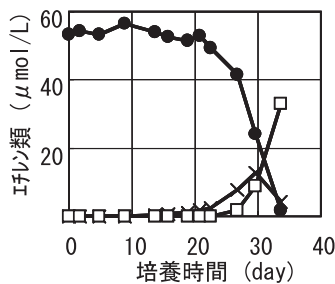


図 4. PCE 集積培養体の T-RFLP 解析結果

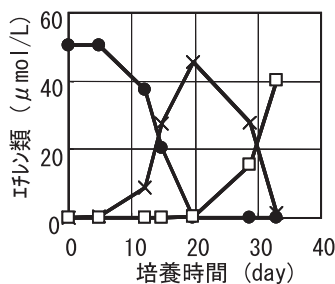
電子供与体としてエタノール (30 mg/L), 乳酸 (30 mg/L), スクロース (50 mg/L), あるいはプロピオン酸 (60 mg/L) を供給したところ, いずれも水滞留時間 (HRT) 4~5 時間で 4 mg/L の PCE をエチレンにまで分解し, PCE, TCE および *cis*-DCE を地下水基準 (それぞれ 0.01 mg/L 以下, 0.03 mg/L 以下, 0.04 mg/L 以下) に, VC を 0.01 mg/L 以下にすることができた。図 8A, 図 8B にそれぞれエタノールとプロピオン酸を用いた試験の結果を示す。

また, 硫酸イオンを添加 (14~61 mg/L) することにより, HRT 4 時間では VC 濃度が上昇し, 若干脱塩素化反応への阻害が認められたものの, HRT 12 時間で PCE はエチレンにまで分解された。図 8C に硫酸イオン 61 mg/L の試験結果を示す。当社が調査した国内 1,032 地点の地下水では, その 64% が硫酸濃度 60 mg/L 以下であった (図 9)。これらのことから, 水素をめぐる競争という点では, 実用上, 電子供与体の種類や地下水中の硫酸が大きな課題や障害になることはない判断した。

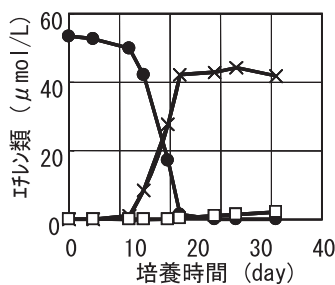
a) VC集積培養体による *cis*-DCE分解



b) *cis*-DCE集積培養体による *cis*-DCE分解



c) *cis*-DCE集積培養体による *cis*-DCE分解 (ただしb)を継代培養したもの)



●- : *cis*-DCE, -x- : VC, -□- : エチレン

図 5. VC 集積体および *cis*-DCE 集積体による *cis*-DCE の脱塩素化。

### 3.4. バイオスティミュレーションの適用性と *Dehalococcoides* 属細菌の検出<sup>35)</sup>

Hendrickson<sup>13)</sup> は *Dehalococcoides* 属細菌が北米や欧州に広く分布すること, およびバイオレメディエーションにおいて有効に働く可能性があることを報告している。しかしながら, 日本国内において, *Dehalococcoides* 属細菌がどの程度分布し, あるいはバイオスティミュレーションがどの程度適用できる可能性があるのかは明らかでなかった。そこで, 国内 14 箇所の TCE 汚染現場から土壌・地下水を採取, TCE と有機酸で培養し, TCE 分解の有無からバイオスティミュレーションの適用性を調べた。また, プライマーとして表 2 に示す De624f および De1232r を用い, *Dehalococcoides* 属細菌の 16S rDNA を標的とした PCR によって *Dehalococcoides* 属細菌の検出を試みた。

結果を表 3 に示す。14 種類の土壌のうち半数にあたる 7 つの土壌で TCE がエチレンあるいはエタンまで分解し, これらの土壌を採取した現場にはバイオスティミュレーションが適用できるものと考えられた。

また, TCE がエチレンあるいはエタンにまで分解した土壌では PCR 反応によりアガロースゲル上に DNA の増幅が認められ, 培養後の土壌・地下水中に *Dehalococcoides* 属細菌が存在することがわかった。

これらのことから, *Dehalococcoides* 属細菌がエチレンへの分解を担っていることが示唆された。逆に, *Dehalococcoides* 属細菌が生育していない現場にはバイオスティミュレーションを適用できないことが予想され, PCR を用いた *Dehalococcoides* 属細菌の検出によりバイオスティミュレーションの適用性を予想できると考えられた。

現在, 当社では適用性判断と浄化進捗予測を行うため,

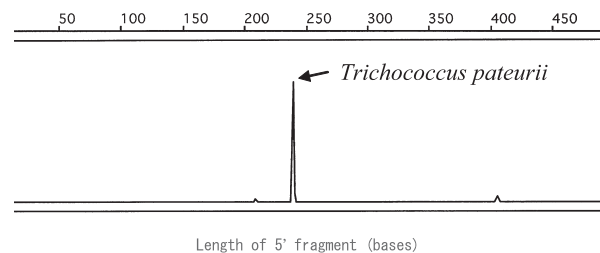


図 6. *cis*-DCE 集積体の T-RFLP 解析結果

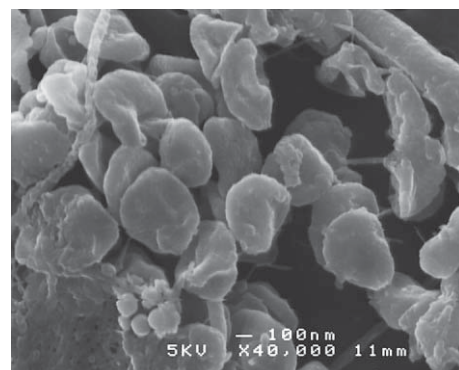


図 7. 利用微生物群の顕微鏡写真。

プライマーとして De624f および De1232r (表 2) を、ハイブリダイゼーションプローブとして De971fL および De997fR (表 2) を用い、*Dehalococcoides* 属細菌の 16S rDNA を標的とした Real-Time PCR により *Dehalococcoides* 属細菌の定量検出を行っている。また、状況に応じて、TCE 還元デハロゲナーゼや VC レダクターゼの定量検出も行っている。

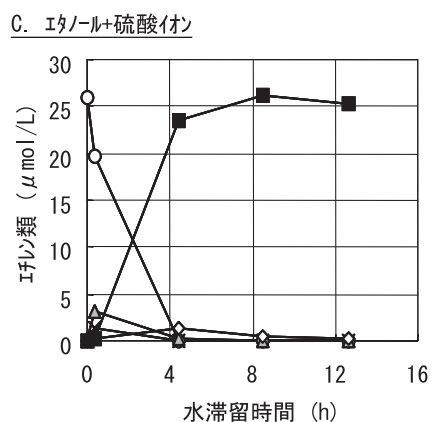
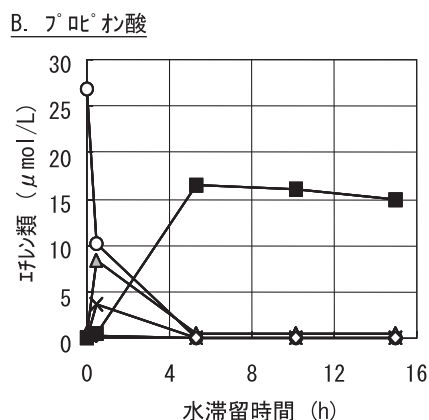
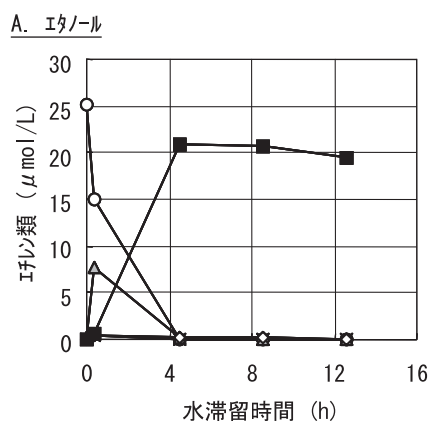
### 3.5. バイオオーグメンテーションの有効性確認<sup>20)</sup>

バイオオーグメンテーションの有効性を確認するた

め、カラム試験を実施した。カラム試験には塩素化エチレン汚染現場より採取した土壌および地下水を利用した。カラムは同一のものを 2 本設置し、一方はバイオスティミュレーション用、他方はバイオオーグメンテーション用とした。オーグメンテーションカラム、スティミュレーションカラムともに、嫌気条件とするために 15 日間予備通水を行った後、本試験を開始した。オーグメンテーションカラムには、本試験開始時および 8 日後に利用微生物群培養液 (前述 (3.2.) で集積培養したもの) を 1 mL (*Dehalococcoides* 属細菌の 16S rDNA 濃度として約  $10^7$  copies/mL) 植種した。また両カラムには本試験開始時、8 日後、14 日後に、電子供与体として有機酸を添加した。

両カラムにおける *cis*-DCE の分解挙動を図 10 に示す。スティミュレーションカラムでは試験期間中 *cis*-DCE の分解はほとんど認められなかったのに対し、オーグメンテーションカラムでは、本試験開始 29 日目に *cis*-DCE が 0.04 mg/L 以下 (地下水基準) まで分解された。また、オーグメンテーションカラムでは、28 日後に *vcrA* コピー数に有意な上昇が認められた。これは、当初は植種した *Dehalococcoides* 属細菌 (*vcrA* を保有) のほとんどが土壌へ吸着し、塩素化エチレンの分解に伴って *Dehalococcoides* 属細菌が増殖、一部が液相に移動したことによるものと考えられる。

これらの結果から、本利用微生物群を土壌・地下水に供給することにより、塩素化エチレン分解菌が生息しない汚染現場の浄化が可能となるだけでなく、土着の分解菌が生息している現場でも、分解菌量を増やすことにより、浄化期間の短縮化が期待できると考えられた。さらに、塩素化エチレンを、VC の蓄積なくエチレンまで確実に分解できるものと期待された。



○ PCE    × TCE    △ *cis*-DCE  
◇ VC    ■ Iflen

図 8. PCE 分解における電子供与体・硫酸イオンの影響。

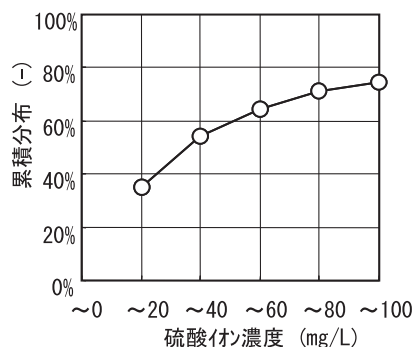


図 9. 国内の地下水中硫酸イオン濃度の検出頻度

表 2. PCR プライマーおよびハイブリダイゼーションプローブ

Bact27f	: 5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
De624f	: 5'-CAGCAGGAGAAAACGGAATT-3'
Bact1492r	: 5'-ACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'
De1232r	: 5'-GACAGCTTTGGGGATTAGC-3'
De971fL	: 5'-GTAGTGAAGTCAAAGGGGAACGACC-3' (3'FITC 標識)
De997fR	: 5'-GTAAAGTCAGGAAGTGCACAGGTG-3' (5'LCRed640 標識)

表 3. TCE 分解試験と *Dehalococcoides* 属細菌検出の結果.

TCE 分解試験結果：○ (エチレン・エタンまで分解)  
 △ (*cis*-DCE で分解が停止)  
 × (全く分解せず).

*Dehalococcoides* 属細菌検出結果：○ (検出), × (未検出).

サンプル	土壌		TCE 分解 試験結果	<i>Dehalococcoides</i> 属 細菌の検出結果
	土質	採取深度		
A	腐植物混じり 粘土	GL-3 m	○	○
B	腐植物混じり シルト	GL-3 m	○	○
C	砂	GL-10 m	○	○
D	粘土	GL-5 m	○	○
E	シルト	GL-12 m	○	○
F	砂	GL-1 m	○	○
G	砂	GL-7 m	○	○
H	粘土	GL-9 m	△	×
I	シルト	GL-8 m	△	×
J	粘土	不明	△	×
K	シルト	不明	△	×
L	シルト	Gl-2 m	△	×
M	マサ土	GL-5 m	×	×
N	風化岩	GL-7 m	×	×
結果まとめ			7/14	7/14

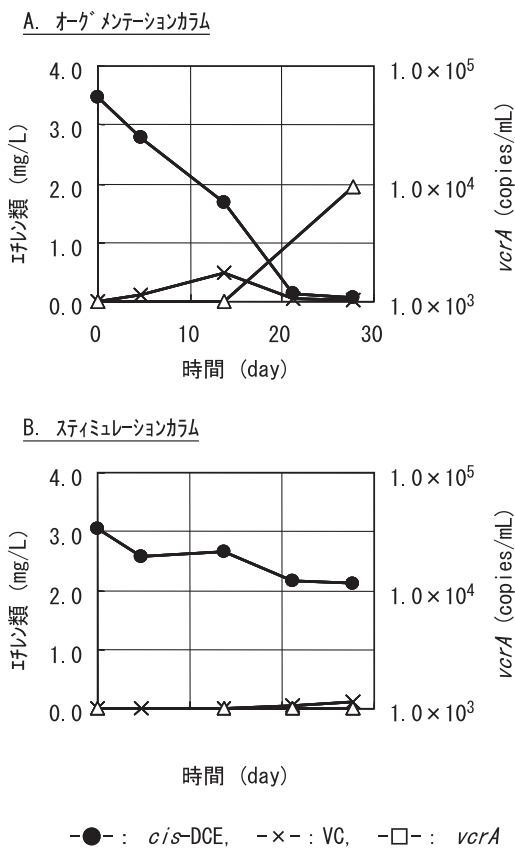


図 10. 土壌カラムにおける *cis*-DCE の分解におけるバイオオーグメンテーションの効果.

### 3.6. 利用微生物群の安全性把握<sup>20)</sup>

利用微生物群の安全性を把握することを目的に、利用微生物群培養液（前述（3.2.）で集積培養したもの）について、細菌 16S rDNA のランダムクローニングを行った。得られた 96 のクローンそれぞれについて、16S rDNA の前方部約 500 bp の塩基配列の決定を試み、最終的に 92 クローン分について塩基配列データを取得した。Ribosomal Database Project データベースを利用して近縁種の推定を行った。

その結果、90 クローンは *T. pasteurii*（相同性：98.4%～99.8%）、2 クローンは *Clostridium peptidivorans*（相同性：99.0%～99.6%）に最も近縁であることが明らかとなった。

「バイオセーフティー指針」（日本細菌学会）およびドイツ DSMZ の各データベースを調べた結果、*T. pasteurii*、*C. peptidivorans* についてはいずれも病原性の報告はなかった。また、その存在率が小さいため *Dehalococcoides* 属細菌由来のクローンは得られなかったが、*Dehalococcoides* 属細菌についても病原性の報告はない。

また、利用微生物群にヒト病原体が存在しないことを確認するため、95 種類の代表的ヒト病原体について特異的な遺伝子配列を対象とした定量 PCR を実施した。その結果、これらの該当遺伝子の濃度は定量下限値（約  $2.5 \times 10^2$  copies/mL）未満であった。

これらの結果より、本利用微生物群は有意な数の病原性細菌を含まないことが明らかとなり、バイオオーグメンテーション利用の安全性を十分に確保できると考えられた。

#### 4. 嫌気性バイオレメディエーションの現場適用

以下に、嫌気性バイオレメディエーションの現場適用事例を紹介する。

##### 4.1. バイオスティミュレーションの現場適用事例<sup>36)</sup>

対象サイトではかつて洗浄溶剤として TCE が使用されていた。土壌・地下水調査を実施したところ、GL -5 m 以上の土壌と帯水層地下水が TCE および *cis*-DCE で汚染されていることが判明した。そこで、調査結果に基づき、一部掘削除去を行うとともに揚水処理を行った。しかしながら、対策開始後 2 年を経ても地下水濃度に顕著な変化は認められなかった。そこで、短期浄化を目指してバイオスティミュレーションを適用した。適用は、揚水処理による浄化対策を開始した 760 日後、汚染エリア 2 から開始した (図 11)。また、970 日後からはエリア 1 にも適用を拡大した。

当サイトには、地表から深度 1 m に盛土が分布し、

以下深度 1~5 m に粘性土、5~15 m に砂礫、15 m 以下に粘性土が分布している。地下水は深度 5~15 m の砂礫層に存在し、これが帯水層となっている。

増殖基質は、脱炭素塔に通した水道水でその濃厚溶液を希釈することにより調製、帯水層全深度 (5~15 m) にスクリーンをもつ井戸より注入した (図 12)。

地下水流向の下流側、敷地境界の井戸では、汚染拡散防止対策として揚水処理を継続したが、それ以外の井戸については揚水処理を停止し、増殖基質注入井戸に転用した。

汚染エリア 1 では観測井戸 MW-1 で、汚染エリア 2 では観測井戸 MW-2 でモニタリングを行った。MW-2 におけるモニタリング結果を図 13 に示す。

バイオスティミュレーションを適用する前までは地下水濃度に大きな変化は認められなかったが、適用 (増殖基質注入) 後、TCE 濃度は速やかに低下し、*cis*-DCE 濃度が上昇、TCE から *cis*-DCE への変換が観察された (760~780 日)。次に、*Dehalococcoides* 属細菌 16S rDNA のコピー数が増加し、*Dehalococcoides* 属細菌の増殖が確認された (780~920 日)。この期間は *cis*-DCE に顕著な濃度変化は観察されなかった。その後 *cis*-DCE 濃度が低下、VC、エチレンあるいはエタンの濃度が上昇し、*cis*-DCE のエチレンあるいはエタンへの分解が観察された (920~1,170 日)。また、MW-1 についても同様に、TCE から *cis*-DCE への変換、*cis*-DCE のエチレンあるいはエタンへの分解、および *Dehalococcoides* 属細菌の増殖が認められた (データ示さず)。

最終的には、MW-1、MW-2 とともに、適用 410 日後 (揚水処理開始から 1,170 日後) までに TCE と *cis*-DCE がそれぞれ 0.03 mg/L 以下、0.04 mg/L 以下 (地下水基準) となり、対象サイトを浄化することができた。

前述のように、TCE が *cis*-DCE に変換された後、*cis*-DCE に顕著な濃度低下が観察されない期間があった (780~920 日)。この期間、塩素化エチレンの濃度変化からだけでは浄化の進捗を把握できないが、*Dehalococcoides* 属細菌の増殖を確認することにより浄化の進捗状況を把握することができた。Real-Time PCR による定量検出<sup>23)</sup> は浄化進捗予測に有効であると言える。

##### 4.2. バイオオーグメンテーションの現場実証試験<sup>25)</sup>

前述のように、当社は、複合微生物系として初めて利用指針に対する適合確認を取得した。そこで、確認申請した事業計画に従って実証試験を行い、バイオオーグメ

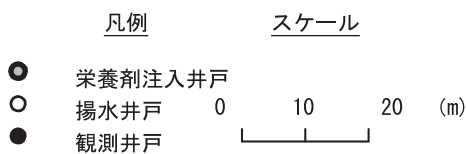
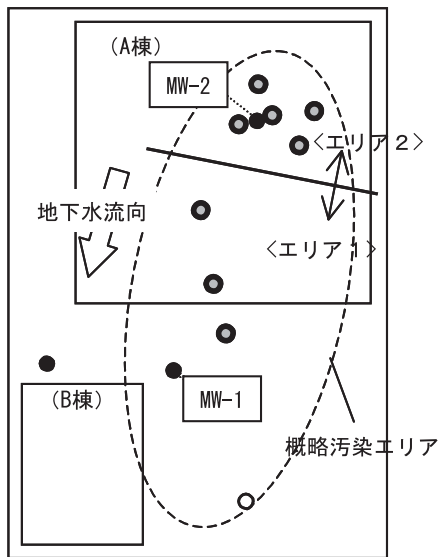


図 11. 井戸の平面配置.

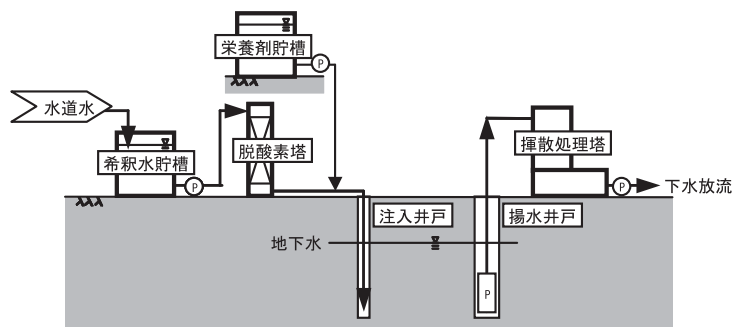
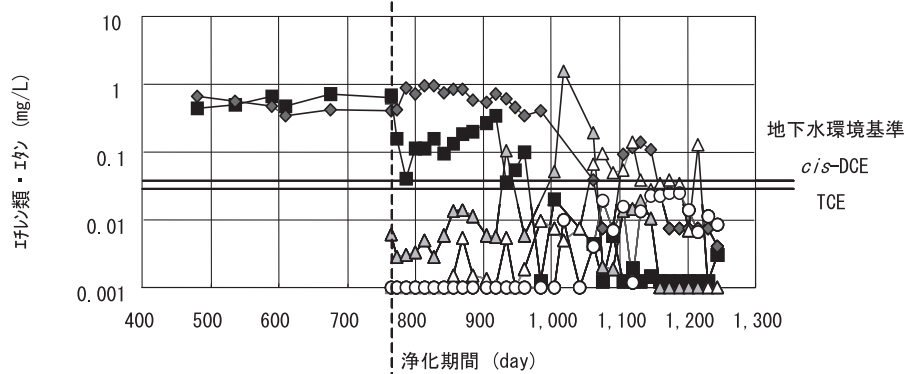
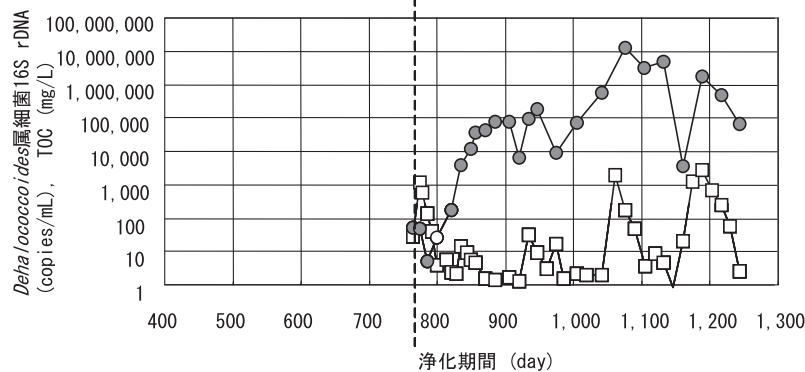


図 12. 増殖基質注入・揚水処理フロー.

## 1) MW-2におけるTCEの分解 汚染I72 : バイオスティミュレーション開始

2) MW-2における*Dehalococcoides*属細菌の増殖とTOCの挙動

TCE      ■ *cis*-DCE      ◆ VC      ▲  
 エチレン      △ エチン      ○  
*Dehalococcoides*属細菌16S rDNA      ●  
 TOC      □

図13. バイオスティミュレーション適用サイトにおけるモニタリング結果.

ンテーションの有効性を評価した。

実証サイトの土質は砂礫層であり、地下水位は深度6 m 前後、帯水層厚みは約13 m である。

本サイトにおけるTCEの汚染状況と設置井戸の配置は図14に示す通りである。TCE濃度0.1~1 mg/Lの範囲に利用微生物群注入井戸（オーグメンテーション井戸：AIW）を設置し、AIWより1 m離れた地点にモニタリング井戸MW-1を設置した。また対照井戸として、AIWより約20 m離れた地点に増殖基質注入のみの井戸（スティミュレーション井戸：SIW）を、約30 m離れた地点に増殖基質も注入しないモニタリング井戸（MW-3）を設置した。さらに安全性評価の目的で、AIWの約150 m上流側にモニタリング井戸（MW-4）、3 m下流にMW-2、約100 m下流側には系外流出防止用揚水井戸とモニタリング井戸（MW-5）を設置した。全ての井戸には、深度6~19 mの帯水層に対してスクリーンを設置した。

なお、実証試験開始前に測定したところ、AIW、SIW、MW-1およびMW-3における地下水中の*Dehalococcoides*属細菌16S rDNAコピー数はいずれも定量下限値（5 copies/mL）未満であった。

利用微生物群は、10 L規模の発酵槽を用いて前述

（3.2.）のようにVCで培養し、専用タンクを用いて嫌気条件を保持したまま実証サイトに輸送した。合計約25 Lの利用微生物群（*Dehalococcoides*属細菌16S rDNAコピー数：約 $1 \times 10^8$  copies/mL）を増殖基質とともにAIWに注入した。なお、地下水中を嫌気条件にするため、利用微生物群注入にあたっては事前に増殖基質を注入した。バイオオーグメンテーションでは増殖基質の注入を2回実施したことになる。一方、バイオスティミュレーションでは増殖基質の注入は1回であるが、増殖基質の注入量は両者とも同じである。

AIWおよびSIWでのエチレン類の濃度変化、ならびに*Dehalococcoides*属細菌16S rDNAおよび*vcrA*コピー数の変化をそれぞれ図15および図16に示す。

AIWでは、利用微生物注入後にTCE濃度の低下に伴い*cis*-DCE濃度が一時的に上昇、その後低下しエチレン濃度が上昇した。ここでVC濃度が著しく上昇することにはなかった。このように、AIWではVCが蓄積することなく、TCEおよび*cis*-DCEがエチレンへ分解した（図15A）。また、注入2ヵ月後（図中100日目）には、TCE、*cis*-DCEともに地下水基準（それぞれ0.03 mg/L以下、0.04 mg/L以下）を達成した。MW-1でも同様に



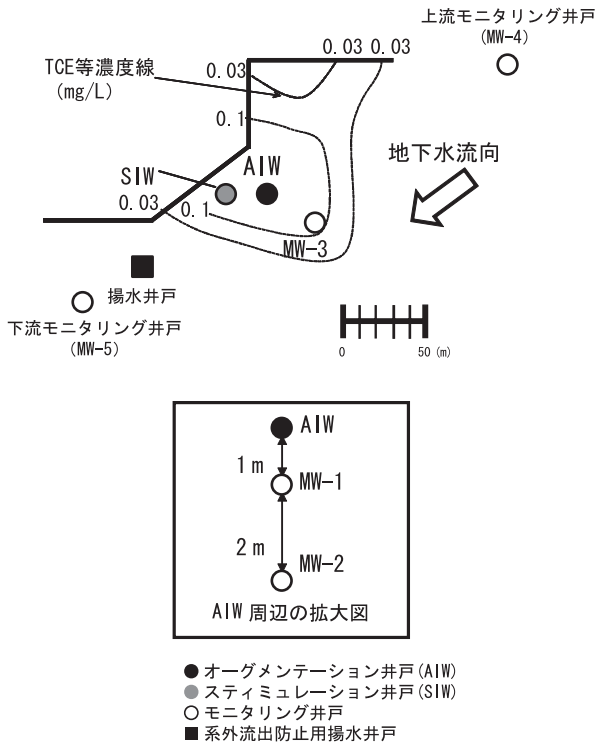


図 14. 地下水中の TCE 濃度分布および井戸の平面配置。

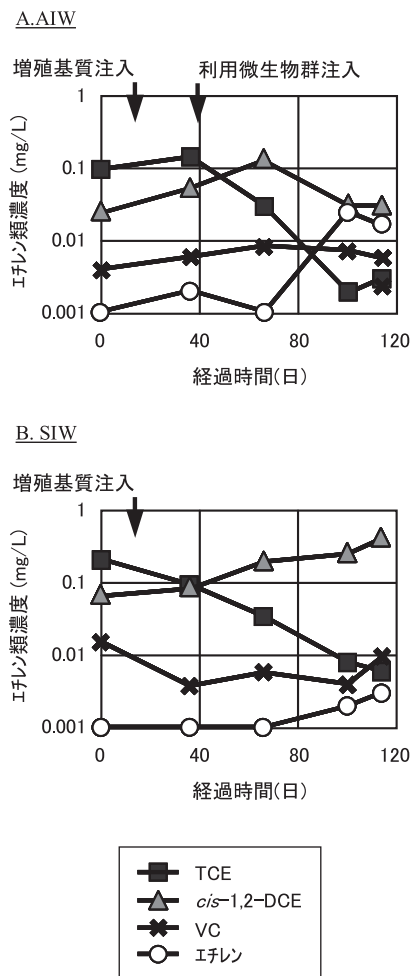


図 15. バイオオージェメンテーション実証試験におけるエチレン類の濃度変化。

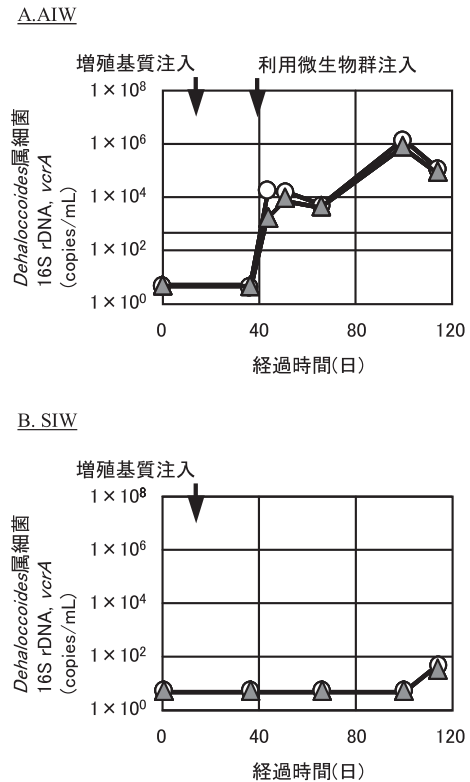


図 16. バイオオージェメンテーション実証試験における *Dehalococcoides* 属細菌 16S rDNA および *vcrA* のコピー数変化。

TCE および *cis*-DCE がエチレンに分解し、地下水基準を達成した (データ示さず)。

一方、SIW については、増殖基質注入後に TCE に濃度低下が観察されたものの、*cis*-DCE 濃度が上昇するのみで、VC およびエチレン濃度に顕著な変化は認められなかった (図 15B)。MW-3 では塩素化エチレン類に顕著な濃度変化は認められなかった (データ示さず)。

また、AIW では、利用微生物群注入後 *Dehalococcoides* 属細菌 16S rDNA および *vcrA* コピー数が上昇し、注入 2 ヶ月後 (図中 100 日目) には約  $1.0 \times 10^6$  copies/mL となった。(図 16A)。また、AIW 下流の MW-1 においても有意な上昇が確認された (データ示さず)。

一方、SIW では、*Dehalococcoides* 属細菌 16S rDNA および *vcrA* コピー数ともに注入 2 ヶ月後 (図中 100 日目) まで定量下限値未満であり、注入約 3.5 か月後 (図中 115 日後) に約 40 copies/mL 検出されたのみであった (図 16B)。MW-3 では常時定量下限値未満であった (データ示さず)。

これらの結果から、バイオオージェメンテーションによって地下水中の *Dehalococcoides* 属細菌数を増やすことができ、バイオスティミュレーションと比較してより短期間で塩素化エチレン汚染地下水を浄化できることが示された。

一方、AIW の下流に設置したモニタリング井戸 (MW-2 および MW-5) において病原性細菌のモニタリングを継

続しているが、利用微生物群注入後 2.5 カ月経過した時点において病原性細菌の有意な増加は確認されていない。

## 5. おわりに

本稿では、当社における嫌気性バイオレメディエーションの検討結果と現場適用事例について述べた。バイオスティミュレーションについては、「揚水処理より短く、掘削除去より安く」、といった市場ニーズに対応し、近年かなり普及してきた。しかしながら、まだまだ浄化期間・費用に対する期待は大きい。また、バイオスティミュレーションではそもそも塩素化エチレン分解菌が生息しない現場には適用できない。これに対してバイオオーグメンテーションは塩素化エチレン分解菌の濃度を高めることで浄化期間を短縮、さらに費用を低減することが期待できる。また、分解菌が生息しない現場にも適用することも期待できる。今後は、さらにバイオオーグメンテーションの現場適用を進め、短期間・安価で、適切な浄化を行うことにより土壌・地下水環境の保全に貢献していきたいと考えている。

## 謝 辞

この度は当社の技術を評価いただき、環境バイオテクノロジー学会技術賞という大変栄誉ある賞をいただいたこと、誠に光栄に存じます。

本技術開発の一部は NEDO プロジェクト「生分解・処理メカニズムの解析と制御技術開発」の一環として実施したものです。開発にあたって多岐にわたるご指導をいただきました東北学院大学工学部の中村寛治教授に心より感謝申し上げます。

## 文 献

- Adrian, L., U. Szewzyk, J. Wecke, and H. Görisch. 2000. Bacterial dehalorespiration with chlorinated benzenes. *Nature*. 408: 580–583.
- de Bruin, W.P., M.J. Kotterman, M.A. Posthumus, G. Schraa, and A.J. Zehnder. 1992. Complete biological reductive transformation of tetrachloroethene to ethane. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1996–2000.
- Bunge, M., L. Adrian, A. Kraus, M. Opel, W.G. Lorenz, J.R. Andreesen, H. Görisch, and U. Lechner. 2003. Reductive dehalogenation of chlorinated dioxins by an anaerobic bacterium. *Nature*. 421: 357–360.
- Cheng, D. and J. He. 2009. Isolation and characterization of “Dehalococcoides” sp. strain MB, which dechlorinates tetrachloroethene to trans-1,2-dichloroethene. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 5910–5918.
- Cupples, A.M., A.M. Spormann, and P.L. McCarty. 2003. Growth of a Dehalococcoides-like microorganism on vinyl chloride and cis-dichloroethene as electron acceptors as determined by competitive PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 953–959.
- DiStefano, T.D., J.M. Gossett, and S.H. Zinder. 1991. Reductive dechlorination of high concentrations of tetrachloroethene to ethene by an anaerobic enrichment culture in the absence of methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2287–2292.
- DiStefano, T.D., J.M. Gossett, and S.H. Zinder. 1992. Hydrogen as an electron donor for dechlorination of tetrachloroethene by an anaerobic mixed culture. *Appl. Environ.*

- Microbiol.* 58: 3622–3629.
- Fennell, D.E. and J.M. Gossett. 1997. Comparison of butyric acid, ethanol, lactic acid, and propionic acid as hydrogen donors for the reductive dechlorination of tetrachloroethene. *Environ. Sci. Technol.* 31: 918–926.
- Freedman, D.L. and J.M. Gossett. 1989. Biological reductive dechlorination of tetrachloroethylene and trichloroethylene to ethylene under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2144–2151.
- Haston, Z.C. and P.L. McCarty. 1999. Chlorinated ethene half-velocity coefficients(Ks) for reductive dehalogenation. *Environ. Sci. Technol.* 33: 223–226.
- He, J., Y. Sung, R. Krajmalnik-Brown, K.M. Ritalahti, and F.E. Löffler. 2005. Isolation and characterization of Dehalococcoides sp. strain FL2, a trichloroethene (TCE)- and 1,2-dichloroethene-respiring anaerobe. *Environ. Microbiol.* 7: 1442–1450.
- He, J., K.M. Ritalahti, K.L. Yang, S.S. Koenigsberg, and F.E. Löffler. 2003. Detoxification of vinyl chloride to ethene coupled to growth of an anaerobic bacterium. *Nature*. 424: 62–65.
- Hendrickson, E.R., J.A. Payne, R.M. Young, M.G. Starr, M.P. Perry, S. Fahnestock, D.E. Ellis, and R.C. Ebersole. Molecular analysis of Dehalococcoides 16S ribosomal DNA from chloroethene-contaminated sites throughout North America and Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 485–495.
- Holliger, C., D. Hahn, H. Harmsen, W. Ludwig, W. Schumacher, B. Tindall, F. Vazquez, N. Weiss, and A.J. Zehnder. 1998. Dehalobacter restrictus gen. nov. and sp. nov., a strictly anaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetra- and trichloroethene in an anaerobic respiration. *Arch. Microbiol.* 169: 313–321.
- Koenigsberg, S.S., A. Willett, and P. Rohdenburg. 2004. Biological treatment of residual DNAPL with slow-release electron donor HRC-X. Proceedings of the fourth international conference on remediation of chlorinated and recalcitrant compounds. 2E-07.
- 小松俊哉, 桃井清至, 松尾友矩, 花木啓祐. 1995. cis-1,2-ジクロロエチレン分解嫌気性菌の集積培養. *水環境学会誌*. 18: 396–404.
- Krajmalnik-Brown, R., T. Hölscher, I.N. Thomson, F.M. Saunders, K.M. Ritalahti, and F.E. Löffler. 2004. Genetic identification of a putative vinyl chloride reductase in Dehalococcoides sp. strain BAV1. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6347–6351.
- Magnuson, J.K., M.F. Romine, D.R. Burris, and M.T. Kingsley. 2000. Trichloroethene reductive dehalogenase from Dehalococcoides ethenogenes: sequence of tceA and substrate range characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5141–5147.
- Maymó-Gatell, X., U. Chien, J.M. Gossett, and S.H. Zinder. 1997. Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science*. 276: 1568–1571.
- 水本正浩, 石田浩昭, 上野俊洋, 中村寛治. 2008. 複合微生物系を利用したバイオオーグメンテーション浄化技術の開発. *土壌環境センター技術ニュース*. 15: 1–8.
- Müller, J.A., B.M. Rosner, G. Von Abendroth, G. Meshulam-Simon, P.L. McCarty, and A.M. Spormann. 2004. Molecular identification of the catabolic vinyl chloride reductase from Dehalococcoides sp. strain VS and its environmental distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4880–4888.
- Neumann, A., H. Scholz-Muramatsu, and G. Diekert. 1994. Tetrachloroethene metabolism of Dehalospirillum multivorans. *Arch. Microbiol.* 162: 295–301.
- 中村寛治, 上野俊洋, 石田浩昭. 2003. 塩素化エチレン分解に関与する微生物の解析および検出. *土壌環境センター技術ニュース*. 7: 15.
- 大谷高広, 奥津徳也, 石田浩昭. 2010. 嫌気性バイオレメディエーションによる地下水浄化対策事例. 第16回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究会講演集. 473–477.

- 25) 奥津徳也, 田村 渉, 水本正浩, 石田浩昭, 上野俊洋, 飯泉太郎. 2010. *Dehalococcoides* 属細菌を利用したバイオオーグメンテーションの実用化に向けた検討. 第16回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会講演集. 42-45.
- 26) Ritalahti, K.M., B.K. Amos, Y. Sung, Q. Wu, S.S. Koenigsberg, and F.E. Löffler. 2006. Quantitative PCR targeting 16S rRNA and reductive dehalogenase genes simultaneously monitors multiple *Dehalococcoides* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2765-2774.
- 27) Sharma, P.K. and P.L. McCarty. 1996. Isolation and characterization of a facultatively aerobic bacterium that reductively dehalogenates tetrachloroethene to cis-1,2-dichloroethene. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 761-765.
- 28) 塩谷 剛, 上野俊洋, 石田浩昭, 橋本正憲. 2010. 嫌気性バイオレメディエーション法による塩化ビニルモノマー汚染地下水の浄化効果. 第16回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会講演集. 612-615.
- 29) Smatlak, C.R. and J.M. Gossett. 1996. Comparative Kinetics of Hydrogen utilization for reductive dechlorination of tetrachloroethene and methanogenesis in an anaerobic enrichment culture. *Environ. Sci. Technol.* 30: 2850-2858.
- 30) Solutions-IES. 2006. Using the emulsified oil process. pp. 1-9. SERDP and ESTCP. Protocol for enhanced *in situ* bioremediation using emulsified edible oil (ER-0221). Arlington, USA.
- 31) Sung, Y., K.M. Ritalahti, R.P. Apkarian, and F.E. Löffler. 2006. Quantitative PCR confirms purity of strain GT, a novel trichloroethene-to-ethene-respiring *Dehalococcoides* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1980-1987.
- 32) The Parsons corporation. 2004. State of the practice. pp. 1\_1-1\_23. Principles and practices of enhanced anaerobic bioremediation of chlorinated solvents. AFCEE, NAVFAC & ESTCP. Brooks city-base, Port Hueneme & Arlington. USA.
- 33) 上野俊洋, 石田浩昭, 中村寛治. 2001. テトラクロロエチレンを分解する微生物群の集積培養および土壌カラムにおけるテトラクロロエチレンの分解. 環境工学研究論文集. 38: 163-174.
- 34) 上野俊洋, 石田浩昭, 中村寛治. 2002. 嫌気性微生物を用いたバイオレメディエーションの現場実証. 土壌環境センタ―技術ニュース. 4: 13-18.
- 35) 上野俊洋, 石田浩昭, 中村寛治. 2002. 塩素化エチレン分解に関与する *Dehalococcoides* 属細菌の解析. 第8回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会講演集. 361-362.
- 36) 上野俊洋, 石田浩昭, 中村寛治. 2005. 原位置嫌気性バイオレメディエーションの現場適用事例. 第11回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会講演集. 736-740.
- 37) 上野俊洋, 石田浩昭. 2006. 嫌気性バイオレメディエーションの現場適用事例および *Dehalococcoides* 属細菌定量検出のモニタリングへの適用事例. 第12回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会講演集. 735-739.
- 38) U.S. Environmental Protection Agency. 2000. *In situ* bioremediation technologies. pp. 3\_1-3\_15. Engineered approaches to *in situ* bioremediation of chlorinated solvents: Fundamentals and field applications. EPA 542-R-00-008. U.S. Environmental Protection Agency. Washington, USA.
- 39) Yang, Y. and P.L. McCarty. 1998. Competition for hydrogen within a chlorinated solvent dehalogenating anaerobic mixed culture. *Environ. Sci. Technol.* 32: 3591-3597.