

Dehalococcoides 属細菌を含む複合微生物系を利用した バイオオーグメンテーション技術の開発と現場適用

Development and Practical Application of *in situ* Anaerobic Bioaugmentation Using *Dehalococcoides*-containing Dechlorinating Mix Culture

奥津 徳也*, 田村 渉, 上野 俊洋, 石田 浩昭
NORIYA OKUTSU, WATARU TAMURA, TOSHIHIRO UENO 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 1-1

* TEL: 0280-54-2609 FAX: 0280-57-2957

* E-mail: noriya.okutsu@kurita.co.jp

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

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
Key words: Contamination of soil and groundwater, trichloroethene, bioremediation, *Dehalococcoides*

(原稿受付 2013年6月27日/原稿受理 2013年6月27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。平成 22 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 年に経済産業省・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, バイオスティミュレーションによる浄化を加速する技術という位置づけで, *Dehalococcoides* 属細菌を含む複合微生物系を利用したバイオオーグメンテーション技術の開発を行い, 2008 年 6 月に, 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・環境大臣から取得した。

ここでは, 当社における *Dehalococcoides* 属細菌を含む複合微生物系を利用したバイオオーグメンテーション技術の開発と現場適用事例について紹介する。

2. *Dehalococcoides* 属細菌を利用した バイオオーグメンテーションの概要

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 (*cis*-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。嫌気性バイオレメディエーションは本反応を利用するものであり, 使用される電子供与体の種類, 地下への供給方法等に関しては, 既報を参照されたい⁸⁾。*Dehalococcoides* 属細菌を利用したバイオオーグメンテーション技術は, こうした電子供与体の供給技術に加えて, 予め培養した微生物群を導入する技術であり, 工法としてはバイオスティミュレーションとほぼ同等である。そこで以下に, 国外における普及状況について述べる。

Dehalococcoides 属細菌を利用したバイオオーグメンテーション技術は, 欧米において早く実用化されており, 野外での利用実績も多数報告されている^{1,3,4)}。このように欧米で実用化が進んだ要因は, *cis*-DCE 以降の分解には *Dehalococcoides* 属細菌が必須であることを示すデータが集積されてきたこと²⁾, VC 分解酵素の発見⁵⁾によるところが大きい。これらの研究成果に基づき, ① *cis*-DCE 以降の分解が進まない, ② VC 分解酵素を有する *Dehalococcoides* 属細菌が検出されない, ③ *Dehalococcoides* 属細菌を増大して浄化期間を短縮したい, といった現場において, バイオオーグメンテーションが適用されている。

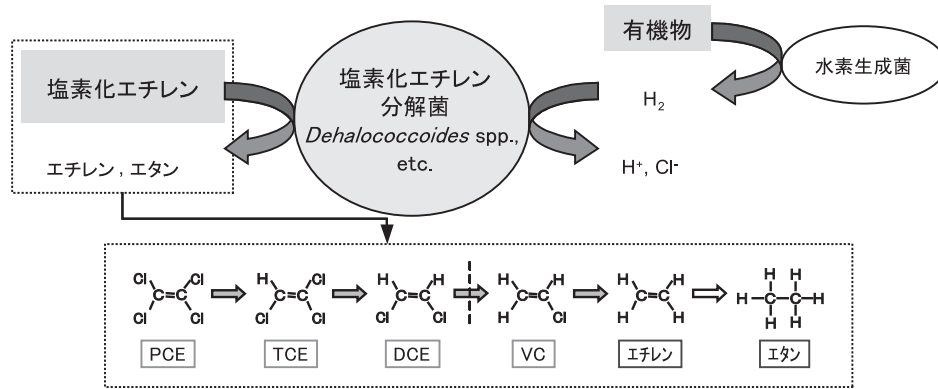


図1. 塩素化エチレン分解反応の概念図.

表1. バイオオーグメンテーションに利用されるコンソーシアムの概要

	会社名				
	栗田工業	SiREM	Shaw Environmental, Inc.	Regenesis	Bioremediation Consulting Inc.
浄化実績数	—	150	160	30	6
適用先	日本	米国, 英国, スウェーデン, デンマーク	米国	米国	米国
主な分解物質	TCE, <i>cis</i> -DCE, VC	PCE, TCE, <i>cis</i> -DCE, VC	PCE, TCE, <i>cis</i> -DCE, VC, 1,1,1-TCA	PCE, TCE, <i>cis</i> -DCE, VC, 1,1,1-TCA など	PCE, TCE, <i>cis</i> -DCE, VC, 1,1,1-TCA など
コンソーシアム中の主要微生物	<i>Dehalococcoides</i> <i>Trichococcus pasteurii</i> <i>Clostridium pertidivorans</i> <i>Methanobacterium bryantii</i>	<i>Dehalococcoides</i> <i>Geobacter</i> <i>Methanomethylovorans</i>	<i>Dehalococcoides</i> メタン生成菌	<i>Dehalococcoides</i> <i>Dehalobacter</i> ^{a)} <i>Desulfomonas michiganensis</i> <i>Desulforomonas chloroethenica</i> メタン生成菌 ※ Shaw Environmental, Inc のコンソーシアムのうち1種を利用	<i>Dehalococcoides</i> <i>Dehalobacter</i> ^{a)} 硫酸還元菌 メタン生成菌
病原菌評価	96種類の病原菌についてコンソーシアム中に存在しない事を確認。	11種類の病原菌についてコンソーシアム中に存在しない事を確認。	不明	13種類の病原菌についてコンソーシアム中に存在しない事を確認。	7種類の病原菌についてコンソーシアム中に存在しない事を確認。

上表は各社の HP および ESTCP 資料 (Environmental Security Technology Certification Program, E. Cox *et al.*, October, 2005) を参考に作成した。a) は 1,1,1-トリクロロエタン分解細菌であり、オプションで混合される。

当社がバイオオーグメンテーションに利用している微生物とともに、欧米の汚染現場での適用実績がある代表的な微生物について、概要をまとめたものを表1に示す。ここで注目すべきは、これら事業に利用されている微生物は全て複合微生物系 (=コンソーシアムであり、単離された *Dehalococcoides* 属細菌ではないという点である。単離菌では培養が不安定になる、地中に添加しても増殖しない、といった問題があるのであろう。一方コンソーシアムを利用する場合には培養液中に病原菌が含まれていないかが重要となるが、この点については、当社を含め各社独自の評価方法を用いている。

3. *Dehalococcoides* 属細菌を含む複合微生物系の培養

当社がバイオオーグメンテーションに利用するコンソーシアムは、国内の塩素化エチレン汚染地下水由来であり、VCを基質として集積培養を行い、菌相解析等により病原菌を含まないことを確認している⁹⁾。このような開発段階では、100 mL程度の培養液を用いて評価することが可能であるが、実規模の帯水層を対象に

Dehalococcoides 属細菌を利用したバイオオーグメンテーション技術を適用するには、より多くの培養液を生産する能力が必要である。実際に米国では、4000 Lの発酵槽を用いた *Dehalococcoides* 属細菌の培養実績が報告されている⁷⁾。ここでは、当社における200 L容量の発酵槽を用いた DHC 菌の大量培養について述べる。

発酵槽の外観を図2に示す。2.6 mMの有機酸を含む無機培地150 Lを発酵槽に入れ、窒素・炭酸混合ガス(混合比8:2)で内部の空気を置換した後、発酵槽を密閉した。その後、還元剤として塩化第一鉄と硫化ナトリウムをそれぞれ1 mM, 2 mMとなるよう添加して培養液を調製した。培養液調製直後に、*Dehalococcoides* 属細菌を含む培養液1 LとVCガスを500 mL添加して培養を開始し、所定期間経過後に有機酸を0.1 mmole/L-培養液/dayで連続的に滴下した。なお培養期間中は、発酵槽のジャケットに温水を通過することにより、培養液の温度は30°Cに保持した。また発酵槽内部に取り付けた攪拌羽を用いて、40 rpmで培養液を常時攪拌した。

培養期間中のVC濃度、VCの分解生成物であるエチレン濃度、および *Dehalococcoides* 属細菌16SrDNAコ



図2. 200 L 容量の発酵槽外観

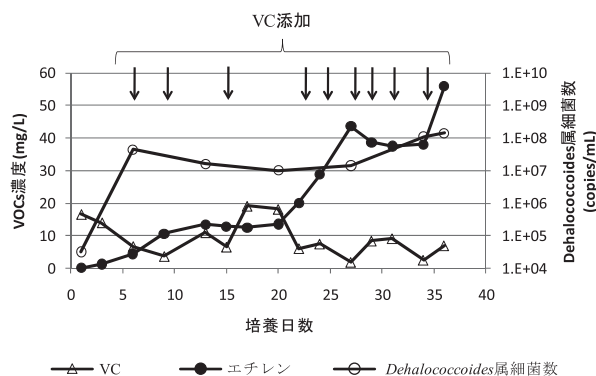


図3. 培養期間中における VOCs 濃度および *Dehalococcoides* 属細菌数の経時変化
 図中矢印は、VC ガスを追添加した時期を示す。

ピー数（以下、DHC 菌数）の経時変化を図3に示す。培養初期の VC 濃度は、約1週間で 16 mg/L から 3 mg/L まで低下し、エチレン濃度の増加が確認された。VC 分解に伴い、DHC 菌数は約 10⁴ copies/mL から約 10⁷ copies/mL にまで増加した。その後は培養 20 日目から有機酸の連続滴下を開始した。その結果、VC の分解速度は約 3 倍に増加し、培養 33 日目には 10⁸ copies/mL に到達したため、培養を終了した。

本結果から、VC と有機酸を栄養源として供給して嫌気条件下で培養を行うことにより、約1か月間で、DHC 菌数を 10⁸ copies/mL 含む嫌気性微生物群を 150 L 調製できることを確認した。これにより、実規模の帯水層に対して DHC 菌を利用したバイオオーグメンテーション技術を適用することが可能となった。

4. *Dehalococcoides* 属細菌を利用したバイオオーグメンテーションの現場適用

前述のように、当社は、経済産業省と環境省による利用指針に対する適合確認を、複合微生物系として初めて

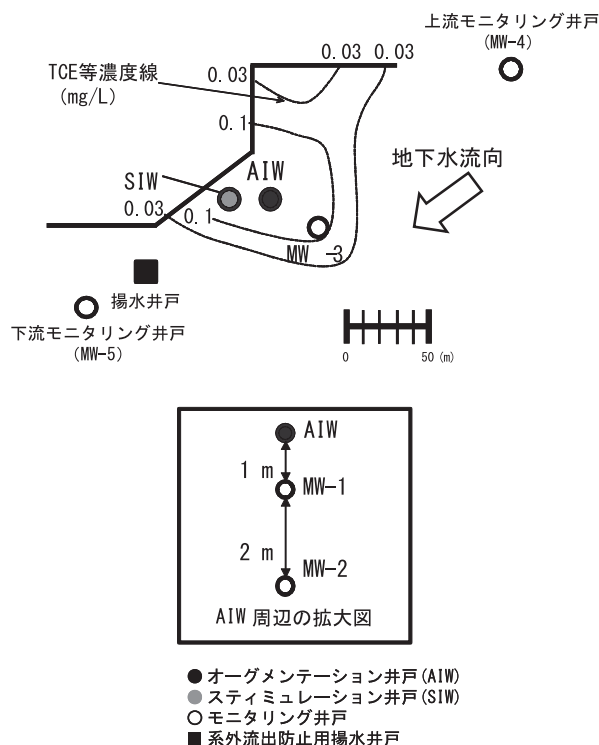


図4. 地下水中の TCE 濃度分布および井戸の平面配置

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、前述のコンソーシアムを利用したバイオオーグメンテーションの有効性を評価した。既報⁸⁾では試験期間中であつたため、試験開始後4ヶ月までの結果を示しており、本報ではその後の経過を含めて報告する。

実証サイトの土質は砂礫層であり、地下水位は深度 GL-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4に示す通りである。TCE 濃度 0.1~1.0 mg/L 以上の範囲にコンソーシアム注入井戸（オーグメンテーション井戸：AIW）を設置し、AIW より 1 m 離れた地点にそれぞれモニタリング井戸 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 GL-約 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 周辺の井戸、SIW、および MW-3 における地下水中の DHC 菌数はいずれも検出下限値（5 copies/mL）未満であつた。

コンソーシアムは、10 L 規模の発酵槽を用いて VC で培養したものを、輸送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 のコンソーシアム（DHC 菌数：約 1×10⁸ copies/mL）を増殖基質とともに AIW に注入した。なお、地下水を嫌気条件にするため、コンソーシアム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

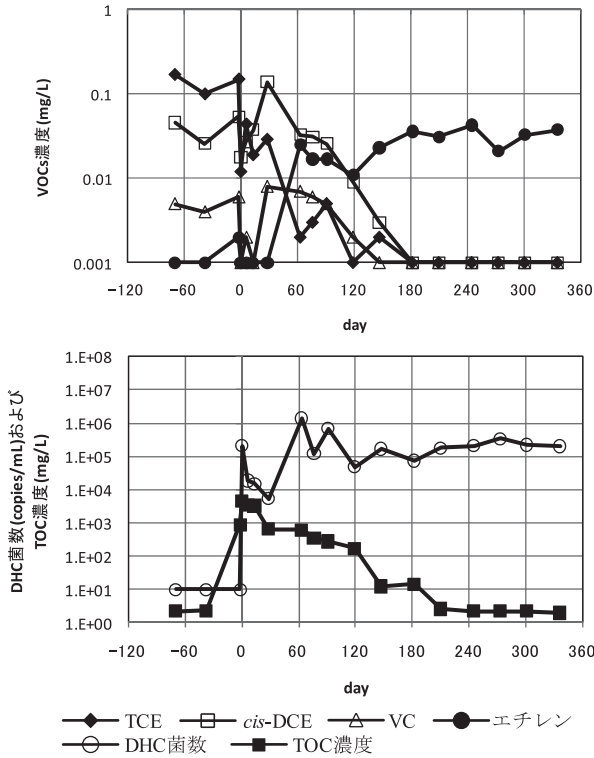


図5. AIWにおけるモニタリング結果
 図中 day 0 において、コンソーシアムを注入した。

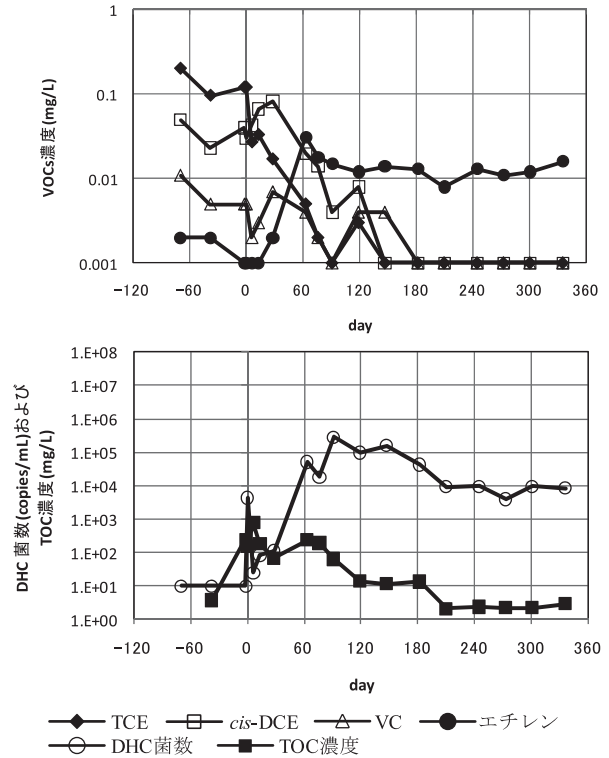


図6. MW-1におけるモニタリング結果
 図中 day 0 において、AIW にコンソーシアムを注入した。

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。

各井戸でのモニタリング結果をそれぞれ図5～図8に示す。なお、揮発性有機化合物 (VOCs)、DHC 菌数、および TOC の分析下限値は、それぞれ 0.001 mg/L、10 copies/mL、1 mg/L であり、分析の結果未検出であった場合、図では便宜上、分析下限値の値を表示した。

オーグメンテーション井戸 (AIW) では、コンソーシアム注入前において TCE および *cis*-DCE 濃度はほとんど変化しなかったが、注入1か月後には TCE の分解に伴い *cis*-DCE 濃度が増加した (図5)。注入2か月後には、DHC 菌数の増加 (約 1.0×10^6 copies/mL) と同時に、*cis*-DCE 濃度は 0.033 mg/L にまで減少し、分解生成物であるエチレン濃度の増加が確認された。その後は VC 濃度も減少し、注入4か月後には 0.002 mg/L にまで低下した。

AIW の 1 m 下流に位置する MW-1 では、コンソーシアム注入1か月後には TCE の分解に伴い *cis*-DCE 濃度が増加した (図6)。注入2か月後には、DHC 菌数の増加 (約 1.0×10^5 copies/mL) と同時に、*cis*-DCE 濃度は 0.02 mg/L にまで減少し、分解生成物であるエチレン濃度の増加が確認された。その後は VC 濃度も減少し、注入4か月後には一時的なリバウンドが発生したものの、注入6か月後には検出下限値未満となった。さらに AIW の 3 m 下流に位置する MW-2 においても、注入1か月後には TCE の分解に伴い *cis*-DCE 濃度が増加した (図7)。注入2か月後にはほとんど変化は見られなかったものの、注入3か月後には DHC 菌数が増加 (約 1.0

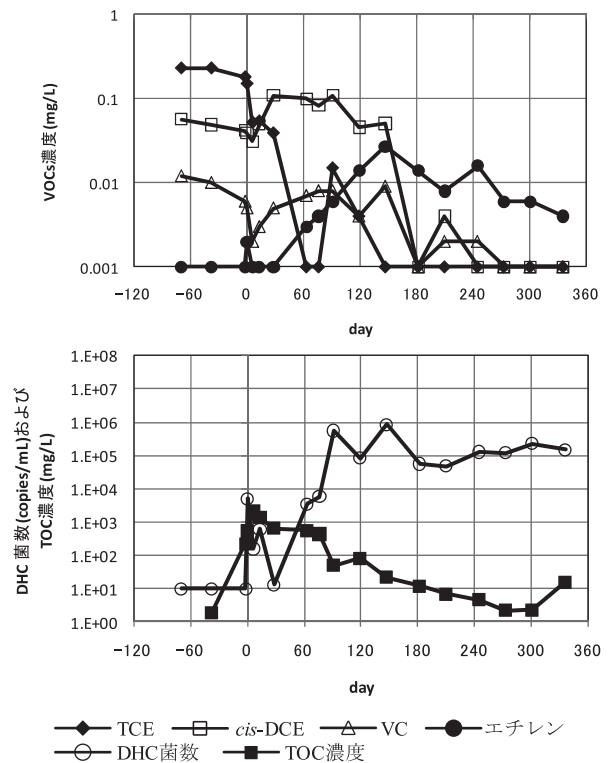


図7. MW-2におけるモニタリング結果
 図中 day 0 において、AIW にコンソーシアムを注入した。

×10⁶ copies/mL) し、注入6か月後には *cis*-DCE, VC ともに検出下限値未満となった。その後は注入7か月後に VC が一時的にリバウンドしたものの、注入9か月後には検出下限値未満となった。

以上の結果から、TCE はコンソージウムを注入した井戸およびその下流井戸全てにおいて、注入2か月以内に地下水基準に適合し、*cis*-DCE はコンソージウムを注入した井戸およびその下流1mの井戸で注入4か月以内、下流3mで注入6か月以内に地下水基準に適合した。また VC はコンソージウムを注入した井戸で注入4か月以内、下流1mの井戸で6か月以内、下流3mの井戸で9か月以内に地下水環境基準に適合した。下流井戸において *cis*-DCE および VC の分解に時間を要したのは、注入井戸と一定の距離があるため、注入直後における DHC 菌数が少なく、*Dehalococcoides* 属細菌の増殖が律速したためと考えられる。

一方 SIW では、増殖基質注入1か月後には TCE の分解に伴い *cis*-DCE 濃度が増加し、注入2か月後には TCE 濃度が 0.034 mg/L にまで低下したものの、DHC 菌数の増加や *cis*-DCE および VC 濃度の減少は確認されず、分解生成物であるエチレン濃度の増加も確認されなかった(図8)。その後 DHC 菌数は、注入5か月後に約 1.0×10³ copies/mL、注入6か月後に約 1.0×10⁶ copies/mL にまで増加し、エチレンについても 0.02 mg/L にまで増加した。注入7か月以降は TOC が 10 mg/L 以下にまで低下し、*cis*-DCE および VC 濃度の減少も確認されなかった。

なお、VC 分解に関わる遺伝子 (*verA*) の周辺における塩基配列解読により、AIW、および MW-1 と MW-2

で検出された *Dehalococcoides* 属細菌は、コンソージウム中に含まれる *Dehalococcoides* 属細菌と同種であり、SIW で検出された *Dehalococcoides* 属細菌とは異なることを確認した⁶⁾。従って、AIW で増殖した *Dehalococcoides* 属細菌はコンソージウム由来の微生物である可能性が示唆されている。また、AIW の下流に位置するモニタリング井戸 (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、コンソージウム注入後約1年経過した時点においても、バイオオーグメンテーションによる病原性細菌の有意な増加は確認されていない。さらに、コンソージウムも増殖基質も注入していない 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ず、DHC 菌数も常時検出下限値未満であった(データ示さず)。

今回増殖基質のみを注入した SIW では、*Dehalococcoides* 属細菌の増殖に時間を要したことと、DHC 菌数が約 1.0×10⁶ copies/mL に到達した注入6か月後には TOC がほとんど残留していなかったことにより、*cis*-DCE 以降の分解が進まなかったものと考えられる。このため、SIW において *cis*-DCE の浄化を促すには、今後さらに栄養剤を追加注入する必要がある。このように、バイオスティミュレーションでは土着の *Dehalococcoides* 属細菌の増殖に時間を要するために、浄化が長期化するだけでなく、栄養剤の注入量が増えることで浄化コストの増加にもつながるケースが想定される。これに対して、バイオオーグメンテーションは *Dehalococcoides* 属細菌の初濃度を高めることで浄化期間を短縮し、さらには浄化コストを削減することが期待できる。

5. おわりに

本稿では、当社における *Dehalococcoides* 属細菌を含むコンソージウムを利用したバイオオーグメンテーション技術の開発と現場適用事例を述べた。コンソージウムの状態において培養規模の拡大には大きな課題は無く、また現場実証においても浄化期間・浄化コストの両面において良好な結果が得られている。しかしながら、生態系への影響等から、外来微生物を導入することに対する抵抗感は依然として散見される。今後は、現場適用を進める中で、バイオオーグメンテーションが地下の生態系に与える影響を詳細に解析していく必要があると考えている。

謝 辞

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

1) Ellis, D.E., E.J. Lutz, J.M. Odom, R.J. Buchanan, Jr., M.D. Lee, C.L. Bartlett, M.R. Harkness, and K.A. DeWeerd. 2000. Bioaugmentation for accelerated in situ anaerobic bioremedia-

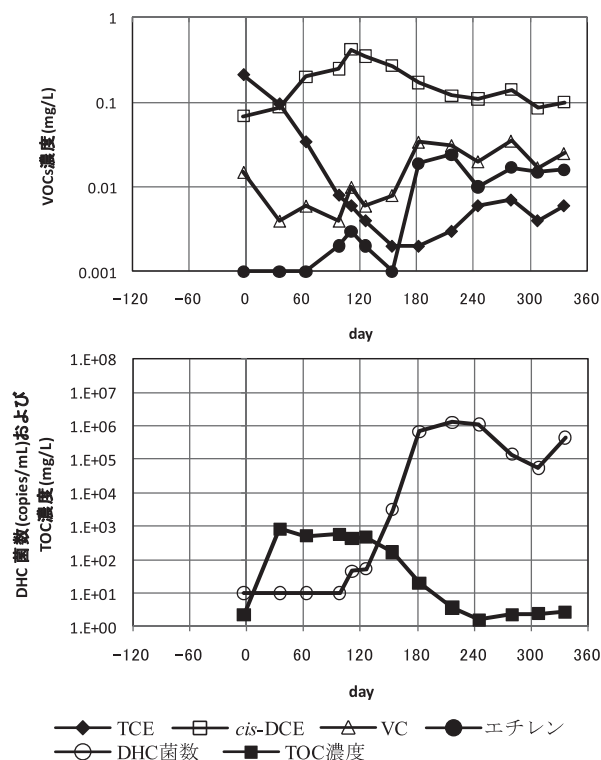


図8. SIW におけるモニタリング結果
 図中 day 0 において、増殖基質のみを注入した。

- tion. *Environ. Sci. Technol.* 34: 2254–2260.
- 2) Hendrickson, E.R., J.A. Payne, R.M. Young, M.G. Starr, M.P. Perry, S. Fahnestock, D.E. Ellis, and R.C. Ebersole. 2002. Molecular analysis of *Dehalococcoides* 16S ribosomal DNA from chloroethene-contaminated sites throughout North America and Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 485–495.
 - 3) Lendvay, J.M., F.E. Löffler, M. Dollhopf, M.R. Aiello, G. Daniels, B.Z. Fathepure, M. Gebhard, R. Heine, R. Helton, J. Shi, R. Krajmalnik-Brown, C.L. Major, M.J. Barcelona, E. Petrovskis, R. Hickey, J.M. Tiedje, and P. Adriaens. 2003. Bio-reactive barriers: a comparison of bioaugmentation and biostimulation for chlorinated solvent remediation. *Environ. Sci. Technol.* 37: 1422–1431.
 - 4) Major, D.W., E.A. Edwards, S.M. Dworatzek, E.R. Hendrickson, M.G. Starr, J.A. Payne, and L.W. Buonamici. 2002. Field demonstration of successful bioaugmentation to achieve dechlorination of tetrachloroethene to ethene. *Environ. Sci. Technol.* 36: 5106–5116.
 - 5) 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.
 - 6) Okutsu, N., W. Tamura, M. Mizumoto, T. Ueno, H. Ishida, and T. Iizumi. 2012. Field demonstration of bioaugmentation in trichloroethene-contaminated groundwater. *Water Practice and Technology*. 7: doi:10.2166/wpt.2012.053
 - 7) Vainberg, S., C.W. Condee, and R.J. Steffan. 2009. Large-scale production of bacterial consortia for remediation of chlorinated solvent-contaminated groundwater. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36: 1189–1197.
 - 8) 上野俊洋, 奥津徳也, 水本正浩, 石田浩昭. 2010. 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. *環境バイオテクノロジー学会誌*. 10: 79–89.
 - 9) 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. *土壤環境センター技術ニュース*. 15: 1–8.