

バイオレメディエーションによる汚染土壌の修復（その3）

トリクロロエチレン汚染へのバイオオーグメンテーションの適用

岡村 和夫

（技術研究所）

渋谷 勝利

（技術研究所）

田崎 雅晴

（技術研究所）

Soil Remediation Using Bioremediation Technology ()

Using Bioaugmentation to Degrade Trichloroethylene in Contaminated Soil

by Kazuo Okamura, Katsutoshi Shibuya and Masaharu Tasaki

abstract

Biological technologies are used in many contaminated-soil treatment projects to degrade harmful chemicals. In bioaugmentation, a specified microbe is cultivated and injected into the groundwater. This technique is effective for degradation of organic compounds that are toxic and do not easily decompose. This paper describes the results of a series of laboratory and field tests that show the effectiveness and environmental safety of bioaugmentation.

概要

有機性化合物で汚染された土壌の浄化対策として、バイオレメディエーションが活用されている。そのような中、トリクロロエチレン(TCE)の様な難分解性の汚染物質を分解させるために、TCE分解微生物を分離・大量培養し、汚染サイトに添加して浄化するバイオオーグメンテーションの検討を室内と実サイトで進めた。その結果、バイオオーグメンテーションの管理・安全性と、TCE分解能力について確認した。

§ 1 . はじめに

人間が合成したトリクロロエチレン(TCE)等の有機塩素系化合物は、自然界に生息する微生物では分解しにくいものであると考えられてきた。しかしながら1985年以降、嫌気条件でテトラクロロエチレンは脱塩素化され、TCE、ジクロロエチレンを経てビニルクロライドになり、最終的には二酸化炭素およびメタンにまで分解することがわかってきた。また、好氣的条件下でメタン資化性菌はメタンを分解する際に誘導される酵素によりTCEを共代謝することが報告された。また、メタンの他にフェノールやトルエン資化性菌による共代謝も有効なことがわかってきた。

一方、汚染環境に分解菌が少ないか、あるいはわずしか存在しない場合、病原性や毒素生産がないことが確認された純粋分離菌を大量培養後、汚染環

境に注入し、原位置で分解を促進させる方法であるバイオオーグメンテーション法が有効であると考えられる。

そのような背景から、汚染環境からTCE分解菌を純粋分離し、TCE分解性能の把握、安全性の確認を経て、日本で初めてのバイオオーグメンテーション実証試験を行った。

§ 2 . 汚染サイトの状況

2.1 水理地質学的特性

汚染サイト(久留里汚染サイト)は千葉県君津市に位置している。汚染サイトの地質学的特性は、ボーリングより得たコアサンプルを用いて調査した。図-1に示すように汚染サイトの地質は上位より表土、盛土あるいは土壌層、段丘堆積層、更新統上総

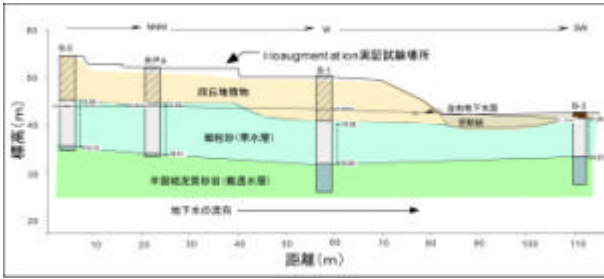


図 - 1 汚染サイト周辺水理地質断面図

層群柿の木台層の砂層と、泥質砂岩層から構成されている。表土、盛土、土壌層、段丘堆積層は通気帯で、柿の木台層の砂層が帯水層、その下部の泥質砂岩が難透水層である。帯水層は地表から -8 ~ -18m に存在する。TCE に汚染された工場が位置する崖上では、通気帯層は約 7 ~ 10m、第一帯水層の層厚は 7 ~ 10m である。地質調査結果によれば、帯水層を構成する地層は粒径が比較的均一な細粒砂層である。土壌コアサンプルの室内透水性試験の結果から透水係数は $4 \sim 6 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$ である。柿の木台層の砂層と泥質砂岩の境界付近では、地層の色相が褐色から暗青色に変化していた。酸化還元電位は帯水層で 400 mV 前後であったが、難透水層との境界以深で急激に低下し、-20 mV になっており、帯水層基底では酸素の不足した環境で緑色を呈していた。地下水の流れは図 - 1 の左から右への南西方向に流れており、TCE 濃度は工場敷地内で 789 $\mu\text{g/L}$ が検出された。TCE 濃度は採水井戸によりばらつきはあるものの地下水流れ方向に拡がっており、下流ほど濃度が低くなる傾向にあった¹⁾。

2.2 表層ガス調査

表層ガス調査は君津式検知管法で行った²⁾。その結果を図 - 2 に示す。工場建屋の東側に 2 カ所と西側 1 カ所に高濃度の表層ガス汚染が認められた。いずれも 1000ppm を超えるガス濃度であり、汚染の広がりが確認された。

§ 3 . 微生物学的検討

3.1 分解菌の TCE 分解特性

久留里汚染サイトの土壤中から分解菌の探索・単離を行い、数株の TCE 分解菌を分離した。汚染サイトから得られた芳香族資化性 TCE 分解菌

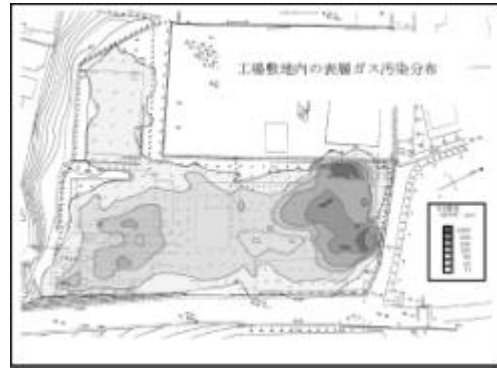


図 - 2 表層ガス調査結果

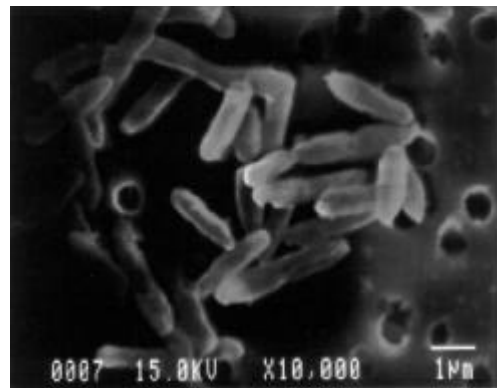


写真 - 1 Ralstonia eutropha K T - 1 株顕微鏡写真

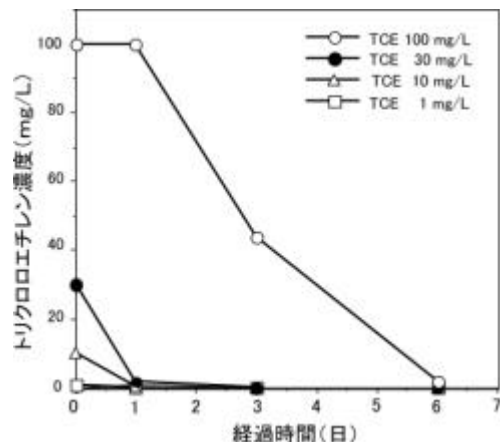


図 - 3 KT-1 株の TCE 分解試験結果

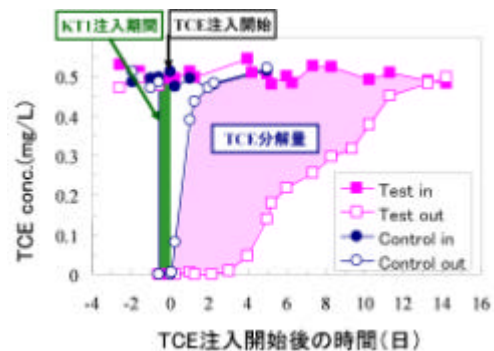


図 - 4 土壌カラム試験結果

Ralstonia eutropha KT-1 株の電子顕微鏡写真を写真-1に示す。無機培地 20 mg/L を入れたバイアルビンに約 10^8 個/m² の菌濃度で KT-1 株を接種した。これに液相部にトルエンを 100 mg/L および TCE を各濃度で添加し、KT-1 株の TCE 分解特性を把握した。久留里汚染サイトの土壌から分離した KT-1 株の TCE 分解試験結果を図-3 に示す。TCE 濃度が 30 mg/L を 3 日間で検出限界以下とし、TCE 100 mg/L でも分解を示した。

3.2 帯水層を模擬した浄化効果予測

全長が 90 cm の土壌カラムを用い、吸光度(OD 600)=1 で 11 時間、線速度 16 cm/hr で通水後、カラム中の土壌を採取し、電子顕微鏡観察および菌数を測定した結果、KT-1 株は注入点近傍から広がりにくい特性がある事が判明した。そこで 1 本の井戸を用いて利用微生物を注入し、帯水層に微生物ゾーンを形成させた後、同じ井戸から汚染地下水を揚水することにより浄化する 1 点注入/揚水方式を採用することとした。1 地点での注入では、土壌中に注入後、菌体の井戸周辺への拡散とともに流速は低下していくことから、KT-1 株注入時の線速度を注入・揚水井の状況にできるだけ近い条件で検討することを目的として、直径の異なる 2 種類のカラムを組み合わせ、実験を行った。KT-1 株はトルエンにより賦活後、OD600=1.0 になるように脱塩素水道水で希釈した。そして、実証試験で注入地点から 5cm、および 50cm 離れた地点における線速度 (17 cm/hr、1.6 cm/hr) になるように、カラム試験の流量を設定し、14 時間にわたって 21 m³ /min で通水した。その後 TCE 0.5 mg/L を含んだ地下水を菌体の注入とは逆の方向から同じ流量で通水し、カラム出口の TCE 濃度、溶存酸素濃度、および菌体の指標となる OD 600 の測定を経時的に行った。なお、トルエンで賦活しない KT-1 株を注入するコントロール試験を実施することにより、賦活した KT-1 株による TCE の浄化効果をブランクとした。

図-4 に KT-1 株注入カラムお

表-1 KT-1 株のヒトおよび環境生物への影響

急性毒性試験			皮膚刺激性	目刺激性
経口投与	静脈内投与	経気道投与		
影響なし	影響なし	影響なし	影響なし	影響なし

環境生物への影響		
淡水魚 (コイ)	淡水無脊椎動物 (オオミジンコ)	藻類
影響なし	影響なし	影響なし

よびコントロールカラム出口水の TCE 濃度の経時変化を示す。コントロールカラムでは賦活しない菌体を注入し、TCE が検出限界になった後に TCE 0.5 mg/L の通水を開始した。その結果、2 日目には TCE 濃度が 0.5 mg/L に回復したのに対し、賦活 KT-1 株注入試験カラムでは TCE 通水開始後 3 日間は環境基準値である 0.03 mg/L 以下を維持し、その後緩やかに TCE 濃度が上昇、13 日後に 0.5 mg/L に回復した。この結果から、試験カラムにおける TCE の分解が菌体の吸着などによるものではなく、賦活した利用微生物の注入により、TCE が分解していることが明らかとなった。

§4 . 安全性評価

バイオオーグメンテーション実証試験では、トルエン資化性 TCE 分解菌の Ralstonia eutropha KT-1 株を用いることとした。バイオオーグメンテーションに向けて、ヒトへの安全性評価および環境生

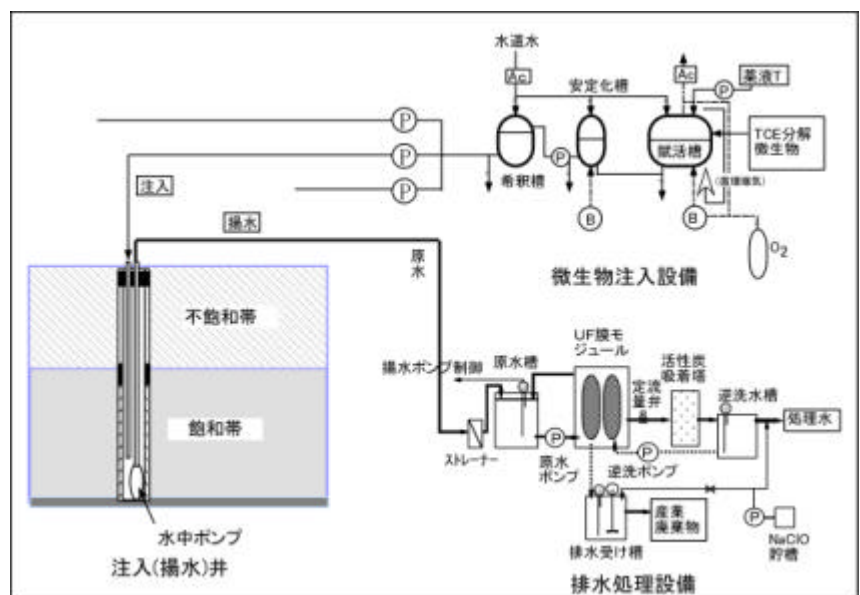


図-5 バイオオーグメンテーション設備の概略フロー

物への影響評価として、ラットを用いた急性毒性試験（経口・静脈内・経気道投与）、ウサギを用いた眼および皮膚刺激性試験、ならびに変異原性（エームス）試験を実施した。また、環境生物の影響試験として淡水魚（コイ）および淡水無脊椎動物（オオミジンコ）影響試験ならびに藻類生育阻害試験を実施した。その結果を表-1に示す。動物等を用いた試験結果から、ヒトおよび環境生物への影響を示唆する結果は見られなかった。また、平成10年5月の通産省「組換えDNA工業技術化指針」の改正に伴い、当面組換え体でない分解菌の環境中での利用に際しても指針が適用されたことから、その実施については通産省審議会での安全性確認を得るため、「組換えDNA技術工業化指針」平成10年通商産業省告示第259号に基づく安全性評価を行い、その安全性が確認された³⁾。



写真-2 実証試験装置外観

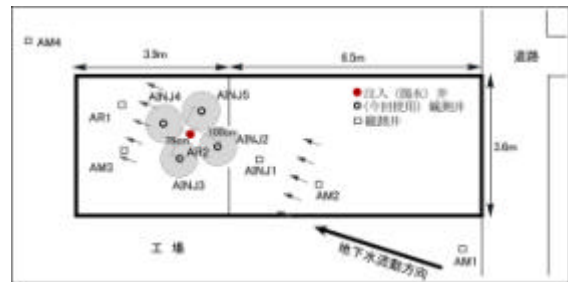


図-6 井戸配置図

§ 5 . 実証試験概要

5.1 試験装置の概要

KT-1株は、トルエンによりTCE分解酵素が誘導される。実際の注入は地下水中にトルエンを添加するのではなく、あらかじめ培養したKT-1株にトルエンを加えて賦活化させ、分解酵素を誘導した休止菌体を用いることとした。また、高濃度の休止菌体を注入し、注入井近傍にバイオフィルタゾーンを形成させ、注入井から揚水することによりTCE汚染地下水をこのゾーンに通過、接触させて浄化する一点注入・揚水法を採用した。実証試験装置外観写真のフローを図-5に示す。実証試験装置の外観を写真-2に示す。

工場敷地内の汚染源と考えられるホットスポットの1地点にバイオオーグメンテーション用井戸を設置した。井戸配置図を図-6に示す。注入および揚水は中央の注入・揚水井（AR2）を使用し、周囲の4井（AM2, 3, 4, 5）を観測井として用いた。なお、KT-1株はヒトおよび環境生物に対する影響は少ないと言えるが、日本最初のバイオオーグメンテーション実験であることから、KT-1株を含む揚水地下水は限外ろ過膜処理で濃縮後、産業廃棄物として焼却処分した。

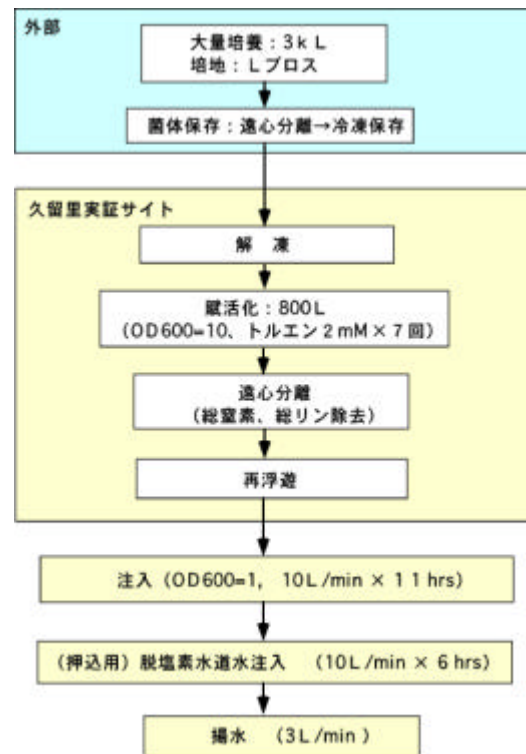


図-7 実証試験運転フロー

5.2 利用微生物の大量培養

大量培養には6k?の内容積を有する培養槽を使用し、30 で約1日間培養した。使用培地はポリペプトン 1%、酵母エキス 1%、および NaCl 0.5%の組

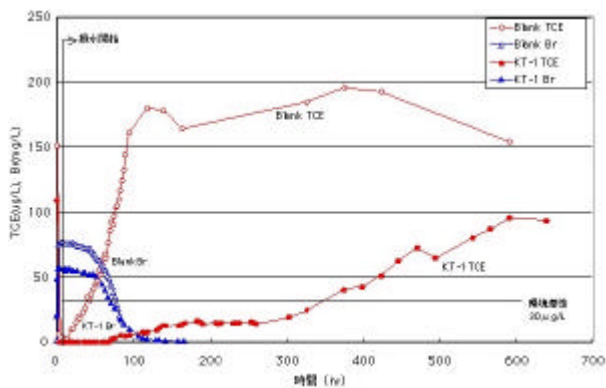


図-8 実証試験結果

成を用いた。この培養で初期OD値0.2を10まで増殖させた。培養後、連続遠心分離機にて遠心分離後、0.8%生理食塩水に再浮遊し、再度遠心してKT-1株を回収した。回収したKT-1株は、約1kgごとに分包して速やかに凍結保存した。

5.3 利用微生物の調整方法

利用に際しては活性化槽内にトルエンを唯一炭素源とした無機培地を800 μ g/L調整し、解凍したKT-1株を入れ、約1日間でトルエンを複数回添加してKT-1株を活性化させた。一点注入・揚水法では、注入により注入井近傍の地下水が排除されるが、揚水により先ず注入水が回収され、その後はTCEを含む地下水が回収される筈である。したがって、地下水揚水時における揚水地下水中のTCE濃度の上昇を、ブランク試験時とKT-1株注入時とを比較することで、その濃度差分がKT-1株のTCE分解効果であると判断した。

TCE分解酵素を有するKT-1株をOD 1に調整し、10 μ g/minで11時間注入した。さらにKT-1株の地中内部への押込みとして脱塩素水道水を6時間注入し、その後、3 μ g/minで揚水を開始した。

§6 実証試験結果

6.1 注入試験によるTCE分解効果

試験の結果を図-8に示す。注入水にトレーサー物質のみ注入した。ブランク試験および本試験における揚水開始時の臭素イオンの挙動は、ほぼ同一の傾向を示しており、地下水の流れはブランク試験および本試験ともに同一であると推定され、トレーサー物質はほぼ160時間で消失した。

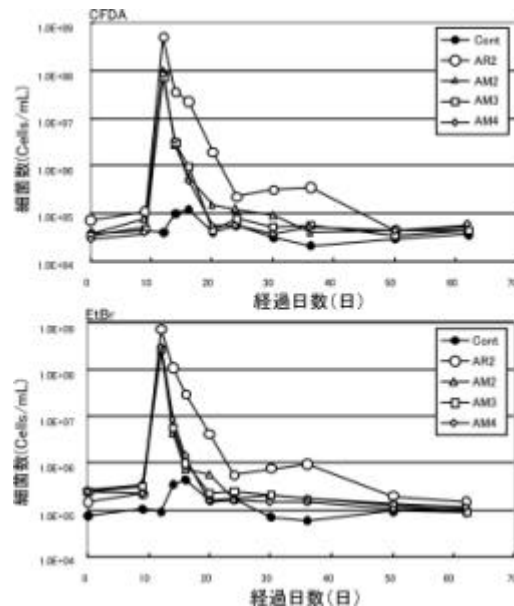


図-9 各井戸における細菌数の経時変化

KT-1株注入による注入・揚水井の水位上昇はさほど大きくなく、井戸管頭からオーバーフローすることなく全ての利用微生物を帯水層中に注入が可能であった。また、注入・押込終了時には、注入・揚水井周辺で各観測井のOD値の上昇が認められ、周辺の観測井までKT-1株が到達したことが示唆された。

ブランク試験における注入井戸のTCE濃度の変化は、注入時に150 μ g/Lから検出限界以下に減少した。注入終了時には注入井戸周辺には注入水のみが存在していると考えられることから、揚水開始に伴い、ある一定のタイムラグ後にTCE濃度の上昇が認められると予想していた。しかしながら、実際には揚水開始とともに揚水地下水中にはTCEが検出され、揚水開始24時間後にはTCE濃度が環境基準値となった。これに対し、KT-1株注入時では揚水開始後約50時間持続してTCEを検出せず、約300時間まで環境基準値以下を維持した。その後TCE濃度は徐々に上昇し、約600時間後に試験開始前の濃度となった⁴⁾。

EtBr染色による全菌数の計測、同様にCFDA染色による生菌数の結果を図-9に示す。全菌数は注入開始前までは 10^5 cells/mLレベルであったものがKT-1株の注入によって注入井AR2は約 10^9 cells/mL、他のモニタリング井戸では 3×10^8 cells/mLと著しく高くなった。その後の揚水によりオーグメンテーションサイト内におけるAR2以外の井戸では全菌数は12日後迄にはほぼ注入前のレベルまで低下した。CFDA染色による生菌数の結果も全菌数と全く同様

の傾向を示している。この様に、揚水開始後はKT-1株の菌数は速やかに低下して行き、地下水環境の復元が確認された。

6.2 生態系への影響調査結果

注入揚水井AR2における揚水開始後25日目までのT-RFLP解析結果を図-10に示す。KT-1株の優占度が高い状態が揚水開始後12日目まで続き、18日目から優占度の低下が観察され始めた。18日目では注入前に観察されていた他の微生物由来のピークも観察されている。この様に、注入されたKT-1株の地下水中での存在割合は徐々に低下し、注入前に観察された他の微生物が再び検出されている。それゆえ、KT-1株の注入が微生物生態系に致命的なダメージを与えてはいないと推測できた⁵⁾。

§7.まとめ

1) 注入微生物の選択

汚染サイトからTCE分解菌を分離し、TCE除去性能、病原性の低さから、バイオオーグメンテーションに使用する分解菌として *Ralstonia eutropha* KT-1株を選択した。

2) 実証試験方法の構築、サイトデザイン

・実証試験はトルエンを地下水中に注入せず、地上部で分解菌にあらかじめ分解酵素を誘導した休止菌体を用いた。

・注入井戸近傍にバイオフィルターゾーンを形成させる1点注入・揚水方式を採用した。

3) 安全性評価とガイドライン

KT-1株の人および環境生物への安全性に問題がないことを確認するとともに、通産省（現経済産業

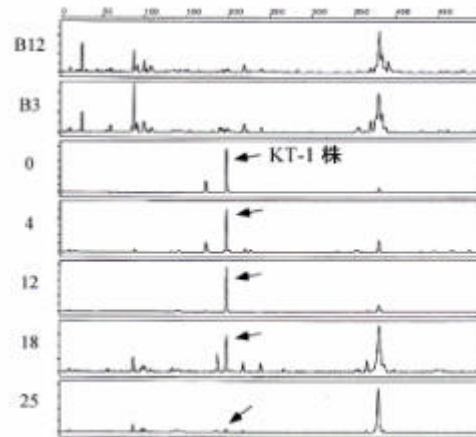


図-10 注入/揚水井戸AR2での微生物群衆変化

省)の組換えDNA技術工業化指針に基づく安全性確認を行い、安全性が確認された。

4) 効果の把握

・ブランク試験では、揚水開始後環境基準値以下を24時間保持したのみであったが、本試験では300時間環境基準値以下を保持し、KT-1株の有効性を確認できた。

・TCE分解菌の大量培養法、菌体の賦活化および取り扱い方法等のバイオオーグメンテーション実施に不可欠な種々のノウハウを得た。

5) 微生物挙動把握と環境影響評価

・KT-1株注入により注入・揚水井および周辺のモニタリング井の全菌数は著しく高くなったが、揚水開始12日後には注入前のレベルまで低下し、揚水開始18日以降、細菌群集構造の多様性回復が認められた。

6) その他

・民家の密集地帯での実証試験であり、技術的な面だけではなく住民対策を行いながらの試験を行い、PA（住民の理解）には最大限の配慮を行った。

<参考文献>

- 1) Eguchi, M., Kitagawa, M., Suzuki, Y., Nakamura, M., Kawai, T., Okamura, K., Sasaki, S. and Miyake, Y., A Field Evaluation of In Situ Biodegradation of Tri-chloroethylene Through Methane Injection, *Water Research*, Vol.35, No.9, pp 2145 ~ 2152, 2001
- 2) 岡村和夫, 土壌汚染の修復と微生物の役割、地質と調査, Vol.86, No.4, pp 43 ~ 47, 2000
- 3) 渋谷勝利、岡村和夫, トリクロロエチレンを対象としたバイオオーグメンテーション、*環境技術*, Vol.29, No.5, pp 380 ~ 385, 2000
- 4) 岡村和夫、渋谷勝利、中村寛治, TCE汚染サイトのバイオオーグメンテーション実証試験結果、*バイオサイエンスとインダストリー*, Vol.59, No.3, pp 52 ~ 55, 2000
- 5) 中村寛治、石田浩昭、飯泉太郎、渋谷勝利、岡村和夫, トリクロロエチレン汚染現場に注入されたフェノール酸化細菌 *Ralstonia eutropha* KT-1株のPCRによる定量検出、*環境工学研究論文集*, Vol.37, pp 267 ~ 278, 2000