

## 平成 30 年度・令和元年度低コスト・低負荷型土壤汚染調査対策技術検討調査結果

実施機関：大成建設株式会社

技術名称：デハロコッコイデス属細菌 UCH007 株を用いるバイオオーグメンテーション技術

調査対策区分：対策

技術の区分：原位置浄化

実証試験の評価対象物質：トリクロロエチレン、1,2-ジクロロエチレン、クロロエチレン

試験期間：平成 30 年 12 月～令和 2 年 3 月

### 1. 技術の原理および特徴

本技術は、トリクロロエチレン (TCE) などの塩素化エチレン類で汚染された帯水層 (地下水) に、1,2-ジクロロエチレン (1,2-DCE) 以降の脱塩素化が可能な嫌気性の脱塩素細菌 *Dehalococcoides mccartyi* UCH007 株 (以下「UCH007 株」、写真-1) を汚染帯水層に注入管を用いて導入し、土壌や地下水中に存在する汚染物質の無害化を促進させる原位置浄化技術である。本技術では、浄化菌の導入前に有機性の浄化材を帯水層に注入し、帯水層中で UCH007 株が活動できる適切な嫌気環境を事前に形成させる。浄化材の注入により、地盤内に存在する *Dehalococcoides* 属細菌 (以下「デハロ菌」) による浄化も期待できるが、デハロ菌が浄化に必要な菌数まで増殖する速度が遅いため浄化期間が長くなる。そのため、UCH007 株の導入により浄化期間の短縮が期待できる。尚、UCH007 株の増殖を促進させる効果が確認されている *Sulfurospirillum* sp. UCH001 株 (以下「UCH001 株」、写真-2) を用いて共培養した菌液を浄化に用いる。

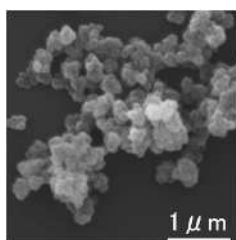


写真-1 UCH007 株の電子顕微鏡写真

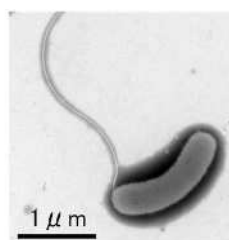


写真-2 UCH001 株の電子顕微鏡写真

### 2. 技術保有会社のコスト・環境負荷低減の考え方

塩素化エチレン類で汚染された帯水層に対して浄化材を注入して地盤中の脱塩素細菌を活性化させて浄化を行う方法 (バイオスティミュレーション) は従来工法として広く普及している。本技術は、従来工法に浄化菌の培養液 (以下「菌液」) を導入する工程が付加された浄化技術 (バイオオーグメンテーション) である。そのため、従来工法と比較すると菌液の培養や注入に必要なコストや環境負荷が増加する。一方で、浄化期間の短縮が見込めるため、地下水モニタリング等を含む現場管理に関わるコストや環境負荷の低減が期待できる。本実証調査では、菌液の大量培養方法や注入方法に新たな技術を導入することでコストや環境負荷低減を目指した。

### 3. 調査結果の概要

#### (1) 実証調査方法

##### ① 実証試験装置と試験方法

本実証調査は図-1、図-2 に示す実証試験装置を用いて、UCH007 株導入による浄化効果を比較工法と共に検証した。区画-1 は、浄化材注入後に UCH007 株を導入する条件（菌導入区）、区画-2 は浄化材のみを導入する条件（対照区）とした。

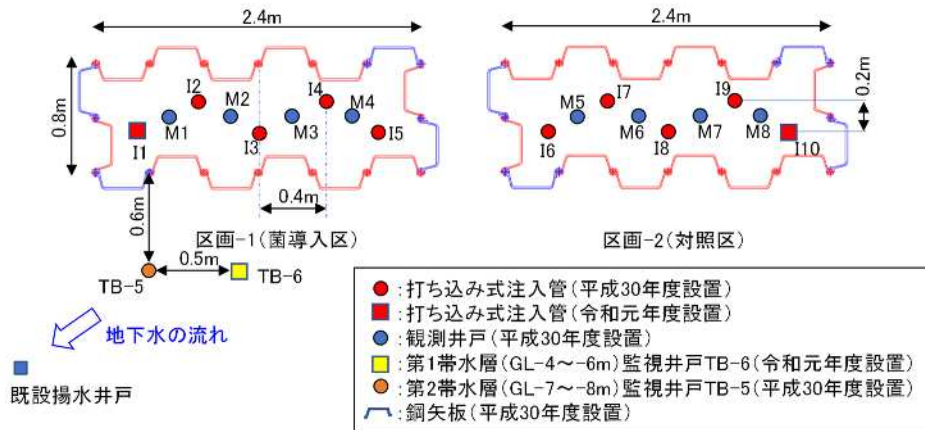


図-1 実証試験装置の平面図

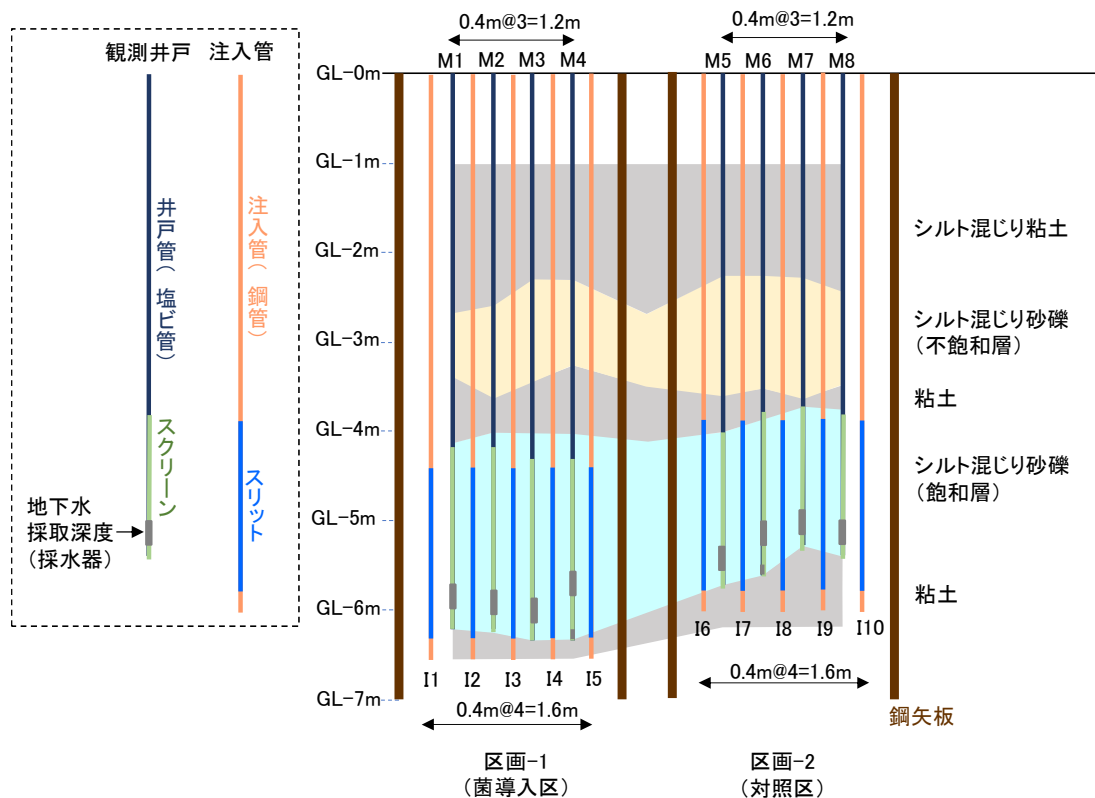


図-2 実証試験装置の断面図



図-3 実証調査のフロー

試験の全体フローを図-3 に示す。浄化材と菌液は、小型のバイプロドリルで打設した鋼製の打込み式注入管から注入した。約 19L 容の耐圧容器（市販のビア樽の改造品）で培養した菌液は、外気に接触しないように窒素ガス発生装置（PSA 方式）を用いて地盤に供給した。帯水層へ導入された UCH007 株の培養液中の菌数は 1 回目、2 回目の注入共に約  $2 \times 10^7$  cells/mL であった。

## ②測定方法

測定項目、分析方法、測定検体数を表-1 に示す。各観測井戸の地下水位を測定してパージを実施後、図-2 に示す GL-5m～-6m の深度からテフロン製の採水器を用いて地下水を採取した。地下水試料の採取後に投げ込み式多項目測定器を用いて現地地下水状況を測定した。監視井戸では監視対象とする帯水層にスクリーンを設置し、その中央部から地下水を採取して観測井戸と同様の測定を行った。

試験開始前の土壌試料は、各区画 4 箇所の観測井戸設置地点におけるボーリングコアから採取した。試験終了時の土壌試料は、各観測井戸から 30cm 離れた地点でボーリング実施後に土壌を採取した。分析用の土壌試料は、各地点で試験開始前は 4 深度、試験終了後は 6 深度採取し（写真-3）、塩素化エチレン類（TCE、1,2-DCE、VCM）の土壌溶出量を測定した。

表-1 測定項目および測定数

	測定項目	分析方法	目的	測定検体数
地下水	トリクロロエチレン	JIS K0125 5.3	浄化効果の確認	11回×10箇所 計:110検体
	1,2-ジクロロエチレン	JIS K0125 5.3		
	クロロエチレン	JIS K0125 5.3		
	全有機炭素濃度	JIS K0102 22.1	浄化材の存在量の確認	
	溶存性有機炭素濃度	JIS K0102 22.1		
	全無機炭素濃度	JIS K0102 22.1		
	硫酸イオン濃度	JIS K0102 41.3	栄養塩の存在状況確認	
	硝酸性窒素濃度	JIS K0102 43.2.5		
	亜硝酸性窒素濃度	JIS K0102 43.1.2		
	アンモニア性窒素濃度	JIS K0102 42.5		
	オルトリン酸リン濃度	JIS K0102 46.1	浄化に適切な地下水環境条件の確認 嫌気環境状態の確認	
	pH	投げ込み式多項目測定器		
	溶存酸素濃度	投げ込み式多項目測定器		
	酸化還元電位	投げ込み式多項目測定器		
	電気伝導率	投げ込み式多項目測定器		
	地下水温	投げ込み式多項目測定器		
	地下水位	地下水位計	注入水の拡散・希釈状況の確認	
	ナトリウムイオン濃度	JIS K0102 48.3		
	塩化物イオン濃度	JIS K0102 35.3	導入微生物の存在状況(減少)確認 浄化関連細菌数の推移確認	
	全菌数(バクテリア数)	定量PCR法 <sup>1)</sup>		
デハロ菌数	定量PCR法 <sup>1)</sup>			
<i>verA</i> 遺伝子数	定量PCR法			
UCH007株菌数	定量PCR法 <sup>2)</sup>			
UCH001株菌数	定量PCR法 <sup>3)</sup>			
土壌	トリクロロエチレン溶出量	JIS K0102 38.1, 38.3	浄化効果の確認	8箇所×4深度 8箇所×6深度 計:48検体
	1,2-ジクロロエチレン溶出量	JIS K0102 38.1, 38.3		
	クロロエチレン溶出量	JIS K0102 38.1, 38.3		
	全菌数(バクテリア数)	定量PCR法 <sup>1)</sup>	導入微生物の存在状況(減少)確認	8箇所×1深度 計:8検体
	デハロ菌数	定量PCR法 <sup>1)</sup>		
	<i>verA</i> 遺伝子数	定量PCR法		
	UCH007株菌数	定量PCR法 <sup>2)</sup>		
	UCH001株菌数	定量PCR法 <sup>3)</sup>		

1) 16S rRNA遺伝子、2) 23S-5S rRNA遺伝子、3) *tolC*遺伝子

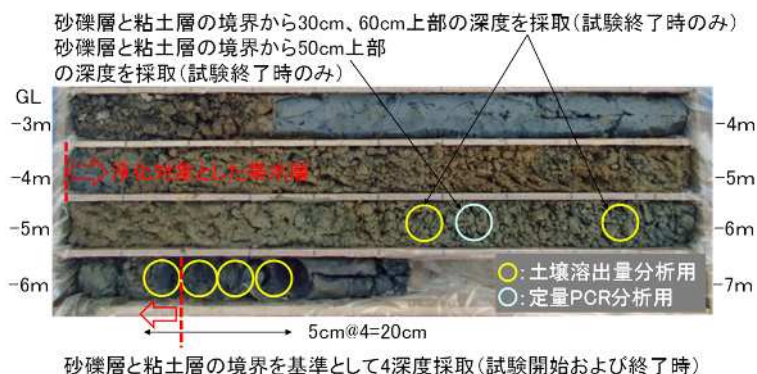


写真-3 土壌試料の採取深度

### ③浄化対象土壌

第一帯水層のシルト混じり砂礫層（概ね GL-4m～-6m）が浄化対象範囲であり、1区画あたりの処理土壌量は 5.1m<sup>3</sup>であった。第一帯水層の上部と下部には透水性の低い粘土層があり、止水処理を施した鋼矢板で区画を仕切ったため、試験区画内は外部の帯水層とは遮断された。本事業より前に実施した事前調査により、浄化対象とする帯水層の土壌は溶出量基準を超過せず、帯水層直下のシルト層において土壌溶出量基準値を超過する塩素化エチレン類が存在したため、土壌調査は第一帯水層とシルト層の境界付近のシルト層を中心に実施した。

## （2）実証調査結果

### ①技術の有効性

#### 1) 地下水中の塩素化エチレン類の浄化効果

浄化材の注入（0日目）直後に地下水中の菌導入区、対照区共に溶存性有機炭素濃度は約 4,000mg/L まで増加したが、その後は全菌数の増加に伴って漸減した（図-4）。菌数の増加に伴って帯水層の酸化還元電位は低下し、1回目の菌液導入時（浄化開始から 20日目）にはデハロ菌の脱塩素化に適した硫酸イオン濃度が減少した硫酸還元状態となっていることを確認した（図-5）。対照区では 1,2-DCE 以降の脱塩素化は浄化開始から約 50日後に確認されたが、菌導入区では菌液を導入した直後から脱塩素化が生じたことによる浄化促進効果を確認できた（図-6）。

UCH007 株の遺伝子数は菌導入区において 1回目の菌液導入直後に 10<sup>6</sup>copies/mL 程度で検出されたがその後は減少し、2回目の菌液導入の直前には 10<sup>3</sup>copies/mL 程度と導入時と比較して約 1/1000 まで減少した（図-7 左）。対照区では試験期間を通じて UCH007 株が検出されなかったことから、対照区で増加したデハロ菌は UCH007 株とは異なる種のデハロ菌であると推察された（図-7 右）。対照区においては浄化材の導入からデハロ菌が増加するまでに約 1ヶ月の期間を要したことから、菌導入の効果が明確に確認できた。

試験前後の地下水中の塩素化エチレン類の濃度を表-2 に示す。浄化開始から 120 日目における各観測井戸における塩素化エチレン類の濃度の平均値は TCE および 1,2-DCE は地下水基準値以下となったが、VCM は基準値を満たせなかった。この理由として、全ての項目で基準値を満たした対照区と比較して浄化開始前の TCE 濃度が 1.6 倍、1,2-DCE 濃度が 6.1 倍、VCM 濃度が 21.7 倍高く、菌導入区で塩素化エチレン類が浄化開始前に高濃度で存在していたためと考えられた。

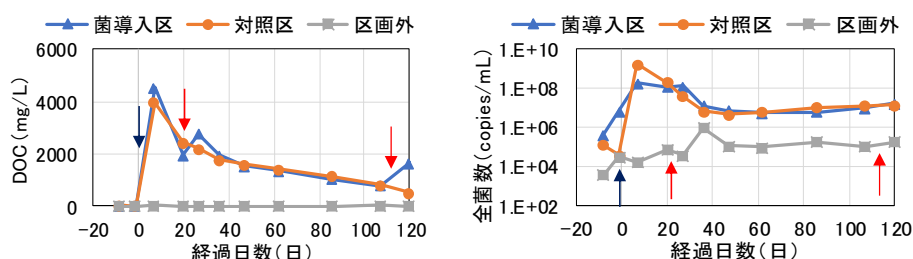


図-4 地下水中の溶存性有機炭素濃度（左）および全菌数（右）の経時変化  
（菌導入区：M1～M4 井戸の平均値、対照区：M5～M8 井戸の平均値、区画外：TB-6 井戸）  
（↓：浄化材の注入日、↓：菌液の導入日）

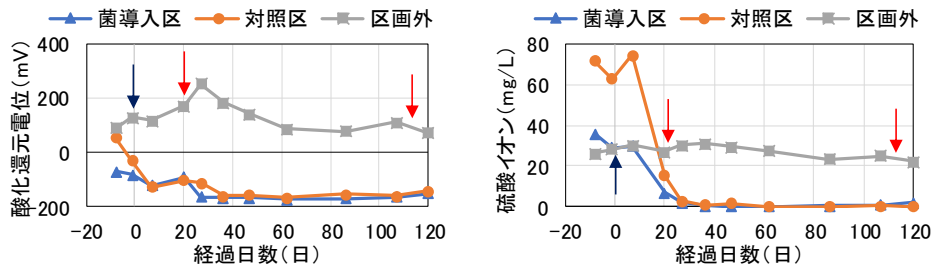


図-5 地下水中の酸化還元電位（左）および硫酸イオン濃度（右）の経時変化  
 (菌導入区：M1～M4 井戸の平均値、対照区：M5～M8 井戸の平均値、区画外：TB-6 井戸)  
 (↓：浄化材の注入日、↓：菌液の導入日)

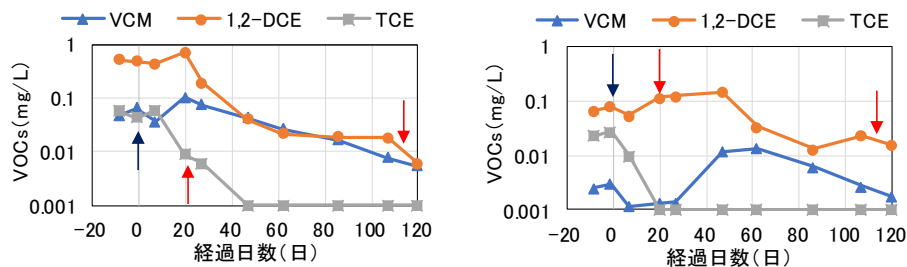


図-6 地下水中の塩素化エチレン類の経時変化  
 (左：菌導入区：M1～M4 井戸の平均値、右：対照区：M5～M8 井戸の平均値)  
 (↓：浄化材の注入日、↓：菌液の導入日)

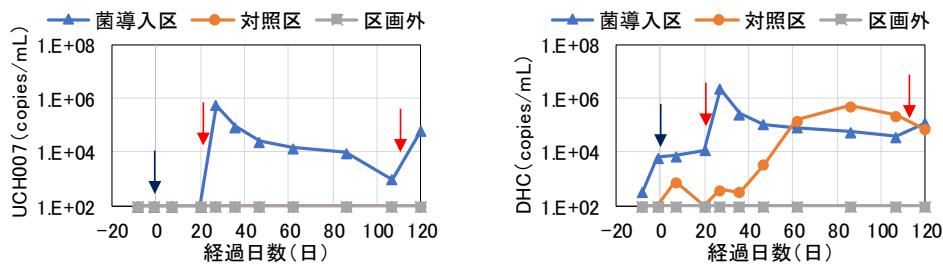


図-7 地下水中の UCH007 株菌数（左）およびデハロ菌数（右）の経時変化  
 (菌導入区：M1～M4 井戸の平均値、対照区：M5～M8 井戸の平均値、区画外：TB-6 井戸)  
 (↓：浄化材の注入日、↓：菌液の導入日)

表-2 浄化前後における地下水中の塩素化エチレン濃度（菌導入区）

測定項目	区画-1(菌導入区)の観測井戸(M1～M4)						区画-2(対照区)の観測井戸(M5～M8)					
	VCM(mg/L)		1,2-DCE(mg/L)		TCE(mg/L)		VCM(mg/L)		1,2-DCE(mg/L)		TCE(mg/L)	
	試験前*	試験後**	試験前*	試験後**	試験前*	試験後**	試験前*	試験後**	試験前*	試験後**	試験前*	試験後**
平均値	0.0650	0.0054	0.473	0.008	0.043	<0.003	0.0030	0.0018	0.078	0.015	0.027	<0.003
除去率	91.7%		96.4%		93.1%以上		41.7%		80.3%		89.0%以上	

※赤字：地下水環境基準値を超過

\*2019年10月2日(浄化開始1日前) \*\*2020年1月21日(浄化開始120日目)

## 2) 土壌中の塩素化エチレン類の浄化効果

本実証試験での浄化前後における砂礫層とその下部に位置する粘土層の土壌溶出量の測定結果を表-3に示す。菌導入区では試験終了後に土壌溶出量基準値を超過する塩素化エチレン類が検出されなかった。また、試験後の帯水層から採取した全ての土壌試料においても土壌溶出量基準値を超過する塩素化エチレン類は検出されなかった。

本実証試験では浄化対象とした帯水層における土壌の浄化効果を明らかにすることができなかったため、現地の帯水層から採取した細粒分を含む土壌と地下水を用い、ガラスバイアル瓶内でTCEによる帯水層汚染を再現したバッチ試験を実施し、気相中のガス濃度および土壌中の塩素化エチレン類の溶出量および含有量を測定することにより土壌の浄化効果を確認した。この結果、菌導入区と同条件（バイオオーグメンテーション条件）では菌導入（3週間目測定直後）から6週間で全ての塩素化エチレン類が溶出基準を満たし、対照区と同条件（バイオスティミュレーション条件）と比較して土壌の浄化速度に明確な差が生じていることが示された（図-8上）。また、土壌含有量と気相ガス濃度の結果から、土壌中に存在している塩素化エチレン類の脱塩素化が生じてエチレンまで浄化されている状況を確認できた（図-8下）。

表-3 実証試験前後の土壌溶出量および浄化率

土壌試料 採取地点	区画-1(菌導入区)*					
	VCM(mg/L)		1,2-DCE(mg/L)		TCE(mg/L)	
	試験前**	試験後***	試験前**	試験後***	試験前**	試験後***
M1	0.0034	0.0013	0.140	<0.004	<0.003	<0.003
M2	0.0018	<0.0002	0.035	<0.004	<0.003	0.006
M3	0.0017	0.0004	0.015	0.008	0.007	<0.003
M4	0.0011	0.0010	0.180	<0.004	0.110	<0.003
土壌試料 採取地点	区画-2(対照区)*					
	VCM(mg/L)		1,2-DCE(mg/L)		TCE(mg/L)	
	試験前**	試験後***	試験前**	試験後***	試験前**	試験後***
M5	0.0004	0.010	0.044	0.058	<0.003	0.011
M6	<0.0002	0.0004	0.008	<0.004	0.008	0.004
M7	0.0005	0.0034	0.035	<0.004	<0.003	<0.003
M8	0.0016	0.0030	0.067	0.025	<0.003	<0.003

※赤字: 土壌溶出量基準値を超過

\*帯水層下部の粘土層から採取した4深度の測定結果のうち最大値を表示

\*\*試験開始前(2019年1月28-31日)

\*\*\*試験終了後(2020年1月27-29日)

土壌試料は試験前(観測井戸設置地点)から30cm離れた地点で採取

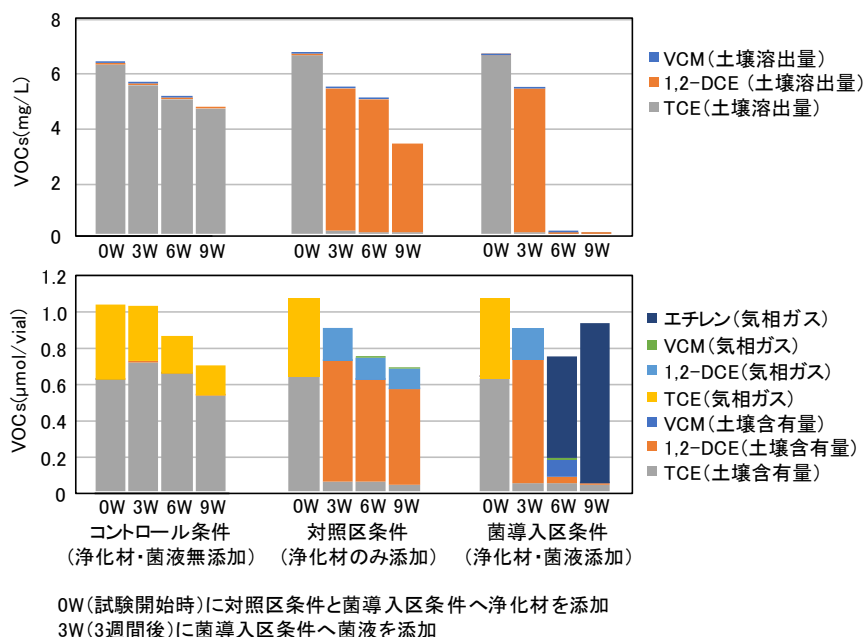


図-8 室内バッチ試験による TCE 汚染土壌の浄化状況

## ②技術の実用性

### 1) 浄化期間の短縮

浄化材を汚染帯水層に供給して塩素化エチレン類の浄化を行うバイオスティミュレーションは、他の原位置浄化技術と比較してコストや環境負荷が小さな技術であるが、浄化期間が長期化する課題があった。そのため、菌液を導入することで浄化期間を短縮できれば、浄化技術の実用性が高まる。

実証試験における 1 回目の菌液導入日の前日から 94 日間（2 回目の菌液導入前）までの期間の TCE、1, 2-DCE、VCM のモル濃度の合算値の経時変化から分解速度を決定した。その結果、菌導入区の分解速度の平均値は  $0.046\text{day}^{-1}$  となり、対照区の  $0.022/\text{day}^{-1}$  と比較して分解速度が 2.1 倍高くなった（表-4）。したがって、塩素化エチレン類の濃度の初期値が同一であれば、浄化菌を導入した後に基準値まで塩素化エチレン類が減少する期間は、浄化材のみを供給する条件と比較して短縮できると考えられた。

表-4 実証試験結果より求めた分解速度

観測井戸		分解速度		相関係数	観測井戸		分解速度		相関係数
		k (day <sup>-1</sup> )	平均値				k (day <sup>-1</sup> )	平均値	
区画-1 (菌導入区)	M1	0.043	0.046	0.876	区画-2 (対照区)	M5	0.030	0.022	0.890
	M2	0.037		0.887		M6	0.013		0.723
	M3	0.039		0.857		M7	0.021		0.782
	M4	0.064		0.887		M8	0.022		0.821



## 2) 設備・装置の実用性

本実証試験の工法は浄化対象範囲に応じて、井戸本数や浄化設備の規模を設定することが可能であり、浄化規模の大小が設備や装置の設置に支障をきたさない。

排土・洗浄作業が不要な鋼管製の打込み式注入管を小型の自走式バイブドリルを用いて打設するため、施工速度が速く、狭隘な場所で作業が可能である。打込み式注入管は施工が容易で引き抜いて再利用でき、メンテナンスも容易であることから作業性や経済性が高い。本実証試験では打込み式注入管の打設・引抜時にトラブルは無く、約 6m の注入管の施工を 10 分程度で完了した。

既製品を改良した繰り返し使用可能な密閉性の高い培養装置（ピア樽）を用いる浄化菌の培養方法と窒素ガスを用いる注入方法を確立した。大型のファーメンターを用いる培養方法と比較して、菌液を輸送容器に移し替える手間が不要であり、一定期間であれば常温で菌液が保管できることが示された。嫌気状態の菌液を空気に接触することなく汚染帯水層に導入するために新たな注入装置を開発し、AC100V が使用可できる安価な窒素発生装置（PSA 方式）を用いて菌液を容易に供給できることを実証試験で確認した。

## ③技術の経済性

10,000t (5,000m<sup>3</sup>) の *cis*-DCE (土壌溶出量基準で約 2.5 倍超過、地下水基準で 25 倍超過を想定) で汚染された帯水層に対してコスト試算を実施した結果、本技術（バイオオーグメンテーション）の浄化コストは 20,600 円/m<sup>3</sup> となり、バイオスティミュレーションと比較して浄化コストが 28% 高くなった。塩素化エチレン類を対象としたバイオオーグメンテーションは、バイオスティミュレーションに菌液を導入する工程を増やして実施する技術であるため、工期短縮によって労務費や現場管理費を下げるができなければ工事全体のコストを下げるのが難しい。本試算では菌液の調達費が工事費全体の 55% に達し、浄化期間が短縮された経費節減分を含めても全体の工事費を下げるができなかった。浄化コストを低減するには、培養液中の UCH007 株の菌密度を高め、単位土壌量当たりの菌液供給量を減らす必要があると考えられた。一方、バイオオーグメンテーションによる直接的な工事費をバイオスティミュレーションより大きく削減することは難しいが、浄化期間を短縮して土地の有効利用を早期に実現できれば、間接的なコストを低減できる可能性がある。

## ④環境負荷度

### 1) 二酸化炭素排出量の削減量

浄化期間を短くできるため、浄化対象土壌を 5,000m<sup>3</sup> とした場合の二酸化炭素排出量は 1.8kg-CO<sub>2</sub>/m<sup>3</sup> となり、比較工法（バイオスティミュレーション）より二酸化炭素排出量を約 55% 低減できると試算された。比較工法としたバイオスティミュレーションは、揚水処理法などの他の原位置浄化技術よりも二酸化炭素排出量が低いが、浄化期間が短縮されたことにより事務所内等で使用する電気使用量が削減されたため、二酸化炭素発排出量が小さくなった。

## 2) 技術の環境負荷・安全性

小型のバイブドリルを用いて行う注入管の設置作業に伴う騒音や振動は、発生源から約10m離れた地点でも規制値内に収まることが確認でき、敷地境界に近い施工エリアでも本技術が適用できることが示された。また、本技術では悪臭や排ガスは生じなかった。

打込み式注入管の採用により汚染土壌が発生せず、揚水等の処理も行わないため、施工中における汚染物質による曝露可能性は低い。また、菌液は耐圧容器に密閉した状態で現地に輸送し、菌液が外部に漏洩しない方法で注入を行うため、菌液に対する曝露可能性も低い。

本実証調査は「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」の指針審査時に提出した事業計画に基づいて実証試験を行った。UCH007株およびUCH001株の培養にはTCEを用いるが、出荷前に窒素パージ処理を行うことによって培養液に含まれる塩素化エチレン類の濃度が検出限界以下であることを確認している。また、特異的にUCH007株およびUCH001株を検出できる定量PCR法によって、土壌および地下水中のUCH007株およびUCH001株の増減について観測しており、帯水層に導入したUCH007株およびUCH001株が減少していることを確認した。

## 4. 検討会による評価

本実証調査は、塩素化エチレン類で汚染された帯水層の浄化を行う場合に、1,2-DCE以降の脱塩素化を促進可能なデハロ菌（UCH007株）を導入するバイオオーグメンテーション技術の適用範囲を明らかにして、コスト面・環境面での優位性を他工法と比較して、工法としての技術の成熟と普及促進のための実証データを得ることを目的に実施された。実証試験の目標および評価を表-5に示す。

表-5 実証試験の目標値及び評価

評価項目	技術目標	結果概要
技術の有効性	塩素化エチレン類の除去効果 (地下水)	塩素化エチレン類の地下水濃度が基準値以下(実証試験)
	菌導入区における地下水中の TCE 濃度および 1,2-DCE 濃度は、菌導入から 120 日後に全ての観測井戸で地下水基準以下となった。VCM 濃度は 4 本中 3 本の観測井戸で基準値を超過したが、菌導入区において塩素化エチレン類の分解生成物を含めた地下水濃度(モル濃度)の浄化速度は、未導入区と比較して速くなっていることを実証試験の結果から確認した。	
	塩素化エチレン類の除去効果 (土壌)	菌導入の土壌浄化効果を定量的に評価(室内試験)
	実証試験において、未導入区と菌導入区で土壌採取を行い、菌導入区では、TCE、1,2-DCE、VCM がいずれも土壌溶出量は基準値以下となった。 室内試験において、バイアル瓶中に含まれる塩素化エチレン類の土壌含有量と気相中の濃度を測定することにより、菌導入による土壌浄化効果を定量的に確認した。初期の TCE 溶出量が約 5mg/L の汚染土に対して浄化材(有機物)を添加して嫌気状態となった 3 週間後に UCH007 株を導入した結果、菌導入から 6 週間後に TCE、1,2-DCE、VCM がいずれも土壌溶出量基準値以下になることを確認した。	
技術の実用性	浄化期間の短縮	比較工法より、1/2 以下に工期短縮(実証試験)
	本実証試験で菌導入後の分解生成物を含めた塩素化エチレン類の実証期間における浄化速度は、未導入区と比較して速くなった。浄化速度が増加したことにより浄化期間が短縮されることを確認した。	
技術の経済性	全体の浄化コスト	15.7 千円/m <sup>3</sup> 以下(比較工法より 3%削減)
	本実証試験の結果を基に試算した菌導入区の 1m <sup>3</sup> あたりの浄化コストは 20,600 円となり対照区と比較して 28%高くなったが、浄化期間が短縮されることによる間接的なコスト削減効果を考慮すると本技術の適用性は高い。本実証試験では菌導入区に多量の菌液を供給したことが高コストとなった要因と考えられ、培養条件を最適化して培養液中の UCH007 株数を増やすことができれば菌液供給量を減らせるため、コストの低減が見込まれる。	
環境負荷度	二酸化炭素排出量の削減量	1.7kg-CO <sub>2</sub> /m <sup>3</sup> 以下(比較工法より 55%削減)
	本実証試験で菌導入区における二酸化炭素排出量は 1.8kg-CO <sub>2</sub> /m <sup>3</sup> となり対照区と比較して 55%低減できることを確認した。この要因として、浄化期間の短縮によって間接的なエネルギー使用量(事務所内で使用する電気使用量や通勤等に使用する燃料使用量)が低減したためと考える。	