

## 合同委員会委員からの意見及び考え方の整理(案)について

平成16年7月30日

通し 番号	論点の 分類	提出等 意見番 号	委員からの意見	考え方の整理(案)
1	基本的 考え方	提出 1	バイオレメディエーションは優れた手法であり、今後は安全性を評価する仕組みが必要である。浄化をしない場合の生態系影響、健康リスクを把握した上で、浄化による効果、生態系影響との比較がなされるべきではないか。	環境汚染修復事業は、安全性評価を十分踏まえつつ実施するというのであれば、負の遺産である環境等汚染の浄化が進むことによって、全体として生態系影響及び健康影響の安全性をより一層高めることができるものであるという考え方が重要であり、その役割を担うことができるものの一つの手法として、バイオレメディエーション事業が位置付けられ、今後、当該事業の健全な育成を図ることが期待されているところと考えますが、如何か。
2		提出 2	汚染サイトの修復事業は、道路、ダム工事などとは異なり、既に汚染されたことにより現にリスクが生じている地域を対象にするため、汚染物質を取り除くことを最優先とし、事前調査は最低限に留めるべきである。	
3		提出 3	各項目にどれだけの情報を盛り込む必要があるかを明らかにするために、解説書の作成が必須である。	新指針作成後、本合同会合における審議内容、これまでの経済省の指針、環境省の指針及びカルタヘナ法の生物多様性影響評価実施要領等を参考にしつつ、解説書を作成したいと考えています。
4		提出 4	「生態系等への影響の安全確保」を「環境影響の未然防止」とする(影響評価する手法が未発達のため)。	本指針における安全性評価の項目としては、主として、主要な動植物(人を含む)に対する病原性、毒性、利用微生物を含めた微生物群集の組成変化、対象物質より毒性の高い物質の残留性、生態系等へのその他有害な影響を及ぼす可能性等である。 このことから、これらの評価を代表する用語として、「生態系等への影響評価」とし、この用語の中に、人に対する健康影響を含むこととした。 なお、環境影響評価という用語は、環境影響評価法に定義されている環境影響評価(いわゆる環境アセスメント)と誤解をまねく可能性があると考え、その使用を避けた。 いずれにしても、本指針には、評価すべき項目及びその内容が個々に記載されているので、この用語を使用しても混乱はきたさないのではないかと。 また、本指針は、非組換え微生物を対象としていることから、組換え体による交雑、駆逐等の影響を受けることを想定した生物多様性影響評価というよりも、「生態系への影響評価」という用語の方が適切と考えました。
5		提出 5	安易に「生態系」という用語を使わず、従来の「環境影響」のほうがより包括的で賢明である。	
6		提出 6	「生態系等への影響の安全確保」とあるが、環境経由のヒトの健康について言及しなくていいか。あるいは生態系等の「等」の中に含まれているのか。	
7		提出 7	「生態系等への影響」の中には健康影響も含まれていると思うが、「人の健康および生態系への影響」と併記する必要はないか。病原性を評価したり、硝酸性窒素など、人の健康を損なう有害な添加物の拡散のおそれを評価するのであるから、生態系への影響の評価が中心とは思えない。	
8		提出 8	目的:人及び生態系等(以下生態系等)への…、と加筆すべきである。	

9	提出 9	「生態系等への影響評価に必要な項目」を「環境影響評価に必要な項目」とする(影響評価する手法が未発達のため)。	
10	提出 10	「生態系等への影響評価を行い」を「環境への影響評価を行い」とする(影響評価する手法が未発達のため)。	
11	提出 11	今回の指針は、カルタヘナ法に影響されすぎている印象がある。非組換え微生物の利用で、生物多様性の保全をどこまで強く意識する必要があるかを議論すべきである。	
12	提出 12	「環境への安全性」という用語の中に、健康影響も含めているのか。言葉の定義をはっきりさせて使う必要がある。	
13	利用微生物 委員会1	米国では塩素系溶剤の浄化にdehalococcoidesの混合菌が盛んに利用されている。複合微生物系への対応が必要ではないか。	<p>本指針の利用微生物の範囲については、これまでの議論では、安全性の評価が適切に行い得る単一菌及び既知の複合菌としてきたところ。但し、既知の複合菌の範囲として、どこまでが既知でなくてはならないかについて、さらなる議論が必要。</p> <p>例えば、PCR-DGGE法等により複合菌に含まれる主要な菌の同定が可能であって、その情報によって全体的に病原性がない又はその可能性が極めて低いことが確認できれば、既知の複合菌に準じることとしてはどうか。具体的には、</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 環境浄化に関与する目的の種を分類同定し、同定に基づいた病原性の有無を文献、データベースによって調査する(この際、必ずしも株レベルまで同定を行う必要はなく、例えばある微生物が属又は種レベルまで同定された場合、その属又は種に既知の病原性細菌が含まれない場合は、安全性を評価することが可能ではないか。)</li> <li>2) 複合菌中に未分類・未同定のもが存在している場合は、その複合菌の由来及び自然界における分離源、分布状況並びに経験的に安全な利用の歴史等の内容を調査する。</li> <li>3) 事前の室内試験による使用複合菌全体の生存・増殖性の有無等を調査する。</li> <li>4) なお、必要に応じて追補的な試験等を行う。</li> </ol> <p>以上の情報から総合的に安全性を評価することが可能な場合があると考えるが、如何か。</p>
14	委員会2	dehalococcoidesはバイオスティミュレーションでは国内でも10箇所以上の汚染サイトで利用されている。現実的には、パイレメ事業が進むかどうかは、その手法が経済的に見合うか、安い費用で浄化できるかどうかポイントとなる。また、この菌は他の菌と混合すればよく育つが、ピュアリファイしたものを全部混合するという状態では使われていない。このような事実を検討すべきである。	
15	提出 13	コンソーシアにおいても、順養を続けることで構成微生物の種類・数が限定されてくる。このような場合、構成微生物を16S rDNA等の分析を通じて分類同定し、安全と確認できる情報を提供すれば、複数菌として使用できる道を開くべきである。ただし、指針の書き方をかえる必要はなく、実施に向けた解説書で説明すべきである。	
16	提出 14	「未知の複数菌(コンソーシア)は対象としない」はそのままでもよいが、「既知の菌」とは種名・株まで明らかとするのはかなり難しいので、「DNAのプロファイルで一定のものか」、「16S DNAで同定したが生育ができないもの」も既知の菌の概念に入れるべきと思われる。(理由: 単一では難しいあるいは培養不可の菌があるから(同定であればDNAレベルなどでは可能))	

17		提出 15	微生物の種類について特に触れていないが、必要ではないか。細菌、糸状菌(腐朽菌)などは実用段階に入っており、将来的には更に多様になると考えられる。	今回の指針はいわゆる微生物(細菌、古細菌、菌類)全体を対象としており、各種微生物の種類の安全性については、個別案件審査の段階で検討されることとなります。
18		提出 16	輸入菌に対して、土着菌とは異なる評価基準を設ける必要はないか。	本指針では、利用微生物毎の特性の評価を実施し、その情報を踏まえ、利用可能な微生物について適切な管理のもとに使用するものであることから、国内と輸入微生物について異なる基準を設ける必要はないと考えています。
19		提出 17	植物浄化の場合、植物の根系に生息する微生物については、特に新たな微生物を加えるのでなければ、評価の対象にならないと思われる。	植物による環境浄化に関しては、植物の寄与と根系微生物の寄与の区分が困難なため、評価の対象外としています。
20	拡散防止	提出 18	最も重要な点は、除染効率の高い手法を用いて、できる限りクローズドな系で迅速に対応することである。特に、二次汚染防止の観点から、作業中に汚染物質を対象サイト外に絶対に漏出させないようにするための評価が更に必要である。	事業者は、作業区域(微生物を直接取り扱う区域)を設定し、作業区域又は作業所(産業活動に必要な業務を行う場所)から周辺へ微生物が漏出することを可能な限り防止し、又は最小限にする対策を講じる必要がある。 具体的には、作業区域・作業所及びその周辺において微生物の拡散が生じる可能性があり、それが問題となる場合は、防水堤の採用、遮水シート設置等その対策が必要となる。(例えば、微生物を混合する土壌は舗装された場所で養生し、かつ、降雨による漏洩防止のためにシートで覆う。掘削のために設けた矢板を使った止水兼山留壁によって、地下水流による拡散防止を図る。など)。
21		提出 19	作業区域外への拡散の可能性についても評価すべきではないか。	
22		提出 20	サイトの周辺環境によっては、人間だけでなく、動植物に対する病原性チェックも厳重に行う必要がある。	
23	収集すべき情報	提出 21	利用微生物をユニークに識別する方法、利用微生物の生存が有利になる条件、利用微生物の生息を制限する条件は必須。	利用微生物をユニークに識別する方法に関しては、「生態系等への影響評価に必要な項目」中の「利用微生物に関する情報」中の「利用微生物の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性」にて記載すべきものとしています。 また、利用微生物の生存が有利になる条件、利用微生物の生息を制限する条件に関しては、「生理学的及び生態学的特性」の「生息又は生育可能な環境の条件」にて記載すべきものとしています。

24	提出 22	資料4-3「第5 生態系等への影響評価の考え方」の「 .評価に必要なとされる情報」に「上記の情報の一部を用いる必要がないと考える合理的な理由がある場合には、それらの情報を収集しなくてもよい。」とあるが、その場合は不要と考える理由の記載を求めるべきである。	ご指摘のとおりと考えます。この点が明確になるよう、修正します。
25	提出 23	浄化作業計画に盛り込む内容として、浄化対象物質とその達成目標レベル(濃度等)を記載した方がよい。	ご指摘のとおりとします。
26	提出 24	口、環境の条件あるいは分離源、と加筆すべきである。	
27	提出 25	八、捕食性、は必要か。	
28	提出 26	八の「捕食性」は不要ではないか。あるいは捕食性を残すのであれば、原生動物の場合のみ、といった説明を入れた方がいいのではないか。	
29	提出 27	捕食性又は寄生性とあるが、きのこの菌糸などを使う場合は、菌根性のものが多数ある。樹木の70～80%の根にはきのこの菌糸が、野菜の根にはVAMなどが付いているので、捕食性、寄生性に加えて、共生性についても加えたほうが良いと思われる。	

30	評価の項目	委員会3	指針を作るときに、対照にするところをどこに置かということが必要。汚染されていない生態系の健全な姿、又は、人や人に係る動植物にとって、安全であることが十分評価できる生態系の姿を明確にしながらやる必要がある。	<p>本指針での作業区域は汚染地域であり、汚染土壌等と修復された土壌等では微生物群の組成は変化すると考えられるため、浄化後にどのような生態系を求めるかを検討し、一律的な基準を設定することは非常に困難なことであると考えられます。</p> <p>このことを前提として、生態系等の影響評価について、以下のような考え方で如何か。</p> <p>生態系等への影響評価項目は、主として、 主要な動植物(人を含む)に対する病原性、毒性の有無、 利用微生物を含めた微生物群集の組成変化、 対象物質より毒性の高い物質の残留性、 生態系等へのその他有害な影響を及ぼす可能性等である。</p> <p>すなわち、導入微生物が増殖することにより、当該導入微生物による病原性や毒性によって、他の微生物を有意に減少させ、生態系等へ有害な影響を与えるかどうかを総合的に評価することとなる。</p> <p>生態系等への有害な影響とは、望ましい生態系等の姿に対する許容できない有意な影響を意味するものである。また、望ましい生態系等の姿とは、生態系等の基盤の変化によってもたらされる、生物種の多様性、主要な動植物の生育環境、人の居住環境、経済活動等が維持できなくなる等、多様な観点からのものを意味するものである。</p> <p>なお、この基本的な考え方をもとに、具体的な評価は、個別案件審査の中で検討していきたいと考えています。</p>
31		委員会4	どこまでいったら原生生態系なのかというようなことは難しく、微生物生態学の世界に入ってしまう。有害でない生態系になればよいのではないか。	
32		委員会5	本指針における安全性評価は従来からの自然生態系に対するアセスとは異なる。既に汚染された生態系を非汚染生態系に変えるという視点から、浄化後どのような生態系になればいいのか検討する必要がある。	
33		委員会6	バイレメでは、自然生態系を修復するのではなく、限定された汚染地域を修復する。生態系にとらわれすぎると生態系とは何かという別の議論に陥ってしまう。	
34		委員会7	環境修復の必要な場所の多くは、工場地帯や人家であって、基本的には自然生態系を対象にしていることはないのであって、我々の使用に見合った基準の設定ということで良いのではないか。	
35		提出28	資料4-3 評価項目の最初の・微生物群集の組成変化について、バイオオーグメンテーションの様々な作業を行えば微生物群集の組成は少なからず変化することが予想されるが、その変化を可とするか否とするかを判断する科学的根拠は現在乏しいと思われる。(組成が変わっても全体としての機能が維持されていればよいとの考え方もあり得る。)「微生物に由来する土壌等の重要な機能に影響を及ぼすかどうか」といった「機能」面で評価することにした方がよいのではないか。	

36	浄化技術の情報	提出 29	技術の開発段階において、他の浄化手法および、放置した場合との比較ができる野外での実験設定をして影響調査をし、浄化メカニズムの化学的理解を深めるべきである。	今後の検討課題と考えます。
37		提出 30	対象場所における微生物の挙動、と加筆すべきである。	ご指摘のとおりとします。
38		提出 31	イ.土着性は必要か(不要なことが多い)。	土着性は、利用微生物が作業区域に由来する土着生物であるかどうかを記入するものとしていましたが、バイオオーグメンテーションの場合、収集すべき情報として、不要と考えられるため、削除することとします。
39		提出 32	二.自然生息域(あるいは周辺の未汚染地域の生息環境)と加筆すべきである。	ご指摘のとおりとします。
40		提出 33	「ホ.残留性」を「ホ.生残性」ないしは「ホ.生存性」とする(生物が残留しているという表現は学術的ではないため)。	「生残性」とします。
41		提出 34	重金属については、取り除いた重金属の回収や処理なども含めて、技術システムとしての実施可能性の検討が必要となる。	重金属の回収・除去を目的とした事業の場合、その技術的内容は、「浄化作業計画」中の「浄化作業等の内容(浄化技術の内容、浄化作業の実施方法、保管、運搬等)」の技術システムとして、安全確認の内容が検討されることとなります。具体的な評価は、個別案件審査の中で検討したいと考えています。
42		提出 35	水濁法の特定施設を有するところで、浄化対策を実施する場合の地下水に注入する水の水質について水質汚濁防止法上の規定を適用するか否かについては結論が出ているのか。	本指針のほかに、他法令の遵守は当然であり、水質汚濁防止法上の規制が適用されるのであれば、規制されることとなります。

43	浄化場所	提出 36	本指針の適用はあくまでも原位置浄化の場合か。バイオパイルのような半開放系での処理はどうするのか。ものの出入りを管理できる装置の中は、屋外でのバイオパイルとは微生物や有害物質の拡散を管理するという点でかなりの違いがあると思われる。	本指針の範囲は、開放系で、かつ、バイオオーグメンテーションで実施されるものが対象となります。開放系かどうかの考え方は、カルタヘナ法の定義に準拠するものと考えており、同法によれば、組換え生物の拡散防止措置が講じられているもの(閉鎖系(第二種))以外のものすべてが開放系と定義されています。したがって、ご指摘の手法のものは、利用微生物に対して、特別な拡散防止措置が執られていない場合、すべて開放系の定義になると考えられます。 具体的な事例は、「浄化作業計画」の個別案件審査において、検討されることとなります。
44		提出 37	「開放的利用」、「自然的条件」という表現があいまいである。土壌や地下水を取り出して密閉された装置内で処理するのは対象外になるものと思われるが、バイオパイルなど半開放的な使用はどのように判断するのか。開放度の違いによってリスクが大きく異なるため、上記の点を明確にしておくことが重要である。 また、今回紹介されたバイオオーグメンテーションの例でも、地下水を取り出してから実施した方が安全であり、かつ効率が高いと考えられるにも関わらず、あえて原位置の土壌・地下水中に微生物を投入している事例がある。このような例は事業計画の評価の中でチェックしていくのか。	
45		提出 38	ヒトや生態系への影響は環境条件によって大きく変わってくる。作業環境を特定せずに、想定される利用環境を前提とするのであれば、そのような場所への適用に限定すべきであり、実際に適用する場合に、実際の利用環境の条件が想定した環境と同等であることを確かめることが必要である。	以下の内容についての考え方で良いか。  本指針は、浄化技術の情報及び浄化場所の情報等を収集し、その収集した情報及び浄化作業計画に基づき評価することとなっています。申請は個別サイトへの適用に限定されるものではなく、適用条件を想定した上で全国の汚染地域への適用の申請も可能としています(カルタヘナ法申請の場合も同様)。申請に応じて、個別サイト又は全国で適用可能かどうかの審査がなされることとなり、全国適用の確認の場合は、審査時の内容に適合している限り、どこでも実施が可能ということになります(但し、審査によっては、必要に応じ、条件を付す場合もある)。なお、申請の浄化技術の情報及び浄化場所の情報等の内容と異なる場合は、別の申請が必要になります。
46		提出 39	サイトの特徴を踏まえる必要性については、2段階の審査を考えるとよいのではないかと。第1段階では対象技術の特徴や制約条件にあったサイトがあれば使えるかどうかを評価し、第2段階では個別のサイトごとの条件に照らして本技術の適用が可能かどうかを評価する。統一指針では、個別のサイトごとに評価する1段階の評価となっていると考えてよいのか。すべて個別サイトごとに評価を行うのであればそれでもよいと考える。	
47		提出 40	原位置で行うのではなく、取り出したものをバイオレメディエーションで処理するのであれば、処理物を原位置に戻す場合を除いて、土壌も底質も変わりはないと考えてよいのではないかと。	底質については、本指針の内容が遵守される限り、敢えて除く必要はないと考えているが、現時点では、解決すべき課題も多く実用化にはなおも相当な時間を要することが予想されることから、「土壌、地下水等」の中に含めるといって如何か。なお、底質の原位置処理については、微生物又は添加物等の拡散を少なくする防止措置を図ることができないことから適用はできないと考えます。
48		提出 41	対象場所;自然・・・(土壌、地下水、底質等)、と加筆すべきである。	

49	委員会8	浄化現場近傍の非汚染土壌に関するデータを取得すれば、浄化の目標値の目安になる。人間にとって害のないものというだけでは住民の合意をとるのは困難である。	「作業区域周辺の状況」において、作業区域周辺の非汚染生態系に関する情報の記載を求めているところです。また、浄化の目標値については、浄化作業計画で定めることとしています。(関連として、委員会3及び4等の意見を参照のこと)
50	提出42	対象サイトに複合汚染が見られる場合、注意が必要である。汚染対象有機化合物の分解産物や微生物自身が排泄する有機物が重金属を可溶化し、重金属汚染を拡大する可能性が考えられる。	ご指摘を踏まえ「浄化場所の情報 汚染状況」に複合汚染の状況を記載されるよう、修正します。詳細は、個別案件ごとに審査されることとなります。
51	提出43	作業区域周辺の特徴の中に、保護の対象となるような生物の生息について記載を求めています。	評価の項目として、「作業区域及びその周辺における主要な動植物(人を含む)に対する病原性、毒性の有無」を評価することとしております。ご指摘の保護の対象となるような生物は、主要な動植物に含まれると考えます。
52	提出44	無機成分についても、資料4-3、2 汚染物質の状況に示してあるような情報があるとよい。	無機成分についても、「汚染物質の状況」に含まれていると考えます。
53	提出45	「水理地質」という言葉が資料中に多く見られるが、「水文地質」の方が適切であり、改めるべきである。	ご指摘のとおりとします。
54	生態系に関する影響試験 委員会及び提出46	動物実験で何を見ようとするのかが不明である。毒性を見るのであれば、動物種にさほど左右されずに影響を見ることができると思われるが、感染性、病原性に関しては動物種によって反応が異なる。合同部会での回答は「審査の段階でケースバイケースで考える」ということであり、それで結構であるが、感染性、病原性については上記のように動物実験の結果でヒト、あるいは生息している動物に対する安全性を完全には保証できない、ということを理解しておく必要がある。	本指針での安全性評価は、病原性、感染性及び毒性等といった幅広い範囲での安全性情報の収集によることとなっています。病原性、感染性及び毒性等については、文献検索(検索データベース及び参考文献は別添資料1)を活用して情報を収集することになりますが、既存情報が全くない場合、又は既存情報において疑いのある情報がある場合は、必要に応じ、生態系等への影響試験を実施する必要があります。具体的には、動植物の毒性試験としては、微生物農薬に係る試験方法から選択して、実施するのが適当と考えますが如何か(別添資料2)。また、微生物の生態系への影響試験については、必ずしも最適な試験があるものではありませんが、今までの委員のプレゼン等を取りまとめれば、別添資料3のとおりであり、これらを参考として、試験を行うこととしては如何か。
55	提出47	生態系影響を正確に評価するのは困難であるが、浄化目標を提示することはできる。目標設定には植物の生育や土壌動物への毒性試験など、バイオアッセイを活用すべきである。	
56	提出48	利用微生物に関する既存情報がない場合等、必要に応じて動物試験等を実施するとあるが、水生生物試験では、利用微生物数が多い場合、魚やミジンコ類ではエラに付着し窒息死する可能性があり、また、利用微生物が光を遮ることで藻類の増殖に影響する可能性がある。水生生物試験は利用微生物の影響試験として行う必要がないのではないか。	バイレメで使用する微生物の濃度レベルは、水生生物試験のそれに比して高濃度であり、毒性以外の試験影響を受ける場合があります。経済省では、かつて水生生物試験は、コイへの腹腔内注入試験の結果によって確認したことがあります。上記のとおり、微生物農薬の試験方法を参考にしているものの、バイレメ使用に見合った安全性試験方法について、効率的、かつ、弾力的に変化させていくということは必要と考えますが、如何か。(添付資料2を参照のこと)



57	提出 49	<p>生態系等への影響評価に必要な項目は、農薬微生物の開発にあたってヒトや動植物への安全性を配慮する場合、以下の通りである。</p> <p>ヒトに対する安全性試験成績</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 単回経口投与試験</li> <li>2) 単回経皮投与試験</li> <li>3) 単回経気道投与試験</li> <li>4) 単回静脈内投与試験</li> <li>5) 眼一次刺激性試験</li> <li>6) 皮膚感作性試験</li> <li>7) 細胞培養試験</li> <li>8) 反復投与試験</li> <li>9) 変異原性試験</li> <li>10) 繁殖試験</li> <li>11) ウイルス発がん性試験</li> <li>12) 免疫不全誘起試験</li> <li>13) 霊長類影響試験</li> <li>14) 製造、使用に際して発生した過敏性反応等事例に関する資料</li> </ol> <p>環境生物に対する影響試験成績</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 淡水魚影響試験</li> <li>2) 淡水無脊椎動物影響試験</li> <li>3) 鳥類影響試験</li> <li>4) 植物影響試験</li> <li>5) 標的外昆虫影響試験</li> <li>6) 蜜蜂影響試験</li> <li>7) 蚕影響試験</li> <li>8) 土壌微生物影響試験</li> <li>9) 環境中での動態に関する試験成績</li> </ol>	<p>既存情報が全くない場合、又は既存情報において疑いのある情報がある場合には、必要に応じて動物試験等を実施するとしていますが、その際の具体的な試験方法において、微生物農薬において要求されている試験方法(第1段階のもの)は、本バイレメ指針においても参考となるものと考えております。</p> <p>(添付資料2を参照のこと。)</p>
58	提出 50	<p>既存情報が全くない場合に、どのようにヒトや動植物への影響が否定できないという情報を得るのか。この場合は、全ての情報について、必要に応じて動物実験等を行うのか。</p>	<p>既存情報が全くない場合、又は既存情報において疑いのある場合には、基本的には、事業者がバイレメ事業としての安全性の確保に重要と判断される試験を実施することとなります。また、国へ確認を求めた場合には、必要に応じて動植物試験を要求されることがあります。</p>

59	残留性	提出 51	微生物の生残性に関して、微生物は有機物や栄養塩が枯渇すれば通常自然減衰すると考えられる。元来、土壌中の微生物生態系(微生物相)に関する人間の知識は極めて断片的なものであるため、病原性などが無い菌を使用している限りにおいては、減衰傾向の確認をもって事業完了としてよいと考える。	ご指摘のとおり、バイオオーグメンテーションにおける安全性確認の最も重要なことは、導入した微生物の減衰傾向の確認ではないかと考えています(当然ながら、病原性のない微生物を用いることが前提)。 すなわち、微生物の生残性及び増殖特性に関する情報について、汚染サイト付近又は想定される区域の土壌等を用いた実験系において環境条件を設定して確認し、また、微生物の生存、増殖を制限する条件(湿度、pH、温度等)について、当該区域付近等の土壌等を用いた実験系において情報を収集し、その情報をもって、評価することが重要と考えます。(関連として、委員会17～21を参照のこと)
60		提出 52	「微生物の残留性」を「微生物の生残性」ないしは「微生物の生存性」とすべきである(生物が残留するという表現は学術的ではないため)。	ご指摘のとおりとします。
61		提出 53	第5 生態系等への影響評価の考え方 評価の項目の中で「利用微生物が利用終了後に増殖する可能性」とあるが、非遺伝子組換え体であっても輸入されたものについては慎重な検討が必要ではないか。「利用終了後に不活化すること」が必要とすべきではないか。	本指針では、利用微生物毎の特性の評価を実施し、その情報を踏まえ、利用可能な微生物について適切な管理のもとに使用するものであることから、国内と輸入微生物について異なる基準を設ける必要はないと考えています。また、微生物の利用終了後においては、「浄化作業の終了において、利用微生物が作業終了後に増殖、又は高濃度に残留しないこと」の基準の確認をもって、終了できることとしています。
62		提出 54	「利用終了後に…」とあるが、具体的な期間を示すことができないので分かりにくい。「作業終了後に…」としてはどうか。	ご指摘のとおりとします。

63	分解生成物	委員会9	分解生成物等も含めて、地下水汚染が生じないか等の環境安全性が十分に担保されているかについて考えておく必要があるのではないか。また、人間の活動によって土壤中で動かなくなっていた重金属が溶出してくるのも心配。	<p>対象物質が完全に無害に分解されずに、予想される分解生成物又は中間生成物がある場合については、その名称、物理化学的性質、及び生態系等への有害な影響等について、情報を収集する必要があります。また、作業区域及びその周辺への残留性並びに作業区域外への拡散の可能性について具体的に記入する必要があります。</p> <p>この情報をもって、分解生成物が残存される結果、生態系等への許容できない影響について推定されるものを評価します。</p> <p>なお、本指針とは別に、土壤汚染対策法、水質汚濁防止法、化審法等の関係する法令を遵守する必要があることは当然です。</p> <p>(分解生成物のモニタリングについては、後述(委員会17～)。) (拡散防止については、前述(提出18～)。)</p>	
64		委員会10	ビニルクロライドのような中間生成物が生成するのであればバイレメを認めないのか、最終的には消滅してあるレベル以下になればよいと判断するということが良いのではないか。		
65		委員会11	フィールドでのバイオレメディエーションにおいては中間生成物も含めて環境中に放出される。特に、地下水のような媒体については、中間生成物の安全性を十分に検討する必要がある。		
66		委員会12	有機塩素系化合物の分解過程では中間生成物としてビニルクロライドが生成するが、時間が経過すれば分解する。浄化途中のモニタリングを適切に実施すれば最終的にはフォローできるのではないか。		
67		提出55	分解生成物については、その移動性、すなわち、分解生成物の発生状況(飽和層か不飽和層か)、サイトの地質状況(透水性など)により評価が変わる。		
68		提出56	分解生成物あるいは分解経路、と加筆すべきである。		ご指摘のとおりとします。
69		提出57	バイオスティミレーションで問題となる分解生成物や添加物の拡散の問題はどのように扱うのか。この指針とは別途、指針を策定するのか。あるいは既に環境省が作成している指針を適用するのか。		本指針の対象外であるが、分解生成物及び添加物に関する規定は、バイオスティミュレーションも同様な遵守が望まれるものであり、事業者において、本規定にのっとって管理されるべきと考えます。

70	添加栄養分	提出 58	微生物そのものの添加の影響よりも栄養分添加の影響の方が、実は遙かに大きい場合がしばしばあるのではないかと思われる。指針案は従来の経済省・環境省の指針と比べてかなりあいまいな内容となっている。「少なくとも浄化作業区域外においては「利用中にも」生態系の基盤等に有為な影響を与えないこと。」等の記述を加えたらどうか。	<p>以下の内容についての考え方でどうか。</p> <p>微生物と同時に導入する添加剤が残存する場合は、添加剤の名称(CAS番号)、導入の目的、物理化学的性状、安全性(分解性等)、導入量、導入濃度・頻度を情報として記載する必要があります。更に、環境基準などの規制値に関する情報があれば併記することとなります。</p> <p>二次汚染(人や生態系への許容できない影響)の可能性のある物質を用いる場合には、有害性、残存性及び作業区域での拡散性について記載することになります。更に二次汚染を未然に防ぐための対策について具体的に記載することとなります。</p> <p>この情報をもって、残存される結果、生態系等への許容できない影響について推定されるものを評価することとなります。 この点が明確になるよう、修正します。</p> <p>なお、土壤汚染防止対策法、化学物質審査規制法、水質汚染防止法等他法令の遵守は当然です。</p> <p>(添加栄養分等のモニタリングについては後述。)</p>
71		提出 59	界面活性を有する物質は有機汚染物質の拡散を促進し、また錯生成能を有する有機物の併用は金属の移動を促進するため、N,Pなどの栄養塩以外の物質による二次汚染の可能性も検討対象とすべきである。	
72		提出 60	直接的ではなく、間接的に生態系の基盤である土壤環境に影響を及ぼすものも含めるべきである。(栄養物質等の生態系への影響だけでなく、栄養物質等そのものの毒性や土壤の条件を変化させて土壤中に含まれる有害成分の溶出を促進するおそれなども評価する必要がある。)	
73		提出 61	添加栄養分等については、単に何を用いるかだけではなく、有害性、法規制の状況、副次的な影響等の情報を合わせて収集する必要がある。	
74		提出 62	栄養物質等の中には、化審法等の審査を考えずに使われている例が多い。化審法、化管法、その他の排出規制などでどのような扱いになっているかを記載させる必要がある。土壤中の無機成分は、pHや酸化還元状態など、現場の地質学的特性によって溶出特性が大きく変化する。添加物質によってこの条件が変化することにも留意する必要がある。	
75		提出 63	土壤中の無機成分は、pHや酸化還元状態など、現場の地質学的特性によって溶出特性が大きく変化する。このような条件を変化させる物質を添加する場合には、土壤中に含まれる、無機成分の状況についての情報も必要となる。また、現場に存在する土着微生物の状況でも分解生成物の分解特性が変わってくる可能性がある。	
76		提出 64	添加栄養分等については、単に何を用いるかだけではなく、有害性、法規制の状況、副次的な影響等の情報を合わせて収集する必要がある。	

77	提出 65	バイオオーギュメンテーションを対象とするのには賛成である。ただし、バイオスティミュレーションについての取り扱いについて記載する必要があると考える。バイオスティミュレーションにおいて、土壌・地下水中に注入される薬剤には、化審法などの審査を経ず、安全性のチェックを受けないまま使用されている例もあるなど、生態系および人の影響の評価が十分でない場合も考えられる。バイオスティミュレーションに関する上記のような事項については、従来の指針・ガイドラインを適用するのであれば、そのことを明記しておく必要がある。	本指針の対象外であるが、添加物に関する規定は、バイオスティミュレーションも同様な遵守が望まれるものであり、事業者において、本規定にのっとって管理されるべきと考えます。	
78	委員会 13	添加物として、少量のフェノールを注入することが可能であるかどうかについて検討していただきたい。	開放系で行われるバイレメ事業として、できる限り適切な添加物が選定されるべきであり、有害性又は分解性が遅い等の情報が存在する化学物質は、適切な使用量の考慮、若しくはその使用を差し控えるべきであると考えが如何か。	
79	委員会 14	環境基準値未満のフェノールであれば規制されるものではないかもしれないが、その行為について住民の同意を得ることは困難である。		
80	緊急対応	委員会 15	微生物の場合、同定した株を特許菌として寄託した場合は、寄託機関名及び登録番号を記入することとなります。また、公認されている株から変異株を得ている場合は、その方法と親株との同異点を記入し、その試験結果等に基づく根拠を示す必要があります。	
81		委員会 16		浄化期間中は、汚染現場に当該菌が生息しており、菌を寄託するといった制度は必要ないのではないか。
82		提出 66		既知の微生物であっても研究の進展によって危険性が新たに分かることもあり、科学的な知見によって安全性を合理的に判断することは難しい。新しい知見が得られた段階で、野外使用の禁止措置がとれるようにしてほしい。

83	事業期間及びモニタリング	委員会17	作業中だけでなく、事後のモニタリングを含めるべきである。科学的知見に基づいて、これで安全だと評価できることは難しいのであるから、ポイントごとのモニタリング実施は、住民への説明責任からも重要。	<p>以下の内容についての考え方でどうか。</p> <p>事業期間は、浄化作業の準備から始まり、浄化目標達成した浄化作業終了までの期間及びその後のモニタリングまでを含んだ期間をいいます。</p> <p>終了方法は、浄化対象物質の濃度、利用微生物の生残数及び栄養添加剤を導入した場合は、その濃度等に関して、終了の条件となる基準とその根拠を示すことにより、その基準を達成できた場合に事業終了することとなります。なお、この点が明確になるよう、修正します。</p> <p>モニタリングについては、事業形態により最適な方法を採用すべきであり、画一的なものではないことに留意する必要があると考えます。(例えば、微生物の変化であれば、土壌中微生物の生態系(一般細菌数、放線菌数、糸状菌数、大腸菌群数等)を対象とし、微生物数の計測管理によって実施するなど)</p> <p>モニタリングの結果、万が一予期していなかった許容できない有害な影響が確認され、経済産業大臣及び環境大臣の確認を受けている場合には、速やかに経済産業大臣及び環境大臣に報告し、必要に応じて適切な対応をとることとなります。</p> <p>(事業終了に関しては、前述(提出53)を参照のこと。)</p>	
84		委員会18	どの時点で事業完了とするかを定めるべきである。汚染物質があるレベル以下になったところで浄化事業としては終了しており、その後微生物が増殖することはないのではないか。		
85		委員会19	実際の土壌汚染においては、土地の売却等を踏まえて事業者は浄化作業に着手する。従って、モニタリング期間を明確にしなければ浄化に踏み切れない。		
86		委員会20	土壌汚染対策法には汚染物質濃度に関するモニタリング期間は定められているが、微生物生態を含めたモニタリング期間については定められていない。		
87		提出67	「計画書に定めた期間」というのは、どこまでを指すのか。地下水環境基準が達成されるまでか。汚染状況の監視におけるモニタリングと浄化対策に係るモニタリングの関係を整理する必要がある。		
88		提出68	「利用終了後に…」とあるが、具体的な期間を示すことができないので分かりにくい。「作業終了後に…」としてはどうか。		
89		委員会21	不溶化されていた汚染物質が人為的活動により再溶出するといったモニタリング項目を加えるべきである。		
90		地域の理解	委員会22		地域住民等への説明において、「必要に応じ」とは、どのようなタイミングを指すのか。
91			提出69		バイオオーグメンテーションは、汚染物質の分解機能を持つ遺伝子が水平伝播をしてその土壌の多くのバクテリアにとりこまれることが、土壌における特定の汚染物質を分解するのに成功したメカニズムと考える立場もある。従って、遺伝子組換え生物ではなくとも汚染物質分解に係る遺伝子が伝播することはおそらく事実であり、技術の適用にあたって住民を含めて周知すべきである。

92	その他	提出 70	バイオレメディエーション、バイオスティミュレーション、バイオオーグメンテーションという用語は一般には理解しがたい用語であり、ガイドラインを定める際に、英語に対応する日本語の用語を定めるべきである。	ご指摘を踏まえ、修正します。
93		提出 71	資料3について<加筆・修正> ・バイオレメディエーション事業の意義 1. 環境修復…化学的手法及び生物機能を活用した生物学的手法が存在するが、その中において、特に…投入エネルギーが少なく、多様な汚染物質への適用の可能性や一般的に浄化コスト… 2. 特に、…、今後は油類や分解が遅い化学物質の浄化について、…。 …進める上で、 <u>微生物導入に伴う安全の確保</u> …	ご指摘を踏まえ、修正します。
94		提出 72	P4 浄化技術に関する情報：微生物を利用微生物と明記することが望ましい。 P10 11行目 生態系に対する影響の本文：「生態系に対する影響の有無」を「利用の場における生態系に対する影響の有無」とすることが望ましい。	「微生物の挙動等」を「利用微生物の挙動」とし、本文も同様に修正します。  本指針は、「利用の場における微生物の挙動」の場合のほか、想定される代表的な土壌をいくつか選択して、全国の工場等に使用することが可能なような申請方法も認めているため、「利用微生物の挙動」と修正します
95		提出 73	P10 下から10行目 微生物の挙動：「微生物の挙動」を「利用の場における微生物の挙動」とすることが望ましい。	
96		提出 74	P10 下から4行目 栄養物質等：残留性や影響について配慮すべき栄養物質等を使用する場合には、残留性や影響に関する記述が望まれる。	ご指摘を踏まえ、修正します。また、評価の項目において、「浄化に当たって栄養物質等を添加する場合は、作業終了後の当該物質による生態系への有意な影響」を評価することになります。
97		提出 75	その他 申請をどちらの省にすべきかの仕分けが考慮されていない。	申請書の提出先については、告示の制定時に決定しますが、一方に提出されればもう一方にも情報が送付される仕組みとし、事業者にとって過度の負担とならないよう配慮したいと考ます。
98		提出 76	バイオレメディエーションは技術としてまだ開発段階であり、また生態系影響について十分な研究例があるとは思われない。公的機関による生態系影響評価の研究が必要である。	今後の検討課題と考えます。

99	提出 77	第5. . 1. 「自然環境における分布状況」については多くの場合調べるのは困難と思われるので、「分離源」とすべき。	ご指摘のとおりとします。
100	提出 78	第5. . 1. の捕食性又は寄生性・繁殖又は増殖の様式は細菌の場合は不必要。	微生物に限定したことから、補食性は削除し、「寄生性又は共生性」とする。また、「繁殖又は増殖の様式」は、細菌の場合は、ほとんどが細胞分裂ということとなりますが、胞子を形成する菌等もバイレメに使用することもあり得るため、必要と考えました。
101	提出 79	第5. . 1. の病原性、毒性(ヒト及び動植物等に対する影響)の動植物等の前に「主要」を加える。	ご指摘のとおりとします。
102	提出 80	第5. . 1. の記載は不要。既存情報により評価が困難な場合には実施せざるを得ないため。	ご指摘のとおりであるが、実際に試験が必要な場合を明確にするために記載したものです。
103	提出 81	第5. . 2. 微生物の挙動等 「土着性」、「自然生息域と作業区域の生息環境の比較、選択圧」については多くの場合評価が困難であるため削除。 「拡散の特性」は微生物にとって意味がないので削除。 「残留性」については、独立の項目とはせず、生存・増殖能力、残留性とすべき。	安全な微生物情報を収集し、効果的な防止措置を講ずることによって、より安全性の高い管理が可能となると考えます。 残留性は、生残性とし、生存・増殖能力と同じ項目とします。
104	提出 82	第5. . 3. ・生息する主要な動植物 「感受性」については、科学的な意味が明確でないので、「病原性・毒性等」にすべき。	ご指摘のとおりとします。
105	提出 83	第5. . 4～6については安全性評価に関する直接的な情報とは言い難いため不必要	安全性を評価するための貴重な情報になり得ると考えます。
106	提出 84	第5. . 「微生物群集の組成変化(他の微生物を減少させる性質)」については、どの程度の情報が必要か不明なので削除	別途、生態系への影響試験方法において、記載することとします。
107	提出 85	第5. . 「必要に応じ、作業区域外への影響に配慮した措置。」は何を求めているのか具体性がない。	地下水脈による利用微生物及び添加物質の拡散や、土壌の流失等の可能性のある場合には、それらを防止するために、戸板等でせき止める等の措置が必要となります。詳細は、解説書で明記します。



108	提出 86	第5. 「浄化に当たって栄養物質等を添加する場合は、終了後の当該物質による生態系への有意な影響。」は窒素、リンの場合は農業での使用の程度以上の場合にすべき。	解説書で明記します。
109	提出 87	第5. 「浄化作業の実施に係る生態系等への影響の防止の措置が講じられていること。」については、安全性が評価された微生物を用いる場合は不要	安全な微生物を使用し、効果的な防止措置を講ずることによって、より安全性の高い管理が可能と考えます。
110	提出 88	第5. 「偶発的事故発生時」とは具体的にどのような事故を想定するのか不明である。	天災等も含め、微生物が生態系等へ直接的に拡散する場合等があると考えます。
111	提出 89	第6 「利用微生物の特性又は当該計画の内容及び方法に応じ実験室内での使用等又は浄化作業が予定されている環境と類似の環境での使用等することにより、生態系等への影響を評価するための情報が得られていること。」については、生態系への影響を実験室又は類似の環境で評価することはほぼ不可能(特に動植物も含めた場合)なので削除	実験室での生態系への影響試験は、当然ながら、完全なものではありませんが、ひとつの評価すべき貴重な情報になると考えます。
112	提出 90	第6 「生態系等への影響の効果的な防止に資する措置が確実に講じられるものであること。」は、生態系への影響はない安全な微生物を利用することを前提としていることから不要	安全な微生物を使用し、効果的な防止措置を講ずることによって、より安全性の高い管理が可能となると考えます。
113	提出 91	第7 「さらに、事業所または浄化実施機関に、生産業務等安全・環境管理委員会を設置する。」は委員会の具体的な役割責任が不明である。	解説書等で明記することとします。

## 利用微生物等の「病原性」の調査要領について(案)

生態系等への影響評価に必要な情報のうち、利用微生物の「病原性、毒性(人及び主要な動植物等に対する影響)」については、利用微生物又は利用微生物が分類された属又は種の病原性の有無及びその根拠を記述し、病原性が知られている場合には、その内容等を記載し、必要に応じて関連資料を添付します。この病原性有無の調査にあたっては、申請事業者自らが扱う微生物の種類に応じて、種々の文献を選定して調査し、有無の判断をしていただくことが基本ですが、例を示せば、病原性細菌であるかどうかの判断は、次に掲げるようなリスト及び文献のとおりです。

### ・ 第1次検索調査

以下のような病原性細菌名に基づく検索公開リストを参照していただき、多面的に病原性の有無の確認をされるよう努めてください。その際どのようなデータベース等に基づいたのか、その根拠を併記してください。

- ・国立感染症研究所 病原体等安全管理規定(平成11年4月)別表1付表1,付表2、同 研究所ホームページ(<http://www.nih.go.jp/niid/index.html>)
- ・日本細菌学会バイオセーフティー指針(<http://wwwsoc.nii.ac.jp/jsb/biosafety/CONTENTS.HTM>、<http://wwwsoc.nii.ac.jp/jsb/biosafety/FUHYO1.HTM>、<http://wwwsoc.nii.ac.jp/jsb/biosafety/FUHYO2.HTM>)
- ・文部科学省 組換え DNA 実験指針(平成14年1月)別表2、別表3(このリストは組換え体を前提としたリストです)
- ・農林水産省 動物検疫所(<http://www.maff-aqs.go.jp/>、[http://www.maff-aqs.go.jp/tetuzuki/index\\_4.htm](http://www.maff-aqs.go.jp/tetuzuki/index_4.htm))
- ・DSMZ(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) Bacterial Nomenclature Up-to-date(<http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>)

### ・ 第2次検索調査(上記の検索において病原性が有ると疑われる場合)

第1次検索調査等において、利用微生物又は利用微生物の属または種に病原性が有ると確認された場合は、次に示すような文献検索等により関連資料を収集してください。必要に応じ、該当部分を下線等で明示した後、別添として提出してください。

### 文献検索

- ・Medline ゲートウェイ(<http://www.healthy.pair.com/>)(無料)

**MEDLINE** は NLM(National Library of Medicine) が提供する医、歯、薬、獣医関連文献の索引・抄録を電子化した

世界最大のデータベースです。

- ・NCBI National Library of Medicine (医学、生物科学全般) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>) (無料)

**PubMed** は NLM 内の NCBI (National Center for Biotechnology Information) が試験的に提供する MEDLINE など文献抄録データベースの検索サービスです。

- ・科学技術振興機構 (JST, JOIS) (自然科学工学全般) (<http://pr.jst.go.jp/db/db.html>) (有料)

**JMEDICINE** は (JST) 主催の国内の医薬関連文献データベースです。WEB では **Enjoy Jois** としてさまざまな DB の一つとして有料で提供されています。

- ・ICI Current Contents connect (<http://connect.isihost.com/>) (有料)

更に、以下のような専門の参考文献がありますので参照ください。

- ・日本植物病害大事典 岸 国平 (編集) 全国農村教育協会 (1999)
- ・植物病理学事典 日本植物病理学会 (編集) 養賢堂 (1995)
- ・魚病学概論 室賀 清邦, 江草 周三 (編集) 恒星社厚生閣 (1996)
- ・魚病学 畑井喜司雄, 宗宮弘明, 渡邊翼 (共著) 学窓社 (1998)
- ・天敵微生物の研究手法 植物防疫特別増刊号 (No.2) 日本植物防疫協会 (1993)
- ・Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2) David R. Boone, George Garrity (著) Springer Verlag 2巻 (2004)
- ・The Desk Encyclopedia of Microbiology, M. Schaechter (著) Academic Press (2003)
- ・Manual of Clinical Microbiology, 8th Ed. Patrick R. Murray, 他(編集) American Society for Microbiology (2003)
- ・Fields Virology 4th Ed. (Two volume set with CD-ROM), Bernard N. Fields, 他(編集) Lippincott Williams & Wilkins (2001)

## バイオレメディエーションにおける試験方法（案）

バイオレメディエーションのうち、バイオオーグメンテーションを実施する際は、生態系等への影響評価の情報が必要となりますが、既存情報が全くない場合、又は既存情報において疑いのある場合には、必要に応じて動植物試験を実施する必要があります。

以下の試験方法は、微生物農薬の試験方法の安全性評価要求項目のうち、第一段階試験として位置付けられているものです。

この試験方法を基に、事業者において、バイオレメディエーション目的の安全性試験として、必要と判断される試験方法を選択して実施してください。

### ・動植物試験方法（微生物農薬試験（第一段階のもの））

#### ヒトに対する安全性試験成績

- 1) 単回経口投与試験
- 2) 単回経皮投与試験
- 3) 単回経気道投与試験
- 4) 単回静脈内投与試験
- 5) 眼一次刺激性試験
- 6) 皮膚感作性試験
- 7) 細胞培養試験

#### 環境生物に対する影響試験成績

- 1) 淡水魚影響試験
- 2) 淡水無脊椎動物影響試験
- 3) 鳥類影響試験
- 4) 植物影響試験
- 5) 標的外昆虫影響試験
- 6) 蜜蜂影響試験
- 7) 蚕影響試験
- 8) 土壌微生物影響試験
- 9) 環境中での動態に関する試験成績

上記の試験は、G L P制度にのっとり試験成績結果でなくとも良いこととします。

### ・バイオレメディエーション目的の適切な安全性試験手法

本指針においては、バイオレメディエーションの使用に見合った安全性試験方法として、事業者への過度な負担を避けるという観点から、効率的、かつ、弾力的な運用を図っていくことが必要と考えられ、事業者において、根拠を示すことにより、試験項目の一部省略や適切な試験方法に修正することも可能とします。

（例）・マウス等の試験等において、全頭の解剖試験の一部を省略。

- ・微生物の濃度レベルは、一般の水生生物試験のそれに比して高濃度で毒性以外の試験影響を受ける場合があるため、水生生物試験における腹腔内注入試験に修正。

## (参 考)

微生物農薬の登録申請に係る安全性評価に関する試験成績の取扱いについて(抜粋)  
(平成9年8月29日付け9農産第5090号農林水産省農産園芸局長通知)

## 8 土壤微生物影響試験

### (1) 目的

微生物農薬が土壤微生物(細菌、放線菌、真菌)に及ぼす影響を評価するために、高濃度の農薬微生物を土壤に混和し、土壤微生物に対する影響を調べる。

微生物の生物学的性質により科学的な根拠がある場合及び微生物農薬の使用方法から土壤微生物に暴露の可能性がない場合には当該試験を省略することがある。

なお、必要に応じ土壤微生物の炭素代謝、窒素代謝に関する農薬微生物の影響を調べる。

### (2) 試験方法

ア 被験試料：原体

イ 試験土壤

水田で用いるものについては水田状態の土壤を、畑地等で用いるものについては畑地土壤を用いる。また、試験に当たっては1m×1m程度の大きさの隔離、管理された施設を用いる。

ウ 試験区構成

対照区：無添加区

処理区：単位面積当たりの施用量の10倍量を土壤に混和する。混和深は20cmとする。

なお、上記施用量での実験で影響が認められた場合は、影響を生じる農薬微生物の用量を明らかにするため用量-反応試験を実施する。

試験は3反復で実施する。

エ 試験期間

原則として3カ月間とする。

オ 土壤の採取

1試験区4箇所以上から土壤を採土管(径4cm×深4cm程度)等を用いて採取し、よく混合する。採取時期は、原則として1日、10日、30日、90日後とする。

カ 検査項目

採取した土壤中の細菌、放線菌、真菌について、それぞれの菌数を測定する。なお、菌数の測定には、菌の種類に応じて選択性、感度及び信頼性の高い方法を用いる。

### (3) 結果の整理

検査項目に沿って成績を整理する。また影響が認められた場合は最大無作用量を求める。

### (4) 次の試験への進行

の1の(4)に準ずる。

## 生態系への影響(微生物群の変化)試験方法及び バイレメに導入する複合微生物の同定試験方法(案)について

導入する微生物が複合菌の場合は同定試験を実施する必要があります。また、生態系への影響試験については、それぞれの作業区域の特徴に応じて、その生態系の指標となる微生物群を選定して、その微生物群の組成変化についての評価が必要です。微生物群の試験方法としては、次のような方法が代表的なものとして挙げられます。

### I. 培養による微生物の検出

#### 希釈平板法、最確数法を用いた一般細菌、放線菌、糸状菌、大腸菌の微生物数の計測

- ・一般細菌数；希釈平板法(標準寒天培地)・・・JIS K0101 63.2
- ・放線菌数；希釈平板法(酵母エキス・デンプン寒天培地)・・・土壤微生物実験法(養賢堂)
- ・糸状菌数；希釈平板法(ローズベンガル寒天培地)・・・土壤微生物実験法(養賢堂)
- ・大腸菌群数；最確数法(BGLB 培地法)・・・JIS K0101 63.4

これらの方法は古典的な培養法であり、培養が可能な微生物のみが検出されるものです。したがって、得られる微生物群集に関する情報は断片的なものとなります。これまでに土壤中に含まれる微生物の中で培養可能な微生物はわずかであるという知見が得られているため、必要に応じて、以下の方法などによって土壤中に含まれる微生物相の変動についての詳細な情報を得ることが必要です。

なお、「微生物農薬の登録申請に係る安全性評価に起案する試験成績の取扱いについて」中に「8 土壤微生物影響試験」があり、この試験方法において、微生物農薬が土壤微生物(細菌、放線菌、真菌)に及ぼす影響を評価することとなっている(詳細は、別添資料3を参照のこと)。

### II. 培養を要しない微生物の検出

#### 16S rDNA-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 法

この方法は土壤中の微生物の 16S リボソーム RNA 遺伝子を標的として電気泳動パターンから微生物構造の分布を解析する方法です。具体的には、土壤試料から DNA を抽出した後に PCR によって 16S rDNA を増幅し、ウレア濃度勾配を持つポリアクリルアミドゲル中で電気泳動を行い、現れたバンドのパターンによって微生物群集構造の変化を評価します(Muyzer, G. *et al. Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 695-700(1993))。作業区域の土壤試料をバイオレメディエーション作業以前の土壤試料又は作業区域周辺の土壤試料と比較することで、微生物相の構造を比較することができます。また、経時的に土壤のサンプリングを行うことによって時間経過による微生物相の変化を解析することができます。さらに、電気泳動のバンドを切り出し配列を決定することによって、土壤中に含まれる微生物の同定や検出に用いることもできます。

### T-RFLP(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)法

この方法は 16S リボソーム RNA 遺伝子を標的としてクロマトグラフィーによって分析し、微生物構造を解析する方法です。具体的には、rRNA 遺伝子などを 5 末端を蛍光標識されたプライマーを用いて PCR によって増幅し、PCR 産物の制限酵素処理で得られた末端断片を分析します。DGGE 法と同様に微生物相の構造の比較や、経時変化の解析を行うことができます。(Liu W.-T. *et al. Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4516-4522 (1997) )

### キノプロファイル法

キノンは呼吸鎖や電子伝達系に関わる成分であり、微生物界に広く分布します。キノプロファイル法はキノンを化学マーカーとして使用し、土壤に含まれるキノンの分子種の多様性を分析することによって微生物群の分布を解析する方法です。

### 生態系等への影響評価について

バイオレメディエーションを行うことによって土壤に含まれる有害物質が浄化された結果、作業以前とは異なる微生物分布となる場合があると考えられます。また、作業区域の微生物分布が作業区域周辺と同一とはならない場合もあり得ると考えられます。したがって、評価のポイントとしては作業に用いた利用微生物の異常な増加がなく、他の微生物の異常な減少がないことを確認し、作業区域及び土壤の特徴等のその他の情報も活用し、総合的に判断することが重要です。