

**微生物によるバイオレメディエーション
利用指針の解説**

平成 1 7 年 7 月

経済産業省製造産業局生物化学産業課
環境省環境管理局総務課環境管理技術室

微生物によるバイオレメディエーション利用指針の解説

目 次

はじめに	1
. 利用指針の概要	2
. 利用指針の解説及び確認申請に当たっての注意事項	8
第一章 総則	
第一 趣旨及び目的	9
第二 用語の定義	10
第三 指針の対象	14
第二章 浄化事業計画の作成	18
第三章 生態系等への影響評価の実施	27
第一 生態系等への影響評価に必要な情報	28
第二 生態系等への影響評価の項目及び実施方法	46
第四章 浄化事業の実施及び終了	50
第一 浄化事業の実施	50
第二 モニタリング	50
第三 浄化事業の終了	51
第五章 経済産業大臣及び環境大臣による確認	52
第六章 留意事項	54
第一 緊急時の対応及び事故対策	54
第二 安全管理体制の整備	54
第三 記録等の保管	57
第四 バイオスティミュレーションの扱い	58
第五 周辺住民への情報の提供	58

第六 指針の見直し	59
. 確認申請様式	68
. 参考資料	79
. 微生物によるバイオレメディエーション利用指針（告示）	80
. 微生物によるバイオレメディエーション利用指針について（報告）	91
. 微生物によるバイオレメディエーション利用指針連絡先	111

（資料の見方）

．利用指針の概要

全体概要を理解する際に、ご利用頂きたい。

．利用指針の解説及び確認申請に当たっての注意事項

本解説書は、本指針で説明が不足している点、理解しにくい用語等を補うための必要な項目について解説を行うとともに、国への確認申請を行うに当たって、申請の要領及び注意事項を加え、編集したものである。

確認申請の要領に関わるものは、文章の書き出しに を記したので、その目的で使用する際は、当該部分について、特に注意して読んで頂きたい。

．確認申請様式

当該申請書は、文章の長さによって、適宜、枠を広げて使用頂きたい。また、図・表、参考文献及び長文は、別添として記載頂きたい。経済産業省及び環境省ホームページにおいて、電子媒体でも提供していく予定。

．参 考

微生物によるバイオレメディエーション利用指針（告示）

微生物によるバイオレメディエーション利用指針について（報告）

はじめに

経済産業省及び環境省は、本年3月30日に、「微生物によるバイオレメディエーション利用指針（以下、指針）」を告示しました。

微生物によるバイオレメディエーションについて、これまで我が国においては、平成10年5月に通商産業省（当時）が「組換えDNA技術工業化指針」の改訂を行い、生物的環境修復等の開放系利用を指針の対象に加え、その中で微生物等についても、「当分の間、本指針を準用する」とし、また、平成11年3月に、環境庁（当時）が揮発性有機化合物による地下水汚染に対して微生物を利用して浄化する際の環境への影響を防止するため、「微生物を用いた環境浄化の実施に伴う環境影響の防止のための指針」を策定し、安全性に係る指針が並立して存在していました。

本指針は、このような状況を踏まえ、産業構造審議会化学・バイオ部会組換えDNA技術小委員会開放系利用技術指針作成ワーキンググループ及び中央環境審議会水環境・土壌農薬合同部会バイオレメディエーション小委員会（以下、合同会合）における議論・報告を受けて両省共同の指針として策定されたものです。その内容は、微生物を利用するバイオレメディエーションの中でも特に、バイオオーグメンテーションを実施する際の安全性の確保に万全を期すために、生態系への影響及び人への健康影響に配慮した適正な安全性評価手法及び管理手法等のための基本的要件の新たな考え方を示したものです。

本資料は、バイオレメディエーションを実施する事業者向けに、指針の内容について詳細を解説したものであり、経済産業省製造産業局生物化学産業課及び環境省環境管理局総務課環境管理技術室が共同して作成したものです。

本資料では、本指針で説明が不足している点や理解しにくい用語等を補うために、合同会合における議論の内容、パブリックコメントの意見・回答並びに経済産業省（旧通商産業省）において運用されてきた組換えDNA技術工業化指針に係る「組換えDNA技術工業化指針の解説（（財）バイオインダストリー協会編集、通商産業省生物化学産業課監修、平成12年5月）及び環境省（旧環境庁）における指針等参考となる規定類等の資料をもとにして、本指針の告示文に従い逐条的に記述し、わかりやすく解説しました。

今後、必要に応じて追加及び修正があり得ることを前提に、参考にして頂ければ幸いです。

なお、本資料は、合同会合の各委員の専門的知見及び協力を頂きながら作成したものです。

. 利 用 指 針 の 概 要

微生物によるバイオレメディエーション利用指針（告示）の策定に

ついて

経済産業省及び環境省は、3月30日、両省共同で、「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」を告示しました。

本指針は、バイオレメディエーション事業の一層の健全な発展と、バイオレメディエーションの利用の拡大を通じた環境保全に資することを目的として、微生物の働きを利用して汚染物質を分解等することにより土壌、地下水等の汚染の浄化を図る際の安全性評価手法及び管理手法のための基本的要件の考え方を示したものです。

1. 経緯

(1) 通商産業省（当時）は、平成10年5月に、遺伝子組換え生物における産業利用の際の安全性評価・管理のための「組換えDNA技術工業化指針」を改訂し、同指針に微生物によるバイオレメディエーションに関する事項を追加しました。

一方、環境庁（当時）は、平成11年3月に、「微生物を用いた環境浄化の実施に伴う環境影響の防止のための指針」を策定しました。

(2) 安全性に係る指針が並立して存在していることから、平成14年12月にBT戦略会議において策定された「バイオテクノロジー戦略大綱」において、一元化を含めた制度の検討を行う必要性が指摘されました。

(3) 産業構造審議会開放系利用技術指針作成ワーキンググループ及び中央環境審議会バイオレメディエーション小委員会の合同審議により、両指針の一元化を目指した検討を行い、本年2月、「微生物によるバイオレメディエーション利用指針について（報告）」がとりまとめられました。

(4) 本指針は、上記報告の内容に基づき策定したものです。

2. 指針策定の必要性

(1) 微生物によるバイオレメディエーションは、微生物の働きを利用して汚染物質を分解等することにより、土壌、地下水等の環境汚染の浄化を図る技術です。

(2) 微生物によるバイオレメディエーションの中でも特に、バイオオーグメンテーション手法に関しては、外部で培養した微生物を意図的に土壌中等に導入すること、かつ、その事業を行う者にとって安全性評価の経験が浅く、その統一

された評価手法が存在していないことから、当該事業を実施する上で、生態系への影響及び人への健康影響（以下、「生態系等への影響」という。）に配慮した適正な安全性評価手法及び管理手法のための基本的要件の考え方（指針）を示すことが必要です。

- (3) 事業者が本指針を活用することによって、バイオレメディエーション事業の一層の健全な発展と、バイオレメディエーションの利用の拡大を通じた一層の環境保全が図られることが期待されます。

3．指針の内容

(1) 浄化事業計画の作成

事業者は、浄化事業の実施に当たって、あらかじめ浄化事業の内容及び方法を盛り込んだ「浄化事業計画」を策定することとします。

(2) 生態系等への影響評価の実施

事業者は、浄化事業の実施に当たって、あらかじめ必要な情報を収集して、科学的かつ適正な生態系等への影響評価を実施し、その結果を記載した「生態系等への影響評価書」を策定することとします。

(3) 浄化事業の実施

事業者は、生態系等への影響評価を踏まえた浄化事業計画に従って、適切な安全管理のもとに浄化事業を実施することとします。

(4) 国による確認

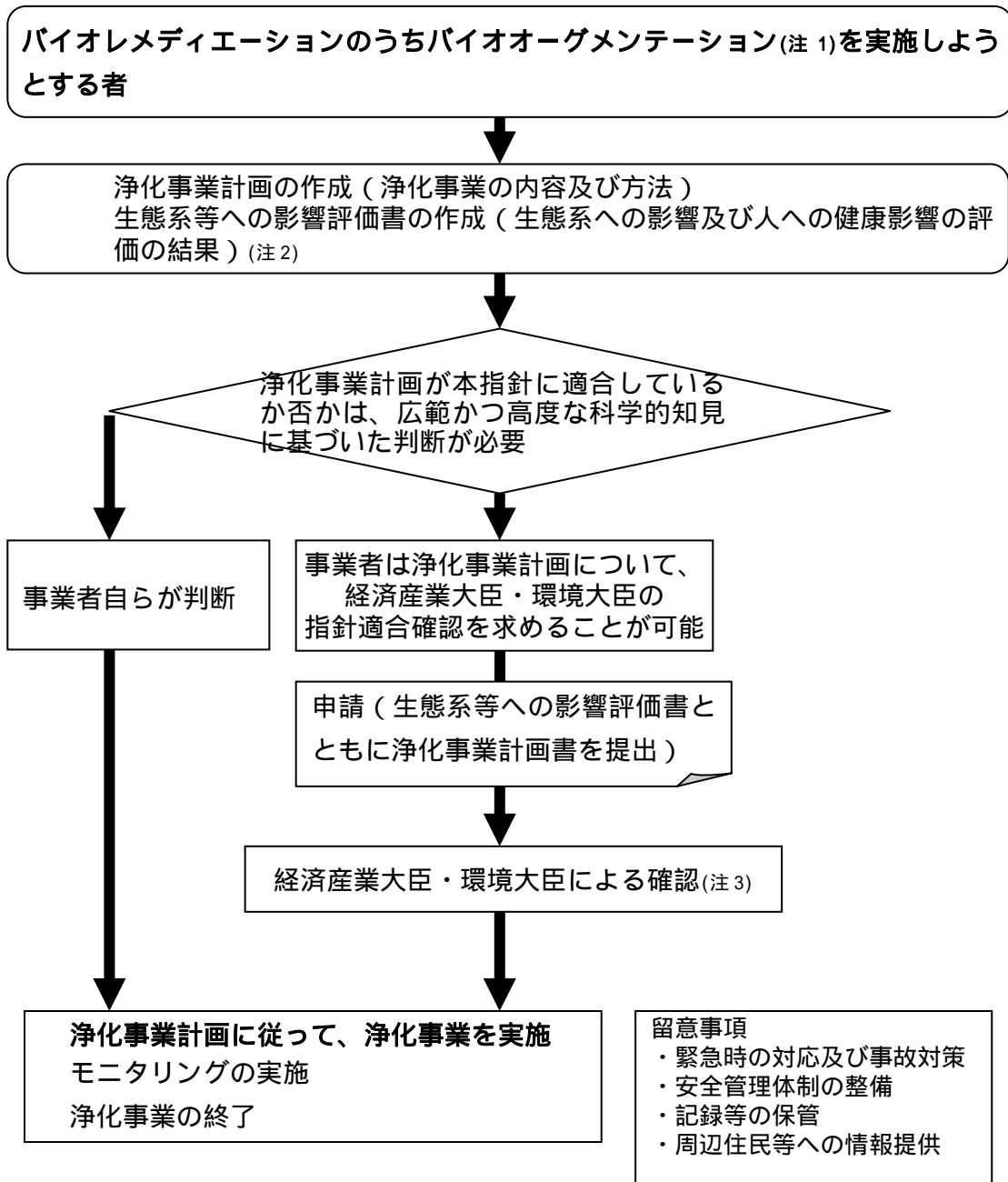
経済産業大臣及び環境大臣は、事業者の求めに応じ、事業者の作成した浄化事業計画が、本指針に適合しているか否かについて、確認を行います。

指針本文については、経済産業省及び環境省ホームページを御参照下さい。

<http://www.meti.go.jp/policy/bio/Cartagena/anken-shinsa.htm>

<http://www.env.go.jp/air/tech/an050330.pdf>

微生物によるバイオレメディエーション利用指針の体系図



バイオスティミュレーション(注4)については、本指針の考え方を参考にしつつ、事業者自らが適切な安全性の点検を行い、適切な安全管理のもとに実施。

(注1) 外部で培養した微生物を導入して環境汚染の浄化をする手法。
(注2) 個別に場所を限定しなくても、浄化事業の適用条件を想定した上で浄化事業計画の作成及び生態系等への影響評価を行うことが可能。

(注3) 確認を行う際は、学識経験者の意見を聴く。

(注4) 浄化場所に生息している微生物を活性化して環境汚染の浄化をする手法。

微生物によるバイオレメデーション利用指針の適用可能な範囲

(: 国の確認可能、 : 指針の適用可能、 × : 指針の適用外)

技術手法 : バイオオーグメンテーション
(バイオスティミュレーションは、指針の考え方を参考とすること。)

利用微生物 : 天然微生物(細菌、古細菌、菌類)(セルフクローニング等含む)

— 単一微生物及びその混合物

— 高度に培養した複合微生物

— 複合微生物

× 遺伝子組換え微生物(カルタヘナ法 の承認)

浄化対象物質 : トリクロロエチレン等揮発性有機化合物
ダイオキシン等多環芳香族化合物
重質油等の油分
その他重金属等

環境媒体(限定された作業区域が設定可能なもの)

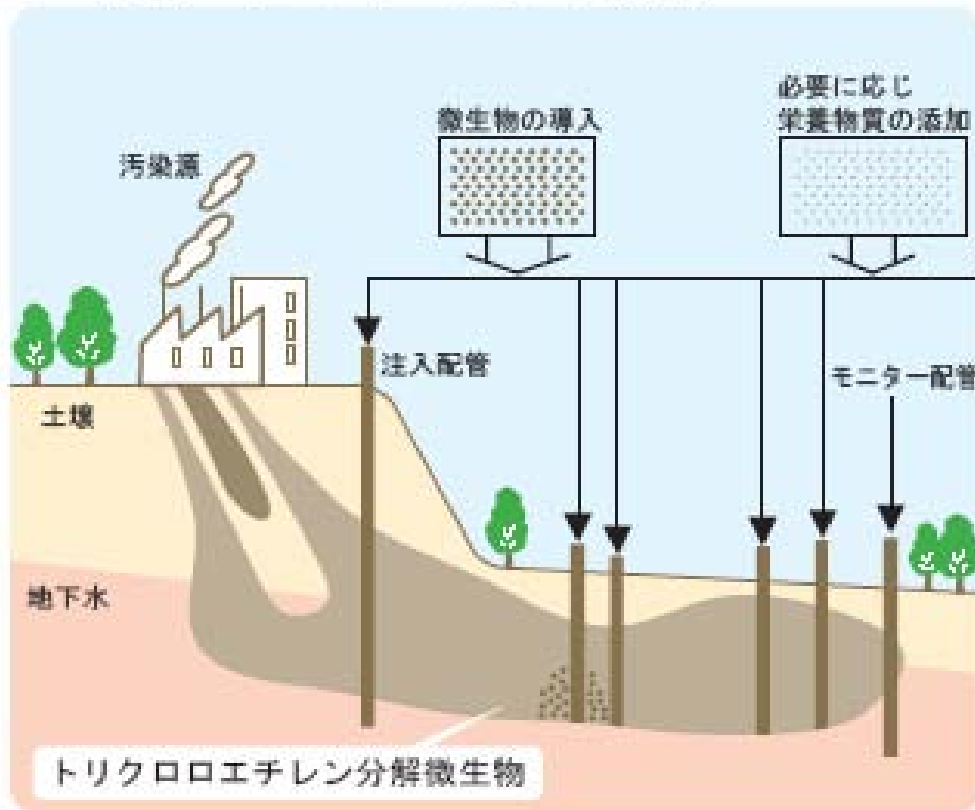
: 土壌、地下水、その他(底質等)

(例) × 海洋石油流出、× 底質(原位置)(限定された作業区域が設定できないため、指針の適用ができない。)

浄化場所 : 個別に限定された場所
未確定の複数の場所(浄化事業の適用条件を想定)

遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律

■ バイオオーグメンテーションの具体例



バイオレメディエーション

(微生物等の働きを利用する、土壌・地下水等の浄化技術)

バイオオーグメンテーション

(外部で培養した微生物を導入し、浄化する技術)

バイオスティミュレーション

(修復場所に生息している微生物を活性化し、浄化する技術)

・ 利用指針の解説及び確認申請に当たっての注意事項

第一章 総則

第一 趣旨及び目的

バイオレメディエーションは、微生物等の働きを利用して汚染物質を分解等することによって、土壌、地下水等の環境汚染の浄化を図る技術である。環境汚染浄化の技術的手法としては、物理的手法、化学的手法及び微生物機能の活用等生物学的手法が存在するが、微生物を利用するバイオレメディエーションは、多様な汚染物質への適用可能性を有し、投入エネルギーが理論的には少なく、一般的に浄化費用も低く済む可能性があり、将来の主要技術の一つと考えられている。微生物を利用するバイオレメディエーションの中でも特に、バイオオーグメンテーションについては、主に難分解性化学物質の汚染に対し、近年、環境汚染浄化技術としての注目が高まっており、今後の利用拡大が期待されているところである。

微生物の開放系利用となるバイオレメディエーションは、安全性評価を十分踏まえつつ実施することを前提にすれば、汚染された土壌、地下水等の浄化が進められることによって、全体として生態系への影響及び人への健康影響を低減することが期待できるものである。

特に、バイオオーグメンテーションは、一般的には、自然環境から分離した特定の微生物を選択して培養されたものを意図的に一定区域に導入することによって、汚染された土壌、地下水等の浄化を図ろうとするものであるが、生態系への影響及び人への健康影響を与えるおそれがないとはいえないことから、あらかじめ安全性の評価を実施してから利用することが適当な手法として位置付けられるものである。しかしながら、この安全性評価は、事業者にとっていまだ経験が浅く、その統一された評価手法が存在していないのが現状である。

この微生物によるバイオレメディエーション利用指針(以下「指針」という。)は、微生物を利用するバイオレメディエーションの中でも特に、バイオオーグメンテーションを実施する際の安全性の確保に万全を期すための指針である。

本指針は、生態系への影響及び人への健康影響に配慮した適正な安全性評価手法及び管理手法のための基本的要件の考え方を示し、バイオレメディエーション事業の一層の健全な発展及びバイオレメディエーションの利用の拡大を通じた環境保全に資することを目的とする。

第一章 第一-1

本指針は、微生物によるバイオレメディエーションを土壌・地下水等の環境汚染の浄化に利用する場合の、生態系への影響及び人への健康影響(以下、生態系等への影響)に関する安全性の確保のための基本的要件を示したものである。

バイオレメディエーションは、環境汚染の浄化に対して将来の主要技術の一つ

と考えられており、安全性評価を十分踏まえつつ実施するということを前提にすれば、汚染された土壌、地下水等の浄化が進められることによって、全体として生態系等への影響を低減することが期待できるものである。すなわち、汚染物質を安全かつ確実に取り除いて有害性の低減を図ることが基本的に重要であると考えられる。

特に、バイオオーグメンテーションは、一般的には自然環境から分離した特定の微生物を選択し、閉鎖系のバイオリクター等を利用して工業的に培養されたもの等を意図的に一定区域に導入することによって、汚染された土壌、地下水等の浄化を図ろうとするものであり、外部で培養された微生物の意図的な開放系利用であること、微生物の中には病原性を有すと知られている特定の微生物が存在しており、利用微生物が生態系等への影響を与えるおそれがないとはいえないこと等から、あらかじめ安全性の評価を実施してから利用することが適当な手法として位置付けられるものである。(「生態系等への影響を与えるおそれがないとはいえないこと等・・・」とは、生態系等への影響を与える可能性は低い、全く無いとは言えないことから、安全性の確保に万全を期すという意味が込められている。)このことから、バイオレメディエーションは、適正な科学的評価の実施の上で社会的な信頼性を得つつ事業を進めることが重要と考えられるが、この安全性評価は、事業者にとって未だ経験が浅く、その統一された評価手法等が存在していないのが現状である。

以上から、国が関係者の理解を得つつとりまとめた本指針を示すことによって、バイオレメディエーション事業の一層の健全な発展につながり、バイオレメディエーションの利用の拡大を通じた環境保全が図られることが期待されるものである。

第一章 第一-2

本指針には、バイオオーグメンテーション事業を実施するに当たり、一般的に必要と考えられる生態系等への影響評価方法及び管理手法のための基本的要件が記載されている。したがって、各事業者が行おうとする事業が、各々の評価項目等に該当しないときは、その理由を付して、適宜省略したり、適用条件を想定したりして浄化事業計画や生態系等への影響評価書を作成することとなる。

第二 用語の定義

本指針の解釈に関しては、次の定義に従うものとする。

- 1 「バイオレメディエーション (Bioremediation)」とは、微生物等の働きを利用して汚染物質を分解等することによって、土壌、地下水等の環境汚染の浄化を図る技術をいい、本指針は、微生物によるバイオレメディエー

ションを対象とする。

「バイオレメディエーション」は、専門用語であるが、日本語の定訳が関連学会等でも未だ設定されておらず、最近マスコミ等でも取り上げられ、かなり一般的になりつつあることからカタカナのまま使用している。

「微生物等」とは、一般にバイオレメディエーションには、微生物の他に、植物を利用した土壌の浄化等（ファイトレメディエーション）を行う事業が含まれていることから、このように表記している。なお、この指針は、微生物を利用する浄化のみを対象としており、植物を利用する浄化は含まれていない。また、植物を利用する浄化の場合、植物の根圏に生息する微生物の寄与がある場合があるが、植物の寄与と微生物の寄与の区分が困難なため、根圏微生物を利用する浄化であっても指針の対象外としている。

「分解等」とは、バイオレメディエーションは、有機化合物の分解による有害性の低減化が一般的であるが、金属のように、酸化数の増減によって、有害性が大きく変化するものも含んでいることから、このように表記している。

「土壌、地下水等」とは、現時点において、バイオレメディエーションの対象とされる環境媒体として土壌と地下水が主に想定されており、本指針ではこれらを中心に想定して作成しているが、現時点では解決すべき課題も多く、実用化に相当な時間を要すると考えられる底質も将来的に対象として考えられるため、このように表記している。

2 「バイオオーグメンテーション(Bioaugmentation)」とは、バイオレメディエーションのうち、外部で培養した微生物を導入することによるものをいう。

「バイオオーグメンテーション」は、バイオレメディエーションよりも更に、不慣れな専門用語であるが、上記のとおり定義することによりこのまま使用することとした。

3 「バイオスティミュレーション(Biostimulation)」とは、バイオレメディエーションのうち、栄養物質その他添加剤（以下「栄養物質等」という。）又は酸素を加えて浄化場所に生息している微生物を活性化することによるものをいう。

「バイオスティミュレーション」は、上記のとおり定義であるが、修復場所に生息している微生物をいったん浄化場所から分離し、外部で培養して利用する場合は、バイオオーグメンテーションに該当する。

4 「微生物」とは、細菌、古細菌及び菌類をいい、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（平成15年法律第97

号) 第2条第2項に規定される「遺伝子組換え生物等」は含まない。
なお、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律施行規則(平成15年財務省、文部科学省、厚生労働省、農林水産省、経済産業省、環境省令第1号)第2条第1号¹に規定する技術及び同施行規則第3条に規定する技術以外の生物の細胞を融合する技術²の利用により得られた生物は、「遺伝子組換え生物等」の定義から除外されていることから、本指針の「微生物」に含める。

「微生物」の中には、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(以下、「カルタヘナ法」という。)に規定される「遺伝子組換え生物等」は含まない。但し、同法において、いわゆる「セルフクローニング」及び「ナチュラルオカレンス」等に起因する生物は、「遺伝子組換え生物等」の定義から除外されて整理されていることから、当該生物は、本指針の「微生物」に含めることとする。また、「微生物」の定義は、実用的なものとして細菌、古細菌、菌類にすることとした。なお、将来の技術進展に応じ、原生動物、藻類等が利用されることになれば、別途、検討することとなる。

1: 「施行規則第二条第一号に規定する技術」とは、細胞に移入する核酸として、次に掲げるもののみを用いて加工する技術をいう。

- ・当該細胞が由来する生物と同一の分類学上の種に属する生物の核酸(いわゆるセルフクローニング)
- ・自然条件において当該細胞が由来する生物の属する分類学上の種との間で核酸を交換する種に属する生物の核酸(いわゆるナチュラルオカレンス)

2: 「施行規則第三条に規定する技術以外の生物の細胞を融合する技術」とは、異なる分類学上の科に属する生物の細胞を融合する技術であって、交配等従来から用いられているもの以外の技術を除く、生物の細胞を融合する技術をいう。

5 「生態系等への影響」とは、作業区域及びその周辺における生態系への影響及び人への健康影響をいう。

本指針は、主として自然環境から分離した微生物を対象とし、バイオレメディエーションにおける利用微生物の影響を評価するには、生物多様性影響(注)のうち、特に、物質循環等への影響を通じた「生態系への影響」が重要と考えられることから、このように表記している。

人への健康影響が生態系への影響よりも後に記載してあって、これら二つをあわせて「生態系等への影響」という用語を使用しているが、人への健康影響に関して、必要なものは、各種法律において規制していることから、ガイドラインである本指針では、人への健康影響を配慮しつつ、生態系への影響を評価するとい

う観点から、このように表記している。

注) カルタヘナ法では「生物多様性影響」という用語が使用されており、この法律で「遺伝子組換え生物等の使用等により生ずる影響であって、生物の多様性を損なうおそれのあるもの」と定義されている。さらにこの法律で「生物の多様性」とは、生物の多様性に関する条約第二条に規定する「生物の多様性」(すべての生物(陸上生態系、海洋その他の水界生態系、これらが複合した生態系その他生息又は生育の場のいかなを問わない。)の間の変異性をいうものとし、種内の多様性、種間の多様性及び生態系の多様性を含む。)と定義されており、生態系の多様性は生物の多様性の一部という位置づけになっている。

6 「浄化事業」とは、バイオレメディエーションを利用する事業をいい、「事業者」とは、浄化事業を実施する者をいう。

ここでの浄化事業は、バイオレメディエーションを利用する事業のことをいうが、具体的には、揮発性有機化合物、多環芳香族化合物等の汚染物質を含む土壌、地下水等の環境媒体から、汚染物質の分解等を行うことにより、汚染物質の含有量を減少させ、環境媒体の浄化を図る事業をいう。

7 「作業区域」とは、利用微生物を取り扱う場所として設定される区域をいう。

作業区域は、浄化の対象となる場所のほか、その近傍で微生物の培養、取扱い等を行う場所も含む。基本的に、現場から遠く離れた場所(実験室等)は含まないが、ex situ 方式による浄化(後述本章 第三 1 参照のこと)の場合は、浄化対象場所から離れた、浄化作業を行う場所も含む。

8 「利用微生物」とは、バイオオーグメンテーションにおいて、浄化事業のため浄化場所に導入する微生物をいう。

詳細は、本章 第三 指針の対象 1 を参照のこと。

9 「単一微生物」とは、分類学上の株レベルで分類及び同定された微生物をいう。ただし、株レベルの分類及び同定が不可能な場合は、生態系等への影響評価が可能な場合に限り、種又は属レベルにより分類及び同定したものを含む。

詳細は、本章 第三 指針の対象 2 を参照のこと。

10 「複合微生物系」(コンソーシア)とは、複数の種類の微生物が混在している状態のものをいう。

「コンソーシア」については、日本語の定訳は関連学会等でも未だ設定されていないが、微生物を扱う者の中では複合微生物系を一般的にこのように称していることから、本指針では、参考として記載している。

11 「浄化事業計画」とは、浄化事業の内容及び方法を定めた計画をいい、浄化事業計画を記載した書面を「浄化事業計画書」という。

第二章「浄化事業計画の作成」に従って作成することとなる。

12 「モニタリング」とは、浄化事業計画に定める必要な項目を監視することをいう。

浄化事業計画に定める必要な項目は、第四章 第二 モニタリングの実施を参照のこと。

第三 指針の対象

1 本指針は、バイオオーグメンテーションを対象とする。

本指針は、「第二 用語の定義」に示した「バイオオーグメンテーション」に対して適用され、利用微生物には、単一微生物とその混合微生物及び複合微生物系(コンソーシア)が含まれる。バイオオーグメンテーションにおける実施形態については、土壌や地下水等を原位置で処理する *in situ* 方式、現場上で処理する *on site* 方式又は汚染された土壌や地下水等を処理場所へ運搬して処理する方式である *ex situ* 方式に係るものに適用する。

なお、バイオスティミュレーションについては、添加する栄養物質等又は酸素の供給の停止とともに、浄化場所に生息している活性化された微生物は減少すると考えられることから、本指針の対象としていない。

2 本指針が対象とする利用微生物は、単一微生物と複合微生物系とする。このうち、第五章に規定する経済産業大臣及び環境大臣による確認の対象とする利用微生物は、利用微生物の種類ごとに生態系等への影響についての科学的知見に基づいた適切な評価が可能なものとし、具体的には、次のとおりとする。

- (1) 分類及び同定された単一微生物又はそれらを混合した微生物系
- (2) 自然環境から採取された複合微生物系を基にして、特定の培養条件で集積培養された複合微生物系であって、高度に限定された微生物で構成され、そ

の構成が継続的に安定していることが確認されたもの。

また、自然環境から採取された複合微生物系を基にして培養された複合微生物系（(2)のものを除く。）は、第五章に規定する確認の対象としないが、浄化事業計画の作成及びその実施に当たり、本指針の考え方を参考にし、事業者自らが適切な安全性の点検を行い、適切な安全管理の下にバイオオーグメンテーションを実施するよう努めること。

2-1 「利用微生物の種類ごと」について

国が確認する利用微生物は、「利用微生物の種類ごと」に生態系等への影響評価が必要であるとしている。「種類ごと」とは、基本的には、微生物の「株」、すなわち、単一微生物ごとの生態系等への影響評価が必要であるという意味である。

しかしながら、本指針では、単一微生物に加え、高度に限定され、安定した系で構成された複合微生物系も国の確認の対象としていることから、一律に、単一微生物の株ごとの生態系等への影響評価を求めることは、技術的に困難である場合が多い。自然環境から採取された複合微生物系は、いくら高度に限定された集積培養による複合微生物系であっても、一般的には、全ての微生物の株について検出し、評価することは困難と考えられることから、単一微生物ごとに評価を行うことを基本としつつも、別添4に示すような検定及び識別の手法を用いて、単一微生物の株ごとに評価を行った場合と同等の安全性評価が可能な場合は、複合微生物系を一つのものとして評価してもよい。

2-2 「利用微生物の対象範囲」について

利用微生物の対象範囲として、複合微生物系を含めるべきか、否かについて、指針作成の合同会合において、大いに議論があったが、主な趣旨としては、以下のとおりであった。

現在の実用的なバイレメ事業は、複合微生物系がよく使用されている。実態に則した指針策定を考慮するとともに、利用微生物が他の微生物との混合状態で活性化し、必ずしも純粋分離することに意味がないもの又は単離できない株があること等から、当該複合微生物系そのものを指針の対象とすることを検討すべきではないか。

一方、国の確認においては、科学的知見によって適正な評価が可能なものとして、菌株等が分離・同定されているものだけを対象とすべきではないか。

複合微生物には、選択的に数種に絞り込めるもの、又は分離・培養が困難なもの、又は既にいろいろな分野で経験的に安全利用されているもの等がある。そもそもこれら全てについて安全性評価をする必要があるのか。又は全ての評価項目の評価をしなくても一定の安全性評価が可能であるものがあるのではないか。

評価可能なものだけを指針の対象とし、評価ができないものは対象からはずすという考え方は問題ではないか。安全性の観点から、何らかの基準となるガイドラインの遵守は必要ではないか。

以上の意見等を踏まえ、従来から運用されてきた経済省又は環境省の指針においては、単一微生物だけしか確認の対象にしていなかったが、今後、複合微生物系が実際のバイオオーグメンテーション事業で活用される可能性がある実状に鑑み、複合微生物全体を指針の対象とするとともに、高度に限定され、安定した系で構成された複合微生物系も単一微生物と同様に適切な生態系等への影響評価が可能であれば、国の確認の対象とすることとした。

結論として、**2-2**の意見及びその検討結果を踏まえ、本指針は、以下のとおり、整理された。

2-3 本指針及び確認の対象範囲

基本的考え方としては、本指針は単一微生物から複合微生物利用までのバイオオーグメンテーション全てについて適用する。このうち、経済産業大臣及び環境大臣による確認の対象とする利用微生物は、利用微生物の種類ごとに生態系等への影響についての科学的知見に基づいた適切な安全性評価が可能なものを対象とする。この考え方から、指針で確認の対象とする利用微生物が上記の(1)及び(2)のとおり定義された。

規定(2)に含まれる複合微生物系とは、以下のような要件を満たしているものと理解される。

- ・ 汚染の浄化に寄与する微生物がコンソーシア中で優占していること。
- ・ 構成微生物が事実上単離不可能である等、コンソーシアを用いる相当の理由があること。
- ・ 汚染の浄化に寄与する微生物の種類が少数で、それらがある種又は属レベルで同定され、同定に基づいた病原性の有無をデータベース及び文献によって調査し、安全性評価が可能なこと。16S rDNA-DGGE 法等により主要な菌の同定が可能で、菌相の推移が追跡できること。
- ・ コンソーシア中に少量の未分類・未同定の微生物が存在している場合は、そのコンソーシアの由来及び自然界における分離源及び経験的に安全な利用の歴史等の内容を調査することが可能なもの又は実験等による安全性を確認したもの。

2-4 「高度に限定された微生物」について

高度に限定された微生物とは、馴養・集積培養を続けることで構成微生物の種

類・数が限定されて安定化したもので、できる限りの集積培養を行った際に、DNAの解析等により検出・同定が可能な少数の特定の微生物を含む複合微生物系のことを指す。

事業者から申請されて実際の確認が可能かどうかの審査は、ケースバイケースで扱わざるを得ず、安全性評価が単一微生物と同水準のものとして確認が可能かどうかの学識経験者による判断によることとなる。

2-5 「その構成が継続的に安定していること」について

「構成が継続的」とは、国が指針への適合性を確認する以上、どのような組成のものを確認したのかを、後にフォローアップすることが可能な状態にあることが必要であることからこのように表記している。具体的には、集積培養して一定に保持された微生物の各株の組成が土壌中等に導入するまで同じ状態にあること。また、少なくともバイレメ事業実施期間中は、一定の保存状態で同様な組成が保持されていることが必要と考えられる。

2-6 確認ができない複合微生物系の扱い

自然環境から採取された複合微生物系をもとにして培養された複合微生物系（第三 2 (2)のものを除く）は、構成している微生物の把握が難しく、学識経験者によって評価することが困難であると判断され、原則として、単一微生物ごとの科学的知見のもとに評価をすることとしている本指針の基本的考え方の適用ができないため、確認の対象としないこととした。

長期間の使用等の経験から伝統的に開放系で広く安全利用がなされている複合微生物系として、活性汚泥又はコンポスト等がある。これらは極めて複雑な組成からなる複合微生物系であり、国が指針への適合性を審査し、確認することは困難なことから、国による確認の対象としないこととした。

なお、上記 及び の複合微生物系においても、本指針が適用可能な項目にあっては、浄化事業計画の作成及び浄化事業の実施に当たり、本指針の考え方を参考にし、事業者自らが適切な安全性評価を行い、適切な安全管理のもとにバイオオーグメンテーションを実施することが適当である。

3 浄化対象物質

環境汚染浄化の対象物質は、石油類、揮発性有機化合物（トリクロロエチレン等）、多環芳香族化合物（ダイオキシン類等）及び金属類を代表的なものとするが、これらの物質に限定しない。

本指針では、環境汚染浄化の対象物質は、特に指定するものではない。

トリクロロエチレン、テトラクロロエチレン等揮発性有機化合物、ダイオキシン類等多環芳香族化合物等のほか、重質油類及び金属類等が対象として考えられる。

4 浄化対象環境媒体

浄化作業が行われる環境媒体は、自然条件下の限定された区域の土壌、地下水等とする。

浄化作業が行われる環境媒体としては、代表的なものとして土壌及び地下水を想定している。これ以外にも現時点では解決すべき課題も多く、実用化に相当な時間を要すると考えられる底質も将来的に対象となることが考えられる。但し、これらは自然条件下の限定された区域の設定が必要である。

「自然条件下の限定された区域」とは、土壌及び地下水等の汚染範囲が明確なもので、その区域を限定して浄化することが可能な区域をいう。

例えば、底質のうち、原位置処理については、自然条件下の限定された区域が設定できないことから適用はできない。また、同様に、海洋の石油流出事故汚染も限定された区域の設定ができず評価ができないため、対象とすることはできない。

第二章 浄化事業計画の作成

事業者は、浄化事業の実施に当たって、あらかじめ浄化事業の内容及び方法を明確にしてから実施するものとし、以下に掲げる事項を含む浄化事業計画を作成すること。

なお、浄化事業を個別に限定された場所で実施しようとするのではなく、浄化事業の適用条件を想定した上で未確定の複数の場所で実施しようとする場合は、浄化事業計画には、その想定する適用条件を記載すること。

浄化事業を実施しようとする事業者は、あらかじめ浄化事業計画を作成することが必要である。浄化事業計画の内容としては、大きく分けて、以下の4項目について調査し、記載することが必要である。

- ・利用微生物の種類の名称
- ・浄化事業の内容
- ・浄化事業の実施方法
- ・安全管理の方法

また、第5章の国の確認への申請を行う場合は、浄化事業計画には浄化事業全体を表現する「事業名の名称」記載すること。

なお、浄化事業を個別に限定された場所で実施しようとするのではなく、浄

化事業の適用条件を想定した上で未確定の複数の場所を実施しようとする場合は、浄化事業計画には、その想定する適用条件を記載すること。

1 利用微生物の種類の名称

利用微生物の種類ごとに分けて名称を付すこと。複合微生物を利用する場合も、原則として、「株」ごとに名称を記載するが、株ごとに評価を行った場合と同等な安全性評価が可能であるならば、複数の異なる株を一つのものとして取扱ってもよい（第一章 第三 2-2、2-3を参照のこと）。株名が不明の場合は、株名は付さず属又は種名の名称のみでよいが、その理由及び概況を記載すること。なお、学名、同定の根拠等の詳細は、「第三章第一 1 . 利用微生物の情報」に記載すること。

2 浄化事業の内容

- (1) 浄化対象物質の名称及び想定される濃度（浄化対象物質以外の汚染物質がある場合は、その物質の名称及び濃度）
- (2) 浄化対象物質の浄化目標濃度
- (3) 浄化事業期間
 - a 浄化作業期間（浄化作業準備開始から浄化対象物質が浄化目標濃度に達するまでの期間）
 - b 浄化事業終了確認期間（浄化作業期間終了後から浄化事業の終了を確認するまでの期間）

(1) 浄化対象物質の名称及び想定される濃度

浄化対象物質の名称は慣用名で記載し、想定される濃度は最高値とおおよその平均値を位置と地下深度等の場所とともに記載すること。浄化対象物質以外の共存する汚染物質がある場合は、同様にその物質の名称及びその濃度を示すこと。

（記入例）

個別の限定された場所を実施する場合

・浄化対象物質

トリクロロエチレン、事前調査濃度（最高値） mg/l、（平均値）
mg/l（地下 x x m）

・共存物質

ジクロロエチレン、事前調査濃度（最高値） mg/l、（平均値）
mg/l（地下 m）

未確定の複数の場所を実施する場合

どのような物質を対象とし、おおよそどの程度の濃度を対象とするのかを記載する。

・浄化対象物質

トリクロロエチレン、 mg/l ~ mg/l 程度

・共存物質

ジクロロエチレン、 mg/l ~ mg/l 程度

(2) 浄化対象物質の浄化目標濃度

浄化事業で目標とする浄化濃度及びその理由を記載すること。なお、その目標設定が法令等における基準値等に基づくものであれば、その旨を記載すること。

(記入例)

トリクロロエチレン 浄化目標濃度：0.03mg/l

(地下水の水質汚濁に係る環境基準(平成9年3月13日環境庁告示第10号)を参照)

(3) 浄化事業期間

浄化事業期間は、作業区域における浄化作業の準備から始まり、浄化目標濃度に達し、最終的に浄化事業の終了が可能であることを確認するまでの期間である。

浄化作業期間(浄化準備開始から浄化目標達成時までの期間)と浄化事業終了確認期間(浄化作業期間終了後から浄化事業の終了を確認するまでの期間)の二つに分けて記載すること。

(記入例)

・浄化作業期間(予定): 約 ヶ月間

・浄化事業終了確認期間(予定): 約 ヶ月間

3 浄化事業の実施方法

(1) 作業区域(範囲並びに浄化対象の面積及び土壌等の量)の設定

(2) 作業区域及びその周辺の概要

(3) 浄化技術の概要

(4) 利用微生物の導入方法等

a 利用微生物の導入方法

b 導入する利用微生物の菌密度及びその量

c 利用微生物と同時に導入する栄養物質等

(5) モニタリングの実施方法

(6) 浄化事業の終了方法

(1) 作業区域の設定

事業を実施する前に、使用微生物を取り扱う場所として、あらかじめ作業区域を設定し、別添として、作業区域を図中に示すこと。併せて、浄化対象とする面積及び土壌量又は地下水量を設定すること。浄化の対象となる場所のほか、その近傍で微生物の培養、取扱い等を行う場所も含めること。なお適応条件を想定した上で未確定の複数の場所で浄化事業を実施しようとする場合は、事業計画作成時は作業区域を限定しないこととなるが、可能な限り浄化事業の適用条件を具体的に想定して情報を収集し、作業区域の概念図等を示すこと。また、実際に事業を実施する際には作業区域を設置してから行うこと。

なお、詳細事項は、「第三章 第一 3 .(1) 作業区域等の特徴」に記載すること。

(記入例)

個別の場所に適用する場合

- ・ 住所： 県
- ・ 利用微生物を取り扱う作業区域及びその周辺は添付図（省略）のとおり。（図中に作業区域を太線で囲み範囲を示す）
- ・ 浄化対象面積：約 m^2 、浄化対象土壌（推定値）約 $\times \times m^3$ （添付図（省略）を参照）

複数の場所に適用する場合

- ・ 業種工場敷地内での浄化を想定。
- ・ 利用微生物を取り扱う範囲は、工場敷地内で添付図（省略）のとおり想定
- ・ 浄化対象面積 $\sim m^2$ 、浄化対象土壌 $\sim m^3$ 程度を想定

(2) 作業区域及びその周辺の概要

事業を実施する前にあらかじめ作業区域及びその周辺の概要を調査し記載すること。「第三章 第一 3 .(1) 作業区域等の特徴」に記した内容をまとめて簡潔に記載すること。別添として、上記の(1)の図に併せて図示するとともに、作業区域及びその周辺区域の土地履歴についても概説すること。適応条件を想定した上で未確定の複数の場所で浄化事業を実施しようとする場合は、作業区域の概念図等を示すこととなるが、この場合も可能な限り浄化事業の適用条件を具体的に想定して情報を収集すること。

(3) 浄化技術の概要

計画しているバイオオーグメンテーションの浄化技術について、作業区域において適用する *in situ*¹、*on site*²、*ex situ*³等の浄化手法を含めて、その概要について、簡便に記載すること。別添として、以下(4)の利用微生物の導入方法とともに、概略図（例示省略）を示すこと。

（記入例）

本技術は、塩素系脂肪族炭化水素化合物が嫌氣的条件下で嫌気性細菌の活動により脱塩素化される性質を利用したものである。トリクロロエチレンによる汚染区域内に設置した 箇所の注入井から嫌気性細菌 及び栄養物質××を注入し、汚染区域内における の活性化を図り、トリクロロエチレンをエチレンまで脱塩素化する。

- 1：汚染現場の土壌を掘削することなく対象汚染物質の浄化を図る方式
- 2：汚染現場の土壌を掘削した後、掘削した土壌を作業区域から搬出することなく、作業区域内地上部において対象汚染物質の浄化を図る方式
- 3：作業区域から汚染土壌等を搬出して、再度、埋め戻す方式

(4) 利用微生物の導入方法等

上記の「(3) 浄化技術の概要」とともに、利用微生物の導入方法等について記載すること。なお、生態系等への影響に係る科学的知見に関する事項は、「第三章 第一 2．浄化技術の情報」に記載すること。

a. 利用微生物の導入方法

以下の記入例を参照のこと。

ここでは、上記の「(3)浄化技術の概要」に既に記載してある内容は、適宜省略してよい。なお、必要に応じ、利用微生物導入の概略図を上記の(3)と併せて別添として示すこと。

（記入例）

利用微生物は、作業区域外の培養槽にてあらかじめ培養したものを、作業区域内に設置した賦活化槽でトルエンを添加することにより賦活化させ、分解酵素を誘導した休止菌体を用いるものとする。この休止菌体を水道水により濃度調整し、注入井からのポンプ圧入を行い、作業区域（汚染地下水）への利用微生物の導入を行うものとする。

b. 利用微生物の菌密度及びその量

以下の記入例を参照のこと。

(記入例)

- ・ 菌密度： cells/ml
- ・ 量： cells/日 (1日の注入量が ml/hr × ×時間注入)

c. 利用微生物と同時に導入する栄養物質等

利用微生物と同時に導入する栄養物質等を添加する場合には、その物質名、導入方法、導入量等について記載すること。

「栄養物質等」とは、栄養物質のほか、界面活性剤等(緩衝液、キレート剤、酸化還元剤等)のその他添加剤をいう。

以下の記入例を参照のこと。

(記入例)

- ・ 物質名
- ・ 導入方法
作業区域より抽出した地下水に、利用微生物とともに添加することにより作業区域内に導入する。
- ・ 導入量 濃度 g/ml の溶液を x ml/日の割合で添加する。導入量は g/日である。

(5) モニタリングの実施方法

本項では、モニタリングすべき項目及び実施期間を記載すること。モニタリング項目については、「第四章 第二 モニタリングの実施」で解説をしているので参照のこと。

モニタリングは、浄化事業計画の内容に従って、適切な安全管理の下に浄化事業が実施されているか否かについて確認するために行うものである。

モニタリングは、浄化作業中に使用する利用微生物の増殖の可能性、栄養物質の分解性、浄化対象物質の分解性等に応じて、項目や実施期間等が変わるため、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べきである。

(5)-1 モニタリングをすべき項目

浄化事業に先だって、モニタリングを実施すべき項目を作成すること。実施すべき項目として、第四章 第二において浄化対象物質、利用微生物(必要に応じ、他の微生物を含む)の変化、分解生成物(必要に応じ、中間生成物を

含む) 栄養物質等を掲げている。

なお、その他必要な事項については、例えば以下のような項目について、必要に応じモニタリングを行うことが想定される。

(例示：その他必要な事項)

- ・ トリクロロメタンの浄化の際に、栄養物質を入れることにより、土壌・地下水の pH が変わり重金属の溶解度が変化する可能性
- ・ 複合汚染がある場合、浄化対象物質以外の汚染物質の挙動
- ・ 呼吸活性などの土壌の微生物活性
- ・ 希少種の存在状況等、対象区域周辺の生態系(主要な動植物等)への影響等

生態系への影響のモニタリングの方法については、その生態系の指標となる生物を選定して行うこと等が考えられる。

(5)-2 モニタリングの方法

以下のように、上記(5)-1の項目について、サンプリング方法、測定方法及び測定結果の項目を記載する必要がある。

サンプリング方法

予定しているサンプリングの方法、位置、頻度、期間、保存方法等、試料に関する情報を記載すること。適用するモニタリングの手法の原理、特徴及び感度や再現性等信頼性の観点からも記載する。

測定者、測定方法、前処理方法、測定場所、測定頻度(定期的な管理状況)、管理基準及び土壌、地下水等の事業諸条件、測定の留意事項等を記録する必要がある。

測定方法

化学物質は、ガス検知器、ガスクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー質量分析等の分析方法等、及び利用微生物は、PCR-ザット、マイクロアレイ等において、検出、定量、定性分析が可能なものを記載すること。

測定結果

モニタリングの測定結果は、時系列に検査・評価ができるよう整理及び記録し、事業が終了後5年間は、事業者が保管する必要がある。

モニタリングの測定結果において、万が一予期していなかった生態系への許容できない影響が確認された場合には、必要に応じて適切な対応をとるものとする。

なお、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又は環境大臣に報告するものとする。

(記入例)

別添図(省略)の位置に設けた観測井戸により地下水の採水を行う。採水は、処理開始前は30日、20日、10日及び前日に浄化作業期間中は4日毎に、浄化作業終了後は20日毎に実施する。

採水した試料はJIS規格の試験方法に則り、浄化対象物質A及び想定される分解生成物B,C,D、栄養物質Eの濃度を測定し、定期的な濃度変化を記録する。

また、利用微生物の検出においては、採水後、直ちに1%ホルマリン濃度下において固定し、冷蔵保存する。検出方法は、モノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法により実施する。本手法の地下水での検出感度はcells/mlであり、株特異的な検出が可能である。

本計画による作業区域はパイル工法によるシーリングがほどこされており、利用微生物は地下に導入するため、直接曝露の可能性のある生物はいない。

(5)-3 モニタリング実施期間

モニタリングの実施期間は、浄化作業開始から始まり浄化事業終了までとしている。

(6) 浄化事業の終了方法

「浄化事業の終了方法」については、浄化作業の終了と浄化事業全体の終了についてそれぞれの方法と手順を記載すること。なお、詳細事項に関する事項は、「第四章 第三 浄化事業の終了」に解説しているので参照のこと。

浄化作業終了時の浄化対象物質や中間生成物の濃度や事業終了後の利用微生物の生残数、栄養物質等を添加した場合にはその濃度等、それぞれの段階において終了の条件となる判定基準とその根拠を示すこと。さらに、浄化作業終了及び事業終了に向けて行う装置の停止やその他の具体的作業手順を明らかにすること。

なお、バイオレメディエーション事業は事業終了時点における安全性をモニタリングにより確認して終了することとなる。この場合、浄化事業期間以降も、上記の(5)-1のモニタリング項目の値が事業終了時に比べ悪化しないことの科学的裏付けが必要となる。

(記入例1)

浄化作業終了後モニタリングを行い、処理対象区域内のX地点での地下水中対

象物質 の濃度が 0.03mg/ l 以下になった時点浄化作業終了の目安とする。この際地上の装置はすべて停止し、地下水の人為的な循環は無くなる。更に、作業区域内の地下水最下流である Y 点の井戸から汲み上げた地下水中の利用微生物数が cells/ml になるまで 1 回/週、利用微生物のモニタリング測定を継続し、継続して 3 回目標値以下になった時点で浄化事業終了とする。(浄化事業終了基準の根拠別添(略))

(記入例 2)

処理が完了した土壌は掘削箇所に埋め戻すが、当該微生物の減少を確認した後に埋め戻す。

4 安全管理の方法

- (1) 利用微生物の拡散防止対策
- (2) 栄養物質等の拡散防止対策
- (3) 浄化対象物質(必要に応じ、中間生成物を含む。)の拡散防止対策
- (4) 安全管理体制の整備
- (5) 記録等の保管
- (6) 緊急時の対応及び事故対策

(1) 利用微生物の拡散防止対策

(2) 栄養物質等の拡散防止対策

(3) 浄化対象物質(必要に応じ、中間生成物を含む。)の拡散防止対策

バイオオーグメンテーション事業では、可能な限り利用微生物及び汚染物質等を作業区域外に拡散させないということが重要である。この観点から、事業者は、作業区域を設定し、利用微生物及び汚染物質等が作業区域の周辺へ漏出することを可能な限り最小限にする対策を講じる必要がある。

また、利用微生物及び栄養物質等に関しては、作業区域への過剰な導入を避け、また地下水の流向、流速を定期的に監視する等して、作業区域外への拡散が生じないように対策を講じる必要がある。

作業区域及びその周辺において利用微生物、汚染物質、栄養物質等の拡散が生じる可能性があり、問題となる場合は、防水堤の設置、遮水シートの設置等その対策が必要となるので、その内容を記載すること。必要に応じ、分かり易く説明するために概要図、工法図面及び付帯設備図等を活用し、添付すること。

(記入例)

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。

(4) 安全管理体制の整備

本項は、第六章 第二 安全管理体制の整備に係る留意事項を遵守するためのものであり、その内容を参照し、体制整備概要を示すこと。

概要としては、経験を有する全体の管理を行う者及びその者を補佐する者を配置し、バイオレメディエーション事業の技術面、安全面における責任を遂行する体制を整備し、また、安全・環境管理について助言を行う委員会を設置する。

(5) 記録等の保管

本項は、第六章 第三記録等の保管に係る留意事項を遵守するためのものであり、その内容を参照し、整備概要を示すこと。

概要としては、作業日誌、利用微生物や対象物質等のモニタリング実施記録簿などを策定すること、また、事業期間中に導入した利用微生物はサンプリングし、適切な期間、適切な管理の下、保存すること等である。

(6) 緊急時の対応及び事故対策

本項は、第六章 第一緊急時の対応及び事故対策に係る留意事項を遵守するためのものであり、その内容を参照し、体制整備概要を示すこと。

概要としては、天災を含めた事故時の対策マニュアルを作成し、従業員にその内容を周知徹底するものである。

第三章 生態系等への影響評価の実施

事業者は、浄化事業の実施に当たって、あらかじめ利用微生物の種類ごとに科学的かつ適正な生態系等への影響評価を実施し、その結果を記載した図書（以下「生態系等への影響評価書」という。）を作成すること。生態系等への影響評価を実施するに当たり、第一に掲げる評価に必要な情報を収集すること。ただし、これら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、この限りではない。この場合において事業者はその理由を示すこと。また、これらの情報以外の情報を収集する必要がある場合には、追加して収集すること。

事業者は、生態系等への影響評価について、第一に掲げる評価に必要な情報を用いて、第二の1に掲げる評価の項目ごとに、必要に応じ、第二の2に掲げる評価の実施方法に従って行い、その評価結果を踏まえ、浄化事業の実施に伴う生態系等への影響の総合的な判断を行うこと。また、事業者が行っ

た判断については、その根拠を明らかにすること。

なお、浄化事業を個別に限定された場所で実施しようとするのではなく、浄化事業の適用条件を想定した上で未確定の複数の場所で実施しようとする場合は、その想定した適用条件を満たす場所での情報を収集することによって生態系等への影響評価を実施すること。

また、生態系等への影響評価の実施に当たっては、最新の科学的知見による情報を用いること及び用いた情報の出典（当該情報が学識経験者又は評価を行う者の有する知識又は経験に基づくものである場合はその旨）を明らかにすること。

第三章-1

生態系等への影響評価を実施するに当たり、先ず、生態系等への影響評価に必要な情報を収集する必要がある。その内容は、大きく分けて三つの事項があって、第一に、利用微生物の病原性をはじめとする生理学的及び生態学的特性等についての情報、第二に、実施を計画している浄化技術についての情報、第三に、どのような場所でどのような物質を浄化しようとしているのかの情報である。

以上の三つの情報収集によって、定められた生態系等への影響評価の項目ごと評価を実施し、最終的に浄化事業の実施に当たっての総合的な判断を行うこととなる。なお、評価の実施方法が定められている項目については、それに従うことになる。

第三章-2

本指針における国への確認申請は、個別に限定された場所で実施しようとするもののほか、適用条件を想定した上で未確定の複数の場所に適用することも可能である。複数の場所で実施しようとする場合は、個別の場所で実施しようとする場合よりも、一般的には情報量は多く求められる。例えば、利用微生物又はその近縁種において使用実績が高く、利用微生物に関する情報量が多く存在する場合、又は実験室等において、情報が多く取得されているものは、複数の場所での適用が検討され得る。

第一 生態系等への影響評価に必要な情報

1 利用微生物の情報

利用微生物について、以下に掲げる情報を収集すること。収集に当たっては、まず、各種データベース、文献等既知の情報の十分な調査を行い、情報が不足している場合には、必要に応じ、実験室等で利用微生物を使用し、結果を収集すること。

第5章の国の確認への申請を行う場合は、浄化事業に利用する微生物ごとに分

けて生態系等への影響等を記載し、利用微生物全体をまとめて、一つのものとして申請すること。

(1) 分類学上の位置付け及び分離源（微生物を採集した場所）

分類学上の位置付けについて、既に学名が公認されている種・株の場合は、「学名」は属名、種名、及び株名まで記入し、学術誌等の同定の根拠が記載されているものを添付すること。また、学名が変更になっている場合には必要に応じて旧名称も併記すること。なお、同定した株を特許微生物株として寄託した場合は作製した基準株の寄託機関名と登録番号を記入すること。特許微生物株、又は菌微生物分譲機関からの分与を受けた微生物であっても、寄託時の同定が不完全な場合は、完全な同定を必要とする場合がある（以下の「同定をする際の参考文献例」を参照のこと。）

新たに自然界から分離した公認されていない微生物を利用する場合は、以下の文献を参考に種の同定を行うこと。さらに、微生物の分離年月日、分離場所、分離源と分離方法とともに、同定年月日、同定者、同定の方法と結果を記入した資料を添付すること。また、既に学名が公認されている種・株との同異点及びその根拠を記載すること。

なお、公認されている株から変異株を得ている場合は、誘導方法も加えその方法と親株との同異点を記入し、試験結果等の同異点を明らかにした根拠を示すこと。

利用する微生物が複合微生物系の場合には、別添4に述べた分子生物学的な手法等（16S リボソーム RNA 遺伝子の解析、PCR-サザンブロット解析法等）を用いて、微生物系を構成する主たる微生物の構成が一定であることを確認するとともに、その分類学的位置付けを記載すること。

< 同定をする際の参考文献例 >

【細菌】

- International Journal of Systematic Bacteriology
- The Prokaryotes, 2nd ed., vols 1-4 ., Springer-Verlag, Heiderberg(1991).
(Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H)
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.1 ~ 4 ., Williams and Wilkins, Baltimore (1984).
(Krieg, N.R., and Holt, J.G. (ed.))
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.2., Williams and Wilkins, Baltimore (1986).
(Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., and Holt, J.G. (ed.))

- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.3., Williams and Wilkins, Baltimore(1989).
(Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N., and Holt, J.G.(ed.).)
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.4., Williams and Wilkins, Baltimore (1989).
(Williams, S.T., Sharpe, M.E., and Holt, J.G.(ed.).)
- Manual of Clinical Microbiology, 6th ed., American Society for Microbiology, Washington, DC 20005(1995)
(P.R.Murray(Editor-in-Chief))

【菌類】

- The Fungi.Advanced Treatise.Vol. A and B. Academic Press (1973).
(G.C.Ainworth, F.K.Sparrow, and A.S.Sussman)
- Introduction to Food-borne Fungi.CBS, (1996).
(R.A.Samson and E.S.Hoekstra, J.C.Frisvad and O.Filtenborg)
- 菌類図鑑 上・下、講談社サイティフィック, (1978)
(宇田川俊一、椿啓介、堀江義一、三浦宏一郎、箕浦久兵衛、山崎幹夫、横山竜夫、渡辺昌平)

【酵母】

- The Yeasts, a Taxonomic Study, 3rd revised and enlarged edition, Elsevier (1984).
(N.J.W.Kreger-van Rij(ed.).)
- The Yeasts, a Taxonomic Study, 4th revised and enlarged edition, Elsevier (1997).
(C.P.Kurtzman & J.W.Fell(ed.))
- Yeasts: Characteristics and Identification, 2nd ed., Cambridge University Press (1995).
(J.A.Barnett, R.W.Payne & D.Yarrow)

(記載例：複合微生物系の場合)

今回の浄化事業には、米国で下水処理施設から分離された細菌 XXXX strain Y を含むコンソーシアを用いた。この系は既に海外でトリクロロエチレン等の浄化に有効なことが示されている(文献1)。また、そのゲノム配列も解読が進んでいる(文献2)。

浄化に当たって、本コンソーシアが特定の微生物からなり、その組成が一定し

ていることを確認するためにDNAレベルの解析を行った。

まず、文献2のデータから得られた細菌XXXXに特異的な16S rDNAに対する配列をプライマーに用いてPCR-サザン法により本菌がコンソーシア中に存在することを確認した(図1)。

また、その他の微生物についても、16S rDNAに対するユニバーサルプライマーを用いて同様に解析を行い、継時的に培養する過程で一定の微生物相から構成されることを確認した(図2)。

以上のことから、本浄化事業に用いるコンソーシアはXXXX strain Yを中心とした高度に限定された一定の微生物から構成される複合微生物系であることを確認した。

文献1) Isolation of a bacterium ...

文献2) Genome sequence of the bacterium XXXX ...

図1) 図2)...

(2) 使用の歴史及び現状

使用の歴史及び現状について、野外での利用実績がある場合は、利用概要を記載すること。さらに、導入微生物を利用した歴史はないが、近縁種を利用した歴史がある場合は、その近縁種の使用実績を記載すること。また、実験室や閉鎖系における利用実績があれば、別に記載すること。なお、これらについて裏付ける資料を添付すること。

(3) 生理学的及び生態学的特性

a 基本的特性

利用微生物又はその近縁種について、どのような性質の土壤に多く生息しているのか、といった生活形態に関する特性について記載すること。また、炭化水素の資化、窒素固定、重金属の捕獲等、利用微生物に元来備わっている、特記すべき炭素・窒素・リン・硫黄・重金属などの物質循環に係わる性質とその関与の仕方について記入すること。なお、これらについて参考とした資料があれば添付すること。

b 好適生育環境の条件(利用微生物の生存が有利になる又は生存を制限する条件)

利用微生物の生存、増殖が有利になる条件又は利用微生物の生存、増殖を制限する条件はバイオレメディエーション事業にとって重要事項である。

栄養要求性、酸素要求性、温度、光、湿度、pH 等の条件について、科学的知見を記載すること。

(記入例)

微生物は、導入地点付近の土壌を用いた実験系において、乾燥、低 pH (pH4.7 以上)、高温 (42 以上) により、標準培養条件と比べて増殖数及び生残数が著しく低下する。(実験データ添付(略))

c 寄生性又は共生性

他の動植物への寄生性又は共生性について文献等の情報をもとに記載すること。きのこの菌糸やアーバスキュラー菌根菌 (Arbuscular Mycorrhizal Fungi) といった菌根性を有する微生物を利用する場合は、共生性に関する詳細を記入すること。また、線虫捕食菌といった捕食性を有する微生物を利用する場合は、本項に捕食性に関する詳細を記入すること。

d 生活環 (接合、孢子形成等)

生存に有利な孢子形成や真菌の二相性 (接合) といった形態変化等を含む生活環について記載すること。

(記入例) 孢子及びシストは形成しない。

e 病原性 (主要な動植物及び人に対する影響)

「病原性」については、主要な動植物及び人に対する影響の両方を調査し、記載する必要がある。記載に当たっての注意事項等は、以下のとおり。

e-1 影響評価の概要

利用微生物又は利用微生物の分類学上の種に病原性がないこと、及びその根拠を記載すること。この場合、先ず、文献等の十分な調査及びデータベースでの検索を行い、主要な動植物及び人に対する病原性の記載がないことを確認すること。当該利用微生物そのものの情報がない場合は、近縁種において調査すること。

この調査で、もし利用微生物そのものに病原性が知られている情報を得た場合は、その情報を否定する情報が必要となる。また、病原性があったとしても、影響を受ける生物の種、感染経路、病態等について、さらに当該浄化事業計画で主要な動植物及び人に病原性を示し得るかの情報等によっても使用の可否が異なるので、有識者の意見も聴きつつ判断する必要がある。

科学的知見に基づく論理的根拠によって、又は各種実験等を行う等して病原性

を明白に否定できない場合は、原則として、バイオレメディエーションには使用すべきでない。

なお、病原性の有無に係わらず、その判断根拠とした文献名及び参考となるページのコピー、検索に用いたデータベースの名称、検索式、利用した文献や実験結果等を資料として添付する必要がある。

また、分類学上の近縁種において、病原性の情報があった場合は、ケースバイケースになるので、その内容に基づき広範な科学的知見によって判断することとなる。

e-2 情報収集手段

利用微生物に関して、主要な動植物及び人に対する病原性の有無を調査するには、以下のような検索用データベース又は参考文献等を参考とすること。文献等名及びその根拠を記載すること（別添1を参照のこと）。

病原性等の文献・文献検索用データベース

国立感染症研究所の病原体等安全管理規程（平成15年4月改定）

別表1付表1：ヒトに対する病原体のレベル分類

別表1付表2：実験動物の病原体等のバイオセーフティレベル分類（イヌ、ネコ、サル、げっ歯類）

日本細菌学会バイオセーフティ指針付表1の「病原体のバイオセーフティレベル分類」等のバイオセーフティレベル等の情報

（財）バイオインダストリー協会は、「組換え微生物等の産業使用促進情報システム、J B A M：JBA Microorganismと略）」を平成17年4月に一般公開している。この当該システムに関する情報は、カルタヘナ法に基づいた遺伝子組換え微生物の適切な使用への対応を念頭に置いたものであるが、一般微生物の情報を検索するためにも、利便性が高いので参考となる。（URL：

www.jba.microorganism.info）。

e-3 病原性の有無に基づく記載事項

病原性がある場合には参考文献等によりその内容（惹起しうる病名及び感染する種の範囲等）及びその病原性の影響を否定する情報を記載する。これらについては浄化事業実施時における最新のものをを用いること。詳細内容の説明が必要である場合は、適宜、別添資料を付けて説明すること。

なお、科学的知見によって病原性が疑われる情報がある場合は、必要に応じ、これらを否定する情報が必要となる。

病原性はないものの、他の文献等で日和見感染やアレルギー惹起性の報告が

ある場合は、適切な配慮が必要となるため、その旨を記入しその根拠を示す資料を添付すること。この報告がある場合は、乳児、幼児、子供、老人、免疫不全又は免疫抑制状態の人に影響を生じる可能性がある。但し、長期間利用の歴史のある微生物については、適切な措置（従事者の健康状態等の配慮）を執ったうえで病原性のない微生物としての扱いが可能である。

また、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る。

動植物試験の実施に当たっては、利用微生物の種類、浄化区域における生物相、浄化情報と曝露の可能性等を考慮し、最も適した対象生物種を選定して試験を実施する必要がある。感染性、病原性を見るのであれば、微生物の宿主域等の問題があるので幅広い動植物の選択が必要となり、現実的には、病原性について明確に否定するための科学的な証明を行うことは困難を伴うため、既存情報を大いに活用し病原性等が疑われるようなものは利用すべきではない。

また、毒性を見るのであれば、動植物種にさほど左右されずに影響を見ることができるので、適宜、試験方法の例については、別添2の生態系等への影響評価の試験方法の例及び別添3の微生物農薬に関する土壌微生物への影響試験方法の例等を参照すること。

どのような動植物試験が必要かについては、実施する事業者が、利用微生物の性状及び既存情報の存在を踏まえ、不足している情報を得るために適切に試験内容を選択し実施する必要がある。この場合、例として掲げれば、げっ歯類での単回経口投与試験等が代表的なものと考えられ、また、土壌に生息する生物への影響を評価するということからミミズ、トビムシ（別添2を参照のこと）、水中生物影響試験であれば、コイ、ヒメダカ、藻、ミジンコ類等の試験が、毒性スクリーニング試験に一般的に用いられているものである。これらは、生物学的知見の情報量が多く存在すると考えられるので、それらの情報と比較し判断することが可能なことから、一定の安全性の合理的な判断が可能と考えられる（別添2を参照のこと）。

（記入例）

導入微生物である〇〇は、作業区域と類似の環境中に広く分布していることが知られており、下記の文献に、主要な農作物、家畜、家禽、水産物、昆虫、植物、哺乳類、鳥類、水棲生物の病気との関連性は示されていない。また、のデータベースによる検索によっても病気との関連性を示す文献は見いだせなかった（添付資料1：検索式等（略））。地下水の移動方向の湖沼には、稀少魚種は生息しておらず、また、周辺には地下水を灌漑用水として利用する圃場は存在しない。

本事業では 微生物を土壌中に注入すること、微生物はメタンの非存在下では増殖しないことから、陸上動植物への曝露の可能性は極めて低い。しかしながら、万が一導入微生物を含んだ地下水が水系に流入する可能性を考え、利用微生物を用いて水生生物の曝露試験を行った。試験は代表的試験生物であるヒメダカ、ミジンコ、緑藻を用いて実施した。試験の結果、高濃度曝露においても、ヒメダカ、ミジンコの死亡及び行動、形態異常、緑藻類の増殖阻害を示さなかった（添付資料 2：試験結果（略））。（利用文献（略））

f 有害物質の産生性（主要な動植物及び人に対する影響）

有害物質の産生性（主要な動植物及び人に対する影響）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有害物質産生性の有無及びその根拠を記入すること。有害物質の産生性がある場合には、その物質の名称と主要な動植物や他の微生物を減少させる性質があるかどうかを記載すること。記入要領の詳細については、「e. 病原性」の解説で示した内容を参考とすること。

調査に当たっては、まずは、文献等の十分な調査し、主要な動植物及び人に対する有害物質を産生する性質の記載がないことを確認する。当該利用微生物そのものの情報がない場合は、近縁種において調査する。

g 利用微生物の特性に応じて、その他必要な情報

a. ~ f. の情報以外で生態系影響評価に必要な情報があれば記載すること。

(4) 利用微生物の検出及び識別の方法並びにそれらの感度、特異性及び信頼性

利用微生物を選択的に検出及び識別する方法は、導入微生物の事後管理という観点から重要である。具体的な方法については、別添 4を参考にし、必要に応じ、近年の微生物解析技術を踏まえること。

2 浄化技術の情報

計画している浄化技術について、以下に掲げる情報を収集すること。収集に当たっては、まず、文献等既知の情報の十分な調査を行い、情報が不足している場合には、必要に応じ、実験室等で利用微生物等を使用し、結果を収集すること。

以下の情報収集は、まずは、文献等の既知の情報の十分な調査を行う必要があるが、情報が不足している場合は、必要に応じ、実験室等での使用の結果を収集する。

ラボスケールでの酸素消費速度や汚染物質分解速度等の測定が実施されていればその結果を示すこと（例えば、ビーカー試験、カラム試験、やや大規模なも

のではライシメーター試験（「トリータピリティ試験」と称されている。）の結果等）。

この場合、浄化現場ごとの現場パイロット試験を実施するということを意味しているわけではない。

(1) 浄化技術の内容

利用微生物の土壌、地下水等への導入方法及び導入条件並びに基本的な技術的原理。

利用微生物の土壌、地下水等への導入方法及び導入条件並びに基本的な技術的原理について記載すること。

対象場所において複合汚染が生じている場合は注意が必要である。例えば、汚染対象物質の分解生成物や微生物自身が産生する有機物が、土壌中の水分への重金属の溶出を促進し、その汚染範囲が拡大される可能性もある。

（記入例）

利用微生物は、井戸より揚水した地下水に混合した上で、揚水井戸とは別に設置した注入井戸からその混合物を注入することにより、対象土壌及び地下水に導入する。導入条件は、導入する利用微生物の濃度は cells/ml で、導入頻度は3時間置きに 1/分の流量で1時間の間欠注入とする。したがって、1日当たりの利用微生物の最大導入量は cells（利用微生物を含む地下水導入量 1/日）である。

なお、本技術は、利用微生物が土壌・地下水中のアルコールや糖、有機酸などを電子供与体として利用し、有機塩素化合物が電子受容体として働くハロゲン呼吸により、塩素が水素に置換されるという原理を利用したものである。これにより、テトラクロロエチレンからトリクロロエチレン、ジクロロエチレン、塩化ビニル、エチレンへと脱塩素化が行われ、有機塩素化合物による汚染が浄化される。

(2) 分解生成物、分解経路等

想定される分解生成物の有無及び分解経路について、文献等既知の情報の調査又は実験室等での利用微生物の使用の結果により確認すること。分解生成物の存在が認められる場合には、その性状を調査すること。なお、浄化対象物質以外の汚染物質がある場合、その物質の性状等を調査すること。

文献等の情報及び実験データをもとに、分解経路を記載すること。また、分解生成物の有無を調査し、分解生成物がある場合には、その名称、物理化学的性質、有害性の有無、分解生成物の残留性を明らかにすること。なお、分解生成物（必要に応じ、中間生成物）が有害性を持つ場合は、その条件と推定発生量、生

態系等への環境影響、作業区域外への拡散の防止措置、並びにその分解生成物の処理方法について具体的に記載すること。また、作業区域について、浄化対象物質以外の汚染物質が共存する場合には、その物質の分解生成物及び残留性についても記入すること。なお、判断根拠となった資料や実験データについては添付すること。

特に、分解生成物及び中間生成物が毒性等を有する場合は、その分解等に伴い、二次的な汚染が生じておらず、環境安全性が十分に担保されているかについて考慮する必要がある。例えば、トリクロロエチレンの処理は、嫌気下で行うと、発ガン性物質ビニルクロライドの中間生成物が生成される可能性がある。対策として、分解処理時には好氣的条件を維持管理し、ビニルクロライドの生成を未然に防止する等の措置が必要となる。

(記入例1) 推定される対象物質の代謝経路(別紙 参照)

- | |
|--|
| (3) 作業区域における利用微生物の特性等 |
| a 生存能力、増殖能力及び生残性 |
| b 拡散の特性 |
| c 分離源区域と作業区域の生存環境の比較、作業区域における増殖促進等のための条件 |
| d 他の微生物群集への影響 |

a) 生存・増殖能力及び生残性

実験結果、文献等をもとに、作業区域における利用微生物の生存特性及び増殖能力特性に関する情報を記載すること。利用微生物の生存、増殖を制限しうる条件(湿度、pH、温度等)があれば記載すること(第三章 第一 (3)b 好適生育環境の条件を踏まえて記載すること)。

(記入例1)

導入地点付近の土壌を用いた実験系において、環境条件を設定して1g乾土当たり1億個の利用微生物を接種したところ、生存菌数は速やかに減少して約50日後に1g当たり10個未満となった。一方、同一の系に対象物質 を定期的に(2週間間隔)に施用すると1g乾土当たり100万~1000万個程度の菌数で推移した。したがって、微生物の元来の増殖・生存率は低いが、対象物質 を選択圧として増殖・生存性を高めることが出来ると考えられる。利用微生物の増殖・生残特性もこれに準ずると考えられる。(実験データ添付(略))

(記入例2)

利用微生物は、導入地点付近の土壌を用いた実験系において、乾燥、低 pH (pH4.7 以下)、高温 (42 以上) により、標準培養条件と比べて増殖数及び生残数が著しく低下する。(実験データ添付(略))

(記入例 3)

利用微生物は、対象物質 の存在する土壌への導入直後に増殖したが、の分解に伴い減少し、×週間後には に示す方法での検出限界以下 (10^2 cells/l 以下) となっていた。したがって、利用微生物は作業区域においてわずかに生残するとしても の存在しない状態では増殖するとは考えがたい。

b) 拡散の特性

実験結果、文献等をもとに、作業区域及び周辺における利用微生物の拡散媒体 (生物、水、土壌等) 及び拡散状況 (拡散速度と方向など) 等挙動について記載すること。孢子を形成して、拡散する可能性がある場合は、その旨記載すること。

(記入例)

本事業では利用微生物を直接地下水中に注入するため、地下水が拡散媒体となる。現場において地下水は測定の結果、南南東に向かって cm/day の速度で移動している。(実験データ添付(略))

c) 分離源区域と作業区域の生存環境の比較、作業区域における増殖促進等のための条件

微生物を導入しようとしている作業区域における生息環境と、元々の分離源区域における生息環境を比較すること。

利用微生物の生息に対して選択的に働く条件がある場合には、その条件の内容を記載すること。また、作業区域とその周辺の環境が、その条件を満たす可能性があるかについて検討し、記載すること。

(記入例)

利用微生物は で汚染された運河から分離されたものである。導入地点付近の地下水も で汚染されており、気候的にも採取源の環境と大きな違いはない。導入微生物は が存在しない環境では生残力は強くないが、 が存在する場合は選択的に有利に生残出来ることが示されている。(文献参照(略)) 導入場所では $\times\times$ mg/l の が存在する。しかし、作業区域の周辺では、 は検出されていない。(資料参考(略))

d) 他の微生物群集への影響

「他の微生物群集への影響」とは、利用微生物による生存環境の競合又は有害物質の産生等により、他の微生物群集への生育阻害の影響等を与えることによる組成の変化をいう。この変化によって、本来あるべき土壌等としての機能が失われ、かつ、その状態が長期に渡って継続的に維持されることが予想されるかどうか、すなわち、生態系の基盤を変化させることを通じて、間接的に主要な動植物の生育環境等への影響を与えたどうかを評価するため、この情報を収集し、記載すること。なお、この影響評価の実施方法は、「第三章 第二 2 . 生態系への影響評価の実施方法 (1) 他の微生物群集への影響」を参照すること。微生物群の株ごとに影響を評価するのではなく、微生物群のマクロの組成として捉え評価することとなる。

(4) 栄養物質等を添加する場合は、その情報

- a 名称 (CAS 番号)、化学構造式、分子量
- b 性状、分解性及び毒性等安全性
- c 導入の目的
- d 導入量、導入濃度及び導入頻度
- e 環境基準又は既存の法律等による規制等に関する情報
- f 二次的な汚染の可能性がある場合は、その情報 (物質名、毒性、予想される残留性、残留濃度、拡散性等)
- g その他副次的な影響

利用微生物とともに、栄養物質等を添加する場合、使用する化学物質は、開放系で使用するものであることから、物理化学性状及び分解性、毒性等の性状において、明らかに安全性が高いものとして情報が豊富なものを使用し、多少でも疑わしいものはその使用を差し控えるべきである。

使用される栄養物質等が食品衛生法等他の法律で使用が認められているものである場合、又は自然界に豊富に存在する場合等は、その情報を記載すること。また、栄養物質の添加による浄化対象物質や分解生成物の拡散の可能性等二次的な汚染の可能性も記載すること。

例えば、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、二次的な汚染の可能性も検討すべきである。

a) 栄養物質等の名称 (CAS 番号)、化学構造式、分子量

添加する栄養物質等を特定するために、名称、CAS 番号、化学構造式、分

子量を記載すること。

栄養物質等には、栄養物質の他、界面活性剤等（緩衝剤、キレート剤、酸化還元剤等）を含む。また、微生物の培養には合成培地が使用され、その合成培地は、微生物と同時に導入されるのが通常である。この場合、合成培地について、一般的なものであればその名称を、特殊なものであれば、その内容（炭素源、誘導物質、無機塩、trace element 等）を記載すること。

なお、該当する物質が混合物である等、CAS 番号、化学構造式で表せないものについては、その旨を明記するものとする。

（記入例 1）

注入物質：IUPAC 名：リン酸二水素カリウム（慣用名： ）
CAS 番号：7778-77-0
化学構造式： KH_2PO_4
分子量：136.09

（記入例 2）

注入物質：IUPAC 名： （慣用名： ）
CAS 番号、化学構造式、分子量については「混合物」につき示せない。

b) 性状、分解性及び毒性等安全性

栄養物質等の性状、分解性及び毒性等安全性について、情報をその出典とともに記載すること。

（記入例）

性状：粘性のあるゲル状物質
分解性：環境中で容易に分解される
半減期（大気） 時間¹⁾、半減期（水中） 時間²⁾、
半減期（土壌） 時間³⁾
（ 1 ） 2 ） 3 ）：分解条件等及び出典を明記すること。）

c) 導入の目的

「利用微生物の活性化を促進するため」等、根拠を示しつつ、添加する栄養物質等の導入の目的を記載すること。

d) 導入量、導入濃度及び導入頻度

栄養物質等の導入量、導入濃度及び導入頻度について記載すること。

(記入例)

導入濃度： mg/l、地下水中初期濃度： mg/l、導入量： x g/日、導入頻度：
1回/12時間

e)環境基準又は既存の法律等による規制等に関する情報

土壤汚染に係る環境基準や地下水の水質汚濁に係る環境基準のほか、化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）、土壤汚染防止法、水質汚濁防止法、特定化学物質の環境への排出量の把握及び管理の改善の促進に関する法律（PRTR法）等の関係法令等において規定された事項を記載すること。また、例えば食品衛生法で食品添加物として認められているなど、安全性に関連する他の事項があれば併せて記入すること。

(記入例)

法令、基準等	規定事項
土壤環境基準	対象物質に指定されていない
地下水環境基準	対象物質に指定されていない
化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律	第2種特定化学物質に指定されている
水質汚濁防止法	特になし
・・・	

f)二次的な汚染の可能性がある場合は、その情報（物質名、毒性、予想される残留性、残留濃度、拡散性等

二次的な汚染とは、利用微生物や利用微生物と同時に導入する栄養物質等が残留、代謝される結果、生態系及び人にとって許容できない影響が生じることをいう。なお、この場合、二次的な汚染による影響は、栄養物質等の添加によって、当然ながら生態系も変化することになるが、この場合、(3) dと同様に微生物群のマクロの組成として捉えて影響評価を行うこととなる。

二次的な汚染の可能性のある物質を用いる場合には、その物質名を記載し、有害性、導入時の濃度、導入量、残留性及び作業区域での拡散性等について記載すること。また、汚染を未然に防ぐための対応については、第二章 4.安全管理の方法「栄養物質等の拡散防止対策」に記載すること。

(記入例)

土壤中の有機汚染物質を土壤粒子から遊離させて地下水相に移動させ、パイ

オレメディエーションによる浄化効果を向上することを目的として、界面活性剤 A を利用する。ただし、有機汚染物質の拡散を招く可能性が考えられる（拡散防止対策（事業計画書に記載）は別途実施）。

- ・物質名：IUPAC 名： （慣用名：界面活性剤 A）
 - ・有害性：ADI mg/kg/day¹⁾, NOAEL mg/kg/day²⁾, NOEL mg/kg/day³⁾
- <データ出処>

1) WHO INCHEM JMPR

2), 3) ATSDR Toxicological Profiles Agency for Toxic Substances

(<http://www.atsdr.cdc.gov/toxpro2.html#Final>)

ここに示した有害性の指標は一例。毒性情報は、公知の既存情報を調査の上記載すること。

- ・導入時の濃度： mg/l
- ・導入量： l/min で 時間注入
- ・残留性：土壌中で 日で半減
- ・作業区域での拡散性：地下水の移動とともに拡散するため、 mm/day の速度で の方角へ移動すると考えられる

g) その他副次的な影響

その他、栄養物質等を添加することによる副次的な影響が想定される場合には、その内容を記載すること。

(記入例)

栄養物質 を導入した場合、土壌・地下水の pH が弱酸性に変化する可能性がある。この際、対象地域の土壌・地下水中に含有される重金属の溶解度が変わる可能性が考えられる。そのため、溶出が懸念される物質をモニタリング項目として設定する。

3 作業区域及びその周辺の情報

作業区域及びその周辺について、以下に掲げる情報を収集すること。作業区域を限定しない場合においては、浄化事業の適用条件を具体的に想定して情報を収集すること。

作業区域を限定しない計画の場合は、適用条件を具体的に想定して、記載する。収集すべき情報は当然ながら個別の限定された場所よりも多くなる。

(1) 作業区域等の特徴

a 位置

作業区域の位置、周辺状況等。

b 現場における汚染原因等

汚染原因、現在の汚染状況等。

c 水文地質学的特性

作業区域及びその周辺の水文学的特性（帯水層の分布、地下水の水位等）及び地質条件（土壌種、有機物含量、物理・化学特性等）。

d 生息又は生育する主要な動植物

作業区域及びその周辺に生息又は生育する主要な動植物。特に、保護の対象となる動植物及び利用微生物の病原性又は毒性によって影響を受けやすいことが知られている動植物については、詳細な情報。

e 土地利用の状況

作業区域及びその周辺の土地利用の状況について、工業地、商業地、住宅地等の別。在住人口及び労働人口についての情報。河川水及び地下水の飲料用水、工業用水、灌漑用水等としての利用の状況についての情報。

f その他作業区域周辺の特徴

以下の a), b) に関しては、第二章 3 に記載されていれば、その旨を記載し省略できる。

a) 位置

作業区域についての位置・周辺状況などをまとめて簡便に図示すること。また、作業区域が地下に及ぶ場合にはその位置も図示すること。

b) 現場における汚染原因等

汚染物質の発生原因及び現在の状況などを記載すること。必要に応じ現場の汚染状況等を示す図を添付すること。

(記入例)

現場 A は、 年以來廃棄物保管庫として 年まで使用された。その際、廃棄物中に含有されていたジクロロエチレン、トリクロロエチレン等を含む有機溶剤や、鉛、カドミウム等の重金属が保管庫の床面の亀裂部分等を通じて地下浸透し、現場の土壌及び地下水の汚染を引き起こした。

対象地の土壌及び地下水の汚染調査の結果、面積 m^2 、深さ m に及ぶ有機系塩素化合物及び重金属汚染が確認され、遮水壁を不透水層まで打設することにより、汚染の拡散を防止している状況である（図省略）。

c) 水文地質学的特性

利用微生物、栄養物質等、浄化対象物質の拡散性を考慮するときに必要となる情報である。

作業区域の地質条件、帯水層の分布、地下水の水位、流向、流速、地層の透水係数について記入すること。この際、時間的要素による変動がかなり想定される場合には、その条件、予想される影響について記入すること。必要であれば、地下水の成分分析表を添付すること。

(記入例) 作業区域における水文地質学的特性については以下のとおり。

・地質条件：土壌種 関東ローム

GL ~ GL- m：砂礫層（礫分 %、砂分 %、シルト分 %、粘土分 %）

GL- ~ m：砂層（礫分 %、砂分 %、シルト分 %、粘土分 %）

GL- m 以深：粘土層（礫分 %、砂分 %、シルト分 %、粘土分 %）

均等係数 、曲率係数 、強熱減量 %、日本統一土質分類 、有機物含量 %、含水比 %、pH 、土粒子密度 g/cm^3 、吸着係数

GL は Ground Level (地表面)

・帯水層の分布：GL - m、 m において二つの帯水層が存在

・地下水の水位：第一帯水層 GL - m、第二帯水層 GL - m

・地下水の流向：汚染源（旧廃棄物保管庫）より北北西の方向

・地下水の流速： mm/day

・地層の透水係数： mm/sec

・地層の透気係数： mm/sec

上記に関する参考図及び地下水の成分分析表を示す（別添資料参照）

(注) 上記の水文地質学的特性の記入例は参考項目であり、その他必要な項目について適宜記入すること

d) 生息又は生育する主要な動植物

作業区域及びその周辺に生息又は生育する主要な動植物について記載。保護の対象となる生物種、及び利用する微生物の病原性又は毒性によって影響を受けやすいことが知られている生物種については、特に詳細な情報を記入すること。なお、利用微生物の主要な動植物の病原性等の調査によって、何も情報が得られていない場合は、その旨を記入すること。

e) 土地利用の状況

土地利用の状況によって浄化事業の自然環境への影響度合いも異なると考えられることから記載するものである。

作業区域の土地利用の状況について、工業地域、商業地、住宅地などの別について記入する。また、作業区域が住宅地にある場合は在住人口、工業地域などの場合には労働人口などについて記入する。さらに河川・湖沼の有無や地下水の利用（上水、工業用水、灌漑用水としての利用や、作業区域周辺の住民の生活用水又は飲用水としての利用）などの有無についても記入する。

f) その他作業区域周辺の特徴

作業区域周辺地域について、特筆すべき事項があれば記載すること。

(2) 浄化対象物質の情報

浄化対象物質の名称（CAS番号）、化学構造式、分子量、性状、分解性、毒性等安全性の情報。また、環境基準又は既存の法律等により当該物質に関する規制等がある場合には、その基準値等参考となる情報。

浄化対象物質を特定するために、CAS番号、化学構造式、分子量を記載すること。その際、当該物質の性状、分解性、毒性等の安全性等の情報を記載すること。当該物質が混合物である場合は、その旨を記載すること。また、既存の法規等（土壌汚染に係る環境基準や地下水の水質汚濁に係る環境基準の他、化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）、土壌汚染対策法、水質汚濁防止法、特定化学物質の環境への排出量の把握及び管理の改善の促進に関する法律（PRTR法）等の法令等）により当該物質に関する規制等がある場合にはその基準値等参考となる情報をその根拠となる文献等とともに記載すること。

（記入例）IUPAC名：1,1,2-トリクロエレン（慣用名：トリクロエレン）

分子量：131.39

構造式：CHCl=CCl2

CAS番号：79-01-6

毒性等安全性の情報：適宜、既存情報を添付すること。

法令、基準等	規定事項
土壌環境基準	0.03mg/l 以下
地下水環境基準	0.03mg/l 以下
化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律	第2種特定化学物質に指定されている
水質汚濁防止法	0.3mg/l 以下
・・・	

(3) 汚染状況

浄化場所に存在する浄化対象物質の、水平分布及び垂直分布に関する情報。浄化対象物質以外の汚染物質がある場合は、その水平分布及び垂直分布に関する情報。

利用微生物の導入予定場所に存在する浄化対象物質の分布状況を示すこと。共存する汚染物質がある場合は、同様に示すこと。浄化対象物質及び共存汚染物質の水平分布、垂直分布を示すこと。必要に応じ、図を添付すること。

(記入例)

利用微生物の導入が予定される場所に存在する浄化対象物質の状況は、以下のとおり。

- ・垂直分布濃度：最高 mg/kg ~ 最低 mg/kg、(平均) mg/kg (GL ~ GL- m 程度)
- ・水平分布濃度：表層汚染物質濃度： mg/kg 地下 (m)：最高 mg/kg (GL - m 程度)

第二 生態系等への影響評価の項目及び実施方法

1 生態系等への影響評価の項目

事業者は、第一に掲げる評価に必要な情報を用いて、以下に示す評価の項目ごとに、評価を行うこと。

第一 評価に必要な情報で収集した、利用微生物の情報、浄化技術の情報、作業区域及びその周辺の情報を用いて、以下の項目ごとに評価すること。

(1) 利用微生物が浄化作業の終了後に増殖する可能性。必要に応じ、作業区域外への影響に配慮した効果的な措置。

第一 1 利用微生物の情報等で収集した情報を使用して、評価すること。浄化作業の終了後とは、設定した浄化目標達成後のことをいう。

「必要に応じ、・・・効果的な措置」とは、利用微生物の生態系等への影響の評価の結果を勘案して決められるものであって一律なものではないということに留意すること。例えば、当該利用微生物が過去長期間、非常に広範に使用されており、使用実績が高いものである場合、又はその逆で使用実績が低いものの場合によって、拡散防止措置を執る必要の程度が異なることとなる。

第5章 3 .にあるように、「生態系等への影響の評価に際して勘案した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ているもの」であるか否かについてケースバイケースの弾力的な判断が必要となる。

(2) 作業区域における他の微生物群集への影響。

情報の収集は、第三章 第一 2 . 浄化技術の情報、(3)を参照のこと。
生態系等への影響評価の実施方法は、後述する 2 . を参照のこと。

バイオオーグメンテーションの様々な作業を実施すれば微生物群集への影響は少なからず生じると考えられることから、浄化後の他の微生物群集の変化そのものによって生態系等への影響を評価することは困難と考えられる。

したがって、ここでは、全体としての土壌等の重要な機能に影響を及ぼしているかどうかを評価することとした。具体的には生存環境の競合又は有害物質の産生等により、導入微生物が他の微生物の生育を阻害し、生態系の基盤を大きく変化させることを通じて、間接的に主要な動植物の生育環境等への影響を与える性質等を評価する。

(3) 作業区域及びその周辺における主要な動植物及び人に対する、利用微生物の病原性、有害物質の産生性その他有害な影響を及ぼす可能性。必要に応じ、生態系等への影響に配慮した効果的な措置。

(4) 浄化作業に伴う浄化対象物質（必要に応じ、中間生成物を含む。）の拡散の可能性。必要に応じ、作業区域外への影響に配慮した効果的な措置。

(5) 浄化作業に当たって栄養物質等を添加する場合は、浄化作業の終了後の当該物質の有意な残留の可能性。必要に応じ、作業区域外への影響に配慮した効果的な措置。

(6) 浄化作業の終了後の有害な分解生成物等の有意な残留の可能性。必要に応じ、作業区域外への影響に配慮した効果的な措置。

(3)～(6)は、第一での利用微生物の情報、浄化技術の情報、作業区域及びその周辺の情報を用いて評価すること。また、必要に応じて、作業区域や作業区域外への影響に配慮した効果的な措置を講ずること。

例えば、汚染土壌や地下水脈による、利用微生物、浄化対象物質、栄養物質等及び分解生成物の作業区域への拡散や残留、流出等の可能性がある場合には各々の生態系等への影響評価を踏まえて、それらを防止するための効果的な措置を執る必要があり、この内容を記載すること。

「必要に応じ、生態系等への影響に配慮した効果的な措置とは」、そもそも利用微生物は生態系への影響がない安全な微生物を使用していることが原則であるが、安全性の高い管理で万全を期すという観点から、当該措置が必要とされることとなる。

また、例えば、(5)の栄養物質等の添加においては、窒素、リン使用の場合は農業において長期にわたり利用されてきた歴史があり、このような使用実績も

踏まえて、各々の生態系等に対する影響評価に応じた効果的な対策を考慮する必要がある。

2 生態系等への影響評価の実施方法

生態系等への影響評価の実施方法としては、1の(1)から(6)までに関係する既知の情報を十分に収集し、活用した上で行うこと。

なお、情報が不足している場合には、必要に応じ、実験室等での利用微生物等の使用の結果を収集して行うこと。

また、必要に応じ、以下に定めた評価の実施方法に沿って評価を行うこと。

- (1) 1の(2)中、他の微生物群集への影響は、浄化作業終了時点において、利用微生物により他の微生物群集が影響を受けたことによって、本来あるべき土壤等としての機能が失われ、かつ、その状態が長期間継続的に維持されることが予想されるかどうかを評価する。この場合、作業区域に類似した土壤等を選定し、当該土壤等の物質循環に深く関与している微生物のうち特定の種を選定して評価し、又は適切な手法によって得られた微生物群集の構成変化(プロファイル変化)に基づき評価する。微生物の特定の種を選定して評価する場合は、一般細菌、硝化菌、脱窒菌等を選定して当該菌数の増減を測定し、又は土壤の呼吸活性(例えば、二酸化炭素発生量)、硝化活性、脱窒活性等を測定することによって評価する。
- (2) 1の(3)中、主要な動植物に対する有害な影響は、作業区域及びその周辺で影響を受ける可能性のある動植物の種を選定して、受ける影響の具体的内容及び影響の生じやすさについて評価し、生態系への影響が生ずるおそれの有無について評価する。

生態系等への影響評価の実施する方法について、説明が必要と考えられる二つのものとして、「他の微生物群集への影響」及び「主要な動植物に対する有害な影響」について規定している。

(1) 他の微生物群集への影響

(1)-1 影響評価の実施方法

他の微生物群集への影響評価にあたっては、まずは、既知の情報を十分に収集し、活用すること。影響評価に資する既知の情報が不足している場合は、必要に応じ、作業区域の土壤等を用いて実験室等での模擬浄化試験を行い、微生物群集の構造変化(プロファイル(菌叢)変化)を把握し、その結果によって生態系等への影響を評価すること。

浄化作業に伴う汚染物質の減少、外来の微生物の導入又は栄養物質の添加等によって、汚染土壤等と修復された土壤等では微生物群の組成は当然ながら変化す

るため、浄化後にどのような生態系を求めるかを参照する土壌等が必要となる。そこで、まずは、作業区域に類似した土壌等を選定することになる。この土壌等と比較し、修復された土壌について、当該土壌等の物質循環に深く関与している微生物のうち特定の種を選定して評価し、又は適切な手法によって得られた微生物群集の構成変化（プロファイル（菌叢）変化）に基づき評価する。

微生物の特定の種を選定して評価する場合は、一般細菌、硝化菌、脱窒菌等を選定して当該菌数の増減を測定し、又は土壌の呼吸活性（例えば、二酸化炭素発生量）、硝化活性、脱窒活性等を測定することによって評価する判断情報とする。

微生物群集の構成変化（プロファイル（菌叢）変化）とは、別添 4 の利用微生物の検出及び識別方法に示したような分子生物学的手法等により、浄化地域に生息する微生物の種類及び量等の微生物群集構造の変化について経時的に把握したものを指す。具体的には、実際の浄化作業に即した模擬的な試験を実験室レベルで実施し、浄化前、浄化途中、浄化終了後に試料のサンプリングを行い、各サンプルの微生物群集構造を把握する。なお、浄化途中のサンプリングについては、1度ではなく、可能な限り複数回のサンプリングを実施する。微生物群集構造（プロファイル（菌叢））を経時的に比較することによって、浄化開始から浄化終了後において微生物の種類及び量等について、どの程度の変化があるかを調査することとなる。

また、影響評価の対象となる微生物については、一般細菌を広く網羅するようにし、可能な限りにおいて硝化菌や脱窒菌等の物質循環に係わる菌の増減についても調査する。

なお、上記のような試験を実施した場合はその試験内容、試験結果（写真やデータなど）を資料として添付すること。

(1)-2 影響評価に当たっての情報の収集方法

影響評価に当たっての情報の収集方法としては、まずは、関係する既知の情報を十分に活用して行うことになる。病原性のない微生物は、近縁の種を含めて、基本的な生理学的特性を収集することが重要となる。

情報が不足している場合は、必要に応じ、実験室等の結果等を収集して行うことになるが、既知の情報収集において不足している事項について、実験室等の結果において補完をすることとなる。

実験等の場合、別添 3 の微生物農薬に関する土壌微生物への影響評価方法や、別添 4 の微生物群集の各種解析手法を適宜参考にすること。また、評価の根拠となる実験データを添付すること。

(1)-3 影響評価の判断方法

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、一般的には浄化作業以前とは異なる微生物分布となる。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がある。したがって、評価の実施に際しては、作業に用いた利用微生物の異常な増加がなく、かつ作業区域に類似した土壤等との比較において、他の微生物群集についてマクロの組成において異常な減少等がないことを確認するとともに、作業区域及び土壤の特徴等のその他の情報を活用し、総合的に判断することが重要となる。

(2) 主要な動植物に対する有害な影響

間接的に主要な動植物の生育環境等への影響を与える性質等を評価する。「主要な動植物に対する有害な影響」は、作業区域及びその周辺で影響を受ける可能性のある動植物の種を選定して、受ける影響の具体的内容及び影響の生じやすさについて評価し、生態系への影響が生ずるおそれの有無について評価する。動植物に関する既知の情報は、現時点少ないものの、人に対する病原性情報も参考にしつつ、第三章第一(3) e で収集した情報を最大限活用して判断する。

第四章 浄化事業の実施及び終了

第一 浄化事業の実施

事業者は、生態系等への影響評価書を踏まえ、浄化事業計画書の内容に従って、適切な安全管理の下に浄化事業を実施すること。

第二 モニタリングの実施

浄化事業計画に基づき、浄化事業期間内に、以下に掲げる項目についてモニタリングを実施すること。

- 1 浄化対象物質
- 2 利用微生物（必要に応じ、他の微生物を含む。）
- 3 分解生成物（必要に応じ、中間生成物を含む。）
- 4 栄養物質等
- 5 浄化事業の内容に応じて、その他必要な事項

第一 浄化事業の実施

浄化事業計画書の内容にのっとり、事業が実施されることが重要である。

浄化事業を行う者が浄化事業の依頼者と異なる場合は、浄化事業者は、当該依頼者の協力を得つつ、浄化事業に当たることが望まれる。

第二 モニタリングの実施

モニタリングは、浄化事業計画の内容に従って、浄化事業期間内に適切な安全

管理の下に浄化事業の実施がなされているか否かについて確認するために行うものである。

モニタリングは、浄化作業中に使用する、利用微生物の増殖の可能性、栄養物質の分解性、浄化対象物質の分解性等に応じて、項目や実施期間が変わるため、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べきである。モニタリングは、できる限り定量的な方法を用いるものとする。

なお、「5 .その他必要な事項」については、以下のような項目が掲げられる。
(例示：その他必要な事項)

- ・トリクロロメタンの浄化の際に、栄養物質を入れることにより、土壌・地下水の pH が変わり重金属の溶解度が変化する可能性
- ・複合汚染がある場合、浄化対象物質以外の汚染物質の挙動
- ・呼吸活性などの土壌の微生物活性
- ・希少種の存在状況等、対象区域周辺の生態系（主要な動植物等）への影響等

生態系への影響のモニタリングの方法については、その生態系の指標となる生物を選定して行うこと等が考えられる。

第三 浄化事業の終了

浄化事業計画に定めたモニタリングの実施方法及び浄化事業の終了方法に従って、以下の1から5までについて第二のモニタリングの実施によって確認してから浄化事業を終了すること。

- 1 浄化対象物質が、浄化作業の終了後に浄化目標濃度に達したこと
- 2 利用微生物が、浄化作業の終了後に増殖し、又は高濃度に残留しないこと
- 3 分解生成物が、浄化作業の終了後に有意に残留しないこと
- 4 栄養物質等が、浄化作業の終了後に有意に残留しないこと
- 5 この他、浄化事業計画に定めた事項が遵守されていること

浄化事業の終了に当たっては、対象物質及び分解生成物の濃度、利用微生物の生残数、並びに栄養物質等を導入した場合はその濃度等についてモニタリングを行い、上記1～5における事項が満たされていることを確認する必要がある。

特に、2については、作業区域における事業終了時には、生態系等に許容できない影響を及ぼさないと判断される生残数等の終了判定基準までに微生物が減少し、かつ、それを維持していることを確認する必要がある。

「モニタリングの実施によって確認してから浄化事業を終了すること」とは、必ずしも、最終的な実測を意味するものではない。理由を付すことにより、浄化作業終了時の情報を用いて浄化事業の終了を行うことができる。例えば、利用微生物の生残性に関して、あらかじめ栄養物質等が枯渇することや、生存を制限す

る条件（湿度、pH、温度等）等の科学的な情報により、経過時間とともに微生物が減少することが説明されれば、作業途中のモニタリングによる情報をもって、浄化事業を終了することも可能である。

第五章 経済産業大臣及び環境大臣による確認

事業者は、バイオオーグメンテーションを実施する際、浄化事業計画が本指針に適合しているか否かについて、広範かつ高度な科学的知見に基づいた判断を必要とすることから、経済産業大臣及び環境大臣へ確認を求めることができる。事業者は、経済産業大臣及び環境大臣の確認を受けようとする場合には、生態系等への影響評価書とともに、氏名及び住所並びに浄化事業計画を記載した申請書を経済産業大臣及び環境大臣に提出すること。

経済産業大臣及び環境大臣は、以下に掲げる観点から、生態系等への影響評価書が添付された浄化事業計画書の内容が、本指針に適合しているか否かについて、確認を行うこととする。

1 生態系等への影響評価書に照らし、浄化事業計画に従って浄化事業を行った場合に生態系等に影響を及ぼすおそれがないことについて十分な科学的知見に基づき適正に評価されたと認められる浄化事業計画であること。

2 利用微生物の特性又は浄化事業計画の内容及び方法に応じ、既知の十分な情報又は実験室等での利用微生物等の使用の結果を収集することにより、生態系等への影響を評価するための必要な情報が得られていること。

3 利用微生物の特性又は浄化事業計画の内容及び方法に応じ、生態系等への影響の評価に際し勘案した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。

なお、経済産業大臣及び環境大臣は、確認の日以降の科学的知見の充実により、確認を受けた浄化事業計画に従って浄化事業が行われる場合においてもなお生態系等への影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、確認を取り消すとともに、必要に応じ、その知見について関係者へ周知する。

第5章-1 概要

浄化事業計画が指針に適合しているか否かについて、広範かつ高度な科学的知見に基づいた判断が必要であることから、経済産業大臣及び環境大臣は、事業者の求めに応じ、事業者の作成した浄化事業計画が、本指針に適合しているか否かについて確認することとしている。

この確認は、生態系等への影響評価書の評価結果を踏まえた浄化事業計画書が、指針にのっとって適切に作成されたものであるか否かの観点から行うものである。

第5章-2 実施場所について

国による確認については、浄化事業を個別に限定した場所で行う場合又は浄化事業の適用条件を想定した上で未確定の複数の場所で行う場合の両方について、申請することができる。

申請内容に応じて、個別の場所又は複数の場所において、浄化事業が適用可能か否かの審査かなされることとなる。複数の場所への適用について国の確認を受けた場合は、審査時の内容に適合している限り、国の確認が有効であるということになる(ただし、審査結果によっては、必要に応じて、条件を付す場合がある)。

なお、浄化事業の適用条件が、申請時における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、情報の追加等をして新たに申請を行うことが必要になる。

第5章-3 確認申請書の提出先について

事業者が浄化事業計画書の確認を国に求める場合は、様式1に基づき申請書を作成し、生態系等への影響評価書とともに、経済産業省又は環境省に正本2通、副本2通を提出すること。

第5章-4 有識者からの意見聴取

経済産業大臣及び環境大臣は、浄化事業計画の確認に当たって、専門的な科学的知見を有識者から意見聴取を行う。

第5章-5 標準処理期間について

確認申請の標準処理期間は、申請書が経済産業大臣及び環境大臣に提出され、受け付けた日から、6ヶ月とする。但し、申請書の不備を申請者が修正等する期間及び有識者の意見に基づき必要となった追加的情報を申請者が調査し、提出する期間等があった場合は、これを超えることがある。

第5章-6 申請書の内容の一部変更届出

確認の後、申請内容に変更（軽微な変更は除く）があった場合は、あらかじめ経済産業大臣及び環境大臣に様式 2 に基づき届け出ること。

また、住所、代表者等の変更は、様式 3 に基づき届け出ること。

第六章 留意事項

第一 緊急時の対応及び事故対策

事業者は、浄化事業の実施中に、生態系等に影響が及ぶおそれのあることを示すモニタリング結果が得られた場合又は事故が発生した場合には、生態系等への影響を防止するために必要な措置を講じること。また、経済産業大臣及び環境大臣による確認を受けている場合にあっては、生態系等に影響が及ぶおそれのあることを示すモニタリング結果が得られた旨又は事故が発生した旨を速やかに経済産業大臣及び環境大臣に連絡すること。

施設の破損等によって適切な拡散防止措置が執れなくなる等、生態系等に影響が及ぶおそれが生じた場合は、直ちに事故についての応急の措置を執るとともに、国の確認を受けている場合は、速やかにその事故の状況及び執った措置の概要を経済産業大臣及び環境大臣に連絡し、事故における連絡体制の整備を行うよう努めること。

具体的には、浄化事業の実施中に、生態系等に影響が及ぶおそれのあることを示すモニタリング結果が得られた場合に、汚染物質や利用微生物等の拡散を防止するために、防水堤を設置したり、遮水シートを設置するなどの必要な措置を講ずる。

また、運転の誤操作や地震等の偶発的事故を含め、施設の破損等によって、適切な拡散防止措置が執れなくなった場合の応急の措置に対する具体的なマニュアルを作成すること。更に、速やかにその事故の状況及び執った措置の概要を経済産業大臣及び環境大臣に届出するための人的体制（不在の場合の代理者を含む）、連絡網、対応措置等を具体的に決めマニュアル化すること。

なお、国の確認を受けている場合で、バイオレメディエーションに係る事業実績や新しい文献等により知り得た知見が当該利用微生物の安全性に影響を与える可能性がある場合は、速やかに経済産業大臣及び環境大臣に連絡すること（指定様式はなし）。

第二 安全管理体制の整備

安全で的確な実施を確保するため、事業者は安全管理体制を整備すること。このため、事業者は、浄化事業ごとに、経験を有する全体の管理を行う者及びその者を補佐する者を配置し、安全管理業務を遂行させるとともに、安全及び環境管理について助言を行う委員会を設置するよう努めること。また、微生物の取扱い

に関する教育訓練及び事故時における連絡体制の整備を行うよう努めること。

企業の代表者は、当該バイオレメディエーション事業の安全性を確保するために、事業所等の長に対し、あらかじめ事業遂行に当たり微生物等の安全な取り扱いについての検討を行うとともに、微生物等の経験を有するものの配置、教育訓練等体制整備を行わせるようマニュアル化に努めること。

職務の具体例を以下に記載する。

第二-1 利用微生物等の安全な取扱いについての検討を行うこと。

(具体例)

事業所の長は、当該事業開始に先立ち、浄化事業ごとに経験を有する全体の管理を行う者(以下、「全体管理者」という)及び全体管理者を補佐する者(以下、「全体管理者の補佐者」という)を選任するとともに、安全・環境管理委員会を設置し、その委員を任命し、当該バイオレメディエーション事業の安全性確保について諮問する。また、全体管理者は、事業計画の立案及びその実施に際し、本指針を十分に遵守し、全体管理者の補佐者との連絡の下に、事業全体の適切な管理・監督に当たることとする。なお、全体管理者は、利用微生物を取り扱う上での注意事項、設備・装置、取扱方法、安全・運転管理についてのマニュアルを用意し、従事者に配布しておくよう努める。

全体管理者は、当該事業の従事者以外の者の作業区域への立ち入りは制限し、当該事業の性質を知らない者を作業区域へは入れないこととする。また、当該事業の従事者以外の者が立ち入る時には、従事者の指示に従わせることとする。

全体管理者は、以下の事項についてその検査・調査内容、方法、その結果とそれに伴う対応作業内容、実施日、実施者を記入する検査等の記録簿を作成し、当該事業終了後5年間保存、管理することとする。

- ・利用微生物の名称及びその容器に付された番号
- ・利用微生物の保管
- ・利用微生物の生物学的性状及びその試験検査の年月日
- ・利用微生物の譲受けの相手方の氏名、住所、目的及び受け入れ体制
- ・健康診断の結果(免疫機能の低下している人は又はアレルギー体質の人は微生物は取扱わない等の適切な配慮を行うこと。)
- ・安全・環境管理委員会の審議記録(利用微生物の取扱方法の適否を確認する根拠となった資料を含む。)
- ・設備・装置の定期点検及び運転操作の記録

全体管理者は、当該バイオレメディエーション事業の技術面、安全面における

責任を遂行するものとする。また、バイオレメディエーション技術における情報を不断に収集するとともに、当該利用微生物に影響を及ぼすような知見を事業の記録や新しい文献等より発見した場合には、事業所の長に報告する。その場合、事業所の長は速やかに経済産業大臣及び環境大臣に対して報告を行う。全体管理者の補佐者は、全体管理者を補佐するとともに、全体管理者が旅行、病気、事故等によりその職務を行うことができない場合に、その職務を代行する。

全体管理者及び全体管理者の補佐者の選任

全体管理者とは、バイオレメディエーション又は微生物の取扱いに関する高度な専門知識を有し、浄化事業全体の安全管理を統括できる能力を有する者でバイオレメディエーション事業を行う上で必要とされる知識、技術及びこれらを含む関連の知識を有する者の中から、事業所の長が選任したものをいう。

また全体管理者の補佐者は、バイオレメディエーション事業を行う上で必要とされる知識、技術及びこれらを含む関連の知識を有する者の中から、事業所の長が選任したものをいう。

第二-2 利用微生物の取扱いについて経験を有する者の配置

(具体例)

安全委員会は、浄化事業ごとに設置するものとし、高度に専門的な知識、技術及び広い視野に立った判断が要求されることを十分に考慮し、適切な分野の者により構成されることとする。

申請に際しては、安全委員会の名簿を作成し、名簿には氏名、専門、利用微生物の取扱いの実務経験年数を記載する。

必要な専門分野は、直接事業に係わる分野の他に、少なくとも「微生物」、「安全に係わる労務管理」の分野を専門とする委員を加えて構成する。また、産業医若しくは産業医の連絡係を置き、その氏名を記入する。

安全委員会は、事業所の長の諮問に応じて、イ)利用微生物の取扱い方法の適否、ロ)当該事業従事者の安全教育訓練及び健康管理、ハ)事故の際に必要な措置及び改善策、ニ)その他当該業務を行う際の安全性の確保ならびに環境の管理に関する必要な事項について調査審議し、助言する。

第二-3 教育・訓練

全体管理者は、バイオレメディエーション事業の開始前に当該事業の従事者に対し、本指針の内容を熟知させるとともに、教育訓練を行う。特に、微生物の取扱いに関する教育訓練においては、従事者の作業形態に応じて、業務に係る

安全性知識の教育・訓練を行う。教育・訓練すべき内容は以下のとおり。

- ・利用微生物の安全性に関する知識
- ・安全性評価に応じた利用微生物の取扱い
- ・設備・装置に関する知識及び技術
- ・事故発生時の措置に関する知識 等

第二-4 対策マニュアルの作成

事故時における連絡体制の整備においては、天災を含めた事故の対策マニュアルを作成する。このマニュアルには以下のような事項を盛り込むものとする。

- ・発生の可能性が想定される事故
- ・他の従業員と消防等関係方面への連絡網
- ・避難地の設定
- ・必要な処置及び改善策 等

第三 記録等の保管

事業者は、浄化事業の実施状況、安全及び環境管理に関する委員会の審議内容等当該事業に必要と考えられる事項に関する記録を行い、その保管に努めること。また、浄化事業期間に導入した利用微生物について、適切な期間、適切な管理の下に保管すること。

事業に関する記録として、作業日誌、利用微生物や対象物質等のモニタリング実施記録簿などを策定すること。この際、作業日誌がモニタリング実施記録簿を兼用してもよい。

作業日誌には日時、従事者名、利用微生物の導入量や同時に導入する物質（栄養物質等）量なども含めた事業内容などを記載する。さらに、安全及び環境管理に関する委員会の審議内容等についても記録に残すこと。

また、事業期間中に導入した利用微生物はサンプリングし、適切な期間、適切な管理の下、保存すること。

このため、事業に関する作業日誌、及びモニタリングなどの生データ及びその解析結果の記録を行うための実施記録簿や、サンプリングし保存する利用微生物の名称、その容器のラベルと保管状況、分類同定など生物学的性状、及びその試験結果の年月日、安全及び環境管理に関する委員会の審議内容等の記載内容を記録するための、帳簿の有無・書式案等について記入すること。

第四 バイオスティミュレーションの扱い

バイオスティミュレーションについては、添加する栄養物質等又は酸素の供給の停止とともに、浄化場所に生息している活性化された微生物は減少すると考えられることから、本指針の対象としないが、浄化事業の計画及び実施に当たり、栄養物質等の添加等本指針の考え方を参考にしつつ、事業者自らが適切な安全性の点検を行い、適切な安全管理の下に実施するよう努めること。

バイオスティミュレーションは修復現場に生息している微生物を活性化する方法であり、その他の微生物を新たに導入するものではないため、国による確認の対象とはしていない。

しかしながら、特に、栄養物質等としての化学物質の添加に関しては、指針の主旨に沿った管理と同様であることから、本指針の規定を参考にして実施することが望まれる。

当該栄養物質等の安全性、その分解性及び浄化対象物質の分解生成物等の有無並びにそれらの拡散の問題等二次汚染の可能性は同様である。

また、微生物の活性化のために導入する栄養物質等については、例えば、バイオオーグメンテーションを実施する場合と同様に、重金属の可溶性を高める等の現象を生じる等の可能性が否定できないため、本指針に示した内容に準じた形で自主的な安全管理を行うことが望まれる。

第五 周辺住民等への情報の提供

本指針にのっとったバイオレメディエーションは、利用微生物等に係る科学的知見に基づく安全性評価及び安全管理が適切に行われることによって、安全性の確保に万全を期して進められるものであるということに関する周辺住民等の一層の理解を得るために、事業者は必要に応じ、周辺住民等に対して十分な情報の提供を行い、周辺住民等とのコミュニケーションを進めること。

微生物の開放系利用となるバイオレメディエーションは、安全性評価を十分踏まえつつ実施するということを前提にすれば、汚染された土壌、地下水等の浄化が進められることによって、全体として生態系への影響及び人への健康影響（以下、生態系等への影響）を低減することが期待できるものである。

指針にのっとったバイオレメディエーションは、利用微生物及び添加する物質に係る科学的知見に基づく安全性評価及び安全管理を適切に行うことによって、安全性の確保に万全を期して進めるべきものである。

以上について、周辺住民等の一層の理解を得るために、事業者が必要に応じ、周辺住民等に対して十分な情報の提供を行い、周辺住民等とのコミュニケーションを進めることが重要である。

(説明内容の具体例)

- ・当該事業が科学的知見に基づく評価の下に行われていること
- ・事業者が作成した浄化事業計画に則り、適正な管理の下に事業が行われること
- ・周辺環境に有害な影響がないこと(利用微生物に病原性等がないことの根拠、汚染物質が拡散する可能性がないことの根拠等) 等

第六 指針の見直し

本指針は、微生物によるバイオレメディエーションに関する今後の科学的知見の充実又は当該技術の進展及び普及等を踏まえ、必要に応じて見直しを行う。

本指針は、バイレメ事業に当たっての安全性評価が事業者にとって経験が浅く、統一された評価手法が存在していないことから策定されたものであり、当該バイレメにおける土壌等浄化が一般化し、標準的な安全性評価手法が定着化すれば、廃止等も含め見直しの検討をするものとする。

(別添1) 病原性等の調査用の文献・文献検索用データベース

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「病原性及び有害物質の産生性（主要な動植物及び人に対する影響）」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等及びその根拠を記述し、病原性等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する。こ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、有無の判断をすることが基本であるが、例を示せば、病原性等をもつ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。

第1次検索調査

以下のような検索公開リストを参照し、多面的に病原性等の有無の確認をしよう努めること。その際どのようなデータベース等に基づいたのか、その根拠を併記すること。

- ・ 国立感染症研究所 病原体等安全管理規程（平成15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>)；現在、更新中のため書面での配布
- ・ 日本細菌学会 バイオセイフティー指針
(<http://wwwsoc.nii.ac.jp/jsb/biosafety/CONTENTS.HTM>、
<http://wwwsoc.nii.ac.jp/jsb/biosafety/FUHY01.HTM>、
<http://wwwsoc.nii.ac.jp/jsb/biosafety/FUHY02.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)
農林水産省 植物防疫所 (<http://www.pps.go.jp>)
<http://www.jcm.riken.jp/JCM/shokubou.htm>
- ・ DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)
Bacterial Nomenclature Up-to-date
(<http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>)
- ・ Ecological database of the world's insect pathogens
(<http://cricket.inhs.uiuc.edu/edwipweb/edwipabout.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等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すること。必要に応じ、該当部分を下線等で明示した後、別添として提出すること。

・ 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 (無料) (医学、生物科学全般)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>)

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るので参照頂きたい。

・ 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)

・ 生物農薬ガイドブック 日本植物防疫協会 (編集) 日本植物防疫協会 (2002)

・ 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)

(別添2) 生態系等への影響評価の試験方法の例

バイオレメディエ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るが、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る。

例として掲げれば、げっ歯類での単回経口投与試験等が代表的なものと考えられ、また、土壌の生息する生物への影響を評価するということからミミズ、トビムシ、水中生物影響試験であれば、コイ、ヒメダカ、藻、ミジンコ類等の試験が、毒性スクリーニング試験に一般的に用いられているものである。これらは、生物学的知見の情報量が多く存在すると考えられるので、それらの情報と比較し判断することが可能なことから、一定の安全性の合理的な判断が可能と考えられる。

以下の試験方法等を参考に、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すること。

・ 動植物試験方法

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づけられているもの

・ 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

土壌に生息する生物への影響を評価する試験方法の例

・ ミミズ

OECD Guideline for testing of chemicals 207 "Earthworm acute toxicity tests"
OECD Guideline for testing of chemicals 222 "Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/ Eisenia andrei)"

ISO 11268-1 1993 Soil quality - Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida) - Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate

ISO 11268-2 1998 Soil quality - Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida) - Part 2: Determination of effects on reproduction

ISO 11268-3 1999 Soil quality - Effects of pollutants on earthworms - Part 3: Guidance on the determination of effects in field situations

・トビムシ

ISO 11267 Soil quality - Inhibition of reproduction of Collembola (Folsomia candida) by soil pollutants

・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する。

(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。

(別添3) 微生物農薬に関する土壌微生物への影響試験方法の例

「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（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）」では、微生物農薬を使用する際の、土壌微生物への影響試験方法を示している。土壌微生物に対する影響評価試験方法の一手法として、参考にされたい。

「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（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）」
(抜粋)

< 土壌微生物影響試験 >

(1) 目的

微生物農薬が土壌微生物（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壌に混和し、土壌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壌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、必要に応じ土壌微生物の炭素代謝、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 試験土壌

水田で用いるものについては、水田状態の土壌を、畑地等で用いるものについては、畑地土壌を用いる。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倍量を土壌に混和する。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 土壌の採取

1 試験区4箇所以上から土壌を採土管(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

採取した土壌中の細菌、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。

(別添4) 利用微生物の検出および識別方法の例

利用微生物の検出および識別方法については、次のような方法が代表的なものとして挙げられる。

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ある。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る。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ある。

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ある。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する（Muyzer, G. *et al.* *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 412 (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る。また、経時

的に土壌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る。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、土壌中に含まれる微生物の同定や検出に用いることもできる。

○PCR-サザンプロット解析法

サザンプロットは 1975 年にサザン (Southern) が開発した DNA の分析方法で、アガロースゲル等で電気泳動した DNA をメンブレンに 1 本鎖の状態に写し取り、放射性同位元素等で標識した DNA とハイブリダイズさせ、目的 DNA を検出する。この方法は検出感度が低いため、微生物群集の解析においては、感度を上げるために、土壌等から抽出した DNA の目的配列を PCR によって増幅した後、サザンプロットを行う。これを PCR-サザンプロットという。

○マイクロアレイ (microarray)、DNA マイクロアレイ (DNA microarray)

様々な微生物の rDNA を微小な間隔で規則正しく並べて固定化した基盤 (マイクロアレイ) 上に、試料から抽出した蛍光標識された rRNA を滴下し、ハイブリダイズした rRNA を検出することにより、微生物の群集組成を同定・解析する方法。微生物から抽出した rRNA 分子を直接解析に用いるため、定量的な解析が可能である。

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ある。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する。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る。(Liu W.-T. *et al. Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4516-4522 (1997)).

キノンプロファイル法

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ている。キノンプロファイル法はキノンを化学マーカーとして使用し、土壌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ある。

その他の方法として、リン脂質脂肪酸法 (PFLA) 等がある。

文献 : *Chemosphere*, Vol. 39, No. 4. pp. 665-682, 1999

. 確 認 申 請 様 式

様式 1

番 号
年 月 日

経済産業大臣 殿
環境大臣 殿

住所（法人にあつては主たる事務所の所在地）
氏名（法人にあつては名称及び代表者の氏名）印
電話番号

「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」に基づく浄化事業計画の確認について

微生物によるバイオレメディエーション利用指針第五章の規定に基づき、別添の生態等への影響評価書の評価結果を踏まえた浄化事業計画が指針に適合していることの確認を求めます。

浄化事業計画

年 月 日

企 業	所在地	(郵便番号)
	名称	Tel :
	代表者職名・氏名	
事 業 所	所在地	(郵便番号)
	名称	Tel :
	事業所長氏名	
事業名称		
1 . 利用微生物の種類の名		

2. 浄化事業の内容		
(1)	浄化対象物質の名称及び想定される濃度	(浄化対象物質) 名称： 想定濃度： (存在する場合には) 共存する汚染物質) 名称： 想定濃度
(2)	浄化対象物質の浄化目標濃度	
(3)	浄化事業期間	a. 浄化作業期間： 平成 年 月 日 ~ 平成 年 月 日 b. 浄化事業終了確認期間： 平成 年 月 日 ~ 平成 年 月 日
3. 浄化事業の実施方法		
(1)	作業区域	住所： 利用微生物を取り扱う範囲： 浄化対象面積： 浄化対象土量又は地下水量：
(2)	作業区域及びその周辺の概要	
(3)	浄化技術の概要	
(4)	利用微生物の導入方法等	a. 利用微生物の導入方法 b. 利用微生物の菌密度及びその量 菌密度： 量： c. 利用微生物と同時に導入する栄養物質等 物質名： 導入方法： 導入量： その他 ():

(5)	モニタリングの実施方法	<ul style="list-style-type: none"> ・モニタリングする項目、方法 ・モニタリング期間
(6)	浄化事業の終了方法	<ul style="list-style-type: none"> ・浄化作業の終了方法 ・浄化事業全体の終了方法
4 . 安全管理の方法		
(1)	利用微生物の拡散防止対策	
(2)	栄養物質等の拡散防止対策	
(3)	浄化対象物質(必要に応じ、中間生成物を含む)の拡散防止対策	
(4)	安全管理体制の整備	
(5)	記録等の保管	
(6)	緊急時の対応及び事故対策	

(備考1) 氏名(法人にあっては、その代表者の氏名)を記載し、押印することに代えて、本人(法人にあっては、その代表者の氏名)が署名することができる。

(備考2) 「微生物によるバイオレメディエーション利用指針の解説」の「第二章 浄化事業計画の作成」に示された内容を参考に過不足なく記入すること。

(備考3) 上の表の各欄の事項に関して、より詳細な又は関連した記載を要する場合には、別紙として添付すること。

(備考4) この用紙の大きさは、日本工業規格A4とする。

生態系等への影響評価書（浄化事業計画に添付すること）

利 用 微 生 物 の 情 報	(1) 分類学上の位置付け及び分離源（微生物を採集した場所）
	(2) 使用の歴史及び現状
	(3) 生理学的及び生態学的特性
	a．基本的特性
	b．好適生育環境の条件（利用微生物の生存が有利になる又は生存を制限する条件）
	c．寄生性又は共生性
	d．生活環（接合、孢子形成等）
	e．病原性（主要な動植物及び人に対する影響）
	f．有害物質の産生性（主要な動植物及び人に対する影響）
	g．利用微生物の特性に応じて、その他必要な情報
(4) 利用微生物の検出及び識別の方法並びにそれらの感度、特異性及び信頼性	
浄 化 技 術 の 情 報	(1) 浄化技術の内容
	(2) 分解生成物、分解経路等
	(3) 作業区域における利用微生物の特性等
	a．生存能力、増殖能力及び生残性
	b．拡散の特性
	c．分離源区域と作業区域の生存環境の比較、作業区域における増殖促進等のための選択圧
d．他の微生物群集への影響	
(4) 栄養物質等を添加する場合は、その内容	

	a . 名称 (CAS番号)、化学構造式、分子量
	b . 性状、分解性及び毒性等安全性
	c . 導入の目的
	d . 導入量、導入濃度及び導入頻度
	e . 環境基準又は既存の法律等による規制等に関する情報
	f . 二次的な汚染の可能性がある場合は、その情報 (物質名、毒性、予想される残留性、残留濃度、拡散性等)
	g . その他副次的な影響
作業区域及びその周辺の情報	(1) 作業区域等の特徴
	a . 位置
	b . 現場における汚染原因等
	c . 水文地質学的特性
	d . 生息又は生育する主要な動植物
	e . 土地利用の状況
	f . その他作業区域周辺の特徴
(2) 浄化対象物質の情報	
(3) 汚染状況	
生態系等への影響の	(1) 利用微生物が浄化作業の終了後に増殖する可能性。必要に応じ、作業区域外への影響に配慮した効果的な措置。
	(2) 作業区域における他の微生物群衆への影響。
	(3) 作業区域及びその周辺における主要な動植物及び人に対する、利用微生物の病原性、有害物質の産生性、その他有害な影響を及ぼす可能性。必要に応じ、生態系等への影響に配慮した効果的な措置。
	(4) 浄化作業に伴う浄化対象物質 (必要に応じ、中間生成物を含む。) の拡散の可能性。必要に応じ、作業区域外への影響に配慮した効果的な措置。

総合評価	(5) 浄化作業に当たって栄養物質等を添加する場合は、浄化作業の終了後の当該物質の有意な残留の可能性。必要に応じ、作業区域外への影響に配慮した効果的な措置。
	(6) 浄化作業の終了後の有害な分解生成物等の有意な残留の可能性。必要に応じ、作業区域外への影響に配慮した効果的な措置。
総合評価	

- (備考1) 「微生物によるバイオレメディエーション利用指針の解説」の「第三章 生態系等への影響評価の実施」に示された内容を参考に過不足なく記入すること。
- (備考2) 上の表の各欄の事項に関して、より詳細な又は関連した記載を要する場合には、別紙として添付すること。
- (備考3) この用紙の大きさは、日本工業規格A4とする。

様式 2

微生物によるバイオレメディエーション利用指針に基づく浄化事業計画の変更に伴う
届出について

年 月 日

経済産業省製造産業局
生物化学産業課長
環境省環境管理局
総務課長

あて

申請者

氏名

住所

印

(年月日付け、文書番号)により確認を受けた、浄化事業計画の内容について、
次のとおり一部変更を行いたく届出します。

浄化事業計画の一部変更

	年 月 日
文書番号	号
事業の名称	

変更の内容	変更前	
	変更後	
変更の理由		
変更予定時期		

(備考1) 氏名(法人にあっては、その代表者の氏名)を記載し、押印することに代えて、本人(法人にあっては、その代表者の氏名)が署名することができる。

(備考2) 変更する箇所のみすべて記入すること。

(備考3) 変更の内容に関して、より詳細な内容又は関連した記載を要する場合には、別紙として添付すること。

(備考4) 確認を受けた際の概要様式のコピーを添付すること。

(備考5) この用紙の大きさは、日本工業規格A4とすること。

様式3

微生物によるバイオレメディエーション利用指針に基づく浄化事業計画の変更(住居表示等)に伴う届出について

年 月 日

経済産業省製造産業局
生物化学産業課長
環境省環境管理局
総務課長

あて

氏名
申請者
住所

印

(年月日付け、文書番号)により確認を受けた浄化事業計画の内容について、(企業、事業所)の(所在地、名称、代表者)に変更があったので別添のとおり報告します。

(別添)

住居表示、名称、代表者の変更届

変更後（変更した項目を含め全ての項目を記入すること。）

企 業	所在地	(郵便番号)
	名称	Tel.
	代表者の職名・氏名	
事 業 所	所在地	(郵便番号)
	名称	Tel.
	事業所長氏名	

変更前（変更した項目のみ変更前の状況を記入すること。）

企 業	所在地	(郵便番号)
	名称	Tel.
	代表者の職名・氏名	
事 業 所	所在地	(郵便番号)
	名称	Tel.
	事業所長氏名	

(備考1) 氏名(法人にあっては、その代表者の氏名)を記載し、押印することに代えて、本人(法人にあっては、その代表者の氏名)が署名することができる。

(備考2) この用紙の大きさは、日本工業規格A4とすること。

. 参 考 资 料

微生物によるバイオレメディエーション利用指針
(告示：平成17年3月30日)

微生物によるバイオレメディエーション利用指針
(平成十七年経済産業省・環境省告示第四号)

目次

- 第一章 総則
- 第二章 浄化事業計画の作成
- 第三章 生態系等への影響評価の実施
- 第四章 浄化事業の実施及び終了
- 第五章 経済産業大臣及び環境大臣による確認
- 第六章 留意事項

第一章 総則

第一 趣旨及び目的

バイオレメディエーションは、微生物等の働きを利用して汚染物質を分解等することによって、土壌、地下水等の環境汚染の浄化を図る技術である。環境汚染浄化の技術的手法としては、物理的手法、化学的手法及び微生物機能の活用等生物学的手法が存在するが、微生物を利用するバイオレメディエーションは、多様な汚染物質への適用可能性を有し、投入エネルギーが理論的には少なく、一般的に浄化費用も低く済む可能性があり、将来の主要技術の一つと考えられている。微生物を利用するバイオレメディエーションの中でも特に、バイオオーグメンテーションについては、主に難分解性化学物質の汚染に対し、近年、環境汚染浄化技術としての注目が高まっており、今後の利用拡大が期待されているところである。

微生物の開放系利用となるバイオレメディエーションは、安全性評価を十分踏まえつつ実施することを前提にすれば、汚染された土壌、地下水等の浄化が進められることによって、全体として生態系への影響及び人への健康影響を低減することが期待できるものである。

特に、バイオオーグメンテーションは、一般的には、自然環境から分離した特定の微生物を選択して培養されたものを意図的に一定区域に導入することによって、汚染された土壌、地下水等の浄化を図ろうとするものであるが、生態系への影響及び人への健康影響を与えるおそれがないとはいえないことから、あらかじめ安全性の評価を実施してから利用することが適当な手法として位置付けられるものである。しかしながら、この安全性評価は、事業者にとってはまだ経験が浅く、その統一された評価手法が存在していないのが現状である。

この微生物によるバイオレメディエーション利用指針（以下「指針」という。）は、微生物を利用するバイオレメディエーションの中でも特に、バイオオーグメンテーション

を実施する際の安全性の確保に万全を期すための指針である。本指針は、生態系への影響及び人への健康影響に配慮した適正な安全性評価手法及び管理手法のための基本的要件の考え方を示し、バイオレメディエーション事業の一層の健全な発展及びバイオレメディエーションの利用の拡大を通じた環境保全に資することを目的とする。

第二 用語の定義

本指針の解釈に関しては、次の定義に従うものとする。

- 1 「バイオレメディエーション (Bioremediation)」とは、微生物等の働きを利用して汚染物質を分解等することによって、土壌、地下水等の環境汚染の浄化を図る技術をいい、本指針は、微生物によるバイオレメディエーションを対象とする。
- 2 「バイオオーグメンテーション (Bioaugmentation)」とは、バイオレメディエーションのうち、外部で培養した微生物を導入することによるものをいう。
- 3 「バイオスティミュレーション (Biostimulation)」とは、バイオレメディエーションのうち、栄養物質その他添加剤 (以下「栄養物質等」という。) 又は酸素を加えて浄化場所に生息している微生物を活性化することによるものをいう。
- 4 「微生物」とは、細菌、古細菌及び菌類をいい、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律 (平成15年法律第97号) 第2条第2項に規定される「遺伝子組換え生物等」は含まない。

なお、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律施行規則 (平成15年財務省、文部科学省、厚生労働省、農林水産省、経済産業省、環境省令第1号) 第2条第1号に規定する技術及び同施行規則第3条に規定する技術以外の生物の細胞を融合する技術の利用により得られた生物は、「遺伝子組換え生物等」の定義から除外されていることから、本指針の「微生物」に含める。
- 5 「生態系等への影響」とは、作業区域及びその周辺における生態系への影響及び人への健康影響をいう。
- 6 「浄化事業」とは、バイオレメディエーションを利用する事業をいい、「事業者」とは、浄化事業を実施する者をいう。
- 7 「作業区域」とは、利用微生物を取り扱う場所として設定される区域をいう。
- 8 「利用微生物」とは、バイオオーグメンテーションにおいて、浄化事業のため浄化場所に導入する微生物をいう。
- 9 「単一微生物」とは、分類学上の株レベルで分類及び同定された微生物をいう。ただし、株レベルの分類及び同定が不可能な場合は、生態系等への影響評価が可能な場合に限り、種又は属レベルにより分類及び同定したものを含む。
- 10 「複合微生物系」(コンソーシア)とは、複数の種類の微生物が混在している

状態のものをいう。

- 1 1 「浄化事業計画」とは、浄化事業の内容及び方法を定めた計画をいい、浄化事業計画を記載した書面を「浄化事業計画書」という。
- 1 2 「モニタリング」とは、浄化事業計画に定める必要な項目を監視することをいう。

第三 指針の対象

- 1 本指針は、バイオオーグメンテーションを対象とする。
- 2 本指針が対象とする利用微生物は、単一微生物と複合微生物系とする。このうち、第五章に規定する経済産業大臣及び環境大臣による確認の対象とする利用微生物は、利用微生物の種類ごとに生態系等への影響についての科学的知見に基づいた適切な評価が可能なものとし、具体的には、次のとおりとする。

- (1) 分類及び同定された単一微生物又はそれらを混合した微生物系
- (2) 自然環境から採取された複合微生物系を基にして、特定の培養条件で集積培養された複合微生物系であって、高度に限定された微生物で構成され、その構成が継続的に安定していることが確認されたもの

また、自然環境から採取された複合微生物系を基にして培養された複合微生物系（(2)のものを除く。）は、第五章に規定する確認の対象としないが、浄化事業計画の作成及びその実施に当たり、本指針の考え方を参考にし、事業者自らが適切な安全性の点検を行い、適切な安全管理の下にバイオオーグメンテーションを実施するよう努めること。

3 浄化対象物質

環境汚染浄化の対象物質は、石油類、揮発性有機化合物（トリクロロエチレン等）、多環芳香族化合物（ダイオキシン類等）及び金属類を代表的なものとするが、これらの物質に限定しない。

4 浄化対象環境媒体

浄化作業が行われる環境媒体は、自然条件下の限定された区域の土壌、地下水等とする。

第二章 浄化事業計画の作成

事業者は、浄化事業の実施に当たって、あらかじめ浄化事業の内容及び方法を明確にしてから実施するものとし、以下に掲げる事項を含む浄化事業計画を作成すること。

なお、浄化事業を個別に限定された場所で実施しようとするのではなく、浄化事業の適用条件を想定した上で未確定の複数の場所で実施しようとする場合は、浄化事業計画には、その想定する適用条件を記載すること。

1 利用微生物の種類の名称

2 浄化事業の内容

- (1) 浄化対象物質の名称及び想定される濃度（浄化対象物質以外の汚染物質がある場合は、その物質の名称及び濃度）
- (2) 浄化対象物質の浄化目標濃度
- (3) 浄化事業期間
 - a 浄化作業期間（浄化作業準備開始から浄化対象物質が浄化目標濃度に達するまでの期間）
 - b 浄化事業終了確認期間（浄化作業期間終了後から浄化事業の終了を確認するまでの期間）

3 浄化事業の実施方法

- (1) 作業区域（範囲並びに浄化対象の面積及び土壌等の量）の設定
- (2) 作業区域及びその周辺の概要
- (3) 浄化技術の概要
- (4) 利用微生物の導入方法等
 - a 利用微生物の導入方法
 - b 導入する利用微生物の菌密度及びその量
 - c 利用微生物と同時に導入する栄養物質等
- (5) モニタリングの実施方法
- (6) 浄化事業の終了方法

4 安全管理の方法

- (1) 利用微生物の拡散防止対策
- (2) 栄養物質等の拡散防止対策
- (3) 浄化対象物質（必要に応じ、中間生成物を含む。）の拡散防止対策
- (4) 安全管理体制の整備
- (5) 記録等の保管
- (6) 緊急時の対応及び事故対策

第三章 生態系等への影響評価の実施

事業者は、浄化事業の実施に当たって、あらかじめ利用微生物の種類ごとに科学的かつ適正な生態系等への影響評価を実施し、その結果を記載した図書（以下「生態系等への影響評価書」という。）を作成すること。生態系等への影響評価を実施するに当たり、第一に掲げる評価に必要な情報を収集すること。ただし、これら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、この限りではない。この場合において事業者はその理由を示すこと。また、これらの情報以外の情報を収集する必要が生じた場合には、追加して収集すること。

事業者は、生態系等への影響評価について、第一に掲げる評価に必要な情報を用いて、第二の1に掲げる評価の項目ごとに、必要に応じ、第二の2に掲げる評価の実施方法に従って行い、その評価結果を踏まえ、浄化事業の実施に伴う生態系等への影響の総合的な判断を行うこと。また、事業者が行った判断については、その根拠を明らかにすること。

なお、浄化事業を個別に限定された場所で実施しようとするのではなく、浄化事業の適用条件を想定した上で未確定の複数の場所で実施しようとする場合は、その想定した適用条件を満たす場所での情報を収集することによって生態系等への影響評価を実施すること。

また、生態系等への影響評価の実施に当たっては、最新の科学的知見による情報を用いること及び用いた情報の出典（当該情報が学識経験者又は評価を行う者の有する知識又は経験に基づくものである場合はその旨）を明らかにすること。

第一 生態系等への影響評価に必要な情報

1 利用微生物の情報

利用微生物について、以下に掲げる情報を収集すること。収集に当たっては、まず、各種データベース、文献等既知の情報の十分な調査を行い、情報が不足している場合には、必要に応じ、実験室等で利用微生物を使用し、結果を収集すること。

- (1) 分類学上の位置付け及び分離源（微生物を採集した場所）
- (2) 使用の歴史及び現状
- (3) 生理学的及び生態学的特性
 - a 基本的特性
 - b 好適生育環境の条件（利用微生物の生存が有利になる又は生存を制限する条件）
 - c 寄生性又は共生性
 - d 生活環（接合、孢子形成等）
 - e 病原性（主要な動植物及び人に対する影響）
 - f 有害物質の産生性（主要な動植物及び人に対する影響）
 - g 利用微生物の特性に応じて、その他必要な情報
- (4) 利用微生物の検出及び識別の方法並びにそれらの感度、特異性及び信頼性

2 浄化技術の情報

計画している浄化技術について、以下に掲げる情報を収集すること。収集に当たっては、まず、文献等既知の情報の十分な調査を行い、情報が不足している場合には、必要に応じ、実験室等で利用微生物等を使用し、結果を収集すること。

(1) 浄化技術の内容

利用微生物の土壌、地下水等への導入方法及び導入条件並びに基本的な技術的原理。

(2) 分解生成物、分解経路等

想定される分解生成物の有無及び分解経路について、文献等既知の情報の調査又は実験室等での利用微生物の使用の結果により確認すること。分解生成物の存在が認められる場合には、その性状を調査すること。なお、浄化対象物質以外の汚染物質がある場合、その物質の性状等を調査すること。

(3) 作業区域における利用微生物の特性等

- a 生存能力、増殖能力及び生残性
- b 拡散の特性
- c 分離源区域と作業区域の生存環境の比較、作業区域における増殖促進等のための条件
- d 他の微生物群集への影響

(4) 栄養物質等を添加する場合は、その情報

- a 名称（CAS番号）、化学構造式、分子量
- b 性状、分解性、毒性等安全性
- c 導入の目的
- d 導入量、導入濃度及び導入頻度
- e 環境基準又は既存の法律等による規制等に関する情報
- f 二次的な汚染の可能性がある場合は、その情報（物質名、毒性、予想される残留性、残留濃度、拡散性等）
- g その他副次的な影響

3 作業区域及びその周辺の情報

作業区域及びその周辺について、以下に掲げる情報を収集すること。作業区域を限定しない場合においては、浄化事業の適用条件を具体的に想定して情報を収集すること。

(1) 作業区域等の特徴

- a 位置
作業区域の位置、周辺状況等。
- b 現場における汚染原因等
汚染原因、現在の汚染状況等。
- c 水文地質学的特性
作業区域及びその周辺の水文学的特性（帯水層の分布、地下水の水位等）及び地質条件(土壌種、有機物含量、物理・化学特性等)。
- d 生息又は生育する主要な動植物
作業区域及びその周辺に生息又は生育する主要な動植物。特に、保護の対

象となる動植物及び利用微生物の病原性又は毒性によって影響を受けやすいことが知られている動植物については、詳細な情報。

e 土地利用の状況

作業区域及びその周辺の土地利用の状況について、工業地、商業地、住宅地等の別。在住人口及び労働人口についての情報。河川水及び地下水の飲料用水、工業用水、灌漑用水等としての利用の状況についての情報。

f その他作業区域周辺の特徴

(2) 浄化対象物質の情報

浄化対象物質の名称（CAS番号）、化学構造式、分子量、性状、分解性、毒性等安全性の情報。また、環境基準又は既存の法律等により当該物質に関する規制等がある場合には、その基準値等参考となる情報。

(3) 汚染状況

浄化場所に存在する浄化対象物質の、水平分布及び垂直分布に関する情報。浄化対象物質以外の汚染物質がある場合は、その水平分布及び垂直分布に関する情報。

第二 生態系等への影響評価の項目及び実施方法

1 生態系等への影響評価の項目

事業者は、第一に掲げる評価に必要な情報を用いて、以下に示す評価の項目ごとに、評価を行うこと。

- (1) 利用微生物が浄化作業の終了後に増殖する可能性。必要に応じ、作業区域外への影響に配慮した効果的な措置。
- (2) 作業区域における他の微生物群集への影響。
- (3) 作業区域及びその周辺における主要な動植物及び人に対する、利用微生物の病原性、有害物質の産生性その他有害な影響を及ぼす可能性。必要に応じ、生態系等への影響に配慮した効果的な措置。
- (4) 浄化作業に伴う浄化対象物質（必要に応じ、中間生成物を含む。）の拡散の可能性。必要に応じ、作業区域外への影響に配慮した効果的な措置。
- (5) 浄化作業に当たって栄養物質等を添加する場合は、浄化作業の終了後の当該物質の有意な残留の可能性。必要に応じ、作業区域外への影響に配慮した効果的な措置。
- (6) 浄化作業の終了後の有害な分解生成物等の有意な残留の可能性。必要に応じ、作業区域外への影響に配慮した効果的な措置。

2 生態系等への影響評価の実施方法

生態系等への影響評価の実施方法としては、1の(1)から(6)までに関係する既知

の情報を十分に収集し、活用した上で行うこと。

なお、情報が不足している場合には、必要に応じ、実験室等での利用微生物等の使用の結果を収集して行うこと。

また、必要に応じ、以下に定めた評価の実施方法に沿って評価を行うこと。

- (1) 1の(2)中、他の微生物群集への影響は、浄化作業終了時点において、利用微生物により他の微生物群集が影響を受けたことによって、本来あるべき土壤等としての機能が失われ、かつ、その状態が長期間継続的に維持されることが予想されるかどうかを評価する。この場合、作業区域に類似した土壤等を選定し、当該土壤等の物質循環に深く関与している微生物のうち特定の種を選定して評価し、又は適切な手法によって得られた微生物群集の構成変化（プロファイル変化）に基づき評価する。微生物の特定の種を選定して評価する場合は、一般細菌、硝化菌、脱窒菌等を選定して当該菌数の増減を測定し、又は土壤の呼吸活性（例えば、二酸化炭素発生量）、硝化活性、脱窒活性等を測定することによって評価する。
- (2) 1の(3)中、主要な動植物に対する有害な影響は、作業区域及びその周辺で影響を受ける可能性のある動植物の種を選定して、受ける影響の具体的内容及び影響の生じやすさについて評価し、生態系への影響が生ずるおそれの有無について評価する。

第四章 浄化事業の実施及び終了

第一 浄化事業の実施

事業者は、生態系等への影響評価書を踏まえ、浄化事業計画書の内容に従って、適切な安全管理の下に浄化事業を実施すること。

第二 モニタリングの実施

浄化事業計画に基づき、浄化事業期間内に、以下に掲げる項目についてモニタリングを実施すること。

- 1 浄化対象物質
- 2 利用微生物（必要に応じ、他の微生物を含む。）
- 3 分解生成物（必要に応じ、中間生成物を含む。）
- 4 栄養物質等
- 5 浄化事業の内容に応じて、その他必要な事項

第三 浄化事業の終了

浄化事業計画に定めたモニタリングの実施方法及び浄化事業の終了方法に従って、以下の1から5までについて第二のモニタリングの実施によって確認してから浄化事業を終了すること。

- 1 浄化対象物質が、浄化作業の終了後に浄化目標濃度に達したこと
- 2 利用微生物が、浄化作業の終了後に増殖し、又は高濃度に残留しないこと
- 3 分解生成物が、浄化作業の終了後に有意に残留しないこと
- 4 栄養物質等が、浄化作業の終了後に有意に残留しないこと
- 5 この他、浄化事業計画に定めた事項が遵守されていること

第五章 経済産業大臣及び環境大臣による確認

事業者は、バイオオーグメンテーションを実施する際、浄化事業計画が本指針に適合しているか否かについて、広範かつ高度な科学的知見に基づいた判断を必要とすることから、経済産業大臣及び環境大臣へ確認を求めることができる。事業者は、経済産業大臣及び環境大臣の確認を受けようとする場合には、生態系等への影響評価書とともに、氏名及び住所並びに浄化事業計画を記載した申請書を経済産業大臣及び環境大臣に提出すること。

経済産業大臣及び環境大臣は、以下に掲げる観点から、生態系等への影響評価書が添付された浄化事業計画書の内容が、本指針に適合しているか否かについて、確認を行うこととする。

- 1 生態系等への影響評価書に照らし、浄化事業計画に従って浄化事業を行った場合に生態系等に影響を及ぼすおそれがないことについて十分な科学的知見に基づき適正に評価されたと認められる浄化事業計画であること。
- 2 利用微生物の特性又は浄化事業計画の内容及び方法に応じ、既知の十分な情報又は実験室等での利用微生物等の使用の結果を収集することにより、生態系等への影響を評価するための必要な情報が得られていること。
- 3 利用微生物の特性又は浄化事業計画の内容及び方法に応じ、生態系等への影響の評価に際し勘案した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。

なお、経済産業大臣及び環境大臣は、確認の日以降の科学的知見の充実により、確認を受けた浄化事業計画に従って浄化事業が行われる場合においてもなお生態系等への影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、確認を取り消すとともに、必要に応じ、その知見について関係者へ周知する。

第六章 留意事項

第一 緊急時の対応及び事故対策

事業者は、浄化事業の実施中に、生態系等に影響が及ぶおそれのあることを示すモニタリング結果が得られた場合又は事故が発生した場合には、生態系等への影響を防止するために必要な措置を講じること。また、経済産業大臣及び環境大臣による確認を受けている場合にあっては、生態系等に影響が及ぶおそれのあることを示すモニタリング結果が得られた旨又は事故が発生した旨を速やかに経済産業大臣及び環境大臣に連絡する

こと。

第二 安全管理体制の整備

安全で的確な実施を確保するため、事業者は安全管理体制を整備すること。このため、事業者は、浄化事業ごとに、経験を有する全体の管理を行う者及びその者を補佐する者を配置し、安全管理業務を遂行させるとともに、安全及び環境管理について助言を行う委員会を設置するよう努めること。また、微生物の取扱いに関する教育訓練及び事故時における連絡体制の整備を行うよう努めること。

第三 記録等の保管

事業者は、浄化事業の実施状況、安全及び環境管理に関する委員会の審議内容等当該事業に必要と考えられる事項に関する記録を行い、その保管に努めること。また、浄化事業期間に導入した利用微生物について、適切な期間、適切な管理の下に保管すること。

第四 バイオスティミュレーションの扱い

バイオスティミュレーションについては、添加する栄養物質等又は酸素の供給の停止とともに、浄化場所に生息している活性化された微生物は減少すると考えられることから、本指針の対象としないが、浄化事業の計画及び実施に当たり、栄養物質等の添加等本指針の考え方を参考にしつつ、事業者自らが適切な安全性の点検を行い、適切な安全管理の下に実施するよう努めること。

第五 周辺住民等への情報の提供

本指針にのっとりたバイオレメディエーションは、利用微生物等に係る科学的知見に基づく安全性評価及び安全管理が適切に行われることによって、安全性の確保に万全を期して進められるものであるということに関する周辺住民等の一層の理解を得るために、事業者は必要に応じ、周辺住民等に対して十分な情報の提供を行い、周辺住民等とのコミュニケーションを進めること。

第六 指針の見直し

本指針は、微生物によるバイオレメディエーションに関する今後の科学的知見の充実又は当該技術の進展及び普及等を踏まえ、必要に応じて見直しを行う。

微生物によるバイオレメディエーション利用指針に
ついて（報告）

微生物によるバイオレメディエーション
利用指針について（報告）

平成17年2月14日

産業構造審議会化学・バイオ部会 組換えDNA技術小委員会
開放系利用技術指針作成ワーキンググループ
中央環境審議会水環境・土壌農薬合同部会
バイオレメディエーション小委員会

目次

第1	はじめに.....	- 94 -
第2	バイオレメディエーション利用の現状.....	- 95 -
第3	指針の対象.....	- 96 -
1	対象とするバイオレメディエーションの手法.....	- 96 -
2	利用微生物.....	- 96 -
3	浄化対象物質.....	- 97 -
4	浄化対象環境媒体.....	- 97 -
第4	バイオレメディエーションの実施概要.....	- 97 -
第5	浄化事業実施手順の詳細.....	- 98 -
1	浄化事業計画の策定.....	- 98 -
(1)	利用する微生物の種類と名称.....	- 99 -
(2)	浄化事業の内容.....	- 99 -
(3)	浄化事業の方法.....	- 99 -
(4)	安全管理の方法.....	- 99 -
2	生態系等への影響評価の実施.....	- 99 -
(1)	評価に必要な情報.....	- 100 -
(2)	評価の項目及び評価の実施方法.....	- 102 -
3	浄化事業の実施.....	- 104 -
4	浄化事業の終了.....	- 104 -
第6	国による確認.....	- 104 -
第7	浄化事業の実施に当たっての留意事項.....	- 105 -
1	モニタリング.....	- 105 -
2	緊急時の対応及び事故対策.....	- 105 -
3	安全管理体制の整備.....	- 105 -
4	記録等の保管.....	- 105 -
5	周辺住民等への情報の提供.....	- 105 -
6	その他.....	- 106 -
(添付資料)		
・用語の解説		
・合同会合審議経過		
・産業構造審議会 開放系利用技術指針作成WG委員名簿		
・中央環境審議会 バイオレメディエーション小委員会委員名簿		

第1 はじめに

バイオレメディエーションとは、微生物等の働きを利用して汚染物質を分解・無害化することによって、土壌、地下水等の環境汚染の浄化・修復を図る技術である。環境汚染浄化の技術的手法としては、物理的手法、化学的手法及び微生物機能の活用等の生物学的手法が存在するが、微生物を利用するバイオレメディエーションは、多様な汚染物質への適用可能性をもち、投入エネルギーが理論的には少なく、一般的に浄化コストも低く済む可能性があり、将来の主要技術の一つと考えられている。微生物を利用するバイオレメディエーションの中でも特に、バイオオーグメンテーション(注1)については、主に難分解性化学物質の汚染に対し、近年環境汚染浄化技術としての注目度が高まっており、今後の利用拡大が期待されているところである。

微生物の開放系利用となるバイオレメディエーションは、安全性評価を十分踏まえつつ実施するということを前提にすれば、汚染された土壌、地下水等の浄化が進められることによって、全体として生態系への影響及び人への健康影響(以下、「生態系等への影響」という。)を低減することが期待できるものである。

特に、バイオオーグメンテーションは、一般的には自然環境から分離した特定の微生物を選択し、培養されたものを意図的に一定区域に導入することによって、汚染された土壌、地下水等の浄化を図ろうとするものであるが、生態系や人に対する有害な影響を与えるおそれがないとは言えないことから、あらかじめ安全性の評価を実施してから利用することが適当な手法として位置付けられるものである。しかしながら、この安全性評価は、事業者にとって未だ経験が浅く、その統一された評価手法が存在していないのが現状である。

このことに対し、これまで我が国においては、通商産業省(当時)では、平成10年5月に、「組換えDNA技術工業化指針」の改訂を行い、生物的環境修復等の開放系利用を指針の対象に加え、その中で微生物等についても、「当分の間、本指針を準用する」こととし、また、環境庁(当時)では、平成11年3月に、揮発性有機化合物による地下水汚染に対して微生物を利用して浄化する際の環境への影響を防止するため、「微生物を用いた環境浄化の実施に伴う環境影響の防止のための指針」を策定したところであるが、その安全性に係る指針が並立して存在していることから、平成14年12月に策定された「バイオテクノロジー戦略大綱」において、一元化を含めた制度の検討を行う必要性が指摘されているところである。

一方、平成15年6月、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(以下、「カルタヘナ法」という。)(注2)」が制定され、同法に基づき、生物多様性影響評価実施要領が同年11月に告示され、本検討の参考となる生物多様性への影響の評価手法が示されることとなった。

本報告書は、このような状況を踏まえ、産業構造審議会化学・バイオ部会組換えDNA技術小委員会開放系利用技術指針作成ワーキンググループ及び中央環境審議会水環

境・土壌農薬合同部会バイオレメディエーション小委員会において、微生物(注3)を利用するバイオレメディエーションの中でも特に、バイオオーグメンテーションを実施する際の安全性の確保に万全を期すために、生態系等への影響に配慮した適正な安全性評価手法及び管理手法等のための基本的要件の新たな考え方(以下、「指針」という。)を検討し、とりまとめたものである。上記のとおり、国が関係者の理解を得つつとりまとめた指針を示すことによって、バイオレメディエーション事業の一層の健全な発展につながり、バイオレメディエーションの利用の拡大を通じた環境保全が図られることが期待されるものである。

(注1) バイオレメディエーション(Bioremediation)のうち、外部で培養した微生物を導入することによる環境修復をバイオオーグメンテーション(Bioaugmentation)、栄養物質等(栄養物質及びその他の添加剤をいう。以下同じ。)や酸素を加えて修復場所に生息している微生物を活性化することによる環境修復をバイオスティミュレーション(Biostimulation)という。

(注2) 後述の第4の「(参考)カルタヘナ法の概要」を参照のこと。

(注3) ここでいう「微生物」には、カルタヘナ法に規定される「遺伝子組換え生物等」は含まない。また、カルタヘナ法において、いわゆる「セルフクローニング」、「ナチュラルオカレンス」に起因する生物は、「遺伝子組換え生物等」の定義から除外されて整理されていることから、当該生物は、指針の「微生物」の中に含めることとした。

なお、ここでいう微生物とは、細菌、古細菌、菌類である。

第2 バイオレメディエーション利用の現状

バイオレメディエーションには汚染された土壌や地下水等を処理サイトへ運搬して処理する方式(ex situ)又は現場上で処理する方式(on site)と汚染された土壌や地下水等を原位置で処理する方式(in situ)とがある。また、微生物の利用方法により分類すると、栄養物質等や酸素を加えて土着の微生物を活性化させるバイオスティミュレーションと外部で培養した微生物を導入するバイオオーグメンテーションとがある。

土壌、地下水等汚染修復におけるバイオレメディエーションは、海外では1980年代から実用化され、汚染サイトの浄化に適用されるようになった。バイオレメディエーションの先進国である米国では、1980年代末から1990年代にかけてバイオレメディエーションが商業化された。1989年のエクソン・バルディーズ号のアラスカ原油流出事故の後、技術的進展が加速したとされる。

日本では、湾岸戦争で汚染されたクウェートの油汚染土壌をバイオレメディエーションにより浄化する実証試験をPEC((財)石油産業活性化センター)が1990年代に実施した。また、有機塩素化合物による汚染については、1994年から1995年に環境庁(当

時)の調査の一環としてバイオスティミュレーションの実証試験が行われた。また、RITE((財)地球環境産業技術研究機構)は、1995年から2000年の期間でバイオスティミュレーション及びバイオオーグメンテーションの実証試験を実施した。これらの取組により、日本においてもバイオレメディエーション技術が急速に進歩した。近年では、主として、ダイオキシン類などの難分解性有機汚染物質の分解や重金属の処理に対するバイオオーグメンテーション技術の適用に関する研究開発も行われている。

また、バイオレメディエーションの運転管理や安全性評価のため、微生物のモニタリング手法の研究開発も進んでおり、希釈平板法、MPN法、PCR-DGGE法、定量PCR法、マイクロアレイ等の微生物解析技術の応用が試みられているところである。

以上のように、バイオレメディエーションは土壌、地下水等の環境修復において今後有望な技術の一つと位置づけられ、その更なる技術的進展が期待されているところである。

第3 指針の対象

1. 対象とするバイオレメディエーションの手法

指針の対象とするバイオレメディエーションの手法は、微生物を利用するバイオレメディエーションのうち、「第1 はじめに」に記載した事項及び最近の技術の進歩や利用動向等を踏まえ検討した結果、微生物を利用したバイオオーグメンテーションとすることとした。また、バイオスティミュレーションについては、添加する栄養物質等又は酸素の供給の停止とともに、修復場所に生息している活性化された微生物は減少すると考えられることから、対象としないこととしたが、浄化事業の計画・実施に当たっては、栄養物質等の添加等指針の考え方を参考にしつつ、バイオレメディエーションを実施する者(以下、「事業者」という。)自らが適切な安全性の点検を行い、適切な安全管理のもとに実施されることが望ましい。

2. 利用微生物

微生物を利用したバイオオーグメンテーションのうち、指針で確認(注1)の対象とする利用微生物は、利用微生物の種類ごと(注2)に生態系等への影響についての科学的知見に基づいた適切な評価が可能なものとする。

この基本的考え方の観点から、具体的には、

分類・同定された単一微生物(注2)又はそれらを混合した微生物系

自然環境から採取された複合微生物系(注3)をもとにして、特定の培養条件で集積培養された複合微生物系であって、高度に限定された微生物で構成され、その構成が継続的に安定していることが確認されたもの

とすることが適当と考える。

なお、自然環境から採取された複合微生物系をもとにして、培養された複合微生物系

(前記のものを除く。)は、構成している微生物の把握が難しく、指針における確認の対象としないこととしたが、浄化事業の計画・実施に当たっては、指針の考え方を参考にしつつ、事業者自らが適切な安全性の点検を行い、適切な安全管理のもとにバイオオーグメンテーションを実施することが望ましい。

(注1) 事業者から提出された浄化事業計画や生態系への影響評価の結果等に基づき、指針に適合しているか否かを国が判断・確認するもの(詳細は、後述第6を参照のこと)。

(注2) 「単一微生物」とは、生態系等への影響を評価するためには、微生物の特性についての知見が必要であることから、株レベル(不可能な場合は種又は属レベル(ただし、安全性評価が可能な場合。また、評価を実施する場合は同じ属・種であっても個別事業毎に行う。))で分類・同定された微生物をいい、「微生物の種類」とは、各々の単一微生物をいう。

(注3) 一般的に「コンソーシア」と称されている。

3. 浄化対象物質

環境汚染浄化の対象物質としては、特に指定するものではないが、バイオオーグメンテーション技術への期待から、石油類の他に、分解が遅い化学物質(トリクロロエチレン等揮発性有機化合物、ダイオキシン類等多環芳香族等)及び金属類等を想定している。

4. 浄化対象環境媒体

浄化作業が行われる環境媒体としては、特に指定するものではないが、開放系利用を前提に、自然条件下の限定された区域の土壌及び地下水等を想定している。

第4 バイオレメディエーションの実施概要

事業者は、あらかじめ浄化事業ごとに浄化事業の内容及び方法を盛り込んだ「浄化事業計画」を策定し、同時に、利用微生物の種類ごとに科学的かつ適正な生態系等への影響評価を実施し、その結果を記載した評価書(以下、「生態系等への影響評価書」という。)を策定する。

この生態系等への影響評価書を踏まえ、浄化事業計画に記載した内容において、適切な安全管理のもとに浄化事業を実施するものとする。

浄化事業を終了する際は、指針に基づき浄化事業計画に定めた項目を確認してから終了するものとする。全体の手順は以下のとおりであり、各手順の詳細については次項で記載する。

1. 浄化事業計画の策定

2. 生態系等への影響評価の実施
 - (1) 評価に必要とされる情報
 - (2) 評価の項目及び評価の実施方法
3. 浄化事業の実施及びモニタリングの実施
4. 浄化事業の終了

上記各項目の内容の検討に当たっては、カルタヘナ法に基づく開放系利用における生物多様性影響評価及びその承認の枠組みが微生物のバイオレメディエーションの安全性評価及びその確認を実施していく上で基本的には同様な概念であることから、同法を参考とした。ただし、この法律は、遺伝子組換え生物等を対象としたものであることから、微生物の利用に際しては、安全性評価及び安全管理方法として不必要と考えられる項目は除外した。

(参考) カルタヘナ法の概要

我が国は、「生物の多様性に関する条約のバイオセーフティに関するカルタヘナ議定書」を締結するため、2003年6月、カルタヘナ法を制定し、2004年2月19日に議定書が我が国について発効すると同時にカルタヘナ法が施行された。

カルタヘナ法及びこれに基づく省令、告示等では、開放系での遺伝子組換え生物等の利用に当たって、利用する組換え生物等の種類の名称、使用等の内容及び使用等の方法について定めた「第一種使用規程」を作成し、主務大臣の承認を受けることとされている。また、承認を受ける場合には、生物多様性影響について評価を行い、その結果を記載した「生物多様性影響評価書」を提出することになっている。この生物多様性影響評価においては、分類学上の位置づけ等、使用等の歴史、生理学的・生態学的特性（生息可能な環境条件、寄生性等、繁殖・増殖の様式、病原性、有害物質の産生性等）について情報を収集した上で評価するとされている。さらに、事故時の措置等についても規定されている。

第5 浄化事業実施手順の詳細

1. 浄化事業計画の策定

事業者は、浄化事業を行うに当たって、あらかじめその事業の内容及び方法を明確にし、指針に定められた内容を確実に実施するために、以下の内容を含む「浄化事業計画」を策定し、これに従って事業を行う。なお、土壤汚染対策法、水質汚濁防止法及び化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律等の関係する法令を遵守することは当然のことである。

なお、浄化事業を個別に限定された場所で実施しようとするのではなく、適用条件を想定した上で複数の場所で実施しようとする場合は、浄化事業計画には、その想定する

適用条件を記載することとする。

(1) 利用する微生物の種類の種類

(2) 浄化事業の内容

浄化対象物質及び想定される濃度（浄化対象物質以外の共存する汚染物質がある場合は、その物質及び濃度）

浄化対象物質の浄化目標濃度（以下、浄化目標という。）

浄化事業期間

- ・ 浄化作業期間（浄化準備開始から浄化目標達成時までをいう。）
- ・ 浄化事業終了確認期間（浄化作業期間終了後から浄化事業の終了を確認するまでの期間）

(3) 浄化事業の方法

作業区域（浄化作業を行う範囲・面積・土壌等の量）の設定

作業区域及びその周辺の概要（詳細は 2 . (1) . 3) 参照）

浄化技術の概要（詳細は 2 . (1) . 2) 参照）

利用微生物の作業区域への導入

- ・ 利用微生物の導入方法
- ・ 導入する利用微生物の菌密度及びその量
- ・ 利用微生物と同時に導入する栄養物質等（詳細は 2 . (1) . 2 ） . 参照）

モニタリングの実施

浄化事業の終了方法（詳細は、 4 . 参照）

(4) 安全管理の方法

- ・ 利用微生物の拡散防止対策
- ・ 栄養物質等の拡散防止対策
- ・ 浄化対象物質（必要に応じ、中間生成物を含む）の拡散防止対策
- ・ 安全管理体制の整備（関係として、第 7 3 . 参照）
- ・ 事業に関する記録等の保管（関係として、第 7 4 . 参照）
- ・ 緊急時の対応及び事故対策（関係として、第 7 2 . 参照）

2 . 生態系等への影響評価の実施

生態系等への影響評価に当たり、以下の(1)に掲げる評価に必要とされる情報を収集する。ただし、掲げられた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、その理由を示すことにより、それらの情報を収集する必要はない。また、これらの情報以外の情報を収集する必要が生じた場合には、当該情報を追加して収集する。

生態系等への影響評価は、(1)の評価に必要とされる情報を用いて、以下の(2)に掲げる評価項目ごとに、必要に応じ、定められた(2)に掲げる評価の実施方法に沿って行い、その評価結果を踏まえ、生態系等への影響が生ずるおそれがあるか否かを総合的に判断

する。

なお、浄化事業を個別に限定された場所で実施しようとするのではなく、適用条件を想定した上で複数の場所で実施しようとする場合は、その想定条件を満たす場所での情報を収集することによって生態系等への影響評価を行うこととする。

また、生態系等への影響評価の実施に当たっては、最新の科学的知見による情報を用いることが必要である。なお、評価を行うに当たり用いられた情報の出典（当該情報が学識経験者又は評価を行う者の有する知識又は経験に基づくものである場合はその旨）が明らかになるようにする。以上によって、評価の結果を記載した「生態系等への影響評価書」を策定する。

（１）評価に必要な情報

１）利用微生物の情報

利用微生物について、以下のような情報を収集する。収集に当たっては、第一には、各種データベース及び文献等の既知の情報の十分な調査を行い、情報が不足している場合には、必要に応じ実験室等での使用等の結果を収集する。

分類学上の位置付け及び分離源

使用等の歴史及び現状

生理学的及び生態学的特性

・基本的特性

・好適生育環境の条件（利用微生物の生存が有利になる条件、生存を制限する条件等）

・寄生性又は共生性

・生活環（接合、孢子形成等）

・病原性（主要な動植物及び人に対する影響）

・有害物質の産生性（主要な動植物及び人に対する影響）

・その他の情報

利用微生物の検出及び識別の方法並びにそれらの感度、特異性及び信頼性（必要に応じて、近年の微生物解析技術を踏まえること。）

２）浄化技術の情報

計画している浄化技術について、以下のような情報を収集する。収集に当たっては、第一には、文献等の既知の情報の十分な調査を行い、情報が不足している場合には、必要に応じ実験室等での使用等の結果を収集する。

浄化技術の内容

利用微生物の土壌、地下水等への導入方法及び導入条件並びに基本的な技術的原理の説明。

分解生成物及び分解経路等

想定される分解生成物の有無及び分解経路について、文献等の既知の情報の調査や実験室等での使用等の結果により確認する。分解生成物の存在が認められる場合には、その性状を調査する。なお、浄化対象物質以外の共存する汚染物質がある場合、その物質の挙動を調査する。

作業区域における利用微生物の挙動等

- ・ 生存・増殖能力及び生残性
- ・ 拡散の特性
 - ・ 分離源区域と作業区域の生存環境の比較、作業区域における増殖促進等のための選択圧
- ・ 他の微生物群集への影響（(2)を参照のこと）
 - 栄養物質等を添加する場合は、その内容
 - ・ 栄養物質等の名称（CAS 番号）、化学構造式、分子量
 - ・ 性状、分解性及び毒性等安全性
 - ・ 導入の目的
 - ・ 導入量
 - ・ 導入濃度及び導入頻度
 - ・ 環境基準等の規制等に関する情報
 - ・ 二次的な汚染の可能性がある物質を用いる場合は、その情報（物質名、毒性、導入時の濃度、導入量、残留性及び作業区域での拡散性）
 - ・ その他副次的な影響

3) 作業区域及びその周辺の情報

利用微生物を導入する場所について、以下のような情報を収集する。作業区域を特定しない場合においては、利用環境を具体的に想定して収集する。

作業区域等の特徴

- ・ 位置

作業区域の位置・周辺状況等

- ・ 現場における汚染原因等

汚染原因及び現在の汚染状況等

- ・ 水文地質学的特性

作業区域及びその周辺の地質条件(土壌種、有機物含量、物理・化学特性等)、並びに水理地質学的特性（帯水層の分布、地下水の水位等）

- ・ 生息する主要な動植物

作業区域内及びその周辺に生息・生育している主要な動植物。特に、生活環境に係る動植物等保護の対象となる生物種及び利用する微生物の病原性又は毒性によって影響を受けやすいことが知られている生物種につい

ては、詳細な情報。

- ・土地利用の状況

作業区域及びその周辺の土地利用の状況について、工業地域、商業地、住宅地等の別、また、住宅地にある場合には在住人口、工業地域等の場合には労働人口等についての情報。さらに河川水及び地下水の飲料用水や工業用水、灌漑用水等としての利用の状況についての情報。

- ・その他作業区域周辺の特徴

浄化対象物質の情報

対象物質の化学構造式、分子量、CAS 番号、性状、分解性及び毒性等安全性の情報。

また、既存の法律等により当該物質に関係する規制等がある場合には、その基準値等参考となる情報。

汚染状況

利用微生物の導入予定場所に存在する浄化対象物質の状況について、水平分布及び垂直分布に関する情報。浄化対象物質以外の共存する汚染物質がある場合は、その状況についての情報。

4) その他

上記1)～3)の情報収集に関しては、

国内外における使用等又は実験室等での使用等の結果に関する情報があれば収集する。

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、その理由を示すことにより、それらの情報を収集する必要はない。

上記1)～3)以外の情報を収集する必要がある場合には、当該情報を追加して収集する。

(2) 評価の項目及び評価の実施方法

事業者は、前記(1)の評価に必要とされる情報を用いて、以下に示す評価項目ごとに、評価を行う。また、以下の評価項目ごとの評価結果の概要及びこれらの評価を踏まえた総合的な判断の結果によって、浄化事業に伴う生態系等への影響を評価する。なお、評価を行う者が行った判断については、その判断の根拠を明らかにする。

利用微生物が浄化作業の終了後(注1)に増殖する可能性。必要に応じ、作業区域外への影響に配慮した効果的な措置。

作業区域における他の微生物群集への影響(注2)。

作業区域及びその周辺における主要な動植物及び人に対する、利用微

生物の病原性及び有害物質の産生性の有無その他の有害な影響を及ぼす可能性。必要に応じ、生態系等への影響に配慮した効果的な措置。

浄化作業に伴う浄化対象物質（必要に応じ、中間生成物を含む）の拡散の可能性。必要に応じ、作業区域外への影響に配慮した効果的な措置。

浄化に当たって栄養物質等を添加する場合は、浄化作業の終了後の当該物質の有意な残留の可能性。必要に応じ、作業区域外への影響に配慮した効果的な措置。

浄化作業の終了後の有害な分解生成物等の有意な残留の可能性。必要に応じ、作業区域外への影響に配慮した効果的な措置。

評価の実施方法としては、第一には、上記の ～ に関する既知の情報を十分に収集し、活用した上で行う（注3）。なお、情報が不足している場合は、必要に応じ、実験室等での使用等の結果等を収集して行う。

上記の 中、他の微生物群集への影響は、作業区域に類似した土壌等を選定し、当該土壌等の物質循環に深く関与している微生物の特定の種を選定等して評価するか（注4）又は適切な手法によって得られた微生物群集の構成変化（プロファイル変化）に基づき評価する。

また、上記の 中、主要な動植物に対する有害な影響は、作業区域及びその周辺で影響を受ける可能性のある動植物の種を選定して、受ける影響の具体的内容及び影響の生じやすさについて評価し、生態系への影響が生ずるおそれの有無について評価する。

（注1）浄化作業の終了後とは、設定した浄化目標達成後をいう。

（注2）ここでの「他の微生物群集への影響」とは、浄化作業終了時点において、利用微生物によって他の微生物群集が影響を受けたことによって、本来あるべき土壌等としての機能が失われ、かつ、その状態が長期に渡って継続的に維持されることが予想される影響を与えた場合を言う。具体的には、生存環境の競合又は有害物質の産生等により、導入微生物が他の微生物の生育を阻害し、生態系の基盤を大きく変化させることを通じて、間接的に主要な動植物の生育環境等への影響を与える性質等を評価する。

（注3）自然環境等から分離された微生物であれば、一般的には、生物学的知見の情報量が多く存在するため、その情報を十分調査することによって、判断することが重要である。

（注4）例えば、一般細菌（炭素循環に係る作用）、硝化菌・脱窒菌（窒素循環に係る作用）等を選定して、当該菌数の増減を測定することによって評価する、又は土壌の呼吸活性（例えば、二酸化炭素発生

量)又は硝化活性、脱窒活性等を測定することによって評価する。

3. 浄化事業の実施

浄化事業は浄化事業計画に従って、行うこととする。

4. 浄化事業の終了

浄化事業計画に定めた浄化事業の終了方法とその手順に従って、浄化作業の終了後、浄化対象物質、利用微生物、分解生成物及び栄養物質等の濃度等が以下のとおり、終了可能な水準に達したことを確認して浄化事業終了とする。

- ・浄化対象物質が、浄化事業計画に定めた浄化目標に達したこと
- ・利用微生物が、浄化作業終了後に増殖、又は高濃度に残留しないこと
- ・分解生成物が、浄化作業終了後に有意に残留しないこと
- ・栄養物質等が、浄化作業終了後に有意に残留しないこと
- ・その他、浄化事業計画に定めた事項が遵守されていること

第6 国による確認

事業者がバイオオーグメンテーションを実施する際、浄化事業計画が指針に適合しているか否かについて、広範かつ高度な科学的知見に基づいた判断を必要とすることから、指針において国への確認を求めることができる制度を設けることが必要である。事業者は、国の確認を受ける場合には、生態系等への影響評価書とともに、浄化事業計画を記載した申請書を国に提出する。国は、以下の観点から、生態系等への影響評価書が添付された浄化事業計画の確認を行うこととなる。

- ・生態系等への影響評価書及び学識経験者から聴取した意見の内容に照らし、浄化事業計画に従って浄化事業を行った場合に生態系等に悪影響を及ぼすおそれがないか否かについて科学的知見に基づき十分に評価された計画であること。
- ・利用微生物の特性又は浄化事業計画の内容及び方法に応じ、既知の十分な情報収集又は実験室等での使用等の結果を収集することにより、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。
- ・利用微生物の特性又は浄化事業計画の内容及び方法に応じ、生態系等への影響の評価に際し勘案した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。

また、確認に当たっては、微生物や土壌、地下水等についての広範かつ専門的な知見を必要とすることから、学識経験者から意見を聴取した上で判断することが必要である。

なお、国は、確認の日以降の科学的知見の充実により、確認を受けた浄化事業計画に従って浄化事業が行われる場合においてもなお生態系等への影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、学識経験者からの意見を聴取した上で確認を取り消す

とともに、必要に応じ、その知見について関係者へ周知する。

第7 浄化事業の実施に当たっての留意事項

浄化事業の実施に当たって留意すべき事項について、以下に記述する。

1. モニタリング

事業者は、浄化事業計画に基づき、浄化事業期間（浄化事業計画に定めた期間）内のモニタリングを実施することとする。モニタリングについては、以下の項目において行うこととする。

- ・ 浄化対象物質
- ・ 利用微生物及び必要な場合は他の微生物の変化
- ・ 分解生成物（必要に応じ中間生成物を含む）
- ・ 栄養物質等
- ・ その他の必要な項目

2. 緊急時の対応及び事故対策

浄化事業の実施中に、生態系等に影響が及ぶおそれのあることを示すモニタリング結果が得られた場合や事故が発生した場合には、事業者は、生態系等への影響を防止するために必要な措置を講じる必要がある。また、第6の国による確認を受けた事業者は、その旨を速やかに国に連絡することとする。

3. 安全管理体制の整備

安全で的確な実施を確保するため、事業者は安全管理体制を整備することが必要である。このため、事業所等の長は、浄化事業ごとに経験を有する全体の管理を行う者及びその者を補佐する者を配置し、安全管理業務を遂行させ、さらに、安全・環境管理について助言を行う委員会を設置するとともに、微生物の取扱いに関する教育訓練、事故時における連絡体制の整備を行うよう努める。

4. 記録等の保管

事業者は、浄化事業の実施状況、上記3における委員会の審議内容等、当該事業に必要と考えられる事項に対する記録を行い、その保管をしよう努めること、また、事業期間に導入した利用微生物について、適切な期間、適切な管理のもとに保管する。

5. 周辺住民等への情報の提供

指針にのっとったバイオレメディエーションは、利用される微生物について科学的知見に基づく安全性評価を実施し、安全管理を適切に行うことによって、安全性の確

保に万全を期して進められるものであるということに対する周辺住民等の一層の理解が必要なことから、事業者は必要に応じ、周辺住民等に対して十分な情報の提供を行い、周辺住民等とのコミュニケーションを進めることが必要である。

6 . その他

指針は、微生物によるバイオレメディエーションに関する今後の科学的知見の充実又は当該技術の進展及び普及を踏まえ、必要に応じ見直しを行うことが必要である。

用語の解説：近年の微生物解析技術

MPN 法：MPN 法は、培養法に基づいた微生物の計数方法の一つで、Most Probable Number 法の略である。液体の選択培地等に、希釈した試料を接種し、特定の微生物を選択的に培養する。希釈率および増殖が認められたチューブの数から、統計学的に菌数を推定することができる。特定微生物の検出や定量には有効であるが、培養不可能な微生物には適用できない。

PCR-DGGE 法：PCR-DGGE 法は、核酸を利用したモニタリング法の一つで、Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis 法の略である。環境中の微生物群集について、PCR で遺伝子を増幅し、変性剤の濃度勾配を形成させたゲル上で、それぞれの塩基配列の違い（微生物種の違い）により電気泳動度が異なることを利用して、微生物群集由来の遺伝子を分離する方法である。微生物を単離培養しなくても、微生物群集を再現性よくプロファイリングすることが可能である。さらに、DGGE で得られたバンドを切り出して塩基配列を決定することにより、微生物の系統関係を推定することができる。ただし、PCR を用いて遺伝子増幅を行っているため、定量性に欠けることに注意を要する。

T-RFLP(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism、制限酵素末端断片長解析)法：末端を蛍光標識したプライマーを用いて目的 DNA を PCR で増幅し、制限酵素で消化した後、そのフラグメントを電気泳動する。集団を構成する微生物の種類が違えば制限酵素切断部位も異なるため、電気泳動により得られるピークの強度、位置、数も異なる。このことを利用して微生物群集の構造を解析する。微生物群集の解析には、16S rRNA 遺伝子をターゲットとする方法がよく用いられる。

PCR-サザンプロット解析法：サザンプロットは 1975 年にサザン (Southern) が開発した DNA の分析方法で、アガロースゲル等で電気泳動した DNA をメンブレンに 1 本鎖の状態ですり取り、放射性同位元素等で標識した DNA とハイブリダイズさせ、目的 DNA を検出する。この方法は検出感度が低いため、微生物群集の解析においては、感度を上げるために、土壌等から抽出した DNA の目的配列を PCR によって増幅した後、サザンプロットを行う。これを PCR-サザンプロットという。

マイクロアレイ(microarray)、DNA マイクロアレイ (DNA microarray)：様々な微生物の rDNA を微小な間隔で規則正しく並べて固定化した基盤(マイクロアレイ)上に、試料から抽出した蛍光標識された rRNA を滴下し、ハイブリダイズした rRNA を検出することにより、微生物の群衆組成を同定・解析する方法。微生物から抽出した rRNA 分子を直接解析に用いるため、定量的な解析が可能である。

(参 考)

産業構造審議会 化学・バイオ部会 組換え DNA 技術小委員会
開放系利用指針作成ワーキンググループ 及び
中央環境審議会 水環境・土壌農薬合同部会
バイオレメディエーション小委員会 合同会合審議経過

平成16年4月26日 第1回

- (1) 検討会の設置趣旨(経済産業省、環境省)
- (2) 従来指針について(経済産業省、環境省)
- (3) カルタヘナ法の概要
- (4) 合同会合における主要な論点(案)
- (5) バイオレメディエーション実施事例に関するプレゼンテーション
- (6) その他

平成16年6月11日 第2回

- (1) バイオレメディエーション実施事例等に関するプレゼンテーション
- (2) 指針の方向性について(案)
- (3) その他

平成16年7月30日 第3回

- (1) 委員からの意見について
- (2) バイオレメディエーション利用指針に関する報告書(案)について
- (3) その他

平成16年10月7日 第4回

- (1) バイオレメディエーション利用指針に関する報告書(案)について
- (2) その他

産業構造審議会 化学・バイオ部会 組換えDNA技術小委員会
開放系利用技術指針作成ワーキンググループ委員名簿

委員長

藤田 正憲 大阪大学大学院工学研究科 教授

委員

青木 宙 東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科 教授

江崎 孝行 岐阜大学大学院医学研究科 教授

岡村 和夫 清水建設株式会社 技術研究所 社会基盤技術センター
環境バイオグループ主席研究員

妹尾 啓史 東京大学大学院農学生命科学研究科 教授

田口 雄作 (独)産業技術総合研究所 地圏資源環境研究部門 主任研究員

辻 博和 株式会社大林組 東京本社 土木技術本部 環境技術第二部長

富田 房男 放送大学北海道センター 所長

中村 和憲 (独)産業技術総合研究所 生物機能工学研究部門 副研究部門長

中村 寛治 東北学院大学 工学部 環境土木工学科 教授

福田 雅夫 長岡技術科学大学工学部生物系 教授

宮 晶子 株式会社荏原総合研究所 生物研究室 室長

森永 力 広島県立大学生物資源学部生物資源開発学科 教授

山下 修一 東京大学大学院農学生命科学研究科 助教授

山田 靖子 国立感染症研究所 動物管理室 室長

[敬称略]

中央環境審議会水環境・土壌農薬合同部会
バイオレメディエーション小委員会委員名簿

委員長

松本 聰 秋田県立大学生物資源科学部 教授

委員

大塚 直 早稲田大学法学部 教授

加藤 順子 (株)三菱化学安全科学研究所 リスク評価研究センター長

中杉 修身 横浜国立大学 客員教授

森田 昌敏 (独)国立環境研究所 統括研究官

金子 信博 横浜国立大学大学院環境情報研究院 教授

高松武次郎 (独)国立環境研究所 水圏環境研究領域土壌環境研究室長

長谷部 亮 (独)農業環境技術研究所 化学環境部有機化学物質研究グループ長

藤田 正憲 大阪大学大学院工学研究科 教授

矢木 修身 東京大学大学院工学系研究科附属水環境制御研究センター 教授

渡辺 信 (独)国立環境研究所 生物圏環境研究領域長

[敬称略]

微生物によるバイオレメディエーション利用指針連絡先

経済産業省 製造産業局 生物化学産業課

〒100-8901

東京都千代田区霞が関1 - 3 - 1

TEL:03-3501-8625

FAX:03-3501-0197

環境省 環境管理局 総務課環境管理技術室

〒100-8975

東京都千代田区霞が関1-2-2 中央合同庁舎5号館23階

TEL:03-3581-3351(内線6557)

FAX:03-3593-1049