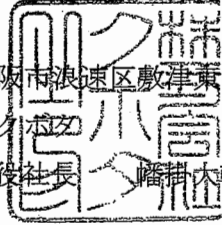


平成 18 年 3 月 15 日

経済産業大臣 二階 俊博 殿
環境大臣 小池 百合子 殿

住所 大阪府大阪市浪速区敷津東 1-2-47
氏名 株式会社 小池 百合子
代表取締役社長 藤井 大輔



電話番号 06-6648-2111

「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」に係る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

平成 18 年 3 月 15 日

企 業	所在地	(郵便番号 301-0852) 茨城県竜ヶ崎市向陽台 5 丁目 6 番地 Tel.0297-64-7211
	名称	株式会社クボタ 環境エンジニアリング事業本部 バイオセンター
	代表者職 名・氏名	理事(所長) 倉根 隆一郎
事 業 所	所在地	日本国内全域において事業計画に沿った実施を想定しているため、 適用サイトの特定は行わず、国内全域を対象とする。
	名称	
	事業所長氏 名	
事業名称		バイオオーグメンテーションによるテトラクロロエチレン含有汚染 土壌の浄化
1 . 利用微生物の 種類の名称		<i>Desulfitobacterium</i> sp. KBC1 株 テトラクロロエチレン (PCE) を脱塩素化してトリクロロエチレン (TCE) に変換する細菌 (添付資料 1)
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 テトラクロロエチレン (PCE) 0.1 ~ 15.0mg/L 程度 (土壌溶出濃度) ・主として PCE 含有汚染土において想定される共存物質 トリクロロエチレン (TCE) 0.1 ~ 15.0mg/L 程度 (土壌溶出濃度) ジクロロエチレン (<i>cis</i> -DCE が主体) 0.1 ~ 15.0mg/L 程度 (土壌溶出濃度)
(2)	浄化対象物 質の浄化目 標濃度	・各汚染物質について環境基準値以下とする。 PCE : 0.01mg/L 以下 (土壌溶出濃度) TCE : 0.03mg/L 以下 (土壌溶出濃度) <i>cis</i> -DCE : 0.04mg/L 以下 (土壌溶出濃度) (土壌の汚染に係る環境基準について 平成 3 年環境庁告示第 46 号 を参照)

(3)	浄化事業期間	<ul style="list-style-type: none"> ・浄化作業期間(想定): 約3ヶ月(汚染土壌10,000m³程度として) ・浄化事業終了確認期間(想定): 約10日間 <p>上記期間はあくまでも平均的な浄化期間であり、実際はサイトの規模(汚染土壌量)によって異なる。</p>
3. 浄化事業の実施方法		
(1)	作業区域	<p>日本国内全域での事業展開を想定(サイトは特定しない)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・主として各種製造業ならびに洗濯業等の工場敷地内および不法投棄現場での浄化を想定 ・利用微生物を取り扱う範囲は、工場敷地内および不法投棄現場で、添付図のとおり想定(添付資料2)・浄化対象面積: 工場敷地内の場合1,000~100,000m²程度を想定 浄化対象土壌: 工場敷地内の場合5,000~50,000m³程度を想定
(2)	作業区域及びその周辺の概要	<p>日本国内全域での事業展開を想定していることから、作業区域および周辺の概要はサイトごとに異なる。</p>
(3)	浄化技術の概要	<p>本技術は、嫌気条件あるいは若干の酸素が存在する好気条件においてPCEをTCEに脱塩素化する当該微生物の性質を利用し、まずは、汚染土壌に含まれるPCEを利用微生物の作用によりTCE(一部<i>cis</i>-DCEを含む)に変換(嫌気バイオ工程)し、次いで一般的な土壌改良(砂、パーライトもしくは生石灰処理)を施すことにより、含有するTCE(一部<i>cis</i>-DCEを含む)を揮散除去させるものである(土壌改良工程)(添付資料3) なお、上記工程において毒性の高い塩化ビニルモノマーを生成することなく、作業環境上も問題にならないことを確認している(添付資料28)。</p> <p>土壌改良時における土壌改良材の投入量は以下の通り。</p> <p>砂添加の場合: 処理土壌1kg当たり100~500g程度</p> <p>パーライト添加の場合: 処理土壌1kg当たり10~200g程度</p> <p>生石灰添加の場合: 処理土壌1kg当たり10~150g程度</p> <ul style="list-style-type: none"> ・工法名称: PCE含有汚染土壌を対象とした掘削オンサイト型処理 <p>掘削した汚染土壌をサイトの地上部で無害化処理し、最終的に掘削場所に埋め戻す。1日当たりの汚染土壌処理量は、1ライン当たり100m³程度とし、順次同様の処理を繰り返すバッチ処理方式にて対応する。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・本技術の特長 <p>本技術は、比較的高濃度のPCEを含む掘削土壌を対象とし、特に浄化の難しい粘性土壌等を対象とする。</p>

(4)	利用微生物の導入方法等	<p>a. 利用微生物の導入方法 利用微生物は、作業区域外で培養したものを作業区域内に設置した菌体保管場所に一時保管し、適宜必要量を土壌処理に用いるものとする。菌体は、必要に応じて水道水等により濃度調整し、後述する栄養物質と共に汚染土壌に添加・混合する。</p> <p>b. 利用微生物の菌密度及びその量 菌密度：菌体（保管原液） $10^7 \sim 10^{10}$ cells/ml 投入量：土壌への導入菌数 $10^4 \sim 10^7$ cells/g 乾土</p> <p>c. 利用微生物と同時に導入する栄養物質等 物質名：1) コーンステープリカー 2) 乳酸ナトリウム 3) リン酸水素ニアンモニウム 4) 炭酸水素ナトリウム 導入方法：利用微生物と共に掘削土壌に所定量添加・混合する。 導入量：基本導入量（$100 \times$ 導入栄養物質重量 / 乾土重量） 1) コーンステープリカー 0.3% 2) 乳酸ナトリウム 0.3% 3) リン酸水素ニアンモニウム 0.03% 4) 炭酸水素ナトリウム 0.1% その他：導入量はサイトの諸条件（土質、対象物質濃度等）によって異なる。</p>
-----	-------------	--

<p>(5) モニタリングの実施方法</p>	<p>・モニタリングする項目</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 浄化対象物質および主として汚染土壌に含有する共存物質が、浄化作業の終了時に浄化目標濃度(環境基準値以下)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ないこと、又は高濃度に残留しないこと 3) 残留栄養物質等が、浄化作業の終了後において土着有害微生物に有意な影響を与えないレベルであること 4) 栄養物質による分解生成物が、浄化作業の終了後において土着有害微生物や大気汚染に有意な影響を与えないレベルであること 5) 栄養物質の投入により、有害微生物が有意に増殖しないこと 6) 複合汚染がある場合は、浄化対象物質以外の汚染物質の挙動を調査し、浄化作業の終了後に有意に残留することがないこと (例：栄養物質投入による重金属の溶出量変化) <p>* 土着有害微生物に有意な影響を与えないレベルについては、P17 d.他の微生物群集への影響 2) 項を参照。</p> <p>・モニタリングの方法</p> <p>まずは、浄化作業開始前の小規模事前評価試験(現場土壌を用いた隔離された閉鎖系での適用評価試験)において、本浄化事業計画に基づいてモニタリング項目が問題のないことを十分に確認した上で浄化事業を実施することとする(添付資料3)。</p> <p>浄化作業時には、想定現場配置図(添付資料2)の養生場所から定期的(概ね10~30日ごと)に処理土壌の一部をサンプリングし、浄化対象物質および主として汚染土壌に含有する共存物質が浄化目標濃度以下であることを確認する。一方、埋め戻しに当たっては、埋め戻し土仮置場所の処理土壌を対象として上記したすべてのモニタリング項目を実施し、問題の無いことを確認した上で埋め戻し作業を行う。</p> <p>採取した土壌は、JIS規格の試験方法に則り浄化対象物質および主として汚染土壌に含有する共存物質を測定すると共に、他の微生物群集への影響、栄養物質に由来する分解生成物(乳酸、酢酸、プロピオン酸、n-酪酸等)を調査する。また、必要に応じてその他の化合物(重金属、悪臭物質)を測定する。利用微生物の定量においては、後述する特異的なデハロゲナーゼ遺伝子領域を標的とした微生物モニタリング手法を適用する。(添付資料5および6の方法を参照)</p>
------------------------	--

		<ul style="list-style-type: none"> ・モニタリング期間 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する。
(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 汚染物質(PCE)および主として汚染土壌に含有する共存物質(TCE、<i>cis</i>-DCE 等)の濃度が、環境基準値以下になった時点を浄化作業終了の目安とする。浄化作業終了後の土壌については、遮水シートを敷いてシート被覆を施した「埋め戻し土仮置場所」に集積し一時的に保管する(添付資料2)。 ・浄化事業全体の終了方法 処理が終了した土壌(埋め戻し土仮置場所)は、主として掘削箇所に埋め戻すが、モニタリング項目に定めた事項(浄化対象物質および共存物質、利用微生物の残留(10⁶cells/g未満*)、栄養物質、栄養物質による分解生成物、有害微生物の有意な増殖および重金属などの複合汚染が問題のないこと)を確認した後に埋め戻す。また、作業区域内において汚染物質の拡散の恐れのある箇所(汚染土壌の一次保管場所、養生エリアの下部等)についても浄化対象物質および共存物質のモニタリングを行い、汚染の拡散が無いことを確認する。これらの作業完了をもって浄化事業全体を終了とする。なお、土壤汚染対策法に基づいた汚染サイトの場合は、土壤汚染対策法施行規則28条に則って浄化事業終了後の確認を行うものとする。 <p>*通常、利用微生物は嫌気養生期間中に10⁸cells/g程度にまで増殖する(添付資料6)。このことから、最終的な生残数が10⁶cells/g未満であればピークから1/100以下に減少したことになり、有意な減少傾向および場の優占種にならないことを確認したことになる。</p>
4.安全管理の方法		
(1)	利用微生物の拡散防止対策	<ul style="list-style-type: none"> ・利用微生物の処理は建屋もしくはテント内で実施し、処理土壌は遮水シートを敷いた場所で積上養生する。 ・建屋外の埋め戻し土仮置場所においても、地表面遮水やシート被覆を行い、降雨による漏洩等を防止する。(添付資料2を参照) ・作業従事者には、保護手袋、保護マスク、保護メガネ、保護衣の着用を義務付ける。また、使用した保護衣等の着替えを行うことも義務付ける。

(2)	<p>栄養物質等の拡散防止対策</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・栄養物質の処理は建屋もしくはテント内で実施し、処理土壌は遮水シートを敷いた場所で積上養生する。 ・建屋外の埋め戻し土仮置場所においても、地表面遮水やシート被覆を行い、降雨による漏洩等を防止する。(添付資料2を参照) ・積上養生場所等からの浸出水の漏洩に備え、水処理設備を作業区域内に設置し処理する。 ・処理過程で発生する悪臭物質を含む排ガスについては、ガス処理設備(プロアー吸引/活性炭吸着塔等)により適正に処理し、周辺地域への大気汚染を防止する。 ・作業従事者には、保護手袋、保護マスク、保護メガネ、保護衣の着用を義務付ける。また、使用した保護衣等の着替えを行うことも義務付ける。
(3)	<p>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</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・汚染土壌の掘削から移送工程において、鋼矢板等の止水兼土留め対策を実施するとともに、雨水対策として仮設テント等を設けることで汚染物質の飛散、揮散および流出による拡散を防止する。 ・積上養生場所等からの浸出水の漏洩に備え、水処理設備を作業区域内に設置し処理する。 ・事業の実施に当たっては、適正な作業環境測定(添付資料28)および大気汚染濃度測定等を実施し、必要に応じて作業環境の改善および周辺への拡散防止対策を講じるものとする。 ・処理過程で発生するVOCsを含む排ガスについては、ガス処理設備(プロアー吸引/活性炭吸着塔等)により適正に処理し、周辺地域への大気汚染を防止する。 ・作業従事者には、保護手袋、保護マスク、保護メガネ、保護衣の着用を義務付ける。また、使用した保護衣等の着替えを行うことも義務付ける。 ・浄化事業終了にあたっては作業区域内において汚染物質の拡散の恐れのある箇所(汚染土壌の一次保管場所、養生エリアの下部等)についても浄化対象物質および共存物質のモニタリングを行い、汚染の拡散が無いことを確認する。汚染が確認された場合は適切に浄化を行う。

<p>(4) 安全管理体制の整備</p>		<p>・微生物の取扱い経験を有する全体管理者、およびその者を補佐する者を配置する（管理体制図下記）。これと並行して、安全・環境管理委員会を立ち上げ、事業の安全性確保について諮問する。</p> <div style="text-align: center;"> <pre> graph TD A[事業所長] --- B[全体管理者 (微生物取扱経験者)] B --- C[全体管理者補佐] C --- D[現場作業従事者] E[安全・管理委員会] --- B </pre> </div> <p>・微生物ならびに周辺設備・装置の取扱い方法についての安全作業マニュアルを作成し、現場従事者への教育および周知徹底を図る。</p>
<p>(5) 記録等の保管</p>		<p>全体管理者は、以下の事項について検査、調査内容、方法、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。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 利用微生物の名称およびロット番号 2) 利用微生物の保管 3) 利用微生物の生物学的性状および試験検査の年月日 4) 利用微生物の受け入れ状況（日時、相手先の氏名・住所、目的） 5) 健康診断の結果（従事者の免疫低下、アレルギーなどに配慮） 6) 安全・環境管理委員会の審議記録 7) 設備、装置の定期点検および運転操作の記録
<p>(6) 緊急時の対応及び事故対策</p>		<p>・天災を含めた事故発生時の対策マニュアルを作成し、現場従事者への徹底を図る。</p> <p>・利用微生物を殺菌する必要がある場合は、回収して熱滅菌処理、あるいは焼却による産業廃棄物処理等により適切に処分する。</p>

（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

利 用 微 生 物 の 情 報	<p>(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）</p> <p>学名 : <i>Desulfitobacterium</i> sp. KBC1株 / 非組換え微生物（添付資料1）</p> <p>分離源：茨城県竜ヶ崎市の畑土壌より分離</p> <p>寄託 : 寄託機関 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター 登録番号 FERM BP-08573 / 寄託者 株式会社クボタ バイオセンター</p>
	<p>(2) 使用の歴史及び現状</p> <p><i>Desulfitobacterium</i> sp. KBC1株の野外での使用実績はこれまでにない。また、<i>Desulfitobacterium</i> 属細菌（近縁種）のバイオオーグメンテーションへの利用事例も世界的にない。ただし、本属細菌は自然界に幅広く分布しており、栄養物質を投入して土着の分解菌を活性化するバイオスティミュレーションの適用サイトにおいては、土着分解菌の一つとして実際に有効利用されていると推測される。</p> <p>一方、本属細菌についての研究実績は非常に多く、1994年のタイプストレイン <i>Desulfitobacterium dehalogenans</i> の分離・同定を契機として、国内外で数多くの研究が行われている（添付資料7、8）。</p> <p>我々は、平成15年6月に本利用微生物の分離に成功し、以降2年以上に渡り計10名程度が本微生物に係る研究開発に従事したが、これまでに健康障害に関する問題は全く確認されていない。</p>

(3) 生理学的及び生態学的特性

a . 基本的特性

Desulfitobacterium 属細菌は、亜硫酸塩を還元して生育できることから生理学的には硫酸還元菌に類似すると考えられ、生育環境は嫌気的環境下であると推測される。また、土壌や地下水中などの様々な環境下から分離されていることから、地球上に広範囲に生息する微生物であると考えられる（添付資料8）。

利用微生物は、16S rDNA配列から*Desulfitobacterium* 属細菌に分類される。菌の大きさは2~3µm程度のグラム陽性桿菌であり、乳酸やピルビン酸などの低級脂肪酸を用いて、亜硫酸塩やPCE、*o*-クロロフェノール類を還元してエネルギーを得ることができる。また、利用微生物は土壌中のPCE（0.01~15mg/L：土壌溶出濃度）を脱塩素化し、環境基準値以下に高速に低減させることができ、分解過程で塩化ビニルモノマーを生成しない（添付資料1）。

利用微生物は、*prdA*遺伝子によってコードされるPCE脱塩素化酵素（デハロゲナーゼ）を発現し、機能させることでPCEをTCEまで脱塩素化することができる。*prdA*遺伝子は、*pceA*（添付資料9）、*tceA*（添付資料10）、もしくは*vcrA*（添付資料11）などの他のデハロゲナーゼ遺伝子と比較してユニークなDNA配列であり、アミノ酸レベルの相同性は最大でも36%と極めて低い（添付資料1）。このことから、本遺伝子領域を利用してDNAレベルでの検出を行うことで、利用微生物の特異的なモニタリングが可能になる。

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

乳酸およびピルビン酸等の有機酸を添加した液体培地を用いた場合、利用微生物は10~40 の間で生育することができ、至適温度は34 である。pHは、7~9で生育することができ、至適pHは7.5である。また、利用微生物は嫌気条件下および0.6%以下の酸素分圧濃度の微好気条件下では生育することができるが、1%を超える酸素分圧濃度条件では生育することができない（添付資料1）。

c . 寄生性又は共生性

既知情報（データベース、書籍等）を調査し、*Desulfitobacterium*属細菌およびその近縁種（硫酸還元菌）の動植物等への寄生性又は共生性について記載がないことを確認している。

・ 調査対象

国立感染症研究所病原体等安全管理規定

米CDC病原体リスト

日本細菌学会

（バイオセーフティー指針：病原菌危険度リスト / 日和見感染症リスト）

経済産業省微生物安全情報データ

（ヒトの病原微生物 / 動物病原微生物（家禽・魚介類等） / 植物病原微生物）

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology

獣医微生物学 文永堂1995

新編獣医微生物学 養賢堂1989

魚病学概論 恒星社厚生閣1996

植物病理学辞典 養賢堂1995

日本植物病害大辞典 全国農村教育協会1998

天敵微生物の研究手法 日本植物防疫協会1993

d . 生活環（接合、孢子形成等）

利用微生物は、孢子およ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）

利用微生物およびその近縁種は、想定した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、既知の文献およびデータベース等に主要な家畜・家禽・水産物・昆虫・植物・哺乳類・鳥類・水棲生物等の病気との関連性は示されていない。（調査対象は、c. 寄生性又は共生性の項と同じ） また、本事業では建屋もしくはテント内に移送した掘削土壌を対象として利用微生物を導入し、処理後に適正な微生物モニタリングを実施して土壌中の利用微生物数が有意に増殖していないことを確認した上で埋め戻し等の作業を行うことから、周辺の陸上動植物や水棲生物等への暴露の可能性は極めて低いものと考えられる。

しかしながら、本利用微生物および近縁種の病原性に係る既存情報が全くないこと、ならびに万が一の作業従事者への暴露や周辺環境への流亡および拡散の可能性を考慮し、利用微生物を用いて主要な動植物に対する投与試験を実施した。試験は、ヒトに対する影響試験6項目（ラット/単回経口投与試験、ラット/単回経気道投与試験、ラット/単回静脈内投与試験、ウサギ/単回経皮投与試験、ウサギ/眼一次刺激性試験、モルモット/皮膚感作性試験）、および環境生物に対する影響試験4項目（コイ/淡水魚影響試験、ミジンコ/淡水無脊椎動物影響試験、藻類影響試験、ウズラ/鳥類影響試験）を行った。試験の結果、いずれの試験項目においても感染性、病原性、毒性、体内生残性、および生長阻害に係る影響等を示さないことを確認している。なお、体内生残性評価は、投与後経日的（単回経口投与試験の場合：投与後0日、1日、3日、7日、14日、21日）にMPN法（PCR検出）にて生菌数を測定した（添付資料12～23）。

f . 有害物質の産生性（主要な動植物及び人に対する影響）

利用微生物と共に導入する栄養物質（乳酸ナトリウム）を由来とする有機酸（酢酸、プロピオン酸、ギ酸、n-酪酸等）およびサイトの土質によっても大きく異なるが嫌気反応に起因する化合物（硫化メチル、二硫化メチル、トリメチルアミン等）の生成が確認されている。その他、無機成分としてはアンモニアが検出される可能性がある。栄養物質に由来する有機酸については生石灰の場合を除き、微生物処理後の土壌改良処理により急速に消失する（添付資料6）。生石灰の場合は微生物が死滅することにより分解されないが、残留する有機酸は一般環境中で易分解性であることから（添付資料6）、埋め戻し後に周辺の生態系への影響（主要な動植物及び人に対する影響）を及ぼすものとはならないと考えられる。また、嫌気反応による化合物についても、排ガス処理装置及び水処理設備により適正に処理されることから、埋め戻し後に周辺の生態系への影響を及ぼすものとはならないと考えられる（添付資料24）。

以上の生成物を考慮して、サイトでの実施に当たっては適正な作業環境測定および大気汚染濃度測定（悪臭防止法に指定される悪臭物質等）等を実施し、必要に応じて作業環境の改善、および周辺への悪臭汚染防止対策（検出物質に応じた排ガス処理方法の決定）を講じるものとする。

	<p>g . 利用微生物の特性に応じて、その他必要な情報特になし。</p> <p>(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</p> <p>1) 利用微生物のモニタリング方法 利用微生物を含む土壌試料を段階希釈 (× 10) し、その希釈液を特定の専用培地に接種 (3連制) したのち、密栓して30 ℃ で3日間静置培養する。その後、各々の培養液からDNAを抽出し、利用微生物が保有する特異的なデハロゲナーゼ遺伝子 (<i>prdA</i>) 由来のプライマーを用いてPCR増幅を行う。PCR増幅の断片の有無を指標として、最確数法 (MPN法 / 3連制) により利用微生物の生菌数を定量する (添付資料25の方法を参照) 。</p> <p>2) 本手法の特異性 使用するプライマーは利用微生物に特異的な配列であり、これまでのところ本遺伝子 (<i>prdA</i>) に高い相同性を示す遺伝子は見出されていない (添付資料1) 。このことから、本手法は利用微生物に特異的なモニタリングができるものと考えられる。</p> <p>3) 本手法の感度 利用微生物は、上記培養条件において生菌1cellで増殖可能なことを確認している。従って、本モニタリング手法は生菌1cellからの検出が可能である。</p>
<p>浄化技術の 情報</p>	<p>(1) 浄化技術の内容 利用微生物は、作業区域外で培養したものを作業区域内に設置した菌体保管場所に一時保管し、適宜必要量を土壌処理に用いる。菌体保管液 ($10^7 \sim 10^{10}$ cells/ml) を必要に応じて水道水等により希釈調整し、後述する栄養物質と共に汚染土壌に添加、混合する ($10^4 \sim 10^7$ cells/g乾土) 。</p> <p>なお、本事業は嫌気条件あるいは若干の酸素が存在する微好気条件において PCE を TCE に脱塩素化する利用微生物の性質を利用し、まずは、汚染土壌に含まれる PCE を利用微生物の脱塩素化作用により TCE (一部 <i>cis</i>-DCE を含む) に変換し (嫌気バイオ工程 : 3日間程度養生) 次いで一般的な土壌改良 (砂、パーライトもしくは生石灰処理) を施すことにより、含有する TCE (一部 <i>cis</i>-DCE を含む) を揮散除去させる (土壌改良工程 : 1日間程度養生) ものである。なお、上記工程において塩化ビニルモノマーを生成することはなく、作業環境上も問題にならないことを確認している (添付資料 28) 。</p> <p>・ 工法名称 : PCE 含有汚染土壌を対象とした掘削オンサイト型処理 掘削した汚染土壌をサイトの地上部で無害化処理し、最終的に掘削場所に埋め戻す。 1日当たりの汚染土壌処理量は、1ライン当たり 100m³程度とし、順次同様の処理を繰り返すバッチ処理方式にて対応する。</p>

(2) 分解生成物、分解経路等

1) 分解生成物

利用微生物による浄化過程において、TCE（および*cis*-DCE）などの塩素化エチレンが出現する可能性がある（添付資料6）。この工程において塩化ビニルモノマーを生成することではなく、作業環境上も問題にならないことを確認している（添付資料28）。その他の生成化合物に係る情報については、前項（利用微生物の情報 / 生理学および生態学的特性 / f. 有害物質の産生性）に記載済み。

2) 分解経路：嫌気バイオ工程

利用微生物は、土壌溶出濃度0.01～15mg/LのPCE汚染を環境基準値レベル（<0.01mg/L）にまで脱塩素化分解することができ、変換後は土壌中にはTCEが蓄積する。ただし、この脱塩素化の際、一部脱塩素化酵素のゆらぎにより変換されたTCE量に対しておよそ1%の割合で*cis*-DCEを生じる可能性がある。

3) 分解経路：土壌改良工程

前段の嫌気バイオ工程で蓄積したTCE（および*cis*-DCE）を、土壌改良処理を施すことによって環境基準値以下（TCE：<0.03mg/L、*cis*-DCE：<0.04mg/L）にまで揮散除去する（添付資料6）。揮散ガスは、トラップしてガス処理設備で適正に処理した後に大気放散する。

4) 分解経路：浄化効果のマスバランス推定評価

これまでの典型的な浄化結果に基づき、各処理工程における塩素化エチレンのマスバランスを推定した。その結果、PCEについてはおよそ85%が利用微生物により脱塩素化分解され、残りの15%は揮散効果により除去されるものと推定された。

一方、TCEおよび*cis*-DCEについては、後段の土壌改良効果により100%揮散除去されるものと推定された（添付資料26）。

(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

性質の異なる土壌（3種）ならびに環境水（3種）を選定し、各試料中での生残性を調査した（添付資料25）。

1) 土壌中での生残性試験結果

利用微生物を各種土壌に 10^7 cells/g程度になるように添加・混合し、任意の温度条件（10、20、30）に保管した。その後、土壌中に残存する利用微生物数を経日的にモニタリング調査した。その結果、土壌A（高液性限界の砂質粘土）、土壌B（高液性限界の粘土）、土壌C（礫質砂）のいずれにおいても利用微生物の速やかな減少が確認された。

2) 環境水中での生残性試験結果

利用微生物を環境水3種（W1 / 地下水、W2 / 湖沼水、W3 / 河川水）および対照区として滅菌蒸留水（W4）に 10^7 cells/ml程度になるように添加し、任意の温度条件（10、20、30）に保管した。その後、水中に残存する利用微生物数を経日的にモニタリングしたところ、土壌の場合と同様にいずれの環境水中においても速やかな減少が確認された。以上のことから、利用微生物の環境中での生存能力は非常に低く、速やかに減少するものと推測される。

b. 拡散の特性

本技術は、掘削土壌を対象とした浄化手法であり、かつ閉鎖された空間（建屋内もしくはテント内）で利用微生物を使用することから、周辺地域への利用微生物の拡散は考えられない（添付資料4を参照）。仮に、大量の利用微生物が環境中（拡散媒体：水系、土壌等）に流出したとしても、利用微生物の生存能力は低く急速に減少するものと予測される（添付資料25）。

また、処理後土壌には利用微生物が有意に残留していないことをモニタリングした上で埋め戻し作業を行うことから、周辺生態系への影響評価（希少生物の存在状況等）は必要ないものと考えられる。

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

利用微生物は、茨城県内の非汚染畑土壌から分離されたものである。微生物の導入場所は、汚染サイト内（工場等を想定）の閉鎖された空間（建屋内もしくはテント内）を想定しており、分離源と作業区域の環境条件は大きく異なる。

利用微生物は有機酸等の栄養物質が存在し、かつ還元状態（嫌気条件）にある場合は選択的に有利に生残することが可能であるが、本事業においては後段で好気条件の養生処理を実施することから、この期間中に急速に減少するものと考えられる（添付資料6）。

d . 他の微生物群集への影響

下記の手法で、他の微生物群集への影響を評価する（添付資料5）。

なお、本評価は事前の適用評価試験において実施し、問題のないことを確認した上で事業を行うこととし、浄化開始から浄化終了までは任意の間隔で適宜実施するものとする。

1) 希釈平板法による微生物影響試験

処理前土壌および処理後土壌を対象として、各種選択寒天培地を用いた希釈平板法による菌数測定（CFU）を行い、土壌微生物（一般細菌・嫌気細菌・真菌・放線菌）に及ぼす影響を調査する。なお、方法については「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日付け農産第5090号農林水産省農産園芸局長通知）に準拠する。

2) 遺伝子モニタリングによる有害微生物の評価

処理前および処理後土壌を対象として、土壌中からのDNA抽出およびT-RFLP解析を行い処理前と処理後のフラグメントパターンを比較する。その後、処理後土壌を対象としてランダムクローニングを行い、出現頻度が複数かつ上位5番目までのクローンを対象として16S rDNAの部分塩基配列を決定し、処理後に増加したピークの菌種を特定する。特定した菌種が有害微生物（主要な病原菌：破傷風菌、ボツリヌス菌、ウエルシュ菌等）でないことを確認する。なお、有害微生物の特定に当たっては、必要に応じて専門家の意見を仰ぐ。

3) 他の微生物群集への影響に関する総合評価

上記1)、2)の結果ならびに周辺情報（栄養物質の残留性、サイトの環境特性）を考慮し、他の微生物群集への影響を総合的に評価する。万が一、有害微生物の顕著な増殖が認められた場合は、まずは工法改善を図り再評価するが、それでも回避できない場合については本事業の適用を避ける。

4) 実施例

上記した方法に従って、これまでに複数の汚染土壌（3種）を用いて他の微生物群集への影響を評価した。すべての結果において、希釈平板法での細菌数（CFU）の顕著な増加が認められたものの、遺伝子解析結果では病原菌に相当する有害微生物の顕著な増殖は認められていない（添付資料6）。

(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

利用微生物と同時に導入する栄養物質の情報を下表に示す。

名称	性状	主成分	有効成分%	主な使用用途
コーンステープリカー CAS:66071-94-1	液体	乳酸、還元糖、粗灰分等 (糖精製過程の副産物)	-	醗酵原料、肥料、 家畜飼料 等
乳酸ナトリウム CAS:72-17-3	液体	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COONa}$ 分子量: 112.06	60%	食品添加物 医薬品、化粧品 等
リン酸水素二アンモニウム CAS:7783-28-0	粉末 結晶	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 分子量: 132.06	99%以上	食品添加物 肥料 等
炭酸水素ナトリウム CAS:144-55-8	粉末 結晶	NaHCO_3 分子量: 84.01	99%以上	食品添加物 医薬品 等

b . 性状、分解性及び毒性等安全性

上表に示したように性状は各成分によって異なるが、サイトでは適当量を水道水等に溶解・希釈して土壤に投入する。各成分ともにヒトもしくは家畜等が一般生活で摂取する食品添加物レベルのものであり、明らかに安全性が高いものである。

c . 導入の目的

- 1) コーンステープリカー / 嫌気環境形成の促進、利用微生物の脱塩素化促進
- 2) 乳酸ナトリウム / 嫌気環境形成の促進、利用微生物の脱塩素化促進
- 3) リン酸水素二アンモニウム / 無機成分の補給
- 4) 炭酸水素ナトリウム / 土壤pHの調整および安定化

d . 導入量、導入濃度及び導入頻度

導入量はサイト (対象土壤の性質等) によって異なるが、基本的な導入量を下記する。

・基本導入量 (100 × 導入栄養物質重量 / 乾土重量)

- 1) コーンステープリカー 0.3%
- 2) 乳酸ナトリウム 0.3%
- 3) リン酸水素二アンモニウム 0.03%
- 4) 炭酸水素ナトリウム 0.1%

・導入の頻度

掘削した汚染土壤に対して、上記組成の栄養物質を一回投入して浄化を行う。

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

栄養物質の法令・基準等に係る情報

関連法令・基準等	規定事項
土壌環境基準	指定なし
地下水環境基準	指定なし
化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律	指定なし
水質汚濁防止法	特になし
食品衛生法	乳酸ナトリウム、リン酸水素二アンモニウム、および炭酸水素ナトリウムは食品添加物として指定されている。

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）

特になし。

g . その他副次的な影響

本事業を実施した場合、栄養物質によるキレート作用や土壌pHの変化等に伴い、土壌中の重金属の溶出を微弱ながら促進する可能性がある（添付資料27）。このため、溶出が懸念される重金属をモニタリング項目として設定する。

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

本事業は、各種製造業、洗濯業等の工場もしくは工場跡地、ならびに不法投棄現場等を主な浄化事業所として国内全域を対象とする。

b . 現場における汚染原因等

汚染原因はサイトによって異なるが、工場等で工業利用されてきたPCEが保管形態の不備（保管容器の亀裂、不法投棄等）により環境中に漏洩し、地下浸透することによってサイトおよび周辺の土壌および地下水汚染を引き起こすケースが多い。

c . 水文地質学的特性

水文地質学的な特性はサイトによって異なるが、本事業は掘削した汚染土壌を対象とした浄化事業であり、地盤・地下水に向けて直接的に利用微生物や栄養物質を投入することはない。このため、サイトの水文地質学的な影響は考えられない。

d . 生息又は生育する主要な動植物

生息する主要な動植物はサイトによって異なるが、本事業は閉鎖された空間（建屋もしくはテント内）で実施すること、かつ利用微生物の拡散の可能性が無い（添付資料4）ことから、動植物への影響はないものと考えられる。

e . 土地利用の状況

土地利用の状況はサイトによって異なるが、本事業の適用サイトは工場等の事業所内（工業地域もしくは商業地等）もしくは不法投棄現場等になると予想される。

f . その他作業区域周辺の特徴

特になし。（サイトごとに異なる）

(2) 浄化対象物質の情報

・浄化対象物質

1,1,2,2-テトラクロロエチレン（慣用名：テトラクロロエチレン、PCE）

分子量：165.8

構造式： $C_2Cl_4 / Cl_2C=CCl_2$

CAS 番号：127-18-4

毒性情報：刺激性、がん原性、肝機能障害等が報告されている。

法令・基準等	規定事項
化審法	第2種特定化学物質
労働安全衛生法	有機溶剤中毒予防規則第2種有機溶剤
土壤環境基準	0.01mg/L 以下
地下水環境基準	0.01mg/L 以下

・主として、PCE 含有汚染土に想定される共存物質

1,1,2-トリクロロエチレン（慣用名：トリクロロエチレン、TCE）

分子量：131.39

構造式： $CHCl=CCl_2$

CAS 番号：79-01-6

毒性情報：刺激性、がん原性、肝機能障害等が報告されている。

法令・基準等	規定事項
化審法	第2種特定化学物質
労働安全衛生法	有機溶剤中毒予防規則第1種有機溶剤
土壤環境基準	0.03mg/L 以下
地下水環境基準	0.03mg/L 以下

cis-1,2-ジクロロエチレン（慣用名：シス-ジクロロエチレン、*cis*-DCE）

分子量：96.95

構造式： $ClCH=CHCl$

CAS 番号：156-59-2

毒性情報：刺激性が報告されている。（発がん性を判断する有用な報告はない）

法令・基準等	規定事項
化審法	第2種監視化学物質
労働安全衛生法	有機溶剤中毒予防規則第1種有機溶剤
土壤環境基準	0.04mg/L 以下
地下水環境基準	0.04mg/L 以下

(3) 汚染状況

PCEによって汚染した工場および不法投棄現場等では、汚染物質は通常漏洩した箇所の地下垂直方向（範囲：GL-数m～-数十m）および地下水の流れによって水平方向（範囲：数十m）に分布する。特に、漏洩箇所の近傍においては高濃度（原液も含まれる）の汚染物質が存在しており、本事業は主として比較的高濃度の汚染土壌を対象として掘削・浄化するものである。なお、平均的な浄化対象物質の土壌溶出濃度は0.5～5mg/L程度であると推測される。

ちなみに、地下水の流れによって周辺に拡散した比較的低濃度の汚染区域については、浄化期間や処理コストなどを考慮して、掘削を伴わない揚水曝気法やバイオスティミュレーション法などを適用するケースが多い。

生態系等への影響の総合評価	<p>(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。</p> <p>導入する利用微生物は、浄化途中の嫌気養生工程においておよそ10^8 cells/g乾土レベルにまで増殖するが、その後の好気養生工程において急速に減少する。さらに、利用微生物は環境中での生存能力が非常に弱く、低残留性の性質を有していることから、栄養物質の存在しない環境中（土壌あるいは水系）において増殖し、長期間残留するとは考えられない。また、本技術は掘削土壌を対象としてほぼ閉鎖された空間で利用微生物を使用することから、周辺環境への利用微生物の拡散は考えられない。</p> <p>以上のことから、利用微生物が浄化作業終了後（埋め戻し後）に増殖する可能性は低いと総合的に判断される。</p>
	<p>(2) 作業区域における他の微生物群集への影響。</p> <p>本浄化事業では、栄養物質の投入により掘削土壌中の微生物群集は少なからず変化する。特に、希釈平板法の結果では土壌細菌数の顕著な増加が認められる。しかしながら、T-RFLP解析やクローン解析などの遺伝子モニタリング結果では、これまでにヒトや環境生物に対する有害微生物（主要病原菌等）の顕著な増殖は認められていない。また、投入した栄養物質およびその生成物等も、後述の理由（P25(5)参照）から浄化終了時点では土着の有害微生物に影響を与えないレベルであると考えられる。以上のことから、浄化作業終了後（埋め戻し後）のサイト環境において他の微生物群集に大きな悪影響を与えることはないものと推測される。</p> <p>ただし、事前の適用評価試験で前述した遺伝子モニタリングを行い、問題のないことを確認した上で浄化事業を実施することとする。</p>

(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。

生息する主要な動植物はサイトによって異なるが、本事業では閉鎖された空間（建屋もしくはテント内）において掘削土壌を対象として利用微生物を導入すること、利用微生物自体の拡散の可能性が低いこと、さらに利用微生物はヒトや環境生物に対して病原性や毒性を示さないことなどから、サイトを問わず周辺動植物等への影響はないものと考えられる。

浄化過程で栄養物質に由来する一部有害な化合物（有機酸、悪臭物質等）を生成する可能性があるが、悪臭物質については排ガス処理装置等により適正に処理し、残留する有機酸についても後述の理由（P25(5)参照）から周辺動植物への影響を与える可能性は低いものと考えられる。

ただし、サイトごとに環境特性を都度考慮して、必要な評価を実施するとともにサイトに応じた適切な対応を行う。

(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。

本事業は、掘削土壌を対象として閉鎖された空間（建屋もしくはテント内）において浄化を実施することから、作業区域から浄化対象物質（PCE等）及び中間生成物が周辺環境に拡散する可能性は低い（添付資料28）。ただし、浄化事業の終了にあたり、作業区域内において汚染物質の拡散の恐れのある箇所（汚染土壌の一次保管場所、養生エリアの下部等）についても浄化対象物質および共存物質のモニタリングを行い、汚染の拡散が無いことを確認することとしており、汚染が見られた場合は適切に浄化を行う。また、掘削による汚染物質の二次拡散や浸出水の漏洩、あるいは揮散ガスによる大気汚染等の可能性はゼロではないことから、掘削場所についてもサイトの特性に応じた適切な汚染対策（止水板、土留め、雨水対策、表面遮水工、水処理設備、排ガス処理設備等）を徹底し、事故の未然防止に努める。

(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。

栄養物質に由来する有機酸については生石灰の場合を除き、微生物処理後の土壌改良処理により急速に消失する（添付資料6）。生石灰の場合は微生物が死滅することにより分解されないが、残留する有機酸は一般環境中で易分解性であることから（添付資料6）、埋め戻し後における土着微生物への影響は低いと考えられる。

しかしながら、栄養物質および生成物の有意な残留が確認され、生態系に影響を与える恐れがある場合は、埋め戻し土仮置き場所での保管期間を延長するなどの適切な処置を施し、栄養物質が土着の微生物群集に有害な影響を与えないレベルになったことを確認した上で埋め戻し作業を行うこととする。

(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。

浄化過程で栄養物質に由来する一部有害な化合物（有機酸、悪臭物質等）を生成する可能性があるが、悪臭物質については排ガス処理装置等により適正に処理することから、有機酸については前述の理由（5参照）から土着微生物や大気汚染への影響を与える可能性は低いものと考えられる。ただし、実施に当たっては作業環境測定や大気汚染濃度測定（悪臭防止法に指定される悪臭物質）などを予め実施し、必要に応じて作業環境の改善や周辺への悪臭汚染防止対策（検出物質に応じた排ガス処理方法の決定）を講じるものとする。

また、本事業を実施した場合、栄養物質によるキレート作用や土壌 pH の変化等に伴い、土壌中の重金属の溶出を若干促進する可能性がある。このことから、溶出が懸念される重金属をモニタリング項目として設定する。

総合評価

事業の実施に当たっては、事前の適用評価試験（サイトの一角もしくはサイト以外の隔離された場所で小規模試験を実施）を行い、先に掲げたすべてのモニタリング項目が浄化事業計画に基づいて問題のないことを確認した上で事業を適用するものとする。これにより、サイトにおける安全性を向上させるよう努める。

一方、適用評価試験で問題のあった場合については、工法の改善を図り再評価するが、それでも改善されない場合は該当サイトへの事業の適用を回避する。また、浄化作業開始後は定期的なモニタリングを実施して、サイトの安全性を確保すると共に、安全管理体制の徹底を図る。

- (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。

添付資料一覧 (No.1 ~ 28)

- [添付資料 1](#)
利用微生物の分離・同定・基本特性およびデハロゲナーゼ遺伝子に係る参考文献
Norihiko Tsukagoshi, Satoshi Ezaki, Tetsuya Uenaka, Nobukazu Suzuki, Ryuichiro Kurane
Isolation and transcriptional analysis of novel tetrachloroethene reductive dehalogenase gene from *Desulfitobacterium* sp. strain KBC1 Appl Microbiol Biotechnol 2006 Jan;69(5):543-553
リンク先
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=16172885&query_hl=1&itool=pubmed_docsum
- [添付資料 2](#)
作業区域に係る情報
作業区域（現場想定図）
- [添付資料 3](#)
処理技術に係る情報
基本処理フロー
- [添付資料 4](#)
利用微生物の拡散に係る試験データ（実験データ）
作業区域および周辺地域への利用微生物の拡散状況
- [添付資料 5](#)
他の微生物群集への影響に係る情報
他の微生物群集への影響評価方法
- [添付資料 6](#)
浄化データ
汚染土壌を用いた浄化およびモニタリング結果（実験データ）
- [添付資料 7](#)
利用微生物の近縁種に係る参考文献
Ilya Utkin, Carl Woese, Juergen Wiegel
Isolation and characterization of *Desulfitobacterium dehalogenans* gen. nov., sp.nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates chlorophenolic compounds Int J Syst Bacteriol Vol.44, P.612-619 (1994)
リンク先
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=7981092&query_hl=10&itool=pubmed_DocSum
- [添付資料 8](#)
脱塩素化細菌全般に係る参考文献（レビュー）
J Damborsky
Tetrachloroethene-dehalogenating bacteria-Review Folia Microbiol Vol.44, P.247-262 (1999)
リンク先
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=10664879&query_hl=6&itool=pubmed_DocSum
- [添付資料 9](#)
PCEデハロゲナーゼ遺伝子 (*pceA*)に係る参考文献
Akiko Suyama, Masaki Yamashita, Sadazo Yoshino, Kensuke Furukawa
Molecular characterization of the PceA reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium* sp. strain Y5 1 J Bacteriol Vol.184, P.3419-3425 (2002)
リンク先
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=12057934&query_hl=8&itool=pubmed_docsum
- [添付資料 10](#)
TCEデハロゲナーゼ遺伝子 (*tceA*)に係る参考文献

Jon K Magnuson, Margaret F Romine, David R Burris, Mark T Kingsley
Trichloroethene reductive dehalogenase from *Dehalococcoides ethenogenes*: sequence of *tceA* and substrate range characterization Appl Environ Microbiol Vol.66, P.5141-5147 (2000)

リンク先

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=11097881&query_hl=13&itool=pubmed_docsum

• **添付資料 11**

Vinyl chloride デハロゲナーゼ遺伝子 (*vcrA*)に係る参考文献

Jochen A Müller, Bettina M Rosner, Gregory Von Abendroth, Galit Meshulam-Simon, PerryL McCarty, Alfred M Spormann

Molecular identification of the catabolic vinyl chloride reductase from *Dehalococcoides* sp. strain VS and its environmental distribution Appl Environ Microbiol Vol.70, P.4880-4888(2004)

リンク先

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=15294827&query_hl=16&itool=pubmed_docsum

• **添付資料 12**

ヒトに対する安全性に係る試験データ (1)

利用微生物 (*Desulfitobacterium* sp. KBC1) のヒトに対する安全性試験結果 (要約)

• **添付資料 13**

ヒトに対する安全性に係る試験データ (2)

最終報告書 KBC1のラットを用いた単回経口投与試験

• **添付資料 14**

ヒトに対する安全性に係る試験データ (3)

最終報告書 KBC1のラットを用いた単回経気道投与試験

• **添付資料 15**

ヒトに対する安全性に係る試験データ (4)

最終報告書 KBC1のラットを用いた単回静脈内投与試験

• **添付資料 16**

ヒトに対する安全性に係る試験データ (5)

最終報告書 KBC1のウサギを用いた単回経皮投与試験

• **添付資料 17**

ヒトに対する安全性に係る試験データ (6)

最終報告書 KBC1のウサギを用いた眼一次刺激性試験

• **添付資料 18**

ヒトに対する安全性に係る試験データ (7)

最終報告書 KBC1のモルモットを用いた皮膚感作性試験

• **添付資料 19**

環境生物に対する安全性に係る試験データ (1)

利用微生物 (*Desulfitobacterium* sp. KBC1) の環境生物に対する安全性試験結果 (要約)

• **添付資料 20**

環境生物に対する安全性に係る試験データ (2)

試験報告書 *Desulfitobacterium* sp. KBC1の淡水魚影響試験

• **添付資料 21**

環境生物に対する安全性に係る試験データ (3)

試験報告書 *Desulfitobacterium* sp. KBC1の淡水無脊椎動物影響試験

• **添付資料 22**

環境生物に対する安全性に係る試験データ (4)

試験報告書 *Desulfitobacterium* sp. KBC1の藻類生長阻害試験

• **添付資料 23**

環境生物に対する安全性に係る試験データ (5)

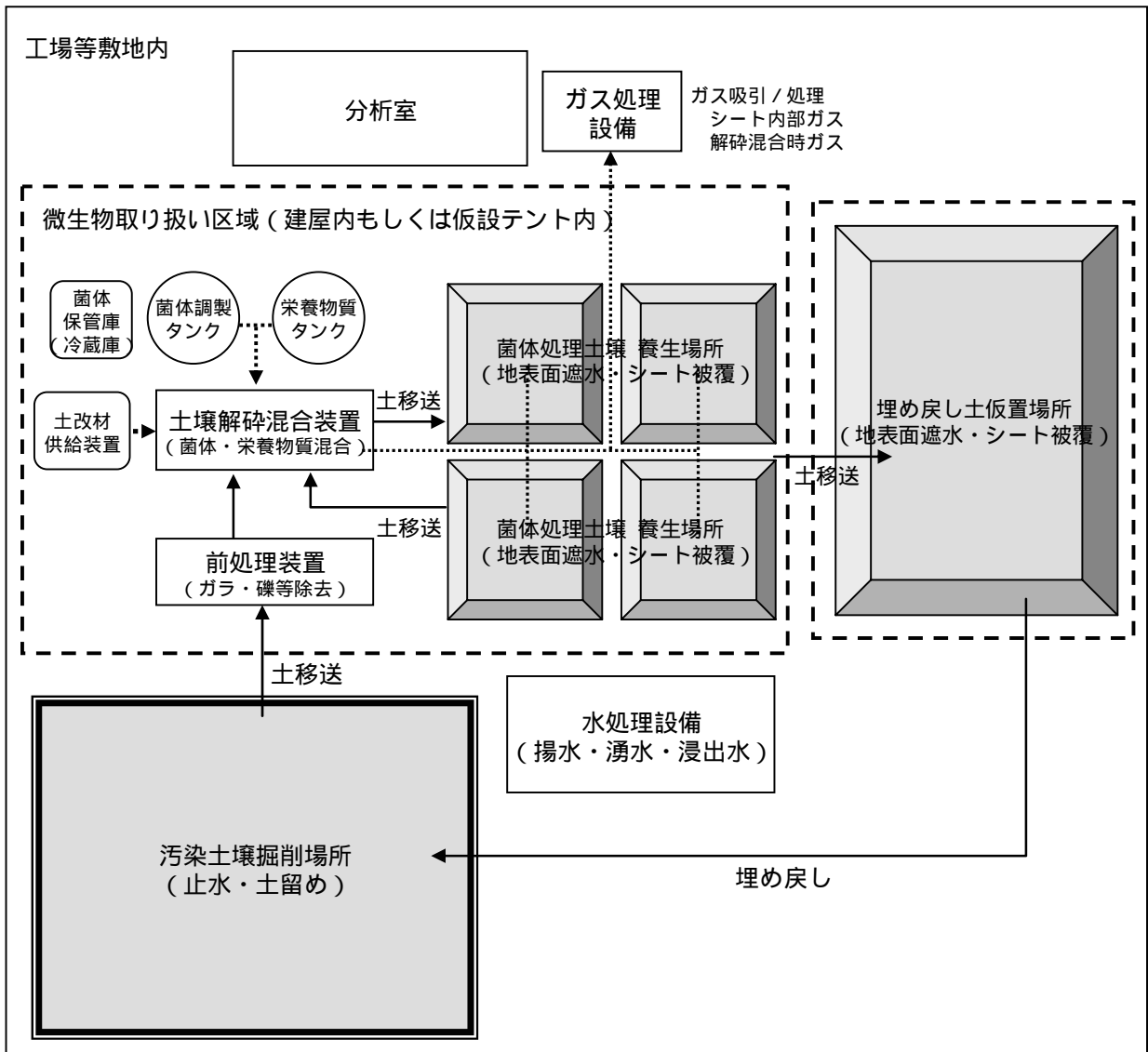
試験報告書 *Desulfitobacterium* sp. KBC1のウズラを用いた鳥類影響試験

- [添付資料 24](#)
有害物質の産生性に関する情報（実験データ）
- [添付資料 25](#)
利用微生物の環境試料中での生残性（実験データ）
- [添付資料 26](#)
浄化効果のマスバランス評価（典型的な浄化パターンからの推定）
- [添付資料 27](#)
当該浄化技術による重金属溶出への影響評価（実験データ）
- [添付資料 28](#)
作業環境測定結果（実験データ）

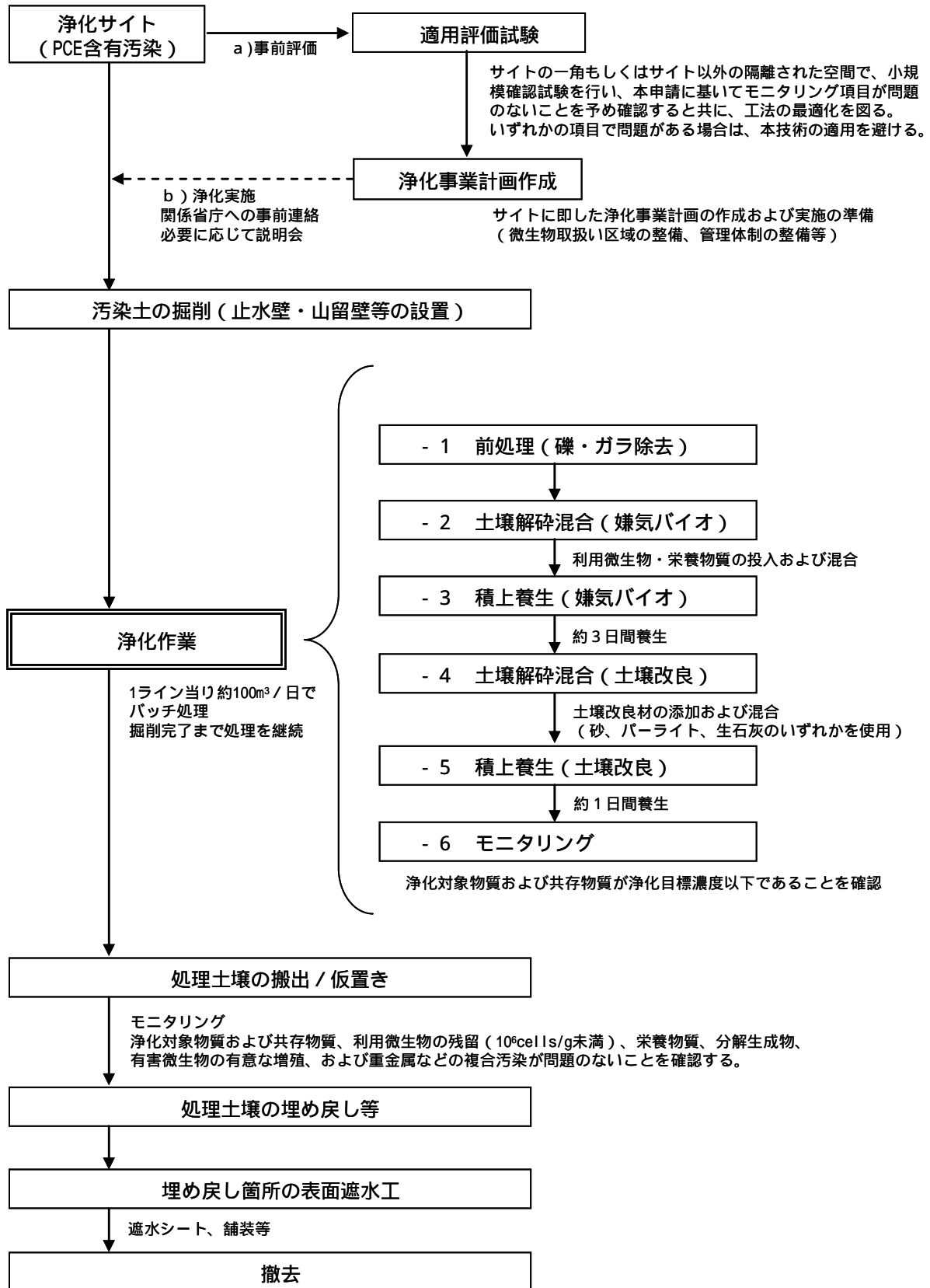
* 添付資料1および7～11の参考文献についてはリンク先（下線部）を参照。

* 添付資料13～18（ヒトに対する安全性に係る試験データ）および添付資料20～23（環境生物に対する安全性に係る試験データ）は大部に亘るため掲載省略。

作業区域（現場想定図）



基本処理フロー



作業区域および周辺地域への利用微生物の拡散状況

1. 目的

浄化事業実施の際の利用微生物 (*Desulfitobacterium* sp. KBC1株) の拡散の可能性を模擬的に調査する。

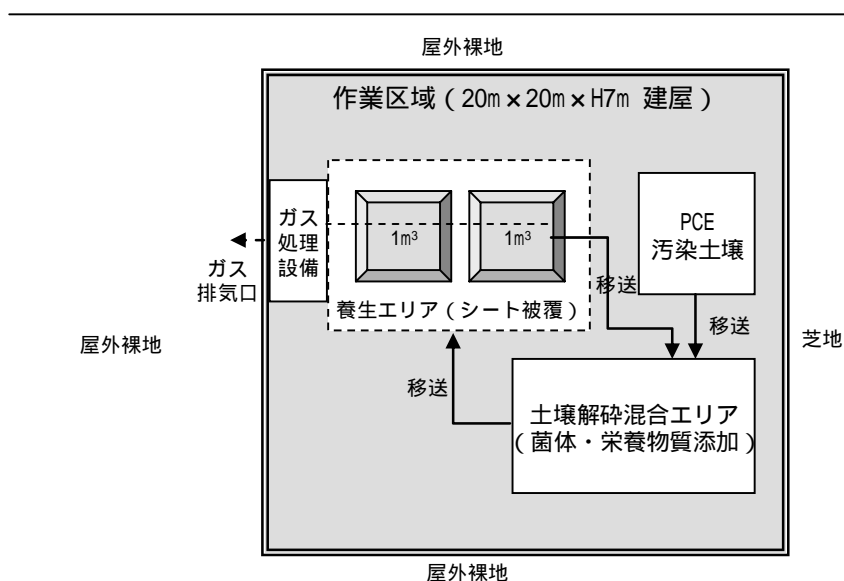
2. 試験日時・場所

日時：平成17年9月26日～9月30日

場所：株式会社クボタ バイオセンター（茨城県竜ヶ崎市向陽台5-6）

3. 試験方法

現場配置を模擬した数m³規模の小規模試験系を構築し、試験的に浄化施工した後、作業区域内および周辺地域への利用微生物の拡散状況を調査した。浄化方法は、すべて所定の処理フロー（嫌気バイオ＋砂処理）に準拠し、初期の菌体処理量は想定最高濃度の10⁶cells/ml土壌とした。サンプリングは、浄化終了時点（処理後4日目）に下図の任意地点より土壌および土埃等を採取し、MPN-VCC法にてサンプル中の生菌数を検証した。



* ~ は土壌サンプリング場所を示す。（ ~ は土壌埃、 ~ は表層土壌を採取）

4. 結果

No.	採取場所	生菌数/乾土g	No.	採取場所	生菌数/乾土g
	建屋内養生土壌 (1)	1.23 × 10 ³		周辺西側裸地 (排気口 真下)	N.D.
	建屋内養生土壌 (2)	2.94 × 10 ³		周辺西側裸地 (排気口から5m)	N.D.
	建屋内養生エリア付近 (1)	N.D.		周辺北側裸地	N.D.
	建屋内養生エリア付近 (2)	N.D.		周辺東側芝地	N.D.
	建屋内解砕混合エリア	N.D.		周辺南側裸地	N.D.

*N.D. / 検出不可

5. 考察

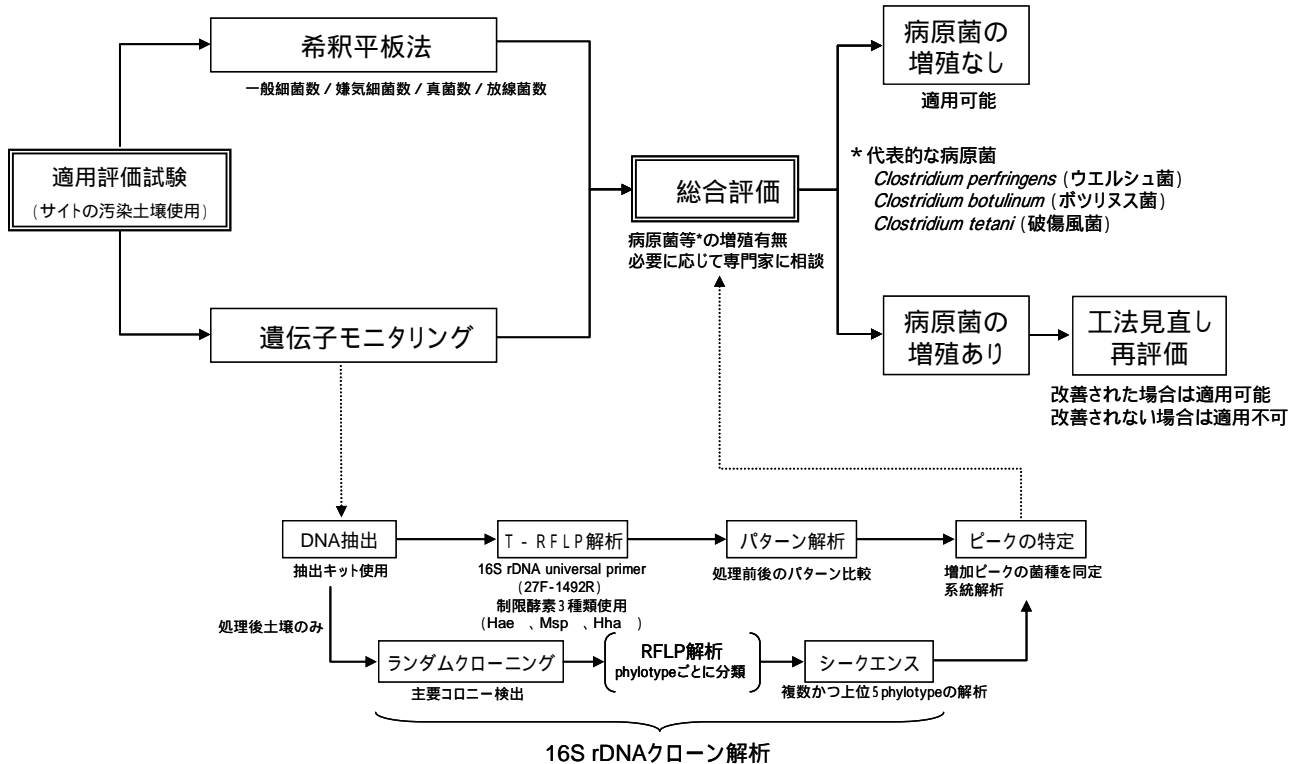
本利用微生物は、導入対象の土壌中からのみ検出されており、それ以外の区域（作業建屋内および周辺土壌）からは全く検出されなかった。特に、検出される可能性の高い建屋内においても全く検出されていないことから、本利用微生物の周辺地域への拡散の可能性は極めて低いものと考えられる。

他の微生物群集への影響評価方法

1. 方法の概要

他の微生物群集への影響評価は、事前の適用評価試験において 希釈平板法による全菌数測定、および 遺伝子モニタリングによる有害微生物の残留性評価を実施し、総合的に安全性を評価した(下図参照)。なお、サイトでの処理後土壌の埋め戻し等のモニタリングについても、本方法に準拠して行うこととする。

他の微生物群集への影響評価フロー



2. 方法の詳細

希釈平板法の方法

希釈平板法による全菌数測定は、処理前土壌および処理後土壌を対象として実施した。具体的には、処理土壌の一部を採取し滅菌水を用いて段階希釈 (×10) を行ったのち、所定の選択寒天培地 (90mm プレート) に 0.1ml ずつ接種し、任意の培養期間後にプレート上に生育したコロニー数 (CFU) を計数した。その結果から、乾土 1g 中に含まれる微生物数を算出した。測定対象微生物および使用培地は以下の通り。(すべて実績のある検出方法を選択した)

- ・一般細菌数：標準寒天培地 (JIS K0101 63.2) / 培養期間 3~7 日 (25)
- ・嫌気細菌数：GAM 寒天培地 (日水製薬)・アネロパック使用 / 培養期間 10 日 (25)
- ・真菌数：ローズベンガル培地 / 培養期間 3~7 日 (25)
- ・放線菌数：HV 培地・メンブレンフィルター0.22 μm 使用 / 培養期間 7~10 日 (25)

遺伝子モニタリングの方法

a. 土壌サンプルからの DNA 抽出

処理前および処理後の土壌サンプルからの DNA 抽出は、Isoil for Bead Beating キット (ニッポンジーン)を用いて行なった。なお、使用した DNA 抽出キットは、現在最も一般的に利

用されている。

T-RFLP 解析

b. T-RFLP による微生物群集構造解析

T-RFLP による微生物群集構造解析を行うために、a.で抽出した DNA 溶液 1 µl をテンプレートに 16S rDNA を PCR 増幅した。PCR 増幅のための反応液の全容量は 50 µl とし、2 × Ex Taq premix (宝酒造)、16S rDNA を増幅するためのプライマーとして、27F プライマー (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') および 1492R プライマー (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') をそれぞれ 50 pmol 使用した。この際、27F プライマーは 5'末端を Well Red Dye で標識したものを使用した (プロリゴに依頼合成)。その他の反応液組成は添付のマニュアルに従った。PCR 反応は、Pre-heating; 94 5 分に続き、第一段階; 94 30 秒、第二段階; 55 30 秒、第三段階; 72 1 分を 30 サイクル繰り返し、Post extension; 72 7 分を行なった。本反応は、GeneAmp PCR system 9700(アプライドバイオシステムズ)を使用した。

PCR 増幅産物は一部アガロースゲル電気泳動にかけ、目的である 1.5 kb の断片を確認し、次にこの断片を Microspin S-400 HR columns (アマシャムバイオサイエンス)を用いて精製した。その後、エタノール沈殿により DNA を回収し、少量の滅菌蒸留水に溶解させ、適量を 3 種類の制限酵素 (*Hae*III, *Msp*I, *Hha*I) でそれぞれ切断した。切断した 16S rDNA は CEQ8000 DNA シークエンサー (ベックマンコールター)によりフラグメントモードにより解析し、T-RFLP (0 から 500 あるいは 600base の範囲)の Electropherogram を得た。その後、処理前後の Electropherogram のパターンを比較した。

16S rDNA クローン解析

c. PCR 法による 16S rDNA の増幅

処理後土壌を対象として a で前述したように、抽出した DNA 溶液 1 µl をテンプレートに 16S rDNA を PCR 増幅した。この際、27F プライマーは未標識のものを使用した。PCR に用いた反応液組成および反応条件は b と同様である。

d. PCR 増幅された 16S rDNA からのクローンの取得 (ランダムクローニング)

PCR 増幅産物の一部をアガロースゲル電気泳動にかけ、目的である 16S rDNA (約 1.4 kb) の増幅断片を確認した。次にこの断片を spin column を用いて精製した。そして、精製断片を pGEM-T Easy vector kit (プロメガ)を用いてクローニングした。その後、大腸菌に形質転換させ LB 寒天培地 (アンピシリン 100 µg/ml を含む)に塗布し 37 °C で 1 晩培養した。

生育したコロニーのマスタープレートを作製し、このプレートから菌を直接かき取り、それをテンプレートに PCR を行い、16S rDNA の遺伝子断片が挿入されているか否かの判断をした。用いたプライマーは大腸菌の染色体上の 16S rDNA を増幅させないために、プラスミド上に存在する配列のプライマーである、M13-F プライマー (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') および M13-R プライマー (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3')を用いた。PCR 条件および反応液組成は b.と同様に行なった。そして PCR 反応液の電気泳動を行い、約 1.5 kb の増幅断片が確認できたものを陽性クローンとした。陽性クローンは 1 つの土壌サンプルにつき、約 50 クローンを目途に取得した。

e. 16S rDNA クローンの Phylotype による分類 (RFLP 解析)

d の陽性クローンから QIAprep Spin Miniprep Kit (キアゲン)を用いてプラスミド抽出を行なった。これを 1 µl 用いて、再び PCR 反応を行なった。プライマーは 27F, 1492R を使用した。PCR 反応液 1 µl を 3 種類の制限酵素によりそれぞれ切断し、アガロースゲル電気泳動を行い、切断パターンを比較して、3 種類が全て同じパターンを示すものを同一の phylotype

として分類を行なった。

f. 16S rDNA のシーケンス

e においてクローンの出現頻度が複数かつ上位 5 番目までの Phylotype (出現頻度の少ないクローンについてはシーケンスしない) に関しては、プライマーとして 27F を利用して前方約 500base の塩基配列を決定した。塩基配列の決定には ABI3100 あるいは ABI3700 を用いた。得られた塩基配列は、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に送付し、Blast により近縁種を決定した。

ピークの特定

g. 処理後土壌における病原菌の増殖有無の確認

b の T-RFLP 解析で顕著に増加の認められたピークに対して、16S rDNA クローン解析の結果と照合し、それぞれのピークがどのような微生物由来であるかを特定した。その後、特定したピークに相当する微生物が、病原菌等の有害微生物であるか否かを日本細菌学会のバイオセーフティー指針に記載されている付表 1 バイオセーフティーレベルの分類および付表 2 バイオセーフティーレベル 1 であるが人からの分離例があり、日和見感染を起こす可能性のある菌種のリストで検索した。

総合評価

前述した希釈平板法の結果および遺伝子モニタリング結果、ならびに周辺情報 (栄養物質の残留性、サイトの環境特性等) を踏まえて、他の微生物群集への影響を総合的に評価した。なお、遺伝子モニタリングの結果、有害微生物 (病原菌等) の有意な増殖が認められた場合は、工法の見直しを図り再評価するが、それでも改善できない場合は該サイトへの浄化技術の適用を避けることとする。

汚染土壌を用いた浄化およびモニタリング結果（小規模実験データ）

1. 目的

浄化事業計画に基づき、複数の実汚染土壌を対象とした浄化実験を行い、当該浄化技術の安全性を総合的に検証した。

2. 方法

1) 使用土壌

異なるサイトから掘削したPCE汚染土壌（3種類：下表参照）を対象として、株式会社クボタバイオセンター（茨城県竜ヶ崎市）の実験設備内において浄化試験を実施し、各種モニタリング項目について調査した。実施規模は、試験によって異なるが0.1～1.0m³程度の汚染土壌を対象として浄化試験を実施した。

土質試験結果		土壌A	土壌B	土壌C
一般	土粒子密度 (g/cm ³)	2.638	2.614	2.65
	自然含水比 (%)	36.6	133.5	24.2
粒度	礫分2～75mm (%)	4.5	0.5	11.6
	砂分75μm～2mm (%)	16	4.1	36.5
	シルト分5～75μm (%)	23.9	52.6	29.8
	粘土分5μm未満 (%)	55.6	42.8	22.1
	最大粒径 mm	9.5	4.75	19
	50%粒径 D50mm	0.00226	0.00801	0.063
	30%粒径 D20mm	NT	NT	0.0056
コンステツク特性	液性限界 (%)	60.6	155	35.9
	塑性限界 (%)	20	56	19.3
	塑性指数	40.6	99	16.6
	コンステツク指数	0.591	0.217	0.705
分類	分類名	砂質粘土 (高液性限界)	粘土 (高液性限界)	礫分まじり砂質粘土 (低液性限界)
	分類記号	CHS	CH	CLS-G
その他	土のpH	7.9	5.1	2.8
	強熱減量 Li (%)	7	15	3.2
汚染濃度 (mg/L) 土壌溶出量	PCE	0.55	2.12	0.25
	TCE	0.01	<0.001	<0.001
	cis-DCE	<0.001	<0.001	<0.001

1) NT; not tested.

2) 浄化方法

上記汚染土壌に所定量の利用微生物および栄養物質を添加し、土壌解砕混合機を用いて均一に混合した。その後、この処理土を遮水シートを敷いた床面に畝状に積上げ、上部をビニールシートで覆い3日間室温条件（25 前後）にて嫌気養生した。次いで、嫌気養生終了後（処理3日目）の処理土壌に所定量の土壌改良材を混合し、再度同様の方法で養生（好気条件）した。

試験には、前述した汚染土壌（A・B・C）を用い、土壌改良資材との組合せで合計5ケースの試験を実施した。試験条件およびモニタリング項目の詳細を下表に示す。

試験条件の詳細

項目	ケース 1	ケース 2	ケース 3	ケース 4	ケース 5
使用土壌の種類	A 土壌	A 土壌	A 土壌	B 土壌	C 土壌
利用微生物の添加量 (湿土あたり重量%)	10 ⁶ cells	10 ⁶ cells	10 ⁶ cells	10 ⁶ cells	10 ⁶ cells
栄養物質の添加量 (乾土あたり重量%)	コンスティブ リカ-	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%
	乳酸ナトリウム	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%
	リ酸水素二アンモニウム	0.03%	0.03%	0.03%	0.03%
	炭酸水素ナトリウム	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
土壌改良材の種類および添加量 (湿土あたり重量%)	砂 20%	パーライト 15%	生石灰 5%	砂 20%	砂 20%
モニタリング項目 (実施)	塩素化エチレン分析				
	利用微生物残留性				
	栄養物質残留性				
	微生物群集影響				
	重金属溶出影響	-	-	-	

3) 塩素化エチレンのモニタリング方法

任意の経過日数ごとに処理土壌の一部を採取し、公定法に準拠して土壌からの抽出およびガスクロマトグラフィー分析を実施した。なお、分析には GC-ECD (検出器) もしくは GC-FID (検出器) を用いた。

4) 利用微生物のモニタリング方法

任意の経過日数ごとに土壌中に含まれる利用微生物数 (生菌数) を測定した。(方法の詳細は、添付資料 25 を参照)

5) 栄養物質の残留性モニタリングの方法

任意の経過日数ごとに処理土壌の一部を採取し、土壌と等量の水を添加して抽出 (30 分間振とう) を行ったのち、HPLC (有機酸分析システム) による有機酸分析を実施した。分析結果は、乾土 1g から水に溶出する有機酸量を算出し、この値を土壌溶出有機酸量とした。

6) 他の微生物群集への影響評価方法

任意の経過日数ごとに希釈平板法による全菌数測定ならびに遺伝子モニタリングによる微生物群集構造解析を実施した。(方法の詳細は、添付資料 5 を参照)

7) 重金属のモニタリング方法

処理前土壌および処理後土壌 (処理 10 日目) を対象として、重金属の溶出量分析ならびに含有量分析を行った。分析方法は、土壤汚染対策法平成 15 年環境省告示第 18 号、第 19 号にそれぞれ従った。方法の詳細を下表に示す。

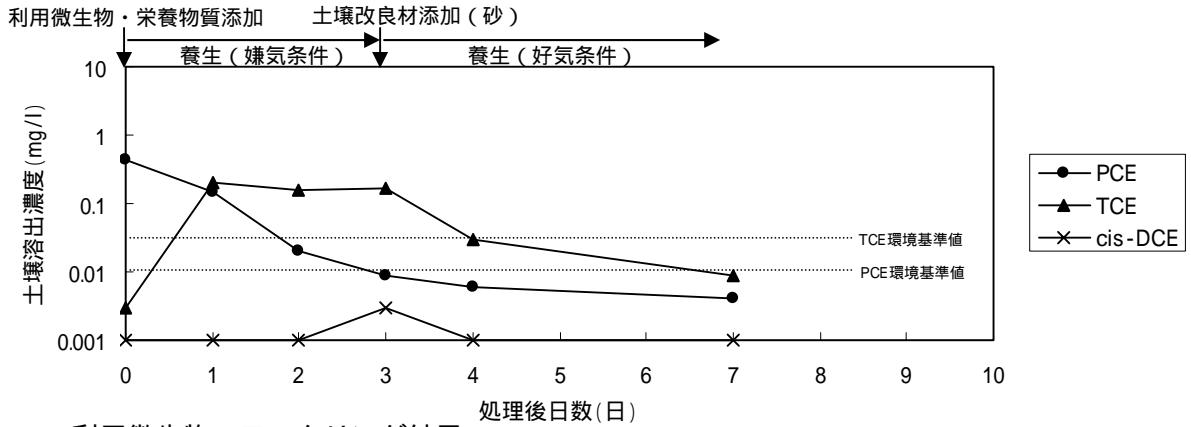
計量の試験項目	計量方法	計量の試験項目	計量方法
カドミウム化合物	JIS・K・0102・55・4 (ICP質量分析法)	セレン化合物	JIS・K・0102・67・3 (水素化物発生ICP法)
六価クロム化合物	JIS・K・0102・65・2・1 (ジフェニルカルバジド吸光法)	鉛化合物	JIS・K・0102・54・4 (ICP質量分析法)
シアン化合物	JIS・K・0102・38・1, 38・3 (4ピリジンカルボン酸吸光法)	砒素化合物	JIS・K・0102・61・2 (水素化物発生原子吸光法)
水銀化合物	S46環告59号付表1 (還元気化原子吸光法)	ふっ素化合物	JIS・K・0102・34・1 (ALC-La吸光光度法)
アルキル水銀 ¹⁾	S46環告59号付表2 (GC-ECD法)	ほう素化合物	S46環告59号付表7 (ICP質量分析法)

1)土壌溶出量試験のみ計量を行なった。

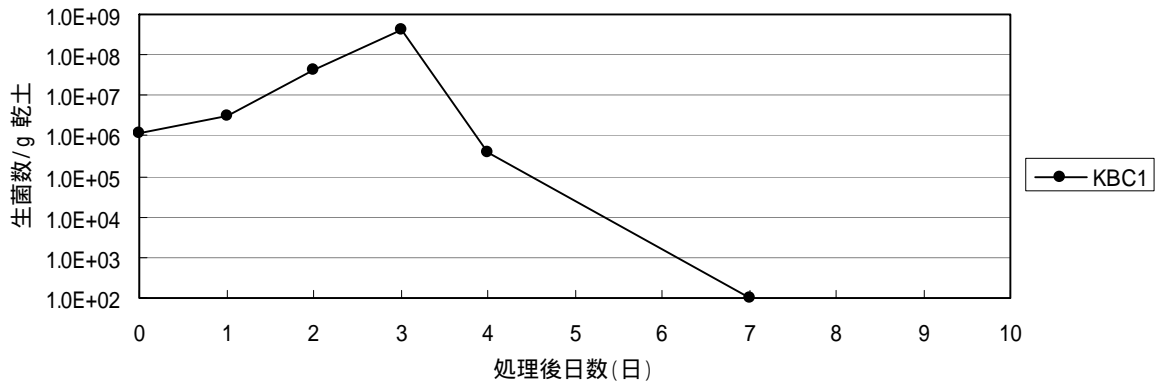
3. 結果

浄化データ(ケース1): A 土壌 / 嫌気バイオ + 砂処理 (20%w/w)

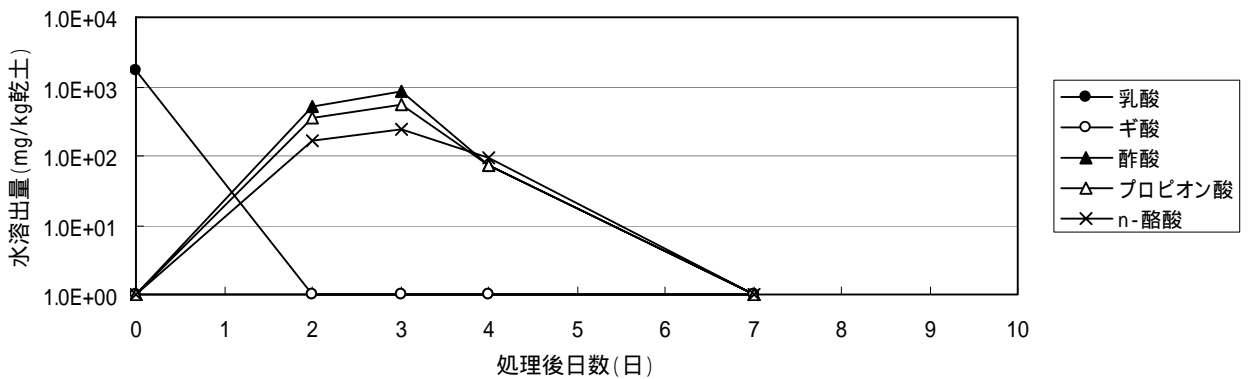
1 - 塩素化エチレンのモニタリング結果



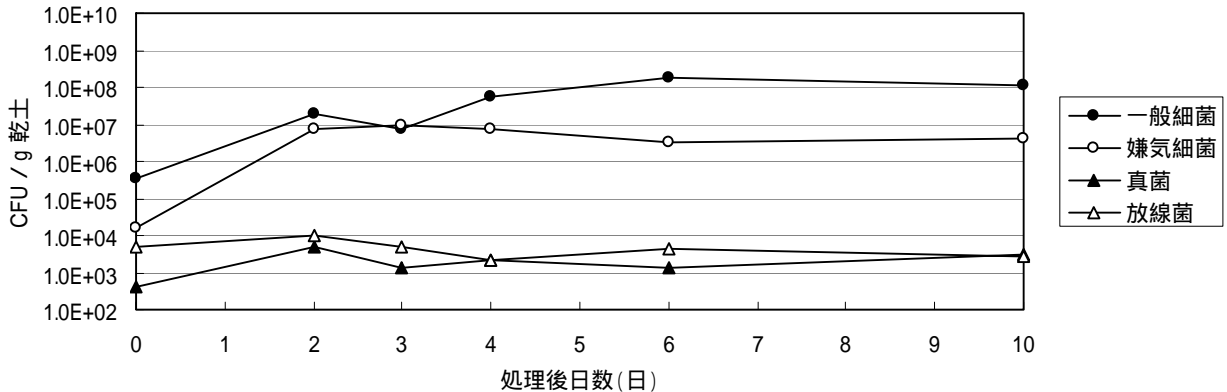
1 - 利用微生物のモニタリング結果



1 - 栄養物質の残留性モニタリング結果

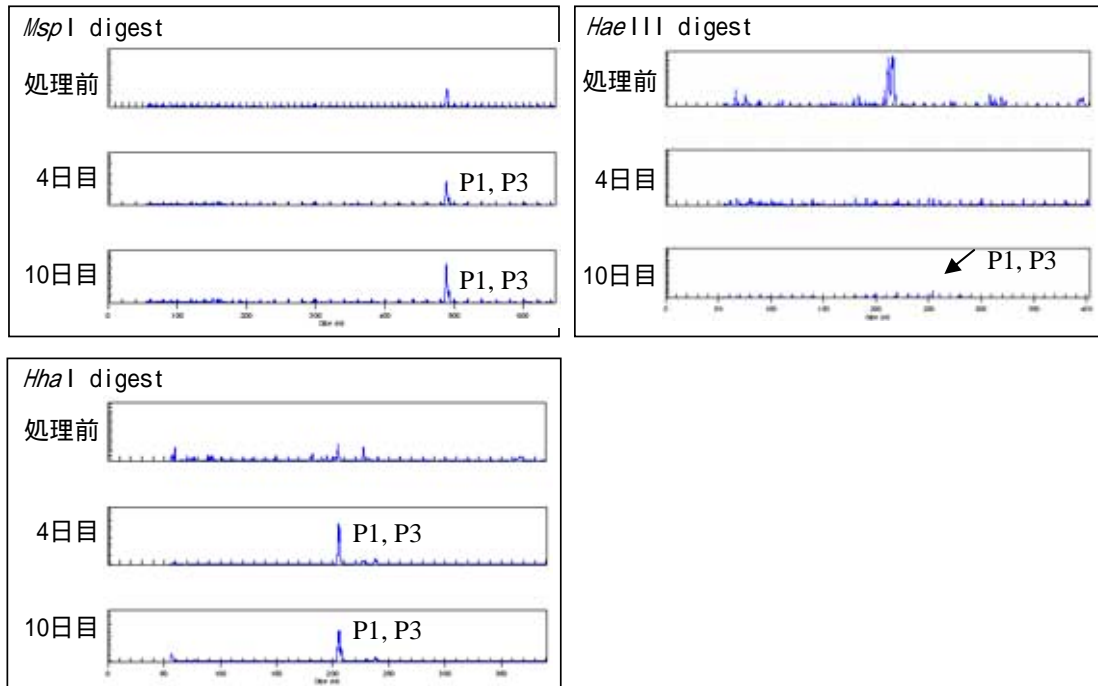


1 - 他の微生物群集への影響評価(希釈平板法)

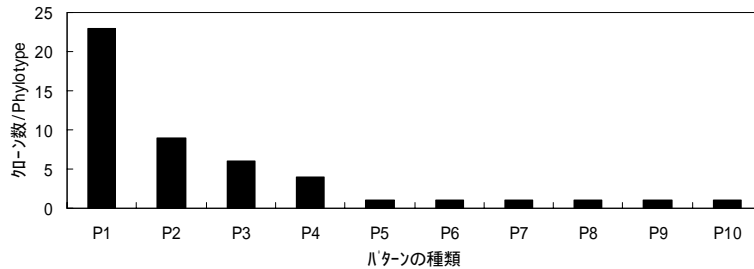


1 - 他の微生物群集への影響評価 (遺伝子モニタリング)

1) T-RFLP 解析



2) RFLP パターンによる Phylotype の分類



3) 制限酵素切断により生成される 5'断片の理論値

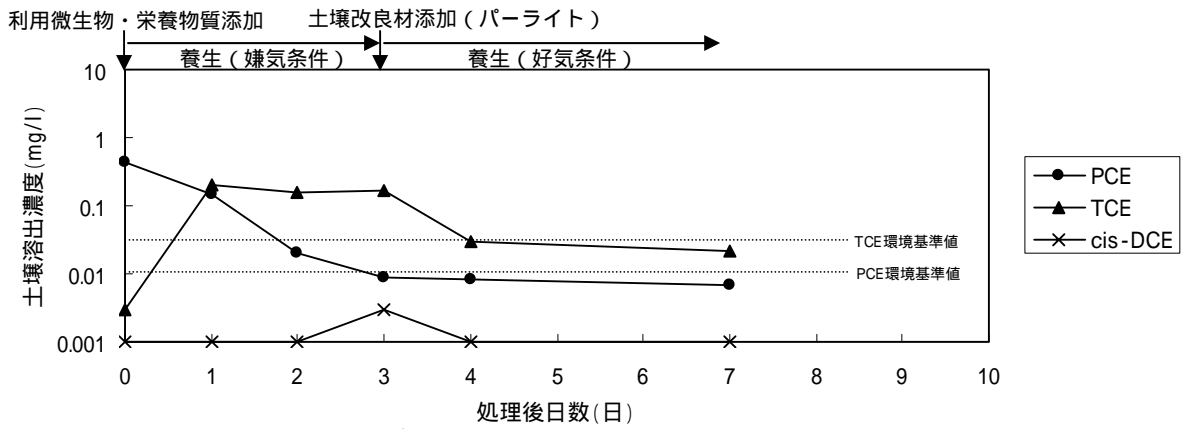
Phylotype名	クローン数	5'断片の大きさ (bases)			最近縁種
		<i>MspI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HhaI</i>	
P1	23	491	254	208	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (93%)
P2	9	491	405	208	<i>Acinetobacter sp.</i> (95%)
P3	6	492	254	208	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (97%)
P4	4	491	40	208	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> (97%)

結果および考察（ケース1）： **A 土壌 / 嫌気バイオ + 砂処理（20%w/w）**

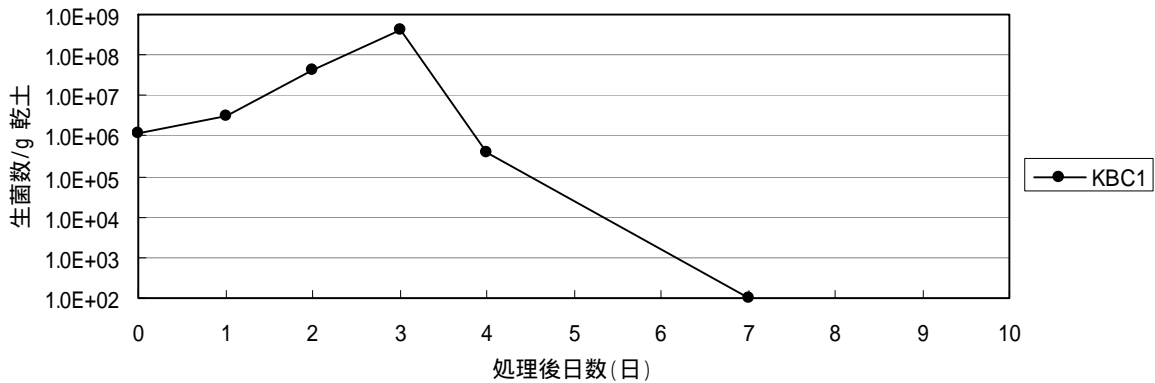
モニタリング項目	結果および考察
塩素化エチレン	<ul style="list-style-type: none"> ・PCE は処理後 3 日目で環境基準値以下（<0.01mg/L）に到達した。 ・TCE は処理後 4 日目で環境基準値以下（<0.03mg/L）に到達した。 ・cis-DCE は処理後 3 日目に少量生成されたが、処理後 4 日目には消失した。 <p>処理後 4 日目（土壌改良材処理 1 日後）で浄化対象物質および共存物質等の浄化目標をクリアーした。</p>
利用微生物	<ul style="list-style-type: none"> ・利用微生物は、処理後 3 日目までに 10⁸オーダーまで増殖した。 ・処理後 4 日目以降（土壌改良 1 日後）には急速に減少し、処理後 7 日目には検出限界以下（10²以下）になった。 <p>利用微生物は、処理土壌中で長期間残留することではなく、砂添加による土壌改良処理（好気条件）に伴って急速に死滅するものと考えられる。</p>
栄養物質	<ul style="list-style-type: none"> ・処理後 3 日目までに、酢酸、プロピオン酸、n-酪酸の生成が認められた。 ・これらの有機酸は、処理後 4 日目以降（土壌改良後）には顕著に減少し、処理後 7 日目には検出限界以下（<1mg/kg）になった。 <p>栄養物質およびそれに由来する生成物（有機酸）は、処理土壌中で長期間残留することではなく、土壌改良処理に伴う土着好気微生物の生分解作用によって急速に減少するものと考えられる。</p>
環境影響評価 （希釈平板法）	<ul style="list-style-type: none"> ・一般細菌および嫌気細菌は処理後 3 日目までに 2~3 オーダー程度増加した。 ・一般細菌は、処理後 3 日目以降も 1 オーダー程度増加したが、処理後 6 日目以降は緩やかに減少する傾向が認められた。 ・嫌気細菌は、処理後 3 日目以降緩やかに減少する傾向を示した。 ・真菌および放線菌は元々の含有菌数が低く、菌数は終始大きく変動することなかった。 <p>本浄化技術の適用により、土着の細菌（好気細菌・嫌気細菌）が顕著に増加するものと考えられた。ただし、処理後 6 日目以降には緩やかに減少するものと考えられた。一方、真菌および放線菌については、菌体数に大きな影響を及ぼさないものと考えられた。</p>
環境影響評価 （遺伝子モニタリング）	<ul style="list-style-type: none"> ・T-RFLP 解析の結果、処理後土壌において 1~2 本の顕著なピークの増加が認められた。 ・16S rDNA クローン解析後の RFLP パターンにより、10 種類の Phylotype に分類された。 <p>優占種と考えられる P1~P4 までのシーケンスを行い、そのデータを処理後の増加ピークと照合し、増加ピークの P1, P3 は <i>Acinetobacter lwoffii</i> に最近縁種であったが、相同性の低さから本菌には相当しないと考えられた。</p>
重金属溶出影響	実施していない。

浄化データ(ケース2): A 土壌/嫌気バイオ+パーライト処理(15%w/w)

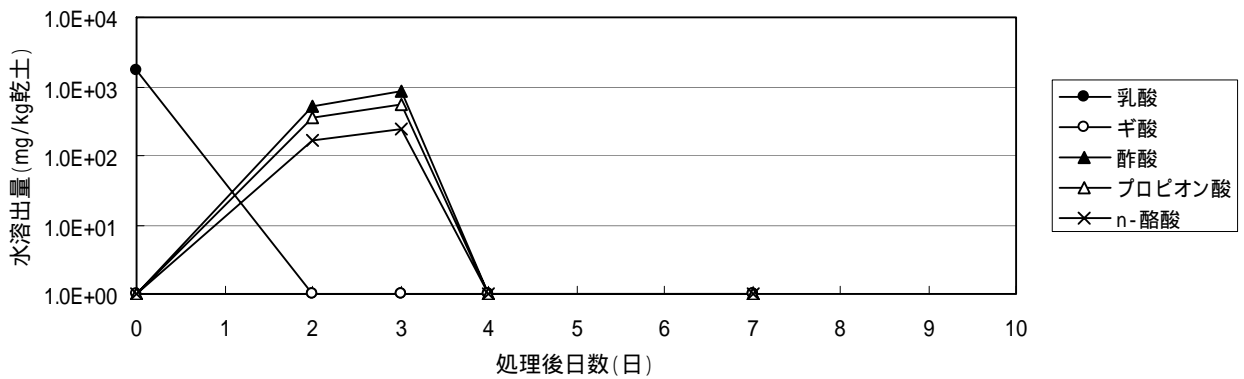
2 - 塩素化エチレンのモニタリング結果



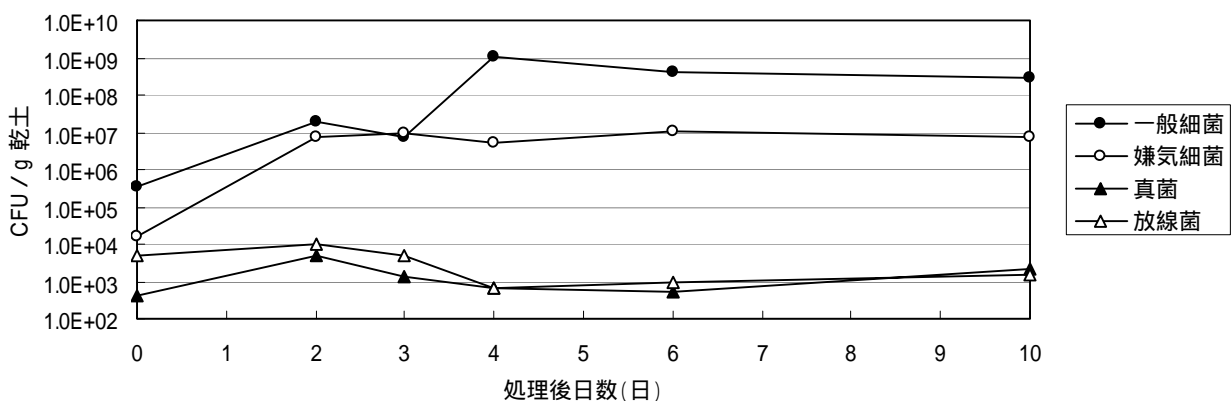
2 - 利用微生物のモニタリング結果



2 - 栄養物質の残留性モニタリング結果

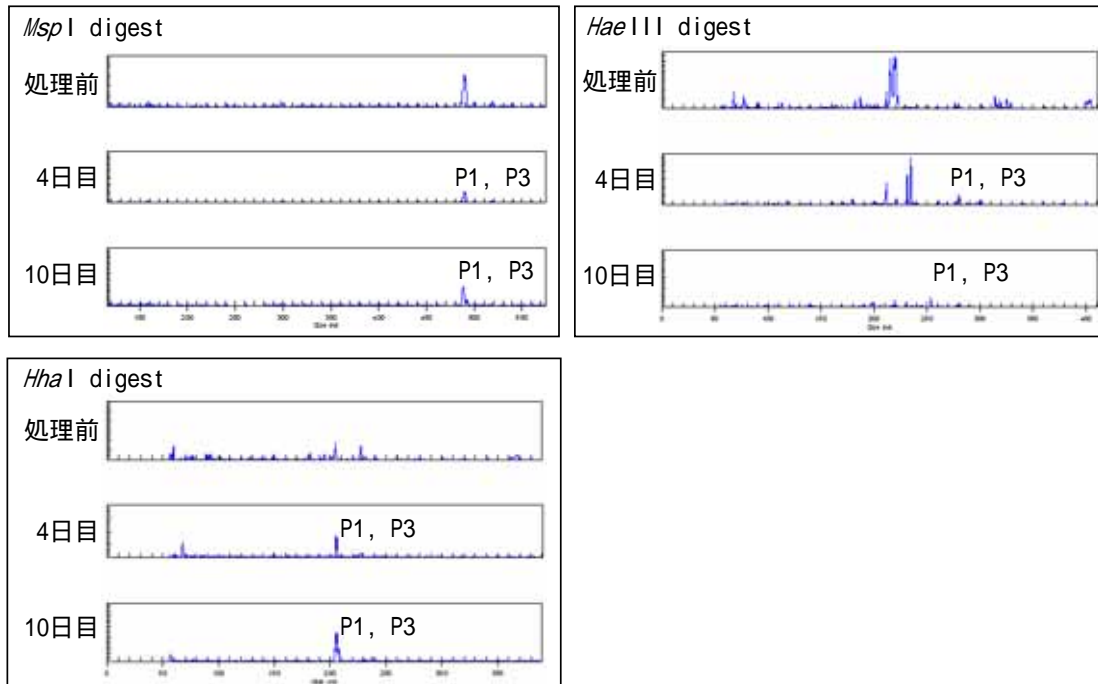


2 - 他の微生物群集への影響評価(希釈平板法)

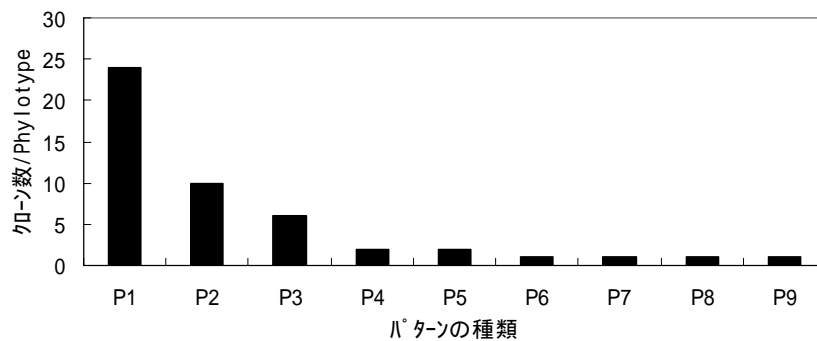


2 - 他の微生物群集への影響評価 (遺伝子モニタリング)

1) T-RFLP 解析



2) RFLP パターンによる Phylotype の分類



3) 制限酵素切断により生成される 5'断片の理論値

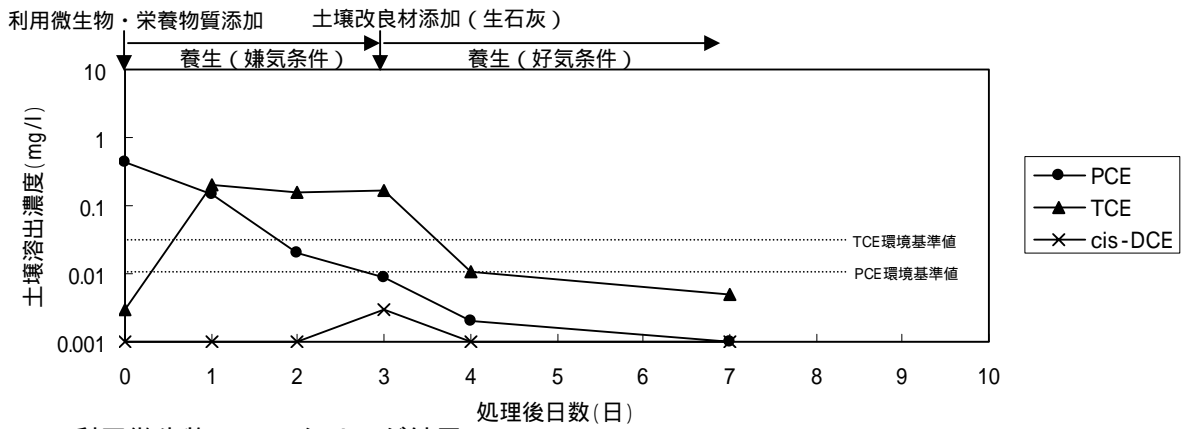
Phylotype名	クローン数	5'断片の大きさ (bases)			最近縁種
		<i>MspI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HhaI</i>	
P1	24	491	254	208	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (93%)
P2	10	491	405	208	<i>Acinetobacter sp.</i> (95%)
P3	6	492	254	208	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (97%)
P4	2	491	40	208	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> (97%)
P5	2	132	217	94	<i>Geobacter hephaestius</i> (96%)

結果および考察（ケース 2）： **A 土壌 / 嫌気バイオ + パーライト処理（15%w/w）**

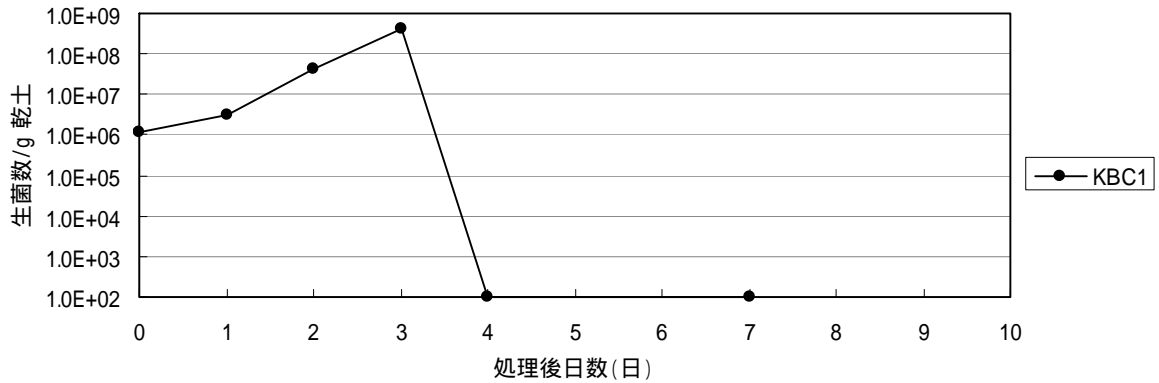
モニタリング項目	結果および考察
塩素化エチレン	<ul style="list-style-type: none"> ・ PCE は処理後 3 日目で環境基準値以下（<0.01mg/L）に到達した。 ・ TCE は処理後 4 日目で環境基準値以下（<0.03mg/L）に到達した。 ・ <i>cis</i>-DCE は処理後 3 日目に少量生成されたが、処理後 4 日目には消失した。 <p>処理後 4 日目（土壌改良材処理 1 日後）で浄化対象物質および生成物の浄化目標をクリアした。</p>
利用微生物	<ul style="list-style-type: none"> ・ 利用微生物は、処理後 3 日目までに 10⁸オーダーまで増殖した。 ・ 処理後 4 日目以降（土壌改良後）には急速に減少し、処理後 7 日目には検出限界以下（10²以下）になった。 <p>利用微生物は、処理土壌中で長期間残留することはなく、土壌改良処理（好気条件）に伴って急速に死滅するものと考えられる。</p>
栄養物質	<ul style="list-style-type: none"> ・ 処理後 3 日目までに、酢酸、プロピオン酸、n-酪酸の生成が認められた。 ・ これらの有機酸は、処理後 4 日目以降（土壌改良材処理 1 日後）には急速に減少し、検出限界以下（<1mg/kg）になった。 <p>栄養物質およびそれに由来する生成物（有機酸）は、処理土壌中で長期間残留することなく、土壌改良処理に伴う土着微生物の生分解作用によって急速に減少するものと考えられる。</p>
環境影響評価 （希釈平板法）	<ul style="list-style-type: none"> ・ 一般細菌および嫌気細菌は処理後 3 日目までに 2 オーダー程度増加した。 ・ 一般細菌は、処理後 3 日目以降も 2 オーダー程度増加したが、処理後 6 日目以降は緩やかに減少する傾向が認められた。 ・ 真菌および放線菌は元々の含有菌数が低く、菌数は終始大きく変動することはなかった。 <p>本浄化技術の適用により、土着の細菌（好気細菌・嫌気細菌）が顕著に増加するものと考えられた。ただし、処理後 4 日目以降は緩やかに減少するものと考えられた。一方、真菌および放線菌については、菌体数に大きな影響を及ぼさないものと考えられた。</p>
環境影響評価 （遺伝子モニタリング）	<ul style="list-style-type: none"> ・ T-RFLP 解析の結果、処理後土壌において 1～2 本の顕著なピークの増加が認められた。 ・ 16S rDNA クローン解析後の RFLP パターンにより 9 種類の Phylotype に分類された。 ・ 優占種と考えられる P1～P5 までのシーケンスを行い、そのデータを処理後の増加ピークと照合し、増加ピークの P1, P3 は <i>Acinetobacter lwoffii</i> に最近縁種であったが、相同性の低さから本菌には相当しないと考えられた。
重金属溶出影響	実施していない。

浄化データ(ケース3): A 土壌/嫌気バイオ+生石灰処理(5%w/w)

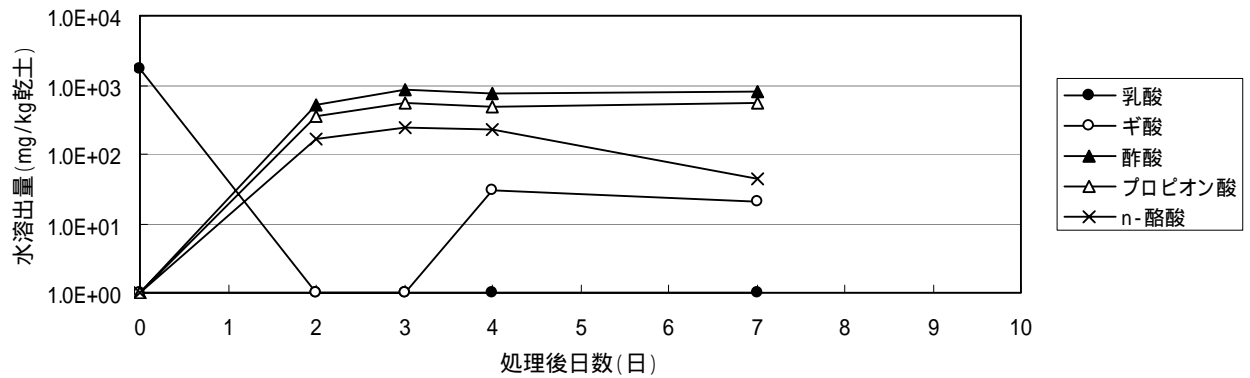
3 - 塩素化エチレンのモニタリング結果



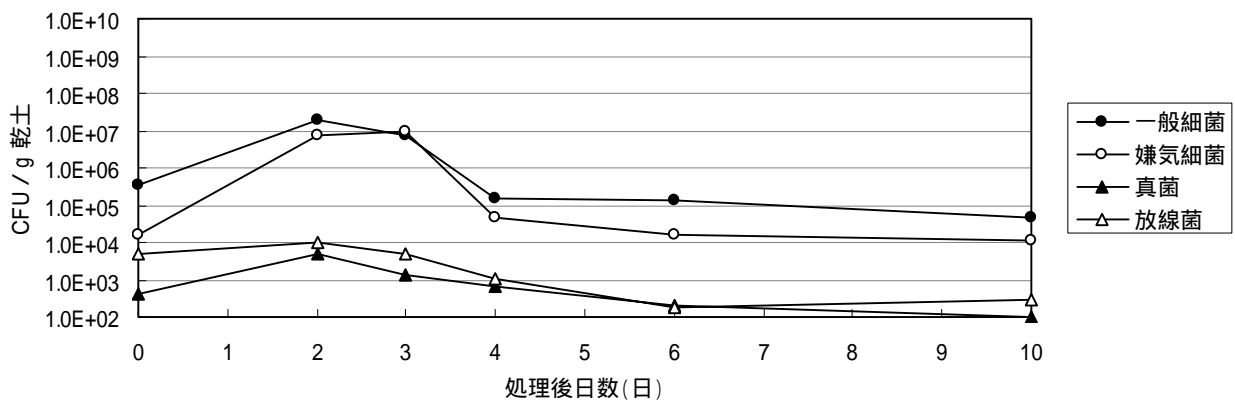
3 - 利用微生物のモニタリング結果



3 - 栄養物質の残留性モニタリング結果

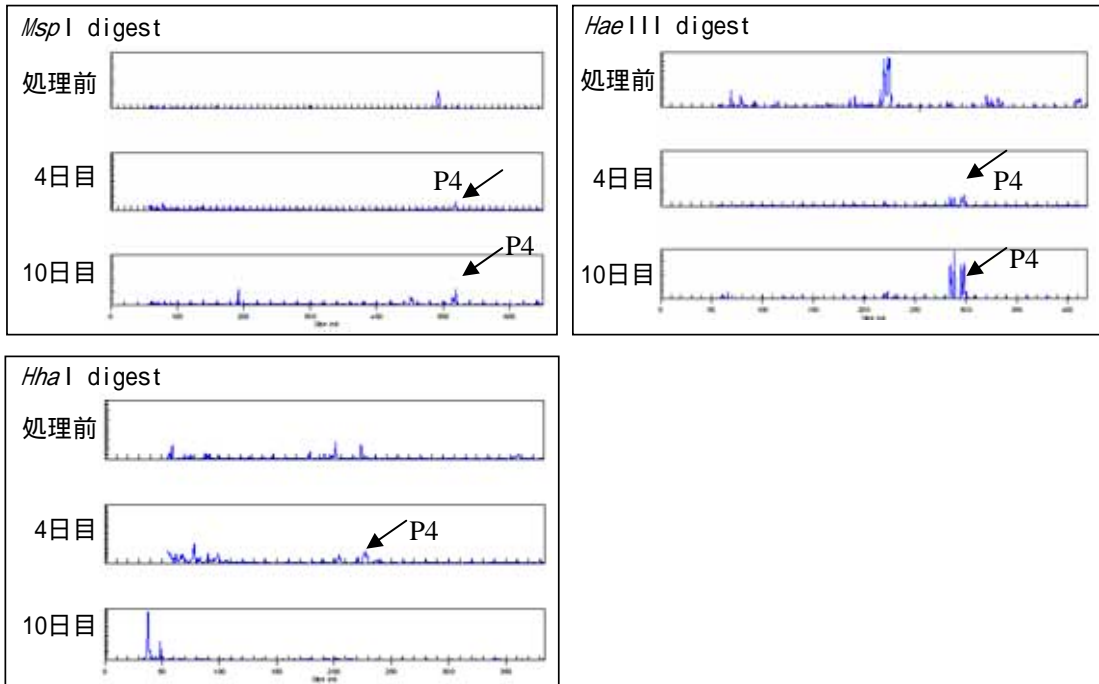


3 - 他の微生物群集への影響評価(希釈平板法)

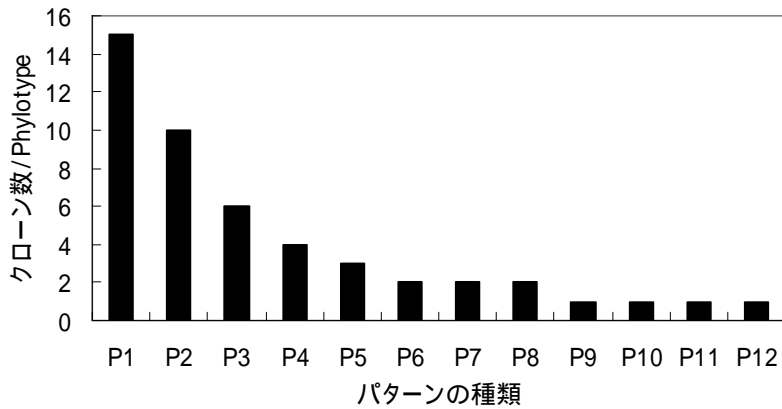


3 - 他の微生物群集への影響評価 (遺伝子モニタリング)

1) T-RFLP 解析



2) RFLP パターンによる Phylotype の分類



3) 制限酵素切断により生成される 5'断片の理論値

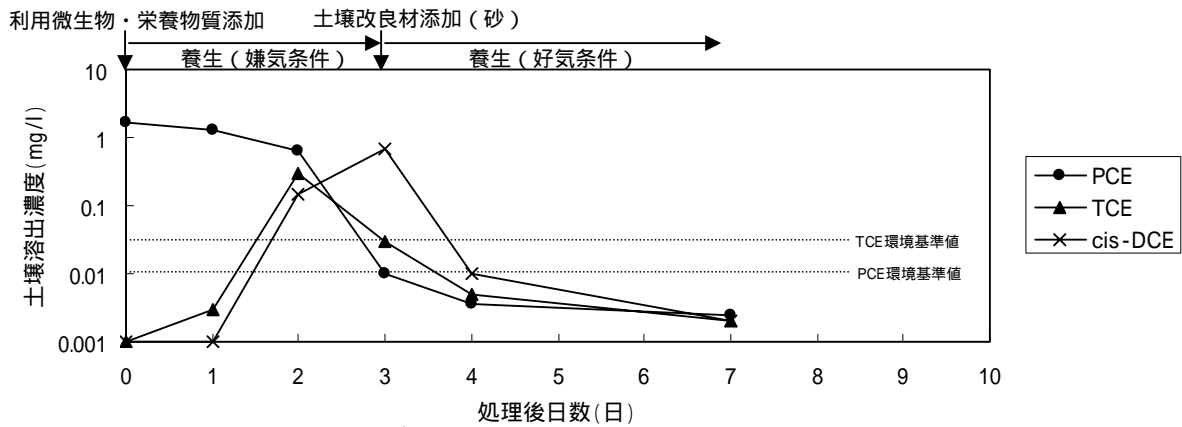
Phylotype名	クローン数	5'断片の大きさ (bases)			最近縁種
		MspI	HaeIII	HhaI	
P1	15	521	301	サイトなし	<i>Clostridium acetobutylicum</i> (97%)
P2	10	518	40	208	<i>Clostridium favosporum</i> (100%)
P3	6	93	211	576	unidentified eubacterium (97%)
P4	4	501	301	232	<i>Clostridium carboxidivorans</i> (97%)
P5	3	521	223	232	<i>Clostridium cylindrosporum</i> (92%)

結果および考察（ケース3）：**A 土壌 / 嫌気バイオ + 生石灰処理（5%w/w）**

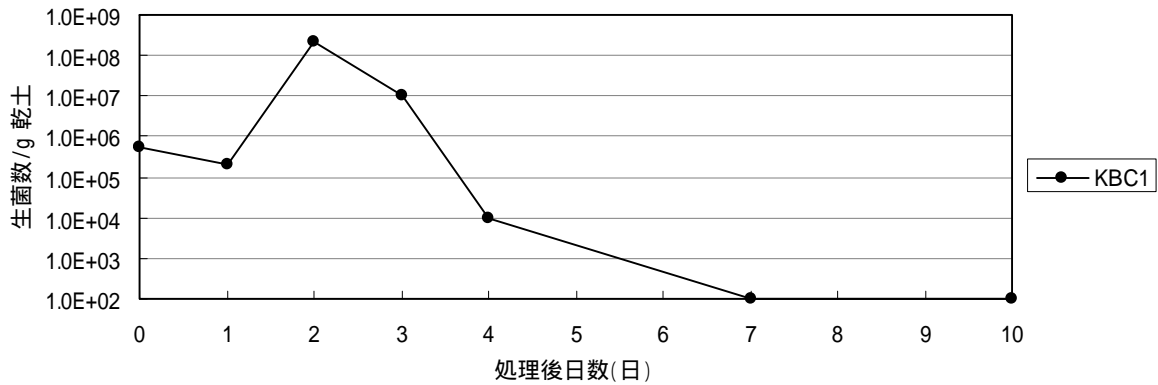
モニタリング項目	結果および考察
塩素化エチレン	<ul style="list-style-type: none"> ・ PCE は処理後 3 日目で環境基準値以下（<0.01mg/L）に到達した。 ・ TCE は処理後 4 日目で環境基準値以下（<0.03mg/L）に到達した。 ・ <i>cis</i>-DCE は処理後 3 日目に少量生成されたが、処理後 4 日目には消失した。 <p>処理後 4 日目（土壌改良材処理 1 日後）で浄化対象物質および生成物の浄化目標をクリアした。</p>
利用微生物	<ul style="list-style-type: none"> ・ 利用微生物は、処理後 3 日目までに 10⁸オーダーまで増殖した。 ・ 処理後 4 日目以降（土壌改良後）には極めて急速に減少し、検出限界以下（10²以下）になった。 <p>利用微生物は、処理土壌中で長期間残留することはなく、土壌改良処理（好気条件）に伴って極めて急速に死滅するものと考えられる。特に、生石灰処理によるアルカリ性への移行（土壌 pH12 程度まで上昇）が大きく影響したのと考えられる。</p>
栄養物質	<ul style="list-style-type: none"> ・ 処理後 3 日目までに、酢酸、プロピオン酸、n-酪酸の生成が認められた。 ・ 酢酸およびプロピオン酸は、処理後 4 日目以降にも引続いて残留し、減少する傾向は認められなかった。 ・ 処理後 4 日目以降にギ酸の生成が認められた。 <p>栄養物質に由来する生成物（有機酸）は、急速に減少することはなく、残留する傾向が認められた。これは、生石灰処理によって土壌微生物の活性が低下し、生分解速度が低下したためであると考えられる。</p>
環境影響評価 （希釈平板法）	<ul style="list-style-type: none"> ・ 一般細菌および嫌気細菌は処理後 3 日目までに 2 オーダー程度増加した。 ・ 一般細菌および嫌気細菌は処理後 3 日目以降において急速に減少し、処理前の微生物数レベルもしくはそれ以下に安定した。 ・ 真菌および放線菌も処理後 3 日目以降に減少する傾向を示した。 <p>嫌気養生中に土着の細菌（好気細菌、嫌気細菌）が顕著に増加するものの、処理後 3 日目以降は総じて急激に減少した。これは、生石灰添加によって土壌 pH が急激にアルカリ性になったため、土壌微生物が死滅しているものと推察される。ただし、処理後 4 日目以降は微生物数が安定することから、これ以降の大きな変動はないと考えられる。</p> <p>* 上記したように、本浄化条件では栄養物質由来の生成物（酢酸、プロピオン酸等）の残留性が認められたが、これに起因して処理後土壌の微生物数が大きく変化することはないと考えられた。</p>
環境影響評価 （遺伝子モニタリング）	<ul style="list-style-type: none"> ・ T-RFLP 解析の結果、処理後土壌において数本の顕著なピークの増加が認められた。 ・ 16S rDNA クローン解析後の RFLP パターンにより、12 種類の Phylotype に分類された。 ・ 優占種と考えられる P1～P5 までのシーケンスを行い、そのデータを処理後の増加ピークと照合し、増加ピークの P4 は <i>Clostridium carboxidivorans</i> に最近縁種であったが、相同性の低さから本菌には相当しないと考えられた。
重金属溶出影響	実施していない。

浄化データ(ケース4): B 土壌/嫌気バイオ+砂処理(20%w/w)

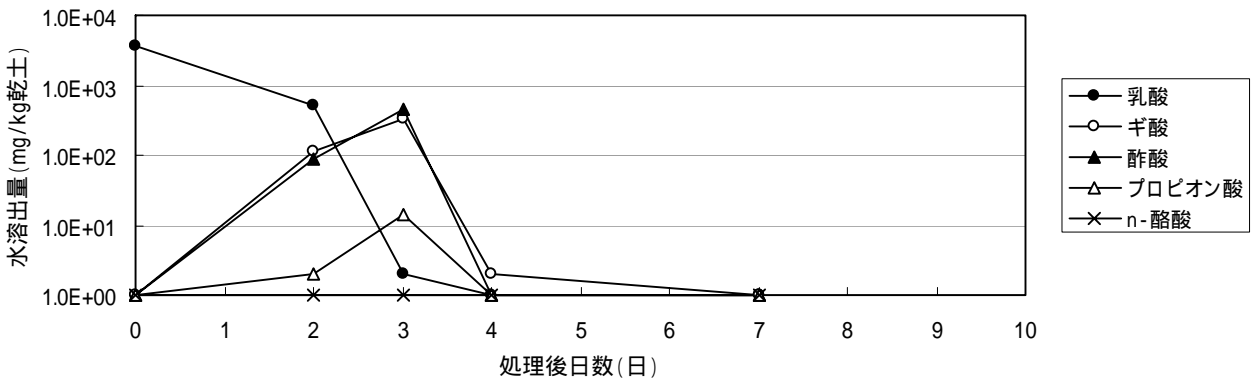
4 - 塩素化エチレンのモニタリング結果



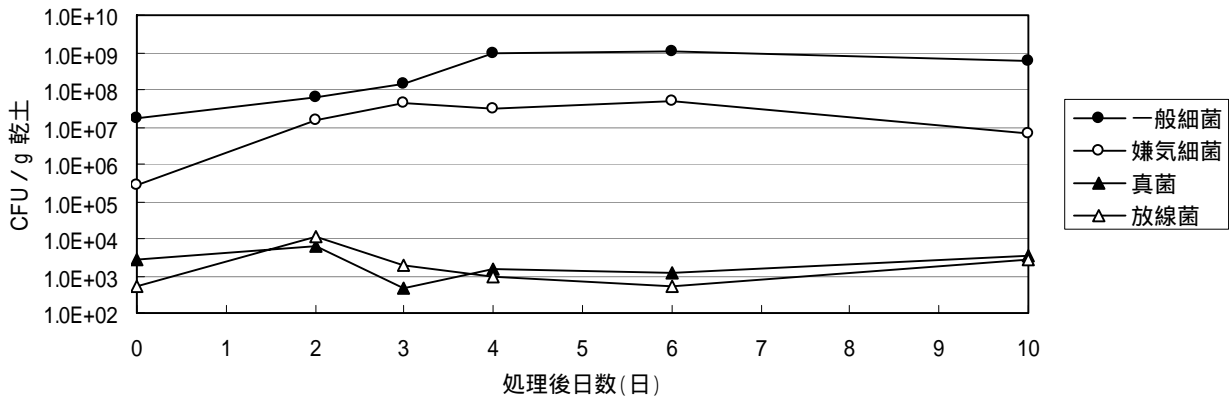
4 - 利用微生物のモニタリング結果



4 - 栄養物質の残留性モニタリング結果

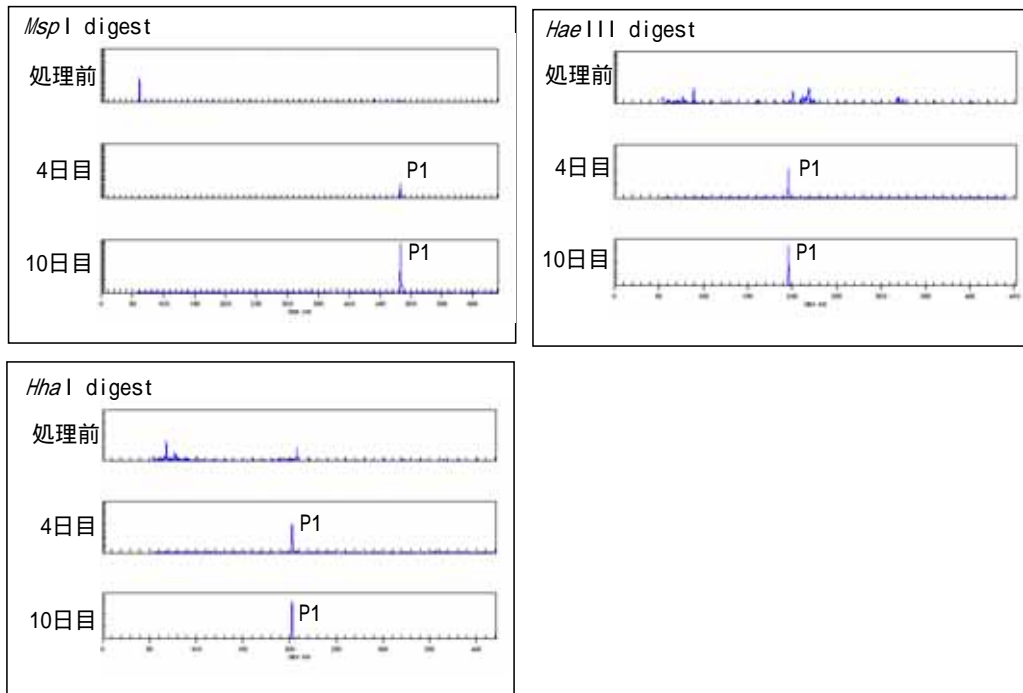


4 - 他の微生物群集への影響評価(希釈平板法)

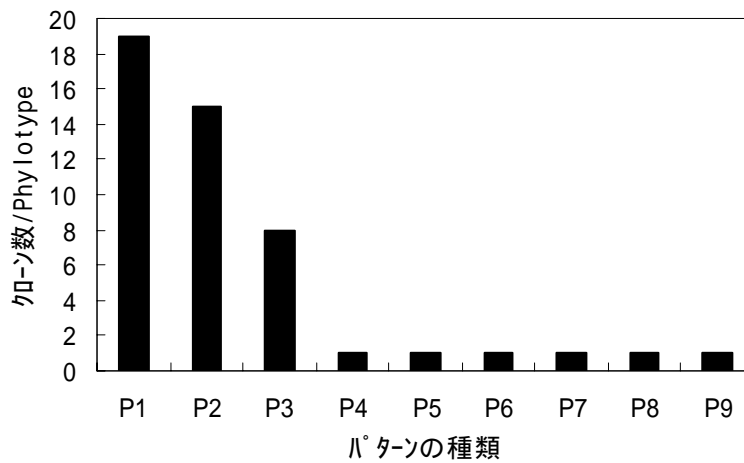


4 - 他の微生物群集への影響評価 (遺伝子モニタリング)

1) T-RFLP 解析



2) RFLP パターンによる Phylotype の分類



3) 制限酵素切断により生成される 5'断片の理論値

Phylotype名	クローン数	5'断片の大きさ (bases)			最近縁種
		<i>MspI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HhaI</i>	
P1	19	489	199	206	<i>Acidovorax</i> sp. (99%)
P2	15	492	202	209	<i>Acidovorax</i> sp. (96%)
P3	8	280	203	361	<i>Geothrix fermentans</i> (99%)

4 - 重金属のモニタリング結果

項目	溶出量試験 (mg/L)			含有量試験		
	基準値*	処理前土壌	処理後土壌 (処理 10 日目)	基準値*	処理前土壌	処理後土壌 (処理 10 日目)
カドミウム	0.01	<0.001	<0.001	150	<15	<15
六価クロム	0.05	<0.005	<0.005	250	<25	<25
シアン	検出されないこと	<0.01	<0.01	遊離シアンとして 50	<5.0	<5.0
水銀	0.0005	<0.00005	<0.00005	15	<1.5	<1.5
アルキル水銀	検出されないこと	<0.0005	<0.0005	-	-	-
セレン	0.01	<0.001	<0.001	150	<15	<15
鉛	0.01	<0.001	<0.001	150	<15	<15
砒素	0.01	<0.001	0.002	150	<15	<15
ふっ素	0.8	<0.1	<0.1	4000	<100	<100
ほう素	1	<0.1	<0.1	4000	<100	<100

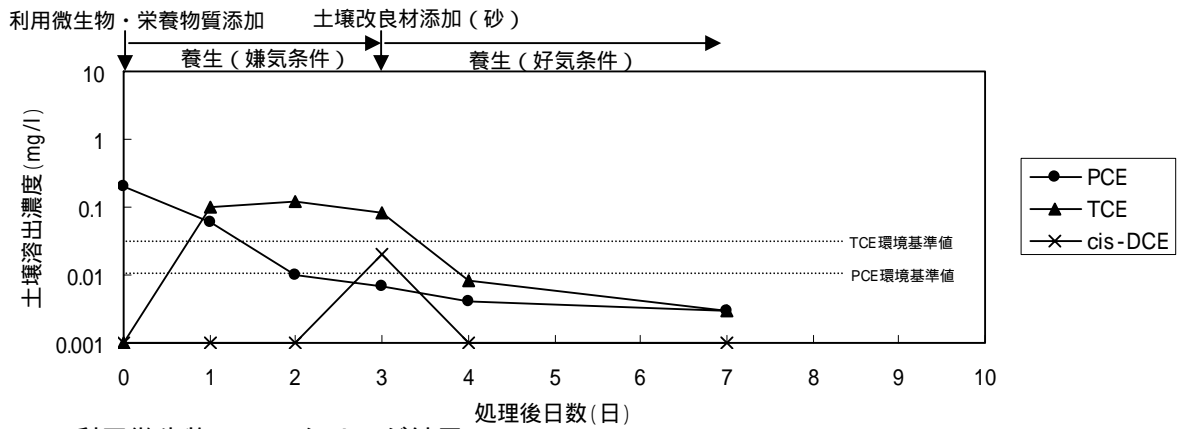
*平成 15 年環境省告示第 18 号 (土壌汚染対策法)

結果および考察（ケース4）：**B 土壌 / 嫌気バイオ + 砂処理（20%w/w）**

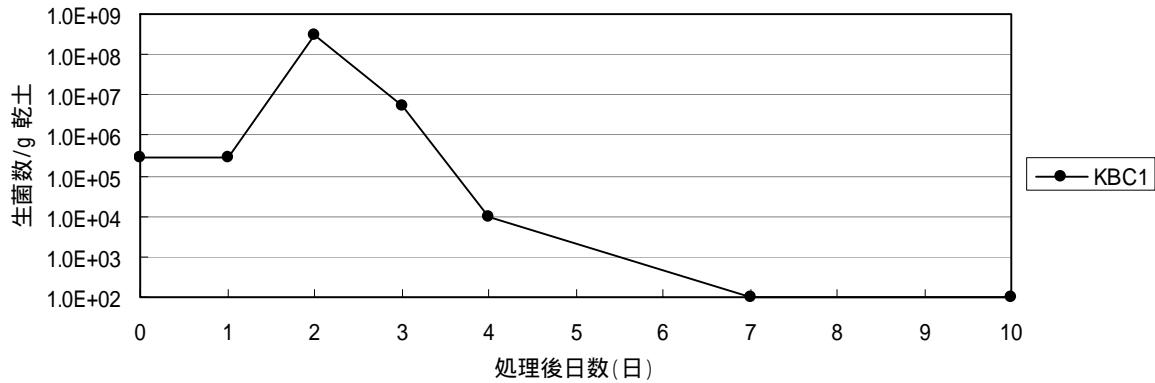
モニタリング項目	結果および考察
塩素化エチレン	<ul style="list-style-type: none"> ・ PCE は処理後 3 日目で環境基準値以下（<0.01mg/L）に到達した。 ・ TCE も処理後 3 日目で環境基準値以下（<0.03mg/L）に到達した。 ・ <i>cis</i>-DCE は処理後 3 日目に確認されたが、処理後 4 日目には環境基準値以下（<0.04mg/L）に低減した。 <p>処理後 4 日目（土壌改良材処理 1 日後）で浄化対象物質および生成物の浄化目標をクリアした。この実験では、<i>cis</i>-DCE の顕著な蓄積が認められたが、これは土着微生物中に PCE もしくは TCE を脱塩素化する嫌気微生物が生息しており、利用微生物と共に活性化されたものと推察される。</p>
利用微生物	<ul style="list-style-type: none"> ・ 利用微生物は、処理後 2 日目までに 10⁸オーダーまで増殖した。その後、3 日目にかけて減少し、処理後 4 日目以降（土壌改良後）には急速に減少した。 <p>利用微生物は、処理土壌中で長期間残留することはなく、土壌改良処理（好気条件）に伴って急速に死滅するものと考えられる。</p>
栄養物質	<ul style="list-style-type: none"> ・ 処理後 3 日目までに、酢酸、プロピオン酸、ギ酸の生成が認められた。 ・ これらの有機酸は、処理後 4 日目以降（土壌改良材処理後）には急速に減少し、処理後 7 日目にはすべて検出限界以下（<1mg/kg）になった。 <p>栄養物質およびそれに由来する生成物（有機酸）は、処理土壌中で長期間残留することなく、土壌改良処理に伴う土着微生物の生分解作用によって急速に減少するものと考えられる。</p>
環境影響評価 （希釈平板法）	<ul style="list-style-type: none"> ・ 一般細菌および嫌気細菌は処理後 3 日目までに 2 オーダー程度増加した。 ・ 一般細菌は、処理後 3 日目以降も 1 オーダー程度増加したが、処理後 6 日目以降は緩やかに減少する傾向が認められた。 ・ 嫌気細菌は、処理後 3 日目から 10 日目にかけて緩やかに減少する傾向を示した。 ・ 真菌および放線菌は元々の含有菌数が低く、菌数は終始大きく変動することなかった。 <p>本浄化技術の適用により、土着の細菌（好気細菌・嫌気細菌）が顕著に増加するものと考えられた。ただし、処理後 6 日目以降には緩やかに減少するものと考えられた。一方、真菌および放線菌については、菌体数に大きな影響を及ぼさないものと考えられた。</p>
環境影響評価 （遺伝子モニタリング）	<ul style="list-style-type: none"> ・ T-RFLP 解析の結果、処理後土壌において 2 本の顕著なピークの増加が認められた。 ・ 16S rDNA クローン解析後の RFLP パターンにより 9 種類の Phylotype に分類された。 ・ 優占種と考えられる P1～P3 までのシーケンスを行い、そのデータを処理後の増加ピークと照合し、増加ピークを P1 (<i>Acidovorax sp.</i>) と特定した。 <p>病原菌リスト検索の結果、<i>Acidovorax sp.</i> は有害な病原菌には相当しないことが確認された。</p>
重金属溶出影響	<ul style="list-style-type: none"> ・ 分析した全項目の中で唯一、処理後土壌における砒素化合物の溶出量が検出されたが、溶出濃度は微量であった。 <p>主だった影響は認められなかった。</p>

浄化データ(ケース5): C土壌/嫌気バイオ+砂処理(20%w/w)

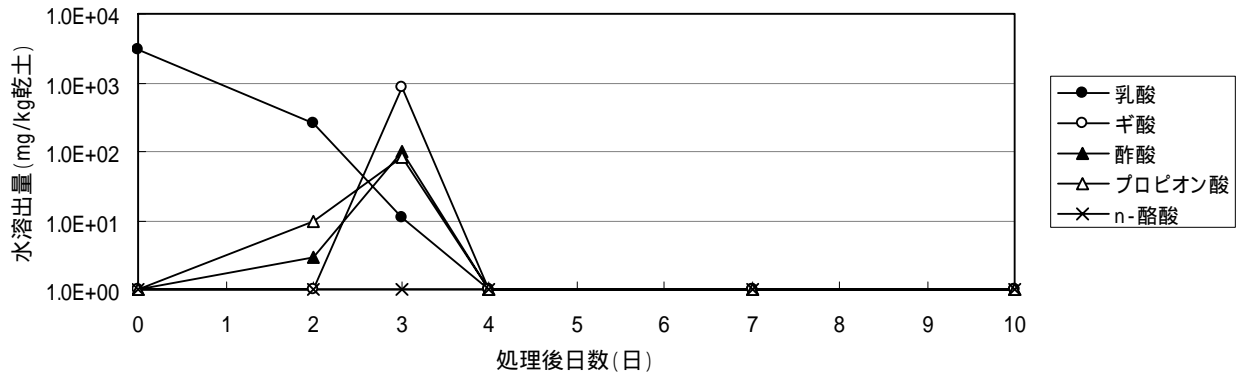
5 - 塩素化エチレンのモニタリング結果



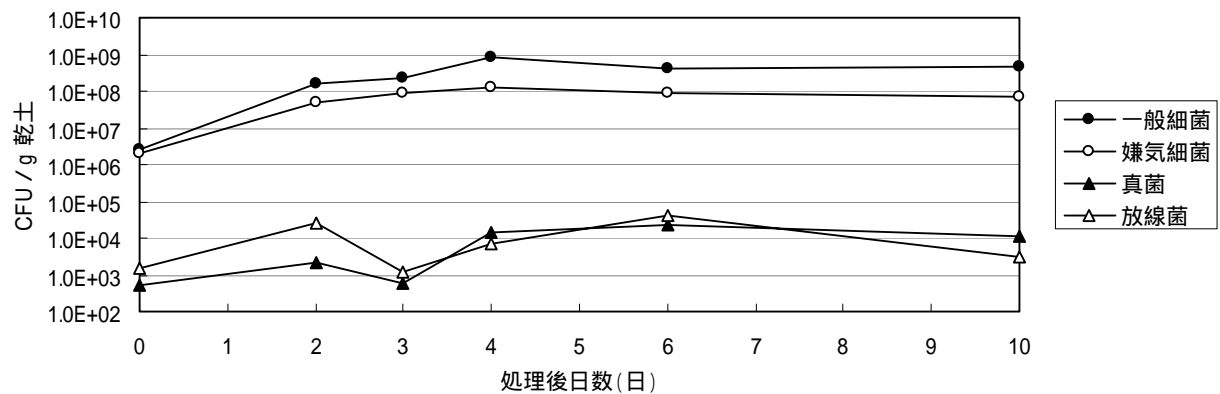
5 - 利用微生物のモニタリング結果



5 - 栄養物質の残留性モニタリング結果

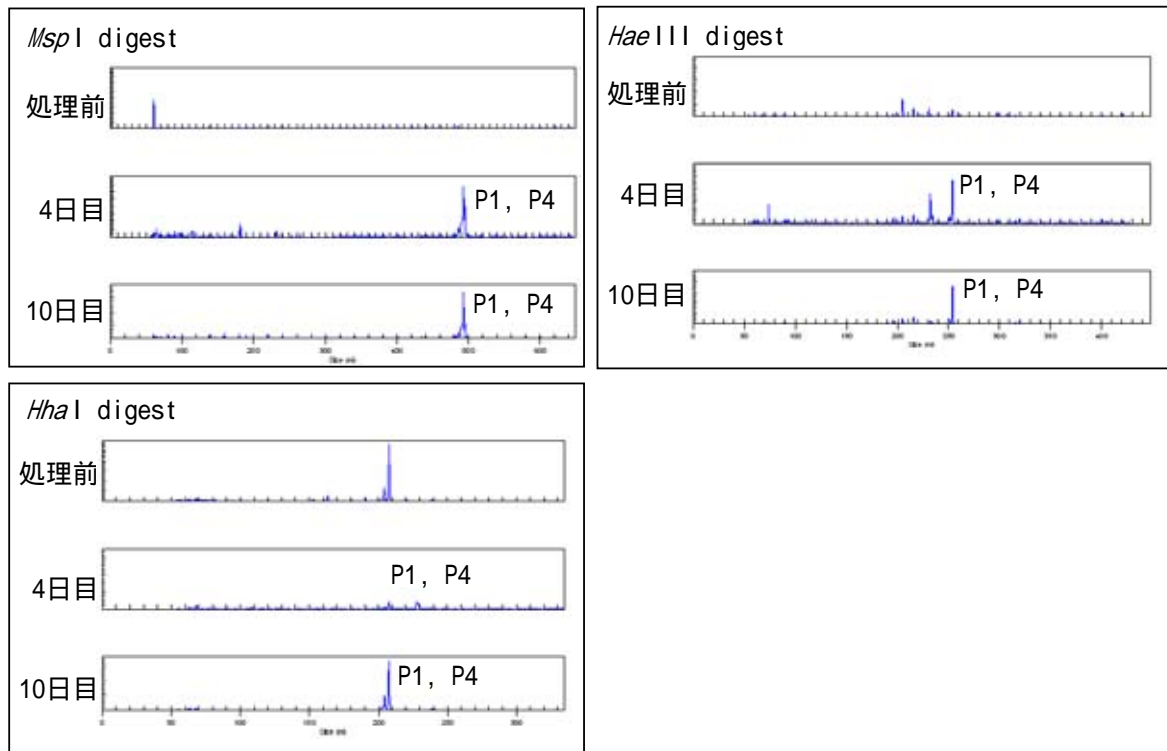


5 - 他の微生物群集への影響評価(希釈平板法)

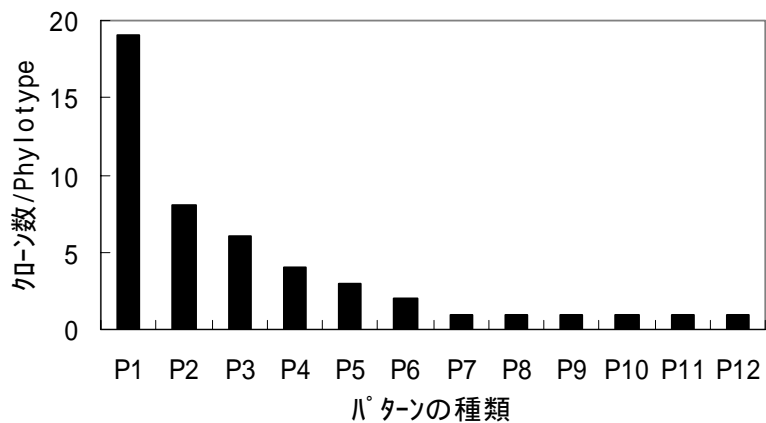


5 - 他の微生物群集への影響評価 (遺伝子モニタリング)

1) T-RFLP 解析



2) RFLP パターンによる Phylotype の分類



3) 制限酵素切断により生成される 5'断片の理論値

Phylotype名	クローン数	5'断片の大きさ (bases)			最近縁種
		<i>MspI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HhaI</i>	
P1	19	492	254	208	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (97%)
P2	8	497	42	374	uncultured bacterium (99%)
P3	6	93	211	576	<i>Ralstonia mannitolilytica</i> (98%)
P4	4	491	253	207	<i>Acinetobacter sp.</i> (97%)
P5	3	154	222	210	<i>Diaphorobacter sp.</i> (95%)

5 - 重金属のモニタリング結果

項目	溶出量試験 (mg/L)			含有量試験		
	基準値*	処理前土壌	処理後土壌 (処理 10 日目)	基準値*	処理前土壌	処理後土壌 (処理 10 日目)
カドミウム	0.01	<0.001	<0.001	150	<15	<15
六価クロム	0.05	<0.005	<0.005	250	<25	<25
シアン	検出されないこと	<0.01	<0.01	遊離シアンとして 50	<5.0	<5.0
水銀	0.0005	<0.00005	<0.00005	15	<1.5	<1.5
揮発性水銀	検出されないこと	<0.0005	<0.0005	-	-	-
セレン	0.01	0.001	<0.001	150	<15	<15
鉛	0.01	0.006	0.008	150	<15	<15
砒素	0.01	0.002	0.005	150	<15	<15
ふっ素	0.8	<0.1	<0.1	4000	<100	<100
ほう素	1	<0.1	<0.1	4000	<100	<100

*平成 15 年環境省告示第 18 号 (土壌汚染対策法)

結果および考察（ケース5）：**C 土壌 / 嫌気バイオ + 砂処理（20%w/w）**

モニタリング項目	結果および考察
塩素化エチレン	<ul style="list-style-type: none"> ・ PCE は処理後 3 日目で環境基準値以下（<0.01mg/L）に到達した。 ・ TCE は処理後 4 日目で環境基準値以下（<0.03mg/L）に到達した。 ・ <i>cis</i>-DCE は処理後 3 日目に確認されたが、処理後 4 日目には消失した。 <p>処理後 4 日目（土壌改良材処理 1 日後）で浄化対象物質および生成物の浄化目標をクリアした。</p>
利用微生物	<ul style="list-style-type: none"> ・ 利用微生物は、処理後 2 日目までに 10⁸オーダーまで増殖した。その後、3 日目にかけて減少し、処理後 4 日目以降（土壌改良後）には急速に減少した。 <p>利用微生物は、処理土壌中で長期間残留することはなく、土壌改良処理（好気条件）に伴って急速に死滅するものと考えられる。</p>
栄養物質	<ul style="list-style-type: none"> ・ 処理後 3 日目までに、乳酸、酢酸、プロピオン酸、ギ酸の残留および生成が認められた。 ・ これらの有機酸は、処理後 4 日目（土壌改良材処理 1 日後）には急速に減少し、すべて検出限界以下（<1mg/kg）になった。 <p>栄養物質およびそれに由来する生成物（有機酸）は、処理土壌中で長期間残留することなく、土壌改良処理に伴う土着微生物の生分解作用によって急速に減少するものと考えられる。</p>
環境影響評価 （希釈平板法）	<ul style="list-style-type: none"> ・ 一般細菌および嫌気細菌は処理後 3 日目までに 2 オーダー程度増加した。 ・ 一般細菌は、処理後 3 日目以降も増加傾向を示したが、処理後 6 日目以降は緩やかに減少する傾向が認められた。 ・ 嫌気細菌は、処理後 3 日目から 10 日目にかけてほぼ安定する傾向を示した。 ・ 真菌および放線菌は処理工程によって若干変動するものの、処理後の菌数は処理前と大きく変動することはない。 <p>本浄化技術の適用により、土着の細菌（好気細菌・嫌気細菌）が顕著に増加するものと考えられた。ただし、処理後 6 日目以降には安定もしくは緩やかに減少するものと考えられた。一方、真菌および放線菌については、処理後の菌体数に大きな影響を及ぼさないものと考えられた。</p>
環境影響評価 （遺伝子モニタリング）	<ul style="list-style-type: none"> ・ T-RFLP 解析の結果、処理後土壌において 2 本の顕著なピークの増加が認められた。 ・ 16S rDNA クローン解析後の RFLP パターンにより、12 種類の Phylotype に分類された。 <p>・ 優占種と考えられる P1～P5 までのシーケンスを行い、そのデータを処理後の増加ピークと照合し、増加ピークの P1、P4 は <i>Acinetobacter lwoffii</i> および <i>Acinetobacter</i> sp. に最近縁種であったが、相同性の低さからこれらの菌には相当しないと考えられた。</p>
重金属溶出影響	<ul style="list-style-type: none"> ・ 処理後土壌において、鉛化合物と砒素化合物の溶出量の増加が認められた。ただし、溶出増加濃度は環境基準値以下であった。 <p>今回の分析結果では、主だった影響は認められなかった。しかしながら、ケース 4 と同様に一部の重金属の溶出を促進する傾向が認められた。（添付資料 27 にて重金属に関する詳細検討を別途実施）</p>

利用微生物 (*Desulfitobacterium* sp. KBC1) のヒトに対する安全性試験結果 (要約)

本試験は「農薬の毒性に関する試験の適正実施について」(11 農産第 6283 号農林水産省農産園芸局長通知、平成 11 年 10 月 1 日)の GLP に従って実施したものである。なお、試験方法については「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」(9 農産第 5090 号農林水産省農産園芸局長通達、平成 9 年 8 月 29 日)に従った。

No.	試験の種類・期間	供試生物 (動物数)	投与方法 (菌数/動物)	結果および考察 (病原性・感染性・生残性等)
1	単回経口投与試験 (21 日)	SD 系ラット (5 週齢) 14 匹 14 匹	1×10^8 cells	【結果】 死亡例なし 一般状態、体重、剖検異常なし 糞便中の生残性なし 体内生残性なし (腎臓、脳、肝臓、肺、脾臓、 腸間膜リンパ節、胃、小腸、大 腸、血液) 【考察】 感染性・病原性・体内生残性お よび毒性なし
2	単回経気道投与試験 (21 日)	SD 系ラット (5 週齢) 17 匹 17 匹	1×10^8 cells	【結果】 死亡例なし 一般状態、体重、剖検異常なし 体内生残性なし (脾臓、肝臓、腎臓、脳、肺、 気管支リンパ節、気管、鼻腔、 血液) 【考察】 感染性・病原性・体内生残性お よび毒性なし
3	単回静脈内投与試験 (21 日)	SD 系ラット (5 週齢) 17 匹 17 匹	1×10^7 cells	【結果】 死亡例なし 一般状態、体重、剖検異常なし 体内生残性なし (脾臓、肝臓、腎臓、脳、鼠径 リンパ節、小腸、大腸、血液) 【考察】 感染性・病原性・体内生残性お よび毒性なし
4	単回経皮投与試験 (14 日)	日本白色種ウサギ (Kbl: JW) 5 匹 5 匹	1×10^8 cells (24h 閉塞塗布)	【結果】 皮膚反応なし 一般状態、体重、剖検異常なし 【考察】 皮膚刺激性および経皮毒性なし
5	眼一次刺激性試験 (7 日)	日本白色種ウサギ (Kbl: JW) 9 匹 (非洗眼群 6 匹) (洗眼群 3 匹)	1×10^7 cells (点眼)	【結果】 眼刺激性なし 【考察】 眼刺激性なし
6	皮膚感作性試験 (感作 32 日) (惹起 2 日)	Hartley 系雄性 モルモット 30 匹	1.25×10^6 cells/ml 感作 10 回 惹起 1 回	【結果】 皮膚反応なし 一般状態、体重異常なし 【考察】 皮膚感作性なし

* 体内生残性は、投与後経日的に MPN 法 (PCR 検出) にて生菌数を測定した。

利用微生物 (*Desulfitobacterium* sp. KBC1) の環境生物に対する安全性試験結果 (要約)

本試験の淡水魚影響試験、淡水無脊椎動物影響試験および鳥類影響試験は「農薬登録申請に係る試験成績について (12 農産第 8147 号農林水産省農産園芸局長通知 平成 12 年 11 月 24 日)」別添の「農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針」に準拠して実施した。また、藻類影響試験については OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 201 (1984) に準じて実施した。

No.	試験の種類・期間	供試生物 (数)	投与方法 (菌数/生物)	結果および考察 (影響・死亡例等)
1	淡水魚影響試験 (14日)	コイ 全 80 尾 (20 尾/区)	腹腔内注射 (3 濃度処理) 対照群 1×10^3 cells 1×10^4 cells 1×10^5 cells	【結果】 すべての処理濃度で死亡例なし 一般状態、体重、体長異常なし 飼料摂取量・要求率異常なし 剖検異常なし 体内生残性なし (腎臓) 【考察】 影響なし
2	淡水無脊椎動物 影響試験 (21日)	ミジンコ <i>Daphnia magna</i> 全 240 頭 (60 頭/区)	水中暴露 (3 濃度処理) 対照群 1×10^4 cells 1×10^5 cells 1×10^6 cells	【結果】 死亡例 (対照群との有意差なし) 60 頭中 13 頭死亡 60 頭中 12 頭死亡 60 頭中 12 頭死亡 60 頭中 13 頭死亡 一般症状異常なし 産仔数有意差なし 【考察】 影響なし
3	藻類影響試験 (生長阻害試験) (72 時間)	藻類 ムレミカツキモ 初期 10^4 cells/ml 72h 振とう培養	水中暴露 (2 濃度処理) 対照区 1×10^7 cells/ml 1×10^8 cells/ml * 試験開始時の実測処理 菌数は、 4.3×10^6 cells/ml 1.5×10^7 cells/ml であった。	【結果】 生長阻害率有意差なし 【考察】 影響なし
4	鳥類影響試験 (30日)	ウズラ ニホンウズラ 全 40 羽 (対照区 10 羽) (処理区 30 羽)	経口投与 (5 日間連続投与) 対照群 1×10^8 cells	【結果】 死亡例なし 臨床観察異常なし 肉眼的病理検査異常なし 体重、増体量有意差なし 飼料摂取量・要求率有意差なし 体内生残性なし (肝臓、腎臓、脾臓、肺、血液) 【考察】 影響なし

* 体内生残性は、MPN 法 (PCR 検出) にて生菌数を測定した。

有害物質の産生性に関する情報（実験データ）

1. 目的

本事業の浄化過程における有害物質の産生性を調査した。

2. 方法

基本的な処理フローに従って浄化処理を行う過程において、適宜処理土壌の一部をサンプリングし、土壌中の含有物質（HPLC による有機酸分析）および土壌より揮散するガス濃度分析（悪臭物質等）を行った。なお、浄化処理の方法は、「嫌気バイオ処理（3日間養生）+土壌改良処理（砂添加 1日間養生）」にて実施した。

3. 結果

3 - 1 処理土壌の水抽出液 HPLC 分析結果（有機酸）

まずは、栄養物質に由来する生成物（主に有機酸）の土壌残留性を HPLC により経時的に分析した。方法は、処理土壌を等量の水に希釈し、30 分間振とう抽出を行った後に HPLC 分析に供した。

対象物質	水溶出濃度 (mg/g 乾土)		
	処理 0 日後 (栄養物質投入直後)	処理 3 日後 (嫌気バイオ終了時点)	処理 4 日後 (土壌改良処理 1 日後)
リン酸	検出されず	検出されず	検出されず
乳酸	1,694	検出されず	検出されず
ギ酸	検出されず	検出されず	検出されず
酢酸	検出されず	842	検出されず
プロピオン酸	検出されず	550	検出されず
n-酪酸	検出されず	235	検出されず

3 - 2 処理土壌のガス濃度分析結果（悪臭物質）

次いで、嫌気反応に起因すると思われる処理土壌からの揮散ガス濃度分析（悪臭物質）を行い、生成する有害物質を定量評価した。方法は、適当な大きさのテドラバッグに下表の土壌サンプル量を入れ、密栓後適当量の Air を注入し、1 時間程度放置後のガスを分析した。（昭和 47 年環境庁告示第 9 号 特定悪臭物質の測定の方法 に準拠） なお、本分析は最も成分濃度が高いと思われる嫌気バイオ終了時点（処理 3 日後）の処理土壌のみを対象として実施した。

物質名	土壌量 (kg)	Air 量 (L)	処理 3 日後土壌測定濃度 (ppm)	備考 (悪臭防止法で定める敷地 境界線上の規制濃度)
アンモニア	3	65	1.3	1 ~ 5
メルカプタン	1	2.5	<0.0005	0.002 ~ 0.01
硫化水素			<0.001	0.02 ~ 0.2
硫化メチル			0.014	0.01 ~ 0.2
二硫化メチル			0.002	0.009 ~ 0.1
トリメチルアミン	4	60	0.002	0.005 ~ 0.07
アセトアルデヒド	4	65	<0.01	0.05 ~ 0.5
プロピオンアルデヒド			<0.01	0.05 ~ 0.5
ノルマルブチルアルデヒド			<0.005	0.009 ~ 0.08
イソブチルアルデヒド			<0.005	0.02 ~ 0.2
ノルマルパレルアルデヒド			<0.002	0.009 ~ 0.05
イソパレルアルデヒド			<0.002	0.003 ~ 0.01
イソブタノール	1	2.5	<0.1	0.9 ~ 20
プロピオン酸	3	55	<0.0005	0.03 ~ 0.2
ノルマル酪酸			<0.0005	0.001 ~ 0.006
ノルマル吉草酸			<0.0005	0.0009 ~ 0.004
イソ吉草酸			<0.0005	0.001 ~ 0.01

4. 考察

HPLC による土壌分析結果から、処理後 3 日目（嫌気バイオ処理終了時点）に導入した栄養物質（乳酸）に由来する酢酸、プロピオン酸、n-酪酸の生成が認められた。しかしながら、これらの有機酸は土壌改良 1 日後には検出されず、急速に消失した。（この現象は、これまでに試験したすべての土壌で同様の傾向が認められている）

土壌改良処理によって、土壌条件が嫌気から好気へと移行し、土着の好気性微生物による分解作用が活性化されたためであると推察される。

一方、処理後 3 日目（嫌気バイオ処理終了時点）の土壌ガス分析において、土着の嫌気性微生物の活性化に因ると考えられるアンモニア、硫化メチル、二硫化メチル、トリメチルアミンが検出された。それぞれの物質の検出濃度は、悪臭防止法で定める敷地境界線上の規制濃度下限もしくはそれ以下であった。また、処理後 4 日目以降（土壌改良以降）の処理土壌の臭気は急速に減少することを確認している（定量データ未実施）。通常、悪臭物質測定は開放系でのガス捕集を基本として行われるが、本試験では採取した土壌を密閉バッグ内に放置して測定する簡易法を採用したため、測定濃度は非常に高い値になると予測された（高感度分析方法）。しかしながら、本試験の結果では規制濃度レベルのアンモニア等が検出されたのみであった。このことから、本試験で検出されたアンモニア等の 4 物質については、サイトの生態系影響や周辺への大気汚染等において問題になるレベルではないと推察される。

ただし、これら生成物の種類および量に関してはサイトによって大きく異なることが予想されるので、事前の適用評価試験で問題にならないことを確認すると共に、実施サイトの作業環境の確保ならびに排ガス対策を徹底する必要があると考えられる。

利用微生物の環境試料中での生残性（実験データ）

1. 目的

利用微生物の一般環境中での生存能力および生残性を調査することを目的として、性質の異なる複数の環境試料中（土壌、環境水）での生残性試験を実施した。なお、本試験は利用微生物が環境中に流出したことを想定し、栄養物質を添加しない条件で生残性を評価した。

2. 生残性試験方法

1) 使用した環境試料

性状の異なる3種類の汚染土壌（土壌A / 高液性限界の砂質粘土、土壌B / 高液性限界の粘土、土壌D / 礫質砂）および4種類の水系試料（W1 / 地下水、W2 / 湖沼水、W3 / 河川水、W4 / 滅菌蒸留水）を用いた。それぞれの性状を下表に示す。

土壌試料

土質試験結果		土壌A	土壌B	土壌D
一般	土粒子密度 (g/cm ³)	2.638	2.614	2.627
	自然含水比 (%)	36.6	133.5	9.1
粒度	礫分2~75mm (%)	4.5	0.5	37.1
	砂分75μm~2mm (%)	16	4.1	59.9
	シルト分5~75μm (%)	23.9	52.6	1.9
	粘土分5μm未満 (%)	55.6	42.8	1.1
	均等係数	NT ¹⁾	NT	14.1
	曲率係数	NT	NT	0.9
	最大粒径 mm	9.5	4.75	19
	50%粒径 D50mm	0.00226	0.00801	1.24
	30%粒径 D30mm	NT	NT	0.451
コンステツク-特性	液性限界 (%)	60.6	155	ND ²⁾
	塑性限界 (%)	20	56	ND
	塑性指数	40.6	99	NT
	コンステツク-指数	0.591	0.217	NT
分類	分類名	砂質粘土 (高液性限界)	粘土 (高液性限界)	礫質砂
	分類記号	CHS	CH	SWG
その他	土のpH	7.9	5.1	4.3
	強熱減量 Li (%)	7	15	1.4

1); NT, not tested

2); ND, not detected

水系試料

水質試験結果	W1	W2	W3	W4
硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素 [mg/L]	検出されず (1.0未満)	検出されず (1.0未満)	6	NT ¹⁾
鉄及びその化合物 [mg/L]	2.2	3.3	0.32	NT
塩化物イオン [mg/L]	8.9	11	30	NT
有機物等（過マンガン酸カリウム消費量） [mg/L]	検出されず (0.5未満)	20	5.9	NT
pH値 ()	7.6 (19.0)	7.0 (19.0)	7.5 (20)	NT
色度 [度]	12	100	12	NT
濁度 [度]	4	24	2.7	NT
浮遊物質量 [mg/L]	5.6	44	6	NT

1); NT, not tested

2) 環境試料の保管方法

所定量の利用微生物($10^7 \sim 10^8$ cells/ml程度)を環境試料中に添加・混合し、25ml容のバイアル瓶内に密栓保管した。なお、保管は10、20、30の3条件で行った。

3) 利用微生物の生菌数測定方法

保管試料を滅菌水で段階希釈($\times 10$)し、希釈液を特定の培地(下表参照)に接種し、30で3日間静置培養した(3連制)。そして、培養液からDNA抽出を行い、利用微生物に特異的なデハロゲナーゼ遺伝子(*prdA*)由来のプライマーである、ORF0208-534F(5'-AAGGAGGAGAAGCGAAGCG-3')およびORF0208-832R(5'-TCTGCCTCAATATGCGAAGG-3')を用いてPCR増幅を行った。その後、PCR増幅断片の有無を指標にした最確数法(MPN法)により環境試料中の生菌数を算出した。

利用微生物の生残性試験に用いた培地組成

試薬	量(1L分)
ピロリン酸ナトリウム	2.2g
NaHCO ₃	3.5g
NH ₄ Cl	0.4g
KH ₂ PO ₄	0.5g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.3g
NaCl	0.4g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.01g
Yeast Extract	1g
Sodium Acetate	0.41g
SL-10 Trace Elements Solution	1ml
Wolfes Vitamin Solution	5ml

SL-10 Trace Elements Solution

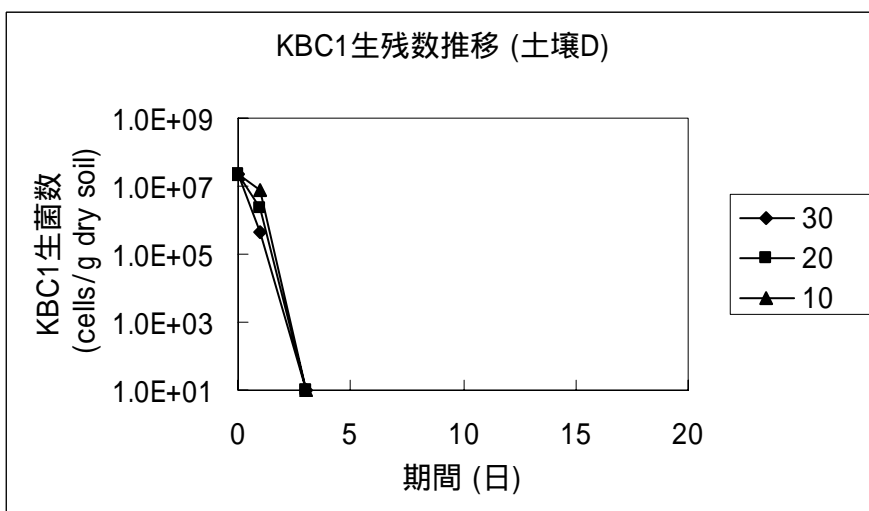
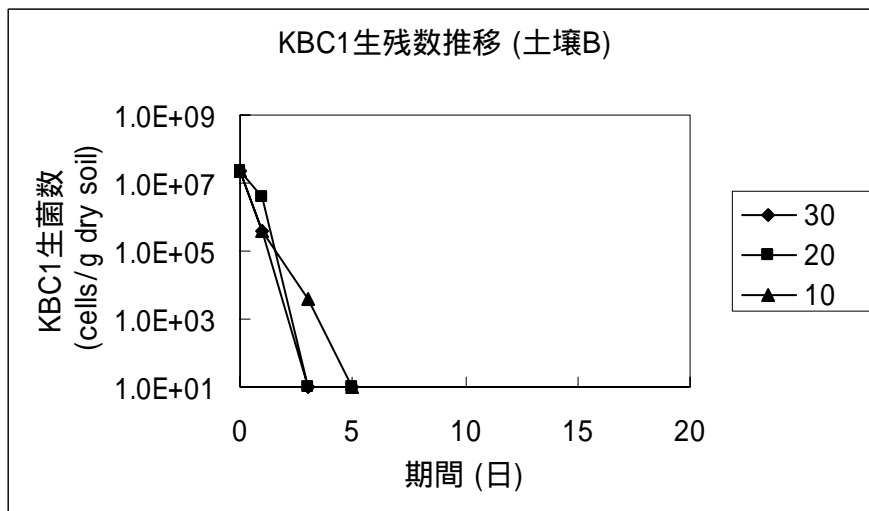
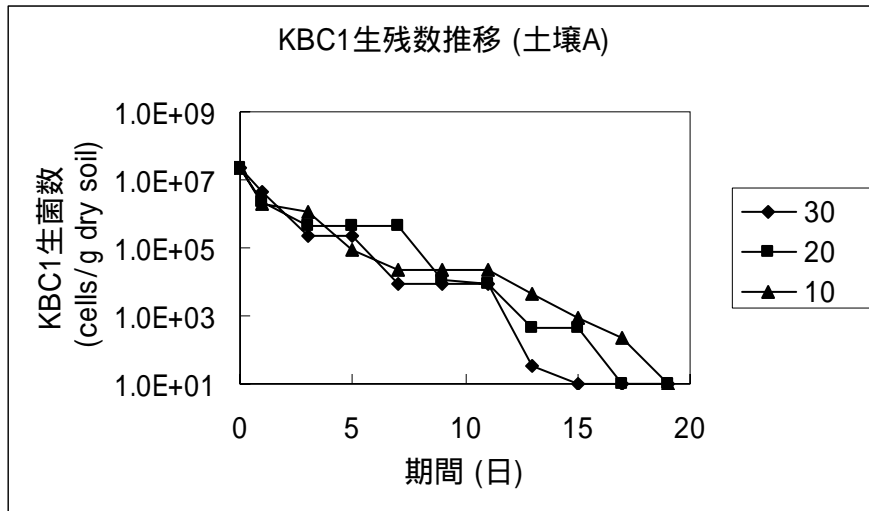
HCl(25%)	10ml
FeCl ₂ ·4H ₂ O	1.5g
ZnCl ₂	70mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	100mg
H ₃ BO ₃	6mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	190mg
CuCl ₂ ·2H ₂ O	2mg
NiCl ₂ ·6H ₂ O	24mg
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	36mg
D.W.	990ml

Wolfes Vitamin Solution

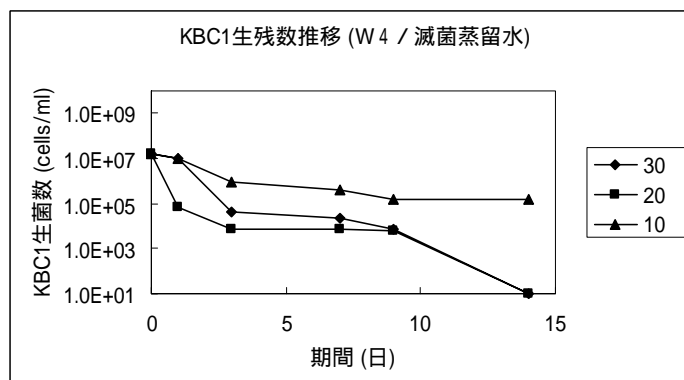
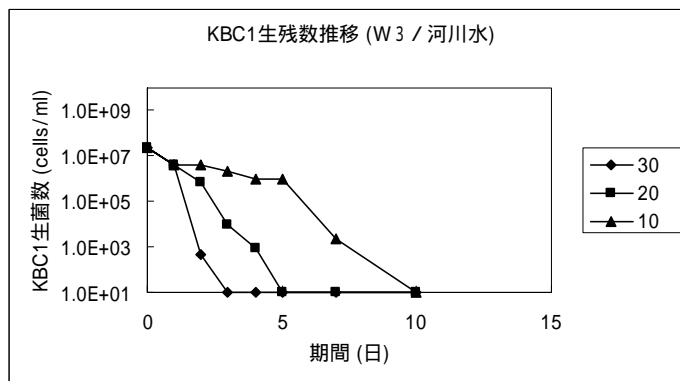
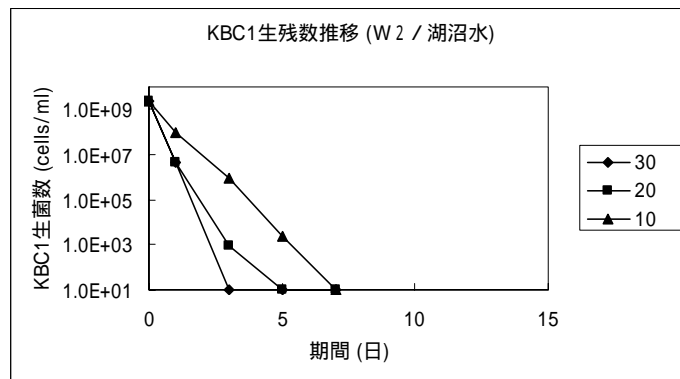
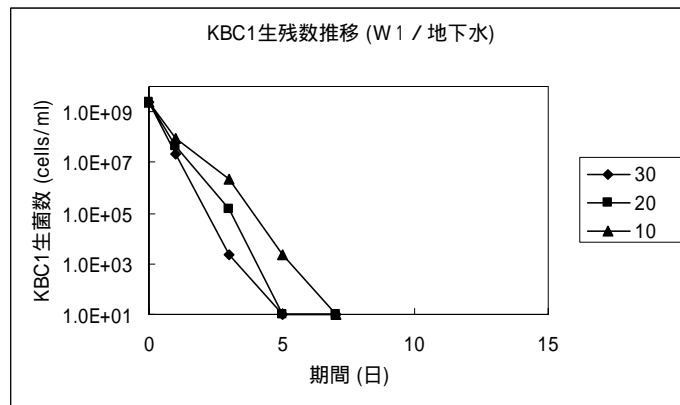
Biotin	2mg
Folic acid	2mg
Pyridoxine hydrochloride	10mg
Thiamine-HCl	5mg
Riboflavin	5mg
Nicotinic acid	5mg
Calcium D-(+)-pantothenate	5mg
Vitamin B12	0.1mg
p-Aminobenzoic acid	5mg
Thioctic acid	5mg
D.W.	1L

3. 結果

1) 利用微生物の土壌試料中での生残性試験結果



2) 利用微生物の水系試料中での生残性試験結果



4. 結果および考察

利用微生物の環境試料中での生残性を調査したところ、いずれの土壌および水中においても速やかに減少することが明らかになった。得られた結果から、各条件における50%減期を算出したところ、いずれも4日以内であった(下表参照)。

以上のことから、仮に利用微生物が環境中に流出したとしても、栄養物質の無い条件では環境中において長期間残留することはなく、速やかに減少するものと考えられた。また、この結果から周辺地域への拡散の可能性も極めて低いものと考えられた。

土壌中での50%減期(日数)

試料	30	20	10
土壌A	0.4	2.0	1.7
土壌B	0.3	0.7	0.5
土壌D	0.5	0.7	0.7

土壌中での99%減期(日数)

試料	30	20	10
土壌A	4.4	5.0	5.4
土壌B	1.0	1.3	1.3
土壌D	1.0	1.1	1.2

水系での50%減期(日数)

試料	30	20	10
W1 / 地下水	0.1	0.5	1.0
W2 / 湖沼水	0.3	0.2	0.8
W3 / 河川水	0.3	0.4	1.4
W4 / 滅菌蒸留水	0.9	1.7	3.6

水系での99%減期(日数)

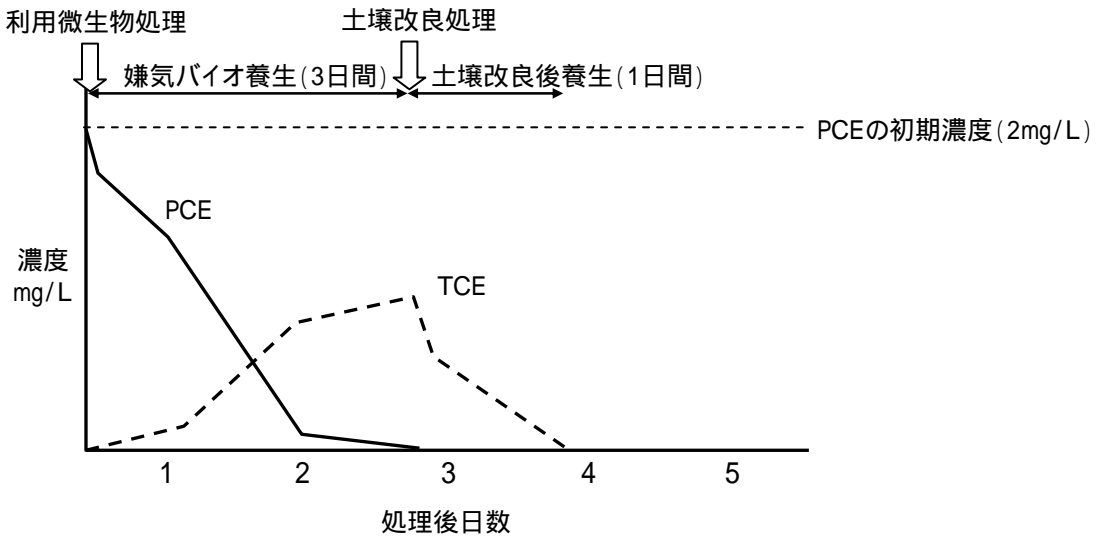
試料	30	20	10
W1 / 地下水	0.9	1.3	1.8
W2 / 湖沼水	0.6	0.6	1.7
W3 / 河川水	1.0	1.6	4.3
W4 / 滅菌蒸留水	2.0	4.0	10

浄化効果のマスバランス評価（典型的な浄化パターンからの推定）

本浄化事業の典型的な浄化パターンに基づいた塩素化エチレンのマスバランス(推定結果)を下記する。なお、浄化パターンはこれまでの複数の浄化実績から類推して模擬的に作成したものである。

典型的な浄化パターン

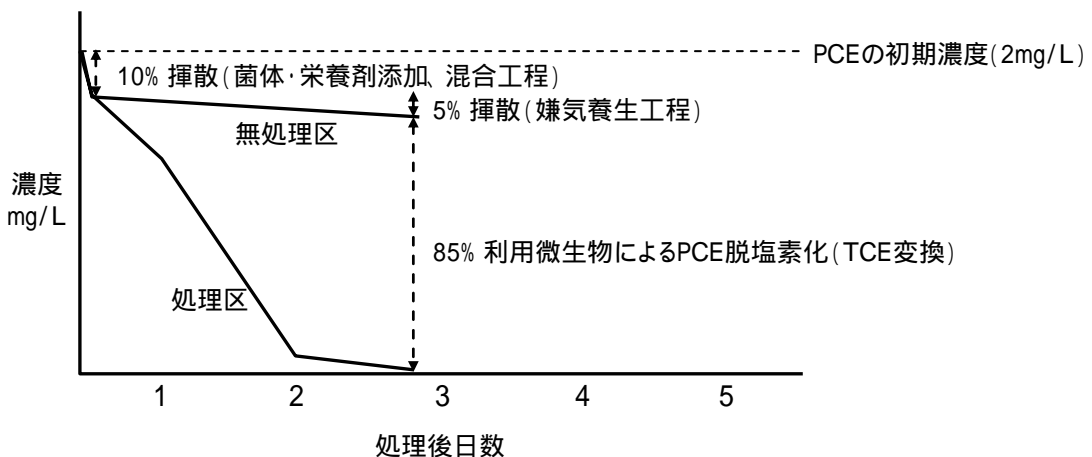
PCE 汚染土壌（溶出濃度 2mg/l を想定）に利用微生物および栄養物質を添加混合し、3 日間嫌気養生することで、PCE を TCE に変換する（PCE は環境基準値以下）。その後、土壌改良材を添加混合し、1 日間好気条件で養生することで TCE を環境基準値以下にまで低減する（下図）



上記浄化パターンを基に、各工程に細分化して塩素化エチレンのマスバランスを検討する。

PCE のマスバランス

初期に汚染土壌中に含有されている PCE は、まずは菌体・栄養物質混合工程においておよそ 10%程度が揮散効果により除去される。次いで、嫌気バイオ(嫌気養生)の 3 日間におよそ 5%相当の PCE がガス化揮散(無処理区比較)するとともに、利用微生物による脱塩素化反応が起こり、残りの 85%の PCE は環境基準値以下のレベルにまで低減する。(下図・下表参照) 従って、PCE の浄化効果は 85%が利用微生物の脱塩素化によるもので、他の 15%は揮散効果によるものであると考えられる。



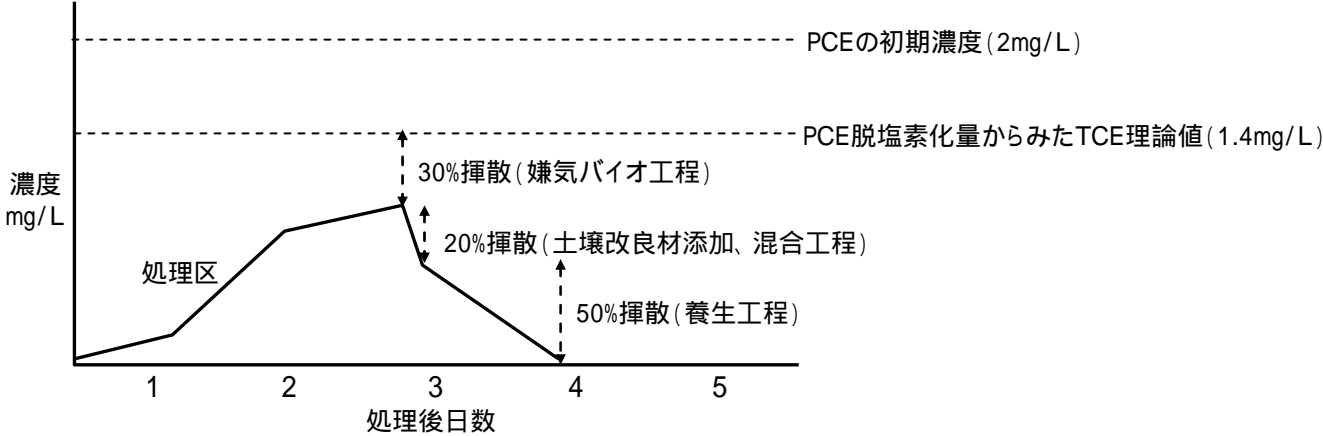
PCE のマスバランス

工程	要因	PCE 浄化効果比率
菌体・栄養物質添加、混合	土壌解砕・混合	- 10% (揮散)
嫌気養生処理 (3 日間)	養生	- 5% (揮散)
利用微生物による分解	脱塩素化	- 85% (分解)

TCE のマスバランス

嫌気バイオ工程で変換・生成された TCE のマスバランスを下図および下表に示す。前述したように、処理 3 日後における利用微生物の PCE 脱塩素化効果は概ね 85% と想定された。このことから、理論的にはおよそ 1.4mg/l 程度の TCE の生成が見込まれるが、実際にはこの段階で理論値に比べ - 30% 程度の TCE しか残留していない。つまり、嫌気バイオ工程において変換された TCE は、すでに嫌気養生期間中に揮散し始めていることになる。その後、土壌改良材の添加・混合工程において、さらに 20% の TCE が揮散効果により除去され、残った 50% 相当の TCE は最終的に好気養生期間中に揮散により環境基準値以下にまで低減する。

総合的に見れば、生成された TCE はすべて揮散効果によって除去されることになる。



TCE のマスバランス

工程	要因	TCE 浄化効果比率
嫌気養生処理 (3日間)	養生	- 30% (揮散)
土壌改良材添加、混合	土壌解砕・混合	- 20% (揮散)
土壌改良後の養生処理 (1日間)	養生	- 50% (揮散)

当該浄化技術による重金属溶出への影響評価（実験データ）

前述した浄化データ（添付資料 6 のケース 4 および 5）において、当該処理技術の適用により土壤中に含まれる重金属（砒素、鉛）の溶出を極微量ながら助長する傾向が認められた。ここでは、重金属と当該対象物質との複合汚染を想定して、鉛を含有する土壌を用いて試験的に処理技術を適用して影響を精査した。

1) 使用土壌

試験には、およそ 20mg/kg 程度の鉛及びその化合物を含有する土壌を用いた（塩素化エチレンは非汚染）。

2) 処理方法

利用微生物添加、栄養剤添加、嫌気養生、土壌改良材添加、好気養生、および試験期間などは、すべて通常の浄化方法に準拠した。（添付資料 6 の方法項を参照）

なお、本試験では「嫌気バイオ + 砂処理（20%w/w）」、「嫌気バイオ + パーライト処理（15%w/w）」、および「嫌気バイオ + 生石灰処理（5%w/w）」の 3 工法すべてについて検討を行った。

3) 結果

処理前土壌および処理後土壌（処理 10 日目）を対象とした重金属の分析結果を下表に示す。

含有量分析結果

項目	含有量分析結果 (mg/kg)				
	基準値*	処理前土壌	処理後土壌 (砂添加)	処理後土壌 (パーライト添加)	処理後土壌 (生石灰添加)
カドミウム	150	<15	<15	<15	<15
六価クロム	250	<25	<25	<25	<25
シアン	遊離シアンとして 50	<5.0	<5.0	<5.0	<5.0
水銀	15	<1.5	<1.5	<1.5	<1.5
セレン	150	<15	<15	<15	<15
鉛	150	24	18	20	21
砒素	150	<15	<15	<15	<15
ふっ素	4000	<100	<100	<100	<100
ほう素	4000	<100	<100	<100	<100

* 平成 15 年環境省告示第 18 号（土壌汚染対策法）

溶出量分析結果

項目	溶出分析結果 (mg/L)				
	基準値*	処理前土壌	処理後土壌 (砂添加)	処理後土壌 (パーライト添加)	処理後土壌 (生石灰添加)
カドミウム	0.01	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
六価クロム	0.05	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
シアン	検出されないこと	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
水銀	0.0005	<0.00005	0.00007	0.00006	0.00019
アルキル水銀	検出されないこと	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005
セレン	0.01	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
鉛	0.01	<0.001	0.035	0.019	<0.001
砒素	0.01	<0.001	0.005	0.005	<0.001
ふっ素	0.8	1.1	1.0	1.1	0.1
ほう素	1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1

* 平成 15 年環境省告示第 18 号（土壌汚染対策法）

含有量分析結果では、処理前土壌における鉛及びその化合物が 24mg/kg 検出されたのに対し、処理後土壌は 18 ~ 21mg/kg の鉛及びその化合物が検出された。

一方、溶出量分析結果では、処理前土壌に検出された物質はふっ素 1.1mg/L のみであったのに対し、処理後土壌では水銀及びその化合物 0.00006 ~ 0.00019mg/L、鉛及びその化合物 0.019 ~ 0.035mg/L、砒素及びその化合物 0.005mg/L、ふっ素及びその化合物 0.1 ~ 1.1mg/L が検出された。

4) 考察

含有量分析結果については、処理後土壌で 18～21mg/kg の鉛及びその化合物が認められたが、土壌改良材添加による重量的な希釈効果を考慮すると、極めて妥当な値であると考えられる。

一方、溶出量については処理前土壌の分析結果で認められていなかった重金属（水銀、鉛、砒素）の溶出が処理後土壌に微量認められており、これらの重金属は当該処理技術の適用により明らかに溶出促進されたものと考えられる。とりわけ、元々の含有量が比較的多い鉛については、砂添加加工法およびパーライト添加加工法の適用によって土壌汚染対策法における基準値レベル以上の溶出量が検出された。この原因としては、栄養物質（有機酸等）によるキレート作用、土壌 pH の変化もしくは嫌気条件と好気条件が切替わることによる鉛化合物の存在形態が変化したことによる溶出促進であると推測される（下表参照）。ただし、処理後土壌が pH11 以上のアルカリ性を示す生石灰添加加工法については、鉛および砒素等の溶出量の促進作用は認められず、重金属の溶出促進はないものと考えられた。

鉛化合物の溶出量比較

鉛化合物		溶出量（水 100g/25 ）
塩化鉛	PbCl ₂	1080mg
硫酸鉛	PbSO ₄	45mg
酸化鉛	PbO	10.7mg
炭酸鉛	PbCO ₃	0.25mg
水酸化鉛	Pb(OH) ₂	0.11mg
硫化鉛	PbS	0.009mg

<http://www.ne.jp/asahi/ssd/calcium/newindex.html>より引用

以上の結果より、重金属との複合汚染サイトにおける本浄化事業の実施に当たっては、土壌中の重金属の溶出量促進に十分に配慮する必要があると考えられる。具体的な対応策としては、事前の適用評価試験で重金属分析を行い、問題のない工法を選択・適用し、問題のある場合（サイト）については本技術の適用を回避することとする。

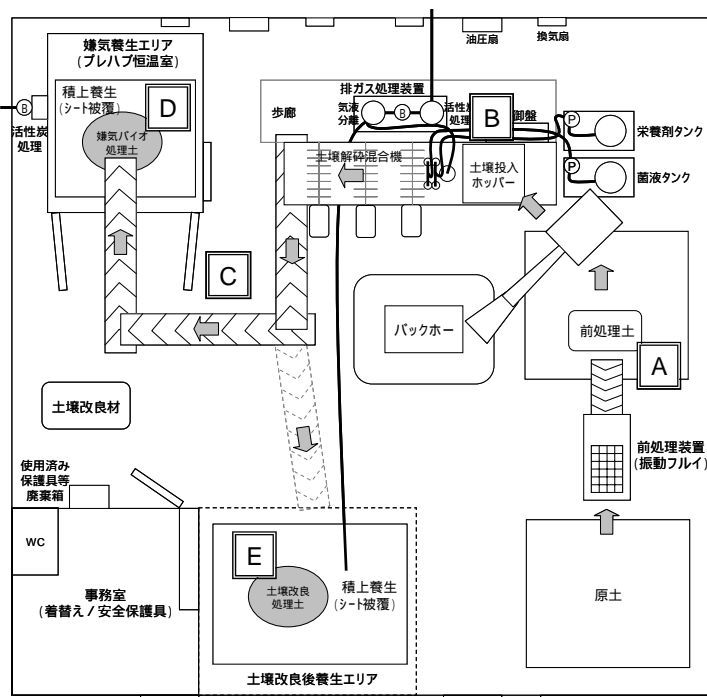
作業環境測定結果（実験データ）

浄化作業従事者の安全性確保と大気汚染防止を主な目的として、現場を模擬した小規模プラント実験において塩素化エチレンの揮散ガス濃度測定を行った。

1) 方法

小規模実験プラント（下図）において、所定の処理フローに則って一連の浄化作業を行った。この過程で、作業中に発生する塩素化エチレン類（テトラクロロエチレン、トリクロロエチレン、cis-1,2-ジクロロエチレン、塩化ビニルモノマー）のガス濃度を、労働安全衛生法で定める作業環境測定方法に準拠して測定した。測定は、揮散濃度が最も高いと考えられる嫌気バイオ処理作業時および土壌改良処理作業時に各々5点ずつ行った。

株式会社クボタ バイオセンターの
実験棟（20×20×H7.5m）内にて実施
測定はA～Eの5点で実施



2) 使用土壌

砂混じり粘性土（2m³）を使用。土壌汚染濃度は以下の通り。

- ・土壌汚染濃度（嫌気バイオ処理前） / PCE 1.0mg/L、TCE 0.01mg/L
- ・土壌汚染濃度（土壌改良処理前） / PCE 0.01mg/L、TCE 0.2mg/L、cis-DCE 0.2mg/L

3) 結果

測定結果を下表に示す。

すべての物質が検出下限以下を示した。

測定点	嫌気バイオ処理作業時 (ppm)				土壌改良処理作業時 (ppm)			
	PCE	TCE	cis-DCE	VC	PCE	TCE	cis-DCE	VC
A	<1.0	<0.5	<1.0	<0.1	<1.0	<0.5	<1.0	<0.1
B	<1.0	<0.5	<1.0	<0.1	<1.0	<0.5	<1.0	<0.1
C	<1.0	<0.5	<1.0	<0.1	<1.0	<0.5	<1.0	<0.1
D	<1.0	<0.5	<1.0	<0.1	<1.0	<0.5	<1.0	<0.1
E	<1.0	<0.5	<1.0	<0.1	<1.0	<0.5	<1.0	<0.1

4) 考察

労働安全衛生法で規定される上記化学物質の作業環境評価基準(管理濃度)は、テトラクロロエチレン 50ppm、トリクロロエチレン 50ppm、ジクロロエチレン 150ppm、塩化ビニルモノマー2ppm であるが、今回の測定結果では全て検出下限以下であった。このことから、作業従事者への暴露および大気汚染の可能性は低いものと考えられた。ただし、現場によってはさらに高濃度の汚染土壌を処理するケースもあることから、浄化事業計画にも記載した通り、安全保護具の装着等を徹底すると共に活性炭等による排ガス対策を実施することとする。