

# UCH007株を用いるVOCs汚染地下水の浄化技術

塩素化エチレン類で汚染された地下水のバイオオーグメンテーションによる浄化実証

伊藤 雅子\*<sup>1</sup>・高畑 陽\*<sup>1</sup>・内野 佳仁\*<sup>2</sup>

Keywords : chlorinated ethylenes, trichloroethylene, bioaugmentation, *Dehalococcoides mccartyi* strain UCH007

塩素化エチレン類, トリクロロエチレン, バイオオーグメンテーション, *Dehalococcoides mccartyi* UCH007株

## 1. はじめに

揮発性有機化合物 (VOCs: Volatile Organic Compounds) は土壌環境基準および地下水の水質汚濁に係る環境基準が定められており, そのうちテトラクロロエチレン (以下, PCE) やトリクロロエチレン (以下, TCE) などの塩素化エチレン類は, 安価で汎用性が高い有機溶媒として様々な産業で使用されてきた。しかし, 発がん性などの有害性が明らかとなり<sup>1)</sup>, PCE や TCE だけでなく, その分解生成物である 1,1-ジクロロエチレンや 1,2-ジクロロエチレン (以下, 1,2-DCE), クロロエチレン (以下, VC) も規制物質となっている (1,2-DCE は, シス-1,2-ジクロロエチレン (以下, *cis*-1,2-DCE) とトランス-1,2-ジクロロエチレンの合算として規制値が設けられている)。

塩素化エチレン類は水より比重が重いため, 土壌に漏洩すると地下深部に到達しやすく, 地下水に溶解して汚染が広域に拡散するケースが多い<sup>2)</sup>。塩素化エチレン類で汚染された地下水を浄化するために, 化学分解, 熱処理, エアスパーキングなどの原位置浄化技術が開発されてきたが, 土壌汚染対策法が施行された2003年以降, 浄化対策件数の増加と共に比較的成本が安い嫌気性細菌を利用する微生物浄化技術 (バイオレメディエーション) が広く普及している。

バイオレメディエーションの中では, 有機物を含む微生物活性材 (以下, 有機資材) を供給し, 地盤中に元来存在する有用な嫌気性細菌 (脱塩素細菌) を活性化させて浄化を行うバイオスティミュレーションが多く用いられている。この方法では PCE や TCE は様々な脱塩素細菌が関与して比較的容易に *cis*-1,2-DCE まで還

元脱塩素化が進行するが, *cis*-1,2-DCE から無害のエチレンまでの脱塩素化を行うことが報告されているのは *Dehalococcoides* 属細菌<sup>3)</sup>だけである (図-1)。そのため, この細菌が非常に少ない, もしくは存在しない汚染サイトでは, TCE の分解生成物である *cis*-1,2-DCE や VC が蓄積して浄化期間が長期化する課題があった<sup>4)</sup>。

このような課題を解決するため, 浄化を促進するために培養した有用菌を汚染地盤に導入する浄化技術 (バイオオーグメンテーション) が着目されている。*Dehalococcoides* 属細菌を用いるバイオオーグメンテーションは, 集積培養液 (複数の細菌が混在) を用いる方法が既に実用化されているが<sup>5)</sup>, 単離菌を利用したバイオオーグメンテーションの事例は存在しなかった。

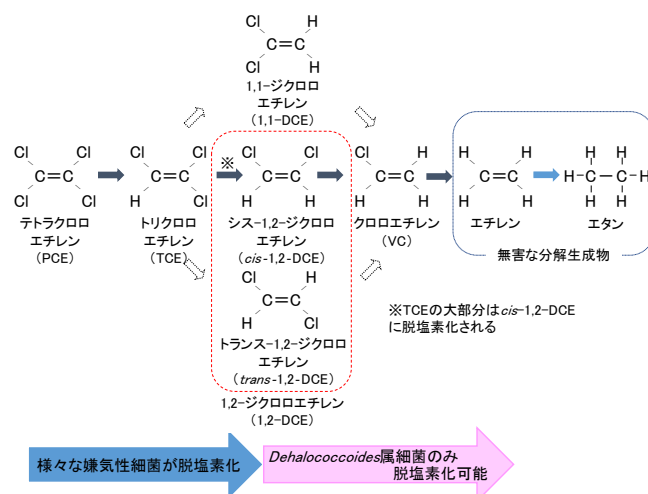


図-1 塩素化エチレン類の生物学的な還元脱塩素化経路  
Fig.1 Pathway for biological reductive dichlorination of chlorinated ethylenes

\*1 技術センター 社会基盤技術研究部 環境研究室

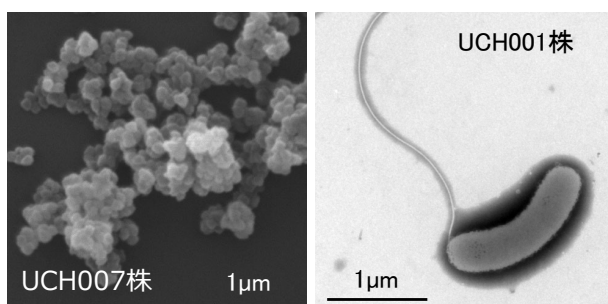
\*2 (独) 製品評価技術基盤機構

単離株を用いることにより、大量培養の管理が容易になり、浄化に用いる培養液の調達コストを抑えることが期待できる。

筆者らは、塩素化エチレン類を無害のエチレンまで還元脱塩素化できる *Dehalococcoides* 属細菌<sup>6)</sup>を国内で初めて分離し、本細菌を用いるバイオオーグメンテーションの実用化に向けて様々な検討を行っている<sup>7)8)</sup>。本稿では、絶対嫌気性細菌である UCH007 株の培養液を汚染地盤に導入する最適な条件を室内試験で検討すると共に、実汚染地盤に培養液を導入するバイオオーグメンテーションの実証試験を行い、従来技術であるバイオスティミュレーションと浄化効果を比較した。

## 2. *Dehalococcoides mccartyi* UCH007 株

*Dehalococcoides mccartyi* UCH007 株 (以下、UCH007 株) (写真-1(a)) は、アガーシェイク法<sup>9)</sup>により国内で初めて単離された *Dehalococcoides* 属細菌である。UCH007 株は TCE, *cis*-1,2-DCE, VC を還元脱塩素化することが可能であるが、UCH007 株を単独で培養した場合は、脱塩素化速度が非常に緩慢となり、培養 3 週



(a)UCH007 株 (b)UCH001 株

写真-1 UCH007 株と UCH001 株の電子顕微鏡写真

Photo. 1 Electron micrographs of strains UCH007 and UCH001

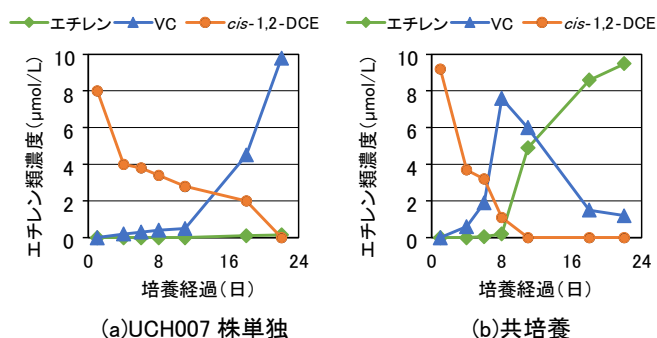


図-2 UCH007 株の培養時における塩素化エチレン類の脱塩素化状況

Fig. 2 Dechlorination of chlorinated ethylenes during cultivation of strain UCH007

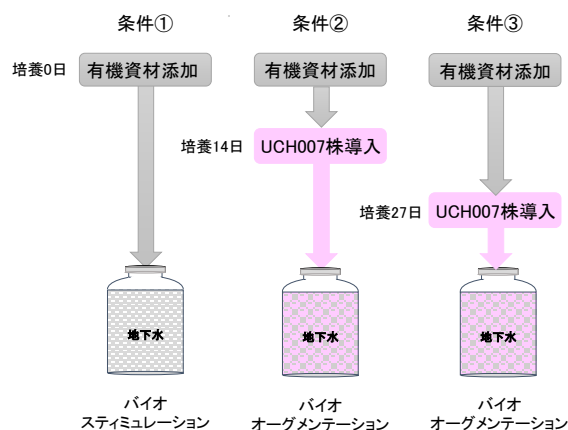


図-3 バッチ試験の培養条件

Fig. 3 Culture conditions for the batch test

後もエチレンは生じていない (図-2(a))。一方、嫌気性細菌である *Sulfurospirillum* sp. UCH001 株<sup>9)</sup> (以下、UCH001 株) (写真-1(b)) と UCH007 株を共培養した場合は、脱塩素化活性が促進されて培養 3 週間後には塩素化エチレン類の殆どがエチレンとなり (図-2(b))、UCH007 株の増殖も促進されることが明らかとなっている。そこで、本報における室内試験及び実証試験では、UCH007 株と UCH001 株と一緒に培養した共培養液を用いた。

## 3. UCH007 株導入の環境条件の検討

### 3.1 目的

UCH007 株は絶対嫌気性細菌であるため、UCH007 株を実汚染地下水に導入して浄化を行う際は、事前に導入先の地下水を嫌気環境に保つ必要がある。そこで、汚染地下水に有機資材を供給後、UCH007 株の導入に適したタイミングとなる地下水の還元状態を把握するため、室内培養試験を実施した。

### 3.2 試験方法

#### 3.2.1 試料の調製

本試験は、全量 72 ml のガラスバイアル瓶を用いるバッチ試験により実施した。ガラスバイアル瓶に実汚染地下水 30 ml を入れ、乳酸ナトリウムを含む有機資材と TCE 溶液をそれぞれ終濃度で 200 mgC/L, 2.0 mg/L 添加してバイアル瓶を密栓した。有機資材の添加により、地下水に存在する様々な細菌によって有機物が利用され、バイアル瓶中の還元状態が進行する。本試験では有機資材を添加後に、UCH007 株の培養液を供給しない条件を①、培養 14 日目に UCH007 株の培養液を供給した条件を②、培養 27 日目に UCH007 株の培養液を

供給した条件を③として試験を行った(図-3)。UCH007株の培養液(培養液中のUCH007株菌数:約 $1.0 \times 10^7$  cells/ml)は、条件②、条件③ともに各0.5 ml供給した。バイアル瓶は条件毎に複数本作製して20°Cの恒温で静置培養した。

### 3.2.2 分析方法

条件①、②、③の各バイアル瓶を1本ずつ定期的に回収して分析に供した。TCEとその分解生成物であるcis-1,2-DCEおよびVCは、ページ&トラップGCMS分析装置(GCMS-QP2010 Ultra:島津製作所)で測定した。有機資材の残存量の指標となる全有機炭素濃度(TOC)は全有機炭素計(TOC-L:島津製作所)で測定した。還元環境形成の指標となる硝酸性窒素(NO<sub>3</sub>-N)濃度と硫酸イオン(SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)濃度は高速液体クロマトグラフィー(Alliance 2695XC Separations Module:日本ウォーターズ)で測定し、ポータブル水質計(D-75:堀場製作所)で酸化還元電位(ORP)を測定した。また、全てのDehalococcoides属細菌を検出できるDehalococcoides属細菌の16S rRNA遺伝子領域(Dhc16S rRNA)をターゲットとしたプライマーセット<sup>10)</sup>と、Dehalococcoides属細菌の中でもUCH007株を特異的に検出できる23S-5S rRNA領域(UCH007)をターゲットとしたプライマーセット<sup>7)</sup>を用いて、地下水中の遺伝子コピー数(以下、遺伝子数)をリアルタイムPCR(Quant Studio 6 Flex:ライフテクノロジーズ)を用いて定量した。

### 3.3 試験結果

#### 3.3.1 地下水水質の経時変化

試験開始時、UCH007株を導入した培養14日目、培養27日目の地下水の水質分析結果を表-1に示す。有機資材の添加により199 mg/Lに上昇したTOC濃度は、培養14日目には23.9 mg/Lまで低下した。有機物分解に伴い地下水のORPは-280 mVまで低下したが、この時点では硫酸イオンは50 mg/L前後の高濃度で残存していた。さらに培養を継続した培養27日目には、酸化還元電位は-313 mVまで低下し、硫酸イオン濃度も1.8 mg/Lまで低下した。

#### 3.3.2 塩素化エチレン類濃度の経時変化

培養開始時の塩素化エチレン類は、ほぼ全量がTCEであったが、培養14日目には、その殆どが分解生成物であるcis-1,2-DCEとして検出された。各培養液の塩素化エチレン類のモル濃度の経時変化を図-4に示す。有機資材のみ添加した条件①は、TCEの脱塩素化は生じたが、cis-1,2-DCE以降の脱塩素化は生じなかった。嫌気培養開始から14日目にUCH007株を導入した条件②

では、培養27日目にVCが検出されたが、cis-1,2-DCEも培養53日目まで検出された。嫌気培養開始から27日目にUCH007株を導入した条件③では、培養39日目にcis-1,2-DCEが非検出になり、その後のVCの脱塩素化が速やかに進行した。UCH007株を導入してからのcis-1,2-DCEとVCの合計濃度の脱塩素化速度は、条件③では条件②よりも約1.6倍速い結果となった。

#### 3.3.3 Dehalococcoides属細菌遺伝子数の経時変化

試験に用いた地下水からDehalococcoides属細菌の16SrRNA遺伝子(以下、Dehalococcoides属細菌遺伝子)が $8.8 \times 10^4$  copies/ml検出され、一定数のDehalococcoides

表-1 培養した地下水の水質変化  
Table 1 Water qualities in cultured groundwater

| 測定項目                          | 単位   | 地下水採取時 | 条件①培養開始時 | 条件②*培養14日目 | 条件③*培養27日目 |
|-------------------------------|------|--------|----------|------------|------------|
| TCE                           | mg/L | 0.015  | 1.910    | 0.002      | 0.006      |
| cis-1,2-DCE                   | mg/L | 0.016  | 0.014    | 0.952      | 0.899      |
| VC                            | mg/L | 0.013  | 0.007    | 0.004      | 0.003      |
| TOC                           | mg/L | 8.0    | 199      | 23.9       | 12.5       |
| ORP                           | mV   | -18    | 117      | -280       | -313       |
| NO <sub>3</sub> -N            | mg/L | <0.1   | 16       | 0.4        | <0.1       |
| SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> | mg/L | 57     | 56       | 46         | 1.8        |

\*培養液を導入する直前の地下水について測定

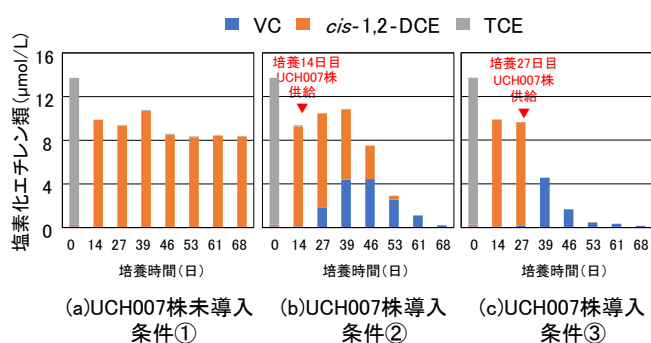


図-4 地下水中の塩素化エチレン類濃度の経時変化

Fig.4 Concentrations of chlorinated ethylenes in groundwater

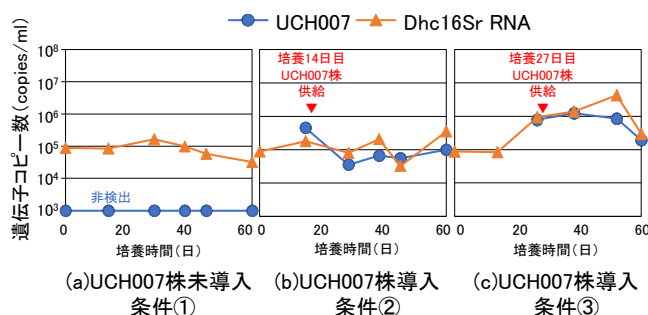


図-5 UCH007株およびDehalococcoides属細菌の遺伝子数の経時変化

Fig.5 Numbers of genes in strain UCH007 and Dehalococcoides spp.

属細菌が存在していることを試験開始時に確認した(図-5)。培養14日目にUCH007株の培養液を供給した条件②では、培養液を供給して14日後(培養27日目)にUCH007株遺伝子数が低下する現象が確認された。一方、培養27日目にUCH007株の培養液を供給した条件③では、UCH007株遺伝子数が減少せず、導入から約1ヶ月間は菌数が維持された。塩素化エチレン類の濃度低下もUCH007株を後から導入した条件③の方が早かったことから、UCH007株の導入に適した還元状態は条件③であると考えられた。

本試験の結果から、UCH007株を導入する際の還元状態の指標として地下水中の硫酸イオン濃度を確認しておくことが重要であり、硫酸イオン濃度が低下する還元状態になったことを確認してからUCH007株を導入することで、導入菌の脱塩素化活性を維持でき浄化が促進できることが示された。

#### 4. 実サイトでのUCH007株導入効果の検証

##### 4.1 目的

これまでに、*Dehalococcoides*属細菌の単離株を塩素化エチレン類で汚染されている実汚染サイトに導入してバイオオーグメンテーション効果を確認した事例はなかった。そこで、UCH007株の大量培養を行い、培養液を実際に汚染帯水層に供給して浄化効果を確認することを目的とした。

また、大量培養に用いた容器をそのまま現場に送付し、簡易な方法で培養液を浄化対象とする地下水に供給する方法について検証を行った。

##### 4.2 試験方法

###### 4.2.1 実証試験サイトの概要

実証試験サイトは、塩素化エチレン類で汚染されたエリアを鋼矢板で仕切り、区画-1(UCH007株導入区)とUCH007株を導入しない区画-2(対照区)を設けた(図-6)。各区画内に4本の観測井戸と有機資材や培養液を供給するための5本の打ち込み式注入管<sup>1)</sup>を配置した。それぞれのスクリーンやスリットは、浄化対象となる概ねGL-4m~-6mのシルト混じり砂礫層に位置するように調整した。

###### 4.2.2 実証試験のフロー

実証試験のフローを図-7に示す。試験サイトに鋼矢板、観測井戸、注入管を設置後、区画-1および区画-2の注入管(I1~I10)から有機資材を供給した。有機資材は、乳酸ナトリウムを主成分とする有機資材を注入管1本あたり10L供給した。試験開始から3週間後に

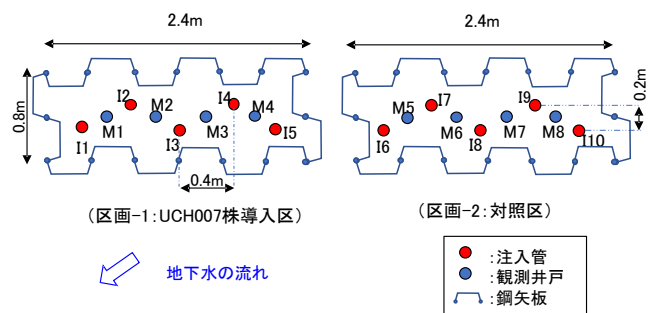


図-6 実証試験サイトの平面図  
Fig.6 Plan view of the field test site

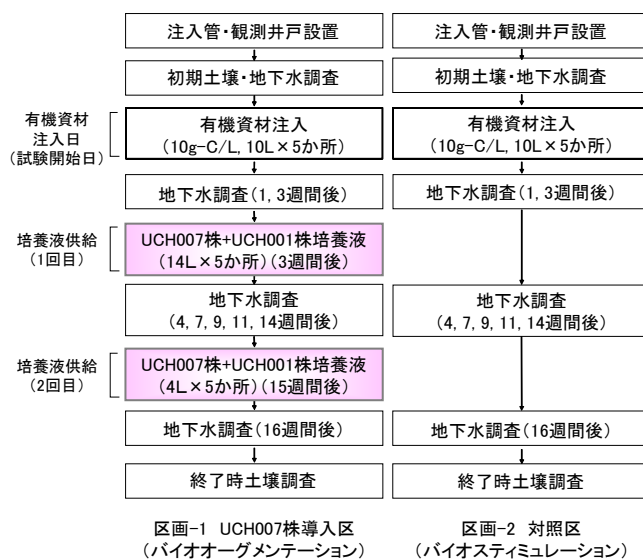


図-7 実証試験のフロー  
Fig.7 Flow of the field test

地下水の酸化還元電位と硫酸イオン濃度の低下が確認されたため、区画-1にUCH007株とUCH001株の共培養液を供給した。共培養液の供給は試験終了間際の試験開始15週目にも実施した。

実証試験前後に各試験区の土壌調査を行い、地下水は定期的に採取して、分析に供した。

###### 4.2.3 UCH007株の大量培養方法

これまでバイオオーグメンテーションなどで用いる浄化菌は微生物の大量培養に必要な条件を一定に保つことができるファーメンターを用いて培養し、培養後に密閉容器に入れ替えて輸送する方法が用いられていた。しかしながら、UCH007株は絶対嫌気性細菌であるため培養液を空気に触れさせずに密閉容器に入れ替えて輸送する必要があり、作業の手間とコストが高くなる課題があった。そこで、密閉容器として市販品のケグ(ビア樽)を改造した耐圧容器(約19L)を用い、UCH007株とUCH001株をバッチ方式で共培養した(写

真-2)。培養終了後は、UCH007 株の菌数が平均して  $1 \times 10^7$  cells/ml 以上増加していることを確認し、培地に残存した塩素化エチレン類を窒素パージにより耐圧培養容器から完全に除去した。耐圧培養容器はそのまま梱包し、汚染サイトに宅配便で送付した。

#### 4.2.4 実汚染サイトへの導入方法

培養液を空気に触れさせずに汚染サイトに供給するため、培養液を供給する前に注入管の上部を蓋で密栓し、PSA 方式の窒素ガス発生装置 (M4NT-0.4 : コフロック) を用いて、注入管内部を窒素ガス (窒素純度を 99.99 % 以上に設定) で 5 分間パージした。その後、耐圧培養容器内に窒素ガスを供給することで耐圧培養容器内の培養液を注入管内に供給した。

#### 4.2.5 土壌の採取および分析方法

試験開始前の土壌調査は各区画の観測井戸設置地点、試験終了後の土壌調査は各観測井戸から 30 cm 離れた地点で実施した。トリクロロエチレン等の塩素化エチレン類は水より比重が重いため、帯水層の底の難透水層の上面に汚染物質が滞留することで土壌汚染が生じ易い。この土壌汚染が存在し続けると、長期的に地下水汚染が引き起こされる原因となる。そこで、本調査では、浄化対象とするシルト混じり砂礫層の直下にある粘土層をそれらの境界から 20 cm 下部まで採取し、



写真-2 耐圧培養容器を用いた UCH007 株の大量培養  
Photo.2 Mass cultivation of strain UCH007 using pressure-resistant vessels

5 cm 深度毎の TCE, 1,2-DCE, VC の土壌溶出量を土壌汚染対策法に基づく土壌溶出量調査に係る測定方法 (環境省告示第 18 号) に準じて測定した。

#### 4.2.6 地下水の採取および分析方法

揚水ポンプで観測井戸内をパージ後、テフロン製の採水器を用いて地下水を採取した。地下水の水質分析および塩素化エチレン類は 3.2.2 と同様の方法で実施した。また、塩素化エチレン類の最終生成物であり、浄化完了の指標となる地下水中のエチレンおよびエタン濃度についてはガスクロマトグラフ (GC-2014 : 島津製作所) により測定した。

表-2 実証試験前後の各区画における塩素化エチレン類の土壌溶出量  
Table 2 Soil elution amount of chlorinated ethylenes in each area before and after the field test

| 区画-1 UCH007株導入区 |          |              |         |        |              |         |        | 区画-2 対照区 |          |              |         |        |              |         |        |
|-----------------|----------|--------------|---------|--------|--------------|---------|--------|----------|----------|--------------|---------|--------|--------------|---------|--------|
| 地点              | 深度* (cm) | 試験開始前 (mg/L) |         |        | 試験開始後 (mg/L) |         |        | 地点       | 深度* (cm) | 試験開始前 (mg/L) |         |        | 試験開始後 (mg/L) |         |        |
|                 |          | VC           | 1,2-DCE | TCE    | VC           | 1,2-DCE | TCE    |          |          | VC           | 1,2-DCE | TCE    | VC           | 1,2-DCE | TCE    |
| M1              | 0~5      | <0.0002      | <0.004  | <0.003 | <0.0002      | <0.004  | <0.003 | M5       | 0~5      | <0.0002      | 0.010   | <0.003 | <0.0002      | <0.004  | 0.011  |
|                 | 5~10     | 0.0020       | 0.092   | <0.003 | <0.0002      | <0.004  | <0.003 |          | 5~10     | 0.0003       | 0.033   | <0.003 | 0.0002       | 0.025   | <0.003 |
|                 | 10~15    | 0.0026       | 0.140   | <0.003 | <0.0002      | <0.004  | <0.003 |          | 10~15    | 0.0003       | 0.039   | <0.003 | 0.0006       | 0.043   | <0.003 |
|                 | 15~20    | 0.0034       | 0.140   | <0.003 | 0.0013       | <0.004  | <0.003 |          | 15~20    | 0.0004       | 0.044   | <0.003 | 0.010        | 0.058   | <0.003 |
| M2              | 0~5      | 0.0004       | <0.004  | <0.003 | <0.0002      | <0.004  | <0.003 | M6       | 0~5      | <0.0002      | <0.004  | 0.008  | <0.0002      | <0.004  | <0.003 |
|                 | 5~10     | 0.0010       | 0.007   | <0.003 | <0.0002      | <0.004  | <0.003 |          | 5~10     | <0.0002      | 0.007   | <0.003 | <0.0002      | <0.004  | 0.004  |
|                 | 10~15    | 0.0007       | 0.008   | <0.003 | <0.0002      | <0.004  | 0.006  |          | 10~15    | <0.0002      | 0.007   | <0.003 | 0.0004       | <0.004  | 0.003  |
|                 | 15~20    | 0.0018       | 0.035   | <0.003 | <0.0002      | <0.004  | 0.003  |          | 15~20    | <0.0002      | 0.008   | <0.003 | 0.0003       | <0.004  | <0.003 |
| M3              | 0~5      | 0.0010       | <0.004  | 0.007  | 0.0003       | <0.004  | 0.005  | M7       | 0~5      | 0.0002       | 0.007   | <0.003 | <0.0002      | <0.004  | <0.003 |
|                 | 5~10     | 0.0009       | <0.004  | <0.003 | <0.0002      | <0.004  | <0.003 |          | 5~10     | 0.0002       | 0.014   | <0.003 | 0.0006       | <0.004  | <0.003 |
|                 | 10~15    | 0.0007       | <0.004  | <0.003 | <0.0002      | <0.004  | <0.003 |          | 10~15    | 0.0005       | 0.035   | <0.003 | 0.0034       | <0.004  | <0.003 |
|                 | 15~20    | 0.0017       | 0.015   | <0.003 | 0.0004       | 0.008   | <0.003 |          | 15~20    | 0.0004       | 0.031   | <0.003 | 0.0017       | <0.004  | <0.003 |
| M4              | 0~5      | 0.0005       | <0.004  | <0.003 | 0.0010       | <0.004  | <0.003 | M8       | 0~5      | <0.0002      | 0.009   | <0.003 | <0.0002      | <0.004  | <0.003 |
|                 | 5~10     | 0.0008       | 0.058   | 0.041  | 0.0002       | <0.004  | <0.003 |          | 5~10     | 0.0002       | 0.014   | <0.003 | 0.0004       | 0.016   | <0.003 |
|                 | 10~15    | 0.0011       | 0.180   | 0.110  | <0.0002      | <0.004  | <0.003 |          | 10~15    | 0.0011       | 0.067   | <0.003 | 0.0003       | 0.008   | <0.003 |
|                 | 15~20    | <0.0002      | 0.012   | 0.004  | 0.0002       | <0.004  | <0.003 |          | 15~20    | 0.0016       | 0.064   | <0.003 | 0.0030       | 0.025   | <0.003 |

\*浄化対象とする帯水層とその下部の粘土層の境界からの深度  
赤字 : 土壌溶出量基準値を超過

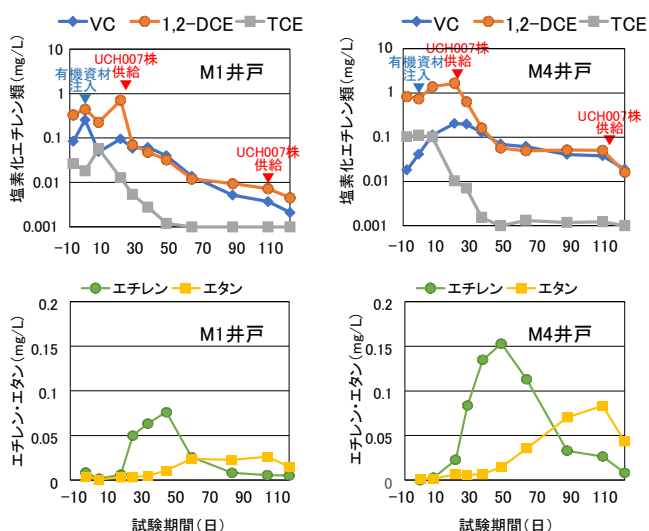


図-8 区画-1 (UCH007株導入区)の塩素化エチレン類と分解生成物の経時変化

Fig.8 Concentrations of chlorinated ethylenes and degradation products in area-1 (bioaugmentation using strain UCH007)

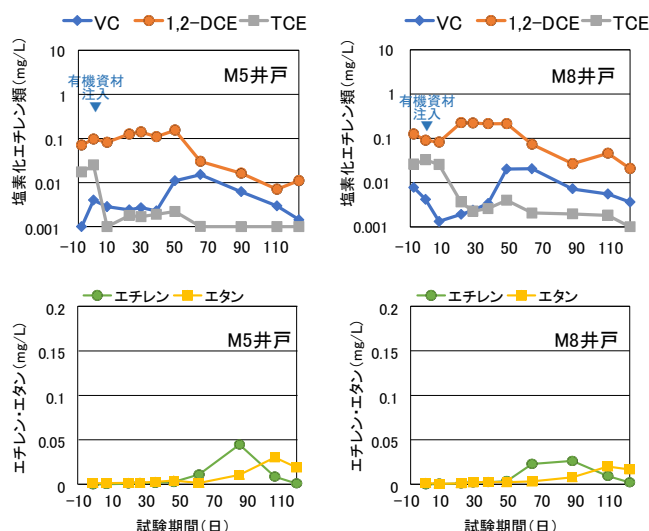


図-9 区画-2 (対照区)の塩素化エチレン類と分解生成物の経時変化

Fig.9 Concentrations of chlorinated ethylenes and degradation products in area-2 (control)

### 4.3 試験結果

#### 4.3.1 注入管からの有機資材および培養液の供給

本試験では約 6 m の打ち込み式注入管をバイブロドリルマシン<sup>11)</sup>を用いて打設した。打設時間は 1 本あたり約 15 分であり、マシンの段取りおよび片付けを含めて作業は半日で完了した。水で希釈した有機資材および UCH007 株の培養液は 4.2.3 で示した耐圧培養容器から窒素ガスを用いて注入管を経由して地盤に供給した。有機資材希釈液および培養液の供給速度は概ね 2 L/分であり、有機資材の供給作業は約 1 時間、UCH007 株の培養液の供給作業 (1 回目) は注入管のページ作業も含めて約 1.5 時間で完了した。

これらの作業の課程で汚染地下水や汚染土壌は排出されず、培養液を地上で漏洩させることなく、簡単かつ安全に全ての培養液を地盤内に供給できることを確認した。

#### 4.3.2 土壌試料の塩素化エチレン類の土壌溶出量

採取した土壌試料について塩素化エチレン類の土壌溶出量を測定した結果を表-2 に示す。試験開始前に採取した土壌のうち区画-1 の M4 土壌から土壌溶出量基準を超過する TCE が検出された。また、区画-1 の M1 土壌、M4 土壌、区画-2 の M5 土壌、M8 土壌から土壌溶出量基準を超過する 1,2-DCE、VC が検出された。

試験終了後に採取した土壌試料のうち 5 試料から 1,2-DCE 又は VC の土壌溶出量基準を超過する試料が確認されたが、いずれも区画-2 から採取した土壌であった。UCH007 株を導入した区画-1 では土壌溶出量基準を

過する試料が確認されなかった理由として、UCH007 株の培養液の供給によりシルト混じり砂礫層における塩素化エチレン類の浄化が進行し、その直下にある粘土層から帯水層への塩素化エチレン類の溶脱が促進したためと推測された。

#### 4.3.3 地下水中の塩素化エチレン類の経時変化

試験開始前の土壌試料から汚染が確認された地点 (区画-1 : M1 地点, M4 地点), (区画-2 : M5 地点, M8 地点) に設置した観測井戸から採取した地下水の塩素化エチレン類および分解生成物の経時変化を図-8 (区画-1), 図-9 (区画-2) に示す。区画-1 の M1 および M4 井戸から採取した地下水からは環境基準値を超過した 1,2-DCE と VC が、区画-2 の M5 および M8 井戸から採取した地下水からは 1,2-DCE が試験開始前に検出されていた。

区画-1 の M1 井戸では、1 回目の培養液供給直後から 1,2-DCE と VC が一定の速度で減少し、それに伴うエチレンとエタンの増加が確認された。一方、TCE による土壌汚染が確認された地点に設置された M4 井戸の地下水は、培養液供給から 2 週間は 1,2-DCE が急激に減少したが、その後 1,2-DCE および VC の減少は緩やかとなった。しかし、分解生成物であるエチレンとエタンが高濃度で検出され続けたことから脱塩素化活性は維持されていると考えられ、M4 地点では地下水中の塩素化エチレン類濃度の低下と帯水層下部の粘土層からの TCE などの塩素化エチレン類の溶脱が同時に進み、そのため地下水中の塩素化エチレン類濃度が平衡状態で

推移したものと推測された。

区画-2 の地下水中の塩素化エチレン類の濃度は、区画-1 と比較して1 オーダー程度低かった。M5 およびM8 井戸を含め区画-2 における地下水中の 1,2-DCE 濃度は、区画-1 と比較すると停滞期間が長く続き、試験開始 7 週間後から減少傾向を示した。この結果から、区画-1 と区画-2 では塩素化エチレン類の初期濃度に違いがあるものの、培養液の供給により 1,2-DCE が減少する時期が明確に早くなることが示された。

#### 4.3.4 地下水中の *Dehalococcoides* 属細菌遺伝子数の経時変化

区画-1, 区画-2 の各観測井戸における地下水中の *Dehalococcoides* 属細菌遺伝子数と UCH007 株遺伝子数の経時変化（各区画の平均値）を図-10 に示す。*Dehalococcoides* 属細菌遺伝子数は、有機資材の注入により区画-1 でより多く増加した。この要因として、区画-1 は地下水中の塩素化エチレン類の濃度が高く、*Dehalococcoides* 属細菌が増えやすい環境であったと推測された。更に区画-1 では培養液の供給により *Dehalococcoides* 属細菌遺伝子数が 2 オーダー増加し、その後は漸減傾向を示した。区画-2 でも有機資材の注入から約 5 週間後に *Dehalococcoides* 属細菌遺伝子数が増え始め、有機資材の注入から約 9 週間後には *Dehalococcoides* 属細菌遺伝子数が定常状態に達して区画-1 と同等の遺伝子数となった。

UCH007 株は、培養液導入前は全ての観測地点で検出されず、区画-2 では *Dehalococcoides* 属細菌遺伝子数が増加した期間も UCH007 株は検出されなかったことから、区画-2 で増加した *Dehalococcoides* 属細菌は UCH007 株とは異なる種の *Dehalococcoides* 属細菌であると推察された。また、区画-1 においては、培養液供給後に *Dehalococcoides* 属細菌遺伝子数の方が UCH007 株遺伝子数より減少速度が緩やかであった。この理由は、区画-1 においては UCH007 株が減少していく一方で、区画-2 と同様に低濃度で存在していた UCH007 株と異なる種の土着の *Dehalococcoides* 属細菌が増えたためと考えられた。これらの結果から、区画-1 においては異なる *Dehalococcoides* 属細菌（土着の *Dehalococcoides* 属細菌と UCH007 株）が、塩素化エチレン類が存在する地盤環境中で競合している可能性はあるが、*Dehalococcoides* に属する細菌群は他の種類の細菌の影響を受けずに地盤内に一定の菌数を維持しており、安定して浄化を行えることが本実証試験より明らかとなった。

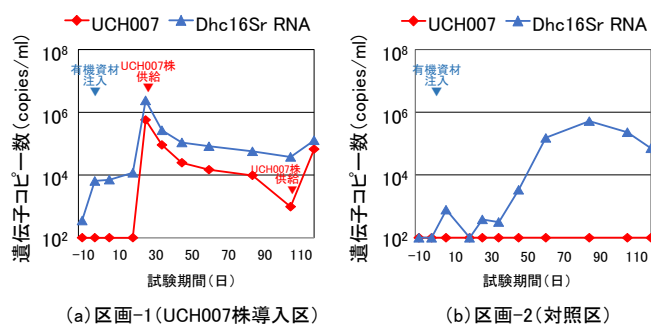


図-10 *Dehalococcoides* 属細菌および UCH007 株遺伝子数の経時変化

Fig.10 Numbers of genes in *Dehalococcoides* spp. and strain UCH007



図-11 *Dehalococcoides* 属細菌を汚染帯水層に導入する浄化手順

Fig.11 Remediation procedure for introducing *Dehalococcoides* sp. into the contaminated aquifer

## 5. おわりに

国内で初めて単離された *Dehalococcoides* 属細菌である UCH007 株を大量培養して、その培養液を塩素化エチレン類で汚染された地下水に供給する実証試験を行った結果、以下の知見を得た。

- 有機資材を注入後に UCH007 株の培養液を汚染地下水に供給する最適なタイミングは、浄化対象とする地下水中の硫酸イオン濃度が低下し、地下水が硫酸還元状態となっていることであることが判明した。
- 耐圧培養容器で大量培養した UCH007 株の培養液を塩素化エチレン類で汚染されたサイトに供給した結果、*Dehalococcoides* 属細菌数は長期的に維持され、1,2-DCE と VC は導入直後から急激に低下し、浄化期間を短縮できることを実証した。また、帯水層の浄化を促進させることが帯水層下部の粘土層における土壌浄化にも寄与することを確認した。
- 打ち込み式注入管や搬送可能な耐圧培養容器を用いる一連の *Dehalococcoides* 属細菌を地盤に導入す

る技術(図-11)によって、有機資材や培養液の供給作業を簡単かつ短時間で実施できることを確認した。

### 謝辞

本報に記載した実証試験は、環境省受託事業「令和元年度低コスト・低負荷型土壌汚染調査対策技術検討調査」で実施したものである。

### 参考文献

- 1) (一社)化学物質評価研究機構：化学物質の有害性評価書，[https://www.cerij.or.jp/evaluation\\_document/hazard\\_assessment\\_report.html](https://www.cerij.or.jp/evaluation_document/hazard_assessment_report.html)，(参照 2023-08-03)。
- 2) 江種伸之：地下水・土壌汚染 6.揮発性有機化合物・油の動態，地下水学会誌，Vol.45, No.2, pp.169-178, 2003.
- 3) Maymó-Gatell, X., Chien, Y., Gossett, J. M., Zinder, S. H. : Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene, Science, Vol.276, pp.1568-1571, 1997.
- 4) 綿貫健文，栗栖太，春日郁朗，古米弘明：クロロエチレン類の脱塩素化において蓄積した塩化ビニルモノマー脱塩素促進因子，土木学会論文集 G, Vol.70, No.1, pp.2-10, 2014.
- 5) 奥津徳也，田村渉，水本正浩，石田浩昭，上野俊洋，飯泉太郎：Dehalococcoides 属細菌を利用したバイオオーグメンテーションの実用化に向けた検討，第16回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会講演集，pp.42-45, 2010.
- 6) Uchino, Y., Miura, T., Hosoyama, A., Ohji, S., Yamazoe, A., Ito, M., Takahata, Y., Suzuki, K., Fujita, N. : Complete genome sequencing of Dehalococcoides sp. strain UCH007 using a differential reads picking method, Standards in Genomic Sciences, Vol.10, 102, 2015.
- 7) 伊藤雅子・内野佳仁・三浦隆匡・山副敦司・高畑陽：汚染帯水層を模擬した飽和土壌へ Dehalococcoides mccartyi UCH007 株導入による塩素化エチレン類の浄化効果，土木学会論文集 G, Vol.78, No.1, pp.1-12, 2022.
- 8) 伊藤雅子・高畑陽・内野佳仁・山副敦司：Dehalococcoides sp.UCH007 株の汚染帯水層導入前に用いる有機資材の影響，第25回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会講演集，pp.127-130, 2019.
- 9) Miura, T., Uchino, Y., Tsuchikane, K., Ohtsubo, Y., Ohji, S., Hosoyama, A., Ito, M., Takahata, Y., Yamazoe, A., Suzuki, K., Fujita, N. : Complete genome sequences of Sulfurospirillum strains UCH001 and UCH003 isolated from groundwater in Japan, Genome Announcements, Vol.3, No.2, e00236-15, 2015.
- 10) 中村寛治，上野俊洋，石田浩昭：地下水中の塩素化エチレン分解細菌の検出，EICA, Vol.9, No.1, pp.21-25, 2004.
- 11) 高畑陽，藤原斉郁，石井裕泰，松井秀岳：自走式パイプドリルマシンで設置可能な打ち込み式注入管の開発，地盤工学会誌，Vol.67, No.2, pp.32-33, 2019.