

令和4年度 土壌汚染対策セミナー

嫌気性バイオオーグメンテーション (クリオーグ・パワーバイオ[®]等)

2023年2月1日～2月14日 録画配信セミナー

栗田工業株式会社
鈴木 義彦

1. バイオレメディエーション開発の経緯
2. 嫌気性バイオレメディエーションの開発と適用
3. オークメンテーション（クリオーグ・パワーバイオ[®]）の
開発と適用
4. パワーバイオE-PLUSのご紹介

1. バイオレメディエーション開発の経緯
2. 嫌気性バイオレメディエーションの開発と適用
3. オーグメンテーション（クリオーグ・パワーバイオ[®]）の
開発と適用
4. パワーバイオE-PLUSのご紹介

1. バイオレメディエーション開発の経緯

バイオレメディエーション (Bioremediation) とは？

生物的浄化・生物的修復

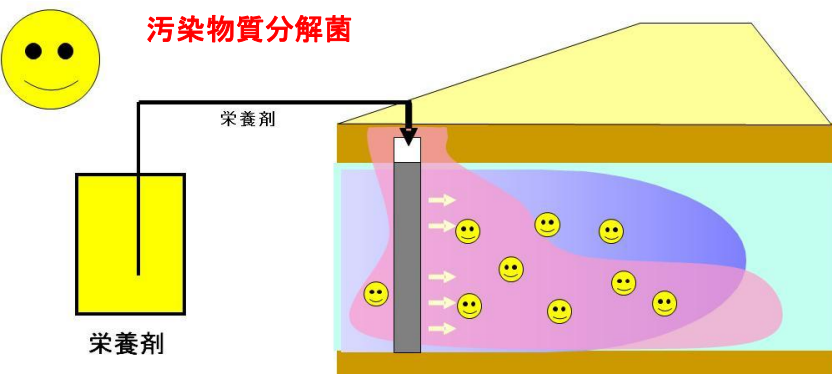
→生物の力を借りて、汚染物質を分解・無害化すること。

特にここでは土壌や地下水中に元来存在する微生物の力を利用すること

バイオレメディエーション

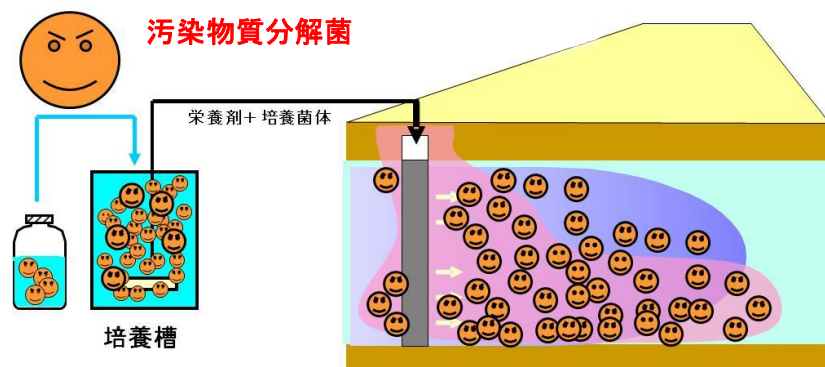
バイオスティミュレーション (Biostimulation)

栄養剤等を地下水に注入し、**土着の汚染物質分解菌を活性化させ、汚染物質を分解する。**



バイオオーグメンテーション (Bioaugmentation)

ラボ等で培養した**汚染物質分解菌**を**栄養剤**とともに地下水に注入し、**汚染物質を分解する。**

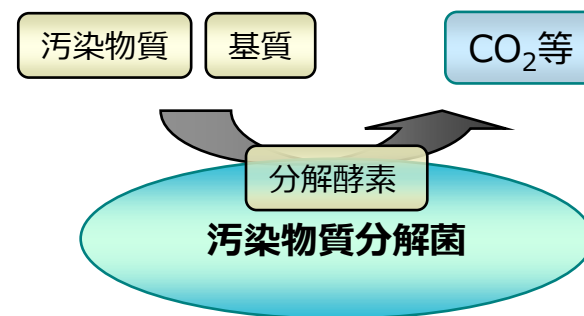


1. バイオレメディエーション開発の経緯

バイオレメディエーションとは？

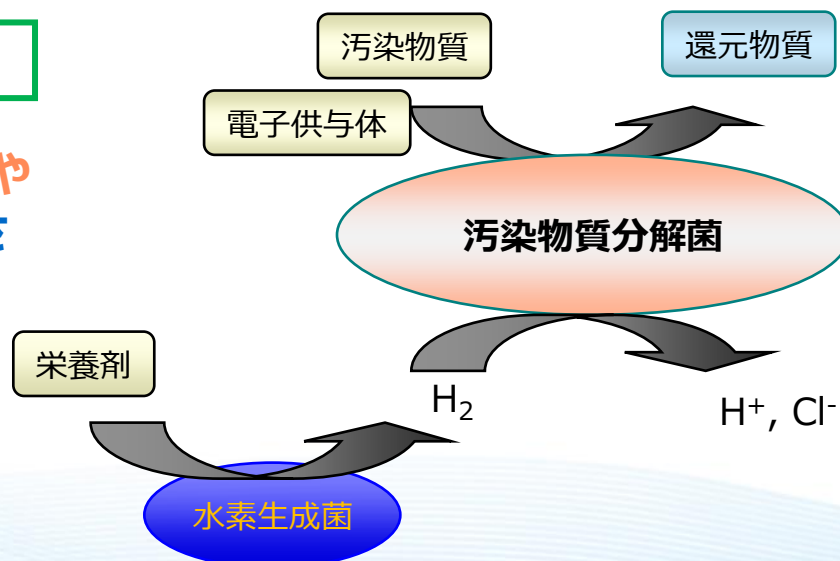
好気性バイオレメディエーション

主に、**共代謝反応**を利用して、**酸化分解**する。**共代謝反応**を利用するため、**分解酵素**を発現させるための**誘導基質**を加える。**酸素源**の添加も必要。



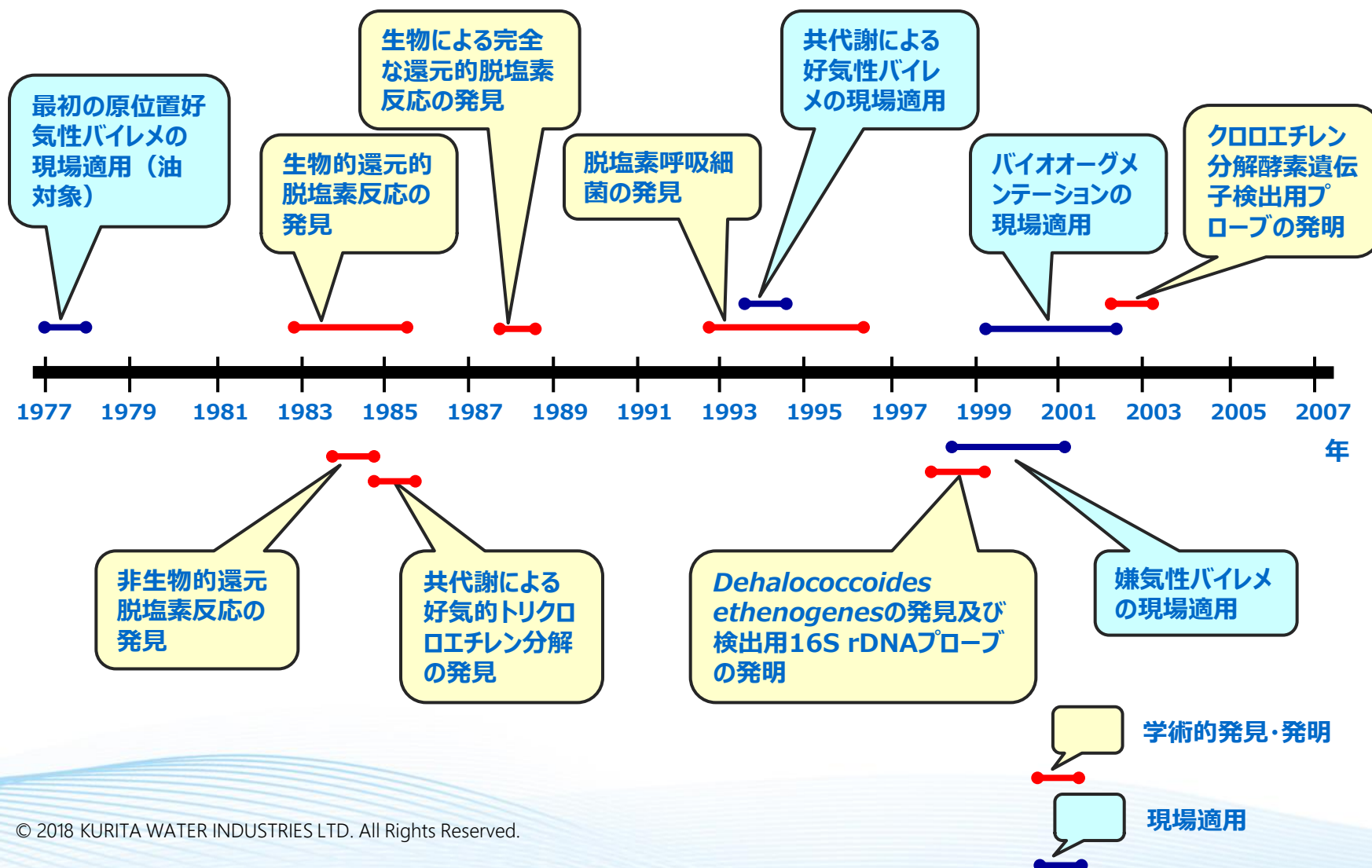
嫌気性バイオレメディエーション

主に**電子供与体**となる**有機物**や**栄養塩**を加え**分解菌**を**活性化**させる。



1. バイオレメディエーション開発の経緯

世界的なバイオレメディエーションの開発の経緯



1. バイオレメディエーション開発の経緯

今回の発表でターゲットとする汚染物質

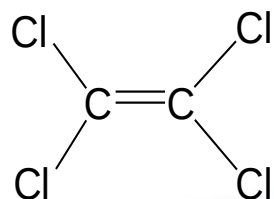
ドライクリーニングや半導体産業等で溶剤や洗浄剤として使用されてきた、

- ・テトラクロロエチレン (以下、**PCE**と記載)
- ・トリクロロエチレン (以下、**TCE**と記載)

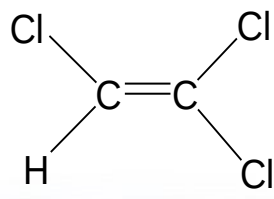
これらの物質が土壌・地下水中に漏洩し、浸透した場合、自然に生物分解され生成する

- ・シス-1,2-ジクロロエチレン (以下、**cis-1,2-DCE**と記載)
- ・トランス-1,2-ジクロロエチレン (以下、**trans-1,2-DCE**と記載)
- ・1,1-ジクロロエチレン (以下、**1,1-DCE**と記載)
- ・クロロエチレン (以下、**CE**と記載)

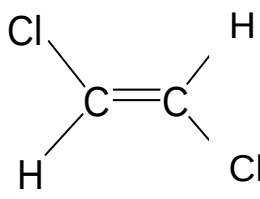
を対象汚染物質とします。



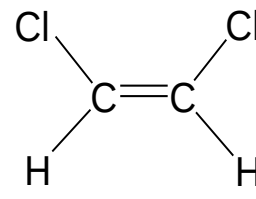
テトラクロロエチレン
(**PCE**)



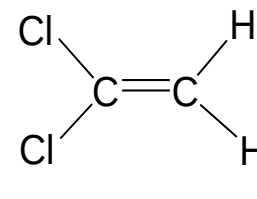
トリクロロエチレン
(**TCE**)



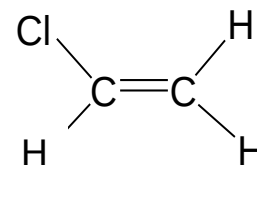
trans-1,1-ジクロロエチレン
(**trans-1,2-DCE**)



cis-1,2-ジクロロエチレン
(**cis-1,2-DCE**)



1,1-ジクロロエチレン
(**1,1-DCE**)



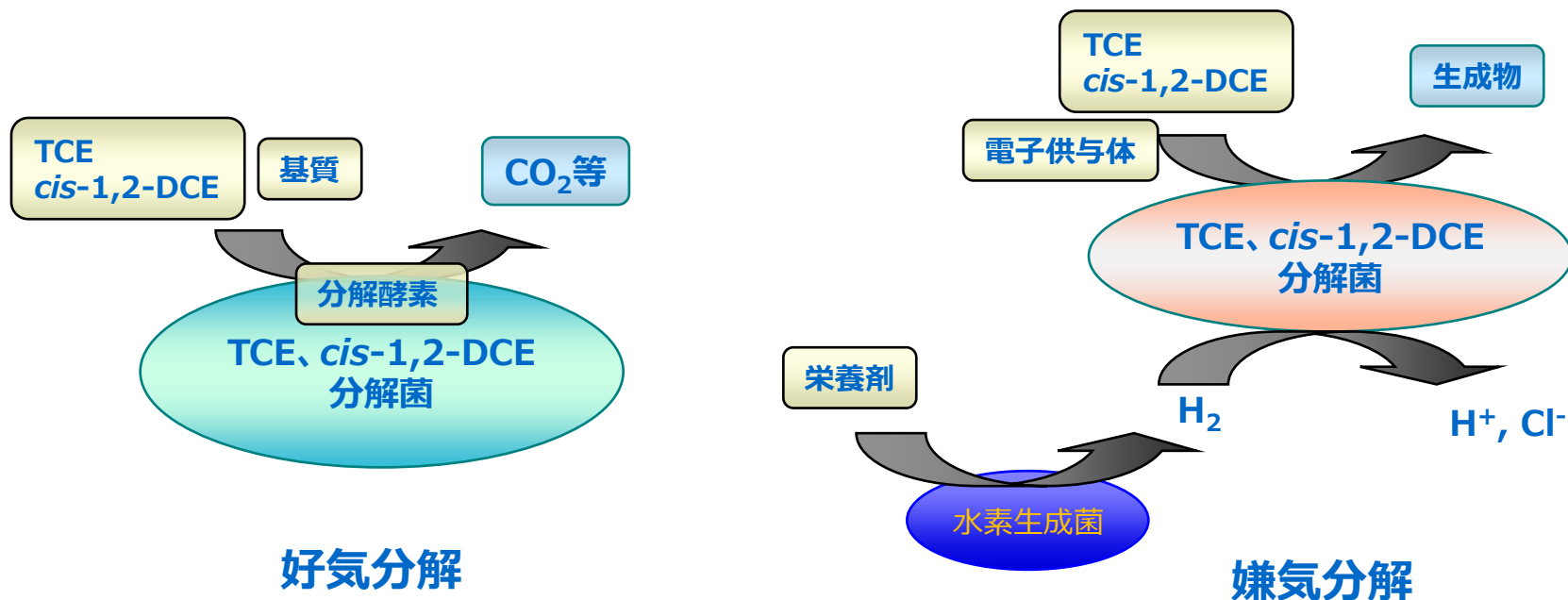
クロロエチレン
(**CE**)

1. バイオレメディエーション開発の経緯
2. 嫌気性バイオレメディエーションの開発と適用
3. オーグメンテーション（クリオーグ・パワーバイオ®）の
開発と適用
4. パワーバイオE-PLUSのご紹介

2. 嫌気性バイオレメディエーションの開発と適用

好気性バイオレメディエーションと嫌気性バイオレメディエーションの違い(1/3)

TCEや cis -1,2-DCEは生物的分解にて好氣的にも、嫌氣的にも可能である。



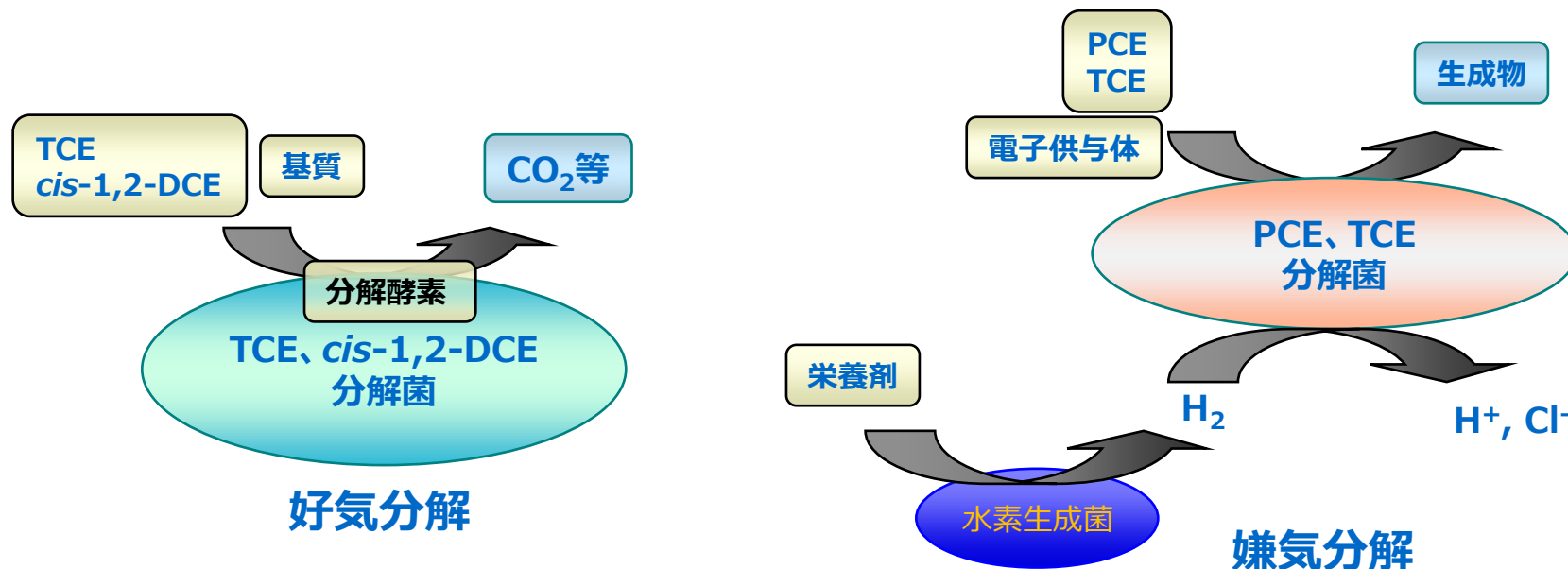
共代謝反応であるため、基質の添加が必須であり、基質自体がTCEや cis -1,2-DCE分解の目的に対しては拮抗阻害が起こり、効率的分解を望むのは難しい。

また、**PCE**を分解できない。

電子供与体と栄養塩等があれば、PCEやTCEを分解できる。

2. 嫌気性バイオレメディエーションの開発と適用

好気性バイオレメディエーションと嫌気性バイオレメディエーションの違い(2/3)



基質として、メタン、フェノール、トルエン、プロパン、イソプロピルベンゼン、アンモニアを資化する細菌が、共代謝反応によりTCEやcis-1,2-DCE分解する。
フェノールやトルエン等を地下水に注入することに懸念あり。

既に、土壌・地下水中でPCEやTCEがcis-1,2-DCEまで分解されており、cis-1,2-DCEが蓄積している汚染サイトが多く、cis-1,2-DCEをクロロエチレンを介して、エチレンやエタンまで分解できるのはDehalococcoides属細菌（以下、DHC菌と記載）が必要。

2. 嫌気性バイオレメディエーションの開発と適用

好気性バイオレメディエーションと嫌気性バイオレメディエーションの違い(3/3)

嫌気性の方が適用できる物質が多い

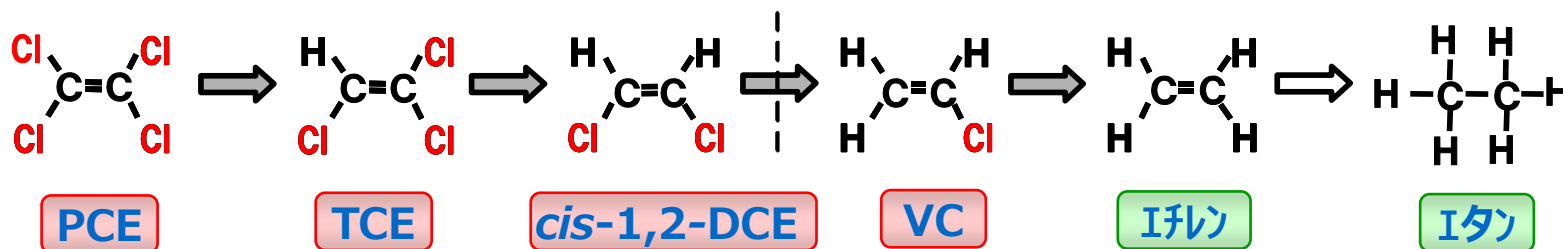
	好気性バイ法	嫌気性バイ法
クロロベン	○	○
四塩化炭素	△	○
1,2-ジクロロエタン	○	○
1,1-ジクロロエタン	△※1	○
シス-1,2-ジクロロエタン	△※1	○
1,3-ジクロロプロパン	△	○
ジクロロメタン	○	○
テトラクロロエタン	×	○
1,1,1-トリクロロエタン	△	○
1,1,2-トリクロロエタン	△	○
トリクロロエタン	△	○
ベンゼン	○	△※2

○ : 容易に分解 (工場排水に利用可能) △ : やや難分解 (共代謝等で分解) × : 分解困難

※1 : 工場排水として利用できる分解菌の報告あり ※2 : 脱窒菌による分解可能

2. 嫌気性バイオレメディエーションの開発と適用

嫌気性バイオ法による塩素化エチレンの分解経路

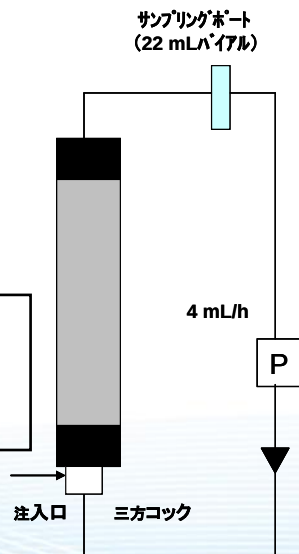


ここまでは簡単に進行

Dehalococcoides 属細菌 (DHC菌) が必要

弊社は当該DHC菌が存在する、集積培養体を獲得。

カラム : $\phi 5 \times 20$ cm
温度 : 20 °C
炭素源、窒素、りん添加



2. 嫌気性バイオレメディエーションの開発と適用

弊社は当該DHC菌が存在する、集積培養体を獲得。



どのように獲得したか？

右写真の土カラム試験では電子供与体として、*cis*-1,2-DCEを添加し、現場汚染地下水を使用し、分解試験を行い、*cis*-1,2-DCEがエチレン、エタンまで脱塩素反応が進んだ試験カラムである。



嫌気菌を培養で単離するのは困難。

そこで、**DHC菌の16SrDNA※**を測定する技術を開発し、当該汚染物質の分解にDHC菌が寄与していることを確認



カラム : $\phi 5 \times 20$ cm
温度 : 20 °C
炭素源、窒素、リン添加

※16SrDNA : 16SrRNA (遺伝子から転写されたメッセンジャーRNA : mRNAを取り込み、タンパク質をアミノ酸から合成する際に必要となるリボソームを構成する遺伝情報の一つ) の遺伝子。タンパク質合成にかかわる重要な分子であるため、進化速度が比較的遅く、種のレベルにおいて保存が高い遺伝子。

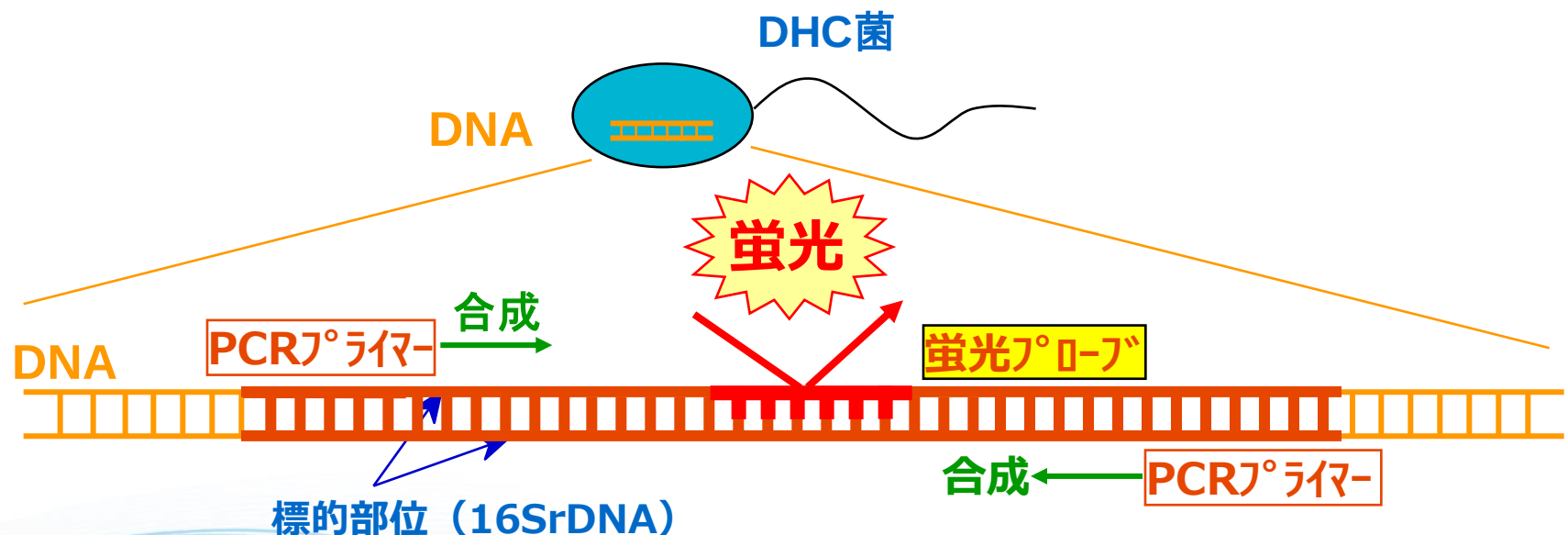
2. 嫌気性バイオレメディエーションの開発と適用

DHC菌の16SrDNAを測定する技術を開発



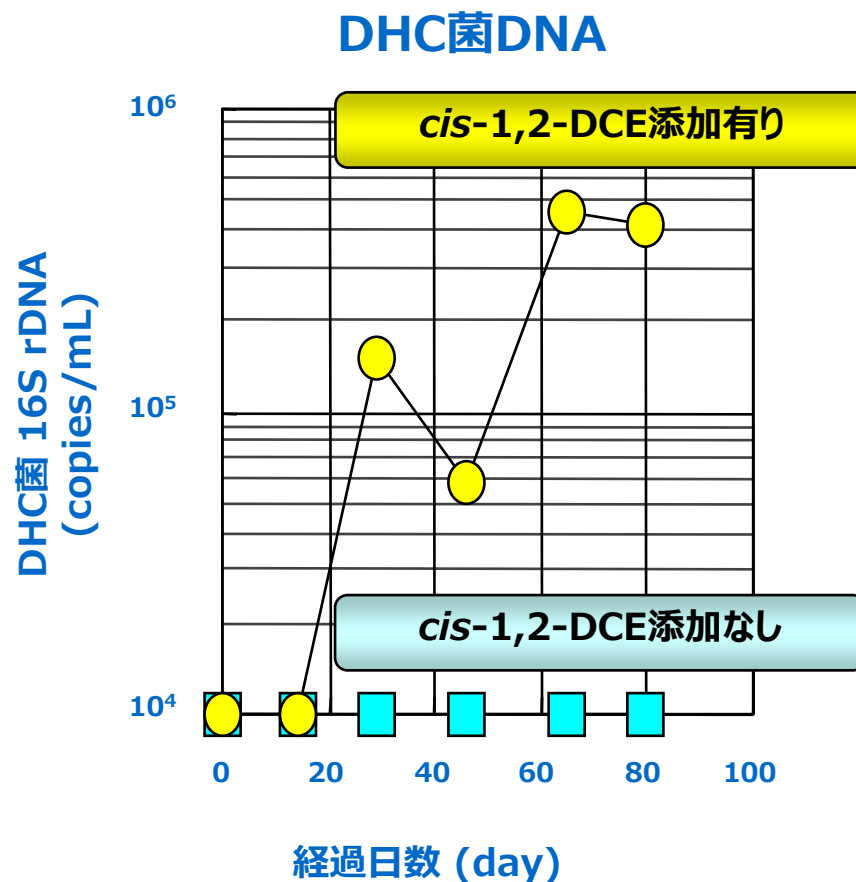
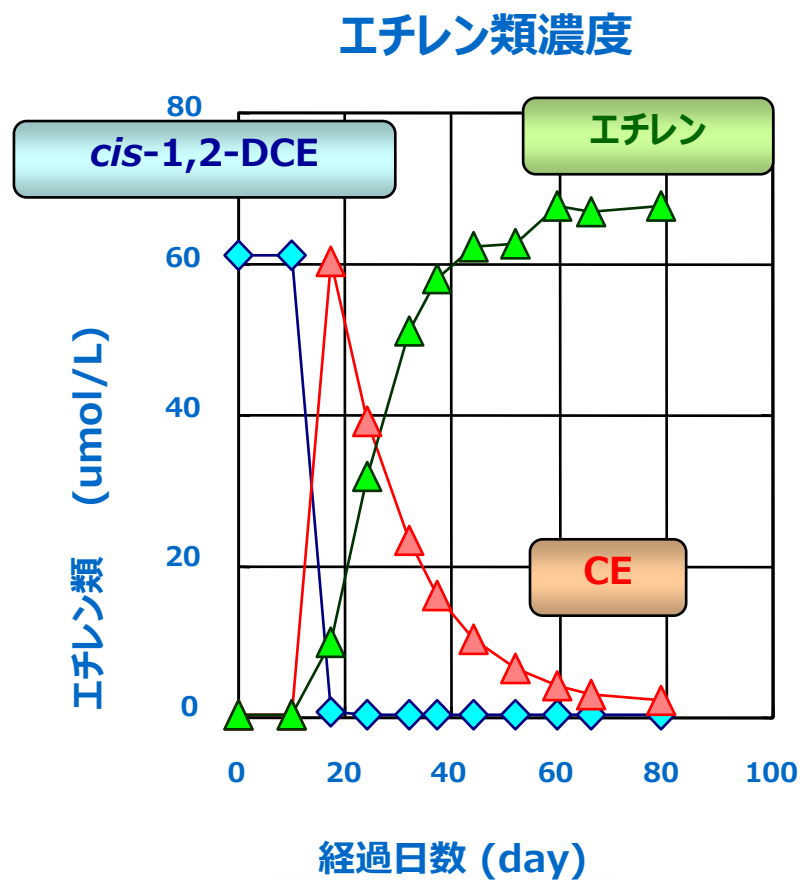
Real-Time PCRによるDHC菌検出

DHC菌の存在数は少ないため、16SrDNAを増幅させ、見える化させる。
DHC菌が存在しなければ、当該16rDNAは増幅されない。



2. 嫌気性バイオレメディエーションの開発と適用

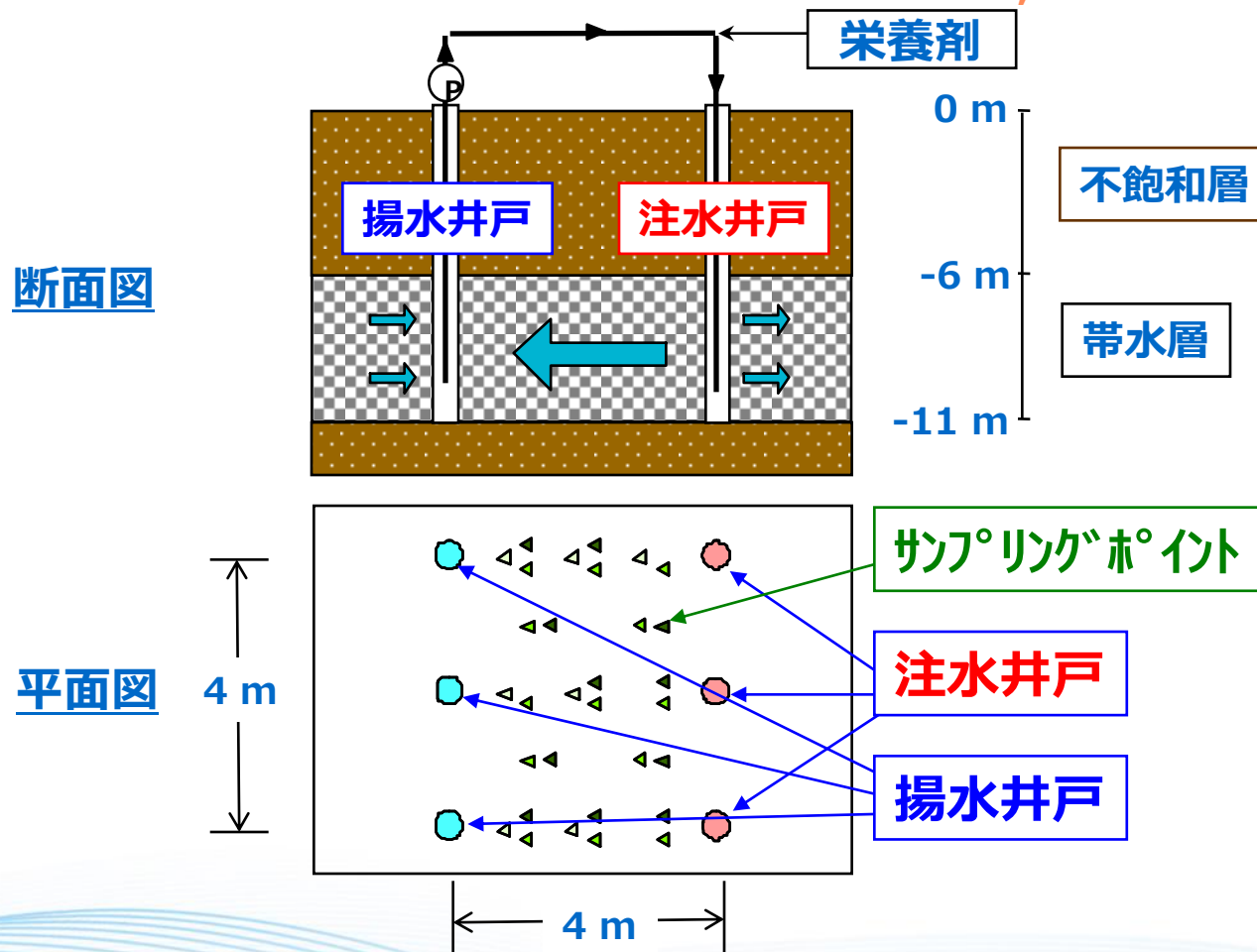
土カラム試験の水中の各物質の濃度変化



2. 嫌気性バイオレメディエーションの開発

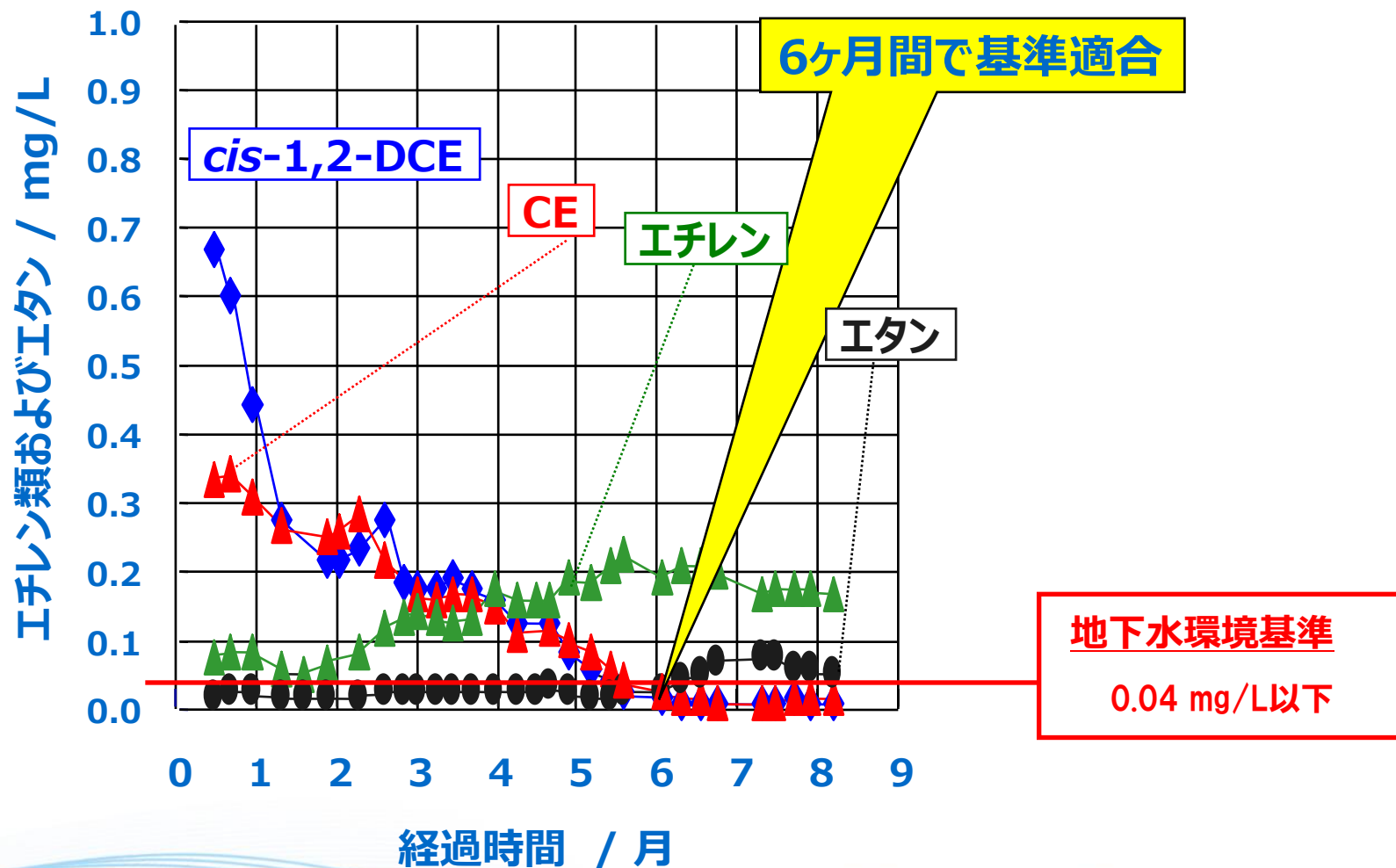
嫌気性バイオ法の適用（パイロット試験）

実地下水汚染現場にて実施。主たる汚染物質は*cis*-1,2-DCE



2. 嫌気性バイオレメディエーションの開発

嫌気性バイオ法の適用（パイロット試験）



2. 嫌気性バイオレメディエーションの開発

嫌気性バイオ法の適用の流れ

1. 適用可能性試験 (Treatability test)



- ・対象サイト地下水を採取し、分解菌の存在を確認

2. パイロット浄化試験



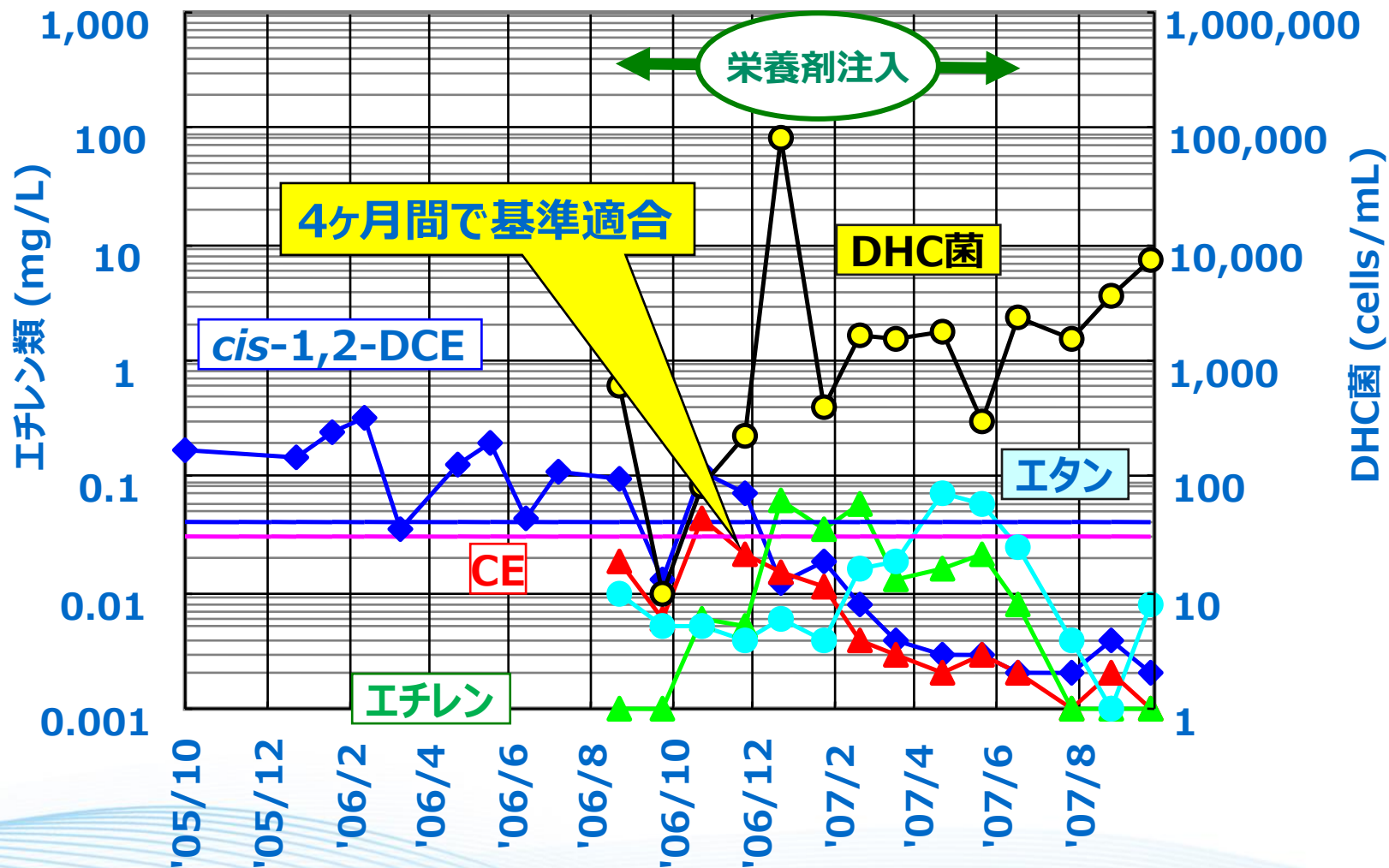
- ・地質・水理学的条件、既存の調査結果より、処理条件を決定し、対象サイトの一部で浄化試験を実施
- ・栄養剤の拡がり、分解菌の増殖、及び対象汚染物質をモニタリング

3. フルスケール浄化

- ・パイロット浄化試験結果に基づき、最適化された処理条件にて、対象サイトをフルスケール浄化を実施
- ・浄化効果をモニタリングにて確認

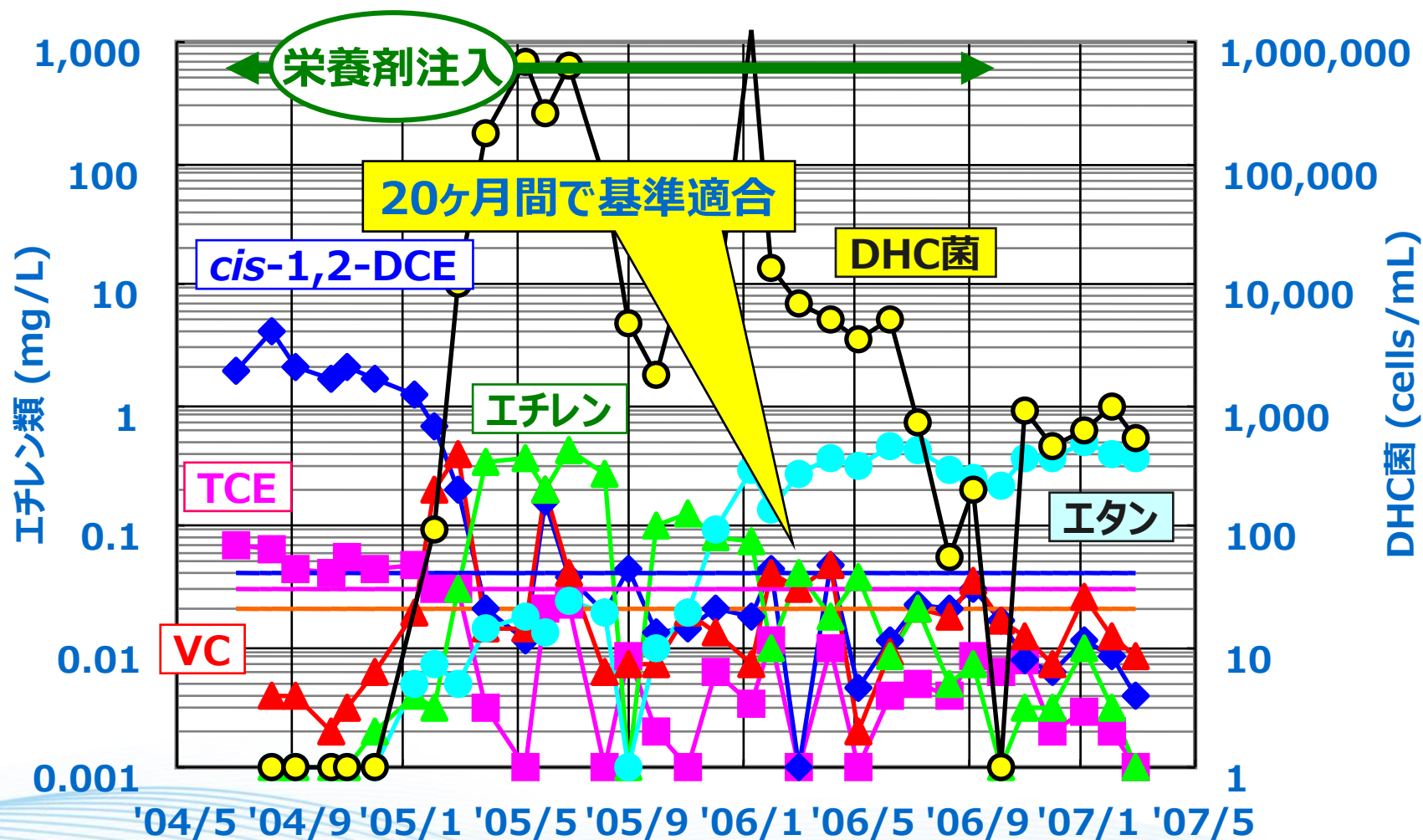
2. 嫌気性バイオレメディエーションの開発

嫌気性バイオ法の適用事例（Aサイト）



2. 嫌気性バイオレメディエーションの開発

嫌気性バイオ法の適用事例（Bサイト）

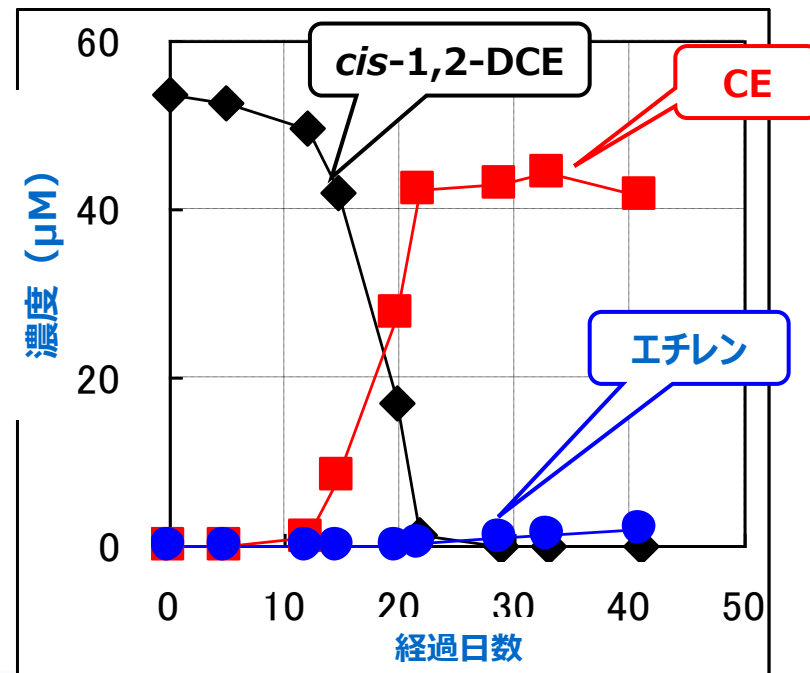
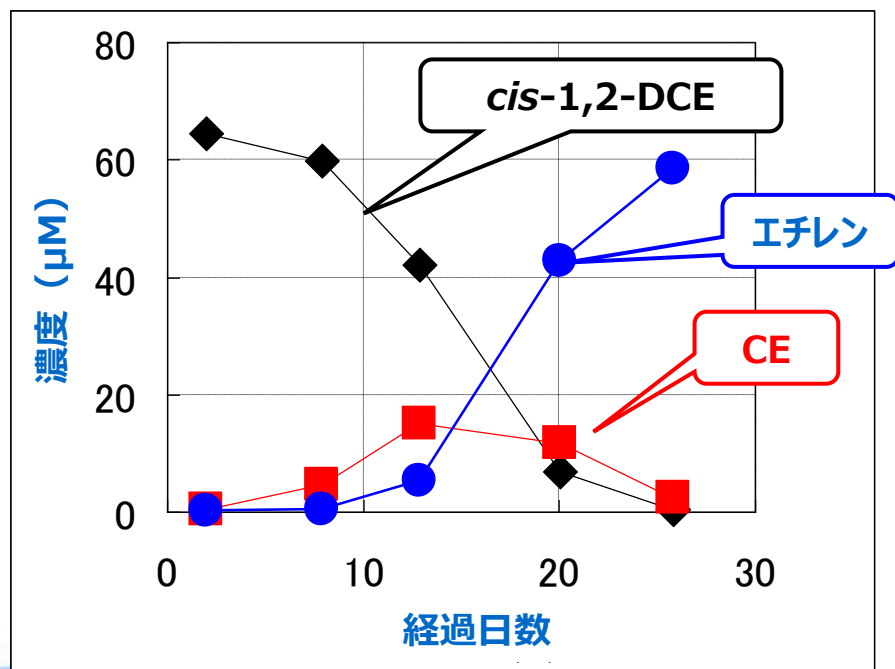


2. 嫌気性バイオレメディエーションの開発

嫌気性バイオ法の適用してからの課題

左図のように、*cis*-1,2-DCEもCEも分解されエチレンが生成する現場がほとんどであったが、右図のように、*cis*-1,2-DCE分解後CEが蓄積するサイトが確認された。

→当該試験時、CE（塩化ビニルモノマーとして）が地下水環境基準の要監視項目から有害物質になるかどうか検討されていた時期であった。



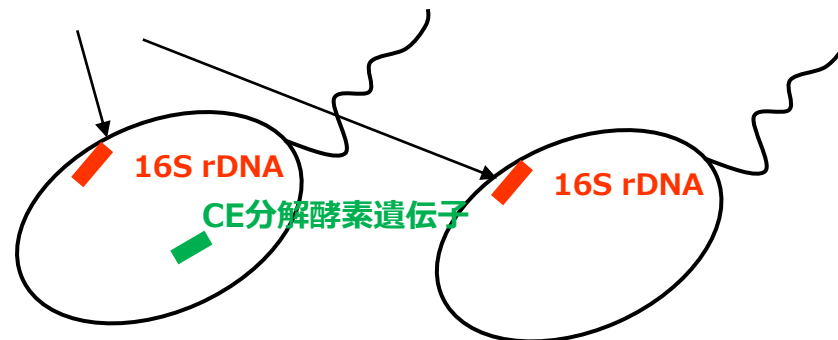
2. 嫌気性バイオレメディエーションの開発

嫌気性バイオ法の適用してからの課題

これらの地下水中のDHC菌の性状を調べた。



DHC菌を特異的に検出する際に利用する遺伝子



CE分解酵素遺伝子を持つ
DHC菌

VC分解酵素遺伝子を持たないDHC菌

地下水中にDHC菌が存在したとしても、CEを分解する酵素を有するものとなないものが存在することが判明。

2. 嫌気性バイオレメディエーションの開発

嫌気性バイオ法によってCEを含む塩素化エチレン類を確実に分解するためには



- ①現場地下水中にDHC菌が存在することを事前に確認
- ②さらにそのDHC菌の多くがCE分解酵素遺伝子を有することを確認する必要がある。

嫌気性バイオ法の適用してからのさらなる課題

- ・現場地下水中にDHC菌が存在しない or 非常に少ない場合
- ・DHC菌が存在したとしても、CE分解酵素遺伝子を有しない場合



このような地下水汚染をバイオレメディエーションでどう浄化すればいいか？

1. バイオレメディエーション開発の経緯
2. 嫌気性バイオレメディエーションの開発と適用
3. オークメンテーション（クリオーグ・パワーバイオ[®]）の
開発と適用
4. パワーバイオE-PLUSのご紹介

■従来法（バイオスティミュレーション）の課題

- ①もともとDHC菌が生息しないサイトでは適用できない
- ②DHC菌が一定数まで増殖し、濃度が低下するまでに期間を要する。
- ③生息するDHC菌の種類によっては、CEの状態で分解が止まってしまう場合がある。

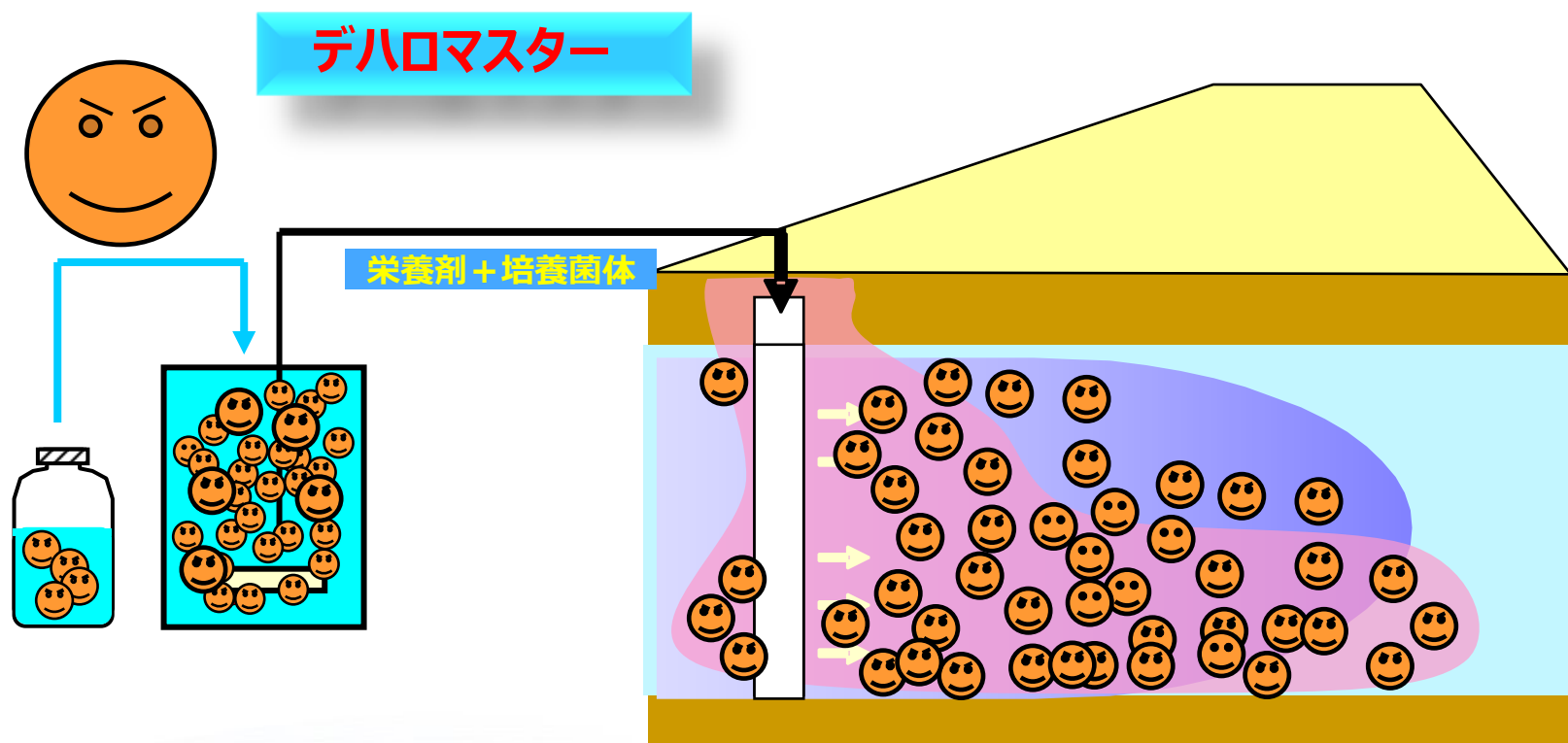


■クリオーグ・パワーバイオ[®]（バイオオグメンテーション）の特徴

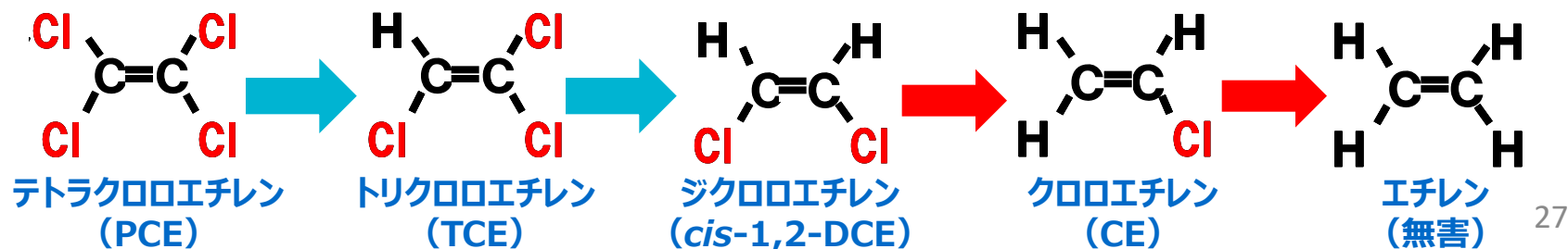
- ①もともとDHC菌が存在しなくても適用できる。
- ②一定数以上の分解菌を注入するため、速やかに汚染濃度が低下する。
- ③CE分解能を持つ菌を注入するため、CEも分解できる。

3. オグメンテーション（クリオーグ・パワーバイオ®）の開発と適用

デハロマスター®（栗田が開発した塩素化エチレン分解菌群の集積培養体）を栄養剤と共に現場地下水に注入し、塩素化エチレン汚染土壤地下水を浄化



3. オークメンテーション（クリオーグ・パワーバイオ®）の開発と適用



様々な嫌気性
微生物



DHC菌

栗田の培養菌



CEも分解

CEを分解
できない
タイプが存在

3. オグメンテーション（クリオグ・パワーバイオ®）の開発と適用

デハロマスター®（塩素化エチレン分解菌群の集積培養体）の集積培養

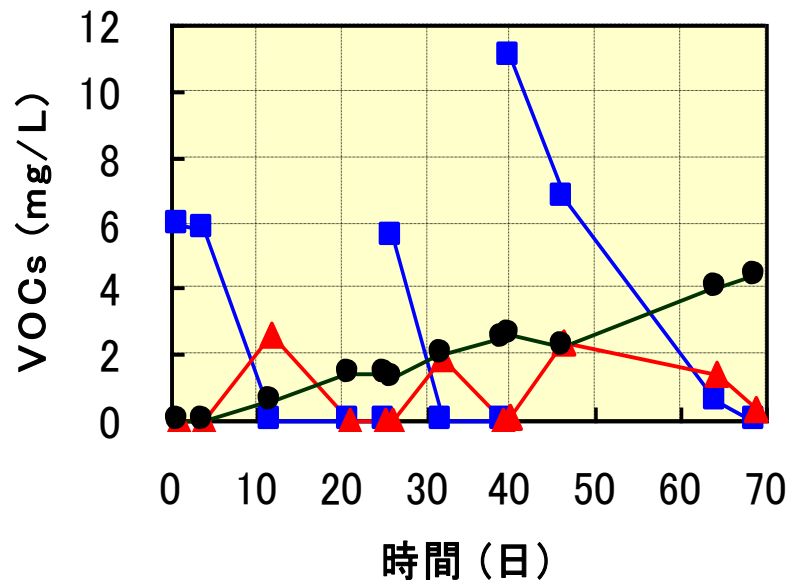


図1 *cis*-1,2-DCEの分解

—■— *cis*-1,2-DCE —▲— CE —●— ETH

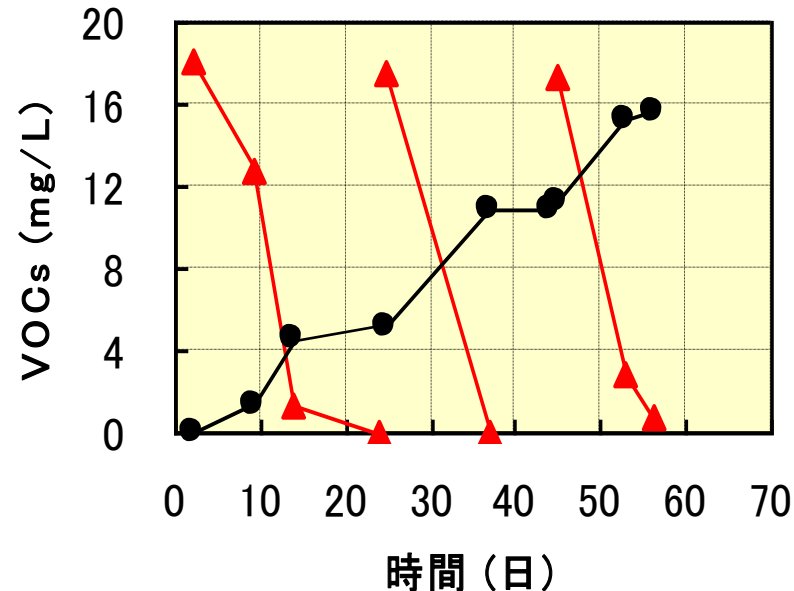


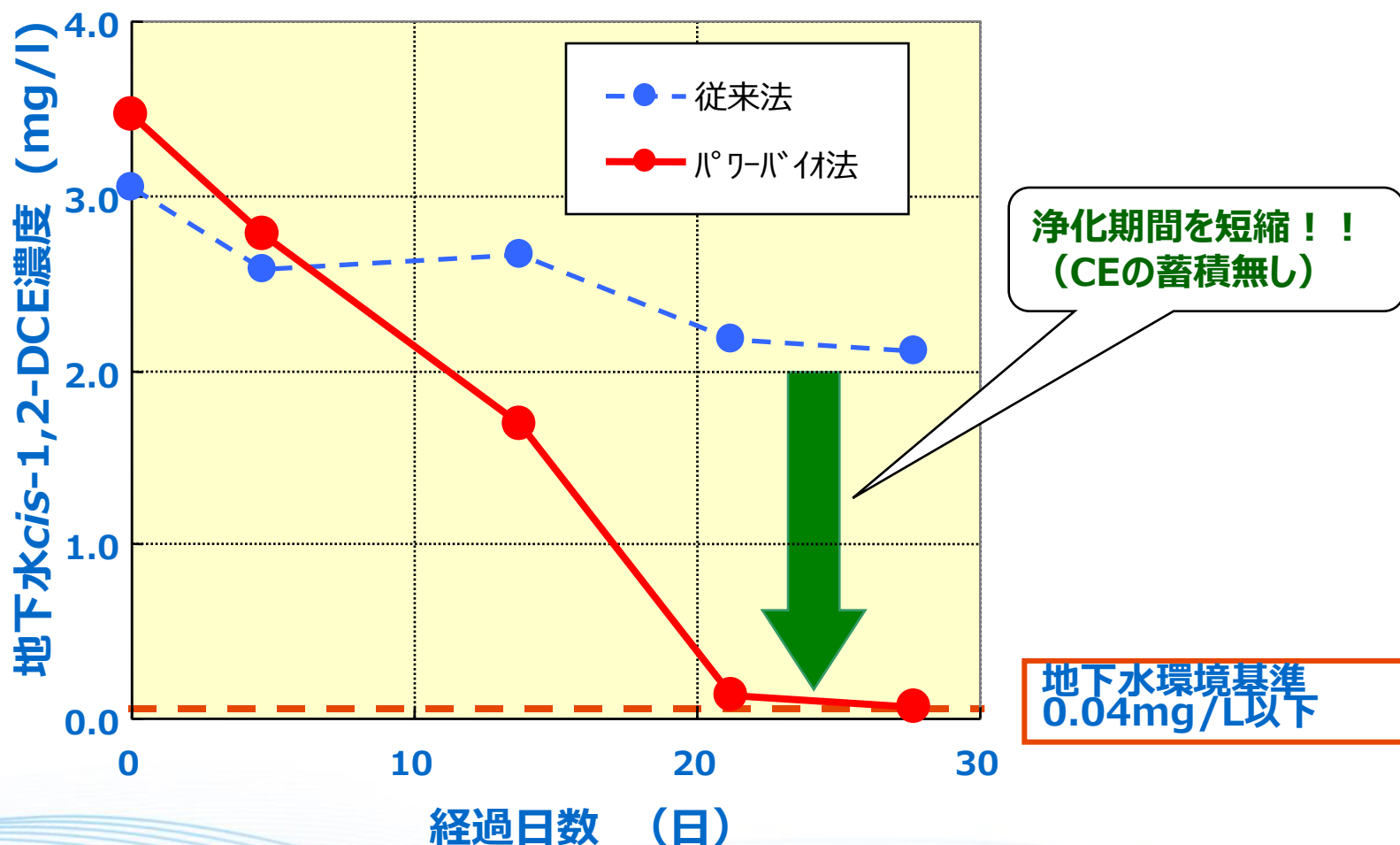
図2 CEの分解

—▲— CE —●— ETH

3. オグメンテーション（クリオグ・パワーバイオ®）の開発と適用



デハロマスター®（塩素化エチレン分解菌群の集積培養体）の分解能



オグメンテーション適用時の課題

【課題①】

人工的に培養した高性能な分解菌を自然環境（土壌・地下水）中に注入するため、高い浄化効果は期待できるが、人体や生態系への影響がないことを検証する必要がある。

【課題②】

短期間で培養できる菌の量に限界がある。
つまり、比較的小規模（数千 m^3 ）の汚染サイトや大規模の汚染サイトの一部の適用に留まり、コスト削減や期間短縮効果が得られるケースが限定的であった。

【課題①】への対応

バイオオークメンテーションの指針

「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」を環境省・経済産業省が制定（平成17年3月30日）



栗田のクリオーグ・パワーバイオ®法：（塩素化エチレン汚染土壌地下水向けバイオオークメンテーション技術）



- ・環境省及び経済産業省の合同部会で審査
- ・浄化効果及び安全性を確認



原位置でのバイオオークメンテーションとしては 国内第1号の指針適合（平成20年6月）

3. オークメンテーション（クリオーグ・パワーバイオ®）の開発と適用



利用指針適合確認取得事業（全件）

適合確認日	事業者名	事業名称	使用菌体
平成18年3月31日	株式会社クボタ	バイオオーク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	<i>Desulfitobacterium</i> sp.KBC1株
平成18年10月30日	前田建設工業株式会社	白色腐朽菌利用による ダイオキシン類 汚染土壌の浄化	キノコの一つでウスキイロカワタケの分離株YK-624株
平成20年6月9日	栗田工業株式会社	バイオオークメンテーションによる 塩素化エチレン 汚染地下水および土壌の浄化	<i>Dehalococcoides</i> 属細菌を含むコンソーシア※
平成21年5月29日	株式会社 奥村組 株式会社 アイアイビー	バイオオークメンテーションによる 油含有土壌 の浄化 奥村組は主に浄化事業、アイアイビーは主に投入微生物の管理、培養を行う。	<i>Novosphingobium</i> sp.No.2株 <i>Pseudomonas</i> sp.No.5株 <i>Rhodococcus</i> sp.No.10株
平成21年5月29日	大成建設株式会社	バイオオークメンテーションによる ベンゼン 汚染土壌・地下水の浄化	<i>Azoarcus</i> sp.DN11株
平成23年5月6日	日工株式会社 株式会社熊谷組 学校法人立命館	バイオオークメンテーションによる 鉱油類汚染土壌 の浄化	<i>Rhodococcus</i> sp.NDKK6株 <i>Gordonia</i> sp.NDKY76A株
平成23年5月6日	鹿島建設株式会社 ケミカルグラウト株式会社 日本国土開発株式会社 他6社	微生物による 鉱物油及びベンゼン汚染土壌 の浄化	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Gordonia polyisoprenivorans</i> <i>Rhodococcus rhodochrous</i>
平成25年4月9日	株式会社ゲイト	バイオオークメンテーションによる ベンゼン及び鉱物油汚染土壌 の浄化	<i>Acinetobacter</i> sp. (GKN-4)
平成26年10月8日	大成建設株式会社 独立行政法人製品評価技術基盤機構	バイオオークメンテーションによる 塩素化エチレン類 汚染土壌及び地下水の浄化	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1株
平成27年11月25日	大成建設株式会社 独立行政法人製品評価技術基盤機構	塩素化エチレン類を分解する嫌気性菌UCH007株およびUCH001株による 塩素化エチレン類 汚染土壌及び地下水の浄化	<i>Dehalococcoides mccarti</i> UCH007株及び <i>Sulfurospirillum</i> sp.UCH001株

3. オークメンテーション（クリオーグ・パワーバイオ®）の開発と適用



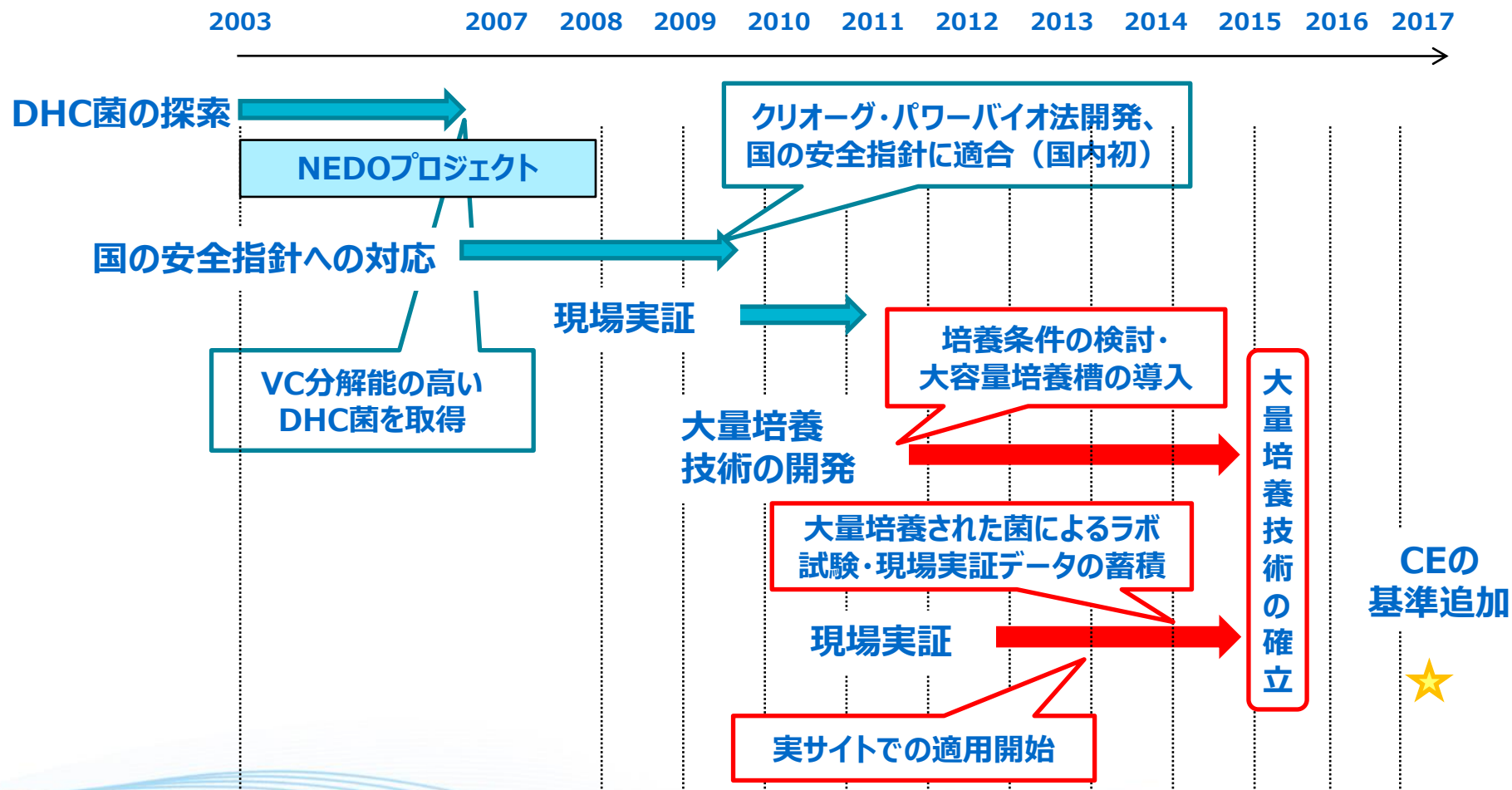
適合確認日	事業者名	事業名称	使用菌体
平成31年4月24日	株式会社竹中工務店 国立大学法人名古屋工業大学	バイオオークメンテーションによる クロロエチレン類 含有汚染土壌の浄化	<i>Dehalococcoides mccartyi</i> NIT01株
令和4年9月1日	株式会社エンバイオ・エンジニアリング 国立大学法人東京農工大学	バイオオークメンテーションによる 塩素化エチレン類 汚染汚染土壌・地下水の浄化	<i>Dehalococcoides</i> 属細菌 UCH-ATV1株

現在12件が指針適合となっています。

3. オークメンテーション（クリオーグ・パワーバイオ®）の開発と適用



【課題②】への対応



3. オークメンテーション（クリオーグ・パワーバイオ®）の開発と適用

【課題②】への対応

- ・食品添加物を主体とした栄養剤により培養。
- ・大容量の培養槽において高濃度で分解菌を培養することに成功。

新規導入



培養規模 : 約150 L

従来



培養規模 : 約8 L



3. オグメンテーション（クリオグ・パワーバイオ®）の開発と適用



【課題②】への対応

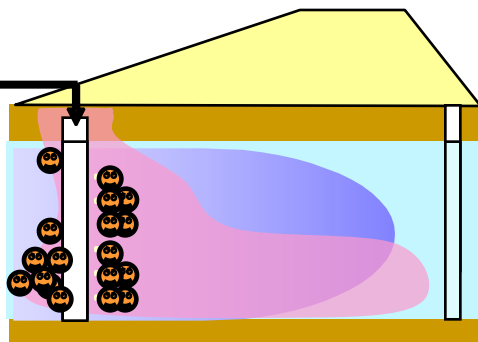
大量培養による浄化規模の拡大



CE分解能
を持つDHC菌

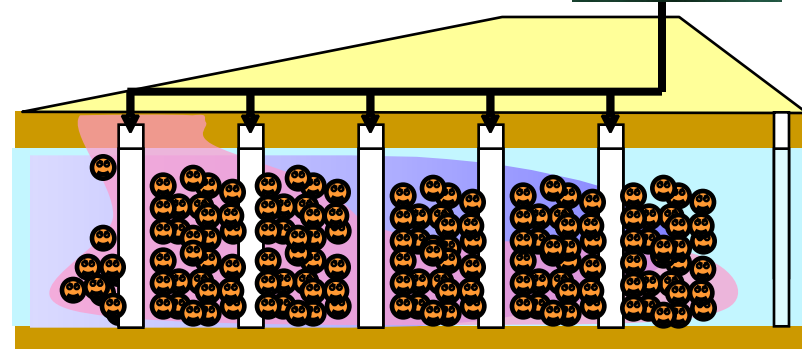
栄養剤＋
培養菌体

8 L



培養能力 : 浄化体積約500 m³分/月

対象体積
約20倍



培養能力 : 浄化体積約10,000 m³分/月

従来

短期浄化（半年程度）を狙う場合、
汚染体積が数千 m³までの小規模サイトに
限定された。

大量培養技術確立後

汚染体積が数万 m³以上の大規模サイト
であっても短期浄化を狙うことが可能と
なった。

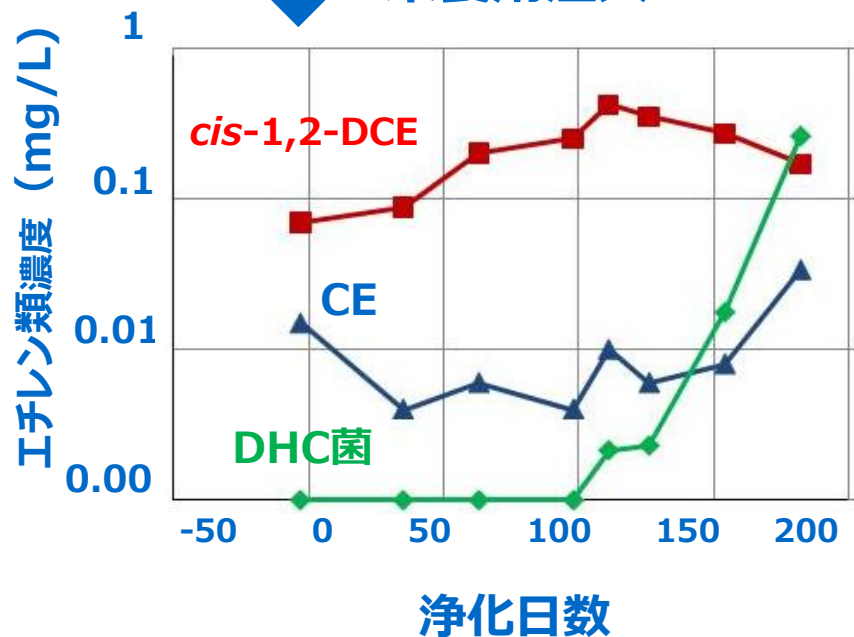
3. オグメンテーション（クリオグ・パワーバイオ®）の開発と適用



適用事例（Cサイト）

嫌気性バイオ法

栄養剤注入



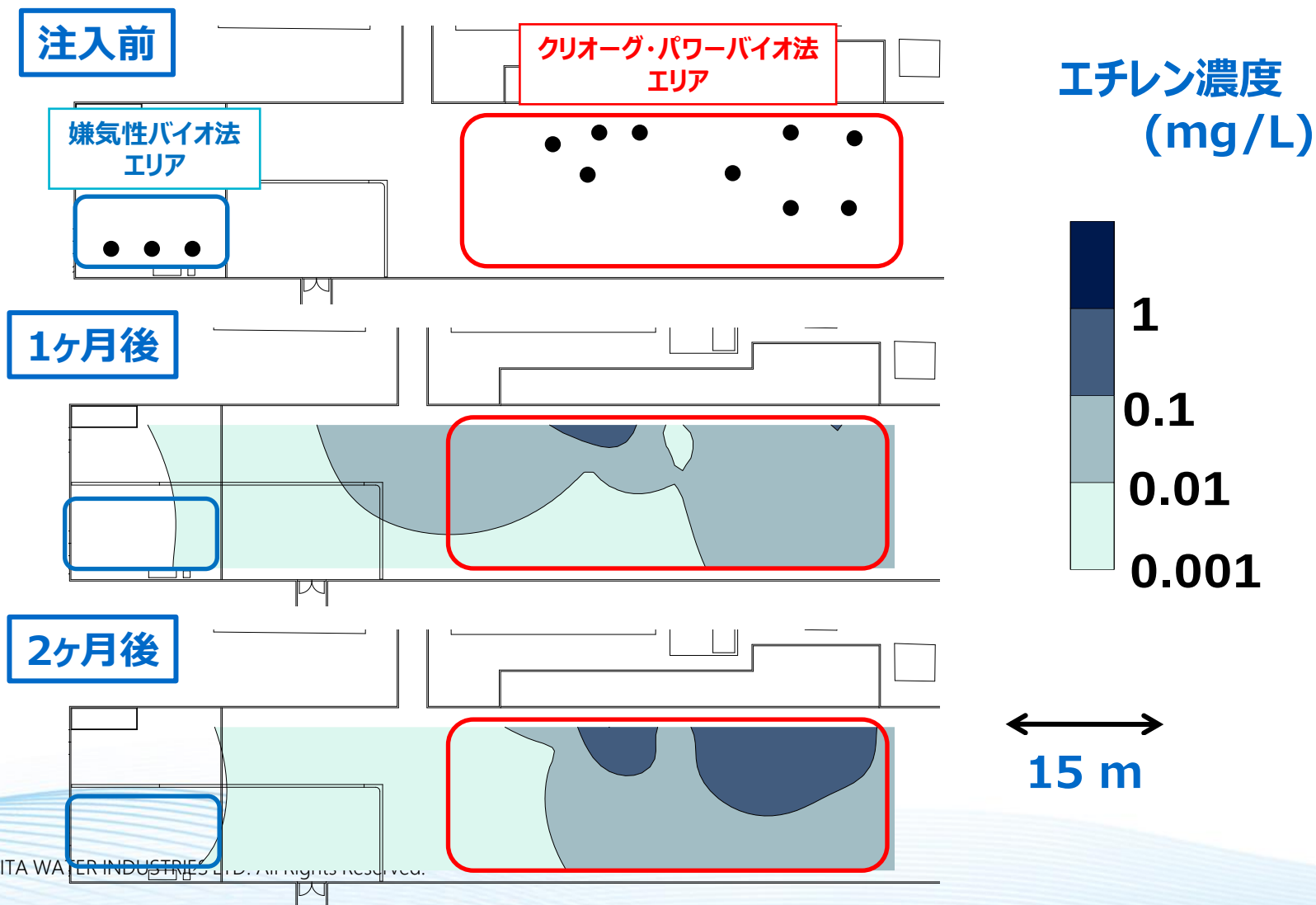
クリオグ・パワーバイオ法

栄養剤 + 分解菌注入



3. オグメンテーション（クリオーグ・パワーバイオ®）の開発と適用

適用事例（Dサイト）

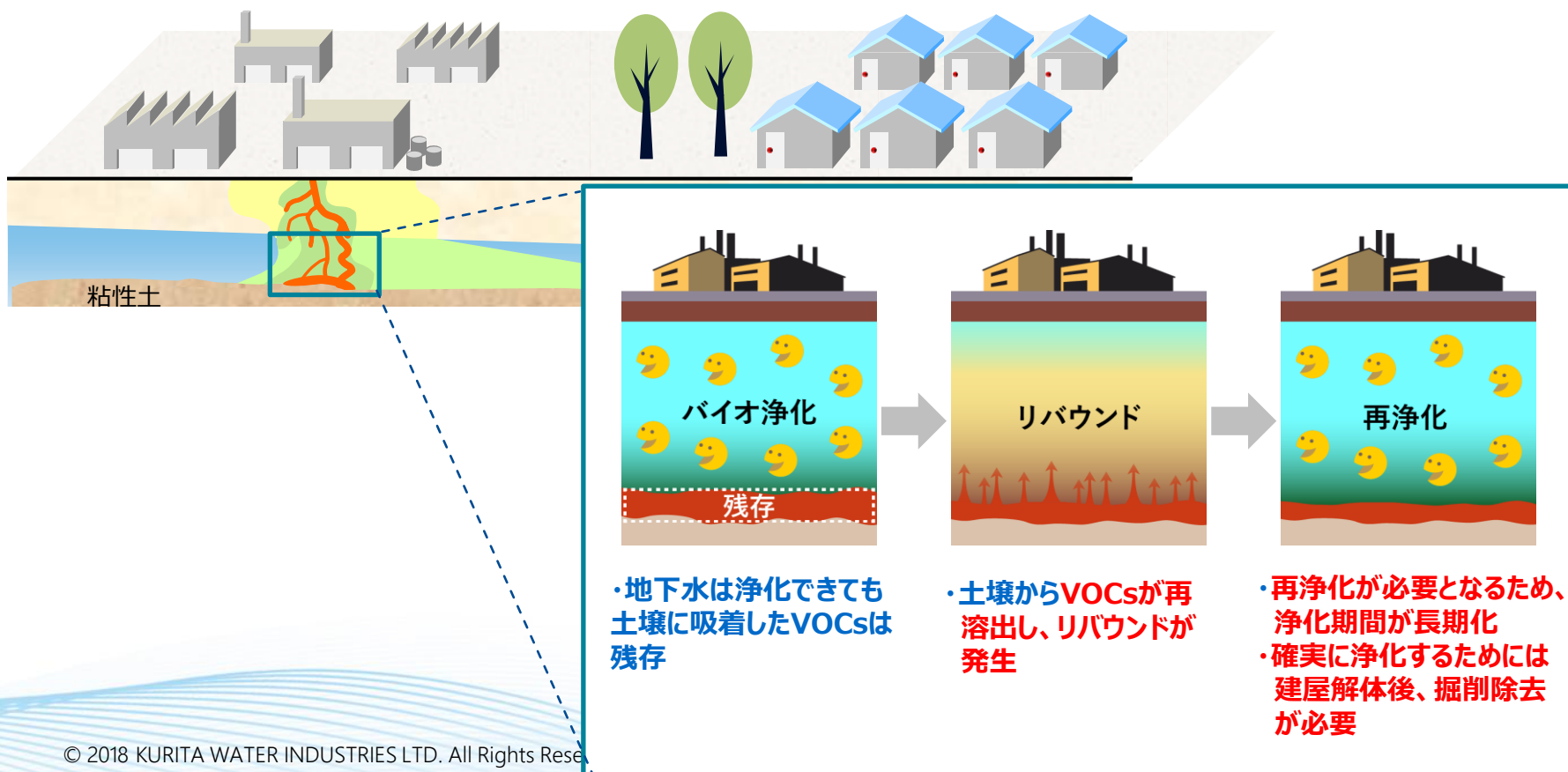


1. バイオレメディエーション開発の経緯
2. 嫌気性バイオレメディエーションの開発と適用
3. オークメンテーション（クリオーグ・パワーバイオ[®]法）の
開発と適用
4. パワーバイオE-PLUSのご紹介

4. パワーバイオE-PLUSのご紹介

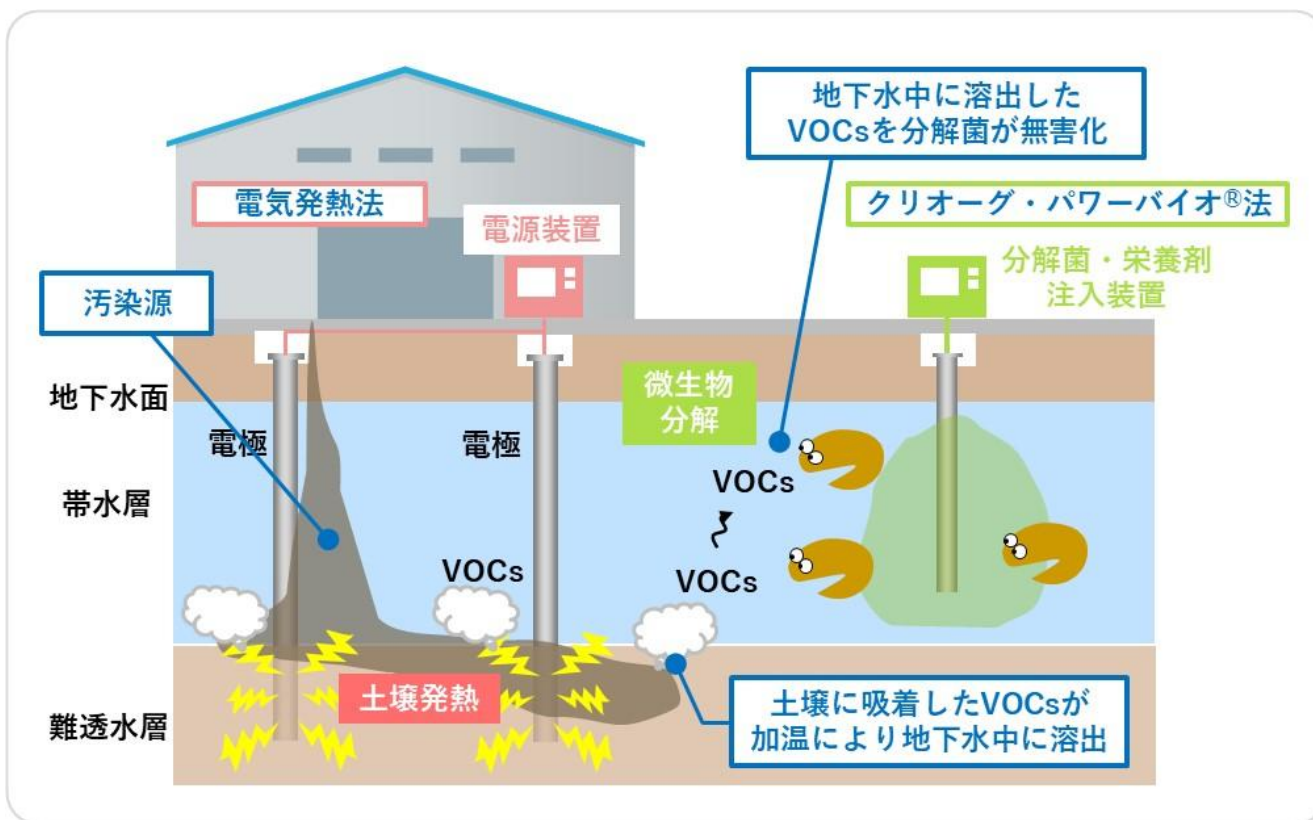
地下水の原位置浄化時の課題

従来、土壤中に塩素化エチレン類（VOCs）が残存する場合にはバイオ浄化だけでは完全に浄化することが難しく、**リバウンド**により**浄化期間が長期化**するという課題がある。



4. パワーバイオE-PLUSのご紹介

地下に電極を設置し、土壌を加温することによりVOCsを地下水中に溶出させ、溶出したVOCsをクリオグ・パワーバイオ®法により分解



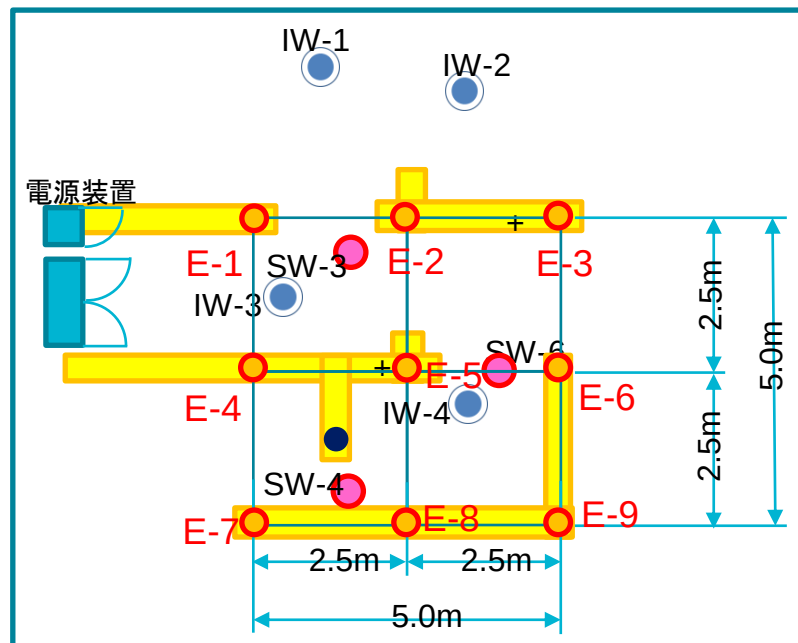
土壌中のVOCsを確実に除去

リバウンドの抑制による
浄化期間の短縮

作業中の建屋内でも施工可能

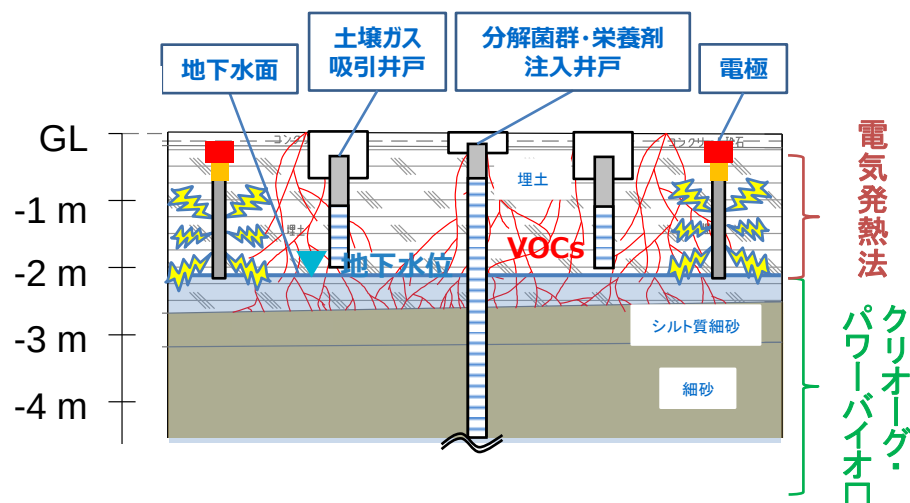
4. パワーバイオE-PLUSのご紹介

パワーバイオE-PLUS適用事例（Eサイト）



- 既存設備：栄養素注入井戸 ● 電気発熱用：電極井戸(E-1～9)
- 既存設備：土壌ガス吸引井戸 ● 電気発熱用：土壌温度観測井戸
- 電気発熱用：埋設用トレンチ

図-1 平面配置図



地下水位以浅 ⇒ 電気発熱法でVOCsを揮発させ吸引

地下水位以深 ⇒ 電気発熱法で地下水にVOCsを溶出させ微生物分解

図-2 断面配置図（イメージ）

4. パワーバイオE-PLUSのご紹介

パワーバイオE-PLUS適用事例（Eサイト）

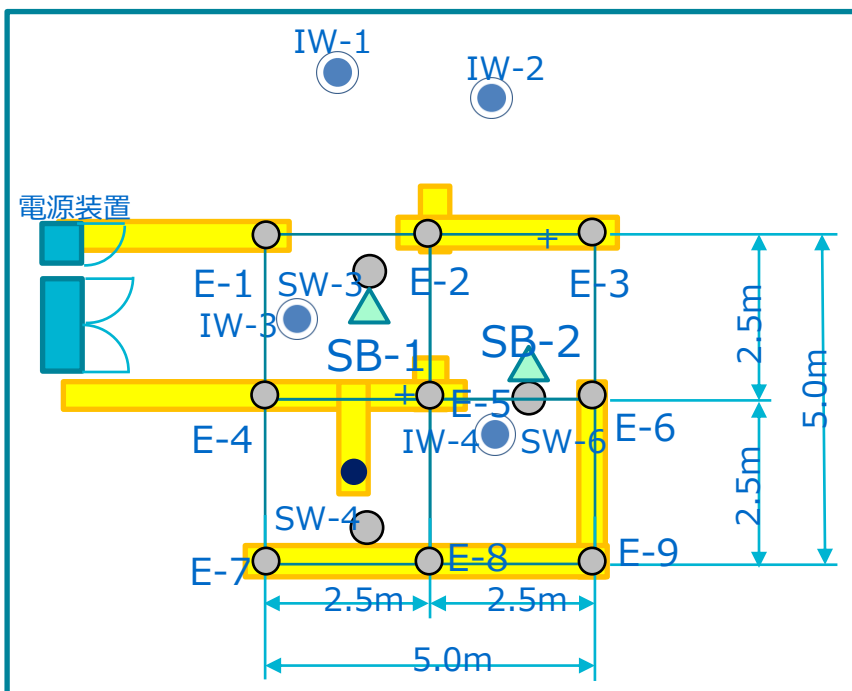


図-3 ボーリング地点図 ▲ ボーリング調査地点

表-1 PCE土壌溶出量（基準値：0.01 mg/L以下）

	浄化前	浄化後
SB-1 GL-1 m	0.043	0.0041
SB-2 GL-1 m	0.040	0.0095

基準適合

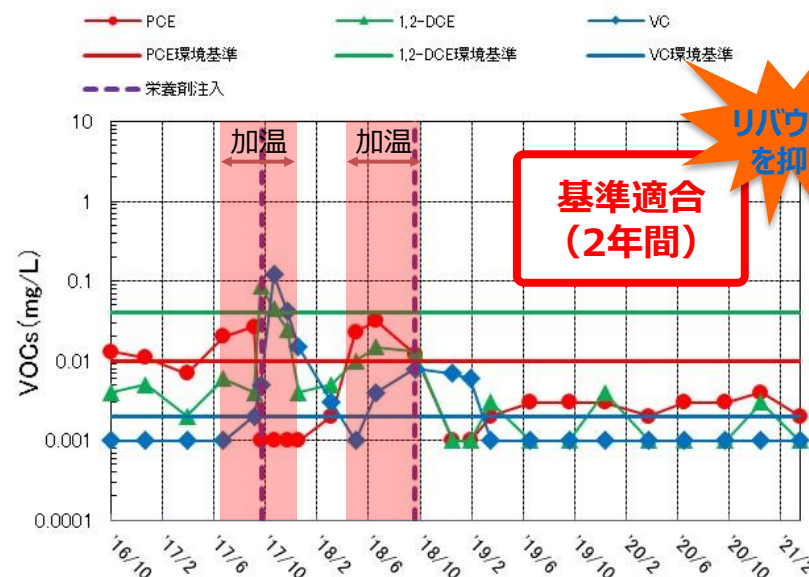
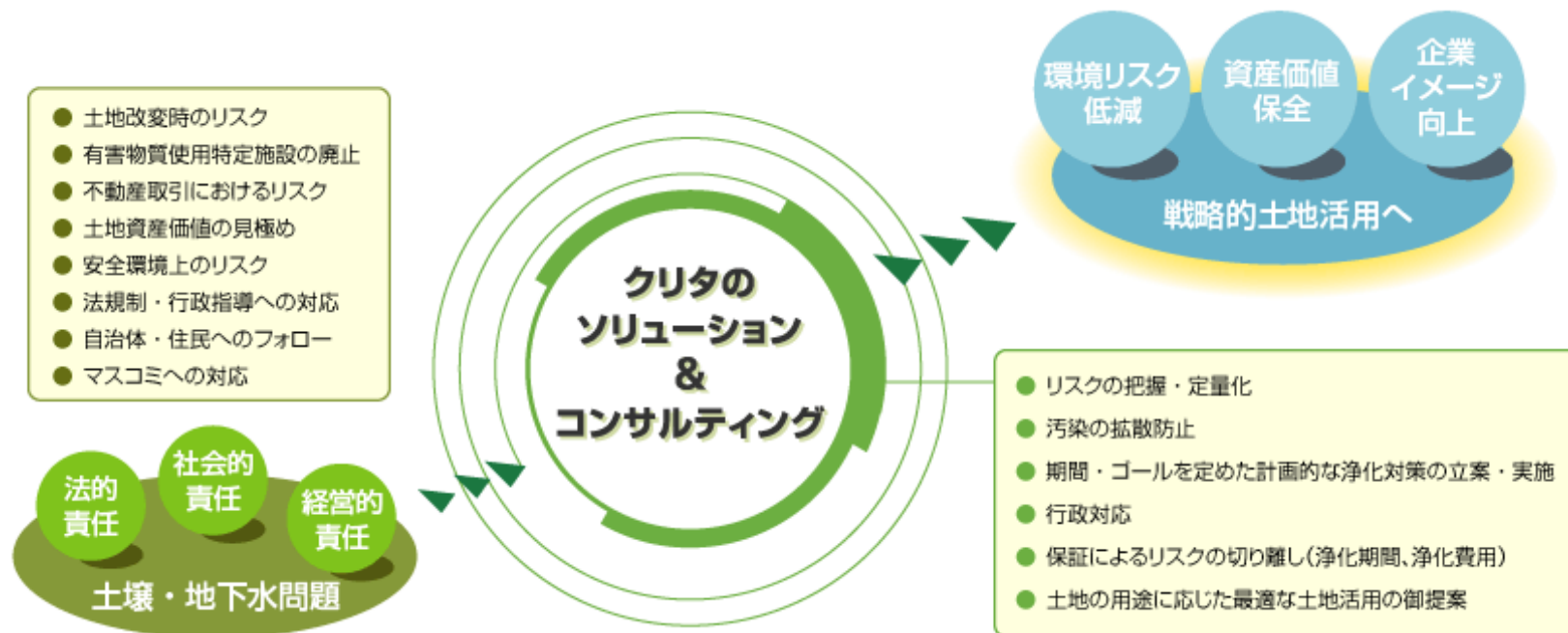


図-4 地下水濃度変化（IW-4）

- ・電気発熱法を適用した結果、PCE土壌溶出量基準適合が確認された。
- ・加温後バイオ浄化を適用したことによりCEを含む地下水中VOCs濃度が低減し、その後地下水基準適合の状態を2年間継続している。



栗田工業株式会社 国内営業本部
社会インフラ部門 土壌営業部 コンサルティング課
主任技師 鈴木 義彦
Tel 090-2494-7719
E-mail y-suzuki18@kurita-water.com

