

トリクロロエチレン汚染土の ハイブリッド型バイオレメディエーション処理システムの開発

石川 洋二 藤井 研介 峠 和男
(エンジニアリング 本部) (エンジニアリング 本部)

井出 一貴 辻 博和

Hybrid Bioremediation System: Degradation of Trichloroethylene in Soil

Yoji Ishikawa Kensuke Fujii Kazuo Toge
Kazuki Ide Hirokazu Tsuji

Abstract

A combined treatment system comprising physical and biological processes has been developed as a "Hybrid Biotreatment System" for degrading chlorinated solvents such as trichloroethylene (TCE) and dichloroethylene (DCE) in soil using a phenol-induced microbe screened as TCE degrading bacteria. This microbe was found to have no toxicity. When this system was applied, TCE in contaminated soil from an actual site (Soil-A) reached the cleanup standard level (0.03 mg/L) within two hours and the decrease of *cis*-1,2-DCE in the soil was even quicker. TCE in modeled soils (Soil-B and Soil-C) did not reach 0.03 mg/L with only turn-over and aeration. However, the addition of bacterial cells lowered the concentration well below that level. No noticeable influence was found of the added microbe on the soil fauna, and the number of the added microbes decreased after the treatment.

概 要

トリクロロエチレン (TCE) などの有機塩素系化合物に汚染された土の浄化法として、物理的処理と生物的処理を組み合わせたハイブリッド型処理システムを考案し、実際の汚染土および人工模擬汚染土を用いて浄化の実証試験を行ないその有効性を確認した。物理的処理は、通気攪拌によるTCEなどの気化促進であり、生物的処理は、安全性の確認されたTCE分解菌を休止菌体の形で適用する生物分解である。予備試験にて検討した浄化最適条件に基づき実施した分解試験において、それぞれ人工模擬汚染土、実汚染土を用いた場合とも処理後のTCE濃度は土壌環境基準値以下であることが明らかになった。実汚染土において共存した *cis*-1,2-ジクロロエチレン (*cis*-1,2-DCE) も分解された。また、浄化終了後には分解菌数は減少し、かつ、土着微生物への影響も見られなかった。

1. はじめに

有機塩素系化合物による土壌・地下水汚染が全国で顕在化している。その一種であるトリクロロエチレン(TCE)は、金属機械部品の洗浄剤として使用されてきており汚染例が多く、また、土壌環境基準値が0.03mg/Lと定められており早急な処理対策が必要となっている。

対策技術として各種の物理化学的方法も開発されているが、生物学的修復方法(バイオレメディエーション)はコストが低廉な省エネルギーの手法であり、かつ、処理後に有害な副生成物がほとんど残らず土の性状も変えないという特徴から有効な対策技術と考えられている。

トリクロロエチレンは自然な条件では生分解し難いが、好氣的代謝を維持する条件下で共代謝により分解を受けることが明らかになっている¹⁾。そこで、自然界より選抜したフェノール資化性のTCE分解微生物を用い、しかもフェノールにより酵素活性を誘導した休止菌体を利用するという方式により汚染土を浄化する技

術に着目した。

バイオレメディエーションでは、原理的に菌体あたりの汚染物質分解量が制限される。一方で、比較的揮散し易いトリクロロエチレンは、とりわけ高濃度汚染土の場合物理的攪拌作業のみでかなりの部分が揮発除去される。そこで、揮散し易い大部分のトリクロロエチレンを攪拌のみで除去する第一段階の「物理的処理」と、揮散できずに土に残留したトリクロロエチレンを微生物作用により環境基準値以下にまで分解する第二段階の「バイオレメディエーション」を組み合わせた「ハイブリッド型バイオレメディエーション処理システム」を考案した²⁾。

本報告では、トリクロロエチレン等で汚染された一種類の実汚染土、および、二種類のトリクロロエチレン人工模擬汚染土を用いた実証実験の結果について述べる。また、本システムにおけるTCE分解微生物と処理方式に関する安全性について報告する。最後に、本システムの適用性について考察する。

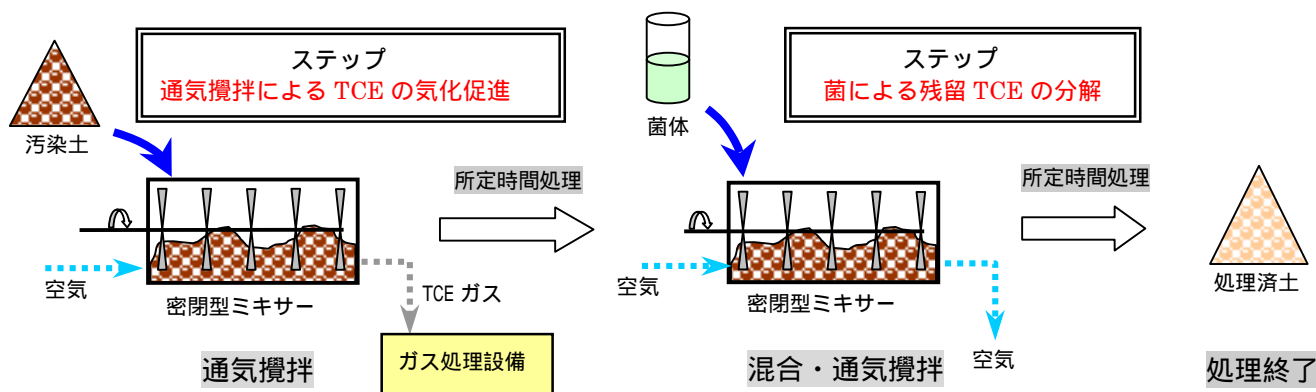


Fig.1 「ハイブリッド型バイオレメディエーション処理システム」における浄化処理の流れ
Schematic Flow of "Hybrid Bioremediation System"

2. 「ハイブリッド型バイオレメディエーション処理システム」の原理と特徴

2.1 システムにおける浄化処理の流れ

「ハイブリッド型バイオレメディエーション処理システム」における浄化処理の流れをFig.1に示す。

第一段階では、密閉容器内において通気攪拌により、トリクロロエチレンの気化を促進する。これにより、土中の汚染物質濃度を生物処理のメリットが得られるレベルまで低減する。気化したガスは活性炭を充填したガス処理設備に導かれてトラップされる。

第二段階では、同一容器内において、TCE分解菌を添加し通気攪拌を行うことで菌体と汚染物質を常に効率よく接触させ、好氣的条件下で汚染物質を環境基準値(0.03mg/L)以下にまで分解する。

2.2 システムの特徴

処理工程はすべて単一の容器内で行われ、処理はバッチ方式である。第一段階の物理処理により汚染物質濃度が大きく減少するので、第二段階における生物処理単独での使用菌体量が少なく全処理時間が短く済む。したがって、コストの更なる低減化が図られている。ハイブリッド型を採用したため高濃度の汚染にも対応可能であり、かつ、物理的処理だけでは環境基準に達しない粘性土等の汚染にも適用可能である。

3. 実証試験

3.1 試験概要

本システムの有効性を確認するために、室内試験規模で55L容の攪拌装置を用い、実汚染土と人工模擬汚染土を対象とした実証試験を行った。試験に先立ち、浄化条件の予備検討として、物理的処理のための条件と生物的処理のための条件の検討を行なった。これらの検討結果に基づき、ハイブリッド型の処理試験を行ない、効果を確認した。



Photo 1 試験装置全景
Experimental Apparatus

3.2 試験装置

攪拌装置、通気用ブロアおよびコンプレッサー、ガス処理設備(活性炭吸着塔)、制御盤から構成される。Photo 1に試験装置全景を示す。

攪拌装置内容積は55Lであり、その内部には攪拌翼による攪拌機構を持つ。容器内にはブロアおよびコンプレッサーにより空気が供給される。気化したTCEを含む空気は容器から排出され、ガス処理設備で浄化され、清浄な空気として系外に放出される。本システムにおける物理的気化促進、および、微生物による好氣的共代謝、のいずれの処理過程においても、攪拌、通気の設定が重要であるため、物理的形狀の工夫のほかに、運転時間、攪拌翼回転数、通気量などが調整可能となっている。

3.3 使用菌体

トリクロロエチレンなどは、好氣的条件下で共代謝により分解することが知られており、メタン、フェノール、トルエンなどを資化できる微生物により効率よく分解される。浄化にあたっては分解能力のより高いものを使うことが有効であるため、本報告では、TCE分解能力を持つ菌体を新たに選抜し、試験に用いた。

この微生物は、自然環境から単離した菌体であり変異

操作等を行っていない。16S rRNA遺伝子の系統解析によれば、分類学的にはJanibacter属と考えられる。20~30の条件下、中性pH域において良好に増殖し、栄養培地あるいは無機培地（炭素源としてグルコース等を含む）等で培養可能なフェノール資化性菌である。

菌の安全性を確認するためTable 1に示す試験を実施したところ、汚染土浄化に用いる場合の安全性については問題はないとの判定を得た。また、PCRによる遺伝子検出法および選択培地を用いた生菌数計数による当菌の検出が可能である。

菌体の利用方式として、菌体を培養後に集菌・洗浄操作を行い、TCE分解酵素の誘導剤であるフェノールを除去した休止菌体を土中に投入する方法を採用した。休止菌体方式は以下の利点を持つ。

- (1) それ自体有害なフェノールを土壌へ投入することがない。
- (2) 土中に投入後に栄養塩添加が不要なため栄養塩による二次汚染の心配がない。
- (3) 誘導剤を伴わないため、浄化後に土中にて菌体が増殖する可能性がきわめて低い。

分解菌を休止菌体として用いる場合のTCE分解能については、Fig. 2に示す液体系での分解例の通りであり、10⁹cfu/mLの菌体濃度で1日当り30~50mg/LのTCEを分解できる。

3.4 供試汚染土

3.4.1 種類 実際のTCE汚染サイトより採取した実汚染土「土-A」、および、沖積土を用いて作成した人工模擬汚染土「土-B」、自然含水比の大きな粘性土として関東ロームを用いて作成した人工模擬汚染土「土-C」を試験対象とした。人工模擬汚染土の作成方法としては、汚染物質を蒸気で土に添加する方法が提案されているが³⁾、本報告では、風乾した土にTCEを付着する方法で人工汚染土を作製した。

3.4.2 土質 供試土の土質性状をTable 2に示す。

3.4.3 汚染状況 実際のサイトから採取された「土-A」について、土壌の汚染に係る環境基準の定められた化学物質25種および関連する水質要監視項目物質を調べた結果、TCEとそれに由来する物質のみで汚染されていることが判明した。Table 3に、「土-A」におけるTCEとその関連物質の汚染濃度を示す。TCE濃度は土壌環境基準値（0.03mg/L）を超えていた。TCEの脱塩化物質であるシス-1,2-ジクロロエチレン、1,1-ジクロロエチレン、トランス-1,2-ジクロロエチレン、塩化ビニルモノマーの汚染が見出された。この結果から、「土-A」はTCEにより汚染されたものであり、脱塩素化反応が進んでいることが推測された。TCEが好気的条件下で生分解してできるジクロロ酢酸の濃度は検知限界以下だったので、好気的な生分解は進んでいないことが推測された。

3.5 分析方法

分析項目および方法をTable 4に示す。TCE濃度の分析

Table 1 使用TCE分解菌の安全性試験項目
Non-Toxicity Tests of The TCE Degrading Microbes

試験番号	試験項目
1	ウサギを用いた単回経皮投与毒性試験
2	ウサギを用いた目一次刺激性試験
3	ラットを用いた単回経口投与毒性試験
4	ラットを用いた単回静脈内投与毒性試験
5	ラットを用いた単回経気道投与毒性試験
6	ウズラを用いた経口投与による鳥類影響試験
7	ヒメダカを用いた淡水魚影響試験
8	ミジンコを用いた淡水無脊椎動物影響試験
9	藻類を用いた生長阻害試験
10	モルモットを用いた経口投与による皮膚感作性試験(ドレイズ法)
11	モルモットを用いた皮膚感作性試験(ビューラー法)

試験は、OECD Principles of Good Laboratory Practices および日本国農林水産省「農薬の毒性試験の適性実施に関する基準」に従って実施した。

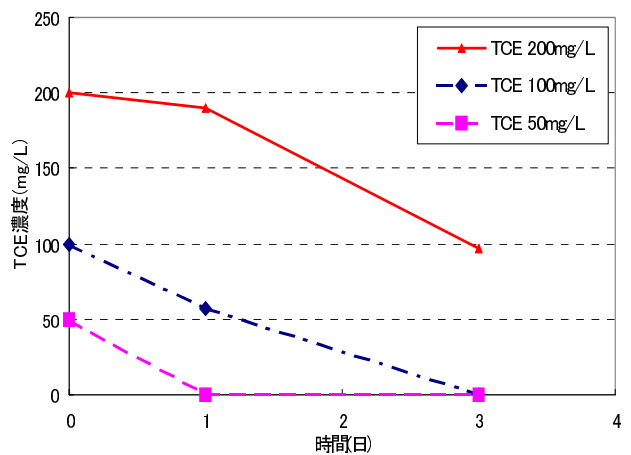


Fig.2 TCE分解菌の液体系でのTCE分解能力
Degrading Rates of TCE by The TCE Degrading Microbes

Table 2 供試汚染土の土質性状
Physico-Chemical Characteristics of The TCE Contaminated Soils

測定項目	土-A	土-B	土-C
土粒子密度(g/cm ³)	2.65	2.72	2.60
自然含水比(%)	43.8	25.7	73.5
液塑性限界(%)			
液性限界	46.6	28.9	114.8
塑性限界	32.9	19.7	79.2
粒度分布(%)			
礫分 2~75mm	4	0	0
砂分 75μm~2mm	52	53	47
シルト分 5~75μm	30	35	36
粘土分 5μm以下	14	12	17
土質分類	細粒分質砂 SF	シルト質砂 SM	砂質有機質粘土
pH	6	6.5	
強熱減量(%)	4.6	4.0	14.4

Table 3 「土-A」の汚染濃度
Concentration of Contaminants in "Soil-A"

物質	汚染濃度 mg/L	土壌環境基準値 mg/L
トリクロロエチレン TCE	0.1~1.8	0.03
シス-1,2-ジクロロエチレン cis-1,2-DCE	2.0	0.04
1,1-ジクロロエチレン 1,1-DCE	0.005	0.02
トランス-1,2-ジクロロエチレン trans-1,2-DCE	0.018	0.04 *
塩化ビニルモノマー VC	0.40	
ジクロロ酢酸 DCAA	<0.002	0.02 **

* : 水質要監視項目指針値

** : 水道水質要監視項目指針値

は、溶出量について公定法（JIS K 0125）を用い、含有量については、溶媒で抽出し、振とう後、溶媒相のTCEをGC-MSで分析した。

3.6 浄化条件の予備検討

3.6.1 物理的処理のための条件 物理的処理の原理は通気攪拌によりTCEの揮散を促進して浄化を行うことにあり、処理能に影響を与える条件としては、通気方法と通気量、攪拌量、土の含水比、が考えられた。

(1) 通気方法および通気量 コンプレッサーによる土中への空気の強制的な噴出の有無、および、その噴出量による気化への影響を調べた。その結果、含水比が高く気化しにくい状況では噴出量が大きいほど気化量が多かった。

(2) 攪拌量 土の取扱い易さと装置への負担を考慮して攪拌翼の回転数は高くないレベルで一定とし、連続もしくは間欠運転による気化促進効果を検討した。結果として、連続攪拌は間欠攪拌とそれほど効果の点で変わらなかった。

(3) 土の含水比 含水比が高いほど気化を抑制する状況にあった。これは、汚染物質の周囲に常に水があるため、汚染物質が直接気相に触れて気化することが無く、水中に溶出するか移動した後にしか気化できないためと考えられた。

これらの予備試験の結果として、物理処理過程では通気については土中への噴出量が多いほど気化促進効果がすぐれ、土の含水比による気化への影響も大きい。物理処理中は含水比の調整を極力控え、低含水比で処理を行うことが気化を促進するうえで重要であることが明らかとなった。

3.6.2 生物的処理のための条件 生物的処理に影響を及ぼす要素として、土壌中の分解阻害物質、添加菌体量、系内の酸素量、土の含水比、が考えられた。

(1) 分解阻害物質 汚染土によっては分解菌の活動を阻害する物質を含む場合があるので「土-A」について通常より多い菌体量を添加して、阻害物質の存在有無を確認した。結果は阻害物質が含まれないことを示し、TCEやDCEなどを生分解することができる汚染土であることが判明した。

(2) 添加菌体量 使用した分解菌によるTCEなどの個々の分解速度データは取得しているものの、「土-A」はTCEを含む有機塩素化合物の複合汚染なので、異なるレベルの菌体量の添加による分解試験を行い、必要な菌体量を導き出すこととした。個々の物質に対する分解試験の結果、cis-1,2-DCEの分解速度はTCEよりも速いことが分かった。「土-A」については、含まれるすべての汚染物質に対して、菌体量は 3×10^9 CFU/g-dry soil以上であれば浄化可能であった。実際の処理では、生物処理開始時の汚染物質濃度に応じた菌体量の調整が必要である。

(3) 系内の酸素量 本技術で使用している分解菌は、TCEなどを好気条件下で酸化分解する菌である。浄化処理系内で酸素が不足すると菌体の活動が停止し分解が行

Table 4 本試験における分析方法 Analytical Methods

分析項目		分析方法	
汚染物質濃度	cis-1,2-ジクロロエチレン、トリクロロエチレン	溶出量	公定法 (JIS K 0125)
		含有量	溶媒抽出 GC-MS 法
	ジクロロ酢酸	溶出量	公定法 (GC-MS 法)
使用菌体	菌体数	選択培地使用	
土着微生物	一般細菌数	希釈平板法 (アルブミン培地)	
	大腸菌群数	最確数定量法	
	放線菌	希釈平板法 (アルブミン培地)	
	糸状菌	希釈平板法 (ローズベンガル培地)	

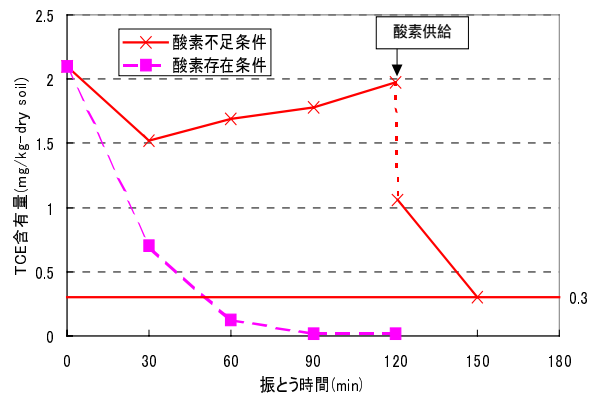


Fig.3 生物処理時における酸素の影響 Influence of Oxygen on TCE Bio-Degradation

われなくなる。そこで、酸素不足の状況下での菌体の分解活動と、酸素が不足した状況に酸素を供給した後の菌体の分解活動を試験により調査することとした。試験では酸素不足の状況を、系内の水に窒素を吹き込み溶存酸素量を低減させ、気相部にも窒素を吹き込むことで作製した。この状況下で分解効果の確認試験を実施し、その後、酸素を吹き込んで酸素存在状況にし、分解効果を確認した。結果をFig.3に示す。この結果から、酸素が不足した状況下では分解が進まないが、その後に酸素が供給されれば浄化は十分に行われることが明らかとなった。

3.7 ハイブリッド型処理による分解試験

3.7.1 試験方法 物理的処理と生物的処理を組み合わせた試験であり、基本的に、汚染土20kg-wetを用い、攪拌装置を設定条件で運転しつつ、所定時間後に菌体投入およびイオン交換水添加を実施する。菌体添加量、土中噴出量、攪拌量、土の含水比については複数の条件で試験を実施した。

3.7.2 ハイブリッド型処理の効果 人工模擬汚染土「土-B」および「土-C」を使用して行なった試験の結果をFig.4およびFig.5に示す。図には併せて実施した菌体

非混合系の試験結果も記載した。図から明らかなように、「土-B」、「土-C」ともに、通気攪拌で徐々に濃度が低減するが、前者で40hr、後者で25hr継続しても環境基準値以下にならなかった。これに対して、通気攪拌で0.1mg/L程度まで低減した段階で菌体を添加混合すると、添加後2~3hr後には環境基準値以下までに処理することができている。

実汚染土「土-A」を対象とした場合の分解試験の結果の例をFig.6に示す。環境基準値の10倍程度含まれていたTCEは、処理開始約2時間後、菌体投入約1時間後で環境基準値(0.03mg/L、図中で太線で示す)を下回った。同じ試料に含まれていたcis-1,2-DCEについてはTCEよりも早く浄化された。ただし、この「土-A」は、汚染物質が気化しやすい汚染状況であったために物理処理の効果が生物処理の効果に比べてはるかに大きく、生物処理の効果は顕著には見られなかった。

3.7.3 分解副生成物 一般にTCEを好氣的条件下で生物処理すると、その分解副産物としてジクロロ酢酸(DCAA)が生成される可能性がある。DCAAは水道水質の要監視項目に指定される物質でその指針値は0.02mg/Lである。本試験において生物処理実施前、実施中、処理完了時において濃度を測定した。ほとんどの試験で処理中にDCAAの濃度が上昇したが、すべての試験において終了時には指針値を下回っていた。このことから、中間産物として一時DCAAが生成するが、これも最終的には生分解されていると推測できた。

3.7.4 菌体数の推移 本技術で浄化を実施した土は、高含水比で処理を行った場合の含水比を除き特に物性に大きな変化は無いため掘削箇所への埋戻しが可能である。その場合には生物処理で添加した分解菌が含まれたまま埋め戻されるため、土壌中の微生物環境への分解菌の影響が懸念される。そこで、土中環境に存在する微生物(土着微生物)への影響を、種々の微生物の菌体数の変化をもって判断した。Table 5に、一般細菌数、大腸菌群数、放線菌数、糸状菌数についての生物処理の実施前と処理完了後の菌体数を示す。なお、一般細菌数および放線菌数は区別せず計測し、処理完了後はTCE分解菌数が含まれるため、検討材料とはしなかった。表から明らかなように、一般細菌については大腸菌群数、糸状菌数を指標として考えると、分解菌の添加による劇的な増減はなく影響は無かった。加えて、TCE分解菌については処理土壌を保存し長期的な菌体数変化についても測定した。保存方法については容器に入れ室内保存もしくは土壌中に埋めて屋外保存とした。Fig.7に一例を示すように、分解菌は日数の経過とともに減少傾向にあり土壌中での増殖は認められなかった。

4. 「ハイブリッド型バイオレメディエーション処理システム」の評価

4.1 浄化効果

沖積粘性土「土-B」と関東ローム系「土-C」の人工模擬汚染土については、物理的攪拌に引き続く生物的処理

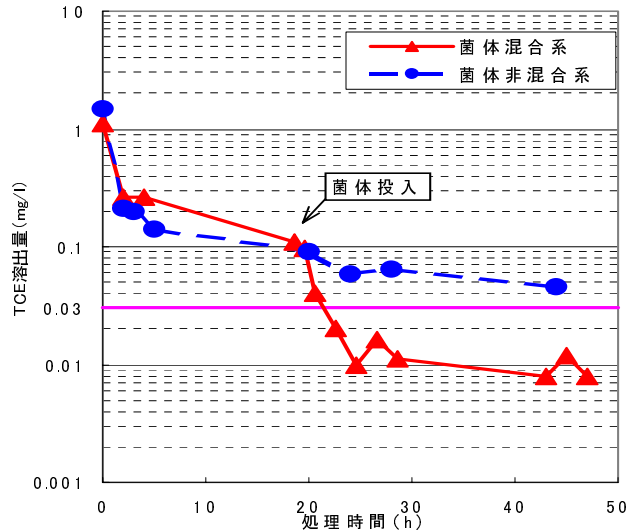


Fig.4 ハイブリッド型処理におけるTCE濃度変化(「土-B」)
TCE Concentration during the Hybrid System (Soil-B)

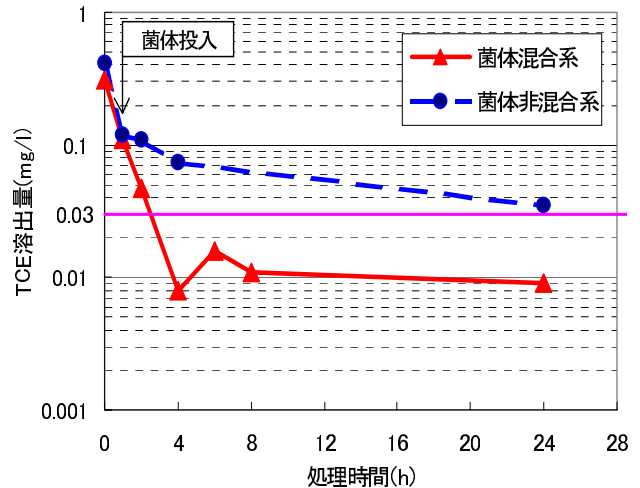


Fig.5 ハイブリッド型処理におけるTCE濃度変化(「土-C」)
TCE Concentration during the Hybrid System (Soil-C)

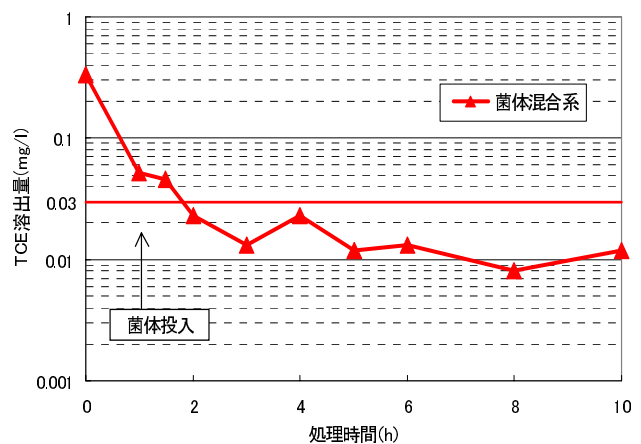


Fig.6 ハイブリッド型処理におけるTCE濃度変化(「土-A」)
TCE Concentration during the Hybrid System (Soil-A)

をもって基準値以下に到達した。実汚染土「土-A」は比較的汚染物質が溶出し易かったことから、基準値以下まで達したもののハイブリッド型処理の効果は顕著に見られなかった。土質に応じて方法を選定していくことで各種の土に対して本技術が有効であることが明らかになった。

4.2 安全性

本技術において問われる安全性として、菌体自体の安全性、生物処理に伴う有害副生成物生成の可能性、分解菌投入による土中の常在微生物類への影響、が考えられた。

菌体自体については、3.3節に述べたように安全性試験において安全であることが確認されている。有害物質の生成については、TCEの分解副生成物であるジクロロ酢酸の生成を確認したが、処理土における濃度は安全なレベルであった。分解菌投入による土中常在菌は、大腸菌群および糸状菌を指標として処理の前後で比較すると処理後に大きく変化することはなかった。また、投入したTCE分解菌自体は、休止菌体として使用し栄養分の添加も行わなかったため増殖も起こらず、処理終了後の時間の経過とともにその生菌数の減少が確認された。したがって、本技術の安全性に関しては問題がないといえる。なお、処理に伴う物理的な影響としては含水比の上昇のみでありpHの大きな変化や化学物質の混入はなかった。

4.3 経済性

本技術は、鉄粉混合法などの物理化学処理法とほぼ同じコストで実行可能であると試算された。全コストのうちイニシャルコストは、汚染土の性状に応じて決定されるべき処理に要する時間に依存する。ランニングコストは相対的に低いがやはり処理時間に比例する。処理時間のさらなる短縮を図ることにより同条件の汚染土でも処理コストが低減されることが示唆された。

4.4 適用条件

4.4.1 物理的処理の適用条件 汚染物質の吸着特性や溶出特性によるが、試験結果から土の含水比も大きな要因であることが判明した。粘性土の場合には攪拌を容易にするために含水比の調整が必要である。一方、含水比が高い場合には気化を促進するために通気量を増大する必要がある。吸着特性によらず物理処理による汚染濃度のかなりの低減が可能であることが明らかになったので、相当な高濃度汚染土であっても生物処理の可能なレベルまで物理処理により低減できる。

4.4.2 生物的処理の適用条件 「土-A」のように溶出・気化しやすい汚染土の場合には、物理的処理のみで短期間に基準値以下にまで浄化が可能なので生物的処理は不要であろう。生物的処理が必要な土については、分解阻害物質が存在しないことを条件に、処理に必要な菌体量の添加とともに、酸素量が生物的処理に大きく影響することから、含水比・通気量の適切な制御が必要である。

Table 5 処理前後の各種微生物数の変化
Number of Several Types of Microorganisms Before and After the Treatment

試験	TCE 分解菌 添加数	調査項目	生物処理前	生物処理完了時
A	3.0 × 10 ¹⁰	一般細菌・放線菌数 CFU/g-dry soil	1.1 × 10 ⁶	-
		大腸菌群数 MPN/ g-dry soil	4.8 × 10 ⁴	3.0 × 10 ⁵
		糸状菌数 個/ g-dry soil	4.7 × 10 ³	1.4 × 10 ³
B	3.0 × 10 ¹⁰	一般細菌・放線菌数 CFU/g-dry soil	1.1 × 10 ⁶	-
		大腸菌群数 MPN/ g-dry soil	2.4 × 10 ⁴	1.5 × 10 ⁴
		糸状菌数 個/ g-dry soil	6.8 × 10 ³	1.6 × 10 ⁴
C	3.0 × 10 ⁹	一般細菌・放線菌数 CFU/g-dry soil	1.1 × 10 ⁶	-
		大腸菌群数 MPN/ g-dry soil	5.7 × 10 ³	2.4 × 10 ⁴
		糸状菌数 個/ g-dry soil	5.5 × 10 ³	1.3 × 10 ⁴

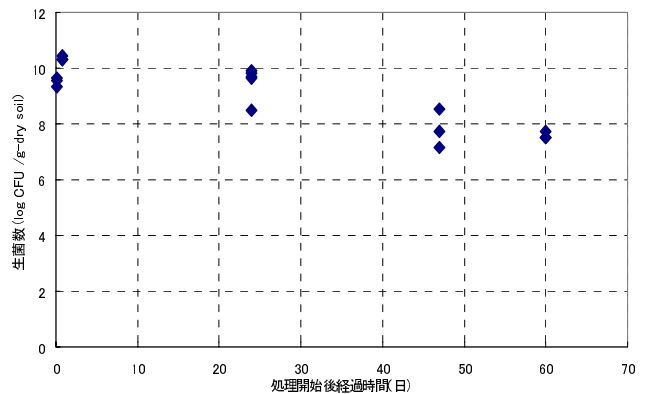


Fig.7 処理土中のTCE分解菌数の経日変化
Number of TCE degrading bacteria in the Treated Soil

5. おわりに

本研究の一部は、平成11年度環境庁（現環境省）土壌・地下水汚染対策新技術実証調査の補助金を受けた。

参考文献

- 1) ジョン・T・クックソン, Jr. 著, 藤田, 矢木監訳: バイオレメディエーションハンドブック- 設計と応用-, エヌ・ティー・エス, (1997)
- 2) 藤井, 井出, 石川, 辻: ハイブリッド方式によるTCE汚染土壌の浄化, 地下水・第7回土壌汚染とその防止対策に関する研究集会, (2000)
- 3) 渡邊, 宮本, 神子, 浦野: 揮発性有機物汚染土壌試料の調整方法, 水環境学会年会, (1997)