

微生物の地層処分環境条件における 馴化の研究

(核燃料サイクル開発機構 業務委託報告書)

2002年2月

株式会社 関西新技術研究所

本資料の全部または一部を複写・複製・転載する場合は、下記にお問い合わせください。

〒319-1194 茨城県那珂郡東海村大字村松 4 番地 33
核燃料サイクル開発機構 東海事業所
運営管理部 技術情報室

Inquiries about copyright and reproduction should be addressed to:

Technical Information Section,
Technology management
Administration Division,
Tokai Works,
Japan Nuclear Cycle Development Institute
4-33 Muramatsu, Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki-ken, 319-1184,
Japan

©核燃料サイクル開発機構 (Japan Nuclear Cycle Development Institute)
2002

微生物の地層処分環境条件における馴化の研究

(核燃料サイクル開発機構 業務委託報告書)

藤原 和弘 川嶋 文人

要 旨

TRU 廃棄物の処分方法として、セメント系材料を構造体とした地下への埋設処分が検討されている。この処分システムの安全性に影響を与える要因となりうる項目の一つとして地下環境における微生物による有機物分解の可能性があげられている。本研究では、セメント系材料の影響によって処分場が長期間保持されていると考えられている。高アルカリ環境における微生物による有機物分解性の評価に資するデータを獲得することを目的として、TRU 廃棄物に含まれる有機物のなかで最も量の多いアスファルト（ブローンアスファルト）を対象に、微生物の高アルカリ環境への馴化試験及び微生物によるアスファルト分解試験を実施した。まず異なる3つの天然環境にある微生物群を採取し、アスファルトを炭素源とする高アルカリ環境での馴化培養を行った。次にこの馴化微生物を用いて高アルカリ環境でのアスファルトの分解試験を実施した。なお本研究では微生物によるアスファルトの分解速度を評価するために、バイアル試験と結晶皿試験を行った。バイアル試験ではIC、TOC、微生物種、微生物濃度の測定を、結晶皿試験ではアスファルト分解量、微生物濃度を評価した。さらに遺伝子解析手法（DGGE&シーケンス法）を用いて、アスファルト分解に関与する微生物についても解析を行った。その結果 pH12.5 の高アルカリ環境下において微生物がアスファルトを分解しうることを示唆する結果が得られた。また、アスファルトを炭素源として高アルカリ環境に馴化した微生物のアスファルト分解活性は嫌気条件では好気条件より大きく低下した。

本報告書は株式会社関西新技術研究所が核燃料サイクル開発機構との契約により実施した研究成果に関するものである。

機構担当課室：東海事業所 処分研究部 処分材料研究グループ

株式会社関西新技術研究所

Experimental Studies of Microbial Acclimation to Condition of Geological Disposal System
(Document Prepared by Other Institute, Based on the Trust Contract)

Kazuhiro Fujiwara* and Ayato Kawashima*

Abstract

TRU waste is disposed of deep underground by packed in cement compounds as engineering barrier material. One of negative effects to this disposal system is supposed to be ability of microbial degradation of organic compounds. This disposal system might be exposed to high alkali condition by cement compounds. For estimating the quantity of degradation of organic compounds under high alkali conditions, asphalt (blown asphalt) that is the major ingredient of TRU waste was used for the microbial acclimation test to high alkali condition and degradation test. After microbial were collected as water samples from three different conditions, those were cultured with asphalt as carbon source for acclimation under high alkali conditions. These acclimated microbial were used for vial and plate test measuring degradation rate of asphalt at high alkali condition. Estimation items were ICs, TOCs, groups and cell count of microbial from vial test, and also, quantity of asphalt degradation and cell count of microbial from plate test. Furthermore, the genetic information of microbial was analyzed with the DGGE method and those sequencing data. The result shows that microbial might degrade asphalt under high alkali condition like pH 12.5, and it was less asphalt degradation rate in anaerobic than in aerobic condition.

This work was performed by Kansai Research Institute, Inc. under contract with Japan Nuclear Cycle Development Institute.

JNC Liaison: Materials Research Group, Waste Isolation Research, Division, Tokai works.

*Kansai Research Institute

目 次

| | |
|------------------------------------|--------------|
| 1 はじめに | ・ ・ ・ ・ ・ 1 |
| 2 高アルカリ環境馴化サンプルのアスファルト分解試験及び評価 | |
| 2.1 多環芳香族馴化サンプルによるアスファルト分解試験の概要 | ・ ・ ・ ・ ・ 1 |
| 2.2 試験方法 | ・ ・ ・ ・ ・ 1 |
| 2.2.1 多環芳香族馴化サンプル | ・ ・ ・ ・ ・ 1 |
| 2.2.2 分解試験方法 | ・ ・ ・ ・ ・ 2 |
| 2.2.3 評価項目 | ・ ・ ・ ・ ・ 2 |
| 2.2.4 評価方法 | ・ ・ ・ ・ ・ 6 |
| 2.3 結果 | ・ ・ ・ ・ ・ 6 |
| 2.3.1 sample TN160AA の試験結果 | ・ ・ ・ ・ ・ 6 |
| 2.3.2 sample TN180AA の試験結果 | ・ ・ ・ ・ ・ 7 |
| 2.3.3 遺伝子シーケンスの結果 | ・ ・ ・ ・ ・ 8 |
| 2.4 多環芳香族馴化サンプルによるアスファルト分解試験に関する考察 | ・ ・ ・ ・ ・ 8 |
| 3 アスファルトを栄養源とした高アルカリ環境への馴化試験及び評価 | |
| 3.1 概要 | ・ ・ ・ ・ ・ 10 |
| 3.2 試験方法 | ・ ・ ・ ・ ・ 10 |
| 3.2.1 天然環境サンプルの選定及び採取 | ・ ・ ・ ・ ・ 10 |
| 3.2.2 馴化方法 | ・ ・ ・ ・ ・ 10 |
| 3.2.3 評価方法 | ・ ・ ・ ・ ・ 11 |
| 3.3 結果 | ・ ・ ・ ・ ・ 11 |
| 3.3.1 直接計数法による微生物濃度の測定 | ・ ・ ・ ・ ・ 11 |
| 3.3.2 プレートによる生菌数の測定 | ・ ・ ・ ・ ・ 12 |
| 3.3.3 微生物種の測定 | ・ ・ ・ ・ ・ 12 |
| 3.4 アスファルトを栄養源とした馴化試験に関する考察 | ・ ・ ・ ・ ・ 13 |
| 4 アスファルト馴化サンプルによるアスファルト分解試験及び評価 | |
| 4.1 概要 | ・ ・ ・ ・ ・ 13 |
| 4.2 試験方法 | ・ ・ ・ ・ ・ 14 |
| 4.2.1 アスファルト馴化サンプル | ・ ・ ・ ・ ・ 14 |
| 4.2.2 分解試験方法 | ・ ・ ・ ・ ・ 15 |
| 4.2.3 評価方法 | ・ ・ ・ ・ ・ 15 |
| 4.3 結果 | ・ ・ ・ ・ ・ 15 |
| 4.3.1 sample TN160 の試験結果 | ・ ・ ・ ・ ・ 15 |

| | |
|-------------------------------------|--------------------|
| 4.3.2 sample TN180 の試験結果 | ・ ・ ・ ・ ・ 16 |
| 4.3.3 sample HG600 の試験結果 | ・ ・ ・ ・ ・ 17 |
| 4.3.4 sample HG700 の試験結果 | ・ ・ ・ ・ ・ 18 |
| 4.3.5 sample OK12 の試験結果 | ・ ・ ・ ・ ・ 18 |
| 4.3.6 遺伝子シーケンスの結果 | ・ ・ ・ ・ ・ 19 |
| 4.4 アスファルト馴化サンプルによるアスファルト分解試験に関する考察 | ・ ・ ・ ・ ・ 20 |
| 5 高アルカリ環境における微生物によるアスファルトの分解速度の評価 | |
| 5.1 採取サンプルの違いによる影響 | ・ ・ ・ ・ ・ 21 |
| 5.2 微生物生存 アスファルト分解 環境の影響 | ・ ・ ・ ・ ・ 22 |
| 6 おわりに | ・ ・ ・ ・ ・ 22 |
| 参考文献 | ・ ・ ・ ・ ・ 23 |
| 付録 アスファルト分解試験後の微生物に関する情報 | ・ ・ ・ ・ ・ 付 1 (62) |

図目次

| | | |
|-----|---------------------------------|-------|
| 図 1 | 多環芳香族馴化サンプルによるアスファルト分解 | ・・・24 |
| 図 2 | 活性染色プロトコール | ・・・25 |
| 図 3 | 蛍光染色プロトコール | ・・・26 |
| 図 4 | アスファルトによる馴化とアスファルト分解試験 | ・・・27 |
| 図 5 | アスファルトによる馴化培養における TN160 の総菌数の推移 | ・・・28 |
| 図 6 | アスファルトによる馴化培養における TN180 の総菌数の推移 | ・・・29 |
| 図 7 | アスファルトによる馴化培養における HG600 の総菌数の推移 | ・・・30 |
| 図 8 | アスファルトによる馴化培養における HG700 の総菌数の推移 | ・・・31 |
| 図 9 | アスファルトによる馴化培養における OK12 の総菌数の推移 | ・・・32 |

表目次

| | | |
|------|---|-------|
| 表 1 | 採取地下水サンプル | ・・・33 |
| 表 2 | 培養液組成 | ・・・34 |
| 表 3 | PCR 法の反応条件 | ・・・35 |
| 表 4 | 多環芳香族馴化サンプルによるアスファルト分解試験 (TN160AA : バイアル試験) | ・・・36 |
| 表 5 | 多環芳香族馴化サンプルによるアスファルト分解試験 (TN160AA : 結晶皿試験) | ・・・37 |
| 表 6 | 多環芳香族馴化サンプルによるアスファルト分解試験 (TN180AA : バイアル試験) | ・・・38 |
| 表 7 | 多環芳香族馴化サンプルによるアスファルト分解試験 (TN180AA : 結晶皿試験) | ・・・39 |
| 表 8 | 分析対象微生物 (多環芳香族馴化サンプル) | ・・・40 |
| 表 9 | アスファルト分解試験前後の微生物相 (多環芳香族馴化サンプル) | ・・・41 |
| 表 10 | 多環芳香族馴化サンプルによるアスファルト分解試験ブランク測定実測データ | ・・・42 |
| 表 11 | 多環芳香族馴化サンプルによるアスファルト分解試験のまとめ | ・・・43 |
| 表 12 | 採取地下水サンプル | ・・・44 |
| 表 13 | アスファルトによる馴化培養における微生物濃度 (1ml あたり) | ・・・45 |
| 表 14 | アスファルトによる馴化培養における微生物種数 | ・・・46 |
| 表 15 | アスファルト馴化サンプルによるアスファルト分解試験ブランク測定実測データ | ・・・47 |
| 表 16 | アスファルト馴化サンプルによるアスファルト分解試験 (TN160 : バイアル試験) | ・・・48 |
| 表 17 | アスファルト馴化サンプルによるアスファルト分解試験 (TN160 : 結晶皿試験) | ・・・49 |
| 表 18 | アスファルト馴化サンプルによるアスファルト分解試験 (TN180 : バイアル試験) | ・・・50 |
| 表 19 | アスファルト馴化サンプルによるアスファルト分解試験 (TN180 : 結晶皿試験) | ・・・51 |
| 表 20 | アスファルト馴化サンプルによるアスファルト分解試験 (HG600 : バイアル試験) | ・・・52 |

| | | | |
|------|---|-----|----|
| 表 21 | アスファルト馴化サンプルによるアスファルト分解試験(HG600：結晶皿試験) | ・・・ | 53 |
| 表 22 | アスファルト馴化サンプルによるアスファルト分解試験(HG700：バイアル試験) | ・・・ | 54 |
| 表 23 | アスファルト馴化サンプルによるアスファルト分解試験(HG700：結晶皿試験) | ・・・ | 55 |
| 表 24 | アスファルト馴化サンプルによるアスファルト分解試験(OK12：バイアル試験) | ・・・ | 56 |
| 表 25 | アスファルト馴化サンプルによるアスファルト分解試験(OK12：結晶皿試験) | ・・・ | 57 |
| 表 26 | 分析対象微生物（アスファルト馴化サンプル） | ・・・ | 58 |
| 表 27 | アスファルト分解試験前後の微生物相（アスファルト馴化サンプル） | ・・・ | 59 |
| 表 28 | アスファルト馴化サンプルによるアスファルト分解試験のまとめ | ・・・ | 60 |
| 表 29 | 微生物サンプルの（TC）総炭素量測定結果 | ・・・ | 61 |

1 はじめに

以前は、現状の処分システムでは、人工バリア材料としてセメント系材料の使用が想定されており、処分環境が pH12 以上の高アルカリとなると予測されるので、このような環境においては、微生物の活性がほとんどないと考えられてきた。

しかしながら、近年の研究により、地下深部に多種多様な微生物が生息していること、地上では高アルカリ環境に順応している微生物が普遍的に存在する可能性が高いことが明らかになってきた(掘越 et al.,1993)。このため、地下深部においても高アルカリ環境に順応する(以下、馴化と記す)微生物が存在することは否定できず、たとえ pH12 以上であっても微生物が処分システムに影響を与える可能性が存在する。また、TRU 廃棄物の中には有機物を含むものも存在するため、処分場において微生物の栄養源となる可能性がある。

そこで本研究では、高アルカリ環境における有機物の微生物による分解性(Potter et al.,2001;Proctor et al.,2001;Brunner et al.,1987)の評価を目的として、TRU 廃棄物に含まれる有機物のなかで最も量の多いアスファルト(ブローンアスファルト)を対象に、微生物の高アルカリ環境への馴化試験及び微生物によるアスファルト分解試験を実施した。なお、本研究では、近年微生物の動態解析手法として注目されている、遺伝子解析手法である DGGE(変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法)&シーケンス法(Gerard et al.1993;春日 et al.,2001)を用いて、アスファルト分解に關与する微生物についても検討を行った。

2 高アルカリ環境馴化サンプルのアスファルト分解試験及び評価

2.1 多環芳香族馴化サンプルによるアスファルト分解試験の概要

平成 12 年度に高アルカリ環境下、多環芳香族を炭素源として馴化した微生物群を用いて、pH10.5、11.5、12.5 におけるアスファルトの分解試験を行った。好気性条件(+)及び嫌気性条件(-)にて試験を行い(以下各サンプルを TN160AA+10.5 : sample TN160AA、好気条件下、pH10.5 のように表記する)、アスファルトの分解速度(6 週間の分解量)を評価した。アスファルト分解速度は、試験前後の乾燥重量を測定する重量法、および微生物が産生する CO₂ 量(IC)や水系に存在する総有機炭素量(TOC)を測定する方法により評価した。また試験前後の微生物群の 16SrRNA 遺伝子を DGGE&シーケンス法の結果を解析し、微生物種数の把握と同定を行った。さらに、微生物濃度の把握のため、生菌数及び総菌数の測定を行った。

2.2 試験方法

2.2.1 多環芳香族馴化サンプル

平成 12 年度に東濃鉦山(試錐孔 KNA-6)から採取した地下水(表 1 参照; sample TN160、sample TN180)中の微生物群を、ナフタレン、フェナントレンを炭素源としてアルカリ環境下で馴化した微生物を分解試験に供した。アルカリ環境下での馴化は、培地 pH を 7.5、

8.5、9.5、10.5、11.5、12.5 と2週間ごとに1ずつ pH を上昇させることにより行った。これらの馴化サンプルのなかで、アスファルト分解試験には pH10.5、11.5、12.5 での馴化サンプル(図1参照)を用いた。

2.2.2 分解試験方法

微生物によるアスファルト分解性を、バイアル試験と結晶皿試験の2つの方法により評価した。

(1) バイアル試験

バイアル試験は、本研究において新たに導入した試験方法であり、当該試験の目的は、微生物がアスファルトを分解することにより生じる有機、無機炭素を測定し、これによって微生物の代謝活動状況を推定することにある。

試験は、以下の手順により行った。まず、加熱溶融したアスファルトを液体窒素で冷却し、1 mm 程度に粉砕した後、およそ 200mg のアスファルト小片をバイアル瓶(公称 100ml 容)に投入した。次いで、紫外線照射を行い、滅菌した後、所定の無機塩培地 25ml および上記馴化サンプル 25ml を添加して、バイアル瓶をブチルゴム栓で密閉し、所定期間、所定温度で培養を行った。

(2) 結晶皿試験

結晶皿試験は、過去の研究例を参考に、微生物がアスファルトを分解することによって減少するアスファルトを重量変化で評価し、微生物の分解活性を推定しようというものである。

試験は、以下の手順により行った。まず、およそ 5 cm × 5 cm 四方のガラス板におよそ 500mg のアスファルトをのせ、300 で3分間加熱・溶融し、プレート状にしたものを、さらに紫外線照射を行い、滅菌した。次いで、アスファルトプレートを結晶皿の底に置き、バイアル試験同様に、所定の無機塩培地 25ml および上記馴化サンプル 25ml を添加して、所定期間、所定温度で培養を行った。

(3) 分解試験条件

バイアル試験、結晶皿試験ともに、好気あるいは嫌気条件下で、培地 pH をそれぞれ 10.5、11.5、12.5 に調製して、30 で6週間培養した。炭素源はアスファルト(核燃料サイクル開発機構殿より提供)を用いた。分解試験に用いた培地の組成を表2に示す。

2.2.3 評価項目

微生物によるアスファルトの分解速度の評価を目的として、下記項目について測定を行った。

バイアル試験 : IC、TOC、微生物種、微生物濃度

結晶皿試験 : アスファルト分解量、微生物濃度

以下に、各測定方法を示す。

(1) 微生物の代謝に関する測定項目

() IC

微生物の代謝により発生する二酸化炭素が培地のアルカリにより培地に取り込まれて、無機炭素として検出される濃度を示す。本研究では、培地に溶け込んでいる無機炭素量を初期アスファルト投入量で除し、アスファルトを微生物が6週間以内に分解した結果生じたアスファルト単位重量当たりの無機炭素量(分解 IC)を示した。

ICの測定に際しては、バイアル試験の培養液をメンブレンフィルター(DISMIC PTFE 0.2 μ m)で濾過したものを試料とし、ガス測定法にて測定した。

() TOC

微生物分解によって溶出した炭素量とアルカリ分解によって溶出した炭素量の総濃度を示す。本研究では、ICと同様に培地に溶け込んでいる有機炭素量を初期アスファルト投入量で除し、アスファルトを微生物が6週間以内に分解した結果生じたアスファルト単位重量当たりの有機炭素量(分解 TOC)を示した。

TOCは、ICと同様にTC(全炭素量)の測定を行い、TCからICを差し引くことにより算出した。

() アスファルト分解量

試験前の乾重量と試験後の乾重量との差をアスファルト分解量として計測した。このアスファルト分解量は、微生物により分解・消費された量と、微生物に関係なくアルカリにより分解された量の和である。本研究では、微生物が6週間以内に分解したアスファルトの総量をアスファルトの表面積で除し、アスファルト単位面積当たりの微生物が分解したアスファルト重量を示した。

なお試験後の乾重量の測定に際しては、アスファルトの重量変化がなくなるまで(約24時間)室温で乾燥した。

(2) 微生物の増殖に関する測定項目

() 微生物種

DGGE法によって求められた微生物の種類数であり、試験前後の微生物種を比較すると、アスファルト分解試験の過程で変化した微生物の種類数を推定できる。ただし、DGGE法は微生物のDNAを検出する手法であり、そのためPCR増幅等の操作を必要とすることから、PCR増幅可能な濃度を上回っているDNA(微生物)のみが検出可能である。

また、遺伝子配列解析(遺伝子シーケンス)により、アスファルト分解試験の過程で変化

した微生物を同定できた場合には、その微生物の性質や動態に関する情報からアスファルト分解に関する考察を深めることができる。

以下に DGGE 法と遺伝子配列解析（遺伝子シーケンス）の試験方法を示す。

サンプルの濃縮

10ml のサンプルから 1.5ml をエッペンドルフチューブ（1.5ml）に移し 14,000rpm で 5 分間遠心分離した後、上澄み 1.4ml を捨てる。以下同じ操作をサンプルがなくなるまで繰り返し、最終的に 100 μ l の溶液とした（100 倍濃縮）。

サンプルからの DNA 抽出・精製

Genomic DNA Miniprep Kit を用いて、遠心濃縮後のサンプルから、DNA を抽出した。試験手順は Genomic DNA Miniprep Kit Protocol に従って行った。

抽出 DNA の再精製

上記で抽出・精製した DNA をさらに QIAGEN 社製の QIAquick™ Gel Extraction Kit を使用して、電気泳動ゲルから DNA を分離、精製した。試験手順は QIAquick™ Gel Extraction Kit Protocol に従って行った。

精製 DNA の PCR (Polymelase Chain Reaction)

精製した DNA をテンプレートとし、プライマーとして 357fGC (Bacteria-specific, 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGC AGCAG-3'), 518r(universal, 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') を用い、遺伝子の増幅 (PCR) を行った。PCR 反応液、反応条件を表 3 に示す。

PCR-DGGE 法

PCR を行ったサンプルに対し、DGGE 法を行った。DGGE は D code system (Bio Rad 社) を採用し、同社のプロトコルに準拠した。7.5%(wt/vol) ポリアクリルアミドゲルを用い、変性剤の濃度勾配を 40% 70% に設定し、70V、50mA で 13 時間、PCR 産物の電気泳動を行った。泳動終了後 SYBR Gold nucleic acid stain (Molecular Probes) を用いてゲルを 30 分間染色し観測を行った。

DNA の切り出しと GC クランプ除去

DGGE 法により分離されたバンドを切り出し、この回収した DNA をテンプレートとして PCR(357f, 518r) を行った。温度条件は 94 ; 5 分 (94 ; 1 分, 60 ; 1 分, 72 ; 1 分) × 30 サイクル 72 ; 7 分である。

目的遺伝子のクローニング

pGEM-T Vector Systems (Promega 社) を使用して DNA のベクターへの組み込みを行った後、コンピテントセルとして JM109(大腸菌) を使用し、16SrRNA 遺伝子を組み込んだベクターを挿入した。Ampicillin/X-gal/IPTG プレートにて目的遺伝子が導入されたコロニーを選抜し、大量培養を行った。EZNA Plasmid Miniprep Kit(Omega Biotek. Inc) を用いて大腸菌よりプラスミド DNA の抽出を行い、シーケンス反応に供した。シーケンス反応は

BigDye Terminator Cycle Sequence キットを用い、オートシーケンサーABI PRISM 310 Genetic Analyzer(PE Biosystems)により塩基配列を決定した。解読した 16SrRNA 遺伝子の配列は、米 NCBI のホームページ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) の遺伝子解析ソフト (BLAST search) により遺伝子データバンクから相同性の高い遺伝子を持つ微生物を抽出した。さらにこの中から好気、嫌気といった生育環境、あるいは微生物の形状などからサンプリングされる可能性の低い微生物を除き、存在可能性が高いと思われる微生物種を決定した。

() 微生物濃度

直接計数法によって求められた微生物濃度であり、試験前後の微生物濃度を比較すると、アスファルト分解試験の過程で変化した微生物濃度を推定できる。ただし、直接計数法における理想的な微生物濃度は 10^6 cells/ml であり、検体中の微生物濃度がそれを下回る場合には、絶対濃度としての信頼性は劣るが、本法は、微生物濃度をリアルタイムに推定できるため、試験に供する微生物濃度をほぼ均一に設定する場合や微生物濃度変化を簡便に把握するなどの場合において有用な手法である。また本法で計数される微生物数は、生菌と死菌の和である。本研究では、必要に応じて、生菌と死菌を識別可能な活性染色法(山口 et al.,1994) を適用して微生物を計数し、生菌濃度、死菌濃度及び総菌濃度から微生物の存在状況を以下のように推定した。図 2 にプロトコルを示す。

- ・ 死菌が多く総菌数が増加した場合：
微生物が増殖後、6 週間目にはすでに死滅期に移行していた。
- ・ 死菌が多く総菌数が変化しない場合：
微生物が増殖することなく、時間の経過とともに死滅期に移行した。
- ・ 生菌が多く総菌数が増加した場合：
6 週間以内に微生物が徐々に増殖し続けたか、あるいは一定期間内に増殖した微生物が一定の濃度で生存しつづけた。
- ・ 生菌が多く総菌数が変化しない場合：
微生物の増殖はほとんどなく 6 週間をとおして生存し続けている。

なお、直接計数法は蛍光色素染色による直接検鏡法を用いた。蛍光色素としては核酸および菌体表層部の酸性ポリ多糖に親和性のある Acridine orange (AO)を用いて行った。図 3 にプロトコルを示す。

2.2.4 評価方法

アスファルト分解試験の結果、好気、嫌気条件にかかわらず、以下のような測定結果が得られるものと考えられ、これらに基づいて、本研究の試験結果を考察した。

| | 試験データ：ケース1 | 試験データ：ケース2 |
|------------------------|---------------------|----------------------|
| 1) 微生物の代謝に関する評価 | | |
| IC | 増加 | 変化なし |
| TOC | 増加 | 変化なし |
| アスファルト分解量 | 増加 | 変化なし |
| 2) 微生物の増殖に関する評価 | | |
| 微生物種数 | 増加 or 変化なし or 減少 | 変化なし or 減少 |
| 微生物濃度 (直接計数法による総菌数) | 増加 or 変化なし or 減少 | 変化なし or 減少 |
| 結果の解釈 | 微生物によってアスファルトが分解される | 微生物によってアスファルトが分解されない |

2.3 結果

前節に示した評価項目、評価方法に基づいて、多環芳香族を炭素源として高 pH 条件に馴化させたサンプル(以下、多環芳香族サンプル)によるアスファルト分解試験結果を下記に示す。

2.3.1 sample TN160AA の試験結果

(1) バイアル試験

IC、TOC、微生物種数、微生物濃度の測定結果を表4に示す。

- ・分解 IC：TN160AA-12.5 において 44mg/g の増加が見られた。また他のサンプルにおいても 20mg/g 程度の増加が見られた。
- ・分解 TOC：TN160AA-12.5 において 10.7mg/g の増加が見られたが他のサンプルでは大きな増加は見られなかった。
- ・微生物種数：すべてのサンプルにおいて開始時には 2 ないし 1 種が観測されたが 6 週間後には TN160AA-12.5 (嫌気条件下、pH12.5 で馴化・分解試験を実施) のみにおいて 1 種の微生物が観測された。
- ・微生物濃度：すべてのサンプルにおいて試験前後で大きな変化は見られなかった。

(2) 結晶皿試験

アスファルト分解量、微生物濃度の測定結果を表 5 に示す。

- ・アスファルト分解量: TN160AA-12.5 において顕著な増加が見られた。また TN160AA-10.5、TN160AA-11.5 (嫌気条件下、pH11.5 で馴化・分解試験を実施) においても 0.3mg/cm² 程度の増加が観測された。
- ・微生物濃度: すべてのサンプルにおいて試験前後で一定の増加が認められた。

以上の結果から、TN160AA-12.5 において微生物の代謝活動 (IC, TOC) ならびに微生物の増殖活動 (アスファルト分解量) において顕著な増加が認められたことから、sample TN160AA 中に棲息する微生物群のなかには、嫌気条件、pH12.5 の環境下で、アスファルトを分解する微生物が存在する可能性があると考えられる。

2 . 3 . 2 sample TN180AA の試験結果

(1) バイアル試験

IC、TOC、微生物種数、微生物濃度の測定結果を表 6 に示す。

- ・分解 IC : TN180AA-12.5 において 35mg/g の増加が見られた。また他のサンプルにおいても 10 ~ 20mg/g 程度の増加が見られた。
- ・分解 TOC: TN180AA-12.5 (嫌気条件下、pH12.5 で馴化・分解試験を実施) において 5.3mg/g の増加が、また TN180AA+11.5 (好気条件下、pH11.5 で馴化・分解試験を実施) TN180AA-10.5 (嫌気条件下、pH10.5 で馴化・分解試験を実施) に 3.8mg/g、2.1mg/g の増加が見られた。他のサンプルでは顕著な増加は見られなかった。
- ・微生物種: すべてのサンプルにおいて開始時には 2 ないし 1 の微生物種が観測されたが試験終了後 (6 週間後) には検出されなかった。
- ・微生物濃度: 試験前後で TN180AA+11.5、12.5 で一定の増加が認められたが、その他のサンプルでは微生物濃度に大きな変化はなかった。

(2) 結晶皿試験

アスファルト分解量、微生物濃度の測定結果を表 7 に示す。

- ・アスファルト分解量 : TN180AA-10.5、TN180AA-11.5、TN180AA-12.5、において 0.2mg/cm² 程度の増加が観測された。
- ・微生物濃度: すべてのサンプルにおいて試験前後で一定の増加が認められた。

以上の結果から、TN180AA-12.5 において微生物の代謝活動 (IC、TOC) ならびに微生物

物の増殖活動（アスファルト分解量）において顕著な増加が認められたことから、sample TN160AA と同様に、sample TN180AA 中に棲息する微生物群のなかにも、嫌気条件、pH12.5 の環境下で、アスファルトを分解する微生物が存在する可能性があると考えられる。

2.3.3 遺伝子シーケンスの結果

TN160AA、TN180AA の両サンプルに共通して存在していると考えられる微生物 と分解試験後に TN160AA-12.5 のサンプルにおいて観測された微生物 について（表 8）16SrRNA 遺伝子の遺伝子シーケンスを行った。その結果を表 9 に示す。TN160AA、TN180AA の分解前のサンプルに観測される微生物 は 99.4% の相同性で Aniline-degrading bacterium と一致した。この微生物はアニリン分解活性を持っている。また分解試験後に観測された TN160AA-12.5 の微生物 は 99.4% の相同性で Uncultured bacterium clone RB13C11 と一致し、これは芳香族化合物の分解活性を持っている微生物であった。以上の結果は、サンプル TN160AA、TN180AA の中に存在する微生物、微生物 が芳香族化合物の代謝に関与する酵素を持っており、これらが多環芳香族の重合体であるアスファルトの分解に関与している可能性を示唆するものである。

2.4 多環芳香族馴化サンプルによるアスファルト分解試験に関する考察

本研究では、バイアル試験、結晶皿試験の各々に対して、リファレンスとして微生物無添加の試験を平行して行っているが、嫌気、好気条件に関わらず、IC、TOC、アスファルト分解量の測定値に若干の変動が見られている（表 10）。これまでの知見から、特に嫌気条件下では、アルカリによるアスファルトの分解性は極めて乏しいことなどから、リファレンスサンプルの測定値の変動は、今回の測定方法全体の試験誤差と考えられる。したがって、測定項目の各条件つまり好気、嫌気、各々のリファレンス試験における測定値の平均値を求め、これらの値を実測値から差し引いた値で測定データの評価を行った。このリファレンスの平均値は IC については好気では 9ppm、嫌気では 16ppm、TOC については好気では 4ppm、嫌気では 6ppm、アスファルト重量については好気では 0.1mg、嫌気では 2.4mg であった。

分解 IC、分解 TOC、微生物種数、微生物濃度、アスファルト分解量の各測定項目の測定結果を表 11 にまとめる。分解 IC、分解 TOC については 5mg 以上を、20mg 以上を、40mg 以上を と表示し、微生物濃度については 5 倍以上増加を、2 倍以上増加を と表示し、アスファルト分解量については 1mg/cm² 以上分解を、0.5mg/cm² 以上分解を と表示した。またバイアル試験、結晶皿試験各々について複数の項目に印のついたものには着色して表示している。各サンプルの分解 IC、分解 TOC、アスファルト分解量の測定値から、多環芳香族馴化サンプルにおいては好気環境よりも嫌気環境の方が高いアスファルト分解活性を示し、また pH12.5 において分解量が大きい傾向にあることが分かった。これは多環芳香族を炭素源として長期間高濃度アルカリで馴化培養により選択された微生物群のなかに嫌気かつ高アルカリ環境においてもアスファルト分解が可能な微生物が存在することを

示唆するものである。

またアスファルト分解挙動はサンプル TN160AA、TN180AA とともに似ており、これはサンプル採取深度が異なるものの同じ採取地点であるため、菌相が類似しているためと考えられる。

次に、TOC の算出のため分析した TC の測定結果から、微生物の代謝活動により 50ml の培地中に溶出した総炭素量(無機、有機炭素)を知ることができる。そこで、TN160AA-12.5 について炭素源収支を考えてみると、培地中に溶出した総炭素量は 7.05mg/50ml であり、また元素分析の結果から求めたアスファルトの炭素含有量が 84.9%であったことから、微生物によって分解されたアスファルト量は 8.3mg/50ml と推算される。一方、結晶皿試験において重量法により測定されたアスファルト分解量は 1.7mg/50ml であり、総炭素量の測定値を下回っていた。

この測定値の差が生じたのは、アスファルトの水分乾燥が不十分である、多量のバイオフィームがアスファルト表面に生成した等の可能性が考えられる。しかし、アスファルトを 120 で加熱乾燥しても 1 mg 程度の重量変化しかみられないこと、またアスファルト表面にはヌメヌメ感が確認できなかったことなどから、これらの理由が重量に影響する可能性は低いと思われる。したがって測定値の差は TC の測定精度と、重量法によるアスファルト分解量の測定精度の差によるものと考えられるが、測定精度は TC の方がより高いと考えられるため、微生物によって分解されたアスファルト量は TC の測定結果から算出した分解量を採用すべきと考える。ただし、測定精度には差があるものの、双方の評価方法において、アスファルトの分解を示唆する結果が得られていることから、アスファルトの分解は起こっていると解釈すべきと考えられる。

また、TN160AA-12.5 や TN180AA-12.5 において観察された、培地中に溶出した総炭素量(無機、有機炭素)の増加やアスファルトの重量減少は、微生物によるアスファルト分解とアルカリによるアスファルト分解との総和であるが、TN160AA-12.5 や TN180AA-12.5 などは嫌気条件下の試験であったことを考慮すると、アスファルトがアルカリによって分解された可能性は低く、また仮にアルカリによるアスファルト分解があったとしてもリファレンス試験の測定値を差し引いていることからアルカリによるアスファルト分解については考慮の必要がないと思われる。したがって総炭素量(無機、有機炭素)の増加やアスファルトの重量減少は微生物に起因する可能性が高いと考えられる。

以上の結果から、sample TN160AA や sample TN180AA 中に棲息する微生物は、嫌気性条件下において微生物濃度が 10^4 cells/ml から 10^5 cells/ml である場合、高アルカリ条件(pH12.5)においても、6 週間に数 mg/50ml のアスファルトを分解する可能性があるといえる。

3 アスファルトを栄養源とした高アルカリ環境への馴化試験及び評価

3.1 概要

環境の異なる3地点から採取した5サンプル(表12参照; sample TN160、sample TN180、sample HG600、sample HG700、sample OK12)中の微生物群を、アスファルトを炭素源としてアルカリ環境下で馴化した。アルカリ環境下での馴化は、培地pHを7.5、9.5、10.5、11.5、12.5と2~4週間の間隔で徐々にpHを上昇させることにより行った(図4参照)。なお、馴化培養は、好気条件(+)、嫌気条件(-)、および硝酸塩無添加の嫌気条件(-N)(以下各サンプルをTN160+10.5:TN160の好気pH10.5のように表記する)の3条件にて行い、馴化の状況は、第2章と同様な分析手法を用いて、微生物種数および微生物濃度を測定すると共に、寒天培地を用いたコロニー計数法により生菌数を測定し、これらの結果を合わせて評価した。

3.2 試験方法

3.2.1 微生物サンプルの選定及び採取

本研究の目的を考慮して、下記のサンプルを採取した。表12に各サンプルの特性を示す。

A: 通常の地下水サンプル:

東濃鉾山の地下水

B: アスファルトを栄養源とする微生物が棲息する可能性のある油田地下水サンプル:

ガス田(新潟県)の地下水

C: 天然環境で比較的長期間アルカリ環境に曝されていたサンプル:

鉾山(石川県)の貯留沈殿池の表層水

なお、サンプルの採取は次の手順で行った。すなわち、アルコールで滅菌した500ml容のポリプロピレンボトルを用意し、サンプルを口から溢れるまで充填した後、素早く蓋をして密閉するというものであった。また採取したサンプルはその日のうちに実験室に持ち帰り、試験に供するまで、約5日間、4℃の冷蔵庫内で保存した。

3.2.2 馴化方法

(1) 好気環境下での馴化培養

加熱溶解したアスファルトを液体窒素で冷却し、1mm程度に粉碎した後、およそ500mgのアスファルト小片を100ml三角フラスコに投入した。次いで、紫外線照射を行い、滅菌した後、無機塩培地25mlおよび微生物サンプル25mlを投入し、綿栓を装着した後、30℃で培養を行った。20%(w/v)NaOHで培地の初期pHを7.5とし、2週間以上培養した後、pHを9.5、10.5、11.5、12.5と徐々に上昇させながら、それぞれ2週間づつ馴化培養を行った。培地組成を表2に示す。

(2) 嫌気環境下での馴化培養

バイアル瓶（公称 100ml 容）を用い、これに上記馴化条件と同様に、アスファルト、無機塩培地、微生物サンプルを投入した後、バイアル瓶をブチルゴム栓で密閉し、ヘッドスペースを窒素ガス（水素 10%含有）で置換した。また嫌気条件下における硝酸塩の影響を把握するため、硝酸態窒素無添加と添加（最終濃度；100mM）の2条件で実施した。その他の馴化条件は好気環境下での馴化培養と同様な条件とした。

3.2.3 評価方法

第2章と同様な分析手法を用いて、直接計数法により微生物濃度を測定するとともに、寒天培地を用いたコロニー計数法により生菌数の測定を行った。また pH を上昇させる各々の段階において、DGGE 法（第2章参照）により微生物群の 16SrRNA 遺伝子を識別し、微生物種数の把握を試みた。さらに、必要に応じて、生菌と死菌を識別可能な活性染色法（第2章参照）を適用し、微生物の存在状況を推定した。

寒天培地を用いたコロニー計数法の試験方法については、10倍希釈した N-broth 寒天培地に 100 μ l の微生物サンプルをアプライし、1週間程度培養後、顕微鏡にて生菌数を計測するという方法で実施した。

3.3 結果

3.3.1 直接計数法による微生物濃度の測定

直接計数法により測定した微生物濃度ならびにその濃度変化を表 13、図 5 ~ 9 に示す。

まず、sample TN160 についてみると、TN160+7.5（好気条件下、pH7.5 で馴化）、TN160+9.5（好気条件下、pH9.5 で馴化）では、微生物濃度が 10^7 cells/ml 程度まで増加したが、pH をさらにアルカリ側にシフトさせると、微生物濃度が減少した（TN160+10.5、TN160+12.5）。一方、嫌気環境（硝酸塩あり）の TN160-9.5（嫌気条件下、pH9.5 で馴化）では、微生物濃度の増加は若干であり、さらに高アルカリ側の条件下では、減少傾向がみられた。また嫌気環境（硝酸塩無添加）でも微生物濃度は減少した。これらの傾向は、もう一方の東濃サンプルである TN180 においても同様に観測された。

HG600、HG700 では、好気、嫌気（硝酸塩添加）、嫌気（硝酸塩無添加）のすべての条件下において、pH の上昇に伴って微生物濃度の増加量は減少した。ただし、各々の pH における最終微生物濃度が初期濃度よりも増加していることから、高アルカリ環境下においても微生物が増殖し得るものと考えられる。

OK12 においては、サンプル採取した表層水が高アルカリ性（pH11.5）であるため、馴化培養は pH11.5、12.5 の2条件で行った。pH11.5 の条件下では、好気条件下、嫌気条件下ともに微生物濃度の減少が見られたが、培地 pH を 12.5 に上げることにより、両条件下において微生物濃度の増加が見られた。

3.3.2 プレートによる生菌数の測定

寒天培地法による馴化微生物の生菌数の測定結果を以下に示す。

まず、好気環境下では、pH7.5 の TN160+7.5 において 1.2×10^4 CFU/ml、TN180+7.5 において 6.9×10^3 CFU/ml、HG700+7.5 において 1.3×10^2 CFU/ml の生菌が観測されたが他のサンプル、pH ではコロニーの形成が確認されなかった。嫌気条件下（硝酸塩添加）嫌気条件下（硝酸塩無添加）では、培地の pH にかかわらず、すべてのサンプルにおいてコロニー形成が見られなかった。

これらの結果を、前述の微生物濃度測定結果と比較すると、例えば TN160+9.5 では、微生物濃度の増加はみられたが、生菌は検出されなかった（検出限界 10^3 CFU/ml 以下であった）。この結果については、以下のような可能性が考えられる。

- a 馴化により、生きているが寒天培地上でコロニーを形成しない微生物が増殖していた。
- b 第2章で述べたように、微生物が初期に増殖した後、馴化終了時（2週間以内）にはすでに死滅し、生菌が検出限界以下にまで減少していた。
- c 微生物濃度を測定精度が不十分な直接計数法により行っているため、一見増殖したかのように見えたが、実際は誤差範囲内であり、増殖はない。
- d 個別で大きく増殖する微生物はいないが全体としては増殖している。

そこで、上記 a, b の違いを確認するため、TN160+9.5 のサンプル中に存在する生菌の有無を菌体細胞の活性染色法により評価した。その結果、生菌由来の緑色蛍光は観察されず、少なくとも検出限界以下（ 10^3 cells/ml 以下）であることがわかった。

したがって、TN160+9.5 の場合、サンプル中に存在する微生物濃度（総菌数）が 10^6 cells/ml であったのに対して、コロニー計数法および活性染色法により判明した生菌濃度は、それぞれ 10^3 CFU/ml、 10^3 cells/ml 以下であり、これらの結果の解釈は、上記考察の a ではなく b が主要因であろうと考えられる。また、TN160+10.5 のように直接計数法による微生物濃度が 10^4 cells/ml 程度に下がっているサンプルについては c の可能性も考慮する必要がある。また、d の可能性も否定できない。4章で記載している、本章で馴化を行った微生物によるアスファルト分解試験結果を考慮すると、d の可能性が高いものと考えられる。

これらの結果から、TN160+9.5 のサンプルのように、直接計数法による微生物濃度とコロニー計数法による生菌濃度に相関が見られない他のサンプルについても、TN160+9.5 と同様な現象が起こっていたものと解釈すべきと考えられる。

3.3.3 微生物種の測定

DGGE 法による微生物種の測定結果を表 14 に示す。

各サンプルとも馴化前のオリジナルサンプルからは 2 ~ 7 つの微生物種が観測された。好気条件下における馴化において初期段階に著しい微生物濃度の増加が見られた TN160、TN180 においては、TN160+7.5、TN180+7.5 でそれぞれ 7 種、8 種と初期よりも多くの微生物種が検出されたが、TN160+9.5、TN180+9.5 ではともに 1 種、さらにそれ以上の高ア

ルカリ条件では微生物種は検出されなかった。一方、嫌気条件下(硝酸塩添加)では、pH7.5、pH9.5 において1～2種の微生物種が検出されたが、嫌気条件下(硝酸塩無添加)ではすべてのサンプルにおいて微生物種が検出されなかった。

HG600では好気条件下のHG600+7.5、嫌気条件下のHG600-7.5において、それぞれ2種の微生物が検出された。またHG700では、好気条件下のHG700+7.5で8種、嫌気条件下のHG700-N9.5で1種が観測された。

OK12では微生物種はまったく検出されなかった。

3.4 アスファルトを栄養源とした馴化試験に関する考察

TN160+7.5、TN180+7.5における微生物濃度の増加、ならびにDGGE法によって検出されたTN160+7.5、TN180+7.5の微生物種の増加は、ともに微生物の増殖を示唆する結果と考えられる。つまり地下の嫌気環境に在ったサンプル中に存在した好気性微生物が好気環境に適合し急激に増殖したためと考えられる。しかしながらpH9.5で馴化培養すると数種類の微生物種が検出されるにとどまり、さらにpHを10.5以上に上げると、微生物種はまったく検出されなかった。この結果は、pHが10.5以上の場合に微生物濃度が 10^4 cells/ml程度まで減少していたことを考慮すると、微生物の濃度がDGGE法の検出限界を下回っていた可能性が指摘される。すなわち、複数種の微生物が低濃度(10^3 cells/ml以下)で系内に存在した場合、DGGE法によって検出されない可能性がある。また、TN160の好気条件下と嫌気条件下(硝酸塩添加)では、pH10.5以上において最終微生物濃度が開始微生物濃度を下回るケースが見受けられ、高アルカリ環境においてアスファルトを分解する微生物はそれほど多く存在しない可能性あるいは単一で増加した種は存在しないことが示唆される。

一方、HG600、HG700では、各pHにおける最終微生物濃度が開始微生物濃度を上回っており、さらにOK12もpH12.5において好気条件下、嫌気条件下ともに最終微生物濃度が開始微生物濃度を上回っていたことから、これらは微生物の増殖を示唆するものと考えられる。したがって、HG600、HG700およびOK12中には、TN160、TN180に比べて、高アルカリ環境においてアスファルトを分解する微生物が比較的多く存在する可能性がある。

4 アスファルトを栄養源とした馴化サンプルのアスファルト分解試験及び評価

4.1 概要

高アルカリ環境下、アスファルトを炭素源として馴化した微生物群(3章参照)を用いて、pH10.5、11.5、12.5におけるアスファルトの分解試験を行った。好気条件、嫌気条件、および硝酸塩無添加の嫌気条件(-N)(以下各サンプルをTN160-N10.5: sample TN160、嫌気条件下、硝酸塩無添加、pH10.5のように表記する)の3条件にて試験を行い、アスファルトの分解速度(6週間の分解量)を評価した。アスファルト分解速度は、試験前後の乾燥重量を測定する重量法、および微生物が産生するCO₂量(IC)や水系に存在する総有機炭素量(TOC)を測定する方法により評価した。また試験前後の微生物群の16SrRNA遺

伝子を DGGE & シーケンス法の結果を解析し、微生物種数の把握、同定を行った。さらに、微生物濃度の把握のため、生菌数及び総菌数の測定を行った。

4.2 試験方法

4.2.1 アスファルト馴化サンプル

3章で説明したアルカリ環境下での馴化試験により、培地 pH を 10.5、11.5、12.5 におけるサンプルを用いアスファルトの分解試験を行った(図 4 参照)。

4.2.2 分解試験方法

微生物によるアスファルト分解性を、バイアル試験と結晶皿試験の 2 つの方法により評価した。

(1) バイアル試験

バイアル試験の目的は、第 2 章と同様に、微生物がアスファルトを分解することにより生じる有機、無機炭素を測定し、これによって微生物の代謝活動状況を推定することにある。

試験は、以下の手順により行った。まず、加熱溶解したアスファルトを液体窒素で冷却し、1mm 程度に粉砕した後、およそ 200mg のアスファルト小片をバイアル瓶(公称 100ml 容)に投入した。次いで、紫外線照射を行い、滅菌した後、所定の無機塩培地 25ml および上記馴化サンプル 25ml を添加して、バイアル瓶をブチルゴム栓で密閉し、所定期間、所定温度で培養を行った。

(2) 結晶皿試験

結晶皿試験は、第 2 章と同様に、微生物がアスファルトを分解することによって減少するアスファルトを重量変化で評価し、微生物の分解活性を推定しようというものである。

試験は、以下の手順により行った。まず、およそ 5cm × 5cm 四方のガラス板に約 500mg のアスファルトをのせ、300 で 3 分間加熱・溶解し、プレート状にしたものを、さらに紫外線照射を行い、滅菌した。次いで、アスファルトプレートを結晶皿の底に置き、バイアル試験同様に、所定の無機塩培地 25ml および上記馴化サンプル 25ml を添加して、所定期間、所定温度で培養を行った。

(3) 分解試験条件

バイアル試験、結晶皿試験ともに、好気あるいは嫌気条件下で、培地 pH をそれぞれ 10.5、11.5、12.5 に調製して、30 で 6 週間培養した。炭素源はアスファルト(核燃料サイクル開発機構殿より提供)を用いた。

4.2.3 評価方法

微生物によるアスファルトの分解速度の評価を目的として、下記項目について測定を行った。各測定項目は微生物の増殖に関する測定項目あるいは微生物の代謝に関する測定項目であり、これらの測定データを解析することによりアスファルト馴化サンプルによるアスファルト分解試験結果を評価した(第2章参照)。本研究では、バイアル試験、結晶皿試験の各々に対して、リファレンスとして微生物無添加の試験を平行して行っているが、嫌気、好気条件に関わらず、IC、TOC やアスファルト分解量の測定値に若干の変動がみられた。しかし、これまでの知見から、特に嫌気条件下では、アルカリによるアスファルトの分解性は極めて乏しいことなどから、リファレンスサンプルの測定値の変動は、今回の測定方法全体の実験誤差と考えられる。したがって、各測定項目の好気、嫌気(硝酸塩添加)、嫌気(硝酸塩無添加)各々の条件におけるリファレンスサンプルの測定値の平均値(表15)を求め、これらの値を実測値から差し引いた値で測定データの評価を行った。

測定項目

バイアル試験：IC、TOC、微生物種、微生物濃度

結晶皿試験：アスファルト分解量、微生物濃度

4.3 結果

4.3.1 sample TN160 の試験結果

(1) バイアル試験

IC、TOC、微生物種数、微生物濃度の測定結果を表16に示す。

- ・分解 IC：TN160+12.5(好気条件下、pH12.5 で馴化・分解試験を実施)において 21.9mg/g の増加が見られた。また他の好気条件下のサンプルにおいても 10mg/g 程度の増加が見られた。一方、嫌気条件下のサンプルでは数 mg/g 程度の増加のみが確認された。
- ・分解 TOC：TN160+11.5(好気条件下、pH11.5 で馴化・分解試験を実施)において 2.1mg/g の増加が、また TN160-11.5(嫌気条件下、pH11.5 で馴化・分解試験を実施)、TN160-N12.5(嫌気硝酸塩無添加条件下、pH12.5 で馴化・分解試験を実施)において 1.3mg/g、2.2mg/g の増加が見られた。しかし、他のサンプルにおいては顕著な増加は見られなかった。
- ・微生物種：すべてのサンプルにおいて開始時には検出されなかったが、試験終了後(6週間後)には TN160-10.5(嫌気条件下、pH10.5 で馴化・分解試験を実施)、TN160-11.5(嫌気条件下、pH11.5 で馴化・分解試験を実施)において 4 種、3 種の微生物種が観測された。また TN160-N10.5(嫌気硝酸塩無添加条件下、pH10.5 で馴化・分解試験を実施)においても 1 種の微生物種が観測されたが、

他のサンプルでは検出されなかった。

- ・微生物濃度：試験前後で TN160+10.5、11.5 では 10 倍程度の増加が見られたが、その他のサンプルでは微生物濃度に大きな差は見られなかった。

(2) 結晶皿試験

アスファルト分解量、微生物濃度の測定結果を表 17 に示す。

- ・アスファルト分解量：TN160+12.5、TN160-12.5、TN160-N12.5 において 0.6 ~ 0.9mg/cm² 程度の増加が観測された。
- ・微生物濃度：試験前後で微生物濃度に大きな差は見られなかった。

以上の結果から、とくに TN160+12.5 において微生物の代謝活動 (IC, TOC) ならびに微生物の増殖活動 (アスファルト分解量) において顕著な増加が認められたことから、サンプル TN160 に棲息する微生物群のなかに、好気条件、pH12.5 の環境下で、アスファルトを分解する微生物が存在する可能性があると考えられる。

4 . 3 . 2 sample TN180 の試験結果

(1) バイアル試験

IC、TOC、微生物種数、微生物濃度の測定結果を表 18 に示す。

- ・分解 IC：TN180+12.5 (好気条件下、pH12.5 で馴化・分解試験を実施) において 21.6mg/g の増加が見られた。また他の好気条件下のサンプルにおいても 9mg/g 程度の増加が見られた。一方、嫌気条件下のサンプルでは 1 ~ 5mg/g 程度の増加のみが確認された。
- ・分解 TOC：TN180+11.5 (好気条件下、pH11.5 で馴化・分解試験を実施) において 3.8mg/g の増加が、また TN180+10.5 (好気条件下、pH10.5 で馴化・分解試験を実施)、TN180-10.5 (嫌気条件下、pH10.5 で馴化・分解試験を実施)、TN180-11.5、TN180-N11.5 (嫌気硝酸塩無添加条件下、pH11.5 で馴化・分解試験を実施) において、それぞれ 1.2mg/g、2.1mg/g、0.9mg/g、0.9mg/g の増加が見られた。しかし、他のサンプルでは顕著な増加は見られなかった。
- ・微生物種：すべてのサンプルにおいて開始時には検出されなかったが、試験終了後 (6 週間後) には TN180+10.5、TN180+11.5 において 1 種、TN180-10.5、TN180-11.5 において 2 種の微生物種が検出された。ただし、他のサンプルでは微生物種は検出されなかった。
- ・微生物濃度：TN180+10.5、TN180+11.5 において微生物濃度の増加が観測されたが、その他のサンプルでは試験前後で微生物濃度に大きな差は見られなかった。

(2) 結晶皿試験

アスファルト分解量、微生物濃度の測定結果を表 19 に示す。

- ・アスファルト分解量： pH12.5 の TN180+12.5、TN180-12.5、TN180-N12.5 において 0.7～0.9mg/cm² 程度の増加が観測された。
- ・微生物濃度：試験前後で微生物濃度に大きな差は見られなかった。

以上の結果から、とくに TN180+12.5 において微生物の代謝活動 (IC, TOC) ならびに微生物の増殖活動 (アスファルト分解量) において顕著な増加が認められたことから、サンプル TN180 に棲息する微生物群のなかに、好気条件、pH12.5 の環境下で、アスファルトを分解する微生物が存在する可能性があると考えられる。

4 . 3 . 3 sample HG600 の試験結果

(1) バイアル試験

IC、TOC、微生物種数、微生物濃度の測定結果を表 20 に示す。

- ・分解 IC：HG600+12.5 (好気条件下、pH12.5 で馴化・分解試験を実施) において 6.6mg/g の増加が見られた。また他の条件下のサンプルにおいても 1～4mg/g 程度の増加が見られた。
- ・分解 TOC：HG600+12.5、HG600-10.5 において 7.8mg/g、4.5mg/g の増加が見られた。他のサンプルでは 1～2mg/g 程度の増加が見られた。
- ・微生物種：HG600-12.5、HG600-N12.5 を除くすべての試験条件におけるサンプルにおいて 1種、ないしは 2種の微生物種が観測された。
- ・微生物濃度：試験前後で微生物濃度に大きな差は見られなかった。

(2) 結晶皿試験

アスファルト分解量、微生物濃度の測定結果を表 21 に示す。

- ・アスファルト分解量：HG600-N12.5 において 0.9mg/cm² のアスファルト分解が観測された。また HG600+12.5、HG600-12.5 において 0.8mg/cm²、0.6mg/cm² の分解が見られた。
- ・微生物濃度：試験前後で微生物濃度に大きな差は見られなかった。

以上の結果から、とくに HG600+12.5 において微生物の代謝活動 (IC、TOC) ならびに微生物の増殖活動 (アスファルト分解量) において顕著な増加が認められたことから、サン

プル HG600 に棲息する微生物群のなかに、好気条件、pH12.5 の環境下で、アスファルトを分解する微生物が存在する可能性があると考えられる。

4.3.4 sample HG700 の試験結果

(1) バイアル試験

IC、TOC、微生物種数、微生物濃度の測定結果を表 22 に示す。

- ・分解 IC：HG700+10.5(好気条件下、pH10.5 で馴化・分解試験を実施)において 10.6mg/g の増加が、HG700+12.5(好気条件下、pH12.5 で馴化・分解試験を実施)において 9.2mg/g の増加が見られた。また他の条件下のサンプルにおいても 0.5～5.2mg/g 程度の増加が見られた。
- ・分解 TOC：HG700+12.5 において 8.2mg/g の増加が見られた。
- ・微生物種：試験開始時にはすべての試験条件におけるサンプルで微生物種は検出されなかったが、試験終了の 6 週間後には HG700-12.5 を除くすべてのサンプルにおいて 2 種から 4 種の微生物種が検出された。
- ・微生物濃度：試験前後で微生物濃度は HG700+10.5 が 10 倍程度の増加をした他は、大きな変化は見られなかった。

(2) 結晶皿試験

アスファルト分解量、微生物濃度の測定結果を表 23 に示す。

- ・アスファルト分解量：HG700-N12.5 において 0.9mg/cm²、HG700+12.5、HG700-12.5 において 0.8mg/cm² のアスファルト分解が観測された。
- ・微生物濃度：試験前後で微生物濃度に大きな差は見られなかった。

以上の結果から、HG700+12.5、HG700+10.5 において微生物の代謝活動 (IC, TOC) ならびに微生物の増殖活動 (アスファルト分解量) において増加が認められたことから、サンプル HG700 に棲息する微生物群のなかに、好気条件、pH12.5、pH10.5 の環境下で、アスファルトを分解する微生物が存在する可能性があると考えられる。

4.3.5 sample OK12 の試験結果

(1) バイアル試験

IC、TOC、微生物種数、微生物濃度の測定結果を表 24 に示す。

- ・分解 IC：OK12+12.5(好気条件下、pH12.5 で馴化・分解試験を実施)において 46.1mg/g、OK12-12.5 において 22.9mg/g、OK12+10.5 において 17.3mg/g の増加が見られ

た。また他の条件下のサンプルにおいても 0.6～5.6mg/g 程度の増加が確認された。

- ・分解 TOC：OK12-11.5 において 6.7mg/g、OK12-12.5 において 6.8mg/g の増加が見られた。また OK12+11.5 において 5.0mg/g の増加が見られた。
- ・微生物種：試験終了後の嫌気条件のサンプルから 4 種類の微生物種が検出された。
- ・微生物濃度：試験前後で微生物濃度に大きな差は見られなかった。

(2) 結晶皿試験

アスファルト分解量、微生物濃度の測定結果を表 25 に示す。

- ・アスファルト分解量：OK12-12.5 において 2.0mg/cm² のアスファルト分解が観測された。また OK12+12.5、OK12-N12.5 において 1.3mg/cm²、0.8mg/cm² の分解が見られた。
- ・微生物濃度：試験前後で微生物濃度に大きな差は見られなかった。

以上の結果から、OK12+12.5、OK12-12.5、OK12-N12.5 において微生物の代謝活動(IC, TOC) ならびに微生物の増殖活動(アスファルト分解量) において顕著な増加が認められたことから、サンプル OK12 に棲息する微生物群のなかに、好気条件、pH10.5 好気条件および嫌気条件 pH12.5 の環境下で、アスファルトを分解する微生物が存在する可能性があると考えられる。

4.3.6 遺伝子シーケンスの結果

各々のサンプルの各 pH において共通に見られた微生物種について 16SrRNA 遺伝子の遺伝子シーケンスを行った(表 26)。TN160 では 2 種、TN180 では 3 種、HG600、HG700 では各 1 種、OK12 では 2 種の微生物種の同定を試みた。その結果を表 27 に示す。TN160 の 2 種のうち 1 種は先の TN160AA で観測した微生物 と同一であった。また 1 種は微生物 であり油を分解する能力を持っている微生物と相同性が高いことが分かった。TN180 では 3 種、微生物 、微生物 、微生物 を同定したが、微生物 は 5 塩基の違いがあるものの TN160AA、TN160 で観測された微生物 と相同性が高い結果となった。また微生物 、微生物 とともに芳香族化合物を分解する能力を持っている微生物と相同性が高いことが分かった。OK12 では微生物 、微生物 の同定を行ったが、ともに有機化合物分解能を持っていることを知られる微生物との高い相同性は得られなかった。微生物 は深海から採取された微生物と 95%の相同性、また微生物 はソイルコアから採取された微生物と 100%の相同性を持っていることが分かった。

TN160 では TN160AA でも見られた微生物 が、また HG600、HG700 では TN160AA、TN180AA でも見られた微生物 が観測された。これは馴化培養によって芳香族化合物分解

酵素を持つ同一の微生物が増幅されたことによるものと考えられる。OK12 ではアスファルト分解試験において他のアスファルト馴化サンプルよりも高い分解能が得られているが、遺伝子シーケンスでは既知の有機化合物分解微生物との相同性は見られなかった。これは微生物が新規であること、シーケンスが不十分であること、遺伝子サンプルの回収時期と微生物の増幅時期とのずれなどの理由によりアスファルト分解を主に行った微生物が生存していなかったため、あるいは数種の微生物が共働でアスファルト分解を行っている、等の原因が考えられ、今後検討が必要であると考えられる。

4.4 アスファルト馴化サンプルによるアスファルト分解試験に関する考察

本研究では採取環境の異なる5つの微生物サンプルのアスファルト分解性評価のために分解 IC、分解 TOC、微生物種数、微生物濃度、アスファルト分解量による評価を行った。この5つの微生物サンプルの各測定項目の測定結果を表28にまとめる。分解 IC、分解 TOC については5mg以上を、20mg以上を、40mg以上を と表示し、微生物濃度については5倍以上増加を、2倍以上増加を と表示し、アスファルト分解量については1mg/cm²以上増加を、0.5mg/cm²以上増加を と表示した。またバイアル試験、結晶皿試験各々について複数の項目に印のついたものには着色して表示している。

微生物サンプル TN160、TN180、HG600、HG700 では好気条件において微生物代謝、増殖に関する測定項目に有意な変化が見られたが、嫌気条件下では代謝に関する測定項目である分解 IC、TOC に顕著な変化は見られなかった。これは好気条件下に比べて嫌気条件下における微生物活性(アスファルトの分解に関わる酵素活性など)が低下していることによる可能性がある。これに対して pH の影響はそれほど大きくないものと考えられる。また微生物サンプル OK12 では好気、嫌気いずれにおいても代謝、増殖に関する測定項目に変化が見られ、高アルカリ環境においてアスファルト分解が可能な微生物群の存在を示唆する結果が得られた。

3章と同様に TC の測定結果から、培養による50mlの培地中に溶出した総炭素量(無機、有機炭素)を計算により求めたところ、OK12-12.5 では微生物によって分解されたアスファルト量は10.4mg/50ml(6週間)と計算できる。また、結晶皿試験における同サンプルのアスファルト分解量は13.0mg/50mlであり、アスファルト馴化された微生物の高アルカリ環境におけるアスファルト分解を示唆していると考えられる。

また馴化試験終了時の pH10.5 以上のサンプルでは微生物種が観測されなかった(3章)にもかかわらず、アスファルト分解試験後のサンプルでは微生物種が観測されている。これは、馴化試験終了時には DGGE の検出レベルをこえる微生物種がいなかったが、アスファルト分解試験後には存在したことを意味する。また、アルカリ馴化での微生物の状態は単独では大きく増殖したものはいなかったものの、全体としては微生物が増加していた可能性が高い。したがって馴化試験の期間をもっと長くすることにより、よりアスファルト分解が可能な微生物の集積培養が可能であるものと考えられる。

5 高アルカリ環境における微生物によるアスファルトの分解速度の評価

本試験では微生物のアスファルト分解活性を評価するために5つの測定項目にて評価を行っているが、この中で最も精度が高いと考えられる分解 IC、分解 TOC の測定値の和、TC (総炭素量) を指標として、微生物によるアスファルトの分解速度の評価を行った。表 29 に各微生物サンプルの TC 測定データを示す。

5.1 採取サンプルの違いによる影響

今回の微生物サンプルは以下の3地点にて採取を行ったサンプルである。

A: 通常の地下水サンプル:

東濃鉦山の地下水(TN160、TN180)

東濃鉦山由来地下水を多環芳香族を用いて馴化 (TN160AA、TN180AA)

B: アスファルトを栄養源とする微生物が棲息する可能性のある油田地下水サンプル:

ガス田 (新潟県) の地下水(HG600、HG700)

C: 天然環境で比較的長期間アルカリ環境に曝されていたサンプル:

鉦山 (石川県) の貯留沈殿池の表層水(OK12)

同じ採取地点の微生物サンプルである TN160 と TN180、HG600 と HG700、TN160AA と TN180AA はそれぞれ同様な挙動を示しており、採取深度は異なるものの同じ種類の微生物種が存在しているものと思われる。OK12 は地下水サンプルではなく鉦山の貯留池の表層水であり、pH11.5 の高アルカリ環境下のサンプルであるため、好気の高アルカリ条件 pH12.5 において他の微生物サンプルよりも最も高いアスファルト分解能を示した。好気条件下においては TN160、TN180 は HG600、HG700 のおよそ 1.5 倍のアスファルト分解活性を有し、さらに OK12 は HG600、HG700 に対して 3 倍程度のアスファルト分解活性をもっているものと予想される。中でも最も高い活性を有する OK12 の好気条件下 pH12.5 の微生物サンプルによるアスファルトの分解速度を炭素源の収支から検討してみると、培地中に溶出した総炭素量は 10.1mg/50ml であり、また元素分析の結果から求めたアスファルトの炭素含有量が 84.9%であったことから、微生物によって分解されたアスファルト量は 11.9mg/50ml (6 週間)と推算される。微生物サンプル TN160AA、TN180AA は基本的には TN160、TN180 と同じ採取地点で採取されたものであるが、多環芳香族による馴化を行っているため、アスファルトによる馴化を行って集積された微生物種のスペクトルが広い。また事実上の馴化の期間が長いためにアスファルトによる馴化を行った微生物より高アルカリ環境に適した微生物が増加し、結果として特に嫌気環境ではアスファルトによる馴化を行った微生物による大きなアスファルト分解活性が観測されたものと思われる。

5.2 微生物生存 アスファルト分解 環境の影響

アスファルトによって馴化を行った微生物の各条件下における TC の値を比較すると、好気条件下が最も大きく、嫌気条件下、嫌気条件下（酸素もしくは硝酸塩無添加）の順に TC の値が低下する傾向が見られる。例えば TN160、TN180 では好気条件下と嫌気条件下では分解速度に数倍の違いがあると考えられる。このことから、微生物のアスファルト分解速度は好気条件下で速く、嫌気条件下、さらに嫌気(硝酸塩無添加)条件下ではアスファルト分解活性が大きく低下しているものと考えられる。これは硝酸塩が微生物によるアスファルトの代謝に電子受容体として必要であるためと思われ、嫌気環境において硝酸塩のような電子受容体が存在しない場合には微生物によるアスファルトの分解が起こりにくいものと考えられる。

高アルカリ環境の影響について TC の値を検討すると、pH11.5 での TC 値は pH10.5 における値よりも低いものの、pH12.5 では逆に多くのサンプルで TC 値が pH10.5 よりも大きな値となっている。現在の試験系における TC 値の増加要因としては、微生物による分解と高アルカリによる分解という2つの可能性が考えられるが、本試験条件、すなわち、30℃、pH12.5、6週間という条件下ではアスファルトのアルカリ分解はほとんど起こらないと推測され、またリファレンス試験の測定値による補正も行っているため、この TC 値の変化は微生物によるものと考えられる。したがって、大深度地下における嫌気環境下では微生物のアスファルト分解活性は低いと考えられるが、「高アルカリ環境」であっても、微生物のアスファルト分解は起こりうるものと推測される。また多環芳香族による馴化試験後、同環境にて6か月以上保存されていたサンプルである TN160AA、TN180AA の TC 値はともに他のサンプルよりもアスファルト分解活性が高く、特に嫌気環境下では高い分解活性を示している。これは馴化期間が微生物の高アルカリ環境でのアスファルト分解に影響するためと考えられる。

6 おわりに

本研究ではアスファルトを炭素源とした高アルカリ環境下で微生物の馴化培養を行い、この馴化サンプルによるアスファルトの分解試験を行った。微生物によるアスファルトの分解性の評価は IC、TOC、微生物種、微生物濃度、アスファルト分解量により行った。その結果、pH12.5 の高アルカリ環境下において微生物がアスファルトを分解しうることを示唆する結果が得られた。このアスファルトの分解は好気条件でも、嫌気条件でも起こることから、大深度地下における嫌気環境下でも微生物のアスファルト分解は十分に起こりうるものと考えられる。ただし、アスファルトによる馴化を行った微生物のアスファルト分解活性は嫌気環境では好気環境より大きく低下する。したがって今後さらに圧力、温度等の大深度地下の環境状況を考慮に入れた試験系を構築し、検討をしていく必要があると思われる。また微生物のアスファルト分解活性に馴化期間が大きく影響する可能性のあることが分かった。したがって馴化の期間をさらに長くした研究の必要性もあるものと考えられる。

参考文献

掘越弘毅、秋葉暁彦：好アルカリ微生物、初版、学会出版センター。（1993）

T.L.Potter, B.Duval：“Cerro Negro bitumen degradation by a consortium of marine benthic microorganisms”、*Environ. Sci. Technol.*、vol.35、p.76。（2001）

L.M.Proctor, et al.：“Enhancement of orimulsion biodegradation through the addition of natural marine carbon substrates”、*Environ. Sci. Technol.*、vol.35、p.1420。（2001）

C.Brunner, et al.：“Enrichment of bitumen-degrading microorganisms”、*FEMS Microbiol. Lett.*、vol.43、p.337。（1987）

M.Gerard, et al.：“Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA”、*Appl. Environ. Microbiol.*、p.695。（1993）

春日郁郎、et al.：“PCR-DGGEによる津久井湖における藻類を含む微生物群集構造の季節変動解析”、*水環境学会誌*、vol.24、p.856。（2001）

山口進康、et al.：“二重染色法による芽胞形成細菌の生活環の解析”、*J. Antibact. Antifung. Agents.*、vol.22、p.65。（1994）

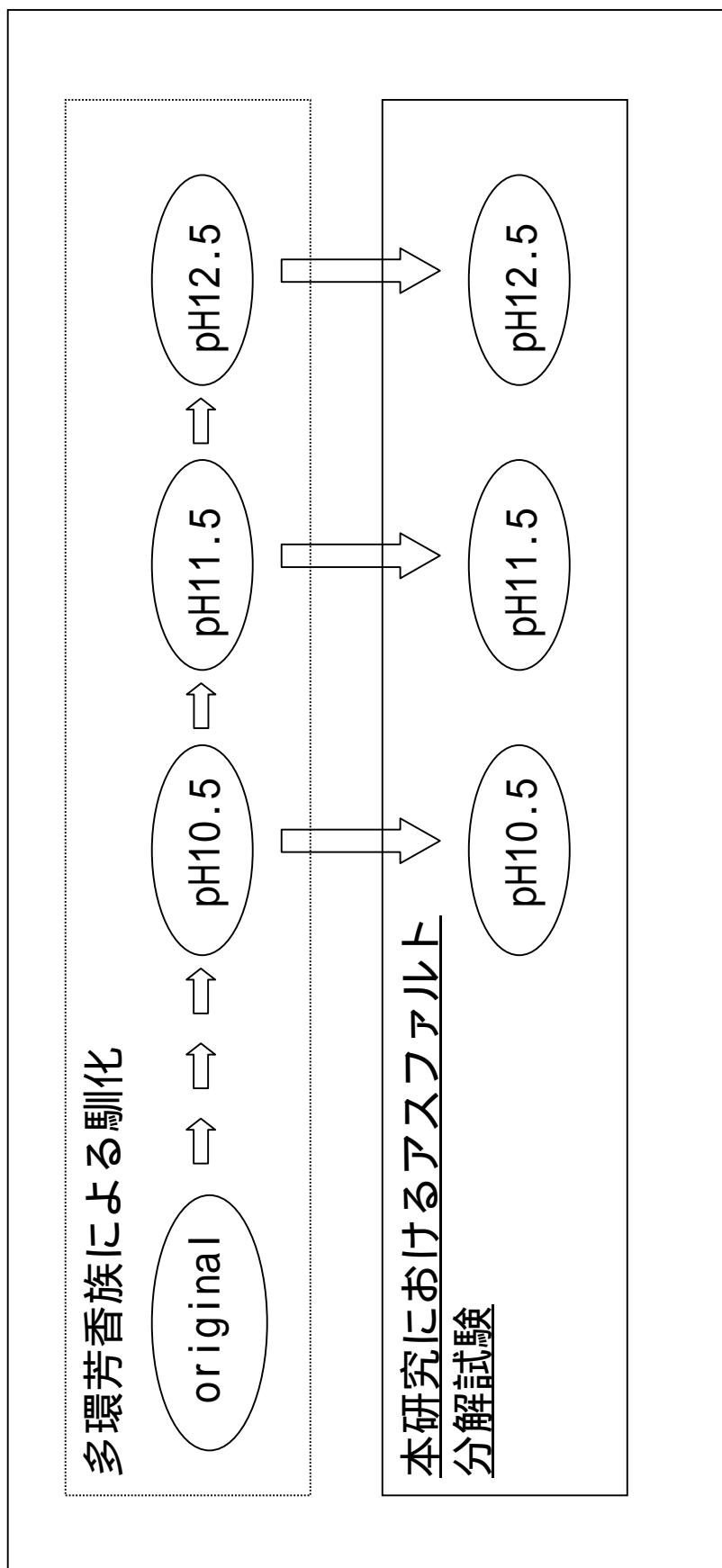


図1 多環芳香族馴化サンプルによるアスファルト分解

フィルターホルダーにヌクレオポアフィルターを二枚重ねにしてホルダーを閉める。

固定化菌体溶液をフィルター濾過し、PBS(0.1M リン酸バッファ-pH8.5+5% NaCl)2mlで洗浄

0.02%FDA溶液(0.1M リン酸バッファ-pH8.5+5% NaCl 用時調整)約600 μ lと0.5%PI溶液(0.1M Tris-0.1M NaCl+5% 1N HCl用時調整)100 μ lを混合注入し、フィルターに染み込ませ、遮光下で約15分間染色

染色後、染色液を取り除き、フィルターホルダーを取り外す。

フィルターを取り出し、キムタオルの上のせ、遮光下約20分放置。(余分な水分を取り除く)

フィルターをスライドグラスにのせ、フィルター上にオイルを一滴のせてカバーグラスをのせる。

方眼接眼マイクロータには10 \times 10の計数用の方形が入っており、10視野の合計菌数を測定する。

図2 活性染色プロトコール

フィルターホルダーにヌクレオポアフィルターを二枚重ねにしてホルダーを閉める。

固定化菌体溶液をフィルター濾過し、PBS(20mM リン酸バッファー+130mM NaCl pH 7.4)2mlで洗浄

0.01%AO溶液 (pH 7.4)0.01M Tris- HCl、用時調整) 約1mlを注入し、フィルターに染み込ませ、約5分間染色

染色後、染色液を取り除き、フィルターホルダーを取り外す。

フィルターを取り出し、キムタオルの上へのせ、約20分放置。(余分な水分を取り除く)

フィルターをスライドグラスにのせ、フィルター上にオイルを一滴のせてカバーグラスをのせる。

方眼接眼マイクロメータには10×10の計数用の方形が入っており、10視野の合計菌数を測定する。

図3 蛍光染色プロトコール

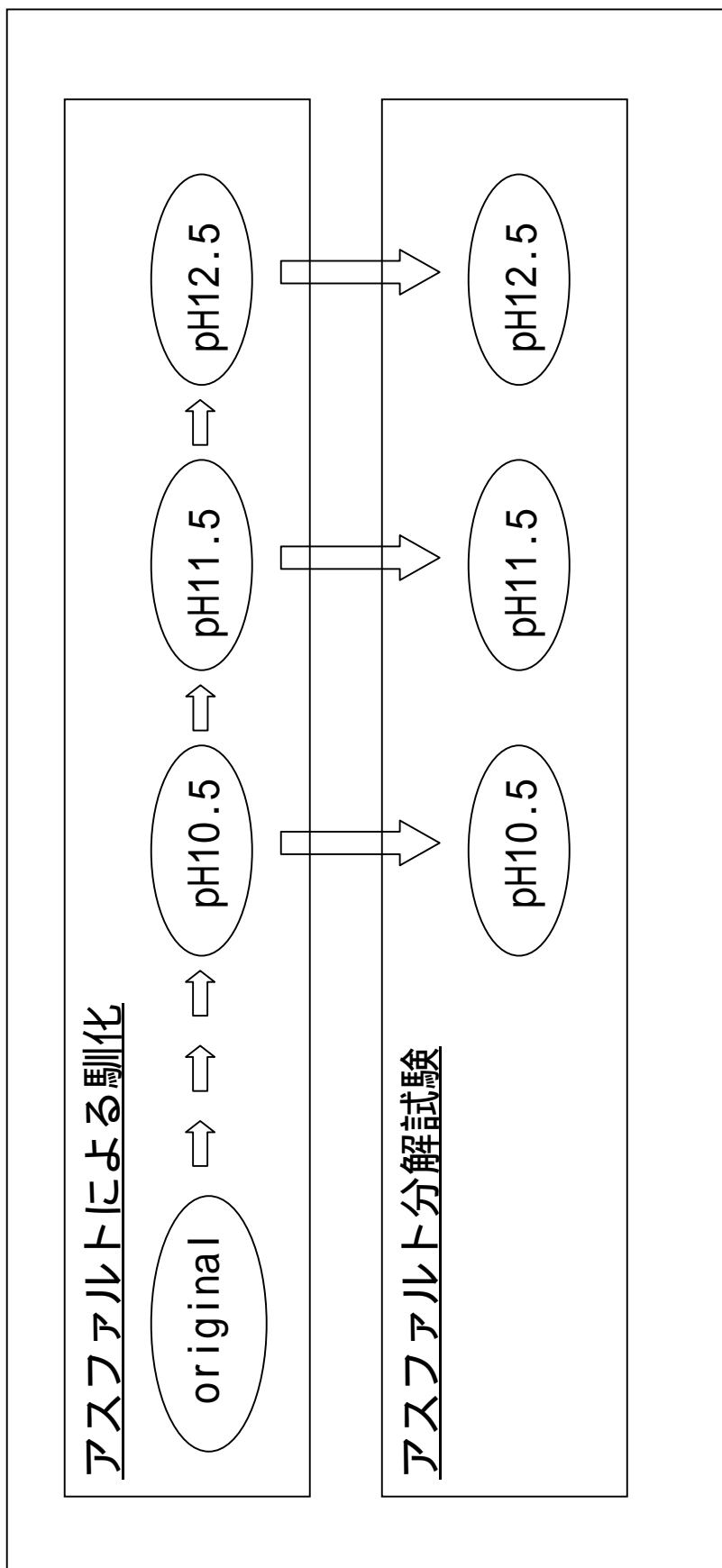


Figure 4 Aspartate Alkalization and Aspartate Decomposition Test

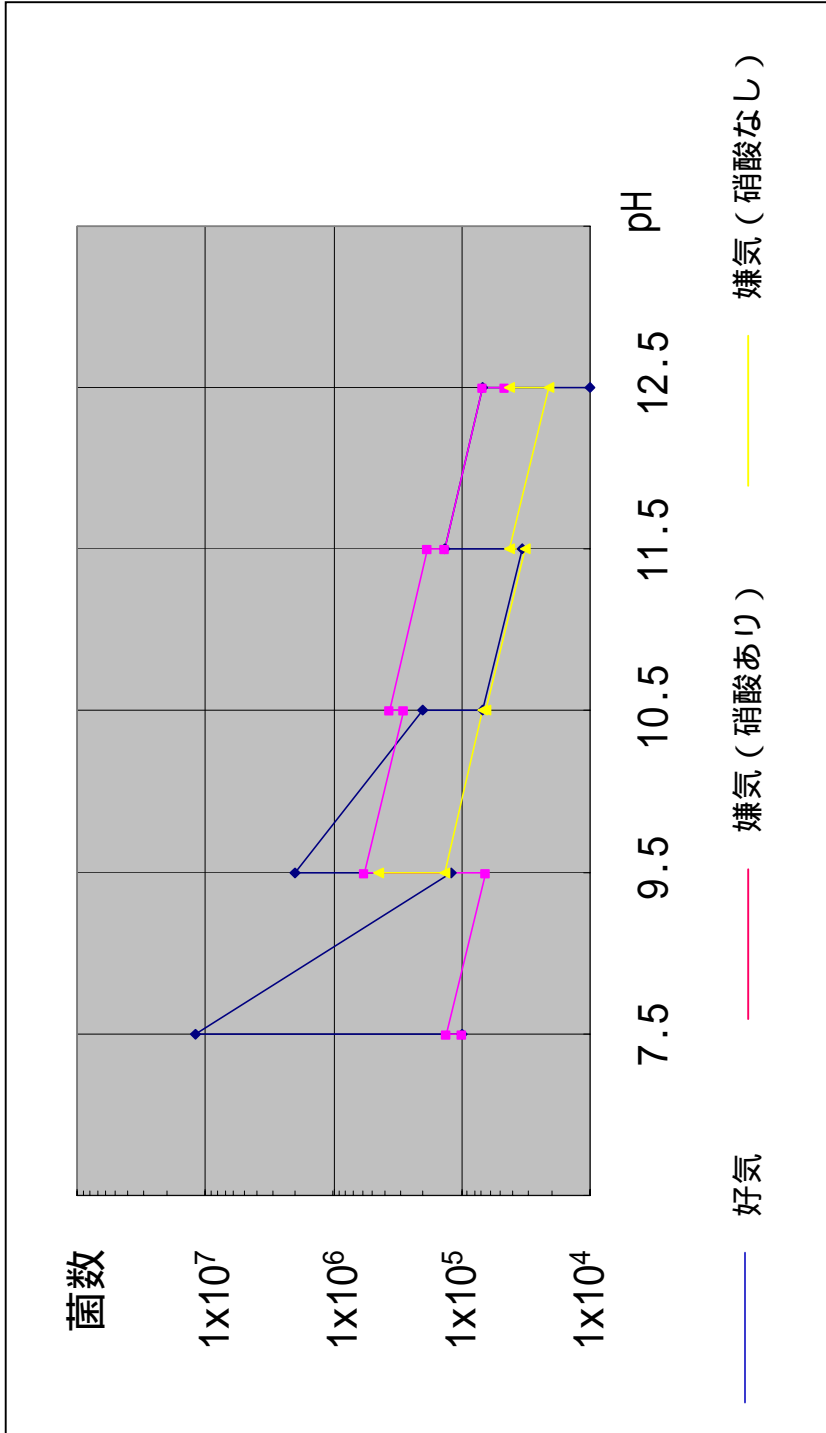


図5 アスファルトによる馴化培養におけるTN160の総菌数の推移

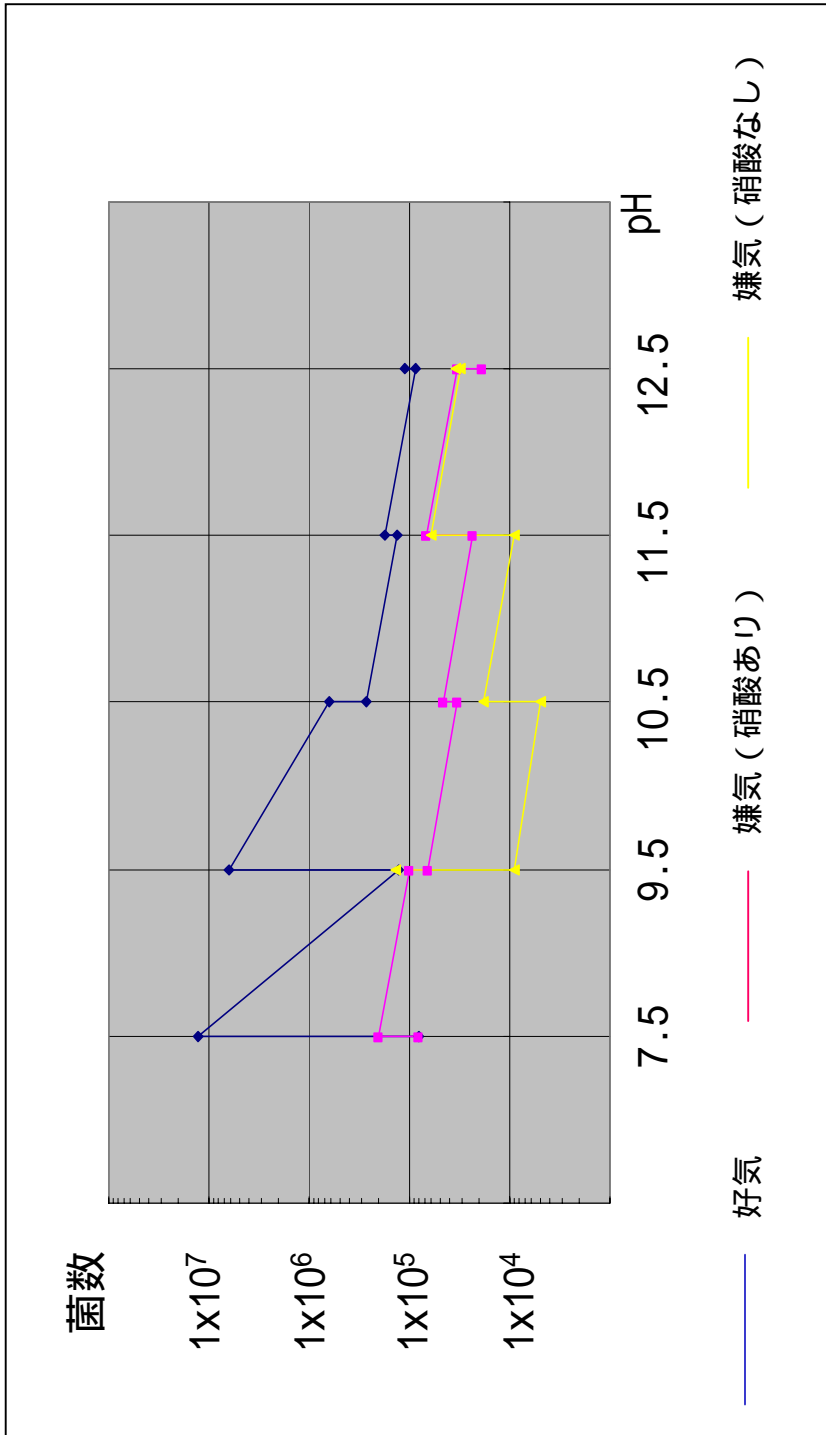


図6 アスファルトによる馴化培養におけるTN180の総菌数の推移

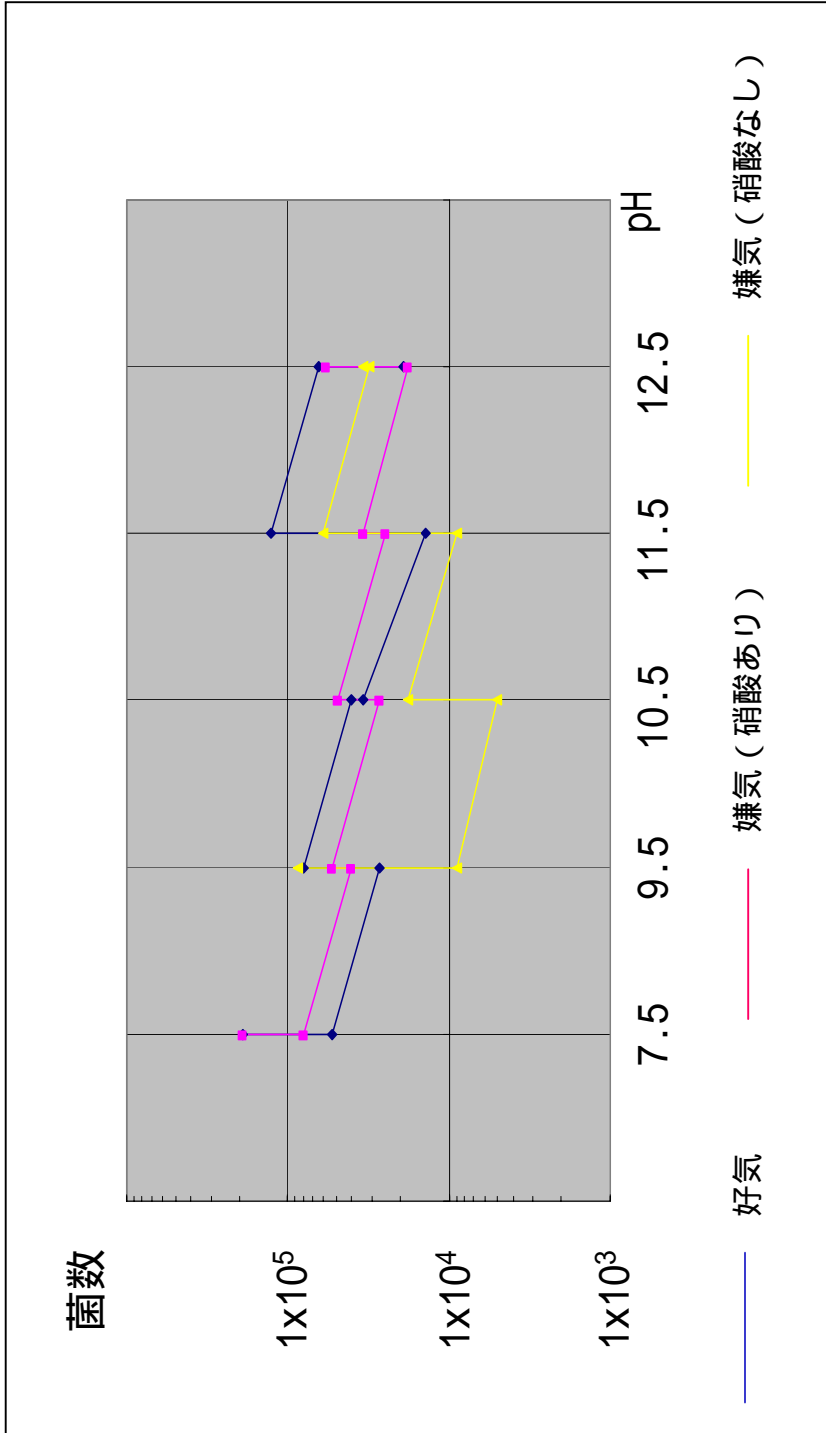


図7 アスファルトによる馴化培養におけるHG600の総菌数の推移

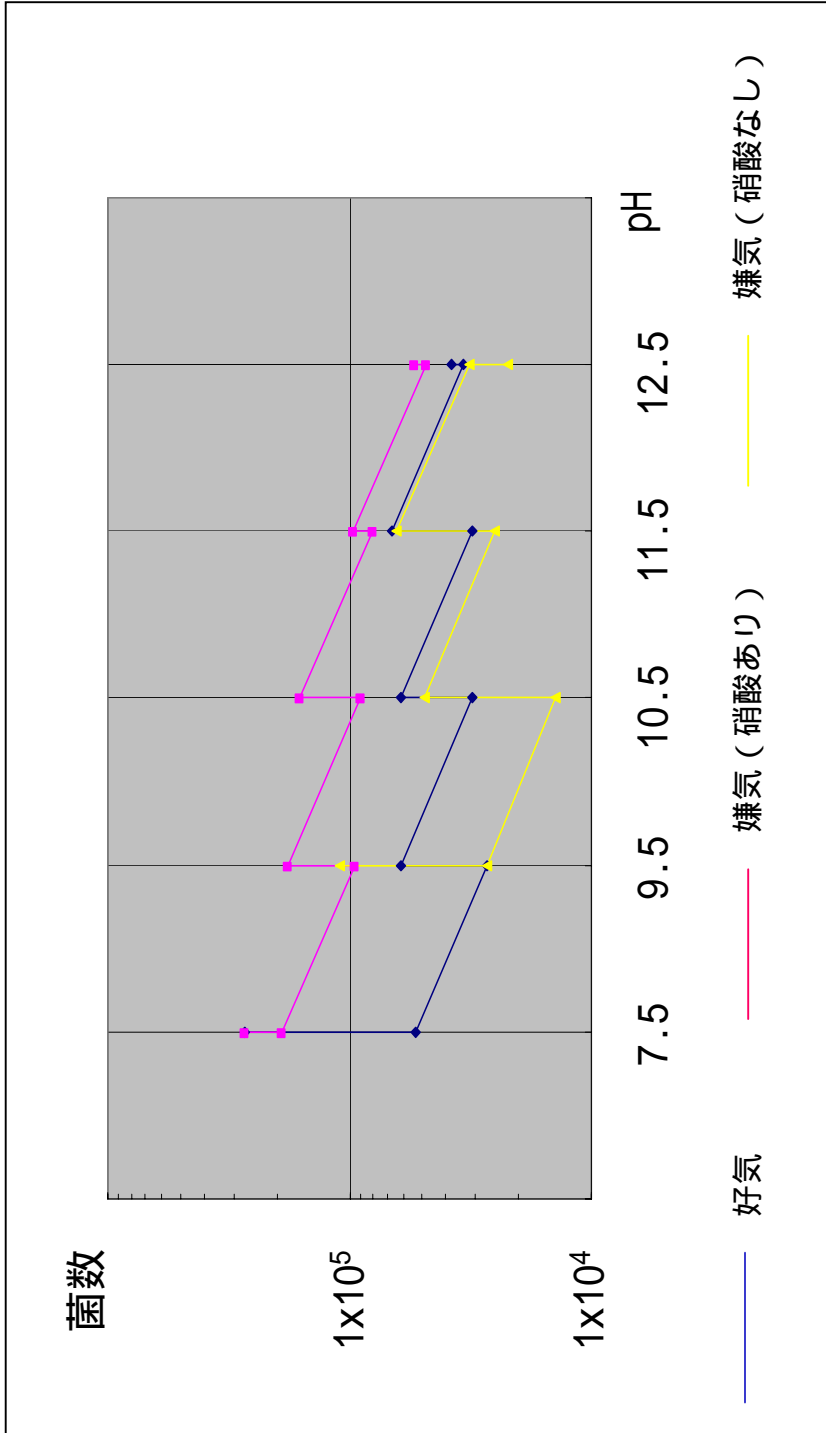


図8 アスファルトによる馴化培養におけるHG700の総菌数の推移

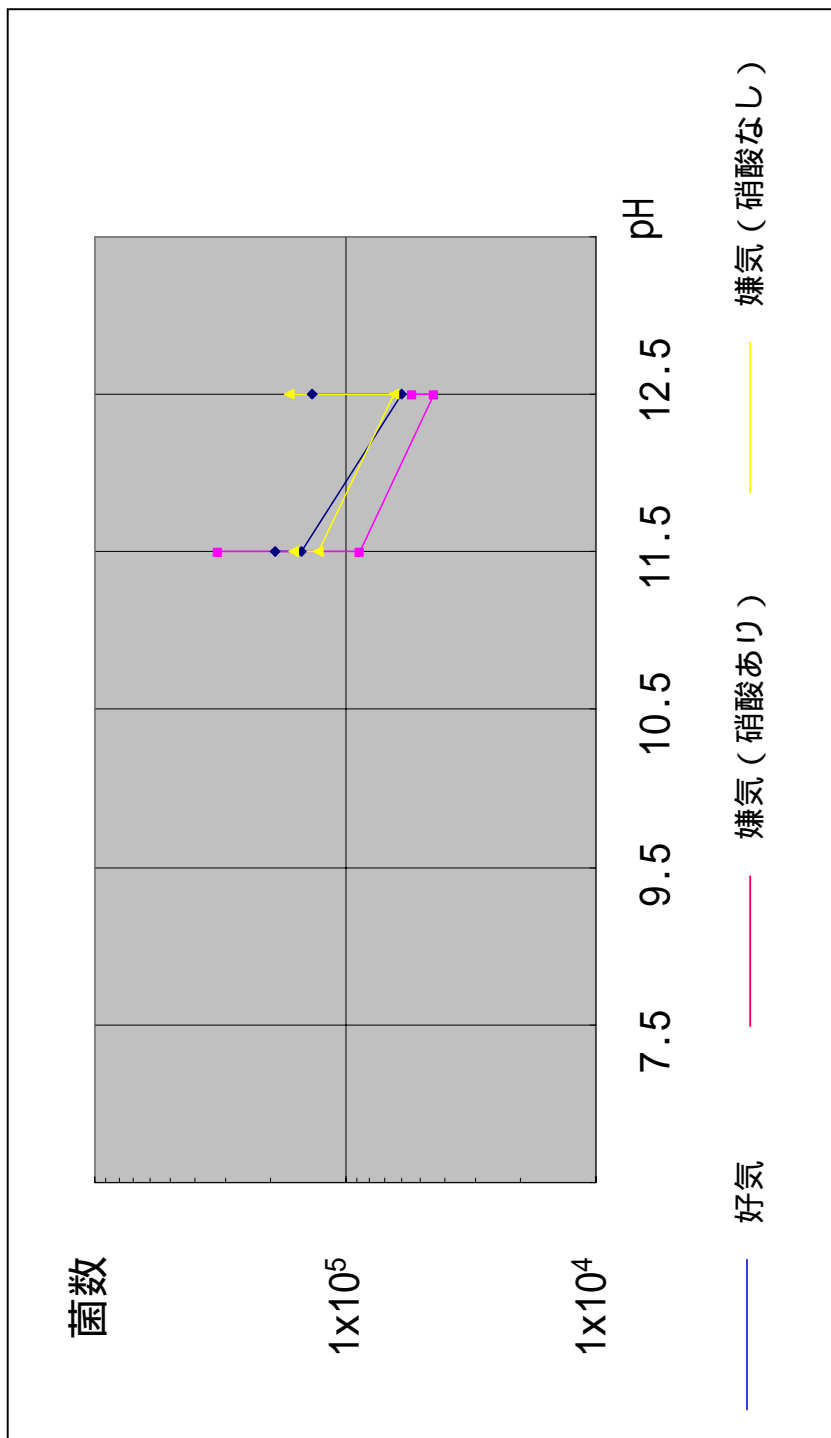


図9 アスファルトによる馴化培養における0K12の総菌数の推移

表1 採取地下水サンプル

| サンプル | 深度 | 岩質 | 場所 |
|-------|-------|--------|-------------------------|
| TN160 | 160 m | 土岐夾炭累層 | 岐阜県土岐市 東濃鉾山試錐孔 KNA-6 |
| TN180 | 180 m | 土岐花崗岩 | 岐阜県土岐市 東濃鉾山試錐孔 KNA-6 |

表 2 培養液組成

| | |
|---|-------------------|
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 18mM |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 1 μM |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 100 μM |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 1mM |
| NaCl | 8.5mM |
| リン酸二ナトリウム - 水酸化ナトリウム緩衝液 | 10mM buffer |
| pH | 10.5、11.5、12.5 |

嫌気培養の場合は、100mMの硝酸態窒素を添加

表3 PCR法の反応条件

| | | |
|--|--------------|----------------|
| <ul style="list-style-type: none"> PCR反応溶液 (50 μlスケール) | | |
| 10 \times buffer | 5 μ l | |
| 10 \times MgCl ₂ | 5 μ l | |
| d-NTP MIXTURE (2.5mM) | 5 μ l | (final:0.25mM) |
| DGGE clamp primer (10pmol/ μ l) | 1 μ l | |
| 518R Primer (10pmol/ μ l) | 1 μ l | |
| Taq DNA Polymerase (5U/ μ l Taq) | 0.2 μ l | |
| 鋳型DNA | 4 μ l | |
| water | 28.8 μ l | |
| <ul style="list-style-type: none"> 反応条件 | | |
| Hot start | | |
| 94 | 5min | |
| Denature temp. | 94 | } 35 cycle |
| Annealing temp. | 53 | |
| Extension temp. | 72 | |
| 72 | 5min | |

表 4 多環芳香族馴化サンプルによるアスファルト分解試験(TN160AA：バイアル試験)

| サンプル | TN160AA +10.5 | TN160AA +11.5 | TN160AA +12.5 | TN160AA -10.5 | TN160AA -11.5 | TN160AA -12.5 |
|-------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| アスファルト重量 (g) | 0.146 | 0.208 | 0.197 | 0.362 | 0.275 | 0.131 |
| IC(ppm) | 57 | 69 | 90 | 75 | 95 | 116 |
| TOC(ppm) | 3 | 5 | 7 | 1 | 5 | 28 |
| 分解IC(mg/g) | 19 | 17 | 23 | 10 | 17 | 44 |
| 分解TOC(mg/g) | 1.0 | 1.2 | 1.8 | 0.1 | 0.9 | 10.7 |
| 微生物種 (開始) | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| 微生物種 (6週間) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 微生物濃度 (開始) X10 ⁴ | 3 | 3 | 4 | 9 | 3 | 3 |
| 微生物濃度 (6週間後) X10 ⁴ | 4 | 10 | 9 | 7 | 7 | 9 |
| 微生物濃度 (増殖量) X10 ⁴ | 1 | 7 | 5 | -2 | 4 | 6 |

表 5 多環芳香族馴化サンプルによるアスファルト分解試験(TN160AA : 結晶皿試験)

| サンプル | TN160AA +10.5 | TN160AA +11.5 | TN160AA +12.5 | TN160AA -10.5 | TN160AA -11.5 | TN160AA -12.5 |
|---------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| アスファルト重量変化 (mg) | 0 | 0 | 0.2 | 1.8 | 1.6 | 2.8 |
| アスファルト面積 (cm ²) | 10.27 | 9.10 | 5.48 | 5.43 | 5.64 | 5.66 |
| アスファルト分解量 (mg/cm ²) | 0.00 | 0.00 | 0.04 | 0.33 | 0.28 | 0.49 |
| 微生物濃度 (開始) X10 ⁴ | 3 | 3 | 4 | 9 | 3 | 3 |
| 微生物濃度 (6週間後) X10 ⁴ | 56 | 50 | 34 | 28 | 23 | 14 |
| 微生物濃度 (増殖量) X10 ⁴ | 53 | 47 | 30 | 20 | 20 | 11 |

表 6 多環芳香族馴化サンプルによるアスファルト分解試験(TN180AA : バイアル試験)

| サンプル | TN180AA +10.5 | TN180AA +11.5 | TN180AA +12.5 | TN180AA -10.5 | TN180AA -11.5 | TN180AA -12.5 |
|-------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| アスファルト重量 (g) | 0.229 | 0.234 | 0.284 | 0.167 | 0.194 | 0.171 |
| IC(ppm) | 69 | 58 | 82 | 72 | 72 | 120 |
| TOC(ppm) | 3 | 18 | 0 | 7 | 0 | 18 |
| 分解IC(mg/g) | 15 | 12 | 14 | 22 | 19 | 35 |
| 分解TOC(mg/g) | 0.7 | 3.8 | 0.0 | 2.1 | 0.0 | 5.3 |
| 微生物種 (開始) | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| 微生物種 (6週間) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 微生物濃度 (開始) X10 ⁴ | 3 | 7 | 4 | 8 | 4 | 5 |
| 微生物濃度 (6週間後) X10 ⁴ | 5 | 30 | 23 | 4 | 4 | 11 |
| 微生物濃度 (増殖量) X10 ⁴ | 2 | 23 | 19 | -4 | 0 | 6 |

表7 多環芳香族馴化サンプルによるアスファルト分解試験(TN180AA : 結晶皿試験)

| サンプル | TN180AA +10.5 | TN180AA +11.5 | TN180AA +12.5 | TN180AA -10.5 | TN180AA -11.5 | TN180AA -12.5 |
|---------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| アスファルト重量変化 (mg) | 0 | 0 | 0 | 1.8 | 1.9 | 2 |
| アスファルト面積 (cm ²) | 9.03 | 8.61 | 8.70 | 7.27 | 7.15 | 12.76 |
| アスファルト分解量 (mg/cm ²) | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.25 | 0.27 | 0.16 |
| 微生物濃度 (開始) X10 ⁴ | 3 | 7 | 4 | 8 | 4 | 5 |
| 微生物濃度 (6週間後) X10 ⁴ | 37 | 14 | 18 | 30 | 35 | 29 |
| 微生物濃度 (増殖量) X10 ⁴ | 34 | 7 | 14 | 22 | 31 | 24 |

表 8 分析対象微生物（多環芳香族馴化サンプル）

| sample | 微生物 | 試験前 試験後 | 10.5+ | 11.5+ | 12.5+ | 10.5- | 11.5- | 12.5- |
|---------|-----|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | | | | | | | |
| TN160AA | 微生物 | 試験前 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| | | 試験後 | | | | | | |
| TN180AA | 微生物 | 試験前 | | | | | | ○ |
| | | 試験後 | | | ○ | ○ | ○ | ○ |

表9 アスファルト分解試験前後の微生物相（多環芳香族馴化サンプル）

| 微生物種 | ACCESSION No. | 登録塩基数 | Identity | Homology (%) | Remarks |
|---|---------------|-------|----------|--------------|---|
| 微生物 Aniline-degrading bacterium HY99 | AF21031 | 1525 | 159/160 | 99.4 | aniline degrading |
| 微生物 Uncultured bacterium clone RB13C11 | AF407414 | 1492 | 159/160 | 99.4 | groundwater samples contaminated with chlorobenzene |

表10 多環芳香族馴化サンプルによるアスファルト分解試験
 ブランク測定実測データ

| 好気 (+) | Ref+10.5 | Ref+11.5 | Ref+12.5 | 平均 |
|-----------------|----------|----------|----------|------|
| アスファルト重量変化 (mg) | -1.5 | 0.5 | 0.6 | -0.1 |
| IC(ppm) | 11 | 9 | 7 | 9 |
| TOC(ppm) | 4 | 5 | 4 | 4 |
| 嫌気 (-) | Ref-10.5 | Ref-11.5 | Ref-12.5 | 平均 |
| アスファルト重量変化 (mg) | 1.3 | 2.3 | 3.5 | 2.4 |
| IC(ppm) | 17 | 15 | 17 | 16 |
| TOC(ppm) | 4 | 6 | 7 | 6 |

表11 多環芳香族馴化微生物によるアスファルト分解試験のまとめ

好気性

| | | TN-160AA | TN-180AA | |
|----------|------|----------|----------|-----------------|
| IC | 10.5 | | | 40以上、 20以上、 5以上 |
| (バイアル) | 12.5 | | | |
| TOC | 10.5 | | | 40以上、 20以上、 5以上 |
| (バイアル) | 12.5 | | | |
| 微生物種数 | 10.5 | | | 種の増加数 |
| (バイアル) | 12.5 | | | |
| 微生物濃度 | 10.5 | | | 5倍以上増加、 2倍以上増加 |
| (バイアル) | 12.5 | | | |
| アスファルト分解 | 10.5 | | | 1以上、 0.5以上 |
| (結晶皿) | 12.5 | | | |
| 微生物濃度 | 10.5 | | | 5倍以上増加、 2倍以上増加 |
| (結晶皿) | 12.5 | | | |

表中数字の単位：IC、TOCはppm、アスファルト分解はmg/cm²

着色部は、複数項目に印のついた試験区。

嫌気性

| | | TN-160 | TN-180 | |
|----------|------|--------|--------|-----------------|
| IC | 10.5 | | | 40以上、 20以上、 5以上 |
| (バイアル) | 12.5 | | | |
| TOC | 10.5 | | | 40以上、 20以上、 5以上 |
| (バイアル) | 12.5 | | | |
| 微生物種数 | 10.5 | | | 種の増加数 |
| (バイアル) | 12.5 | | | |
| 微生物濃度 | 10.5 | | | 5倍以上増加、 2倍以上増加 |
| (バイアル) | 12.5 | | | |
| アスファルト分解 | 10.5 | | | 1以上、 0.5以上 |
| (結晶皿) | 12.5 | | | |
| 微生物濃度 | 10.5 | | | 5倍以上増加、 2倍以上増加 |
| (結晶皿) | 12.5 | | | |

表中数字の単位：IC、TOCはppm、アスファルト分解はmg/cm²

着色部は、複数項目に印のついた試験区。

アスファルト分解 まとめ

| | | TN160 | TN180 | |
|---------------------|--------|-------|-------|--------|
| 好気性菌による アスファルト分解 | pH10.5 | | | バイアル試験 |
| | pH12.5 | | | 結晶皿試験 |
| 嫌気性菌による アスファルト分解 | pH10.5 | | | バイアル試験 |
| | pH12.5 | | | 結晶皿試験 |

表12 採取地下水サンプル

| サンプル | 温度(°C) | pH | 深度(m) | 場所 |
|-------|--------|------|-------|-----------|
| TN160 | 22 | 7.2 | 160 | 東濃鉾山(岐阜) |
| TN180 | 22 | 7.2 | 180 | 東濃鉾山(岐阜) |
| HG600 | 35 | 7.5 | 600 | ガス田(新潟) |
| HG700 | 35 | 7.5 | 700 | ガス田(新潟) |
| OK12 | 15 | 11.5 | 表層 | 鉾山貯留池(石川) |

表13 アスファルトによる馴化培養における微生物濃度(1ml当たり)

| サンプル | 培養環境 | | pH7.5 | pH9.5 | pH10.5 | pH11.5 | pH12.5 |
|---------|------------|---------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| TN160+ | 好気 | 初期微生物濃度 | 1.0X10 ⁵ | 1.2X10 ⁵ | 2.0X10 ⁵ | 3.4X10 ⁴ | 6.8X10 ⁴ |
| | | 最終微生物濃度 | 1.2X10 ⁷ | 2.0X10 ⁶ | 6.8X10 ⁴ | 1.4X10 ⁵ | 1.0X10 ⁴ |
| TN160- | 嫌気(硝酸塩添加) | 初期微生物濃度 | 1.0X10 ⁵ | 6.5X10 ⁴ | 2.9X10 ⁵ | 1.8X10 ⁵ | 6.8X10 ⁴ |
| | | 最終微生物濃度 | 1.3X10 ⁵ | 5.7X10 ⁵ | 3.7X10 ⁵ | 1.4X10 ⁵ | 4.6X10 ⁴ |
| TN160-N | 嫌気(硝酸塩無添加) | 初期微生物濃度 | | 4.4X10 ⁵ | 6.8X10 ⁴ | 3.2X10 ⁴ | 2.1X10 ⁴ |
| | | 最終微生物濃度 | | 1.4X10 ⁵ | 6.4X10 ⁴ | 4.2X10 ⁴ | 4.2X10 ⁴ |
| TN180+ | 好気 | 初期微生物濃度 | 0.8X10 ⁵ | 1.3X10 ⁵ | 6.2X10 ⁵ | 1.4X10 ⁵ | 8.8X10 ⁴ |
| | | 最終微生物濃度 | 1.3X10 ⁷ | 6.2X10 ⁶ | 2.7X10 ⁵ | 1.8X10 ⁵ | 1.1X10 ⁵ |
| TN180- | 嫌気(硝酸塩添加) | 初期微生物濃度 | 8.0X10 ⁴ | 1.0X10 ⁵ | 3.3X10 ⁴ | 2.3X10 ⁴ | 3.4X10 ⁴ |
| | | 最終微生物濃度 | 2.0X10 ⁵ | 6.5X10 ⁴ | 4.6X10 ⁴ | 6.7X10 ⁴ | 1.9X10 ⁴ |
| TN180-N | 嫌気(硝酸塩無添加) | 初期微生物濃度 | | 1.4X10 ⁵ | 0.5X10 ⁴ | 0.9X10 ⁴ | 3.1X10 ⁴ |
| | | 最終微生物濃度 | | 0.9X10 ⁴ | 1.8X10 ⁴ | 6.1X10 ⁴ | 3.4X10 ⁴ |
| HG600+ | 好気 | 初期微生物濃度 | 1.9X10 ⁵ | 2.7X10 ⁴ | 4.0X10 ⁴ | 1.4X10 ⁴ | 6.4X10 ⁴ |
| | | 最終微生物濃度 | 5.3X10 ⁴ | 8.0X10 ⁴ | 3.4X10 ⁴ | 1.3X10 ⁵ | 1.9X10 ⁴ |
| HG600- | 嫌気(硝酸塩添加) | 初期微生物濃度 | 1.9X10 ⁵ | 4.0X10 ⁴ | 2.7X10 ⁴ | 2.5X10 ⁴ | 1.8X10 ⁴ |
| | | 最終微生物濃度 | 8.0X10 ⁴ | 5.3X10 ⁴ | 4.9X10 ⁴ | 3.4X10 ⁴ | 5.8X10 ⁴ |
| HG600-N | 嫌気(硝酸塩無添加) | 初期微生物濃度 | | 8.7X10 ⁴ | 0.5X10 ⁴ | 1.4X10 ⁴ | 2.3X10 ⁴ |
| | | 最終微生物濃度 | | 0.9X10 ⁴ | 2.7X10 ⁴ | 4.6X10 ⁴ | 2.2X10 ⁴ |
| HG700+ | 好気 | 初期微生物濃度 | 2.7X10 ⁵ | 2.7X10 ⁴ | 3.1X10 ⁴ | 3.1X10 ⁴ | 3.4X10 ⁴ |
| | | 最終微生物濃度 | 5.3X10 ⁴ | 6.1X10 ⁴ | 6.1X10 ⁴ | 6.7X10 ⁴ | 3.8X10 ⁴ |
| HG700- | 嫌気(硝酸塩添加) | 初期微生物濃度 | 2.7X10 ⁵ | 9.5X10 ⁴ | 9.0X10 ⁴ | 8.0X10 ⁴ | 4.8X10 ⁴ |
| | | 最終微生物濃度 | 1.9X10 ⁵ | 1.8X10 ⁵ | 1.6X10 ⁵ | 9.6X10 ⁴ | 5.4X10 ⁴ |
| HG700-N | 嫌気(硝酸塩無添加) | 初期微生物濃度 | | 1.1X10 ⁵ | 1.4X10 ⁴ | 2.5X10 ⁴ | 3.2X10 ⁴ |
| | | 最終微生物濃度 | | 2.7X10 ⁴ | 4.9X10 ⁴ | 6.4X10 ⁴ | 2.2X10 ⁴ |
| OK12+ | 好気 | 初期微生物濃度 | | | | 1.9X10 ⁵ | 6.0X10 ⁴ |
| | | 最終微生物濃度 | | | | 1.5X10 ⁵ | 1.4X10 ⁵ |
| OK12- | 嫌気(硝酸塩添加) | 初期微生物濃度 | | | | 3.2X10 ⁵ | 4.4X10 ⁴ |
| | | 最終微生物濃度 | | | | 8.7X10 ⁴ | 5.4X10 ⁴ |
| OK12-N | 嫌気(硝酸塩無添加) | 初期微生物濃度 | | | | 1.6X10 ⁵ | 6.4X10 ⁴ |
| | | 最終微生物濃度 | | | | 1.3X10 ⁵ | 1.7X10 ⁵ |

表14 アスファルトによる馴化培養における微生物種数

| サンプル | 培養環境 | 源サンプル | pH7.5 | pH9.5 | pH10.5 | pH11.5 | pH12.5 |
|---------|------------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| TN160+ | 好気 | 4 | 7 | 1 | ND | ND | ND |
| TN160- | 嫌気(硝酸塩添加) | | 1 | 2 | ND | ND | ND |
| TN160-N | 嫌気(硝酸塩無添加) | | -- | ND | ND | ND | ND |
| TN180+ | 好気 | 4 | 8 | 1 | ND | ND | ND |
| TN180- | 嫌気(硝酸塩添加) | | 1 | 1 | ND | ND | ND |
| TN180-N | 嫌気(硝酸塩無添加) | | -- | ND | ND | ND | ND |
| HG600+ | 好気 | 5 | 2 | ND | ND | ND | ND |
| HG600- | 嫌気(硝酸塩添加) | | 2 | ND | ND | ND | ND |
| HG600-N | 嫌気(硝酸塩無添加) | | -- | ND | ND | ND | ND |
| HG700+ | 好気 | 2 | 8 | ND | ND | ND | ND |
| HG700- | 嫌気(硝酸塩添加) | | ND | ND | ND | ND | ND |
| HG700-N | 嫌気(硝酸塩無添加) | | -- | 1 | ND | ND | ND |
| OK12+ | 好気 | 7 | -- | -- | -- | ND | ND |
| OK12- | 嫌気(硝酸塩添加) | | -- | -- | -- | ND | ND |
| OK12-N | 嫌気(硝酸塩無添加) | | -- | -- | -- | ND | ND |

表15 アスファルト馴化サンプルによるアスファルト分解試験
 ブランク測定実測データ

| 好気 (+) | Ref+10.5 | Ref+11.5 | Ref+12.5 | 平均 |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|------|
| アスファルト重量変化 (mg) | -1.9 | -1.7 | -2.1 | -1.9 |
| IC(ppm) | 1.6 | 1.2 | 2.2 | 1.6 |
| TOC(ppm) | 4.0 | 7.1 | 3.4 | 4.8 |
| 嫌気 (-) 硝酸塩添加 | Ref-10.5 | Ref-11.5 | Ref-12.5 | 平均 |
| アスファルト重量変化 (mg) | 0.1 | -0.1 | 0.0 | 0.0 |
| IC(ppm) | 2.6 | 2.8 | 3.8 | 3.1 |
| TOC(ppm) | 2.9 | -1.2 | 7.2 | 3.0 |
| 嫌気 (-N) 硝酸塩無添加 | Ref-N10.5 | Ref-N11.5 | Ref-N12.5 | 平均 |
| アスファルト重量変化 (mg) | 0.3 | 0.6 | 0.5 | 0.5 |
| IC(ppm) | 2.1 | 4.1 | 6.5 | 4.2 |
| TOC(ppm) | 7.5 | 7.4 | -0.7 | 4.7 |

表16 アスファルト馴化サンプルによるアスファルト分解試験(TN160：バイアル試験)

| サンプル | TN160+10.5 | TN160+11.5 | TN160+12.5 | TN160-10.5 | TN160-11.5 | TN160-12.5 | TN160-N10.5 | TN160-N11.5 | TN160-N12.5 | TN160-N10.5 | TN160-N11.5 | TN160-N12.5 |
|------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| アスファルト重量(g) | 0.3295 | 0.3306 | 0.2447 | 0.3805 | 0.7 | 0.6259 | 0.5593 | 0.5207 | 0.4483 | | | |
| IC(ppm) | 74 | 56 | 107 | 20 | 10 | 40 | 19 | 22 | 3 | | | |
| TOC(ppm) | 0 | 14 | 0 | 3 | 19 | 0 | 2 | 0 | 19 | | | |
| 分解IC(mg/g) | 11.2 | 8.5 | 21.9 | 2.6 | 0.7 | 3.2 | 1.7 | 2.1 | 0.4 | | | |
| 分解TOC(mg/g) | 0.0 | 2.1 | 0.0 | 0.4 | 1.3 | 0.0 | 0.2 | 0.0 | 2.2 | | | |
| 微生物種(開始) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| 微生物種(6週間) | 0 | 0 | 0 | 4 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | | | |
| 微生物濃度(開始) X10 ⁴ | 1.3 | 1.3 | 0.4 | 1.9 | 1.7 | 2.3 | 1.9 | 3 | 2.1 | | | |
| 微生物濃度(6週間後) X10 ⁴ | 11 | 10 | 1.1 | 1.9 | 6.8 | 1.5 | 1.9 | 7.6 | 1.5 | | | |
| 微生物濃度(増殖量) X10 ⁴ | 9.7 | 8.7 | 0.7 | 0.0 | 5.1 | -0.8 | 0.0 | 4.6 | -0.6 | | | |

表17 アスファルト馴化サンプルによるアスファルト分解試験(TN160：結晶皿試験)

| サンプル | TN160+10.5 | TN160+11.5 | TN160+12.5 | TN160-10.5 | TN160-11.5 | TN160-12.5 | TN160-N10.5 | TN160-N11.5 | TN160-N12.5 |
|---------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| アスファルト重量変化 (mg) | 0.0 | 0.0 | 6.5 | 0.0 | 0.0 | 8.0 | 0.0 | 0.0 | 6.0 |
| アスファルト面積 (cm ²) | 8.224 | 8.119 | 8.657 | 7.224 | 7.746 | 9.134 | 11.239 | 8.104 | 9.866 |
| アスファルト分解量 (mg/cm ²) | 0.0 | 0.0 | 0.8 | 0.0 | 0.0 | 0.9 | 0.0 | 0.0 | 0.6 |
| 微生物濃度 (開始) X10 ⁴ | 1.3 | 1.3 | 1.3 | 1.9 | 1.7 | 2.3 | 1.9 | 3 | 2.1 |
| 微生物濃度 (6週間後) X10 ⁴ | 3 | 3 | 3 | 2.3 | 4.6 | 0.4 | 2.3 | 1.9 | 3.8 |
| 微生物濃度 (増殖量) X10 ⁴ | 1.7 | 1.7 | 1.7 | 0.4 | 2.9 | -1.9 | 0.4 | -1.1 | 1.7 |

表18 アスファルト馴化サンプルによるアスファルト分解試験(TN180：バイアル試験)

| サンプル | TN180+10.5 | TN180+11.5 | TN180+12.5 | TN180-10.5 | TN180-11.5 | TN180-12.5 | TN180-N10.5 | TN180-N11.5 | TN180-N12.5 |
|------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| アスファルト重量(g) | 0.3272 | 0.3422 | 0.2506 | 0.3246 | 0.3539 | 0.4205 | 0.5928 | 0.4769 | 0.4958 |
| IC(ppm) | 60 | 62 | 108 | 17 | 12 | 38 | 13 | 15 | 31 |
| TOC(ppm) | 8 | 26 | 0 | 14 | 7 | 0 | 3 | 9 | 0 |
| 分解IC(mg/g) | 9.2 | 9.1 | 21.6 | 2.6 | 1.6 | 4.5 | 1.1 | 1.6 | 3.2 |
| 分解TOC(mg/g) | 1.2 | 3.8 | 0.0 | 2.1 | 0.9 | 0.0 | 0.2 | 0.9 | 0.0 |
| 微生物種(開始) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 微生物種(6週間) | 1 | 1 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 微生物濃度(開始) X10 ⁴ | 6.1 | 8.4 | 5.7 | 1.5 | 2.3 | 1.0 | 1.5 | 1.7 | 1.7 |
| 微生物濃度(6週間後) X10 ⁴ | 23 | 33 | 4.2 | 2.3 | 4.9 | 4.6 | 2.7 | 1.9 | 1.5 |
| 微生物濃度(増殖量) X10 ⁴ | 16.9 | 24.6 | -1.5 | 0.8 | 2.6 | 3.7 | 1.2 | 0.2 | -0.2 |

表19 アスファルト馴化サンプルによるアスファルト分解試験(TN180：結晶皿試験)

| サンプル | TN180+10.5 | TN180+11.5 | TN180+12.5 | TN180-10.5 | TN180-11.5 | TN180-12.5 | TN180-N10.5 | TN180-N11.5 | TN180-N12.5 | TN180-N10.5 | TN180-N11.5 | TN180-N12.5 |
|---------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| アスファルト重量変化 (mg) | 2.4 | 0.5 | 7.4 | 0.0 | 0.0 | 7.5 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 7.0 |
| アスファルト面積 (cm ²) | 6.701 | 6.075 | 7.836 | 6.672 | 9.851 | 6.985 | 11.119 | 8.507 | 9.836 | | | |
| アスファルト分解量 (mg/cm ²) | 0.4 | 0.1 | 0.9 | 0.0 | 0.0 | 1.1 | 0.0 | 0.0 | 0.7 | | | |
| 微生物濃度 (開始) X10 ⁴ | 6.1 | 8.4 | 5.7 | 1.5 | 2.3 | 1.0 | 1.5 | 1.7 | 1.7 | | | |
| 微生物濃度 (6週間後) X10 ⁴ | 4.2 | 7.2 | 7.2 | 3.4 | 2.3 | 1.5 | 1.1 | 1.5 | 2.7 | | | |
| 微生物濃度 (増殖量) X10 ⁴ | -1.9 | -1.2 | 1.5 | 1.9 | 0.0 | 0.6 | -0.4 | -0.2 | 1.0 | | | |

表20 アスファルト馴化サンプルによるアスファルト分解試験(HG600：バイアル試験)

| サンプル | HG600+10.5 | HG600+11.5 | HG600+12.5 | HG600-10.5 | HG600-11.5 | HG600-12.5 | HG600-N10.5 | HG600-N11.5 | HG600-N12.5 |
|-------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| アスファルト重量 (g) | 0.3801 | 0.341 | 0.3606 | 0.2702 | 0.6804 | 0.5528 | 0.9622 | 0.7439 | 0.4133 |
| IC(ppm) | 33 | 22 | 47 | 17 | 20 | 35 | 26 | 9 | 33 |
| TOC(ppm) | 13 | 14 | 56 | 24 | 10 | 9 | 39 | 16 | 4 |
| 分解IC (mg/g) | 4.3 | 3.2 | 6.6 | 3.2 | 1.4 | 3.2 | 1.4 | 0.6 | 4.0 |
| 分解TOC (mg/g) | 1.7 | 2.1 | 7.8 | 4.5 | 0.7 | 0.8 | 2.0 | 1.1 | 0.5 |
| 微生物種 (開始) | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 微生物種 (6週間) | 1 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 2 | 1 | 0 |
| 微生物濃度 (開始) X10 ⁴ | 1.0 | 0.8 | 1.0 | 1.1 | 1.3 | 2.9 | 1.0 | 1.0 | 1.1 |
| 微生物濃度 (6週間後) X10 ⁴ | 3.8 | 2.3 | 2.7 | 4.9 | 3.8 | 1.9 | 2.7 | 2.3 | 4.2 |
| 微生物濃度 (増殖量) X10 ⁴ | 2.9 | 1.5 | 1.8 | 3.8 | 2.5 | -1.0 | 1.8 | 1.4 | 3.1 |

表21 アスファルト馴化サンプルによるアスファルト分解試験(HG600：結晶皿試験)

| サンプル | HG600+10.5 | HG600+11.5 | HG600+12.5 | HG600-10.5 | HG600-11.5 | HG600-12.5 | HG600-N10.5 | HG600-N11.5 | HG600-N12.5 |
|---------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| アスファルト重量変化 (mg) | 0.0 | 0.0 | 4.6 | 0.0 | 0.0 | 5.6 | 0.0 | 0.0 | 8.2 |
| アスファルト面積 (cm ²) | 8.687 | 8.299 | 6.045 | 8.179 | 9.224 | 9.507 | 8.701 | 8.299 | 8.970 |
| アスファルト分解量 (mg/cm ²) | 0.0 | 0.0 | 0.8 | 0.0 | 0.0 | 0.6 | 0.0 | 0.0 | 0.9 |
| 微生物濃度 (開始) X10 ⁴ | 1.0 | 0.8 | 1.0 | 1.1 | 1.3 | 2.9 | 1.0 | 1.0 | 1.1 |
| 微生物濃度 (6週間後) X10 ⁴ | 1.9 | 1.5 | 1.5 | 1.1 | 2.3 | 0.8 | 2.3 | 0.8 | 0.8 |
| 微生物濃度 (増殖量) X10 ⁴ | 1.0 | 0.7 | 0.6 | 0.0 | 1.0 | -2.1 | 1.4 | -0.2 | -0.3 |

表22 アスファルト馴化サンプルによるアスファルト分解試験(HG700：バイアル試験)

| サンプル | HG700+10.5 | HG700+11.5 | HG700+12.5 | HG700-10.5 | HG700-11.5 | HG700-12.5 | HG700-N10.5 | HG700-N11.5 | HG700-N12.5 |
|-------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| アスファルト重量 (g) | 0.2282 | 0.4522 | 0.2498 | 0.2229 | 0.4067 | 0.7158 | 0.4545 | 0.4655 | 0.6124 |
| IC(ppm) | 48 | 47 | 46 | 20 | 23 | 18 | 17 | 20 | 6 |
| TOC(ppm) | 0 | 24 | 41 | 0 | 14 | 30 | 17 | 0 | 4 |
| 分解IC(mg/g) | 10.6 | 5.2 | 9.2 | 4.5 | 2.9 | 1.2 | 1.9 | 2.1 | 0.5 |
| 分解TOC(mg/g) | 0.0 | 2.7 | 8.2 | 0.0 | 1.7 | 2.1 | 1.9 | 0.0 | 0.3 |
| 微生物種 (開始) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 微生物種 (6週間) | 3 | 3 | 2 | 4 | 2 | 0 | 2 | 3 | 4 |
| 微生物濃度 (開始) X10 ⁴ | 1.9 | 2.6 | 1.9 | 1.5 | 1.3 | 2.7 | 1.1 | 1.3 | 1.1 |
| 微生物濃度 (6週間後) X10 ⁴ | 10 | 4.2 | 4.2 | 6.1 | 4.6 | 6.1 | 3.8 | 4.9 | 1.5 |
| 微生物濃度 (増殖量) X10 ⁴ | 8.1 | 1.6 | 2.3 | 4.6 | 3.3 | 3.4 | 2.7 | 3.6 | 0.4 |

表23 アスファルト馴化サンプルによるアスファルト分解試験(HG700：結晶皿試験)

| サンプル | HG700+10.5 | HG700+11.5 | HG700+12.5 | HG700-10.5 | HG700-11.5 | HG700-12.5 | HG700-N10.5 | HG700-N11.5 | HG700-N12.5 |
|---------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| アスファルト重量変化 (mg) | 0.6 | 0.0 | 4.8 | 0.1 | 0.0 | 7.5 | 0.0 | 0.0 | 6.7 |
| アスファルト面積 (cm ²) | 7.313 | 8.851 | 6.239 | 6.507 | 9.045 | 9.104 | 6.896 | 6.985 | 7.731 |
| アスファルト分解量 (mg/cm ²) | 0.1 | 0.0 | 0.8 | 0.0 | 0.0 | 0.8 | 0.0 | 0.0 | 0.9 |
| 微生物濃度 (開始) X10 ⁴ | 1.9 | 2.6 | 1.9 | 1.5 | 1.3 | 2.9 | 1.1 | 1.3 | 1.1 |
| 微生物濃度 (6週間後) X10 ⁴ | 2.3 | 3 | 3 | 1.5 | 1.5 | 2.3 | 1.5 | 2.3 | 1.1 |
| 微生物濃度 (増殖量) X10 ⁴ | 0.4 | 0.4 | 1.1 | 0.0 | 0.2 | -0.6 | 0.4 | 1.0 | 0.0 |

表24 アスファルト馴化サンプルによるアスファルト分解試験(OK12:バイアル試験)

| サンプル | OK12+10.5 | OK12+11.5 | OK12+12.5 | OK12-10.5 | OK12-11.5 | OK12-12.5 | OK12-N10.5 | OK12-N11.5 | OK12-N12.5 |
|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|
| アスファルト重量 (g) | 0.3678 | 0.4826 | 0.2228 | 0.3617 | 0.5393 | 0.3087 | 0.6522 | 0.4886 | 0.4883 |
| IC(ppm) | 127 | 46 | 205 | 14 | 34 | 141 | 7 | 37 | 55 |
| TOC(ppm) | 0 | 48 | 4 | 20 | 73 | 42 | 3 | 3 | 21 |
| 分解IC(mg/g) | 17.3 | 4.7 | 46.1 | 1.9 | 3.1 | 22.9 | 0.6 | 3.7 | 5.6 |
| 分解TOC(mg/g) | 0.0 | 5.0 | 0.9 | 2.8 | 6.7 | 6.8 | 0.2 | 0.3 | 2.2 |
| 微生物種 (開始) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 微生物種 (6週間) | 4 | 0 | 0 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 1 |
| 微生物濃度 (開始) X10 ⁴ | 6.8 | 2.3 | 6.5 | 8 | 3.4 | 10 | 6.3 | 5.9 | 8.4 |
| 微生物濃度 (6週間後) X10 ⁴ | 11 | 9.5 | 5.7 | 3.8 | 4.6 | 4.6 | 4.9 | 6.1 | 4.6 |
| 微生物濃度 (増殖量) X10 ⁴ | 4.2 | 7.2 | -0.8 | -4.2 | 1.2 | -5.4 | -1.4 | 0.2 | -3.8 |

表25 アスファルト馴化サンプルによるアスファルト分解試験(OK12：結晶皿試験)

| サンプル | OK12+10.5 | OK12+11.5 | OK12+12.5 | OK12-10.5 | OK12-11.5 | OK12-12.5 | OK12-N10.5 | OK12-N11.5 | OK12-N12.5 |
|---------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|
| アスファルト重量変化 (mg) | 0.5 | 0.7 | 9.4 | 0.0 | 0.0 | 15.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| アスファルト面積 (cm ²) | 7.806 | 13.373 | 7.194 | 6.851 | 8.358 | 7.418 | 7.343 | 8.731 | 8.254 |
| アスファルト分解量 (mg/cm ²) | 0.1 | 0.1 | 1.3 | 0.0 | 0.0 | 2.0 | 0.0 | 0.0 | 0.8 |
| 微生物濃度 (開始) X10 ⁴ | 6.8 | 2.3 | 6.5 | 1.5 | 3.4 | 3 | 6.3 | 5.9 | 8.4 |
| 微生物濃度 (6週間後) X10 ⁴ | 6.1 | 6.1 | 6.1 | 2.7 | 3.4 | 3 | 2.3 | 2.7 | 2.7 |
| 微生物濃度 (増殖量) X10 ⁴ | -0.7 | 3.8 | -0.4 | 1.2 | 0.0 | 0.0 | -4.0 | -3.2 | -5.7 |

表26 分析対象微生物（アスファルト馴化サンプル）

| sample | 微生物 | 試験前 | 試験後 | 10.5+ | 11.5+ | 12.5+ | 10.5- | 11.5- | 12.5- | 10.5-N | 11.5-N | 12.5-N |
|--------|-----|-----|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| TN160 | 微生物 | | ○ | | | | | | | | | |
| | 微生物 | | ○ | | | | | ○ | | | | |
| TN180 | 微生物 | | ○ | | | | | ○ | | | | |
| | 微生物 | | ○ | | | | | ○ | | | | |
| HG600 | 微生物 | | ○ | ○ | ○ | ○ | | | | ○ | ○ | |
| | 微生物 | | ○ | ○ | ○ | | | | | ○ | ○ | |
| HG700 | 微生物 | | ○ | ○ | ○ | ○ | | | | ○ | ○ | ○ |
| | 微生物 | | ○ | ○ | ○ | | | | | ○ | ○ | ○ |
| OK12 | 微生物 | | ○ | ○ | ○ | ○ | | | | ○ | ○ | ○ |
| | 微生物 | | ○ | ○ | ○ | | | | | ○ | ○ | ○ |

表27 アスファルト分解試験前後の微生物相 (アスファルト馴化サンプル)

| 微生物種 | ACCESSION No. | 登録塩基数 | Identity | Homology (%) | Remarks |
|--|---------------|-------|----------|--------------|---|
| 微生物 Aniline-degrading bacterium HY99 | AF21031 | 1525 | 159/160 | 99.4 | aniline degrading |
| 微生物 Uncultured bacterium clone RB13C11 | AF407414 | 1492 | 159/160 | 99.4 | groundwater samples contaminated with chlorobenzene |
| 微生物 Oil-degrading bacterium AOB3 | AF249839 | 178 | 158/158 | 100 | Oil-degrading bacterium |
| 微生物 Uncultured bacterium clone RB13C11 | AF407414 | 1492 | 154/160 | 96.3 | groundwater samples contaminated with chlorobenzene |
| 微生物 Rhodopseudomonas palustris strain BIS10 | AF314064 | 1256 | 151/153 | 98.7 | degrade chlorinated benzoic acids |
| Rhodopseudomonas palustris strain BIS6 | AF416654 | 1256 | 151/153 | 98.7 | 3-chlorobenzoate-degrading |
| 微生物 Pseudomonas stutzeri | AF353684 | 631 | 159/160 | 99.4 | polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading |
| Pseudomonas pseudoalcaligenes | AF238494 | 1477 | 159/160 | 99.4 | metal cyanide degrading bacteria |
| Pseudomonas mendocina | AF232713 | 1439 | 159/160 | 99.4 | phenol- and p-cresol-degrading bacteria |
| 微生物 Uncultured eubacterium clone GL182.16 | AY038618 | 1283 | 146/153 | 95.4 | |
| Unidentified alpha proteobacterium gene | AB002633 | 1383 | 146/153 | 95.4 | deepest sea mud of the Mariana Trench |
| 微生物 Uncultured marine bacterium COL-22 | AY028405 | 194 | 160/160 | 100 | |
| Uncultured gamma proteobacterium MoDE-6 | AF419356 | 194 | 160/160 | 100 | |
| Unidentified bacterium oxSCC-14 | AJ387867 | 845 | 160/160 | 100 | soil cores |

表28 アスファルト馴化微生物によるアスファルト分解試験のまとめ

好気性

| | | TN-160 | TN-180 | HG-600 | HG-700 | OK-12 | |
|-------------------|------|--------|--------|--------|--------|-------|-----------------|
| IC (バイアル) | 10.5 | ■ | | | ■ | | 40以上、 20以上、 5以上 |
| | 12.5 | ■ | | ■ | | | |
| TOC (バイアル) | 10.5 | ■ | | | ■ | | 40以上、 20以上、 5以上 |
| | 12.5 | ■ | | ■ | | | |
| 微生物種数 (バイアル) | 10.5 | | 1 | | 3 | 4 | 種の増加数 |
| | 12.5 | | | | 2 | | |
| 微生物濃度 (バイアル) | 10.5 | ■ | | | ■ | | 5倍以上増加、 2倍以上増加 |
| | 12.5 | ■ | | ■ | | | |
| アスファルト分解 (結晶皿) | 10.5 | ■ | | | ■ | | 1以上、 0.5以上 |
| | 12.5 | ■ | | | ■ | | |
| 微生物濃度 (結晶皿) | 10.5 | ■ | | | ■ | | 5倍以上増加、 2倍以上増加 |
| | 12.5 | ■ | | | ■ | | |

表中数字の単位：IC、TOCはppm、アスファルト分解はmg/cm²
着色部は、複数項目に印のついた試験区。

嫌気性

| | | TN-160 | TN-180 | HG-600 | HG-700 | OK-12 | |
|-------------------|------|--------|--------|--------|--------|-------|-----------------|
| IC (バイアル) | 10.5 | | | | | ■ | 40以上、 20以上、 5以上 |
| | 12.5 | | | | | ■ | |
| TOC (バイアル) | 10.5 | | | | | ■ | 40以上、 20以上、 5以上 |
| | 12.5 | | | | | ■ | |
| 微生物種数 (バイアル) | 10.5 | 4 | 2 | 2 | 4 | 4 | 種の増加数 |
| | 12.5 | | | | | 4 | |
| 微生物濃度 (バイアル) | 10.5 | | | ■ | | | 5倍以上増加、 2倍以上増加 |
| | 12.5 | | | ■ | | | |
| アスファルト分解 (結晶皿) | 10.5 | | | | | | 1以上、 0.5以上 |
| | 12.5 | | | | | | |
| 微生物濃度 (結晶皿) | 10.5 | | | | | | 5倍以上増加、 2倍以上増加 |
| | 12.5 | | | | | | |

表中数字の単位：IC、TOCはppm、アスファルト分解はmg/cm²
着色部は、複数項目に印のついた試験区。

嫌気性(硝酸塩無添加)

| | | TN-160 | TN-180 | HG-600 | HG-700 | OK-12 | |
|-------------------|------|--------|--------|--------|--------|-------|-----------------|
| IC (バイアル) | 10.5 | | | | | ■ | 40以上、 20以上、 5以上 |
| | 12.5 | | | | | ■ | |
| TOC (バイアル) | 10.5 | | | | | ■ | 40以上、 20以上、 5以上 |
| | 12.5 | | | | | ■ | |
| 微生物種数 (バイアル) | 10.5 | 1 | | 2 | 2 | 4 | 種の増加数 |
| | 12.5 | | | | 4 | 1 | |
| 微生物濃度 (バイアル) | 10.5 | | | ■ | | | 5倍以上増加、 2倍以上増加 |
| | 12.5 | | | ■ | | | |
| アスファルト分解 (結晶皿) | 10.5 | | | | | | 1以上、 0.5以上 |
| | 12.5 | | | | | | |
| 微生物濃度 (結晶皿) | 10.5 | | | | | | 5倍以上増加、 2倍以上増加 |
| | 12.5 | | | | | | |

表中数字の単位：IC、TOCはppm、アスファルト分解はmg/cm²
着色部は、複数項目に印のついた試験区。

アスファルト分解 まとめ

| | | TN160 | TN180 | HG600 | HG700 | OK12 | |
|---------------------------------|--------|-------|-------|-------|-------|------|--------|
| 好気性菌による アスファルト分解 | pH10.5 | | | | | | バイアル試験 |
| | pH12.5 | | | | | | |
| 嫌気性菌による アスファルト分解 | pH10.5 | | | | | | |
| | pH12.5 | | | | | | |
| 嫌気性菌による アスファルト分解 (硝酸塩無添加) | pH10.5 | | | | | | |
| | pH12.5 | | | | | | |

表29 微生物物サンプルの総炭素量(TC)測定結果 (mg/g)

| 環境条件 | | 好気 | |
|---------|------|------------|------|
| pH | 10.5 | 11.5 | 12.5 |
| TN160 | 11.2 | 10.6 | 21.9 |
| TN180 | 10.4 | 12.9 | 21.6 |
| HG600 | 6.0 | 5.3 | 14.4 |
| HG700 | 10.6 | 7.9 | 17.4 |
| OK12 | 17.3 | 9.7 | 47.0 |
| TN160AA | 20.0 | 18.2 | 24.8 |
| TN180AA | 15.7 | 15.8 | 14.0 |
| 環境条件 | | 嫌気 | |
| pH | 10.5 | 11.5 | 12.5 |
| TN160 | 3.0 | 2.1 | 3.2 |
| TN180 | 4.7 | 2.5 | 4.5 |
| HG600 | 7.7 | 2.1 | 4.0 |
| HG700 | 4.5 | 4.6 | 3.3 |
| OK12 | 4.7 | 9.8 | 29.7 |
| TN160AA | 10.1 | 17.9 | 54.7 |
| TN180AA | 24.1 | 19.0 | 40.3 |
| 環境条件 | | 嫌気(硝酸塩無添加) | |
| pH | 10.5 | 11.5 | 12.5 |
| TN160 | 1.9 | 2.1 | 2.6 |
| TN180 | 1.3 | 2.5 | 3.2 |
| HG600 | 3.4 | 1.7 | 4.5 |
| HG700 | 3.8 | 2.1 | 0.8 |
| OK12 | 0.8 | 4.0 | 7.8 |

付録 アスファルト分解試験後の微生物に関する情報

(1) 代謝経路について

多環芳香族による馴化サンプルでアスファルト分解の可能性が示唆されたことから、アスファルトを分解する微生物あるいは微生物群（以降、微生物）は、多環芳香族を分解可能な微生物でもあるものが多い可能性がある。BLAST Search の結果からも、多環芳香族分解性能を持つ微生物のいくつかとの高い相同性が確認できた。今回相同性のあった BLAST 登録微生物は、多環芳香族資化性についての報告を元に登録されたものであるが、個々の微生物に関する多環芳香族の分解に関する代謝経路については、明らかでないものが多い。ここでは、本研究の対象である嫌気環境と BLAST Search 結果を考慮して、一般的な代謝経路から適当なものを挙げる。

微生物の代謝経路は、エネルギー代謝と物質代謝の 2 つに分けることができる。前者は生命活動に必要となる ATP (アデノシン三リン酸) を取り出すもので、後者には異化代謝（細胞内物質の分解）および同化代謝（細胞構成物質の合成）があり、エネルギー代謝と密接に関連している。

酸素以外の無機酸化物を電子受容体として利用する嫌気呼吸による代謝によって ATP 生成を行う微生物が嫌気条件下では生存していると考えられる。

- ・硝酸呼吸：硝酸 亜硝酸（*Pseudomonas* 属など）
- ・硫酸呼吸：硫酸 硫化水素（*Desulfovibrio* 属、*Desulfotomaculum* 属など）
- ・炭酸呼吸：炭酸 メタン（*Methanobacterium* 属など）

なお、有機物を利用する一般微生物では、嫌氣的代謝である発酵と好氣的代謝である呼吸により、解糖系（エムデン-マイヤーホフ経路）を経て、TCA 回路（クレブス回路、トリカルボン酸サイクル、クエン酸回路）で糖、脂肪酸、アミノ酸などの酸化を行い、ATP と還元剤が生成し、引き続き電子伝達系でもさらなる ATP 合成を行う。本研究の対象である地下環境であっても、系内への極微量の酸素や有機物混入によって、微生物によるこれら経路での ATP 合成を否定することはできない。

高アルカリの表層水では、光合成細菌やラン藻が発生する可能性があり、これらの死骸有機物を利用する場合もあると考えられる。

また、独立栄養微生物では、 H_2S 、 S 、 S_2O_3 などの還元型硫黄化合物や H_2 、 CO 、 NH_3 、 NO_2 、 Fe^{2+} などの無機化合物を基質として利用し、その酸化過程で ATP と還元剤を生成する。ただし、 NO_2 や Fe^{2+} などを基質とする場合では、ATP を消費して電子伝達系を逆流して還元力を得ている。

BLAST に登録された微生物情報は、微生物の存在と遺伝子配列情報の登録が中心である。そのため、文献が未発表のものがあること、および多環芳香族分解に関する代謝系まで踏み込んだ研究は見られなかったため、各微生物の詳細な代謝情報の入手には至らな

った。多くの微生物が多環芳香族分解性能を持つことは、近年多く報告されている。ただ、これら微生物の環境浄化への利用が強く望まれているため、実用のための開発研究が強く進められ、系全体の分解収支などはデータとしてよく挙げられているものの、代謝まで踏み込んで解析されているものは少ない。関連の情報や文献を数多く集めて、多環芳香族やさらにはアスファルト分解に関連した代謝系についての記述を丹念に検索することが必要である。

(2) BLAST から得られた微生物情報

微生物 ~ の BLAST 記載情報を掲載する。

微生物

CACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTACGGTACCGTCATGGGCCTCTCGTATTAGGAGAAGC
TTTTTCGTTCCGTACAAAAGCAGTTTACAACCCGAAGGCCTTCATCCTGCACGCGGCATTGC
TGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAAAATTCCCCA

159/160 (99%)

LOCUS AF210313 1525 bp DNA linear BCT 03-OCT-2000

DEFINITION Aniline-degrading bacterium HY99 16S ribosomal RNA, complete
sequence.

ACCESSION AF210313

VERSION AF210313.1 GI:10443644

KEYWORDS .

SOURCE aniline-degrading bacterium HY99.

ORGANISM aniline-degrading bacterium HY99

Bacteria; Proteobacteria; beta subdivision; Comamonadaceae.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1525)

AUTHORS Kahng,H.Y., Kukor,J.J. and Oh,K.H.

TITLE Characterization of strain HY99, a novel microorganism capable of
aerobic and anaerobic degradation of aniline

JOURNAL FEMS Microbiol. Lett. 190 (2), 215-221 (2000)

MEDLINE 20487095

REFERENCE 2 (bases 1 to 1525)

AUTHORS Kahng,H.-Y., Kukor,J.J. and Oh,K.H.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (01-DEC-1999) Biotechnology Center for Agriculture and
the Environment, Rutgers University, 59 Dudley Road, New Brunswick,
NJ 08901, USA

微生物

TGGGGAATTTGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAGCCATCCCGCGTGTATGATGAAGGC
CTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTGGCAGAGAAGAAAAGGTATCTCCTAATACGAGATACTGCT
GACGGTATCTGCAGAACAAGCACCGGCTAACTACGTG

159/160 (99%)

LOCUS AF407414 1492 bp DNA linear BCT 05-SEP-2001

DEFINITION Uncultured bacterium clone RB13C11 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence.

ACCESSION AF407414

JNC TJ8400 2002-034

VERSION AF407414.1 GI:15430914
KEYWORDS .
SOURCE uncultured bacterium.
ORGANISM uncultured bacterium
Bacteria; environmental samples.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1492)
AUTHORS Alfreider,A., Vogt,C. and Babel,W.
TITLE Microbial diversity in an in situ reactor system and from
groundwater samples contaminated with chlorobenzene
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1492)
AUTHORS Alfreider,A., Vogt,C. and Babel,W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (10-AUG-2001) Department of Environmental Microbiology,
UFZ Center for Environmental Research, Permoserstr. 15, Leipzig
04318, Germany

微生物

TGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGG
CCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAG
AAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATATC

158/158 (100%)

LOCUS AF249839 178 bp DNA linear BCT 04-DEC-2000

DEFINITION Oil-degrading bacterium AOB3 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence.

ACCESSION AF249839

VERSION AF249839.1 GI:11528072

KEYWORDS .

SOURCE oil-degrading bacterium AOB3.

ORGANISM oil-degrading bacterium AOB3
Bacteria; Firmicutes; Actinobacteria; Actinobacteridae;
Actinomycetales.

REFERENCE 1 (bases 1 to 178)

AUTHORS Myhr,S., Lilleboe,B.-L.P., Sunde,E., Beeder,J. and Torsvik,T.

TITLE Effect of nitrate injection on H₂S production and microbial
community composition in an oil reservoir model column

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 178)

AUTHORS Myhr,S. and Torsvik,T.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (28-MAR-2000) Department of Microbiology, University of
Bergen, Jahnebakken 5, Bergen N-5020, Norway

微生物

CACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTACGATACCGTCAGCAGTATCTCGTATTAGGAGAT
ACCTTTTCTTCTCTGCCAAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCATCATAACGCGGG
AGGGCTGGATCAGGGTTTCCCCATTGTCCAAGGTTCCCCA

154/160 (96%)

LOCUS AF407414 1492 bp DNA linear BCT 05-SEP-2001

DEFINITION Uncultured bacterium clone RB13C11 16S ribosomal RNA gene, partial

sequence.
ACCESSION AF407414
VERSION AF407414.1 GI:15430914
KEYWORDS .
SOURCE uncultured bacterium.
ORGANISM uncultured bacterium
Bacteria; environmental samples.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1492)
AUTHORS Alfreider,A., Vogt,C. and Babel,W.
TITLE Microbial diversity in an in situ reactor system and from
groundwater samples contaminated with chlorobenzene
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1492)
AUTHORS Alfreider,A., Vogt,C. and Babel,W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (10-AUG-2001) Department of Environmental Microbiology,
UFZ Center for Environmental Research, Permoserstr. 15, Leipzig
04318, Germany

154/160 (96%)
LOCUS AF353705 660 bp DNA linear BCT 14-JUN-2001
DEFINITION *Alcaligenes* sp. PS-P2a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION AF353705
VERSION AF353705.1 GI:14423237
KEYWORDS .
SOURCE *Alcaligenes* sp. PS-P2a.
ORGANISM *Alcaligenes* sp. PS-P2a
Bacteria; Proteobacteria; beta subdivision; Alcaligenaceae;
Alcaligenes.
REFERENCE 1 (bases 1 to 660)
AUTHORS Daane,L.L., Harjono,I., Zylstra,G.J. and Haggblom,M.M.
TITLE Isolation and characterization of polycyclic aromatic
hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of
salt marsh plants
JOURNAL *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (6), 2683-2691 (2001)
MEDLINE 21268866
PUBMED 11375181
REFERENCE 2 (bases 1 to 660)
AUTHORS Daane,L.L., Harjono,I., Zylstra,G.J. and Haggblom,M.M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (27-FEB-2001) Biochemistry and Microbiology, Rutgers
University, 76 Lipman Drive, New Brunswick, NJ 08901, USA

微生物

TGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCCTGCCGCGTGAGTGATGAA
GGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTGTGCGGGAAGATAATGACGGTACCGCAAGAATAA
GCCCCGGCTAACCTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATATCGAATT

151/153 (98%)
LOCUS AF314064 1256 bp DNA linear BCT 02-JAN-2002
DEFINITION *Rhodopseudomonas palustris* strain BIS10 16S ribosomal RNA gene,

partial sequence.
ACCESSION AF314064
VERSION AF314064.1 GI:12659064
KEYWORDS .
SOURCE Rhodopseudomonas palustris.
ORGANISM Rhodopseudomonas palustris
Bacteria; Proteobacteria; alpha subdivision; Rhizobiaceae group;
Bradyrhizobium group; Rhodopseudomonas.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1256)
AUTHORS Oda,Y., de Vries,Y.P., Forney,L.J. and Gottschal,J.C.
TITLE Acquisition of the ability for Rhodopseudomonas palustris to
degrade chlorinated benzoic acids as the sole carbon source
JOURNAL FEMS Microbiol. Ecol. 38 (2-3), 133-139 (2001)
REFERENCE 2 (bases 1 to 1256)
AUTHORS Oda,Y., de Vries,Y.P., Forney,L.J. and Gottschal,J.C.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (18-OCT-2000) Microbiology, University of Groningen,
Kerklaan 30, Haren 9751 NN, The Netherlands

151/153 (98%)
LOCUS AF416654 1256 bp DNA linear BCT 11-OCT-2001
DEFINITION Rhodopseudomonas palustris strain BIS6 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence.
ACCESSION AF416654
VERSION AF416654.1 GI:16033570
KEYWORDS .
SOURCE Rhodopseudomonas palustris.
ORGANISM Rhodopseudomonas palustris
Bacteria; Proteobacteria; alpha subdivision; Rhizobiaceae group;
Bradyrhizobium group; Rhodopseudomonas.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1256)
AUTHORS Oda,Y., Meijer,W.G., Gottschal,J.C. and Forney,L.J.
TITLE Analysis of genetic diversity among 3-chlorobenzoate-degrading
strains of Rhodopseudomonas palustris
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1256)
AUTHORS Oda,Y., Meijer,W.G., Gottschal,J.C. and Forney,L.J.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (05-SEP-2001) Microbiology, University of Groningen,
Kerklaan 30, Haren 9751 NN, The Netherlands

微生物

CACGAAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTGCGGTAACGTCAAACACTGACGTATTAGGTTA
ATGCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCACACACGCGG
CATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATATTCCCCA

159/160 (99%)
LOCUS AF353684 631 bp DNA linear BCT 14-JUN-2001
DEFINITION Pseudomonas stutzeri 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION AF353684
VERSION AF353684.1 GI:14423216
KEYWORDS .

SOURCE *Pseudomonas stutzeri*.
ORGANISM *Pseudomonas stutzeri*
Bacteria; Proteobacteria; gamma subdivision; Pseudomonadaceae;
Pseudomonas.
REFERENCE 1 (bases 1 to 631)
AUTHORS Daane,L.L., Harjono,I., Zylstra,G.J. and Haggblom,M.M.
TITLE Isolation and characterization of polycyclic aromatic
hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of
salt marsh plants
JOURNAL Appl. Environ. Microbiol. 67 (6), 2683-2691 (2001)
MEDLINE [21268866](#)
PUBMED [11375181](#)
REFERENCE 2 (bases 1 to 631)
AUTHORS Daane,L.L., Harjono,I., Zylstra,G.J. and Haggblom,M.M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (27-FEB-2001) Biochemistry and Microbiology, Rutgers
University, 76 Lipman Drive, New Brunswick, NJ 08901, USA

159/160 (99%)
LOCUS AF238494 1477 bp DNA linear BCT 24-APR-2000
DEFINITION *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence.
ACCESSION AF238494
VERSION AF238494.1 GI:7638166
KEYWORDS .
SOURCE *Pseudomonas pseudoalcaligenes*.
ORGANISM *Pseudomonas pseudoalcaligenes*
Bacteria; Proteobacteria; gamma subdivision; Pseudomonadaceae;
Pseudomonas.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1477)
AUTHORS Brinne,A.M.
TITLE Phylogenetic studies of metal cyanide degrading bacteria in gold
mine tailings dams
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1477)
AUTHORS Brinne,A.M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (24-FEB-2000) CSIRO Land and Water, CSIRO, Underwood
Ave,
Perth, WA 6014, Australia

159/160 (99%)
LOCUS AF232713 1439 bp DNA linear BCT 24-FEB-2000
DEFINITION *Pseudomonas mendocina* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION AF232713
VERSION AF232713.1 GI:7025505
KEYWORDS .
SOURCE *Pseudomonas mendocina*.
ORGANISM *Pseudomonas mendocina*
Bacteria; Proteobacteria; gamma subdivision; Pseudomonadaceae;
Pseudomonas.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1439)

AUTHORS Heinaru,E., Truu,J., Stottmeister,U. and Heinaru,A.
TITLE Three types of phenol and p-cresol catabolism in phenol- and
p-cresol-degrading bacteria isolated from river water continuously
polluted with phenolic compounds
JOURNAL FEMS Microbiol. Ecol. (2000) In press
REFERENCE 2 (bases 1 to 1439)
AUTHORS Heinaru,E. and Vedler,E.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (08-FEB-2000) Dep. of Genetics, Institute of Molecular
and Cell Biology, Riia 23, Tartu 51010, Estonia

微生物

TGGGGAATCTTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCGGCCATGCCGCGTGAATGATGAA
GGTCTTAGGATTGTAAAATTCTTTCACCGGGGACGATAATGACGGTACCGTAAGAATAA
GCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAATCGAAT

146/153 (95%)

LOCUS AY038618 1283 bp DNA linear BCT 01-AUG-2001
DEFINITION Uncultured eubacterium clone GL182.16 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence.
ACCESSION AY038618
VERSION AY038618.1 GI:15072511
KEYWORDS .
SOURCE uncultured eubacterium.
ORGANISM uncultured eubacterium
Bacteria; environmental samples.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1283)
AUTHORS Vescio,P.A. and Nierzwicki-Bauer,S.A.
TITLE 16S rRNA sequence analysis and phylogenetic characterization of
microbial communities associated with lacustrine subsurface
sediments
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1283)
AUTHORS Vescio,P.A. and Nierzwicki-Bauer,S.A.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (05-JUN-2001) Darrin Fresh Water Institute, Rensselaer
Polytechnic Institute, 5060 Lakeshore Drive, Bolton Landing, NY
12814, USA
FEATURES Location/Qualifiers

146/153 (95%)

LOCUS AB002633 1383 bp DNA linear BCT 15-AUG-1997
DEFINITION Unidentified alpha proteobacterium gene for 16S rRNA, partial
sequence, isolate HTA333.
ACCESSION AB002633
VERSION AB002633.1 GI:2337739
KEYWORDS 16S ribosomal RNA.
SOURCE Unidentified alpha proteobacterium (isolate:HTA333) DNA.
ORGANISM uncultured alpha proteobacterium
Bacteria; Proteobacteria; alpha subdivision; environmental samples.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1383)
AUTHORS Takami,H.

TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (07-APR-1997) Hideto Takami, Japan Marine Science and
Technology Center, Deep-sea Microorganisms Research Group; 2-15
Natsushima, Yokosuka, Kanagawa 237, Japan
(E-mail:takamih@jamstec.go.jp, Tel:0468-67-3895, Fax:0468-66-6364)
REFERENCE 2 (sites)
AUTHORS Takami,H., Inoue,A., Fuji,F. and Horikoshi,K.
TITLE Microbial flora in the deepest sea mud of the Mariana Trench
JOURNAL FEMS Microbiol. Lett. 152 (2), 279-285 (1997)
MEDLINE [97375070](#)
FEATURES Location/Qualifiers

微生物

CACGTAGTTAGCCGGTCCTTATTCTTCCGGTACCGTCATCGACCCAGGTATTAACCAG
AGCCATTTCTTTCCGGACAAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCACACACGCGG
CATTGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAAAATTCCCCA

160/160 (100%)
LOCUS AY028405 194 bp DNA linear BCT 13-NOV-2001
DEFINITION Uncultured marine bacterium COL-22 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence.
ACCESSION AY028405
VERSION AY028405.1 GI:13660708
KEYWORDS .
SOURCE uncultured marine bacterium.
ORGANISM uncultured marine bacterium
Bacteria; environmental samples.
REFERENCE 1 (bases 1 to 194)
AUTHORS Bidle,K.D. and Azam,F.
TITLE Bacterial control of silicon regeneration from diatom detritus:
significance of bacterial ectohydrolases and species identity
JOURNAL Limnol. Oceanogr. 46 (7), 1606-1623 (2001)
REFERENCE 2 (bases 1 to 194)
AUTHORS Bidle,K.D. and Azam,F.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (05-MAR-2001) Scripps Institution of Oceanography,
University of California San Diego, 9500 Gilman Drive, La Jolla, CA
92093-0202, USA
FEATURES Location/Qualifiers

160/160 (100%)
LOCUS AF419356 194 bp DNA linear BCT 15-OCT-2001
DEFINITION Uncultured gamma proteobacterium MoDE-6 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence.
ACCESSION AF419356
VERSION AF419356.1 GI:16119030
KEYWORDS .
SOURCE uncultured gamma proteobacterium.
ORGANISM uncultured gamma proteobacterium
Bacteria; Proteobacteria; gamma subdivision; environmental samples.
REFERENCE 1 (bases 1 to 194)

AUTHORS Bidle,K.D., Long,R.A., Jones,J., Brzezinski,M.A. and Azam,F.
TITLE The role of bacteria-mediated silicon regeneration during a natural
diatom bloom in the Monterey, California upwelling system
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 194)
AUTHORS Bidle,K.D., Long,R.A., Jones,J., Brzezinski,M.A. and Azam,F.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (17-SEP-2001) Scripps Institution of Oceanography,
University of California San Diego, 9500 Gilmann Drive- 0202, La
Jolla, CA 92093, USA
FEATURES Location/Qualifiers

160/160 (100%)
LOCUS UBA387867 845 bp DNA linear BCT 11-FEB-2000
DEFINITION Unidentified bacterium oxSCC-14 partial 16S rRNA gene.
ACCESSION AJ387867
VERSION AJ387867.1 GI:6977995
KEYWORDS 16S ribosomal RNA; 16S rRNA gene.
SOURCE uncultured bacterium oxSCC-14.
ORGANISM uncultured bacterium oxSCC-14
Bacteria; environmental samples.
REFERENCE 1 (bases 1 to 845)
AUTHORS Ludemann,H., Arth,I. and Liesack,W.
TITLE Spatial changes in the bacterial community structure along a
vertical oxygen gradient in flooded paddy soil cores
JOURNAL Appl. Environ. Microbiol. 66 (2), 754-762 (2000)
MEDLINE 20120534
REFERENCE 2 (bases 1 to 845)
AUTHORS Liesack,W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (06-JUN-1999) Liesack W., Biogeochemistry,
Max-Planck-Institute for Terrestrial Microbiology,
Karl-von-Frisch-Str., D-35043 Marburg, GERMANY
FEATURES Location/Qualifiers