

微生物の地層処分環境条件における 馴化の研究(概要)

(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（概要）

（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	．．．．．1
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	．．．．．1
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	．．．．．2
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	．．．．．2
6 おわりに	．．．．．3

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想されるので、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。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。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

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 法&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。その結果、アスファルトの重量減少、IC、TOC の増加が確認されるケースが有り、微生物が活動しているものと考えられる。今回実施した条件のうちでは 2 種類の微生物サンプルともに pH12.5 嫌気性条件において最も多くのアスファルトを分解しているものと考えられる。

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

環境の異なる 3 地点から採取した 5 サンプル（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。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。

結果として、直接計測法では pH11.5 以上の条件でも微生物数の増加は確認されたが、コロニー計数法では pH11.5 以上でコロニーを形成する微生物は無く、生菌を確認できず、高 pH 環境に対する微生物の馴化を確認できなかった。

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

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。

結果として、アスファルトの重量減少、IC、TOC、微生物種数の増加、微生物濃度の増加等の項目に増加が見られる条件があり、微生物が活動しているものと考えられる。

個別の微生物の活動については 5 章でまとめて評価する。

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。

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鉱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 10.1ppm/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。

微生物生存環境の影響を検討するためにアスファルトを用いて馴化した微生物の各アスファルト分解条件下における 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。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の 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の 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るため、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十分に起こりうるものと推測される。

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。