

# アスファルトの微生物分解に関する研究

(動力炉・核燃料開発事業団 委託研究成果報告書)

1994年3月

財団法人 産業創造研究所

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。

〒319-1184 茨城県那珂郡東海村大字村松4番地49  
核燃料サイクル開発機構  
技術展開部 技術協力課

Inquiries about copyright and reproduction should be addressed to:  
Technical Cooperation Section,  
Technology Management Division,  
Japan Nuclear Cycle Development Institute  
4-49 Muramatsu, Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki, 319-1184  
Japan

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

内容漏洩がないよう管理して下さい。また今回の開示目的以外のことには使用しないよう特に注意して下さい。

本資料についての問合せは下記に願います。

〒319-11 茨城県那珂郡東海村村松 4-33

動力炉・核燃料開発事業団

東海事業所 技術開発推進部 技術管理室

PNC TJ1564 94-003  
1994年 3月

## アスファルトの微生物分解に関する研究

川上 泰\*

## 要旨

中、低レベルの放射性廃棄物はアスファルトで固化されて地層処分される。そのため処分環境でのアスファルトの安定性の評価が重要である。アスファルトの主要成分は炭素数の多い炭化水素の集合体であり、長期間のうちに微生物により分解される可能性がある。本研究では、微生物によるアスファルトの分解に関する現状調査及びアスファルトの成分分画と微生物による易分解成分の同定を行い、今後のアスファルトの生物的な安定性の検討とよりよい固化材をめざす研究開発に資することを目的として行われた。

その結果は次のようにまとめられる。

1. 微生物によるアスファルトの分解に関する研究の現状調査について
  - ・アスファルトは炭化水素および関連化合物の複雑な混合物である。化学的なキャラクタリゼーションには、古くから溶剤への可溶性とクロマトグラフィーを用いて分けられた分画を成分としたおおづかみな組成で評価する方法が発達し、一般的となっている。
  - ・地層処分を行う環境は普通無酸素の環境が選ばれる。無酸素下での炭化水素の微生物分解に関する研究は1990年頃より活発となり現在も続いている。無酸素下でも、硝酸などの窒素酸化物が存在している脱窒条件下では好気的条件よりも劣るもの、活発な炭化水素の分解が起こることが報告されている。硫酸還元条件下でも更に遅くなるがやはり分解が確認されている。硫酸も存在しないような還元的嫌気条件では確実な微生物分解は確認されていない。
  - ・アスファルトの微生物分解の研究は多くないが、発表された5編の論文ではいずれもある程度の微生物分解が確認されている。しかし、各々の実験の条件が様々であり、中には見かけ上、相反するデータも存在する。いずれにせよ研究が少ないので評価できる状態ではまったくない。
2. アスファルトの成分分画と微生物による易分解成分の同定について
  - ・アスファルトの成分分画には、飯島法に準拠したシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画で全体を4成分に分ける方法を用い、比較的軟質のストレートアスファルトを分析したところ、芳香族成分が58%と大半を占め、飽和成分、アスファルテン分がそれぞれ19, 18%、レジン分はきわめて少なかった。
  - ・この方法で分画した各分画に芳香族炭化水素分解能を有するPseudomonas属の5菌株を加えて好気的に培養したところ、飽和分画がどの菌株でも炭素源となり増殖が見られた。アスファルテン分でも増殖が見られたが、これに関しては更に詳細な検討を要する。芳香族分、レジン分でも一部の株で増殖が見られた。

本報告書は、(財)産業創造研究所が動力炉・核燃料開発事業団の委託により実施した研究の成果である。

契約番号: 050D0330

事業団担当部課室および担当者: 環境技術開発部 地層処分開発室 間野 正

\*: (財)産業創造研究所 生物工学研究部



## A study on microbiological degradation of asphalt

Yasushi Kawakami\*

### Abstract

Intermediate or low level radioactive waste is disposed underground after solidified with asphalt. The assessment is essential on the stability of the asphalt in the subterranean environment. Asphalt, a mixture of complicated hydrocarbons and related compounds, is possible to be sensitive to microbial attack in a long time storage. In this study literature on the biodegradation of asphalt and the related hydrocarbons was first surveyed and then a preliminary incubation was done using hydrocarbon-degrading Pseudomonas strains and an asphalt sample.

#### 1. On the literature survey

-Asphalt is a complicated mixture of hydrocarbons and related compounds with high-molecular weight. Chemical characterization of asphalt or similar heavy oils is usually carried out by solubility tests with solvents and chromatographic separation with alumina or silica gel. The composition in terms of the each chromatographic fraction collectively shows the characters of the asphalt.

-The subterranean environment is generally anoxic. Papers on the anaerobic biodegradation of hydrocarbons was thereby surveyed and was found to have been growing since 1990. Several papers demonstrate that biodegradation actively proceeded under denitrifying conditions. The rate was littler less than those under aerobic conditions. Biodegradation was still observed under sulfate-reducing conditions though the rate is far less than denitrification. There are no conclusive evidences on the reduced anaerobic conditions, e.g., methanogenesis.

-On the biodegradation of asphalt, only five papers were found. All of them reported that asphalt was biologically degraded in some extent. But the experimental conditions considerably varied, some data were apparently contrary to each other. More data are necessary to draw any conclusions.

#### 2. Fractionation of asphalt and identification of biodegradable components

-Fractionation into four fractions was done by dissolving in solvent and chromatographic separation with silica gel column chromatography based on the method by Iijima. A straight asphalt with 80/100 penetration was fractionated, and found to be rich in aromatics (58%), poor in resins (>2%). The saturated or asphaltene fractions were 19%, 18%, respectively.

-The above fractions were then used for a biodegradation test. with Pseudomonas strains with aromatic hydrocarbon-degrading ability. In all strains, cell growth was found in the culture with saturated fraction (n-pentane fraction). The asphaltene fraction also gave some growth, but the results was somewhat questionable since water-soluble components were not excluded. The other fractions, aromatics or resins also gave some growth in a few strains.

---

Work performed by Institute of Research and Innovation under contract with Power Reactor and Nuclear Development Corporation.

PNC liaison : Waste Technology Development Division, Geological Isolation Technology Section,  
Tadashi Mano

\* : Biotechnology Department , Institute of Research and Innovation

## アスファルトの微生物分解に関する研究

## 目次

1. 緒言 -----	1
1.1 本研究の目的 -----	1
1.2 本研究の概要 -----	3
2. 微生物によるアスファルトの分解に関する調査 -----	3
2.1 アスファルトの構造と構成成分について -----	3
2.1.1 アスファルトの種類と用途 -----	3
2.1.2 アスファルトの構造と構成成分 -----	4
2.1.2.1 アスファルトなど重質油の分画による characterization -----	4
2.1.2.2 アスファルトの構造 -----	8
2.2 炭化水素および関連化合物の微生物分解に関する既往の研究 (炭化水素の微生物分解に関する研究小史) -----	11
2.2.1 博物学的研究の時代、19世紀末～20世紀前半 -----	11
2.2.2 石油鉱工業で取り上げられた時代、1940～1960 -----	12
2.2.2.1 プロジェクト43 -----	12
2.2.2.2 微生物を用いる石油の探索 -----	13
2.2.2.3 原油の二次回収への微生物の作用 -----	13
2.2.2.4 原油の微生物脱硫 -----	14
2.2.2.5 炭化水素資化性菌の研究 -----	14
2.2.2.6 中間代謝物の研究 -----	14
2.2.2.7 炭化水素代謝の機構の研究 -----	15
2.2.3 石油発酵－発酵原料としての時代、1960～1975 -----	15
2.2.3.1 炭化水素代謝経路の解明 -----	15
2.2.3.2 発酵工業の炭素源としての確立 -----	15
2.2.3.3 水－油二相系の培養に関する研究 -----	17
2.2.4 環境中での炭化水素の分解－石油汚染とその対策の時代 1970～ 現在 -----	18

2.2.4.1 タンカーの大型化と流出事故	18
2.2.4.2 環境中での汚染の生物的処理 (Bioremediation)	19
2.2.4.3 炭化水素分解酵素の遺伝学の発展	23
2.2.5 アスファルトの微生物分解の研究	23
2.3 地層中の微生物生態学に関する既往の研究	25
2.4 地層処分で可能性のある微生物反応の検討	27
2.4.1 地層処分における環境条件	27
2.4.2 上記の環境条件に該当する微生物	27
2.4.3 上記の微生物での反応の検討	27
2.4.3.1 脱窒反応による炭化水素分解	28
2.4.3.2 硫酸還元による炭化水素分解	28
2.4.3.3 メタン発酵による炭化水素分解	29
2.4.3.4 まとめ	29
3. アスファルトの成分分画と微生物による易分解成分の同定	30
3.1 アスファルトの分画法の確立	30
3.1.1 アスファルト試料	30
3.1.2 アスファルト試料のシリカゲルカラムによる分画	30
(1) 方法	30
(2) 結果	31
3.2 芳香族炭化水素分解菌による分画試料の分解	32
3.2.1 分画試料による <i>Pseudomonas</i> 属細菌の培養	32
(1) 方法	32
(2) 結果	35
3.2.2 易分解成分の同定	36
3.3 アスファルトの微生物分解試験方法の検討	41
3.3.1 アスファルトの多様性	42
3.3.2 対象とする微生物の候補	42
3.3.3 試験方法	42
4. まとめ	44
5. 参考文献	46

## 1. 緒言

### 1.1 本研究の目的

再処理工場から発生するプロセス濃縮廃液は、アスファルトで固化されている。そのため同固化体の処分にあたっては、処分環境でのアスファルトの安定性を評価する必要がある。アスファルトは、一般に腐食等に強く不活性な物質であると考えられているが、その主要成分は炭素数の多い炭化水素及び関連物質の集合体であり、環境中では微生物により分解される可能性がある。

本研究では、微生物によるアスファルトの分解に関する現状調査及びアスファルトの成分分画と微生物による易分解成分の同定を行う。

### 1.2 本研究の概要

はじめに微生物によるアスファルトの分解に関する研究の現状調査を以下の項目について行う。

- (1) アスファルトの構造及び構成成分の研究の文献調査
- (2) 炭化水素及び関連化合物の微生物分解研究の文献調査
- (3) 地層中の微生物生態学研究の文献調査
- (4) (1)～(2)の調査結果を踏まえ地層処分で可能性のある微生物反応の検討

アスファルトの微生物分解に関する研究はこれまでそれを知る必要性があまりなかったためきわめて少ない。そこで対象を炭化水素の微生物分解とするが、そうすると今度は余りに膨大であるので、炭化水素の分解に関してはその歴史的経過を概観して、その中で地層処分でのアスファルトの分解に関する可能性のある研究についてレビューすることとする。

特に最近地下水汚染という環境問題から無酸素状態での炭化水素の微生物分解に関する研究が活発となっている。これらの研究はここでの検討課題に密接な関係があるので検討し、今後の研究の方向性を定める一助とする。

次にアスファルトの成分分画と微生物による易分解成分の同定を行う。

- (1) 微生物分解の観点からアスファルトの成分分画を行うための分画法を確立する。
- (2) 上の調査結果を踏まえ、微生物による易分解なアスファルト成分の同定を

行う。

(3) (1)～(2)の実験結果からアスファルトの微生物分解試験方法を検討する。

アスファルトの微生物分解の実験的研究を行うための予備的実験として、アスファルトの成分分画を行い、微生物分解という視点からのcharacterizationを行う。更に入手し易い菌株とアスファルトを用いた分解実験を行い、今後の実験計画策定の基礎とする。

## 2. 微生物によるアスファルトの分解に関する調査

### 2.1 アスファルトの構造と構成成分について

#### 2.1.1 アスファルトの種類と用途

アスファルトはビチューメン<sup>\*)</sup>の一種で天然にも産するが、わが国で目にするものは殆ど石油精製工程から得られる石油アスファルトである。石油アスファルトは原油を常圧蒸留、水蒸気蒸留、減圧蒸留などにかけた時の釜残として得られる。また減圧蒸留残油から高粘度の潤滑油を得るために、残油にプロパンなどの溶剤を加えてオイル分を抽出し、プロパンに不溶のアスファルト分を沈殿分離させる溶剤脱歴法という方法がある。この時に副産物として得られるオイル分の少ないものもある（溶剤脱歴アスファルト）。この釜残のアスファルトそのままのものをストレートアスファルトといい、道路舗装に多く用いられている。このストレートアスファルトを加熱して溶解し、そこに空気を吹き込んで酸化、脱水素、重縮合などの反応を起こさせたものをブローンアスファルトという。ブローンアスファルトはストレートアスファルトに比べ、軟化点が高く（つまり常温で硬い）、温度の変化による硬さの変化が少ない。また、弾性が大きく、水、空気、日光などによる変質劣化が小さい。耐衝撃性、防水性、電気絶縁性もよいので、防水、防湿、保冷、電気絶縁、ゴム混和、などに広範囲に用いられる。

\*) 黒色、黒褐色の粘着性を有する半固体、固体で、おもに二硫化炭素に完全溶解する炭化水素を中心とする物質の混合物の総称。（筆者註）

アスファルトの規格はJIS K2207に石油アスファルト類としてストレートアスファルトが10種、ブローンアスファルトが5種の計15種が規定されている。しかし、その規格は用途が主に舗装、防水用などであることから、針入度や軟化点などその力学的な性質が第一であり、その化学的組成は問題にされていない。石油精製メーカーの技術者によれば、様々な原油の釜残を適当に混合して規格にあったアスファルトを製造しているとのことである。従って原料である原油は様々な産地のものを用いており、その化学的組成はロット毎に変動している可能性が大であるとのことであった。

## 2.1.2 アスファルトの構造と構成成分

アスファルトは多様な物質の混合物であるので、その成分である個々の化合物を同定することは困難であり、またその僅かな一部を同定してもさして意味のあることではない。そこでその成分をグループ化して分析し、その量比でアスファルトをcharacterizeする方法が昔から研究されている。

### 2.1.2.1 アスファルトなど重質油の分画によるcharacterization

重質油をcharacterizeする古くから用いられている方法は、石油エーテル等の軽質飽和炭化水素溶剤で可溶の成分と不溶の成分に分けて、各々の特性を調べることが行われている。前者は油状の成分でマルテンと呼ばれ、後者は黒褐色の固体状成分でアスファルテンと呼ばれている。これらを更に細分するところで多くの方法が提案されている。

今世紀初期のものとしてMarcusson（6ページ註）は軽質石油ナフサで不溶性の成分をアスファルテンとして分離し、更に軽質石油ナフサで可溶性の成分であるマルテンを白土（アルミナ）に吸着される成分と吸着されない成分とに分け、前者をレジン、後者をオイルと名付けた。レジンは暗褐色の粘稠な成分で、オイルは淡黄色の流動性に富んだ成分である。この方法がオイル（炭化水素分）、レジン（含酸素化合物など極性化合物）、アスファルテン（複雑な構造を持った比較的高分子量の化合物）の3つに分離する初めての方法であった。

O'Donnell法<sup>2)</sup>はイソペンタンでアスファルテンを沈殿分離した後、マルテンを分子蒸留により10留分に分別する（沸点の違いによる分離）。各留分中に含まれている硫黄および窒素化合物の一部をHgCl<sub>2</sub>により錯体として除いた後、精製留分をシリカゲルクロマトグラフィーにより、飽和分、芳香族分、レジンに分離する。飽和分は更にメチルイソブチルケトンによる溶剤脱ろうと尿素アダクト法により、パラフィン、パラフィンフリーウックス、ナフテンオイル分に分離される\*）。このうちオイル分は熱拡散により更に細分される。一方、芳香族分はアルミナクロマトグラフィーにより単環と二環の芳香族化合物に分離され、更に過酸化水素による酸化とクロマトグラフィーにより、これらから硫黄化合物の主体であるベンゾチオフェン類が分離される。この方法は主にオイル分の詳細な分類を目指したものである。

\*現在の呼称で云えば、パラフィン = n-アルカン、パラフィンフリーウックス = 少数分枝アルカン、ナフテンオイル = シクロアルカン+多数分枝アルカン

ということになる。 (筆者註)

Chelton-Traxler法 (6ページ註) はn-ペンタンでアスファルテンを分離した後、マルテンはシリカゲルクロマトグラフィーによりメチルシクロヘキサン溶出分 (飽和分) 、ベンゼン溶出分 (芳香族分) およびn-ブタノール溶出分 (レジン) に分離される。メチルシクロヘキサン溶出分は屈折率により2つの留分に分けられ、それらは熱拡散によりそれぞれ10の留分に細分される。ベンゼン溶出分はケイ酸マグネシウムクロマトグラフィーによりメチルシクロヘキサン溶出分とn-ブタノール溶出分に分けられ、前者は更に熱拡散により10の留分に細分される。なお、アスファルテンはそのベンゼン溶液にメタノールを加えて、いくつかの留分に分別される。

以上の0' Donnell法およびChelton-Traxler法はいずれもアスファルトを数10の留分に分別しており、マルテン成分、特にオイル成分のcharacterizationという点では詳細を尽くしており、重質油より潤滑油などの石油製品を製造する場合などには有用であるが、あまり細分し過ぎても単に重質油中の成分の特徴をつかむには煩雑すぎる。組成と物性の関連を調べるには3、4成分に分離する程度で便利かつ十分であろう。この点から一般に広く用いられているものにHabbarらのアメリカ鉱山局法<sup>3)</sup>とTexaco法 (6ページ註) がある。これらの方法はアスファルトを3成分に分け、3角図表に組成を表現できるので便利である。アメリカ鉱山局法は最初のMarcusson法に近いもので、n-ペンタンでアスファルテンを分離し、マルテンは更に活性アルミナに吸着されるレジンと吸着されないオイルとに分離される。この方法の欠点は分画がオイル分で止まっており、飽和成分と芳香族成分とが分けられないことである。Texaco法はこの点を改善しており、試料を先ずn-ブタノールに溶解し、不溶分をアスファルティックスとして分離する。これはアスファルテンとレジンの大部分を含んだ画分であるn-ブタノール可溶分はオイル分に相当するものであるが、これを熱アセトンに溶解した後、-23.3°Cに冷却し、不溶のサチュレートと可溶のサイクリックスに分離する。しかし、この方法では今度はアスファルテンとレジンの量比が得られない欠点が出てきてしまった。

この点を改良した方法が飯島法<sup>4)</sup>である。この方法ではn-ヘプタンでアスファルテンを分離し、マルテンは更に活性アルミナクロマトグラフィーにより飽和分、芳香族分およびレジンに分離する。これにより直留残油はアスファルテン、レジンの量の他に、オイル分の芳香族性が明らかになり、組成と物性の関係の検討に便利は

方法が確立された。アメリカ鉱山局法、Texaco法、飯島法の概要を図2-1に示す。

直留系残油中の芳香族画分は殆どベンゼンに可溶であるが、コールタールピッチや石油系の熱分解、接触分解系ピッチ類では、可溶分のみならずベンゼン不溶分、キノリン不溶分のような高分子量の芳香族系成分が多く含まれるのでそのための分画法が提案されている。

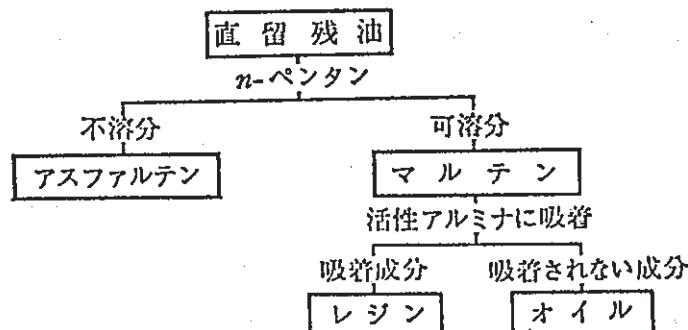
Demann(6ページ註)はコールタールをベンゼン不溶分( $\alpha$ 成分)、ベンゼン可溶、石油エーテル不溶分( $\beta$ 成分)、および石油エーテル可溶分( $\gamma$ 成分)に分別した。Adamら(6ページ註)はベンゼン不溶の $\alpha$ 成分をベンゼン不溶ピリジン可溶成分( $C_2$ )とピリジン不溶分( $C_1$ )に分け、ベンゼン可溶、石油エーテル不溶分をレジノイド、石油エーテル可溶分をクリスタロイドと呼んだ。Dikinson法(6ページ註)では試料を先ず真空蒸留して留出油を分別し、次いで残油についてピリジン不溶分( $C_1$ )、ベンゼン不溶、ピリジン可溶分( $C_2$ )、ベンゼン可溶、n-ヘキサン不溶分(レジンB)、n-ヘキサン可溶分(レジンA)に分離した。

ヨーロッパで広く用いられている方法としては、コールタールおよびピッチを対象としたMallison法(6ページ註)がある。この方法の特徴は様々な溶剤を駆使してH-レジン(高分子量レジン)、M-レジン(中分子量レジン)、N-レジン(低分子量レジン)、m-オイル(中分子量オイル)、およびn-オイル(低分子量オイル)の5成分に分別するところにある。試料を等量ずつ3つとり、第1の試料からH-レジン、第2の試料からH+M-レジン、第3の試料からH+M+N-レジンとm-オイル、n-オイルを分別定量する。

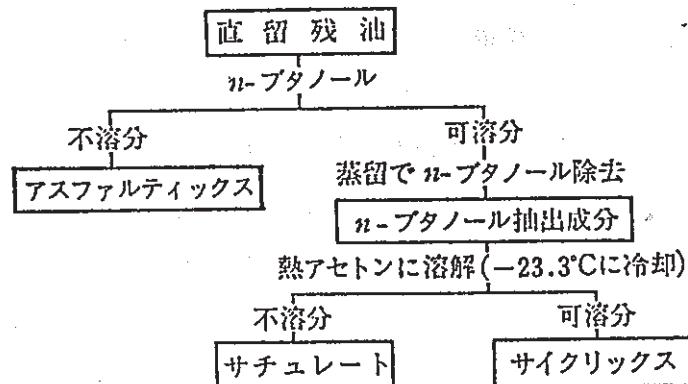
こうして定量してそれぞれの画分のパーセンテージが求められたとして、我々はそこからどんなことを知ることができるのであろうか。それは目的により様々であり、むしろここに示した色々な方法は、ある特定のことを知りたくてその目的に対して適当な方法として考案されたものであるといえる。であるからすべてに優越している方法というものがあるわけではないといえよう。

(参照文献について)文中、(6ページ註)とある文献は文献(1)で引用されているが、オリジナルを手に入れることができなかったので、これらの文献については文献(1)を参照のこと。

(a) アメリカ鉱山局法



(b) Texaco法



(c) 飯島らの方法

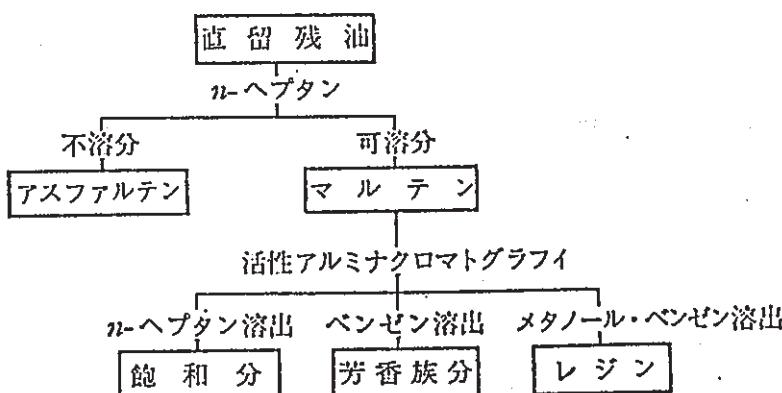


図2-1 直留残油の成分分析法

### 2.1.2.2 アスファルトの構造

アスファルトの構造を考える際にはそのスケールが問題となる。

1. 一番小さい構造としては、共有結合によって結ばれた文字通りの「分子」レベルである。先に示したようにアスファルトはオイルと称される炭化水素とそれに酸素原子が加わって極性を増したレジン分、更に酸素のみならず、窒素、硫黄原子も加わり、複雑な構造をとっているアスファルテン分の混合物である。分子レベルで考えるときはこれらの個々の分子を取り上げることとなる。

① オイル分は更にその構造から脂肪族炭化水素（aliphatics）と芳香族炭化水素（aromatics）に分けられ、その構造により更に細分化し得る。炭化水素はアスファルトの成分中でもっともよくその構造による微生物分解の程度があきらかにされている成分である。従って微生物分解の可能性は先ずこの画分が最も高い。

② レジン分は炭化水素系の無極性溶媒に可溶で極性が高い成分であるという以外あまり特徴的なものがない。レジン分（樹脂分）とはいいうものの無極性溶媒に可溶であり、あまり高分子化しているとも思われない。アスファルテンに比べ、その構造が詳しく調べられたということもないようであるが、この成分の一部は微生物の分解を受ける可能性がある。

③ アスファルテン分はアスファルトに特有の複雑な化合物であり、多環の芳香族などの縮重合した構造を多く含んでいる（図2-2）。また、硫黄や窒素などの原子もその構造中に多く含む。分子の大きさも大きくなり、基本的には生物体内に取り込まれにくい分子である。そのため微生物分解の可能性は最も低いだろう。

2. 1.で見たスケールよりももう一段大きなスケールとして様々な分子同士がどのような状態で存在しているか、というレベルの構造、マクロ構造が考えられる。重質油の分子量は沸点上昇、冰点降下、粘度、浸透圧、超遠心、電子顕微鏡、X線小角散乱などの方法で測定されているが、各々の方法によって、また、その時に用いる溶剤によって結果が変わってくる。表2-2はベネズエラ原油から得たアスファルテン粒子の大きさを種々の溶剤と方法で測定した結果である<sup>1)</sup>。値は著しく異なっており、このばらつきの原因として重質油中では各分子が種々の会合状態を作っており、溶剤によりその会合状態の壊れる程度が異なる。また測定方法によりその検

出の度合いが異なると考えられる。このことから逆にこれらのデータはアスファルテンの会合状態を知る手がかりとなる。図2-3はDickieらがこれらの分子量測定法による相違とX線小角散乱、マススペクトル、ゲルペーミエーションクロマトグラム(GPC)の測定結果を併せてアスファルティックスの集合構造について提案しているモデル構造である<sup>6)</sup>。直線は縮合芳香環を、鋸歯状の線は飽和炭化水素鎖、多環ナフテンを示している。シート状に重なったアスファルテン分子は互いに会合して単位ミセルを、そしてさらに大きなミセルを形成している。レジンでは縮合環は小さく相対的に飽和炭化水素が多い。

表2-2 様々な分析法で求めたベネズエラ残油中のアスファルテン粒子  
の大きさ (単位、オングストローム)

測定溶剤	冰点降下	蒸気圧降下	浸透圧	膜厚法
ベンゼン	2,000 ~ 4,000		50,000 12,000 82,000	~100,000
二硫化炭素	-	13,000 ~22,000		
ニトロベンゼン	800			

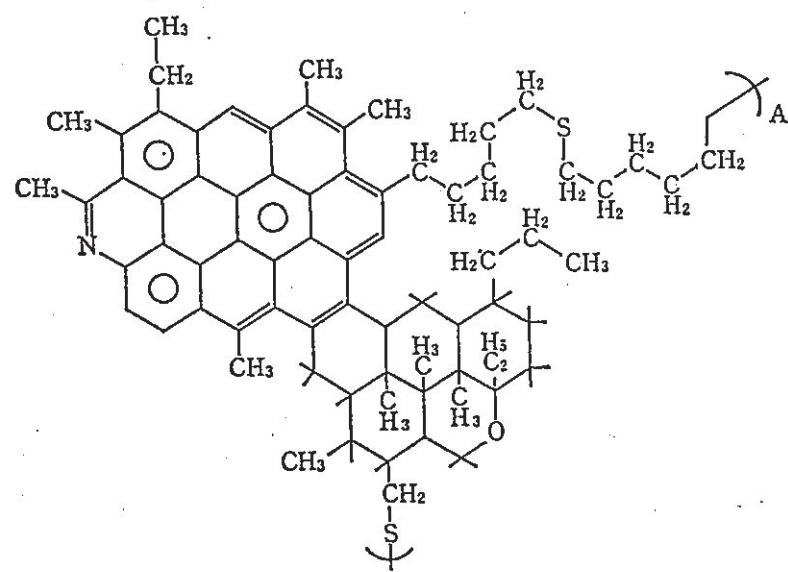


図2-2 Lagunillas原油から得られたアスファルテンの骨格構造モデル<sup>1)</sup>

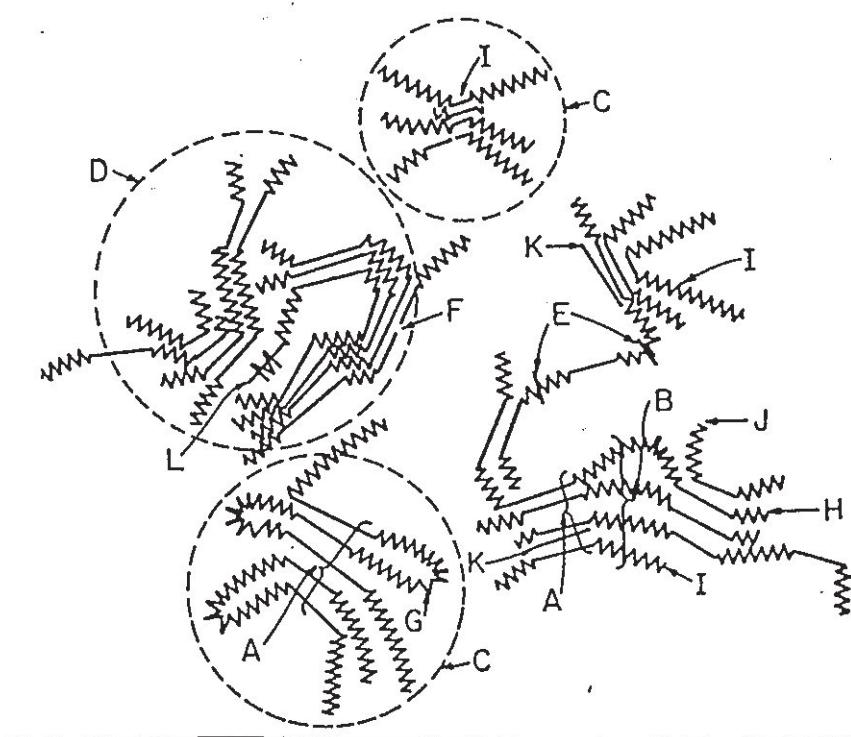


図2-3 アスファルト様物質のマクロ構造モデル。A. 結晶 B. 鎮束 C. マクロ粒子  
D. ミセル E. 弱い結合 F. ギャップとホール G. 分子内クラスター H. 分子間  
クラスター I. レジン J. 単分子層 K. ペトロポルフィリン L. 金属

## 2.2 炭化水素および関連化合物の微生物分解に関する既往の研究

### (炭化水素の微生物分解に関する研究小史)

#### 2.2.1 博物学的研究の時代、19世紀末～20世紀前半

炭化水素が微生物により分解されることを最初に発見したのは、わが国の植物学者三好学博士である。1895年、彼は葡萄果皮にあるパラフィンをBotrytis cinereaというカビが分解することを観察した。この研究はヨーロッパで細菌学が確立したばかりの頃の研究であり、北里柴三郎らが病原菌の分野で活躍したように環境微生物学の分野でもわが国の研究者が先駆的な業績をあげていた一例である。

20世紀に入って石油製品に対するバクテリアの影響などが報告されていたが、本格的にはオランダのDelftの研究者によるものが顕著である。顕微鏡で微生物を初めて観察したvanLeeuwenhoekの伝統をくむDelft工科大学の細菌学者、Beijerinck, Sohngen, Kluyver, Kasererらが活躍していた。彼らはそれぞれ独立にバクテリアのメタン利用に関する研究を発表している。Sohngenはメタンを単独炭素源として生育するバクテリアを分離し、ガスを基質とする培養容器を考案するなどの成果をあげた。この菌はその後Methanomonas methanicaという学名を与えられている。

またその他の炭化水素については、StormerによりBacillus hexacarbovorumなる菌が分離され、この菌が芳香族炭化水素のベンゼン、トルエン、キシレンなどを酸化、利用できることが示された。Sohngenは土壤中よりパラフィンおよび石油を炭素源として生育する多くの菌を分離した。

その後、バクテリア、酵母、カビ、放線菌などによるガス状炭化水素、パラフィンおよび石油の利用について報告され、工場で使用するマシンオイルにPseudomonas属の細菌が繁殖することが報告された。TauszおよびPeterは2種のバクテリアを用いて初めてn-アルカンの種類および炭化水素鎖の鎖長の基質特異性について検討した。現在の分類ではPseudomonasに分類されるであろうこれらの細菌はヘキサン( $C_6$ )からテトラトリアコンタン( $C_{84}$ )までの直鎖およびシクロヘキサン誘導体には生育するが、ヘキサンより短い直鎖化合物および芳香族化合物は利用できないことを示した。

オレフィンの分解についてはHaagによるペンテンを主成分とするオレフィンのMycobacteriumによる酸化に関する報告が最初らしい。酸化速度はヨウ素価の高いもの、即ち不飽和結合の多いものほど高いという。アセチレンの酸化については

Mycobacterium lacticolaがアセチレンをアセトアルデヒドに酸化するという報告がある。またArensによってSerratia marcescensがゴムを分解することが観察され、SohngenとFolも微生物によるゴムの分解を報告している。

注目すべきは、硫酸還元菌によりナフタレン、フェナントレンが分解されることがTaussonにより報告されていることである。硫酸還元菌、Desulfovibrio desulfuricansが嫌気条件下で硫酸を還元しながら炭化水素を分解して生育することが認められ、更にベンゼンを酸化する際に、硫酸の代わりに硝酸も利用され得ることが報告された。

### 2.2.2 石油鉱工業で取り上げられた時代、1940～1960

1940年代は第二回大戦でヨーロッパが戦禍を被ったため、研究の場はアメリカに移った。アメリカで発展していた石油鉱工業では、①全世界の石油の埋蔵量の推定、②能率よく新しい油層を掘り当てる方法の開発、③より能率よく多量の石油を採掘する方法の開発、の3点が問題となっていた。米国石油研究所 (American Petroleum Institute (API))には委員会が組織され、石油の成因と考えられる沈積物の起源と環境について検討が始められた。

#### 2.2.2.1 プロジェクト43

代表的活動として、1942年にAPIで組織された“プロジェクト43”がある。C.E. Zobell博士を中心としたPennsylvania Groupにより石油の成因に関する微生物の役割、炭化水素に対する微生物の作用について組織的な研究が行われた。その研究成果をあげると、

- ① 油井中には掘削時に地表からもたらされた微生物とは別に、もとから油層中に棲息している微生物がいるらしい。その菌叢には細菌の大洋沈積物中にはみられない型の微生物が存在する。
- ② 数千フィートの深さの油井液層からもバクテリアが豊富に見い出された。
- ③ バクテリアの中には0°Cでも生育可能なものの、85°Cでも生育可能なものの、15万psiの水圧にも耐えられるものがあった。
- ④ 現在の大洋沈積物の泥と水の界面には非常に多数のバクテリアが発見されるが、その2ft下では急速にその数が減少する。
- ⑤ 母岩から石油を遊離させるのにある種の硫酸還元菌が有効であった。

⑥ 原油中にはバクテリアの増殖を抑制する物質が存在するらしい。地下で石油成分の炭化水素が、炭化水素分解菌による分解を免れていま尚存在する事実は不思議な現象にも見えるが、ヴァナジン、銅、ニッケル等によって増殖が抑制されているのかも知れない。

⑦ 炭化水素を酸化する好気性バクテリアが多数見いだされた。このような菌のために現在の大西洋沈積物中には炭化水素が見いだされないのであろう。

全体としては微生物生態学的な現象の発見が主なものであったが、このプロジェクト研究の成果がその後の研究に与えた影響は大きい。

#### 2.2.2.2 微生物を用いる石油の探索

石油の埋蔵されている土地の地表にはごく僅かではあるが、油層からの炭化水素のガスが浸出していることが知られていたので、これをを利用して石油の探索を行うアイデアが提唱された。最初に出された特許によれば、炭化水素資化性菌を土壤に混入したものを、候補地に碁盤目に掘った小穴の中に置いて、10日～2週間後に取り出し、菌の増殖の有無を調べるという方法である。その後、この菌の増殖の程度を色の変化で検出する方法、微生物の產生する蛍光物質で検出する方法、土壤試料を別の容器に移して酸素消費を圧変化で調べる方法、酸化還元電位の低下で調べる方法などの特許が出されている。これら的方法はすべて有効であったとは考えられないが、それまでの根拠なく数打つ試掘法に代わって試掘の数を減らす上で有効であったといわれ、ソ連での新油田開発に効果的であったといわれる。

#### 2.2.2.3 原油の二次回収への微生物の作用

原油を水攻法で回収する場合、注入物中に微生物が繁殖して無機塩沈殿が生じ、作業能率が低下するトラブルがしばしば起こって改善が望まれた。その防止法としてZobellはプロジェクト43の研究成果の一つとして、絶対嫌気性菌である2種の細菌 Desulfovibrio hydrocarboclasticus, Desulfovibrio halohydrocarbonclasticus という硫酸還元菌を利用する特許を得た。この内容は硫酸還元菌が有機酸を生成して不溶性炭酸塩を溶解してそれに付着していた油を遊離させるばかりでなく、ある種の界面活性剤を產生して砂粒表面から油を遊離させること、またバクテリア自身が

岩石表面に吸着し、そこに吸着している油膜をはがす作用のあることを示したものである。

#### 2.2.2.4 原油の微生物脱硫

原油中の硫黄を硫酸還元菌で除去する方法がZobellにより特許に出された。原油をDesulfovibrio desulfuricansおよびSporovibriaなどの存在下で多量の水素と接觸させると、硫黄は硫化水素などのガスとなって除去される。Clostridiumを澱粉などを基質とした培養で得られる水素などがこの水素源として利用し得る。この硫酸還元菌を用いた脱硫は、硫黄バクテリアなどの酸化的脱硫と共に注目されるべきものである。

#### 2.2.2.5 炭化水素資化性菌の研究

上記の石油鉱工業からの要請による研究の中で炭化水素資化性菌そのものの研究も進んだ。メタン資化性菌は土壌、大洋沈積物などから広く分離され、普遍的に存在することが示された。なかにはエタンやプロパンをも利用するものもあったが、いずれも形態学的にはよく類似しており、大部分はペプトンやグルコースの培地には生育しなかった。Desulfovibrioはノナン以下の低級アルカンでは生育せず、デカノン、テトラデカン、エイコサン( $C_{20}$ )、ヘントリアコンタン( $C_{31}$ )で培養したところ、炭素数の多いほどよく生育することが示された。

注目すべきはRabotonovaによりアスファルトを分解するThiobacillus、Achromobacterが報告されている。

#### 2.2.2.6 中間代謝物の研究

研究が進むにつれて炭化水素の酸化分解の過程で生じる中間代謝物の同定も進んだ。n-アルカンの酸化ではアセトアルデヒド、酢酸、乳酸、脂肪酸が検出された。Desulfovibrio desulfuricansをn-ヘキサデカンに生育させた場合、培養液中に一度脂肪酸の蓄積が見られ、培養後期に消失した。ベンゼンのNocardiaによる分解では、1,2-trans-trans-ムコン酸が検出され、ムコン酸の前駆体となるものがカテコールであることが多くの研究者によって認められた。ナフトレン、アントラセン、フェナントレンの分解ではサリチル酸の生成が共通して認められた。

#### 2.2.2.7 炭化水素代謝の機構の研究

中間代謝物の研究が進むにつれて、代謝の全体の機構を推定する研究が始まった。特に炭素と水素のみで構成されている炭化水素が酸化される最初の酵素反応の機構について関心が集まったが当時はまだその正しい機構を明らかにすることは出来なかつた。分子状酸素を直接炭化水素に導入する酸素添加酵素、オキシゲナーゼの存在が証明されたのは<sup>18</sup>Oを用いた実験であり、もっと後のことである。ただし、シクロヘキサンの酸化で最初に生成するのは過酸化物であり、それが次に水酸化物に還元されるとか、無酸素下でメチレンブルーを還元して飽和炭化水素から不飽和炭化水素が生成されることなどの重要な示唆に富む研究結果がImelikによって報告されている。

#### 2.2.3 石油発酵－発酵原料としての時代、1960～1975

炭化水素の分解が、炭化水素を基質として増殖する微生物の研究となつた時から、炭化水素を炭素源とした発酵生産の方向が大きな研究の流れとなつた。

##### 2.2.3.1 炭化水素代謝経路の解明

上で触れた代謝経路の解明がこの時期に飛躍的に前進した。炭化水素に最初に酸素原子を導入する酸素添加酵素が<sup>18</sup>Oを用いた実験で証明され、以後TCA回路等のエネルギー獲得経路にまで至る炭化水素代謝経路の大部分が無細胞抽出液を用いた酵素反応実験等によって、この時代に明らかにされた。図2-4、2-5にその概略を示した。これらはいずれもこの時代に解明された代表的な経路であり、例えば芳香族炭化水素のように、その後の研究で更にその多様性が明らかにされたものもある。代謝経路が解明されると変異株などを用いて代謝中間体を培地中に蓄積させ、中間体の生産を目指すなどの応用の試みが出てきた。

##### 2.2.3.2 発酵工業の炭素源としての確立

炭化水素を炭素源として生育する微生物が存在することが広く知られてくると、これを炭素源として発酵工業で利用することが本格的に検討され始めた。炭化水素はこれを完全に酸化すれば、これまで炭素源として利用してきたぶどう糖（グルコース）やエタノールに比べてはるかに大きな自由エネルギー変化が得られるので当然微生物の増殖でも有利であることが推定される。事実実験においても単位基質

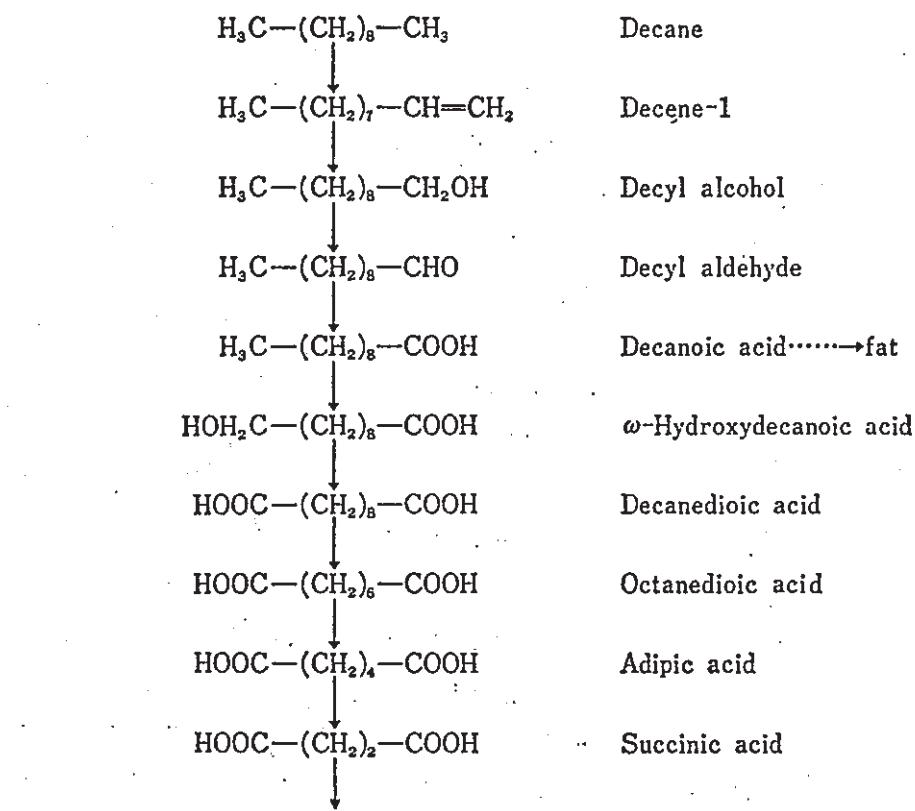
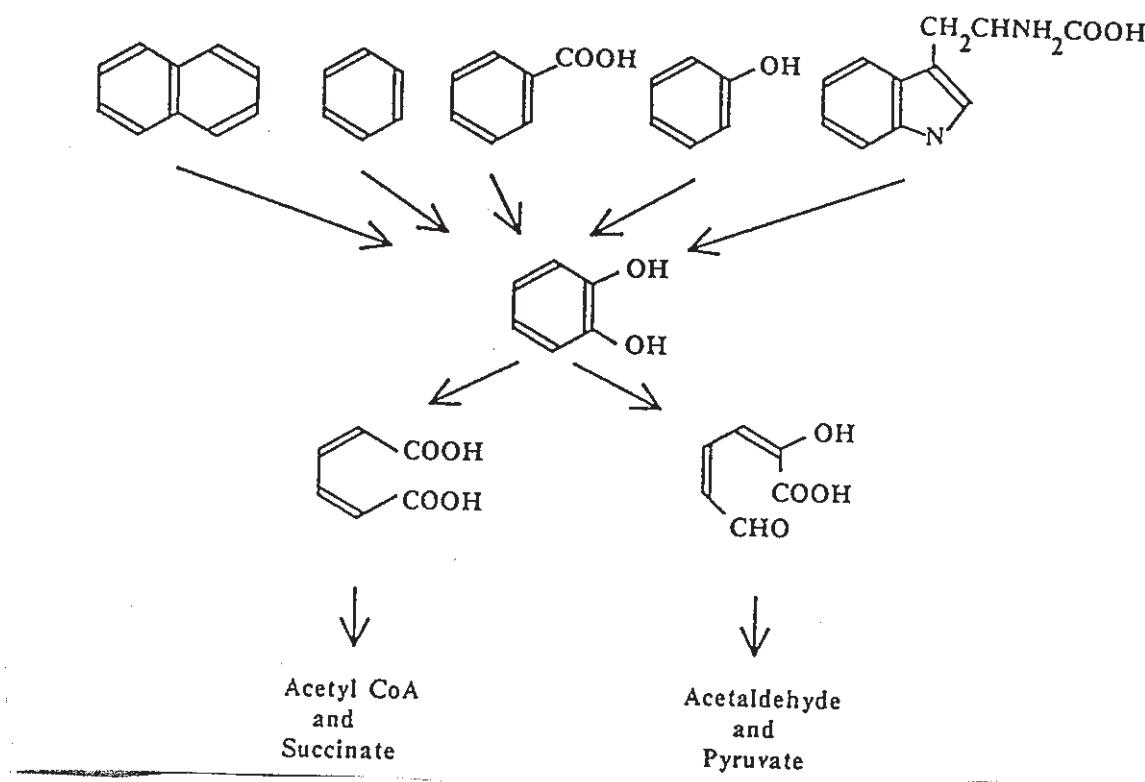
図2-4 酵母 Candida rugosa JF101のn-デカンの代謝経路

図2-5 芳香族炭化水素の代謝経路

量当たり100%を越える収量が得られる場合があり（重量当たり）、これまでの炭素源に比べて有利であることが示された。更に炭化水素は石油から得られるので、農産物から酵素反応で製造されるぶどう糖やエタノールに比べて価格の点でも一段と安価である。ここから先ずこれまでの発酵工業での有用物質生産の炭素源を炭化水素に転換するべく例えばアミノ酸、核酸、ビタミンなどというものの炭化水素からの生産が検討された。

但し、粗製の炭化水素、例えばケロシンなどを用いた場合、その全ての成分を微生物が利用できないために一部が残り問題となる。この問題は精製されたn-パラフィンを用いることで解決した。丁度この頃いわゆるハードな合成洗剤といわれるアルキルベンゼンスルホン酸塩（A B S）による河川の汚染が問題となり、微生物分解の可能な直鎖のリニアアルキルベンゼンスルホン酸塩（L A S）に転換された時期であった。この途上で直鎖のパラフィンを安価に作る技術が確立し、n-パラフィンが安価に製造されることとなった。

この炭化水素の炭素源としての利用は最終的に炭化水素資化性の酵母などを用いて菌体を製造し、いわゆる石油タンパクの生産に焦点が絞られた。石油から菌体（タンパク質）をつくり、例えば家畜の餌とする考えである。わが国の合成化学工業を中心として研究が進み、プラントを海外に輸出するまでになった。しかし、二つの問題点からこの流れは消えてしまった。それは、① 石油を食品や飼料の原料とすることに対して社会的に根強い懸念の声があったこと。具体的には石油に含まれる発ガン性炭化水素（ベンズ(a)ピレン、ジベンズアントラセン、メチルコラントレンなど）に対する抵抗が大きかった ② 細菌や酵母の菌体は食肉や植物性のタンパクである豆類等と比較するとタンパク質に対する核酸成分が多く、これを多量に食べさせると痛風などの生理的障害が多発するという懸念 によるものである。しかし、より根本的には1973年にオイルショックが勃発し、石油が必ずしも安定な炭素源とはいえない不安感が上記の懸念に追い打ちをかけたといえそうである。

#### 2.2.3.3 水-油二相系の培養に関する研究

石油を炭素源とする微生物の大量培養が問題となると、その培養条件を最適化したりする上で、これまでのぶどう糖など水に溶ける炭素源の時とは全く異なる機構を考えねばならない。特に主要な問題が水に殆ど溶けない炭化水素がどうやって菌

体に取り込まれるかという非生物的な過程が重要であったため、この問題には多くの生物化学工学の研究者が実験的研究と同時に様々なモデルを基にシミュレーションによる検討を行った。主な問題点は、① 炭化水素が水中を通って細胞に到達する過程が、油滴と細胞表面の直接接触によるものか、微量の油が培地に溶解して細胞に到達するのか ② ある研究者によれば、石油発酵というのは「石油を水の中で燃やしているようなものだ。」と評された。炭化水素を炭素源とすると、先に述べたように酸化した時の自由エネルギー変化が大きく、細胞の増殖に寄与する分も大きいが、無駄になって熱として培地の温度を上げるように働く分もまた大きい。それを防ぐためには十分な冷却が必要である。培地の温度は30°C程度であるから十分な温度差を以って冷却するには冷媒の温度を下げる必要があり、そのためにはしばしば低温の水では足りず、計算上0°C以下のブラインが必要になる場合もあった。余り指摘されないがこの点が石油発酵のアキレス腱であった。

炭化水素発酵はその中心が菌体生産となるや「単細胞タンパク」(Single Cell Protein, SCP)と名前を変えて分類されるようになったが、石油を用いるSCPが上に述べたような事情で頓座すると、その材料を「バイオマス」と総称する糞やシュガーケイン(サトウキビのしづりかす)などからつくるエタノールや木材からつくるメタノールに求めて研究が続けられた。

#### 2.2.4 環境中での炭化水素の分解－石油汚染とその対策の時代 1970～現在

##### 2.2.4.1 タンカーの大型化と流出事故

日本や欧州での石油の消費の増大は中近東からの輸入量の増大につながり、中東原油の海上輸送量が増大すると輸送の能率を上げるためにオイルタンカーが巨大化して3～40万トンのタンカーが常時運航されるようになった。一旦タンカーが事故を起こし石油が流出するとすぐに数百トン、数千トンある場合には1万トンを越える原油が海上に流出し、長い海岸線を汚染して大災害をもたらす。この石油汚染の生態系への影響が懸念されたが同時に海洋中に自然に存在する炭化水素分解菌による無機化の浄化力を評価しようという研究も始まった。しかし、原油の中には当然アスファルト成分も含まれておりこの分解も問題となってよいのであるが、余り問題とならなかった。石油汚染に関しては、低沸点成分は海面上の油膜から早期に蒸発してしまい、中程度のものが微生物の攻撃を受けて微生物分解し、残りのアスファ

ルト分を含む重質油成分は軽質分を失って密度が増大し、海底に沈むと考えられている。実際海底に沈んだタールボール状のアスファルトの塊がよく観察されている。海底に沈んでからも緩慢な微生物分解を受ける可能性があるが、そのところは研究されていない。

#### 2.2.4.2 環境中での汚染の生物的処理 (Bioremediation)

石油による海洋汚染、特に海岸線の汚染に対して、特に炭化水素分解能を持つ微生物を汚染した地域に与えたり、分解に必要な窒素、燐などの栄養を与えて人為的に微生物分解を促す方法が検討された。それまでは汚染した海岸線では人力で石油を除去したり、界面活性剤を吹き付けて洗い落としたりして石油を取り除いていたが、実際の流出事故で大きな効果を収めた。

##### 〔溶剤による地下水汚染 - 嫌気条件下での微生物分解〕

最近の研究の流れとしては、海洋での石油の流出事故による海洋の汚染と共に、石油、ハロゲン化炭化水素による地下水の汚染が問題にされている。特に米国では陸上の石油タンクなどからの石油の少量の慢性的な漏出による地下水の汚染が深刻であるようで、この地下水の汚染の対策に関連してここ数年、嫌気状態での炭化水素の微生物分解の研究が盛んになっている。これはアスファルトの地層中の微生物分解に大変関係の深い研究であるのでそのいくつかを紹介する。

Hutchinsは地下滯水層に棲息する微生物を用いてベンゼン、トルエン、キシレン、エチルベンゼンなどの分解を主に脱窒の条件で調べている<sup>(7)</sup>。好気条件では用いた炭化水素すべてが10日以内に完全に分解し、化合物間では差が見られなかった。無酸素の試料では分解に差が見られ、トルエンが相対的に分解され易く、ベンゼンでは最も分解されにくく、嫌気条件のものはすべて昇汞やアジドなどの毒物を加えたコントロールと差がなかった。環境条件から見ると、硝酸カリウムや亜酸化窒素を加えて脱窒条件にしたもののが好気条件に次いで分解されたが、硝酸塩や亜酸化窒素を加えず還元的な嫌気条件にしたものではトルエンを除いて、コントロールと有意な差が見られなかった。還元的な嫌気条件でトルエンを加えた培養では、15日以上の誘導期間の後、遅い分解が観察された(図2-6)。Hutchinsは別の論文で一般に脱窒反応を測定する効果的な方法であるアセチレン阻害法がアルキルベンゼンの分解を阻害するので用いるべきでないという結果を示している<sup>(8)</sup>。

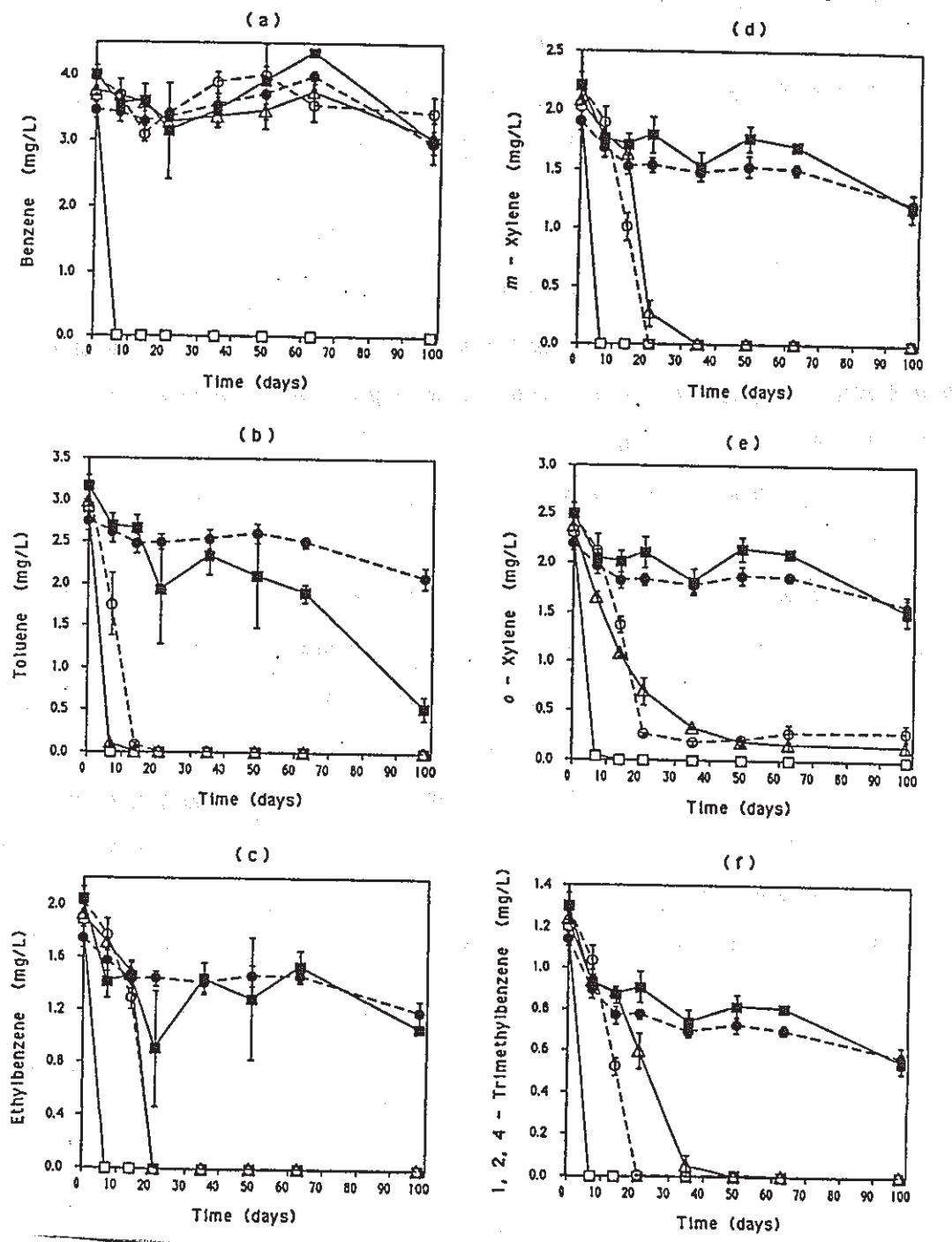


図 2-6 芳香族炭化水素の生分解。(a) ベンゼン (b) トルエン (c) エチルベンゼン (d) m-キシレン (e) o-キシレン (f) 1, 2, 4-トリメチルベンゼン、□、好気条件  
○、硝酸脱窒条件 △、亜酸化窒素脱窒条件 ■、還元性の嫌気条件 ●、毒入り  
コントロール エラーバーは 3 つの試料の標準偏差

脱窒による分解ではこの他にも、トルエンの分解で硝酸還元と亜硝酸還元が逐次に起こることを検討したもの<sup>(8)</sup>、1-n-ヘプタデセンを海洋性の脱窒菌で分解し、細菌からの界面活性剤の分泌を認めたもの<sup>(10)</sup>、クレゾールの脱窒条件下での分解の酵素反応の検討をしたもの<sup>(11)</sup>、p-クレゾールの脱窒条件での分解を回分式と連続式の培養を用いて解析したもの<sup>(12)</sup>、芳香環中に窒素を含んだピリジンを脱窒条件下で土壤中で分解し、その速度の解析をしたもの<sup>(13)</sup>、などがある。

Flyvbjergらは脱窒細菌の混合菌を用いてo-クレゾールの脱窒条件下での分解を検討した<sup>(14)</sup>。この混合菌は硝化と脱窒を行っている12の下水処理場のスラッジを1年間脱窒条件下でトルエンを加えて集積培養したものである。結果は図2-7に示すようにまずトルエンが急速に分解し、トルエンの消失後o-クレゾールの分解が始まるがそう長く続かず、30%以上が残存した。分解したo-クレゾールのうち73%が無機化したことが、炭素14で芳香環をラベルしたo-クレゾールの実験での<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>の発生からわかった。

Ramanandらは滯水層の細菌からなる微生物スラリーを用いてm-クレゾールの嫌気的分解を行った<sup>(15)</sup>。m-クレゾールは脱窒条件と硫酸還元条件で6日間に85%以上が分解した。酸素もしくは硫酸還元における阻害剤であるモリブデン酸が存在すると、または硫酸が存在しないと分解は阻害された。しかし、メタン発酵の阻害剤であるプロモエタンスルホン酸は分解に影響しなかった。微生物スラリーはm-クレゾール1モル当たり3.63モルの硫酸を消費していた。これは硫酸還元での等量的消費量の87%であり、m-クレゾールの大部分が無機化されていたことを示す。この実験ではメタンは検出されなかった。

EdwardsらはカリフォルニアのSeal Beachのガソリンで汚染された底質から得られた菌叢を用いて、硫酸還元条件下で芳香族炭化水素の分解をおこなった<sup>(16)</sup>。ベンゼン、トルエン、3つのキシレンの異性体、エチルベンゼンの混合物を与えた最初の培養では、トルエン、3つのキシレンの異性体はいずれも完全に炭酸ガスとバイオマスに無機化された。しかしひんゼンとエチルベンゼンは同様の条件では分解されなかった(図2-8)。キシレンは最初の培養では分解が始まるまでに30-80日の遅れがあったが、その後の集積培養では遅れがなくなった。トルエン、キシレンでは微生物の倍加時間は20日であり、菌体の収率は0.1-0.14であった。硫酸還元が進むと硫化水素が蓄積することにより反応を阻害するよう見えた。

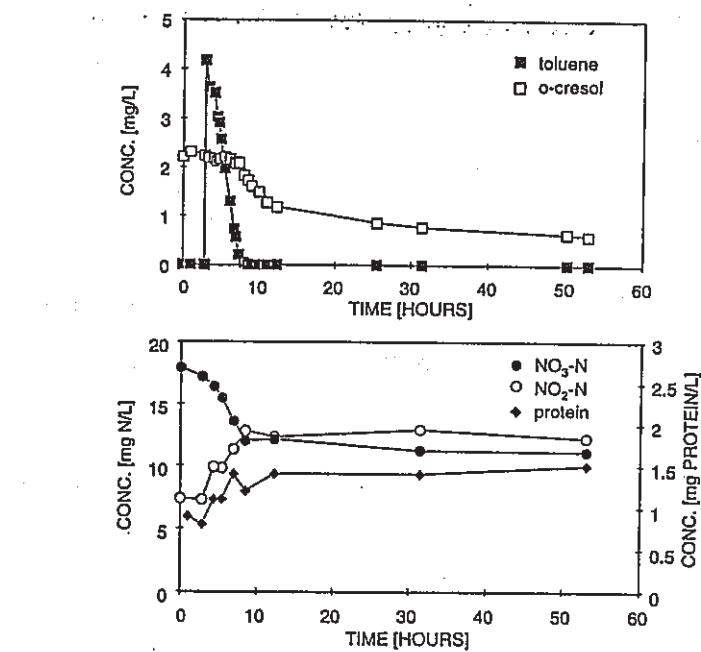


図 2-7 20°Cにおける混合培養でのトルエンとo-クレゾールの消失（上）、菌体蛋白量、硝酸還元による硝酸の還元と亜硝酸の生成

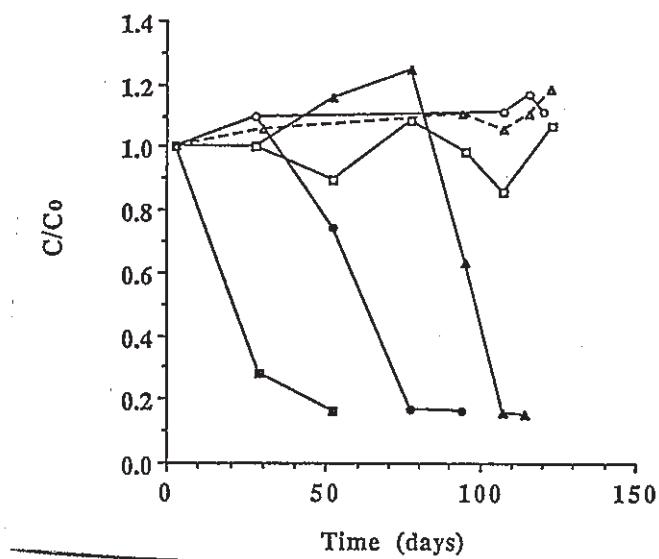


図 2-8 未馴化のマイクロコズムでの芳香族炭化水素の生分解。トルエン (■) 、p-キシレン (●) 、o-キシレン (▲) 、ベンゼン (□) 、エチルベンゼン (○) 減菌したコントロール (△) 、コントロール以外は6本の平均、コントロールは2本の平均、トルエン、p-キシレン、o-キシレンでは分解するにつれて泥質に吸着していた炭化水素が脱着していくので液中での濃度が0には到達しない。

Edwardsらは別の論文で同じ場所の底質からベンゼンのみを与えて集積した菌叢を用いてやはり硫酸還元条件下でベンゼンを分解した<sup>(17)</sup>。炭素14で芳香環をラベルしたベンゼンでの実験から90%以上が<sup>14</sup>C O<sub>2</sub>として検出され、無機化されていたことがわかった。

メタン発酵による炭化水素の分解に関しては先に述べた脱窒、硫酸還元の論文の中には硝酸、硫酸を加えない完全な還元状態での試料も実験中に含めているものもあるが、分解を検出したものは少ない。その中でHutchinsが脱窒を主題とした論文で<sup>(7)</sup>、トルエンを完全嫌気で培養して遅い分解を観察したというのである。この培養では特に硫酸を加えていないため目立った硫酸還元は見られず、一方、培養瓶のヘッドスペース中のメタンは0.05%から4.7%に上昇していたという。トレーサーを用いた実験ではないためメタン発酵による分解であるという完全な証明にはなっていないが、メタン発酵でトルエンが分解する可能性を示唆するものである。

炭化水素ではないが、芳香環に窒素を含んだ複素環式化合物のインドールをメタン発酵で、オキシインドールとイサチンに分解したという報告がある<sup>(18)、(19)</sup>。これらはこのさき更に分解はされないという。

#### 2.2.4.3 炭化水素分解酵素の遺伝学の発展

Bioremediationの研究と並行して、炭化水素分解菌の分解能をになっている酵素の遺伝子の分離が1973年以降の組換えDNA技術の進歩と共に始まった。現在までに芳香族炭化水素分解遺伝子はベンゼン、トルエン、キシレンの分解酵素の遺伝子を中心に相当数クローニングされている。これらの単離された遺伝子を解析して、分解遺伝子の進化してきた道筋を辿ることや、遺伝子を組み合わせてより広い化合物を分解できるような菌株を創出するなどの試みがなされている。

#### 2.2.5 アスファルトの微生物分解の研究

以上見てきたように炭化水素の微生物による嫌気的分解については研究が急速に展開されつつあるが、アスファルトの分解となると研究は少ない。廃棄物の地層処分を考えている研究者がやはり関心を持っているようである。

Traxlerらは3種のアスファルトをMycobacterium ranae, Nocardia coeliacaの2

種のバクテリアと共に4ヶ月培養し、アスファルトの粘度の変化を測定した<sup>(20)</sup>。どのアスファルトも微生物の作用で粘度は無菌のコントロールに比べて高くなっていた。

WyndhamらはAthabascaのオイルサンドから抽出した天然のアスファルトを濾紙に吸着固定させたものを、オイルサンド形成に関わっているAthabasca河とその支流中に置いて微生物のコロニーの生成を見た<sup>(21)</sup>。カラムクロマトグラフィーによる分画では少なくとも2つの株では全ての分画で増殖が見られたが、特にn-ペンタン画分と芳香族画分では良好な増殖が見られた。分解前後のアスファルトの成分変化では飽和画分、芳香族画分の減少が目立ち、その減少した分だけ極性画分、アスファルテン画分が増加していた。

Ait-Langomazinoらは飽和分に富んだブローンアスファルトを種々の微生物を用いて好気的に分解させた<sup>(22)</sup>。Saccharomyces lipolyticaの回分培養では、分解速度は重量にして約9%w/w、アスファルトの表面積当たりでは3.2mg/cm<sup>2</sup>、厚みにして31μmであった。分解が進むにつれてアスファルトの表面に微生物膜が発達した。アスファルトを分画して調べたところ、よく分解された画分は飽和成分であった(図2-9)。飽和成分含有量の少ないストレートアスファルトを用いて同様の実験をしたところ、分解は先の試料に比べて悪かった。

Rofferyらは地層処分でのアスファルトの使用方法を模擬した微生物による分解実験を行った<sup>(23)</sup>。使用したバクテリアは石油分解菌が存在していることがわかっている場所から分離、集積したものを用いた。微生物用の培地を用いたものでは高い分解速度が得られたが、地下水のみを用いたものでは速度は低く、好気条件と嫌気条件での速度はそれぞれ0.8-1.8 μ mols CO<sub>2</sub>/mg-bitumen/month, 1.6-2.0 μ mols CO<sub>2</sub>/mg-bitumen/monthと違いはなかった。コンクリートに接触してpH11.5と高くなつた試料でも好気、嫌気条件下でそれぞれ0.6-1.5 μ mols CO<sub>2</sub>/mg-bitumen/month, 1.1-1.5 μ mols CO<sub>2</sub>/mg-bitumen/monthと殆ど違いはなかった。しかし、この分解速度はCO<sub>2</sub>の発生速度で評価しているが、好気条件と嫌気条件とでは炭化水素モル当りのCO<sub>2</sub>の生成量が異なり、一般には嫌気の方が部分的分解となり炭化水素当りのCO<sub>2</sub>生成量が少なくなるので、上記の結果は実は嫌気の方が好気の方より分解速度が高いと推測される。

Wolfらも中低線量の廃棄物の地層処分を想定した微生物によるアスファルトの分

解を検討している<sup>(24)</sup>。彼らは好気、嫌気を通じて考えられる最大の分解速度を得られるような実験系を構築した。アスファルトは表面積が律速にならないように粉末にして与え、好気的条件では十分な曝気を行った。窒素、燐その他の栄養素および微量元素を加えた培地を用いて栄養上の制限が加わらないようにした。こうした条件下では、好気的条件で20~50g-アスファルト/m<sup>2</sup>/年、嫌気的条件で0.2~0.6g-アスファルト/m<sup>2</sup>/年と嫌気的条件下では好気的条件下に比べ1/100の分解速度となつた。また、3時間にわたり50000radの電子線を照射したところ、照射時には瞬間に CO<sub>2</sub>発生量が増加したが、照射後すぐに発生量は急減し、回復に3日程度を要した(図2-10)。

ObataらはカナダのAlberta Research Councilより提供されたカナダ産と思われるAthabasca ビチューメン(天然アスファルト)とn-テトラデカン(n-C<sub>14</sub>)の混合物を用いてBranhamella属のビチューメン分解菌を土壤中から分離している<sup>(25)</sup>。この菌を用いると、表2-2に示すようにOD<sub>660</sub>(培地の濁度)で見た菌の増殖が、ビチューメンとn-テトラデカンの混合物を与えたものが0.75、テトラデカンのみのものでは0.17であるので、菌の増殖にはビチューメンが寄与していることがわかる。ビチューメンのみでは全く増殖がみられていない。テトラデカンだけでも少しOD実験方法としてn-テトラデカンのように炭化水素の中では最も細菌にとって分解し易いものをビチューメンの5倍も多く共存させることにはやや疑問をもつてしまふが、著者によればテトラデカンはビチューメンをエマルジョン化する役割を持っているらしい。

### 2.3 地層中の微生物生態学に関する既往の研究

地層中の微生物の生態については、地表から1m程度の農耕に用いられる表土中の微生物の生態については土壤学として研究されているが、地層処分の場となるような深い地中の微生物については文献検索では見当たらなかった。先に嫌気性条件下での炭化水素の微生物分解について滞水層から分離した菌叢を用いたというような研究があったが<sup>(16)</sup>、これも1m以下の浅いところから分離したものであった。アスファルトの分解が地層処分を検討している原子力関係の研究者により行われていたように、むしろ原子力の研究機関の方がでよく研究しているのではないだろうか。

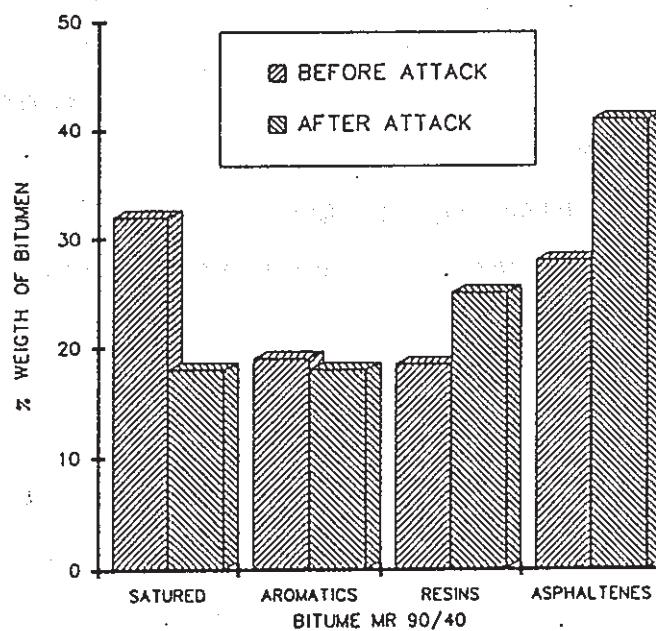


図 2-9 アスファルト Mexphalte R90/40 の培養前後の化学組成

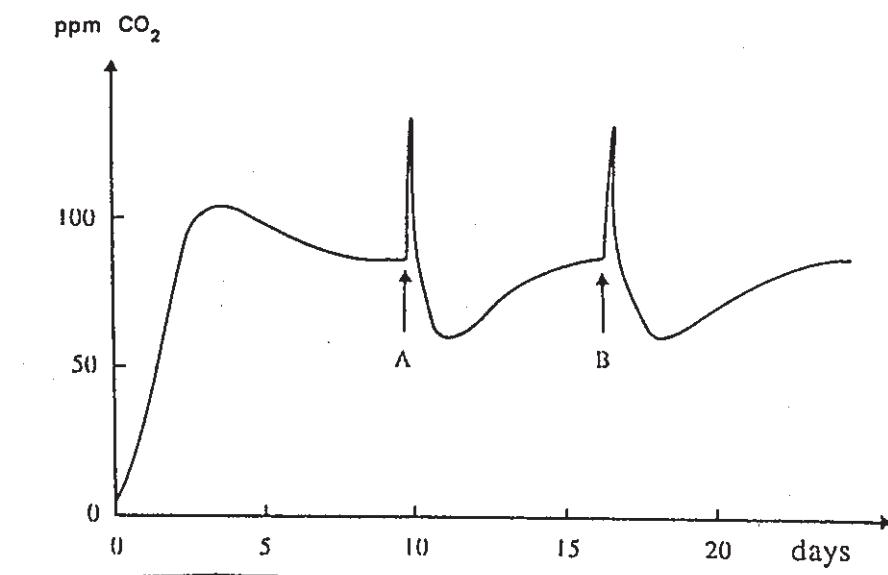


図 2-10 アスファルトの無機化に及ぼす電子線照射の効果。矢印で示した時間に 30KV の電子線ビームを 3 時間のうちに 50000rad だけ照射した。

## 2.4 地層処分で可能性のある微生物反応の検討

### 2.4.1 地層処分における環境条件

地層処分では廃棄物が長期間安定に保存されることが条件であるので、物理的、化学的、生物的に以下のような条件の地層が前提となると考えられる。

- ① 地震による振動、断層などの機械的擾乱がなく、低温であること。
- ② 地下水の流動が緩慢で、水質は中性、溶存イオン濃度が高くない。
- ③ 溶存酸素がなく（嫌気性、酸化還元雰囲気としては還元性）、溶存アニオンとして硝酸、亜硝酸などの窒素イオン、硫酸、亜硫酸イオンが特に低いこと。

### 2.4.2 上記の環境条件に該当する微生物

上記の環境条件に該当する微生物の種類としては、硝酸還元能（脱窒能）を持つ細菌、硫酸還元能を持つ硫酸還元菌、更にメタン生成細菌がある。環境中の存在の頻度、環境へ及ぼす生物的な影響の能力としても、上にあげた順に大きい。

脱窒細菌はある特殊な細菌のグループでなく、様々な通常の好気性の細菌の中で脱窒能を有するものの総称である。例えば後に述べる今回の実験で用いたPseudomonas属の細菌では、少なくともJI104、KR1の2種の株は脱窒能を有している。

硫酸還元菌は特殊な細菌のグループで絶対嫌気性（嫌気性でないと生育できない）、電子受容体に硫酸イオンを必要とする細菌である。種類として明らかにされているもの（Desulfovibrio属）は少ないが、環境中、特に沿岸海洋の底泥中には豊富に棲息する。海水中には硫酸イオンが豊富に含まれるためである。

メタン生成細菌はやはり絶対嫌気性菌のグループで、有機物を分解してメタン発酵によりメタンと炭酸ガスを生じる。淡水の湖沼には豊富に棲息する。

これらの細菌群全てが対象となる細菌ではなく、これらの細菌の中でアスファルトを分解する能力を有するものが対象である。

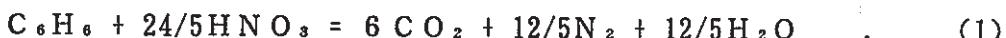
### 2.4.3 上記の微生物での反応の検討

ここでは熱力学的な反応の可能性を検討しておく。酵素反応での可能性を考えるには、純粹な化学反応とは異なり、総括的な反応でなく各素反応毎に考える必要があるが、現時点でその素反応は全く解明されていないので、総括の反応で考える。

しかし、実際的な問題として考えるならばアスファルトの微生物分解で懸念されていることは、アスファルトが微生物によって侵されて本来の物理的遮蔽機能に影響する事態であって、それはアスファルトが炭酸ガスと水に完全無機化することではなく、アスファルトが水溶性、あるいはガス状のものに変化することである。ここでは無機化を前提として計算してあるが、実際はもっと前段の反応で考えるのが本来であろう。ただし前段までの反応の方が無機化に比べて起こりやすいかどうかはいちがいに言えない。炭化水素の分解では前半ではむしろ生物はエネルギーを持ち出し、後半でそれに倍するエネルギーを獲得するような分解経路も存在するからである。

#### 2.4.3.1 脱窒反応による炭化水素分解

アスファルトのモデル物質というものはまだ確立していないので、ここでは最も単純な芳香族の代表としてベンゼンを考える。殆どの高等生物は通常の酸素を含む大気のもとで有機物などの高エネルギー物質を分解し、そこで得られた電子を酸素に渡すことによりATPなどの生化学的なエネルギーを得ている。脱窒反応とは酸素の代わりに硝酸を電子受容体とする反応であり、ベンゼンを分解する時には形式的に次式が成り立つ。



この反応の自由エネルギー変化は  $\Delta G = -2665 \text{ kJ/mol}$  で大きなエネルギーの低下があり、ベンゼンの分解は進み得る反応である。事実、脱窒での炭化水素の分解の報告は多い。

#### 2.4.3.2 硫酸還元による炭化水素分解

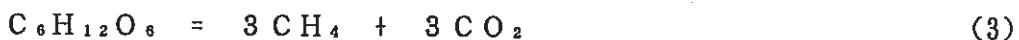
硫酸還元では脱窒での硝酸の役割がそのまま硫酸になり、最終産物が分子状窒素の代わりに硫化水素となる。



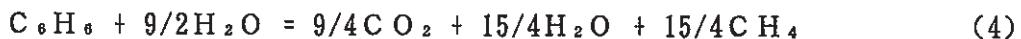
この反応の自由エネルギー変化は  $\Delta G = -739.4 \text{ kJ/mol}$  で、ベンゼンの分解は進み得る反応であるが、脱窒に比べるとエネルギーの減少は少なくそんなに能率的に進み得る反応ではなくなっている。しかし、硫酸還元とリンクした炭化水素の分解の報告もされている。

### 2.4.3.3 メタン発酵による炭化水素分解

メタン発酵では上記2つの反応とは異なり、酸素がないだけではなく、それに代わる電子受容体もない完全な嫌気状態で起こる反応である。例えば通常のメタン発酵で起こっていると考えられるグルコース（ぶどう糖）のメタン発酵では形式的に



となり、出発物質から見ると一部をより還元的な物質へ、一部をより酸化的な物質へと変換し、全体として得られる自由エネルギーの低下を生化学的なエネルギーとして取り出す酵素反応である。(3)式での自由エネルギーの変化は  $\Delta G = -525.2 \text{kJ/mol}$  である。このメタン発酵がベンゼンで起こり得るかどうか計算してみる。反応式はやはり形式的に



となる。この反応の自由エネルギーの変化は  $\Delta G = -135.09 \text{ kJ/mol}$  であり、これまでの反応に比べると辛うじてエネルギーの低下がある程度で、果してこの位の反応の推進力で反応が進むのかどうかわからない。

### 2.4.3.4 まとめ

以上の検討より、熱力学的には無酸素で、硝酸も硫酸もない環境でも、炭化水素の分解は起こり得ない、とは結論できない。しかし、これは原理的な話で、実際にそのような微生物が存在するかどうかは確かめる以外にない。また、そもそもアスファルトそのものが分解しにくいものであると考えられるため、可能な反応からアプローチしていくのが望ましい。

### 3. アスファルトの成分分画と微生物による易分解成分の同定

#### 3.1 アスファルトの分画法の確立

##### 3.1.1 アスファルト試料

用いたアスファルトは当初出光興産より分けて頂くことにしていたが、製造が遅れるとのことであったので、柏研究所の近くの東京石油興業というアスファルトを道路工事業者に供給しているところで用いているアスファルトを分けて頂いた。これは普通に道路工事に用いているもので、スペックとしては針入度\*が80-100という以外、不明であった。常温では持つと指紋がつく位で、かなり軟らかいものに属すると考えられる。

\*針入度 25°Cで100gのおもりを所定の針にとりつけて5秒間アスファルトに貫入させた時の貫入した深さを0.1mm単位で表したもの。アスファルトの場合は主に粘度に対応し、軟化点が高く、常温で固いものほど小さな数値となる。

このアスファルトは室温ではかなり柔らかくこのままで粉砕できない。そのため-25°Cの冷凍庫に保存し硬度を上げて粉砕し易くした後に、5°C以下の低温室で粗いヤスリを用いて粉末にして試料とした。

##### 3.1.2 アスファルト試料のシリカゲルカラムによる分画

###### (1) 方法

分画の方法は先に述べた飯島の方法<sup>(4)</sup>に準拠した。異なる点はカラムクロマトグラフィーの吸着剤をアルミナからシリカゲルに変更したことである。飯島法を採用したのは、溶媒抽出とカラムクロマトグラフィーのみで飽和成分、芳香族成分、レジン、アスファルテン分と基本成分に分けることが出来るためである。シリカゲルを用いた理由は、基本的にはアルミナと余り違わないと、やや粗目の吸着剤を使いたかったので、その点ではシリカゲルの方が活性化が容易なためである。

アスファルト粉末1gをはかり取り、約70mlの-25°Cに冷却したn-ペンタンに溶解した。室温に放置してn-ペンタンの温度が上昇すると共に大粒のアスファルトがなくなり、このアスファルトのn-ペンタン懸濁液を1500rpm、30分間、遠心分離した。上清を除き、再度n-ペンタンを加えて同様の条件で遠心し、上清を先の上清と

合わせた。沈澱物を風乾し、重量を測定し、恒量となったところでこの画分をアスファルテン分とした。

上清はロータリーエバポレーターで約10ml程度に濃縮し、シリカゲルのカラムにのせた。シリカゲルはMerck社のKieselgel 60 (30-70mesh、粒径0.2-0.5mm) を120°C、4時間乾燥したものを用いた。これにn-ペンタンを加えてスラリーにし、径3cm、長さ30cmのガラスカラムに約27cm充填した。

## (2) 結果

写真3-1-(a)は試料をカラムにのせたところである。上部6-7cmに試料は吸着したことが黒褐色に着色した部分からわかる。次に先ずn-ペンタン500ml(ベッド体積の約2.5倍)を流し、このn-ペンタンで流下した分画をn-ペンタン画分とした。n-ペンタンを流すことによってカラム中の着色したバンドはカラムの全体の約60%にまで広がったが、それ以上流し続けても広がらなかった。流下、回収されたn-ペンタンは殆ど無色であった。写真3-1-(b)はn-ペンタン流下のほぼ最終時のものである。次にベンゼン500mlを流し、このベンゼンで流下した分画をベンゼン画分とした。ベンゼンを流すと着色バンドは速やかに流下を始め(写真3-1-(c))、終わり近くでは殆ど流出液は無色となった(写真3-1-(d))。メタノール500mlを流すと上部から脱色を始め(写真3-1-(e))、最終的にはカラムはかなり脱色された(写真3-1-(f))。

各々の溶剤で得られた分画をロータリーエバポレーターで濃縮し、予め重量を測定してあった摺りフタ付きの10-mlのスピツ型試験管に入れて更に溶剤を揮発させ乾固させた。それぞれの分画の重量を測定した結果が表3-1である。回収率は97%であった。それぞれの分画の比率はベンゼン分画が全体の約60%を占め、n-ペンタン、アスファルテン分画が同程度、メタノール分画は非常に少ない。n-ペンタン分画は飽和炭化水素に富んだ分画、ベンゼン分画は芳香族に富んだ分画、メタノール分画は酸素等を含んだ極性物質、アスファルテン分画はn-ペンタンに不溶で二硫化炭素に可溶の画分である。このアスファルトはかなり軟らかく(針入度80-100)、芳香族成分が多く、飽和成分もある程度含み、アスファルテンが少ないので、余り酸化を受けていないストレートアスファルトであると考えられる。アスファルトの中では道路工事用として一般的であるとの説明を東京石油興業から受けたが、もっと硬質のものもJIS規格では示されており、軟質に分類されるアスファルトであ

る。

表3-1 使用したアスファルトの成分 (%)

n-ペンタン分画 (飽和成分)	ベンゼン分画 (芳香族)	メタノール分画 (レジン)	n-ペンタン不溶分画 (アスファルテン)
19.2	57.6	1.6	18.6

### 3.2 芳香族炭化水素分解菌による分画試料の分解

#### 3.2.1 分画試料による芳香族炭化水素分解菌の培養

##### (1) 方法

上で得られた分画試料を炭素源として微生物の培養を行い、増殖を示すかどうかを調べた。用いた以下の微生物はすべてグラム陰性細菌のPseudomonas属のベンゼン、トルエン、キシレン分解能を有する細菌である。その他の物質の分解能、例えばn-パラフィンの分解能があるかどうかは明らかではない。

Pseudomonas aeruginosa JI104

Pseudomonas putida F1

Pseudomonas pseudoalkaligenes KF707

Pseudomonas mendocina G4

Pseudomonas cepacia KR1

Pseudomonas aeruginosa JI104およびPseudomonas pseudoalkaligenes KF707はベンゼン、トルエン、キシレン分解能に加えてビフェニル分解能を持ち、その遺伝子は同一のものである。これらはいずれも通常はLuria Bertani培地（LB培地）で増殖させている。この実験では5mlのLB培地で一夜前培養したもの200μlを5mlのM56培地に植菌し、これに上で得られた分画試料2.5mgを加えて30°Cで2週間培養後、培地のOD<sub>600</sub>（波長600nmでの培地の濁度、菌体およびエマルジョンなどの生成の尺度）を測定した。分画試料は重量測定のために乾固してあったそれぞれの分画にカラムでの流下に用いたそれぞれの溶剤、n-ペンタン分画は、n-ペンタンで、ベンゼン分画はベンゼンで、メタノール分画はメタノールで、アスファルテン分画

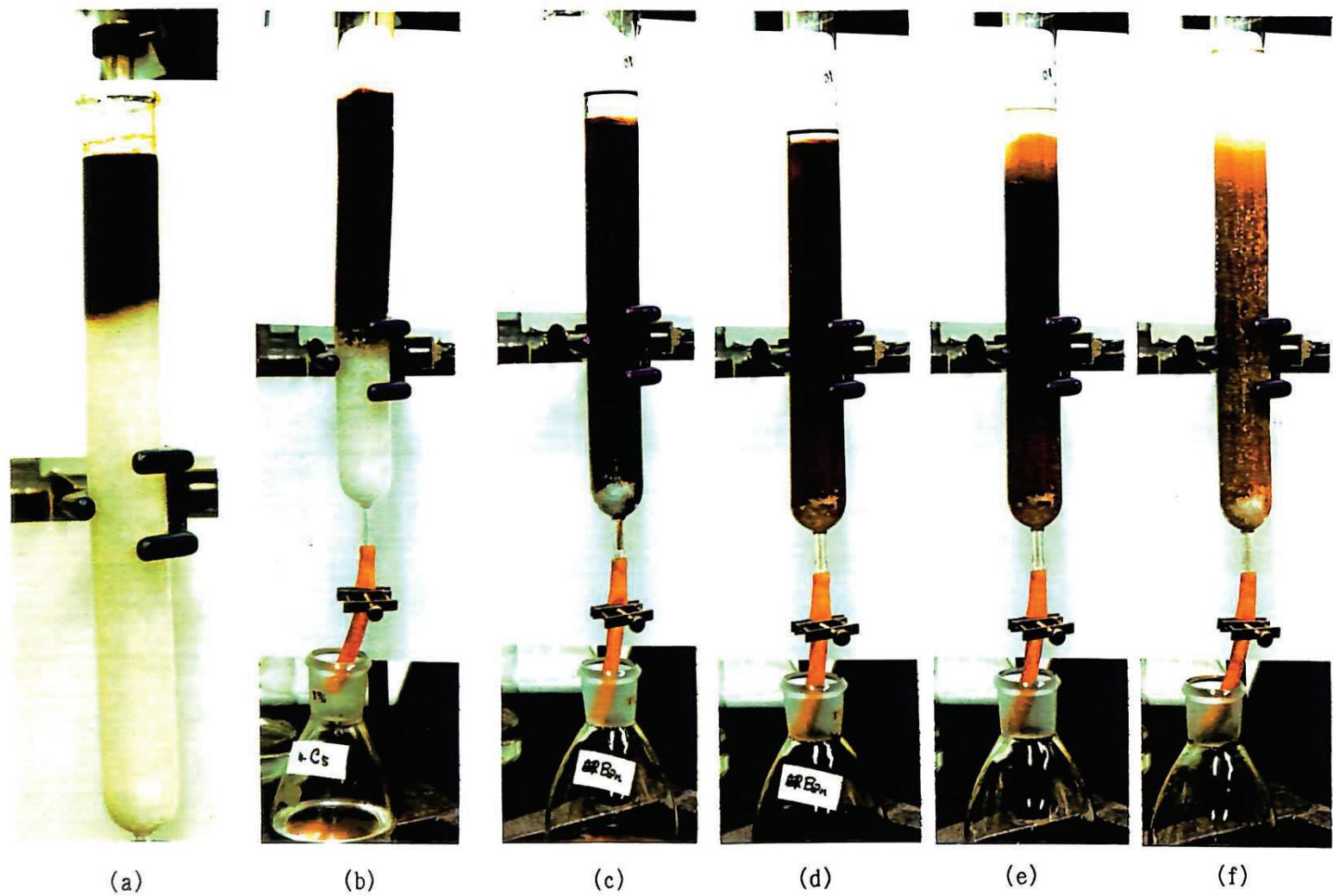


写真3-1 シリカゲルカラムクロマトグラフィーによるアスファルトのn-ペンタン可溶性成分（マルテン）の分画。(a)試料の注入  
(b) n-ペンタン流下終了時 (c)ベンゼン流下開始直後 (d)ベンゼン流下終了時 (e)メタノール流下開始直後 (f)メタノール流下終了時



写真3-2 シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画されたアスファルトの各分画。左よりn-ペンタン分画、ベンゼン分画、メタノール分画、アスファルテン分画。すべて溶剤で125mg/mlの濃度に合わせてある。

は二硫化炭素で再溶解した。それぞれの分画の濃度が125mg/mlとなるように希釈して（写真3-2）、その20μlを1.5cm四方程度のアルミ箔上に滴下してそのまま風乾し、それをそのまま5mlの培地の入ったネジ蓋付き試験管に投入した（写真3-3(a)～(e)）。

L B 培地	Bacto Trypton	10g
	Yeast Extract	5g
	NaCl	10g /1L 蒸留水
	pH	7.5
M 5 6 培地	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.2g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.7g
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.0g
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.1g
	FeSO <sub>4</sub>	0.25mg
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	5mg /1L 蒸留水
	pH	7.2

## (2) 結果

OD<sub>600</sub>の測定結果を表3-2に示す。上段は培養開始後5時間経過後のOD<sub>600</sub>、下段が14日後のOD<sub>600</sub>である。このデータから以下の点が指摘できる。

- 1) 14日間ですべての株でOD<sub>600</sub>が増加した分画はn-ペンタン分画である。
- 2) アスファルテン分画でもF1を除いて他のすべての菌株でOD<sub>600</sub>が増加している。しかし、アスファルテン分画のデータは少し注意深くみる必要がある。培養開始時のOD<sub>600</sub>はもし前培養の菌懸濁液が完全に均一であれば分画間で同じでなければならない。実際にはPseudomonas属の菌は細胞表面が粘液物質に覆われておりフロックをつくりやすい。植菌時によくピペッティングしてフロックを壊して植えたつもりであるが、培養開始時のOD<sub>600</sub>にはばらつきが見られる。ところがアスファルテン分画の培養開始時のOD<sub>600</sub>は、F1を除きいずれも極めて低くなっている。これは偶然そうなったと考えるよりも、例えばアスファルテン分画が細菌を物理的に吸着し易く、加えた細胞のかなりの部分を吸着してしまったと推定できる。培養開始時のOD<sub>600</sub>を植菌直後でなく5時間後に行った理由は、炭素源が溶存態でなく固体であ

るためにそのような変化の可能性を期待したためである。逆にアスファルテン分画以外の分画ではそのような変化は格別顕著ではない、ということがいえる。

しかし、その培養開始時のOD<sub>600</sub>の低下を考慮してアスファルテン分画の培養終了後のOD<sub>600</sub>を他の分画の培養開始時のOD<sub>600</sub>を比較してもJI104、KRI、そしてG4ではなおOD<sub>600</sub>は増加しており、菌の増殖がみられたと結論できる。

アスファルテン分は培養後の試料では他の画分とは異なりアルミ箔に塗布したものが剥がれて培地中にバラバラに懸濁していた。しかし、それらのアスファルテンの粒は振盪を止めればすぐに底に沈む程度に大粒であった。またその表面の様子は微生物の攻撃が激しくされたようには見えなかった。このアスファルテン画分でのOD<sub>600</sub>の増加はアスファルテン分がそのまま炭素源になったと考えるよりも、アスファルテン分に含まれていた水溶性の物質が培地中に溶け出し、それを微生物が利用したように思える。ストレートアスファルトを製造する過程では多分水での洗浄は行われていないので、蒸留の過程で原油に含まれていた水溶性の物質がアスファルトに濃縮し、n-ペンタンに溶解しないでアスファルテン分画に濃縮された可能性がある。更に検討する必要がある。

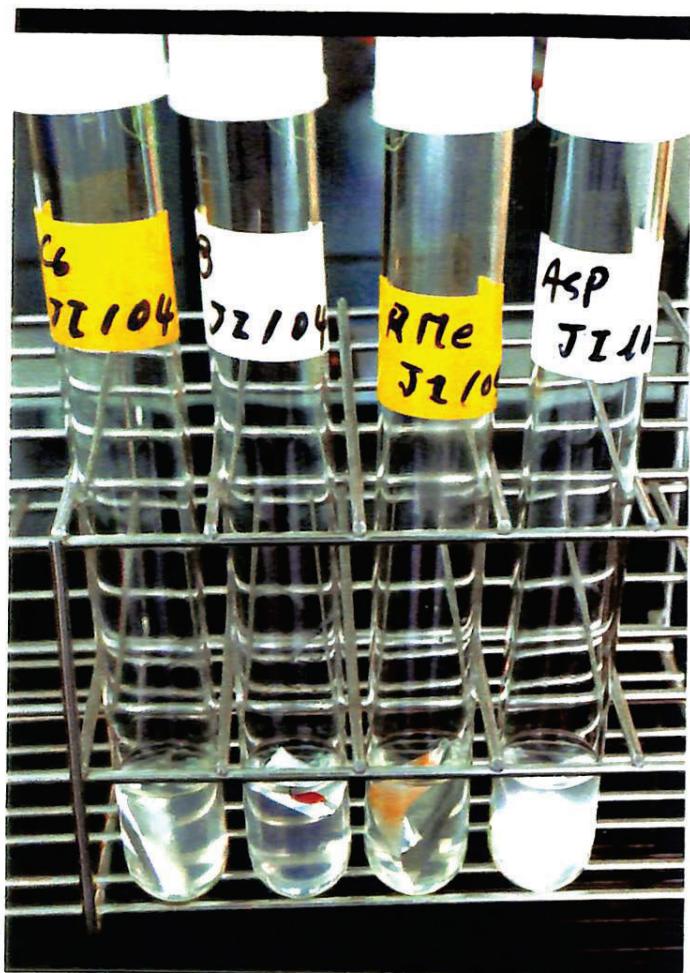
3) 菌株の方から見るとKRI、G4ではすべての分画でOD<sub>600</sub>の増加が見られる。

また14日後の試料の写真を写真3-3-(a)~(e)に示した。ベンゼン分画とアスファルテン分画は黒褐色をしており、この分画がエマルジョン化などで培地全体に分散する可能性を考えていたが、写真からそのようなことはなかったことがわかる。n-ペンタン、メタノール分画では色が薄いのでエマルジョン化については判然としない。

もし全く増殖がなく、エマルジョン化もしない場合には、14日の培養では細胞の死滅によりやや濁度は低下するのが普通である。いくつかの試料で見られる若干のOD<sub>600</sub>の低下はそのようなものと考えられる。

### 3.2.2 易分解成分の同定

3.1.2での結果は任意の一つのアスファルト試料を芳香族分解能を有する菌株でその分解性を予備実験的に見たものであり、直ちに一般化するのは危険であるが、今後の研究の指針として敢えて評価するならば、



( a )



( b )

写真3-3 14日間培養後の各試料 (a) *P. aeruginosa* J1104 (b) *P. putida* F1

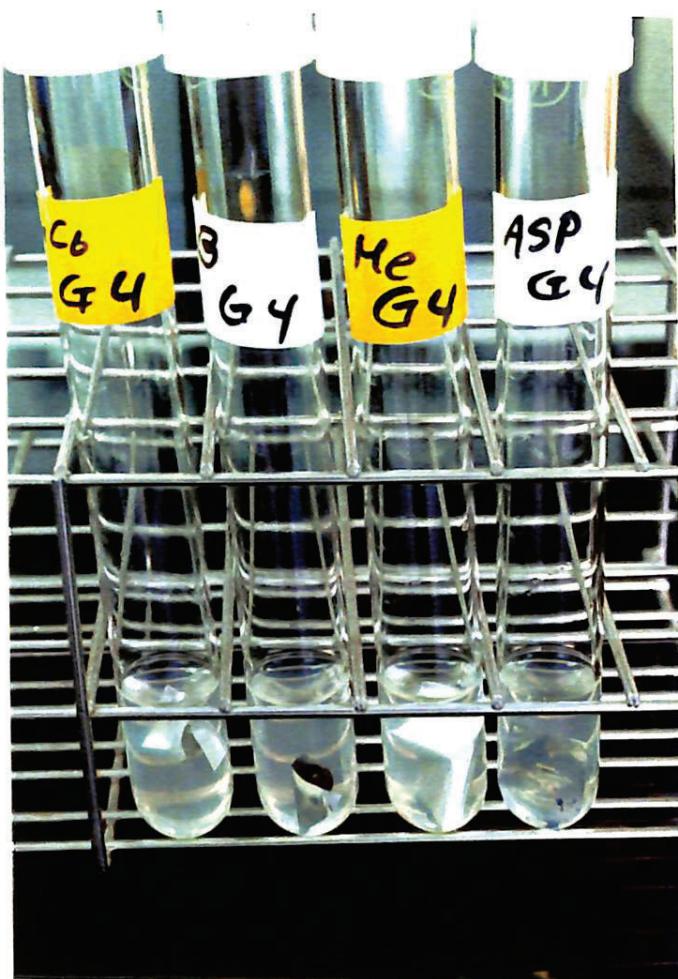
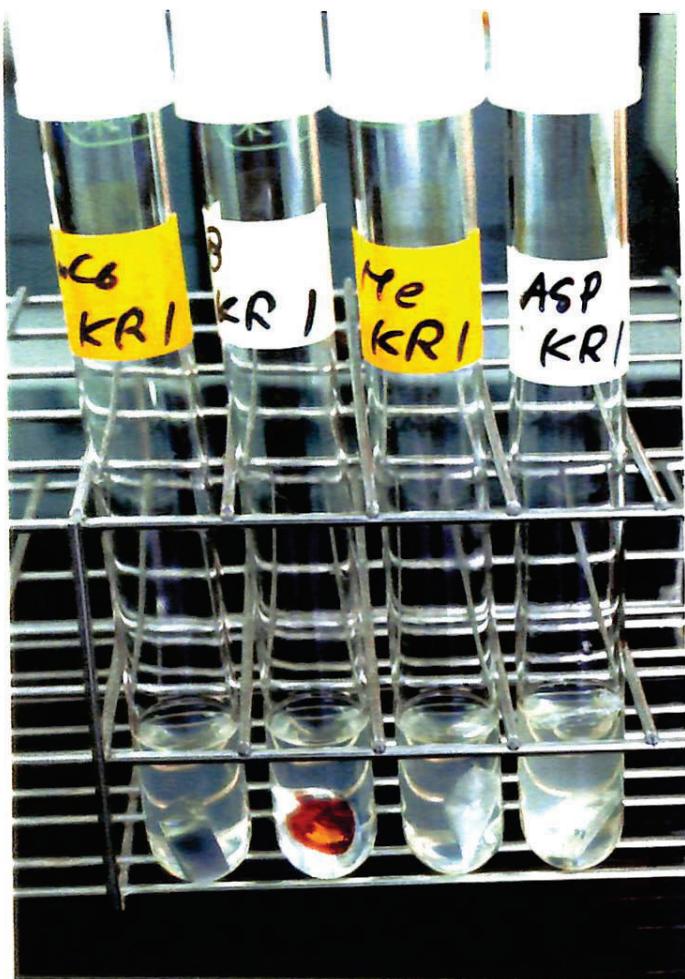


写真3-3 14日間培養後の各試料 (c) *P. mendocina* KR1 (d) *P. cepacia* G4

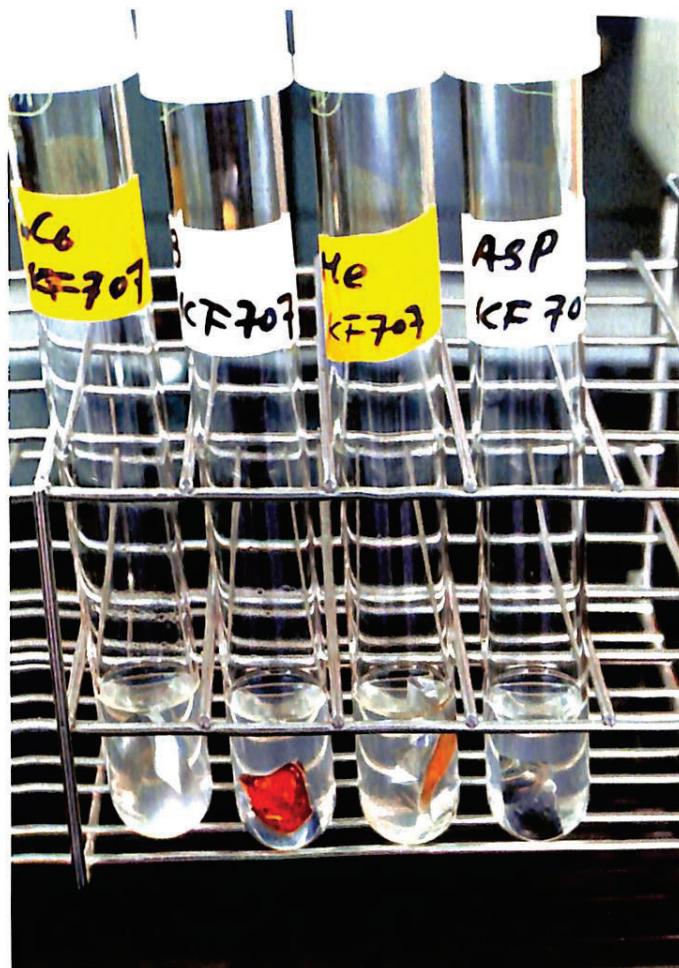


写真 3 - 3 14 日間培養後の各試料 (e) *P. pseudoalcaligenes* KF707

表3-2 アスファルトの各分画を炭素源として培養したPseudomonas属  
の増殖 (O.D. <sub>600</sub>)

	n-ペンタン 流下成分 (飽和炭化 水素分)	ベンゼン 流下成分 (芳香族炭化 水素分)	メタノール 流下成分 (レジン分)	二硫化炭素 可溶分 (アスファル テン分)
P.aeruginosa JI104	0.168	0.181	0.132	0.063
	0.200	0.126	0.141	0.278
	0.032	-0.055	0.009	0.215
P.putida F1	0.283	0.313	0.270	0.225
	0.302	0.278	0.187	0.135
	0.019	-0.035	-0.083	-0.087
P.mendocina KR1	0.162	0.110	0.146	0.046
	0.230	0.190	0.202	0.330
	0.068	0.080	0.056	0.284
P.cepacia G4	0.192	0.180	0.178	0.090
	0.323	0.325	0.288	0.290
	0.131	0.145	0.110	0.200
P.pseudo- alcaligenes KF707	0.210	0.202	0.174	0.040
	0.263	0.203	0.185	0.183
	0.053	0.001	0.011	0.149

上段： 実験開始時 O.D.

中段： 14日後 O.D.

下段： 増殖量、△O.D. = 14日後 O.D. - 実験開始時 O.D.

- 1) 実験前の予測通り、n-ペンタン分画（飽和炭化水素分）は細菌の炭素源になり易い。ここで用いた菌株の飽和炭化水素に対する分解能は明かではないが、データが示す通り分解能があるようである。
- 2) ベンゼン分画、メタノール分画では菌株間で結果が異なり、株に依存した結果となっている。全ての菌株が単純な芳香族炭化水素の分解能を有しているにもかかわらず、アスファルトに含まれているような高沸点の複雑な構造のものには特異性が異なるようである。
- 3) アスファルテン分画でのいくつかの菌株での増殖は予想に反した意外なものである。アスファルテンは4つの分画中で最も分解を受けにくいであろうと予想していた。その理由は、① アスファルテンは分子量が数千と大きな分子であり、水への溶解度はほぼ厳密に0と考えられる。炭化水素やそれに類する物質の細菌による代謝では、これまでの知識では酵素が培地中に分泌されて物質に到達して反応する事はなく、炭化水素の方が培地中に微量溶解し、細胞に達して反応する。厳密に溶解しない場合は酵素反応は起こらないと考えられる。② アスファルテンは石炭ほどではないが、分子同士が更に非共有結合によって結合して大きなクラスターをなしている（2.1.2.2参照）。このようなクラスター形成は水への溶解を一層困難なものにし、たとえ酵素が分泌性の場合でもセルラーゼが結晶性セルロースに対しては反応性が落ちるよう反応性が乏しくなるであろう。

予想に反して増殖が見られたということから、次のようなことが想像できる。

- 1) アスファルトは原油を蒸留した釜残である。原油の中には炭化水素のみならず微量ではあるが水溶性の物質も含まれていると考えられ、蒸留中に揮散、分解を受けなければ釜残のアスファルト中に濃縮されて残る。菌が増殖したのはアスファルテンを炭素源にしたのではなく、このような水溶性成分を炭素源にしたからである。
- 2) アスファルテンは生物との関係からみると炭化水素とはかなり異なる物質で、アスファルテンの微生物分解は、炭化水素の分解の既存の知識から検討するのではなく、新たに虚心に取り組むべき課題である。例えば菌によってはアスファルテンを分解する分泌性の酵素を有する、などのことがあるのかも知れない。

今後更に追求する必要があるが、培地中でアスファルテンに目立った変化がみられなかったこと、アスファルテンそのものの分解に上で述べたような原理的な困難があることから現状での予想は1)の方に傾いている。

### 3.3 アスファルトの微生物分解試験方法の検討

上記の予備的実験より得られた知見から、アスファルトの微生物分解の試験方法について以下の点を指摘することができる。

#### 3.3.1 アスファルトの多様性

材料のアスファルトの仕様は用途から決められるものなので、ある温度での硬度などの物理的性質が第一である。アスファルトは複雑な有機物の混合物であり、微生物分解のされ易さは物理的性質ではなく、構成している成分に依存している。そのため例えばJISで定めた規格のものを一通り総て揃えて試験をしても、全貌が明らかになるわけではない。具体的に地層処分に用いる予定のあるアスファルト（一種類でなく複数種類）について試験をするのが望ましい。逆に微生物分解のされにくいアスファルトを試験した上で選定するのであれば、原料である原油の由来の明らかなかなりの種類のアスファルトについて分解性の試験をおこない、優秀なものを選定する。

#### 3.3.2 対象とする微生物の候補

アスファルトの選定のためには、できるだけアスファルトにとっては過酷な条件、即ち微生物にとって分解に有利な条件で分解実験を行い、その内で分解されにくくアスファルトを選ぶ。具体的には好気、中性、30°C前後の通常の微生物にとって好ましい条件で、高い炭化水素分解能を持つ株が適当である。

逆に現実に地層処分に近い条件での実験では、微生物はそのような環境中の菌叢、もしくはそれに近いと考えられる菌叢を用いることが望ましく、一方、分解されるべき物質としてはかなり分解され易い、もしくは確認しやすいものを選ぶ。

そしてその両方から考えて微生物的に安定と考えられる処分システム、処分条件を検討する。

#### 3.3.3 試験方法

試験方法としては、大きな流れとして以下の順序で検討するのが適当と考えられる。

- 1) 既存炭化水素分解株のいくつかを用いてアスファルトの物理化学的性質とその

微生物による分解のされ易さとを相関づけ、どのようなアスファルトが微生物に対してより高い耐性を持つかを系統的に明らかにする。

- 2) アスファルトを構成する炭化水素および関連化合物のモデル物質を選定し、それらと深層地層環境で棲息している可能性のあるモデル微生物とを組み合わせて分解実験をおこない、定量的評価をおこなってその後の実験の設計に用いる。
- 3) アスファルトを構成する炭化水素および関連化合物のモデル物質と環境中より分離育成した微生物の菌叢を用いて分解試験を行い、微生物を含めた環境とアスファルトのモデル物質との相関関係を明らかにする。
- 4) アスファルトと環境中より分離育成した微生物の菌叢を用いて分解試験を行い、地層環境中のアスファルトの対生物安定性を評価する。

#### 4. まとめ

本研究の結果は次のようにまとめられる。

##### 1. 微生物によるアスファルトの分解に関する研究の現状調査に関して

(1) アスファルトは炭化水素および関連化合物の複雑な混合物である。化学的なキャラクタリゼーションには、その一つひとつの化合物を測定することは不可能であるので、なんらかの特徴に基づいた大きなグループ分けによる組成の表示方法が必要となる。最近は機器分析による表示方法などが検討されているが、古くからその構成物質を溶剤への可溶性とクロマトグラフィーを用いた極性による分離で大きくグループ分けし、その分けられた分画を成分とした組成で評価する方法が開発され、一般的となっている。この方法は分画後、その分画をその後の研究に用いることができる点でも、実用性が高い。

(2) 地層処分が行われる地中の環境は腐食の起こりにくいところが選ばれ、還元性、即ち酸素のない環境である。過去、炭化水素の微生物分解はすべて大気環境中を前提とした好気的分解として研究されてきた。しかし、炭化水素による地下水の汚染が問題となってから、無酸素下での炭化水素の微生物分解に関する研究が1990年頃より活発となり現在も続いている。無酸素下でも、硝酸などの窒素酸化物が存在している脱窒条件下では好気的条件よりは分解速度の点で劣るが、それでも活発な炭化水素の分解が行われたことが報告されている。硫酸還元条件下では、更に遅くなるがやはり分解が確認されている。硫酸も存在しない還元的嫌気条件、即ちメタン発酵の起こるような条件下では確実な微生物分解は確認されていないが、それを示唆するようなデータは発表されている。

(3) アスファルトの微生物分解の研究は多くないが、発表された5編の論文ではいずれもある程度の微生物分解が確認されている。しかし、各々の研究の狙いとするところが異なるために実験の条件が著しく異なっており、なかには好気的分解と嫌気的分解の速度が余り違わないとするデータと著しく嫌気的分解が遅いとするデータのように、見かけ上相反するデータも存在する。いずれにせよまだまだ研究そのものが少ないので、評価ができる状態ではまったくない。

(4) 地中環境中での微生物の生態に関する文献が発見できなかった。放射性廃棄物の地層処分以外、そもそもあまり実用的研究がないであろうことも予想できるが、更に角度を変えて文献検索を行う必要がある。

## 2. アスファルトの成分分画と微生物による易分解成分の同定に関して

- (1) アスファルトの成分分画には、飯島法に準拠したシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画法で全体を4成分に分ける方法を用い、比較的軟質のストレートアスファルトを分析したところ、芳香族成分が58%と大半を占め、飽和成分、アスファルテン分がそれぞれ19.18%、レジン分は2%以下ときわめて少なかった。
- (2) この方法で分画した各分画に芳香族炭化水素分解能を有する*Pseudomonas*属の5菌株を加えて好気的に14日間培養したところ、飽和分画がどの菌株に対しても炭素源となり、濁度が上昇した。次にいくつかの株でアスファルテン分を加えたもので増殖が見られたが、これに関しては予想に反する結果で更に詳細な検討を要する。芳香族分、レジン分でも一部の株で増殖が見られた。
- (3) 今回の分解実験は初めての実験であり、最も簡便な方法と比較的容易に入手し易い材料を用いて行ったものであり、これだけからある結論を引き出せるようなものではない。これから更に培養系、測定系を検討する必要がある。

## 5. 参考文献

- 1) 神谷佳男、真田雄三、富田 彰、石炭と重質油 その化学と応用、p6-11、講談社サイエンティフィック、東京、1979
- 2) O'Donnell, G., Separating Asphalt into its Chemical Constituents. *Anal. Chem.*, 23, 346 (1951).
- 3) Hubbard, R. L. and K. E. Stanfield, Determination of Asphaltenes, Oils, and Resins in Asphalt. *Anal. Chem.*, 20, 460 (1948).
- 4) 飯島 博、アスファルトの組成と物性について、石油誌、13, 606 (1970).
- 5) 真田雄三、重質油の組成と構造、石油誌、16, 357 (1973).
- 6) Dickie, J. P. and T. F. Yen, Macrostructures of the Asphaltic Fractions by Various Instrumental Methods. *Anal. Chem.*, 39, 1847 (1967).
- 7) Hutchins, S. R., Biodegradation of Monoaromatic Hydrocarbons by Aquifer Microorganisms Using Oxygen, Nitrate, or Nitrous Oxide As the Terminal Electron Acceptor. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 2403-2407 (1991).
- 8) Hutchins, S. R., Inhibition of Alkylbenzene Biodegradation Under Denitrifying Conditions by Using the Acetylene Block Technique. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3395-3398, (1992).
- 9) Evans, P. J., W. Ling, N. J. Palleroni and L. Y. Young, Quantification of Denitrification by Strain T1 during Anaerobic Degradation of Toluene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 136 (1992).
- 10) Gilewicz, M., G. Monpert, M. Acquaviva, G. Mille and J-C. Bertrand, Anaerobic Oxidation of 1-n-Heptadecene by a Marine Denitrifying Bacterium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 252 (1991).
- 11) Rudolphi, A., A. Tschech, and G. Fuchs, Anaerobic Degradation of Cresols by Denitrifying Bacteria. *Arch. Microbiol.*, 155, 238 (1991).
- 12) Khoury, N., W. Dott, and P. Kampfer, Anaerobic Degradation of p-Cresol in Batch and Continuous Cultures by a Denitrifying Consortium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 529 (1992).
- 13) Ronen, Z., and J-M. Bollag, Rapid Anaerobic Mineralization of Pyridine

- in a Subsurface Sediment Inoculated with a Pyridine-degrading Alcaligenes sp. Appl. Microbiol. Biotechnol., 37, 264 (1992).
- 14) Flyvbjerg, J., C.Jorgensen, E.Arvin, B.K.Jensen, and S.K.Olsen, Biodegradation of Ortho-Cresol by a Mixed Culture of Nitrate-Reducing Bacteria Growing on Toluene. Appl. Environ. Microbiol., 59, 2286 (1993).
- 15) Ramanand, K. and J.M.Suflita, Anaerobic Degradation of Meta-Cresol in Anoxic Aquifer Slurries - Carboxylation Reactions in a Sulfate-Reducing Bacterial Enrichment. Appl. Environ. Microbiol., 57, 1689 (1991).
- 16) Edwards, E.A., L.E.Wills, M.Reinhard, and D.Grbic-Gallic, Anaerobic Degradation of Toluene and Xylene by Aquifer Microorganisms under Sulfate-Reducing Conditions. Appl. Environ. Microbiol., 58, 794 (1992).
- 17) Edwards, E.A. D.Grbic-gallic, Complete Mineralization of Benzene by Aquifer Microorganisms Under Strictly Anaerobic Conditions. Appl. Environ. Microbiol., 58, 2663 (1992).
- 18) Gu, Ji-Dong, and D.F.Berry, Degradation of Substituted Indoles by an Indole-Degrading Methanogenic Consortium. Appl. Environ. Microbiol., 57, 2622 (1991).
- 19) Gu, Ji-Dong, and D.F.Berry, Metabolism of 3-Methylindole by a Methanogenic Consortium. Appl. Environ. Micorbiol., 58, 2667 (1992).
- 20) Traxler, R.W., P.R.Proteau, and R.N.Traxler, Action of Microorganisms on Bituminous Materials. Appl. Microbiol., 13, 838 (1965).
- 21) Wyndham, R.C., and J.W.Costerton, In Vitro Microbial Degradation of Bituminous Hydrocarbons and In Situ Colonization of Bitumen Surfaces Within the Athabasca Oil Sand Deposit. Appl. Environ. Microbiol., 41, 791 (1981).
- 22) Ait-Langomazino, N., R.Sellier, G.Jouquet, and M.Trescinski, Microbial Degradation of Bitumen. Experientia, 47, 533 (1991).
- 23) Roffey, R., and A.Norqvist, Biodegradation of Bitumen Used for Nuclear

- Waste Disposal. *Experientia*, 47, 539 (1991).
- 24) Wolf, M., and R. Bachofen, Microbial Degradation of Bitumen. *Experientia*, 47, 542 (1991).
- 25) Obata, H., T. Tanaka, and H. Kawahara, Isolation and Characterization of a *Branhamella* Strain That Degrades Bitumen in the Presence of n-Tetradecane. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 837 (1993).