

要約版

## アスファルトの微生物分解に関する研究 (II)

(動力炉・核燃料開発事業団 研究内容報告書)

技術資料		
開示区分	レポート No.	受領日
ㄨ	J1564 95-004	1995.8.11
この資料は技術管理室保存資料です 閲覧には技術資料閲覧票が必要です 動力炉・核燃料開発事業団 技術協力部技術管理室		

1995年3月

財団法人 産業創造研究所

## アスファルトの微生物分解に関する研究(Ⅱ)

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わ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学的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. アスファルトの成分分画及び化学分析に関して

- ・本実験に用いたアスファルトは動力炉・核燃料開発事業団、東海事業所 環境技術開発部 地層処分開発室より供給されたもので、実際にプロセス濃縮廃液の固化に用いられているものである。このアスファルトを石油学会規格の方法により分画した。その結果は、飽和分:20.3%、芳香族分:33.4%、レジン分:21.6%、アスファルテン分:24.7% (回収率 92.3%) であった。この数値は今回用いたアスファルトがブローンアスファルトであるため、昨年度のストレートアスファルトに比べ、レジン分、アスファルテン分が多くなっている。
- ・化学分析としては紫外-可視吸光スペクトルをとった。そのスペクトルから
  - ① トルエン流下分には芳香環2-3の芳香族炭化水素とその関連物質が多く含まれる。
  - ② レジン画分には直鎖の炭化水素骨格に酸素などが付加した極性物質が多く含まれる。
  - ③ アスファルテン画分には芳香環が4以上の多環芳香族炭化水素とその関連物質が多く含まれる。ことが示唆された。

## 2. アスファルトを最も劣化させ易い微生物の選定及び培養実験に関して

- ・地下埋設処分に用いられるアスファルトを劣化させる能力を持つ微生物を用いた実験のために昨年度用いた芳香族炭化水素分解細菌の既存株の他に、新たに環境中より適当な菌株を単離した。川崎、横浜両市の淡水域と海水域より水試料から目的の細菌を数株単離した。
- ・今回単離した菌株のうち、その一部の脱窒能を調べた。その結果かなりの株が脱窒能を有していた。
- ・脱窒能は有機炭素源を用いた時は高い能力を示したが、モデル炭化水素を用いた時は極めて薄弱なガス発生しか観察されなかった。

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:

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 生物学研究部

A study on microbiological degradation  
of asphalt (II)

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. To assess the possibility of the microbial degradation of asphalt, In this study we made fractionation of asphalt with column chromatography and preliminary experiments on the microbial growth on the fractions of asphalt with newly isolated several hydrocarbon-degrading bacteria.

1. Fractionation and characterization of asphalt

-Brown asphalt that was actually used for the containment of radioactive waste was provided by PNC for the present experiments. The asphalt was fractionated with the method recommended by the Japan Petroleum Society. The results were, saturates: 20.3%, aromatics: 33.4%, resins: 21.6%, asphaltenes: 24.7% (92.3% recovery). The percentage of resins or aromatics were higher than those of the straight asphalt that was determined last year. This showed the clear difference in the nature between straight asphalt and brown ones.

The UV-VIS absorption spectrum of each fraction was taken for the preliminary characterization. The each spectrum gave the following inferences.

- 1) The aromatic fraction may consist of aromatic hydrocarbons and the related compounds with a few aromatic rings.
- 2) The resin fraction contains polar compounds with non-aromatic structure, possibly with aliphatic one.
- 3) The asphaltene fraction was rich in polynuclear aromatic hydrocarbons with more than four aromatic rings and the related compounds.

2. Isolation and selection of microbes capable of deterioration of asphalt and their incubation -

In addition of the conventional aromatic hydrocarbon degrading strains which were used last experiments, new strains were isolated from the polluted marine and freshwater environment around Kawasaki and Yokohama.

Several strains were tested for their denitrifying activities. Nearly half of the number of isolates had an activity.

The denitrifying activity provided considerable nitrogen gas formation with nutrient broth, whereas with model hydrocarbons, the gas evolution was very poor and more sensitive method for the detection of the activity seemed necessary.

---

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

## 目次（概要版）

1. 緒言 -----	1
1. 1 本研究の目的 -----	1
1. 2 本研究の概要 -----	1
2. アスファルトの成分分画及び化学分析 -----	2
2. 1 アスファルトの成分分画 -----	2
2. 2 分画試料のcharacterization -----	3
3. アスファルトを最も劣化させ易い微生物の選定及び培養実験 -----	3
3. 1 アスファルトを最も劣化させ易い微生物の選定 -----	3
3. 2 アスファルト分画を炭素源とした培養実験 -----	7
4. まとめ -----	9
5. 参考文献 -----	10

## 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当たっては、処分環境でのアスファルトの挙動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の集合体であり、長期間において微生物により分解される可能性がある。

本研究は、実際にプロセス濃縮廃液の固化に用いているアスファルトを成分分画し、各成分に対する微生物による分解挙動について、代謝物の分析から知見を得ることを目的に行うものである。

### 1. 2 本研究の概要

本研究では以下の2項目をおこなう。

#### (1)アスファルトの成分分画及び化学分析

昨年度は、アスファルトの微生物分解に関する文献調査を行い、予察的なアスファルトの分画を行った。

本年度は、昨年度の結果を基に実際にプロセス濃縮廃液の固化に用いているアスファルト（支給品）の成分分画を行い、それらの成分の割合をもとめる。更に、各分画成分の化学分析を行い化学組成を求める。

#### (2)アスファルトを最も劣化させ易い微生物の選定及び培養実験

(1)で得られた分画成分を炭素源として、地中に存在し、好気、嫌気の下で最も活動しそうな微生物を選定する。更に、分画成分のみの場合や分画成分と硝酸塩等が共存する場合とに分けて、微生物を培養し、予察的に代謝物（ガス、溶存化学種）の分析を行う。

## 2. アスファルトの成分分画及び化学分析

## 2.1 アスファルトの成分分画

本実験に用いたアスファルトは動力炉・核燃料開発事業団、東海事業所 環境技術開発部 地層処分開発室より供給されたもので、実際にプロセス濃縮廃液の固化に用いられているものである。その仕様を表2.1に示した。

表2.1 使用したアスファルトの仕様

商品名	ADコンパウンド
製造者	昭和シェル石油(株)
タイプ	ブローンアスファルト
軟化点	358±5K
針入度	40±5×10 <sup>-4</sup> m, at 298K
引火点	>533K
伸度	>3cm
比重	1.025±0.025×10 <sup>3</sup> kg/cm <sup>3</sup>

アスファルトの分画は石油学会規格JPI-5S-22-83、アスファルトのカラムクロマトグラフィーによる組成分析方法<sup>1)</sup>に準じておこなった。

使用したアスファルトの分画による組成を表2.2に示す。

表2.2 使用したアスファルトの組成 (%)

飽和分	20.3
芳香族分	33.4
レジン分	21.6
アスファルテン分	24.7

回収率 92.3%

昨年度おこなったストレートアスファルトの分画は、第1溶剤が*n*-ペンタンであったこと、加熱カラムを用いないで分画したことなどから直接には比較できないが、参考のために記すと、飽和分 19.2%、芳香族分 57.6%、レジン分 1.6%、アスファルテン分 18.6%となり、今回のブローンアスファルトの方がレジン分、アスファルテン分が多く、その分芳香族分が少ないことが主な違いである。これはこのアスファルトがブローンアスファルトであるので先のストレートアスファルトに比べ、酸化や重合した部分が増えていることに対応している。

## 2.2 分画試料のcharacterization

分画成分の性質の違いを明らかにするために分画成分の紫外・可視吸収スペクトルをとった。方法は各分画を0.15mg/mlのクロロホルム溶液とし、クロロホルムを対照として880nmから190nmの吸収スペクトルをとった。これらのスペクトルからいくつかのことが指摘できる。

- ① トルエン流下分には芳香環2-3の芳香族炭化水素とその関連物質が多く含まれる。
- ② レジン画分には直鎖の炭化水素骨格に酸素などが付加した極性物質が多く含まれる。
- ③ アスファルテン画分にはC)の芳香環が4以上の多環芳香族炭化水素とその関連物質が多く含まれる。

## 3. アスファルトを最も劣化させ易い微生物の選定及び培養実験

### 3.1 アスファルトを最も劣化させ易い微生物の選定

地下埋設処分に用いられるアスファルトを劣化させる能力を持つ微生物を用いて、アスファルトの劣化の実験を行うことが必要であるが、そのために昨年度用いた芳香族炭化水素分解細菌の既存株の他に、新たに環境中より適当な菌株を単離してみることにした。

川崎、横浜両市の淡水域と海水域より水試料を採取し、その中から目的の細菌を単離することを試みた。試料の採取場所は表3.1に示した6ヶ所である。

各試料は、持ち帰った後直ちに30℃で培養した。

表 3.1 試料採取場所と水質

番号	場所	水質	その他
1	川崎市 浮島公園岸壁	海水	(多摩川の淡水を含む)
2	同 市営埠頭	海水	(運河水)
3	横浜市 東京ガス鶴見工場前	淡水	(運河水)
4	同 鶴見川河口	海水	(河口水)
5	同 鶴見川臨港鶴見川橋	機水	(海水、淡水混合)
6	同 鶴見川末吉橋	淡水	

表 3.4 に示すような菌株を単離した。

今回単離した菌株のうち、その一部の脱窒能を調べた。その結果を表 3.4 の脱窒能の有無の欄に示す。かなりの株が脱窒能を有しており、環境中での脱窒が普遍的な現象であることを示唆している。。

また、昨年度の研究で用いた既存炭化水素分解株の脱窒能についても同様の方法で培養 5 日後の菌の増殖による濁度で検討した。その結果を表 3.5 に示す。



表 3.4 単離した炭化水素分解菌

株番号	好気/嫌気	基質炭化水素	脱窒能	運動性	その他
G32	好気	ビフェニル	n. t.	n. t.	
G51	好気	ビフェニル	+	n. t.	ナフタレンにも生育
G511	好気	ビフェニル	+	n. t.	ナフタレンにも生育
G512	好気	ビフェニル	±	n. t.	ナフタレンにも生育
G61	好気	ビフェニル	+	n. t.	
G62	好気	ビフェニル	-	n. t.	
Y2	好気	ナフタレン	n. t.	n. t.	
Y61	好気	ナフタレン	+	+	ナフタレン、 $n\text{-C}_{14}$ * にも生育
Y62	好気	ナフタレン	-	+	ナフタレン、 $n\text{-C}_{14}$ * にも生育
P31	好気	n-トデシルベンゼン	-	n. t.	$n\text{-C}_{14}$ *にも生育
P32	好気	n-トデシルベンゼン	-	n. t.	$n\text{-C}_{14}$ *にも生育
P5	好気	n-トデシルベンゼン	-	n. t.	
P6	好気	n-トデシルベンゼン	-	n. t.	
N2	嫌気	ナフタレン	+	+	好気でも生育
N2	嫌気	ナフタレン	+	+	好気でも生育
N52	嫌気	ナフタレン	+	+	好気でも生育

 $n\text{-C}_{14}$ \*:n-テトラデカン

表 3.5 既存の芳香族炭化水素分解菌の脱窒能の検討  
硝酸塩の有無による増殖の違い (OD<sub>600</sub>)

菌株	NaNO <sub>3</sub> あり	NaNO <sub>3</sub> なし	脱窒能
<i>P. aeruginosa</i> JI104	0.816	0.160	+
<i>P. putida</i> F1	0.102	1.106	-
<i>P. mendocina</i> KR1	0.628	0.423	+
<i>P. cepacia</i> G4	0.054	0.973	-
<i>P. pseudoalcaligenes</i> KF707	0.484	0.677	-

有機栄養源を基質とした時のガス発生を今回単離した株と既存の株のいくつかを選んで更に定量的に検討した。*Pseudomonas aeruginosa* JI104、*Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707は前者が脱窒能を持ち、後者が無いということが既にわかっている。新たに環境中より単離したN52、Y62では前者がJI104とほぼ同等の脱窒能力があり、後者には無いということが明らかになった。

モデル炭化水素を炭素源とした候補株の硝酸還元による嫌氣的増殖を窒素ガス発生で調べた。候補株を今度は炭化水素の混合物を基質として硝酸還元を検討した。その結果を図 3.3 に示す。見かけ上、有機栄養培地のNB培地でガス発生量の多かったJI104とN52が炭化水素を基質とした培養でも窒素ガス発生量が多くなっており、少なかったKF707とY62がここでも少なかった。しかし、ガス発生量の絶対量は有機栄養培地の30分の1程度であり極めて少なく、対照の瓶を用意して大気からの窒素ガスの混入については一応考慮しているが有意なものかどうか疑問が残る。

いずれにせよ、炭化水素を炭素源とする脱窒は、有意なものとしても栄養培地での脱窒に比べれば僅かのガス発生となると予想されるから、もっと確実な測定法により測定する必要があるだろう。また培地中に溶存する有機物について、この培養をおこなったあとの培地中の有機物について液体クロマトグラフ(以下HPLC)にかけてそのパターンを見た。いずれのクロマトグラムもよく似ており、大きな違いは

ない。短い保持時間で表れるピークは親水性の高いアミノ酸、ヌクレオチドなどの一般的な有機物であり、細菌の培養では普遍的に現れると考えられるものである。炭化水素の培養に関係していると思われるものは、後半のやや疎水性の勝った領域に現れている多数のピークであると推定される。

### 3.2 アスファルト分画を炭素源とした培養実験

昨年度はたまたま入手できたストレートアスファルトを用い、既存株を用いてその分画成分を炭素源とした増殖を検討した。今回はアスファルトとして支給されたブローンアスファルトを、また菌株として既存株に加え、今回環境中より単離した株を加えて同様の実験を行った。4つのアスファルト分画を炭素源としたM56培地5mlにNB培地で前培養した培養液0.1mlを加えて5日間30℃で培養した後の濁度の変化を測定し、炭素源を加えていない対照の濁度を差し引いて変化量とした。

その結果を表3.8に示す。特徴的なことは

- ① 昨年度の結果では飽和成分（昨年度では*n*-ペンタン流下成分）がどの株に対しても炭素源となっていたが、今回のアスファルトでは他の画分と比較して飽和分の利用度が低い。
- ② それと対照的に芳香族成分は最もよく利用されている。
- ③ アスファルテン分は昨年と同様、かなり利用されている。
- ④ 菌株では今回単離した2株の増殖は殆どないと言っていい。特にN52株は脱窒能力で分けてきた株であるので好気での能力は高くないのかも知れない。
- ⑤ 昨年成績の悪かった*P. putida* F1は今回は格別悪くない。昨年フロックを作っていたため所期の濁度が測定されなかった可能性がある。

表 3. 8 アスファルトの各分画を炭素源として培養した菌株の増殖 (O. D. 600)

	飽和成分 ( <i>n</i> -ヘプタン 流下成分)	芳香族成分 (トルエン 流下成分)	レジジン分 (メタノール 流下成分)	アスファルテン分 ( <i>n</i> -ヘプタン 不溶成分)
<i>P. aeruginosa</i> JI104	0.013 (0.016)	0.112	0.038	0.013
<i>P. putida</i> F1	0.005 (0.055)	0.124	0.028	0.070
<i>P. mendocina</i> KR1	0.009 (0.041)	0.089	0.083	0.089
<i>P. cepacia</i> G4	-0.032 (0.070)	0.078	0.016	0.045
<i>P. pseudoalcaligenes</i> KF707	0.036 (0.051)	0.059	0.072	0.005
Y62	-0.005 (0.056)	0.004	0.001	0.002
N52	0.007 (0.035)	0.038	0.001	0.030

カッコ内は対照のO. D. (今回は前培養が8時間の若い菌を用いたので培養が均一であったため、対照の5日後の濁度をそれぞれの濁度から差し引いた。)

#### 4. まとめ

本研究の結果は次のようにまとめられる。

##### 1. アスファルトの成分分画について

(1) 支給品のブローンアスファルトを石油学会規格JPI-5S-22-83、アスファルトのカラムクロマトグラフィーによる組成分析方法に準じておこなった。その結果は、飽和分 20.3%、芳香族分 33.4%、レジン分 21.6%、アスファルテン分 24.7%であった。これは昨年のストレートアスファルトを飯島の方法で分画した、飽和分 19.2%、芳香族分 57.6%、レジン分 1.6%、アスファルテン分 18.6%と比べて、今回のブローンアスファルトの方がレジン分、アスファルテン分が多く、その分芳香族分が少ないことが主な違いであった。ただし、分画方法が異なるので数値そのものの厳密な比較はあまり意味がないと考えられる。

(2) 分画試料の紫外-可視スペクトラムをとって相互比較を行った。その結果、芳香族成分は芳香環が2-3程度の比較的小分子の芳香族炭化水素および関連物質を多く含むこと、対照的に飽和画分、レジン画分は芳香環が2-3程度の比較的小分子の芳香族炭化水素および関連物質の含有量が少ないこと、レジン画分には直鎖の炭化水素骨格に酸素などが付加した極性物質が多く含まれること、アスファルテン画分には芳香環が4以上の多環芳香族炭化水素とその関連物質が多く含まれること、が推定された。

##### 2. アスファルトを最も劣化させ易い微生物の選定及び培養実験について

(1) アスファルトを最も劣化させ易い微生物の選定については、環境中よりピフェニル、ナフタレン、*n*-ドデシルベンゼンなどのモデル炭化水素を用いて集積培養をおこなった。その集積培養から株の単離を試み、数株の炭化水素資化性細菌を単離した。

(2) 単離したものの嫌気状態での生育を見たところ、いくつかの株が脱窒能を有していることが確認された。

(3) それらの株の培養実験では、バクトペプトン、酵母エキスなどの有機栄養を炭素源とし、硝酸塩が共存した無酸素状態では高い窒素ガス発生能を有していたが、炭化水素を唯一の炭素源とした硝酸還元雰囲気下では、僅かの窒素ガスしか検出できなかった。

(4) 1のアスファルトの各分画を炭素源とした培養では、アスファルトの種類が異なるため、昨年とはかなり異なる結果を得た。その要点は、昨年度の結果では飽和成分（昨年度では*n*-ペンタン流下成分）がどの株に対しても炭素源となっていたが、今回のアスファルトでは他の画分と比較して飽和分の利用度が低い。それと対照的に芳香族成分は最もよく利用されており、アスファルテン分も昨年と同様、かなり利用されていた。一方、菌株に関しては、今回単離した2株の増殖は殆どなかった。また、昨年成績の悪かった*P. putida* F1は今回は格別悪くなかった。この違いは昨年の結果がフロックを作っていたためではないかと考えられる。

## 5. 参考文献

1)石油学会、アスファルトのカラムクロマトグラフィーによる組成分析法

JPI-5S-22-83 石油学会規格 昭和58年11月25日