

地層処分システムにおける微生物の影響について(2)[†]

— 微生物の栄養源と透過性について —

吉川英樹^{††}川上泰^{†††}福永栄^{††††}岡野誠司^{††}藤木喜市^{††††}本谷益良^{††††}油井三和^{††}朝野英一^{††††}

処分環境下での微生物の生息を検討する上で欠かせないのが微生物のエネルギー源と炭素源である。そこで本研究では、ベントナイトとアスファルトの両者に関し、これらを微生物がエネルギー源、炭素源とする可能性について検討を行った。ベントナイト中に含有する有機物量を定量するとともに、ベントナイト中での微生物の存在、繁殖を実験的に確認した。また、有機固化体であるアスファルトの分画を試料として生息実験を実施した。最後に、圧縮ベントナイト中での微生物の移行経路について知見を得る目的で、カラムを用いた移行実験を実施した。

ベントナイト中での有機物量について、月布産ベントナイト(クニゲルV1、クニミネ工業(株))を試料とし、乾燥ベントナイト中の全有機炭素量(TOC)及びフミン酸、フルボ酸の含有量を測定した。その結果、月布産ベントナイト中のTOCは0.30~0.35 wt%であることが分かった。また、本測定でOH腐植抽出液の分析の結果、フミン酸量は0.5~10 ppmであった。一方、地下水中の微生物の増殖の実験から、ベントナイトを加えた場合2~3倍の菌数となった。ストレートアスファルトを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成分に分けた。微生物による易分解成分は、分画した各分画に*Pseudomonas*属の細菌を加え培養したところ、各分画に増殖可能な菌種が確認された。

Organic content and availability as nutrients were investigated for bacteria in compacted bentonite and asphalt material, and possibilities of bacteria migration in compacted bentonite were examined. Total organic carbon and humic substances in the bentonite (Kunigel V1) were estimated more than 0.30 to 0.35 wt%, 0.5 to 10 ppm, respectively. Bacteria in groundwater were propagated in the presence of bentonite as much as twofold greater than in the absence of it. A straight asphalt was separated into 4 fractions by solvent extraction and by chromatographic technique. Growth of some *Pseudomonas* strain was observed in some fractions. Finally, the experimental system was shown for a better understanding of bacterial migration in compacted bentonite.

1. はじめに

地層処分システムにおける微生物の影響評価の点では、処分場施工開始時から埋め戻し終了時までには持ち込まれた微生物と原位置に以前から存在している微生物の影響が評価対象となる。持ち込まれる微生物として、懸念されるのは、処分場に搬入される緩衝材としての候補材料であるベントナイト(クニゲルV1)中の微生物の影響である。一般的にベントナイトの成因からは、生菌数としては土壌より低い事が考えられるが無視できない。侵入した微生物が処分環境で増殖し活性を持つか、そしてこ

の微生物の繁殖により固化体を含めた処分システムにどのような影響を与えるのかが重要である。処分シナリオ上影響を受けるのは、オーババックの腐食、酸化還元環境の変化、ガス発生、放射性核種の吸着と思われる。腐食に関しては腐食量を見積もった検討がなされているが[1]、他のシナリオについては定量的に評価する段階まで研究が進んでいない。一方で、深部地下環境に対する死滅や、圧縮ベントナイトによるフィルトレーション効果による微生物挙動の閉鎖性が期待されている。

処分環境下での微生物の生息を検討する上で欠かせないのが微生物のエネルギー源と炭素源である。微生物が深部地層へ持ち込まれ、原位置の環境変化でも死滅しないという菌がいた場合、生息の為の栄養源は何であるかという観点での検討が必要となる。そこで本研究では、高レベル放射性廃棄物の地層処分に際し使用される人工バリア材料の候補であるベントナイトと、低・中レベル放射性廃棄物の地層処分を想定したアスファルトの両者に関し、これらをエネルギー源、炭素源とする可能性について検討を行った。すなわち、ベントナイト中に含有する有機物量を定量するとともに、ベントナイト中での微生物の存在、繁殖を実験的に確認した。また、微生物

[†] Preliminary Investigation of Microbiological Effect for Radioactive Waste Disposal System (2) -Experimental Investigation of Nutrients for Some Bacteria and Migration in Compacted Bentonite-, by Hideki Yoshikawa, Yasushi Kawakami, Sakae Fukunaga, Seiji Okano, Kichiro Fujiki, Masura Honya, Mikazu Yui and Hidekazu Asano

^{††} 動力炉・核燃料開発事業団東海事業所 Tokai Works, Power Reactor and Nuclear Fuel Development Corporation

^{†††} 産業創造研究所 Institute of Research and Innovation

^{††††} 石川島播磨工業(株) 技術研究所 Research Institute, Ishikawajima-Harima Heavy Industries Co., Ltd.

^{†††††} 石川島播磨工業(株) 原子力事業部 Nuclear Power Division, Ishikawajima-Harima Heavy Industries Co., Ltd.

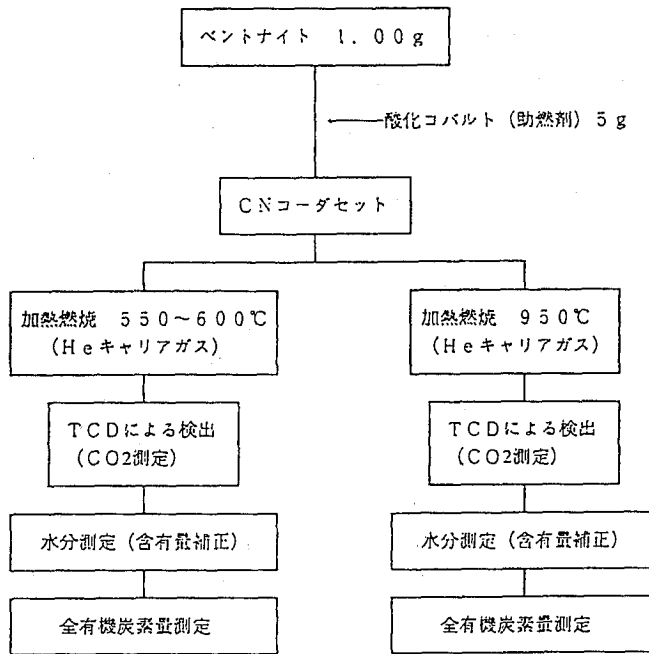


図1 全有機炭素量の測定

が有機固化体の成分を栄養源として利用できるかについて検討する目的で、有機固化体であるアスファルト固化体の易溶性成分を試料として生息実験を実施した。最後に、微生物が原位置で増殖をするとした場合、人工バリア内で微生物がどう挙動するかを確認することは天然バリアの研究との関連からも重要である。そこで、圧縮ベントナイト中での微生物の移行経路について知見を得る目的で、カラムを用いた移行実験を実施した。

以上の研究についてデータ取得等まだ不十分な点もあるが、本報告は人工バリア材料中での微生物生息、移行実験結果の紹介というよりは、むしろ処分シナリオにおける微生物の影響調査研究のひとつの方法論を提出しようとするものである。

2. ベントナイト中の有機物の分析

風化作用より生成した粘土は、原位置に集積し残留粘土となるか、地表水や風により運搬され沈殿・堆積して堆積性の粘土となる。また、地下及び海底で熱水変質により粘土が生成し熱水性粘土となる。これら粘土は続成作用を受けるが、運搬や堆積過程でも成分変化を起し、鉱物組成を異にする多種多様な粘土を生じることになる。このことから、人工バリア材料の候補とされる粘土につ

いても、その成因によって微生物の栄養源、エネルギー源となる有機物量が変化すると思われる。そこで現在、緩衝材の候補材料として考えられているベントナイト(クニゲルV1、クニミネ(株)製)について、含有する有機物量を求めた。

2.1 ベントナイト中の有機物の分析方法

2.1.1 全有機炭素量の分析

ベントナイト中の全有機物量の定量を目的として重クロム酸カリウムで酸化し、熱分解時に発生するCO₂ガスを吸引管に捕集し、重量測定を行う方法と、酸化コバルトを助燃剤としてCNコーダーで燃焼させる方法を用いた。吸引管を用いた方法は、試料に硫酸第一アンモニウム溶液を加え、煮沸し、重クロム酸カリウムを酸化剤として加えて前処理を行い無機炭素を除去した。ガスライン中で試料分解のためにH₂SO₄:H₃PO₄=3:2液を用い、加熱分解させた。発生したCO₂ガスをソーダライムの吸引管にトラップさせ重量増加を測定した。また、CNコーダーの方法を用いた。本法は、5gの酸化コバルトを助燃剤に使用して、ベントナイト1gをCNコーダー中で550~600°Cに加熱し、熱伝導検出器(TCD)で全有機炭酸量を測定した。このベントナイト中の全有機炭

表 2 ベントナイト中のフミン酸・フルボ酸濃度

| 腐植抽出液 | 0.1N-過マンガン酸 カリウム消費量 | | 腐植抽出 割合1) (%) | 沈殿部 割合2) (%) | フミン 酸濃度3) (ppm) | フルボ 酸濃度4) (ppm) | $\Delta \log K5)$ |
|-------------|------------------------|-------------------|---------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|
| | フミン酸 (ml/g) V1 | フルボ酸 (ml/g) V2 | | | | | |
| OH腐植 抽出液 | 0.013 | 0.070 | 1.2 | 15.8 | 9.5 | 61 | 0.77 |
| P腐植抽 出液 | 0.008 | 0.097 | 1.5 | 7.5 | 8 | 97 | 0.32 |

- 1): $(V1 \times 0.40 + V2 \times 0.45) / \text{ベントナイト} 1 \text{g 中の有機炭素量}(\text{mg}) \times 100$, ここで、0.40, 0.45(mg/ml) はそれぞれ、過マンガン酸カリウム滴定量に対するフミン酸、フルボ酸中の炭素重量を表す (佐藤, 1979)。
 2): $V1 / (V1 + V2) \times 100$, 腐植中の炭素重量に対するフミン酸の炭素重量を表す。
 3): $V1 \times 0.40 / 0.55 \times 1000$ ここで、0.55はフミン酸中の炭素重量比を表す。
 4): $V2 \times 0.45 / 0.45 \times 1000$ ここで、0.45はフルボ酸中の炭素重量比を表す。
 5): $\Delta \log K = \log K400 - \log K600$ (K400, K600は、それぞれ400 nm, 600 nmにおける吸光度を表す)

素量測定に關しての手順を圖 1 に示す。

表 1 乾燥ベントナイト中の全有機物量

| | 全有機炭素量 (wt%) | 全炭素量 (wt%) | 全窒素量 (wt%) |
|---|-----------------|---------------|---------------|
| 1 | 0.31 | 0.45 | 0.03 |
| 2 | 0.30 | 0.44 | 0.03 |
| 3 | 0.31 | 0.44 | 0.03 |

2.1.2 滴定によるベントナイト中のフミン酸、フルボ酸の定量

(1) 腐植抽出操作

ベントナイトから腐植液を抽出する操作の手順を圖 2 に示す。抽出法は、我が国の土壤中の腐植研究の分野で広く用いられている熊田の方法にしたがった [2]。ベントナイトを 0.1N-水酸化ナトリウムで煮沸し、ベントナイトコロイドの除去のため、飽和硫酸ナトリウムを添加する。遠心分離操作により得られた上澄み液を OH 腐植抽出液とした (OH 腐植抽出液とは抽出剤に NaOH を使用して得られた腐植液を意味する)。さらに、OH 腐植抽出後の残渣について抽出剤に 0.1 mol/l - $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (ピロリン酸ナトリウム) を使用して P 腐植抽出液を得た (P 腐植抽出液とは抽出剤に水酸化ナトリウムを使用して得られた残渣をピロリン酸ナトリウムで抽出した腐植液を意味する)。

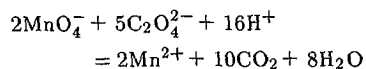
(2) フミン酸、フルボ酸分画操作

上記腐植抽出操作により得られた OH 腐植液並びに P

腐植液をそれぞれ全量用いてフミン酸とフルボ酸に分画した。操作手順を圖 3 に示す。分画操作に關しても、抽出法同様熊田の方法にしたがい、pH 調整剤に濃硫酸を使用して pH 約 1.5 に調整し、フミン酸とフルボ酸を分画した。

(3) 0.1N-過マンガン酸カリウムによるフミン酸、フルボ酸の定量

フミン酸抽出液の全量並びにフルボ酸抽出液 (1/5 量) に 4N 硫酸を添加し、過マンガン酸カリウムを加えて有機炭素を酸化した。その後、過剰の 0.1N-シュウ酸を加え、未反応の MnO_4^- を分解した。そして、未反応のシュウ酸について、0.1N-過マンガン酸カリウムにて逆滴定を行った。操作手順は圖 4 に示す。また、過マンガン酸カリウムとシュウ酸との酸化-還元反応は以下に示すとおりである。



2.2 結果及び考察

2.2.1 ベントナイト中の全有機炭素量

乾燥ベントナイト中の全有機炭素量測定を 3 回実施したときの結果と、全炭素量、全窒素量を合わせて表 1 に示す。平均値をとると、乾燥ベントナイト中の全有機炭素濃度 (TOC) は 0.31 wt % (= 3100 ppm) と算出された。

Gehman が現世及び地質時代における粘土質堆積物中の有機炭素量の頻度分布を報告している [3]。圖 5 に示した。本結果では比較的全有機物量は少ないほうに属し

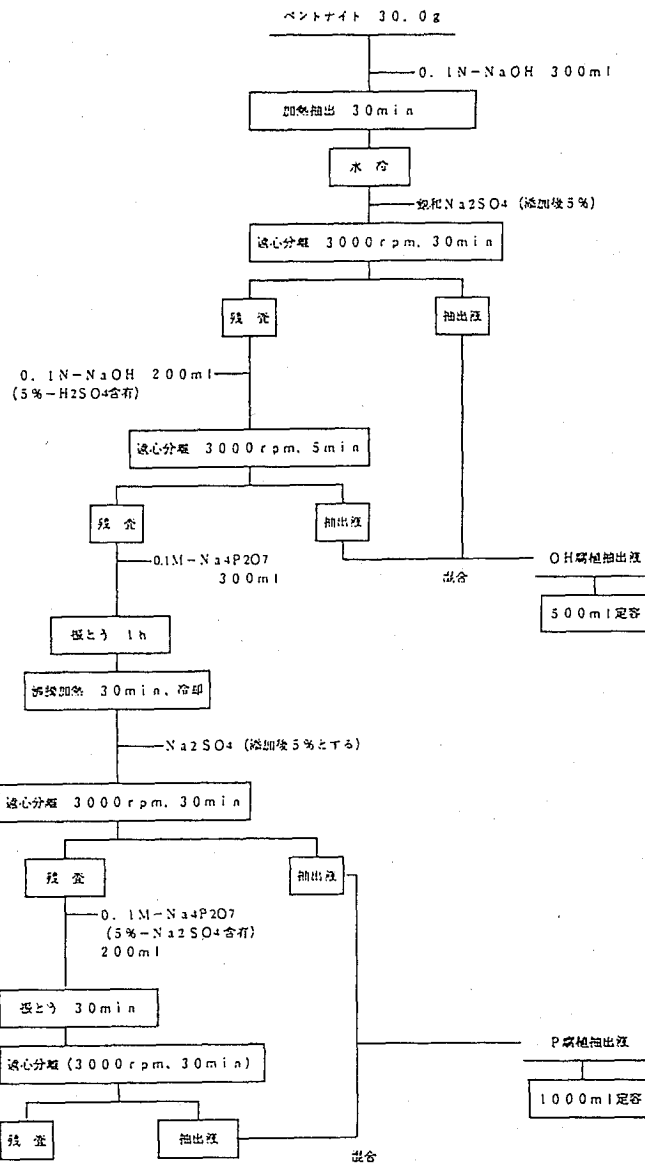


図2 腐植抽出液の調製

ていることが分かる。また、淡水湖（あるいは内湾）堆積物である木節粘土中の有機炭素量よりも低かった。これは、ベントナイトの起源である火山灰の堆積時に有機物が混入する可能性は低いとみとて考えられる。

2.2.2 ベントナイト中のフミン酸、フルボ酸の定量

過マンガン酸カリウムの滴定結果から算出した乾燥ベントナイト 1g 当たりの過マンガン酸カリウム消費量、腐

植抽出割合、沈殿部割合、フミン酸・フルボ酸濃度を表 2 に示した。

表 3 における木節粘土中のフミン酸量は、定量方法については異なるが、本報告と同様の分画操作によって得られた試料を分析結果から算出した値を表している [4]。ベントナイト中のフミン酸量は、木節粘土中のフミン酸量よりも低い数値を示している。これは、有機炭素量が

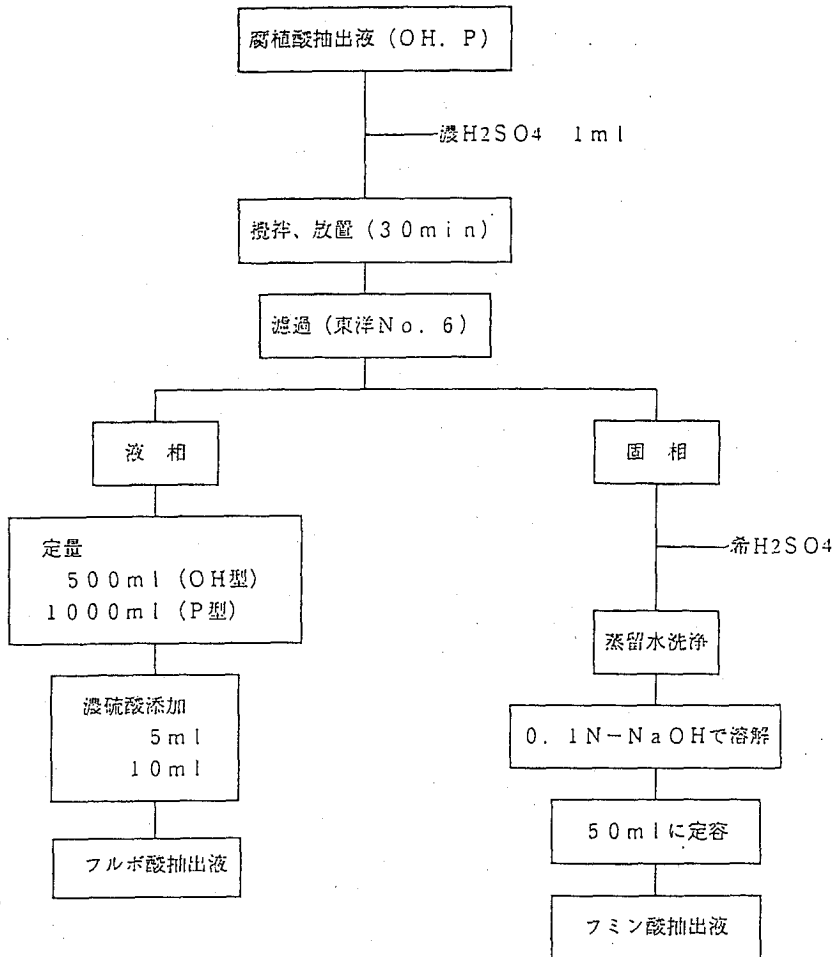


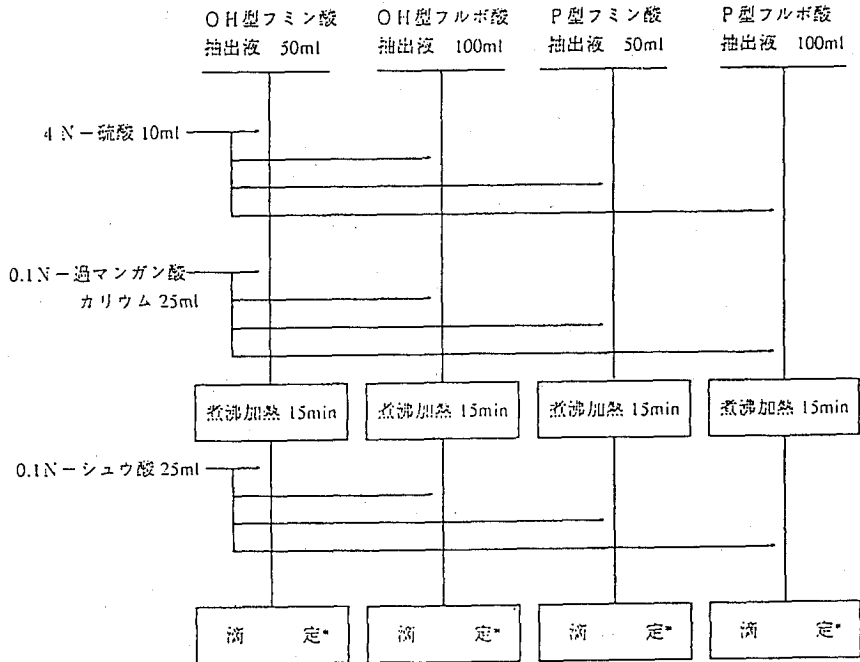
図3 フミン酸、フルボ酸分画操作

低いことに起因するところが大きいものと推定される。また、腐植の進行度を表す一つの指標となる吸光スペクトルの変化 ($\Delta \log K$) に関しては、ベントナイト中のフミン酸の方が、低い数値を示している。よって、ベントナイト中のフミン酸の方が、木節粘土中のフミン酸よりも腐植が進行しているものと推定される。

また、フミン酸、フルボ酸量の分析に、ここでは過マンガン酸による滴定法を用いているが、この滴定法では他の酸化性の無機成分が混入すると誤差が生じることが懸念される。そこで、フミン酸、フルボ酸分析に関して、CN コーダにより炭素重量を測定フルボ酸中の炭素重量比で除することによりフルボ酸含有量を算出した結果と

比較した。結果を表4に示した。滴定法での定量結果と比較すると異なった。その結果として以下の1~3が考えられる。

1. 滴定法での定量において過マンガン酸カリウム消費量に対するフミン酸、フルボ酸中の炭素重量について経験的数値 (報告値) を用いているので、ベントナイト中のフミン酸、フルボ酸の酸化能が実際と異なることにより生じた。
2. フミン酸、フルボ酸分画操作で異なる点は、 $0.45 \mu\text{m}$ のフィルタを用いている点である。フミン酸の分子量は一定ではなく大小様々なフミン酸が存在するので、フィルタ径の影響が現われた。



(* : 0.1 N-過マンガン酸カリウムによる逆滴定)

図 4 過マンガン酸カリウムによる滴定手順

3. フミン酸の分別操作において、酸性で沈殿する無機化合物が存在し過マンガン酸カリウムを消費した。

これらの事より、土壌や地下水等に含まれるフミン酸やフルボ酸を定量する場合は、分画操作並びに定量法に統一性を持たせる必要がある。国際腐植学会においては、分画操作に統一性をもたせるという動きもある [5]。しかし、分画操作による有機物の化学特性の変化にも注意が必要である。また、微生物の増殖に対しての両有機酸及び OH、P 各抽出物の相関については知られていない。処分環境を想定した場合、pH 調整により分別されたフミン酸、フルボ酸とピロリン酸で抽出されたフミン酸、フルボ酸の挙動に違いがあるか不明であり、現時点ではこれらを個別に評価することが難しい。そこで、地下水の化学的性質である pH 変化に対応させて、有機酸とした議論を行うことが妥当と思われる。以上のことよりベントナイトが微生物の栄養源、エネルギー源となる可能性があることが分かった。

3. ベントナイト中での微生物生息実験

前項の実験により、ベントナイトが微生物の栄養源、エネルギー源となる可能性が指摘されたが、ベントナイトが微生物にとっての環境として、増殖を促進しやすい条件を作るか否か明らかではない。ここでは、ベントナイトがどれだけの微生物を含んでいるかを測定する「微生物計数調査」と、ベントナイトが地下水の微生物の増殖に与える影響を調査する「増殖影響調査」とを実施した結果を述べる。

3.1 培養方法

微生物計数調査では表 5 に示すように、6 カ所の産地のベントナイト製品 (熱で乾燥したもの)、およびそのうち 1 カ所の乾燥前のもの、計 7 種を材料として用いた。増殖影響調査では、表 5 のうちの産地 C の製品を用いた。

微生物計数調査ではベントナイトの好気性従属栄養細菌、嫌気性従属栄養細菌および硫酸塩還元細菌を培養法により計数した。すなわち、ベントナイトを無菌的にホ

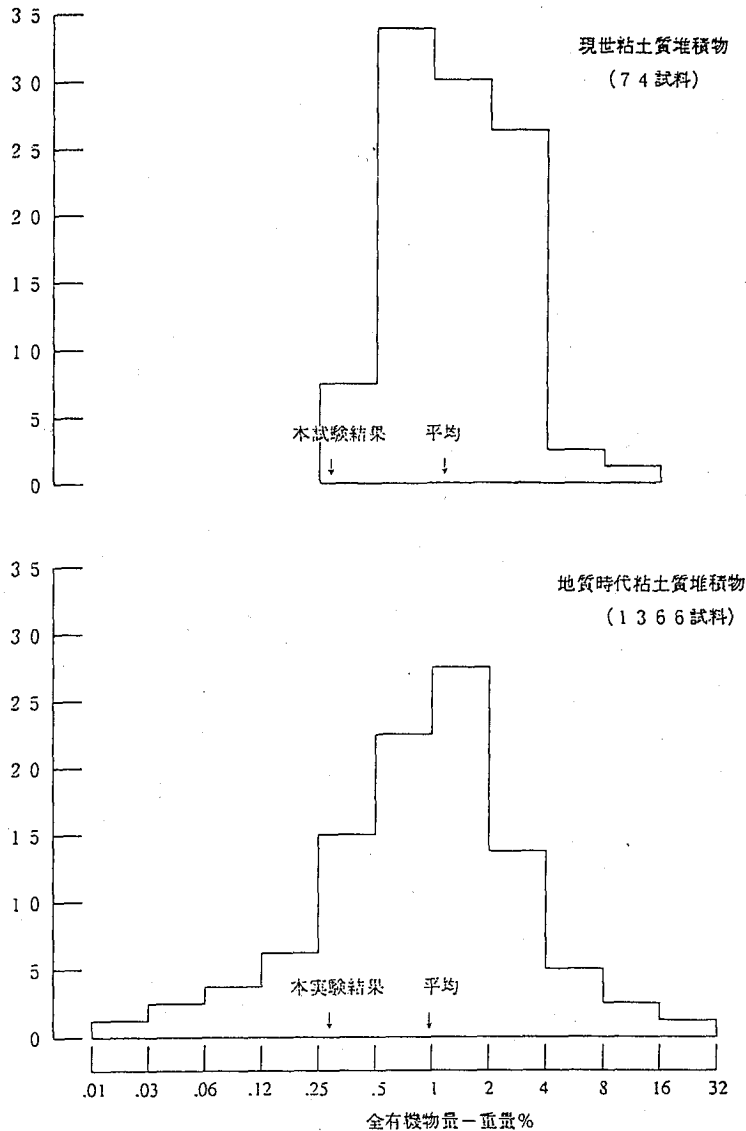


図5 粘土質堆積物中の全有機炭素量の頻度分布 [3]

モジナイザで分散処理したのち、滅菌水で段階的に希釈し、各希釈段階から表6の培地に接種し30°Cで培養して形成されるコロニー数を計測し、もとの材料中の菌数を算出した。培地として、硫酸塩還元細菌はm-ISA培地を、他の二者はVL培地およびSE培地(土壌抽出液培地)を用いた。接種の方法として、好気性従属栄養細菌は寒天平板に塗抹、他の二者はロールチューブに混釈

した。

増殖影響調査では図6に示すように、フラスコの地下水に重量比で2~10%のベントナイト材料および熱処理により殺菌したベントナイトを浸漬して、14日間30°Cに保持(インキュベーション)して、その間の好気性従属栄養細菌数をVL培地および土壌抽出液培地を用いた培養法により計数した。地下水のみのものとベントナイト

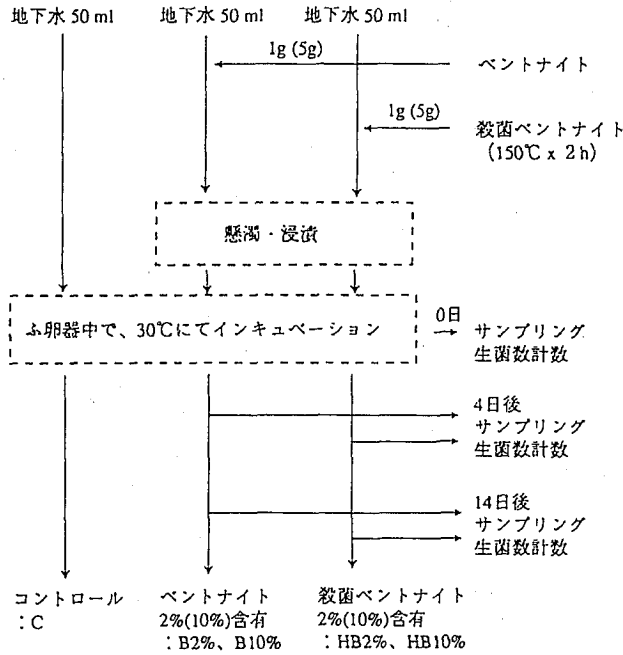


図 6 増殖影響調査手順

表 3 木節粘土中の腐植抽出割合 [4]

| 産地 | 有機炭素量 (%) | 抽出法 | 抽出割合 (%) | フミン酸濃度 (ppm) | $\Delta \log K^1$ |
|----------------------------|-----------|-----|----------|--------------|-------------------|
| 本山木節; 愛知県 瀬戸市 西印所 | 1.24 | OH型 | 26.1 | 129 | 1.01 |
| | | P型 | 21.4 | 200 | 0.83 |
| 原木節; 岐阜県 恵那郡 山岡町 | 1.27 | OH型 | 12.6 | 68 | 0.99 |
| | | P型 | 10.2 | 108 | 0.84 |
| 伊賀木節; 三重県 阿山郡 島ヶ岡 | 1.68 | OH型 | 62.7 | 800 | 0.84 |
| | | P型 | 24.6 | 357 | 0.85 |

1) $\Delta \log K = \log K_{400} - \log K_{600}$ (K_{400}, K_{600} は、それぞれ400 nm, 600 nmにおける吸光度を表す)

を添加したものの細菌数の比較検討を行った。

表 4 粉末試料によるフルボ酸定量結果

| 腐植抽出液 | CN法 (ppm) | 滴定法 (ppm) |
|---------|-----------|-----------|
| OH腐植抽出液 | 83.9 | 61 |
| P腐植抽出液 | 55.3 | 97 |

表 5 微生物計数調査に用いたベントナイト材料

| 試料名 | 産地 | 試料名 | 産地 |
|------|-------|-------|-----|
| 製品 A | 青森県 | 製品 E | 宮城県 |
| 製品 B | 新潟県 | 製品 F | 山形県 |
| 製品 C | 群馬県 1 | 乾燥前 F | 山形県 |
| 製品 D | 群馬県 2 | | |

3.2 結果及び考察

微生物計数調査の計数のための培養においては、乾燥前のベントナイトから多くのコロニーが形成した(図7)。これに対し乾燥試料(製品)ではコロニー数が非常に少なかったが、ある程度の数のコロニーは観察された。計数結果を表7に示す。製品化のための乾燥工程を経ていな

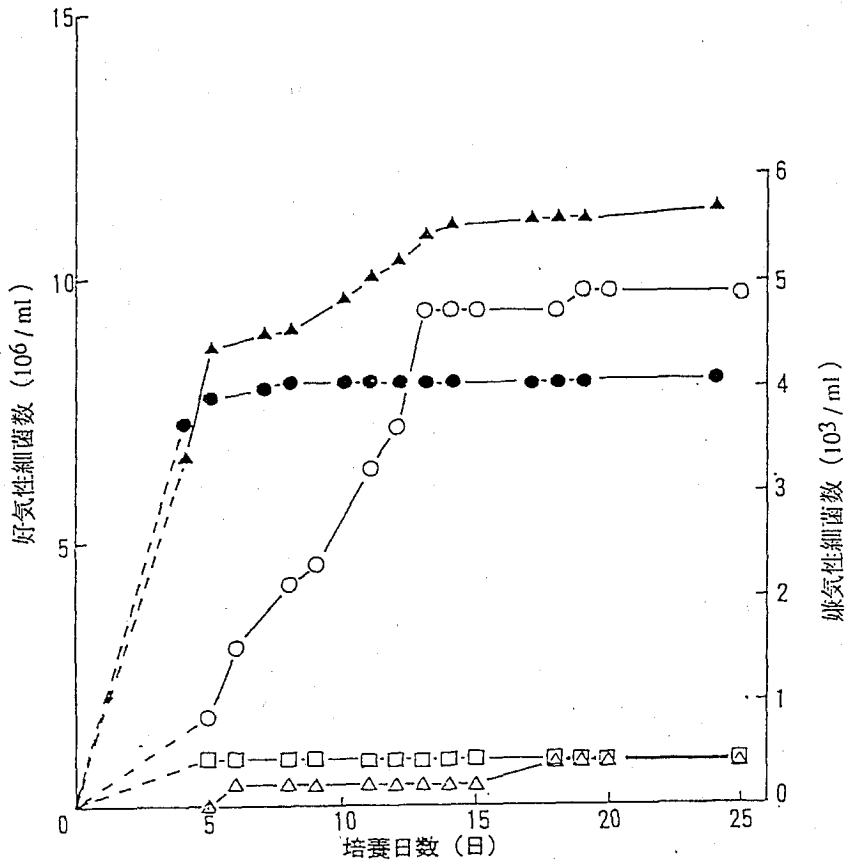


図7 ベントナイト(乾燥前F)コロニー形成曲線; VL 培地 ○: 嫌気性細菌、●: 好気性細菌; SE 培地 △: 嫌気性細菌、▲: 好気性細菌; m-ISA 培地 □: 硫酸塩還元細菌

いベントナイトからは、乾燥重量 1g あたり、約 1×10^7 の好気性細菌、 5×10^3 の嫌気性細菌、および 4×10^2 の硫酸塩還元細菌が検出された。製品化により菌数は大幅に減少したが、ベントナイト乾燥重量 1g あたりで最大値として、約 7×10^3 の好気性細菌、約 2×10^2 の嫌気性細菌、および約 2×10^2 の硫酸塩還元細菌が検出された。これは熱による乾燥 (約 80°C) が、ベントナイトの菌数を減らすのに有効ではあるが、完全には殺菌できず、上記の量の微生物は存在する事が分かった。これら細菌がベントナイト産出時より存在していたのか、製品中へ製造工程で混入したのか、微生物の起源は定かではないが、処分場建設候補材料の中から定量的に検出したのは初めてである。そして、ベントナイト自体微生物を含有する事からも、処分場環境へ地上の微生物が持ち込

まれる可能性が示された。

一方、増殖影響調査では、実験系に存在させた微生物の大部分は地下水の微生物である。本実験系で 14 日間地下水のみをインキュベーションしたときの結果は、4 日間で細菌数が急増し以後一定となった (図 8 の Control)。菌数が一定となったのはおそらく地下水内の栄養が細菌のそれ以上の増殖を支えるほどでなかったためと考えられる。一方、ベントナイトを加えた系では 4 日目までは地下水のみの場合と同様の菌数増加であったが、それ以後も増加を続け、14 日目には地下水のみの系の 2~3 倍の菌数となった (図 8 の B2%、B10%)。その 14 日目の各フラスコの菌数計測のための培養におけるコロニー数の変化を図 9 に示す。殺菌したベントナイトを添加した場合のコロニー数 (図 9 の HB2%、HB10%) は、殺菌し

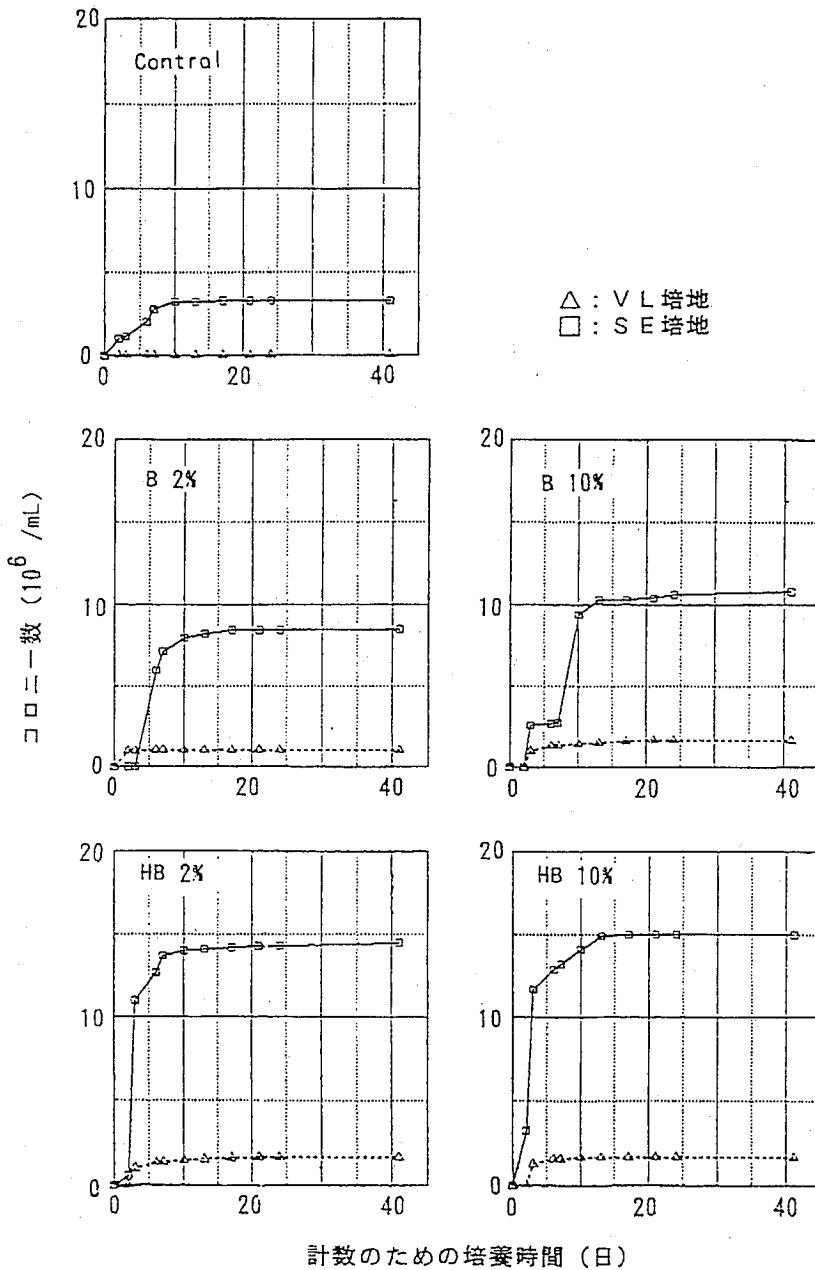


図9 増殖影響調査の14日目の細菌数計数

ない場合(図9のB2%、B10%)のコロニー数以上だったので、菌数増加はベントナイトの物理化学的作用によると考えられる。本結果から、ベントナイトは本実験条

件で地下水中の微生物の増殖を促進した事が分かった。

4. アスファルトの分画

表 6 微生物計数用培地

| VI培地組成 (好気性・嫌気性細菌用) | | m-ISA培地組成 (硫酸塩還元細菌用) | |
|------------------------|--------|---|--------|
| ペプトン | 10g | トリプトン | 10g |
| グルコース | 2g | 乳酸ナトリウム | 5g |
| 酵母エキス | 5g | Na ₂ SO ₃ · 7H ₂ O | 0.5g |
| 肉エキス | 2g | MgSO ₄ · 7H ₂ O | 2g |
| NaCl | 5g | FeSO ₄ · 7H ₂ O | 0.5g |
| 寒天 | 15g | クニン酸鉄(III) | |
| 脱塩水 | 1000ml | アンモニウム | 0.5g |
| | | 寒天 | 20g |
| | | 脱塩水 | 1000ml |

| SE培地組成 (好気性・嫌気性細菌用) | | 嫌気性細菌用の培地 | |
|---------------------------------|--------|-----------|---------|
| K ₂ HPO ₄ | 0.2g | レサズリン | 1mg |
| 寒天 | 15 g | システイン | |
| 土壌抽出液 | 1000ml | 1 塩酸塩 | 0.5g |
| | | pH | 7.0~7.2 |

表 7 ベントナイトの生菌数

| 試料 | 製品A | 製品B | 製品C | 製品D |
|---------|-------------------|-----|-------------------|-------------------|
| 好気性細菌 | 5×10 ² | ND | 4×10 ³ | 7×10 ³ |
| 嫌気性細菌 | 2×10 ² | ND | 2×10 ² | ND |
| 硫酸塩還元細菌 | ND | ND | 2×10 ² | ND |

| 試料 | 製品E | 製品F | 乾燥前F |
|---------|-----|-------------------|-------------------|
| 好気性細菌 | ND | 3×10 ³ | 1×10 ⁷ |
| 嫌気性細菌 | ND | ND | 5×10 ³ |
| 硫酸塩還元細菌 | ND | ND | 4×10 ² |

生菌数は試料の乾燥重量 1g 当りの数 (CFU/g d.w) として表わした。好気性細菌及び嫌気性細菌については 2 種類のうちコロニー数の多い方を採用した

微生物の栄養源として、人工バリア材料のほかに固化体材料の一つであるアスファルトが利用される可能性が考えられる。アスファルトは高分子量でもあり微生物による分解を確認した報告は少ない。アスファルトは炭化水素等の化合物の複雑な混合物であり、キャラクタリゼーションとして溶剤を用いて、数種類の分画に分類される。この分画組成より評価する方法が用いられている。本研究では微生物の生息確認試験を行うことを前提にして、微生物の生息しやすい分画成分を調査することを目的とした。ここでは、飯島の方法 [5] 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を行うことにした。

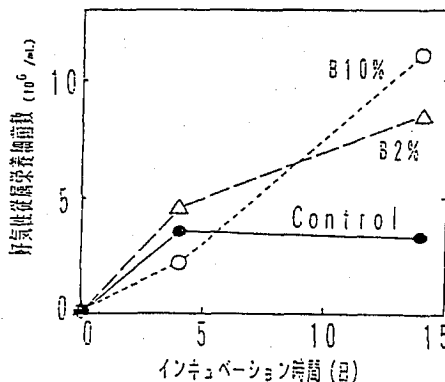


図 8 ベントナイトの増殖影響調査結果

4.1 アスファルトの分画方法

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。本研究で用いたアスファルトは道路工用のもので針入度が 80~100、室温で表面に指紋がつく程柔らかいものである。また、ストレートアスファルト、ブローンアスファルトの区別はされていない。そこで以下の分画操作により、その化学的組成を調べるとともに、微生物の栄養源となりえる成分の検出を行った。

試料は室温では柔らかく粉砕できないので、-25°C で凍凍後、5°C 以下の低温室で粉砕して用いた。分画には前述のように、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、レジジン、アスファルテン分と基本成分に分けることができる飯島の方法で行った、吸着剤にはシリカゲルを活性化して用いた。粉砕した 1g のアスファルト粉末を n-ペンタンに溶解し、この懸濁液を 1500rpm、30 分間遠心分離した。沈殿物は風乾し、恒量としたものをアスファルテン分とし、上澄み液はクロマト分離した。カラムは Merck 社製のシリカゲル Kieselgel 60 (30~70 mesh、粒径 0.2~0.5 mm) を用いた。溶離液の溶媒により、n-ペンタン分画、ベンゼン分画、メタノール分画とした。分画の様子を図 10 に示した。

4.2 分画の結果

各々の溶剤で得られた分画をロータリーエバポレータ

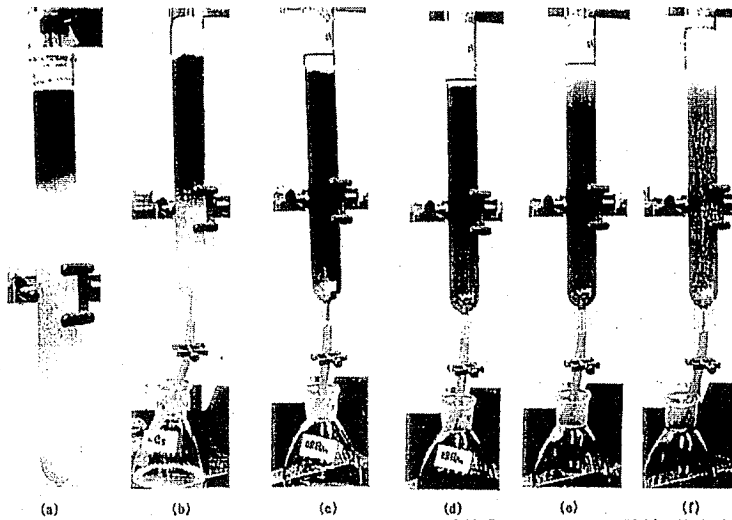


図 10 カラムクロマトグラフィーによるアスファルトの *n*-ペンタン可溶性成分の分画; (a) 試料の注入時、(b) *n*-ペンタン流下終了時、(c) ベンゼン流下開始時、(d) メタノール、(e) メタノール流下開始時

ーで濃縮し、試験管内で乾固させた。それぞれの分画の重量を測定した結果が表 8 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分画である。本実験の結果、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ことが分かった。また、微生物の栄養源として、成分の多い芳香族成分について検討することにした。

表 8 使用したアスファルトの成分 (%)

| <i>n</i> -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) | <i>n</i> -ペンタン不溶分画 (アスファルテン) |
|----------------------------|-----------------|------------------|---------------------------------|
| 19.2 | 57.6 | 1.6 | 18.6 |

5. アスファルト分画中での微生物培養実験

アスファルトの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。微生物の選定に

は分画成分を栄養源として利用しそうな菌種を用いることにより、安全上保守的に評価することを期待した。以下に用いた微生物を示す。これら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。

Pseudomonas aeruginosa JI104

Pseudomonas putida F1

Pseudomonas pseudoalkaligenes KF707

Pseudomonas mendocina G4

Pseudomonas cepacia KR1

5.1 培養方法

これらの菌種はいずれも通常 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 200 μ l 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 OD₆₀₀ (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。分画試料はそれぞれの分画の濃度が 125mg/ml となるように希釈して、アルミ箔上に滴下してそのまま風乾し、培地の入ったネジ蓋付き試験管に投入した。

| | | |
|-------|---------------|-------|
| LB 培地 | Bacto Trypton | 10g/l |
| | Yeast Extract | 5g/l |
| | NaCl | 10g/l |
| | pH | 7.5 |

| | | |
|--------|---|----------|
| M56 培地 | Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O | 8.2g/ℓ |
| | KH ₂ PO ₄ | 2.7g/ℓ |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1.0g/ℓ |
| | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.1g/ℓ |
| | FeSO ₄ | 0.25mg/ℓ |
| | Ca(NO ₃) ₂ | 5mg/ℓ |
| | pH | 7.2 |

5.2 結果及び考察

OD600 の測定結果を表 9 に示す。上段は培養開始後 5 時間経過後の OD600、下段が 14 日後の OD600 である。14 日間ですべての株で OD600 が増加した分画は *n*-ペンタン分画である。

表 9 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 (OD600)

| 菌種 | <i>n</i> - ペンタン | ベンゼン | メタノール | アスファ ルテン |
|---|--------------------|--------|--------|-------------|
| <i>P.aeruginosa</i> 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 |
| <i>P.putida</i> F1 | 0.283 | 0.313 | 0.270 | 0.225 |
| | 0.302 | 0.278 | 0.187 | 0.138 |
| | 0.019 | -0.035 | -0.083 | -0.087 |
| <i>P.mendocina</i> 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 |
| <i>P.cepacia</i> 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 |
| <i>P.pseudo- alcaligenes</i> KF707 | 0.210 | 0.202 | 0.174 | 0.040 |
| | 0.263 | 0.203 | 0.185 | 0.183 |
| | 0.053 | 0.001 | 0.011 | 0.148 |

上段；実験開始時 OD

中段；14 日後 OD

下段；増殖量, $\Delta OD = 14$ 日後 OD - 実験開始時 OD

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 OD600 が増加している。アスファルテン分画のデータは、培養開始時の OD600 がばらついている。これは、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からと考えられる。しかし、植菌時のピベッティングによりフロック破壊を行っているにもかかわらずばらつきが見られるので、F1

を除きいずれも極めて低くなっているのは、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も推定できる。その培養開始時の OD600 の低下を考慮してアスファルテン分画の培養終了後の OD600 を他の分画の培養開始時の OD600 を比較しても JI104、KR1、そして G4 では、OD600 は増加しており、菌の増殖がみられたと結論できる。

アスファルテン分画では培養後の試料では他の分画とは異なり、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分画での OD600 の増加はアスファルテン分画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水での洗浄は行われていないと思われるので、蒸留の過程で原油に元から含まれていた水溶性の物質がアスファルトに濃縮し、アスファルテン分画に含まれた可能性がある。この点について更に検討する必要がある。

菌株の方から見ると KR1、G4 のすべての分画で OD600 の増加が見られる。また 14 日後の試料は、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ことはなかった。*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 日も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 OD600 の低下はそのようなものと考えられる。

こ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、以下のように評価できる。

1. *n*-ペンタン分画 (飽和炭化水素分) は、ここで用いた菌株の飽和炭化水素に対する分解能は明らかではないものの、細菌の炭素源になり易い。
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。すべ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対しては特異性がある。

3. 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アスファルテン分画で、いくつかの菌株が増殖したのは、原油の中には元から存在していた微量の水溶性の物質が、蒸留中に揮散、分解を受けずに釜残のアスファルト中に濃縮され、これを菌が炭素源にして増殖したからか、既知の炭化水素分解の経路ではなく、別の酵素系で分解されたかの可能性がある。

今後詳細に検討する必要があるが、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から、(1)の可能性の方が高いと考えられる。以上のようにアスファルトの成分によっては微生物の増殖の可能性があることが明らかとなった。

6. 圧縮ベントナイトへの微生物透過実験

図 11 に SRB (*Desulfovibrio*) のアクリジンオレンジ染色後の蛍光顕微鏡写真を示した。また、走査型電子顕微鏡 (SEM) 写真を図 12 に示す。*Desulfovibrio* は径 0.5~1.0 μm 、長さ 3~5 μm 、1本の鞭毛を持つと言われているが [7]、写真はほぼそれに近い形態を示していた。これが、どの程度の小さな隙間まで入りこめるかは不明であるが、一般に 0.2 μm のフィルターで除菌ができることから、0.2 μm 以上の隙間が必要と推定できる。圧縮ベントナイトにこれらの微生物が通過可能な空隙があるのか疑問ののこりフィルトレーション効果が期待されるが、圧密ベントナイトにおける微生物の挙動については未だ不明である。そこで、まず初めに圧密ベントナイト (クニゲル VI) 緩衝材における微生物の透過の有無を掴むための測定方法の検討を行った。微生物は、実験雰囲気左右されないよう大腸菌を用いた。

6.1 実験方法

細菌の透過の検討にはまずベントナイト中の微生物群による測定の混乱を防ぐ必要がある。そこで、材料、器具類の滅菌および操作処理上の雑菌の混入に対して注意を払い実験を行った。

6.1.1 供試菌と培養液

細菌の中で比較的小型であり、試験期間が長期にわたる事が予想される事より、ベントナイト中の嫌気的条件下でもまた滴下時の好気的条件下でも菌の増殖が可能な事を考慮して大腸菌を選定した。大腸菌の培養は色素 (エオシン) や pH 指示薬 (BTB) を含む EMB または LB 培

地、pH 7.2 を用いて 35°C で行った。

6.1.2 試験装置と菌の投与方法

ベントナイトはクニゲル VI を用いて、粉を浸透させながら紫外線を照射してさらに二度、70°C、1時間の加熱による殺菌を行った。この材料を成型機にて圧力 230 Kg/cm^2 にて圧密 1.8 g/cm^3 、径 50 mm×25 mmH のベントナイト円筒型成型体を作成した。図 13 に試験装置の概略図を示す。同装置は恒温室内で上、下蓋付の亚克力製の格納容器にベントナイト成型体と焼成アルミナフィルタ (孔径) を無菌的に設置した。培養菌液は上部よりメッシュ付きチューブを通して滴下させ、液量を調整させた。菌及び培養液の透過の有無は培養液の色素により確認した。また試験後の試験体の容器からの抜きだし方法と試験体中の菌の測定法についての検討も行った。投与菌の生息 (生育) 菌数の確認は試験体を無菌的に切りだして上記寒天培地、一般生菌数計測用寒天培地によるコロニー計測法によるものと、切り出したベントナイト切片を直接寒天培地で培養する方法も検討した。

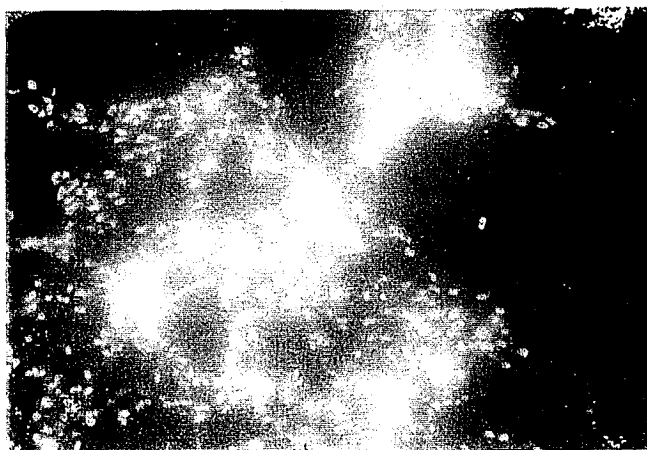
6.2 結果及び考察

ベントナイトの殺菌については、ベントナイト粉体を紫外線の照射と二度の 70°C 加熱を行い、微生物群を大幅に殺菌する事ができ、投与菌のみを計測することが可能になった。しかし孢子菌などは、この条件でも残存する可能性があるために、投与する供試菌には抗生物質耐性菌を用いて雑菌の生育を抑えて計測の信頼性を更に高める方法も良いであろうと思われる。

培養液は、圧密ベントナイトへの微生物の透過試験開始後、液面先端が 20 日前後で成型体の底部に達した。この際、指示薬により浸透位置 (特にエオシンによる赤色) を鮮明にさせることができ、また試験容器に試験体を設置する際のベントナイト損傷、不具合に対する判断材料の一つにもなった。

実験装置は、培養液透過によるベントナイトの膨潤を焼結アルミナで十分に耐圧を担保できた。また、菌の接種では、培養液の温度を 28°C で、増殖期の菌を接種直前に新しい培地で二倍に希釈した菌液を用いて、穏やかに増殖させながら繰り返し供給することにより実験期間中の菌の生息を維持させた。試験終了後の供給菌液の残存菌数の例を図 14 に示した。実験終了後の試料の取り出しは、無菌的に行うために殺菌したシリコン栓を上部から押し出し、試料を装置の下部から切り出し、雑菌の汚染を防いだ。

ベントナイト中の透過菌の測定は、切り出し片、0.2 g



5 μ m

図 11 SRB の蛍光顕微鏡写真



図 12 SRB の SEM 写真

を生理的食塩水で懸濁させ、10倍希釈法でコロニーを計測した。ただし、LB培地では、希釈率が低いときにはベントナイト粒子が菌のコロニーと区別しにくくなった。寒天培地の選択としてはBTB(24 mg/l)を加えた一般生菌数計測用培地が比較的良好であった。また、ベントナイト試料そのものを薄切りし、その切片を寒天培地上で直接培養したところ、寒天中で試料の再膨潤が起り寒天培地に亀裂が生じ菌を増殖させコロニーを作らせることが困難であった。

以上のように本装置を用いて、微生物の透過実験が可

能である事が分かった。今後、菌種を検討しながら透過実験を行うこととしたい。

7. まとめ

ベントナイト中での有機物量について次のことが分かった。月布産ベントナイト(クニゲルV1、クニミネ工業(株))を試料とし、乾燥ベントナイト中の全有機炭素量(TOC)及びフミン酸、フルボ酸の含有量を測定した。その結果、吸引管を用いたTOC分析では、乾燥ベントナイト1gに対して有機炭素量0.34 wt%、また、CNコー

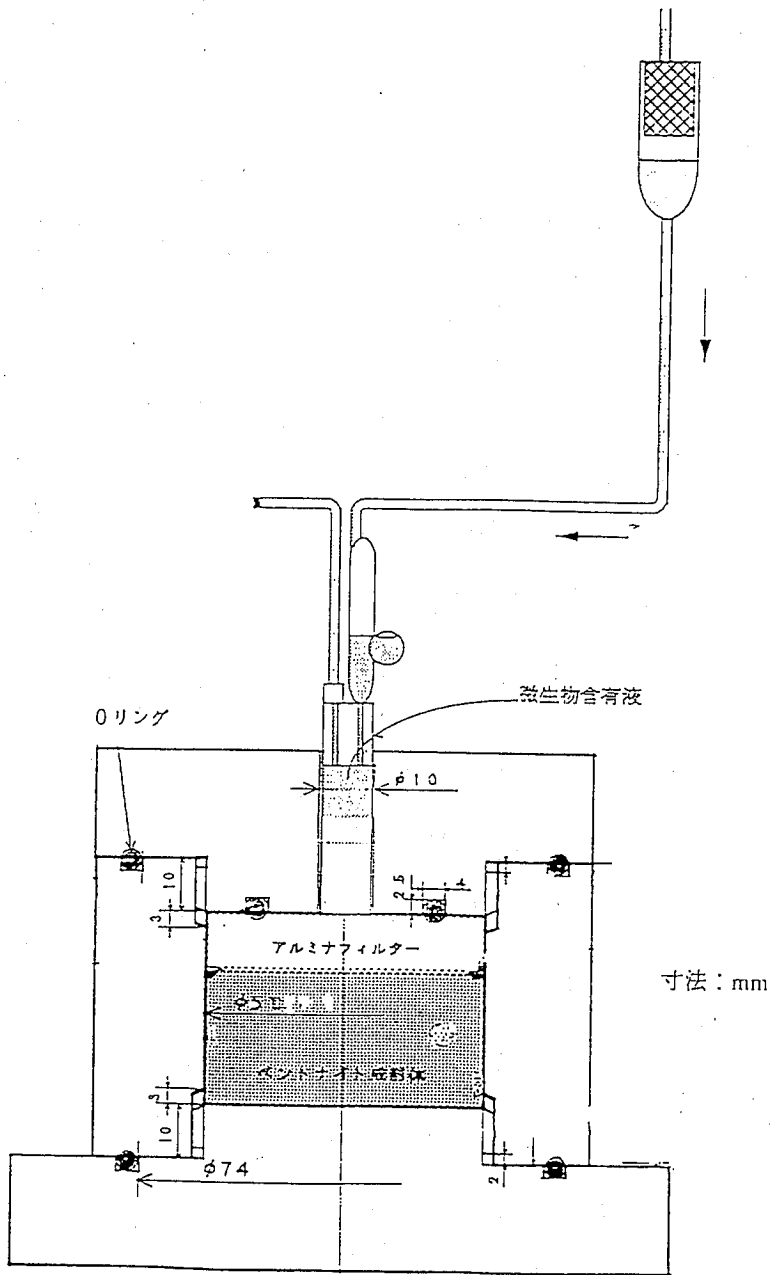


図 13 圧縮ベントナイトの微生物透過試験概要図

ダによる分析でも 0.31 wt %であったので、月布産ベントナイト中の TOC は 0.30~0.35 wt %であることが分かった。また、本測定の前腐植抽出液の分析の結果、

フミン酸量は 0.5~10 ppm、フルボ酸量は 60~84 ppm であった。これらの結果よりベントナイト中には有機炭素が有意に存在し、微生物の栄養源となりえる可能性が

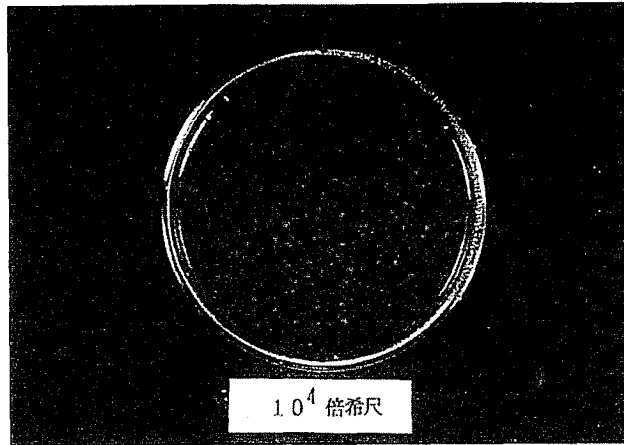


図 14 試験終了後の投与菌液の残存菌数の例

あることが分かった。一方、微生物の増殖の実験から、ベントナイトの製品化の工程で乾燥工程があるにもかかわらず、ベントナイト乾燥重量 1g あたりで最大値として、約 7×10^3 の好気性細菌、約 2×10^2 の嫌気性細菌、および約 2×10^2 の硫酸塩還元細菌が検出された。乾燥工程前の試料では、それぞれ約 1×10^7 、 5×10^3 、 4×10^2 であった。これはベントナイト自体微生物を含有する事が分かり、処分場環境へ地上の微生物が持ち込まれる可能性が示された。また、地下水中の微生物とベントナイトを反応させたところ、ベントナイトを加えた場合 2~3 倍の菌数となった。ベントナイトを滅菌しても同様な増加が観測されたので、ベントナイトは本実験条件下で地下水中の微生物の増殖を促進した事が分かった。ベントナイトは、従来その高い pH 故に微生物にとって抑制的とも考えられてきた。確かにベントナイトの存在下の pH(約 9) は pH だけを考えれば微生物を抑える方向に働く。しかし、アルカリ領域でも微生物の生存と活動は可能であり、さらにベントナイトは微生物を持ち込んだり、微生物の増殖を促進する場合もある。処分場環境を評価する上でベントナイトと微生物の関係のより詳細な解明が重要な研究課題である。

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った。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。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。

微生物の易分解成分は上記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 菌株を加えて好氣的に 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。

これらの結果は、アスファルト固化体の安定性の観点からも重要な結果であり、以下の検討が必要と思われる。

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の関連性を系統的に調べる。
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、それらと深部地層環境中で棲息している可能性のある微生物、地表から持ち込む可能性のある微生物とを組み合わせた生息実験から定量的評価を行う。

本実験結果よりアスファルトの成分によっては微生物の増殖の可能性があることが分かった。今回の培養実験は、最も簡便な方法と比較的容易に入手し易い材料、そして分解が期待された菌種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と考えている。

また、圧密ベントナイト中での微生物の透過性に関する知見を得る事を目的として、実験装置を制作した。微生物には好氣的、嫌氣的両環境で生息可能な大腸菌を用

い、実験装置の有効性を確認した。今後、本装置を用いてベントナイト及び砂共存下での微生物の移行実験を行い、空隙と微生物の移行挙動について知見を得たいと考えている。

以上のように、微生物影響調査を対象にした放射性廃棄物処分研究への方法論に糸口を求めるため、原位置に微生物が持ち込まれた際の現象を対象にして、微生物の生息、移動の可能性について検討を行った。本報告で述べた実験装置及び手法を元にして、さらに基礎データを取得することにより、人工バリア、天然バリアにおける微生物の挙動、生態系に関する手がかりを得られるものと期待される。

8. 謝辞

有機物の分析に関しては、パリノ・サーヴェイ(株)土壌研究所のご協力をいただいたので感謝いたします。

9. 参考文献

- [1] 石川博久 他: PNC TN8410 92-139 (1992).
- [2] 熊田恭一: “土壌有機物の化学” 第2版、学会出版センター (1992).
- [3] Gehman Jr. H. M.: *Geochim. Cosmochim. Acta*, **26**, 885 (1962).
- [4] 横尾正和 他: 粘土科学、**30**, 109 (1990).
- [5] 米林甲陽: ペトロジスト、**32**, 138 (1988).
- [6] 飯島博: 石油誌、**13**, 606 (1970).
- [7] Krieg, N. R. and Holt, J. G.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, **1**, p663-679, Williams & Wilkins (1984).