

脱窒細菌のアルカリ性及び  
還元環境下での耐性に関する実験的研究  
(試験報告)

2000年7月

核燃料サイクル開発機構  
東海事業所

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)  
2000

脱窒細菌のアルカリ性及び還元環境下での耐性に関する実験的研究  
(試験報告)

嶺 達也\* 三原 守弘\* 大井 貴夫\*

要旨

TRU 廃棄物の処分方法として、地層処分施設へ埋設する方法が検討されている。使用済核燃料の再処理施設より発生する TRU 廃棄物である低レベルプロセス濃縮廃液の固化体には、多量の硝酸塩が含まれている。硝酸塩は微生物の脱窒作用により、最終的に窒素まで還元される可能性がある。

このため、嫌気条件下での微生物による硝酸塩の脱窒にともなって発生する窒素が人工バリアの破壊や人工バリア中の汚染水の押し出しといった物理的な影響を与える可能性があることが指摘されている。

したがって、脱窒能を有する微生物（以下、脱窒細菌と記す）が処分システムに与える影響は重要であると考えられる。

本研究では、高アルカリ、還元性となる処分環境に対する脱窒細菌の耐性を調査することを目的として、脱窒細菌として *Pseudomonas denitrificans* を使用し、pH 及び Eh が脱窒細菌の活性に与える影響を把握するための実験的研究を実施した。

その結果、pH が脱窒細菌の活性に与える影響については、本研究で使用した脱窒細菌では、pH が中性より高くなるにつれて低下し、pH=9.5 以上では定量下限値以下となることが示された。Eh が脱窒細菌の活性に与える影響については、把握することはできなかったが、試験条件が還元環境に制御されていれば、脱窒細菌は活性を持つことが明らかとなった。いずれにしても、pH が 12.5 程度の高アルカリとなる処分環境条件においては、本研究で使用した脱窒細菌の活性は Eh にかかわらず、中性領域での活性と比較すると小さくなると考えられた。

---

\*東海事業所 環境保全・研究開発センター 処分研究部 システム解析 Gr.

Experimental investigation of activities and tolerance of denitrifying bacteria under  
alkaline and reducing condition

Tatsuya Mine\* Morihiro Mihara\* Takao Ooi\*

Abstract

In the geological disposal system of TRU wastes, nitrogen generation by denitrifying bacteria could provide significant impact on the assessment of this system, because nitrate contained in process concentrated liquid waste might be electron acceptor for denitrifying bacteria.

In this study, the activities and tolerance of denitrifying bacteria under disposal condition were investigated. *Pseudomonas denitrificans* as denitrifying bacteria was used. The results showed that *Pseudomonas denitrificans* had activity under reducing condition, but under high pH condition (pH>9.5), the activity of *Pseudomonas denitrificans* was not detected. It is possible that the activity of *Pseudomonas denitrificans* would be low under disposal condition.

---

\* Repository System Analysis Group, Waste Isolation Research Division, Waste Management and Fuel Cycle Research Center, Tokai Works

目次

1	はじめに	1
2	脱窒活性に対する pH の影響把握試験	2
2.1	試験の概要	2
2.1.1	脱窒細菌の選定	2
2.1.2	培養液の選定	3
2.1.3	脱窒細菌の増殖状況の調査	3
2.1.4	脱窒細菌の活性測定	4
2.2	試験結果	6
2.2.1	増殖状況の調査結果	6
2.2.2	脱窒活性の測定結果	7
3	脱窒活性に対する E h の影響把握試験	7
3.1	試験の概要	7
3.2	試験結果	8
3.2.1	増殖状況の調査結果	8
3.2.2	脱窒活性の測定結果	9
4	おわりに	11
	謝辞	12
	参考文献	13

## 図目次

図1	装置の概略図（pHの影響把握試験）	15
図2	微生物の増殖曲線	16
図3	脱窒活性の測定法	17
図4	pH影響把握試験における 培養液の菌体濁度、pH及びEhの経時変化（1）	18
図5	pH影響把握試験における 培養液の菌体濁度、pH及びEhの経時変化（2）	19
図6	pHが脱窒細菌の増殖に与える影響	20
図7	装置の概略図（Ehの影響把握試験）	21
図8	Eh影響把握試験における 培養液の菌体濁度、pH及びEhの経時変化（1）	22
図9	Eh影響把握試験における 培養液の菌体濁度、pH及びEhの経時変化（2）	23
図10	Ehが脱窒細菌の増殖に与える影響	24

## 表目次

表1	脱窒能を有する代表的な細菌属	25
表2	培養液の組成	26
表3	脱窒活性測定液の組成	27
表4	脱窒活性の測定結果（pHの影響把握試験）	28
表5	脱窒活性の測定結果（Ehの影響把握試験）	29

## 1 はじめに

使用済核燃料の再処理施設や MOX 燃料加工施設より発生する超ウラン (TRU) 核種を含む放射性廃棄物のうち、全  $\alpha$  核種の放射能濃度が区分目安値 (約 1GBq/ton) を超え、浅地中以外の処分方法が適切と考えられている放射性廃棄物は TRU 廃棄物と呼ばれている (原子力委員会、1991)。TRU 廃棄物には、再処理施設より発生するハル・エンドピースなどの金属、多量の硝酸塩を含む低レベルプロセス濃縮廃液などの廃棄物が含まれる。この TRU 廃棄物の処分方法として、地下数百メートルに設置する地層処分施設へ埋設する方法が検討されている。このような地下深部では、地下水の酸化還元電位 (Eh) が  $-100 \sim -400$  mV 程度の還元環境となることが予想されている (Pedersen et al, 1995)。また、人工バリア材として、セメント系材料の使用が想定されているため、セメント系材料の地下水への溶出により、処分施設周辺の地球化学環境は高アルカリとなると予想されている (Atkinson et al., 1988)。

このような処分を想定した場合、処分システム内外での微生物活動が処分システムの性能に影響を及ぼすと考えられている (去来川ら、1996)。緩衝材としての使用が想定されている珪砂混合ベントナイトの乾燥密度を  $1200 \text{ kg/m}^3$  以上とし、ベントナイト混合率を 50wt% 以上に設定した場合、 $0.5 \mu\text{m}$  程度の大きさの微生物ならば、緩衝材のフィルトレーション効果により、処分システム内部へ侵入できなくなり、処分システム内部での微生物の影響が有意にならない可能性があると考えられる (嶺ら、1999)。しかし、地下深部に生息する微生物が貧栄養状態であった場合には、その体積が数千分の一にまで小さくなってしまい (フレドリクソンら、1997)、容易に処分システム内部に侵入してしまうと予想されるため、処分システム内部での微生物の影響は有意になると考えられる。微生物活動が処分システムに与える影響の一つとして、既存の研究では、嫌気条件での微生物による硝酸塩の脱窒にともなって発生する窒素が人工バリアの破壊や人工バリア中の汚染水の押し出しといった物理的な影響を与える可能性があること (去来川ら、1996 ; Pedersen et al, 1995) を指摘している。

したがって、脱窒能を有する微生物 (以下、脱窒細菌と記す。) が処分システムに与える影響は重要であると考えられる。しかしながら、高アルカリで還元性になると想定される処分環境における脱窒細菌の耐性については明らかではない。

本研究では、処分環境における脱窒細菌の耐性を調査することを目的として、pH 及び Eh が脱窒細菌の活性に与える影響を把握するための実験的研究を実施した。具体的には、まず最初に pH をパラメータとしたときの脱窒細菌の増殖状況の調査及び脱窒活性の測定を行った。さらに Eh を還元剤などを使用して調製し、変動させたときの脱窒細菌の増殖状況の調査及び脱窒活性の測定を行った。

## 2 脱窒活性に対する pH の影響把握試験

ここでは、培養液の pH をパラメータとし (pH=6.5、7.1、7.5、8.5、8.8、9.0、9.5、10.0)、まず、各々の pH における培養液中の脱窒細菌の増殖状況を調査した。その後、任意の増殖のステージにおいて培養液をサンプリングして別途脱窒細菌の活性を測定するための試験を実施し、pH が脱窒細菌の増殖及び活性に与える影響を把握することとした。

### 2. 1 試験の概要

#### 2. 1. 1 脱窒細菌の選定

脱窒とは、微生物の好氣的呼吸によって酸素が消費されつくした嫌気条件において、その微生物が硝酸塩を終末電子受容体として用いることにより、嫌氣的呼吸を行い、硝酸塩を亜硝酸塩に還元し、最終的に亜酸化窒素を経て窒素まで還元する過程のことである (Stanier et al., 1989)。このことは、脱窒細菌は好気条件、嫌気条件のいずれにおいても増殖が可能であり、酸素があれば好氣的呼吸を行い、酸素が無くなれば硝酸塩を利用して嫌氣的呼吸することを意味する。

脱窒細菌は多種多様で多くの種類が知られている (Stanier et al., 1989)。表 1 に脱窒能を有する代表的な細菌属を示す。このうち、*Pseudomonas* 属については、土壌や水域において最も普遍的に存在するものとして知られている (Knowles, 1982)。*Pseudomonas* 属に属する細菌としては、主に *Pseudomonas. aerogenes*、*Pseudomonas. aureofaciens*、*Pseudomonas. caryophylli*、*Pseudomonas. chlororaphis*、*Pseudomonas. denitrificans* などが挙げられている (Knowles, 1982)。

アメリカでは脱窒細菌の生態に関する広範囲にわたる調査が実施されている (Gamble, 1977)。この調査から、8 カ国から採取された、脱窒が起こりやすいと思われる 19 箇所の土壌、3 箇所の淡水湖の底泥及び畜産廃棄物から 146



株の脱窒細菌が単離され、最も主要な属は、*Pseudomonas* 属であることが示された。

また、*Pseudomonas* 属の細菌は石油系炭化水素を分解すること (Evans,1977)、アスファルトを劣化させやすいこと (Wolf et al., 1991) が報告されている。

以上を考慮して、本研究では土壌や水域において普遍的に存在し、アスファルト劣化に関与する *Pseudomonas* 属の脱窒細菌を選定することとし、入手が可能であった *Pseudomonas denitrificans* IFO No.13302 (以下、*P.denitrificans* と記す。(財)発酵研究所より分譲された。)を使用することとした。

### 2. 1. 2 培養液の選定

有機物主体の培養液 (培養液 a)、無機物主体の培養液 (培養液 b) 及びこれらの混合培養液 (培養液 c) を準備し、*P.denitrificans* の生育が見られる培養液を選択することとした。この3種類の培養液組成を表2に示す。

3種類の培養液 (各 500ml) に *P.denitrificans* を含む菌液 10ml を添加し、数時間後の生育状況 (菌体濁度) を吸光度法 (扇元, 1994) にて調査した結果、培養液 c での菌体濁度が比較的高かったため、生育が良好であると判断し、培養液 c を選定することとした。後述するが、*P.denitrificans* の増殖状況を調査するために、この培養液をファーメンタに添加した。

また、後述する亜酸化窒素の測定においては、培養液 c から微生物の増殖に必要であった塩化アンモニウムを除き、亜酸化窒素に還元しやすい亜硝酸塩を添加したものを用いた (表 3 参照)。この溶液を脱窒活性測定液とした。後述するが、*P.denitrificans* の脱窒活性を測定するために、この脱窒活性測定液をバキュームバイアル瓶に添加した。

### 2. 1. 3 脱窒細菌の増殖状況の調査

微生物が増殖する状況を把握する手法として、全菌数法、菌体重量法、菌体容量法、菌体成分法、吸光度法、コールターカウンター法が挙げられる (扇元, 1994)。本試験では、これらの手法のうち、最も簡単で、自動化できる吸光度法を採用し、*P.denitrificans* を含む培養液中の菌体濁度を測定することで、*P.denitrificans* の増殖状況を確認することとした。

なお、図 1 に試験装置の概要を示すが、ファーメンタ中の培養液の菌体濁度は任意の時間でモニタリングできるようにした。また、嫌気条件が維持できる

ように不活性ガス（ヘリウム）を通気できるようにした。

#### 2. 1. 4 脱窒細菌の活性測定

微生物による脱窒の過程では硝酸塩などが還元され、亜酸化窒素 ( $N_2O$ ) を経て窒素まで還元される。このため、脱窒活性を調査するためには、窒素の発生量を測定すればよい。しかしながら、窒素を分析する場合には、分析時に空気中の窒素が混入するなどの影響が考えられ、感度が悪くなる。そこで、アセチレン ( $C_2H_2$ ) が亜酸化窒素から窒素への還元反応を阻害する性質を利用した手法（土壤微生物研究会、1992）を参考にして、アセチレン添加条件での亜酸化窒素の発生量を測定し、その発生速度を算出することとした。

脱窒活性を測定する場合、微生物の菌体重量に対する亜酸化窒素発生速度を把握しておけば、設定した pH ごとに得られる脱窒活性を直接比較することが可能となる。しかしながら、菌体重量の測定は、菌体重量が微量であると予想できるため困難である。ただし、微生物の増殖がバランスのとれた状況（後述する対数期）にある場合、微生物の菌体重量の増加とともに細胞数が比例的に増加し、それにともなって細胞中のタンパク質、RNA、DNA、細胞内含水量なども比例的に増加する（Stanier et al., 1989）。このことは、菌体重量を測定しなくても、あらかじめ菌体重量と細胞中のタンパク質量などとの相関関係が明らかであれば、細胞中のタンパク質量などから菌体重量を推定できることを意味する。そこで、本研究では、培養液中の菌体重量を測定するかわりにタンパク質の量を測定し、単位タンパク質量あたりの亜酸化窒素の発生速度を脱窒細菌の活性と定義することとした。各々の pH において、このように脱窒活性を算出すれば、相対的にその活性を比較することができる。

ただし、微生物は培養時間の経過とともに、その細胞数が増加し、誘導期、対数期、定常期、減少期に区分される増殖曲線（図 2 参照）を示すことが知られている（扇元、1994；Stanier et al., 1989）。それぞれの区分によって微生物の活性は異なり、最も活性が高くなる区分は対数期である（扇元、1994）。このため、脱窒活性は *P.denitrificans* の増殖が対数期となった時期に測定することとした。なお、比較のため、定常期となった時期での脱窒活性も測定した。

以下に *P.denitrificans* の脱窒活性の測定法（増殖状況の調査方法も含む）の詳細を示す（図 3 参照）。

① *P.denitrificans* を含む菌液 10ml と培養液 500ml を図 1 のファーメンタに

混入し、封入した。なお、培養液は水酸化ナトリウムあるいは塩酸を使用し、pHを6.5、7.1、7.5、8.5、8.8、9.0、9.5、10.0に設定した。

- ②不活性ガス（ヘリウム）を通気させながら、任意の期間ごとにファーメンタ中の菌体濁度、pH、Ehを測定し、*P.denitrificans*の増殖状況を調査した。pHに変化がある場合には、水酸化ナトリウムあるいは塩酸を添加し、任意のpHに保たれるように制御した。このときの培養液の温度は30℃とした。
- ③菌体濁度の急激な上昇が見られたとき、*P.denitrificans*の増殖が対数期となったと判断し、ファーメンタから培養液をサンプリングした。ただし、菌体濁度の大きさによらず、サンプリング量を一定とした場合、菌体濁度が低いサンプルに含まれる菌体重量が少なくなり、活性を測定するには不十分な量となる可能性がある。ここでは、ファーメンタ中の菌体濁度が高ければ少なめに、菌体濁度が低ければ多めにサンプリングした。このように菌体濁度の大きさによってサンプリング量を変えることにより、菌体濁度が低い培養液からサンプリングされる菌体重量を増やすことができる。サンプリング後は固相（菌体）と液相（上澄）に遠心分離した。また、濁度が一定となったときを*P.denitrificans*の増殖が定常期であると判断し、対数期の場合と同様の操作を行った。
- ④菌体に設定したpHごとに組成が異なる緩衝液（表3参照）を添加し、この懸濁液中のタンパク質の量をLowry法（Lowry, O.H. et al., 1951）に準じて分析した（子牛アルブミンを標準検体として溶液中のタンパク質量に対する溶液の濁度を測定し、検量線を作成した。測定した懸濁液の濁度と検量線から、懸濁液に含まれるタンパク質の量を算出した。）。なお、この緩衝液は脱窒活性測定液中では1/20に希釈されているため、滅菌蒸留水で1/20に希釈した緩衝液を菌体に添加した。
- ⑤上記操作と並行して、脱窒活性測定液を吸引脱気し、この測定液4.7mlをバキュームバイアル瓶（容量12.5ml）に分注した。なお、本試験ではpHをパラメータとしたため、表3に示すように脱窒活性測定液に添加する緩衝液の組成を変え、脱窒活性測定液のpHを任意のpHに設定できるようにした。また、不活性ガス（アルゴン）によって、バイアル瓶のヘッドスペースの気相を置換し、ブチルゴム栓で密閉した。このような操作を実施することで、バイアル瓶内は嫌気条件に維持され、*P.denitrificans*は脱窒

をともなう嫌氣的呼吸を行うことができる。さらに、*P.denitrificans* による亜酸化窒素の窒素への還元を妨げるため、0.1atm でアセチレンを注入した。

⑥この測定液を含むバイアル瓶に④の懸濁液 0.3ml を添加し、30℃で振とうしながら、所定の時間（0、20、40、60 分）ごとにバイアル瓶のヘッドスペースから気相をサンプリングし、ガスクロマトグラフを用いて、亜酸化窒素発生量を測定した。得られた亜酸化窒素発生量からこの発生速度を算出した。なお、亜酸化窒素発生量は時間に対して比例関係にあったため、その傾きを最小二乗法により算出し、亜酸化窒素発生速度とした。

⑦得られたタンパク質の量及び亜酸化窒素発生速度から *P.denitrificans* の脱窒活性を算出した。

## 2. 2 試験結果

図 4 及び図 5 にファーマンタ中の培養液の菌体濁度、pH 及び Eh の経時変化を示す。また、図 6 に各 pH における菌体濁度の経時変化をまとめて示す。図 4 及び図 5 の矢印で示した時点で *P.denitrificans* の脱窒活性を測定するためのサンプリングを行った。pH=9.5、pH=10 の系では、菌体濁度の増加が全く見られていなかったため、活性がないものと判断し、活性を測定しなかった。なお、pH=10 の系の菌体濁度、pH 及び Eh の経時変化についての図は省略した。また、表 4 に脱窒活性の測定結果を示す。pH=8.5 の系では、予想に反して対数期が短かったため、対数期での活性は測定できなかった。

なお、すべての試験において、極力酸素を除外できるように試験を行ったため、*P.denitrificans* が嫌氣的呼吸を行い、脱窒能を強く示させる培養が行われたと判断できる。

### 2. 2. 1 増殖状況の調査結果

図 4 及び図 5 について、pH を 9.5 に調整した系を除くと、いずれの系においても、Eh は菌体濁度の増加にともなって急速に低下し、菌体濁度の変化が停滞すると Eh も一定となる傾向にあることが分かった。このときの Eh は pH によらず、-50mV 前後であった。

図 6 において、菌体濁度が最も増加していた系は pH=7.1 の系であった。この系よりアルカリ側の系では、pH が高くなるにつれ、菌体濁度の最大値が小さくなっていた。なお、pH=9.5 の系では、菌体濁度の増加は全く見られなかった。酸性側の pH=6.5 の系でも菌体濁度の最大値が pH=7.1 の系より小さく

なっていた。

このことから、本試験で使用した *P.denitrificans* は pH=9.0 以上では pH によってその増殖が阻害され、Eh が -50mV 程度のとき、pH=9.5 以上では増殖しないと考えられる。

## 2. 2. 2 脱窒活性の測定結果

表4において、対数期と定常期での *P.denitrificans* の脱窒活性を比較すると、いずれの pH においても定常期の脱窒活性は対数期の脱窒活性より小さくなっていることが分かった。pH=8.5 の系では、対数期の脱窒活性を測定していないが、対数期の脱窒活性は 185  $\mu\text{l/hr}\cdot\text{mg}$  タンパク質以上となると予想できる。

対数期での各 pH における *P.denitrificans* の脱窒活性を比較すると、pH=7.5 での脱窒活性が最も大きくなり、約 160  $\mu\text{l/hr}\cdot\text{mg}$  タンパク質となることが分かった。したがって、本試験で使用した脱窒細菌である *P.denitrificans* は中性での脱窒活性が高い微生物であったと考えられる。また、この系より pH が酸性側またはアルカリ側になるにつれ、脱窒活性が小さくなる傾向にあることが示され、pH=9.0 での脱窒活性は、pH=7.5 での活性の 1/10 以下となり、pH9.5 では *P.denitrificans* が増殖しなかったため、脱窒活性を測定できなかった。

以上より、pH=9.5 以上では *P.denitrificans* は脱窒活性を示さないと考えられる。

## 3 脱窒活性に対する Eh の影響把握試験

ここでは、培養液の Eh を還元剤などを使用して変動させ、pH をパラメータとした試験と同様に *P.denitrificans* の増殖状況の調査及び脱窒活性の測定を実施して Eh が *P.denitrificans* の増殖及び脱窒活性に与える影響を把握することとした。

### 3. 1 試験の概要

使用した微生物は pH をパラメータとした試験で使用した微生物と同様、*P.denitrificans* である。

なお、本試験での pH については、前述の pH をパラメータとした試験において、*P.denitrificans* の菌体濁度が pH=7.1 で最も大きくなった (図6参照) ことから、pH=7.1 で確実に *P.denitrificans* が増殖すると判断し、pH=7.1 で

試験を実施することとした。また、培養液としては pH をパラメータとした試験と同じものを使用した（表 2 の培養液 c 参照）。脱窒活性測定液については、pH をパラメータとした試験において pH=7.1 としたときの測定液を使用した（表 3 参照）。試験期間中はファーメンタ中の培養液の pH が 7.1 程度に保たれるように水酸化ナトリウムあるいは塩酸を添加した。

ファーメンタ中の培養液の Eh については、設定値を設けていないが、嫌気性微生物の予備還元で使用される還元剤であるチオグリコール酸、システイン、アスコルビン酸（Stanier et al., 1989）を単独で使用する、あるいは組み合わせること、または酸化剤として空気を培養液に直接通気させることで変動させた。また、試験期間中はこれらの還元剤などをファーメンタに供給し、ファーメンタ中の培養液の Eh を制御することとした。このため、還元剤あるいは空気をファーメンタに供給できるように装置の改良を行った（図 7 参照）。なお、ファーメンタに供給した還元剤は滅菌蒸留水 500ml に 10wt%の還元剤（チオグリコール酸、システイン、アスコルビン酸）を 8ml 添加したものである。

*P.denitrificans* の増殖状況の調査については、pH をパラメータとした試験では図 1 に示すように簡易濁度計を設置して菌体濁度を測定していた。しかしながら、本試験では簡易濁度計の測定値が不安定であったため、任意の期間にファーメンタから培養液をサンプリングして菌体濁度を測定することとした。脱窒活性測定については、pH をパラメータとした試験での操作と同様の操作を行った。試験ケースは 5 ケースである。

### 3. 2 試験結果

図 8 及び図 9 にファーメンタ中の菌体濁度、pH 及び Eh の経時変化を示す。図中の矢印で示した時点で *P.denitrificans* の活性を調査するためのサンプリングを行った。図 10 に各 Eh における菌体濁度の経時変化をまとめて示す。また、表 5 に脱窒活性の測定結果を示す。なお、図 10 及び表 5 に、pH をパラメータとした試験において pH を 7.1 に設定したときの結果（Eh の制御は行っていない）を合わせて示す。

#### 3. 2. 1 増殖状況の調査結果

図 8 及び図 9 において、ファーメンタ中の Eh は空気を通気させた (a) の系で 350~220mV、チオグリコール酸と空気通気を組み合わせた (b) の系で 30~-40mV、アスコルビン酸とチオグリコール酸を組み合わせた (c) の系で 20~-70mV、チオグリコール酸とシステインを組み合わせた (d) の系で-100~

-150mV、システインのみの (e) の系で-100~-150mV となった。しかしながら、いずれの系においても対数期（菌体濁度が急激に上昇している期間）では Eh が不安定であり、定常期では比較的 Eh が安定していた。pH については、いずれの系においても 7 程度に制御されていた。このため、Eh が *P.denitrificans* の脱窒活性に与える影響を評価する場合には、Eh が比較的安定している定常期での活性を比較することとした。

図 10 において、ファーメンタ中の培養液の菌体濁度が比較的高くなった系は (a) の系 (Eh=350~220mV)、(b) の系 (Eh=30~-40mV) 及び Eh を制御していない系であった。この系より Eh が低い系では、Eh が低くなるにつれ、菌体濁度の最大値が小さくなっていった。ただし、互いに異なる還元剤を使用した (d) の系（チオグリコール酸とシステインを使用。Eh=-100~-150mV）と (e) の系（システインのみを使用。Eh=-100~-150mV）では、Eh が同等であるにもかかわらず、菌体濁度が異なっていた。このことから、ファーメンタに添加した還元剤が *P.denitrificans* の増殖を阻害している可能性があると考えられる。

### 3. 2. 2 脱窒活性の測定結果

上述したように、いずれの系においても対数期では Eh が不安定であったため、ここでは、Eh が安定している定常期で得られた脱窒活性を対象として、Eh が脱窒活性に与える影響を調査する。なお、表 5 において、対数期と定常期での脱窒活性を比較すると、いずれの系においても対数期での脱窒活性が大きくなっていることが分かった。この傾向は pH をパラメータとした試験での傾向とほぼ一致していた。

表 5 において、各系での定常期の脱窒活性を見ると、Eh を制御していない系での脱窒活性が最も大きくなり、約 66  $\mu\text{l/hr}\cdot\text{mg}$  タンパク質となることが分かった。(a) の系については、タンパク質量が他の系とほぼ同等で、菌体重量もほぼ同等と推定できるにもかかわらず、亜酸化窒素の発生量は定量下限値以下で、脱窒活性を算出することができなかった。(b) の系については、(a) の系よりは脱窒活性が大きくなったが、(e) を除くその他の系と比較して脱窒活性は小さくなった。(e) の系については、(d) の系と同程度の Eh で培養した *P.denitrificans* を使用したにもかかわらず、(d) の系より脱窒活性が小さくなっていった。(a) の系は、ファーメンタ中において培養液に空気を通気して培養した *P.denitrificans* をバイアル瓶に添加したものである。したがって、

(a) の系の *P.denitrificans* は好氣的呼吸をともなって増殖したため、脱窒能を示しにくくなり、亜酸化窒素が発生しにくかったと考えられる。(b) の系では、空気を通気させるだけでなく、還元剤も添加して培養した *P.denitrificans* を使用したため、(a) の系で使用した *P.denitrificans* よりは脱窒能を示しやすいと考えられ、(a) の系よりは脱窒活性が大きくなったと推定できる。(e) の系の脱窒活性については、増殖状況の調査結果において、ファーメンタ中に *P.denitrificans* を培養する際に添加した還元剤が *P.denitrificans* の増殖に影響を与える可能性があることを示したが、脱窒能にも影響を与えた可能性があるため、(d) の系より脱窒活性が小さくなったと考えられる。

以上の結果をまとめると、本試験で使用した脱窒細菌である *P.denitrificans* は Eh が比較的高い好気条件においては、脱窒能を示しにくくなると考えられる。Eh が低い条件では、本試験で使用した還元剤が *P.denitrificans* の脱窒能に影響を与えている可能性を否定できないため、現時点では、Eh が低い条件において、Eh が脱窒細菌である *P.denitrificans* の脱窒活性に与える影響を評価することは難しい。しかしながら、還元性に制御され、定常期での Eh が 30 ~ -40mV となる (b) の系より Eh が低い系では *P.denitrificans* が脱窒能を持つことは確認できた。



#### 4 おわりに

本研究では、高アルカリ、還元性となる処分環境に対する脱窒細菌の耐性を調査することを目的として、脱窒細菌として *P.denitrificans* を使用し、pH 及び Eh が脱窒細菌の活性に与える影響を把握するための実験的研究を実施した。

その結果、本研究で使用した脱窒細菌は pH が中性より高くなるにつれて増殖しにくくなり、pH=9.5 以上では全く増殖しないことが明らかとなった。また、脱窒活性についても、pH が中性より高くなるにつれて低下し、pH=9.5 以上では定量下限値以下となることが示された。Eh が脱窒細菌の活性に与える影響については、Eh を変動させるために使用した還元剤が脱窒細菌の活性に影響を与えている可能性があったため、把握することはできなかったが、試験条件が還元環境に制御されていれば、脱窒細菌は活性を持つことが明らかとなった。いずれにしても、pH が 12.5 程度の高アルカリとなる地球化学環境においては、本研究で使用した脱窒細菌の活性は Eh にかかわらず、中性領域での活性と比較すると小さくなると考えられる。

本研究では、中性領域での増殖能及び脱窒活性が高い微生物を使用して処分環境に対する耐性を調査したが、微生物により pH に対する耐性が異なる可能性がある。今後は、高アルカリにおいても耐性を持つ脱窒細菌を使用してその活性を把握し、本研究で使用したような中性領域での活性が高い脱窒細菌の活性と比較する必要がある。また、本研究では培養液を使用して微生物の活性を維持できる条件で試験を実施したが、地下深部で微生物が活性を維持できるかについては明らかではない。今後は、地上の微生物あるいは地下深部の微生物を使用して地下深部の環境を模擬した、微生物の活性に関する研究を実施することにより、地下深部の環境条件が微生物の活性に与える影響を調査する必要がある。

## 謝辞

最後に、本研究はサイクル機構の委託研究により石川島播磨重工業（株）にて実施されたものである。種々の試験においてご助力を頂きました石川島播磨重工業（株）福永栄氏、本谷益良氏、横山英一氏、荒井和浩氏、並びに石川島検査計測（株）千手隆史氏に心から謝意を表します。

参考文献

去来川汎人、伊藤勝、他：TRU廃棄物処分に係る研究開発の現状調査（1）、PNC TN1420 96-014（1996）

扇元敬司：微生物学、1版、（株）講談社（1994）

原子力委員会、放射性廃棄物対策専門部会：TRU核種を含む放射性廃棄物の処理処分について（1991）

土壤微生物研究会：新編土壤微生物実験法、養賢堂（1992）

フレドリクソン,J.K.、オンストット,T.C.：過酷な環境に生きる地底微生物、日経サイエンス 1997年1月号、P44-51（1997）

嶺達也、三原守弘、他：微生物の珪砂混合ベントナイト中の移行に関する実験的研究、JNC TN8430 99-013（1999）

Atkinson,A.,Everitt,N. et al. : Evolution of pH in a rad-waste repository - Internal reactions between concrete constituents-, UKAEA Report AERE-R12939（1988）

Evans,W.C. : Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environments, Nature, vol.270, No.3, P17（1977）

Gamble,T.N. et al. : Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils, Appl.Environ.Microbiol., vol.33, P926（1977）

Knowles,R. : Denitrification, Microbiological Reviews, vol.46, No.1, P43（1982）

Lowry,O.H.,Rosebrough,N.J. et al. : Protein measurement with the Folin phenol reagent, J. Biol. Chem., 193, P265（1951）

McCabe, A. : The Potential Significance of Microbial Activity in Radioactive Waste Disposal, *Experientia*, vol.46, No.8, P779 (1990)

Pedersen, K. and Karlsson, F. : Investigation of Subterranean Microorganisms – Their Importance for Performance Assessment of Radioactive Waste Disposal-, SKB TECHNICAL REPORT 95-10 (1995)

Stanier, R.Y., Ingraham, J.L. et al. : THE MICROBIAL WORLD, 第5版、培風館 (1989)

West, J. M. and McKinley, I. G. : The Geomicrobiology of Nuclear Waste Disposal, *Mat.Res.Soc.Symp.Proc.*, vol.26, P487 (1984)

Wolf, M. and Bachofen, R. : Microbial Degradation of Bitumen Matrix Used in Nuclear Waste Repositories, *Naturwissenschaften* 78, P414 (1991)

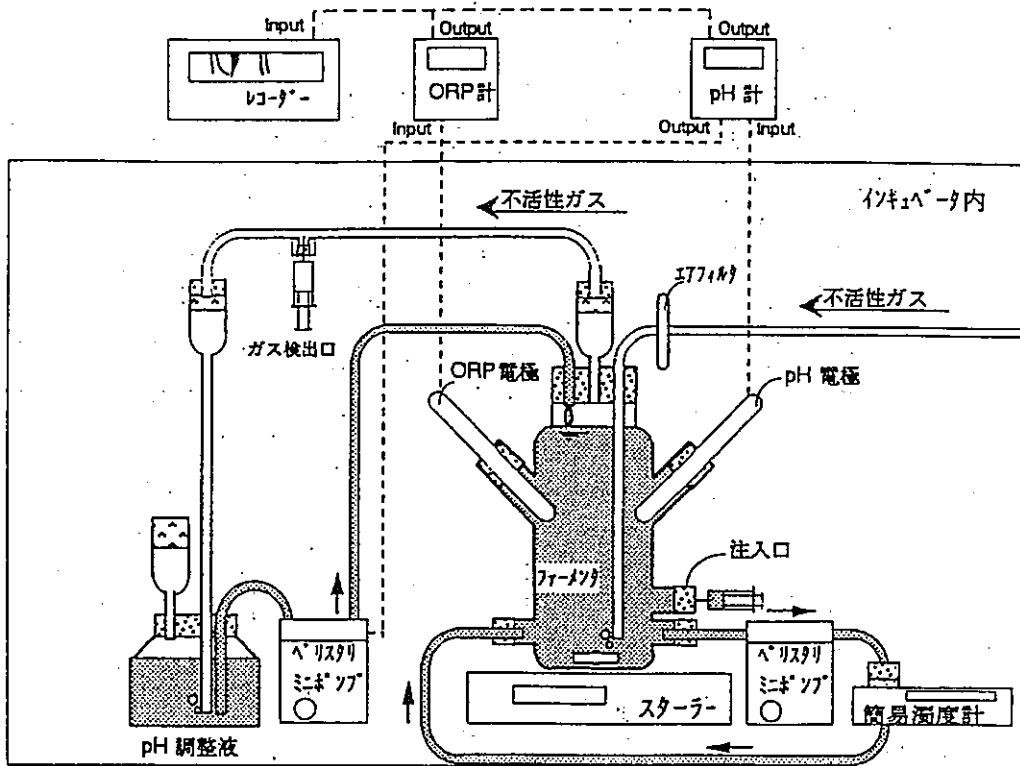


図1 装置の概略図 (pHの影響把握試験)

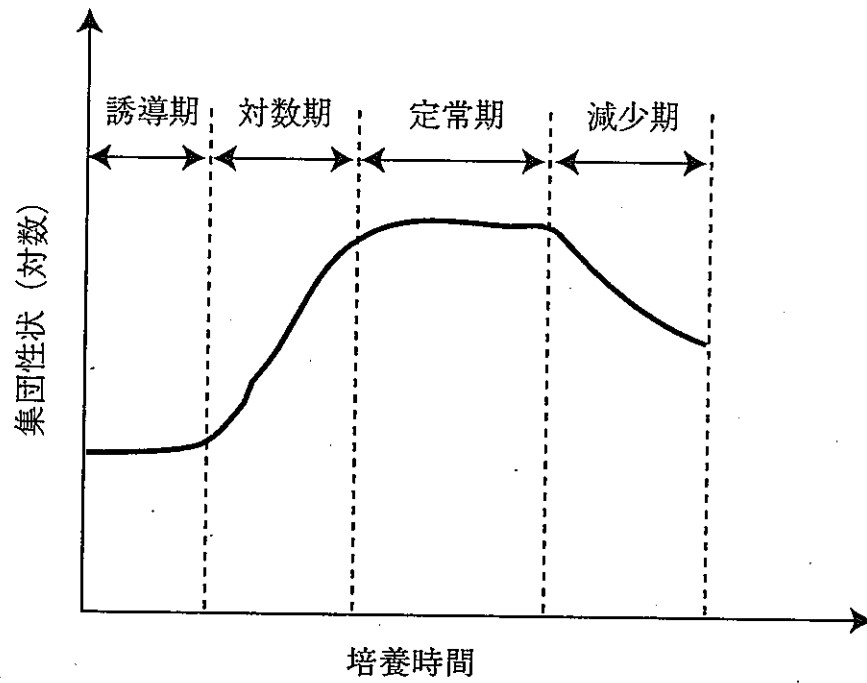


図2 微生物の増殖曲線

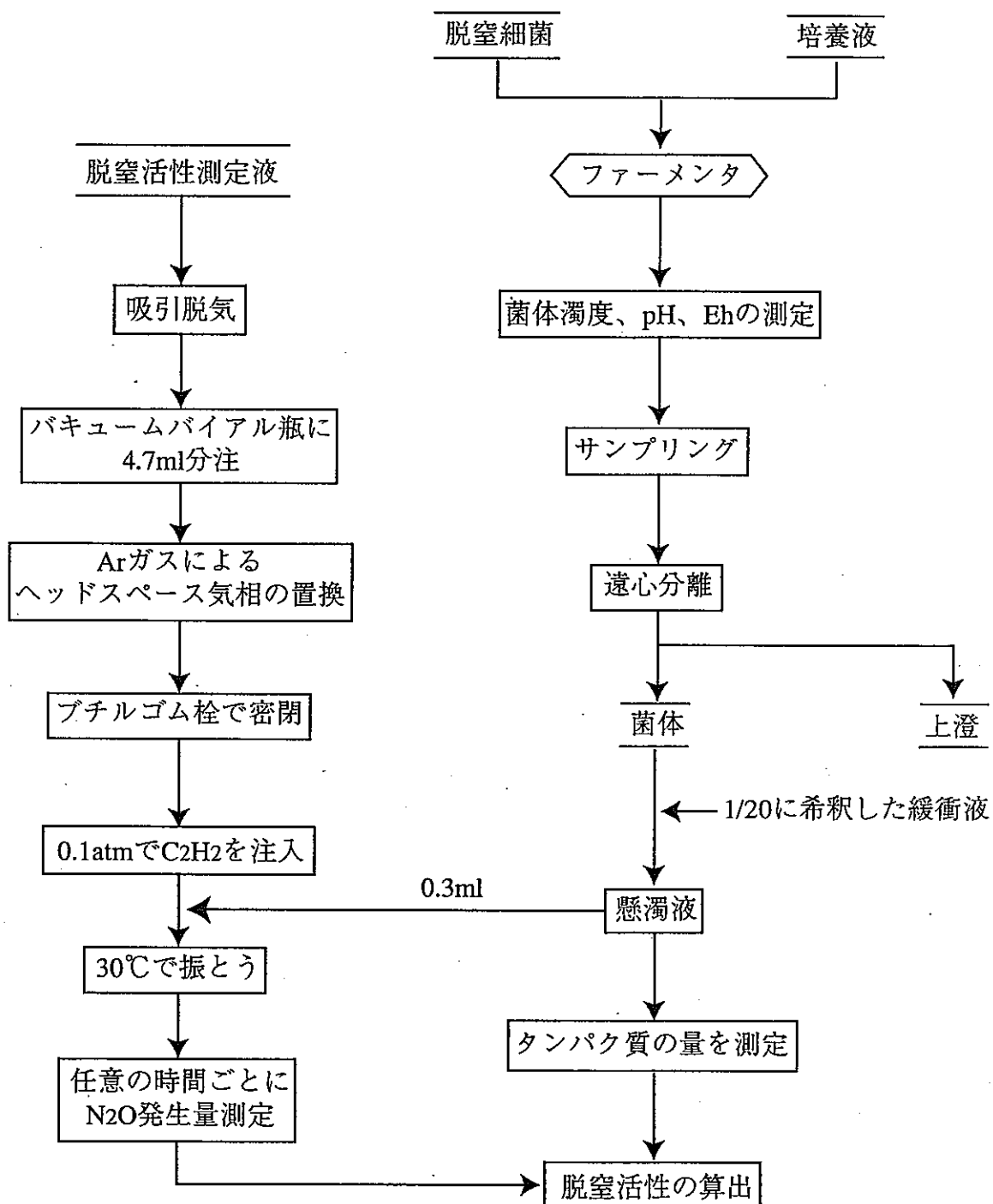


図3 脱窒活性の測定法

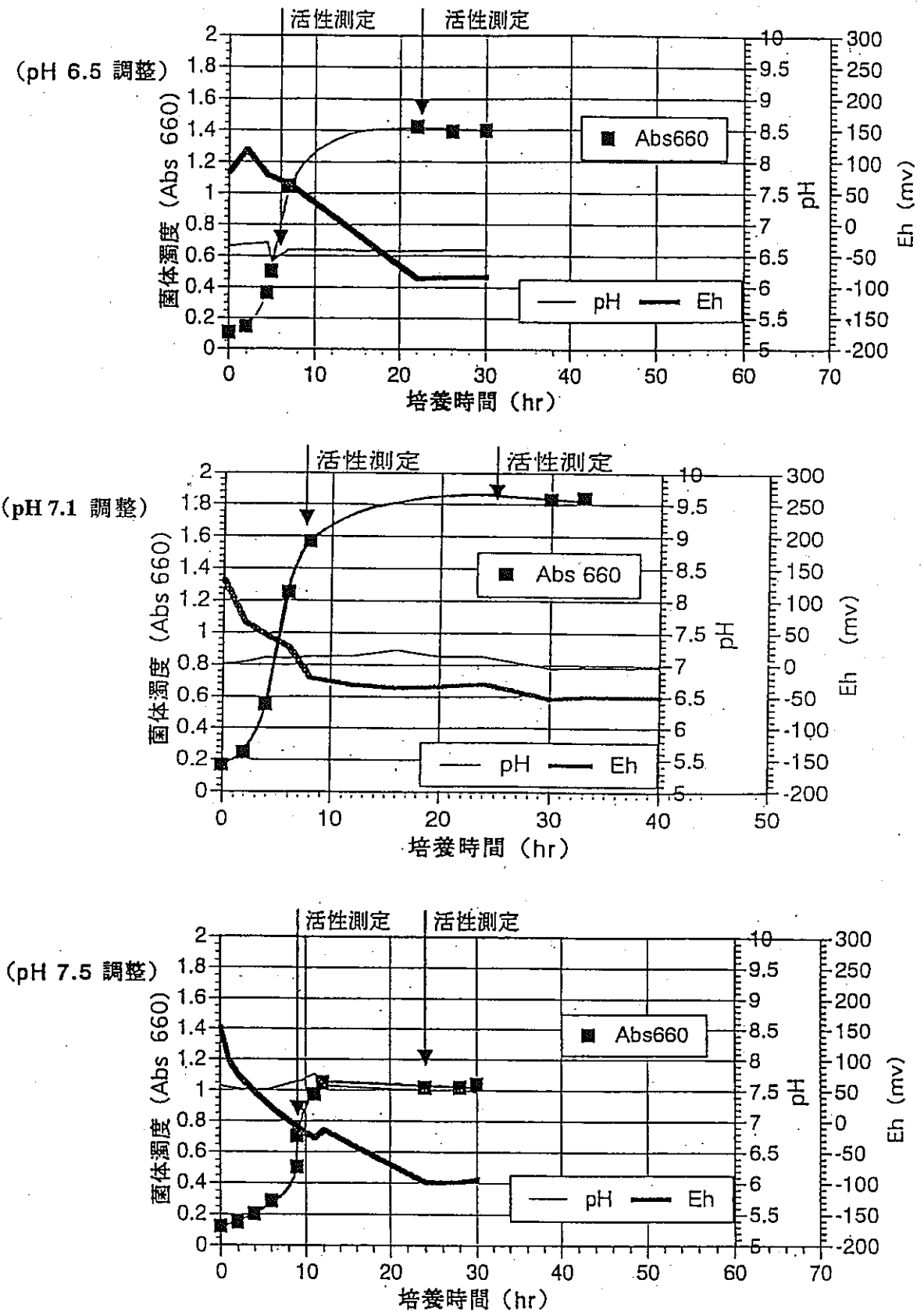


図4 pH影響把握試験における培養液の菌体濁度、pH及びEhの経時変化(1)



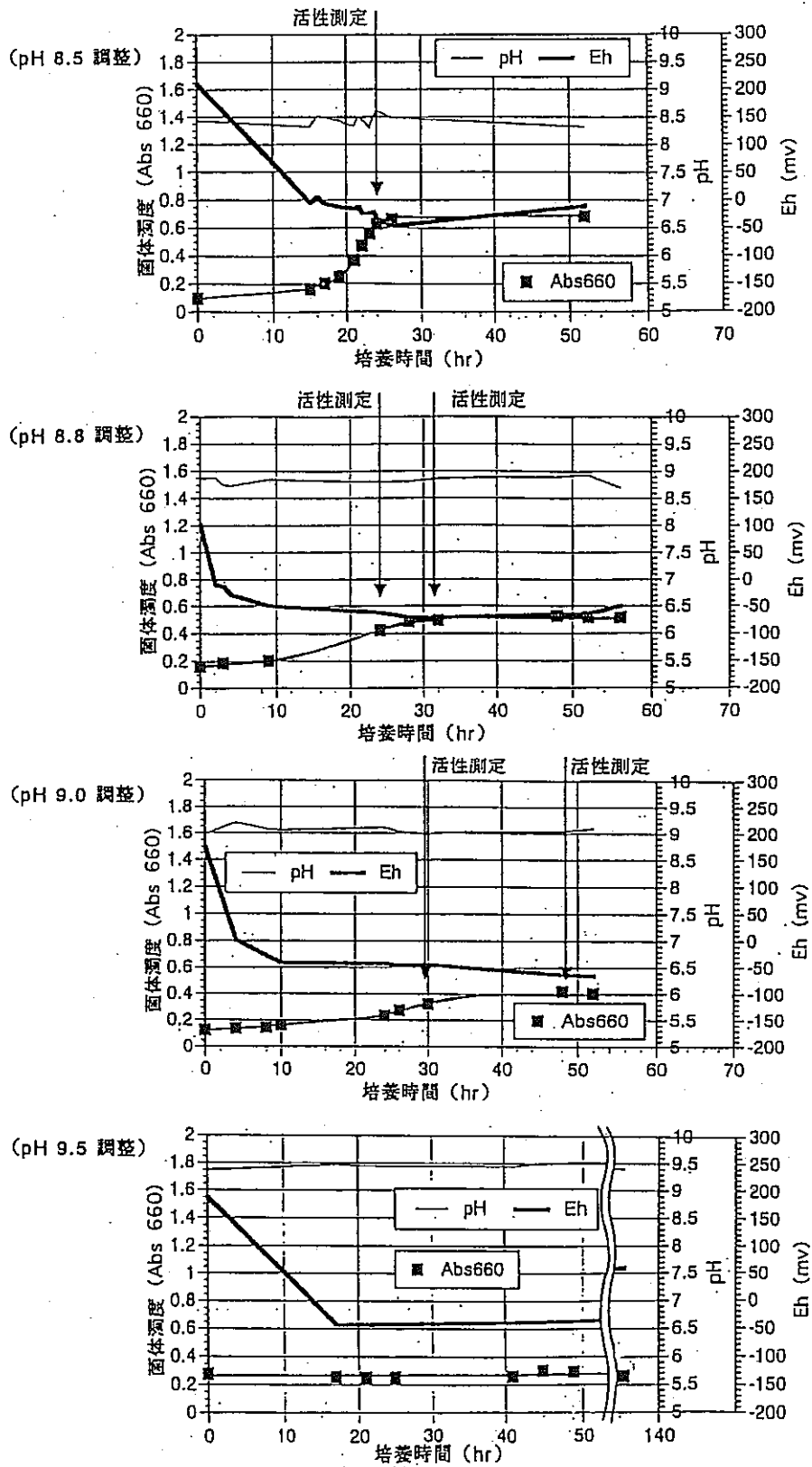


図5 pH影響把握試験における培養液の菌体濁度、pH及びEhの経時変化(2)

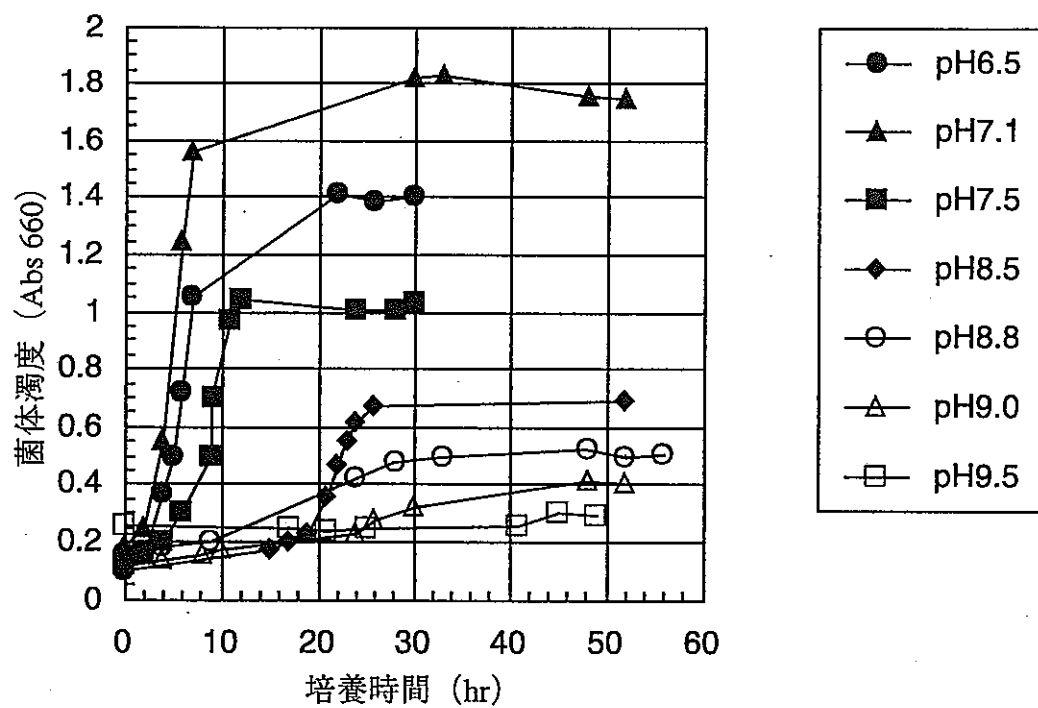


図6 pHが脱窒細菌の増殖に与える影響

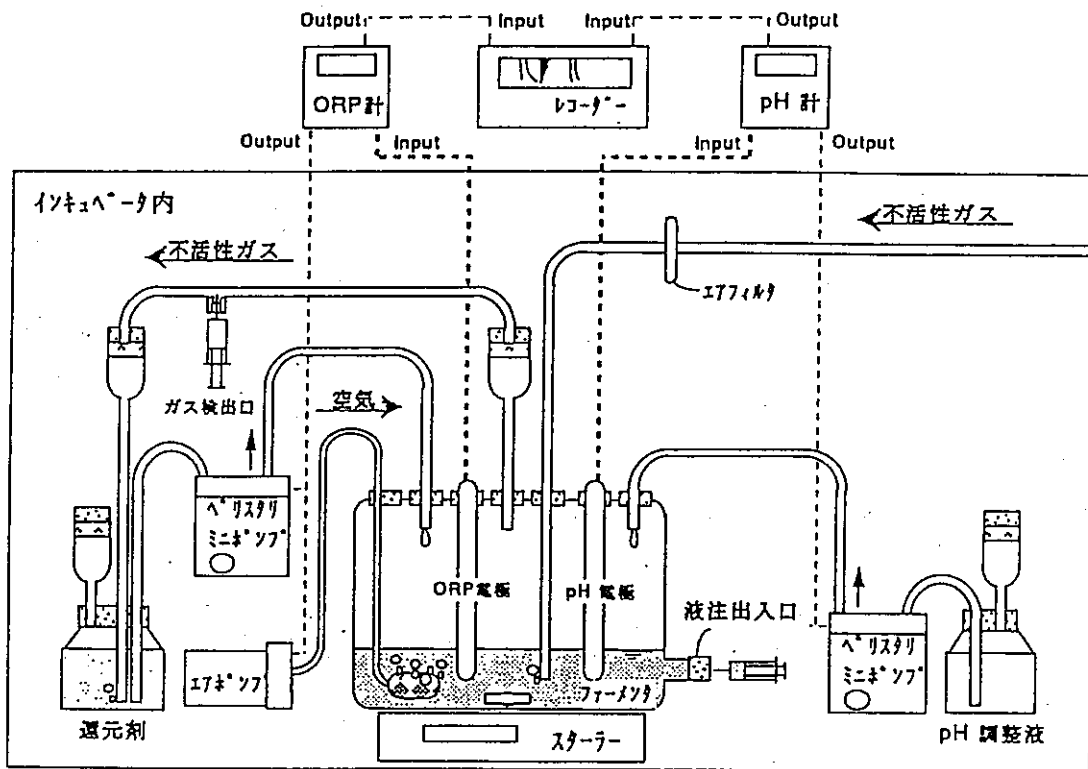
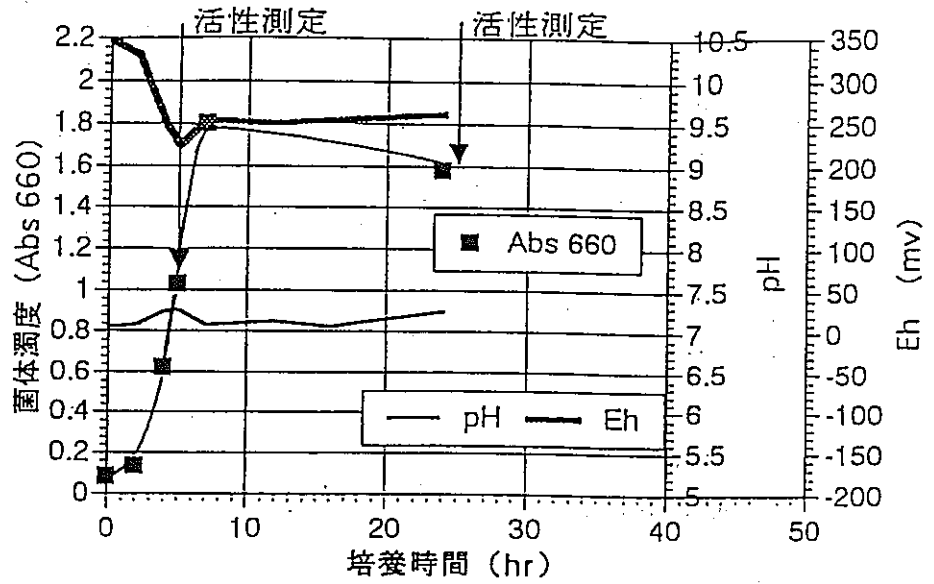


図7 装置の概略図 (Ehの影響把握試験)

増殖カーブ (a)

酸化剤 : Air通気



増殖カーブ (b)

還元剤 : フォルギコール酸

酸化剤 : Air通気

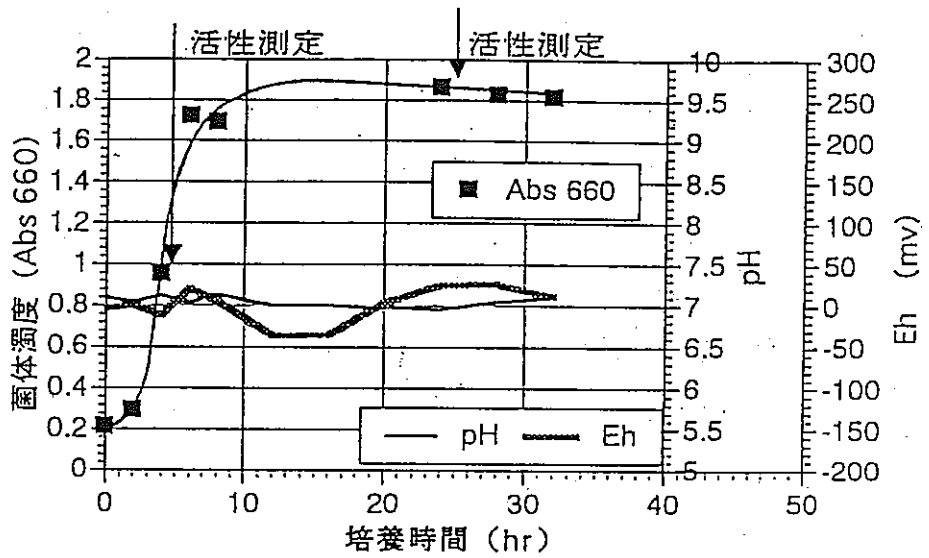
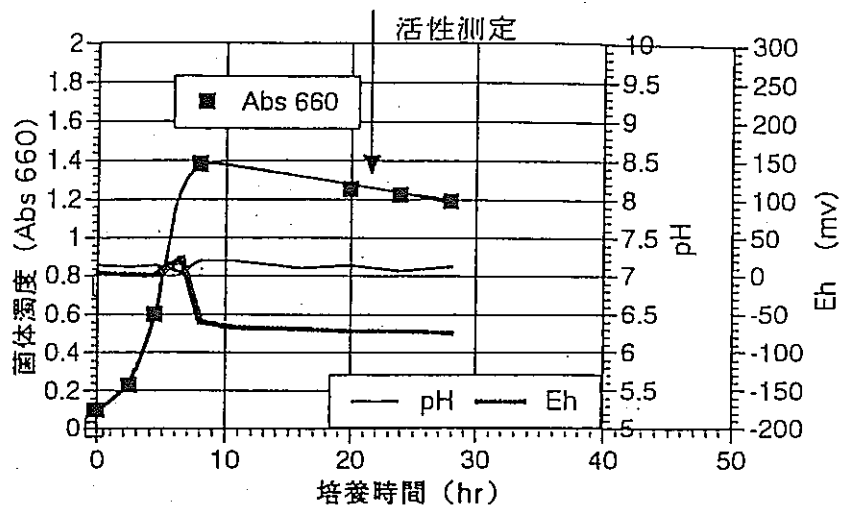


図8 Eh影響把握試験における培養液の菌体濁度、pH及びEhの経時変化 (1)

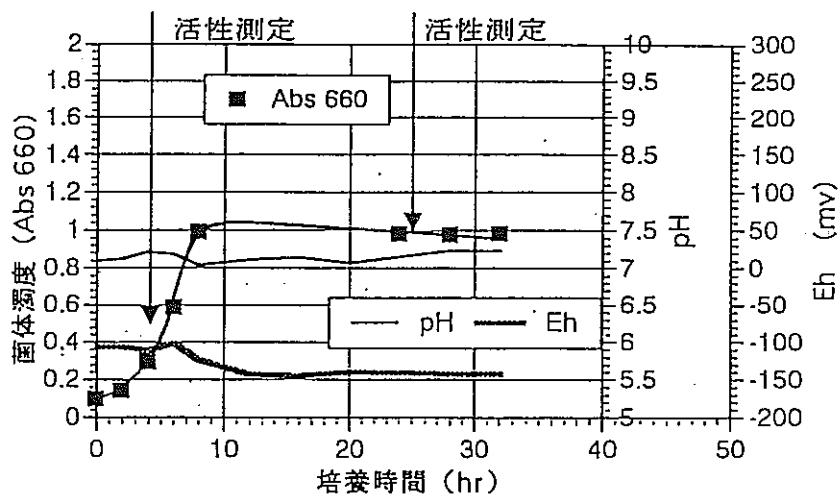
増殖カーブ (c)

還元剤：アスコルビン酸  
 フォケリコル酸



増殖カーブ (d)

還元剤：フォケリコル酸  
 L-システイン塩酸塩  
 (少量)



増殖カーブ (e)

還元剤：L-システイン塩酸塩

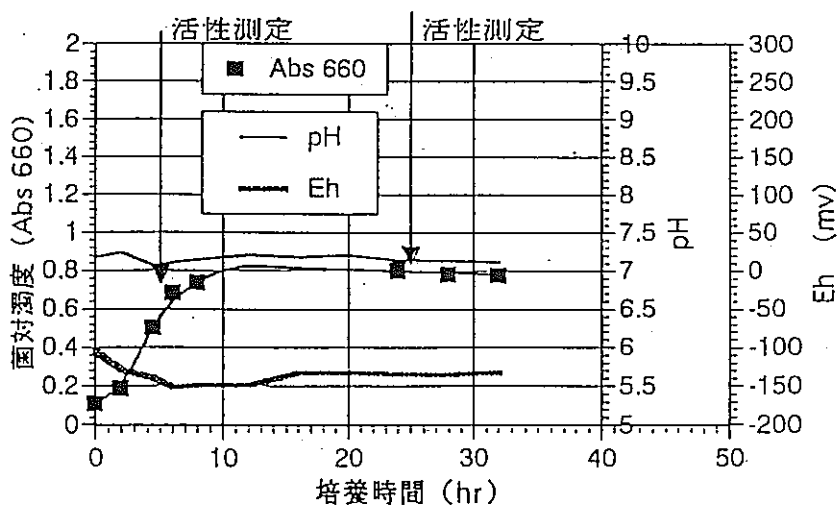


図9 Eh影響把握試験における培養液の菌体濁度、pH及びEhの経時変化 (2)

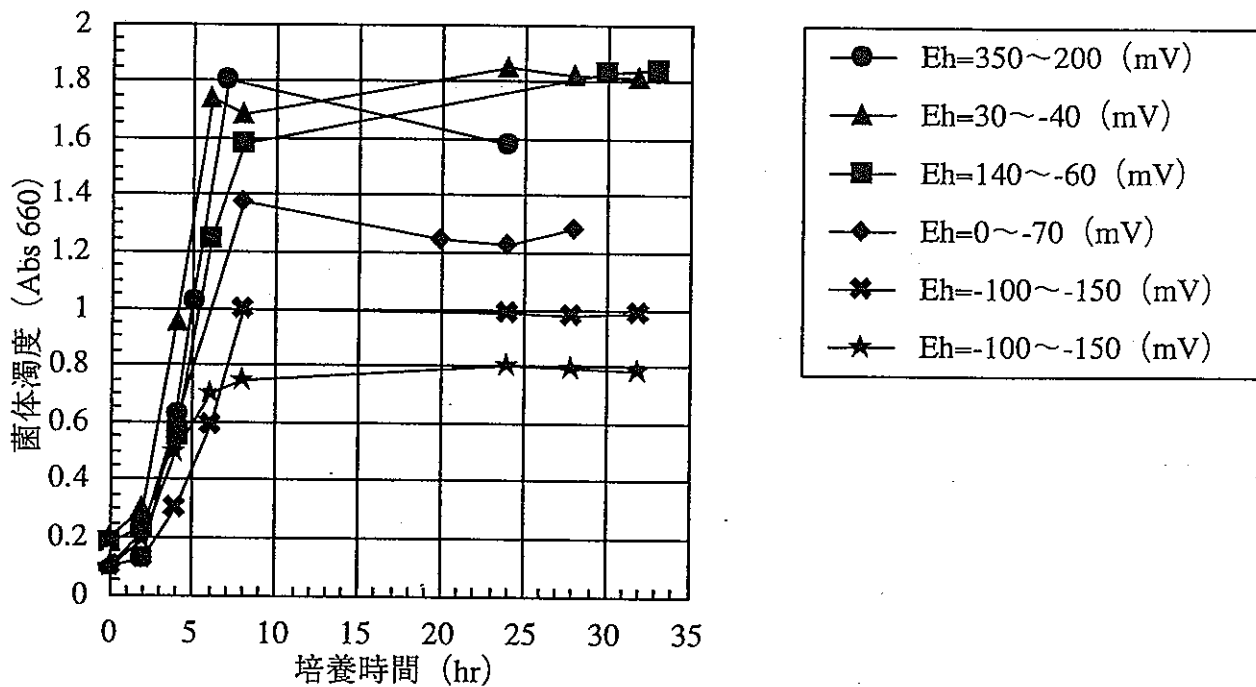


図10 Ehが脱窒細菌の増殖に与える影響

表1 脱窒能を有する代表的な細菌属

細菌の種類	細菌属名
光合成真正細菌	<i>Rhodobacter</i>
化学合成独立栄養真正細菌	<i>Thiobacillus, Thiomicrospira, Thermothrix</i>
メソファイル性真正細菌	<i>Hyphomicrobium</i>
グラム陰性、呼吸型真正細菌	<i>Agrobacterium, Alcaligenes, Aquaspirillum</i> <i>Branhamella, Campylobacter, Chromobacterium</i> <i>Flavobacterium, Gluconobacter, Kingella, Neisseria</i> <i>Paracoccus, Pseudomonas, Rhizobium, Spirillum</i>
滑走真正細菌	<i>Cytophaga</i>
グラム陽性真正細菌：内生孢子形成菌	<i>Bacillus</i>
グラム陽性真正細菌：放射菌群	<i>Corynebacterium</i>
グラム陽性、嫌気性真正細菌	<i>Propionibacterium</i>

表2 培養液の組成

## 培養液 a (有機物主体)

ビーフエキス	3.0g
ペプトン	5.0g
KNO <sub>3</sub>	1.0g
pH=6.8	1リットル

## 培養液 b (無機物主体)

グルコース	4.5g
KNO <sub>3</sub>	5.0g
KNO <sub>2</sub>	5.0g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5.0g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.2g
リン酸緩衝液 *1	50ml
微量元素 *2	1滴
pH=7.1	1リットル

## 培養液 c (有機・無機混合)

ビーフエキス	3.0g
ペプトン	5.0g
KNO <sub>3</sub>	2.5g
NH <sub>4</sub> Cl	0.5g
NaCl	5.0g
グルコース	0.9g
乳酸ナトリウム	0.9g
クエン酸	0.42g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.2g
リン酸緩衝液 *1	50ml
微量元素 *2	1滴
pH=7.1	1リットル

## \*1 リン酸緩衝液

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10g
pH=7.1	50ml

## \*2 微量元素

MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.8g
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.78g
FeCl · 6H <sub>2</sub> O	0.83g
NaMoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.5g
pH=7.1	100ml



表3 脱窒活性測定液の組成

ビーフエキス		3.0g
ペプトン		5.0g
KNO <sub>3</sub>		2.5g
KNO <sub>2</sub>		5.0g
NaCl		5.0g
グルコース		0.9g
乳酸ナトリウム		0.9g
クエン酸		0.42g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		0.2g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	)	0.2g
緩衝液	*1	50ml
微量元素	*2	1滴
		1リットル

## \*1 リン酸緩衝液 (混合比)

	pH6.5	pH7.1	pH7.5	pH8.5
0.2mol/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.1	3.4	1.7	0.05
0.2mol/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.9	6.6	8.3	9.95

## \*1 ホウ酸+KCl+NaOH緩衝液 (混合比)

	pH8.8	pH9.0	pH9.5	pH10.0
0.6mol/l NaOH	0.5	1.0	1.45	1.95
0.6mol/l H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> +0.6mol/l KCl	5.0	5.0	5.0	5.0
H <sub>2</sub> O	14.5	14.0	13.55	13.05

## \*2 微量元素

MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.8g
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.78g
FeCl · 6H <sub>2</sub> O	0.83g
NaMoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.5g
pH=7.1	100ml

表4 脱窒活性の測定結果 (pHの影響把握試験)

(対数期)							
pH設定値	タンパク質量 (mg)	亜酸化窒素発生量 ( $\mu$ l)				亜酸化窒素発生速度 ( $\mu$ l/hr)	脱窒活性 ( $\mu$ l/hr·mgタンパク質)
		反応時間0分	20分	40分	60分		
6.5	0.1183	*4	0.175	0.467	0.610	0.637	5.385
7.1	0.0883	0.824	4.440 *1	*2	8.936	8.112	91.869
7.5	0.0909	*4	2.957	8.059	14.330	14.417	158.603
8.5	*2	*2	*2	*2	*2	—	—
8.8	0.0426	*4	0.131	1.124	1.964	2.065	48.474
9	0.0959	*4	0.161	0.657	1.360	1.372	14.307
9.5	*3	*4	*4	*4	*4	—	—
10	*2	*2	*2	*2	*2	—	—

(定常期)							
pH設定値	タンパク質量 (mg)	亜酸化窒素発生量 ( $\mu$ l)				亜酸化窒素発生速度 ( $\mu$ l/hr)	脱窒活性 ( $\mu$ l/hr·mgタンパク質)
		反応時間0分	20分	40分	60分		
6.5	0.1314	0.299	0.292	0.197	0.664	0.300	2.283
7.1 *1	0.0933	0.208	3.212 *1	*2	6.324	6.116	65.552
7.5	0.3061	*4	2.738	7.942	11.800	11.920	38.942
8.5	0.0887	0.0876	2.044	4.665	*2	6.866	77.407
8.8	0.0748	*4	0.321	1.694	2.446	2.545	34.024
9	0.1096	*4	0.343	0.343	0.752	0.512	4.672
9.5	*3	*4	*4	*4	*4	—	—
10	*2	*2	*2	*2	*2	—	—

\*1: 反応時間30分

\*2: 測定せず

\*3: 測定不能

\*4: 定量下限値 (0.06 $\mu$ l) 以下

表5 脱窒活性の測定結果 (Ehの影響把握試験)

(対数期)								
	Eh測定値	タンパク質量 (mg)	亜酸化窒素発生量 ( $\mu$ l)				亜酸化窒素発生速度 ( $\mu$ l/hr)	脱窒活性 ( $\mu$ l/hr·mgタンパク質)
			反応時間0分	20分	40分	60分		
(a)	350~220mV	0.1524	*9	0.110	0.321	0.591	0.595	3.904
(b)	30~-20mV	0.1070	*9	1.613	2.343	3.511	3.379	31.579
*1	140~-60 mV	0.0883	0.824	4.440 *2	*8	8.936	8.112	91.869
(c)	20~-70mV	*8	*8	*8	*8	-	-	-
(d)	-100~-130mV	0.0948	0.409	1.015	2.336	4.212 *3	3.721	39.251
(e)	-100~-150mV	0.0850	0.058	1.256	1.241 *4	2.037 *5	2.000	23.529

(定常期)								
	Eh測定値	タンパク質量 (mg)	亜酸化窒素発生量 ( $\mu$ l)				亜酸化窒素発生速度 ( $\mu$ l/hr)	脱窒活性 ( $\mu$ l/hr·mgタンパク質)
			反応時間0分	20分	40分	60分		
(a)	約250mV	0.1129	*9	*9	*9	*9	-	-
(b)	30~-40mV	0.1309	*9	0.254	1.394	2.555 *6	2.025	15.470
*1	-30~-50mV	0.0933	0.208	3.212 *2	*8	6.324	6.116	65.552
(c)	約-70mV	0.1000	0.241	2.124	2.752 *4	4.898 *7	4.179	41.790
(d)	約-150mV	0.1114	*9	2.227	3.701	5.636	5.515	49.506
(e)	-130~-150mV	0.1135	*9	0.840	0.883 *4	1.518 *5	1.553	13.683

\*1: pHの影響把握試験の結果

\*2: 反応時間30分

\*3: 反応時間62分

\*4: 反応時間35分

\*5: 反応時間55分

\*6: 反応時間80分

\*7: 反応時間65分

\*8: 測定せず

\*9: 定量下限値 (0.06 $\mu$ l) 以下