

配布限定

人工バリア材料に対する 微生物の影響評価研究

(動力炉・核燃料開発事業団 委託研究成果報告書概要版)

技術資料		
開示区分	レポート No.	受領日
Σ	J1150 94-004	1994.8.11

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

1994年3月

石川島播磨重工業株式会社

この資料は、動燃事業団の開発業務を進めるため、限られた関係者だけに配布するものです。従って、その取扱には十分注意を払って下さい。なお、この資料の供覧、複製、転載、引用には事業団の承認が必要です。また今回の配布目的以外のことには使用しないよう注意して下さい。

This document is not intended for publication. No public reference nor disclosure to the third party should be made without prior written consent of Power Reactor and Nuclear Fuel Development Corporation.

本資料についての問合せは下記に願います。

〒107 東京都港区赤坂1-9-13

動力炉・核燃料開発事業団

技術協力部 技術管理室

配 布 限 定

PNC ZJ1150 94-004

1 9 9 4 年 3 月

人工バリア材料に対する微生物の影響評価研究

石川島播磨重工業株式会社

要 旨

高レベル放射性廃棄物の地層処分の性能評価において微生物の影響を調べるため、各種微生物のアルカリ性(pH)及び還元性環境(Eh)に対する耐性を実験的に調査するとともに、微生物への核種の吸着の研究手法の調査をすることを目的とした。

ガスを発生して核種の移行を促進する可能性があるメタン生成細菌(MPB)と、鉄やコンクリートの腐食を促進させるといわれる硫黄酸化細菌(SOB)について、フエーメンタ(発酵容器)を用いて35℃(MPB)、30℃(SOB)で培養した。活性を示すEh領域は、MPBはpH=8でEh=-210~-230mV以下、SOBはpH=7.5でEh=+200~+240mV以上であった。またSOBは、pH=8以上では増殖しなかった。また、異なるEhと高pHに対する硫酸塩還元細菌(SRB)、MPB、SOBの適応性を比較した。さらに、SRBとSOBの相互関係と放射性元素及び重金属の微生物への吸着挙動について調査、検討した。

本報告書は、石川島播磨重工業株式会社が動力炉・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：050D0299

事業団担当部課室および担当者：東海事業所 環境技術部 地層処分開発室

(吉川 英樹)

Limited Distribution

PNC ZJ1150 94-004

March, 1994

Study on Microbial Effects on Engineering Barrier
for Geological Disposal of Radioactive Wastes

A b s t r a c t

Active ranges of methane-producing bacteria (MPB) and sulfur-oxidizing bacteria (SOB) were estimated in relation to pH and Eh. *Methanosarcina barkeri* as MPB and *Thiobacillus thioparus* as SOB were selected for the purpose. A fermenter equipped with pH and Eh controller was filled with a culture medium, and was inoculated with the MPB or the SOB. Then it was incubated at 35 C and headspace methane was measured periodically for MPB. For SOB, the fermenter was incubated at 30 C and dispersibility in the medium was periodically analysed. The Eh range for MPB and SRB to be active was estimated to be less than -210 to -230 mV at pH 8, and more than +200 to +240 mV at pH 7.5, respectively. SOB could not grow at the pH more than 8. The adaptations to different Eh and high pH of SRB, MPB and SOB was compared. Relationship between SRB and SOB and adsorption of radionuclides and heavy metals on microbial cells were also investigated and discussed.

Work performed by Ishikawajima-Harima Heavy Industries Co., Ltd. under contract with Power Reactor and Nuclear Fuel Development Corporation.

Contract No. : 050D0299

PNC Liaison : Geological Isolation Technology Section,
Tokai Works
(Hideki Yoshikawa)

1. まえがき

放射性廃棄物処分場の環境における微生物の存在が注目され始めたのは、今から10年余り前のことであった。研究が進展するにつれ、天然の深地層に微生物が存在することは、海外のSubsurface Microbiologyの研究者の中では既に共通の認識となったようである。

処分場開設に伴う人工の要因の影響についても検討が始まっている。緩衝材として用いられるベントナイト中の有機物が微生物増殖のための基質となり得ること^{3) 4)}や、そういう基質を微生物が利用した場合の増殖量の試算結果⁵⁾が示されている。処分場開設により微生物増殖のための基質が増え、微生物量が増加する可能性も示唆される。従って、微生物が処分場開設に伴う環境変化あるいは天然の環境変化にどこまで耐えられるかの検討ないし調査手法の開発は、重要な課題といえる。

この観点から、昨年度、硫酸塩還元細菌の実験的調査と題して環境耐性の研究を行なった。その内容は、硫酸塩還元細菌(SRB)がpHおよびEhの変化にどの程度耐えて増殖できるかを実験的に調査したもので、温度35°Cの条件でpHおよびEhをパラメータとしてSRBの一種Desulfovibrio desulfuricansが増殖し活動できる範囲(硫化水素生成活性で判定)を示す耐性領域図を描くことができた。また、そのための実験方法を確定した。SRBを選んだ理由は、

- ・地下で想定される嫌気的な環境で増殖し活動できる
- ・増殖し活動すれば腐食などの問題を起こす
- ・増殖・活動を比較的容易に検知できる

の三点である。

本年度は、この耐性領域図の手法を、地下環境で増殖の可能性のある他の微生物に適用することを試みた。対象微生物として、やはり嫌気的な環境で増殖し活動でき地下での存在も報告されている²⁾メタン生成細菌(MPB)と、好気性細菌であるがSRBが生成した硫化水素を利用できる硫酸化細菌(SOB)を選定し、pHおよびEhをパラメータとした環境耐性試験を実施した。

MPBとSOBは、核種移行や腐食への影響が考えられる微生物であるが、その耐性調査試験(耐性領域図の作成)はSRBほど容易ではない。即ち、MPBは培養の面で困難があり¹⁰⁾、SOBは増殖検出の面で困難がある。従って本年度は両者とも、耐性調査試験に先だって、微生物の選定、培養手法、増殖検出手法の検討を行なった。

本年度は更に二つの課題の調査・検討を行なった。一つは、SRBとSOBの共存モデルでの活性測定手法調査である。これらの二つの微生物が共存するとき腐食は最も著しくなる

と予測される。その意味からは重要な課題であるが、SRBとSOBの活動による生産物（ H_2S と SO_4^{2-} ）がもう一方の微生物に利用されるので、活性の測定は非常に難しい。

もう一つの課題は、微生物への核種吸着実験手法の調査である。これは、核種移行を考える上で必要不可欠な課題である。本年度は検討の第一歩として、過去の研究で用いられてきた手法を調査し評価を加えた。

本年度の研究目的をまとめると次の6項目となる。

- ・ 実験用メタン生成細菌の選定、および培養手法の確認
- ・ メタン生成細菌の中性～アルカリ性および還元性環境下における耐性調査試験
- ・ 硫酸化細菌の選定、および増殖検出手法の信頼性確認
- ・ 硫酸化細菌の中性～アルカリ性およびやや還元性環境下における耐性調査試験
- ・ 硫酸塩還元細菌と硫酸化細菌の共存モデルでの活性測定手法調査
- ・ 微生物への核種吸着実験手法の調査

2. 実験用メタン生成細菌の選定、および培養手法の確認

2.1 メタン生成細菌の選定

メタン生成細菌（MPB）は年々新種が報告され、その分類も変化しつつあるが、ここではBalch, Wolfeらによってまとめられた表（表2-1、成果報告書参照）の中から試験に用いるMPBの選定をすすめた。その検討の結果、地層処分場で供給される可能性のある酢酸と $H_2 + CO_2$ 、そしてメタノールを利用でき、しかも培養も大きな困難無く行われている、*Methanosarcina*を選定した。

*Methanosarcina*は、多くのMPBを保存していることで世界的に有名な菌株保存機関のDSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen)¹⁴⁾ から*Methanosarcina barkeri* DSM804株を入手して用いた。その顕微鏡写真を図2-1に示す。紫外線（V励起）により励起され、青い蛍光を発する。

2.2 培養手法の確認

MPBは絶対嫌気性細菌であり、*Clostridium*などと比べても格段に慎重な嫌気操作が要求されるため、取り扱いに困難があることは事実であるが、基本的な方法が確立している¹⁰⁾。選定したMPBの培養できることを、バイアル瓶、フエレンタを用いて培養し確認するとともに、用いる基質の影響を調べた。基質としては酢酸塩、 $H_2 + CO_2$ 、またはメタノールの3種類を比較検討した結果、今回の環境耐性試験の基質としてはメタノールを用いること

にした。また、攪拌条件について検討し、最適条件を設定した。

3. メタン生成細菌の中性～アルカリ性およびやや還元性環境下における耐性調査試験

3.1 方法

Methanosarcinaのファーメンタでの培養の検討の結果から、耐性調査試験の方法を次のように決めた。

- (1) 使用するMPBの菌株と温度の設定
- (2) 実験装置のセット
(図3-1参照)
- (3) MPBの前培養
- (4) pH、ORP電極のチェック
- (5) 培養液作製、ファーメンタ組み立て、滅菌
- (6) pHおよびORPの記録開始
- (7) ガスの通気開始
- (8) 還元剤添加、MPB接種
- (9) MPB増殖の確認
- (10) 攪拌開始、pH調整開始
- (11) ガス流量、pH、ORPと排ガスのメタン測定、メタン発生量の算出
- (12) ORP調整開始
- (13) ファーメンタ内の液の分析
- (14) pH、ORP電極のチェック

3.2 結果および考察

試験結果を図3-2に示す。これにより、MPBはSRBよりも、より還元的な環境を要求し、Ehが低いほどその活性が認められた。

4. 硫黄酸化細菌の選定および増殖検出手法の信頼性確認

4.1 硫黄酸化細菌の選定

硫黄酸化細菌(SOB)の代表的なものはThiobacillus属である。Thiobacillus属の細菌は元素硫黄あるいは無機硫黄化合物を硫化することによりエネルギーを得て、空気中の炭酸

ガスを固定し、生育、増殖を行う一群の偏性独立栄養細菌である。

試験供試菌体の選定に当たっては特殊な土壌環境ではなく、中性～アルカリ性で生育可能な菌種を理化学研究所、微生物系統保存機関より入手した。

選定した菌種について予備培養した結果、pH6.0～8.0で生育する特徴を持つ *Thiobacillus thioparus* (以下 *T. thioparus* と略す) が安定した増殖を示し、耐性調査試験に向いているものと判断されたのでこれを試験菌種とした。また、硫黄源としてチオ硫酸を用いた。

4.3 増殖検出手法の検討

S O B の増殖を菌体増加量で測ることになるが、増殖検出手法として培地の濁度と蛋白量の二つについて菌の増殖量は菌の培養液 (2.5 ml) を採取して、その濁度で表わし、更に硫黄粒子の影響を少なくするため、これを 1000 rpm × 5 分間遠心して硫黄粒子を除いた上清の濁度を併用して判定する事とした。

5. 硫黄酸化細菌の中性～アルカリ性及びやや還元性環境下における耐性調査試験

5.1 方法

耐性調査試験における菌の生育状況を調べる比較対象のため試作フェルメンターを用いて通常の中性領域通気培養で前章と同様に菌の増殖、Eh、pH変化および30℃と35℃の増殖特性を調べたのち、環境制御下において試験を行った。

実験装置は、MPBにおけるフローと同様であるが、フェルメンタにおける気液接触面積を大きくとれるよう浅い形にしている点が異なる。また、ガス相は、N₂または4% H₂ : 1% CO₂ : 95% N₂ (低Eh用) 及びエア (高Eh用) を用いた。

5.2 結果と考察

本試験では土壌菌の硫黄酸化細菌をpH、Ehの環境制御下で生育させる装置の評価と菌体の増殖に関する知見を得るものであった。装置面では培地のpHは±0.2でコントロール可能であり、嫌気ガスによりある程度のEhの制御が可能であるが培地中のEhは栄養塩によりある程度決められること、また硫化水素などを使えば低Ehの制御は可能であることが確かめられた。

T. thioparus 菌の特性ではEh 250 mV、pH 7.5ではよく生育し、好気条件であっても高pH (8) を維持すると生育に大きな悪影響がでること、及び中性でもEhが160～100 mVでは生育が悪いことが確かめられた。

6. 硫酸塩還元細菌と硫黄酸化細菌の共存モデルでの活性測定手法調査

S R B に関して、間欠的に嫌気性になりやすい土は特に腐食を起こしやすいといわれている。この事が、S O B の存在が S R B による腐食を促進することを示すものとすれば、両者の共存モデルでの活性測定手法調査は腐食への影響を検討する上で重要な課題となる。

本来、嫌気性細菌である S R B と好気性細菌または脱窒細菌である S O B とは至適 E h が異なる。従って、S R B と S O B が同じ場に共存するとは考えにくい。しかし、土壌などの自然環境では、わずかの距離で E h などの環境条件が異なることがしばしばある。また、同じ場で時間の経過により E h が変化し、S R B と S O B が交互に活動することは十分あり得る。従って、S R B と S O B の共存系として考えられるのは、「微細環境による共存」と「時間経過による共存」と言える。

ただし、S R B と S O B の間には硫黄化合物の循環があるので両者の反応を分けて測定するのは難しい。特に「微細環境による共存」における現場での活性測定は困難である。辛うじて S R B と S O B の菌数から活性を論じられるが、菌数も、現場での活性を直接表わすものではない。これに対し、「時間経過による共存」については何らかの手法が成り立ちそうにも思えるが、今後の検討課題であろう。

7. 微生物への核種吸着実験手法の調査

細菌及び他の微小生物はその微生物自体の物性や代謝に絡んだ放射性物質や重金属の吸収、蓄積をしている事が知られている。又、重金属、放射性廃棄物処理に関する環境保全又は経済的な理由により、将来的に微生物を活用してこれらを回収する技術への関心が世界的な高まりをみせている。

ここでは放射性核種を含む金属イオンの微生物技術を主に J I C S T により文献を検索し、その吸着の反応実験系、および核種吸着量測定手法を中心にまとめて、現状と今後の研究の方向性の調査を行った。

一般的手法としては、菌と金属体を培養又は静置し反応させ、その後菌体を遠心して分離又は 0 メンブランフィルターろ過にて集菌後、放射性元素について γ 線カウント、その他は金属塩の精密分析を行う方法がある。洗浄法については E D T A や低 p H での洗浄があるが一般的には希釈食塩又は水によるものが多い。また菌体内結合金属イオンの分析に小角 X 線散乱法と電顕法を行っている例もある。

土壌および鉱物を用いた吸着実験の例として、 ^{137}Cs 汚染土壌中の Cs 吸着微生物の検知

法として、ラジオオートグラフィ法を用いたものがある。これは、土壌から遠心法などにより得た菌群の懸濁希釈液を ^{137}Cs を含む寒天プレート上で培養し、吸着増殖菌のコロニーをフィルム上に感光させるという直接検知法である。その他薄層クロマトを使う方法などもなされている様である。

菌体及び菌体由来成分への吸着には多様性があり、実験に当たっては個別の微生物による固有の新たなデータの蓄積が必要である。

実験手順としては次の項目が考えられる。

- a. 選定微生物に合う吸着測定法、分離-検知法などの検討を行い実験系を組立る。
- b. 菌体との結合吸着については培養条件*はもとより菌体の飽和吸着量、濃度、共存イオンの影響、などの基礎データを要する。
- c. 土壌及び微生物共存群のより複雑な系ではさらに菌体と他の挟雑物の分離・吸着量の解析技術が必要で、これも単一微生物の実験結果を踏まえて、確立することになろう。

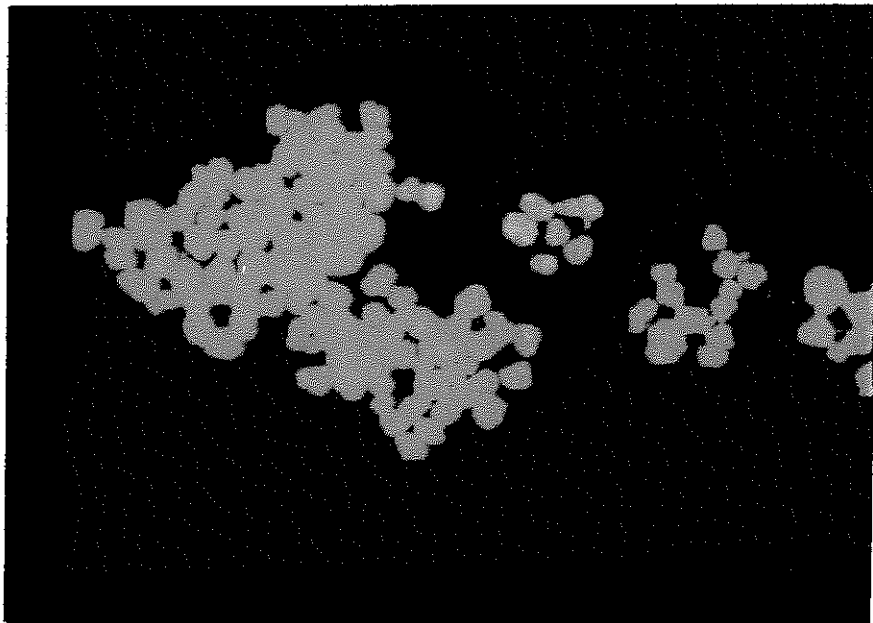
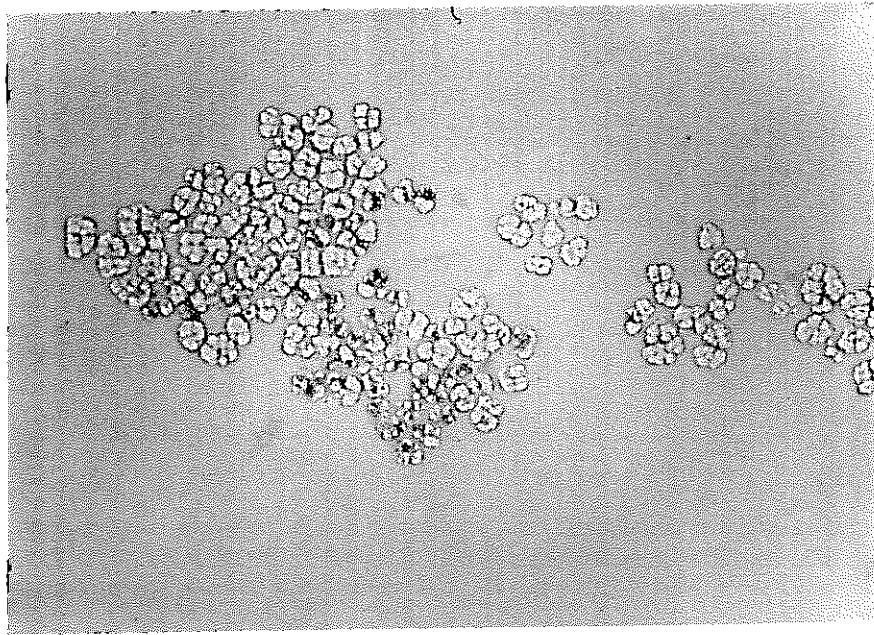
(*微生物成育プロセス状態、菌種特性、気相、イオン還元状態、発酵代謝、還元イオン、メタンなど)

8. 今後の課題

ここまで研究してきた手法は、地下の環境と比べれば格段に栄養分の多い条件下で、pH, Ehなどのパラメータが与えられたとき微生物が増殖し、活性を持ち得るかを定性的に判断するものであった。今後、定量的データを得るためには、想定される処分場環境と同様に栄養分濃度の低い条件で微生物の増殖量などを測れる試験方法を開発する必要がある。また、微生物の核種吸着・移行への影響の検討のためには、微生物と他の固形物の分離方法など吸着した核種のみを選択的に測定する手法を、基礎的な面から開発して行く必要がある。

海外でも、深地層での微生物の存在やその性質調査は盛んに行なわれているが、地下環境での増殖量や核種移行への影響については、これからの課題と考えられる。

なお、引用文献のタイトルについては、成果報告書本文を参照されたい。



50 μ m
| | | | |

図2 1 Methanosarcina barkeri DSM 804の顕微鏡写真
(上：光学顕微鏡、下：蛍光顕微鏡)

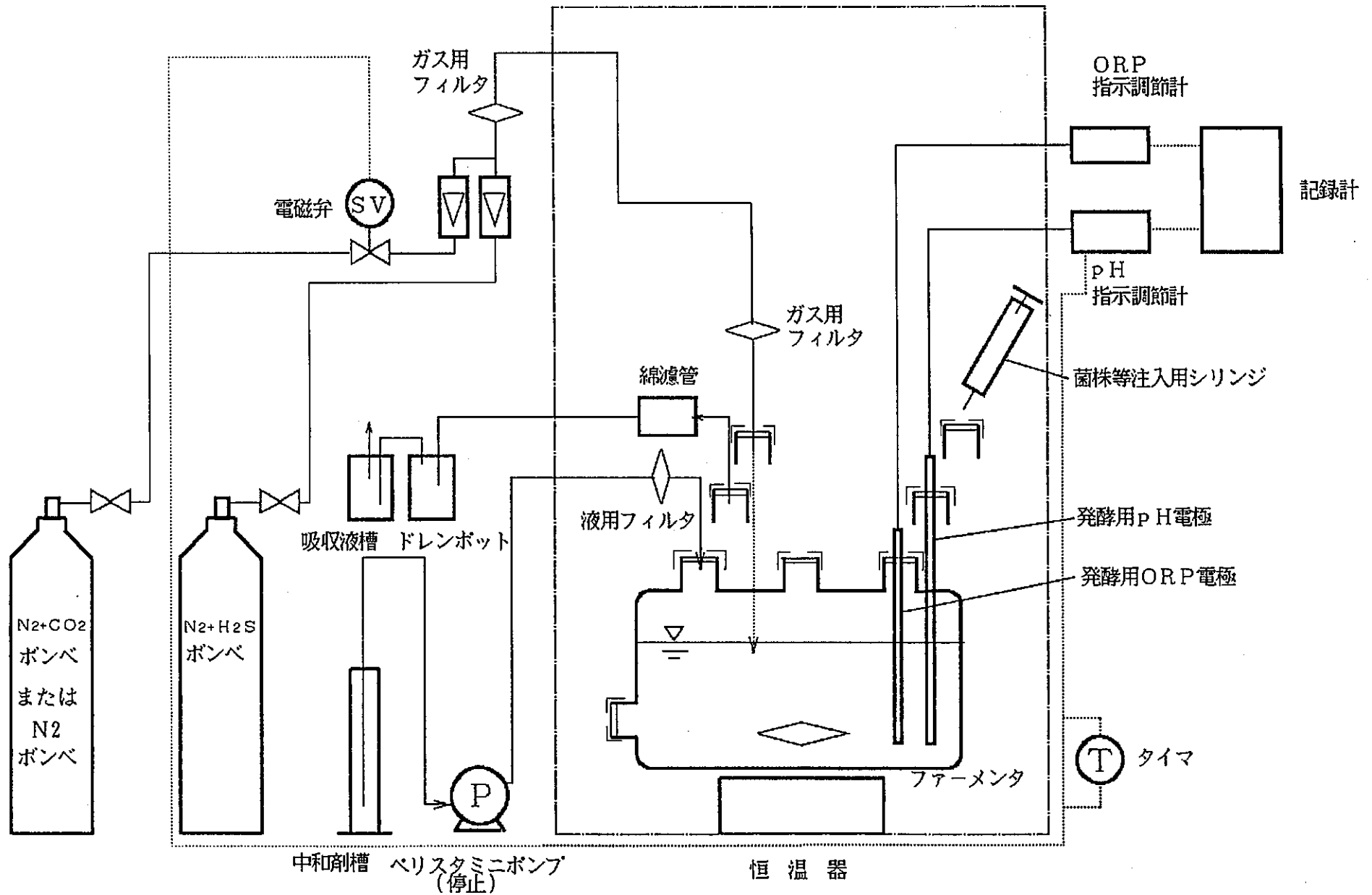


図3-1 MPBの耐性試験装置 (低Eh運転用)

Methanosarcina barkeri DSM 804

Temperature 35 °C

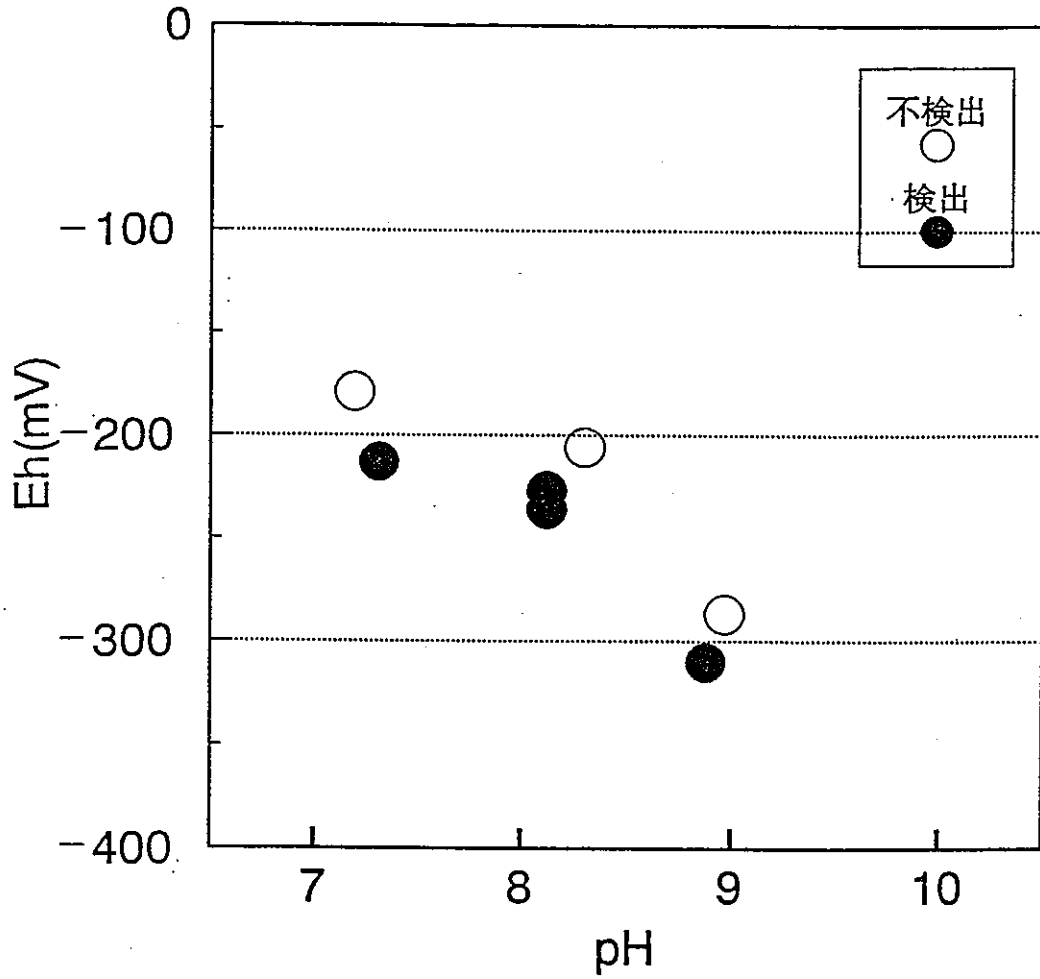


図3-2 Methanosarcina barkeriの耐性領域図

STUDY ON MICROBIAL EFFECTS ON ENGINEERING BARRIER
FOR GEOLOGICAL DISPOSAL OF RADIOACTIVE WASTE

Research Summary of Contract Research Results
consigned from
Power reactor and Nuclear Fuel Development Corp.

M a r c h 1 9 9 4

Ishikawajima-Harima Heavy Industries Co., Ltd.

1. Introduction

It is now some ten years ago that the presence of microorganisms in radioactive waste disposal areas first began receiving attention. Since that time many studies have been conducted, and it is now common knowledge among researchers all over the world that certain kinds of microorganisms live in the natural deep geological formation.

An investigation on the influence of man-made factors caused by the development of a waste disposal area is currently underway. One report states that the organic matter contained in bentonite, which is used as a buffer material, could act as the substrate for proliferation of microorganisms.^{3) 4)} One study gives an estimate of the amount of growth when microorganisms live using such a substrate.⁵⁾ Since the substrate for proliferation of microorganisms increases when a waste disposal area is developed, it is likely that the amount of microorganisms will also increase. Accordingly, it is important to investigate how the microorganism tolerates the change in the natural environment or changes in the environment caused by development of a waste disposal area.

Last year we conducted an experimental study on the environmental tolerance of sulfate-reducing bacteria (SRB). In the experiment, the effect of changes in pH and Eh on the proliferation of SRB was examined. We used the pH and the Eh as parameters at 35° C. Under these conditions, we successfully drew a tolerance map which shows the active area of proliferation of *Desulfovibrio desulfurican*, a kind of SRB. (determined by hydrogen sulfide generation). Our reasons for selecting SRB were as follows:

They can survive and proliferate in an anaerobic environment, which is assumed to be typify an underground environment.

The more SRB proliferate, the greater the corrosion.

The detection of SRB proliferation and activity is relatively easy.

This year, we applied this tolerance map production method to other microorganism that can proliferate underground. The bacteria we selected were:

1) Methane-producing bacteria (MPB), which have been reported as living and proliferating in an anaerobic environment.²⁾

2) Sulfur-oxidizing bacteria (SOB). Although they are an aerobic bacteria, they are able to utilize the hydrogen sulfide SRB produce.

We performed environmental tolerance tests using pH and Eh as the parameters.

Both MPB and SOB are thought to influence radionuclide migration and corrosion. The tolerance test to determine the tolerance for these bacteria was not as easy as that for SRB: MPB was difficult to culture, and we had difficulty in detecting the proliferation of SOB.¹⁰⁾ We therefore changed our test schedule: prior to performing the tolerance test, we investigated how to select microorganisms, how to culture them, and how to detect their proliferation.

We also studied the following two subjects in addition to the above-mentioned subjects:

1) An activity measurement method suitable for both SRB and SOB. We assumed that the most serious corrosion takes place when these two kinds of bacteria coexist. Therefore, this constitutes an important subject. However, the measurement of activity is very difficult because the products (H_2S and SO_4^{2-}) of each bacteria are utilized by the other.

2) Adsorption of a radionuclide by bacteria, which is an indispensable subject in the estimation of the radionuclide migration. We began our investigation by evaluating conventional methods reported in the past.

Our research program for this year is summarized as follows:

- Selection of MPB for the experiment and confirmation of the culture method. Investigation on the tolerance of MPB in neutral to alkaline media under reducing condition
- Selection of SOB and confirmation of the reliability of the proliferation detection method
- Investigation on the tolerance of SOB in neutral to alkaline media in a slightly reducing condition

- Investigation on the activity measurement method when applied to a coexisting model of SRB and SOB
- Investigation on our experimental method for radionuclide adsorption by bacteria.

2. Selection of MPB for the experiment and confirmation of culture method

2.1 Selection of MPB

Every year new MPB are discovered and thus their classification is always changing. We selected the MPB for our experiment from Balch and Wolfe's classification table (Table 2-1. refer to the Study Report). We selected Methanosarcina because it can utilize $H_2 + CO_2$, methanol, and acetic acid which is often generated at a waste disposal site, and because Methanosarcina can be cultured relatively easily.

We procured Methanosarcina barkeri DSM804 from DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen),¹⁴⁾ which is well-known worldwide for having many kinds of MPB. Figure 2-1 is a photograph of the bacteria. They emit a blue fluorescent light when activated with ultraviolet rays.

2.2 Confirmation of the culture method

MPB are strict anaerobic bacteria. Therefore, it is difficult to deal with them because they require more careful anaerobic treatment than Clostridium, for which basic method has been already established.¹⁰⁾ We confirmed that the selected MPB could be cultured using a Bial bottle or a fermenter. We also examined the effect of the substrate by comparing acetate, $H_2 + CO_2$, and methanol. We chose methanol for the substrate. We also established the optimum stirring conditions.

3. Investigation on the tolerance of MPB in neutral to alkaline media under reducing condition

3.1 Method

Based on our investigation on the culture of Methanosarcina in a fermenter, we decided to execute the tolerance test as follows:

- (1) Select the type of MPB to be tested and the temperature
- (2) Set up the experimental apparatus (see Figure 3-1)
- (3) Pre-culture the MPB
- (4) Check the pH and ORP electrodes
- (5) Prepare the culture media, assemble the fermenter, and sterilize the apparatus
- (6) Start recording at the pH and ORP electrodes
- (7) Start gassing
- (8) Add the reducing agent and inoculate the MPB
- (9) Confirm the occurrence of proliferation of MPB
- (10) Begin adjustment of pH
- (11) Measure the gas flow rate, pH, ORP, and methane content in the exhaust gas, and calculate the level of methane production
- (12) Begin the adjustment of ORP
- (13) Analyze the solution in the fermenter
- (14) Check the pH and ORP electrodes

3.2 Results and discussion

Figure 3-2 shows our experimental results, which indicate that MPB require a more reducing condition than SRB. We also found that lowering the Eh increased the activity of the bacteria.

4. Selection of SOB and confirmation of the reliability of the proliferation detection method

4.1 Selection of SOB

Thiobacillus is a one of the well-known bacteria of SOB. The bacteria belong

ging to Thiobacillus are a kind of autotrophic bacteria that obtain the energy to grow and proliferate by sulfurizing elementary sulfur or inorganic sulfur compounds and fixing carbon dioxide in the atmosphere. Rikagaku kenkyusho, a culture collection institute, supplied the test bacteria, which can be brought up in neutral to alkaline media rather than in a special soil environment.

The culture test of the selected bacteria showed that Thiobacillus thioparus (hereinafter called T. thioparus), which characteristically grows in a pH of 6.0 - 8.0, exhibited stable proliferation. We therefore selected it as the test bacteria. The sulfur source was thiosulfate.

4.2 Investigation on the proliferation detection method

We determined the proliferation of SOB by measuring the increase in the amount of bacteria. As the means to detect proliferation, we considered the turbidity of culture medium and the amount of protein. To measure proliferation, we took a sample of culture solution (2.5 ml) and measured the turbidity. To minimize the effect of the sulfur particles, we treated the sample by centrifuging at 1,000 rpm for five minutes to obtain a supernatant solution free of sulfur particles.

5. Investigation on the tolerance of SOB in neutral to alkaline media in a slightly reducing condition

5.1 Method

To compare the growth conditions of bacteria with the test farmeters in the tolerance test experiment, we investigated how the bacteria proliferate in normal culture in a natural environment as in Section 4, how Eh and pH changed and the proliferate characteristics at 30° C and 35° C. After this, all tests were performed in a controlled environment.

We used the same experimental apparatus as that for the MPB test, except that a shallower vessel was employed to enable a larger gas-liquid contact area in the fermenter. We employed the following gas phases: N₂ or 4% H₂, 1% CO₂,

95% N₂ (for a lower Eh) and air (for a higher Eh).

5.2 Results and discussion

The purpose of this experiment was to evaluate the experimental apparatus to increase SOB, which are ubiquitous in the soil, under a controlled pH and Eh, as well as to obtain information about the growth of the bacteria. The apparatus enabled us to control the pH value of the culture medium within ± 0.2 . We were also able to control Eh to some extent by adjusting the anaerobic gas. We found that the Eh value in the culture medium was determined more or less by the nutrient salt, and that hydrogen sulfide enabled us to keep the Eh value as low as possible.

T. thioparus grew well at as Eh as 250 mV and a pH of 7.5. However, we also confirmed that a higher pH of 8 would have a negative effect on its growth even in good conditions. We observed poor growth at an Eh of 160 - 100 mV even in the neutral medium.

6. Investigation on the activity measurement method when applied to a coexisting model of SRB and SOB

It is thought that the soil, which intermittently becomes anaerobic, can easily be corrosive. This suggests that the presence of SOB promotes corrosion due to SRB. Therefore, investigation on the activity measurement method when applied to a coexisting model of both bacteria is one of the most important subjects in the study of their effect on corrosion.

Incidentally, as SRB are anaerobic bacteria and SOB are aerobic bacteria or denitrifying bacteria, their optimum Eh are different from each other. Accordingly, it is difficult to think that these two bacteria can coexist in the same place. However, in a natural environment such as soil, sometimes different environments can coexist in a limited area, with a slightly different area in small spots. In addition, the Eh can change over time in one spot. Therefore, it is highly possible that SRB and SOB are activated alternately. There are two

types of coexistence of SRB and SOB: coexistence in a microenvironment and coexistence over time.

Since sulfur components circulate between SRB and SOB, it is difficult to measure each reaction separately. In particular, it is very hard to measure their activity in the field of microenvironmental coexistence. Although the numbers of SRB and SOB can be counted, the bacteria number does not always represent bacteria activity. However, coexistence over time seems to enable some possibility of measuring the bacterial activity, though further study will be necessary.

7. Investigation on an experimental method for adsorption of a radionuclide by microorganisms

It is known that bacteria and other microorganisms absorb radionuclides and heavy metals and store them in their body in connection with their characters or metabolism. The technology for recovering these elements using the microorganisms is now attracting worldwide attention as a possible method for radioactive waste treatment that is both environmentally and an economically viable.

We examined the available literature on the microbial technology of metal ions, including radionuclide from the JICST database, and reported on the reaction experiment of metal ion adsorption and the method for measuring radionuclide adsorption. Below, we describe present and future research trends.

One of the simplest procedures is to either make the bacteria react with the metal ions in the culture or allow the bacteria and the metal ions to react naturally. After that the bacteria are separated by means of centrifuge or an O-membrane filter. The radioactive elements are measured with an x-ray counter, and the heavy metal salts are analyzed using a microanalysis technique. For washing, in addition to conventional EDTA washing and acid washing, saline water washing and water rinsing can be employed. The application of small-angle x-ray scattering and electron microscopy for analyzing the links between the metal ion

and the bacteria.

As one example of an adsorption experiment using soil and minerals, one study reported the adoption of radioautography for detecting the Cs-adsorbing bacteria in soil contaminated with ^{137}Cs . The suspended solution of bacteria, obtained by centrifuging or by some other means from the soil, was cultured using an agar plate containing ^{137}Cs . The colony of adsorbing bacteria were then detected by employing a photo-sensitive film technique. Some papers reported the use of thin-layer chromatography.

There is a variety of ways of adsorption of bacteria or elements produced from the bacteria. For experimental purposes, therefore, the accumulation of new data for individual bacterium is required.

We decided on the experimental procedure as follows:

- a. Establish the experimental system after investigating the adsorption measurement method and separation-detection method for the selected microorganism.
- b. To determine the bond-adsorption with bacteria, collect basic data on the saturated adsorption of bacteria, and on the effect of the concentration and co-existing ions as well as the culture conditions.
- c. Establish an analytical technique for separating the bacteria from foreign matter in the complex system in a coexisting group of soil and microorganism. The analytical technique will be established based on our experiment results for a single species.

(* microorganism growth process conditions, bacteria characteristics, gas phase, ion reduction state, fermentation metabolism, reduced sulfur, methane)

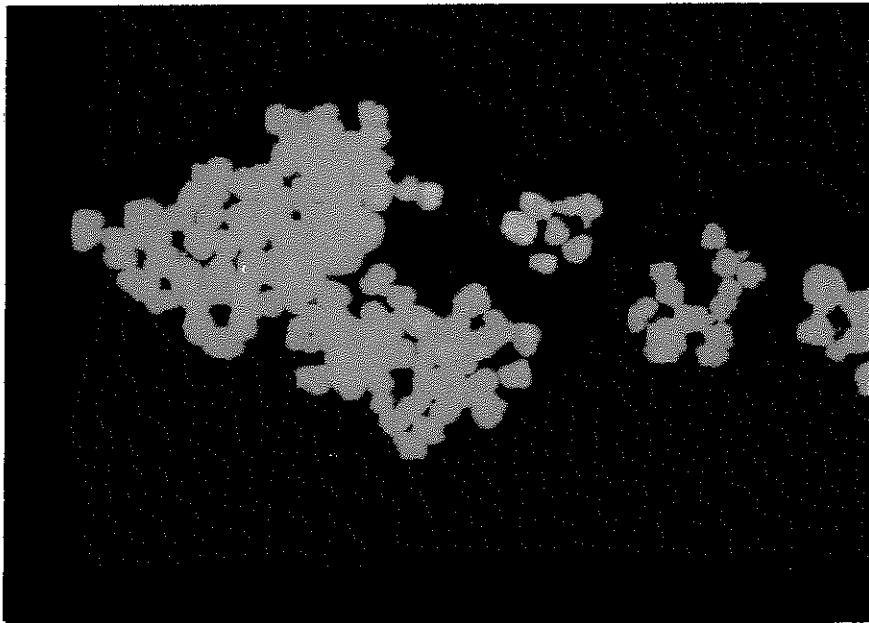
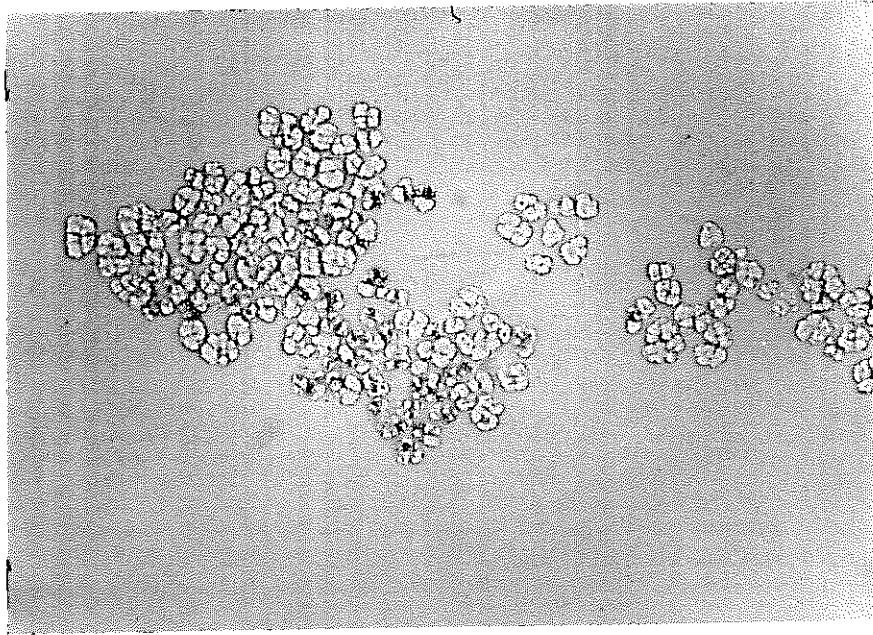
8. Future tasks

We carried out the above study procedure to assess qualitatively whether microorganisms can survive and proliferate when parameters such as the pH and the Eh are under a much more eutrophic environment than the natural underground. To obtain quantitative data henceforth, it is necessary to develop an

experimental procedure that enables measurement of the proliferation of bacteria in rather low-nutrient conditions such as an actual waste disposal site. To investigate the effect of microorganisms upon the adsorption and migration of radionuclides, it is necessary to develop basic techniques of separating the microorganism from other solids and selectively measuring the adsorbed radionuclide.

Studies on the presence of microorganisms in deep geological formations and their characteristics are currently underway worldwide. The amount of their growth underground and the influence of transferring the bacteria to the radionuclide will need to be clarified in the future.

For a list of references, please refer to the original report.



50 μ m
| | | | |

Figure 2-1 Microscopic photographs of Methanosarcina barkeri DSM 804
(above: optical microscope, below: fluorescent microscope)

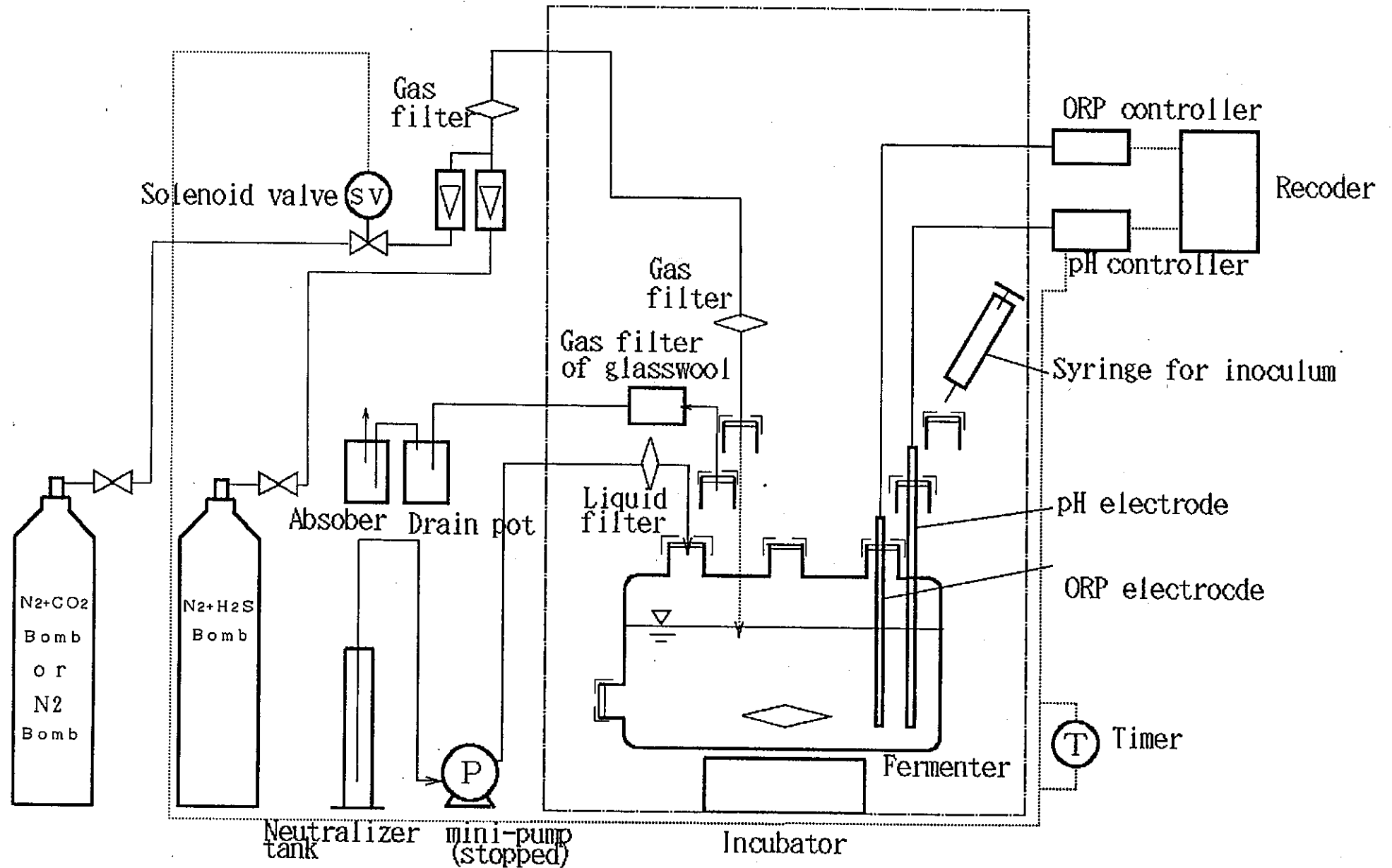


Fig.3-1 Test apparatus for measuring the tolerance of MPB (for low Eh operation)

Methanosarcina barkeri DSM 804

Temperature 35 °C

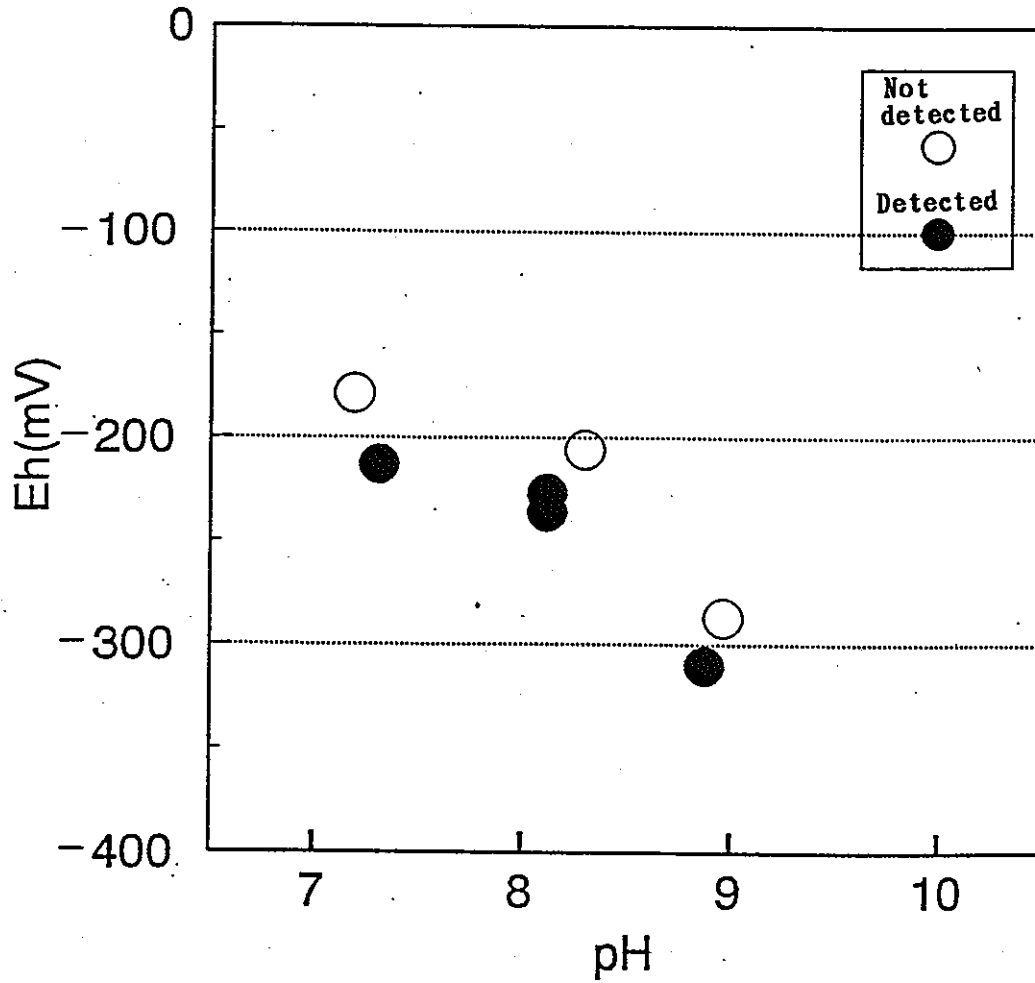


Figure 3-2 Chart of active range of Methanosarcina barkeri