

限定資料

人工バリア材料に対する
微生物の影響評価研究(II)

— 概要書 —

(動力炉・核燃料開発事業団 研究概要)

技術資料		
開示区分	レポート No.	受領日
ㄨ	J1150 95-007	1995.6.15
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

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

限 定 資 料

PNC ZJ1150 95-007

1 9 9 5 年 3 月

人工バリア材料に対する微生物の影響評価研究（Ⅱ）

石川島播磨重工業株式会社

要 旨

放射性廃棄物の処分に際し、微生物の人工バリアへの影響を評価することを目的に研究を行った。TRU廃棄物の処分を想定したアルカリ環境での硫酸塩還元細菌（SRB）のpH耐性試験を行い、pH11がSRBの生育限界であることを確認した。また、銅のオーバーパックを用いた場合に考えられる銅イオンのSRBに対する増殖阻害効果確認の予察試験及び文献調査を実施し、阻害濃度のまとめを行った。さらに、乾燥状態の圧密ベントナイト中への微生物の移行について、実験方法や測定方法の検討と予察試験を行い、試験手法における今後の取組課題を抽出した。また、TRU処分にあたって考慮すべき微生物として脱窒細菌を挙げ、その培養方法等を文献調査し、耐性領域図作成試験への適用を検討すると共に、鉄酸化細菌、鉄還元細菌についても同様の調査、検討を行った。

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：060D0219

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

（間野 正）

Limited Distribution

PNC ZJ1150 95-007

March, 1995

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

Ishikawajima-Harima
Heavy Industries Co.,Ltd.

A b s t r a c t

Biological tolerance of Sulfate-Reducing Bacteria(SRB) under alkaline condition, assuming geological disposal environment of TRU wastes, was studied. The upper limit of growth range of tested SRB was pH 11. Considering copper-made container, inhibition effects of copper ions on SRB activity was investigated through preliminary test and literature survey, then inhibition concentration of copper ions was considered. Also a preliminary test was performed to observe migration behavior of bacteria through compacted bentonite. Considering the TRU wastes disposal, methods of incubation and its active range measurement for denitrifying bacteria were surveyed with those of Iron-Oxidizing Bacteria and Iron-Reducing Bacteria.

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

Contract No. : 060D0219

PNC Liaison : Geological Isolation Technology Section,

Tokai Works

(Mano Tadashi)

1. まえがき

TRU廃棄物は微生物の栄養源となる有機物を豊富に含有するため、処分システムの性能を評価する上で、微生物活動の影響を把握する必要がある。TRU廃棄物の人工バリアの一つとしてコンクリート（高レベル廃棄物の場合はベントナイト緩衝材）が考えられており、その存在によって処分環境が高pH領域（10～13）になると予想される。硫酸塩還元細菌（SRB）は、地層処分場のような地下で想定される嫌気的な環境で増殖し活動することができ、また増殖して活動すれば腐食などに影響することから、処分における微生物の活動を評価する際の重要な細菌である。このSRBの高pH環境での耐性を調べるため、本年度は高アルカリ領域に耐性のあるSRBを選定し、還元性雰囲気条件（低Eh）を設定（温度は一定）して増殖の有無を確認し、pHに対する耐性試験を実施した。

高レベル放射性廃棄物のオーバーパック材料として銅の検討も行われている。本研究では、銅イオン共存下でのSRBの生息を調べる試験を予察的に行い、文献調査による情報も合わせてSRBの増殖に対する銅イオンの阻害濃度のまとめを行った。

また、TRUの処分環境を考慮して今後評価を行っていく必要のある細菌として脱窒細菌を挙げ、これらの細菌の耐性領域図作成試験への見通しを立てるため、その培養手法、増殖検出手法等について文献による調査、検討を行うと共に、鉄還元細菌、鉄酸化細菌についても人工バリアへの影響を鑑み、同様の調査を行った。

さらに、本年度初めての試みであるが、人工バリアである圧密ベントナイト中の微生物の移行実験方法を検討し、選定した微生物を用いて実験によりその方法の妥当性を確認する予察試験の実施、及び得られたデータについて検討評価を行った。

本年度の研究項目をまとめると、以下の通りである。

- ・SRBの高pH領域（10～13）のpH耐性領域図作成試験
- ・銅イオンのSRB阻害効果の予察的試験
- ・脱窒細菌及び鉄還元細菌、鉄酸化細菌の耐性領域図作成試験の調査・検討
- ・圧密ベントナイト中の微生物移行の実験方法・予察試験

2. 試験方法

2.1 SRBの高pH領域(10~13)のpH耐性領域図作成試験

ベントナイト、土壌からロールチューブ法で単離したアルカリ耐性IHI 75-12菌株を試験用に選定した。

選定したSRBについて、嫌気性ファーメンター(図2.1-1)を用いてそのSRBに適した高アルカリ、還元性環境(低Eh)条件における高アルカリ側(pH10~13)の中の3点を設定し、増殖の有無を測定した。

温度35℃の恒温槽にて還元性ガスを通気しpHをコントロールしながら増殖を促し、菌の増殖に伴うH₂Sの発生とFeSと菌体との混合濁度の増加と、黒変化の目視により増殖の判定を行った。

2.2 銅イオンのSRB阻害効果の予察的試験

SRB(Desulfovibrio desulfuricans(ATCC)7757)菌を用いてガスヘッドを窒素置換した試験管の中性pH培地における銅イオンの阻害効果を以下の手順で調べた。

- ①銅イオン濃度条件を大まかに変化させ、予備的培養テストを実施する。培地中のFeがH₂Sと反応してできる黒変があればSRBへの阻害がないと判定する。
- ②次に、銅イオンの阻害を検知した濃度の近傍における増殖阻害効果を調べるため、特製セル付き試験管などを使って菌増殖の目安となる黒変および菌体濁度を経時的に測定する。
- ③実験に供したSRB菌に対する阻害の結果を文献調査による情報も合わせて阻害濃度のまとめを行う。

2.3 脱窒細菌及び鉄還元細菌、鉄酸化細菌の耐性領域図作成試験の調査・検討

脱窒細菌及び鉄還元細菌、鉄酸化細菌の培養手法、増殖検出手法等について以下のような観点で調査を行った。

①種類及び基質利用性の調査

これらの微生物の種類として報告されているもの及び利用できる基質を調査する。

②pHなど環境条件に対する生息範囲の調査

これらの微生物の生息できる最大pHとして報告されているものなど環境条件に対する生息範囲を調査する。

③培地など培養方法の調査

これらの微生物の培地等、培養方法として報告されているものを調査する。

④増殖・活性検出方法の調査

これらの微生物の増殖量または活性を検出する方法を調査検討する。

以上の調査、検討をもとに各々の微生物の耐性領域図作成への見通しをつける。

2.4 圧密ベントナイト中の微生物移行の実験方法・予察試験

以下の各操作における方法的検討と予察試験を行った。

①圧密ベントナイト（クニゲルV1）における微生物移行確認用の試験装置の検討および製作。（図2.4-1）

②ベントナイトの成形前の殺菌操作（紫外線照射と、乾燥器による70℃×1時間2回の加熱殺菌を併用した。）

③試験体の成形。成形体の寸法は、50mmφ×25mmHとした。

④微生物菌の選定と培養（選定に際しては、微生物の大きさ、耐性、測定の簡便さ、標準的などの条件を考慮する。）

⑤試験装置セット（ベントナイトを容器へ設置、容器上部からの菌の培養液の滴下、培養菌のけん濁液上部浸潤、放置観察）

⑥菌体の内部移行の有無測定。

液浸潤後、試験容器からベントナイトを押し出し、成形体、切断片、部位などの検証を行った。成形体は図2.4-2に示すようにスライスした。

⑦切断片における培養の実施と菌数計測。

3. 結果と考察

3.1 SRBの高pH領域（10-13）のpH耐性領域測定試験

実験により、本試験で用いたアルカリ耐性のSRBの高pH領域（10-13）の増殖領域は、表3.1-1に示すようにpH10では-270mV以下のEhで菌の増殖が植菌後2、3日で見られた。またpH11では、これより更に低い-360mV以下のEhで辛うじて菌の増殖が見られるが、このpHを長時間おいた場合は菌の死滅に繋がるようであった。しかしpH12、13では-360mVの低いEhでも全く増殖が認められなかった。これらをまとめたpH耐性領域図を図3.1-1に示す。

3.2 銅イオンのSRB増殖阻害効果に関する予察試験

予備テストの後に特製光度計セル付き嫌気性培養試験管を使って各銅イオン濃度におけるSRB菌(Desulf. desulfuricans、ATCC 7757)の増殖阻害効果を検証した。菌の増殖は培養後菌の増殖に伴う菌体と黒変の濁度を経時的に測定する方法と目視により検知した。結果をまとめて表3.2-1に示す。

銅イオンのSRB菌増殖阻害は結論として銅イオンで65~100ppm以上(硫酸銅液約200~300ppm)で完全に阻害される。また銅イオンで50~25ppmにおいてSRB菌の発育遅延効果が認められた。

また、文献調査の結果より、他のSRB菌群の銅イオンによる最小阻害濃度(増殖阻害を示す最小濃度)は、硫酸銅の値では20から50ppmであり、今回のSRB菌の結果も同様の濃度で亜鉛などに比べてかなり強く阻害されることが分かった。また他の菌類の銅イオンの阻害は、最小阻害濃度が200~400ppmであった。

3.3 脱窒細菌及び鉄還元細菌、鉄酸化細菌の耐性領域図作成試験の調査・検討

脱窒細菌、鉄還元細菌、鉄酸化細菌について、その種類、pHに対する生息範囲、培養方法、増殖・活性検出方法等について文献調査を行った。

脱窒細菌は、培養は容易であるが、脱窒していることの確認とEhの制御を同時に行うことが困難であると予想される。脱窒確認しなければ、キャリアガスを用いてEh制御が可能である。

鉄還元細菌は、国内での研究事例が少なく、また報告されている菌も少ないため菌株入手等検討の必要がある。入手ができない場合は独自に単離する必要があり、耐性領域図作成試験よりも菌の選定で非常な時間を費やすことになる。増殖の検出は濁度による測定が難しいが、活性の検出にはFe(II)生成の測定と細胞数増加測定を併用することで対応可能である。

鉄酸化細菌は、pH<4ではFe²⁺の減少、Fe³⁺の増加で活性をみるのが一般的であるが、pH>4では化学的なFe(II)の酸化があるのでそれと区別するため、Fe²⁺や鉄沈積物の測定の他に酸素抑制など特別な工夫が必要である。

3.4 圧密ベントナイト中への微生物の移行に関する実験方法・予察試験

3.4.1 実験・測定方式の検討

圧密ベントナイト（クニゲルV I）緩衝材を用いて微生物の透過実験法を掴むためにテストを行った。試験に用いる細菌として大腸菌を選定したが、大腸菌を選定した理由は、細菌の中では比較的小型である事と菌の増殖が嫌気、好気の条件でも生育が可能なためである。

細菌の透過の可能性を見るため、材料、器具類の滅菌およびできる限り操作処理上雑菌の混入に対する注意を払った。菌液には色素（エオシン）やpH指示薬（BTB）を含有させて、これによりベントナイト中への液の透過を明確にさせる事ができた。

実験開始後、液面先端は20日前後で成型体の底部に達した。試験容器からのベントナイトの抜き出し及び試験体の切り出しについては、容器と同径のシリコン栓による押し出し、また試験体の切り出しは底部から行うことによって雑菌による汚染を防いだ。

菌数の測定方法を検討した結果、10倍液の希釈方法でコロニーを計測することができたが、試験体によっては培養の結果カビ等の混入が見られた。

3.4.2 圧密ベントナイト中の微生物の移行の予察試験

前項での実験方法及び測定方法を用いて、圧密ベントナイト中への大腸菌の透過・移行の有無を確認する予察試験を実施した。本試験では乾燥したベントナイトから始めて、培養液が浸潤していく過程での微生物の移行の様子を、ベントナイト供試体の各部位での菌数を測定することにより評価した。結果の代表例を表3.4-1に示す。表の様に、ベントナイト供試体の上部から底部に向けて菌数が低下していく傾向が見られ、本試験の条件下においては、圧密ベントナイト中へ微生物が移行する可能性が示された。

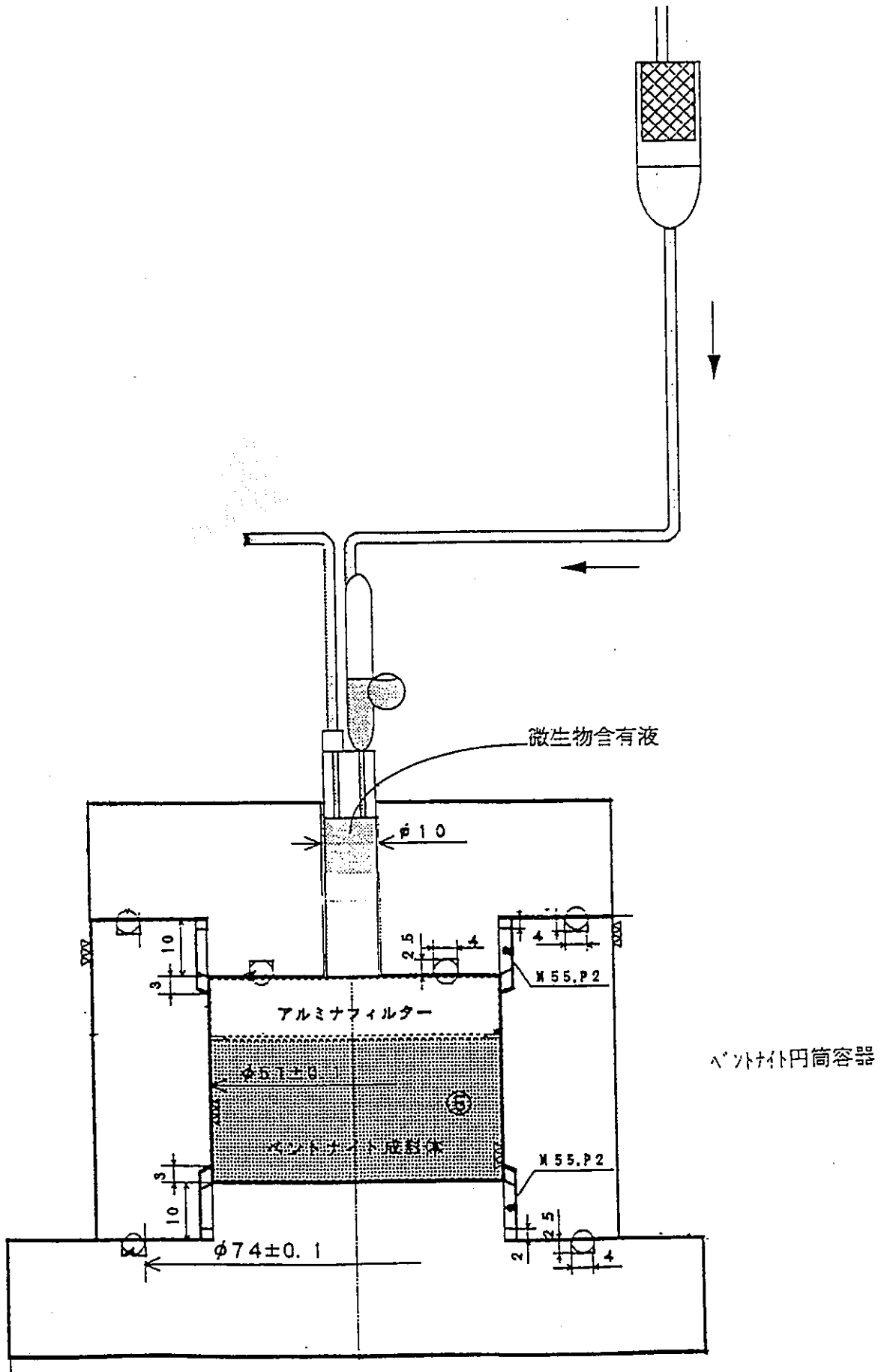


図2.4-1 圧密ベントナイトの微生物透過試験 概要図

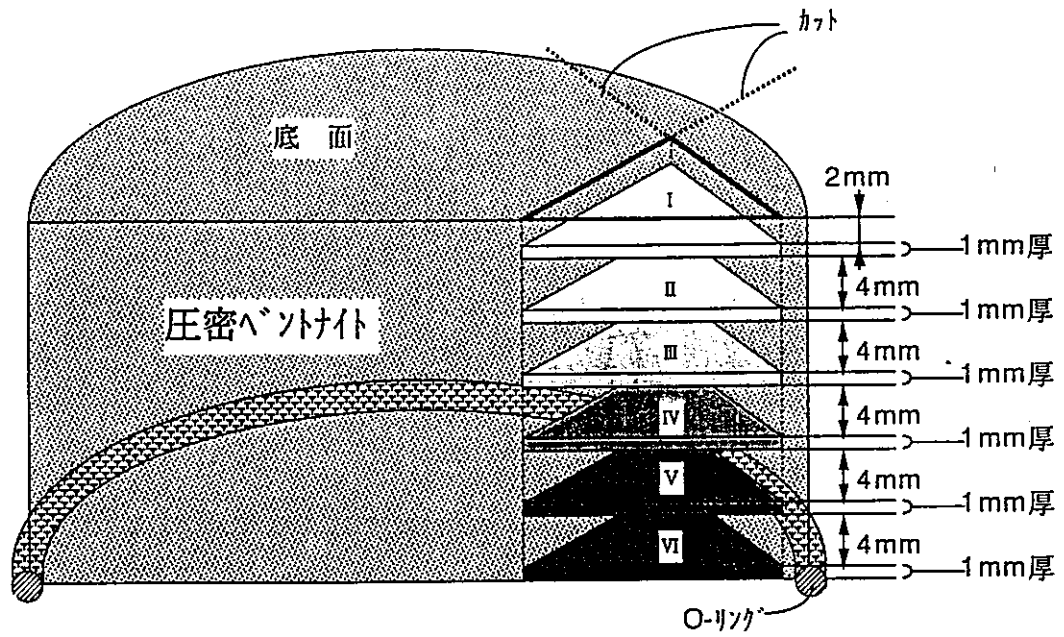


図2.4-2 ベントナイト検体の切り出しの概説図

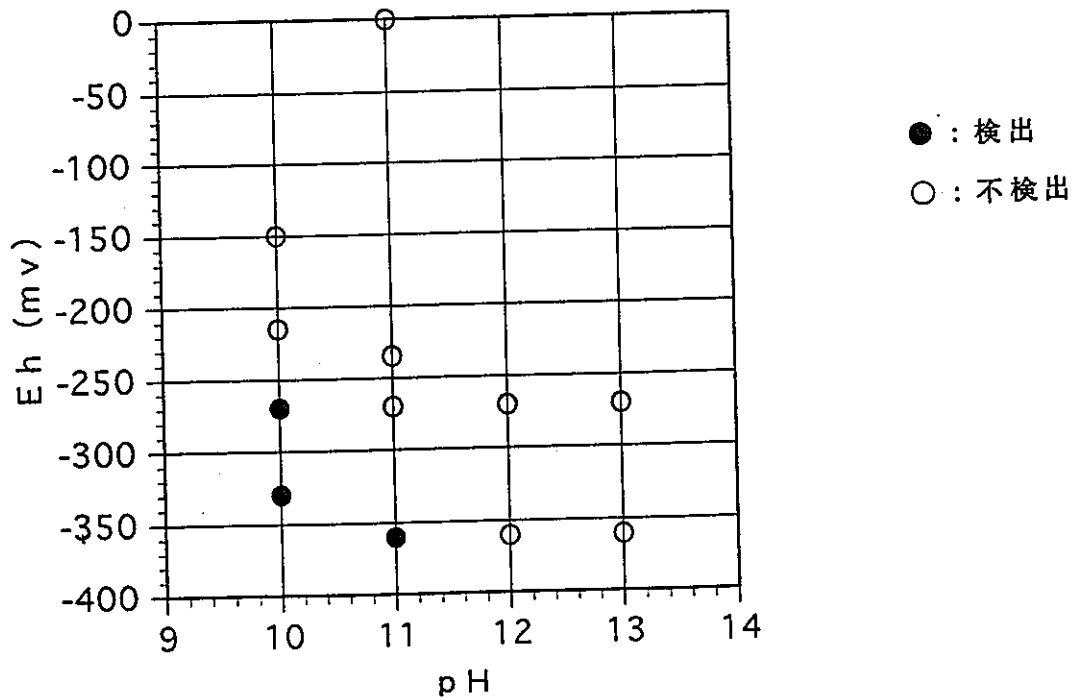


図3.1-1 SRBの高pH側(10-13)における耐性領域図

表3.1-1 SRBの高pH領域(10-13)のpH耐性領域測定結果

	Eh (mv)	増殖判定
pH 10	-330	++
	-270	++
	-215	-
	-150	-
pH 11	-360	++
	-270	-
	-235	-
	0	-
pH 12	-360	-
	-270	-
pH 13	-360	-
	-270	-

++ : 十分増殖、- : 増殖なし。

表3.2-1 銅イオンのSRB増殖阻害試験結果

銅イオン濃度 (ppm)	254	127	63.5	25.4	12.7	0
硫酸銅・5水和物 (ppm)	1000	500	250	100	50	0
培養日数						
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	+	++
3	-	-	-	±	++	++
8	-	-	-	++	++	++

++ : 十分増殖、+ : 増殖、± : 僅かな増殖 - : 増殖なし。

表3.4-1 圧密ベントナイト検体の各層における菌数測定結果例

ベントナイト検体(0.2g)中の菌数($\times 10^2$)				
試験No.		1 (15日投与)	3 (28日投与)	
寒天培地		一般性菌数用	一般性菌数用	LB
ベ ン ト ナ イ ト 層	底部 I	0	0	0
	II	-	-	70
	III	9	121	43
	IV	-	1670	922
	V	30	2404	2200
	VI	5910	3306	2290

- : 測定データなし。