

PNC ZJ1150 97-005

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(Ⅳ)

(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
又	J1150 97-005	97.8.28
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		

1997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。従ってその取扱い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、引用等には、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い合わ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 97-005

1997年3月

## 人工バリア材料に対する微生物の影響評価研究 (IV)

石川島播磨重工業株式会社

### 要旨

耐アルカリ性メタン生成細菌の調査の結果、いくつかの細菌において、pH9 以上で生育することが分かった。脱窒細菌については、pH9.5 以上では活性がないことを確認した。

メタン生成菌及び脱窒細菌によるガス発生量の測定のため、栄養素を変えた条件で集積培養を開始し、いくつかの条件でガスが発生していることを確認した。

微生物のベントナイト中の移行挙動の評価を行った。この結果、圧密密度  $1.2\text{g/cm}^3$ 、ケイ砂を 50wt.% 混合したベントナイトについては、透過する可能性があることが分かった。ベントナイト 100wt.%、圧密密度  $1.8\text{g/cm}^3$  では、透過が観察されなかった。

硫酸塩還元細菌と Pu, Np の共存条件における硫酸塩還元細菌に対する Pu, Np の分配係数(Kd)は、滅菌した場合よりしない場合の方が高い値を示した。また、この傾向は、ベントナイト共存下においても同様であった。

---

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 : 080D0286

事業団担当部課室および担当者 : 東海事業所 環境技術開発部 地層処分開発室

(石川 博久)

Commercial Proprietary  
PNC ZJ1150 97-005  
March, 1997

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

Ishikawajima-Harima  
Heavy Industries Co., Ltd.

Abstract

Study on biological activities of methane-producing bacteria showed that some bacteria can growth under alkaline condition over pH 9. And, no activity of denitrifying bacteria was showed before pH 9.5.

Enriched culture of methane-producing bacteria and denitrifying bacteria for experiments of gas generation were carried out on some nutriment conditions, and gas generation were observed at some samples. Migration test of bacteria through compacted and saturated bentonite was performed. The results shows that bacteria migration was observed in the bentonite(contain 50wt.% silica sand) and not observed in the bentonite(100wt.% bentonite).

The interactions between sulfate reducing anaerobic bacteria and plutonium (Pu-239) and neptunium (Np-237), with or without bentonite present, were investigated using distribution coefficients as an index of the radionuclide behavior. Distribution coefficients (Kd) of plutonium and neptunium for living bacteria shows larger value than for dead bacteria without bentonite present, this tendency was same as with bentonite present condition.

---

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

Contract No. : 080D0286  
PNC Liaison : Geological Isolation Technology Section,  
Tokai Works  
(Hirohisa Ishikawa)

## 目次

1. まえがき.....	1
2. 試験.....	2
2.1 メタン生成細菌及び脱窒細菌耐性領域図作成.....	2
2.2 メタン生成細菌及び脱窒細菌の生長に伴うガス発生量の測定.....	11
2.3 微生物の圧縮ベントナイト中の移行性の検討.....	14
2.4 硫酸塩還元菌等の作用による Pu, Np の酸化還元状態の検討.....	18
2.5 ベントナイトへの Pu, Np の吸着に及ぼす硫酸塩還元菌等の影響調査.....	25
3. まとめ.....	33
4. 今後の課題.....	34
参考文献.....	36

## 1. まえがき

これまで地層処分場における微生物の活動を評価するため、メタン生成細菌（MPB）、硫酸塩還元細菌（SRB）等の耐性領域図を作成してきた。メタン生成菌については、これまで作成した耐性領域よりもさらに高いアルカリ性条件で生息するメタン生成菌がいることが言われており、このような細菌の入手の可能性について調査を行った。脱窒細菌について平成6年度に文献調査を行い、平成7年度においては、この脱窒細菌の耐性領域図を作成するために必要となる活性の測定方法について検討を行った。本年度は、これまでの成果を基に耐性領域図の作成に必要なデータの取得を行った。

地層処分場の微生物活動を評価するにあたって、重要な項目の一つとして、処分場の外側にいる微生物が人工バリア材として使用されている可能性が高いベントナイトを通過して廃棄体に到達し、悪影響を及ぼさないかどうか、もしくは元から処分場内にいる微生物が核種の移行媒体となり、ベントナイトを通過して核種の移行を促進するかどうかの問題になる。つまり、廃棄体の周りに設置されるベントナイト層中を微生物が移行することができるのかどうかということである。これに関する試験として、ベントナイト中の微生物移行試験を平成6年度及び7年度に引き続き本年度も試験パラメータを変えて実施した。

## 2. 試験

### 2.1 メタン生成細菌及び脱窒細菌耐性領域図作成

#### 2.1.1 メタン生成細菌

##### (1) メタン生成細菌の調査

耐アルカリ性メタン生成細菌の入手を検討するため、メタン生成細菌に関し世界で最もレベルの高い菌株保存機関のDSM(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen)のDr. Hippe、地下の微生物学研究をリードするスウェーデン Goteborg 大学の Dr. K. Pedersen、および国内での耐アルカリ性メタン生成細菌研究の草分け的存在である三菱電機の中津川博士とコンタクトまたは論文収集し、耐アルカリ性メタン生成細菌の菌株として次の9株をリストアップした。

- a) *Methanobacterium alcaliphilum* DSM 3387 (至適 pH 8.1-9.1) (1)(2)
- b) *Methanobacterium alcaliphilum* DSM 3457 (至適 pH 8.1-9.1) (1)(2)
- c) *Methanobacterium alcaliphilum* DSM 3458 (至適 pH 8.1-9.1) (1)(2)
- d) *Methanobacterium alcaliphilum* DSM 3459 (至適 pH 8.1-9.1) (1)(2)
- e) *Methanohalophilus zhilinae* DSM 4017 (pH 9.2-9.4) (1)(2)
- f) *Methanohalophilus zhilinae* DSM 9543 (pH 9.2-9.4) (1)(3)
- g) A8p 株 (菌株の分類学的な面は未公表) (pH 7.0-9.2) (4)
- h) C2BIS 株 (菌株の分類学的な面は未公表) (4)
- i) NY-728 株 (*Methanosarcina*?) (pH 7.0-9.2) (5)

以上の報告の中では、純粋培養メタン生成細菌が増殖できる最高pHは9.4である。pH9.4で増殖するメタン生成細菌は好塩性であり、食塩または食塩と炭酸塩の混合物を30-40 g/L含む培地で培養される。好塩性でないメタン生成細菌はpH9.2での増殖が報告されている。一方、A8p株もNY-728株もpH9.5では増殖が確認されなかった。

しかしながら純粋培養では増殖できなくても他の微生物が共存すれば増殖できる可能性は十分ある。そういう自然環境として、砂漠などにあるSoda Lake(塩分とアルカリを大量に含む湖)や類似の水質の地下水の調査例を調べた。

Lake Magadiの例<sup>(3)</sup>を紹介する。この湖のpHは渇水時には10.2であるが満水時には11以上にもなることがある。水温は渇水時に55°Cに達することがある。そこから

の10点の試料に26種類の基質が加えられて耐アルカリ性微生物群の増殖が調べられた。pH9.8-10.2に調整された培地で蟻酸からとメタノールからのメタン生成が確認された。pH12.9の場所では従属栄養細菌や硫酸塩還元細菌の存在は確認されたが(Activeかどうかは不明)、メタン生成細菌は検出されなかった<sup>(6)</sup>。

以上からメタン生成細菌のアルカリ耐性をまとめると、純粋培養では pH9.4 まで、Soda lake では pH10 まで耐えられるが pH12.9 では死滅するらしい。

## (2) フィールドサンプリングによる細菌の探索・調査方法の検討

### (a) 地下微生物のサンプリング法<sup>(7)</sup>

1987年に米国エネルギー省は、サウスカロライナ州の核物質処理工場のあるサバナ川の近くで何本か掘削を行って、地下深くに棲息する微生物の研究を開始した。トレーサー物質をつねに加えながら、地中のコアサンプルが地表にあがってくると、嫌気性微生物を殺さないように窒素ガスで満たされたグローブボックスの中で同じく窒素ガスを充填したコンテナにサンプルは封入され、72時間以内に研究所に送られて岩石の中にいる微生物を検出する一連の試験が行われた。その試験後、サンプルから分離された微生物はフロリダとオレゴンにある微生物保存施設で零下196℃の液体窒素中で保存されている。

### (b) 地下微生物の検出・調査方法

#### (i) 培養法<sup>(8)</sup>

古くから微生物を培養して数を増やし、間接的に元のサンプルに含まれていた微生物やその数を推定する方法が広く用いられてきた。培養法は、細菌にとっての現場の環境条件を再現することが難しいこと、与えられた条件下で一定量以上増殖するものだけコロニー形成や濁度によって検知されるという検出感度の低いことが欠点である。

#### (ii) 蛍光染色法

蛍光染色法は、顕微鏡観察による微生物の検出感度ならびに分解能を飛躍的に高めることをその特長としている。具体的には微生物中の核酸(DNA)と非特異的に結合する蛍光色素(アクリジンオレンジやDAPI)を用い落射蛍光顕微鏡装置で全微生物を検鏡検出する方法<sup>(8)</sup>や、次に述べる in Situ (原位置)ハイブリダイゼーション法<sup>(9)</sup>など



がある。

(iii) 遺伝子増幅による微生物の検出・分類法<sup>(9)</sup>

遺伝子増幅法は、1980年代の終わりに発明された技術(PCR法:ポリメラーゼ・チェーン・リアクション法)で、試験管の中で数時間のうちにある特定の遺伝子(DNA配列又はRNA配列)を数百万倍に増幅(コピーを作る)できるものである<sup>(10)</sup>。この技術の応用範囲はたいへん広いが微生物の高感度検出さらには分類にも利用される。

(c) まとめ

微生物の検出・調査方法のそれぞれの特長と限界について表 2.1-1にまとめた。

このように微生物の検出・調査方法は一つの方法だけで完結するものではなく、それぞれを組み合わせて総合的な調査結果を得ることができる。

その試験フロー案について図 2.1-1に示す。

表 2.1-1 微生物検出方法の特長と限界

	培養法	蛍光染色法	遺伝子増幅法
特長	微生物による反応(核種吸着、ガス発生等の活性)を確認するためには必須の方法。	検出感度が高い。遺伝子プローブを用いる事によって微生物種特異的な検出が可能。	検出感度が高い。未知の微生物に遭遇しても分類作業を進めながら対応できる。
限界	現時点で培養できる微生物は、全微生物の十分の一程と考えられる。従って感度が低い。	微生物による反応は確認できない。(培養試験が必要)	微生物による反応は確認できない。(培養試験が必要)

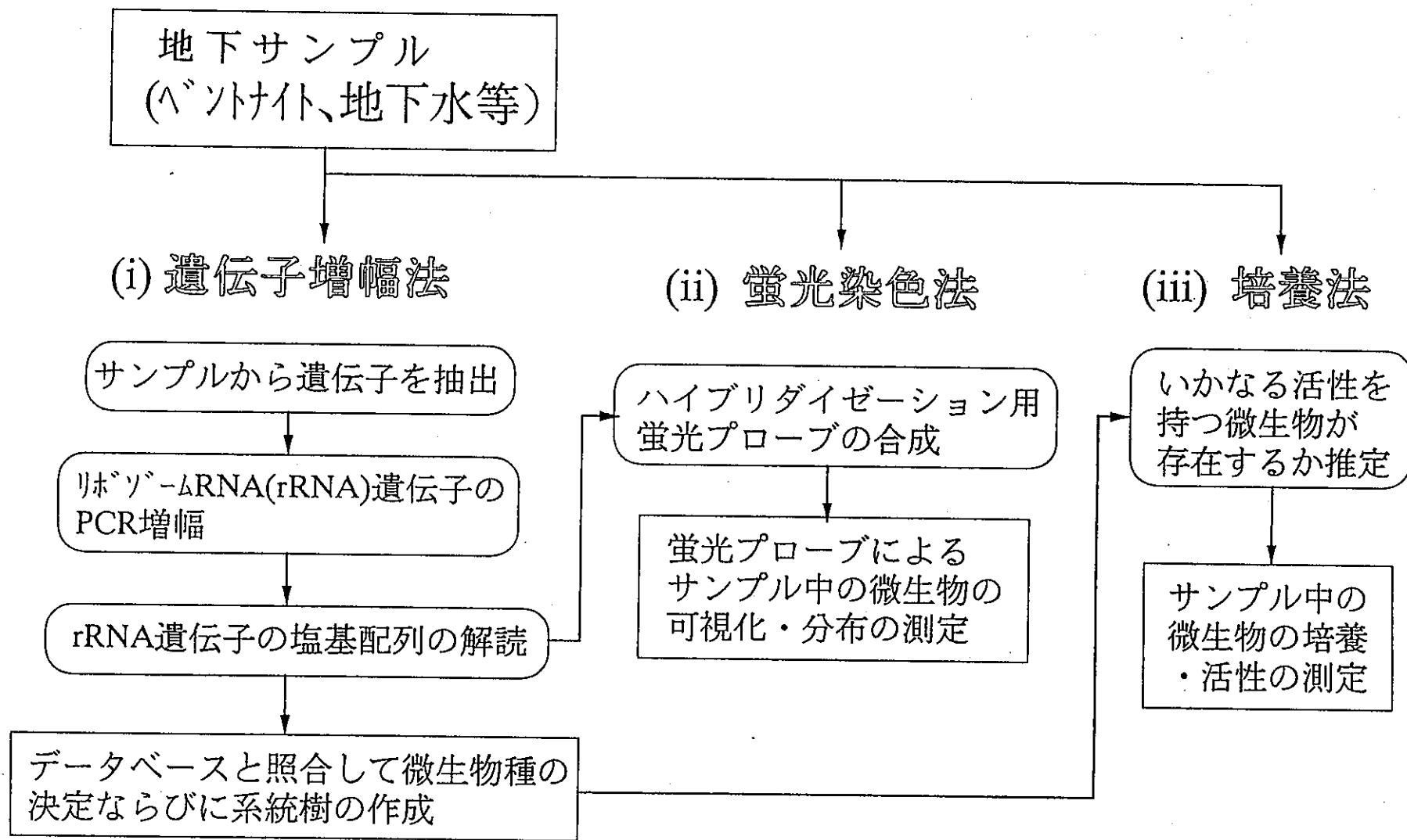


図 2.1-1 微生物の検出・調査試験フロー

## 2.1.2 脱窒細菌<sup>(1)</sup>

### (1) 試験方法

脱窒細菌に関しては、耐性領域図を作成することを目的として以下の条件で試験を実施する。

#### (a) 培地及び培養

前年度に従い、選定脱窒細菌(*Pseudomonas denitrificans* IFO No.13302)の培地及び培養法に基づき、500ml 培養槽を用いて He ガス通気 (Eh モニタリング)、温度 35°C の条件下で、また pH は希塩酸と水酸化ナトリウム溶液で 6.5, 7.5, 8.5, 8.8, 9.0, 9.5, 10 に制御して、各々の一定 pH で菌の培養を行なう。

#### (b) 脱窒活性測定

各 pH の培養菌を用いて前年度の活性測定法に準じて脱窒活性を測定する。図 2.1-2 に活性測定操作手順を示す。

#### (c) 処分環境における脱窒細菌の耐性領域図作成

上記の試験による結果より、*Pseudomonas* 菌の嫌氣的条件下における活動 pH 領域と脱窒活性を指標として耐性領域図を作成する。

### (2) 試験結果と考察

#### (a) 脱窒菌の耐性領域図作成

##### (i) 各 pH における脱窒菌の増殖

この菌の増殖は、中性 pH で最も速く、また、図 2.1-3 に示すように増殖菌体量も多くなった。アルカリ側 pH9.5 以上では全く増殖せず、pH9 で若干増殖した。

##### (ii) 脱窒活性 pH 耐性領域図

図 2.1-4, 図 2.1-5 に脱窒活性を指標とした脱窒菌の pH 耐性領域を図示する。

本菌は pH 中性領域に脱窒活性が高いが、pH9 ではこの活性は 10%程度、それ以上ではアルカリ側で活動しないことが明らかである。また、地層処分環境下では、硝酸、亜硝酸塩も少ないと思われるので、ガス発生は負の方向にあるものと思われる。

##### (iii) まとめ

脱窒菌, *Pseudomonas denitrificans* を pH6.5 から 10 までの範囲で He ガス通気下で

培養を試みて、その増殖の程度と増殖菌体の培養 pH 条件での脱窒活性を調べた。これにより、以下のことが判明した。

- ① 本菌の生育は中性 pH 域で増殖が盛んで、pH が高くなると増殖速度と菌体の両方で少なくなり、pH9.5 以上では全く生育しない。
- ② 各 pH 培養菌と同じ pH 条件下での脱窒活性は pH7.5~8.5 が高い。pH9 では 20%~30%以下に低下するが、pH9.5 以上では菌の生育すらない。従って、脱窒活性を示す培養菌体は、増殖の生理状態が脱窒反応系に向いていさえすれば、Eh よりも pH に大きく依存することが推論された。今後の課題として、Eh 培養条件の違いによる脱窒活性を知ることが残る。
- ③ 地層処分環境での脱窒では、この他に脱窒の源となる硝酸、亜硝酸塩が問題となる。

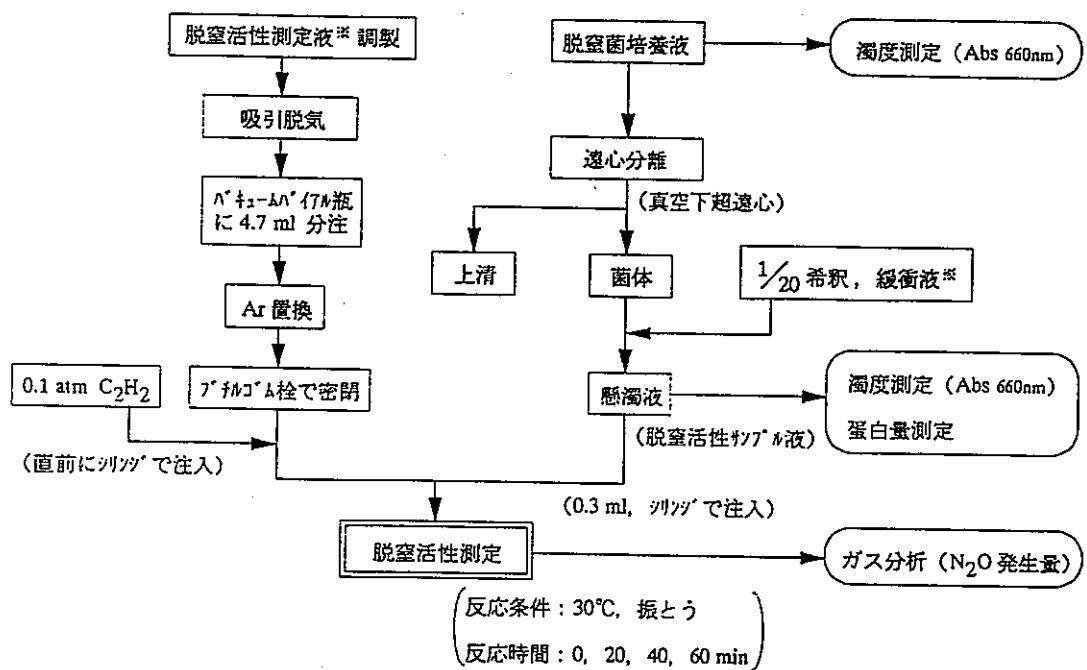


図 2.1-2 脱窒活性測定操作手順

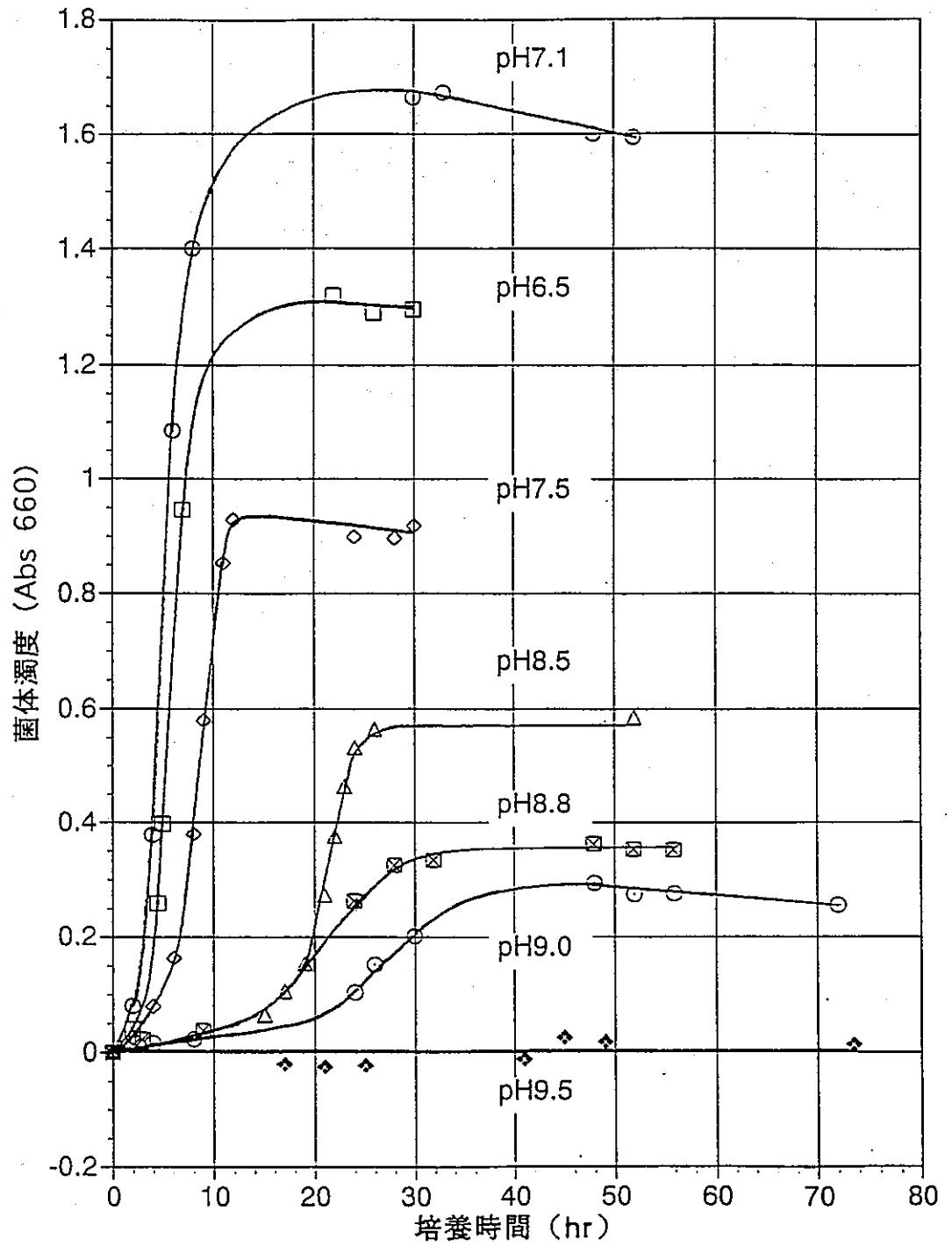


図 2:1-3 各 pH 条件における菌体の増殖曲線

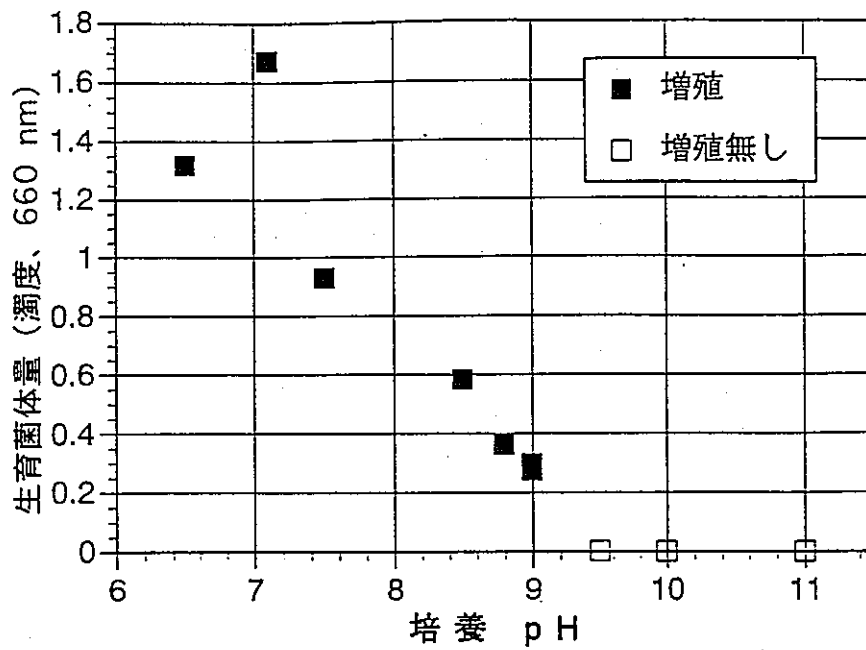


図 2.1-4 脱窒菌の嫌氣的増殖能を指標としたpH耐性領域図

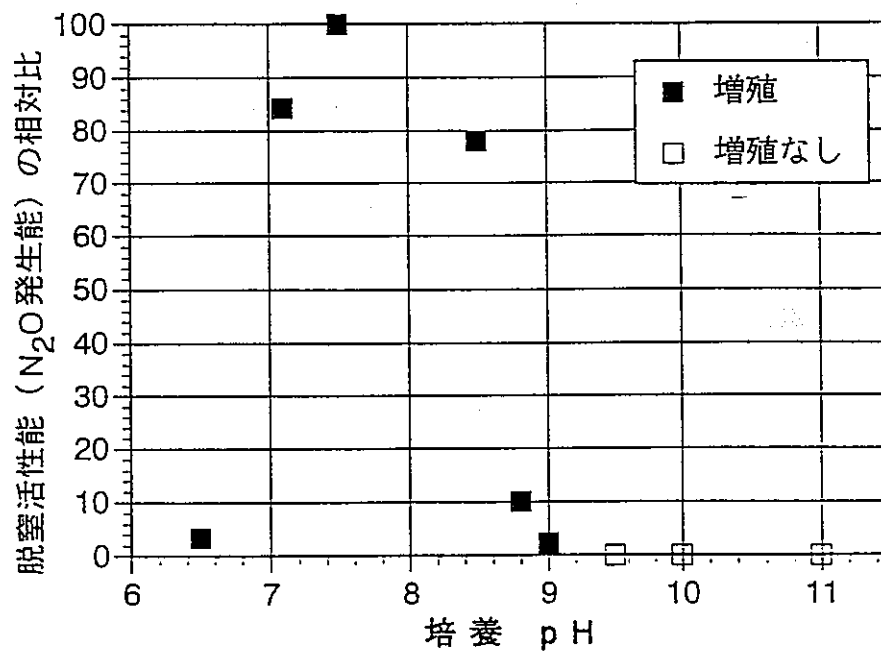


図 2.1-5 脱窒菌の脱窒活性能を指標とするpH耐性領域図  
(相対活性能 : 定常期の活性値 × 菌体増殖量)

## 2.2 メタン生成細菌及び脱窒細菌の生長に伴うガス発生量の測定

### (1) 試験方法

#### (a) 集積培養実験手順

実際の集積培養実験は、600mlバイアル瓶にて図 2.2-1の実験手順に従って行った。また、種となる土壌は、多摩川・大師橋付近の底泥を用い、35℃で培養した。

### (2) 試験結果と考察

試料ならびに窒素ガスをバイアル瓶に封入してから、2ヶ月後のバイアル瓶内のガス組成を表 2.2-1に示す。

メタンガスは、(酢酸、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、pH 7.0)、(セルロース、 $\text{KNO}_3$ 、pH 7.0)、(セルロース、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、pH 7.0)、(セルロース、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、pH 10.0) の4条件で発生が認められた。特に(セルロース、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ )では、初期pH10.0の条件でもメタン発生が見られたことから、よりアルカリ性で生育するメタン菌が集積培養された可能性が大きい。しかしながら、現時点での培養液のpHを測定しておらず、バイアル瓶も開封していないので、詳細は今後の実験で確認が必要である。

有機物としては、セルロースが一番メタンガス、炭酸ガスの発生を多く見た。しかしながら、フミン酸においても酢酸と同等のガスが発生したことから、フミン酸を資化する(栄養源とする)微生物も地層中に多数存在すると考えられる。

炭酸ガスの濃度は、pH10.0の培養瓶では低い値が測定されたが、それは炭酸塩として培養液に溶解したためと考えられ、瓶内炭酸ガスの総量を測定するためには、培養液のIC(無機炭素)量を測定する事が必要である。

酸素ガスも多くの瓶で百分の数パーセントほど測定されたが、それはシリンジ(注射器)によりバイアル瓶からサンプリングして、ガスクロマトグラフィー(測定器)に注入する際に大気中から混入したものと考えられる。



表 2.2-1 地下微生物集積培養試験結果

	酢酸	フミン酸	セルロース
KNO <sub>3</sub> pH 7.0	CH <sub>4</sub> : n d	CH <sub>4</sub> : n d	<u>CH<sub>4</sub> : 0.25 %</u>
	CO <sub>2</sub> : 0.12 %	CO <sub>2</sub> : 0.34 %	CO <sub>2</sub> : 1.46 %
	O <sub>2</sub> : 0.04 %	O <sub>2</sub> : n d	O <sub>2</sub> : 0.07 %
KNO <sub>3</sub> pH 10.0	CH <sub>4</sub> : n d	CH <sub>4</sub> : n d	CH <sub>4</sub> : n d
	CO <sub>2</sub> : 0.01 %	CO <sub>2</sub> : 0.01 %	CO <sub>2</sub> : 0.01 %
	O <sub>2</sub> : n d	O <sub>2</sub> : 0.12 %	O <sub>2</sub> : 0.07 %
NH <sub>4</sub> Cl pH 7.0	<u>CH<sub>4</sub> : 3.83 %</u>	CH <sub>4</sub> : n d	<u>CH<sub>4</sub> : 8.79 %</u>
	CO <sub>2</sub> : 0.30 %	CO <sub>2</sub> : 0.35 %	CO <sub>2</sub> : 1.94 %
	O <sub>2</sub> : n d	O <sub>2</sub> : 0.07 %	O <sub>2</sub> : n d
NH <sub>4</sub> Cl pH 10.0	CH <sub>4</sub> : n d	CH <sub>4</sub> : n d	<u>CH<sub>4</sub> : 1.77 %</u>
	CO <sub>2</sub> : 0.01 %	CO <sub>2</sub> : 0.01 %	CO <sub>2</sub> : 0.02 %
	O <sub>2</sub> : 0.06 %	O <sub>2</sub> : 0.05 %	O <sub>2</sub> : 0.03 %

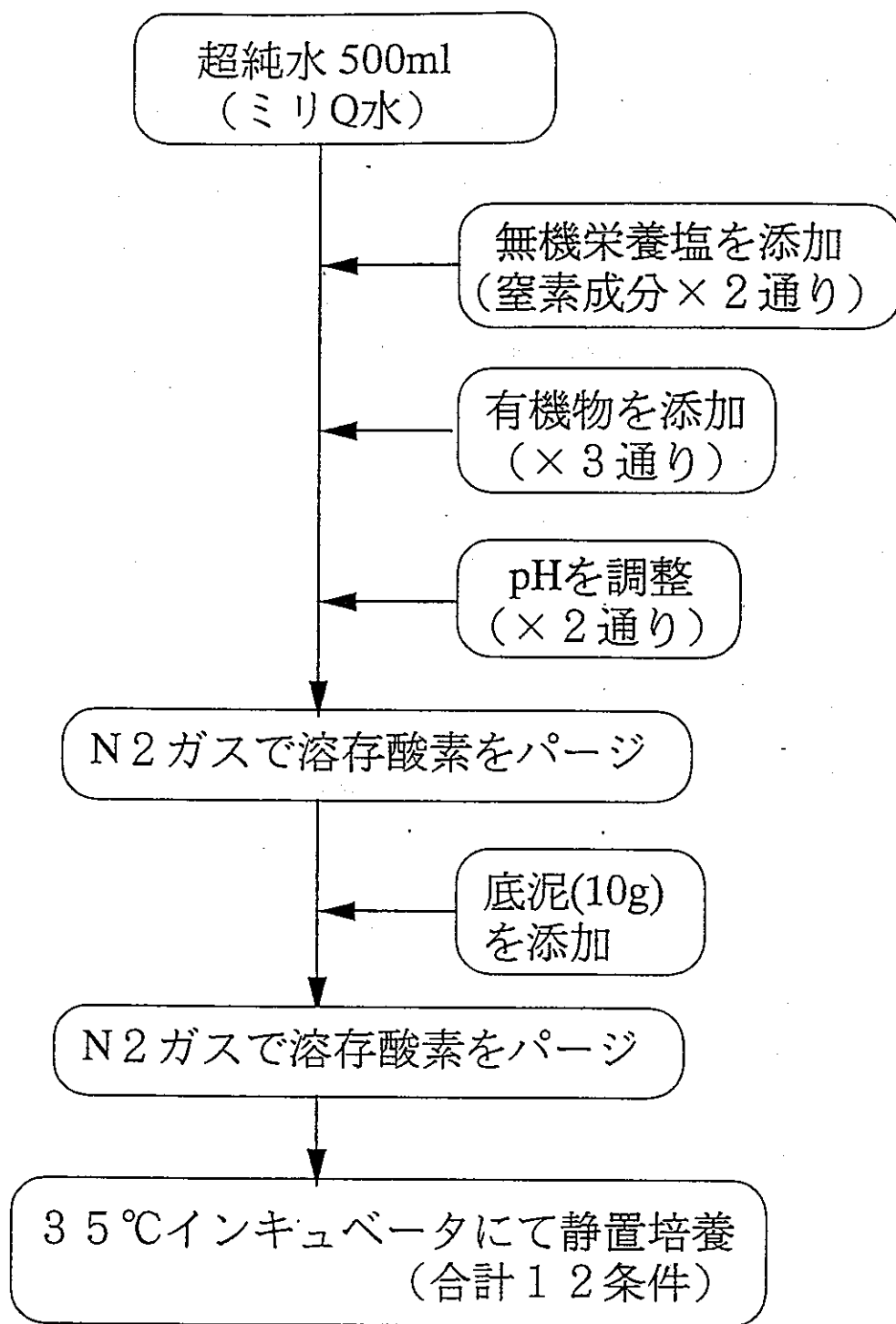


図 2.2-1 集積培養の実験手順

## 2.3 微生物の圧縮ベントナイト中の移行性の検討

### (1) 試験方法

ケイ砂混合率として 50.0wt.%(100wt.%ベントナイト)、乾燥密度として 1.2、1.8g/cm<sup>3</sup> の条件の内、ケイ砂混合率と乾燥密度の組み合わせを検討し、前報に若干の改良を加えた方法で、圧縮ベントナイトでの微生物の透過試験を実施する。また、ベントナイト中を移行した微生物が供給菌と同種であることを確認するための試験を行う。実施する試験内容を以下に示す。

#### (a) 透過試験用微生物及び培地

透過試験用微生物としてアンピシリン耐性大腸菌を選択し、培地は EMB 培地又は LB 培地を用いた。

#### (b) 成型体製作

ベントナイトはクニゲル V1 を、ケイ砂は動燃殿支給品の No.5 と No.3 の粒度のものを均等に混合して使用した。また、成型体の作成時においてもできるだけ雑菌の混入を防ぐようにした。

#### (c) ステンレス製透過試験容器の導入

今回は新たに蒸気滅菌可能なステンレス透過試験容器を製作し、菌の透過試験はベントナイト成型体をセットした試験器を事前に 121℃で 20 分間オートクレーブ処理して試験器中の微生物を滅菌した後に水の膨潤、菌の透過試験を行う。

#### (d) 透過検出微生物の同定

試験体切片より微生物が検知された場合は、その微生物を採取して単離培養を行い、その菌の形態、生理学的特性及び生体成分の生化学的特性分析を行い、供給菌と同種のものであることを確認する試験を行う。

## (2) 試験結果と考察

以下の操作工程で改良を試みた。

### (a) 膨潤化処理工程

今回新たに試験容器をステンレス製にして成型体を設置した後でオートクレーブによる滅菌ができたことで菌の透過処理前の成型体中への雑菌の混入の恐れが大幅に減った。

### (b) 微生物透過結果

#### (i) 100wt.%ベントナイト (圧密 $1.8\text{g}/\text{cm}^3$ )

この試験には滅菌水の膨潤化と菌の投与にそれぞれ3週間、菌の測定に5日間と約1ヶ月間を要する。この結果を表 2.3-1に示す。

本試験期間の結果では、成型体層の中には菌の浸透はなかった。即ち菌の培養液に接している最上層部に菌が検知されたが、それより深層には菌は見られなかった。

#### (ii) 50wt.%ベントナイト (圧密 $1.2\text{g}/\text{cm}^3$ )

3例中1例で最上部以外の上部から5mmの深層(IV)でごく少数の菌が検知された(表 2.3-2)。他の2例については最上部以外には検知できなかった。この理由は成型体がもろく成型体の挿入やフィルター設置等の試験当初の操作上のショックで上部が傷められたり、混合ケイ砂が表面層近傍にむきだして連なり、構造上の強度の劣化や微小空隙を生じさせることは十分に考えられる。いずれにしても成型体の構造体として菌の透過には微妙な領域である可能性がある。

#### (iii) 透過菌か否かの確認

今回は今までの試験の技術課題に取り組んだ。第一に前述のように菌数測定の際に混入する微少なベントナイト粒をろ過除去する。第二に寒天中に混入の粒子を事前にチェックする工夫をした。手間はかかるが、効果はあった。菌の透過がないことを確かめるためにさらに未確認粒子(ベントナイトもしくは菌)に向けて指針し、新たな培地(寒天、液体)に移して菌が繁殖するか否かを確認した。また、50wt.%から得られた菌は別の寒天培地で増殖後、アンピシリンの耐性であることを利用してアンピシリンを含む液

体培養での増殖と顕微鏡による観察で同種であることを確かめた。

以上の試験期間は限られたものであるが、前回の結果を含めてケイ砂／ベントナイト混合成型体の現在までの結果を示す。

ベントナイト／ケイ砂混合比（圧密）	菌の透過の可能性	試験状況または指摘事項
20wt.%(1.2,1.8)	圧密に係わらず透過	構造体成型できず、ベントナイトによる粘着、結合力が極端に弱い。
50wt.%(1.2)	本試験期間ではなしに近い	成型構造物もろい。空隙ができる可能性。特にケイ差の混合分布具合で構造物への影響大
100wt.%(1,8)	本試験期間では透過なし	長期間、大規模での実証も将来的には必要か

表 2.3-1 100%ペントナイト (圧密1.8g/cm<sup>3</sup>) 試験体の各層の切片 (0.2g) における菌数測定結果

試験No. 寒天培地	ペントナイト検体中の検出菌数 (CFU), ×10 <sup>2</sup>			
	1 a	2 a	3 a   b	
ペントナイト層				
底層部	I	0	0	0
	II	0	0	0
	III	0	0	0
	IV	0	0	0
最上層部	V	525	556	640   750

培地 a : 一般生菌数用寒天培地  
b : L.B 寒天培地

表 2.3-2 : 50%ペントナイト (圧密1.2g/cm<sup>3</sup>) 試験体の各層の切片 (0.2g) における菌数測定結果

試験No. 寒天培地	ペントナイト検体中の検出菌数 (CFU), ×10 <sup>2</sup>					
	1		2		3	
	a	b	a	b	a	b
ペントナイト層						
底層部	I	0	0	0	0	0
	II	0	0	0	0	0
	III	0	0	0	0	0
	IV	2	5	1	0	0
最上層部	V	4760	1190	420	410	3760   3621

培地 a : 一般生菌数用寒天培地  
b : L.B 寒天培地

## 2.4 硫酸塩還元菌等の作用による Pu, Np の酸化還元状態の検討

### 2.4.1 硫酸塩還元菌の培養装置の試運転・培養液の作成・保存のための実験

地層処分が行われる深層地下の極端に嫌気性の強い環境で繁殖する、硫酸塩還元菌の純水菌 (*Desulfovibrio desulfuricans* ATCC7757) を米国の N I S T (標準・技術局) から購入した。この硫酸塩還元菌を、純粹培養する装置 (各 2000 ml) 二基の制作をした。

硫酸塩還元菌培養装置の試運転は、3ヶ月の長期にわたって行われた。この間、培養装置の恒温性 (35℃)、窒素ガスによる陽圧のチェック、培養液の注入、培養装置内の外からの磁石による混合効率のチェック、老廃物の排出、そして嫌気性 (eh) の度合いの安定性 (-485 mV から -500 mV) 等が、一ステップずつ行われた。

その結果、本装置は予定した全ての試験に合格した。なお、硫酸塩還元菌の培養液は、一度に 50 リットル作成し、これを小分けして冷凍して保存し、一回分ずつ解凍して使用した。

### 2.4.2 米国 N I S T から得られた標準硫酸塩還元菌の培養装置を用いた大量増殖

標準純粹硫酸塩還元菌の大量増殖には、予想以上の日時を要した。その増殖速度は、予想以上におそく、220日 (平成9年2月10日) 現在、予定した硫酸塩還元菌の半分程度 (5000倍の増殖) の量 (乾燥重量で15グラム) しか、増殖していない。

培養装置内の流れの弱い所に硫酸塩還元菌が、集まる傾向にあるので、培養装置全体を傾けて、少しでも増殖量を大きくする試みも行っている。

### 2.4.3 「深層地下における硫酸塩還元菌の挙動」に関する文献調査

地下深層は、ここ15年程前までは、微生物は、存在しない場所 (無菌の場) と考えられ、微生物学でもその研究対象となることは少なかった。深層地下での微生物の存在は、学問の世界から完全に、無視されていたのである<sup>(12)</sup>。当然のこととして、地層処分が立案され始めた1950~60年台にも、地層処分に対する微生物の影響は、全く考えられていなかった。微生物の影響が、地層処分に影響を与えるは、1980年台になってからのことである<sup>(13)(14)(15)(16)</sup>。カナダを中心とした地層処分の研究で、その影響が指摘され始めてのことである。

しかし歴史を遡ると、70年もの昔に、すでに深層地下での微生物の存在は、指摘さ

れてしていた。1920年代のアメリカ・シカゴ大学のE. S. BastinとF.E.Greerの研究は、この点、時代を先取りするものであった<sup>(12)</sup>。彼らは、地下数百mの原油層の沈殿物から、本研究の対象になっている硫酸塩還元菌を抽出し、それを研究室で培養することに成功したのである。深層地下に硫酸塩還元菌が生存している理由として、E. S. BastinとF.E.Greerは、3億年以上前に原油層ができ、そのときの沈殿物野中に埋まっていた微生物の子孫であろうと推測した。ただ、彼らの先駆的研究は、微生物の学会では「地球表層からの汚染」として無視され、残念なことに全く評価されなかった。

1940～50年代にも、米国のC. E. Zobellらが、海底よりもはるかに深いところに埋まっている微生物の痕跡を研究した。しかし、これも、評価を受けることなく、学会からは無視された<sup>(12)</sup>。

カナダを中心とした地層処分の研究で、1980年代から微生物の影響が指摘され始めると、その研究は、日本はもとより、欧米で活発な研究が始まった。日本の福永らは、緩衝材ベントナイトと微生物、特に硫酸塩還元菌の生息範囲について研究<sup>(17)(18)</sup>し、また、青木らは、地下水中での微生物を研究している<sup>(19)</sup>。さらに、地層処分のために、作られた深層地下実験施設での研究成果の代表的なものとしては、Pederson,K.and Karlson,F.や.Stroes-Gascoyne,S.and West,J.M.がある<sup>(20)(21)</sup>。

#### 2.4.4 環境（特に還元雰囲気）でのPu, Npのスペシエイションの結果ならびにその分析方法に関する文献調査

自然界でのプルトニウムの化学形態を一番積極的に研究している研究者は、アイルランドのDublin大学のMitchellの一派である<sup>(22)</sup>。彼らは、イギリス、セラフィールドの核燃料再処理工場の排水から、アイルランド海に放出されたプルトニウムと、アメリカ空軍が、スペインのパロマレス村周辺海域（西地中海）で事故として放出したプルトニウム（1966年発生）について、その化学形態（スペシエイション）の6年間以上の野外調査を行っている。スペインの事故は、飛行機(B-52)と空中給油機との空中衝突のため、水爆4発（何れも25メガトン）が、落下傘で飛行機から放出されたが、内2発の水爆落下傘が、燃え尽き、地上に激突したため、核爆発を防ぐために、次善の策として爆薬によってプルトニウムを落下周辺地域に放出した歴史的背景を持つ。この時、一発は地上に、残りの一発は、海中にプルトニウムを放出している。

この水爆からの放出時点のプルトニウムの化学形態は、軍事秘密のため、一切公表さ



れていないが、常識的に考えて、薄くニッケル等の金属でメッキされた、金属形態のプルトニウムと考えられる。この金属プルトニウムが、30年間の海洋環境中に存在することで、どのようにその化学形態を変化させ、その挙動をどう変えたかを知ることは、非常に興味深いことである。

一方、アイルランド海とその周辺地域でのプルトニウムは、前述の様にセラフィールドの核燃料再処理工場の排水口から放出されたもので、放出時点の化学形態は、硝酸で酸化されたイオン状であったと考えられる。

Mitchellらは、1988～1993年の6年間に、大型研究船でアイルランド海と西地中海に7回の試料採取に出かけている。

Michellらが使った分析方法は、採取した海水を三つに分けることから、始まった。

- ① 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターで、取れた浮遊物 (SS)
- ② そのろ過水
- ③ 12 A から 120 A の三つのフィルターで濾したろ過水

に分けたものと、海底の底土である。これら、物理的に分離された試料から、プルトニウムの化学形態を分析したのである<sup>(23)(24)(25)(26)</sup>。Pu-241の分析は、Ryan Vives i Batlle が、使用した方法を採用した<sup>(27)(28)</sup>。

Michelle 一派のプルトニウムの化学形態に関する6年間の海洋環境での研究では、次の8つの結論が導かれている。

- ① ろ過された海水では、プルトニウムその大部分 ( $87 \pm 6\%$ ) は、5価 Pu(V) である。
- ② プルトニウムの4価と5価の比 (IV/V) は、アイルランド海では、セラフィールドの核燃料再処理工場の排水口が、最も大きい。これは、プルトニウムの起源に由来するものと考えられる。
- ③ 自然海洋 (海の沖合) では、コロイドと結合しているプルトニウムは15%以下である。この理由は、コロイド成分が少ないためと考えられる。
- ④ 海岸線の近くでは、コロイドと結合している4価のプルトニウムは、全体の15%以上ある。
- ⑤ 4価のプルトニウムは、殆ど、コロイドと結合していると考えられる。
- ⑥ 5価のプルトニウムは、殆ど溶解性として存在する。
- ⑦ 海洋では、5価のプルトニウムは、250～500mの深度で、最大濃度に達す

る。

- ⑧ 地中海でのプルトニウムの殆どは、酸化状態にある。

#### 2.4.5 硫酸塩還元菌と Pu, Np の相互作用実験調査と Pu, Np 分析方法の確立

##### (1) プルトニウム-239の分析法

硫酸塩還元菌のプルトニウムの相互作用試験調査となる分析手順は、下記の順番で行った。

- ① 硫酸塩還元菌集合体を含む水溶液（溶存酸素ゼロ、pH 調整前）に  $^{239}\text{Pu}$  を窒素雰囲気下で混入し、4時間攪拌する。
- ② 水溶液①を、 $0.22\ \mu\text{m}$  のメンブレン・フィルターで、5気圧の圧力をかけ、濾過する。
- ③ 濾過水とフィルターを、別々のエーレンマイヤー・フラスコに入れ、何れのサンプルにも内部標準トレーサーとしてプルトニウム-236を既知の量入れる。それらのサンプルに8規定の硝酸溶液100 ml 入れ、プルトニウムをイオン状にして抽出する。
- ④ 抽出されたプルトニウムは、イオン交換樹脂で、分離、精製する。  
イオン交換樹脂は、Dowexでこの前処理にも色々な工夫が必要である。
- ⑤ 精製されたプルトニウムは、磨かれたステンレスのディスクに電着する。
- ⑥ 電着されたプルトニウム-239は、アルファ線計測器で、プルトニウム-236の収率を考慮して、分析定量する。

##### (2) ネプツニウム-237の分析法

ネプツニウム-237を定量的に分析するためには、ネプツニウム-237とプロトアクチニウム-233のガンマ線のエネルギースペクトルで、分析する方法が、最も簡便と考えられる。ただ、この場合、両核種のガンマ線エネルギーは、非常に接近しているものが多く、例えば、ネプツニウム-237の86.49 keVとプロトアクチニウム-233の86.61 keVのピークは、通常のガンマ線検出器では、分離できない。このため、収率が少しでも高いネプツニウム-237の92.29 keV (1.82%)のピークを使うことが考えられる。本研究では、ネプツニウム-237の分析は、92.29 keVのピークを使用した。

### (3) 硫酸塩還元菌とプルトニウムの相互作用実験調査

アメリカ標準・技術局から、購入した純粋硫酸塩還元菌の増殖にしばらく時間が掛かるので、パルプ排水の嫌気性処理に使用した硫酸塩還元菌を含む微生物を使い、プルトニウム-239と硫酸塩還元菌との収着実験、さらにネプツニウム-237と硫酸塩還元菌との収着実験を行った。

#### (a) 実験方法

硫酸塩還元菌集合体は、乾燥重量で0.1%の濃度になるよう溶存酸素を駆逐した超純水で希釈し作製した。この0.1%硫酸塩還元菌集合体溶液をプルトニウムやネプツニウムとの反応容器に移す。硫酸塩還元菌集合体を滅菌後、または、何もしない(生きている硫酸塩還元菌)反応容器に、プルトニウム-239を既知量を混入する。混入後、反応容器を摂氏20度で4時間、機械的に攪拌し、攪拌した溶液は、0.22ミクロンのメンブレンフィルターで、液相と固相に分離する。液・固の両相に分離された反応溶液には、各々プルトニウムの化学分析収率を見るため、プルトニウム-236を二重トレーサーとして添加する。この後、液・固の両相に分離された反応溶液は、プルトニウムの抽出・精製・減量・電着・計測・データ解析を行なう。各核種の収着の程度を示す指標として、分配係数Kdの値を利用した。なおKdの定義は(プルトニウムの場合)、下記に示す。

$$Kd(ml/g) = \frac{\text{プルトニウムが、固体の単位重量中に含まれる量(Bq/g)}}{\text{プルトニウムが、液体の単位体積中に含まれる量(Bq/ml)}}$$

#### (b) 実験結果・考察

プルトニウムは、活発に活動している硫酸塩還元菌に良く収着される。ただ、その収着される量は、pHに大きく影響を受ける。Kdの値でいえば、1804から112952の50倍程度の広い範囲にまたがる(図2.5-1)。

硫酸塩還元菌が、活発に活動するpHの範囲(5-9)でのKdは、大きく、その値は、5~11万の範囲にある。これに対して、硫酸塩還元菌が活動しにくいpHの範囲(1~5と9~13)の酸性側とアルカリ側では、Kdの値は小さい。特に、酸性側では、アルカリ側のKdより小さく、その値は、1800から7000程度に過ぎ

ない。一方、アルカリ側での  $K_d$  は、前述の様に酸性側より大きく、その値は 8000 から 20000 の間にある。しかも、アルカリ側の  $K_d$  は、アルカリ側に行くほど小さくなる傾向にある。プルトニウムと硫酸塩還元菌との  $K_d$  値が、①中性で大きく、②極端な酸性とアルカリ側で小さくなる、という本収着実験の二つの結果は、生きていて活発な硫酸塩還元菌は、プルトニウムを単位乾燥重量当たりより収着することをしめしている。この実験結果は、「もし人工バリア・ベントナイト中に硫酸塩還元菌が活発に繁殖した場合には、その大きな  $K_d$  の値から、プルトニウムは硫酸塩還元菌内に保持され、人工バリア内を動きにくくする」ことを示唆している。

#### (4) 硫酸塩還元菌とネプツニウムの相互作用実験調査

ネプツニウム-237 と前述の硫酸塩還元菌を含んだ嫌気性菌との相互作用を調べる一回目の実験結果から、次の二点が判明した。

- ① 硫酸塩還元菌に収着するネプツニウムの量は、前述の  $K_d$  という指標で評価した場合、プルトニウムのそれより、格段に小さくなる（5%以下）
- ② ネプツニウム-237 の  $K_d$  は、pH と強い相関関係があり、pH=1.15 の強い酸性の  $K_d$  は 169 であるのに対し、アルカリの pH=12.88 の  $K_d$  は 4260 と高くなる。図 2.5-2 にネプツニウム-237 と硫酸塩還元菌の収着実験結果を示す。

この一回目の実験結果は、プルトニウムの  $K_d$  が、微生物の活動に大きく影響を受けているという結果とは、大きく異なる。（なお、前述プルトニウムの実験結果は、その実験方法に次々と改良を加えた結果の第3回目のものである。）

本実験方法については、すでにいくつかの改善点が見つけられている。それで、現在はその改良した方法で、第2回目の実験が行われている。微生物は、当然のこととして生き物であり、一寸した実験上のミスから思わぬ実験結果を得る場合がある。この点、図 2.5-2 に示された結果は、近日中に改訂される可能性が充分あることを、ここに付け加えておく。

#### 2.4.6 硫酸塩還元菌の生滅による Pu, Np の硫酸塩還元菌への収着実験

微生物は、地層処分施設の人工バリア中で、長い期間（1 万年以上）棲息する間には、生と死を次々に繰り返すことは、充分予想される。本研究では、

- ① 硫酸塩還元菌が、殺菌された場合のプルトニウム-239 とネプツニウム-23

## 7との相互作用

- ② 生きている硫酸塩還元菌が、両核種と相互作用する実験でのコントロールとしての役割

以上2点からの実験結果を得るために収着実験を行った。硫酸塩還元菌を含んだ嫌気性微生物を殺菌する方法は、オートクレーブ（湿式）法を用いた。プルトニウムの結果は、図 2.5-1に、ネプツニウム-237と硫酸塩還元菌との収着実験結果は、図 2.5-2に示されている。

生きている微生物と殺菌された微生物の間には、プルトニウムとネプツニウムとの相互作用の収着実験結果に、明確な差が表れている（図 2.5-1と図 2.5-2参照）。生きている微生物の分配係数  $K_d$  は、プルトニウムの場合、最大50倍も殺菌された微生物の  $K_d$  より大きい。しかも、このプルトニウムの  $K_d$  が大きく表れる pH の範囲は、中性領域で、微生物が、最も活発に活動する条件下である。

ネプツニウム-237の生きている微生物の  $K_d$  と、殺菌された微生物の  $K_d$  との間には、プルトニウムと同じ現象、即ち、「生きている微生物の  $K_d$  が殺菌された微生物の  $K_d$  より大きい」が、見られた。ただ、ネプツニウムで見られた  $K_d$  の差は、プルトニウムの差（50倍）より小さく、7倍程度に過ぎなかった。もともと、ネプツニウムの  $K_d$  は、プルトニウムの  $K_d$  の10分の1以下なので、その差も小さくなったのかも知れない。

プルトニウムとネプツニウムの微生物（生きたものと殺菌されたもの）への収着実験から導き出される結論は、生きている微生物の方が、殺菌されたものより大きな  $K_d$  があるということである。ただ、現在の段階では、その理由は、全く解明されていない。

## 2.5 ベントナイトへの Pu, Np の吸着に及ぼす硫酸塩還元菌等の影響調査

### 2.5.1 ベントナイトと Pu, Np との還元状態での相互作用実験

#### (1) 実験方法

ベントナイト中の溶存酸素を窒素ガスでバブリングして取り除いた後、微量の還元剤 (Sodium thioglycolate 450 ppm 溶液を 1.0 ml/l) を純水に加え、その純水に 0.1% の濃度でベントナイトを溶解し (1.00g/l)、拡散したものを使用した。このベントナイト溶液に、プルトニウム-239 ( $\text{Pu}(\text{NO}_3)_4$ ) またはネプツニウム-237 ( $\text{Np}(\text{NO}_3)_4$ ) を NaOH と HCl で pH を調整した後に加え、4 時間攪拌して、0.22 ミクロンのメンブレンフィルターで、固体と、液体を分離した。分離された固体相と液体相には、プルトニウムの場合は、プルトニウム-236 の内部標準トレーサーを、ある一定量添加し、プルトニウムの化学分離分析を行った。この分析で、各相のプルトニウム含有量が得られた。得られたプルトニウムの固相・液相での分析量から、 $K_d$  が、算出された。ネプツニウム-237 の実験の場合には、分離された固体相と液体相を別々にガンマ線エネルギー・スペクトル検出器で、92.29 keV のピーク (1.82%) を利用して分析定量した。

#### (2) 実験結果・考察

人工バリアの一つであるベントナイトとプルトニウム-239 ならびにネプツニウム-237 との還元状態での相互作用実験結果は、図 2.5-3 に示されている。この実験の特徴は、得られた分配係数  $K_d$  の値が、例えばプルトニウムの場合 10000 前後で (pH = 2-12 の範囲)、硫酸塩還元菌とプルトニウムの  $K_d$  値 100000 であるのに較べると、10 分の 1 程度と小さいことである。この小さい分配係数は、プルトニウムやネプツニウムのイオンがベントナイトの粘土物構造の内側に深く侵入する時間が無かったためではないかと考えられる。この実験では、ベントナイトとプルトニウム、ネプツニウムの接触時間は、僅か 4 時間に限られたため、このような低い分配係数が得られたものと考えらる。

プルトニウム-239 の場合と同様に、ネプツニウム 237 の場合もこの実験で得られた分配係数  $K_d$  の値は、100 前後から 346 で (pH = 1.15-11.33)、硫酸塩還元菌とネプツニウムの相互作用の場合の  $K_d$  値 169-4261 に較べるとかなり小さい。しかも、ネプツニウム-237 の  $K_d$  の値は、実験した広い範囲の pH

(1.15-11.33) に対して余り変化がない。どちらかと言えば、pH の上昇に伴い、僅かに  $K_d$  の値が、上昇する傾向にある。これらの事実を、再現するために、同じ実験が現在再度行われている。

## 2.5.2 ベントナイトと硫酸塩還元菌との混合物と Pu, Np との相互作用実験

### (1) 実験方法

国産ベントナイトと硫酸塩還元菌を含む嫌気性菌とを乾燥重量比 0.1% の同量づつ、還元された純水に溶解した混合液を作成した。この混合液に、プルトニウム-239 またはネプツニウム-237 を別々に混入し、各核種とその混合液との相互作用を調べる実験を行った。前述と同じように、各核種とベントナイトと硫酸塩還元菌混合液との接触反応時間は、4 時間でその間の温度は摂氏 20 度であった。硫酸塩還元菌は、純粹培養の菌が、十分な量培養出来ていないので、硫酸塩還元菌を含む嫌気性菌を使用した。

### (2) 実験結果・考察

プルトニウム-239 の分配係数  $K_d$  の値は、その実験条件の pH によって、1194 から 83648 の広い範囲にまたがった。全体的に言えば、 $K_d$  の値は、硫酸塩還元菌とプルトニウムとの実験結果と同じような値を示している (図 2.5-4)。すなわち、プルトニウムの  $K_d$  の値は、中性の pH 付近で最大値を示し、そこから、酸性側・アルカリ側の両方向に向かうに従って、低くなった。このことは、プルトニウムと硫酸塩還元菌とベントナイトの混合溶液の  $K_d$  値が、中性で大きく、極端な酸性とアルカリ側で小さくなるという前述硫酸塩還元菌のみの実験結果と同じことは、生きていて活発な硫酸塩還元菌は、プルトニウムを単位乾燥重量当たりより収着することをしめしている。さらにベントナイトは、硫酸塩還元菌に較べて、プルトニウムに対する  $K_d$  の値への影響が、小さいことを示している。しかし、本実験は、わずか 4 時間の接触反応時間で得られた結果であり、ベントナイトの  $K_d$  の値に対する影響を「少ない」と断定することは危険である。

### 2.5.3 ベントナイトと硫酸塩還元菌と核種相互作用試験後の核種測定法の検討

核燃料再処理の際発生する、放射性廃棄物を地層処分し、その安全を確保するためには、処分期間に発生するであろう色々なシナリオに、現在の科学技術で対処しなければならないことは、前述した通りである。そのシナリオの一つとして、人工バリア材料の一つである緩衝材、ベントナイトに、地下水が侵入し、そこで嫌気性微生物、特に硫酸塩還元菌を含む嫌気性微生物が、発生することが考えられる。ただ、ここで考えなければならないことは、硫酸塩還元菌の個々の菌は、一万年間生き続けるのではなく、そこには、生命の生滅が、何百、何千回も繰り返されることである。そこで硫酸塩還元菌の生滅が、プルトニウムやネプツニウムの挙動に与える影響を、検討しなければならない。この様な、深層地下環境で起こるであろう現象は、現在の科学的知見では、下記のように整理されよう。

- ① この環境は、還元性の強いもので、プラスのイオン状であったプルトニウムやネプツニウムは、急速に還元されていく。
- ② 還元環境と言えども硫酸塩還元菌の生滅は、微少な有機物、コロイド、生化学生成物（例えば、酵素や高分子蛋白）等を、処分場内部に生み出す。
- ③ プルトニウムやネプツニウムは、これら硫酸塩還元菌の生滅から発生した高分子有機物あるいは簡単なメチル基と、強く結合する可能性がある。
- ④ 有機物と結合したプルトニウム（有機プルトニウム）やネプツニウム（有機ネプツニウム）の環境中での挙動については、現在殆ど解明されていない。
- ⑤ 長崎市西山貯水池の底土、カナダ原子力公社のベントナイト中のプルトニウム拡散実験からは、「動きにくいプルトニウムと動きやすいプルトニウム」の二種類のプルトニウムが、発見されている。どちらのケースでも、その媒体に有機物の存在が、記録されている。

言い換えると、硫酸塩還元菌の生滅によって、有機プルトニウムや有機ネプツニウムが生成されることが考えられる。そして、少なくとも有機プルトニウムは、無機のプルトニウムより「動きやすい」ことを示唆する実験データは、現在ある。

長崎市西山貯水池から得られた底土のプルトニウム分析(1988)は、「2.4.5(1) プルトニウム-239の分析法」で述べた方法で行われ、ここでは、コロイド、微生物と結合しているプルトニウムの特別な分析方法は、検討されなかった。当時は、「動きや

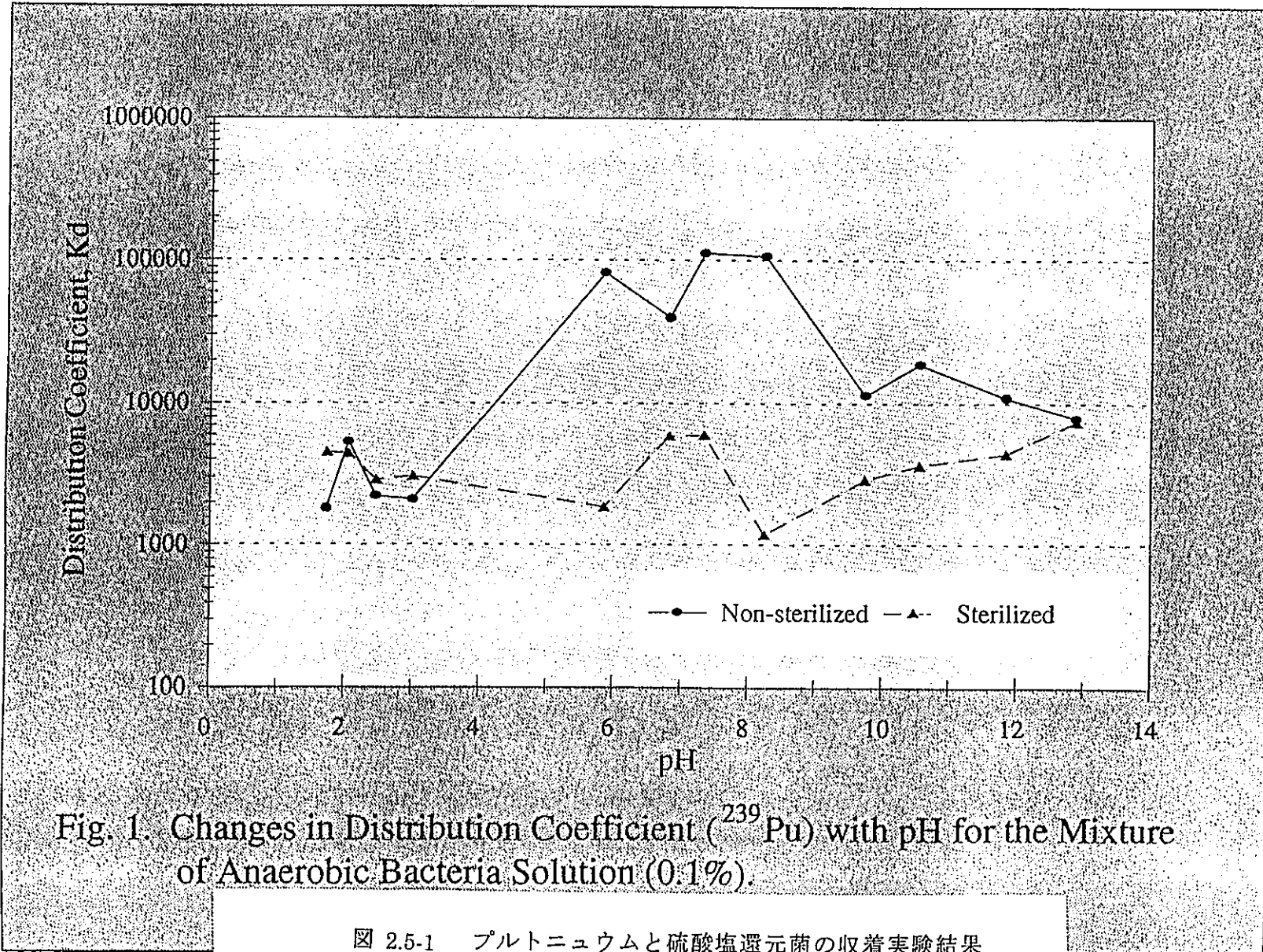


「動きやすいプルトニウム」の存在は、一考だになされていなかったからである。しかし、硫酸塩還元菌の生滅が、「動きやすいプルトニウムの生成に寄与する」ことを実験的に証明するためには、その分析方法は、当然検討され、そのために変化・改良させなければならない。

コロイド、微生物、生化学的に硫酸塩還元菌から生成された物質（特に有機物）と結合したプルトニウムの新しい分析方法の開発方針としては、まず、二つの方向が考えられる。

- ① 10万、3万、1万、5千、3千の分子量で分離するメンブレン・フィルターをサンプルからプルトニウム、ネプツニウムを抽出する前に用いて、イオン状のプルトニウムと、前処理段階で分離分析する。
- ② 有機溶剤で、有機性プルトニウム、有機性ネプツニウムを前処理段階で抽出し、イオン状のものと分離分析する。

現在、これら二つの方向で、還元状態の Pu, Np を、分析出来るよう必要な実験機材を購入し、予備的な実験を始めた。さらに、フミン酸、フルボン酸などの特定の有機物質と結合しているプルトニウムとネプツニウムを分離分析している。来年度は、この分野で何らかの進歩が見られ、世界で初めての有機プルトニウム、有機ネプツニウムの存在が確認出来るものと期待している。



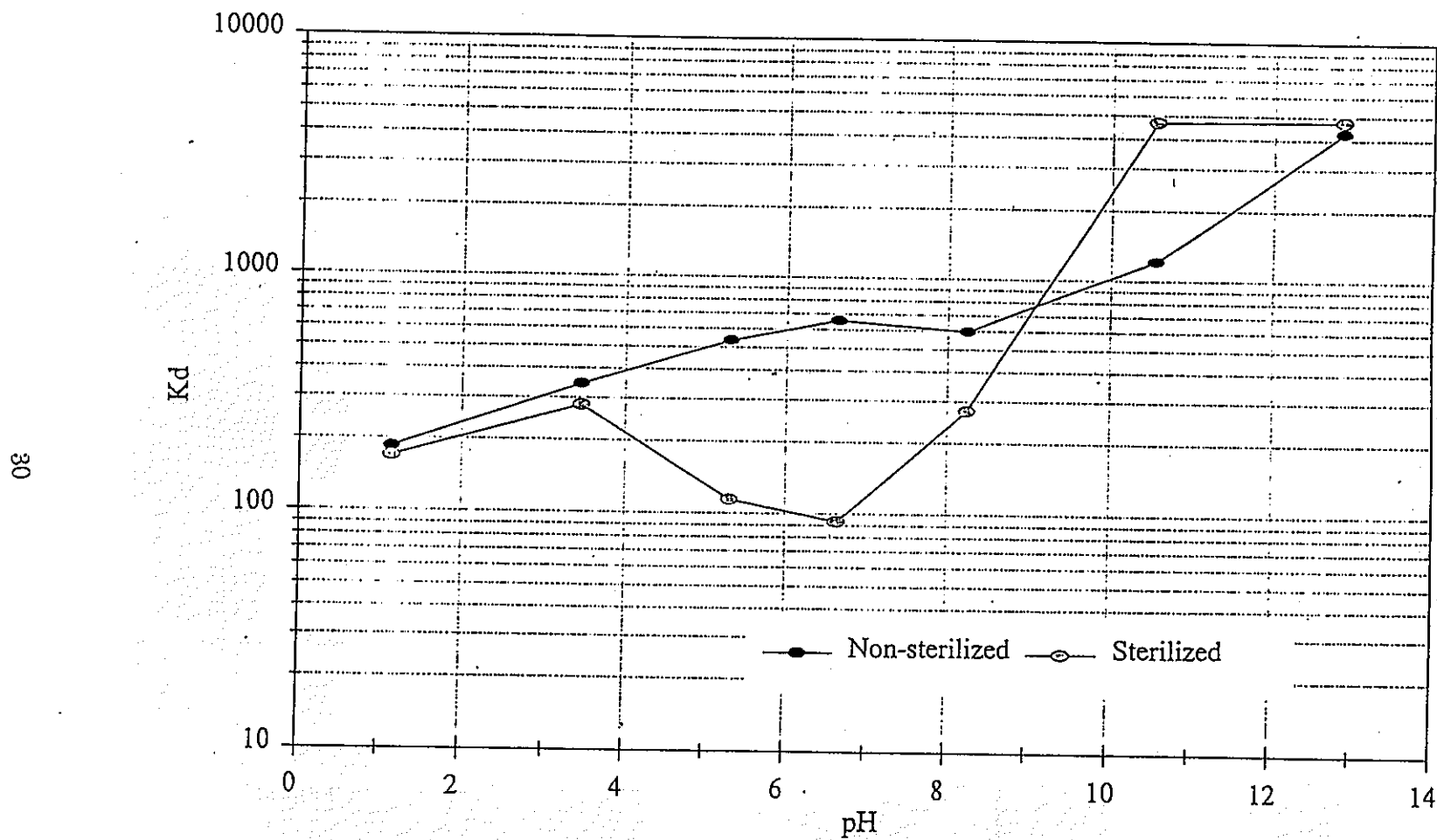


Fig. Changes in  $^{237}\text{Np}$  Distribution Coefficients with pH for Anaerobic Bacteria (0.1%) suspended in Distilled Water.

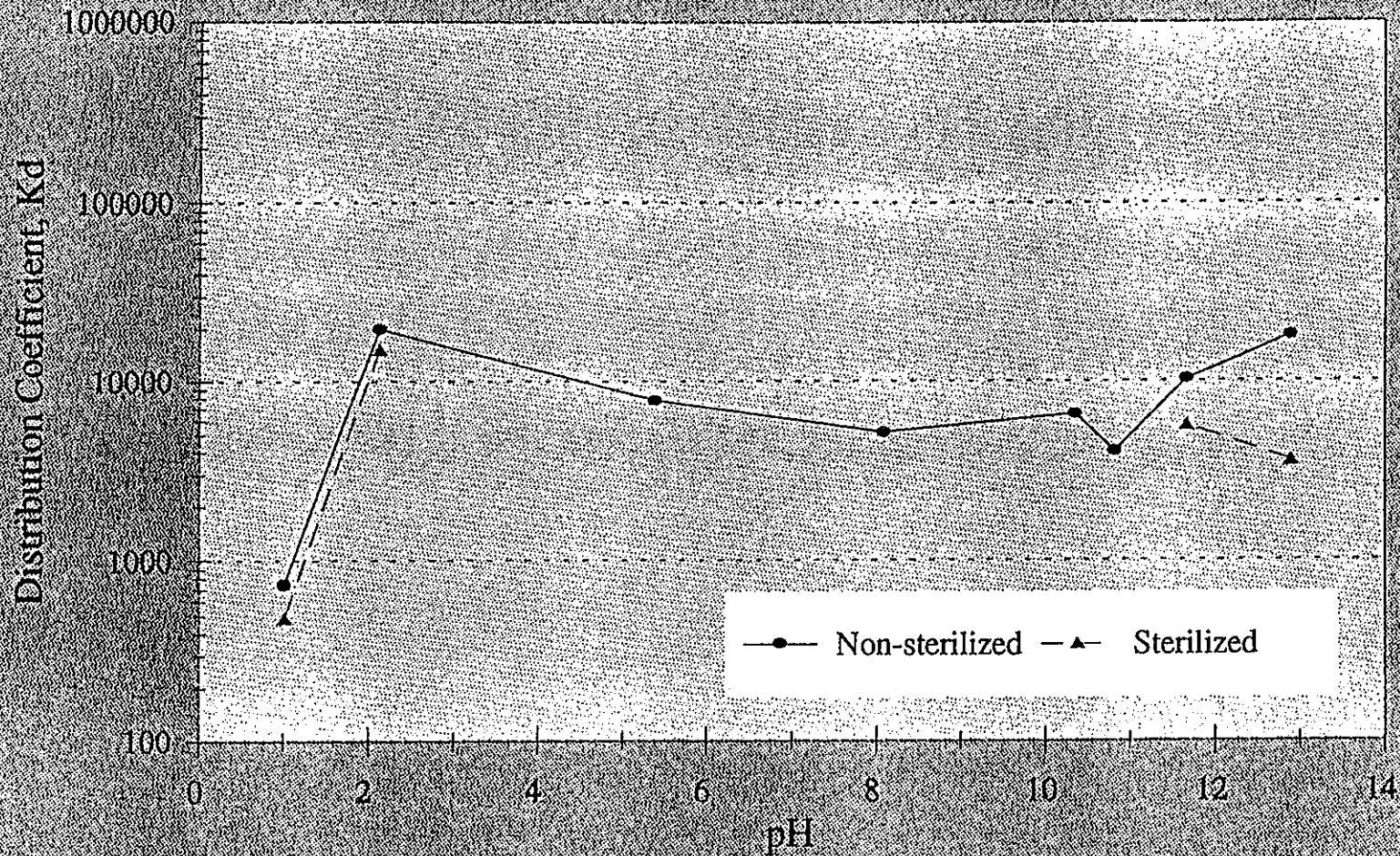


Fig. 3. Changes in Distribution Coefficient ( $^{239}\text{Pu}$ ) with pH in Bentonite Solution (0.1%).

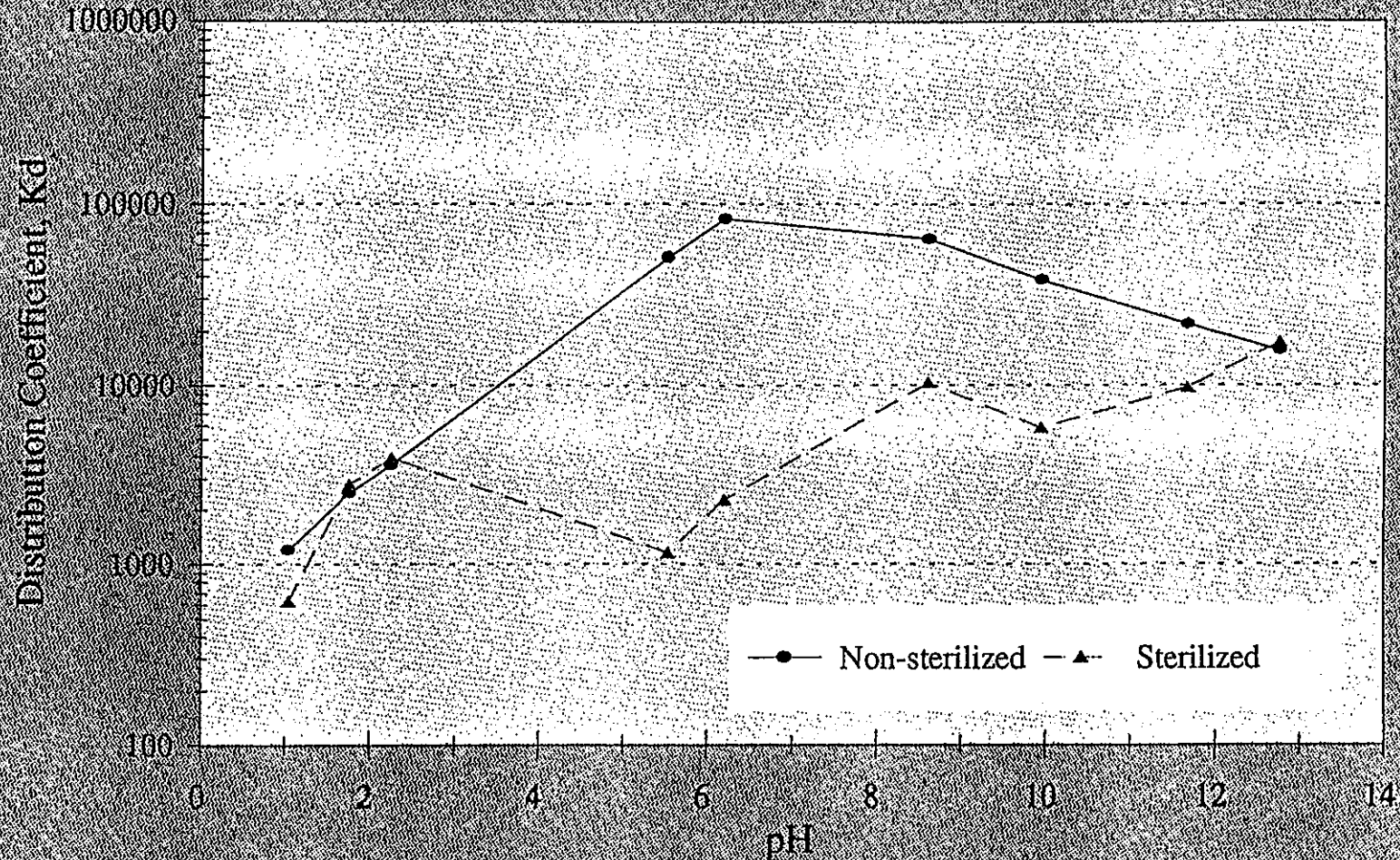


Fig. 2. Changes in Distribution Coefficient ( $^{239}\text{Pu}$ ) with pH for the Mixture of Anaerobic Bacteria (0.1%) and Bentonite Solution (0.1%).

図 2.5-4 ベントナイトと嫌気性（硫酸塩還元菌を含む）の混合溶液（各 0.1%（重量））とプルトニウム-239 の相互作用実験結果

### 3. まとめ

下記に本研究の試験結果のまとめを示す。

#### (1) メタン生成細菌及び脱窒細菌耐性領域図作成

##### ①メタン生成菌の調査

菌株保存機関のDSMのリストおよび国内外の論文収集により、耐アルカリ性メタン生成細菌の菌株として次の9株をリストアップした。

##### ②フィールドサンプリングによる細菌の探索・調査方法の検討

遺伝子増幅法、蛍光染色法及び培養法を用いて、地下水等中に生息する微生物の検出・調査試験フローを提案した。

##### ③脱窒細菌耐性領域図作成

各pH培養菌と同じpH条件下での脱窒活性はpH7.5~8.5が高い。pH9では20%~30%以下に低下するが、pH9.5以上では菌の生育すらない。従って、脱窒活性を示す培養菌体は、増殖の生理状態が脱窒反応系に向いていさえすれば、EhよりもpHに大きく依存することが推論された。

#### (2) メタン生成細菌及び脱窒細菌の成長に伴うガス発生量の測定

有機物としては、セルロースが一番メタンガス、炭酸ガスの発生を多く見られ、初期pH10.0の条件でもメタン発生が見られた。フミン酸においても酢酸と同等のガスが発生したことから、フミン酸を資化する(栄養源とする)微生物も地層中に多数存在すると考えられた。

#### (3) 微生物の圧縮ベントナイト中の移行性の検討

##### ①100wt.%ベントナイト(圧密 $1.8\text{g/cm}^3$ )

本試験期間の結果では、成型体層の中には菌の浸透はなかった。即ち菌の培養液に接している最上層部に菌が検知されたが、それより深層には菌は見られなかった。

##### ②50wt.%ベントナイト(圧密 $1.2\text{g/cm}^3$ )

3例中1例で最上部以外の上部から5mmの深層(IV)でごく少数の菌が検知された。他の2例については最上部以外には検知できなかった。

#### (4) 硫酸塩還元菌等の作用による Pu, Np の酸化還元状態の検討

生きている微生物と殺菌された微生物の間には、プルトニウムとネプツニウムとの相互作用の収着実験結果に、明確な差が表れていた。生きている微生物の分配係数  $K_d$  は、プルトニウムの場合、最大50倍、ネプツニウムで7倍程度殺菌された微生物の  $K_d$  より大きい。しかも、このプルトニウムの  $K_d$  が大きく表れる pH の範囲は、中性領域で、微生物が、最も活発に活動する条件下であった。

#### (5) ベントナイトへの Pu, Np の吸着に及ぼす硫酸塩還元菌等の影響調査

プルトニウム-239の分配係数  $K_d$  の値は、その実験条件の pH によって、1194 から 83648 の広い範囲にまたがった。全体的に言えば、 $K_d$  の値は、硫酸塩還元菌とプルトニウムとの実験結果と同じような値を示していた。さらにベントナイトは、硫酸塩還元菌に較べて、プルトニウムに対する  $K_d$  の値への影響が小さいことを示している。ネプツニウム-237と混合溶液との相互作用実験から得られた  $K_d$  の値は、182 (pH=1.98) から 5095 (pH=12.04) と10倍以上の範囲に広がっている。ここでも、ネプツニウムの  $K_d$  の値は、その実験条件の pH に大きく影響を受けている。言い換えると、ネプツニウムの  $K_d$  と pH には、強い相関関係が見られた。

### 4. 今後の課題

#### (1) メタン生成細菌及び脱窒細菌耐性領域図作成

##### ①メタン生成菌の調査

高アルカリ性領域における耐性領域図は、自然界の微生物群に見られる pH10 でのメタン生成が純粋培養系では再現できていないため、自然界でメタン生成細菌を保護している機構を実験室で作るといような方法論の進歩を待つか、またはメタン生成細菌の単離をせずに、おそらく pH10 でメタンを生成するであろう自然の微生物群のガス(メタン)発生を、pH を変えて測定して活性を持つ pH の上限のデータを得る必要がある。

##### ②フィールドサンプリングによる細菌の探索・調査方法の検討

フィールドサンプリングを実施する際の課題として、地下サンプルを掘り出す時に、より地上に近い地層や地上の微生物の混入を如何に防ぐかがあり、サンプリングに適した器具・設備を開発する必要がある

### ③脱窒細菌耐性領域図作成

今後、Eh 培養条件の違いによる脱窒活性を知る必要がある。

### (2) メタン生成細菌及び脱窒細菌の成長に伴うガス発生量の測定

本研究により集積培養した微生物を用いて、栄養素（有機物）の濃度と活性（ガス発生量）との関係を調査し、栄養素の濃度とガス発生量との間に相関性が見られた場合、処分場の条件におけるガス発生量の推定に用いることができるかどうか検討する必要がある。

### (3) 微生物の圧縮ベントナイト中の移行性の検討

ケイ砂の混合率 50wt.%が、微生物の移行を阻止できる目安とできるかどうかを判断するため、ケイ砂の混合率 50wt.%を固定して乾燥圧密密度を変えた場合における微生物の移行性を評価する必要がある。また、その後により厳密な境界条件を求めるために、ケイ砂の混合率を 50wt.%以下で振った試験が必要と考えられる。

### (4) 硫酸塩還元菌等の作用による Pu, Np の酸化還元状態の検討

純粋培養の硫酸塩還元菌を用いることにより、より低い Eh 条件における硫酸塩還元菌と Pu, Np の相互作用を調べ、この結果と本試験の結果を比較することにより、硫酸塩還元菌の作用による Pu, Np の酸化還元状態の検討をする必要がある。

### (5) ベントナイトへの Pu, Np の吸着に及ぼす硫酸塩還元菌等の影響調査

本試験についても基本的には、上記の「硫酸塩還元菌等の作用による Pu, Np の酸化還元状態の検討」と同様に純粋培養の硫酸塩還元菌を用いてより低い Eh 条件における試験を実施する必要がある。



<参考文献>

- 
- (1) DSM, Catalogue of Strains: (1993)
  - (2) Boone, D.R. et al., Alkaliphilic methanogens from high-pH lake sediments: *System. Appl. Microbiol.*, Vol.7, pp.230-234 (1986)
  - (3) Zhilina, T.N. and A. Zavarzin, Alkaliphilic Anaerobic Community at pH 10: *Current Microbiology*, Vol.29, pp.109-112 (1994)
  - (4) Kotelnikova, S. and K. Pedersen, Isolation and characterization of methanogenic archaea from subsurface groundwater at Aspo hard rock laboratory: *Abstracts of the 1996 Symposium on Subsurface Microbiology (ISSM-96)*, pp.144 (1996)
  - (5) 中津川直樹、堀越弘毅、特殊環境メタン生成細菌に関する研究：京都大学環境衛生工学研究会第10回シンポジウム講演論文集, pp.196-201 (1988)
  - (6) West, J.M., personal communication
  - (7) J.K.フレドリクソン、T.C.オンストット著、堀越弘毅訳「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
  - (8) 須藤隆一編、環境微生物実験法、講談社(1989)
  - (9) RUDOLF I. AMANN, WOLFGANG LUDWIG, and KARKL-HEINZ SCHLEIFER. 1995., Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation., *MICROBIOLOGICAL REVIEWS* Vol.59, No.1, p.143-169
  - (10) 中山弘樹著、バイオ実験③本当にふえるPCR、秀潤社(1996)
  - (11) PNCZJ115095-006
  - (12) Fredrickson, J.K. and Onstott, T.C., "Microbe Deep Inside the Earth", *Scientific American*, 68-73, 1996.
  - (13) Champ, C.R. and Merrit, W.F. "Particulate Transport of Cesium Groundwater", *Proc. Annu. Conf. Canadian Nuclear Society*, 2, 66-69, 1981.
  - (14) West, J.M., Mckinley, I.G. and Chapman, N.A. "The Effect of Microbial Activity on the Containment of Radioactive Waste in a Deep Geological Repository", *Sci. Basis Nuclear Waste Manag.* 5, 831-838, 1982.
  - (15) West, J.M. and Mckinley, I.G. "The Geomicrobiology of Nuclear Waste Disposal", *Sci. Basis Nuclear Waste Manag.* 7, 487-494, 1984.
  - (16) Toste, A.P., Kirby, L.J. and Pahl, T.R. "Role of Organics in the Subsurface Migration of

---

Radionuclides in Groundwater", *Am. Chem. Soc. Symp. Ser. No. 246*, 251-270, 1984.

- (17) Fukunaga, S., Fujiki, K. and Asano, H. "Microbial Growth Enhanced When Using Bentonite as a Buffer Material for Radioactive Waste Repositories", *1993 International Symposium on Subsurface Microbiology (ISSM-93)*, Abstract C-04, Bath, U.K., 1993.
- (18) Fukunaga, S., Yoshikawa, H., Fujiki, K. and Asano, H. "Experimental Investigation on the Active Range of Sulfate-Reducing Bacteria for Geological Disposal", *Material Research Society Symposium 353*, 173-180, 1995.
- (19) Aoki, K., Komuro, K. T., Seo, and Matsushima, E. "Microbiological Examination of Groundwater from the Green Tuff Region of Northern Japan" *1993 International Symposium on Subsurface Microbiology (ISSM-93)*, Abstract C-02, Bath, U.K., 1993.
- (20) Pederson, K. and Karlson, F. "Investigations of Subterranean Microorganisms", *SKB Technical Report 95-10*, Swedish Nuclear Fuel and Waste Management Co., Stockholm, Sweden, 1995.
- (21) Stroes-Gascoyne, S. and West, J. M. "Microbial Considerations and Studies in the Canadian Nuclear Fuel Waste Management Program", *Sci. Basis Nuclear Waste Mang.* 18, 165-172, 1995.
- (22) Mitchell, P. I., Vives i Batlle, J., Downes, A. B., Condren, O. M., Leon Vintro, L. and Sanchez-Cabeza, J. A. "Recent Observations on the Physico-chemical Speciation of Plutonium in the Irish Sea and the Western Mediterranean", *In Plutonium in the Environment* (Kudo, A. and Santry, D. C. ed.), Pergamon Press, Oxford, U.K. 1996.
- (23) Nevissi, A. and Schell, W. R. "Efficiency of a Large Volume Water Sampler for Some Radionuclides in salt and fresh Water", *In: Radioecology and Energy Resources* (Cushing J. E. Jr, Ed.), 277-282, Dowden, Hutchinson and Ross, Stroudsburg, PA. USA, 1976.
- (24) Lovett, M. B. and Nelson, D. M. "Determination of Some Oxidation States of plutonium in Sea Water and Associated Particulate Matter", *In: Proc. Techniques for Identifying Transuranic Speciation in Aquatic Environments*, Ispra, Italy March 1980, 27-35, IAEA, Vienna, 1981.
- (25) Vives i Batlle, J. "Estudio de la Distribucion de Plutonio en el Litoral Catalan Utilizando la Fanerogama Marina Posidonia Oceanica Como Bioindicador", *MSc. Thesis*, Universitat Autonoma de Barcelona, 1988.
- (26) Mitchell, P. I., Vives i Batlle, J., Ryan, T. P., Schell, W. R., Sanchez-Cabeza, J. A. and Vidal-Quadras, A. #Studies on the Speciation of plutonium and Americium in the

- 
- Western Irish Sea", In: *Radionuclides in the Study of Marine Processes* (Kershaw, P.J. and Woodhead, D.S., Ed.), 37-51, Elsevier Applied Science, London, U.K., 1991.
- (27) Ryan, T.P., Michell, P.I., Vives i Batlle., Sanchez-Cabeza, J.A., McGarry, A.T. and Schell, W.R. "Low Level Pu-241 Analysis by Supported-Disk Liquid Scintillation Counting", In: *Liquid Scintillation Spectrometry 1992* (Noakes, J.E. et al Ed.), 75-82, 1993.
- (28) Vives i Batlle, J. "Speciation and Bioavailability of Plutonium and Americium in the Irish Sea and Other marine Ecosystems", Ph D, Dissertation, National University of Ireland, 1993.