

地層処分システムにおける微生物の影響について(1)<sup>†</sup>

## - 還元環境に対する微生物の耐性に関する実験 -

吉川英樹<sup>††</sup>福永栄<sup>†††</sup>油井三和<sup>††</sup>三原守弘<sup>††</sup>朝野英一<sup>††††</sup>

本報告では、光を必要としない細菌である硫酸塩還元菌、硫酸酸化細菌、メタン生成菌に注目し、これら細菌が処分環境に持ち込まれた場合、深部地質環境条件に適応できるか判断する目的で環境因子として pH、Eh をパラメータとした生理活性を実験的に確認し、Eh、pH に関しての耐性領域図の作成を行った。

処分場での微生物の生息条件のうち深部地質環境への耐性を実験的に検討することを目的として、pH、Eh を自動的に制御可能なファーメンタを制作した。本装置を用いて細菌を接種して増殖の有無を確認することにより実験的手法により耐性領域図の作成が可能となった。

硫酸塩還元細菌 (SRB)、硫酸酸化細菌 (SOB)、メタン生成細菌 (MPB) について同様にファーメンタを用いて 35°C (SRB、MPB)、30°C (SOB) で培養した。その結果、活性を示す Eh 領域は、SRB は Eh=-70 ~ -340 mV の範囲で、pH は最大 8.6 (Eh=-340 mV の時)、Eh は最大 -70 mV (pH=7 の時) であった。SOB は pH=7.5 で Eh=+240 mV 以上で pH=8 以上では増殖しなかった。また、MPB は pH=8 で Eh=-210 mV 以下であった。このことから処分環境として考えられるアルカリ、低 Eh の環境で SRB、MPB が生息可能であることが分かった。

Activities and tolerance of some bacteria were investigated under alkaline and reducing conditions for geological disposal. A fermenter was used to control pH and Eh with a liquid culture inoculated with sulphate-reducing bacteria (SRB), methane-producing bacteria (MPB) and sulphur-oxidizing bacteria (SOB). Growth of SRB was obtained at maximum pH 8.6 (Eh -340 mV) or maximum Eh -100 mV (pH 7). Ranges of Eh for the growth of MPB and SOB were estimated to be less than -210 mV at pH8, and more than +240 mV at pH 7.5, respectively. Activity for SOB was not observed in the pH range more than 8.

## 1. はじめに

高レベル放射性廃棄物の処分研究において、微生物の影響研究の必要性が指摘されている [1]。数少ない研究例としてキャニスタの腐食 [2]、腐食にともなうガスの発生 [3] 等がある。しかし、処分環境における放射性核種移行挙動に与える微生物の影響に関する研究はほとんどない。微生物の影響を評価する根拠として次のような点が考えられる。

- 微生物は深地層環境 (高圧、嫌気性) でも存在する。
- 処分場建設及び操業時に地表の微生物がまぎれこむ。
- 微生物は処分環境 (高放射線場) でも存在しえる。

微生物影響の検討が遅れている理由として、廃棄物を処分した後地下の処分場は粘土主体の緩衝材で埋め戻され、地下水の飽和による緩衝材の膨潤で空隙が狭くなるうえ、地下水の流れは拡散支配となる。また、栄養分も少なく、廃棄物から発生する放射線や熱の存在、地圧のために微生物の活動には適さないと考えられていたからである。

Pedersen、Champ によると処分場を地下約 1000m とした場合、想定される地下環境を以下のような環境と想定している [4,5]。

- 地下水溶存酸素濃度: 0.1 ppm 以下
- 酸化還元電位: -100~-300 mV
- 塩分濃度: > 200 g/l の可能性
- 有機物含有量: 数 mg-TOC/l
- 圧力: 数百気圧

また、温度に関しては地温勾配から 500m 以深では 30°C 以上となり、pH は人工バリア材料の緩衝材の化学的作用によりアルカリ性になることが予想される。

West は、これらの個々の環境条件下について生存可能な微生物が報告されていることから、処分環境下でも微生物の活動が考えられると指摘した [6]。温泉や深海等の特殊な環境に存在する微生物が近年発見されており、

<sup>†</sup> Preliminary Investigation of Microbiological Effect for Radioactive Waste Disposal System (1) -Experimental Investigation of Tolerance of Some Bacterias under Alkaline and Reducing Condition -, by Hideki Yoshikawa, Sakae Fukunaga, Mikazu Yui, Morihiro Mihara and Hidekazu Asano

<sup>††</sup> 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

<sup>†††</sup> 石川島播磨重工業 (株) 技術研究所 Research Institute, Ishikawajima-Harima Heavy Industries Co., Ltd.

<sup>††††</sup> 石川島播磨重工業 (株) 原子力事業部 Nuclear Power Division, Ishikawajima-Harima Heavy Industries Co., Ltd.

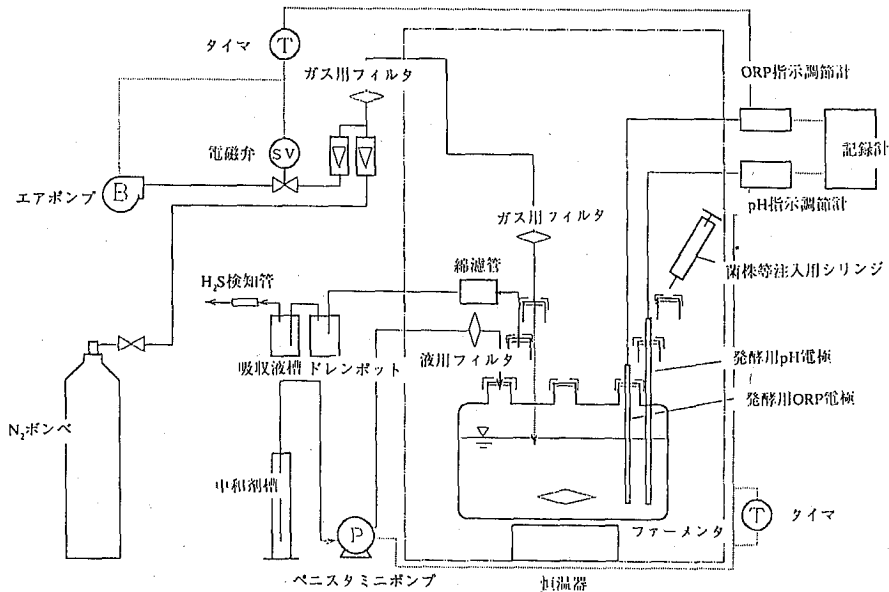


図1 実験装置図

West の指摘も重要と考えられる。また、Pedersen はスウェーデンの地下 400~800 m より採取した地下水に全菌数  $10^5$ /ml、生菌数  $10^3$ ~ $4$ /ml の微生物を検出した [4,7,8]。深部地下水から検出されたこれらの菌数は、貧栄養塩の環境も含め地表で検出される菌数の範囲内にあることを示している。

深部地下環境に存在する微生物のほかに、処分場建設の掘削時及び固化体搬入時に、地表あるいは地表近くの微生物を持ち込む可能性は十分にある。また、建築資材、水、空気を介しても持ち込まれる。問題は、侵入した微生物が処分環境で増殖し活性を持つかである。従って、前述した「微生物が活動する可能性のある環境」に対しての個々の微生物の活性と環境条件の関連を把握する必要がある。

従属栄養細菌の中には、無酸素でも酸化型の無機化合物を還元しながら有機物を酸化してエネルギーを得ている硫酸塩還元菌のようなものがある。また、有機物自体を電子受容体としてエネルギーを得るメタン生成菌等もある。一方、独立栄養細菌の中には、還元型の無機化合物を酸化する際に生じるエネルギーを用いて二酸化炭素を固定し、有機物の存在を必要とせずに生息可能な種、硫酸化細菌などもある。これらの微生物は有機物を分解することができず、むしろ有機物が存在するとかえっ

て生育が阻害される場合もある。還元雰囲気中で炭酸イオン濃度の高いと考えられている処分環境に対して、これら持ち込み菌の影響が、処分環境の長期的な変化を考慮する上で重要と思われる。

本報告では、特定の微生物群として、光を必要としない細菌である硫酸塩還元菌、硫酸化細菌、メタン生成菌に注目し、酸素あるいは有機物がなくても生息できる細菌が処分環境に持ち込まれた場合、深部地質環境条件に適切であるか判断する目的で環境因子として pH、Eh をパラメータとした生理活性を実験的に確認し、Eh、pH に関する耐性領域図の作成を行った。

## 2. 実験方法

各種環境下における硫酸塩還元細菌、メタン生成細菌、硫酸化細菌の生育挙動をみるため、細菌は以下に示すファーメンタ培養装置で液体培地を用いて、pH および Eh を実験容器のガス相のガス成分でコントロールし、生育環境を制御させた環境下での増殖テストを行うとともに、本手法の評価も併せて行った。

培養方法として一般に広く行われている寒天培地を使う方法は、pH、Eh を制御するという目的に適合しないので検討から除外した。液体培地を使う方法では試験管、フラスコなども用いられるが、ガラス製ジャーのファー

メンタ (発酵槽) が用いられる [9]。ファーメンタは SRB の嫌気性細菌の研究にも用いられているので参考にした [10,11]。

ファーメンタを図 1 と図 2 に示した。ファーメンタへのガス流入配管、中和剤の配管には  $0.2 \mu\text{m}$  メンブレンフィルタ (Gelman 社) を取り付け外部の微生物の侵入を防止した。本装置は、pH、ORP (酸化還元電位: Oxidation and Reduction Potential) 電極を取り付けたまま、リン酸塩と還元剤以外の培地を入れて、オートクレーブで滅菌できる。

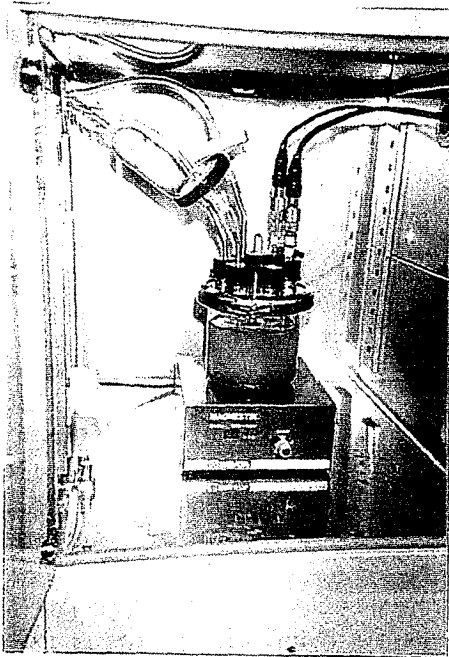


図 2 恒温器内に設置されたファーメンタ

細菌の増殖は濁度を測定する方法や代謝生成物を分析する方法等がある。ここでは代謝生成物のガス分析を行うことにした。ガス分析の場合は、ガス分析ラインと罫囲気ガス (ヘッドスペースガス) の流量管理が微生物増殖環境を維持する上で重要である。例えば、SRB では硫酸塩還元により発生した硫化水素をリアクターから排出して測定するため、培地への硫化物の蓄積による SRB の阻害を防ぐためと、Eh の制御のため、ガスを常時通気する方法を採用している [12]。

## 2.1 微生物の選定

### 2.1.1 硫酸塩還元細菌 (SRB) の選定

SRB の純粋培養を行い、SRB の増殖と pH、Eh の関係を調べる研究は、湖沼・海洋の底泥の微生物生態学研究として Cappenberg、Brown が、また、地球化学研究では Birnbaum が行っている [10,11,13]。前者では pH と Eh を制御する培養系を用いているが、pH の高い領域でのデータはほとんど見当たらない。後者では pH の高い領域でのデータは得られているが、pH と Eh の制御については前者のように進んでいない。本研究では微生物生態学研究で用いられた Brown の方法を基本にした。増殖させた SRB は代表的 SRB である (財) 発酵研究所所有の「*Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 7757」を用いた。土壤微生物研究会の 17-1 培地 (ただし Fe 添加せず) [14] で  $10^\circ\text{C}$  で保存しておき、 $35^\circ\text{C}$  での前培養ののち培養 (反応) 容器に接種した。

### 2.1.2 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、Balch は基質と核酸の塩基 (G+C) 含量の違いによる分類を行っている。基質としては次のようなものが利用される。

- (1)  $\text{H}_2 + \text{CO}_2$
- (2) 酢酸塩
- (3) メタノール
- (4) 蟻酸
- (5) メチルアミン

$\text{H}_2 + \text{CO}_2$  の基質は最も普遍的な基質であり、多くの種類の MPB がこれを容易に利用して増殖する。酢酸塩を基質とする MPB は廃水や廃棄物のメタン発酵処理施設で注目されている菌種である。メタノールを基質とする MPB も廃水のメタン発酵処理施設で重要視されており、*Methanosarcina* など数種の MPB が生息する。他の基質としては蟻酸、メチルアミンがある。処分環境を考慮した場合、金属の腐食により  $\text{H}_2$  が発生する可能性がある。また、緩衝材のベントナイトからも酢酸が検出されており、地層処分場でも基質となり得る可能性がある。酢酸塩を利用できる MPB は *Methanosarcina* と、*Methanotrix* である。特に後者はコロニーを形成しにくく単離・培養が難しい [15]。以上の検討の結果、ここでは、地層処分場で供給される可能性のある酢酸と  $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ 、そしてメタノールを利用できる *Methanosarcina* を選定することにした。*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 DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen) から *Methanosarcina barkeri* DSM804 株を入

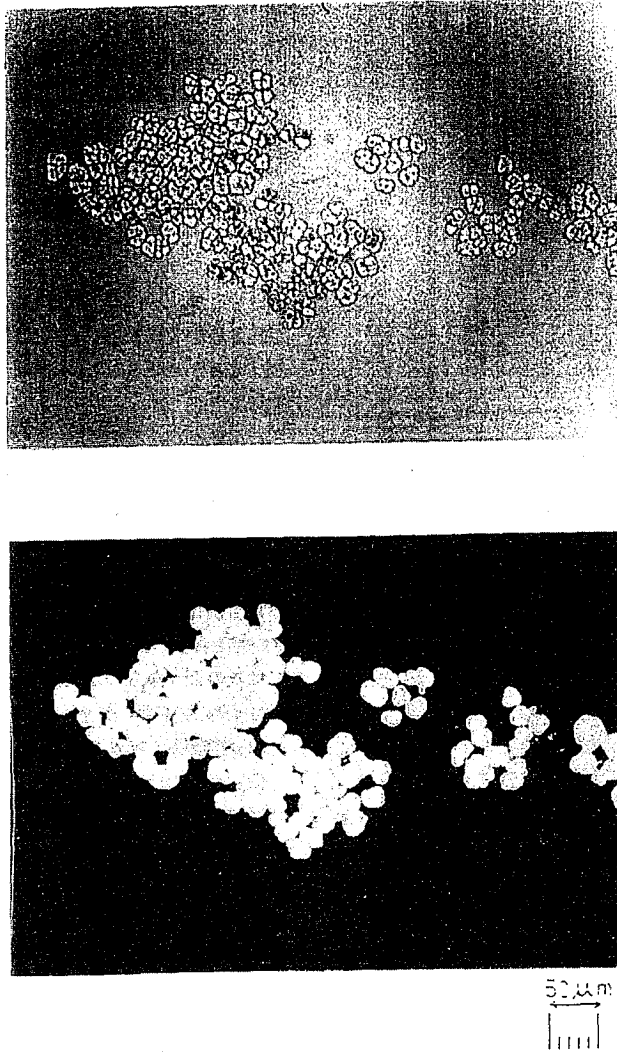


図3 *Methanosarcina barkeri* DSM804 の顕微鏡写真 (上: 光学顕微鏡、下: 蛍光顕微鏡)

手して用いた。その顕微鏡写真を図3に示す。紫外線(V励起)により励起され、青い蛍光を発する。

### 2.1.3 硫黄酸化細菌の選定

硫黄酸化細菌(SOB)にはいくつかの種類があるが、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酸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。グラム陰性、芽胞をつくらない短桿菌である。その主な菌種と特徴を表1に記す。

試験供試菌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2種を理化学研究所、微生物系統保存機関より入手した。

*Thiobacillus thioeparus* Beijerinck

*Thiobacillus neapolitanus* Paker

の2種である。

*Thiobacillus thioeparus* (以下 *T. thioeparus* という) は1904年 Beijerinck が単離した微生物でその後 Jacobsen らは各地方の土壌、泥、水中にこの細菌を確認している。チオ硫酸、硫化水素、元素硫黄を硫黄源とする好気性菌

表 1 硫黄酸化細菌の特徴

菌種	特徴
<i>Thiobacillus novellus</i>	適性無機物利用型
<i>Thiobacillus thioparus</i>	pH 6.0 ~ 8.0 で生育
<i>Thiobaacillus neapolitanus</i>	pH 6.0 ~ 8.0 で生育
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	pH 1.0 ~ 3.0 で生育
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	O <sub>2</sub> がなくてもNO <sub>3</sub> <sup>-</sup> を利用して硫黄化合物を酸化
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	イオウ化合物の他にFe(II)化合物を酸化

で生育 pH は中性付近、pH4 以下になると生育は弱くなるといわれている。選定 2 種について予備培養した結果 *T.thioparus* 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思われたのでこれを試験菌種とした。培地は表 2 に示すものを用いた。

## 2.2 培養実験方法について

### 2.2.1 SRB 培養実験について

#### (1) 培地

微生物培養用の培地は、対象微生物の特性に応じてそれに適したものが多数開発されている。SRB 用の培地としては、基質として乳酸を含むもの、酢酸を含むものなどが使用されている [14]。本実験では主な基質として乳酸を含むものを用いた。pH 緩衝剤にリン酸塩を用いる培地として、17-1 培地 (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.004g/ℓ) [14]、および C 培地を [16]、重炭酸塩緩衝液を用いる培地として 17-1 培地の改変培地 (リン酸塩濃度低下) の中から選定した。培地の供給方法には、種々の方法があるが [9-11]、ここでは pH、Eh の制御を考慮して、回分培養のファーメンタを用いた。

#### (2) ファーメンタによる実験

培養温度はファーメンタそのものを恒温器に入れ 35°C に制御した。Eh の制御は、東亜電波社製の発酵用 ORP 電極と ORP 指示調節計で測定と制御を行った。実験手順としては、SRB 接種の前に N<sub>2</sub> などを通気し、Eh がある程度下がったところで還元剤を添加する。還元剤としては、最終濃度 0.45 g/ℓ のチオグリコール酸ナトリウムを用いる [14]。その後、SRB を接種して Eh を制御した運転を行うが、間欠的に空気を供給して制御した。pH

表 2 硫黄酸化細菌の培地

SM MEDIUM	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.5 g
NH <sub>4</sub> Cl	0.3 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.1 g
10 % Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> solution	100.0 ml
Trace metal solution *	5.0 ml
Distilled water	900.0 ml
Adjust pH to 7.5	
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> solution is added aseptically after filtration.	
*Trace metal solution :	
Ethylenediaminetetraacetic acid	50.0 g
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	22.0 g
CaCl <sub>2</sub>	5.54 g
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	5.06 g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	4.99 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1.10 g
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	1.57 g
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1.61 g
Distilled water	1000.0 ml
Adjust pH to 6.0 with KOH.	

の制御は東亜電波社製の発酵用 pH 電極と pH 指示調節計で pH の測定と制御を行う。pH が設定値より高くなれば中和剤として 0.2N HCl を注入する。pH が設定値より低くなれば、中和剤として 4g/ℓ の NaOH を注入した。SRB の活性は、ヘッドスペースガス中の硫化水素測定で確認した。通気したガスの排ガスを、2.5 % 酢酸亜鉛液で吸収し、よう素滴定法で硫化水素を定量した。SRB 活性測定のための時間設定は、培地の濁りが著しく SRB 量が大きいと思われるときは、30 分程度とし、SRB 量が少なかったり pH · Eh 条件が厳しく SRB の活性が低下すると思われるときは、1 晩以上とした。

### 2.2.2 MPB 培養実験について

#### (1) 培地の確認

MPB は絶対嫌気性細菌であり、慎重な嫌気操作が要求されるが、基本的な方法は確立している [17]。ここでは、選定した *Methanosarcina* の培養実験を、酢酸塩、H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>、メタノールを基質とする 3 種類の培地に関して培養を確認するとともに、その基質の影響を調べる。

各培地を入れたバイアル瓶に接種して培養実験を行った。培地は、DSM のカタログに準じて表 3 のように 3 種

表 3 MPB 用培地組成

組成	基質	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	酢酸塩	メタノール	滅菌
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0.15 g	0.15 g	0.15 g	蒸気滅菌
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O		0.05 g	0.05 g	0.05 g	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O		0.04 g	0.04 g	0.04 g	
NaCl		0.3 g	0.3 g	0.3 g	
NH <sub>4</sub> Cl		0.5 g	0.5 g	0.5 g	
Trace elements *		5 ml	5 ml	5 ml	
Na resazurin 0.1g/l溶液		5 ml	5 ml	5 ml	
CH <sub>3</sub> COONa 3H <sub>2</sub> O			5.4 g		
脱気水		465 ml	465 ml	460 ml	
CH <sub>3</sub> OH 50%溶液				5 ml	
Vitamin solution **		5 ml	5 ml	5 ml	濾過
KHCO <sub>3</sub> 80g/l溶液		20 ml	20 ml	20 ml	濾過
L-Cysteine HCl H <sub>2</sub> O 50g/l溶液 ***		5 ml	5 ml	5 ml	蒸気
Na <sub>2</sub> S 9H <sub>2</sub> O 50g/l溶液 ***		5 ml	5 ml	5 ml	蒸気
ヘッドスペースガス		H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> (3 : 2)	N <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> (3 : 2)	N <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> (8 : 2)	

\* Trace metal solution (g/l)

NTA	12.8 g,	FeCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.35 g,	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.10 g,
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.024 g,	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.10 g,	ZnCl <sub>2</sub>	0.1 g,
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.025 g,	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.01 g,	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.024 g,
NaCl	1.0 g,	NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.12 g,	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.026 g,

First dissolve NTA in 200 ml water and bring the pH to 6.5 with KOH

\*\* Vitamin solution

Biotin	2.0 mg,	Folic acid	2.0 mg,	Pyridoxine-HCl	10.0 mg,
Thiamine-HCl	5.0 mg,	Riboflavin	5.0 mg,	Nicotinic acid	5.0 mg,
DL-calcium-pantothenate	5.0 mg,	Vitamin B <sub>12</sub>	0.1 mg,	p-Aminobenzoic acid	5.0 mg,
Lipoic acid	5.0 mg,	Distilled water	1000.0 ml		

\*\*\* 還元剤

類の培地を調製した。また、これらの培地調製は酸素の混入を防ぐ必要があるため、嫌気グローブボックス内で行うか嫌気性ガスを通気しながら行った。培地中のレサズリンの脱色 (-0.042V 以下) で培地が十分還元状態になったかどうかを見極めた。これに、シリンジで *Methanosarcina* を接種し、接種したバイアル瓶を 35°C でインキュベーションした。その後、ヘッドスペースガスを無菌的にシリンジで採取し、ガスクロマトグラフィーによるメタンの分析を行い、MPB (*Methanosarcina*) の増殖を確認した。

培地確認実験の結果として、培地調製に関しては、レサズリンの着色もなく、還元状態で作成することができた。インキュベーション後のメタンの発生状況を図 4 に示す。各培地においてもメタンの発生が確認できたが、その程度には大きな違いがあった。(H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>) > メ

タノール > 酢酸塩の順であった。そこで前者 2 種類の培地を用いてファーマンタの培養を行った。

### (2) ファーマンタによる実験

MPB の実験方法は、基本操作や環境条件の調製方法については SRB と同様であり、異なる点は以下の点である。

- 1) 活性の測定としてメタンガスの分析を行う。
- 2) SRB より嫌気条件に敏感である。
- 3) Na や K 等の一価の陽イオンに阻害されやすい [18]。上記の点を考慮して還元環境を維持するためにファーマンタの通気ガスに必要なに応じて H<sub>2</sub>S を含ませ、pH 制御には NaOH の使用を避ける理由でガスラインの N<sub>2</sub> ガスと N<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub> ガスの供給量を制御して pH 調整を行った。

### 2.2.3 SOB 培養実験について

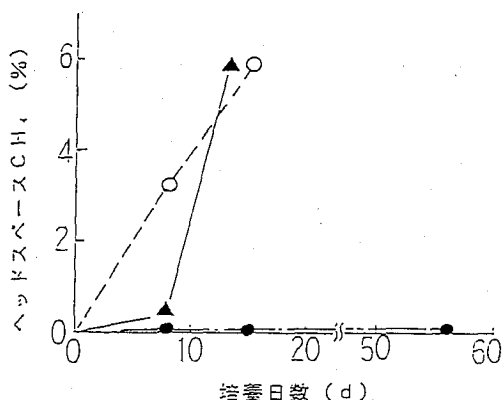


図4 バイアル瓶での培養による *Methanosarcina* のメタン発生状況 (○: 基質  $H_2 + CO_2$ 、●: 基質酢酸塩、▲: 基質メタノール)

### (1) 培地の確認

*T. thioparus* の生育特性を調べるために pH、還元条件を限定した耐性調査試験の予備実験として各 pH 領域における増殖テストを行った。各 pH の培地は表 2 の組成の  $KH_2PO_4$  と  $Na_2HPO_4$  の混合比を変えて行った。硫黄源にはチオ硫酸塩を用いて温度  $30^\circ C$  で培養した。生育温度については  $35^\circ C$  では生育が不安定であるためこの温度とした。各 pH の培地 5ml を加えた試験管を振とう培養して SOB を増殖させた。その結果は表 4 に示すように初期 pH 7.5~7 で良く生育する事が認められる。またこの pH 領域では菌の増殖に伴い急速に pH が低下し、通常の培養法では pH のコントロールがむずかしいことが分かる。さらに、硫黄粒子が生じることにより白濁し、増殖に伴う菌体自体の懸濁と混同することが分かった。

表 4 *Thiobacillus neapolitanus* の生育の pH 特性 (5 日間培養後判定)

初期 pH	8.5	8.0	7.5	7.0	6.55	6.2
増殖	±	+	++	++	+	+
5 日後 pH	8.0	7.6	5	4.6	4.5	4.6

### (2) フェルメンタによる実験

実験装置のフェルメンタは MPB と同じ容量 390 ml の容器を用いた。接種した微生物 (種菌) は *Thiobacillus thioparus* (SOB) を用いた。耐性調査試験における菌の生育状況を調べる事を目的として、比較対象のためにフ

アーメンタを用いて通常の中性領域通気培養で菌の増殖、Eh、pH 変化および  $30^\circ C$  と  $35^\circ C$  の増殖特性を調べた。培地は表 2 の組成の培地を用いた。培養条件は攪拌しながら  $30$  または  $35^\circ C$  を保った。ガスは低 Eh 用には  $N_2$  または  $H_2 + CO_2 + N_2$  (4:1:95) を、また高 Eh 用には空気を用いた。pH の調整は 0.5N KOH と 0.5N NaOH の混合溶液を添加して調整した。増殖の検出は培養液を分取し、固相を遠心分離後、上澄み液の濁度を測定した。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 *Desulfovibrio* について

図 5 に本実験の結果を耐性領域図として示した (一部 MRS94 にて発表済み; [12])。結果をまとめると、次の 2 つのことが分かった。SRB は設定した pH・Eh 条件の範囲では、Eh が低いほど硫化物生成活性が高く (増殖しやすく)、ある Eh を超えると活性が無くなった (増殖しなくなった)。また、SRB 増殖可能な Eh 上限は、pH が高いほど低下した。後者の現象を実測データで示した例は無いと思われる。一方、実験結果の一部で SRB 増殖可能な Eh 上限値が、菌体量に依存する傾向があった。ガス発生量の違いでは説明できず、測定誤差と細胞数の影響も考えられるが、次のように考えた。フェルメンタ内にフロク (凝集) ができることにより、フェルメンタの Eh よりフロク内部の Eh が低くなったためフロク内部の SRB がより増殖しやすくなった可能性もあり得る。測定精度を上げるためには菌体量が多い方が良いが、フロク化による微細環境 (Microenvironment) の形成は今後の検討課題として残った。

一方、ここでは増殖の検出方法として代謝生成物である硫化水素の分析を行っている。ここで、硫化水素発生を確認できなかったプロットについては、もっと長期間測定すれば硫化水素発生が確認できる可能性も否定できない。そこで、本実験条件で設定した pH、Eh 条件で微生物の繁殖を確認できる検出限界を検討した。まず、SRB が増殖したと判断するための硫化水素発生速度の最低値を求めた。本実験では硫化水素発生速度  $0.02 \text{ mgS/h}$  を SRB 増殖確認のための最低値としている。SRB 活性測定時間帯を 2 時間以上とすれば分析精度の面からも  $0.02 \text{ mgS/h}$  を検知できる。この  $0.02 \text{ mgS/h}$  の値は、最適条件での SRB の硫化水素発生速度の何% にあたるかを求めた。Brown によれば、 $10^9$  個/ml 程度 *Desulfovibrio* 細胞数増加が  $10 \text{ mmol/l}$  ( $320 \text{ mg/l}$ ) 程度の硫化物

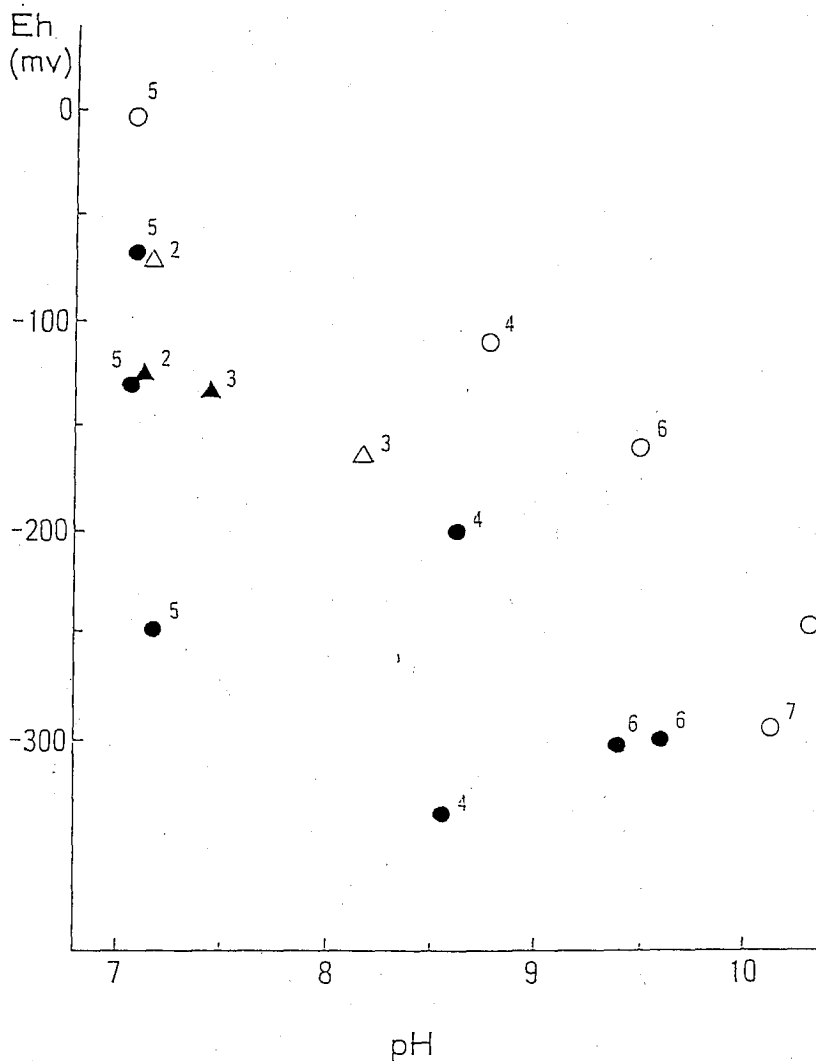


図5 *Desulfovibrio desulfuricans*の耐性領域図 (35°、改変 17-1 培地使用); ●: 硫化水素発生確認 (Run 4~7)、▲: 硫化水素発生確認 (Run 2~3)、○: 硫化水素発生確認せず (Run 4~7)、△: 硫化水素発生確認せず (Run 2~3); 肩の数字は Run の番号を示す。

生成につながっている [11]。すなわち 1mg の硫化物生成は、 $(10^{12} \text{個}/\ell) / (320 \text{ mg}/\ell) = 3.1 \times 10^9$  の細胞数増加に相当する。これがそのまま本実験にあてはまるとすれば、硫化水素発生速度 0.02 mgS/h は、 $3.1 \times 10^9 \times 0.02 = 6.2 \times 10^7$  個/h の SRB 細胞数増加に相当する。一方、本実験でのファーメンタ液あたりの SRB 細胞数は、最適な実験条件での測定で、 $(3 \sim 8) \times 10^7$  個/ml であった。ファーメンタ液量 620ml を乗じると細胞数は

$2 \times 10^{10}$  個以上である。また、好適条件の *Desulfovibrio* の比増殖速度  $\mu_m$  は Brown によると 0.1~0.2/h であり [11]、比増殖速度は次式より

$$\mu_m = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt}$$

ここで、 $x$ : 細胞数、 $t$ : 時間である。 $x = 2 \times 10^{10}$ 、 $\mu_m = 0.1/\text{h}$  を上式に代入すると、 $dx/dt = 2 \times 10^9$  個/h が求まる。



表5 *Methanosarcina*のファーメンタでの培養におけるメタン発生

基質	MPB接種後の日数	pH	Eh(mV)	ガス流量 (ml/min)	排ガスメタン(%)	メタン発生量(ml/h)
H <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub> (8:2)	0	7.56	-176	10.5		
	3	7.78	-190	10.5	0.016	0.10
H <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub> +N <sub>2</sub> (4:1:95)	0	7.78	-190	10.5	0.016	
	3	8.91	-211	10.5	<0.001	不検出
メタノール	0	8.31	-230	10		
	7	8.32	-221	10.5	0.007	0.04
	8	8.33	-220	10.5	0.030	0.19
	9	8.33	-218	10.5	0.35	2.21
		8.20	-206	10.5	0.58	3.65
		10	8.14	-175	10.3	0.83
	13	8.13	-162	10.3	0.81	5.01

この、好適条件の細胞数増加の値  $2 \times 10^9$  個/h に対し、本実験の硫化水素発生速度  $0.02 \text{ mgS/h}$  に相当する細胞数増加の値  $6.2 \times 10^7$  個/h は約 3% となる。すなわち、SRB 増殖の最適条件での増殖速度の約 3% 以上の速度であれば、本実験において SRB 増殖ありと判断したことになる。*Desulfovibrio* は SRB の中でも培養が容易で増殖が速い種類であるが、もし、これが極めて低い硫化水素発生速度（最適条件での増殖速度の約 3% 未満の増殖速度に相当）を維持しながら増殖するとすることがあるとすれば、そういう増殖は検知できていない。長期の処分環境を検討する際には本測定方法の感度向上が課題となる。また、たとえ長期間測定を行い極めて微量の硫化水素発生を確認できた場合でも、その pH、Eh 条件で SRB が増殖した判断ができるかどうか難しい問題を含んでいる。それは、SRB がフロックを作る場合があり、そのときフロック内部の pH、Eh 条件が設定条件より好適な側にずれてフロック内部で微量の硫化水素発生があり得るからである。これらの問題解決が必要となるだろうが、現段階では上述した測定下限値をもって増殖の有無を判定することとした。

### 3.2 *Methanosarcina*について

培地確認実験で *Methanosarcina* の増殖が大きく検出された H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub> 基質について 2 種類のガス組成の影響を調べた。H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub> (8:2) と H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub> + N<sub>2</sub> (4:1:95) である。結果を表 5 に示した。前者ではメタンの生成を確認はできたが、ORP、pH のコントロールが難しかった。環境耐性試験のように長期間 pH と Eh を制御しながら培養を続けるためには、基質の H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub> を連続供

給する必要がありファーメンタを用いる方法では改良の必要があることがわかった。

それに対し、メタノールを基質とする方法では、Eh は ORP 指示調節計の制御により微量の空気を混入させることにより順次上昇することができ、各条件でのメタン発生を検出することができた。また、pH は N<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub> ガスを混入させることによりコントロール可能であることが分かった。SRB と同様に MPB の検出下限について前提条件を以下のようにして求めた。

A: 細胞あたりのメタン生成活性の検出限界 (ml/個/h)

X: ファーメンタ内の細胞濃度 ( $5 \times 10^6$  個/ml)  
(この値は顕微鏡による観察の結果細胞群の占有面積を求め、*Methanosarcina* の細胞直径を平均  $5 \mu\text{m}$  として細胞数に換算した。)

V: ファーメンタ内の液量 (600ml)

F: ガス流量 (10ml/min)

C: 排気ガス中のメタンの検出下限値 (0.02vol%)

以上をもとに定量下限値を求めると、

$$C(\%) = (A \cdot X \cdot V / (F \cdot 60)) \cdot 100$$

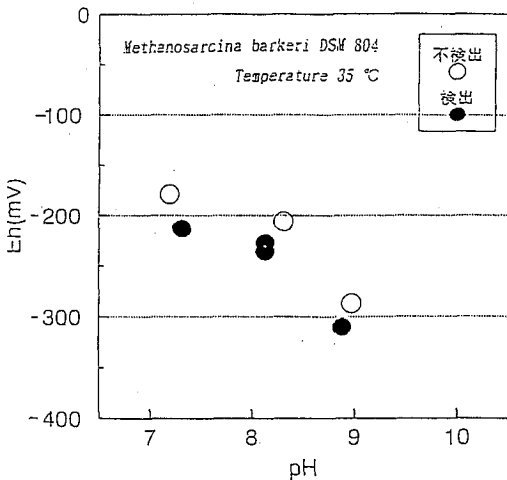
より  $4 \times 10^{-11}$  (ml/個/h) の検出限界が得られた。ただし、これを増殖速度に換算するデータが今のところない。

耐性領域の実験として、ファーメンタの pH を 7、8、9 に設定し、各 pH 条件で Eh を上昇させ MPB の生息を調べた。結果を表 6 に、ファーメンタ内の微生物の状況を図 6 に示した。pH が 7.3、8.9 の時メタンの発生が確認でき、*Methanosarcina* の増殖を顕微鏡的にも確認した。また、pH 8.1 の時、Eh = -230 mV ではメタンが発生したが、わずかにガス量を変化させ Eh = -206

表 6 MPB の耐性調査試験結果

基質	MPB接種後の日数	pH	Eh(mV)	ガス流量 (ml/min)	排ガスメタン (%)	メタン発生量 (ml/h)
メタノール	7	7.31	-212 ~-213	10.0	0.009	0.05
	14	7.19	-179	10.2	<0.001	不検出
メタノール	15	8.12	-235 ~-238	10.2	0.008 ~0.02	0.05 ~0.12
	16	8.12	-220 ~-234	10.2	0.005	0.03
	17	8.30	-206	10.5	<0.001	不検出
メタノール	12	8.88	-310	10.0	0.008 ~0.009	0.05
	19	8.97	-287	10.0	<0.001	不検出

mV ではメタンは検出できなかった。この付近に MPB の生成境界があると思われる。以上の結果を図 7 に耐性領域図としてまとめた。

図 7 *Methanosarcina barkeri* の耐性領域図

### 3.3 *Thiobacillus thioeparus* について

中性領域における培養の結果、図 8 に示すように初期 pH7.5、30°C 培養菌は 1 週間で十分に増殖した。SOB 培地の確認実験 (2.2.3) と異なり 6.8 程度に留まった。逆に 35°C では図 9 に示すようにほとんど生育せず、また、1 週間後に 30°C に返しても顕著な生育はみられな

かった。酸化還元電位は pH7.5 のもので 240 mV から 220 mV であった。

弱アルカリ、高 Eh 制御における試験は pH においても同様に制御が可能であった。Eh については高めに設定したが、250 mV 前後に維持され、これより高くならなかった。これは培地中のチオ硫酸イオンなどが優占的に Eh 保持因子となったためと思われる。この条件下の菌の増殖は 1 週間では全く生育が認められずその後も生育したとしてもわずかであった。すなわち pH8 に制御することでかなり生育が悪くなった。

低酸化還元レベルの制御も基本的には培地の酸化還元電位 (主としてチオ硫酸塩) に依存してしまうが、ここでは 4% H<sub>2</sub> : 1% N<sub>2</sub> の混合ガスである程度の Eh 160 mV ~100 mV の Eh の制御ができた。このガスを利用することで低 Eh 下での培地中の還元イオンの保持で菌の増殖の可能性もあると考えたが、結果は図 10 に示すように 21 日間培養も増殖したとはいえないものとなった。

*T. thioeparus* 菌の特性では Eh 250 mV、pH7.5 ではよく生育する。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ある。中性でも Eh 160~100 mV では生育が悪いという結果が得られた。

SOB の実験結果では、結論として土壤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にとどまった。装置面では培地の pH は 0.2 の誤差でコントロール可能である。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てしまい、硫化水素などを使うことによる低 Eh の制御が課題

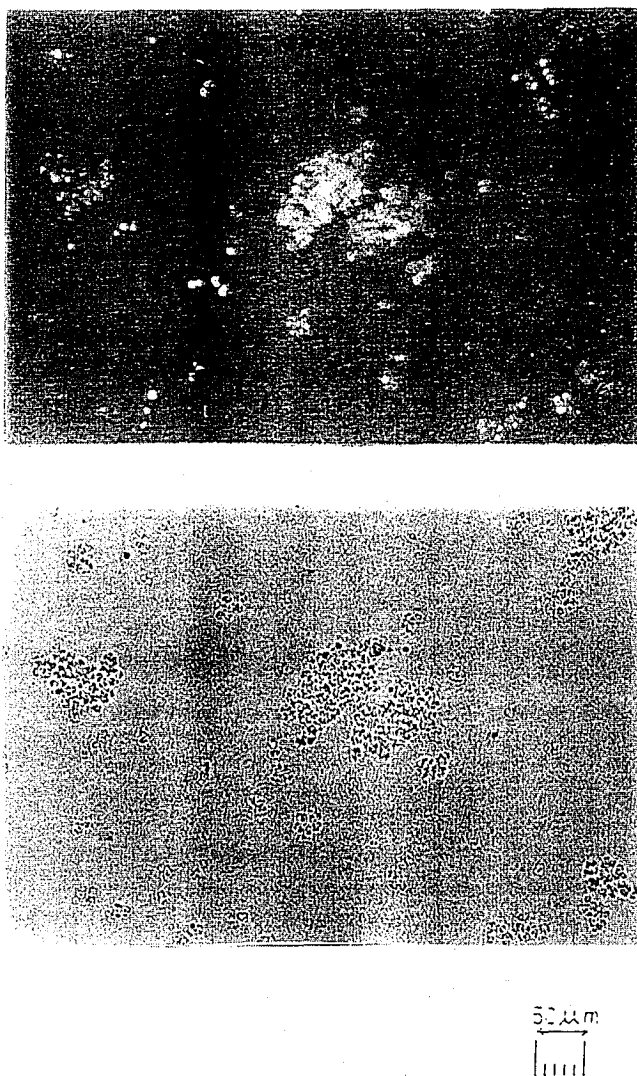


図6 フェーメンタ内の微生物の写真(上: 光学顕微鏡、下: 蛍光顕微鏡)

となった。

#### 4. まとめ

処分場での微生物の生息条件のうち深部地質環境への耐性を実験的に検討することを目的として、pH、Ehを自動的に制御可能なフェーメンタを制作した。本装置を用いて硫酸塩還元菌について、pH、Ehの条件を設定し細菌を接種して増殖の有無を確認することにより実験的手法により耐性領域図の作成が可能となった。

硫酸塩還元細菌(SRB)、同じく鉄の腐食を促進させる微生物として硫黄酸化細菌(SOB)について、またガスを発生し核種移行を促進すると思われるメタン生成細菌(MPB)について同様にフェーメンタを用いて35°C(SRB、MPB)、30°C(SOB)で培養した。その結果、活性を示すEh領域は、SRBはEh=-70~-340 mVの範囲でpHとEhが低いほど高くなった。pHは最大8.6(Eh=-340 mVの時)、Ehは最大-70 mV(pH=7の時)であった。SOBはpH=7.5でEh=+240 mV以上で

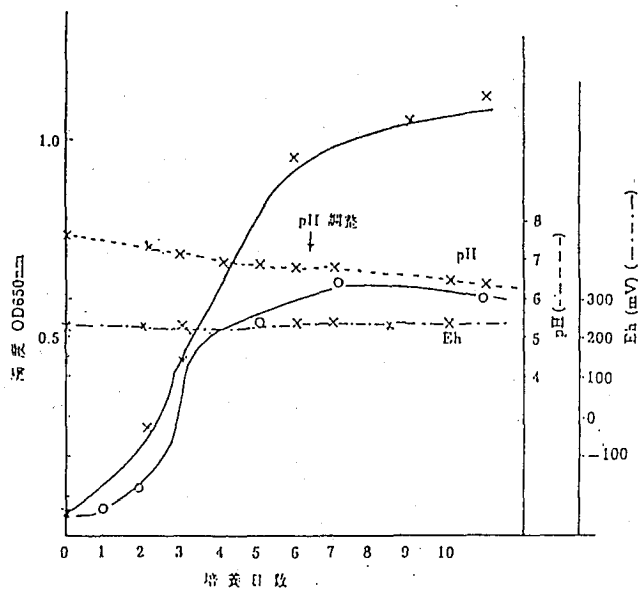


図8 通気培養、中性 pH における *T. thioparus* の増殖曲線 (30°C)

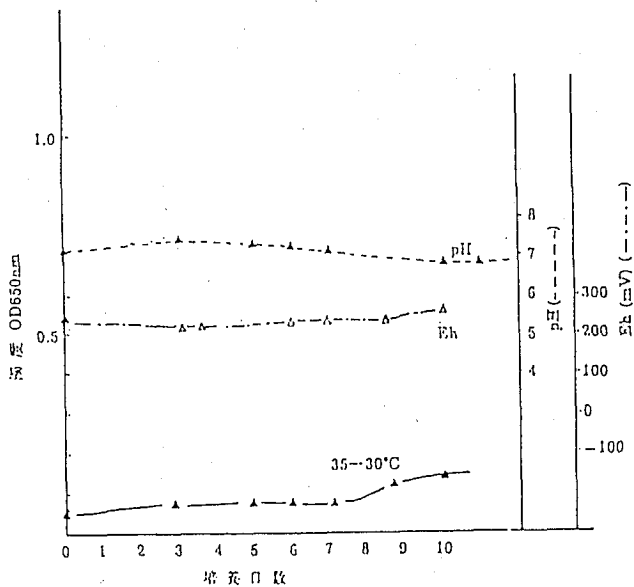


図9 通気培養、中性 pH における *T. thioparus* の増殖曲線 (35°C)

pH=8 以上では増殖しなかった。また、MPB は pH=8 で Eh=-210 mV 以下であった。このことから処分環境

として考えられるアルカリ、低 Eh の環境で SRB、MPB が生息可能であることが分かった。

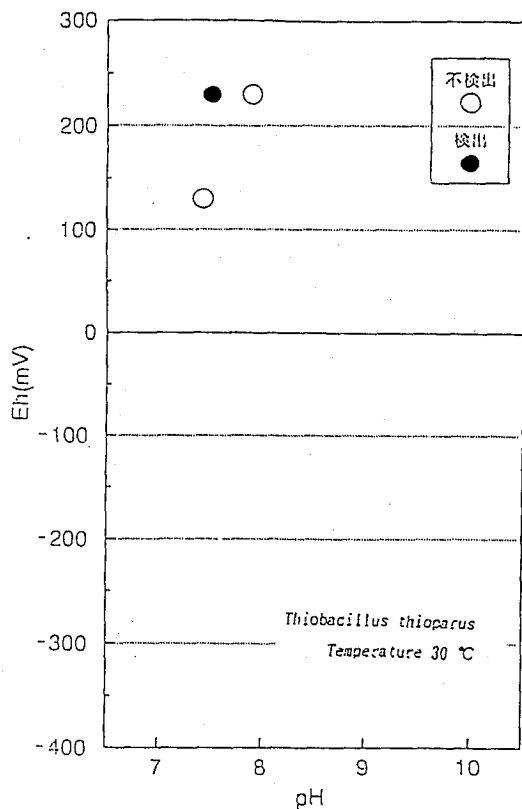


図 10 SOB (*Thiobacillus thioeparus*) の増殖領域の比較

しかし、SOBの実験結果では、結論として土壌菌の硫酸酸化細菌を 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にとどまった。

また、複数の細菌の相互作用の影響についてもまた考慮すべきことと考えられる。SRBにより特に腐食を起こしやすい土壌は間欠的に嫌気性になる条件であり [16]、SOB との共存による相互作用が間欠的な条件変化を引き起こすと思われ、両細菌の共存系での活性測定の研究が重要である。本研究の結果のように、嫌気性細菌である SRB と好気性細菌である SOB との至適 Eh は異なっており SRB と SOB が共存するとは考えにくい。しかしながら、自然環境では Eh の異なる環境が隣接することは珍しくなく、微細な環境の形成がおこる。すると至適 Eh 条件の異なる細菌同士が隣接することも可能であり、「微細環境での共存」といえる。また、生息条件が変化しても細菌が死滅せず、成長速度が遅いだけの場合もある。この場合は、同じ場でも時間の経過により生

息する微生物が変化し、例えば SRB と SOB が交互に活動することにより Eh も変化する可能性がある。これは「時間経過での共存」といえる。Mori は下水管設備において、廃水近くで SRB が繁殖し硫化水素を放出し、その硫化水素ガスを上部のコンクリート部分に繁殖した SOB が利用するという硫黄の循環系が存在して金属とコンクリートの腐食の促進が観測されたことを報告している [19]。今後共存系での実験方法の検討を続けたいと考えている。

また、本報告で述べた実験装置及び手法は、深部地質環境を模擬した微生物実験を可能とし、生息条件の把握に限らず、岩石や人工バリア材料との取着実験、放射性核種との結合定数取得、固化体からの核種の浸出挙動への影響実験にも適用可能である。本方法をもとにして、より複雑な系での微生物影響実験によるデータ取得を行えると考えている。

## 5. 参考文献

- [1] West, J. M.: *Radioactive Waste Manage. Nucl. Fuel Cycle*, **6**, 79 (1985).
- [2] Nagra Working Group on Container Technology: NTB 84-32 (1985).
- [3] Kemakta Konsult: NTB 85-17 (1986).
- [4] Pedersen, K.: SKB T/R 88-01 (1987).
- [5] Champ, D. R.: AECL-85-66 (1984).
- [6] West, J. M. et al.: *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.*, **26**, 487 (1984).
- [7] Pedersen, K.: SKB T/R 89-23 (1989).
- [8] Pedersen, K.: SKB T/R 90-05 (1990).
- [9] Stambury, P. F. and Whitaker, A.: “発酵工学の基礎” (石崎文彬訳)、学会出版センター (1984).
- [10] Cappenberg, Th. E.: *Microbial Ecol.*, **2**, 60 (1975).
- [11] Brown, D. E.: *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, **23**, 141 (1973).
- [12] Fukunaga, S. et al.: *Sci. Basis Nucl. Waste Manage. XVIII* (accepted).
- [13] Birnbaum, S. J. and Wireman, J. W.: *Chem. Geol.*, **43**, 143 (1984).
- [14] 土壌微生物研究会: “新編土壌微生物実験法”、養賢 (1992).
- [15] Kamagata, Y. and Mikami, E.: *Int. J. Systematic Bacteriol.*, **41**, 191 (1991).
- [16] Postgate, J. R.: *The Sulphate-Reducing Bac-*

*teria*, Cambridge Univ. Press (1979).

[17] 古賀洋介 他: 発酵工学、65、419 (1987).

[18] Kugelman, I. J. and Chin, K. K.: *Toxicity, Synergism, and Antagonism in Anaerobic Waste Treatment Processed, Anaerobic Biological Treatment Processed*, p55-90 (1971).

[19] Mori, T. and Koga, M.: *Wat. Sci. Technol.*, 23, 1275 (1991).