

行政院原子能委員會
委託研究計畫研究報告

高完整性混凝土處置容器之長期抗菌性研究(72-02)
Investigation of the Anti-Microbial Effects on High Integrity
Container for Storage Disposal of Radioactive Waste

計畫編號：1052001INER029

受委託機關(構)：國立清華大學 原科中心

計畫主持人：周鳳英

聯絡電話：03-5742884

E-mail address：fichou@mx.nthu.edu.tw

協同主持人：溫曉薇

研究期程：中華民國 105 年 2 月至 105 年 12 月

研究經費：新臺幣 五十六 萬元

核研所聯絡人員：陳鈺沛

報告日期：105 年 12 月 11 日

目 錄

中文摘要	1
ABSTRACT	2
壹、計畫緣起與目的	3
一、背景	3
二、目的	5
貳、研究方法與過程	6
一、三株 SRB 測試菌株之國外採購及培養	6
二、建立 SRB 菌株計數方法	7
三、向原能會申請實驗室使用 ³⁵ S 核種之許可。	7
四、於厭氧箱中製備含受測 SRB 之夯實膨潤土	7
五、夯實膨潤土	8
六、夯實含 SRB 菌株之膨潤土	9
參、主要發現與結論	9
一、微生物培養	9
二、建立 SRB 菌株計數方法	15
三、製備含受測 SRB 之夯實膨潤土	16
四、向原能會申請實驗室使用 ³⁵ S 核種之許可。	17
五、夯實含 SRB 之膨潤土	17
六、探討硫酸鹽還原菌於製備過程中之存活狀況	17

中文摘要

在用過核燃料之地質處置上，膨潤土具維持銅罐之完整性及隔離用過核燃料的重要功能。膨潤土可以阻礙放射性核種向外遷移及含有腐蝕性成分之地下水向內輸送，且可作為岩石移動的緩衝劑。硫酸鹽還原菌（SRB）存在膨潤土及其周圍的地下水中，可以經由還原硫酸鹽（SO₄²⁻）為硫化物（S²⁻）造成銅罐之腐蝕。

本研究為我國高放處置微生物學相關研究之起步，主要為依循瑞典模式（SKB R-15-05）建立一個系統以評估微生物對銅罐完整性之影響。三年的研究包括：培養 *Desulfovibrio aespoeensis* (DSM 10631)、*Desulfotomaculum nigrificans* (DSM 574)、*Desulfosporosinus orientis* (DSM 765) SRB 細菌並建立檢測方法、製備添加 SRB 之膨潤土（Wyoming MX-80），及膨潤土夯實後對銅片之長期腐蝕測試評估。相關之評估資料可提供建立用過核燃料最終處置場許可證申請之需，為長期的安全性評估之一部份。

關鍵字：微生物、最終處置、膨潤土

Abstract

In geodisposal of spent nuclear fuel, the bentonite barrier has an important function in maintaining the integrity of the copper canisters that isolate the spent fuel. The bentonite barrier the outward transport of radionuclides and the inward transport of corrosive groundwater components, while acting as a buffer against the movement of rock. Sulphate-reducing bacteria (SRB) that are present in the surrounding groundwater or reside naturally in the bentonite can damage the canister by producing corrosive sulphide (S^{2-}) by the reduction of sulphate (SO_4^{2-}).

The project is a preliminary study that mainly follows the Swedish model (SKB R-15-05) in establishing a system for evaluating of the effects of microbes on the integrity of the aforementioned copper canisters. Three species of SRB, *Desulfovibrio aespoeensis* (DSM 10631), *Desulfotomaculum nigrificans* (DSM 574) and *Desulfosporosinus orientis* (DSM 765), and Wyoming MX-80 bentonite clay powder were used in the experiment. SRB was cultured and detected and SRB-bentonite clay slurries was prepared. The relevant evaluations are part of the long-term safety assessment of an SR-Site in support of an application for a license to build a final repository for spent nuclear fuel.

Keywords: microbes, final repository, bentonite

壹、計畫緣起與目的

一、背景

高放射性廢棄物最終處置的基本要求是選擇適當的地底地質環境，將高放射性廢棄物永久安置，使其與人類生活圈隔離，以確保民眾安全及環境品質。世界核能先進國家已對用過核燃料或經再處理後所產生高放射性廢棄物之最終處置提出深層地質處置、深孔處置、冰層處置及核種轉換處置等不同之方案進行分析探討，國際原子能總署（IAEA）於 2001 年針對各國執行中之高放射性廢棄物最終處置計畫，建議採深層地質處置方式。深層地質處置法同時也是我國法令明訂之最終處置方式（高放射性廢棄物最終處置及其設施安全管理規則）。目前核能先進國家如美國、瑞典、瑞士、日本、法國、加拿大、比利時、德國、英國等最終處置計畫均採行此一方案，並積極地進行系統化的規劃與研究。深層地質處置是將用過核子燃料及高放射性廢棄物埋在深約 300 至 1000 公尺的穩定地質環境中（如花崗岩），再配合用過核子燃料廢棄物罐（如銅罐）、緩衝材（如夯實的膨潤土）與回填材料（如花崗岩骨材+水泥）等工程設施與包含處置母岩（如花崗岩）及地質圈障壁所組成的多重障壁，可以有效阻絕或遲滯放射性物質的外釋與遷移，以換取足夠的時間與阻隔（黃秉修，民國 103 年）。其中選用之膨潤土材料成份應不可具有對廢棄物罐有害之物質，緩衝材料成份之需求上要求硫

化物及有機碳成份需低於 1%wt (SKB, 2010c)。緩衝材料之膨潤土成份中，除蒙脫石為主要礦物組成外，另含有其他礦物，在處置場工程障壁緩衝材料選擇時，則需考量膨潤土中的這些成份是否會對廢棄物罐造成不良影響，這些礦物作用對工程障壁功能的整體影響，係取決於地下水與緩衝材料之間的交互影響 (SKB, 2010a)。處置環境中硫化物來源包含源自緩衝及回填材料中之硫化礦物之溶解，及緩衝及回填材料中微生物之硫酸鹽還原形成硫化物並將之溶於地下水中，一者來自岩層中之硫化礦物之溶解，或者來自地下水系統中微生物對硫酸鹽之還原 (SKB, 2010b)。

硫酸鹽還原菌 (sulfate reducing bacteria, SRB) 為厭氧菌，廣泛存在許多厭氧環境中，是主要的金屬腐蝕微生物，尤其是對地下管路的腐蝕，造成經濟損失的影響。於厭氧情況下硫酸還原菌利用硫酸根離子 (SO_4^{2-}) 當作電子接受者 (electron acceptor)，利用代謝過程電子的轉移作用，將元素硫或是硫酸根離子還原成硫離子 (S^{2-}) 或硫化氫 (H_2S)，並將硫離子及硫化氫釋放到環境中，硫化氫具強腐蝕性 (Gibson, 1990)。硫酸鹽還原菌於深地下水 (至少 600 至 700 米) 是很常見的。尤其微生物一般較能夠承受惡劣的環境，對於硫化物生產的潛力及可能產生的影響在安全性評估上是值得探討的 (SKB, 2010a)。

研究指出硫酸鹽還原菌可於厭氧環境下於夯實之緩衝材料中

存活並增加硫化物的生成 (Pedersen et al., 2000 ; Masurat et al., 2010) 。Hajj 等人於模擬高放射性廢棄物處置場之高壓環境進行 SRB 對 P235GH 不銹鋼之腐蝕研究，結果顯示硫酸鹽還原菌能於高壓環境下生長並對 P235GH 不銹鋼造成腐蝕，其腐蝕速率為 $28.7 \pm 4.3 \mu\text{m}/\text{year}$ 。在廢棄物處置環境中如果有水及硫酸鹽還原菌之存在，可能造成鋼鐵貯存桶之快速腐蝕 (Hajj et al., 2010) 。Smart 等人之文獻報導瑞典 SKB 計畫，以銅-鐵貯存桶做為用過核燃料處置之貯存容器放置於深層地底處置場，周圍環繞著緩衝材料，評估貯存桶腐蝕速率。實驗結果顯示微生物之活動可能為加速銅、鐵腐蝕速率的原因 (Smart et al., 2011) 。

二、目的

核研所研製之高完整性容器 (high integrity container, HIC) 已由行政院原子能委員會放射性物料管理局核准使用作為「低放射性廢棄物混凝土盛裝容器」，具穩定性及耐久性。本研究已完成放射性廢棄物處置高完整性容器(HIC)之耐生物劣化研究，以 ASTM G21、G22 測試，及以 10 倍菌量的加速測試，顯示對試體抗壓強度、重量變化均無顯著影響。現因應未來廢棄物處置可能採高低放共構處置方案，我國高放處置現階段參考處置概念採用瑞典 KBS-3 銅質外殼鑄鐵為內裡的廢棄物罐參考設計。微生物為接觸放射性廢棄物之第一線生物，硫化物為造成廢棄物罐腐蝕之重要因子，硫化

物之生成可能為：緩衝與回填材料中微生物之硫酸鹽還原形成硫化物並將之溶於地下水中，或者來自地下水系統中微生物對硫酸鹽之還原（SKB, 2010b），因此高放處置之安全評估需考量硫酸鹽還原菌可能造成廢棄物罐之腐蝕。

本研究為我國高放處置之微生物相關研究初起步，參考 Svensk Kärnbränslehantering AB 於 2015 提出之 R-15-05 報告「Microbial sulphide-producing activity in MX-80 bentonite at 1750 and 2000 kg m⁻³ wet density」，探討硫酸鹽還原菌於高壓夯實緩衝材料中之存活狀況，提出三年期計畫。本年度為第一年，研究內容包括：SRB 菌株購買、建立 SRB 菌株之培養、計數等相關技術，同時建立添加 SRB 於膨潤土的製備流程，建立 SRB 菌株存活率之評估技術。

貳、研究方法與過程

一、三株 SRB 測試菌株之國外採購及培養

實驗中使用三種不同的 SRB，分別為 *Desulfovibrio aespoeensis* (ATCC 700646/ DSM 10631)、*Desulfotomaculum nigrificans* (ATCC 19998/ DSM 574) 及 *Desulfosporosinus orientis* (ATCC 19365/ DSM 765) (SKB, 2015)。

由食品工業研究所經國外 German collection of microorganisms and cell cultures (DSMZ) 採購。培養用培養基依其標準方式配製

(Widdel and Bak, 1992)，皆需於厭氣環境下培養。

二、 建立 SRB 菌株計數方法

Acridine orange direct count method (AODC) 是一種利用螢光染料-吡啶橙 (acridine orange, AO) 與微生物體內 DNA 或 RNA 結合後，以 436 或 490nm 的波長激發產生螢光，再以螢光顯微鏡直接計數微生物數量的方法。由於微生物代謝能力的差異會於體內產生不同比例的 RNA 與 DNA 量，因此利用 AO 與 DNA 或 RNA 結合時所產生的不同螢光也能有效判別微生物的活性。

取 SRB 菌液加入 10 mg/l 吡啶橙染色 7 分鐘，將染色水樣經濾膜 (孔徑 0.2 μm ，直徑 13 mm，經 Sudan-black solution 預染色之聚碳酸鹽過濾膜 (polycarbonate filters, Nuclepore)) 過濾，過濾後將濾膜置於載玻片上，以螢光顯微鏡計數視野中發橙色或綠色螢光的菌體，激發光濾光片為 450~490 nm，光束分離濾光片 515 nm (Pedersen and Ekendahl, 1990)。

三、 向原能會申請實驗室使用 ^{35}S 核種之許可。

四、 於厭氧箱中製備含受測 SRB 之夯實膨潤土

選用美國 Wyoming 州開採的 MX-80 膨潤土，屬於鈉型膨潤土。成分為 SiO_2 : 55~64%， Al_2O_3 : 18~21%， Fe_2O_3 : 2.5~2.8%， CaO : 0.1~1.0%， Na_2O : 2.5~2.7%， MgO : 2.5~6.2%， K_2O : 0.2~0.4%。瑞典採用此型膨潤土做為其放射性廢棄物處置場之緩衝材料。

於厭氧箱操作（由 97% N₂ 和 3% H₂ 的氣體配比），取 60 g 輻射滅菌後之膨潤土粉末分散在 1110 ml 的無菌厭氧水中，再分別加入三種 SRB 細菌各 30 ml 之菌液，並與膨潤土均勻混合。膨潤土粘土漿狀物在厭氧箱內大型玻璃培養皿中乾燥，直至通過了膨潤土的凝膠質地。此時將玻璃培養皿取出厭氧箱並放置在通風櫥中，讓粘土完全乾燥。之後以無菌勺將乾燥的粘土刮下，然後小心地研磨成細粉。再取 540 g 膨潤土粉與研磨粘土混合，即可得一批 600 g 膨潤土粉（5x10⁶ SRB/gdw）。另外 300 g 的膨潤土粉末在實驗室以加熱爐 110°C 進行熱處理一周，使膨潤土達完全滅菌，以做為對照組用。

評估混入 SRB 膨潤土製備後之菌株存活率，係以 MPN（most probable number）分析法進行，將樣品移到厭氧箱中，取 1 g 濕重（GWW）的樣品放入試管中加入 40 ml 無菌厭氧之 0.9% NaCl 溶液，移至震盪儀上震盪分散膨潤土（~2 小時），之後將上述樣品進行 10 倍及 100 倍稀釋，再分別接種於 5 管的 9 ml 厭氧 SRB 培養基中（Masurat et al., 2010）。MPN 樣品於厭氧箱中 28°C 下培養 4 週後，觀察其硫化物產生及顏色變化評估之。

五、 夯實膨潤土

試樣之水份含量是在對照組及添加 SRB 膨潤土夯實的前一天進行之。分別取 1 g 樣品於鋁碗以 105°C 加熱一夜。計算加熱前後

的重量差，取其平均值即為每批次膨潤土之水份含量。將上述製備之膨潤土在不透氣的塑料容器中運送至核研所，由專人以儀器夯實膨潤土。滅菌之對照組及添加 SRB 膨潤土夯實兩種不同的粘土濕密度（ $1,750 \text{ kg m}^{-3}$ 、 $2,000 \text{ kg m}^{-3}$ ）。

六、 評估夯實膨潤土中 SRB 菌株的存活率

使用以核研所建立之模擬深層緩衝材料之夯實設備，夯實含 SRB 菌株之膨潤土，以 MPN 分析測試其於不同時間下之 SRB 菌株存活率。

參、 主要發現與結論

本年度主要建立微生物培養條件及探討硫酸鹽還原菌於高壓夯實緩衝材料中之存活狀況。

一、 微生物培養

實驗中使用之 SRB 菌: *Desulfovibrio aespoeensis* (DSM 10631) 是以”DSMZ 193. DESULFOBACTER MEDIUM”之標準方式配製其厭氧培養液，以 30°C 培養之。而 *Desulfotomaculum nigrificans* (DSM 574)及 *Desulfosporosinus orientis* (DSM 765)則以 “DSMZ 63. DESULFOVIBRIO (POSTGATE) MEDIUM”之標準方式配製其厭氧培養液，分別以 55°C 及 30°C 培養之。

表 1 為配製 DSMZ 193. DESULFOBACTER MEDIUM 所需試

藥，其各溶液需分別配製，配製培養液的水均需先煮沸除氧：使用圓底燒瓶及另一三角瓶裝定量 RO 水及磁石，以微波爐進行加熱至沸騰，加磁石可避免突沸，沸騰後上矽膠塞並充入無氧氣體。

1. Solution A: 充無氧氣體下 (80% N₂+20% CO₂) 待圓底瓶中水之溫度冷卻後依續加入預先秤好之各藥品，以滴管吸取三角瓶的水將秤藥紙或瓶口上的藥品沖入，過程中隨時蓋上塞子，此時可加入 Solution B 混合。Solution A 中之 Selenite-tungstate solution 含有厭氧指示劑 Resazurin solution (藍)，加入後初始液體顏色為有氧粉紅色，將圓底瓶塞好持續充入無氧氣體至少 30 min，直至無氧淺黃色。此時吸取 Mix Sol. A+B 9.2 ml 裝填至 Hungate tubes 中 (空 Hungate tubes 先充氮氣 1 min)，裝填後再充氮氣至少 10 min 後蓋上試管蓋封口，以 121°C、15 min 滅菌 (滅菌後應回復無氧色)。
2. Solution C & Solution F: 分別於小密封瓶中秤入藥品，加定量前述煮沸過的水，置換以無氧氣體 30 min，以鋁蓋封口後經 121°C、15 min 滅菌。降溫後備用。
3. Solution D & Solution E: 需先將小密封瓶內裝 0.5 ml RO 水，置換 100% 氮氣 5 min，封鋁蓋後高溫滅菌備用。於無菌操作台內將預先配製好的 Sol. D&E 以針筒加裝 0.22 μm 無菌

filter 過濾入已滅菌之小密封瓶中。再以 100% 氮氣置換空氣 30 min。移除時應讓密封瓶維持正壓狀態。

- 將上述滅菌後之 Sol. A+B 之 Hungate tubes 及 Solution C~F 均移入無菌操作台內，取含 Sol. A+B 之試管管口過火，以排氧後之針筒取 0.5 ml Solution C 液注入試管中，再分別同上述法依序取 Sol. D、E、F 加入各 0.1 ml，使試管最終培養液體積為 10 ml。Sol. F 為還原液於每次培養菌株前加入，加入試管後稍後應轉變為無氧色。

表 1、配製 DSMZ 193. DESULFOBACTER MEDIUM 所需試藥

DSMZ 193. DESULFOBACTER MEDIUM (Solution A: 920 ml + Solution B: 1 ml + Solution C: 50 ml + Solution D: 10 ml + Solution E: 10 ml) + Solution F: 10 ml			
Solution A:		Solution B:	
Na ₂ SO ₄	3.00 g	Trace element solution SL-10	1ml
KH ₂ PO ₄	0.20 g	HCl (25%; 7.7 M)	10.00 ml
NH ₄ Cl	0.30 g	FeCl ₂ x 4 H ₂ O	1.50 g
NaCl	7.00 g	ZnCl ₂	70.00 mg
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1.30 g	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	100.00 mg
KCl	0.50 g	H ₃ BO ₃	6.00 mg
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.15 g	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	190.00 mg
Selenite-tungstate solution	1.00 ml	CuCl ₂ x 2 H ₂ O	2.00 mg
Resazurin solution (0.1% w/v)	0.50 ml	NiCl ₂ x 6 H ₂ O	24.00 mg
yeast extract	1.0 g	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	36.00 mg
Distilled water	920.0 ml	Distilled water	990.0 ml
Selenite-tungstate solution:			
NaOH	0.5 g		
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	3.0 mg		
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	4.0 mg		

Distilled water	1000.0 ml		
Solution C:		Solution D:	
NaHCO ₃	4.00 g	Na-L-lactate	2.50 g
Distilled water	50.00 ml	Distilled water	10.00 ml
Solution E: Vitamin solution	10.00 ml	Solution F:	
<i>Vitamin solution:</i>		Na ₂ S x 9 H ₂ O	0.40 g
Biotin	2.00 mg	Distilled water	10.0 ml
Folic acid	2.00 mg		
Pyridoxine-HCl	10.00 mg		
Thiamine-HCl x 2 H ₂ O	5.00 mg		
Riboflavin	5.00 mg		
Nicotinic acid	5.00 mg		
D-Ca-pantothenate	5.00 mg		
Vitamin B12	0.10 mg		
p-Aminobenzoic acid	5.00 mg		
Lipoic acid	5.00 mg		
Distilled water	1000.0 ml		

圖 1 所示為此厭氧培養液配製過程，其所有步驟均需於充氮氣狀態下進行，液體最後分裝至含墊片蓋可密封的試管（Hungate tube）或密封瓶中。

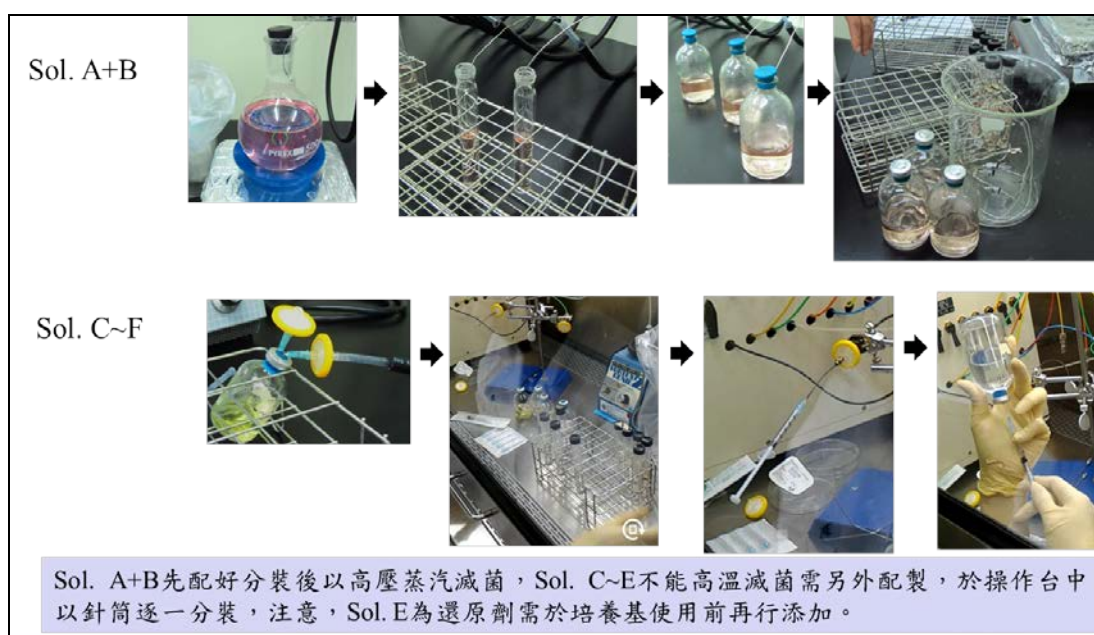


圖 1、DSMZ 193. DESULFOBACTER MEDIUM 配製過程

表 2 為 DSMZ 63. Desulfovibrio (Postgate) Medium 配製所需試藥，包含三種溶液亦需分別配製，配製培養液的水均需先煮沸除氧（與前述相同），使用圓底燒瓶及另一三角瓶裝定量 RO 水及磁石，以微波爐進行加熱至沸騰，沸騰後上矽膠塞並充入無氧氣體（100% N₂），待水之溫度冷卻後依續加入預先秤好之 Solution A 之各藥品，以滴管吸取三角瓶的水將秤藥紙或瓶口上的藥品沖入，過程中保持充氮氣隨時蓋上塞子。另分別以前述煮沸過冷卻的水配製 Solution B 及 Solution C，待 Solution A 各藥品溶解後加入 Solution B & C，以 NaOH 調整 pH 為 7.8，繼續充氮 30 min 後，裝填培養液至 Hungate tubes 中（空 Hungate tubes 先充氮氣 1 min），再充氮氣至少 10 min 後蓋上試管蓋封口，以 121°C 15min 滅菌後備用。此培養液中有添加指示劑，厭氧下為無色，滅菌後至接菌前若液體呈現粉紅色則表示氧含量過高，不宜使用。

表 2、 DSMZ 63. Desulfovibrio (Postgate) Medium 配製所需試藥

DSMZ 63. DESULFOVIBRIO (POSTGATE) MEDIUM			
Solution A: 980 ml + Solution B: 10 ml + Solution C: 10 ml			
Solution A:		Solution B:	
K ₂ HPO ₄	0.5 g	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0.5 g
NH ₄ Cl	1.0 g	Distilled water	10.0 ml
Na ₂ SO ₄	1.0 g		
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.1 g		
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2.0 g	Solution C:	
Na-DL-lactate	2.0 g	Na-thioglycolate	0.1 g
Yeast extract	1.0 g	Ascorbic acid	0.1 g
Resazurin solution	0.5 ml	Distilled water	10.0 ml

(0.1% w/v)	
Distilled water	980.0 ml

由國外採購 SRB 菌株經食品工業研究所菌種中心活化培養後寄存，分別取得三株 SRB 之菌種保存管，於實驗室活化培養並鏡檢觀察，*Desulfovibrio aespoensis* 為脫硫弧菌屬具運動性，不產孢。*Desulfotomaculum nigrificans* 為脫硫腸狀菌屬，是一種嗜熱、產孢桿菌。*Desulfosporosinus orientis* 為脫硫芽孢彎曲菌屬，產孢菌。*Desulfotomaculum nigrificans* 及 *Desulfosporosinus orientis* 均具周生鞭毛可進行運動，皆須以油鏡(100X)觀察之。

接菌時針筒須維持無菌與厭氧，針筒需於氮氣下抽放 30 次，於氮氣下開啟菌株之保存管，並迅速轉移至上述配製培養液之密封試管或密封瓶中。圖 2 為三種培養液於接菌前及接菌後培養 3 天的狀況，可見菌株生長後其培養液有黑色沈澱物或混濁的狀況，此為厭氧情況下硫酸還原菌將硫酸根離子 (SO_4^{2-}) 當作電子接受者 (electron acceptor)，利用代謝過程電子的轉移作用，將元素硫或是硫酸根離子還原成硫離子 (S^{2-}) 而產生黑色之沉澱，可做為接種菌株是否存活之判別，亦為 MPN 法中陽性反應之現象。培養於密封瓶中的菌株生長後，因其密封性佳，於 25°C 下約可保存 2 個月。

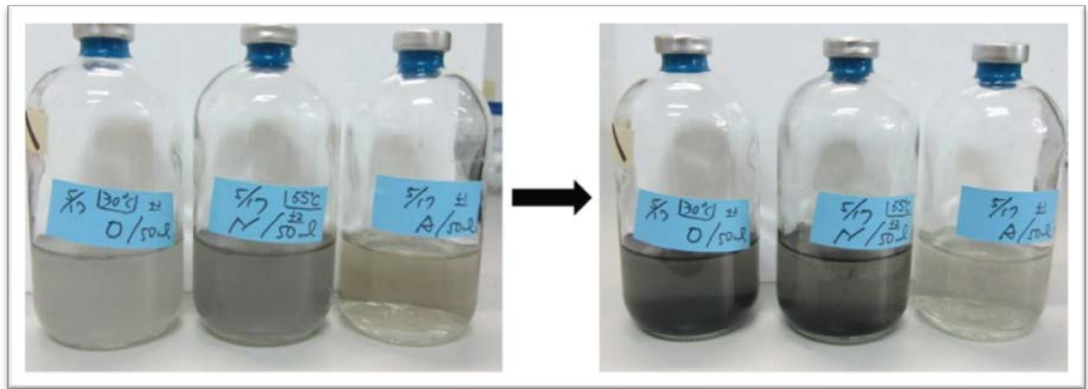


圖 2、剛接菌後的 SRB 菌培養液（左）及接種 SRB 菌後培養三天（右）後之顏色與濁度的變化

二、建立 SRB 菌株計數方法

Acridine orange direct count method (AODC) 是一種利用螢光染料-吡啶橙 (acridine orange, AO) 與微生物體內 DNA 或 RNA 結合後，以 436 或 490nm 的波長激發產生螢光，再以螢光顯微鏡直接計數微生物數量的方法。一般在高活性的微生物體內中存在較大量的 RNA，因此 AO 和 RNA 結合會產生紅色螢光；如為不具活性或生長緩慢的微生物，體內的 DNA 會和 AO 結合產生綠色螢光。

取 SRB 菌液加入 10 mg/L 吡啶橙 (經 0.2 μm 過濾) 染色 5~7 分鐘，將染色水樣經濾膜 (孔徑 0.2 μm ，直徑 13 mm，經 Sudan-black solution 預染色之 polycarbonate filters, Nuclepore 過濾，過濾後將濾膜置於載玻片上，以螢光顯微鏡計數視野中發紅色(活菌)或綠色(死菌)螢光的菌體，激發光濾光片為 450~490 nm，光束分離濾光片 515 nm (Pedersen and Ekendahl, 1990)。實驗中確認培養之三株

SRB 菌之菌數均可至 1×10^6 / ml，方進行後續製備含受測 SRB 之膨潤土。

三、製備含受測 SRB 之夯實膨潤土

將 60 g 經輻射滅菌後之膨潤土、高溫高壓滅菌之無菌水 1110 ml 及養菌之密封瓶均移至於厭氧手套箱中，手套箱使用氣體為 97% 氮氣及 3% 氫氣的混合氣體，並控制環境中氧含量需低於 900 ppm。如圖 3 所示：將無菌水及膨潤土於無菌培養皿中混合，再以針筒分別吸取三種菌液各 30 ml 加入培養皿中，靜置待其乾燥。每週更換手套箱中吸附水氣之乾燥劑以加速乾燥，經 40 天靜置後可見膨潤土完全乾燥。於手套箱中將乾燥之膨潤土分批倒至研鉢中，以研杵與研鉢將膨潤土研磨至細粉後待用。

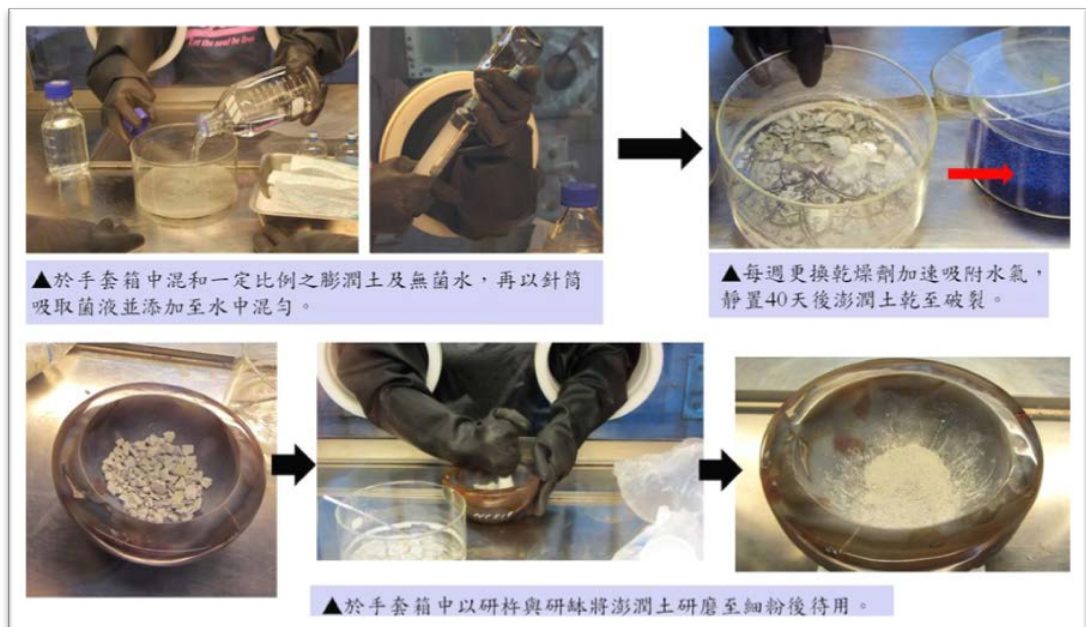


圖 3、於手套箱中製備含受測 SRB 之膨潤土的流程及成品。

四、向原能會申請實驗室使用 ^{35}S 核種之許可。

目前已完成向原能會申請清華大學同位素館 024 室許可使用 ^{35}S 核種。

五、夯實含 SRB 之膨潤土

於厭氧箱中取上述 SRB 之膨潤土再加入 9 倍重量不含菌之膨潤土混合，再以核研之緩衝材料夯實設備夯實含 SRB 菌株之膨潤土，製備之膨潤土包含兩種密度分別為 1750 及 2000 kg/m³，製備為直徑 5 公分厚 0.5 公分的圓形土樣。

六、探討硫酸鹽還原菌於製備過程中之存活狀況

以 MPN 分析測試其於不同時間下之 SRB 菌株存活率上述膨潤土於手套箱靜置乾燥過程中，每 10 天取出大培養皿中 1ml 之水溶液進行 MPN 測試 SRB 菌株之存活。如圖 4 為 MPN 分析中三種稀釋度的三組試管經培養 2 周後之結果，可見其分別有 5/5、2/5、1/5 為長菌之正反應。各製備過程中之菌株分析結果經換算後顯示：在膨潤土未乾燥前取水樣測得菌株含量約為 147~510 MPN/ ml。經乾燥後取土樣進行測試，測得土中菌株含量為 1.05x10⁴ MPN /g；再經研磨後之土樣測得菌數約為 1.05x10⁴ MPN /g。顯示 SRB 菌株能於此乾燥及研磨的製備過程中存活。

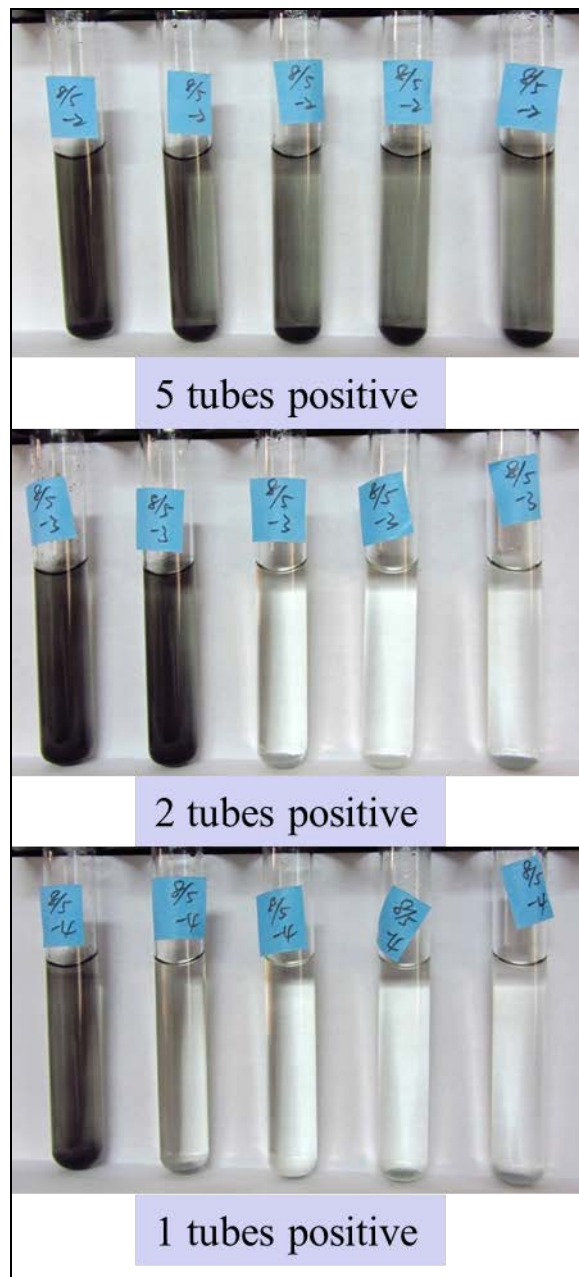


圖 4、MPN 分析中三種稀釋度的三組試管經培養 2 周後之結果，可見其分別有 5/5、2/5、1/5 為長菌之正反應。

肆、参考文献

1. APHA 1992. 4500-SO₄²⁻ E. Turbidimetric Method , Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 18th edition, APHA, AWWA, WEF, Washington, DC.
2. Cord-Ruwisch R 1985. A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 4:33-36.
3. Gibson GR 1990. Physiology and ecology of the sulfate-reducing bacteria. *Journal of applied bacteriology*, 69(6):769-797.
4. Hajj HE, Abdelouas A, Grambow B, Martin C, Dion M 2010. Microbial corrosion of P235GH steel under geological conditions. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* 35:248-253.
5. Hallbeck L, Pedersen K 2008. Characterization of microbial processes in deep aquifers of the Fennoscandian Shield. *Applied Geochemistry*, 23:1796-1819.
6. ISO 8407 2009. Corrosion of Metals and Alloys-Removal of Corrosion Products from Corrosion Test Specimens.
7. Masurat P, Eriksson S, Pedersen K 2010. Microbial sulphide production in compacted Wyoming bentonite MX-80 under in situ conditions relevant to a repository for high-level radioactive waste,

- Applied Clay Science, 47:58-64.
8. Masurat P, Eriksson S, Pedersena K 2010. Evidence of indigenous sulphate-reducing bacteria in commercial Wyoming bentonite MX-80. Applied Clay Science, 47(1-2):51-57.
 9. Pedersen K, Ekendahl S 1990. Distribution and activity of bacteria in deep granitic groundwaters of southeastern Sweden. Microbial Ecology, 20:37-52.
 10. Pedersen K, Motamedi M, Karnland O, Sandén T 2000. Mixing and sulphate-reducing activity of bacteria in swelling compacted bentonite clay under high-level radioactive waste repository conditions. Journal of Applied Microbiology, 89:1038-1047.
 11. SKB 2010a. Buffer, backfill and closure process report for the safety assessment SR-Site, SKB Technical Report, TR-10-47, Swedish Nuclear Fuel and Waste Management Co.
 12. SKB 2010b. Corrosion calculations report for the safety assessment SR-Siter, SKB Technical Report, TR-10-66, Swedish Nuclear Fuel and Waste Management Co.
 13. SKB 2010c. Design, production and initial state of the buffer, SKB Technical Report, TR-10-15, Swedish Nuclear Fuel and Waste Management Co.

14. SKB 2015. Microbial sulphide-producing activity in MX-80 bentonite at 1750 and 2000 kg m⁻³ wet density, SKB Technical Report, R-15-05, Swedish Nuclear Fuel and Waste Management Co.
15. Smart N, Rance A, Reddy B, Lydmark S, Pedersen K, Lilja C 2011. Further studies of in situ corrosion testing of miniature copper-cast iron nuclear waste canisters. *Corrosion Engineering, Science and Technology*, 46:142-147.
16. Widdel F, Bak F 1992. Gram-negative, mesophilic sulphate-reducing bacteria. In Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KZ (eds). *The prokaryotes*. Vol 4. New York: Springer, 3352-3378.
17. 黃秉修，用過核子燃料後端處理技術概述，台電核能月刊第 384 期，民國 103 年 12 月，第 10-25 頁。