

SZENT ISTVÁN EGYETEM KÖRNYEZETTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

MIKROBIÁLIS FOLYAMATOK A TERVEZETT RADIOAKTÍV HULLADÉKTÁROLÓ KÖRNYEZETÉBEN

Doktori értekezés

Készítette: dr. Farkas Gyöngyi

Budapest-Gödöllő 2003

A doktori iskola

megnevezése: Szent István Egyetem Környezettudományi Doktori Iskola

tudományága:Környezettudomány

vezetője: Prof. Dr. Menyhért Zoltán az MTA doktora SZIE, Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar, Ökológiai Mezőgazdasági Tanszék

Témavezető: Prof. Dr. Kecskés Mihály az MTA doktora

Az iskolavezető jóváhagyása

A témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

1.	I. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS					
2.	IRO	DALMI ÁTTEKINTÉS	12			
	2.1	FÉMEK ÉS RADIONUKLIDOK BAKTERIÁLIS MOBILIZÁLÁSA	13			
	2.1.2	Enzimatikus redukció	14			
	2.1.3 2.2	A mikroorganizmusok auai termeti komptexkepző vegyütetek A FÉMEK ÉS RADIONUKLIDOK BAKTERIÁLIS IMMOBILIZÁLÁSA	13			
	221	Descisiódaid	10			
	2.2.1	Precipitacio Rioszornejó	10 10			
	2.2.2	Bioskorpete Bioakkumuláció	20			
	2.3 A	MIKROBIÁLIS GÁZTERMELÉS ÉS -FOGYASZTÁS	20			
	2.4 B	IOFILM KÉPZŐDÉS	21			
	2.5 V	ÁRHATÓ KÖRÜLMÉNYEK A HLW TÁROLÓBAN	22			
	2.5.1	A pufferanyag és a víz	23			
	2.5.2	Hogyan képesek a baktériumok a HLW tárolót szennyezni?	24			
3.	ANY	AG ÉS MÓDSZER	26			
	3.1 M	INTAVÉTEL ÉS A MINTÁK SZÁRMAZÁSA	26			
	3.2	Sziderofor-termelés kimutatása	29			
	3.3 A	EROB BAKTÉRIUMOK SPÓRÁZTATÁSA	30			
	3.4 A	NAEROB BAKTÉRIUMOK SPÓRÁZTATÁSA	31			
	3.5	GÁZTERMELÉS KIMUTATÁSA	31			
	3.6	FÉMIONOKKAL SZEMBENI REZISZTENCIA KIMUTATÁSA	32			
	3.7	NÉHÁNY TOXIKUS FÉM BIOSZORPCIÓJA/BIOAKKUMULÁCIÓJA	32			
	3.8	SZERVESSAV-TERMELÉS MÉRÉSE BOEHRINGER–MANNHEIM TESZTTEL	33			
	3.9	BIOFILMKÉPZŐDÉS	33			
	3.10	SUGÁRREZISZTENCIA MEGHATÁROZÁSA	34			
	3.11	ALKALMAZOTT TÁPTALAJOK	35			
4.	ER	EDMÉNYEK	37			
	4.1	A BODAI ALEUROLIT FORMÁCIÓBA TERVEZETT MÉLYSÉGI HULLADÉKTÁROLÓ KÖRNYEZETÉNEK				
	MIKRO	DBIOLÓGIAI FOLYAMATAI	37			
	4.1.1	A minták csíraszáma	38			
	4.1.2	Az izolált törzsek gáztermelése	42			
	4.1.3	Az izolatumok savtermelése Sridarofor tarmalás kimutatása	44 15			
	4.1.4	Szmerojor-termetes kimumusa Az aerob és anaerob törzsek spórakénzése	45 46			
	4.1.6	A sugárérzékenység meghatározása	46			

	4.1.7 Az aerob törzsek toxikus fémmel szembeni rezisztenciája					
	4.1.8 Az anaerob törzsek toxikus fémekkel szembeni rezisztenciája					
	4.1.9 Néhány toxikus fém izolátumok általi bioszorpciója, bioakkumulációja	53				
	4.1.10 Biofilm kialakulása az aleurolit felszínén	61				
	4.2 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	65				
5.	KÖVETKEZTETÉSEK	67				
6.	ÖSSZEFOGLALÁS	76				
7.	SUMMARY	82				
8.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS88					
9.	IRODALOMJEGYZÉK	90				
10.	MELLÉKLET					

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

- R-A-M: a baktérium sejtfal polimerje-a polimer anionos része-kation
- AFM: atomic force microscopy: atomerő mikroszkóp
- Bq: becquerel: radioaktív bomlás percenként
- D10 érték: Tizedelő dózis
- HLW: High Level Radioactive Waste: Nagy aktivitású radioakív hulladék
- ILW:Intermediate Level Radioactive Waste:Közepes aktivitású radioaktív hulladék
- LLW: Low Level Radioactive Waste: Kis aktivitású radioaktív hulladék
- kGy: kilogray: elnyelt dózis egysége
- MIC: Microbiologically induced corrosion: mikrobiológiai úton indukált korrózió
- NTA: nitrilotriacetic acid (triecetsav-nitril)
- DTPA: diethylenetriaminepentaacetic acid (dietilén-triamin-pentaecetsav)
- EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid (etilén-diamin-tetraecetsav)
- DOC: oldott szerves anyag
- API tápközeg: American Petrol Institute tápközege szulfátredukáló baktériumok
- kimutatására
- SRB: szulfátredukáló baktériumok
- BAF: Bodai Aleurolit Formáció
- MPN módszer: Most Probable Number: Legvalószínűbb csíraszám
- R.C.M. Broth: Reinforced Clostridial Broth: Clostridium tápleves
- OPCA: minimál tápleves, ill tápagar
- L: levegő minta
- V: rétegvíz minta
- Tv: technikai víz

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A fejlett iparral rendelkező országokban az energiatermelés jelentős részét a nukleáris energia adja, Franciaországban 78 %-át, Németországban 29,82 %-át, Japánban 29,35 %-át, USA-ban 18,59 %-át és Oroszországban 12,82 %-át. Magyarországon ez az arány 46 % (CIA, 2002) (Melléklet 1.ábra). A nukleáris ipar fejlődésével a nukleáris hulladéktárolás problémája és annak megoldása is felmerül ill. egyre fontosabbá válik (NAZINA et al. 2000, AARKROG 2001).

A fejlett nukleáris iparral rendelkező országokban 15-20 éve széleskörű kutatási programokat indítottak el, hogy tisztázzák a radioaktív hulladéktárolók tervezésénél a fizikai, kémiai és mikrobiológiai folyamatok jelentőségét. A Nemzetközi Atomenergia Ügynökség (IAEA) besorolása szerint aktivitás alapján megkülönböztetendő nagy aktivitású: >10¹⁴ Bq/m³, közepes aktivitású: 10¹⁰-10¹⁴ Bq/m³, kis aktivitású: <10¹⁰ Bq/m³ radioaktív hulladék. Figyelembe véve, hogy a nukleáris hulladéktárolók biztonságát ezer években mérik, a lassan kialakuló mikrobiális korrózió következményeit (radionuklidok szabaddá válása) is figyelembe kell venni a tervezésnél. Ezer év múlva kisebb, mint egy százaléka marad a radioaktivitásnak, és 100 000 év szükséges hogy a maradék radionuklidok is ártalmatlanná váljanak az emberi szervezet számára. A kutatások kiterjedtek nemcsak a nagy aktivitású radioaktív hulladékok (HLW), mint az atomerőművek kiégett fűtőelemei tárolásának vizsgálatára, hanem a közepes (ILW) és kis (LLW) aktivitású radioaktív hulladékok, mint pl. ioncserélő gyanták és laboratóriumi hulladékok tárolásának vizsgálatára is.

Az Egyesült Királyságban a program különböző területeken az 1980-as évek elején kezdődött: mikrobák jelenlétének kimutatása a vizsgált geológiai képződményekben, mikroorganizmusok hatásának vizsgálata a tárolókra és magára a hulladékra, a radionuklid

migráció mikrobiális hatásainak vizsgálata, valamint modell kísérletek (STROES-GASCOYNE et al. 1996). Tanulmányozták a mikroorganizmusok extrém körülmények (pl. magas hőmérséklet és nyomás) és lúgos körülmények közötti túlélését is (WEST et al. 1985). Egy számítógépes matematikai anyagcsere modellel a baktériumok anyagcseréje során képződő gáz mennyiségét is előre lehet jelezni.

Svájcban a radioaktív hulladék elhelyezés mikrobiológiai kérdéseivel 1980-ban kezdtek el foglalkozni. Tanulmányozták a bitumenbe ágyazott kis aktivitású hulladékok biodegradációját (BACHOFEN et al. 1984). Egyszerű modellszámításokat végeztek a nagy aktivitású hulladékok gránitsziklába való elhelyezésével kapcsolatban és összehasonlították laboratóriumi eredményekkel. Azt kapták, hogy ebben a környezetben a mikrobiológiai aktivitás nem szignifikáns, mivel a hozzáférhető tápanyag és energia limitált (WEST et al. 1985, MC KINLEY et al. 1985). A kis és közepes aktivitású hulladékok esetén az előzetes számítások azt mutatják, hogy a mikrobiális aktivitást figyelembe kell venni, mivel a szervesanyag szint sokkal magasabb, mint a HLW-nél (MC KINLEY és GROGAN 1991, MC KINLEY et al. 1997). Svájcban 5 reaktorban képződik HLW hulladék. A legnagyobb részét La Hague-ban (Franciaországban) újra feldolgozzák és a hulladékokat geológiai képződményekben helyezik el (BLARY és AVEROUS 2002).

Kanada 21 reaktorral rendelkezik. A hulladékot az erőműből való eltávolítás után ideiglenesen szárazon, cement konténerekben tárolják. Végleges tároláskor a hulladékot titán és/vagy réz tartóba kapszulázzák, amit 500-1000 m mélyre gránit sziklába helyeznek el. A tartókat kompakt bentonit agyaggal fedik (50% Na-bentonit és 50% szilícium homok) és 5 cm tiszta homok választja el a tartókat a puffer anyagtól. A furatokat és csatornákat cementtel és agyaggal töltik meg (STROES-GASCOYNE és WEST 1996, STROES- GASCOYNE és SARGENT 1998). Kanadában a mikrobiális hatásokkal kapcsolatos munka 1982-ben kezdődött. A baktériumok számát és típusát tanulmányozták néhány kiválasztott

beágyazóanyagban (MAYFIELD és BARKER 1982). Modellezték egy kanadai nukleáris lerakóhely lehetséges mikrobiális aktivitását tápanyag és energiaforrás analízis alapján (STROES-GASCOYNE 1989). A kanadai Atomenergia Ügynökség egy földalatti kutatólaboratóriumot építtetett, hogy segítségével hulladék elhelyezési technikákat dolgozzon ki. Gránitos kőzet földalatti vizeiben meghatározták a természetben előforduló baktériumok típusát és számát (BROWN és HAMON 1994). Urán lerakóhely mély rétegeiből származó minták mikrobiológiai vizsgálatát is elvégezték (STROES-GASCOYNE et al. 1993, FRANCIS et al. 1993).

Az Egyesült Államokban a már meglevő, felszíni lerakóhelyek vizsgálatára koncentráltak, amelyeket mind ipari, mind nukleáris hulladékok tárolására használtak. E típusú tárolóhely gazdag szervesanyagban, ezért is fontos az itt lejátszódó mikrobiológiai folyamatok komplex vizsgálata. Kísérletek irányultak a gáztermelés, komplexképző vegyületek, aszfalt degradáció, lúgzószerek mikrobiális és kémiai összetételének vizsgálatára, valamint a sugárrezisztencia meghatározására. A szideroforok szerepét a radionuklidok transzportjában is vizsgálták (HERSMAN 1986, 1993). A HLW lerakóhelyen szintén végeztek mikrobiológiai vizsgálatokat. Az elmúlt 50 év alatt az USA 110 atomerőművében 30 000 tonna kiégett fűtőelem és 380 000 m³ egyéb HLW termék (a nukleáris fegyvereknél a plutónium gyártás mellékterméke) keletkezett (WHIPPLE 1996). A kiégett fűtőelemeket a reprocesszálás után fém tartókba kapszulázzák, rozsdamentes acél burkolattal látják el, és a Yucca Hegységben (Nevada) helyezik el (JOLLEY et al. 2003).

Svédországban az a jelenlegi elképzelés a HLW elhelyezésére, hogy a hulladékot réz konténerekbe kapszulázzák, bentonit agyaggal veszik körül és 500-600 m mélyre, kristályos kőzetbe ágyazzák. Az alagutat, amibe a réz kapszulákat helyezik, szintén bentonittal bélelik ki. Két helyen is vizsgálják a lehetséges kölcsönhatásokat a sziklák törései, ill. a lerakóhely és a mikrobák között. Ezek a Stripa kísérleti bánya és az Äsprö föld alatti laboratórium. Jelentős

munkát végeztek itt, hogy megvizsgálják a földalatti vizek mikrobiológiáját és ezeken a helyeken a biofilm-kialakulás lehetőségét (PEDERSEN 1987, PEDERSEN és EKENDAHL 1990, PEDERSEN és ALBINSSON 1992). Molekuláris biológiai technikán alapuló filogenetikai módszereket használtak fel, CO₂-asszimilációt is tanulmányoztak (PEDERSEN et al. 1991, EKENDAHL et al. 1993), valamint egyszerű szorpciós kísérleteket is végeztek szulfát-redukáló baktériumokkal. Svédországban, a négy atomerőműben 12 reaktor működik. A kiégett fűtőelemeket 40 évig vizes medencékben tárolják, amelyek sziklaüregekben találhatóak, 40 m-re a föld felszíne alatt. Miután réz vagy acéltartókba kapszulázzák a hulladékot, 500 m mélyre sziklaágyban futó csatornákba teszik, és agyaggal, ill. őrölt kővel töltik meg a csatornákat (ANONYMOUS 1983, MORÉN 1998).

Mindegyik ország elfogadta azt a biztonsági elvet, hogy a nukleáris hulladékokat többszörös védőgáttal kell ellátni, és megfelelő geológiai képződményben kell elhelyezni. A geológiai képződmény vizsgálata nagyon fontos részét képezi a felméréseknek. A számításba jöhető kőzetek főleg gránit, agyag, só és egyéb üledékes kőzetek (STROES-GASCOYNE és GASCOYNE 1998, LITTLE és WAGNER 1996, KIEFT et al. 1997, VERRHIEST at al. 2002).

Magyarországon a radioaktív hulladék nagy része a Paksi Atomerőműből származik. Hazánkban a kiégett fűtőelemek átmeneti tárolása az atomerőmű területén történik. Először a kiégett fűtőelemek 5 évre egy pihentető vizes medencébe kerülnek, majd kb. 40-50 éves átmeneti száraz tárolás következik szintén az erőmű területén. 1992-ben Nemzeti Programot hirdettek kis- és közepes szintű radioaktív hulladéklerakó létesítésére, ill. megfelelő terület keresésére a nagy aktivitású nukleáris hulladéklerakó számára. 1994-ben 3 terület előzetes vizsgálata kezdődött meg. A munka megrendelője a Paksi Atomerőmű Rt., ill. 1998. júliusától a Radioaktív Hulladékokat kezelő Kht. volt. Nagy aktivitású hulladék lerakóhelyként a Nyugat-Mecsekben található 150 km² területű Bodai Aleurolit Formáció

vagyis permi agyagkő jöhetne számításba. A Mecseki Ércbányászati Vállalat, ill. jogutódja, a Mecsekérc Környezetvédelmi Rt. a folyamatban szakmai koordinátorként vállalta fel a szakmai tervezés, dekontaminálás és kivitelezés feladatait. A Bodai Aleurolit Formáció külszíni előfordulása 150-300 m tengerszint magasságú térszínen (Boda) 15 km², a felszín alatt 150 km² É-i és K-i irányba haladva 2300 m felszín alatti mélységig. A tömör, vízzáró kőzet több mint 1000 m mélységben van, a kőzet vastagsága 700-900 m, alulról és felülről repedésvizes homokkő fogja közre (1. ábra). A mecseki uránbánya egy permi homokkő képződményben található, közel a Bodai Aleurolit Formációhoz. Az uránbányászat 40 éve alatt sok tapasztalat és ismeret gyűlt össze a terület vízrajzáról és a kőzetek szerkezetéről. A bánya vezetősége kísérleti vágatok hajtásával tette lehetővé az agyagkő vizsgálatát, ugyanis korábban a permi agyagkövet a bánya nem érintette (ORMAI et al. 1997).

A Bodai Aleurolit Formáció vizsgálatába 1997-ben kapcsolódtunk be. Három alkalommal végeztünk vizsgálatokat, ill. gyűjtöttünk mintákat mikrobiológiai vizsgálatokhoz. Célkitűzéseink:

- A helyi mikrobiota összetételének felmérése, a leendő lerakóhely megépítése előtti alapállapotban.
- Baktériumtörzsek izolálása, az izolátumok sugárérzékenységének meghatározása.
- A legfontosabb mikrobiológiai folyamatok kimutatása, a várható folyamatok feltárása.
- A helyi mikrobiota befolyása a nukleáris hulladéktároló hosszú távú megbízhatóságára.

A Ny-Mecsek elvi vízföldtani rétegoszlopa							
Kor	Jelölés	Vastagság	k (m/s)	n (%)	Az egyes formációk vízföldtani jellemzése		
Pliocén/Miocén		0-500 m	3,0x10 ⁻⁵ -1,0x10 ⁻³	10-20	Fiatal (Pliocén/Pannon/Miocén) fedőüledékek (Homok, agyagos betelepülésekkel) Utánpótlás: csapadék (kisebb részben laterális áramlás) Víztípus: Ca·Mg·HCO ₃		
N	$T_2^2 - T_3$	0-800 m	4,2x10° -1,0x10°	0,5-3	Mészkő (középső- és felső-triász) (a felső része erősen karsztosodott) Utánpótlás: csapadék (és idelglenes felszíni vízfolyások) Víztípus: Ca·HCO ₃ ·CO ₃		
iás	$\langle \langle \rangle \rangle \langle \mathbf{T}_{2} \rangle \rangle \rangle$	30- 180 m			Anhidrites márga/aleurolit (középső-triász) Vízzáró összlet Víztípus: Ca·Na·SO4		
	P_{3}	500- 1800 m	1,1x10° - 4,2x10 ³	1-5	Alsó-triász és felső-perm homokkövek Kettős porozitású, repedésvizes rendszer Utánpótlás: a külszíni kibúvásoknál csapadék Víztípus: felső zóna: Ca·Mg·HCO ₃ középső zóna: Na·Mg·CO ₃ alsó zóna: Na·SO ₄		
E	P 2	600- 800 m	Ép zónák: 4,0x10 ⁻¹² -5,0x10 ⁻¹⁰ Tektonizšit zónák: 4,0x10 ⁻¹⁰ -9,7x10 ⁻⁴	<1,5	BODAI ALEUROLIT FORMÁCIÓ (középső-perm vízzáró összlet) A HLW végleges elhelyezésére potenciálisan alkalmas képződmény Víztípus: Na-SO4		
PC	Pi	500- 1000 m	?		Alsó-perm homokkövek és riolit Kettős porozitású, repedésvizes rendszer		
Karbon	$\begin{array}{c} \begin{array}{c} & \cdot & \cdot \\ & + & + \\ & + & \gamma \\ & + & + & + \end{array}$?	?		Kristályos alaphegység (Gránit/Metamorfitok)		

Szerk.: Csicsák J. 1997

1. ábra. A Bodai Aleurolit Formáció (Nyugat-Mecsek) földtani szelvénye és vízföldtani rétegoszlopa.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Mindössze néhány évtizedre vezethetők vissza ismereteink a föld mélyebb rétegeinek, illetve a tengeri üledékek mikrobiológiai vizsgálatával kapcsolatban. ZO BELL (1946, 1964) az elsők között tanulmányozta a mélytengeri üledékek mikrobiológiáját. A mikrobiális mineralizációs folyamatokat először kuriózumnak tekintették, de későbbi vizsgálatok kimutatták, hogy sok üledékes képződmény, mint például a fém-szulfidok, vas-oxidok, karbonátok, agyagok, oxidok és szulfidok mind mikrobiális mineralizációs folyamat eredményeként jött létre. A föld alatti környezetben mindenütt kimutathatók baktériumok, ahol a hőmérséklet 110 °C alatt van és víz elegendő mennyiségben áll rendelkezésre. A baktériumok száma néhány száztól néhány millió /cm³ talajvíz, g üledék vagy cm² szilárd felület. A faji diverzitás meglehetősen nagy. Direkt és indirekt mérések azt mutatják, hogy a talajbaktériumok élők és aktívak, bár aktivitásuk rátája alacsonyabb, mint a földfelszíni környezetben. A föld alatti baktériumok számára meghatározó jelentőségű a hőmérséklet, ill. a víz és a hasznosítható energiaforrás milyensége (PEDERSEN 1995).

A kiégett fűtőelemek biztonságos tárolásának kérdéseivel 1980-ig csak a nem biológus szakemberek foglalkoztak. WEST és munkatársai (1982) tekintették át először a mikroorganizmusok extrém környezeti feltételek közötti toleranciájával kapcsolatos vizsgálatokat, és a mikroorganizmusok lehetséges hatásait a nukleáris hulladéktárolók integritására.

Átfogó ismeretek szükségesek a radioaktív hulladékok mikrobiális degradációs folyamatairól, hogy előrejelző modellt lehessen kidolgozni a radionuklidok és toxikus fémek környezetbe történő transzportjának kockázatbecslésére (FRANCIS 1990).

A kiégett fűtőelem uránium-dioxidot (UO₂) és hasadási termékeit tartalmazza, ebben a mátrixban inhomogénen beágyazódva aktinidákat találunk. A kiégett fűtőelem kis fémtartalmú részecskéket, pl. palládiumot, valamint gázokat is tartalmaz. A cézium és jód a felületen található. A kiégett fűtőelem radionuklidjainak bomlásakor hő és radioaktív sugárzás keletkezik (α , β , γ , illetve neutronsugárzás). Az összes α - és β -sugárzást, valamint a γ -sugárzást és neutronok nagy részét elnyeli a kapszula anyaga. Az UO₂ oldhatósága talajvízben nagyon kicsi. Azonban ha a víz behatolna a fűtőelemekbe, a cézium és a jód kioldódna a vízzel. Az aktinidák kis oldhatósággal rendelkeznek a redukált talajvizekben. Baktériumok jelenléte esetén a radionuklid transzport talajvizekben különböző módon változik meg. A mikroorganizmusok megfelelő körülmények között a fémeket oldatba viszik, és mobilizáció vagy immobilizáció vagy, egyszerre több folyamat is lejátszódhat.

2.1 Fémek és radionuklidok bakteriális mobilizálása

A fémek és radionuklidok kioldódása enzimatikus oxidációs-redukciós reakcióknak, ásványi vagy szerves anyagcseretermékek képződésének, vagy a pH csökkenésének tudható be.

2.1.1 Enzimatikus oxidáció

A szervetlen fémvegyületekből a fém - amelynek egynél több oxidációs állapota van, és magasabb oxidációs állapotban kevésbé oldható - enzimatikus oxidációval eltávolítható az oldatból.

A vas- és kénoxidáló baktériumok, mint például a *Thiobacillus ferrooxidans*, *T. thiooxidans* jelentős szerepet játszanak az urán érceikből történő kinyerésében. Az urán kioldása *T. ferrooxidans*-szal indirekt és direkt folyamatok hatására megy végbe.

Indirekt hatás:

$$UO_2 + 2 Fe^{3+} \rightarrow UO_2^{2+} + 2 Fe^{2+}$$

Direkt hatás:

$$UO_2 \rightarrow UO_2^{2+}$$

A reakció során keletkező Fe²⁺ - ionokat a *Thiobacillus ferrooxidans* újra oxidálja:

$$4 \operatorname{Fe}^{2+} + \operatorname{O}_2 + 4 \operatorname{H}^+ \rightarrow 4 \operatorname{Fe}^{3+} + 2 \operatorname{H}_2\operatorname{O}$$

2.1.2 Enzimatikus redukció

Enzimatikus redukciós folyamatokat a fakultatív és obligát anaerob mikroorganizmusoknál mutattak ki. Az urán anaerob körülmények közötti redukciója szulfátredukáló baktériumokkal a következő:

$$UO_2^{2+} + H_2S \rightarrow UO_2 + 2 H^+ + S^0$$

Anaerob körülmények a leggyakoribbak a legtöbb hulladéklerakóhelyen, és az anaerob mikrobiális aktivitás szignifikánsan hat a szerves vegyületek, radionuklidok, toxikus fémek transzportjára és transzformációjára. Azonban kevéssé ismertek a mechanizmus részletei, különösen a bakteriális hatás természete és mértéke anoxiás környezetben. Anaerob körülmények között a fermentációs termékek, mint pl. szerves savak és aminosavak akkumulálódnak és ligandként szolgálnak (BLOOMFIELD és PRUDEN 1975, KEE és BLOOMFIELD 1962).

Anaerob körülmények között a szerves vegyületek a fémoxidok reduktív oldódását eredményezik. Ez a redukció, pl. Mn (III,IV), Fe (III), Co(III), Ni(III) oxid esetén néhány nagyságrenddel növeli az oldhatóságot (STONE 1986, 1987). A mikroorganizmusok szintén szerepet játszanak a fémoxidok direkt vagy indirekt oldódásában. A direkt hatás a fémoxid enzimatikus reduktív oldódása, ahol az oxid egy terminális elektronakceptor, az indirekt működés a mikroorganizmusok által termelt anyagcseretermékeknek, pl. szerves savak és

kelátképző vegyületek képződésének tudható be és ezáltal a közeg pH csökkenésének. A vasoxidok mikrobális redukciója és oldódása anaerob körülmények között széles körben tanulmányozott (GHIORSE 1988).

2.1.3 A mikroorganizmusok által termelt komplexképző vegyületek

A természetes rendszerekben, mint pl. a talajban a fémek különböző oxidációs állapotban vannak jelen, amelyek gyakran nagyon különböző tulajdonságokat mutatnak. A komplexképző szerek kémiai jelentősége, hogy a fémek helyzetét képesek megváltoztatni a biológiai rendszerekben. A komplexek két vagy több olyan egyszerűbb vegyületből képződnek, amelyek külön-külön is léteznek.

Fém + Ligand \Leftrightarrow Fém komplex

Me L MeL

Me: ion v. atom, L: funkcionális csoportot tartalmaz (mint =O, -N=,-S-)

Bármely vegyület, ami a fenti folyamaton keresztül egy kémiai kombinációt képez kationnal, komplexképző szer v. komplexáns. Egy vagy több fémkötő helye van. Ezeknek a fémkötő helyeknek mindegyike funkcionális csoportot tartalmaz (pl. amino, imino, karbonil, éter, alkohol, karboxil, szulfonil). A két funkcionális csoportot tartalmazó, ezáltal a fémmel gyűrűt képző vegyületet kelátnak nevezik. A legtöbb természetes rendszerben, ami kémiailag nem definiálható, egyedi ligandokat láthatóan nem lehet azonosítani, hanem a rendszer összes komplexációs kapacitását használják helyette. A komplexációs kapacitás több paramétertől függ, beleértve a pH-t, fém és ligand koncentrációt, ion erősséget és redox viszonyokat. A mikroorganizmusok által termelt komplexképző vegyületeket két csoportba oszthatjuk:

 mikrobiális anyagcsere és degradációs végtermékek; pl. egyszerű szerves vegyületek (alacsony molekulatömegű szerves savak és alkoholok) vagy makromolekuláris humin és fulvinsavak. mikrobák által termelt olyan anyagok (exudátumok), amelyek előállítását speciális fém ionok jelenléte vagy hiánya idézi elő; pl. vaskötő szideroforok és toxikus fémkötő fehérjék.

Optimális körülmények között, oxigén jelenlétében a komplex szerves anyagok különböző anyagcsere utakon át bomlanak le végtermékekre, szén-dioxidra és vízre. A hulladék lerakóhelyen és a legtöbb talajban azonban gyakran szuboptimálisak a körülmények, pl. alacsony vízaktivitás, a pH semlegestől való eltérése. Ezek között a körülmények között gyakori a nem teljes, inkomplett anyagcsereút, alacsony molekulatömegű szerves savakat és alkoholokat eredményezve (FRANCIS 1982).

Kis molekulatömegű szerves savakat és alkoholokat figyeltek meg radionuklidok kis aktivitású lerakóhelyein. Feltételezték, hogy ezek a vegyületek komplex szerves anyagok anaerob körülmények között történő mikrobiális degradációjából származnak (FRANCIS, 1982). Tisztán kémiai adatok alapján néhány szerves sav és három szintetikus komplex komplexképző képességét hasonlították össze. Megfigyelték, hogy a komplexképző képesség a fém oxidációs állapotától függően a következő sorrendben csökken:

DTPA (dietilén-triamin-pentaecetsav)> EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav)> NTA (triecetsav-nitril)> humin, trikarboxil> dikarboxil> monokarboxil savak.

2.1.3.1 Nagy makromolekulájú ligandok

A szerves anyagok, elsősorban a lignin és cellulóz mikrobiális degradációja során nagy makromolekulájú vegyületek képződnek, amelyek a lebontható szerves szén (DOC) 40-90 %-át képviselik. Ezeket a makromolekulákat összességében humátoknak nevezik és három frakcióra oszthatók:

 huminsavak, olyan vegyületek, amelyek oldhatók híg lúgban és kicsapódnak alacsony pH-n, - fulvinsavak, kis molekulatömegű, savoldható vegyületek,

- maradék humin frakció, nem extrahálható sem híg savval, sem lúggal.

A protonok disszociációja a huminsavakban jelen levő aminocsoportokról új kötőhelyeket alakít ki, és ez azt jelenti, hogy a fémek, mint pl. Zn, Cu és radionuklidok humátokkal való komplexe nagymértékben pH-függő (MANTOURA et al. 1978, RASPOR et al. 1984, YAMAMOTO és SAKANOUE, 1982, BÖCKELMANN et al. 2003, FIERER et al. 2003).

Lúgos pH-n az anionok kompetíciója nő a kötőhelyekért. Szerves anyagban gazdag környezetben a humátoknak nagyobb affinitása van a fémekhez, mint néhány szervetlen ligandnak, sőt relatíve erős komplexeket képeznek.

2.1.3.2 Mikrobiális exudátumok

A mikrobiális exudátumok nagy fémkötő affinitást mutatnak már nyomokban is. Ezek a vegyületek hatékonyan kötik meg az esszenciális fémionokat vagy egy komplexképző mechanizmus részét képezik, hogy megóvják a sejteket a toxikus elemektől.

2.1.3.3 Szideroforok

A Fe(III) molekulák oldhatósága és transzportja mikroorganizmusokban valószínűleg az egyetlen rendszer, ami részleteiben tanulmányozott. A vas esszenciális eleme minden élő szervezetnek, gyakran azonban nem kívánatos a sejtek számára. Ezért az aerob és fakultatív anaerob mikroorganizmusok egy módszert fejlesztettek ki a Fe(III) oldhatóvá tételére és transzportjára. A baktériumok egy relatíve kis molekulatömegű, Fe(III) kötő ligandumot termelnek, amit sziderofornak neveznek (NEILANDS 1981, 1988). Ezek a ligandumok esszenciálisan specifikusak Fe(III)-ra és az oldhatatlan Fe(III) ionnal oldható komplexet képeznek, ami a sejtbe speciális transzportrendszer útján tud bejutni. A szideroforok katekolátokat (R=H, OH, X=O, N) fenolátokat (-C-R[']) vagy hidroxamátokat tartalmaznak, mint kötő csoportokat. Az enterobaktin és a ferrikróm a katekolát és a hidroxamát csoport két prototípusa, és sok sziderofor struktúra ebből a két alaptípusból származik. Bár a szideroforok specifikusak Fe(III)–ra, komplexet tudnak képezni más háromvegyértékű fémekkel is, pl. gallium(III), króm(III), alumínium(III), szkandium, indium, illetve esszenciális fém ionokkal pl. Mg, Mn, Ca. A radionuklidokkal, pl. Pu(IV) szintén tudnak komplexet képezni, és a többi aktinidával is. A Pu(IV) és a Fe(III), a Pu(VI) és Th(IV) hasonlóságokat mutatnak biokémiai és kémiai jellemzőikben (BULMAN 1978).

2.2 A fémek és radionuklidok bakteriális immobilizálása

A toxikus fémek és radionuklidok immobilizációja lehet precipitáció, bioszorpció és bioakkumuláció. Ezeknek a folyamatoknak nagy jelentőségük van, mivel alkalmasak lehetnek a toxikus fémek és radionuklidok szennyvizekből történő eltávolítására (LLOJD 2003).

2.2.1 Precipitáció

A fémionok oldatban történő kicsapásának példája a szulfidképzés. A legtöbb fémszulfid oldhatatlan vízben. E szulfidok stabilitása főleg az anoxiás körülmények fennmaradásától függ. A szerves foszfátok mikrobiális degradációja orto-foszfátokká fémkicsapódáshoz vezet fém-foszfát formájában, főleg pH 7 felett. A következő anionok oldatban való előfordulása esetén is előfordulhat precipitáció: S^{2-} , HCO_{3}^{-} , CO_{2}^{3+} , SO_{4}^{2-} , OH^{-}

$$R-A-M + S^{2-} \rightarrow R-A^{-} + MS$$

R: sejtfal polimer, A⁻: a polimer anionos része, M: kation

Pl. Fe esetén

$$R-A^{-} + Fe^{2+} \rightarrow R-A-Fe^{2+} + 0,75 O_2 + 4,5 H_2O \rightarrow R-A-Fe^{3+}-Fe(OH)_3 + Fe(OH)_3 + 3 H^+$$

A fém precipitátumok, mint például a ferrihidrit, kiindulási helyként szolgálhatnak a további fémkomplexumok képződésének számára (FRIMMEL és GEYWITZ 1987). Ezek a fém precipitátumok zárványokat alkotnak, amelyek gyorsan nőnek, gyakran elérik a sejt méretét. Növekedésük során felhasználják az olyan hozzáférhető anionokat, mint a S²⁻, OH⁻ vagy HCO₃⁻.

2.2.2 Bioszorpció

A bioszorpció a toxikus fémek és radionuklidok nem-enzimatikus folyamatain alapulnak, ilyen az adszorpció. Az adszorpció a fémion nem specifikus kötése a sejt felületéhez, vagy extracelluláris poliszacharidokhoz vagy fehérjékhez (VOLESKY 1990). A baktériumok, a gombák, élesztők, algák sejtfala hatékony bioszorbens. A Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok fémmegkötő kapacitása között különbség van. A Gram-pozitív baktériumok nagyobb mértékben kötik meg a fémionokat, mivel a sejtfalak fő komponense peptidoglikán, ami felelős a kötésért. A Gram-negatív baktériumoknál ez a réteg nagyon vékony (FERRIS és BEVERIDGE 1986).

Néhány fém bakteriális szorpciója a Freundlich-féle adszorpciós izoterma linearizált egyenletével írható le:

$$\log S = \log K + n \log C$$

ahol S az abszorbeált fém μ mol·g⁻¹, C az oldat egyensúlyi koncentrációja, μ mol·l⁻¹, K és n a Freundlich konstansok (MULLEN et al. 1989). A fémionokat mind az élő, mind a holt biomassza képes megkötni (SAG et al. 1999, SAG et al. 2000). A megkötött fémionok savas kezeléssel vagy kelátképző szerekkel távolíthatók el. A baktériumok mellett néhány ipari fermentációból származó gomba is számításba jöhet, mint iparilag jelentős bioszorptív anyag. Sok faj esetén nagy a sejt kitintartalma, és annak az N-acetil-glükózamin tartalma hatékony bioszorbens. A *Saccharomyces cerevisiae* sejtfalában a foszfát-csoportok az uránkomplexáció kötőhelyei. *Rhizopus arrhizus* esetén az urán és tórium kötőhelye a kitinkomponens. A kitozánnak és a glükánnak szintén jelentős bioszorpciós kapacitása van.

2.2.3 Bioakkumuláció

A bioakkumulációt a következő fémekre írtak le: higany, ólom, ezüst, kadmium, nikkel, ¹³⁷cézium, ⁶⁰kobalt, ⁸⁵stroncium, plutónium és urán. A toxikus fémek intracelluláris akkumulációja energiafüggő transzport-rendszer jelenlétének függvénye (GADD 1988).

A toxikus fémek átvitele a sejtmembránon történhet ionpumpával, ioncsatornákon keresztül, hordozó közvetítésével, endocitózissal, a membrán permeábilitás teljes megváltozásával vagy a lipidek permeábilitásának változásával.

A sejtmembránok permeabilitásának növekedése növeli a toxikus elemeknek az intracelluláris fémkötő helyekhez való kapcsolódásának a mértékét, és növeli a passzív akkumulációt is. A fémek és radionuklidok bekerülnek a sejt anyagcsereútjaiba, vagy inaktív formában komplexet képeznek más nagy aktivitású ligandumokkal.

2.3 A mikrobiális gáztermelés és -fogyasztás

A baktériumok gáztermelése különböző folyamatok eredményeként mehet végbe (CHRISTOFI és PHILIP 1997, BACHOFEN et al. 1998, PEDERSEN 1999, VERRHIEST et al. 2002). Az aerob degradációs folyamatok, az erjedés, a szerves anyagok anaerob légzése mind termel szén-dioxidot a rendelkezésre álló szerves anyagoktól függően. Hidrogén az erjedési folyamatokban szabadul fel, dinitrogént, hidrogénszulfidot és metánt a baktériumok az anaerob légzési folyamatokban termelnek (BJORNDALEN 2003). Gázok szervetlen folyamatokban is képződhetnek, mind a radiolízis, mind a hő vagy a kémiai korrózió során. Telítődéskor, vagy ha a nyomás leesik, gázbuborékok képződnek. Az egyik baktérium által termelt gázt szimultán vagy később (pl. ha a környezeti feltételek megváltoznak) egy másik

baktérium felhasználja. Például ha metán és hidrogén képződik anaerob körülmények között, megfelelő elektronakceptorok jelenlétében (pl. nitrát vagy szulfát) más baktériumok oxidálni tudják a metánt és hidrogént széndioxiddá és vízzé.

Ha a fém hulladéktartó megsérül, a legrosszabb esetben a radionuklidok vízzel kerülhetnek kapcsolatba, és ez reaktív radiolízist eredményez. Ez a nem várt folyamat a tároló környezetében a redoxpotenciál növekedését vonja maga után, ezáltal nő a radionuklidok oldhatósága (CHRISTENSEN és BJERGBAKKE 1982). Feltételezhetően a tároló környezetében baktériumok különböző anyagcseretípusba a tartoznak. Következésképpen olyanok is lehetnek, amelyek katalázt és hidrogenázt termelnek. A kataláz el tudja távolítani a hidrogénperoxidot (ami az egyik radiolízis termék, és ezáltal csökkenti a tároló környezetének redoxpotenciálját). Litotróf baktériumok hidrogéngázt a energiaforrásként tudják felhasználni (PEDERSEN 1996). Az oxigént pedig (a radiolízis másik terméke) mint terminális elektronakceptort képesek felhasználni. Tehát a radiolízisből származó H₂ és O₂ baktériumok általi felhasználása előnyös folyamat a HLW lerakóhelyen (PEDERSEN 1999).

2.4 Biofilm képződés

A biofilmek tápanyagszegény környezetben képződnek és előnyös tulajdonságokkal rendelkeznek az oldatban szabadon lévő mikroorganizmusokkal szemben. Szinergista szervezetet képeznek és olyan összetett folyamatok is lejátszódhatnak, amilyenek az egyedi sejtekben nem. A biofilmek vizes környezetben nagy hatást gyakorolhatnak az elemek transzportjára a felvételükkel, adszorpciójukkal és komplexképzésükkel. A mikroorganizmusok életképességére és anyagcseréjére szintén hatással van a biofilm. Anyagcsere szempontból a biofilm baktériumok nem egyszerűen felszínre tapadt sejtek (COSTERTON et al. 1994). Sok tulajdonságuk megváltozott, pl. 500-szor rezisztensebbek az antibakteriális vegyületekkel szemben (LAWRENCE et al. 1994, JAIN 1995). A mikrobiális biofilmek nemcsak nagy mennyiségű fémiont képesek megkötni természetes körülmények között, hanem templátként is szolgálnak az oldhatatlan ásványi fázis kicsapására. FERRIS és munkatársai (1986) beszámoltak róla, hogy a Fe, Mn, Ni, Cu, és Co biofilmekben koncentrálódik, és az extracelluláris polimer gyakran tartalmaz vasoxid precipitátumot.

A biofilmképződés gyorsasága, struktúrája és a biofilm vastagsága a jelenlevő baktériumfajoktól is függ. A biofilm baktériumok mikrobiális közösségben élnek, már van primitív homeosztázisuk, és primitív közösségi szabályozó rendszerük és anyagcseréjük (COSTERTON et al. 1994).

A biofilmek képesek megkötni a radionuklidokat, egészen addig, míg a biofilm tápanyaggal történő ellátásában változás nem következik be (BEVERIDGE és MURRAY 1997, STROES-GASCOYNE és WEST 1996). Így a biofilmek hatásosan immobilizálhatják a radionuklidokat.

2.5 Várható körülmények a HLW tárolóban

A svédországi számítások szerint a HLW tároló felszínén a kezdeti hőmérséklet 80 °C. A távolabbi környezet és kőzet hőmérséklete kb. 17-60 °C között változhat (ANONYMOUS 1983). Körülbelül 3000 év alatt csökken a hőmérséklet 40 °C alá a tározóban. Ezen időszak alatt a termofil baktériumok a dominánsak. A legtöbb mezofil baktériumot elpusztítja a hő, kivételt képeznek a spóraképző baktériumok, amelyek spóra képzésével túlélik a hőhatást.

A sugárzás dózisteljesítménye a kapszula felületén várhatóan 8,9 Gy/nap lesz. Ez a dózis a legtöbb baktérium számára letális. Ezért nyilvánvaló hogy csak a sugárzással szemben rezisztens baktériumok túlélése várható a tároló felszínén vagy a puffer anyagban

(PEDERSEN és KARLSSON 1995). Néhány baktérium, pl. *Deinococcus radiodurans* képes tolerálni 10000 Gy-t is, ha a besugárzás komplex tápközegben történik (MINTON 1994).

A hidrosztatikus nyomás a tárolóban kb. 5 MPa a pufferben és 10-12 MPa a tároló felületén. Ezt a nyomást a legtöbb baktérium képes tolerálni, és ezért ez a körülmény nem limitáló tényező a baktériumok számára.

A talajvizek redoxpotenciálja –100 és –400 mV között változik. A tároló lezárása után az oxigén- és redoxfeltételek egyenlőek lesznek a környező talajvizek paramétereivel (ANONYMOUS 1983). A tároló pH-ja a pufferanyag pH-jától függ, ami pH 8-10 közt lehet (PUSCH 1982).

A lerakóhely üregének zárása után egyre inkább anoxiás körülmények fognak uralkodni. Kezdetben aerob, fakultatív anaerob baktériumok elszaporodása várható. Majd a redoxpotenciál csökkenésével a mikroaerofil és az obligát anaerob baktériumok fognak uralkodni. A tároló magas pH-ja inkább az alkalofil baktériumoknak kedvez.

2.5.1 A pufferanyag és a víz

A tömörített bentonit nagyon ígéretes pufferanyag a radioaktív hulladék számára, mert jó duzzadóképességgel rendelkezik, és szabályozza a redox viszonyokat (ANONYMOUS 1983, BACHOFEN 1990, STROES-GASCOYNE et al. 1996). A kereskedelmi MX-80 Wyoming bentonit 65-75 % montmorillonitot, 10-14 % kvarcot, 5-9 % földpátot, 2-4 % csillámpalát és kloritot, 3-5 % karbonátot és kloritot és 1-3 % nehéz ásványt tartalmaz (PUSCH et al. 1998).

A relatív vízaktivitás a tárolóhelyen a talajvizekben hasonló a tengervízhez (0,98). Ez a vízaktivitás eléggé nagy ahhoz, hogy lehetővé tegye a legtöbb mikroorganizmus túlélését és életműködését .Azonban a pufferben a körülmények teljesen mások. Az agyag összetételétől függően (tiszta bentonit vagy vegyes, sóval vagy őrölt sziklával kevert) a vízaktivitás sokkal

kisebb lesz, mint a környező talajvíz aktivitása. Ez nagymértékben hatni fog a baktériumok túlélésére és aktivitására (MOTAMEDI et al. 1996, PEDERSEN és KARLSSON 1995, STROES-GASCOYNE et al. 1996).

STROES–GASCOYNE és munkatársai (1997) két és fél éves kísérletet végeztek Avonlea Na-bentonit és homok keverékével. Ezt a puffer anyagot 240 m mély furatba helyezték. 394 megfigyelés eredményeként azt kapták, hogy a baktériumok megoszlása (száma) közel azonos a pufferanyag különböző hőmérsékletű helyein (20-55°C). Viszont óriási különbségek vannak a pufferanyag nedvességtartalmának függvényében (11-24%). Ha a vízaktivitás a pufferanyagban csökkent, a baktériumok száma is nagymértékben csökkent. Tehát a víztartalom potenciálisan limitáló faktor a lerakóhelyen.

2.5.2 Hogyan képesek a baktériumok a HLW tárolót szennyezni?

Kétféle módon: vagy az építés során vagy a talajvízből történő migráció során. Az építés során a geológiai képződményekből vagy a felszínről szennyeződésként kerülnek be mikrobák. KARLAND és munkatársai (1998) bentonitba (amit 10% nedvességtartalomra állítottak be, és 0,74 vízaktivitásnak felelt meg), különböző fiziológiai csoportba tartozó baktériumokat: SRB-t, termofileket, spóraképzőket, halotoleráns és sugárrezisztens baktériumokat oltottak be. Majd egy függőleges furatban elhelyezett rézcső felületére rögzítették, ahol a hőmérséklet 50-70 °C, ill. 20-30 °C volt. 3 nap múlva csak a *Deinococcus radiophilus*t és a spóraképző baktériumokat tudták kimutatni. 18 hónap után a 20-30 °C-nak kitett helyről az endospórások közül csak a *D. nigrificans* volt kimutatható.

Kontamináció következhet be a talajvízből a tározó lezárása után. A bentonit agyag lassan abszorbeálja a vizet. Amint az abszorpció bekövetkezett, agyaggél képződik. E körülmények között a talajvíz baktériumai bejuthatnak a bentonitba, azonban nagyon korlátozottan (STROES-GASCOYNE és GASCOYNE 1998). Az ok pedig az, hogy a

bentonit pórusai vízzel teljesen telített formában nanométer méretűek, a baktériumok, amelyek mikrométer méretűek, nem tudnak rajta áthatolni.

2.5.3 A baktériumok aktivitásának hatása a radionuklidok mobilitására

A radioaktív hulladékok tárolásakor anaerob és redukált tárolási viszonyok lennének kedvezőbbek két fő ok miatt. Egyrészt néhány fontos radionuklid immobil ezen körülmények között, de mobil oxiás feltételek mellett. Másrészt a réz (a hulladéktároló kapszula anyaga) kevésbé érzékeny a korrózióra anoxiás körülmények között. Az oxigént a bentonit agyag és más töltőanyagok megtartják, de a szervetlen reakciók következtében 300 év alatt eltűnik. Sok baktérium fogyaszt oxigént a szervesanyagok lebontása során, és ezzel ezt az időt csökkentheti. Oxigén hiányában az erjedés és az anaerob légzés kerül előtérbe, amikor is szerves savak és hidrogén képződik.

A baktériumoknak, amelyek metabolizálják a szervesanyagokat, a tároló környezetében pozitív szerepük lehet, mivel fogyasztják az oxigént és csökkentik a redoxpotenciált, de ugyanakkor más aktivitásuk negatív lehet. Egy ilyen példa a negatív hatásra a szulfátredukáló baktériumok (SRB) szulfát- és kénredukciója szulfiddá, ami aztán a rezet korrodálja. A tároló tartályok, konténerek mikrobiálisan indukált korróziója potenciális probléma a biztonságos tárolás során. A szulfátredukálókhoz Gram-negatív (Proteobacteria) és Gram-pozitív (*Desulfomaculatum, Desulfovibrio*) baktériumok is tartoznak. Pozitív hatása a szulfátredukáló baktériumoknak, hogy redukálják az oldott és a mobil urán (VI)-ot oldhatatlan urán (IV) csapadékká, ezáltal az urán migrációja lelassul (LOVELY et al. 1993).

Egy másik pozitív hatása az SRB aktivitásnak, hogy a szulfidtermelés csökkenti a redoxpotenciált, ezáltal csökkenti a radionuklidok mobilitását.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 Mintavétel és a minták származása

Mikrobiológiai mintavételezést végeztünk a Mecseki Ércbányászati Vállalat α kutatóvágatában (Melléklet 1. kép) három alkalommal, 1997. és 1998. októbere között. A vágathajtás után egy hónappal történt az első mintavétel. A tervezett hulladéktároló helyét a Nyugat-Mecsekben a következő ábra mutatja (2. ábra).



2. ábra. A Nyugat-Mecsekben tervezett mélységi hulladéktároló helyének térképvázlata

3. ábra. A kutatóvágatok térképe néhány mintavételi hely feltüntetésével.

A 3. ábra a kutatóvágatok térképét mutatja a fúrások helyének feltüntetésével. A különböző mélységekből származó vízmintákat mintavevők segítségével vettük és steril

1 literes üvegekbe töltöttük. Minden vízmintából 500 cm³-t anaerob tartóba is helyeztünk a későbbi anaerob tenyésztéshez. A minták laboratóriumi feldolgozása 4 órán belül elkezdődött. A mikrobiológiai vizsgálatokkal párhuzamosan a vízminták fő fizikai és kémiai paramétereit a Mecseki Ércbányászati Vállalat laboratóriumában vizsgálták meg.

Levegő

Az α2 vágatban helyeztünk el 15 darab nyitott, Nutrient-agart tartalmazó Petricsészét, 20 perces expozícióval. Aerob módon inkubáltunk 8 darabot 35 °C-on 4 napig. Anaerob módon 7 darabot inkubáltunk 30-35 °C-on 4-14 napig, majd a kinőtt telepeket izoláltuk (HORVÁTH 1980). (A felhasznált táptalajok összetételének bemutatása a fejezet végén található.)

Rétegvíz

Minden mintából hígítási sort készítettünk és MPN módszerrel anaerob csíraszám meghatározást végeztünk. Minden mintából 3 x 100 cm³-t szűrtünk Millipore HAWP SO membránfilteren (0,45 μ m). Az egyik szűrőpapírt Nutrient-agarra téve aerob csíraszám meghatározást végeztünk, 5 nap 35 °C-os inkubálás után. A makro- és mikromorfológiailag különböző telepeket izoláltuk.

A másik két membránfilteren levő baktériumokat 10-10 cm³ fiziológiás sóoldatban szuszpendáltuk, majd 2,5 cm³-eket kémcsövekbe mértünk API, ill. szulfitagarba és agardugóval zártuk. Az API táptalaj a szulfátredukálók, a szulfitagar a kén-hidrogéntermelő baktériumok kimutatására szolgált. Inkubálás 32 °C-on, illetve 35 °C-on történt (HORVÁTH 1980).

Technikai víz

A technikai víz a fúrásból származó, a források vizével összekeveredett és az emberi tevékenységnek és szennyezettségnek hosszú ideig kitett pangó vizeket jelenti. A technikai vízmintákat a többi vízmintához hasonlóan kezeltük, azokkal azonos vizsgálatokat végeztünk rajtuk (HORVÁTH 1980).

Aleurolit kőzet

A mintákat a vágatfalakról vettük. Steril eszközökkel friss kőzetfelszínt alakítottunk ki, melyből 1-50 g tömegű kőzetdarabkákat vágtunk le, és steril tartókba helyeztük. A mintákból 10-10 g-ot steril dörzscsészében 90 cm³ fiziológiás sóoldatban homogenizáltunk, utána egy órát rázattuk, majd hígítási sort készítettünk és a vízmintáknál leírt vizsgálatokat végeztük el (HALDEMAN et al. 1995). (Aerob és anaerob összcsíraszám, szulfátredukáló- és kénhidrogéntermelő baktériumok.)

Dörzsminták

A vágatfalról, ill. oldalfalakról enyhén nedves steril tamponnal 19 felületi mintát vettünk. A mintákat 5-5 cm³ steril fiziológiás sóoldatban szuszpendáltuk. Aerob baktériumok kimutatására, ill. izolálására 0,1 cm³-t szélesztettünk Nutrient agarlemezre. Az anaerob baktériumok kimutatására 1 cm³-t oltottunk Nutrient Broth-ba, majd paraffinnal lezártuk (HALDEMAN et al. 1995). Minden mintából a savtermelő baktériumokat is kimutattuk Hugh-Leifson tápközegben.

3.2 Sziderofor-termelés kimutatása

Az izolátumok sziderofor-termelésének kimutatását króm-azurol agarlemezen végeztük. A szideroforok kis molekulatömegű peptid molekulák. Baktériumok és egyes

gombák akkor kezdik szintetizálni, ha az életműködésükhöz szükséges vasat nem tudják környezetükből felvenni. A sziderofortermelés kimutatása agarlemezen történik. A táptalaj króm-azurol festékanyagot tartalmaz, amely a ferri-vassal komplexet képez. Ez a komplex kék színű. Ha a ferri-vas-króm-azurol komplexhez olyan anyagot adunk, amely a vassal erősebben komplexet képes alkotni, mint a króm-azurol, akkor a króm-azurol-ferrivas komplexből a ferri-vas felszabadul és az erősebb komplexképző vegyülettel képez komplexet. A ferri-vas mentes króm-azurol festék narancssárga színű. Az agarra oltott, sziderofor-termelésre képes mikroorganizmusok sziderofort termelnek vasigényük kielégítésére. Az agarba kiválasztott sziderofor erősebben köti a ferri-vasat, mint a króm-azurol, így a ferri vas-ionok átkerülnek a festékmolekulákból a vasszállító molekulákba. A vas-ionokat nem tartalmazó festék narancssárga gyűrűként jelentkezik a telep körül (Melléklet 2. kép).

Az indikátor króm-azurol oldat elkészítése: 40 cm³ 1,82 mg/l HDTMA (Hexa-deciltrimetil-ammónium-bromid) vizes oldatot készítettünk. Ehhez állandó keverés mellett 1 mM FeCl₃ x 6H₂O 10 mM sósavban elkészített oldatát csepegtettünk a króm-azurol-HDTMA oldatához egészen addig, amíg a keletkezett oldat színe narancs-sárgáról kékes-lilára csapott át. E kékes-lila szín jelezte, hogy a krómazurol festéket telítettük ferri ionokkal (KÓNYI et al. 1997).

3.3 Aerob baktériumok spóráztatása

A baktériumokat Potato Dextrose Agar felületére szélesztettük és 9 napig 37 °C-on inkubáltuk. Időnként mintát vettünk, és mikroszkóppal ellenőriztük a spórásodást. Amikor a spórák aránya 90 % volt, steril desztillált vízzel összegyűjtöttük a spórákat, háromszor mostuk steril desztillált vízzel. Majd a szuszpenziót 80 °C-on 15 percig hőkezeltük, hogy inaktiváljuk a maradék vegetatív sejteket, lehűtöttük, még háromszor mostuk és végül

reszuszpendáltuk desztillált vízben, hogy 10⁷ spóra/cm³-t kapjunk (TALLENTIRE és KHAN 1975).

3.4 Anaerob baktériumok spóráztatása

Az R. C. M. táplevesben elszaporított baktériumokat centrifugáltuk, és spóráztató oldatban tenyésztettük 30 °C-on 14 napig anaerosztátban.

Spóráztató oldat:

Tripton	50 g/l

Pepton 5 g/l

Na-tioglikolát 1 g/l

Desztillált víz 1000 cm³

Sterilezés: 121°C-on, 15 perc, pH: 7,2.

A spórákat centrifugálással gyűjtöttük össze, a mosás az aerob spórapreparáláshoz hasonlóan történt.

3.5 Gáztermelés kimutatása

Aerob törzsek gáztermelése

Durham-csövet tartalmazó 10 cm³ Brillantzöld-laktóz-epe levesbe (E. E. Broth) oltottunk 0,1 cm³ inokulumot (az izolátumok 18 órás Nutrient Broth-on nőtt tenyészetéből). Inkubálás: 32 °C, 4 nap. A Durham-csőben a buborék jelzi a gáztermelést.

Anaerob törzsek gáztermelése

A CO₂-, ill. H₂-termelést R. C. M. levesben vizsgáltuk, amelybe Durham-csövet tettünk. 4 napos inkubálás után anaerob körülmények között NaOH-szemcse hozzáadásával döntöttük el, hogy a kapott gáz CO₂ vagy H₂.

Az anaerob baktériumtörzsek CH₄-termelését Ruhland-féle táplevesben vizsgáltuk (Durham csővel kiegészítve) (HORVÁTH 1980).

Nitrátredukció és denitrifikáció

A vízmintákból az izolátumok nitrátredukciójának kimutatását Durham-csővel kiegészített nitrátlevesben végeztük egy hét 35 °C-on történő inkubálás után.

Nitritreagens, nitrátreagens, illetve Nessler-reagens segítségével döntöttük el, hogy történt-e nitrátredukció illetve denitrifikáció. (HORVÁTH 1980)

3.6 Fémionokkal szembeni rezisztencia kimutatása

Az aerob izolátumokat minimál táplevesben (OPCA) történő tenyésztés után minimál agarlemezekre kentük ki. (A táptalaj összetétele a mellékletben található.) Az agarlemezből előzőleg steril dugófúróval 6 lyukat vágtunk ki Petri-csészénként. Az agarlyukakba adagoltuk a különböző koncentrációjú fémoldatokat (Cr: 100-650 mg/l, Pb: 10-400 mg/l, Cd: 100-200 mg/l, 50 µl-t). Inkubálás után meghatároztuk azt a fémkoncentrációt, ami gátolja a baktérium szaporodását (2-4 mm gátlási gyűrű a lyuk körül). A fémoldatokat bidesztillált vízzel készítettük, először a törzsoldatot és abból a hígításokat.

3.7 Néhány toxikus fém bioszorpciója/bioakkumulációja

Az aerob, ill. anaerob izolátumok 24 órás, ill. 7 napos biomasszájával végeztük a kísérleteket 100 cm³ oldattérfogatban. A vizsgálatokhoz 18-18 törzset választottunk ki. Az aerob törzseket 100 cm³ Nutrient Broth-ban 32 °C-on rázatva, az anaerob törzseket R. C. M.ben anaerob módon szaporítottuk el. A 24 órás (aerob) ill. 1 hét (anaerob) inkubálás után a baktériumtömeget (6500 ford./perc) 15 perc centrifugálással választottuk el a táplevestől, majd bidesztillált vízzel mostuk, és a baktériumsejt tömeget 20-25 mg/ml koncentrációjú Cd(NO₃)₂ vagy CrCl₃ oldatával rázattuk 2 órán át.

Kétórás rázatás után centrifugálással (6500 fordulat/perc, 15 percig) választottuk el a fémtartalmú oldatot a sejtektől. A felülúszó fémkoncentrációját atomabszorpciós spektrofotométerrel (Varian AA-7) határoztuk meg. A baktériumsejt tömeget 105 °C-on történő 2 órás szárítás után mértük és a baktériumok által felvett fém mennyiséget a baktérium száraz tömegére vonatkoztattuk. A biomassza által akkumulált fémmennyiséget az adszorpciós folyamat előtti és utáni fémkoncentrációk különbségéből számoltuk ki.

Az atomabszorpciós mérés hibája: kimutatási határ: 0,007 mg/l, mérési hiba:±0,02 mg/l.

3.8 Szervessav-termelés mérése Boehringer–Mannheim teszttel

Kiválasztottunk 30 izolátumot, amelyeknek megmértük az ecetsav, citromsav, oxálsav termelését Boehringer-Mannheim teszttel. (Csak ennek a három savnak a mérésére volt lehetőségünk.) Az izolátumok 72 órás, Nutrient Broth-ban történő tenyésztése után a tenyészetet centrifugáltuk 4500 fordulat/perccel 15 percig. A felülúszót hőkezeltük 80 °C-on, 15 percig. Majd a felülúszó extinkcióját mértük 340 nm-en, HITACHI 220A spektrofotométeren a gyártó utasításainak megfelelően.

3.9 Biofilmképződés

A baktériumok megtapadását és biofilm képződését atomerő mikroszkóppal tanulmányoztuk (AFM: atomic force microscopy). Ez a technika alkalmas arra, hogy nanométer nagyságrendű képet kapjunk a vizsgált felületről, legyen az baktérium vagy akár fém. Nagy előnye még az is, hogy vizes oldatokban, in situ nagy felbontású megfigyeléseket lehet végezni. A képalkotás atmoszférikus nyomáson történik, folyadékkamrában, ezáltal a biofilm nem szárad ki. Az atomerő mikroszkóp azért előnyös erre a feladatra, mert nem

szükséges a vizsgálathoz a baktériumok elölése és rögzítése, és nem kapunk műterméket. Az AFM technika egyike a leghatásosabb on-line technikáknak. Nagy felbontású két és háromdimenziós képeket lehet vele készíteni különböző anyagok felszínéről. A biológiai struktúrák vizsgálata mellett a korróziós folyamatok kimutatására használják (TELEGDI et al. 1998). Nagyon fontos viszont, hogy a felületet, amin a baktériumokat meg akarjuk vizsgálni, először SiC papírral (méret:1200), majd 0,25 µm–es gyémántpasztával nm-re egyenletesre kell csiszolni. A bodai agyagkőből 10x10 mm-es csiszolt lapocskákon követtük nyomon a biofilm kialakulását. A vizsgált mikroorganizmus a K/5 jelű izolátum volt. A baktérium 24 órás tenyészetéből (Nutrient Brothban) 3 cm³-t oltottunk hígított, glükózzal kiegészített táplevesbe (14 cm³ Nutrient Broth, 83 cm³ fiziológiás sóoldat, 0,5 g glükóz). Steril üvegekben négy részre osztottuk a táplevest, beleraktuk a steril aleurolit lapocskákat. Az inkubálás kezdetekor, 2 hét múlva és 2,5 hónap múlva vizsgáltuk a biofilm kialakulását atomerő mikroszkóppal (Nanoscope III, Digital Instruments), a Központi Kémiai Kutató Intézetben. A biofilm vizsgálata kontakt módban történt.

3.10 Sugárrezisztencia meghatározása

A baktériumok sugárérzékenységének meghatározásánál a besugárzást ⁶⁰Co SZOVATOM RH-γ-30 készülékben végeztük, 2,0167-2,0475 kGy/óra dózisteljesítmény intervallumban (GAZSÓ 1997). Az aerob és anaerob baktériumszuszpenziókat (10⁷ baktérium/ml) 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 és 3,2 kGy-el, illetve az aerob és anaerob spóraszuszpenziókat (10⁷ spóra/ml) 1, 2, 3, 4 és 6 kGy-el, szobahőmérsékleten sugaraztuk be. Az aerob besugárzás levegőben, az anaerob besugárzás nitrogén atmoszférában történt. A besugárzás után a túlélő baktériumok számát Nutrient-agaron határoztuk meg. Az inkubálás aerob vagy anaerob módon 35°C-on 72 óráig történt. A túlélési görbéket négy kísérleti pontból határoztuk meg és mindegyik ponthoz négy párhuzamos agarlemez eredményét használtuk fel. Minden kísérletet legalább kétszer megismételtünk. A túlélési görbe egy exponenciális egyenlettel írható le (ALPER és GILLIS 1960):

 $S = n \cdot e^{-kD}$, amelynek lineáris formája a következő:

 $\ln S/So = \ln n - k D$,

ahol S: a túlélő mikrobák száma D dózisnál, So a kiindulási élő mikrobaszám, k a görbe meredeksége vagy inaktivációs konstans, n: extrapolációs szám (a váll nagysága). A túlélési görbék lineáris vagy közel lineáris formát adtak. A görbék illesztése a legkisebb négyzetek elve alapján történt. A szórásanalízisre F-próbát, a szignifikáns eltérések vizsgálatára kétmintás t-próbát használtunk (0,95 valószínűségi szintnél).

3.11 Alkalmazott táptalajok

- Nutrient Broth No. 2 (Oxoid CM 67) (Aerob baktériumok izolálására, tenyésztésére)
- Nutrient Agar (Oxoid CM 3)
- API tápközeg (Merck 5259) (Szulfátredukáló baktériumok kimutatására)
- Szulfitagar (Oxoid CM 79) (Kénhidrogéntermelő baktériumok kimutatására)
- Hugh-Leifson tápközeg (Savtermelő baktérium kimutatására)
- *Brillantzöld-laktóz-epe leves* (E.E.Broth) (Oxoid CM 317) (Aerob izolátumok gáztermelésének kimutatására, ill. enterobaktériumok dúsítására)
- Potato-Dextrose Agar (Oxoid CM 139) (Aerob baktériumok spóráztatása)
- Reinforced Clostridial Medium (R.C.M., Oxoid CM 151) (Anaerob baktériumok tenyésztésére és spóráztatására)
- Ruhland-féle táptalaj (Metán termelés kimutatására)
- Króm-azurol agar (Sziderofortermelés kimutatására)
- MacConkey agar (Oxoid CM 7) (Enterobaktériumok kimutatása)

OPCA (Fémionokkal szembeni rezisztencia kimutatására, összetétele a mellékletben található)
4. EREDMÉNYEK

4.1 A Bodai Aleurolit Formációba tervezett mélységi hulladéktároló környezetének mikrobiológiai folyamatai

1. táblázat. A fúrások vízmintáinak főbb kémiai paraméterei

Fúrás (zóna)	Vágattól számított távolság (m-től m-ig)	Eh (mV)	рН	Vezetőképesség (µS cm ⁻¹)	Nyugalmi nyomás (kPa)	Hőmérséklet (°C)
$\Delta 6$	*	-188	7,19	3053		48,1
$\Delta 5Z5$	158-196	167	7,49	1652	8 000	46,1
$\Delta 5Z4$	129-156	47	8,79	2 200	4 900	45,8
$\Delta 5Z3$	78-126	-342	7,56	1 382	5 000	45,2
$\Delta 5Z2$	28-76	-106	8,8	1 061	8 000	44,4
$\Delta 7Z2$	47-52	95	7,8	1 523	3 600	35,8
$\Delta 7Z5$	69-109	99	8,1	1 546	3 600	36,1
Δ1	0-108	-236	8,3	1 195	0+	46,8
α1	6-82	-150	8,3	1 037	_	37,6
α2	6-77	-118	8,6	1 038	-	36,6

 $^{*}\Delta 6$ egész hosszában nyitott, 10-12 m-nél; 94-104 m-nél; 133-143 m-nél intenzív víz beszivárgás .

⁺Nincs nyomás. A rossz vezetékcsövezés miatt szivárog.

2. táblázat. A fúrások vízmintáinak néhány anionja és a kimutatott gázok fajtái

Fúrás	Cľ	CO ₃ ² ·	HCO ₃	SO ₄ ²⁻	Gázok
		(m	gl ⁻¹)		
$\Delta 6$	20	22,6	1 090	849	
$\Delta 5Z5$	14	48	994	22	$N_2, H_2^{\bullet}, He^{\bullet}, Ar^{\bullet},$
					CO_2^{\bullet}
Δ5Z4	18	63	866	457	
Δ5Z3	18	21	729	37	
Δ5Z2	21	54	775	39	CH_4 , N_2 , H_2^{\bullet} , He^{\bullet}
Δ7Z2	14	4	830	215	N_{2} , Ar^{\bullet} , CO_{2}^{\bullet}
Δ7Z5	14	60	744	291	N_{2} , Ar, \bullet CO ₂ \bullet
Δ1	16	2	631	180	
α1	16	36	598	165	N_2, O_2, Ar^{\bullet}
α2	14	48	598	157	N_2 , He [•] , Ar [•]

♦ Nyomokban

A 1. és 2. táblázat a fúrások vízmintáinak főbb kémiai paramétereit mutatja. A víz vezetőképessége 1038-3053 μS/cm, a pH 7,19-8,8 és a hőmérséklet 36,6°C - 48,1°C volt. A vízminták oldott gáztartalma: N₂, CH₄, O₂, CO₂, He, Ar és H₂. A CO₂ a karbonátrendszer része, a metán eredetét tekintve biológiai eredetű, de lehet abiogén eredetű is. A hidrogén elektrolízis útján képződhet, de feltételezték, hogy esetleg bakteriális tevékenység hatására is termelődhet. A nitrogén származására sem volt egyértelmű magyarázat. A hélium a radionuklidok bomlásából származik, az argon pedig az atmoszférából. A redoxpotenciál - 236 és 167 mV között volt és a nyomás 3600-8000 kPa közt változott.

4.1.1 A minták csíraszáma

A mintavétel során összesen 67 mintát vettünk. A 3. táblázat a különböző helyekről vett minták megoszlását mutatja. Ezekből 300 mikro- és makromorfológiailag különböző baktériumtörzset izoláltunk, amelyek 55,3%-a aerob, 44,7%-a anaerob baktérium (4-5. ábra). A legtöbb izolátumot a vízmintákból tudtunk kinyerni, ezt követően aerobokat főleg kőzetből és levegőből, anaerobokat kőzetből és technikai vízből. Az izolált mikroorganizmusokból tiszta tenyészetet készítettünk. Néhány makro- és mikromorfológiai tulajdonságukat megvizsgáltuk, pl. telep alak, forma, konzisztencia, szín, Gram-festés. Azonban az identifikálás nem volt célunk.

Minta	Mintaszám
Levegő	16
Víz	18
Kőzet	5
Dörzs	19
Technikai víz	9
Összesen:	67

3. táblázat. Minták származása és száma



4. ábra. Az aerob izolátumok (összesen 166) megoszlása származásuk szerint



5. ábra. Az anaerob izolátumok (összesen 134) megoszlása származásuk szerint Levegőminták (L) csíraszáma: a 20 perces expozíciónak kitett lemezeken az átlagos aerob csíraszám 2,2 x 10²/lemez azaz 3,5/cm², az anaerob csíraszám 5,6 x 10¹/lemez azaz 0,9/cm² volt.

Rétegvíz minták (V) csíraszáma: az aerob csíraszám $0,39 - 1,2 \times 10^5$ mikroorganizmus/cm³, az anaerob csíraszám $0,36 - 3,9 \times 10^3$ mikroorganizmus /cm³ volt. A csíraszámok nagymértékben függtek a mintavétel helyétől, ill. a víz hőfokától. A mintavételi helytől függetlenül a víz csíraszámát és hozzátartozó hőfokot ábrázolva azt kaptuk, hogy a hőmérséklet növekedésével mind az aerob, mind az anaerob mezofil csíraszám csökkent, a termofil csíraszám pedig jelentősen megnőtt. Termofilek esetén az anaerob csíraszám (7,3-

4,6 x 10^4 /cm³) nagyobb volt, mint az aerob (0,9-2,4 x 10^2 /ml) (6-7. ábra). Enterobaktériumokat egy mintából sem tudtunk kimutatni.



6. ábra. A mezofil csíraszám változása a vízhőmérséklet függvényében



7. ábra. A termofil csíraszám változása a vízhőmérséklet függvényében

Technikai vízminták (Tv) csíraszáma: A technikai víz a fúrásból származó, a források vizével összekeveredett és az emberi tevékenységnek és szennyezettségnek hosszú ideig kitett pangó vizeket jelenti. Nagymértékű csíraszám növekedést kaptunk a fúrások vizével összehasonlítva. A technikai vizek aerob csíraszáma 10^5 - 10^6 /cm³ közt változik és hasonló nagyságrendű az anaerob csíraszám is. Behurcolást bizonyít a csíraszámnövekedés mellett a 10^1 - 10^2 /ml nagyságrendű enterobaktérium szám is, amit a fúrások vizéből nem tudtunk kimutatni. A termofil csíraszám a technikai vízminták esetén max. 10^1 /cm³ nagyságrendű volt (8. ábra).



8. ábra. Technikai vízminták csíraszámai (átlagérték körrel jelölve)

A kőzetek aerob csíraszáma 10^2-10^5 nagyságrendű, míg az anaerob csíraszám 10^1-10^3 /g volt (7. táblázat). A K2 és K4 jelű kőzetmintákból 1,3x 10^3 /cm³ H₂S- termelő mikroorganizmus jelenlétét is sikerült kimutatnunk.

Aerob csíraszám/g	Anaerob csíraszám/g		
$1,20 \ge 10^3$	2,61 x 10^2		
2,47 x 10 ⁵	9,0 x 10 ³		
$1,92 \ge 10^3$	9,0 x 10 ³		
$2,32 \times 10^2$	$4,5 \ge 10^1$		
	Aerob csíraszám/g 1,20 x 10 ³ 2,47 x 10 ⁵ 1,92 x 10 ³ 2,32 x 10 ²		

4. táblázat. Kőzetminták aerob és anaerob csíraszámai

A mikromorfológiailag különbözőnek tűnő összes telepet (n=300) izoláltuk a különböző mintákból. A mikromorfológiai vizsgálatok mellett vizsgáltuk az izolátumok gáztermelését (CO₂, CH₄, H₂), savtermelését, sziderofor termelését, Gram-festését, spóraképzését.

4.1.2 Az izolált törzsek gáztermelése

A vízmintákból izolált anaerob törzseknél N₂ (2,2%), és NH₃ (6%) termelést mutattunk ki, amelyek a következő fúrásokból származtak: $\Delta 5Z5$ (NH₃), $\Delta 5Z4$ (NH₃), $\Delta 5Z2$ (NH₃), $\Delta 5Z2$ (NH₃), $\Delta 7Z2$ (N₂, NH₃), $\Delta 7Z5\Delta$ (N₂, NH₃), $\alpha 1$ (NH₃), $\alpha 2$ (N₂, NH₃). A H₂ (2,2%) a következő fúrások vízmintáiból származik: $\Delta 5Z4$, $\Delta 7Z5\Delta$, $\alpha 2$, $\Delta 6$. A vízmintákból izolált aerob törzseknél is tapasztaltunk N₂ (2,4%) és NH₃ (3,6%) termelést. Származási helyük a következő: $\Delta 5Z4$ (NH₃), $\Delta 7Z2$ (N₂, NH₃), $\Delta 7Z5\Delta$ (N₂, NH₃), $\alpha 2$ (N₂). A technikai vízből izolált törzseknél N₂ (1,5%) termelést mutattunk ki. Az anaerob, CO₂ termelő törzsek közül 3 (2,2%) származott technikai vízből. A felületi mintákból származó 2 aerob és 3 anaerob izolátum mutatott intenzív CO₂-termelést (a törzsek 1 ill. 2,2%-a). A kőzetmintákból származó 3 anaerob izolátum termelt hidrogént (2,2%). A levegőből származó anaerob izolátumok közül 2 (1,5%) termelt széndioxidot. A kőzetmintákból és technikai vízből 2-2





9. ábra. Aerob és anaerob gáztermelő izolátumok aránya

4.1.3 Az izolátumok savtermelése

A savtermelők aránya (10. ábra) a levegőmintákból a legnagyobb, 63 % az aerob és 57% az anaerob izolátumoknál. Felületi mintáknál, vízmintáknál és technikai vízmintáknál kisebb és legkisebb a kőzetmintáknál (13%, ill. 14%). Ez összevethető azzal is, hogy vízmintákban 7,6-8,3 pH értékeket mértünk, ez a tartomány főleg a neutrofil és alkalofil baktériumflórának kedvez. Az aerob és anaerob izolátumokat összehasonlítva, anaerobok esetén a víz és a felületi mintákban nagyobb a savtermelők aránya.



Aerob izolátumok

10. ábra. A savtermelők aránya (kék színnel jelölve) az aerob és az anaerob izolátumokban

Elvégeztük harminc izolátum három szervessav-termelésének (ecetsav, citromsav, oxálsav) kvantitatív meghatározását is Boehringer-Manheim teszttel. A kapott eredményeket

a 11. ábrán tüntettük fel. Az ecetsav termelése volt a legnagyobb (0,1-25,3 mg/l), ezt követte az oxálsav (0,7-39,9 mg/l), majd a citromsav (0,04-9,2 mg/l).



11. ábra Az izolátumok (összesen 30) szervessav termelése (átlagérték körrel jelölve)

4.1.4 Sziderofor-termelés kimutatása

Az aerob izolátumok (összesen 141) 19,4%-a bizonyult sziderofor termelőnek. Az anaerob izolátumok sziderofortermelést nem mutattak. Ez az eredményünk egybeesik azzal a közléssel (BIRCH és BACHOFEN 1990), amely szerint csak az aerob és fakultatív anaerob baktériumok mutatnak sziderofortermelést, az obligát anaerobok nem. A szidero-fortermelők származási helyét tekintve azt találtuk, hogy a legtöbb törzs, kb. 40% a technikai vízből, 28% kőzetből származik, 16% vízből, 13% felületi mintákból, és csak 3% a levegőből (12. ábra).



12. ábra. Sziderofortermelő izolátumok megoszlása az izolálási hely szerint

4.1.5 Az aerob és anaerob törzsek spóraképzése

Megvizsgáltuk az összes aerob és anaerob izolátum spóraképzését. A 28. oldalon leírt spóráztató táplevesekben történő tenyésztés, 80 °C 15 perc hőkezelés után, ill. mikroszkópos spórafestési eljárással ellenőriztük, hogy az izolátumok spórát képeznek-e vagy sem. Az aerob izolátumokból 84 (50,6%), az anaerob izolátumokból 80 (59,7%) bizonyult spóraképzőnek.

4.1.6 A sugárérzékenység meghatározása

Összesen 93 izolátumnak határoztuk meg a sugárérzékenységét. Ezek között az izolátumok közt aerob vegetatív, aerob spórás, anaerob vegetatív, anaerob spórás, vagyis különböző sugárrezisztenciájú csoportba tartozó mikroorganizmusok voltak. Előzetes szelekció után a törzseket 0,2-6 kGy-el sugaraztuk be Co⁶⁰ SZOVATOM RH-γ-30 készüléken. A besugárzás hatását túlélési görbe segítségével fejeztük ki. Egy aerob spórás izolátum (V 3/3) túlélési görbéjét mutatjuk be a 13. ábrán. Azért csak egy görbét mutatunk be, mert a többi csoportba tartozó baktériumnak is hasonló módon szerkesztettük a túlélési görbéjét, eltérés csak a görbe meredekségében van.



13. ábra. A V 3/3 aerob spórás izolátum túlélési görbéje

A görbe szerkesztése úgy történik, hogy a sejtek túlélését logaritmikus skálán ábrázoljuk a sugárdózis függvényében. Ez eredményezi az egyenes vonalat, az exponenciális szakaszt. Annak érdekében, hogy a tizedelődózist a meredekség reciprokaként határozhassuk meg, a túlélő baktériumok számát tizes alapú logaritmikus skálán tüntettük fel. (Az ábrához tartozó számítások a mellékletben találhatók.)

A 4 különböző sugárrezisztenciájú csoportba tartozó izolátumok tizedelő dózis értékei a következő képet mutatják (14. ábra). A D_{10} érték vagy tizedelődózis azt a sugárdózist jelenti, amely hatására a kiindulási csíraszám egy nagyságrenddel csökken. Az aerob spórás izolátumok tizedelő dózis értékei 0,8-2,44 kGy közt változtak. A legrezisztensebb aerob törzs D_{10} értéke 2,44 kGy volt. Az anaerob spórás izolátumok még ennél is rezisztensebbek voltak, a tizedelő dózisok: 1,86-4,93 kGy. Az aerob vegetatív és anaerob vegetatív izolátumoké sokkal alacsonyabb 0,11-0,57 kGy ill. 0,22-0,40 kGy. A spórás baktériumoknak nemcsak spóra formában, hanem vegetatív formában is meghatároztuk a D_{10} értékét. Az eredményeket a 15. ábra mutatja. Láthatjuk, hogy mind az aerob, mind az anaerob csoport esetén a legrezisztensebbek a spórások, de a spóraképzők vegetatív formában is rezisztensebbek a spórát nem képző vegetatív baktériumoknál. A vegetatív baktériumok esetén nem volt szignifikáns különbség az aerob és anaerob izolátumok között és a minimum és maximum értékek sem tértek el nagymértékben az átlagtól (16. ábra). A legnagyobb D_{10} értékeket az anaerob spórásoknál tapasztaltunk (ezek a vízmintákból származtak), de az egyes anaerob spórás izolátumok közötti eltérések ebben a csoportban voltak a legnagyobbak. Ezek az értékek azonban csak az alkalmazott kísérleti körülményekre vonatkoznak. Természetes környezetben a baktériumok aktuális sugárérzékenységét a környezeti feltételek nagymértékben befolyásolhatják.



14. ábra. A különböző sugárrezisztenciájú csoportba tartozó izolátumok D₁₀ értékeinek
átlagai, minimum és maximum értékei. (Aerob vegetatív összesen:15, anaerob vegetatív
összesen:6, aerob spórás összesen:53, anaerob spórás izolátum összesen:19.)



15. ábra. Spórás baktériumok (spóra és vegetatív alakban) valamint vegetatív baktériumok
 D₁₀-értékei. (Aerob vegetatív összesen:15, anaerob vegetatív összesen:6, aerob spórás
 összesen:53, anaerob spórás izolátum összesen:19.)



16. ábra. Az izolátumok D10 értékeinek átlagai és szórásuk

4.1.7 Az aerob törzsek toxikus fémmel szembeni rezisztenciája

Rezisztensnek tekintjük azokat a törzseket, amelyek 1 mM fémmel szemben rezisztenciát mutatnak (NIETO et al. 1987; 1989; TREVORS et al. 1985, FARKAS 2003). E besorolás szerint az összes vizsgált izolátum 100%-ban rezisztens krómmal szemben. Sőt az izolátumok 5,8% -ánál 650 mg/l (12,5 mM) koncentrációjú Cr-oldat mellett sem tapasztaltunk szaporodásgátlást (17. ábra). A sziderofortermelő izolátumoknál 400-650 mg/l Cr koncentráció jelenléte volt gátló hatású. Pb esetében a 400 mg/l (1,93 mM) koncentrációjú oldat sem gátolta az izolátumok 93,7 %-nak szaporodását. Körülbelül ugyanez az arány 1 mM esetén is.



17. ábra. Az aerob izolátumok rezisztenciája krómmal szemben

Kíváncsiak voltunk arra, hogy a toxikus fémekkel szembeni rezisztencia indukálható-e az izolált törzsek esetében. Kiválasztottunk egy izolátumot, a V4/5 aerob törzset és biofotométerrel felvettük a növekedési görbéjét. A baktériumot OPCA minimál táplevesbe oltottuk, amit növekvő Pb (10-100 mg/l, 0,04 mM-0,48 mM) koncentrációval egészítettünk ki. A V4/5 izolátum esetén a kontroll lag fázisa kb. 1 óra, 10 mg/l (0,04 mM) Pb esetén 2 órával hosszabb, 50 mg/l (0,24 mM) Pb-nél kb. 6 óra (18. ábra). A baktériumtörzs 100 mg/l (0,48 mM) Pb koncentrációnál már nem szaporodott. A görbék azt mutatják, hogy a fémmel szembeni rezisztencia indukálható az adott törzsnél. Azonban ennek bizonyításához az adaptálódott törzzsel további kísérletek elvégzése szükséges.



18. ábra. A V4/5-ös izolátum szaporodási görbéi Pb jelenlétében

4.1.8 Az anaerob törzsek toxikus fémekkel szembeni rezisztenciája

Az aerob törzseknél leírt módon végeztük a vizsgálatokat, azzal a különbséggel, hogy az inkubálást CO₂ atmoszférában végeztük. 100 mg/l koncentrációjú Cr (1,9 mM) esetén rezisztens a törzsek 100%-a, Pb (0,48 mM) esetében 81,6%-a, és Cd (0,88 mM) esetében 79%-a. 200 mg/l koncentrációjú Cr (3,8 mM), Pb (0,96 mM), Cd (1,77 mM) oldatok jelenlétében a törzsek 86,1%; 81,6%; 73,5%-a szaporodott. Anaerob törzseknél a toxicitási sorrend: Cr<Pb<Cd.

4.1.9 Néhány toxikus fém izolátumok általi bioszorpciója, bioakkumulációja

A baktériumok fémmel szembeni rezisztenciájánál még nagyobb jelentőséggel bír ezen fémek bioszorpciója. A radionuklidok bioszorpciójának modellezésére mind az aerob, mind az anaerob törzseknél egy kétértékű toxikus fémion a Cd, és egy háromértékű toxikus fémion a Cr bioszorpcióját vizsgáltuk.

5. táblázat. Aerob törzsek Cr és Cd felvétele. Kiindulási konc.: Cr: 25 mg/l (0,47 mM), Cd:
20 mg/l (0,17 mM)

Törzs	Bakt. által felvett Cr mg/l	Fémfelvé- tel haté- konysága %	Felvett fém mg/bio- massza mg	Bakt. által felvett Cd mg/l	Fémfelvé- tel haté- konysága %	Felvett fém mg/bio- massza mg
L 8	14,49	72,37	0,840	15,75	95,45	1,07
D 8	8,96	44,75	1,541	15,532	94,13	1,22
V 4/5	15,02	75,02	0,939	16,276	98,64	1,23
K 2/6	13,66	68,23	0,854	15,64	86,00	1,24
L 6	19,22	96,00	1,430	11,00	66,66	1,45
V 6/3	14,71	73,47	0,986	-	-	-
T 4	-	-	-	15,68	97,39	0,851
V 5/3	19,74	90,13	0,771	14,22	88,32	0,733
D 6	14,06	64,33	0,550	-	-	-
V 7/1	17,70	80,82	0,850	15,889	98,68	1,238
T 5/1	17,36	79,26	1,180	15,893	98,71	1,157
L 2	18,19	83,05	1,870	14,04	87,20	0,732
V 7/2	17,26	78,81	0,831	15,871	98,57	1,197
K 1⁄2	20,572	98,97	0,846	14,953	99,42	0,702
V 4/1	18,903	90,94	0,906	13,904	92,44	0,901

V 7/3	16,703	80,35	0,809	11,15	74,13	0,76
V 4/2	17,822	85,74	1,320	14,796	98,37	1,46
L 14	16,709	80,38	0,756	14,735	97,97	0,945
L 3	17,46	83,99	1,299	14,84	98,67	1,185

Az aerob izolátumok krómfelvétele 0,55-1,87 (felvett Cr mg/biomassza mg) között változott. Kadmiumnál a fémfelvétel 0,70-1,45 (felvett Cd mg/biomassza mg) között változott (8. táblázat). A törzsek egy részét a Cd-bioszorpció, más részénél a Cr-bioszorpció volt a hatékonyabb, néhány törzsnél mind a kettő. Csak a baktériumtömeget (törzstől függetlenül) és az adszorbeált fém mennyiséget figyelembe véve azt kaptuk, hogy fordított arányban van a baktériumok tömege a felvett Cd/ ill. Cr/ baktériumtömeggel. Vagyis a baktériumtömeg növekedésével az egységnyi baktériumtömeg által felvett fémmennyiség csökken (19. és 20. ábra). Ez a megfigyelésünk egyezik JUNGHANS és STRAUBE (1991) megfigyeléseivel élesztőgombák rézakkumulációjával kapcsolatban, valamint SINGH és YADARA (1987) *Anacystis nidulans*-szal kapott eredményével.



19. ábra. Az aerob izolátumok króm-bioszorpciója a baktériumtömeg függvényében



20. ábra. Az aerob izolátumok kadmium bioszorpciója a baktériumtömeg függvényében

Az anaerob törzseknél a fémfelvétel mind a Cd, mind a Cr esetén hasonlóan alakult, mint az aerob törzseknél. Anaerob törzseknél a Cr-felvétel 0,23-2,37 mg/mg baktérium szárazsúly között változott, a kadmiumé 0,03-3,6 mg/mg baktérium szárazsúly volt (9. táblázat).

6. táblázat. Az anaerob izolátumok Cr- és Cd-felvétele. Kiindulási konc.: Cr: 25mg/l (0,47 mM) Cd: 20 mg/l (0,17 mM)

Törzs	Bakt. által felvett Cr (mg/l)	Fémfelvétel hatékonysága (%)	Felvett fém (mg/mg biomassza)	Bakt. által felvett Cd (mg/l)	Fémfelvétel hatékonysága (%)	Felvett fém (mg/mg biomassza)
La 6	24,64	89,85	1,66	5,83	41,40	0,09
SZT 2/2	25,73	93,82	0,23	11,89	83,40	0,19
Va 8/1	25,98	94,74	1,56	11,12	78,00	0,07
AT 1⁄4	25,32	92,32	0,24	12,46	87,30	0,03
AT 1/3	9,51	34,64	1,79	-	-	-
Da 1	22,72	82,84	2,37	-	-	-
Ka 4/1	20,44	85,34	1,58	13,99	97,90	0,24
V 6/3	22,59	91,82	0,76	14,01	98,04	0,51
AT 1/1	17,21	69,96	0,40	3,99	27,92	0,91
Da 3	17,70	71,95	0,11	14,00	97,97	1,23
Ka 3/2	22,03	89,55	0,47	13,99	97,90	3,62
Ta 3	17,22	86,52	0,33	14,43	95,84	0,59

Az anaerob izolátumoknál is megfigyelhető az a tendencia, hogy a baktériumtömeg növekedésével a felvett, adszorbeált fém mennyisége csökken (21-22. ábra).



21. ábra. Az anaerob izolátumok kadmium bioszorpciója a baktériumtömeg függvényében



22. ábra. Az anaerob izolátumok króm bioszorpciója a baktériumtömeg függvényében

Kíváncsiak voltunk arra, hogy a baktériumok által megkötött kadmium, ill. króm visszanyerhető-e, és ha igen milyen szerekkel (23-24. ábra). Kiválasztottuk a K1/2 kőzetből származó aerob izolátumot, és ezzel az izolátummal végeztük el a kimosási kísérleteket. A baktériumsejteket 21 mg/l (0,18 mM) koncentrációjú Cd(NO₃)₂ oldatban rázattuk másfél óráig, majd centifugálással elválasztottuk a sejteket és az oldat maradék koncentrációját mértük (az ábrán a k jelölés). Majd a lecentrifugált sejteket mostuk bidesztillált vízzel, 0,1 M Na-citrát-tal, 0,1 M EDTA oldattal, 0,1 M Na₂CO₃ oldattal és 0,1 M HNO₃-mal. Az 1. 2. és 3. szám a mosások számát jelzi, ill. a kadmium deszorpcióját az illető szerrel. Krómmal is ugyanígy jártunk el és a jelölések is azonosak.



23. ábra. A felvett kadmium kimosása a K1/2 aerob izolátum sejtjeiből különböző szerekkel
Jelölések:0: a kiindulási Cd koncentráció, k: a kiindulási oldat maradék koncentrációja,
1.,2.,3.:mosások száma ill. a mosások során visszanyert Cd koncentráció.



24. ábra. A felvett króm kimosása a K1/2 izolátum sejtjeiből különféle ágensekkel
Jelölések: 0: a kiindulási Cr koncentráció, k: a kiindulási oldat maradék koncentrációja,
1.,2.,3.: mosások száma ill. a mosások során visszanyert Cr koncentráció

Ha összeadjuk a három mosás értékét, ezt összevethetjük a kiindulási és a maradék koncentráció különbségével, ami azt jelzi, hogy mennyi fémet kötött meg a baktériumsejt. A deszorbeáló szerek közül kadmiumnál a salétromsav, a nátrium-citrát, és az EDTA volt hatékony. Króm esetében az előbbi szerek mellett a Na₂CO₃ is hatékony volt. A deszorpció mértéke jelzi, hogy a két fém felvétele bioszorpció, és komplexképző ágensekkel nagyrészt lemosható a sejtekről.

Az aerob izolátumoknál összehasonlítottuk a törzsek krómmal szembeni rezisztenciáját és a króm bioszorpcióját. Azt tapasztaltuk, hogy a Cr bioszorpció a 400 mg/l (7,6 mM) krómmal szemben rezisztens izolátumok nagy részénél nagyobb, mint a 600 mg/l (12,3 mM) esetén, vagyis a rezisztencia ebben az esetben csökkent Cr-bioszorpcióval jár (24. ábra).



25. ábra. Az aerob izolátumok krómmal szembeni rezisztenciája és króm bioszorpciója

4.1.10 Biofilm kialakulása az aleurolit felszínén

Atomerő mikroszkóp segítségével vizsgáltuk a biofilm mikromorfológiáját, és nyomon követtük kialakulását aleurolit kőzet felszínén (26-28. ábra).







A nagyon finom csiszolás ellenére a kőzet felszíne nem tökéletesen egyenletes. Baktériumok nem láthatók.



27. ábra. Az aleurolit felülete 2 hetes inkubálás után

A képen észrevehetők a felszínen megtapadt 0,5-1 µm-es hosszúságú, tojásdad alakú baktériumok.



28. ábra Az aleurolit felszínén kialakult biofilm réteg háromdimenziós ábrája 2,5 hónap inkubáció után.

A kőzet felszínén egyenetlen felületű biofilmréteg alakult ki, amelyben a filmet alkotó egyedi baktériumok is felfedezhetők.

4.2 Új tudományos eredmények

A Bodai Aleurolit Formáció, mint lehetséges radioaktív hulladéklerakóhely mikrobiológiai vizsgálatával hazánkban elsőként foglalkoztunk.

- Adatokat kaptunk a vizsgált terület baktériumközösségeinek összetételére. Meghatároztuk a rétegvízből, kőzetből, (mint természetes környezetből) és technikai vízből, a vágatfalak felületéről és levegőjéből (mint mesterséges környezetből) az aerob és anaerob, mezofil és termofil, spóraképző és spórát nem képző, savtermelő, sziderofortermelő, gázképző törzsek csíraszámát és arányát.
- A izolált törzsek közül nitrátredukálókat, denitrifikálókat (N₂, NH₃, H₂) főleg a vízmintákból tudtunk kimutatni. A technikai vízből N₂, CO₂, a felületi mintákból CO₂-, a kőzetből H₂-, a levegőből CO₂- termelő törzseket izoláltunk.
- Sziderofor termelő baktériumokat mutattunk ki, illetve izoláltunk, főleg technikai vízből és kőzetből. Ezek az izolátumok rezisztensek voltak 400-650 mg/l (7,6-12,5 mM) Cr-mal szemben. A radionuklidok immobilizálásában ugyanígy hatékonyak lehetnek.
- 4. Kimutattunk olyan törzseket, amelyek szervessav-termelésükkel mobilizálhatják a radionuklidokat, ill. mikrobiológiai korróziót okozhatnak. A savtermelők aránya a levegő, víz, felületi mintáknál volt a legnagyobb. Izoláltunk szulfátredukáló baktériumokat, amelyek felelősek lehetnek a tároló fémanyagának direkt mikrobiológiai korróziójáért.
- 5. Meghatároztuk az izolált törzsek sugárérzékenységét. Extrém sugárrezisztens törzset nem találtunk, azonban a baktériumok sugárérzékenysége meglehetősen széles spektrumú, ami jelentős biodiverzitást mutat az adott környezetben.

65

6. Kísérleti rendszerben a kőzetből izolált baktériumok biofilm képzését mutattuk ki az aleurolit felszínén. A biofilmek is fontos szerepet játszhatnak a radionuklidok immobilizációjában, sőt sugárvédelmi problémát is okozhatnak.

Egy előrejelző modell felállításához szükséges lesz annak ismerete, hogy milyen beágyazó ill. "csomagolóanyagokat" fog a hazai ipar felhasználni.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

Vizsgálataink során meghatároztuk a Bodai Aleurit Formáció, mint számításba jöhető radioaktív hulladék lerakóhely környezetéből vett minták csíraszámát. A kutatóvágat különböző helyeiről származó minták közül a technikai vízminták mezofil aerob, ill. anaerob csíraszámai voltak a legnagyobbak ($10^5 - 10^6$ /cm³). A vízminták csíraszáma nagyon változatos képet mutatott, a mintavétel helyétől és a víz hőfokától függően: mezofil aerob összcsíraszám 0,3-1,2 x 10^{5} /cm³, mezofil anaerob összcsíraszám 0,3-3,9 x 10^{3} /cm³ termofil aerob összcsíraszám 0,3-1,1 x 10/cm³, termofil anaerob összcsíraszám 7,3 x 10⁰-4,6 x 10⁴/cm³. A csíraszám a hőfok mellett a vízminták redoxpotenciáljától is függött, -118 -233 mV esetén a mezofil aerob csíraszám csak 5-20/cm³, az anaerob csíraszám viszont 5,8-2,2 x 10⁴/cm³ volt. A Mecseki Ércbányászati Vállalat laboratóriumában vizsgált vízminták pH értéke átlagosan 8,3 körül volt. Sőt a kőzet-pórusvíz rendszer pufferkapacitása olyan jelentős, hogy még nagy koncentrációban adagolt vegyszerekkel sem lehetett tartósan módosítani a pH-t. A magas pH oka az, hogy a Formáció kialakulásakor száraz klíma, lepusztulási térszín, erősen oxidatív környezet, nagy alkália tartalmú víz volt a jellemző. Hasonlóan alakult ki Namíbiában az eocén Green River Formáció. Ez a tartomány főleg az alkalofil baktériumoknak kedvez. Különleges sajátsága az aleurolitnak a nagy albittartalom (15-45 %) (Melléklet 3. kép). A kőzetminták mezofil aerob és anaerob csíraszáma 10^2 - 10^5 /g között változott. A levegőminták aerob csíraszáma 3,5/cm², az anaerob csíraszám 0,9/cm² volt.

BALKWILL (1989) Dél-Karolinában üledékes kőzet fúrásmintáinak (0-550 m) rétegvizéből 10^3 - 10^5 /cm³ élő csíraszámot mutatott ki, amelyek között N₂-fixáló, nitrifikáló, kén-oxidáló, szulfátredukáló, metanogén baktériumok is voltak. OLSON és munkatársai (1981) dolomitos mészkő (USA) artézi fúrások vízmintáiban 10^3 baktérium/ cm³-t talált, szulfátredukáló és metanogén baktériumokkal. Kristályos gránitkőzetek fúrásmintáinak (129-1240 m) vizéből 10^3 - 10^6 összbaktérium/cm³-t, 50- 10^4 élő baktérium/cm³-t kaptak (PEDERSEN 1987;

PEDERSEN és EKENDAHL 1990; PEDERSEN et al. 1991). Összetételük: fakultatív anaerob, szulfátredukáló, metanogén baktériumok voltak. Franciaországban a párizsi medence rétegvízéből (1000-2000 m) 10²-10⁵ élő baktérium/cm³-t határoztak meg (DAUMAS et al. 1986). Heterotóf, szulfátredukáló és metanogén baktériumokat is izoláltak. Mi is hasonló nagyságrendű csíraszámokat kaptunk, ill. kemolitotróf autotróf kénhidrogéntermelő baktériumokat, nitrátredukáló és denitrifikáló baktériumokat tudtunk kimutatni. A szulfátredukáló baktériumok különösen érdekesek a hulladék tárolásánál, mivel az anaerob korróziós folyamatokban fontos szerepük van. Azonban a 67 minta közül csak négyben találtunk ilyen baktériumot (1 felületi, 2 fúrás és 1 technikai víz mintában).

Mintavételeink során a fúrások vízmintáiban nitrogént, hidrogént, héliumot, argont, szén-dioxidot, metánt és oxigént találtunk. Azokból a vízmintákból, amelyekből nitrogént mutattak ki az uránbánya laboratóriumában, mi is izoláltunk N₂-termelő, valószínűleg denitrifikáló baktériumokat. A N₂ mellett a legtöbb esetben NH₃ termelést is kimutattunk, amely folyamat a nitrátredukáló baktériumok működésének tudható be. Nitrátredukáló és denitrifikáló baktériumokat mind az aerob, mind az anaerob módon vett és kezelt vízmintákból izoláltunk. Ennek oka, hogy a fakultatív anaerob nitrátredukálóknak két csoportja van: 1.) Nitrátredukálók, amelyek aerob és anaerob viszonyok között is képesek nitrátredukcióra és ehhez hemet nem igényelnek. A citokrómrendszer metalloflavoproteineket tartalmaz. 2.) Nitrátredukálók, amelyek anaerob viszonyok között nitrátot redukálnak, de növekedésükhöz hemre vagy oxigénre van szükségük.

A vízből származó izolátumokból néhány H₂-termelőnek bizonyult. Metántermelő baktériumok jelenlétét valószínűleg azért nem tudtuk kimutatni, mert a vízminták szén-dioxid tartalma nem elégséges a metántermeléshez, ill. a vízminták redoxpotenciálja nem olyan alacsony (-330 mV), mint ami szükséges lenne a metántermeléshez. Szulfátredukáló, illetve szulfitredukáló H₂S-termelő baktériumokat a technikai vízből és kőzetből izoláltunk.

68

Ugyancsak a technikai vízből N_2 és a kőzetből H_2 termelő törzseket mutattunk ki. Széndioxid termelő izolátumok a technikai vízből, felületről és levegőből származtak. Az izolátumok gáztermelése különféle oxido-redukciós folyamatok során jöhet létre. Szén-dioxid keletkezhet mind az aerob, mind az anaerob légzés és erjedés során is. Kén-hidrogén a szulfátredukáló baktériumok, N_2 a denitrifikáló baktériumok anaerob légzése során keletkezhet. A H_2 anaerob erjedési folyamatok során képződhet.

A felszín alatti vizek gyakran nagy mennyiségben tartalmaznak oldott gázokat. Ezek a gázok a víz kémiai egyensúlyának megteremtésében vesznek részt, ezáltal hatással vannak a baktériumok aktivitására (PEDERSEN és EKENDAHL 1992). A víz kémiai összetétele, szervesanyagtartalma nagymértékben hat a kialakuló bakteriális folyamatokra. Különböző elektronakceptorok jelenléte vagy hiánya határozza meg a víz redoxpotenciálját. Amennyiben elegendő oxigént tartalmaz, aerob viszonyok uralkodnak. Oxigén hiányában, negatív redoxpotenciál esetén anaerob baktériumok jelenléte várható. A víz hőmérséklete 100 m-ként 3°C-kal nő, ezért 500-1000 m mélységben a hőmérséklet állandónak tekinthető és csak kis hatása van a baktériumok aktivitására. Ugyanez vonatkozik a nyomásra és a pH szerepére (MC CABE 1990).

Sziderofortermelő törzseket mutattunk ki legnagyobb részben a technikai vízből, majd ezt követi a kőzetből és vízmintákból izoláltak száma. Ezek az izolátumok rezisztensek voltak ólommal és krómmal szemben, és hatékonyan adszorbeálták a krómot. Irodalmi adatok alapján bár a szideroforok specifikusak Fe(III)-ra, komplexet tudnak képezni galliummal, krómmal, alumíniummal és más átmeneti fémet, aktinidákat is pl. Pu(IV), Th(IV)) megköthetnek (BULMAN 1978, NEILANDS 1981). Ezáltal fontos szerepet játszhatnak a radionuklidok immobilizációjában, és elősegítik a radionuklid sejtbe történő bejutását.

A fémmel szembeni rezisztencia gyakran a toxikus fém csökkent mértékű felvételével vagy teljes impermeabilitással járhat (BIANCHI et al. 1981). Célunk elsősorban toxikus

69

fémek bioszorpciójának, bioakkumulációjának vizsgálata volt, ezáltal modellezve a radionuklidok bioszorpcióját. A bioszorpció vizsgálata mellett tanulmányoztuk az izolált mikroorganizmusok néhány toxikus fémmel szembeni rezisztenciáját is. A kőzetben az agyagásványokhoz kapcsolódva As, V, Cr, Cd, Co, Zn, Ga, Rb, Cs különböző mennyiségei is előfordulnak. A króm mennyisége: 100-300 g/tonna, az ólom mennyisége: 8-44 g/tonna. Valószínűleg ez is hozzájárul ahhoz, hogy toxikus fémekkel szemben a törzsek nagyfokú rezisztenciát mutattak. A gátlási sorrend Cr<Pb<Cd, megegyezett *Pseudomonas* és *R. leguminosarum* törzseken kapott eredményekkel (VÁRADY 2003, BAYOUMI HAMUDA et al. 1996).

Vizsgálatainkban az aerob izolátumok 0,7-1,5; az anaerob izolátumok 0,03-3,6 (mg fém/mg szárazsúly) Cd-ot vettek fel. Sok baktérium képes nehézfémek és radionuklidok környezetből történő eltávolítására. A kötés független az anyagcserétől, ha a nehézfém a sejtfalhoz, extracelluláris polimerekhez vagy más, az élő vagy élettelen sejtben előforduló anyagokhoz kapcsolódik és a felvétel meglehetősen gyors. Az anyagcserétől függő, vagy intracelluláris felvétel vagy transzport csak élő sejtekben fordul elő. A sejt belsejében a fémionok speciális organellumokhoz kapcsolódnak és/vagy fehérjékhez kötődnek. Egy növekvő kultúrában a fémfelvétel anyagcserétől független vagy függő fázisaira a tápanyag összetétele is hat. Így egy adott mikrobiális rendszerben a felvétel különböző mechanizmusai egyszerre vagy egymás után jelentkezhetnek (GADD 1988). Irodalmi adatok szerint (GADD 1986, GADD és DE ROME 1988) ha a baktérium rezisztens egy toxikus fémre, sejtjei nem veszik fel vagy csak nagyon kis mennyiségben az adott fémet. Lehet olyan eset is, amikor a külső tényezők csökkentik a felvételt, de ez gyakran csökkent toxicitással is jár. Ellentétben, Mn²⁺ rezisztens S. cerevisiae törzsek több Mn²⁺-t akkumuláltak, mint a szenzitív szülői törzs (BIANCHI et al. 1981). A kadmiumfelvétel Citrobacter sp. esetén 13,5; E.coli esetén 0,16-0,98; Rhizopus arrhizus-nál 3,0; Saccharomyces cerevisiae-nél 0,24-3,12 (mg fém/mg szárazsúly) volt (MACASKIE et al. 1987, NAKAJIMA és SAKAGUCHI 1986, TOBIN et al.1984, GADD 1988). Azonban léteznek olyan baktériumok és gombák, amelyek szárazanyaguk 34-40 %-nak megfelelő fémet is meg tudnak kötni. WANG és munkatársai (1997) energiadiszperziós mikroanalízissel vizsgálták *Pseudomonas aeruginosa* törzsnél a kadmium sejtfalhoz történő kapcsolódását. Szerintük a kadmium kénnel 1:1 arányban CdS komplex formában a sejtfalhoz kapcsolódik. WHITE és GADD (1998) tanulmányozták egy szulfátredukáló baktérium biofilmképzését. A felvétel mechanizmusa: CdS-kicsapódás volt a biofilm felszínén, ill. a biofilm-mátrixba való beágyazódása. Vizsgálatainkban azonos nagyságrendű értékeket kaptunk, mint az előbb említett irodalmi adatok.

Megvizsgáltuk egy baktérium izolátum által felvett Cd és Cr deszorpcióját is. Esetünkben a deszorpciós szerek közül a Na-karbonát, a Na-citrát és az EDTA volt hatékony. Ez is arra utal, hogy a két vizsgált fém a baktérium sejtfalának lipopoliszacharidjaihoz vagy a külső membránfehérjékhez kapcsolódtak. Vízzel nem volt kimosható egyik fém sem, vagyis nemcsak lazán az extracelluláris poliszacharidokhoz kapcsolódott. COOKSEY és AZAD (1992) vizsgálatában a baktériumok külső membránkomponense által akkumulált Ca, Pb, Mn, Ni, Al nagy része EDTA-val kimosható volt.

Legalább a_w=0,6-0,7 vízaktivitás szükséges a baktériumok életműködéséhez, ha a vízaktivitás ez alá az érték alá csökken, a baktériumok csak spóra formájában képesek a túlélésre. A vizsgált mintákban az aerob és anaerob baktérium izolátumoknak több mint a fele spóraképző volt, ami nagyfokú ellenállást jelent az extrém környezeti viszonyokkal szemben. Sugárérzékenységet tekintve az aerob izolátumok D₁₀ -értéke: 0,8 - 2,44 , az anaeroboknál a legrezisztensebb törzs D₁₀ értéke: 4,93 kGy volt. A mi vizsgálatainkban a legrezisztensebb baktériumokat a fúrások víz mintáiból izoláltuk (1,86-4,93 kGy). Extrém sugár rezisztens baktériumot, mint pl. *Deinococcus radiophilus*, nem találtunk. A baktérium-spórák jóval rezisztensebbek voltak, mint a vegetatív sejtek. Az aerob és anaerob vegetatív

71

baktériumok között nem volt szignifikáns különbség, és a minimum és maximum értékek sem tértek el nagymértékben az átlagtól. Ez az eredmény egybeesik több szerző által kapott adatokkal (URBAIN 1986, JAY 1992, STROES-GASCOYNE és WEST 1996). A vegetatív sejtek tizedelő dózisa általában egy nagyságrenddel kisebb, mint a spóráké (GAZSÓ 1997). A D₁₀ -érték különböző faktoroktól függhet (GRECZ et al. 1983): a citoplazma víztartalmától, a vizsgált mikroorganizmus kromoszómájának DNS méretétől, a kromoszómális DNS struktúrájától, a genom anyag multiplicitásától. Sőt, attól is függ a sejtválasz, hogy a baktérium a szaporodási ciklus melyik szakaszában van (ALPER 1980). A környezeti körülmények (oxigén, víztartalom, kémiai sugárvédő és sugárérzékenyítő vegyületek, hőmérséklet) is nagy hatással lehetnek a sugárérzékenységre (GAZSÓ et al. 2002). Általában a Gram-negatív baktériumok érzékenyebbek a besugárzással szemben, mint a Grampozitívok (ANNELIS et al. 1973, BOTHA és HOLZAPFEL 1988, HASHISAKA et al. 1990). A besugárzás alatti hőmérsékletnek is szerepe van. Ugyanis protektív hatása van a hőmérséklet csökkenésének, mivel csökkenti a szabadgyökök mobilitását (ANNELIS et al. 1973, HASHISAKA et al. 1990). GERWEN és munkatársai (1999) 539 D₁₀- értéket hasonlított össze. A spórás baktériumok átlaga: 2,48 kGy, a vegetatív baktériumoké 0,762 kGy volt. Vizsgálatukban a legrezisztensebb spóra a Bacillus stearotermophilus és Clostridium sporogenes spóra volt.

Amerikai kutatók kísérletükben a Yucca Hegységből vett őrölt vulkáni tufa mintát- ami az eredeti mikroflórát tartalmazta- polisztirén hengerekbe töltötték és besugarazták γ sugárzással, 1,63 Gy/perc dózisteljesítménnyel 96 órán át, modellezve a sugárzás hatását a hulladéktároló közvetlen környékére. Mintát vettek 0; 0,098; 0,58; 2,33; 4,67; 7,01 és 9,34 kGy kapott dózis után. Azt tapasztalták, hogy 2,33 kGy hatására a baktériumok életben maradtak, de nem voltak tenyészthető állapotban. Ezután a mintákat 2 hónapig 4°C- on tárolták, majd megvizsgálták a csíraszámát. A nem besugarazott 26 izolátum száma 10-re

72
csökkent, de újra tenyészthető volt (PITONZO et al. 1999). Az eredeti mikroflóra tehát hosszú ideig tartó sugárzást is képes túlélni, és a körülmények kedvezőbbé válásával újra aktívvá válni.

A nagy aktivitású hulladéktároló üzembe helyezése után a sugárzás és a hő elpusztítja a közvetlen környezetben a baktériumokat, de lehetnek olyan helyek, ahol kisebb az aktivitás. Ezeken a helyeken genetikai mutáció hatására rezisztensebbé válhatnak a baktériumok. Vizsgálataink során kapott sugárrezisztenciai adatok azért is fontosak, mert összehasonlításként szolgálhatnak más élőhelyek, ill. sugárforrások környezetéből izolált törzsek rezisztencia adataihoz. A radioaktív sugárzással szemben rezisztens baktériumok jól alkalmazhatóak a radionukliddal kontaminált talajok remediációjában és a nukleáris ipar különböző területein (bioszorpció, bioprecipitáció, bioszenzorok).

A baktériumok könnyen kitapadhatnak azokra a szilárd felületekre, amelyek talajvízzel állnak kapcsolatban és jobb tápanyag- és energiaforrást biztosítanak, mint maga a víz. Ez a folyamat reverzibilis. Ha azonban a baktériumok extracelluláris polimereket termelnek, így a tapadás irreverzibilis lesz, elszaporodnak és biofilmet képeznek. Minthogy a mikrobák és az extracelluláris polimerek a radionuklidokat meg tudják kötni, a biofilmek addig rögzítik a radionuklidokat, míg a biofilm egyensúlyát meg nem zavarja a tápanyagok változása (STROES-GASCOYNE és WEST 1994).

Laboratóriumi körülmények között mi is ki tudtunk mutatni biofilmképződést aleurolit felszínén, ugyanebből a kőzetből származó izolátummal. Következő lépése a munkánknak a biofilm által felvett fémek szorpciójának tanulmányozása, ill. a biofilm forma sugárérzékenységének tanulmányozása. Utóbbi vizsgálatokat már elkezdtük.

Összefoglalva megállapítható, hogy vizsgálataink során sikerült kimutatni mindazon mikrobiológiai folyamatokat, amelyek a mechanikai, fizikai, kémiai, geológiai tényezők mellett befolyásolhatják a nukleáris hulladéktároló hosszútávú biztonságos üzemeltetését. Ez

magába foglalja azokat a tényezőket, amelyek megváltoztatják az eredeti környezeti feltételeket. Erre utalnak azoknak a törzseknek a jelenléte, ahol gáztermelést (CO_2 , H_2 , N_2) és savtermelést tapasztaltunk. Hasonlóan sikerült viszonylag nagy számban kimutatni olyan mikrobákat, amelyek képesek befolyásolni a radionuklidok mobilitását (sziderofortermelők, bioszorpció, bioakkumuláció). Ugyancsak számolni kell azokkal a tényezőkkel, amelyek felelősek lehetnek a direkt mikrobiológiai korrózióért (H_2 S- és savtermelő, valamint szulfátredukáló mikroorganizmusok).

A Bodai Aleurolit tanulmányozásakor kimutatták, hogy az aleurolit és a homokkő, vagyis az eltérő jellegű földtani képződmények egymástól elkülönülő vízrendszerrel rendelkeznek. Az aleurolitban makroszkóposan megfigyelhető repedések uralkodóan zártak, vízmozgás csak 1-2 jól lokalizálható törésre korlátozódik, amelyek 10⁻⁹-10⁻¹⁰ m/s, míg a zavartalan ép kőzettest 10⁻¹⁰-10⁻¹¹ m/s nagyságrendű szivárgási tényezővel jellemezhető. Kétdimenziós modell felállításával vizsgálták, hogy egy esetleges szennyeződés esetén milyen terjedési sebességgel ill. bioszférába jutási időigénnyel lehet számolni. Például a bányától 500 m-re egy esetleges kontamináció hatása csak közel 100 ezer év elteltével jelenkezhet a bányaüregekben, ill. az onnan kijutó víz révén a bioszférában (Melléklet 1. ábra) (FÖLDING et al. 1999).Ez a modell azonban különböző módosító tényezőket, így a mikrobák hatását nem tartalmazza.

A nagy aktivitású radioaktív hulladékok mellett a kis és közepes aktivitású hulladékok tárolásának, illetve mikrobiológiai vizsgálatának problémája is megoldásra vár hazánkban (ORMAI et al. 2002, BÉRCZY et al. 2002, REZESSY and BÉRCZY 2002). Ezekben az esetekben magának a hulladékanyagnak, valamint a beágyazó anyagok (cement, bitumen) és fémkonténerek (vas) biodegradációját is tanulmányozni kell.

Olyan fontos kérdéseket is tanulmányozni kell, hogy a jelenlévő mikroflóra hogyan tudja megtámadni vagy felhasználni azokat a beágyazó vagy "csomagolóanyagokat" amelyek

elhelyezésre kerülnek. Ugyancsak a hosszútávú mikro-biálisan indukált korrózió, a MIC (Microbial Induced Corrosion) becsléséhez feltétlenül szükséges felmérni a rendelkezésre álló tápanyagforrások mennyiségét és minőségét (C, N, S, P) ahhoz, hogy támpontot adjon annak kiszámításához, hogy egyetlen mikroorganizmus felépítéséhez ($C_{160}H_{280}O_{80}N_{30}P_2S$) milyen lehetőségek állnak rendelkezésre.

Fentiekből következik, hogy egy megbízható komplex modell elkészítéséhez, hasonlóan a nyugati tapasztalatokhoz, hosszútávú kutatásokra van szükség. Reméljük, hogy a hazai energiaipar és környezetvédelem felismeri a mikrobiális korrózió jelentőségét és fontosságát és további anyagi forrásokat biztosít a munka folytatására, ill. egy modell elkészítéséhez.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A fejlett nukleáris iparral rendelkező országokban (Kanada, Finnország, Franciaország, Nagy Britannia, Japán, Spanyolország, Svédország és USA) széleskörű kutatási programokat indítottak el, hogy tisztázzák a radioaktív hulladéktárolók tervezésénél a fizikai, kémiai és mikrobiológiai folyamatok jelentőségét. Magyarországon a radioaktív hulladék nagy része a Paksi Atomerőműből származik. Hazánkban a kiégett fűtőelemek átmeneti tárolása az atomerőmű területén történik. Nagy aktivitású nukleáris lerakóhely létesítése céljából 3 terület előzetes vizsgálata kezdődött meg 1994-ben. Nagy aktivitású hulladék lerakóhelyként a Nyugat-Mecsekben található 150 km² területű Bodai Aleurolit Formáció, vagyis permi agyagkő jöhetne számításba. A Mecseki Ércbányászati Vállalat és a Mecsekurán Rt. javaslatára történt a Bodai Aleurolit vizsgálata. A tömör vízzáró kőzet 1100 m mélységben van, a kőzet vastagsága 700-900 m. A mecseki uránbánya egy permi homokkő képződményben található, közel a Bodai Aleurolit Formációhoz. Az uránbányászat 40 éve alatt sok tapasztalat és ismeret gyűlt össze a terület vízrajzáról és a kőzetek szerkezetéről. A bánya vezetősége kísérleti vágatok hajtásával tette lehetővé az agyagkő vizsgálatát, ugyanis korábban a permi agyagkövet a bánya nem érintette.

A Bodai Aleurolit Formáció vizsgálatába 1997-ben kapcsolódtunk be. Három alkalommal végeztünk vizsgálatokat ill. gyűjtöttünk mintákat mikrobiológiai vizsgálatokhoz. Célkitűzéseink a következőek voltak:

- A helyi mikrobiota összetételének meghatározása, a leendő lerakóhely megépítése előtti alapállapot felmérése.
- Baktériumtörzsek izolálása, az izolátumok sugárérzékenységének vizsgálata.
- A meghatározó mikrobiológiai folyamatok vizsgálata.

A helyi mikrobiota befolyása a nukleáris hulladéktároló hosszútávú megbízhatóságára.

Mintákat vettünk a talajvízből mintavevők segítségével, a levegőből, az aleurolit kőzet felszínéről, a kőzetből, és az úgynevezett technikai vízből. Minden mintának meghatároztuk az aerob és anaerob mezofil és termofil összcsíraszámát. Izoláltunk háromszáz baktérium törzset a különböző mintákból. Megvizsgáltuk az izolátumok spóraképzését, gáztermelését, szervessav termelését, néhány toxikus fémmel (Cd, Cr, Pb) szembeni rezisztenciáját és bioszorpcióját valamint sugárérzékenységét. Tanulmányoztuk biofilm kialakulását aleurolit felszínén in vitro.

A mikrobiológiai vizsgálatok eredményeként a levegő, víz, technikai víz, kőzet és felületi minták mezofil csíraszámai a következők voltak: a levegőminták átlagos aerob csíraszáma 3,5/cm², az anaerob csíraszám 0,9/cm². A vízminták csíraszáma 0,39-1,2 x 10^5 /cm³ (aerob) ill. 0,36- 3,9 x 10^3 /cm³ (anaerob) volt a mintavétel helyétől és a víz hőfokától és redoxpotenciáljától függően. A technikai vízmintáknál mind az aerob és anaerob csíraszám 10^5 - 10^6 /cm³ nagyságrendű volt. Kőzetmintáknál az aerob csíraszám 10^2 - 10^5 /g ill. az anaerob csíraszám 10^1 - 10^3 /g volt. A fúrások vízmintáiban a termofil aerob baktériumok száma 0-2,4 x 10^2 /cm³, a termofil anaerob baktériumok száma 0,43-4,6 x 10^4 /cm³ volt.

A vízmintákból izolált anaerob törzseknél N₂ (2,2%), és NH₃ (6%) valamint H₂ (2,2%) termelést mutattunk ki. A vízmintákból izolált aerob törzseknél is tapasztaltunk N₂ (2,4%) és NH₃ (3,6%) termelést. A technikai vízből izolált törzseknél N₂ (1,5%) termelést mutattunk ki. Az anaerob, CO₂ termelő törzsek közül 3 (2,2%) származott technikai vízből. A felületi mintákból származó 2 aerob és 3 anaerob izolátum mutatott intenzív CO₂-termelést (a törzsek 1 ill. 2,2%-a). A kőzetmintákból származó 3 anaerob izolátum termelt H₂-t (2,2%). A levegőből származó anaerob izolátumok közül 2 (1,5%) termelt CO₂-ot. Metántermelést nem sikerült kimutatnunk.

A savtermelők aránya a levegőmintáknál volt a legnagyobb, 63% ill. 54% (aerob ill. anaerob), a legkisebb a kőzetmintáknál (13 ill. 14%). Kvantitatív vizsgálat során az izolátumok által termelt citromsavat (0,04-9,2 mg/l), ecetsavat (0,11-25,5 mg/l), oxálsavat (0,7-39,9 mg/l) mutattunk ki.

Az aerob izolátumok kb. 20%-a bizonyult sziderofor termelőnek. Az anaerob törzsek sziderofor termelést nem mutattak.

Spóraképzőnek bizonyult az aerob törzsek 50,6%-a, az anaerob törzsek 59,4%-a.

A vegetatív baktériumok sugárérzékenységét tekintve az aerob izolátumok tizedelődózis (D_{10}) értékei: 0,11-0,57 kGy, az anaerob izolátumoké: 0,22- 0,40 kGy volt. Az aerob spórásoké: 0,80-2,44 kGy közt változott, és a legrezisztensebbek az anaerob spórás baktériumok voltak, 1,86-4,93 kGy értékekkel.

Az aerob törzseknél 650 mg/l (12,5 mM) Cr jelenlétében a törzsek 5,8%-a még képes volt szaporodásra, Pb esetén 400 mg/l (1,92 mM) mellett az izolátumok 93,7%-a még szaporodott. Az anaerob törzseknél 200 mg/l (3,85 mM) krómmal szemben rezisztens volt a törzsek 86,1%-a, 200 mg/l (0,96 mM) ólommal szemben rezisztens volt 81,6%. 200 mg/l (1,77 mM) kadmiummal szemben rezisztenciát mutatott a törzsek 73,5%-a. A fémmel szembeni rezisztencia indukálhatóságát a V 4/5 izolátummal mutattuk be.

Az izolátumok bioszorpcióját/bioakkumulációját vizsgálva azt kaptuk, hogy Cr esetén a fémfelvétel az aerob ill. anaerob izolátumoknál 0,55-1,87 ill. 0,23-2,37 (felvett fém mg /biomassza mg) között változott, Cd-nál 0,70-1,45 ill. 0,03-3,62 (felvett fém mg/biomassza mg) volt. A törzsek egy részénél a Cd, másoknál a Cr bioszorpció volt nagyobb.

Vizsgálataink során adatokat kaptunk a terület baktériumközösségeinek összetételére. Meghatároztuk az aerob és anaerob, spóraképző és spórát nem képző, sziderofortermelő, gázképző törzsek arányát.

A szulfátredukáló baktériumok különösen érdekesek a hulladék tárolásánál, mivel az anaerob korróziós folyamatokban fontos szerepük van. A 67 minta közül négy mintában találtunk szulfátredukáló baktériumot (1 felületi, 2 fúrás és1 technikai víz mintában 10^2 - 10^3 /cm³).

A kutatóvágat különböző helyeiről származó minták közül a technikai vízminták anaerob csíraszámai voltak a legnagyobbak $(10^5 - 10^6/\text{cm}^3)$, sőt aerob ill. enterobaktériumokat is sikerült kimutatnunk, amely egyértelműen "behurcolást" bizonyít. A fúrások rétegvíz-mintáiban a termofil anaerobok csíraszáma volt a legnagyobb $(10^4/\text{cm}^3)$. A vizsgált mintákban az aerob és anaerob baktérium izolátumoknak több mint a fele spóraképző volt, ami nagyfokú rezisztenciát jelent a környezeti viszonyok változásával szemben. Sugárérzékenységet tekintve az aerob izolátumok D10 értéke: 0,8-2,44, az anaeroboknál a legrezisztensebb törzs D10 értéke: 4,93 kGy volt. Azonban extrém sugárrezisztens baktériumot, mint pl. Deinococcus radiophilus, nem találtunk. A vegetatív baktériumok közül nem volt szignifikáns különbség az aerob és anaerob izolátumok között de a minimum és maximum értékek sem tértek el nagymértékben az átlagtól. A mi vizsgálatainkban a legrezisztensebb baktériumokat a fúrások víz mintáiból izoláltuk (1,86-4,93 kGy). Az ionizáló sugárzással szemben rezisztens baktériumok kimutatása illetve izolálása azért is fontos, mert ezek a baktériumok alkalmasak lehetnek radionukliddal kontaminált talajok remediációjában és a nukleáris ipar különböző területein is szerepet játszhatnak (bioszorpció, bioprecipitáció, bioszenzorok) (BRIM et al. 2003).

A CO₂-ot, N₂, H₂S ill. H₂-t termelő törzseket ill. a sziderofortermelőket, valamint a savtermelő törzsek nagy arányát feltétlenül figyelembe kell venni a mikrobiális korrózió kialakulásánál.

A talajvízzel érintkező kőzetek felszínén a baktériumok biofilm formájában koncentrálódhatnak, mivel azok jobb tápanyag és energiaforrást biztosítanak, mint maga a

víz. Laboratóriumi körülmények között mi is ki tudtunk mutatni biofilm képződést aleurolit felszínén, ugyanebből a kőzetből származó izolátummal. Következő lépése a munkánknak a biofilm által felvett fémek szorpciójának tanulmányozása ill. a biofilm forma sugárérzé-kenységének tanulmányozása. Utóbbi vizsgálatokat már elkezdtük.

Összefoglalva megállapítható, hogy vizsgálataink során sikerült kimutatni mindazon mikrobiológiai folyamatokat, amelyek a mechanikai, fizikai, kémiai, geológiai tényezők mellett befolyásolhatják a nukleáris hulladéktároló hosszútávú biztonságos üzemeltetését. Ez magába foglalja azokat a tényezőket, amelyek megváltoztatják az eredeti környezeti feltételeket. Erre utalnak azoknak a törzseknek a jelenléte, ahol gáztermelést (CO₂, H₂, N₂) és savtermelést tapasztaltunk. Hasonlóan sikerült viszonylag nagy számban kimutatni olyan mikrobákat, amelyek képesek befolyásolni a radionuklidok mobilitását (sziderofortermelők, bioszorpció, bioakkumuláció). Ugyancsak számolni kell azokkal a tényezőkkel, amelyek felelősek lehetnek a direkt mikrobiológiai korrózióért (szulfátredukáló mikroorganizmusok, H₂S termelés).

Olyan fontos kérdéseket is tanulmányoznunk kell a jövőben, hogy a jelenlévő mikroflóra hogyan tudja megtámadni vagy felhasználni azokat a beágyazó vagy "csomagolóanyagokat" amelyek elhelyezésre kerülnek. Ugyancsak a hosszútávú MIC (Microbial Induced Corrosion) becsléséhez feltétlenül szükséges felmérni a rendelkezésre álló tápanyagforrások mennyiségét és minőségét (C, N, S, P) ahhoz, hogy támpontot adjon annak kiszámításához, hogy egyetlen mikroorganizmus felépítéséhez (C₁₆₀H₂₈₀O₈₀N₃₀P₂S) milyen lehetőségek állnak rendelkezésre.

Ez azt jelenti, hogy egy megbízható komplex modell elkészítéséhez, hasonlóan a nyugati tapasztalatokhoz, hosszútávú kutatásokra van szükség. Reméljük, hogy a hazai energiaipar és környezetvédelem felismeri a mikrobiális korrózió jelentőségét és fontosságát és további anyagi forrásokat biztosít a munka folytatására ill., egy modell elkészítéséhez.

7. SUMMARY

Large national and international research programs are currently under way in Canada, Finland, France, Great Britain, Japan, Spain, Sweden and the USA, in which different questions concerning the safety of future underground repositories for nuclear waste are being studied. In Hungary, the amount of radioactive waste produced has been increasing since the four units of the Paks Nuclear Power Plant started operations. On the basis of preliminary assessments and technical considerations, the Permian Boda Siltstone Formation in the Mecsek Hills area is undergoing evaluation for use as a high-level waste disposal site. Investigations of the suitability of this formation as a location for a waste repository, started in 1994 with the technical assistance of Atomic Energy of Canada Ltd.. The uranium mine is located in the Permian Sandstone Formation close to the Boda Siltstone Formation. The existence of an access tunnel from the Mecsekuran Ltd. uranium mine into the Boda Siltstone Formation at a depth of 1100 m provides an opportunity to characterize some potentially important vertical tectonic structures that could act as groundwater pathways through the siltstone. The Upper Permian Siltstone Formation covers an area of 150 km² and ranges in thickness from 700 to 900 m. At present, this formation is being evallated at one site which is accessible from a uranium mine. The evaluations include geological surveying and hydrogeological, geotechnological and geophysical studies.

The goal of our microbiology program was to investigate this subterranean environment:

- Study of the diversity and distribution of the bacteria in the environment of the planned repository.
- Isolation of bacterial strains and evaluation of the radiosensitivity of the microorganisms.
- Predictions of possible microbial processes.

- Determination of the importance of the microbial effects on the safety of the waste repository.

Samples from the preferred site were taken via the access tunnel from the air, groundwater, aleurolite stones and surfaces. The numbers of viable mesophilic aerobic and anaerobic, and thermophilic aerobic and anaerobic bacteria were investigated. After incubation, all well-separated colony types (based on their morphological appearance) were isolated. The spore-forming capability, gas production, organic acid production, toxic metal resistances (Cd ²⁺, Cr³⁺ and Pb²⁺), biosorption and radiation sensitivity of the isolates were investigated. Biofilm development on the aleurolite was followed by means of atomic force microscopy.

The average mesophilic colony-forming units of the air samples were $3.5/\text{cm}^2$ (aerobic) and $0.9/\text{cm}^2$ (anaerobic). Those of the water samples were $0.39 \cdot 1.2 \times 10^5/\text{cm}^3$ (aerobic) and $0.36 \cdot 3.9 \times 10^3/\text{cm}^3$ (anaerobic). The number of aerobic thermophilic bacteria was $0.2.4 \times 10^2/\text{cm}^3$, while that of anaerobic thermophilic bacteria was $0.43 \cdot 4.6 \times 10^4/\text{cm}^3$. Those of the technical water samples were $10^5 \cdot 10^6/\text{cm}^3$ (both aerobic and anaerobic). Those of the aleurolite samples were $10^2 \cdot 10^5/\text{g}$ (aerobic) and $10^1 \cdot 10^3/\text{g}$ (anaerobic).

2.2% of the anaerobic isolates from the groundwater samples proved to produce N_2 , 6% of the aerobic isolates from the groundwater samples produced NH₃, and 2.2% produced H₂. 2.4% the of aerobic isolates from the groundwater samples produced N₂, and 3.6% produced NH₃. 1.5% of the anaerobic isolates from the technical water produced N₂, and 2.2% produced CO₂. 2 (aerobic) and 3 (anaerobic) isolates from the surface samples produced CO₂, i.e.1% and 2.2%, respectively. 3 anaerobic isolates (2.2%) from the aleurolite samples produced H₂. 2 anaerobic isolates (1.5%) from the air samples produced CO₂. CH₄ was not to found to be produced by in the samples.

Our results demonstrated that 63 % of the aerobic and 54% of the anaerobic isolates of the air samples had the ability to produce acid. Futhermore, quantitative investigation revealed that

citric acid was produced in 0.04-9.2 mg/l, acetic acid in 0.11-25.5 mg/l, and oxalic acid and in 0.7-39.9 mg/l.

Almost 20% of the aerobic isolates displayed siderophore activity; and the anaerobic isolates did not exhibit any production signal.

Altogether 50.6% of the aerobic isolates and 59.4% of the anaerobic isolates were sporeformers. The radiosensitivity of the aerobic and anaerobic isolates was also determined: the D_{10} values of the aerobic spore-formers lay in the range 0.8-2.44 kGy, and those of the anaerobic spore-formers in the range 1.86-4.93 kGy. The D_{10} values of the aerobic and anaerobic vegetative isolates were much lower, in the ranges 0.11-0.57 and 0.22-0.40 kGy, respectively.

5.8% of the aerobic isolates were resistant to 650 mg/l (12.5 mM) Cr^{3+} . 93.7% of the aerobic isolates were resistant to 400 mg/l (1.93 mM) Pb²⁺. 86.1% of the anaerobic isolates were resistant to 200 mg/l Cr^{3+} (3.84 mM). 81.6% of the anaerobic isolates were resistant to 200 mg/l (0.96 mM) Pb²⁺ and 73.5% of the anaerobic isolates were resistant to 200 mg/l (1.77 mM) Cd^{2+} .

The biosorption of Cd^{2+} and Cr^{3+} by the isolates was also studied. The uptakes of Cr^{3+} ions from the model solutions by the aerobic and anaerobic isolates were 0.55-1.87 and 0.23-2.37 mg metal ion/mg biomass. The uptakes of Cd^{2+} ions from the model solution by aerobic and anaerobic isolates were 0.70-1.45 and 0.03-3.62 mg metalion/mg biomass, respectively.

This was the first microbiological study of the Boda Aleurolite Formation as a potential nuclear waste repository. Information was obtained concerning the diversity and distribution of the bacteria. Aerobic, anaerobic, spore-former, non-spore-former, siderophore- producing and gas-producing bacteria were studied. Sulfate-reducing bacteria are of particular interest in waste disposal because they are important in anaerobic corrosion processes; and their activity can change the geochemical environment Their tolerance to repository conditions has been

established. This was found in only in 4 of 67 samples $(10^2 - 10^3/\text{cm}^3)$. The thermophilic anaerobic counts in the groundwater samples were the highest: $10^4/\text{cm}^3$.

The proportion of spore-forming isolates was 50.6% among the aerobic bacteria and 59.4% among the anaerobic bacteria. The D_{10} values of the aerobic spores lay in the range 0.8-2.44 kGy, and those of the anaerobic spores in the range 1.86-4.93 kGy, but extremely resistant bacteria (e.g *Deinococcus radiophilus*) were not found. The D_{10} values of the vegetative aerobic and anaerobic isolates were much lower: 0.11-0.57 kGy and 0.22-0.40 kGy, respectively. These results are in the same range as the D_{10} values cited in the literature for many species of microorganisms. Among the vegetative bacteria, there were no significant differences in radioresistance between the aerobic and the anaerobic isolates, and the minimum and maximum values of D_{10} did not deviate much from the average. It is also consistent with the results of other microbiological studies that the anaerobic spores are more resistant than the aerobic ones, and that the differences between the D_{10} values in both of the spore-forming groups are higher than those for the vegetative cells.

The most resistant bacteria were isolated from the groundwater. Radioresistant bacteria have a number of other applications which are of interest to the nuclear industry (biosorption, bioprecipitation and biosensors) and in the treatment of radionuclide-contaminated soils.

The gases produced by the gas-forming isolates were CO_2 and H_2 (anaerobic isolates). The gas-forming isolates, and the organic acid and siderophore producers may contribute to microbial corrosion. Biofilm formation by the bacteria isolated from the aleurolite was studied on the surface of the stone. Biofilms too can be responsible for the immobilization of radionuclides.

The goal of this work was to investigate this subterranean environment and to determine the importance of the microbial effects as compared with the geological, physical and chemical processes. Some of the most likely processes for the release of radionuclides from a

repository into the biosphere involve transport via flowing groundwater. Microorganisms can influence this release in a number of ways: changing the chemical conditions in and around the repository, gas production (CO₂ and H₂), acid production, siderophore production, biosorption and bioaccumulation. Sulfate- reducing bacteria are of particular interest in waste disposal because they are important in anaerobic corrosion processes. For an active microbial population to develop, sources of carbon, nitrogen, phosphorus, sulphur and energy are essential, plus certain trace elements. For this reason, the modelling approach adopted focuses upon the availability of the key nutrients (C, N, P and S) and energy within the repository environment in order to determine the composition of the organisms and the maximum biomass production ($C_{160}H_{280}O_{80}N_{30}P_2S$).

Although much has been achieved in this period of research there still remains much work to be done in connection with this complex model.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetettel tartozom mindazoknak, akik lehetővé tették számomra, hogy a dolgozat alapját képező kutatásokat elvégezhessem.

Köszönetemet fejezem ki dr. Köteles György professzor úrnak az OKK-Országos "Frédéric Joliot-Curie" Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató Intézet igazgató-főorvosának, hogy lehetőséget nyújtott az Intézetben a kísérletek elvégzésére.

Hálás köszönetemet fejezem ki dr. Gazsó Lajos tudományos igazgatóhelyettesnek, a Környezeti Sugárbiológiai Osztály vezetőjének munkám közvetlen irányításáért, hasznos tanácsaiért és a szakmai segítségen túl mutató emberségéért, megértéséért és türelméért.

Hálával tartozom dr. Kecskés Mihály professzor úrnak, aki PhD. tanulmányaim során végig nyomonkövette tevékenységemet és rendkívül segítőkész volt. Nagyon köszönöm dr. Hosam Bayoumi Hamuda segítségét, hasznos tanácsait.

Szeretnék köszönetet mondani dr. Menyhért Zoltán egyetemi tanárnak, a Szent István Egyetem Környezettudományi Doktori Iskola vezetőjének, amiért fokozatszerzésemet támogatta.

Szeretném megköszönni valamennyi munkatársamnak, hogy a kísérletek elvégzésében tapasztalataikkal és hozzáértésükkel segítségemre voltak: Halmágyi Szabolcsnénak, Kissné Jónyer Erikának, Nágl Józsefnének, Salabert Jánosnénak, Tóth Lászlónénak, Kövendiné Kónyi Júliának. Külön köszönet dr. Telegdi Juditnak az atomerőmikroszkópos képekért, Bokori Editnek az atomabszorpciós mérésekért, Diósi Gábornak, a cikkek elkészítésében és a dolgozat szerkesztésében nyújtott segítségéért, valamint Csicsák József geológusnak hogy a BAF-ról készült térképeket, ábrákat és fotókat rendelkezésemre bocsátotta.

Végül köszönettel tartozom dr. Oros Gyulának és dr. Naár Zoltánnak a dolgozat bírálatáért, a hiányosságok feltárásáért, a javaslatokért, amelyekkel a dolgozat színvonalának emeléséhez hozzájárultak.

9. IRODALOMJEGYZÉK

AARKROG, A. (2001): Manmade radioactivity.In: Radioecology, radioactivity & ecosystems. Van der Stricht, E. and Kirchmann (eds.) Liege, Belgium. pp. 55-78.

ALPER, T. and Gillies, N. E. (1960): Restoration of *Escherichia coli* strain B after irradiation its dependence on suboptimal growth condition. *J. Gen. Microb.*, 18: 461-472.

ALPER, T. (1980): *Cellular radiobiology*, Cambridge: Cambridge University Press. pp. 146-148.

ANELLIS, A., Berkowitz, D., and Kemper, D. (1973): Comparative resistance of nonsporogenic bacteria to low –temperature gamma irradiation. *Appl. Microbiol.*, 25: 517-523.

ANONYMOUS (1983): Final storage of spent nuclear fuel. Parts I-IV. Swedish Nuclear Fuel Supply Co/Division KBS-3. In: Motamedi M. (1999): The survival and activity of bacteria in compacted bentonite clay in conditions relevant to high level radioactive waste (HLW) repositories, PhD thesis, Department of Cell and Molecular Biology Microbiology, Göteborg University, Sweden.6-8.

BACHOFEN, R.(1990): Microorganisms in nuclear waste disposal. *Experientia*, 46: 777-779. BACHOFEN R., Dubach A. C., Tesch, A.W. and Luescher, D. (1984): Literaturstudie über den Abbau von Bitumen durch Mikroorganismen. NAGRA, Baden, Switzerland. Tech. Rep. 18-83.

BACHOFEN R., Ferloni P., and Flynn I. (1998): Microorganisms in the subsurface. *Microbiol. Res.*, 153: 1-22.

BALKWILL, D. L. (1989): Numbers, diversity, and morphological characteristics of aerobic, chemoheterotrophic bacteria in deep subsurface sediments from a site in South Carolina. *Geomicrobiol.J.*, 7: 33-52.

BAYOUMI HAMUDA, H.E.A.F., Kucsma N., Várady, Gy., Kiss Z. és Kecskés M. (1996): Nehézfémek és kombinációik hatása különböző *Rhizobium leguminosarum* törzsek szaporodására. *Agrokém. és Talajt.* 45:153-168.

BEVERIDGE, T.J., and Murray, R. G. E. (1977): Uptake and retention of metals by cell walls of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol., 127: 1502-1518.

BEVERIDGE, T.J., Makin, S.A., Kadurugamuwa, J.L., and Li, Z. (1997): Interactions between biofilms and the environment. *FEMS Microbiol. Rev.*, 20: 291-303.

BÉRCI, K., Ormai P. and Hauszmann, Z. (2002): Safety assessment for centralized waste treatment and disposal facility in Püspökszilágy, Hungary. In: International conference on issues and trends in radioactive waste management. Vienna, Austria, 9-13 December 2002. pp. 66-71.

BIRCH, L., and Bachofen, R. (1990): Complexing agents from microorganisms. *Experimentia*, 46: 827-834.

BIRCH, L. and Bachofen, R.(1990): Effects of microorganizms on the environmental mobility of radionuclides. *Soil Biochem.*, 6: 483-527.

BIANCHI, M.E., Carrbonne, M.L. and Lucchini, G. (1981): Mn²⁺ and Mg²⁺ uptake in Mn-sensitive and Mn-resistant yeast strains. *Plant. Sci. Lett.*, 22: 345-352.

BJORNDALEN, N.(2003): A novel technique for prevention of microbial corrosion. Energ. Sources 25 (10): 945-955.

BLOOMFIELD, C., and Pruden, G. (1975): The effect of aerobic and anaerobic incubation on the extrabilities of heavy metals in digested sewage sludge. *Envir. Pollut.*, 8: 217-232.

BOTHA, S. J. and Holzapfel, W. H. (1988): Resistance of vegetative cells and endospores of *Sporolactobacillus* to gamma-irradiation. *Int. J. Food Microbiol.*, 7: 169-172.

BLARY, C. and Averous, J. (2002): Historical radioactive waste in France: situation and lessons learnt. In: International conference on issues and trends in radioactive waste management. Vienna, Austria, 9-13 December 2002., pp. 249-253.

BÖCKELMANN, U., Szewzyk, U. and Grohmann, E. (2003): A new enzymatic method for the detachment of particle associated soil bacteria. *J. Microbiol. Met.*, 55: 201-211.

BRIM, H., Venkateswaran, A., Kostandarithes, H. M., Fredrickson J. K. and Daily, M. J. (2003): Engineering *Deinococcus geothermalis* for bioremediation of high-temperature radioactive waste environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (8): 4575-4582.

BROWN, D. A., and Hamon, C. J. (1994): Initial investigation of groundwater microbiology at AECL's underground research laboratory. Atomic Energy of Canada Limited, Chalk River, Ont. Tech. Rec. TR-608 and COG-93-171.

BULMAN, R. A., (1978): Chemistry of plutonium and the transuranics in the biosphere. *Struct. and Bond.*, Berlin, 34: 39-77.

CHRISTENSEN H., and Bjergbakke E.(1982): *SKB Technical Report* 82-02. Stockholm: Swedish Nuclear Fuel and Waste Managament Co.

CHRISTOFI N., and Philip J. C.(1997): European microbiology related to the subsurface disposal of nuclear waste. In: *The Microbiology of the Terrestrial deep subsurface*. Amy P. S., Haldeman D.L. (eds.) Boca Raton: Lewis Publishers pp. 267-297.

CIA World Factbook (2002):http://www.nationmaster.com/graph-T/

COOKSEY, D. A. and Azad, H. R. (1992): Accumulation of copper and other metals by copper-resistant- plant pathogenic and saprophytic pseudomonads. *Appl. Envir. Microb.*, 58: 274-278.

COSTERTON, J. W., Lewandovski, Z., Debeer, D., Caldwell, D., Korber, D., and James, G.(1994): Biofilms, the customized microniche. *J. Bacteriol.*, 176: 2137-2142.

COSTERTON, J. W., Lewandowski, Z. Caldwell, D. E., Corber, D. R., and Lappin-Scott, H.-M.(1994): Microbial biofilms. *Ann. Rev. Micr.*, 49: 711-745.

DAUMAS, S., Lombart, R. and Bianchi, A. (1986): A bacteriological study of geothermal spring waters dating from the dogger and trias period in the Paris basin France. *Geomicrob*. *J.*, 4: 423-433.

EKENDAHL, S., Arlinger, J., Ståhl, F., and Pedersen K. (1993): Carbon transformations in deep granitic groundwater by attached bacterial populations characterized with 16 S rRNA gene sequencing technique and scanning elektron microscopy. Swedish Nuclear Fuel and Waste Management Company, Stockholm, Sweden. *SKB Tech. Rep.*, 93-33.

FARKAS, S.(2003): Xenobiotikumok és környezetszennyező anyagok hatása a különböző fajokhoz tartozó *Rhizobium* és *Escherichia* törzsek plazmidjaira. *Doktori értekezés*. Gödöllő. pp.

FIERER, N., Schimel, J. P. and Holden, P. A. (2003): Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biol. & Biochem.*, 35: 167-176.

FERRIS, F. G., and Beveridge, T. J. (1986): Site specificity of metallic ion binding in *Escherichia coli* K12 lipopolysaccharide. *Can. J. Microbiol.*, 32: 52-55.

FÖLDING, G., Hideg, J. és Kovács L. (szerk.) (1999): A Bodai Aleurolit Formáció minősítésének rövidtávú programja. Kutatási zárójelentés. Pécs, 1999. március.

FRANCIS, A. J. (1982): Microbial transformation of low level radioactive waste. IAEA Environmental migration of long-lived radionuclides. IAEA-SM. 72: 415-429.

FRANCIS, A. J. (1990): Microbial dissolution and stabilization of toxic metals and radionuklides in mixed wastes. *Experientia*, 46: 840-851.

FRANCIS, A. J., Joshi-Topé, G., Gillow, J. B., Stroes-Gascoyne, S., and Cramer, J. J. (1993): Microbial population distribution in Cigar Lake Samples. International Symposium on Subsurface Microbiology (ISSM-93), Bath, U.K. September 19-24, Abstr, C-09. FRIMMEL, F. H., and Geywitz, J. (1987): Direct polarographic recording of metal elimination from aquatic samples by coprecipitation with ferric hydroxide. *Sci. Total Environ.*, 60: 57-65.

GADD, G. M. (1986): The uptake of heavy metals by fungi and yeasts: the chemistry and physology of the process and applications for biotechnology, in: Immobilisation of Ions by Biosorption. Ellis Horwood, Chichester, pp.135-147.

GADD, G. M. (1988): Accumulation of metals by microorganisms and algae. In: *Biotechnology* – A Comprehensive Treatise, vol., 6. b. VCH Verlaggesellschaft, Weinheim, pp. 401-433.

GADD, G. M. (1990): Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Experimentia*, 46: 834-840.

GADD, G. M. and de Rome, L.(1988): Biosorption of copper by fungal melanin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29: 610-617.

GAZSÓ, L. G. (1997): Basic radiation microbiology. In: *Microbial degradation processes in radioactive waste repository and in nuclear fuel storage areas*. J.H.Wolfram, R.D. Rogers, and L. G. Gazsó (eds.). Kluwer Academic Publishers, pp 93-101.

GAZSÓ, L., Sáfrány, G., and Köteles, Gy. (2002): Az ionizáló sugárzás biológiai hatásai. *Sugáregészségtan*, Köteles György szerk. Medicina. pp. 41-65.

GERWEN, S. J. C., Rombouts, F. M., Riet, K., and Zwietering, M. H. (1999): A data analysis of the irradiation parameter D_{10} for bacteria and spores under various conditions. *J. Food Protect.*, 62: 1024-1032.

GHIORSE, W. C. (1988): Microbial reduction of manganese and iron. In: *Biology of Anaerobic Microorganisms*. Zhender A. J.B., (ed.) John Wiley and Sons. Inc., New York, 305-331.

GRECZ, N., Rowley, D. B. and Matsuyama, A. (1983): The action of radiation on bacteria and viruses. In: *Preservation of food by ionizing radiation.*, E. S. Josephson and M. S. Peterson (ed.) CRC Press, Inc., Boca Raton, pp.167-209.

HASHISAKA, A. E., Matches, J.R., Batters, Y., Hungate, F. P. és Dong, F. M. (1990): Effects of gamma irradiation at –78 degrees C on microbial populations in dairy products. *J. Food Sci.*, 55:1284-1289.

HALDEMAN, D. L., Amy, P. S., Russel, C. M. and Jacobson, R. (1995): Comparison of drilling and mining as methods for obtaining microbiological samples from the deep subsurface. *J. of Microbiol. Met.*, 21: 305-316.

HERSMAN, L. E. (1986): Biodegradation of drilling fluids: effects on water chemistry and actinide sorption. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, N. Mex. Yucca Mountain Site Characterization Program Rep. M 312.

HERSMAN, L. E. (1993): The role of siderophores in the transport of radionuclides. *Mater*. *Res. Soc. Symp. Proc.*, 294: 765-770.

HORVÁTH, S. (1980): Mikrobiológiai praktikum. Tankönyvkiadó, Budapest, pp. 237-327.

JAIN, D. K. (1995): Microbial colonization of the surface of stainless steel coupons in a deoinized water system. *Wat. Res.*, 29: 1869-1876.

JAY, J. M. (1992): Modern food microbiology. 4th ed. Van Nostrand Reinhold, New York.

JOLLEY, D. M., Ehrhorn, T. F. and Horn, J. (2003): Microbial impacts to the near-field environment geochemistry: a model for estimating microbial communities in repository drifts at Yucca Mountain. *J. Cont. Hydr.*, 62-63: 553-575.

JUNGHANS, K., and Straube, G. (1991): Biosorption of copper by yeast. *Biol. Metals* 4: 233-237.

KEE, N. S., and Bloomfield, C. (1962): The effect of flooding and aeration on mobility of certain trace elements in soils. *Plant Soil* 16: 108-135.

KIEFT, T. L., Kovacik, W. P., Ringelberg, D. B., White, D. C., Haldeman D. L., Amy, P. S., and Hersman, L. E. (1997): Factors limiting microbial growth and activity at a proposed high-level nuclear repository, Yucca mountain, Nevada. *Appl. Environ. Microb.*, 63: 3128-3133.

KARLAND, O., and Sandén, T.(1998): Long term test of buffer material - Construction and emplacement of two pilot test parcels. *Progress Report HRL-97-30*. Stockholm:SKB, Äspö, pp.1-30.

KÓNYI, J., Koska, P., Berzsenyi, G., Gazsó, L. G., and Appanna, V.D. (1997): The role of microorganisms in the mobility of radionuclides in soil. II. Evaluation of siderophore-cation complex forming capacity. *J. Radioecol.*, 5: 9-14.

LAWRENCE, J. R., Wolfaardt, G. M., and Korber, D. R. (1994): Determination of diffusion coefficients in biofilms by confocal laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 1166-1173.

LITTLE, B. and Wagner, P. (1996): An overview of microbiologically influenced corrosion of metals and alloys used in the storage of nuclear wastes. *Can. J. Microb.*, 42: 367-374.

LOVELY, D. R., Roden E. E., Phillips E. J. P., Woodward, J. C.(1993): Enzymatic iron and uranium reduction by sulfate- reducing bacteria. *Mar. Geol.*, 113: 41-35.

LLOYD, J. R. (2003): Microbial reduction of metals and radionuclides. *FEMS Microb. Rev.*, 27 (2-3): 411-425.

MACASKIE, L. E., Dean, A. C. R., Cheetham, A. K., Jakeman, R. J. B. and Skarnulis, A. J. (1987): Cadmium accumulation by a *Citrobacter* sp.: the chemical nature of the accumulated metal precipitate and its location on the bacterial cells. *J. Gen. Microbiol.*, 133: 577-609.

MANTOURA, R., Dickson, A., and Riley, J. P. (1978): The complexation of metals with humic materials in natural waters. *Estuar. Cstl. Mar. Sci.*, 6: 387-408.

MAYFIELD C. I., and Barker J. F. (1982): Biogeochemistry of the backfill/buffer environment. Atomic Energy of Canada Limited, Chalk River, *Ont. Tech. Rec.* Tr-186.

MC CABE, A. (1990): The potential significance of microbial activity in radioactive waste disposal. *Experientia*, 46: 779-787.

MC KINLEY, I. G., West, J. M., and Grogan, H. A. (1985): An analytical overview of the consequences of microbial activity in a Swiss HLW repository. NAGRA, Baden, Switzerland. *Tech. Rep.*, 43-85.

MC KINLEY, I. G. and Grogan, H. A. (1991): Consideration of microbiology in modelling the near fied of a L/ILW repository. *Experientia*, 47: 573-577.

MC KINLEY, I.G., Hagenlocher I., Alexander W. R., and Schwyn B. (1997): Microbiology in nuclear waste disposal: Interfaces and reaction fronts. *FEMS Microb. Rew*, 20: 545-556.

MINTON, K. W. (1994): DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mol. Microbiol.*, 13: 9-15.p.

MORÉN, L. (1998): Använd kämbränsle-Djupförvarets funktion och utveckling. *SKB rapport R-97-21*. Stockholm: Swedish Nuclear Fuel and Waste Managament Co. 21: 1-118.

MOTAMEDI, M. Karland O., and Pedersen K. (1996): Survival of sulfate reducing bacteria at different water activities in compacted bentonite. *FEMS Microbiol. Lett.*, 141: 83-87.

MULLEN, M. D., Wolf, D. C., Ferris, F. C., Beveridge, T. J., Flemming, C. A., and Bailey,

F. W. (1989): Bacterial sorption of heavy metals. Appl. Environ. Microbiol., 55: 3143-3149.

NAKAJIMA, A., and Sakaguchi, T. (1986): Selective accumulation of heavy metals by microorganisms. *Appl., Microbiol.Biotechnol.*, 24: 59-64.

NAZINA, T. N., Kosareva I. M., Davidov A. S., Tourova, T. P., Novikova, E. V., Khafizov, R. R. and Poltaraus A. B. (2000): Physicochemical and microbiological characteristics of groundwater from observation wells of a deep radioactive liquid waste repository. *Microbiology*, 69: 89-95. (Translated from Mikrobiologiya, 69: 105-112).

NEILANDS, J. B. (1981): Microbial iron compounds. Rev. Biochem., 50: 715-731.

NEILANDS, J. B. (1988): Siderophores, in: *ISI Atlas of Science* : Biochemistry, Philadelphia, U.S.A., PA 53-56.

NIETO, J. J., Ventosa, A. and Ruiz-Berraquero, F. (1987): Susceptibility of halobacteria to heavy metals. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 1199-1202.

NIETO, J. J., Fernández-Castillo, R., Márquez, M. C., Ventosa, A., Quesada, E. and Ruiz-Berraquero, F. (1989): Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 2385-2390.

OLSON, G. J., Dockins, W. S., and McFethers, G. A. (1981): Sulfate-reducing and methanogenic bacteria from deep aquifers in Montana. *Geomicrob. J.*, 2: 327-340.

ORMAI P., Frigyesi, F., Gazsó, L. G., Pellet, S. and Berci, K. (1997): Research and development priorities in the Hungarian waste management program. In: *Microbial degradation processes in radioactive waste repository and in nuclear fuel storage areas.* Wolfram, J. H.(ed.) Kluwer Academic Publishers. pp.1-9.

ORMAI, P., Takács, F., és Bérci, K. (2002): Safety upgrading of the Püspökszilágy disposal facility. In: International conference on issues and trends in radioactive waste management. Vienna, Austria, 9-13 December 2002, p. 61.

PEDERSEN, K. (1987): Preliminary investigations of deep groundwater microbiology in Swedish granitic rock. Swedish Nuclear Fuel and Waste Management Company, Stockholm, Sweden, *SKB Tech. Rep.*, 88-01. pp. 22.

PEDERSEN, K., and Ekendahl, S. (1990): Distribution and activity of bacteria in deep granitic groundwaters of southeastern Sweden. *Microb. Ecol.*, 20: 37-52.

PEDERSEN, K., and Albinsson, Y. (1992): Possible effects of bacteria on trace element migration in crystalline bedrock. *Radiochem. Acta*, 48/59: 365-369.

PEDERSEN, K., Ekendahl, S., and Arlinger, J. (1991): Microbes in crystalline bedrock. Assimilation of CO_2 and introduced organic compounds by bacterial populations in groundwater from deep crystalline bedrock at Laxemar and Stipa. Swedish Nuclear Fuel and Waste Management Company, Stockholm, Sweden. *SKB Tech. Rep.*, 91-56. pp53.

PEDERSEN, K., and Ekendahl, S. (1992): Incorporation of CO_2 and introduced organic compounds by bacterial populations in groundwater from the deep crystalline bedrock of the Stripa mine. *J. Gen. Microbiol.*, 138: 369-376.

PEDERSEN, K., and Karlsson, F.(1995): Investigations of subterranean microorganisms. Their importance for performance assessment of radioactive waste disposal. *SKB Technical Report*, 95-10.

PEDERSEN, K. (1996): Investigation of subterranean bacteria in deep crystalline bedrock and their importance for the disposal of nuclear waste. *Can. J. Microbiol.*, 42: 382-391.

PEDERSEN, K. (1999): Subterranean microorganisms and radioactive waste disposal in Sweden. *Eng. Geol.*, 52: 163-176.

PITONZO, B. J., Amy, P. S., and Rudin, M. (1999): Resuscitation of microorganisms after gamma irradiation. *Radiat. Res.*, 152: 71-75.

PUSCH, R. (1982): Copper/bentonite interaction. SKB Technical report 82-07. Stockholm: Swedish Nuclear Fuel and Waste Management Co. 1-33.

PUSCH, R. (1998): Backfiling with mixtures of bentonite/ballast materials or natural smectitic clay? *Technical Report TR-98-16*. Stockholm: Swedish Nuclear Fuel and Waste Management Co.1-52.p.

RASPOR, B., Nurnberg, H. W. Valenta, P. and Branica M. (1984): Significance of dissolved humic substances for heavy metal speciation in natural waters. *Devl. Biogeochem. J.*, 317-328.

REZESSY, G., and Bérczi, K.(2002): Low- and intermediate level waste disposal in Hungary: The Üveghuta Research Programme. In: International conference on issues and trends in radioactive waste management. Vienna, Austria, 9-13 December 2002, p.61.

SAG, Y., Kaya, A., and Kutsal, T. (1999): Simultaneous biosorption of chromium (IV) and copper (II) on *Rhizopus arrhizus* in packed column reactor: Application of the competitive Freundlich model. *Sep. Sci. Tech.*, 34: 3155-3171.

SAG, Y., Kaya, A., and Kutsal, T. (2000): Biosorption of lead(II), nickel(II), and copper(II) on *Rhizopus arrhizus* from binary and ternary metal mixtures. *Sep. Sci. Tech.*, 35: 2601-2617. SINGH, S. P., and Yadara V. (1987): Factors affecting cadmium toxicity in Anacystis nidulans. *J. Environ. Biol.*, 8: 245-246.

STONE, A.T. (1986): Adsorption of organic reductants and subsequent electron transfer on metal oxide surfaces, in: *Geochem. Proc. Chem. Surf.*, J. A. Davis and Hayes K. F. (eds). American Chemical Society, Washington, DC, 446-461.

STONE, A. T. (1987): Microbial metabolites and the reductive dissolution of manganese oxides. Oxalate and pyruvate. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 51: 919-925.

STROES-GASCOYNE, S., and West, J. M. (1994): Microbial issues pertaining to the Canadian concept for the disposal of nuclear fuel waste. Atomic Energy of Canada Limited, Chalk River, *Ont. Rep. AECL-10808 and COG-93-54*.

STROES- GASCOYNE, S., and West, J. M. (1996): An overview of microbial research related to high –level nuclear waste disposal with emphasis on the Canadian concept for the disposal of nuclear fuel waste. *Can. J. Microbiol.*, 42: 349-366.

STROES-GASCOYNE, S. (1989): The potential for microbial life in a Canadian high level fuel waste disposal vault: a nutrient and energy source analysis. Atomic Energy of Canada Limited, Chalk River, *Ont. Rep. AECL-9574*.

STROES-GASCOYNE, S., Francis, A. J. and Cramer, J. J. (1993): Microbiology of groundwaters from the Cigar Lake uranium deposit. *International Symposium on Subsurface Microbiology* (ISSM-93), Bath, U. K. September 19-24. Abstr. C-03.

STROES-GASCOYNE, S., Pedersen K., Haveman, S. A., Dekeyser, K., Arlinger, J. and Daumas S. (1996): Occurence and identification of microorganisms in compacted clay – based buffer material designed for use in a nuclear fuel waste disposal vault. *Can. J. Microbiol.*, 43: 1133-1146.

STROES-GASCOYNE, S., and Gascoyne, M. (1998): The introduction of microbial nutrients into a nuclear waste disposal vault during excavation and operation. *Environ. Sci. Technol.*, 32: 317-26.

STROES-GASCOYNE S., and Sargent, F.P. (1998): The Canadian approch to microbial studies in nuclear waste management and disposal. *J. Cont. Hydr.*, 35: 175-190.

TALLENTIRE, A., and Khan, A. A. (1975): Test of the validity of a model relating frequency of contaminated items and increasing radiation dose. Radiosterilization of medical products 1974. Proceedings of the symposium on ionizing radiation for sterilization of medical products and biological tissues held by the International Atomic Energy Agency at Bombay, 9-13 December 1974. 3-14.

TELEGDI, J., Keresztes Zs., Pálinkás G.,Kálmán E., and Sand, W. (1998): Microbially influenced corrosion visualized by atomic force microscopy. *Appl. Phys.* A 66: 639-642.

TOBIN, J. M., Cooper, D. G., and Neufeld, R. J. (1984): Uptake of metal ions by *Rhizopus arrhizus* biomass. *Appl. Envir. Microbiol.*, 47: 821-824.

TREVORS, J. T., Stratton, G. W. and Gadd, G. M. (1985): Cadmium transport, resistance and toxicity in bacteria, algae and fungi. *Can. J. Microbiol.*, 32: 447-464.

URBAIN, W. M. (1986): Food irradiation. Academic Press, New York.

VÁRADY, GY.(2003): Környezeti stressztényezőkkel szemben toleráns *Pseudomonas* törzsek ökofiziológiai szelekciója. *Doktori értekezés tézisei*. Gödöllő, pp. 8-10.

VERRHIEST, G. J., Cortes, S., Clément, B., and Montuelle, B. (2002): Chemical and bacterial changes during laboratory conditioning of formulated and natural sediments. *Chemospere*. 46: 961-975.p.

VOLESKY, B. (1990): *Biosorption of Heavy Metals*. CRC Press, Boca Raton-Ann Arbor-Boston. U.K.

WANG, C. L., Michels, P. C., Dawson, S. C., Kitisakkul, S., Baross, J. A., Keasling, J. D., and Clark, D. S. (1997): Cadmium removal by a new strain of *Pseudomonas aeruginosa* in aerobic culture. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 63: 4075-4078.

WEST, J. M., Mc Kinley I. G., and Chapman, N. A. (1982): Microbes in deep geological system and their possible influence on radioactive waste disposal. *Radioactive Waste Management and the Nuclear Fuel Cycle*, 3: 1-15.

WEST, J. M., Mc Kinley, I. G., Grogan, H. A., and Arme, S. C. (1985): Laboratory modelling studies of microbial activity in the near field of a HLW repository. *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.*, 50: 533-538.

WHIPPLE, C. G. (1996): Can nuclear waste be stored safely at Yucca mountain. *Sci. Am.*, 6: 56-64.

WHITE, C. and Gadd, G. M. (1998): Accumulation and effects of cadmium on sulphatereducing bacterial biofilms. *Microbiol.*, 144: 1407-1415.

ZO BELL, C. E. (1946): Action of microorganisms on hydrocarbons. Bact. Rev., 10: 1-49.

ZO BELL, C. E. (1964): The occurence, effects, and fate of oil polluting the sea. *Adv. Water Pollution Res.*, 3: 85-109.

YAMAMOTO, M., and Sakanoue, M. (1982): Interaction of humic acids and americium III in aqueous solution. *J. Radiat. Res.*, 23: 261-271.

10. MELLÉKLET



 kép A Bodai Aleurolit Formáció és a fedő Bakonyai Homokkő Tagozat tektonikus érintkezési határa. Alfa-1 kutatóvágat 210,5 m, homlokfal.



2. kép. Sziderofortermelő izolátum



3. kép. Szálas albitos aleurolit



1.ábra. Néhány ország villamosenergia termelésében az atomenergia részaránya



2.ábra Feltételezett radioaktív szennyeződés terjedésének két dimenziós modellje
OPCA agar összetétele

0,25 g
0,35 g
0,015g
0,005 g
0,007 g
0,005 g
0,5 g
1,0 g
0,05 g
0,05 g
0,1 g

1000 ml deszt.víz + 1 ml nyomelem oldat

pH:7,5

Nyomelem oldat (100 ml-re):

$MnCl_2 x 4H_2O$	0,50 g			
H ₃ BO ₃	0,05 g			
ZnCl ₂	0,05 g			
$CoCl_2 \ge 6 H_2O$	0,05 g			
NiSO ₄ x 6 H ₂ O	0,05 g			
$CuCl_2 x \ 2 \ H_2O$	0,03 g			
$NaMoO_4 \ge H_2O$	0,01 g			
Vitaminoldat (100 ml):				

Biotin	0,002 g
Folsav	0,002 g

B6 (HCl)	0,010 g
Riboflavin	0,010 g
Tiamin (HCl)	0,010 g
Pantoténsav	0,005 g
Nikotinamid	0,005 g
B12	0,010 g
PABA	0,005 g
Liponsav	0,006 g
Desztillált víz	100 cm^3

Sterilezés Millipore szűrőn (0,45 μ m).

Sterilizálás autoklávban 121°C-on, 15 percig, majd 1 ml vitaminoldat hozzáadása, utána lemezöntés.

V 3/3 izolátum besugárzása, tizedelő dózis (D10) értékének meghatározása

lzolátum jellemzői: Tenyésztés: Besugárzás körülményei:			Aerob spóraszuszp 1 ml szuszp.	enzio +7ı	ó ml s. d. vízt	pen, levegőbe	en, hűtve	
					Co napi bo	mlási faktor:	0,000353	3
Aktuális adatok: év hónap		Nap		Legutóbbi I	Fricke-mérés év	adatai: hónap	nap	
Dátum:	19	99 2	22		Dátum:	1993	4	23
Dózisteljes Le-fel men	ítmény: eti dózis:	2,04747 13,74149	7kGy/h 9Gy		Dózisteljes Le-fel mene	ítmény: eti dózis:	4,3396 29,125	δKGy/h δGy
			Besugárzás	i idő				
D1 D2 D3 D4 D5 D6 D7 D8 D9 D10	dózis (kGy)	óra 1 () 2 () 4 () 6 ()	Perc)))	28 28 58 58	másodperc 54 54 12 12	Higítások: + + +	D0 D1 D2 D3 D4	: 100000 : 100000 : 10000 : 100 : 10
Telepszám	ok adott dóz	zisnál:				X átlag:	SD:	S/So:
D0 D1 D2 D3 D4 D5 D6 D7 D8 D9 D10	106 39 48 302 121	115 36 49 315 114	103 40 50 316 117		118 35 47 301 118	110,5 37,5 48,5 308,5 117,5 ######### ######### ######### ########	7,141428 2,380476 1,290994 8,103497 2,886757 ///////////////////////////////////	3 1 50,339366516 10,043891403 40,043891403 70,002791855 10,000106335 0 \$
		Szélesztve	:	0,2	ml			
0 1 2 4 6	-0,469331 -1,357620 -2,554107 -3,973324	01 54 11 41	D0 D1 D2 D3 D4		Csíraszám, 55250000 18750000 2425000 154250 5875	/ml:		



 $\lg (S/So) = \lg n - kD$

k:	0,684	D10:		1,46kGy
lgn:	0,1334		n:	1,36