

0006

JNC TJ7440 2005-008
~~PNC ZJ1211 05-015~~
~~JNC ZJ7440 2001-026~~

~~限定資料~~

図書室

北日本中・古生代斑レイ岩類の 深部地質環境データ (地下水)

(動力炉・核燃料開発事業団 契約業務報告書)

1996年3月

三菱マテリアル株式会社

本資料の全部または一部を複写・複製・転載する場合は、下記にお問い合わせ
してください。

〒319-1184 茨城県那珂郡東海村村松 4 番地49
核燃料サイクル開発機構
技術展開部 技術協力課
電話：029-282-1122 (代表)
ファックス：029-282-7980
電子メール：jserv@jnc.go.jp

Inquires about copyright and reproduction should be addressed to:
Technical Cooperation Section,
Technology Management Division,
Japan Nuclear Cycle Development Institute
4-49 Muramatsu, Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki 319-1184, Japan

◎核燃料サイクル開発機構
(Japan Nuclear Cycle Development Institute)
2005

~~この資料は、動燃事業団の開発業務を進めるため、特に限られた関係者だけに開示
するものです。ついては、複製、転載、引用等を行わないよう、また第三者への開示
又は内容遺漏がないよう管理して下さい。また今回の開示目的以外のことには使用し
ないよう特に注意して下さい。~~

~~本資料についての問い合わせは下記に願います。~~

~~〒107 東京都港区赤坂 1-9-13~~

~~動力炉・核燃料開発事業団~~

~~技術協力部 技術管理室~~

北日本中・古生代斑レイ岩類の 深部地質環境データ (地下水)

(動力炉・核燃料開発事業団 契約業務報告書)

1996年3月

三菱マテリアル株式会社

北日本中・古生代斑レイ岩類の深部地質環境データ（地下水）

■■■■■* , ■■■■■** ■■■■■***

要 旨

本資料は、北日本・古生代斑レイ岩類の深部地質環境データ（地下水）を収集し取りまとめたものである。

調査地点は新潟県両津市北鶴島に位置する。昨年度掘削した試錐孔（深地佐渡No. 2孔）の深度303.0～304.0m間に存在する深部地下水を、500m対応パッカー式地下水サンプラー（PGS-500HQ型）を用いて連続的に採取し、化学分析及びバクテリア調査を行った。

調査中の累計採水量は41ℓである。モニター分析結果より、採水区間が本来の地下水で満たされたと判断した後、各種調査のための地下水の採取を行った。調査項目は、主要、微量成分合わせて36種の化学種分析並びに、バクテリアの存在調査として全菌数計数と生菌数計数である。生菌数計数の種類は、鉄酸化細菌、硫酸塩還元細菌、メタン生成細菌、アンモニア酸化細菌、亜硝酸酸化細菌、硝酸還元菌及び脱窒菌である。硫酸塩還元細菌については、属及び種の同定も行った。

採取した深部地下水は、pH 9.4のアルカリ性で酸素を含まないものであった。溶存化学成分の測定結果より、陽イオンは Na^+ (90.1) > K^+ (3.8) > Ca^{2+} (2.4)、陰イオンは HCO_3^- (164) > Cl^- (46.6) > SO_4^{2-} (16.5) の順でそれぞれ高濃度であり（数値の単位はmg/ℓ）、いわゆるNa-HCO₃・Clタイプの地下水である。また、トリチウム濃度から約24～36年前にかん養されたものと計算され、その起源は同位体分析結果より天水であることが示唆された。

バクテリア調査の結果から、全菌数は 7.2×10^5 cells/mlであった。生菌の鉄酸化細菌・アンモニア酸化細菌・亜硝酸酸化細菌・メタン生成菌・硫黄酸化菌は不検出であること、硫酸塩還元細菌・脱窒菌・硝酸還元菌が存在することが確認された。

さらに対象試料として、調査地域内の地表水及び掘削時に使用した浅部地表水に関して、類似の化学分析を行った。

本報告書は三菱マテリアル㈱が、動力炉・核燃料開発事業団との契約により実施した業務の成果である。

契約番号：072 C 1051

事業団担当部課室及び担当者：環境技術開発推進本部地層科学研究グループ ■■■■■

* : 地球事業センター

** : 大手開発㈱ 試錐部

*** : 大手開発㈱ 企画開発部

The Chemical Data on the Deep Groundwater from the Gobbroic Rocks
in the Paleozoic-Mesozoic of North Japan

██████████ * , ██████████ **, ██████████ ****

Abstract

This report summarizes the chemical characteristics of the deep groundwater obtained from the Mesozoic to Palaeozoic gabbro body of the northern part of Japan.

A deep borehole of 435 m depth (Drill Hole No.2) was drilled at the Kitaushima, Ryotsu City, Niigata Prefecture and the pure groundwater was collected at depth from 303.0 m to 304.0 m using the Pakker Groundwater sampler, PGS 500-HQ type, for the chemical analyses and bacterial investigation.

A total of 41 liters of the groundwater was collected during the period of the study. Prior to the collection of water for chemical analyses and bacteria investigation, the water in borehole was monitored for confirming not to be contaminated by the drilling water.

The chemical analyses of 36 elements including major and minor elements and bacteria investigation of counting total numbers of bacteria and number of live-bacteria were conducted for the study. The live bacteria includes iron-oxidizing bacteria (*Thiobacillus ferrooxidans*), sulfate-reducing bacteria, methanogenic bacteria, nitrite bacteria, nitrate bacteria and denitrifying bacteria and in addition to the counting numbers, an identification of sulfate reducing bacteria were conducted.

The pure groundwater shows an alkalinity of 9.4 and it is anaerobic. The results of chemical analyses suggest that the pure groundwater has high concentrations of soluble matter including cations such as Na^+ (90.1) > K^+ (3.8) > Ca^{2+} (2.4) and anions such as HCO_3^- (164) > Cl^- (46.6) > SO_4^{2-} (16.5) in mg/l. From the analytical results, this groundwater is classified to Na- HCO_3 (Cl) type. The isotopic analysis of δD - $\delta^{18}\text{O}$ suggests that the source of the deep groundwater is same as that of terrestrial water. According to the age determination by H^3 content, the deep groundwater is considered to be provided approximately 24 to 36 years ago from surface of the earth.

The bacteria investigation shows that a total of bacteria included in the deep groundwater is 7.2×10^5 cells/ml. No live bacteria of *Thiobacillus ferrooxidans*, methanogenic bacteria, nitrite bacteria and nitrate bacteria were found in the deep groundwater. The amounts of sulfate reducing bacteria and denitrifying bacteria were, respectively 1.6×10^4 MPN/ml and 1.3×10^3 MPN/ml.

For comparison of chemical characteristics, the terrestrial water and shallow groundwater were collected respectively from the upper reach of a nearby river and the No.1 hole of 143.90 m deep.

Work performed by Mitsubishi Materials Corporation under contract with Power Reactor and Nuclear Fuel Development Corporation
PNC Liaison:Radioactive Waste Management Project, Geosciences Research Program,

* :Global Ecoindustry Center

** :Bishimetal Exploration Co.,LTD., Drilling Department

*** :Bishimetal Exploration Co.,LTD., Reserch & Planing Department

目 次

1. 概 要	1
1.1 調査件名	1
1.2 調査目的	1
1.3 調査位置及び岩種	1
1.4 調査期間	1
1.5 調査項目	1
1.6 調査者	1
2. 調査内容	4
2.1 採水区間の決定	4
2.2 作業の概要	4
2.3 各種調査別の試料採取	7
2.3.1 O ₂ , N ₂ , He, H ₂ , CO, CH ₄ , ΣCO ₂ の定量用試料	10
2.3.2 Fe ²⁺ , S ²⁻ の定量用試料	14
2.3.3 T O C 及びフミン酸・フルボ酸の定量用試料	14
2.3.4 Na, K, Li, Ca, Mg, Sr, Al, Total-Fe, Mn の定量用試料	14
2.3.5 F, Cl, Br, I, SO ₄ , P, N, Siの定量用試料	15
2.3.6 ³ H, δ D, δ ¹⁸ O の分析用試料	16
2.3.7 バクテリア調査用試料	16
2.4 化学分析方法	17
2.4.1 モニター期間における各項目の測定方法	17
2.4.2 本採水における各項目の測定方法	18
2.5 バクテリア調査方法	24
2.5.1 本採水における各項目の測定方法	24
2.5.2 硫酸塩還元細菌の同定	29
3. 結 果	38
3.1 モニター測定結果	38
3.2 地下水の化学成分分析結果	45

3.3	バクテリア調査結果	47
3.3.1	細菌数計数結果	47
3.3.2	硫酸塩還元菌の同定結果	48
4.	考 察	52
4.1	地下水の年代	52
4.2	地下水の安定同位体比	52
4.3	地下水の水質	54
4.4	バクテリア	59
	参考文献	63

目 次

図1-1 調査位置図	2
図2-1 BAT システム設置概念図	6
図2-2 深部地下水試料の採取から分析までの概略(その1)	8
図2-2 深部地下水試料の採取から分析までの概略(その2)	8
図2-2 深部地下水試料の採取から分析までの概略(その3)	9
図2-3 地表水及び浅部地下水試料の採取から分析までの概略	9
図2-4 ガラス製ガス採取管の概略(採取容量:約1ℓ)	11
図2-5 地下水試料のヘッドスペース測定用試料の調整	12
図2-6 地表水試料のヘッドスペース測定用試料の調整	13
図2-7 TOC 及びフミン酸・フルボ酸の定量用試料の採取までの操作概略	14
図2-8 Na, K, Li, Ca, Mg, Sr, Al, Total-Fe, Mn の定量用試料の採取までの操作概略	15
図2-9 F, Cl, Br, I, SO ₄ , P, Siの定量用試料の採取までの操作概略	15
図2-10 NO ₂ , NO ₃ , NH ₄ 定量用試料の採取までの操作概略	16
図2-11 Siの定量操作概略	20
図2-12 フミン酸・フルボ酸の定量操作概略	21
図2-13 フミン酸の精製方法操作概略	21
図2-14 バクテリア調査のフローシート	24
図2-15 硫酸塩還元細菌の純粋分離の操作手順	30
図2-16 走査型電子顕微鏡(SEM) 観察試料の調整手順	32
図2-17 グラム染色の手順	33
図2-18 鞭毛染色の手順	33
図2-19 キノン分析操作の概略	36
図2-20 DNA の抽出・精製からGC含量測定までの手順概略	37
図3-1 モニター期間における水温, pH, Eh, 電気伝導度の測定結果	43
図3-2 モニター化学成分測定結果	44
図3-3 硫酸塩還元細菌の属の同定手順	49
図3-4 硫酸塩還元細菌の走査電子顕微鏡写真	49

図4-1 δD - $\delta^{18}O$ ダイアグラム	53
図4-2 トリリニアダイアグラム	55
図4-3 種々細菌数とEhの関係	62

表 目 次

表1-1 資料調査項目	3
表2-1 深部地湧水に関する調査のための採水容量	5
表2-2 水温, pH, 電気伝導度, 酸化還元電位の測定方法及び誤差	17
表2-3 各種化学成分のモニター分析方法	18
表2-4 ガスクロマトグラフィーの測定条件	22
表2-5 Thiobacillus ferrooxidans 計数用培地	25
表2-6 硫酸塩還元細菌計数用培地	26
表2-7 メタン生成細菌計数用培地	27
表2-8 亜硝酸細菌計数用培地	28
表2-9 硝酸計数用培地	28
表2-10 脱窒細菌計数用培地	29
表2-11 硫酸塩還元細菌の純粋化における混在菌(群)の判定	30
表2-12 基質資化性(生育に利用できる炭素源)試験の概要	34
表3-1 比較電極の電位	39
表3-2 モニター測定結果(その1)	40
表3-2 モニター測定結果(その2)	41
表3-2 モニター測定結果(その3)	42
表3-3 測定値の統計計算結果	42
表3-4 モニター化学成分分析結果	44
表3-5 化学分析結果一覧	46
表3-6 本試験結果のイオンバランス	47
表3-7 細菌数計数結果	48
表3-8 各種菌計数時(MPN 5 本法)の陽性本数	48
表3-9 形態, 生理及び遺伝学的試験結果一覧	51
表4-1 主要イオン濃度の換算	54
表4-2 日本の河川水・降雨の平均水質及び本試験河川水の水質	56
表4-3 地表水と深部地下水の水質の比較	56

表4-4 水-岩石相互作用における元素の易動性	57
表4-5 Thiobacillus ferrooxidans の一般的特性	59

1. 概 要

1.1 調査件名

北日本中・古世代斑レイ岩類の地質環境データ（地下水）

1.2 調査目的

我国の高レベル放射性廃棄物地層処分システムの性能評価と概念設計に資する地質環境モデルデータセット整備のため、北日本中・古世代斑レイ岩類の地下水の水質的特性等に関し調査するものである。

1.3 調査位置および岩種

位 置：調査位置図を図1-1 に示す。

岩 種：北日本中・古生代の斑レイ岩類

採水深度：303.00～304.00m

1.4 調査期間

自・平成7年6月15日～至・平成8年3月15日

1.5 調査項目

調査対象となる水は、地表水、井戸採取水（以下浅部地下水とする）、及びBAT システムを用いて採取した地下水（以下深部地下水とする）の3試料である。これらの調査項目を表1-1 に示す。

1.6 調査者

総 括	██████████
主任技術者	██████████
事務調整	██████████
現場代理人	██████████

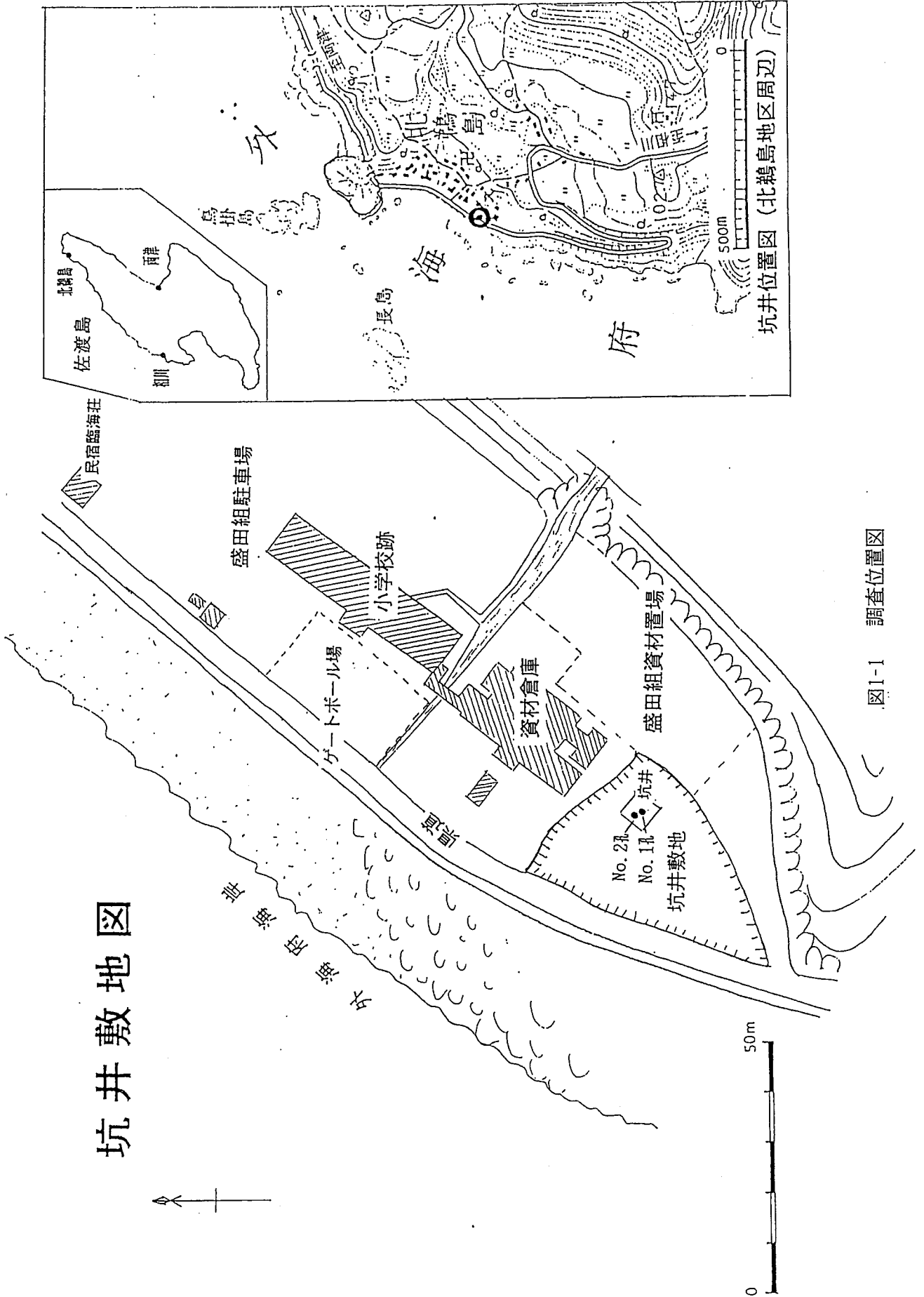


図1-1 調査位置図

坑井敷地図

表1-1 資料調査項目

<p>モニター期間中の測定</p> <ul style="list-style-type: none"> ・掘削水による汚染の影響が皆無な地下水がパッカー間に満たされていると判断するために、採水開始時と、採水量がパッカー間容量(3.5ℓ)に達する毎に以下の化学成分について分析を行う。 Si, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, HCO₃⁻, Cl⁻, F⁻, ウラニン ・現場でサンプラー回収後毎に以下の項目に関して連続測定する。 温度, pH, 電気伝導度, 酸化還元電位
<p>深部地下水調査項目</p>
<p>化学分析</p> <p>O₂, N₂, H₂, He, CH₄, CO, CO₂, TOC, 7シ酸, 7ルボ酸, Si, Na⁺, K⁺, Li⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Sr²⁺, Al³⁺, Mn²⁺, TOTAL-Fe, Fe²⁺, HCO₃⁻, Cl⁻, F⁻, Br⁻, I⁻, S²⁻, PO₄³⁻, SO₄²⁻, NO₃⁻, NH₄⁺ ³H, δD, δ¹⁸O</p>
<p>バクテリア調査</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 全菌数計数 2. 特定バクテリアの存在調査 鉄酸化細菌, 硫酸塩還元細菌, メタン生成細菌, 従属栄養細菌, 硝酸還元細菌, 脱窒細菌, 亜硝酸酸化細菌 3. 硫酸酸塩還元菌の同定
<p>浅部地下水調査項目</p>
<p>化学分析</p> <p>O₂, N₂, H₂, He, CH₄, CO, CO₂, TOC, 7シ酸, 7ルボ酸, Si, Na⁺, K⁺, Li⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Sr²⁺, Al³⁺, Mn²⁺, TOTAL-Fe, Fe²⁺, HCO₃⁻, Cl⁻, F⁻, Br⁻, I⁻, S²⁻, PO₄³⁻, SO₄²⁻, NO₃⁻, NH₄⁺</p>
<p>地表水調査項目</p>
<p>化学分析</p> <p>O₂, He, CO₂, TOC, 7シ酸, 7ルボ酸, Si, Na⁺, K⁺, Li⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Sr²⁺, Al³⁺, Mn²⁺, TOTAL-Fe, Fe²⁺, HCO₃⁻, Cl⁻, F⁻, Br⁻, I⁻, PO₄³⁻, SO₄²⁻, NO₃⁻, NH₄⁺ ³H, δD, δ¹⁸O</p>

2. 調査内容

2.1 採水区間の決定

採水区間は、試錐孔深地佐渡(No. 2孔, 深度435.00m)においてなされた各種コア試験結果(PNC ZJ1211 95-009)に基づき深度303.00~304.00mとした。なお、本調査井は、掘削用水としてNo. 1孔(深度143.90m)から湧出している浅部地下水を用いて掘削している。

2.2 作業の概要

深部地下水を採水するために500m対応パッカー式地下水サンプラーを使用した。現場採水作業は、「パッカー式地下水サンプラー(PGS-500NQU, HQ型)の製作(PNC SJ4411 898-001)」に基づいて行った。本試験で用いた地下水サンプラーは、その採水作業工程において、外部との接触なしに所定深度から地下水を採取することの出来る装置である。また、採取した地下水は、大気に触れることなくアルゴン雰囲気下の実験系に導入できる。従来のように、ベラーもしくは汲み上げポンプ等による採水法の欠点である採水区間の決定の難しさと、地表水の混入により生じる試料の汚染の問題を、極力軽減したシステムである。

現地での操作概要を以下に記す。

まずパッカーにステンレスロッドをつなぎ、303.00 m~304.00 mに採水区間が設置されるように試錐機を用いて降下させた。次にラバーパッカーを水により加圧膨張させて採水区間外からの地下水の流入を遮断した。パッカー圧力は、開始時が4.65kgf/cm²、調査終了時が4.45kgf/cm²であった。

採水容器を備えた地下水サンプラー(容量500m^l)を電動ウインチによりサンプリングカプセルまで降下させた。サンプリングカプセルに着底した後、一定時間(本調査においては10分~20分)静置し地上に引き上げた。深部地下水は、地下水サンプラー内部の気圧と地下水の水圧の差圧によって、地下水サンプラー内部に流入する。図2-1にパッカー式地下水サンプラー(BATシステム)設置概念図を示す。

なお、採水区間(303.00m~304.00m)の空間容積は以下の様に計算した(図2-1)。

$$[(4.9 \times 4.9 \times 3.14) - (4.5 \times 4.5 \times 3.14)] \times 100 + (4.9 \times 4.9 \times 3.14) \times 30 = 3088$$

$$3088 = 3,500 \text{ cm}^3$$

採取した深部地下水は、グローブバック内で分注し水温、pH、電気伝導度及び酸化還元

電位を測定した。また、前述の採水区間容積の計算式に従い採水量が3.5 ℓに達する毎に化学分析を行った。測定値が収束し、パッカー区間内がもともとその深度の地層中に存在している地下水で満たされていると判断されるまで連続的に作業を継続した。本試験では55回(約27.5 ℓ)の採水を地下水モニター期間とし連続採水を行った。

上記の作業が終了後、化学分析およびバクテリア調査用試料の採水作業に移行した。深部地下水に関する各種調査における採水容量は合計で13 ℓである。採水量の詳細を表 2-1 に示す。

地表水並びに浅部地下水の採取に関しては特別な装置等は用いず、河川及び自噴井戸から直接採取した。

表2-1 深部地下水に関する調査のための採水容量

項 目	総採水量(ℓ)	主な内訳
モニター用分析	27.5	—————
化学成分の測定	10.5	溶存気体 1.5 ℓ 同位体 5.5 ℓ その他 3.5 ℓ
バクテリアの調査	2.5	分析用 2 ℓ

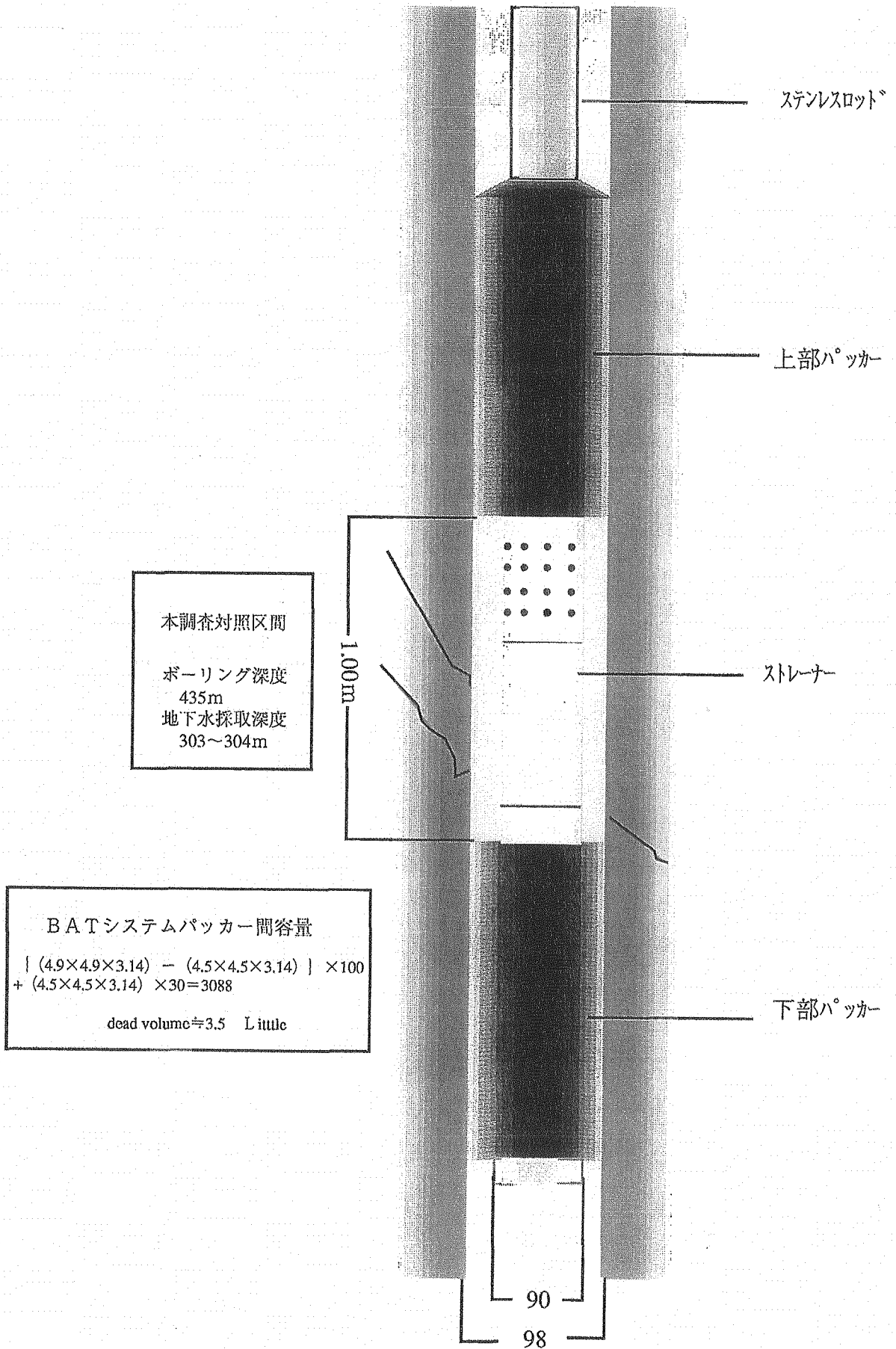


図2-1 BATシステム設置概念図

2.3 各種調査別の試料採取

深部地下水採水に用いる地下水サンプラーは、内部をアルゴンガス(99.999%以上)により置換したものを真空吸引ポンプで減圧し採水に供した。このアルゴンガスによる容器内のパージは、地下水サンプラーを可能な限り真空ポンプで減圧しても大気の混入を無視することはできず、ステンレス容器内への大気の混入を防ぐために行うものである。

溶存ガス及び Fe^{2+} 、 S^{2-} の測定に供する試料水(地下水)は、採取後、地下水サンプラー容器をそのまま氷冷保存(約 2°C)した。その他の分析に供する試料水(地下水)は原則としてテフロン製容器あるいはガラス製バイアルに分注し氷冷保存した(図2-2)。

地表水及び浅部地下水の採取には、特別な手法及び採水容器は使用していない。ただし、溶存ガス成分については、先端にゴム管を付けたをディスポーザブルシリンジ(50 ml容量)を用いて、ゴム管をバイアル瓶の底部まで差し込み、試料水をオーバーフローさせながら採取した。採取した試料水はすべて深部地下水試料と同様に氷冷保存した(図2-3)。

試料採取に関する手順及び試料の前処理方法等は、分析結果に大きく影響を及ぼす因子であると考えられるため、分析項目ごとに最適とされている手法を選択した。

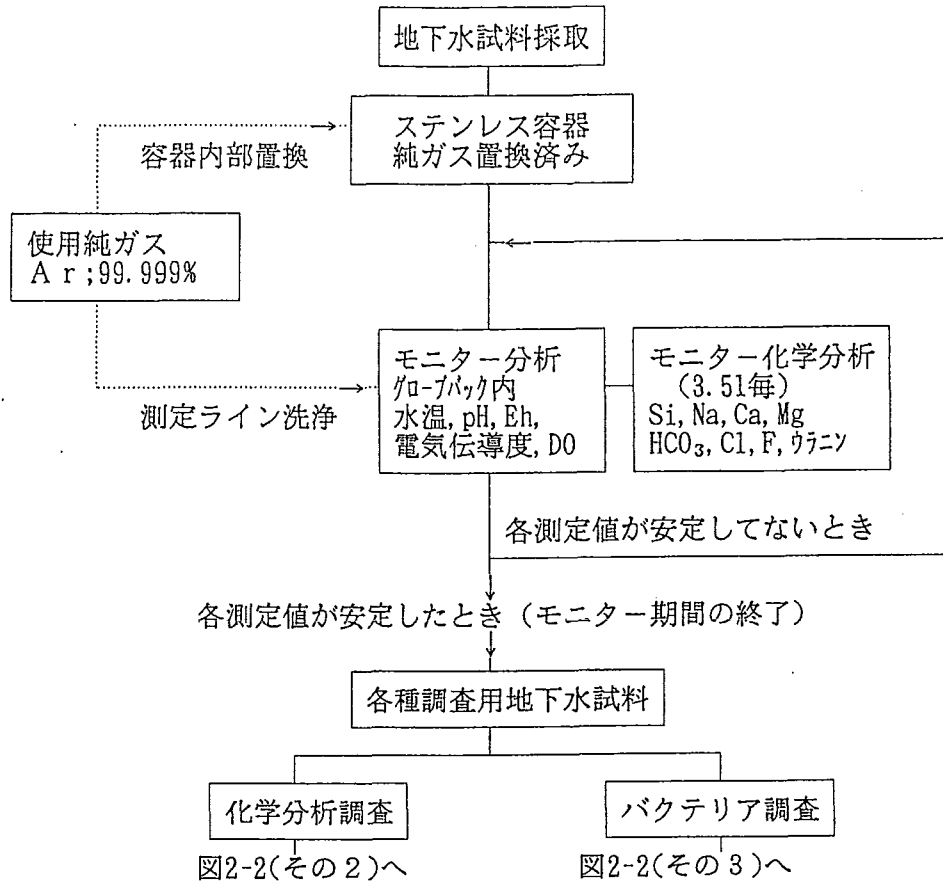


図2-2 深部地下水試料の採取から分析までの概略(その1)

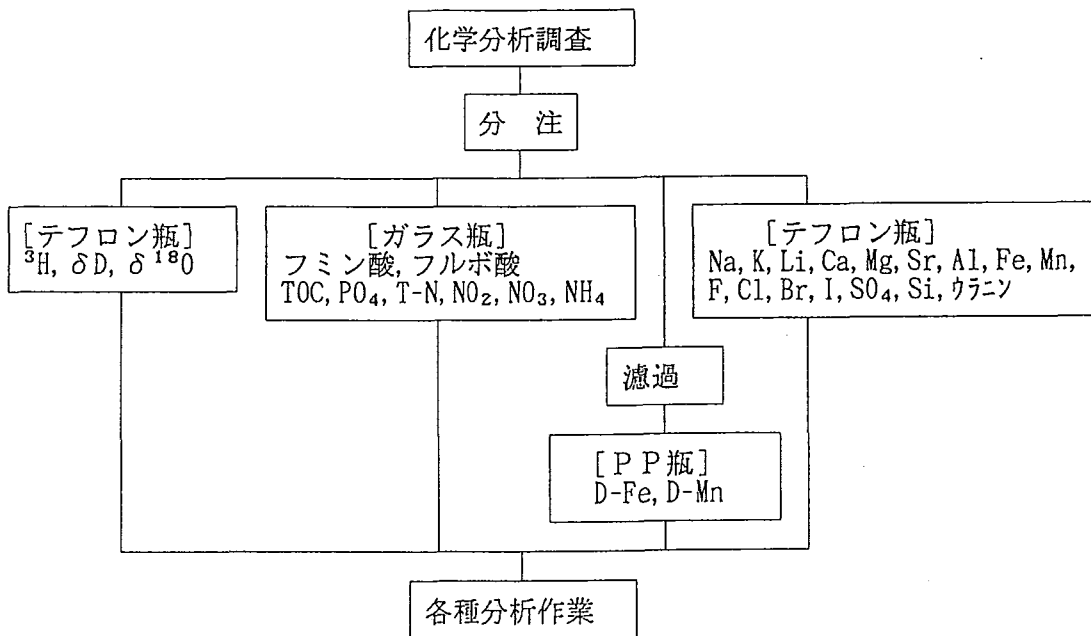


図2-2 深部地下水試料の採取から分析までの概略(その2)

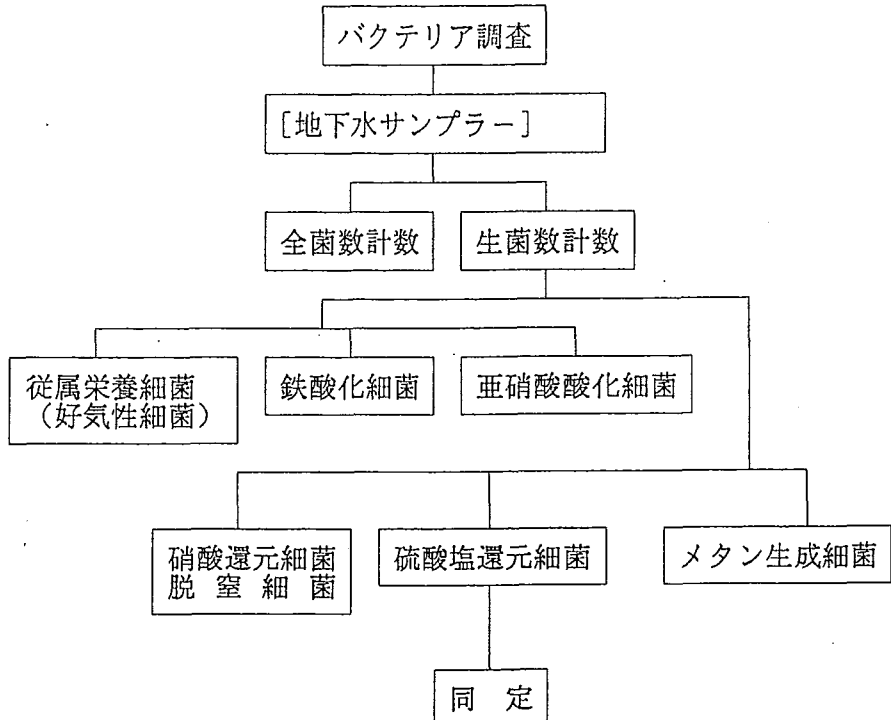


図2-2 深部地下水試料の採取から分析までの概略(その3)

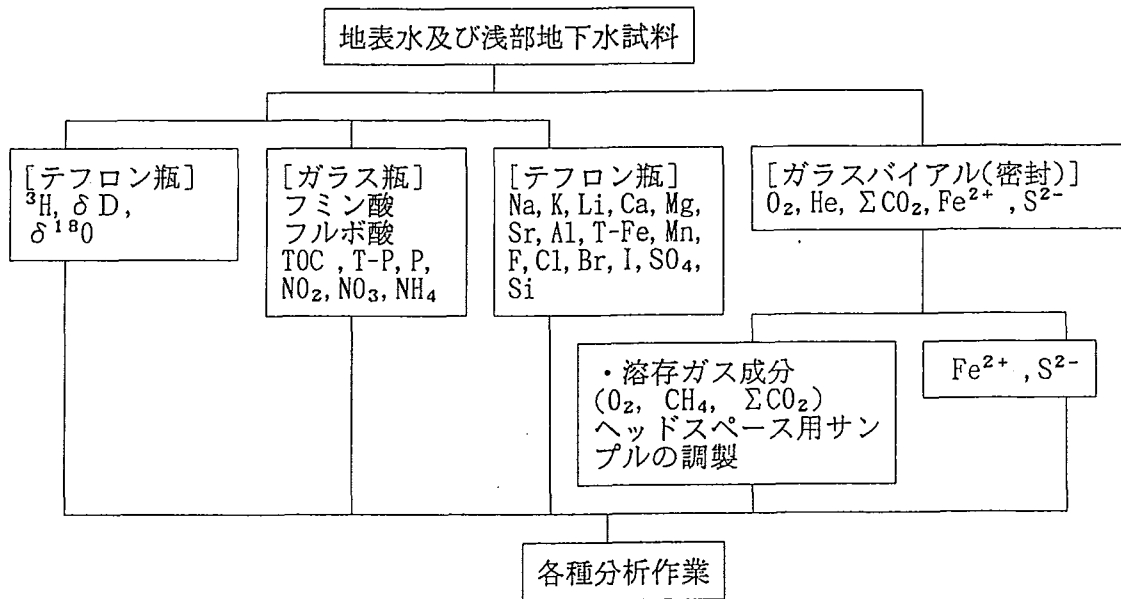


図2-3 地表水及び浅部地下水試料の採取から分析までの概略

(分析項目については、地表水、浅部地下水では異なるので、表1-1に示した項目に従って選定し、作業を進めた。)

2.3.1 O₂, N₂, He, H₂, CO, CH₄, ΣCO₂の定量用試料

地下水中の溶存気体を分析するために、地下水サンプラーにより採取した地下水試料を図2-4 に示すようなガラス製ガス採取管(1ℓ容量)に全量を移し、ガス成分分析に供した。以下の手順で、ステンレス製採水容器からガラス製ガス採取管に地下水試料を移した。

- ① ガラス製ガス採取管について真空引き及び任意の純ガス充填を5回繰り返し、容器内部を完全に任意ガスに置換した後に、容器内部を真空にした。このときの容器内部の圧力は約 -750 mmHg(デジタルマノメータの指示値による)であった。
- ② ①で得られたガラス製ガス採取管とステンレス製採水容器を注射針で連結し、ステンレス製採水容器内部の液相と気相をガラス製ガス採取管に移行させた(図2-4)。さらに、両者を連結させた状態のまま、ステンレス製採水容器に任意のガスを充填したテドラバックを注射針により連結し、ステンレス製採水容器内部の気相を全てガラス製ガス採取管に移した(図2-5)。なお、このときのガラス製ガス採取管内の圧力は常圧(1気圧)であった。
- ③ 試料に塩化第2水銀溶液(1 w/v%)を2 ml加えて生物活性を停止させた。ここで使用した任意ガスは酸素、窒素ガス測定用にはヘリウム(濃度99.99%)を使用し、水素、ヘリウム、一酸化炭素ガス及びメタンガス測定用にはアルゴンガス(濃度99.999%)を使用した。試料採取後から36時間以内に上記作業を完了した。

地表水試料は、ブチルゴム栓付きのガラス製バイアル瓶(120ml容)にヘッドスペースを残さないように採取し、さらにアルミシールを施して密封した。このバイアル瓶試料にデイスポーザブルシリンジを用いて塩化第2水銀溶液(1 w/v%)を添加し、生物活性を停止させ水冷保存して持ち帰った。得られた試水をシリンジにより採取し、別に任意のガス置換を行い、減圧状態(-200~-300mmHg)にしたバイアル瓶(120ml)に約30~40ml分注し、その後、必要があればテドラバックを用いて任意のガスを充填しバイアル瓶内の圧力を1気圧に戻した。この作業のうち、試水をシリンジで採取する際には、バイアル瓶内が減圧状態にならないように、液層と気層を分離し外部からの空気の汚染を防ぐためにN-ヘキサン(CH₃(CH₂)₄CH₃)を緩やかに注入させるような仕組みをとった(図2-6)。

採取した試水の分だけヘキサンを注入する方法は、メタン測定器において密封バイアル瓶から試水を自動採取するときに応用している。ここで水層とヘキサン層を無攪拌状態に

保持し、両層の接触面積を極力制限したときの水層からヘキサン層へのメタンの移行は1時間以内の接触では4%以下である（実験データ値、未公表資料）。したがって、他の無機ガスにおけるヘキサン-水系における分配係数及び水に対する吸収係数は、メタンとほぼ同程度であることから、いずれのガス成分においてもヘキサン層へのガス成分の移行は無視できるものと考えられる。地表水試料について、上記作業を試料採取後約36時間以内に完了した。

以上の様に調製した地下水、地表水試料を、酸素、全炭酸、メタンの各測定に供試した。

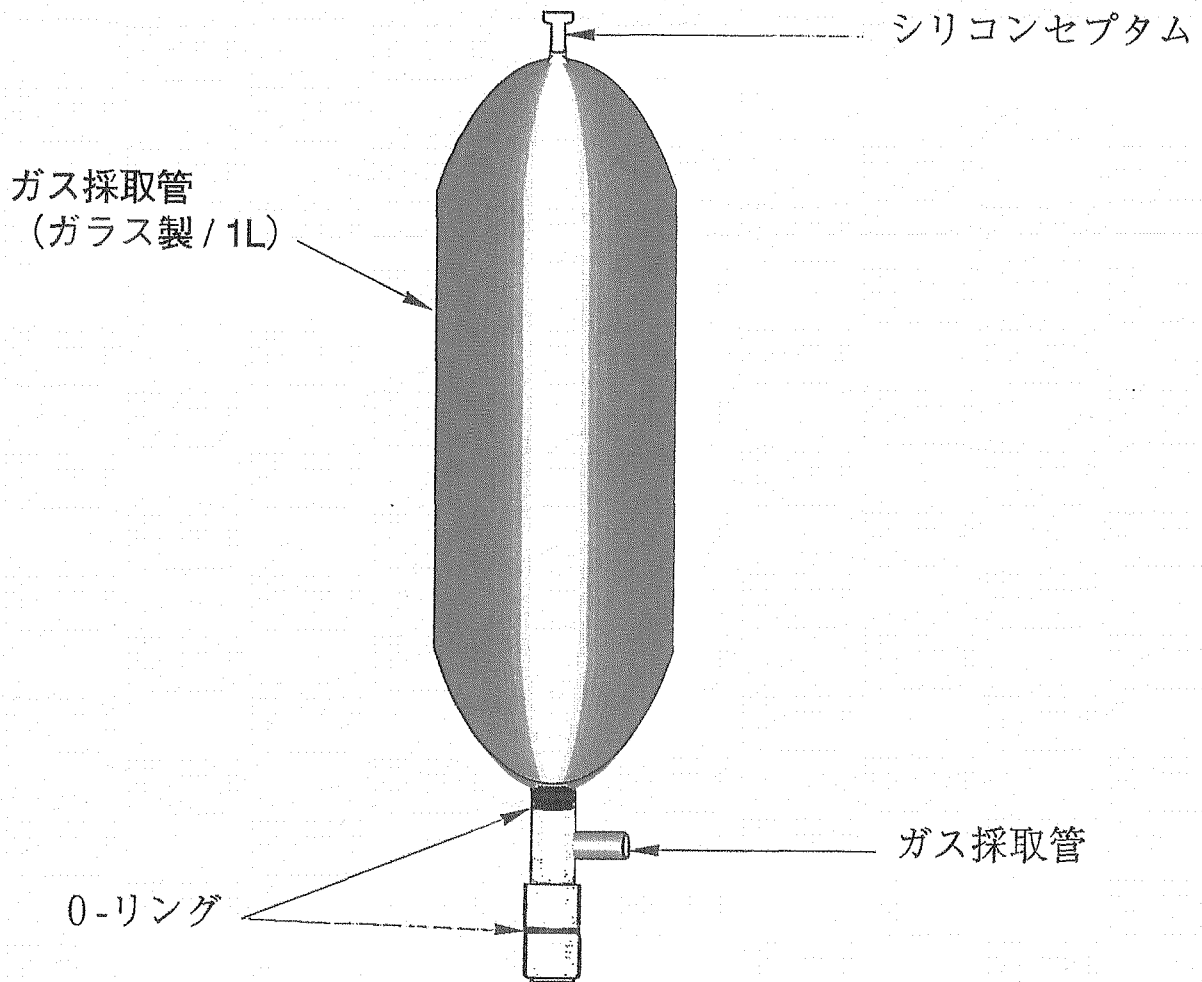
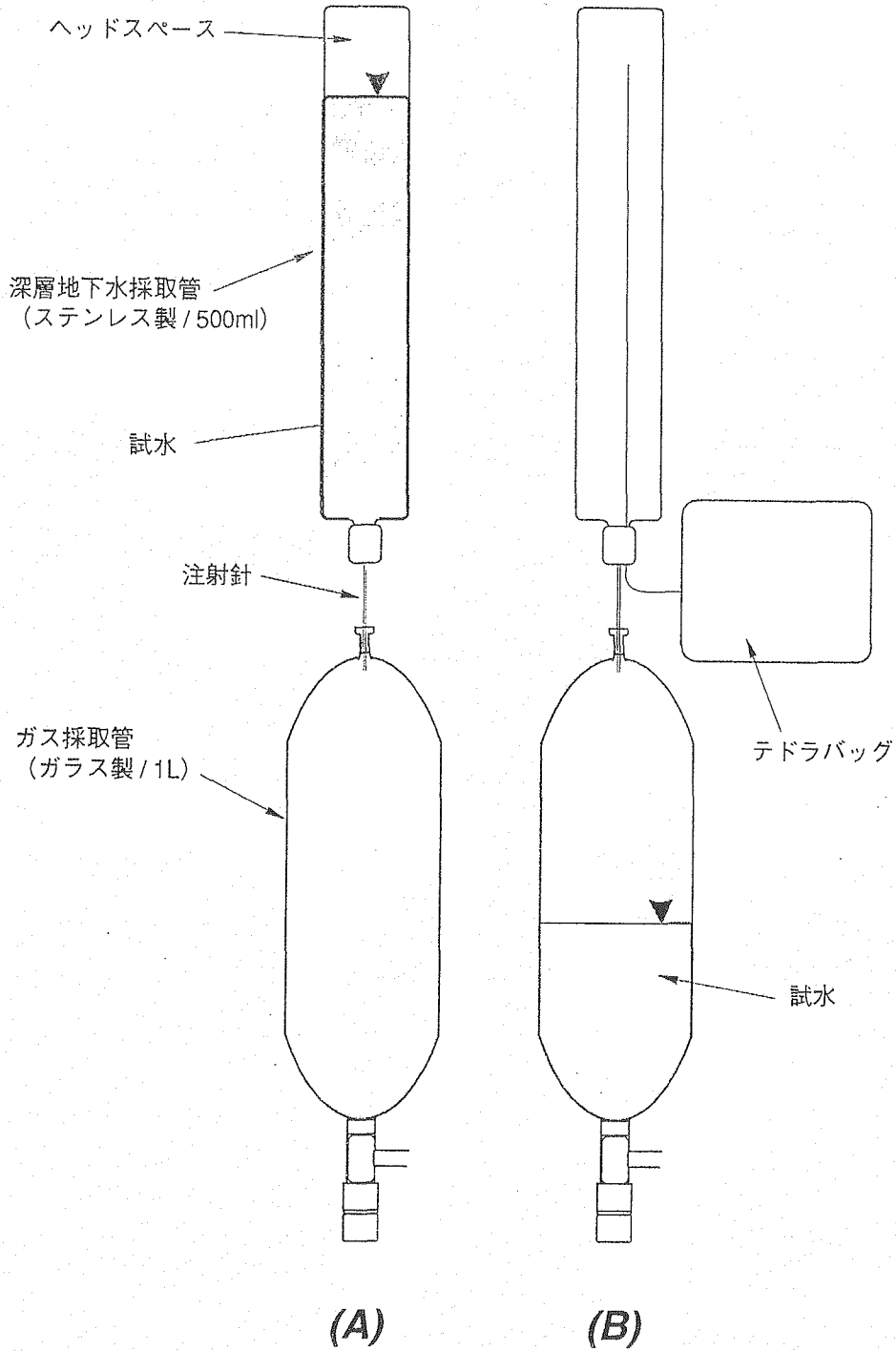


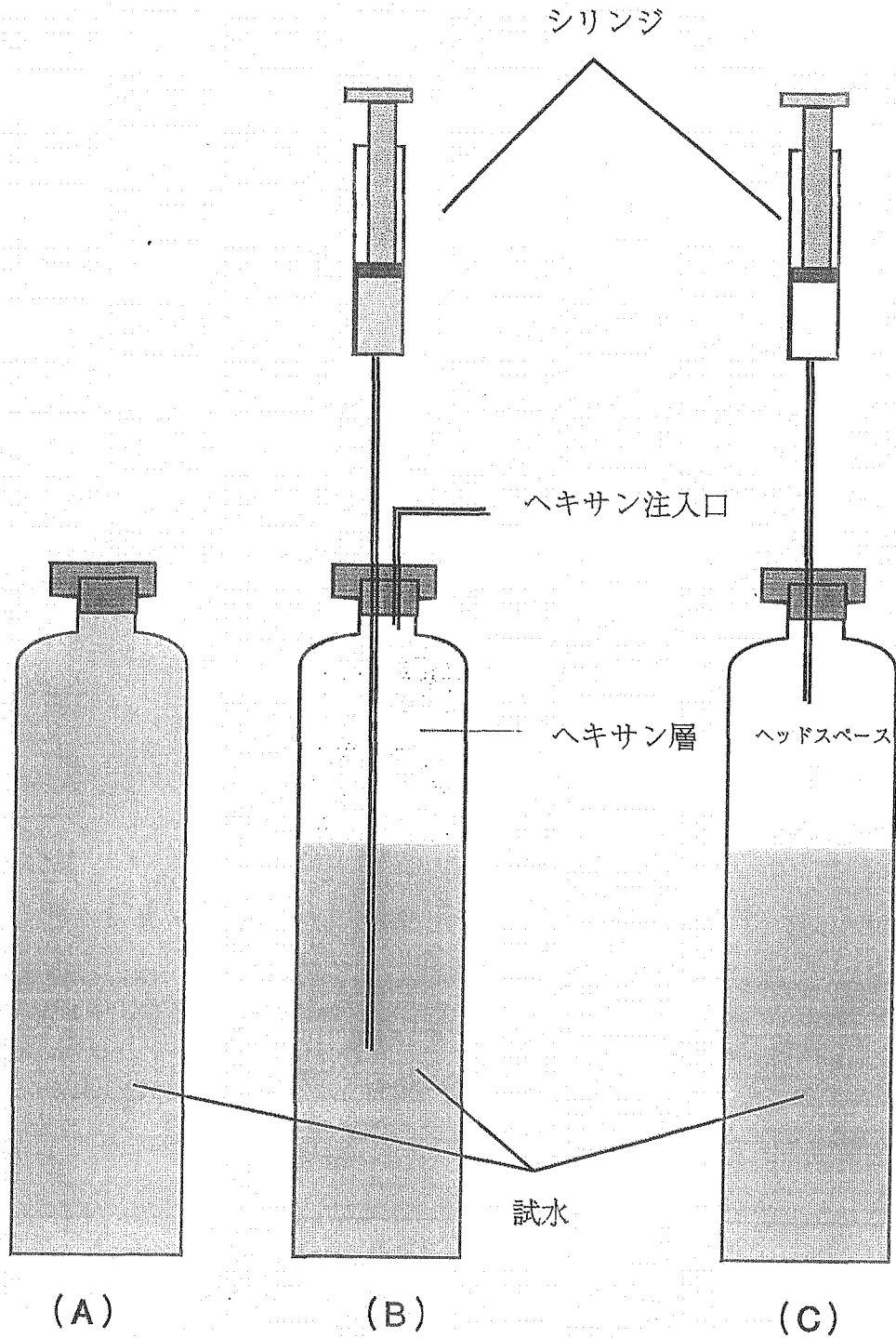
図2-4 ガラス製ガス採取管の概略

(採取容量：約1ℓ)



- (A) 深部地下水を汲み上げたステンレス製採水容器は、加圧状態にある。一方ガラス製ガス採取容器はアルゴンガスにより置換した後に減圧に保持した。これらの容器を両端注射針で連結すると、ステンレス容器内の地下水及びヘッドスペース中のガスが、ガス採取管に移行する。
- (B) 上記の移行現象は両容器の圧力が等しくなった時点で停止する。また、両容器の圧力はこの時点では1気圧以下である。テドラバッグを用いてアルゴンガスを充填し、ステンレス製採水容器内の試水及びガスをガス採取管に移行させる。

図2-5 地下水試料におけるヘッドスペース測定用試料の調整



- (A) 地表水を採取したバイアル瓶
- (B) (A) から注射器により試料を採取する。この時採取した試料と同量のヘキサンを注入しバイアル瓶内にヘッドスペースを作らない用にする。
- (C) アルゴンガスにより内部を置換した別のバイアル瓶に注射器を用いて試水を注入する。

図2-6 地表水試料におけるヘッドスペース測定用試料の調整

2.3.2 Fe²⁺, S²⁻の定量用試料

深部地下水中に溶存態の還元性物質(本調査項目では遊離 2 価鉄及び硫化物イオン)として存在していると予想される化学種の測定に供する試料は、前述の溶存ガス測定用試料と同様に地下水サンプラーを現場で分注せずに、実験室で注射器(20ml)により閉鎖系を形成し採取した試料を分析に供した。地下水試料の採取及び試料保存は溶存ガス成分測定試料水と同様の操作を行った。

2.3.3 TOC及びフミン, フルボ酸の定量用試料

深部地下水, 地表水及び浅部地下水は, 酸処理, 熱処理(450°C, 4時間), 紫外線照射処理の3工程の処理を施したスクリーキャップ付きバイアル瓶にできるだけ空気が残らないように分注した。これらの試料は直ちに2°Cに氷温保存した。TOC及びフミン酸・フルボ酸の定量用試料の採取までの操作概略を図2-7に示す。

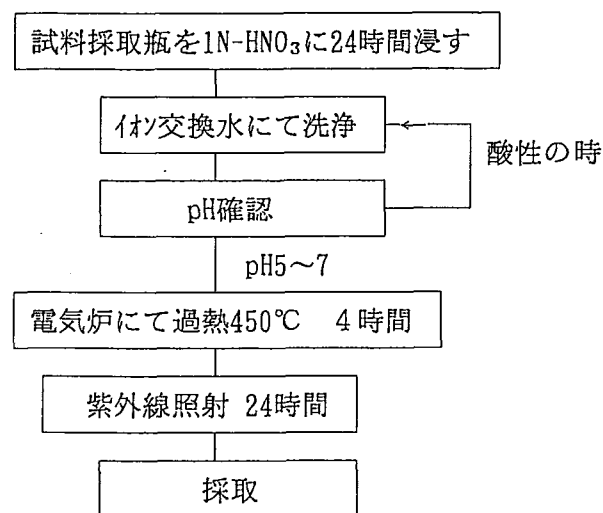


図2-7 TOC 及びフミン酸・フルボ酸の定量用試料の採取までの操作概略

2.3.4 Na, K, Li, Ca, Mg, Sr, Al, Total-Fe, Mnの定量用試料

深部地下水, 地表水, 浅部地下水は酸処理をしたテフロン製容器に分注し, 最終濃度として1(v/v%)になるように精密分析用硝酸を添加した後に氷冷保存した。

Na, K, Li, Ca, Mg, Sr, Al, Total-Fe, Mnの定量用試料採取までの操作概略を図2-8に示す。

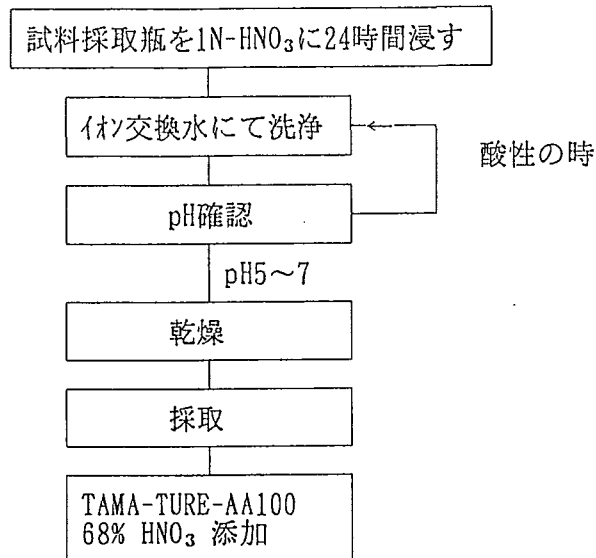


図2-8 Na, K, Li, Ca, Mg, Sr, Al, Total-Fe, Mnの定量用試料採取までの操作概略

2.3.5 F, Cl, Br, I, SO₄, P, N, Siの定量用試料

深部地下水及び地表水ともに、酸処理したテフロン製容器に分注し、氷冷保存して実験室に持ち帰った。なお、いずれの試料においても、懸濁物質濃度が極めて低かったため、グラスファイバーフィルターあるいはメンブレンフィルター等による濾過は行わずに分析に供試した。

リン(P)分析用試料に関しては、ガラス製バイアル瓶に採取した。またシリカ(Si)分析用試料瓶の洗浄には、蒸留水を用いた。これはイオン交換樹脂からのコンタミネーションを考慮したためである。また、窒素化合物(NO₂, NO₃, NH₄)定量用試料の採取容器に関しては塩酸によって洗浄し、24時間流水中に放置した後、イオン交換水にて洗浄、乾燥を行ったガラス製瓶に採取した。各項目における試料の採取までの操作概略をそれぞれ図2-9、2-10に示す。

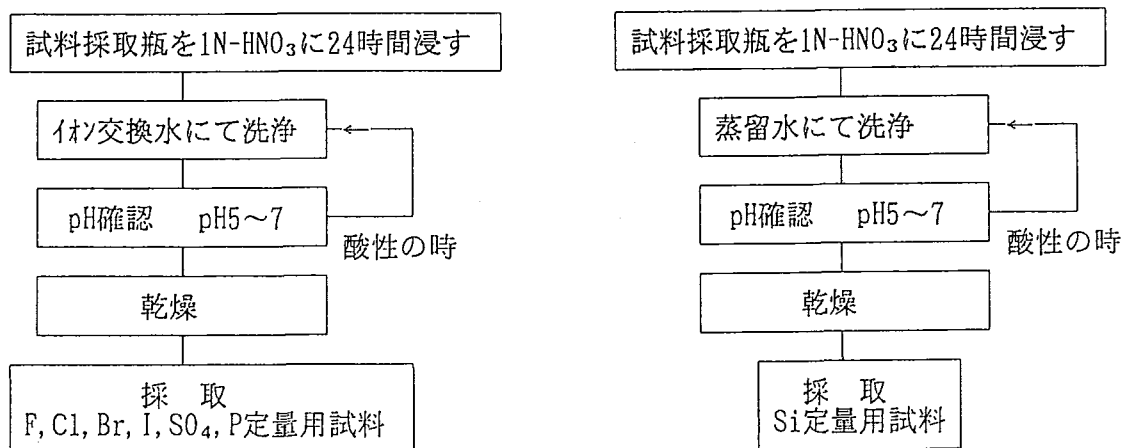


図2-9 F, Cl, Br, I, SO₄, P及びSiの定量用試料の採取までの操作概略

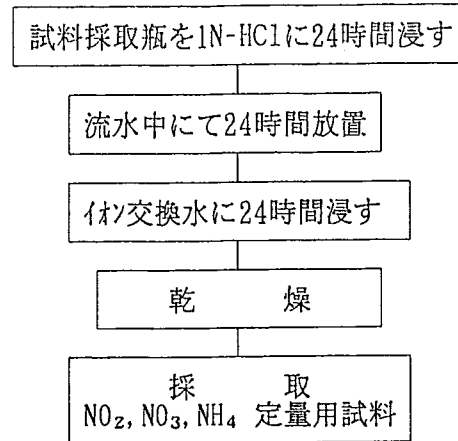


図2-10 NO₂, NO₃, NH₄定量用試料の採取までの操作概略

2.3.6 ³H, δD, δ¹⁸Oの分析用試料

深部地下水及び地表水ともに、酸処理した後イオン交換水によりよく洗浄し乾燥させたテフロン製広口瓶に採取した。各成分における採取量はそれぞれ、³Hで5ℓ、δD及びδ¹⁸Oで0.5ℓを目安とし、合計約5.5ℓ採取した。

2.3.7 バクテリア調査用試料

深部地下水のバクテリア調査に関する試料の採取は、オートクレーブにより121℃で30分の加熱滅菌済みの地下水サンプラーを用いた。

全菌数計数用試料は、現場においてシリンジを用いて地下水サンプラーのゴム栓部分から採取した地下水を抜き出し、ポリプロピレン製瓶に分注した。その後、直ちに中性ホルマリン（ホルマリンにホウ酸ナトリウムを30g/ℓ添加して使用）を2%になるように添加し、冷暗所に保存して持ち帰った。このとき使用したポリプロピレン製瓶は、予め、オートクレーブ滅菌後に無菌水(0.2μm以下)で洗浄したものである。地表水も深部地下水と同様に採取後直ちに中性ホルマリン(ホルマリンにホウ酸ナトリウムを30g/ℓ添加して使用)を2%になるように添加し、冷暗所に保存した。

深部地下水の生菌数計数用試料は、オートクレーブ滅菌済みの地下水サンプラーを用いて採取した試料を容器ごと約2℃に保った。実験室に持ち帰った地下水サンプラーからシリンジにより試料を採取し、各細菌の存在調査に供試した。

2.4 化学分析方法

2.4.1 モニター期間における各項目の測定方法

500m対応パッカー式地下水サンプラーを孔内に設置後、掘削水により汚染された地下水をパッカー間から除くためにモニター期間を設け連続的に地下水を採取した。この作業は、モニター分析結果の各測定項目の値が収束し、パッカー間がもともとその地層中に存在していた地下水で満たされていると判断されるまで行った。

採取した地下水は直ちに、アルゴンガス(99.999%)で満たされたグローブバック内で分注し、水温、pH、電気伝導度、酸化還元電位の順で測定した。またモニター化学分析としてSi、Na⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、HCO₃⁻、Cl⁻、F⁻及びウラニンの7成分に関して採水量3.5ℓ(パッカー間容量)ごとに分析を行った。

(1) 水温、pH、電気伝導度、酸化還元電位の測定

還元物質を含む溶液に対するpH及び酸化還元電位の測定を大気中で行うと、還元物質と酸素の化合及び、酸素の溶存によって重大な誤差を生じさせる原因となる。そこで、グローブバック内をアルゴンガスで置換し、その中で地下水を分注し、水温、pH、電気伝導度、酸化還元電位の測定を行った(表2-2)。

水温、pH、及び酸化還元電位はT0A電波工業社製RP-11Mによって測定した。また電気伝導度は横河社製SC51によって測定した。なおpH及び電気伝導度の測定は、それぞれpH9.0標準溶液及びISOP標準海水を用い各測定毎にドリフト補正を行った。

表2-2 水温、pH、電気伝導度、酸化還元電位の測定方法及び誤差

測定項目	測定方法	精度及び誤差*
水温	水銀温度計及び電極	±0.1 (°C)
pH	ガラス電極法	±0.01
電気伝導度	電極法	2% (変動係数)
酸化還元電位	白金電極	±1 (mV)

*数値はカタログ値である。

(2) 各種化学成分のモニター分析

各種化学成分のモニター分析方法を表2-3に示す。試料は採取後、ポリプロピレン製容器に移した。この時、酸の添加等を行わず、出来るだけ迅速に分析するように心掛けた。やむを得ず試料を放置するときには、冷暗所にて保存した。

表2-3 各種化学成分のモニター分析方法

元素	測定方法
Si	ICP法
Na ⁺	ICP法
Ca ²⁺	ICP法
Mg ²⁺	ICP法
HCO ₃ ⁻	簡易滴定法
Cl ⁻	イオンクロマトグラフ法
F ⁻	イオンクロマトグラフ法

2.4.2 本採水における各項目の測定方法

地下水のモニター期間における測定結果には大きな変動がなく安定していたことから、パッカー間の孔内に満たされている地下水が掘削等によって汚染されていないと判定し、化学分析用の地下水試料を採取し分析を行った。各項目における定量方法を以下に記す。

(1) 全有機性炭素(TOC)

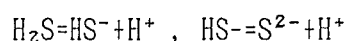
ガラス瓶にて持ち帰った試料を濾過せずTOC分析装置(ベックマン社製, 915-B)を用い赤外吸収による乾式法により測定した。すなわち、試料を希塩酸によりpH=4以下に調整し、その後純窒素ガスにてバブリングを行い炭酸ガスを除去する。この調製された試水をTOC測定系に導入して分析を行った。

(2) Fe²⁺

遊離2価鉄については小山(1991)が示した吸光光度法により分析した。試料水は濾過せず用いた。遊離2価鉄の定量は、2,2'-ジピリジル(2,2'-dipyridyl)により発色させた後に波長460 nmにおける吸光度を測定して求めた。

(3) 硫化物イオン

硫化物イオンは、ヨウ素滴定法及び電極法により測定した。いずれの方法においても試料中のH₂S, HS⁻, S²⁻の各々の濃度はpHとの関係より求める。硫化水素が水中に存在する場合は以下の2段の反応によりイオン解離が起こる。



ここで上式におけるイオン解離定数はそれぞれ以下のとおりになる(田村, 1988)。

$$K_1 = \frac{[\text{HS}^-][\text{H}^+]}{[\text{H}_2\text{S}]} = 9.55 \times 10^{-8} \quad K_2 = \frac{[\text{S}^{2-}][\text{H}^+]}{[\text{HS}^-]} = 1.259 \times 10^{-14}$$

水中硫化物イオン種の相対存在比を考える場合 K_1 は K_2 に対して極めて小さいイオン解離であることを示している。したがって $[\text{S}^{2-}]$ は他のイオン種に対して無視出来る濃度である。

pH9.8の天然水に溶存している H_2S , HS^- のモル比はイオン解離定数より $[\text{H}_2\text{S}]$: $[\text{HS}^-]$ は1:150と計算することができる。このように求めた濃度は溶液のイオン強度及びpHの測定誤差のため最大で10%程度の誤差が生じる。ヨウ素滴定法はJIS K 0102に準じて行った。

電極法による硫化物イオンの測定はBaumann(1974)の方法に従っておこなった。シリンジを用いて試水を空気に触れないように還元剤を添加したアルカリ性溶液(Sulfide Anti Oxidant Buffer soln.)と1:1の割合で混合し、恒温水槽中で銀及び比較電極により電位差測定をして硫化物イオン濃度を求めた。

(4) F, Cl, Br, I, SO_4 ,

フッ素, 塩素, シュウ素, ヨウ素, 硫酸イオンは, イオン排除型イオンクロマトグラフィー(横河電機社製, IC-100)により測定した。分離カラムはイオン交換カラム(SAM3-075)プレカラムはPAM3-035を使用した。溶離液(4.4mM Na_2CO_3 / 1.2mM NaHCO_3), 除去液(15mM H_2SO_4)の流量はいずれも2ml/minとした。イオンクロマトグラフィーによる無機イオンの検出限界は, 目的物質により異なり, また他のピークのテーリング等によっても異なるが, おおよそ0.1 mg/lである。

(5) Na, K, Li, Ca, Mg, Sr, Al, T-Mn, D-Mn, T-Fe, D-Fe

Ca, Mg, Sr, Al, Mn, Feの各金属成分はICP(島津社製ICPS-1000Ⅲ)を用い定量した。なお, Al, Mn, Feについては, 標準添加法を取り入れた。またNa, K, Liは原子吸光(SEIKO-1製)を用い定量した。本方法における検出限界(mg/l)は前に示した順に各々0.08, 0.05, 0.09, 0.04, 0.08, 0.03, 0.04, 0.01(T-Mn, D-Mnとも), 0.04(T-Fe, D-Feとも)であり, 繰返し精度はすべての元素においておおよそ1%以内である。

ここで, Mn及びFeに関しT, Dの記載に付いては濾過処理の有無であり, Tは酸処理した試水を直接実験に供し, Dについては0.2 μm のフィルターで濾過を施した試水を用いた。

(6) 栄養塩類

栄養塩類の分析はオートアナライザー(テクニコン社製, AA II)を使用し, 大槻(1982, 1985)の示した方法に準じて測定した。アンモニウムイオンはインドフェノール青改良型吸光度法, 亜硝酸イオンはスルファニルアミドとNエチレンジアミンにより発色させる吸光度法(JIS K0102), 硝酸イオンはカドミウム還元カラムによる還元法(厚生省令第56号)により測定した。ここで硝酸イオンの定量において, 試料中の全ての硝酸イオンを亜硝酸イオンに還元して測定し, この値から別に測定した試料中の本来の亜硝酸イオン濃度の値を差引いて硝酸態窒素濃度を求めた。

オルトリン酸イオンはモリブデン青吸光度法と原理が同じである混合試薬吸光度法(Murphy and Riley, 1962)により定量した。

(7) Si

Siの分析は島津社製ICPS-1000IIIを用いたICP法により定量した。ICP法によるSiの定量操作概略を図2-11に示す。検出限界(mg/l)は0.1である。なおICP法における繰り返し精度は0.9%である。濾過せず直接ICPによって定量した値をT-Si, 濾過を施した試料に関する値をD-Siと表示した。

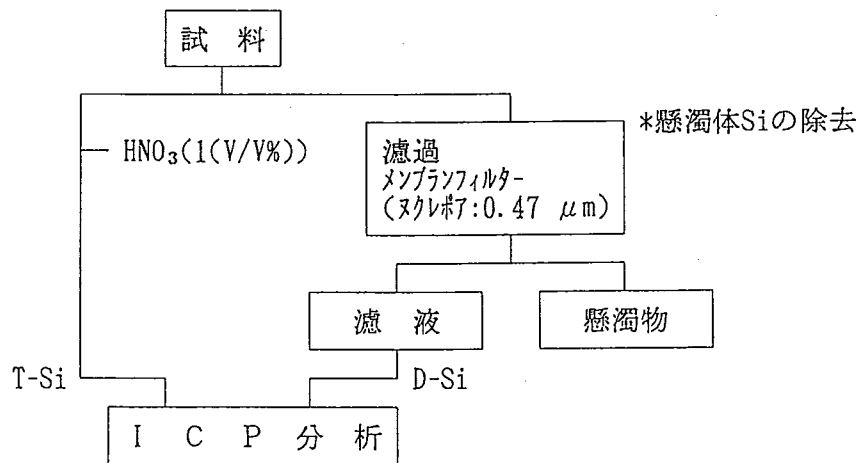


図2-11 Siの定量操作概略

(8) フミン酸及びフルボ酸

フミン酸及びフルボ酸の定量は, 松田ら(1979)の方法を一部改編して求めた。定量操作概略を図2-12に示す。試料1mlに対して0.1 M-EDTA溶液を1ml, アンモニア水-塩化アンモニウム緩衝溶液によりpHを9に調製し1時間静置した。この溶液に対して励起波

長320nm においてフミン酸(500nm) 及びフルボ酸(420nm) のそれぞれの蛍光強度を測定した。標準試料としては、フミン酸の定量は和光純薬製のフミン酸を精製したものをを使用した(図2-13)。また、フルボ酸は東京化成のリグニンスルホン酸ナトリウムを標準試薬とした。蛍光光度計は日本分光製821-FPを使用した。

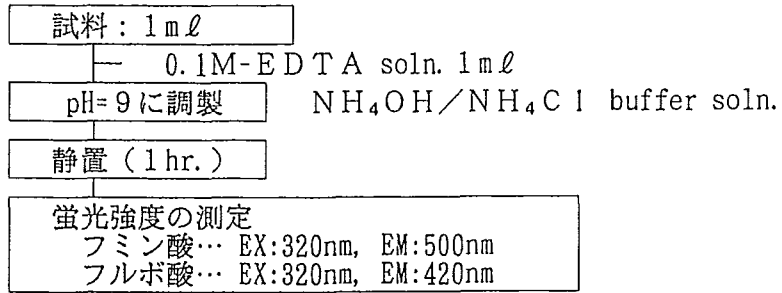


図2-12 フミン酸・フルボ酸の定量操作概略

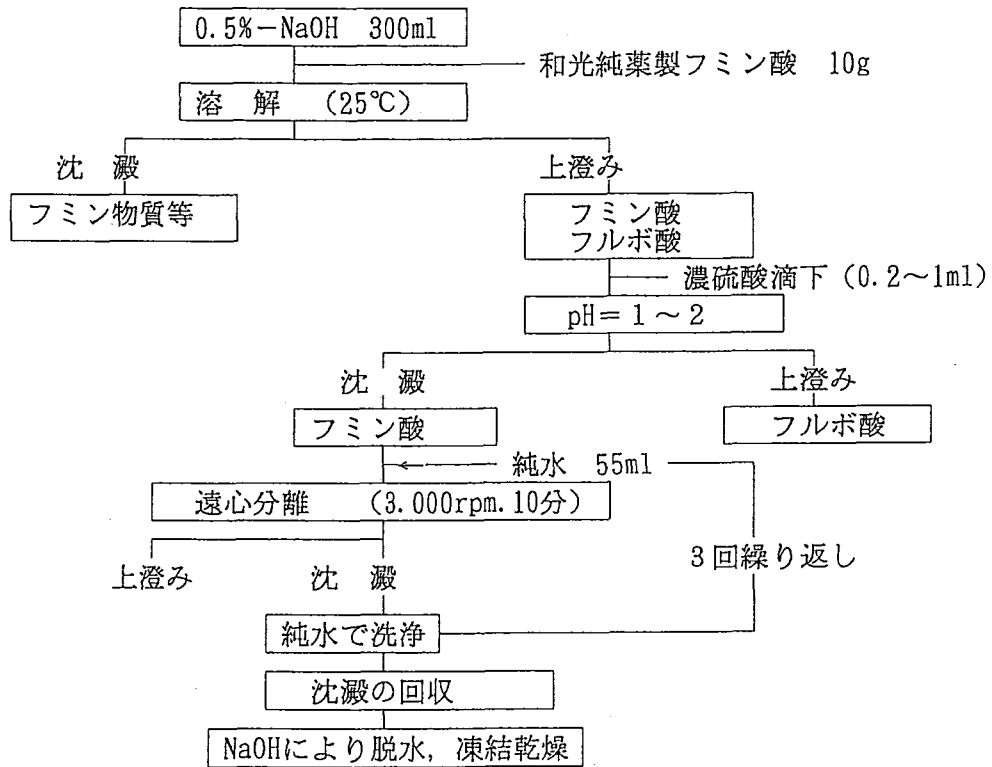


図2-13 フミン酸の精製方法操作概略

フミン酸及びフルボ酸の精製理由

現在、日本で入手可能なフミン酸の標準試薬は和光純薬製及びAldrich Chemical Co., Inc 製のものが代表的である。このようにして入手したフミン酸標準試薬について、定量・定性分析に使用する際には以下のことについて考慮しなくてはならない。

和光純薬が市販しているフミン酸には、目的とするフミン酸以外に、Ca, Mg等の金属、フミン酸、フルボ酸以外の物質(いわゆるフミン物質)等が混入している可能性が高い。一方Aldrich Chemical Co., Incのものは、混入する金属をNaで置換した物であるが、その他の不純物質については和光純薬のものと同等と思われる。以上の理由によりフミン酸として業者から購入した試薬については使用に際してフミン酸のみを精製する事が必要となってくる。リグニンスルホン酸ナトリウム及び精製したフミン酸のC:H:N含有量(%)は以下のとおりである。

リグニンスルホン酸ナトリウム	C:H:N= 25.3:3.41:0.51
精製フミン酸	C:H:N= 23.0:4.60:0.11

(9) ウラニン

予め、本調査孔掘削時に掘削水にトレーサーとして添加したウラニンを、採取した地下水の掘削時の汚染の影響を知るための指標として定量した。

試料中のウラニン濃度は蛍光測定により励起波長365nm、測定波長510nmで測定した。ただし、本調査における試料中のウラニン濃度は極めて低く、試料原液の蛍光波長特性からは検出できなかったために、標準添加法によっても測定した。すなわち、試料原液にウラニン濃度が0.05ppb~0.5ppbになるように添加し、最小自乗法により濃度と蛍光強度の関係直線式から濃度を求めた。

(10) 溶存ガス試料

溶存ガスの分析は二酸化炭素を除き、2.3.1項で述べたヘッドスペース部をガスクロマトグラフィーによって測定した。ガスクロマトグラフィーの測定条件を表2-4に示す。

ヘッドスペースサンプルの気相中の各ガス成分の濃度から分圧を算出し、液相中に溶存している各ガス成分量をHenryの法則に従いBunsenの吸収係数を用いて計算した。

表2-4 ガスクロマトグラフィーの測定条件

測定項目	測定方法	測定機器	備考
O ₂ N ₂	ガスクロ分析 (ヘッドスペース法) (グローブバック内) (置換ガス: アルゴンガス)	島津製 GC-14B	カラム : 内径3mm, 全長4m カラム充填剤 : モレキュラーシーブ5A 60/80メッシュ カラム温度 : 60°C 注入口温度 : 60°C 検出器 : TCD(10倍アンプ付き) 検出器温度 : 80°C キャリアガス, 流量 : アルゴン, 15ml/min
H ₂ He	ガスクロ分析 (ヘッドスペース法) (グローブバック内) (置換ガス: アルゴン)	島津製, GC-14B	カラム : 内径3mm, 全長8m カラム充填剤 : モレキュラーシーブ5A 60/80メッシュ カラム温度 : 60°C 注入口温度 : 60°C 検出器 : TCD(10倍アンプ付き) 検出器温度 : 80°C キャリアガス, 流量 : アルゴン, 30ml/min
CH ₄	ガスクロ分析 (バツ & トラップ) (グローブバック内) (置換ガス: アルゴン)	島津製, GC14B	カラム : 内径3mm, 全長8m カラム充填剤 : モレキュラーシーブ5A 60/80メッシュ カラム温度 : 60°C 注入口温度 : 60°C 検出器 : TCD(10倍アンプ付き) 検出器温度 : 80°C キャリアガス, 流量 : 窒素, 35ml/min

CO ガスクロ分析 島津製, GC6A
(ヘッドスペース法)
(グローブバック内)
置換ガス: アルゴン

カラム : 内径3mm, 全長3m
カラム充填剤: モレキュラーシーブ13X
60/80メッシュ
カラム温度 : 30°C
注入口温度 : 50°C
検出器 : メタン化反応装置付
水素炎付メタン化検出器
検出器温度 : 100°C
キャリアガス, 流量: 窒素, 30ml/min

ΣCO_2 赤外線吸収法 オータノグラフ製
(ヘッドスペース法)
(グローブバック内)
置換ガス: アルゴン

ヘッドスペース測定試料について,
その気相部を赤外線吸収により無機
炭酸を定量するIC分析装置に導入し
て測定した。(TOC-5000によるクロス
チェックも行った。)
H₂CO₃ } - 計算値
HCO₃⁻ }
CO₃²⁻ } (全炭酸濃度とpHの関係)

(11) δD

水試料は、ファインピペットを用いて5 μl を採取し、反応容器内(グリ-スラストフック 付
き石英段つき管)で約0.1gの金属亜鉛と、真空下450 °Cで反応させH₂ ガスを発生させる。
誤差は±1.5%である。

(12) $\delta^{18}\text{O}$

5mlの水試料はポリエチレン製注射器内にとり、これに1気圧, 30 mlのCO₂ ガスを
市販のCO₂ ボンベより導入し、よく振った後一度CO₂ をすてて溶存空気を追い出した
後、新しいCO₂ をいれる。これを25°C付近の恒温室で6時間以上放置する。この結果、
水-二酸化炭素間での酸素同位体交換反応により、二酸化炭素ガスは水の酸素同位体比よ
りも45.15 %ほど¹⁸Oに富む同位体組成に固定される。この二酸化炭素ガスから真空装置
を用いて水と空気を取り除いたのち、質量分析計で測定することにより試料水の同位体比
を算出する(Yoshida and Mizutani, 1989)。誤差は±0.15%である。

(13) ^3H

2 lの水試料は、いったん濾過され蒸留され電解濃縮される。これを繰り返して数 ml
まで濃縮しパカード 社2550TRI 液体シンチレーションカウンターで測定される。定量下限値
は0.3TR, 誤差は0.1TR である。

2.5 バクテリア調査方法

地下水のモニター期間における測定結果には大きな変動がなく安定していたことから、パッカー間の孔内に満たされている地下水が掘削等によって汚染されていないことを確認した後に、バクテリア調査のための地下水試料を採取し分析を行った。

各項目の調査方法を以下に記す。調査のフローシートを図2-14に示す。

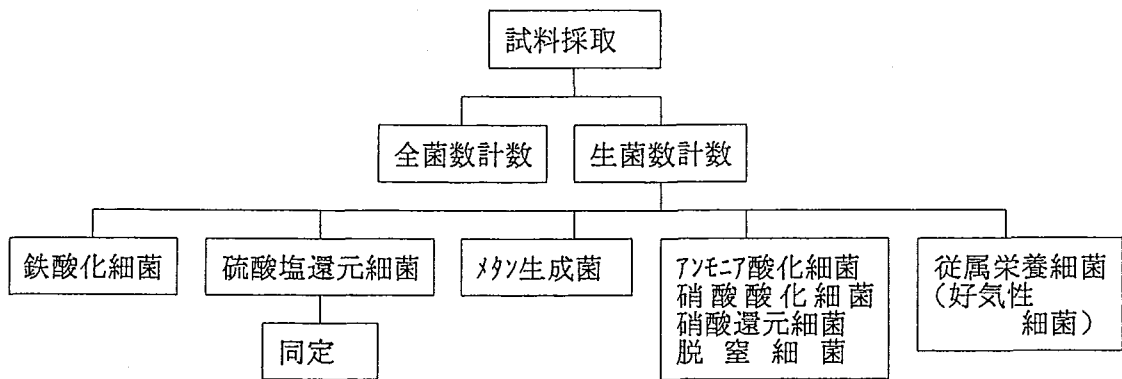


図2-14 バクテリア調査のフローシート

2.5.1 本採水における各項目の測定方法

(1) 全菌数計数

全菌数の計数は、Hobbie(Hobbie J.E. et al., 1977)らが示したアクリジンオレンジ染色法に準拠し行った。直径25mmのヌクレポアーフィルター(ポアサイズ: 0.2 μm)により試料を濾過し、その後アクリジンオレンジ0.01w/v %溶液により染色した。染色をしてから約30分後に、1試料につき3枚のプレパラートを作製した。そして、蛍光用エマルジョンオイルを用いて、蛍光フィルター(BG12)を付した落射型蛍光顕微鏡(オリンパス光学工業, model BH-RFL)により、倍率1500倍にて計数を行った。この時、アクリジンオレンジで染色された細胞は、蛍光励起によりオレンジないしは青色に発色する。これらの発色が認められるもののうち、明らかにバクテリア細胞と判別できるものについて計数した。したがって本法で計数された全菌数は、生菌・死菌に係わらず顕微鏡下で微生物の細胞と認識された全てのものの数である。なお、計数視野は、1枚のフィルターに付き20~40視野とした。

(2) 鉄酸化細菌

鉄酸化細菌のうち *Thiobacillus ferrooxidans* を計数した。

Thiobacillus ferrooxidans の計数には、SilvermanとLundgrenの計数培地を使用した。

その組成を表2-5 に示す。この培地は次のようにして調製した。オートクレーブ滅菌(120℃, 15分間)した [A] 液に, γ 線滅菌済みのミリポアフィルター(ポアサイズ0.2 μm)により濾過滅菌をした [B] 液を, 無菌的に混合した。

このように調製した液体培地を乾熱滅菌(180℃, 4時間)したアルミキャップ付き試験管(30ml容)に約20ml分注し, MPN(5本)法による計数用培地とした。なお, 1試料について2連で培養計数を実施し, 希釈段階は5段とした。このように用意した計数用培地に, 試料原液あるいは段階希釈試料を10v/v %接種し, 試験管ミキサー(ボルテックスミキサー)にて良く攪拌した。培養条件は30℃, 暗条件下において振盪培養した。培養期間は1ヶ月とし, 培養期間内において培養開始から5, 10, 15, 20, 30 日目に顕微鏡観察による生育チェックを行った。

本調査試料は, 水質測定結果(pHなど)から *T. ferrooxidans* の存在が極めて少ないと考えられ, 以上のような常法では, 適正な値が求め難いと判断された。そこで, 試料の接種量を常法よりも10倍増やし, 培養計数をMPN(3本)法により再度実施した。すなわち, 500 mlの三角フラスコに200 mlの液体培地を分注し, 試料原液あるいは段階希釈試料の接種量を20mlとした。この時の三角フラスコは, 綿栓を施し乾熱滅菌をしたもので, 使用した培地及び培養条件はMPN(5本)法の時と同じとした。

表2-5 *Thiobacillus ferrooxidans*計数用培地

試薬種類	添加量
[A] (NH ₄) ₂ SO ₄	3.0 g
KCℓ	0.1 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
Ca(NO ₃) ₂	0.01g
∕Ion Exchanged Water	500 ml
pH adjusted at 2.0 with H ₂ SO ₄	
[B] FeSO ₄ ·7H ₂ O	10.0 g
∕Ion Exchanged Water	500 ml
pH adjusted at 2.0 with H ₂ SO ₄	

(3) 硫酸塩還元細菌

MPN(5本)法と二重皿法の2種類の培養計数手法により, 計数を行った。使用した培地はPostgateの培地を一部改変したもので, その培地組成を表2-6 に示す。以下にMPN法及び二重皿法における手順を述べる。

MPN法は, 培地に寒天を0.3w/v%添加して半固体培地とし, 全量が15mlの試験管に培地10mlを無菌的に分注して使用した。試料は, 培地10mlに対して1mlの割合で接種し, ピペットの先端を培地中に挿入して空気との接触をできるだけ避けるようにした。接種後,

直ちに還元剤としてチオグリコール酸ナトリウムとアスコルビン酸ナトリウムを0.01%添加した1.5%寒天溶液により培地表面をシール、空気との接触を無くし、無酸素状態が保持できるようにした。試料接種が完了した培養試験管を、暗条件下、30℃で静置培養し、培養開始後、7日目及び14日目に計数を行った。なお、培養計数は、1試料につき2連で実施した。

二重皿法には寒天を1.5w/v%添加した固体培地を使用した。それ以外はMPN法とまったく同じである。試料の接種量は培地15mlに対して1mlである。培養条件もMPN法の時と同様である。なお、培養計数は1試料、1希釈段階につき2枚のプレートを作製し実施した。MPN法、二重皿法とも試料の希釈の際、希釈水には還元剤を培地と同様の割合で添加した生理食塩水(NaCl 0.85w/v%)を使用した。また、硫酸塩還元細菌の生育は、硫化鉄の生成による培地の黒変及び黒色コロニーの出現により判断した。

表2-6 硫酸塩還元細菌計数用培地

試薬種類	添加量
Yeast Extract(Difco)	1.0 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
NH ₄ Cl	1.0 g
Na ₂ SO ₄	1.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
Sodium Lactate	3.5 g
Agar-(1)	3.0 g
Agar-(2)	15.0 g
Ion Exchanged Water	1000 ml
pH adjusted at 7.2 with 1N-HCl soln.	

注) ・ Agar-(1)はMPN法, Agar-(2)は二重皿法の時である。
 ・ 培地にはオートクレーブ滅菌後、還元剤として濾過滅菌したチオグリコール酸ナトリウムとアスコルビン酸ナトリウムを、各々最終濃度が0.01%になるように添加する。

(4) メタン生成細菌

表2-7に示す組成の培地を用い、MPN(5本)法により培養計数を行った。培養容器にはシリコン栓の付いたガラス製バイアル瓶(120ml容)を、アルミシールで密封して使用した。培地の調製手順と計数方法を以下に記す。

表2-7に示す組成において、ビタミン混液、微量金属溶液及び炭酸水素ナトリウム溶液を除く組成の液体培地を、ガラス製バイアル瓶に分注し、アルミシールにて密封した後にオートクレーブ滅菌を行った。オートクレーブ滅菌終了後、まだ熱い間に、濾過滅菌したビタミン混液、微量金属溶液及び炭酸水素ナトリウム溶液をシリンジで添加し、その後、流水で冷却しながらバイアル瓶の内部を無菌的に水素/二酸化炭素(20/80)混合ガスで置

換した。ガス置換は、クリーンベンチ内において、滅菌済み注射針とγ線滅菌済みミリポアフィルター(0.2μm)を用いて、減圧とガス充填を数回繰り返した。この時、培地に加えたレサズリンの薄赤色が発色していないことを確かめ、完全な無酸素状態であることを確認してから、培養計数に使用した(ここで、レサズリンは、酸素が存在すると青~紫色を呈し、微好気環境下では薄赤色へと変わり、無酸素環境下では発色しない。すなわち、本培地の場合は透明となる。)。試料の接種及び希釈にはシリンジを使用し、グローブボックス内で作業を行った。なお、希釈液には、培地と等濃度の割合でレサズリンと還元剤を添加した生理食塩水を、培地調製時と同様に滅菌及びガス置換操作により調製したものを用いた。培養は暗条件下、25℃で静置培養し、培養開始後、30日、45日、60日、80日目に生育の判定を行った。生育の判定は、バイアル瓶のヘッドスペース部におけるメタンガスの有無で行った。メタンガスの定性分析は、ヘッドスペース部のガスをガスタイトシリンジで採取し、FIDを検出器としたガスクロマトグラフィー(島津社製,GC-14A)で行った。ガスクロマトグラフィーの測定条件は、分離カラム:PorapakQ 3m, 温度:45℃定温, キャリアーガス及び流量:窒素, 35ml/min, とした。

表2-7 メタン生成細菌計数用培地(門田 元, 多賀信夫, 1985)

試薬種類	添加量
ギ酸ナトリウム	2.5 g
酢酸ナトリウム	2.5 g
メタノール	2.5 ml
CaCl ₂	0.01 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.01 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
KH ₂ PO ₄	0.25 g
システイン塩酸塩	0.2 g
レサズリン	0.001g
イオン交換水	1000 ml
ビタミン混液	2.0 ml
微量金属溶液	10.0 ml
NaHCO ₃ (8% soln.)	65.0ml

(5) 亜硝酸細菌

NH₄-NをNO₂-Nへ酸化する無機栄養細菌をMPN法で計数した。亜硝酸細菌計数用培地の組成を表2-8に示す。この培地で27℃において静置・暗条件下において40日間培養する。亜硝酸細菌の生育の有無は、亜硝酸生成の定性試験から判定する(須藤隆一, 1989)。

表2-8 亜硝酸細菌計数用培地

試薬種類	添加量
(NH ₄) ₂ SO ₄	6mg-N
KH ₂ PO ₄	100 mg
EDTA-Fe	6 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	50 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	20 mg
NaHCO ₃ ¹⁾	200 mg
CaCO ₃	少量
石英砂	少量
／イオン交換水	1000 ml

1)ろ過滅菌して加える

(6) 亜硝酸酸化細菌

NO₂-NをNO₃-Nへ酸化する無機栄養細菌をMPN法で計数した。硝酸細菌計数用培地の組成を表2-9に示す。この培地で27℃において静置・暗条件下において60日間培養する。硝酸細菌の生育の有無は、硝酸生成の定性試験から判定する(須藤隆一, 1989)。

表2-9 硝酸細菌計数用培地

亜硝酸細菌計数用培地の(NH ₄) ₂ SO ₄ を次のものに代える	
NaNO ₂	6mg-N

(7) 脱窒細菌

脱窒細菌とは、嫌気条件下で硝酸呼吸によりNO₂-N及びNO₃-NをN₂やN₂Oに還元する細菌の総称である。ここでは試料を嫌気条件で培養し、ガス生成の有無からMPN法で脱窒細菌数を計数した。脱窒細菌計数用培地の組成を表2-10に示す。この培地とダーラム管の入った試験管に検体を接種し、28℃で14日間培養する(須藤隆一, 1989)。培養前の培地は、ブロムチモールブルーによって緑色を呈しているが、NO₃⁻が消失すれば培地がアルカリ性になるので濃青色となる。これが脱窒によるものであれば、ダーラム管中に気泡がたまる。したがって、濃青色に変化し、かつ気泡がたまった試験管を陽性管とする(土壤微生物研究会, 1992)。

表2-10 脱窒細菌計数用培地

試薬種類	添加量
[A]	
KNO ₃	1.0 g
アスパギン	1.0 g
BTB溶液(1w/v%)	5 ml
/イオン交換水	500 ml
1)BTB溶液	
プロムチモールブルー	1.0 g
エタノール	100 ml
[B]	
クエン酸ナトリウム	8.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0 g
FeCl ₂ ·6H ₂ O	0.05 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.2 g
/イオン交換水	500 ml
[A] と [B] を混合しpH7.0~7.2に調整する	

2.5.2 硫酸塩還元細菌の同定

硫酸塩還元細菌の存在が確認されたため、試料から硫酸塩還元細菌を1株分離し、分離株についてその属及び種の同定作業を行った。ここで、純粹分離は前項目 [2.5.1(3)] に示したMPN法による硫酸塩還元細菌の計数の際、最高希釈段階に出現した培養試験管から釣菌して純粹化を行った。

本調査で実施した硫酸塩還元細菌の純粹分離の操作手順を図2-15に示す。純粹株が得られたか否かについては、他の細菌群との混在のないこと、あるいは同じ硫酸塩還元細菌の複数種の混在のないことについて確認することにより、判定がなされる(表2-11参照)。すなわち、他の細菌群との混在(共生)については、従属栄養細菌、光合成硫黄細菌あるいは化学合成硫黄細菌の混在のないことを培養及び顕微鏡観察により確かめる。また、硫酸塩還元細菌の複数種の存在性については、顕微鏡観察により形態が単一であることから判断する。

したがって、得られた分離株は確率的に最も現存量の多い種である可能性が高いと考えられる。このようにして得た分離株について、形態学的試験、生理学的試験から属・種の同定を試みた。さらに、硫酸塩還元細菌の属及び種の決定の際、有用な情報となる化学分類手法(キノプロファイル法)及び遺伝学的手法(GC含量測定)についても試験を行った。以下に分離、純粹化から同定にいたるまでの方法を記述する。

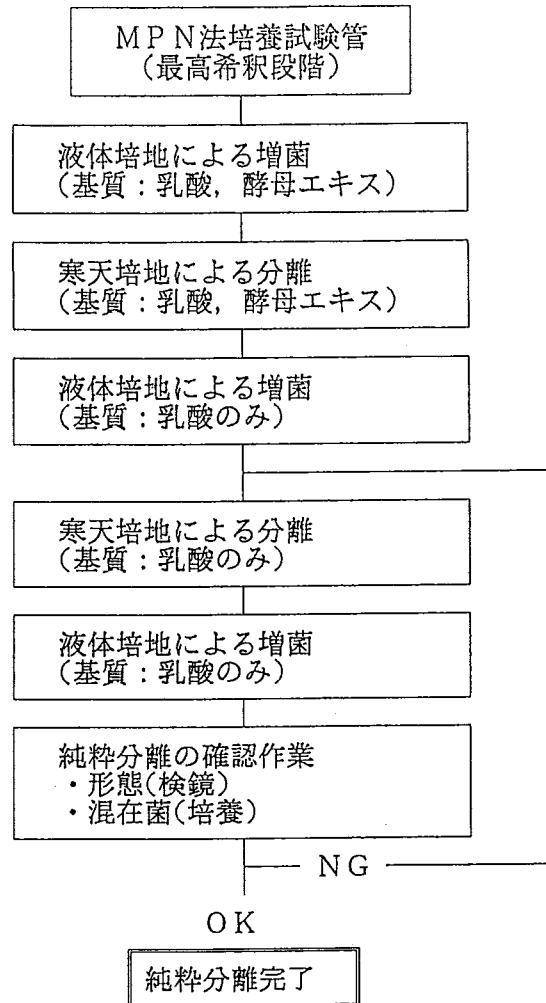


図2-15 硫酸塩還元細菌の純粋分離の操作手順

表2-11 硫酸塩還元細菌の純粋化における混在菌(群)の判定

対象細菌群	試験(判定)方法
好気性従属栄養細菌群	Nutrient(Difco社製)培地及び同培地に乳酸(最終濃度30mM)を添加したもので寒天平板培養(30°C, 1~2週間) ▽判定方法：増殖コロニーの確認
嫌気性従属栄養細菌群	Nutrient(Difco社製)培地及び同培地に乳酸及びブドウ糖(最終濃度30mM)を添加したもので重層寒天によりガスパック嫌気培養(30°C, 2~3週間) ▽判定方法：増殖コロニーの確認
光合成紅色非硫黄細菌	BibleとPfennig(1981)の培地で寒天混釈法により嫌気・明培養(30°C, 3週間) ▽判定方法：増殖コロニーの確認
光合成紅色硫黄細菌	PfennigとTruper(1974)の培地で寒天混釈法により嫌気・明培養(30°C, 4週間) ▽判定方法：増殖コロニーの確認
光合成綠色硫黄細菌 無色硫黄細菌群	光合成紅色硫黄細菌と同じ 光学顕微鏡(400倍)により観察 ▽判定方法：糸状性細胞の有無

(1) 分離及び純粋化

硫酸塩還元菌を分離するための試料は、2.5.1(3)で記述したMPN法における最高希釈段階で出現した試験管の培地の黒変部分を、パスツールピペットで採取することにより得た。

これを計数培地から寒天を除いた組成の液体培地に接種し、暗条件下、30℃で増菌培養した。次に増菌した培養液から1mlを採取、還元剤を添加した生理食塩水で希釈し、希釈液の1mlを38℃に保持した固体寒天培地と混合してシャーレにて嫌気培養を行った。このシャーレから出現したコロニーを再び液体培地に接種し、増菌を行った。ただし、ここから先の段階で用いる培地には、粉末酵母エキスを除外した。これは、共存する従属栄養細菌の増殖を抑え、硫酸塩還元細菌の単一コロニーを得るための配慮である。以後、固体寒天培地と液体培地による培養を繰り返して、両試料から硫酸塩還元細菌の分離株を1株得た。

(2) 同定操作

得られた純粋株に関して、形態学的試験及び生理学的試験等を行い属・種の同定を同定した。さらに同定結果の裏付けとして化学的分類手法(キノプロファイル法)及び遺伝学的手法(GC含量測定)を実施した。以下に試験の内容を記す。

(i) 形態学的試験

① 光学顕微鏡及び電子顕微鏡による細胞の形態観察

走査型電子顕微鏡(SEM)観察試料の調製手順を図2-16に示す。

② 運動能観察

③ グラム染色

グラム染色の手順を図2-17に示す。

④ 鞭毛観察

鞭毛染色の手順を図2-18に示す。

⑤ 孢子形成能試験

孢子形成能試験は、メチレンブルーによる単染色後、検鏡により孢子の形成を観察する。さらに生細胞懸濁液を、85℃で10分間加熱した後、Postgateの培地で培養し生育の確認を行う。ここで孢子形成能の有る細菌であるならば熱処理後も生育するが、非形成の細菌なら生育しない。

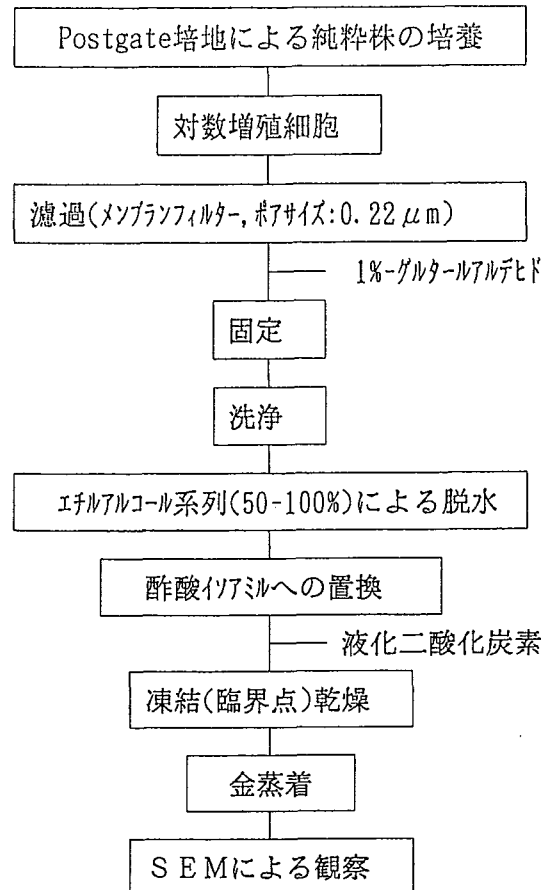


図2-16 走査型電子顕微鏡(SEM)観察試料の調製手順

走査型電子顕微鏡観察の手順

分離、純粋化した菌株をPostgate培地(液体)により30℃、暗条件下で培養した細胞懸濁液を走査型電子顕微鏡(SEM)用の試料とする。

SEM観察用試料の調製方法は、細胞懸濁液の上澄液をメンブランフィルター(ヌクレポアフィルター、ポアサイズ0.22 μm)により濾過し、適量の無菌水で洗浄する。続いてフィルター上に集めた細胞試料を1%グルタルアルデヒド(0.2Mリン酸緩衝液によりpH7.2に調製)で固定し、無菌水で洗浄する。得られたフィルターをエチルアルコール系列(50~100%)により脱水を行い、酢酸イソアミル-エタノール(1:1)、酢酸イソアミルを数回通して酢酸イソアミルに置換し、耐圧容器内で液体二酸化炭素により臨界点凍結乾燥を行う。凍結乾燥完了後、SEM用試料台に張り付け、真空蒸着装置で金蒸着する。以上の操作手順により調製した試料をSEMにより観察し、同時に写真撮影を行う。なお、使用したSEMはSIGMA-II(明石製作所製)を、真空蒸着装置にはQuick Co-ater SC-701(SANNYU-DENSHI製)を使用する。また、濾過試料固定用の1%-グルタルアルデヒドは電子顕微鏡用(和光純薬製)のものを使用する。

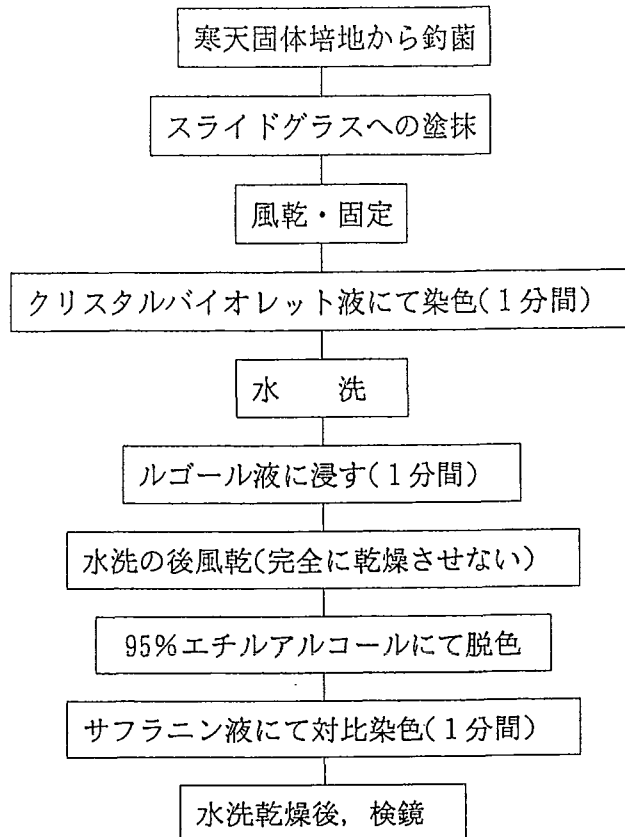
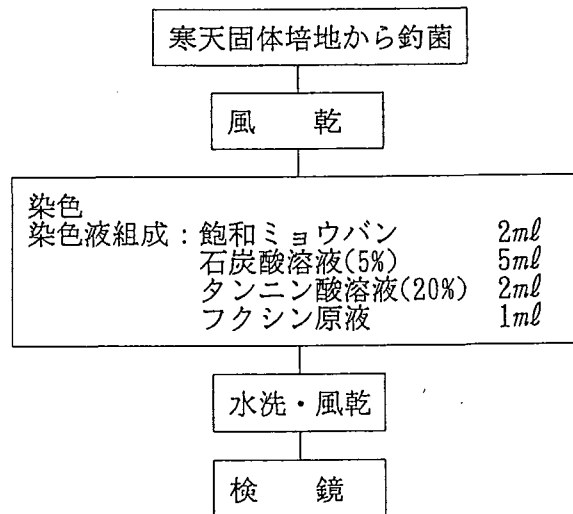


図2-17 グラム染色の手順



2-18図 鞭毛染色の手順

(ii) 生理学的試験

次の内容について試験を行った。

① 基質資化性(生育に利用できる炭素源の検討)

Postgateの培地から粉末酵母エキス及び乳酸を除き、これらの有機物源のかわりにリンゴ酸塩、ギ酸塩、酢酸塩、及びブドウ糖を添加した培地で培養を行い生育を観察する。また、硫酸塩の存在しない場合の基質の資化性についても試験を行う。この場合はPostgate

の培地の硫酸塩と有機物源を除き、かわりにピルビン酸あるいはコリンを添加した培地で培養を行い、生育を観察する。表2-12に基質資化性(生育に利用できる炭素源)試験の概要を示す。

- ② NaCl要求性
- ③ 好温性

表2-12 基質資化性(生育に利用できる炭素源)試験の概要

項目	内容
培養方法 培養容器	スクリーキャップ試験管(20ml) (空気の混入を避けて、培養液を試験管に満し密封)
培地組成	Postgateの培地を基本として、基質炭素及び硫酸塩の組成を変化させる a 硫酸塩の存在下： 乳酸塩 リンゴ酸塩 ギ酸塩 酢酸塩 ブドウ糖 b 硫酸塩の非存在下： ピルビン酸塩 コリン
培養温度等 増殖の判定	30℃, 暗所, 静置 試験管のまま細胞の懸濁状況を経時的に測定する。 測定は比色計にて、波長660nmの吸光度を調べる。

注) 培地に添加した全ての有機物基質は最終濃度を30mMとする。

(iii) 化学分類手法(呼吸鎖キノンの測定)

キノンは細菌の細胞膜に含まれる呼吸鎖や光合成電子伝達鎖の必須成分である。したがって、好気呼吸、嫌気呼吸、あるいは光合成によるエネルギー獲得形式を備えた細菌には全てこの成分が存在する。細菌の呼吸鎖キノンは、ナフトキノン型及びベンゾキノン型に大別され、各々、メナキノンとユビキノンに代表される。このキノン分子種は通常略して表される。すなわち、イソプレレン単位 n 個のメナキノン、ユビキノンは各々、MK- n 、Q- n のように表す。近年、真性細菌の属・分類群において、優占キノン分子種は例外なく決まっていることが明らかとされており、例えば、Paracoccusはユビキノン(Q-10)を、Pseudomonasはユビキノン(Q-8)を優占キノン分子種として持っている。このように細菌の属・種に固有の呼吸鎖キノンは、近年微生物の分類・同定に広く応用されている(Hiraishi, 1988, Dudley, 1980, 平石, 1990)。

本調査においても、地下水試料から分離した硫酸塩還元細菌のキノン分子種の分析を行い、同定の際の情報として採用した。

硫酸塩還元細菌は、Desulfovibrio, Desulfotomaculum, Desulfomonas, Thermode-

sulfobacterium, Desulfobulbus, Desulfobacter, Desulfococcus, Desulfosarcina, Desulfobacterium, Desulfonemaの10属, 約30種から成るが, 各々の優占キノンは属により異なる。すなわち, Desulfovibrioの多くはMK-6を, DesulfobulbusはMK-5を, その他の属の大部分はMK-7を主に優占キノ分子種として有することが知られている(Collins and Widdel, 1986, Widdel, 1988)。したがって, 本分離株の優占キノ分子種を分析することにより, 属レベルでの同定に関し有力な情報が得られると考えられる。細菌細胞からのキノンの抽出及び分離・定性操作の概略を図2-19に示す。図2-19に示したようにキノンの分析は以下の3段階に大別できる。

- ① 測定対象となる細菌の大量培養
- ② 抽出
- ③ 分離・定性の操作

以下に操作の詳細について記す。

- ① 測定対象となる細菌の大量培養

キノンを抽出するためには, 細菌細胞が湿重量として約5.0g必要となる。このため純粋株について大量培養を行った。大量培養には製瓶にPostagat培地から粉末酵母エキス及び硫酸鉄を除いたものを調製し, これと同じ液体培地で前培養(対数増殖期後半にある硫酸還元菌懸濁培養液)を1v/v%の割合で接種し, 嫌気・暗条件下, 30℃において約4~8日間培養した。次に大量培養された純粋株の細胞を遠心分離(14,000/rpm, 10min)により集菌し, 50mMリン酸緩衝溶液で数回洗浄した後に, フリーザで凍結させ, 凍結乾燥器により乾燥させた。ここで得られた乾燥菌体試料をキノン分析に供した。

- ② 抽出

①で得た乾燥菌体試料を50mMリン酸緩衝溶液(約50ml)に懸濁させ, この溶液に対して2~3倍量のクロロフォルム/メタノール(2:1, v/v)を加え, 超音波処理(2分間)を施し遠心分離後中間層及び下層を回収し, 濾紙(東洋社製5B)で濾過し, 残渣について同様の抽出操作を数回行う。ここで得られた粗抽出画分にヘキサン, 水を1:1の割合で加え抽出し上層を回収する。この抽出操作を数回繰り返す, 抽出溶液をエバポレーターで濃縮する。アセトンに濃縮物質を溶解し液体クロマトグラフィーの試料とした。

- ③ 分離・定性の操作

キノンの分離・定性には, 紫外検出器を備えた高速液体クロマトグラフ(日立分光LC

-800)を用いた。HPLCの測定条件は分離カラムにZobaxODS(4.6×250mm), 移動層にはメタノール/イソプロピルエーテル(3:1 v/v), 流速は1ml/分, カラム温度25℃である。各キノンの分子種のピーク同定はスタンダード試料と比較し, そのリテンションタイムにより判断した。

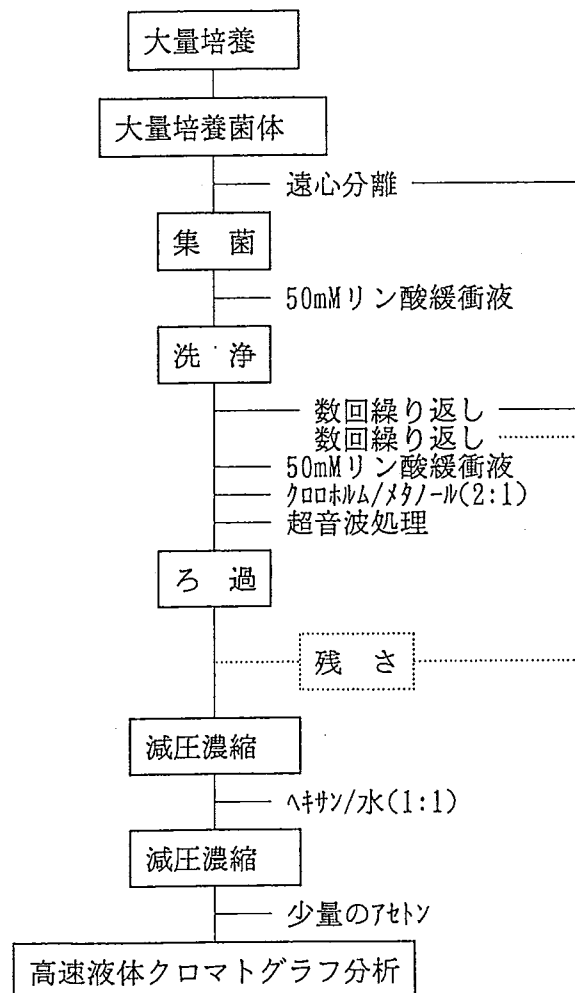


図2-19 キノン分析操作の概略

(iv) 遺伝学的手法(GC含量測定)

DNA塩基中に占めるグアニン(G)とシトシン(C)の割合は, 同じ塩基配列を持つ同一生物間では同じ値となり, 類似の塩基配列を持つ生物群では類似の値を示す。しかしながら, GC含量は単にDNA分子中の平均塩基組成比を示すに過ぎないことから, 全く異なる生物間(類縁性がない種間)でも同じGC含量値を示すことがある。したがって, 多くの表現形質が同じで且つGC含量も同じの場合に, はじめて分類学的に同じグループに包含できる。すなわち, 従来の細菌分類体系で用いられている形態学, 生理学的な情報の裏付けとしてGC含量の測定結果を用いることが望ましい。このように遺伝学的(GC含量測定結果)情報を利用することにより, より信頼性の高い同定が可能になるが, デー

タの取扱いには注意を要する。本調査においても、上述した概念に基づき、GC含量の測定結果を半ば補助的な情報として取り扱うこととする。

DNAの抽出・精製操作の概略(駒形, 1985, 金子, 1985)を図2-20に示す。DNAの熱変性曲線から全吸収増加の50%にあたる温度を変性温度(T_m)と呼ぶが、これよりGC含量は次式で求まる。

$$GC \text{ 含量}(GC \text{ mole}\%) = (T_m - 69.3) / 0.41$$

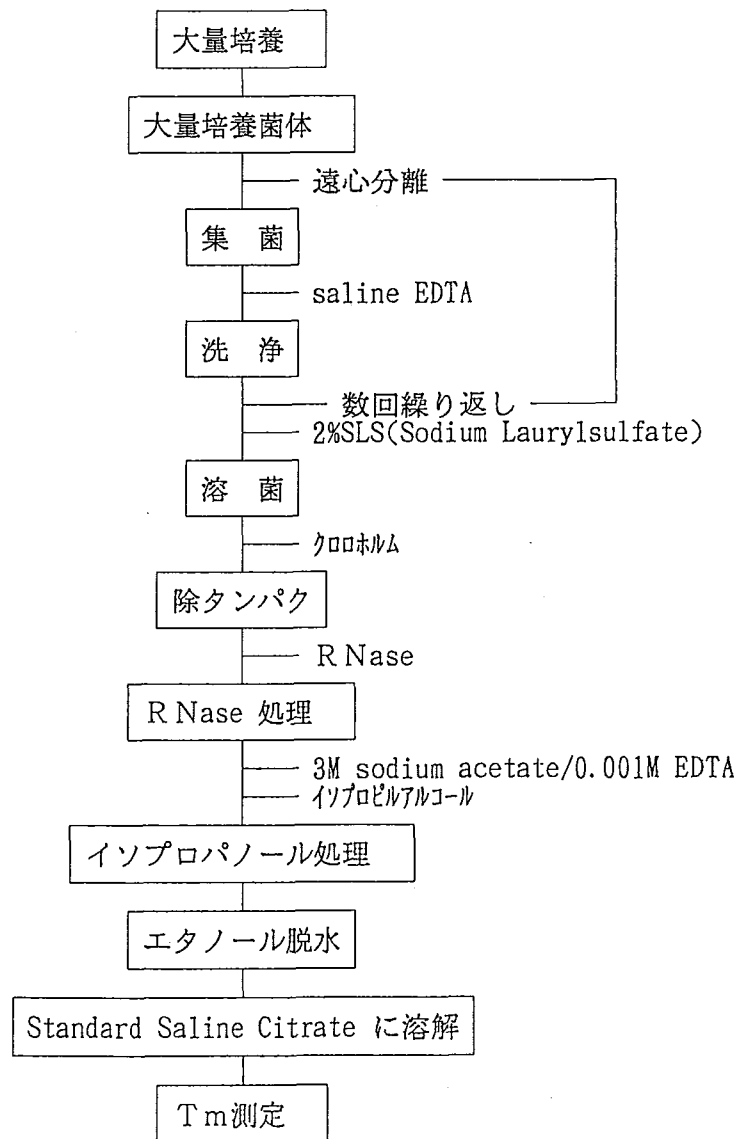


図2-20 DNAの抽出・精製からGC含量測定までの手順概略

3. 結果

3.1 モニター測定結果

(1) 水温

水温は、最高値で23.5℃、最低値で20.1℃、平均で21.6℃、標準偏差は0.9であった。水温の測定では、可能な限り迅速に測定を行っても地下水サンプラーの回収時に外気温の影響を受けることが考えられ、ばらつきが認められる。

(2) pH

pHは採水開始時に9.00と最も低い値を示し、その後採水の進行とともに上昇し、9.4付近で一定となった。

(3) 電気伝導度

電気伝導度では、採水の進行に応じて緩やかな減少傾向がみられた。25℃換算における電気伝導度の平均は0.449(mS/cm)、標準偏差は0.010である。25℃における電気伝導度の換算は以下の式に準じた。

$$(EC*(25-t)*2/100)+EC$$

ただし EC: 電気伝導度の測定値

t: 水温(℃)

(4) 酸化還元電位

酸化還元電位の連続測定結果をみると、明確な傾向は認められない。酸化還元電位の測定は、調査期間中に地下水が大気からの汚染を受けたかどうかあるいは、採水が順調に行われたかを判定する上で重要であると考えられる。

測定値はEh計算値で平均で291mV、標準偏差は9.9であった。

ORPの測定値からEhへの換算は、表3-1より以下の式を導き換算した。

表3-1 比較電極の電位

温度(°C)	電位(mV)
5	221
10	217
15	214
20	210
25	206
30	203
35	199

$$Eh(mv) = -(t-10) \times 0.6 + 217 + ORP$$

ただし t:測定時の水温(°C)

ORP:酸化還元電位の測定値

モニター測定結果を表3-2に示す。また水温, pH, 電気伝導度, Ehの統計計算結果を表3-3に示す。水温, pH, 電気伝導度, Ehの測定結果を図3-1に示す。

表3-2 モニター測定結果（その1）

採水回数	採水量 (ml)	累計量 (ml)	水温 C°	pH	ORP mV	Eh mV	EC mS/cm	EC25度 mS/cm	EC 水温 C°	備考
1	500	500	23.5	9.00	45	254	0.458	0.474	23.3	化学分析
2	500	1000	23.3	9.02	104	313	0.435	0.462	21.9	
3	500	1500	22.6	9.06	61	270	0.437	0.459	22.5	
4	500	2000	23.2	9.10	63	272	0.432	0.457	22.1	
5	500	2500	22.3	9.16	80	290	0.434	0.450	23.2	
6	500	3000	22.0	9.17	90	300	0.430	0.454	22.2	
7	500	3500	22.5	9.23	63	273	0.429	0.451	22.4	化学分析
8	500	4000	22.0	9.24	80	290	0.430	0.448	22.9	化学分析
9	500	4500	21.7	9.25	37	247	0.420	0.449	21.5	
10	500	5000	21.6	9.25	76	286	0.419	0.449	21.4	
11	500	5500	21.4	9.30	69	279	0.416	0.448	21.2	
12	500	6000	21.4	9.40	97	307	0.420	0.454	21.0	
13	500	6500	20.4	9.39	79	290	0.411	0.449	20.4	
14	500	7000	20.1	9.38	80	291	0.408	0.448	20.1	化学分析
15	500	7500	20.5	9.37	75	286	0.409	0.446	20.5	
16	500	8000	22.3	9.37	80	290	0.415	0.443	21.6	
17	500	8500	21.6	9.37	83	293	0.414	0.446	21.1	
18	500	9000	21.3	9.37	87	297	0.410	0.444	20.8	
19	500	9500	20.7	9.38	82	293	0.405	0.443	20.3	
20	500	10000	20.1	9.39	80	291	0.403	0.442	20.1	
21	500	10500	20.1	9.40	74	285	0.404	0.444	20.1	化学分析
22	500	11000	20.1	9.40	84	295	0.405	0.445	20.1	
23	500	11500	20.4	9.41	82	293	0.409	0.446	20.5	
24	500	12000	21.0	9.40	72	282	0.407	0.443	20.6	
25	500	12500	22.5	9.41	73	283	0.427	0.446	22.8	
26	500	13000	21.9	9.42	78	288	0.411	0.442	21.2	
27	500	13500	21.9	9.42	82	292	0.410	0.444	20.9	
28	500	14000	21.9	9.42	79	289	0.412	0.445	21.0	化学分析
29	500	14500	20.2	9.42	82	293	0.407	0.444	20.4	
30	500	15000	20.7	9.42	81	292	0.407	0.442	20.7	

表3-2 モニター測定結果 (その2)

採水回数	採水量 (ml)	累計量 (ml)	水温 C°	pH	ORP mV	Eh mV	EC mS/cm	EC25度 mS/cm	EC水温 C°	備考
31	500	15500	21.3	9.40	85	295	0.415	0.446	21.3	
32	500	16000	20.3	9.43	86	297	0.413	0.452	20.3	
33	500	16500	21.1	9.42	90	300	0.414	0.445	21.2	
34	500	17000	21.5	9.40	93	303	0.422	0.445	22.3	
35	500	17500	22.7	9.38	88	297	0.428	0.448	22.7	化学分析
36	500	18000	22.5	9.40	84	294	0.422	0.442	22.6	
37	500	18500	22.1	9.42	80	290	0.420	0.447	21.8	
38	500	19000	22.0	9.41	80	290	0.418	0.448	21.4	
39	500	19500	21.3	9.40	85	295	0.411	0.446	20.7	
40	500	20000	21.9	9.41	82	292	0.414	0.448	20.9	
41	500	20500	21.6	9.37	79	289	0.420	0.449	21.5	
42	500	21000	22.6	9.40	82	291	0.435	0.449	23.4	化学分析
43	500	21500	21.3	9.40	82	292	0.432	0.448	23.2	
44	500	22000	21.2	9.41	80	290	0.423	0.444	22.5	
45	500	22500	21.8	9.41	80	290	0.428	0.450	22.4	
46	500	23000	20.4	9.37	89	300	0.418	0.453	20.8	
47	500	23500	20.7	9.40	75	286	0.413	0.451	20.4	
48	500	24000	21.1	9.40	85	295	0.412	0.449	20.5	
49	500	24500	22.3	9.40	88	298	0.416	0.443	21.7	化学分析
50	500	25000	21.6	9.41	88	298	0.415	0.442	21.8	
51	500	25500	21.6	9.41	84	294	0.427	0.450	22.3	
52	500	26000	21	9.41	82	292	0.415	0.446	21.3	
53	500	26500	21.2	9.41	93	303	0.411	0.450	20.2	
54	500	27000	22.2	9.41	93	303	0.437	0.450	23.5	
55	500	27500	22.6	9.40	90	299	0.437	0.451	23.4	
56	500	28000	21.3	9.40	98	308	0.427	0.447	22.6	同位体
57	500	28500	21.6	9.40	85	295	0.428	0.454	22.0	同位体
58	500	29000	21.3	9.40	84	294	0.420	0.449	21.5	同位体
59	500	29500	22	9.40	80	290	0.426	0.452	22.0	同位体
60	500	30000	22.2	9.41	83	293	0.422	0.446	22.2	同位体

表3-2 モニター測定結果 (その3)

採水回数	採水量 (ml)	累計量 (ml)	水温 C°	pH	ORP mV	Eh mV	EC mS/cm	EC25度 mS/cm	EC水温 C°	備考
61	500	30500	21.6	9.41	81	291	0.424	0.448	22.2	同位体
62	500	31000	20.5	9.41	81	292	0.426	0.453	21.8	同位体
63	500	31500	23.4	9.40	88	297	0.414	0.450	20.7	同位体
64	500	32000	20.4	9.40	89	300	0.417	0.452	20.8	同位体
65	500	32500	22.0	9.41	80	290	0.429	0.452	22.3	同位体
66	500	33000	22.0	9.41	83	293	0.431	0.453	22.4	同位体
67	500	33500	23.3	9.42	90	299	0.435	0.453	22.9	一般分析
68	500	34000	21.3	9.40	82	292	0.435	0.452	23.1	一般分析
69	500	34500	23.3	9.41	83	292	0.432	0.450	22.9	一般分析
70	500	35000	21.4	9.41	86	296	0.423	0.453	21.4	一般分析
71	500	35500	23.1	9.42	88	297	0.424	0.449	22.1	濾過試料
72	500	36000	-	-	-	-	-	-	-	バケリ
73	500	36500	-	-	-	-	-	-	-	バケリ
74	500	37000	-	-	-	-	-	-	-	バケリ
75	500	37500	-	-	-	-	-	-	-	バケリ
76	500	38000	-	-	-	-	-	-	-	還元物質
77	500	38500	-	-	-	-	-	-	-	溶存気体
78	500	39000	-	-	-	-	-	-	-	溶存気体
79	500	39500	-	-	-	-	-	-	-	溶存気体
80	500	40000	21.1	9.41	88	298	0.422	0.456	21.0	予備
81	500	40500	21.3	9.41	84	294	0.424	0.455	21.4	予備
82	500	41000	21.5	9.41	82	292	0.423	0.453	21.4	予備

表3-3 測定値の統計計算結果

測定項目	水温 C°	pH	ORP mV	Eh mV	EC mS/cm	EC25度 mS/cm
最高値	23.5	9.43	104	313	0.458	0.473
最低値	20.1	9.00	37	247	0.403	0.441
算術平均	21.6	9.36	81	291	0.420	0.448
標準偏差	0.8	0.09	10	10	0.010	0.005

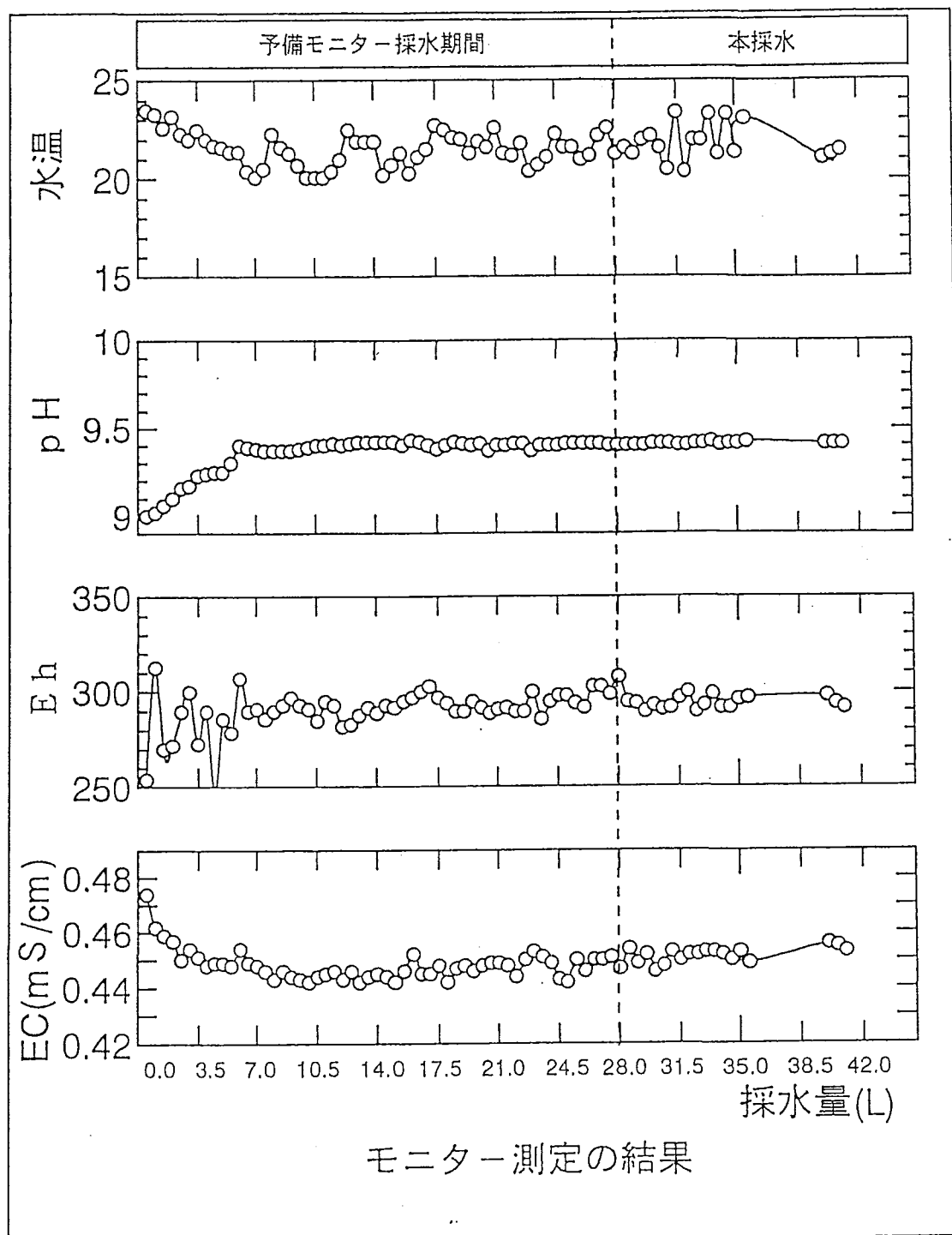


図3-1 モニター期間における水温、pH、Eh、電気伝導度の測定結果

(5) モニター化学分析の結果

採水量が3.5ℓ(以下D.V*1と記す)に達する毎に、Na, K, Ca, Mg, Si, Cl, F, アルカリ度(4.3BOX)及びウランの化学分析を行った。分析結果を表3-4に示す。また上記の成分のうち、Na, K, Si, Cl, アルカリ度に関して図3-2に結果を示す。図3-2よりモニター期間を通してパッカー間の地下水に顕著な水質変動は認められない。

表3-4 モニター化学成分分析結果

採水量*1	Na,	K,	Ca,	Mg,	Si,	Cl,	F,	Alk.	ウラン
D.V 0	93.7	0.01	tr.*2	tr.	8.52	61.8	tr.	2.63	tr.
D.V 1	96.4	0.01	tr.	tr.	8.76	50.9	tr.	2.62	tr.
D.V 2	97.5	0.01	tr.	tr.	8.63	50.3	tr.	2.61	tr.
D.V 3	98.0	0.01	tr.	tr.	8.64	50.4	tr.	2.62	tr.
D.V 4	97.9	0.01	tr.	tr.	8.71	50.2	tr.	2.64	tr.
D.V 5	97.5	0.01	tr.	tr.	8.70	50.4	tr.	2.72	tr.
D.V 6	96.8	0.01	tr.	tr.	8.70	51.2	tr.	2.64	tr.

(UNIT;ppm但しアルカリ度はmeq/L)
 *1:(Dead Volume;パッカー間容積=3,500ml) *2:(tr.;検出限界以下)

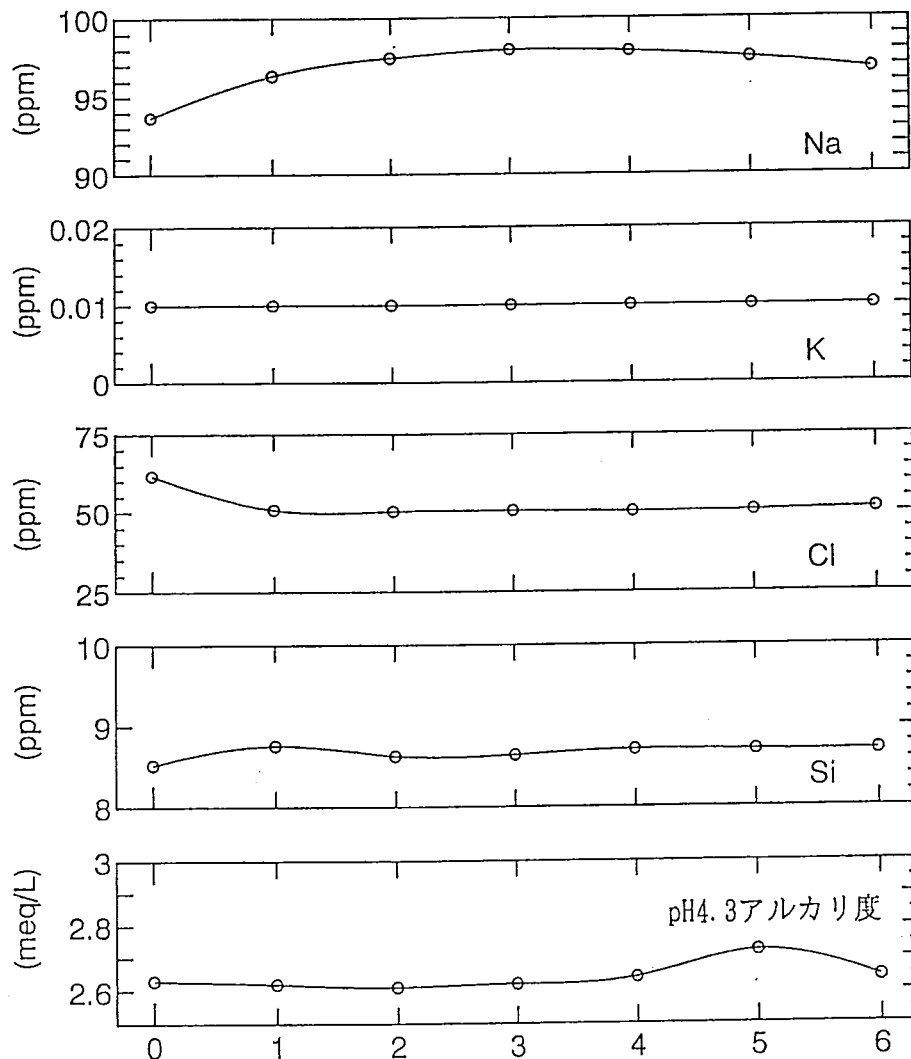


図3-2 モニター化学成分測定結果

(6) モニター期間のまとめ

ボーリング孔から地下水を採取して水質を測定する場合、最も注意しなければならないことは、掘削水の混入によって元来の地下水が変化している点である。

採水に際しては、掘削等によって生じた水質変化の影響がなくなったものを採水する必要がある。そのためには、採水区間に残っている掘削水等を汲み上げて、割れ目等からの浸透水と置換する必要がある。完全に置換させるためにはどの程度の汲み上げ量が必要であるかは、地下水位の位置、地層の透水性、ボーリング孔の深度等に影響されるので、一概に決定することはできない。そのため、各種モニター分析を行い、水質に係わる各測定項目の測定値が安定し、今後採水を続けても変化がないと予想される時点において、採水区間が汚染のない地下水に完全に置換されたと判断した。

本調査においては、pH、電気電導度及びEhは7ℓ（14回）程度から測定値は安定を示した。14回分の採水量は、3,500ccのパッカー間容量に対して、おおよそ9割の容量が汚染されていない元来の地下水で満たされたものと計算される(*)。また、モニター期間における総採水回数55回は、おおよそ99.99%が汚染のない地下水で置換されているものと計算される。

また、モニター化学分析から、陽イオン及び陰イオン共にそれほどの変動が認められない結果が得られている。

3.2 地下水分析結果

(1) 地下水の化学分析結果

深部地下水については、前述のようにモニター分析の結果から、採水区間が元来から存在していた地下水で完全に置換されたと判断し、化学分析及びバクテリア調査のための採水を行った。表3-5に、深部地下水及び比較のために採取した浅部地下水及び地表水の化学分析結果を示す。

溶存酸素ガスは、深部地下水では検出限界以下であったが、浅部地下水及び地表水ではそれぞれ検出されている。

* 実際の岩盤中には、割れ目帯中に浸透した掘削水等もあるため、掘削水等と元来の地下水とが下記のように理想的に入れ替わることについては、検討の余地が残されている。

各1回の採水によって、採水区間の容積3,500ccの地下水のうち、地下水サンプラーの容積500cc分(1/7)が元来の真の地下水で置換されると考えた。この考え方は次式で表すことができる。

$$C(\%) = (6/7)^n \times 100 \quad (C: \text{汚染した地下水}, n: \text{採水回数})$$

例えば、15回目の採水での汚染した地下水は、9.9%と計算される。

表3-5 化学分析結果一覧

分析項目	単位	深部地下水 分析値	浅部地下水 分析値	地表水	方法
O ₂	mg/L	N. D	1.27	7.2	GC-TCD
N ₂	mg/L	38.5	38.9	40.5	GC-TCD
H ₂	mg/L	0.12	N. D	-	GC-TCD
He	mg/L	0.05	N. D	N. D	GC-TCD
CO	mg/L	N. D	N. D	-	GC-FID
CH ₄	μg/L	N. D	N. D	-	GC-FID
ΣCO ₂	mg/L	15.2	25.6	11.1	NDIR
TOC	mg/L	1.23	1.43	1.28	NDIR
フミン酸	mg/L	0.25	N. D	N. D	蛍光
フルボ酸	mg/L	0.43	N. D	N. D	蛍光
4.3BX	meq/L	2.69	1.58	0.66	TYT
T-Si	mg/L	8.80	1.43	8.30	ICP
D-Si	mg/L	8.22	1.25	7.50	ICP
Na	mg/L	90.1	31.9	13.8	AAS
K	mg/L	3.8	0.890	1.75	AAS
Li	mg/L	N. D	N. D	N. D	ICP
Ca	mg/L	2.4	27.6	15.3	ICP
Mg	mg/L	0.24	9.82	5.76	ICP
Sr	mg/L	N. D	N. D	N. D	ICP
Al	mg/L	N. D	N. D	N. D	ICP
T-Fe	mg/L	0.19	1.56	0.650	ICP
D-Fe	mg/L	0.19	1.30	0.018	ICP
Fe ²⁺	mg/L	0.11	1.24	N. D	比色法
T-Mn	mg/L	N. D	0.108	N. D	ICP
D-Mn	mg/L	N. D	0.098	N. D	ICP
ΣS ²⁻	mg/L	N. D	N. D	N. D	滴定法
ΣS ²⁻	mg/L	N. D	N. D	N. D	電極法
F ⁻	mg/L	0.65	0.810	0.623	蒸留&電極
Cl ⁻	mg/L	0.72	0.737	0.542	HPLC
Br ⁻	mg/L	46.6	63.2	20.7	HPLC
SO ₄ ²⁻	mg/L	N. D	N. D	N. D	HPLC
SO ₄ ²⁻	mg/L	16.5	20.3	8.99	HPLC
PO ₄ -P	mg/L	0.021	0.062	0.085	比色法
NH ₄ -N	mg/L	0.087	0.115	0.114	比色法
NO ₂ -N	mg/L	N. D	0.009	0.008	比色法
NO ₃ -N	mg/L	0.066	0.067	0.124	比色法
Uranin	mg/L	N. D	N. D	N. D	蛍光法
δD	‰	-49.7	-	-49.6	
δ ¹⁸ O	‰	-8.7	-	-8.7	
³ H	TU	1.3	-	8.0	
電気伝導度(25℃)		0.446	0.456	0.214	電極法
pH		9.4	7.52	7.84	電極法
Eh		291	304	361	電極法

GC:ガスクロマトグラフィー; HS:ヘッドスペース法; P&T:パーティントラップ法; FID:水素化炭イオン化検出
 TCD:熱伝導度検出; AAS:原子吸光光度法; HPLC:高速液体クロマトグラフィー; ICP:イオン結合方式
 マ; T-:NON FILTER; D-:0.2μm FILTER; N. D:検出下限値以下; 4.3BX:4.3アルカリ度

深部地下水は地表水に比べて、ナトリウムイオンの増加(13.8mg/ℓ → 90.1 mg/ℓ), カルシウムイオンの減少(15.3mg/ℓ → 2.4mg/ℓ) 及びマグネシウムイオンの減少(5.76mg/ℓ → 0.24 mg/ℓ) が認められる。これらの分析結果に関する検討については、考察の項で記述する。

(2) 本調査における各試料水のイオンバランス

試料溶液は電氣的に中性であり、陰イオンと陽イオンの電荷の総計はつり合うはずである。実際には分析誤差等もあるため、以下の式(田村, 1988)に示される誤差範囲であれば、イオンバランスが成立しているものとみなされる。

$$\Sigma_{\text{ANION}} - \Sigma_{\text{CATION}} \leq (0.1065 + 0.0155 \Sigma_{\text{ANION}})$$

本試験結果のイオンバランスを表3-6 に示す。この表から、必ずしも上式を満足する結果が得られていない。この理由としては、CO₂ ガスをHCO₃⁻ 及びCO₃²⁻ として計算していることにより、陰イオンの総計が多少過剰なものと算出されたためと考えられる。

表3-6 本試験結果のイオンバランス

Σ_{ANION}	Σ_{CATION}	$\Sigma_{\text{ANION}} - \Sigma_{\text{CATION}}$	$0.1065 + 0.0155 \Sigma_{\text{ANION}}$
4.34	4.15	0.19	0.173 (深部地下水)
3.78	3.59	0.19	0.165 (浅部地下水)
1.88	1.43	0.45	0.135 (地表水)

但し、 $\Sigma_{\text{ANION}} = (\text{Cl}^- + \text{SO}_4^{--} + \text{NO}_3^{--} + \text{HCO}_3^- + \text{CO}_3^{--} \text{ (若しくは4.3BX)}; \text{unit meq/l})$
 $\Sigma_{\text{CATION}} = (\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Ca}^{++} + \text{Mg}^{++}; \text{unit meq/l})$

3.3 バクテリア調査結果

3.3.1 細菌数計数結果

本調査において得られた種々細菌の現存量の一覧を表3-7 に示す。また各種菌計数時の(MPN 5 本法)の陽性本数とMPN CODEを表3-8に示す。

表3-7 細菌数計数結果

調 査 項 目		地 下 水
全菌数(AODC)		(cells/ml) 7.2×10^5
生菌数	従属栄養細菌	CFU/ml 8.0×10^4
	アンモニア酸化菌	(MPN/ml) N.D
	亜硝酸酸化菌	(MPN/ml) N.D
	硝酸還元菌	(MPN/ml) 3.1×10^4
	脱窒菌	(MPN/ml) 1.3×10^4
	鉄酸化細菌	(MPN/ml) N.D
	硫黄酸化菌	(MPN/ml) N.D
	硫酸塩還元細菌	(CFU/ml) 4.6×10^3
(MPN/ml) 1.6×10^4		
メタン生成細菌	(MPN/ml) N.D	

表3-8 各種菌計数時の(MPN 5 本法)の陽性本数

硫酸塩還元計数時(MPN 5 本法)の陽性本数

希釈倍率	100	1000	10000	100000	1000000	MPN CODE	菌数 (MPN/ml)
地下水	5	5	5	4	0	1600	1.6×10^4
地下水	5	5	5	4	0	1600	1.6×10^4

硝酸塩還元計数時(MPN 5 本法)の陽性本数

希釈倍率	1000	10000	100000	1000000	10000000	MPN CODE	菌数 (MPN/ml)
地下水	5	5	0	1	0	31	3.1×10^4
地下水	5	5	0	0	0	23	2.3×10^4

脱窒菌計数時(MPN 5 本法)の陽性本数

希釈倍率	10	100	1000	10000	100000	MPN CODE	菌数 (MPN/ml)
地下水	5	5	5	4	0	130	1.3×10^4
地下水	5	3	5	4	0	130	1.3×10^4

3.3.2 硫酸塩還元細菌の同定結果

(1) 孢子形成能試験

深層地下水より純粋分離した硫酸還元菌1株について、図3-3に示す手順により、属名を決定した。硫酸還元菌は先ず孢子形成能により大別されており、孢子非形成群はDesulfobacterium, Desulfomonas, Thermodesulfobacterium, Desulfobulbus, Desulfobacter, Desulfococcus, Desulfosarcina, Desulfobacterium, Desulfonemaと判断することができる。本菌株について孢子形成能の有無を顕微鏡観察により調べた。結果として孢子形成能がない

ことから、本菌株はDesulfotomaculumではないことが明らかとなった。

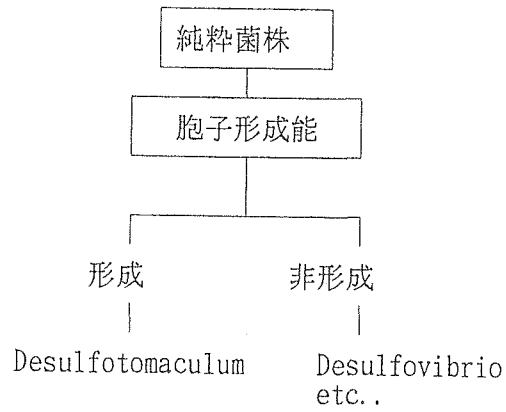


図3-3 硫酸塩還元菌の属の同定手順

(2) 形態学試験

本分離菌株の形態的特徴は、図3-4に示した電子顕微鏡写真から明確なように、不定形のシグモイド型である。別におこなった鞭毛観察では束毛が観察された。また、生菌の顕微鏡観察において運動性が観察された。このことから、本菌株はDesulfovibrio属の一種である可能性が高いことが示唆された。

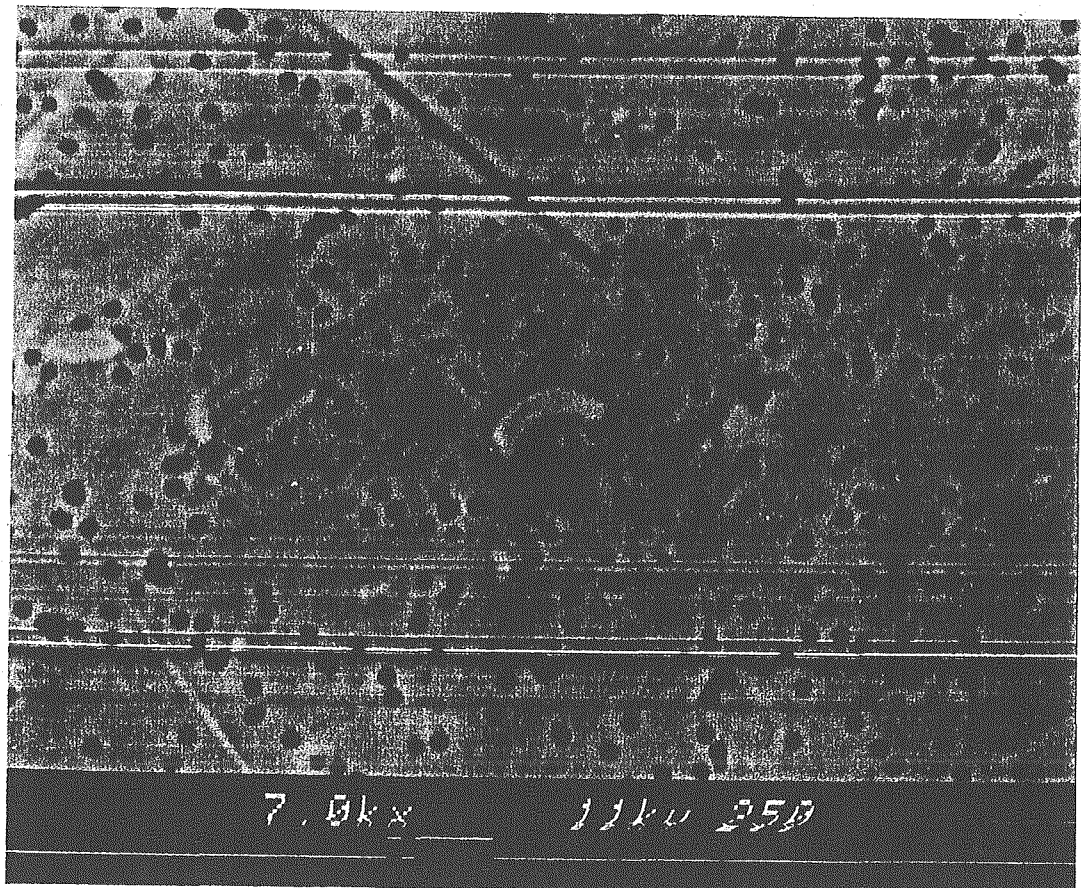


図3-4 硫酸塩還元菌の走査電子顕微鏡写真

(3) 種の同定

本菌株の形態、生理学的試験をおこなった結果について表3-9に示す。なお、表3-9には *Desulfovibrio* に属する代表的な種について Bergy's Manual 8th Edition (1974), Postgate (1979) 及び Widdel (1988) の記述から引用したデータを比較の為に併記した。表3-9から明らかなように、本菌株は形態学的、生理学的及び遺伝子学的にも *Desulfovibrio desulfuricans* であることが示唆された。

表3-9 形態, 生理及び遺伝学的試験結果一覧

	B株	<u>D.</u> <u>Desulfuricans</u>	<u>D.</u> <u>Desulfuricans</u> subsp. <u>aestuarii</u>	<u>D.</u> <u>vulgaris</u>	<u>D.</u> <u>saalexigens</u>	<u>D.</u> <u>africanus</u>	<u>D.</u> <u>gigas</u>
形態	シグモイド型	ビブリオ型	ビブリオ型	ビブリオ型	太いビブリオ型	シグモイド型	らせん型
幅(μm)	0.3	0.5~1		0.5~1	0.5~1	0.5	1.2~1.5
長さ(μm)	2~5	3~5		3~5	3~5	5~10	5~10
鞭毛	束毛	単極毛	単極毛	単極毛	単極毛	束毛	束毛
グラム染色	-	-	-	-	-	-	-
①基質資化性 (with sulfate)							
乳酸塩	+	+	+	+	+	+	+
リンゴ酸塩	+	+	+	-	+	+	-
ギ酸塩	-	±	?	±	±	±	±
酢酸塩	-	-	-	-	-	-	-
ブドウ糖	-	±	±	-	?	?	?
②基質資化性 (without sulfate)							
リンゴ酸塩	-	-	-	-	-	-	-
ピルビン酸塩	-	+	+	-	-	-	-
コリン	-	+	+	-	-	-	-
NaCl要求性	-	-	+	-	+	-	-
G + C mole%	62.4	55.3 ± 1		61.2 ± 1	46.1 ± 1	61.2 ± 1	60.2

4. 考察

4.1 地下水の年代

地下水中のトリチウム分析の主たる目的は、その地下水の滞留時間の推定にある（近藤ら, 1983）。大気中のトリチウム濃度は、1952年以後の大気中における熱核爆発実験によって急激に増加し、1963年には最大値が観測された。1995年現在では、ほぼ天然レベルの5～10TR（トリチウム・ユニットの単位）まで回復している。なお、降水中のTRは経年変化の他に季節変動が認められ、暖候季に高くなる傾向がある。地下水の年代(t)は次式より計算される。

$$t = \frac{T_{1/2}}{\ln 2} \times \ln \frac{N_0}{N}$$

$T_{1/2} = 12.43$ (年) トリチウムの半減期

N_0 = (TR)本地下水のトリチウム濃度

N = (TR)天然レベルの降水のトリチウム濃度 (推定値)

ここで、天然レベルの降水のトリチウム濃度の推定に関しては、その地下水が涵養された時期の推定値を代入しなくてはならない。本地下水は1.3TUであった。涵養当時の降水のトリチウム濃度が現在と同様に10～5TUの間であったと仮定すると、上式より地下水の年齢は36～24年と計算することができる。

4.2 地下水の安定同位体比

水の構成要素である酸素及び水素同位体組成は、水の起源を推定するための有力な情報を提供する。一般に本邦における降水（天水）の水の安定同位体比の関係は下式で表すことができる。 $\delta D - \delta^{18}O$ ダイアグラムを作成すると、この2つの直線の間日本における天水はプロットされる。また、本邦における降水の δD 及び $\delta^{18}O$ 値に対する高度効果は、それぞれ、 $-2\text{‰}/100\text{m}$ 及び $-0.2\text{‰}/100\text{m}$ と見積もられる（佐竹ら, 1982）。第4-1図に $\delta D - \delta^{18}O$ ダイアグラムを示し、本調査結果をプロットした。なお、図中に示される直線は以下のとおりである。

line 1: $\delta D = 8 \delta^{18}O + 16$: 太平洋側の天水の δD と $\delta^{18}O$ の関係

line 2: $\delta D = 8 \delta^{18}O + 26$: 日本海側の天水の δD と $\delta^{18}O$ の関係

本試験結果より地表水及び深部地下水の同位体比はほぼ同一点にプロットされる。これ

は、佐渡島に供給される天水が、高度効果が無視できるほど一定であるためと考えられる。深部地下水は地表水と起源を同じにしていると考えられ、海洋底からの深層海水の供給は同位体測定結果からは無いと判断される。

したがって、同位体測定結果からは、地表水がかん養され、深部地下水に移行していく過程で他の水が混入した形跡はみられず、深部地下水は単一の供給源（地表水）により形成されているといえる。

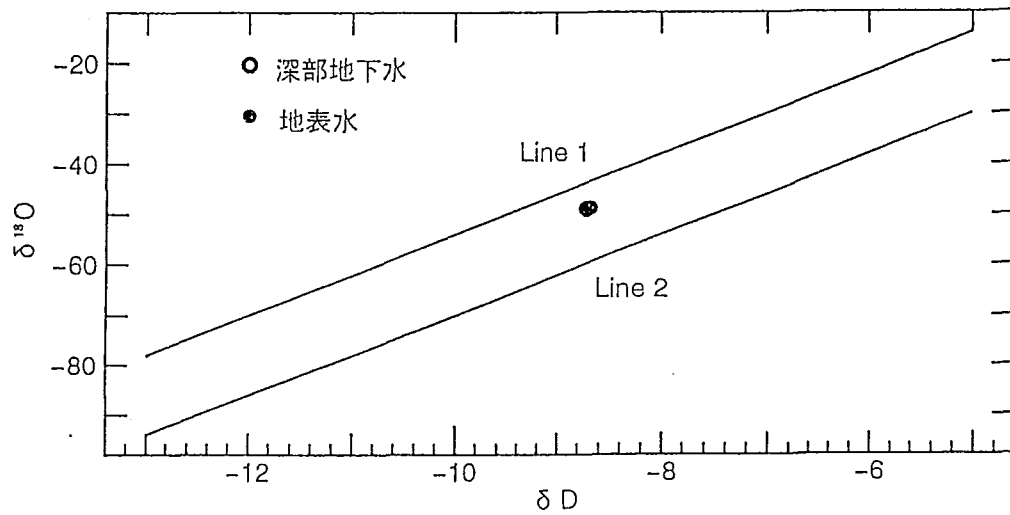


図4-1 $\delta D - \delta^{18}O$ ダイアグラム

4.3 地下水の水質

地下水の水質は、物理的、化学的、生物的作用によって、かん養時の地表水の水質から変化していく。物理的作用とは他の地下水の混合や地殻の活動に伴う水温の変動等である。化学的作用とは風化作用、続成作用、熱水変質などの様々な水-岩石（鉱物）相互作用である。生物的作用とはバクテリアの介在による沈澱物の形成や環境変化等である。これらの作用が、密接に組み合わされて地下水の環境が作りあげられている。

地下水に溶存している元素の濃度は様々な値をとり、主要成分と微量成分を普遍的なものとして分けることは難しい。一般に主要な陽イオンとしては Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^+ 及び Na^+ 、主要陰イオンとしては Cl^- 、 SO_4^{2-} 、 HCO_3^- が挙げられる。本試験結果の主要イオンの測定結果をmol濃度及び当量換算で表4-1に示す。

表4-1 主要イオン濃度の換算

		Ca^{2+}	Mg^{2+}	K^+	Na^+	Cl^-	SO_4^{2-}	HCO_3^-
(mg/ℓ)	深部地下水	2.4	0.24	3.80	90.1	46.6	16.5	164.1
	浅部地下水	27.6	9.82	0.89	31.9	63.2	20.3	96.4
	地表水	15.3	5.76	1.75	13.8	20.7	8.99	40.2
(mmol/ℓ)	深部地下水	0.06	0.01	0.10	3.92	1.32	0.17	2.69
	浅部地下水	0.69	0.41	0.02	1.39	1.79	0.21	1.58
	地表水	0.38	0.24	0.04	0.60	0.58	0.09	0.66
(meq/ℓ)	深部地下水	0.12	0.02	0.10	3.92	1.32	0.34	2.69
	浅部地下水	1.38	0.82	0.02	1.39	1.79	0.42	1.58
	地表水	0.77	0.48	0.04	0.60	0.58	0.18	0.66

*1 HCO_3^- はアルカリ度を代用した。

深部地下水は陽イオンとしては Na^+ が卓越し、全体の95%（当量換算）をしめる。また、陰イオンは $HCO_3^- > Cl^- > SO_4^{2-}$ の順で $Na-HCO_3^- \cdot Cl$ 型の地下水であった。浅部地下水は、 $Na^+ \geq Ca^{2+} > Mg^{2+}$ の順で、陰イオンは $Cl^- > HCO_3^- > SO_4^{2-}$ の順であった。地表水は陽イオンは $Ca > Na > Mg$ の順で陰イオンは $HCO_3^- > Cl^- > SO_4^{2-}$ の順であった。

3 試料の化学分析から得た主成分の当量濃度からプロットしたトリリニアダイアグラムを図4-3に示す。トリリニアダイアグラムは、地下水の分類・起源・変化・進化等を考察する際に一般的に利用される。図中の領域Ⅰは、重炭酸カルシウム・マグネシウムから成り、主として不圧地下水はこの部分にあり、循環性の供給型地下水である。被圧地下水もこの位置にあるがもっと広範囲に散り、徐々にⅡに移行する傾向がある。Ⅱは Na_2CO_3 や K_2CO_3 から成り被圧地下水はここに集まる。Ⅲは地下水にはあまりみられない。Ⅳは塩化物及び硫酸塩が主体で、海水や化石塩水の混入した地下水と考えられる。

本試験結果は図4-2よりそれぞれ以下の領域にプロットされた。

深部地下水：領域II
 浅部地下水：領域III
 地表水：領域III

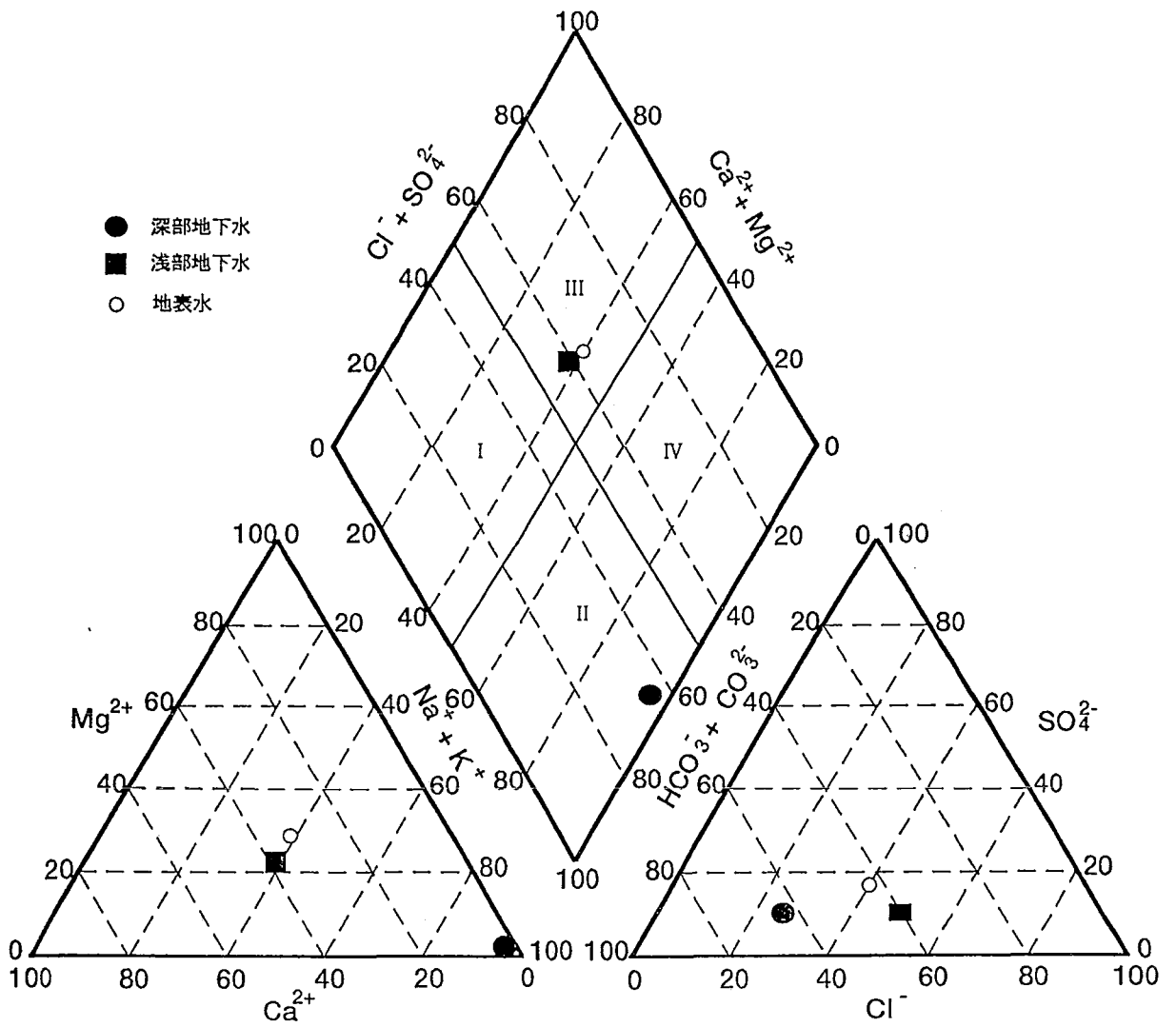


図4-2 トリリニアダイヤグラム

(1) 深部地下水と地表水の主要成分の水質の比較

同位体分析結果（トリチウム, δD , $\delta^{18}O$ ）から深層地下水は地表水の地下へのかん養による天水起源の比較的滞留時間が短い地下水であることが示唆された。つまり、地表水の水質から地下水の水質へ変遷していったと考えられる。そこで、地表水の示す水質から地下水の示す水質へと他の水系の関与を受けないで変遷したものと仮定し、以下に水質の変化について述べる。

まず、本調査地でエンドメンバーとなる地表水の水質の比較として表4-2に日本の河川水の水質を示す。

表4-2 日本の河川水の平均と本試験河川水の水質

	Ca	Na	Mg	K	HCO ₃ -C	SO ₄	Cl	Si
日本の河川水の平均	10.4	6.6	3.6	2.0	7.4	4.1	7.1	3.0
日本の降雨の平均	0.54	1.97	0.26	0.18	-	0.9	3.82	-
本試験の地表水	15.3	13.8	5.8	1.75	-	8.9	20.7	8.3

(unit:ppm)

表4-2 より本試験の地表水は、日本の平均的な地表水に比較してNa, Cl を多く含んでいることがわかる。これは、風送塩に起因するものか、あるいは降水が一旦伏流し、河川に流出したものと考えられる。

次に地表水から深部地下水へどのような元素がどの程度増減したのかをモル濃度で示す。

表4-3 地表水と深部地下水の比較

	Ca	Na	Mg	K	HCO ₃ ⁻	SO ₄	Cl
地表水	0.39	0.60	0.48	0.04	0.66	0.10	0.58
深部地下水	0.06	3.92	0.02	0.10	2.69	0.17	1.32
ΔC^{*1}	-0.33	3.32	-0.46	0.06	2.03	0.07	0.74

*1: 深部地下水C(mmol/l) - 地表水C(mmol/l) (unit:mmol/l)

表4-3から明らかなように、地表水から深層地下水へ移行する過程で最も特徴的な変化は、CaとMgの2価陽イオンが消失し、Naが増加していることである。

一般にNa, Ca, Mg, K等は地下水中の二酸化炭素によって岩石から化学的風化を受けて溶出することが知られている。(玉利ら:1987, 北野・中村:1975)。吉岡(1988)は天然水の溶存化学成分の変動から岩石の風化速度を見積もっている。岩石を構成する元素が風化作用によって溶出するとき、各元素の易動性に関する研究は、地球化学的な興味はもとより地滑り地帯における風化の程度の見積りといった知見からも研究され、天然水の化学組成が岩石の風化状況のパラメータとしても有用であることが指摘されている(高松ら:1981, 一國ら:1982, 玉利ら:1988)。これらの研究の水-岩石相互作用における元素の易動性

を示せば、表4-4のとおりである。

表4-4 水-岩石の相互作用における元素の易動性

岩石種	易動性
石英閃緑岩	Ca > Na > K > Si > Mg
頁岩	Na > Mg > Ca > K > Si
火成岩	Ca > Na > Mg > K > Si
片麻岩・花崗岩	Mg > Ca > Na > K > Si
砂岩	Ca > Na > K > Si
流紋岩	K > Ca > Na > Mg
安山岩	Ca > Mg > Na > K
玄武岩	Na ≥ K ≥ Ca ≥ Mg
斑レイ岩	Na ≥ K ≥ Ca ≥ Mg

(高松ら, 1981, :一国ら, 1982:玉利ら, 1988から抜粋)

主要イオンの易動度の差は、花崗岩類では顕著である。一方、玄武岩や斑レイ岩の主要イオンは、母岩から急速に、そしてほとんど同時に減少する傾向がある。斑レイ岩中に存在する滞留時間の短い地下水においても、Na, K, Mg, Caの水相への溶出は通常よく起こる現象と考えられ、本試験結果におけるCa²⁺, Mg²⁺の消失は、単純な水-岩石の相互作用の結果を反映していない可能性が考えられる。なお、CaやNaの易動性が高いのは、これらの元素が風化に対して不安定な斜長石の主成分であることに起因している。

例えば、地下水がイオン置換帯（多くは粘土層）を含む地層と十分に置換した状態ではNa⁺の濃度が相対的に増加する傾向がある。一般的に粘土に吸着される主要アルカリ金属の傾向の強弱を考えると、2価のものは1価のものよりも強く吸着され、Ca > Mg > K > Naの順位である傾向を示すことが認められる。

今後の課題として、次の2点があげられる。

- ① 地表水から深部地下水への水質変化の仮定について
- ② 地下水流動概念モデルの構築について

①では、 $\delta D - \delta^{18}O$ ダイヤグラム及びトリリニアダイヤグラムから、深部地下水は地表水の地下への涵養による地下水であり、他の水系の関与を受けないで変遷したものと仮定した。しかしながら、電気伝導度及び水質の定量的取扱いによる海水の混入率についての検討、海水の平均組成と深部地下水の組成との比較検討（例えば、海水のNa/Cl比は、10556(mg/l):18980(mg/l)、深部地下水のNa/Cl比は90.1(mg/l):46.6(mg/l)）等、海水の関与についての検討が残されている。

②では、昨年度実施の深部地質環境データの調査結果(PNC ZJ1211 95-009)及び周辺の地表地質・地形の状況を併せて総合的に考察することにより、サイトスペシフィックな地下水流動概念モデルの構築が必要である。

(2) 地下水の酸化還元状態

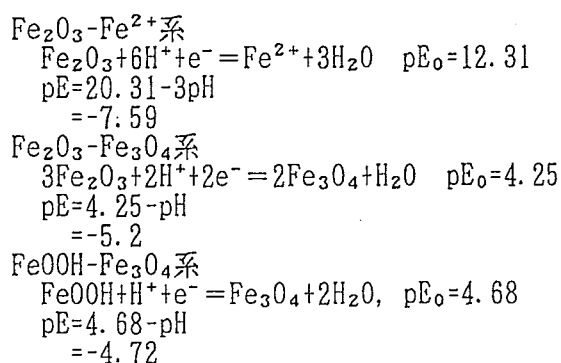
地下水の酸化還元状態は、主にその度合いによって存在状態を遷位させていく元素の濃度に影響を与える。例えばMnやFe等の遷位金属元素は、地下水中に含まれている溶存酸素によって容易に酸化され、固相（岩石）中に移行し、地下水から除かれるし、逆に還元状態であれば岩石中に含まれるものが地下水の中へ溶出する場合もある。また、本調査地のように滞留時間の短い地下水の酸化還元状態は、反応が速やかに進行するバクテリアによる有機物の微生物学的無機化作用によっても、ある程度の影響を受けていることが考えられる。

本試験での深部地下水中の有機物濃度はTOCで1.23ppmと高く、また無機栄養塩類も消失していないため、バクテリア（種類は限定できない）にとっては栄養がある状態である。また、一般に土壤の気相中でさえ酸素はほとんど炭酸に変換され、残存している酸素は体積比で0.01%以下であるとされている（浅見，茅野，1983）。本調査においても化学分析結果より、深部地下水には酸素が含まれていないことが明かとなった。

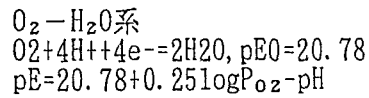
ここでは、化学分析結果より現在の地下水の嫌気度を推察する。深層地下水は、アンモニア及びFe²⁺を含み、硫酸イオンが還元されていない状態である。したがって、鉄酸化-還元レベル付近であると推察される。

本試験における鉄の定量は、T-Fe、D-Fe、Fe²⁺の3態について測定している。T-Feは地下水中に存在する全ての鉄の総計である。またD-Feは溶存している鉄を表し主にFe²⁺やFe³⁺の総計である。ここで、T-Fe、D-Feの差がないということは、ほとんどの鉄が溶存状態で存在していることを表す。したがって、D-FeからFe²⁺を差し引いた値はFe³⁺と考えられる。深部地下水のFe³⁺は0.08ppm(=0.19-0.11)含まれていると計算されるので、深層地下水には、Fe³⁺とFe²⁺の酸化還元対が存在していることが示唆される。

地層中にみられる鉄やマンガンの酸化物は、地下水中の酸化還元の進行を緩衝していると考えられる。そのような鉄の鉱物であるhematite, goethite, magnetite に関して、以下にそれら酸化還元対に対する平衡反応式を記し、標準酸化還元電位を計算した。



さらに、地下水における化学種の酸化還元平衡に関係していると考えられる反応系の中で、 O_2-H_2O に関しては以下のとおりとなる。



地下水が大気中の酸素と平衡に達しているとする $P_{O_2}=0.203atm$ となる。したがって、 $pE=11.21$ となる。

これらの酸化還元平衡系の計算結果からは、母岩中に酸化鉄が存在する限り、地下水中の溶存酸素量に関わらず地下水の標準酸化還元電位(pE)は -7.59 から 11.21 の範囲にあり、深部地下水中の有機物濃度が比較的高濃度であるにもかかわらず、硫化水素等の発生が行われていないのは母岩中に含まれる鉄酸化物による緩衝作用のためと推察される。

4.4 バクテリア

(1)全菌数及び従属栄養細菌について

地下水の水質は、溶存酸素が検出限界以下であり、嫌気的環境を示している。地下水中の種々細菌群において全菌数($cell/ml$)が 7.2×10^5 、好気性従属栄養細菌(CFU/ml)が 8.0×10^4 であった。ここで示した従属栄養細菌は、通性好気性のものであり全菌数に対するその存在率は10%程度であった。Lam et al(1984)によれば、深部地下水における全菌数に対しての生存性細菌は0.1~25%程度としており、本調査で得られた値はLam et al(1984)の示した存在範囲内であった。

(2)鉄酸化細菌

本調査で計数した鉄酸化細菌は、*Thiobacillus ferrooxidans*である。この細菌は絶対好気性細菌であり、酸素の存在下でしか活動を行わない。一般的特性を表4-4に示す(伊藤一郎, 1976)。今回の調査では地下水中に*T. ferrooxidans*は検出されなかった。これは表4-5に見られるように、地下水の水温及びpHが、*T. ferrooxidans*の生育環境から大きく外れていたためと考えられる。

表4-5 *Thiobacillus ferrooxidans*の一般的特性

細菌の大きさ(μm)	0.5×1.0
最適温度(°C)	30
最適pH	2.5~3.8
グラム染色	-
運動性	+

(3)硫酸塩還元細菌

自然水域における硫酸塩還元細菌のおよその出現オーダーは、不検出から $10^4/ml$ 、堆積物中では最高 $10^8/g$ に及ぶ。概して、有機物と SO_4^{2-} に富む汽水域あるいは極度に富栄養化した水域から高い値が報告されている（竹内準一，滝井 進，1987）。硫酸塩還元細菌は $15\sim 45^\circ C$ を生育範囲とし、すべて偏性嫌気性細菌であるが、ある種の硫酸塩還元細菌は曝気に耐えたり好気的な水体でも生存が可能であるという報告もある。。また、好気性細菌との混合培養であれば、共存菌の働きによって速やかに培地が還元されるので、必ずしも還元的である必要はない。局在する生物遺骸を核として硫酸塩還元細菌の増殖が開始されるものと考えられている。

多くはpH4.5～9.5の範囲で生育でき、pH6.5～8.0の中性付近が至適条件である。活動に伴って生成する遊離の H_2S が $150mg/l$ 程度になると、この菌自身の増殖を阻害するようになる。しかし、自然界では鉄塩と反応して硫化鉄として固定されるので、 $800mg/l$ 程度まで集積しても阻害作用が認められないこともある。従属栄養細菌と共存する場合には、純粋培養系とは異なりきわめて広範囲の有機物が利用可能である。

本試験結果では、硫酸塩還元菌の存在が 1.6×10^4 MPN/ml程度の値で認められる。これは地下水における値としては通常観察される値であるが、その活動は水質に現れておらず、活動を停止している状態であったと考えられる。

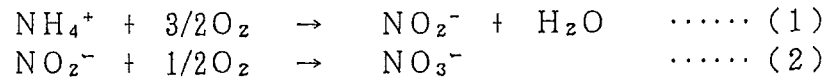
(4)メタン生成細菌

絶対嫌気性細菌は、たとえ極限濃度でも酸素が存在する場合は生育できない微生物であり、特にメタン生成細菌はその中でも酸素に対して非常に感受性の高いグループに属する。すなわちメタン生成細菌は極限濃度の酸素の存在下で生育できないだけでなく、酸素との接触によって速やかに死滅していく。したがって、分布する環境は完全な嫌気的環境に限られる。つまり、メタン生成細菌が存在しているならば、その地下水は長期に渡り嫌気的雰囲気中に保存されていた可能性が非常に高いものと判断できる。今回の調査においては、地下水中のメタン生成細菌数は検出されなかったため、調査対象地下水は、完全な嫌気的雰囲気に保持されていたものではないと考えられる。

(5)硝化細菌

硝化細菌はアンモニアを亜硝酸に酸化するアンモニア酸化細菌（式1）と亜硝酸を硝酸

に酸化する亜硝酸酸化細菌（式2）に大別でき、脱窒作用の前段階として重要な役割を担う。しかしながら酸素の存在しない嫌気的環境下では硝化反応は生じない。したがって、本調査試料において地下水中の硝化細菌が検出されなかったことは妥当である。



(6) 硝酸還元細菌及び脱窒細菌

本調査試料では、地下水試料中での硝酸還元細菌及び脱窒細菌数が各々、 3.1×10^4 、 1.3×10^4 cells/mlと高い値で計数された。硝酸還元反応及び脱窒反応の理想的なEh(mV)は+400~+100である。本調査における地下水試料のEh(mV)は+290であったことから、地下水環境が硝酸還元及び脱窒反応に適した環境であったことが推定され、さらに有機物濃度が高い濃度であったことを考え合わせると、地下水中の硝酸還元及び脱窒細菌の計数値が高い値であったことを裏付けるものと考えられる。

(7) 化学分析結果とバクテリア調査結果による深部地下水の水質について

図4-3 に本調査での種々細菌数とEh(mV)について示した。図から本地下水においてバクテリアが介在する化学反応は、硝酸還元及び脱窒反応及び硫酸還元が主たる反応であることがわかる。一方、化学分析結果からは硫酸還元は行われておらず、エネルギー準位が上位の硝酸還元が顕著であったことを示した。

地下水中に溶存酸素がないことと、好気性細菌生物相よりは、嫌気性細菌の生物相が優位であることは良く一致している。

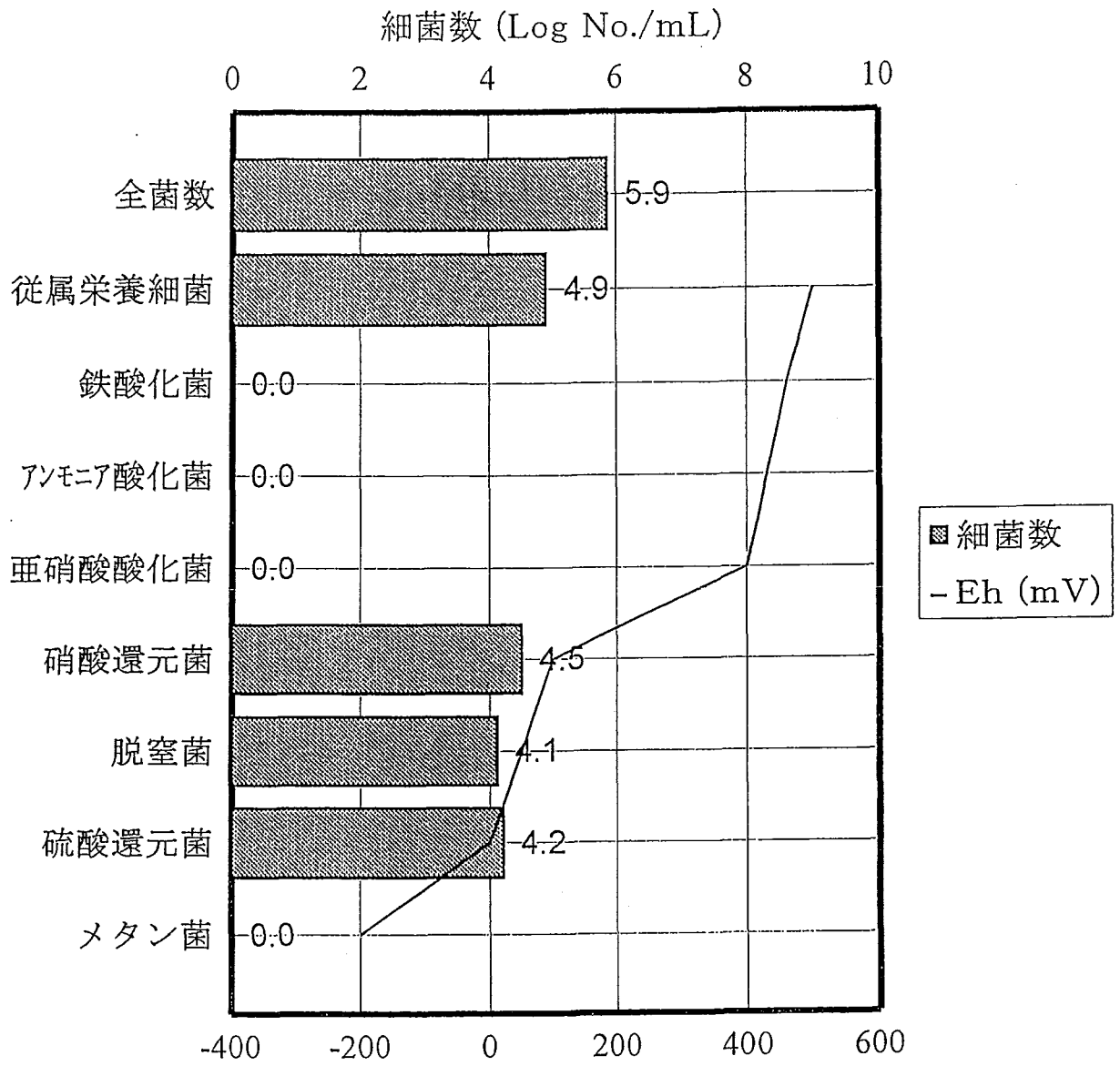


図4-3 種々細菌数とEhの関係

参 考 文 献

- 相崎守弘, 中島拓男 : 陸水富栄養化に関する総合研究 (VI) - 細菌分布から見た霞ヶ浦の物質代謝の特徴 -. 国立公害研究所報告, 22, p. 63-87, (1981).
- 相崎守弘, 田中秀之, 北村 博 : 東京湾における無酸素水塊の形成と青潮. 用水と廃水, 1, (1), p. 41-45, (1990).
- APHA-AWWA-WPCF : Standard Method for Examination of Water and Wastewater 16th Ed. (1985).
- 浅見輝男, 茅野充男訳 : 環境無機化学-元素の循環と生化学-, 博友社, (1983).
- Baumann, E. W : Determination of parts per billion sulfide in water with the sulfide-selective electrode., Anal. Chim., 46(9), p. 1345-1352, (1974).
- Bourg, A. C. M. and P. W. Schindler : Ternary surface complexes. 1. Complex formation in the system silica-Cu(II)-ethylenediamine. Chimia, 32, p. 166-168, (1978).
- Broenkow, J. H. and J. D. Cline : Colometric determination of dissolved oxygen at low concentrations. Limnol. Oceanogr. 14, p. 450-454, (1969).
- Burba III, J. R. and J. L. McAtee, Jr. : The orientation and interaction of ethylenediamine copper(II) with montmorillonite. Clays Clay Miner., 25, p. 113-118, (1977).
- Collins M. D. and Widdel F : Respiratory Quinones of Sulfate-Reducing and Sulphur-Reducing Bacteria (A Systematic Investigation). Syst. Appl. Microbiol., 8, p. 8-16, (1986).
- Cypionka H., Widdel F. and Pfennig N. : Survival of Sulfate-Reducing Bacteria under Oxygen Stress and Growth in Sulfate-Free Oxygen-Sulfide Gradients. FEMS Microbiol. Ecol., 31, p. 39-45, (1985).
- Davis, J. A. and J. O. Leckie : Effect of adsorbed complexing ligands on trace metal uptake by hydrous oxides. Environ. Sci. Technol., 12, p. 1309-1315, (1978).
- Dudley D. J., Guentzel M. N., Ibarra M. J., Moore B. E. and Sagik B. P : Enumeration of Potentially Pathogenic Bacteria from Sewage Sludges. Appl. Environ.

Microbiol., 39, p.118-125, (1980).

Easton, J. A. : Chemical Analysis of Silica Rocks., Elsevier Pub. Comp., p.258, (1972).

Froelich, P. N., G. P. Klinkhammer, M. L. Bender, N. A. Luedtke, G. R. Heath, D. Cullen, P. Dauphin : Geochim. Cosmochim. Acta, 43, p.1075-1090, (1979).

福井 学, 滝井 進: 硫酸還元菌の微視的分布, 日本微生物生態学会講演要旨集, p40, (1989).

Garrels, R. M., and C. L. Christ : Solutions, Minerals, and Equilibria, Harper and Row, New York, 450p, (1965).

Gather, R., J. S. Davis and A. Mares : Regulation of Copper availability to phytoplankton by macromolecules in lake water. Environ. Sci. Technol., 12, p.1416-1421, (1978).

G. J. Olson, W. P. Iverson, W. S. Docins, G. A. McFeter : Sulfate-Reducing and Methanogenic Bacteria from Deep Aquifers in Montana. Geomicrobiology Journal, vol 2, p.327-340, (1984).

半谷高久, 小倉紀雄 : 水質調査法 (改訂第2版), p.265-270, 丸善, (1985).

Hiraishi A : Respiratory Quinone Profiles as Tools for Identifying Different Bacterial Populations in Activated Sludge. J. Gen. Appl. Microbiol., 34, p.39-56, (1988).

平石 明 : キノンプロファイル法による活性汚泥細菌の生態学的研究 . 用水と廃水, 32, (12), p.13-24, (1990).

H. D. Holland 著 山形登訳: 大気・河川・海洋の化学, 318p. 産業図書, (1972).

今井和民 : 独立栄養細菌. 化学同人, 京都, 77p, (1984).

一国雅巳: 無機地球化学. 培風館, 148p, (1981).

一国雅巳, 鈴木勸子, 鶴見実 : 水-岩石相互作用の生成物としてのアルカリ性鉱泉水, 地球化学, 16, p.25-29, (1982).

John G. Holt et al. : BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology WILLIAMS and WILKINS, Baltimore, (1974).

Karsten Pedersen : Deep ground water microbiology in Swedish granitic rock and it's relevance for radio-nuclide migration from a Swedish high level nuclear waste repository. : SKB TECHNICAL REPORT, 89-23, p.1-13, (1989).

Karsten Pedersen : Distribution and activity of bacteria in deep granitic ground waters of Southeastern Sweden. SKB TECHNICAL REPORT, p.1-28, (1990).

工業用水試験法 : JISK 0101, 日本規格協会, (1986).

工業用水試験法 : JISK 0102, 日本規格協会, (1986).

小山忠四郎 : 湖沼ガス代謝 -水の環境対策への基礎と応用-, p.10-18, 成文堂, (1991).

小山忠四郎, 半田暢彦, 杉村行勇 : 湖水・海水の分析, 講談社サイエンティフィック(1972)

近藤昭彦, 鈴木裕一, 高山茂美: トリチウムによる地下水の停滯時間の推定 - 会津盆地北部の自噴井の場合 -. ハイドロ-, 13, p. 60-65, (1983).

日下讓, 辻治男, 藤本雄三, 石田桂子, 福井要 : 六甲山地周辺域の浅層地下水の水質, jap. J. Limnol. 42, 2, p. 65-71, (1988).

松田庄蔵, 平木敬三, 西川泰治 : フミン酸, リグニンスルホン酸ナトリウムのけい光法による同時定量 - 堆積物中のフミン酸, フルボ酸の定量 -, 分析化学, 20, p. 341-346, (1979).

メイスン著 一国雅巳, 松井義人訳: 一般地球化学, 402p, 岩波書店, 東京, (1970).

Mentzel, D. W. and N. Corwin : Limnol. Oceanogr., 10, 280p, (1965).

Miller, J. C., and J. N. Miller著 宗林信訳: データのまとめ方, 238p, 共立出版, 東京, (1991).

Morris, J. C., and W. Stumm : Redox equilibria and measurements of potentials in the aquatic environment. In Equilibrium Concepts in Natural Water Systems, Advances in Chemistry Series 67, American Chemical Society, Washington, D. C., p. 270-285, (1967).

Murphy, J. and J. P. Riley : A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters, Anal. Chem. Acta., 27, p. 31-36, (1962).

日本化学会編 : 土の化学, 187p, 学会出版センター, (1989).

日本化学会編 : 陸水の化学, p184p, 学会出版センター, (1992).

野尻幸宏 : イオンクロマトグラフィーによる天然水中の全炭酸の定量, 国立公害研究所霞ヶ浦臨湖実験施設研究発表会講演報告集, 3, p. 1-4, 2(1984)

大槻 晃 : 湖沼調査指針, 水質汚濁研究会編, (1982).

大槻 晃 : 環境測定分析法注解 (第3巻) -水質汚濁物質及び底質測定分析方法-, p. 82-91, (1985).

PNC SJ 4411 89-001: パッカー式地下水サンプラー (PGS-500NQU, HQ型) の製作. 基礎地盤コンサルタンツ株式会社, 64p, (1989).

PNC ZJ 4401 90-001: 地下深部におけるバクテリアの存在調査研究. 同和工管株式会社, 77p, (1991).

PNC ZJ 1211 95-009: 北日本中・古生代斑レイ岩類の深部地質環境データ. 三菱マテリアル株式会社, 133p, (1995).

Postgate J. R. : The Sulfate-Reducing Bacteria. Cambridge University Press, London, (1979).

Sillen, L. G : The physical chemistry of sea water. In, Oceanography, ed. by M. Sears, American Association for Advancement of Science, Washington, D. C., p. 549-581, (1961).

高井康男 : 微生物の生態 5 -環境汚染をめぐって-, p. 1-21, 学会出版センター, (1979).

高井康男, 和田秀徳 : 土と微生物, p. 45-72, 岩波書店, (1966).

Takii Susumu : Methanogenesis in Sediments of the Polluted Lower Reaches of the Tama River. Jpn. J. Limnol., 50, (3), p. 235-246, (1989).

- 竹内準一, 滝井 進 : 瀬沼と水月湖の湖水中における硫酸還元菌の分布. 用水と廃水, 29, (11), p. 3-7, (1974).
- Tanaka H., Aizaki M. and Kitamura H : Changes in Vertical Distributions of Several Kinds of Bacteria Caused by Up-Welling of Anoxic Water in Tokyo Bay. Japan Water Pollution Research and Control Preprint of Poster Papers, p. 143-146, (1990).
- 田中秀之, 相崎守弘 : 東京湾における青潮に関する研究 - 無酸素水塊の形成と硫酸還元菌の挙動 -. 第24回水質汚濁学会講演集, p. 317-318, (1990).
- 田中秀之, 相崎守弘, 木幡邦男, 中村康男, 竹下俊二, 滝井 進, 田井慎吾 : 東京湾における青潮に関する研究Ⅲ - 水中及び底泥での硫酸還元細菌の分布特性 -. 国立環境研究所臨湖実験施設研究報告集, 6, p. 1-5, (1992).
- 玉利祐三, 辻治雄, 日下譲 : 岩質と陸水の水質との関係 - 岩石の溶出実験による解析 -, 地球化学, 22, p. 139-147, (1987).
- 田村紘基 : 水の分析 (第3版), p. 378-380. 化学同人, (1988).
- 立見辰夫 : 現代鉱床学の基礎, p. 96-97. 東京大学出版界, (1977).
- Van Es FB, Meyer-Reil : Biomass and metabolic activity of heterotrophic marine bacteria. Marshall KC(ed) Advances in microbial ecology, vol 6, p. 111-170, (1982).
- Wakao N. and C. Furusaka : A New Agar Method for the Quantitative Study of sulfate-reducing Bacteria in Soil. Soil. Sci. Plant. Nutr., 18, p. 39-44, (1972).
- Whitfield, M. : Thermodynamic limitations on the use of platinum in Eh measurements. Limnol. Oceanogr., 19, p. 857-865, (1974).
- Winkler, L. W. : Die Bestimmung des im wasser gelosten sauerstoffes. Chem. Ber., 21, p. 2843-2855, (1988).
- 山里一英, 宇田川俊一, 児玉 徹, 森地敏樹編 : 微生物の分離法 R and Dプランニング, 東京, 500p, (1986).

Yoshida, N. and Mizutani, Y. : Preparation of carbon dioxide for oxygen-18 determination of water by use of a plastic syringe. Anal. Chem. 58, p. 1273, (1986).

吉岡龍馬 :天然水の化学組成からみた風化速度. 1988年度日本地球化学年講演要旨集, p. 95, (1988).

Zajic J.E : Microbial biogeochemistry : Academic Press Inc., NewYork, (1969).