

0006

JNC TJ7440 2005-038  
~~JNC TJ7440 2005-038~~

限定資料

西南・中部日本外帶中・古生代結晶片岩類  
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)

1994年3月

住友金属鉱山株式会社

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](mailto: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促進するため、特に限られた関係者だけに配付するものです。ついては供覧、複製、転載、引用等を絶対行わないよう、また第三者への開示又は内容漏洩がないよう厳重に管理してください。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ください。

本資料についての問い合わせは下記にお願いいたします。

〒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-

JNC TJ7440 2005-038

-~~試定資料~~-

JNC TJ7440 04-001

1994年3月

西南・中部日本外帯中・古生代結晶片岩類の深部地質環境データ  
(地下水)

要 旨

本資料は、地層処分システムの性能評価・設計のための地質環境に関するモデルデータセットの作成に資することを目的に、埼玉県児玉郡神川町における深度535.0mの試錐孔での地下水データをとりまとめたものである。

地下水試料はパッカー式地下水サンプラーを用いて深度220.0~222.0mから採水した（後述する浅層地下水と区別するため深層地下水と呼ぶ）。パッカー区間の地下水容量は2.64lで、採水開始時からこの容量ごとにモニター分析を行い、化学分析が安定するまで採水した。その後、分析用の試料を採水した。化学分析項目は以下の通りである。なお、浅層地下水と比較するために、試錐孔周辺の浅井戸から試料も採水した。

- ①O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, He, H<sub>2</sub>, CO, CH<sub>4</sub>, total-CO<sub>2</sub>, Fe<sup>2+</sup>, S<sup>2-</sup>
- ②TOC, フミン酸, フルボ酸
- ③Na, K, Li, Ca, Mg, Sr, Al, total-Fe, Mn
- ④F, Cl, Br, I, SO<sub>4</sub>, P, N, Si
- ⑤δ<sup>18</sup>O, δD, <sup>3</sup>H
- ⑥バクテリア

深層地下水はCl, Na, Kの含有量が海水に類似し、非炭酸ナトリウム型を示すいわゆる古海水の化石水であると考えられる。また、Eh-pH図からは漸移的な酸化還元状態を示している。浅層地下水は表流水に一般的な炭酸カルシウム型を示す。深層地下水のδ<sup>18</sup>Oは+7~+8‰を示し、天水起源のラインからはずれ、岩石と酸素同位体の交換が行われている。

鉄酸化細菌及びメタン生成細菌は浅層、深層地下水ともに検出されなかった。また、硫酸還元細菌はDesulfovibrio desulfuricansが検出されたが菌数は非常に少ない。このことは深層地下水の硫酸イオンが多く硫化水素イオンが少ないと調和している。

---

本報告書は、住友金属鉱山株式会社が動力炉・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：052A1055

事業団担当部課室：環境技術開発推進本部 地層科学研究グループ副主幹（武田精悦）

\* 住友金属鉱山株式会社 資源事業部

JNC TJ7440 2005-038

LIMITED DISTRIBUTION

PNC ZJ1010-94-001

March, 1994

The Chemical Data on the Deep Groundwater from the Crystalline Schist bedrock  
of the Mesozoic and Palaeozoic Members in Outer Zone  
in Mid- to South Western Japan.

[REDACTED]; [REDACTED]\*

**Abstract**

This report presents the chemical data of the groundwater in the Crystalline Schist at Kamikawa-cho, Kodama-gun, Saitama Prefecture. The groundwater sample was collected from GL.- 220m ~ - 222m Section of the drill hole byusing the double packers sampler system. Water volume of a section is 2.62 liter and the monitored sampling of the groundwater have continued until the range of chemical changes have been smaller. And then the deep ground-water had sampled for chemical analysis.

The elements of chemical analysis show as follows.

- ① O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, He, H<sub>2</sub>, CO, CH<sub>4</sub>, total-CO<sub>2</sub>, Fe<sup>2+</sup>, S<sup>2-</sup>
- ② total organic carbon(TOC), humic acid, fulvic acid
- ③ Na, K, Li, Ca, Mg, Sr, Al, total-Fe, Mn
- ④ F, Cl, Br, I, SO<sub>4</sub>, P, N, Si
- ⑤ δ<sup>18</sup>O, δ D, δ H
- ⑥ bacterium

The deep groundwater are similar to the amount of Cl, Na, K contens of SMOW and show a type of non-calcium carbonate on Piper trilinear diagram.

This groundwater contaminated with a paleo oceanic water.

Iron oxidizing bacterium and methane producing bacterium have not detected in the groundwater and the shallow groundwater. Saltate reducing bacterium that species is Desulfovibrio desulfuricans have ditected in the groundwater, therefore the amounts of the bacterium was a very littile. Its comparably to the ionic contents of the groundwater that have a large amount of sulfide and have a few of hydrogen sulfide.

---

Work performed by Sumitomo Metal Mining Co., Ltd, under contract with Power Reactor and Nuclear Fuel Development Corporation.

PNC Liaison : Isolation System Reserch Program,

Radioactive Waste Management Project  
(Seietu Takeda)

\* : Sumitomo Metal Mining Co.,Ltd., Mineral Resorces Div.

## 目 次

1. 資料調査概要 .....	1
1.1 調査件名 .....	1
1.2 調査目的 .....	1
1.3 資料調査位置および岩種 .....	1
1.4 資料調査期間 .....	1
1.5 資料調査項目 .....	1
1.6 資料担当調査者 .....	1
2. 調査概要 .....	3
2.1 試錐孔概要 .....	3
2.2 採水作業 .....	4
2.3 試料採取と分析項目 .....	5
2.3.1 O <sub>2</sub> ,N <sub>2</sub> ,He,H <sub>2</sub> ,CO,CH <sub>4</sub> ,ΣCO <sub>2</sub> の定量用試料 .....	8
2.3.2 Fe <sup>2+</sup> ,S <sup>2-</sup> の定量用試料 .....	12
2.3.3 TOCおよびフミン、フルボ酸の定量用試料 .....	12
2.3.4 Na,K,Li,Ca,Mg,Sr,AL,全Fe,Mnの定量用試料 .....	13
2.3.5 F,Cl,Br,I,SO <sub>4</sub> ,P,N,Siの定量用試料 .....	14
2.3.6 δ <sup>18</sup> O,δD, <sup>3</sup> Hの分析用試料 .....	15
2.3.7 バクテリア調査用試料 .....	16
2.3.7 (1) 深層地下水 .....	16
2.3.7 (2) 浅層地下水 .....	16

3. 化学分析の方法および結果 .....	17
3.1 化学分析の方法 .....	17
3.1.1 モニター期間における各項目の測定方法 .....	17
3.1.1 (1) 水温、pH、電気伝導度、酸化還元電位の測定方法 .....	17
3.1.1 (2) その他の化学成分のモニター分析方法 .....	18
3.1.2 化学分析方法 .....	19
3.1.2 (1) 溶存窒素 .....	19
3.1.2 (2) 溶存酸素 .....	19
3.1.2 (3) 水素、ヘリウム .....	20
3.1.2 (4) メタン .....	20
3.1.2 (5) 一酸化炭素 .....	21
3.1.2 (6) 二酸化炭素 .....	21
3.1.2 (7) ヘッドスペース法による各種溶存气体濃度の計算方法 .....	22
3.1.2 (8) 全有機性炭素 (TOC) .....	24
3.1.2 (9) $\text{Fe}^{2+}$ および全-Fe .....	24
3.1.2 (10) F,Cl,Br,I,SO <sub>4</sub> .....	26
3.1.2 (11) Na,K,Li,Ca,Mg,Sr,Al,Mn,全-Fe .....	26
3.1.2 (12) NH <sub>4</sub> ,NO <sub>2</sub> ,NO <sub>3</sub> ,T-N,T-P .....	26
3.1.2 (13) Si .....	27
3.1.2 (14) フミン酸およびフルボ酸 .....	27
3.1.3 同位体分析法 .....	30
3.1.3 (1) $\delta D$ .....	30
3.1.3 (2) $\delta^{18}\text{O}$ .....	30
3.1.3 (3) <sup>3</sup> H .....	30
3.2 化学分析の結果 .....	31
3.2.1 モニター期間中測定結果 .....	31
3.2.1 (1) 水温 .....	31
3.2.1 (2) pH .....	31
3.2.1 (3) 電気伝導度 .....	31
3.2.1 (4) 酸化還元電位 .....	31
3.2.1 (5) 溶存酸素 .....	31
3.2.1 (6) 陽イオン .....	39
3.2.1 (7) 陰イオン .....	39
3.2.1 (8) フルオレセインナトリウム .....	39
3.2.1 (9) モニター分析のまとめ .....	39
3.2.2 主要元素分析分析結果 .....	40
3.2.2 (1) 化学成分分析結果 .....	40
3.2.2 (2) 同位体分析結果 .....	42

4. バクテリア調査の方法および結果	
4.1 バクテリア調査方法	43
4.1.1 調査フローシート	43
4.1.2 全菌数計数方法	44
4.1.3 生菌数計数方法	45
4.1.3 (1) 鉄酸化細菌	45
4.1.3 (2) 硫酸塩還元菌	46
4.1.3 (3) メタン生成菌	47
4.1.4 硫酸塩還元細菌の同定	52
4.1.4 (1) 分離および純粹化	52
4.1.4 (2) 同定操作	55
4.2 バクテリア分析結果	66
4.2.1 種々細菌数計数結果	66
4.2.2 硫酸塩還元細菌の同定結果	67
4.2.2 (1) 各種試験結果	67
4.2.2 (2) 属の同定	68
4.2.2 (3) 種の同定	69
5. 考察	71
5.1 地下水年代	71
5.2 地下水の同位体比	73
5.3 地下水における酸化還元状態	74
5.4 地下水の化学成分の変化	76
5.4.1 溶存気体濃度の比較	76
5.4.2 無機化学成分の比較	77
5.5 化学分析値からみた深層地下水の特性	79
5.6 バクテリア調査結果に関する考察	81
5.6.1 全菌数について	81
5.6.2 鉄酸化細菌について	81
5.6.3 硫酸塩還元細菌について	81
5.6.4 メタン生成細菌について	82
5.6.5 酸化還元状態とバクテリア	83
6. 参考文献	84

## 本文付表目次

第1-1表	資料調査項目	2
第2-1表	試錐概要	3
第2-2表	各種調査のための採水容量	4
第3-1表	水素,pH,電気伝導度,酸化還元電位,溶存酸素の測定方法および誤差	17
第3-2表	各種化学成分のモニター分析方法	18
第3-3表	水に対する気体の溶解度 (Bunsen吸収係数 $\alpha$ )	23
第3-4表	水に対する気体の溶解度 (Ostwald吸収係数 $\beta$ )	23
第3-5表	モニター測定結果	32
第3-6表	モニター測定結果統計計算結果	32
第3-7表	Dead Volume毎のモニター分析結果一覧表	35
第3-8表	主要元素等 (化学成分) 分析結果一覧表	41
第3-9表	深層地下水および浅層地下水の同位体分析結果	42
第4-1表	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i> 計数用培地	49
第4-2表	硫酸塙還元細菌計数用培地	49
第4-3表	メタン生成細菌計数用培地	50
第4-4表	ビタミン混液の組成 (メタン生成細菌用)	51
第4-5表	微量金属溶液の組成 (メタン生成細菌用)	51
第4-6表	硫酸塙還元細菌の純粋化における混在菌 (群) の判定	54
第4-7表	基質資化性 (生育に利用できる炭素源) 試験の概要	60
第4-8表	光合成紅色非硫黄細菌用培地	64
第4-9表	光合成硫黄細菌用培地	64
第4-10表	微量元素溶液の組成 [光合成細菌用]	65
第4-11表	ビタミン混液の組成 [光合成細菌用]	65
第4-12表	各種細菌数計数結果	66
第4-13表	地下水試料から分離した硫酸塙還元細菌に関する各種試験結果	67
第4-14表	種の同定のための情報整理	70
第5-1表	深層地下水と浅層地下水の溶存気体濃度と濃度比	76
第5-2表	試水中の溶存化学成分濃度比	77
第5-3表	元素の移動し易さに関する研究例	78

## 1. 資料調査概要

### 1.1 調査件名

西南・中部日本外帯中・古生代結晶片岩類の深部地質環境データ（地下水）の購入

### 1.2 調査目的

我が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、埼玉県児玉郡において西南・中部日本外帯中・古生代結晶片岩類の地下水の水質的特性等に關し調査するものである。

### 1.3 資料調査位置および岩種

位 置 埼玉県児玉郡神川町大字渡瀬字柳池東327

岩 種 三波川結晶片岩類

### 1.4 資料調査期間

自・平成5年7月8日～至・平成6年3月9日

### 1.5 資料調査項目

調査項目を第1-1表に示す

### 1.6 資料担当調査者

総 括 [REDACTED]

主任技術者 [REDACTED]

事務調整 [REDACTED]

現場代理人 [REDACTED]

調査・測定および報告書の担当者

[REDACTED] · [REDACTED] · [REDACTED]

採水担当者 [REDACTED]

全 般 [REDACTED]

化学分析 [REDACTED]

バクテリア [REDACTED]

第1-1表 資料調査項目

モニター用分析	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間と、採水量がパッカー間容量毎に以下の化学成分について分析を行う。 Si,Na <sup>+</sup> ,Ca <sup>2+</sup> ,Mg <sup>2+</sup> ,HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ,Cl <sup>-</sup> ,F,フルオレセインナトリウム また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、溶存酸素
主要元素等の分析	温度、pH、電気伝導度、酸化還元電位 O <sub>2</sub> ,N <sub>2</sub> ,H <sub>2</sub> ,He,CH <sub>4</sub> ,CO,CO <sub>2</sub> ,TOC,フミン酸,フルボ酸 Si,Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> ,Li <sup>+</sup> ,Ca <sup>2+</sup> ,Mg <sup>2+</sup> ,Sr <sup>2+</sup> ,Al <sup>3+</sup> ,Mn <sup>2+</sup> -Fe,Fe <sup>2+</sup> HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ,Cl <sup>-</sup> ,F,Br,I,S <sup>2-</sup> ,PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ,SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ,CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> ,H <sub>2</sub> S,NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ,NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> <sup>3</sup> H,δ <sup>2</sup> H,δ <sup>18</sup> O,フルオレセインナトリウム
バクテリアの調査	1.全菌数係数 2.特定バクテリアの存在調査 a) 鉄酸化細菌 b) 硫酸塩還元細菌 c) メタン生成細菌 3.硫酸塩還元細菌の同定

## 2. 調査概要

### 2.1 試錐孔概要

資料調査に使用した試錐孔の概要および採水区間は第2-1表のとおりである。なお、採水区間は、各種検層、コア試験結果に基づき深度220.00～222.00mに決定した。

表2-1 試錐孔概要

口 径	HQ-WL 98.5mm
掘削深度	535.0m
ケーシング深度	178.0m
採水深度	220.00～222.00m
地 質	三波川結晶片岩

## 2.2 採水作業

採水装置は、500m対応パッカー式地下水サンプラーを使用し、その手順書「パッカ一式地下水サンプラー（PGS-500NQNU,HQ型）の製作（PNC SJ4411 898-001）」に基づき採水を行った。作業工程は、以下のように要約できる。

- 1) サンプリングカプセルにステンレスロッドをつなぎ、220.00～222.00m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る。
- 2) 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する。
- 3) 試水容器を備えた地下水サンプラー（容量500m）を減圧する。
- 4) 電動ワインチにより地下水サンプラーをサンプリングカプセルまで降下させる。
- 5) サンプリングカプセルに着底後、一定時間（10分）放置し地上に引き上げる。

採水区間（220.00m～222.00m）の容積は以下のように計算した。

HQ孔直徑98mm,バットシステム採水内管パッカー間隔200cmとして

$$\{(9.8/2)^2 - (8.9/2)^2\} \times \pi \times 200 \\ = 2642 \text{cm}^3 = 2.64 \ell$$

パッカー区間を満たしている地下水の容量を $2.64 \ell$ とし、採水開始時から $2.64 \ell$ 毎に、モニター化学分析を行った。水温、pH、電気伝導度、酸化還元電位、溶存酸素の連続測定結果および、モニター化学分析の結果が安定し、もともとその深度の地層中に存在している地下水でパッカー間が満たされていると判断されるまでこの作業を繰り返し、連続的に地下水を採取した。なお、本試験では44回（約 $22 \ell$ ）の採水を地下水モニター期間とし、その後化学分析およびバクテリア調査用試料として採水を行った。各種調査における採水容量を第2-2表に示す。

第2-2表 各種調査のための採水容量

項目	総採水容量 (ℓ)	主な内訳 (ℓ)	
モニター分析	21.75	分析用	21.75
化学成分の測定	26.50	溶存气体	6.00
		同位体	6.50
		その他	14.00
		ウラン用	5.50
バクテリア調査	2.50	分析用	2.50

### 2.3 試料採取と分析項目

試料採取は、先に述べた採水作業で行った深層地下水と表流水を対象とした浅層地下水の採取を行った。

深層地下水の採取には、内部圧力を十分に保持できるステンレス製の地下水サンプラーを使用した。モニター期間における採水は、地下水サンプラーを可能な限り減圧しても大気の混入を無視することはできず、結果に誤差を生じさせる可能性がある。したがって、あらかじめ地下水サンプラー内部をアルゴンガス（99.999%以上）により置換しステンレス容器内への大気の汚染を防いだ。なお、アルゴンガスによるサンプラー内部へのページは5回連続で行った。分析項目は、下記に示す項目とした。

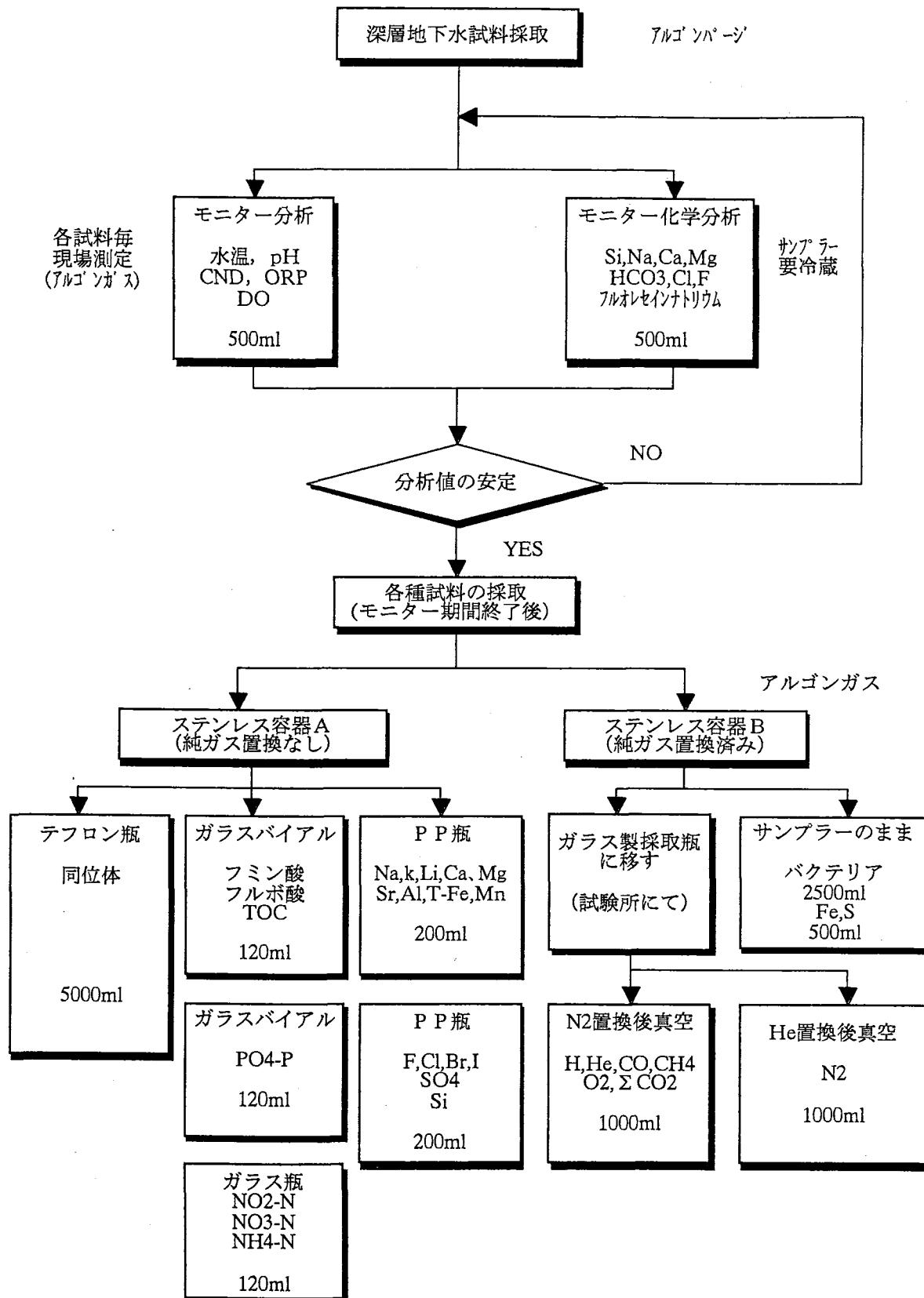
- 1) O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, He, CH<sub>4</sub>, CO, ΣCO<sub>2</sub>
- 2) Fe<sup>2+</sup>, S<sup>2-</sup>
- 3) TOC, フミン酸, フルボ酸
- 4) Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, 全-Fe
- 5) Cl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, H<sub>2</sub>S, N(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), Si
- 6) <sup>3</sup>H, δ<sup>2</sup>H, δ<sup>18</sup>O
- 7) バクテリア調査

溶存ガスおよびFe<sup>2+</sup>, S<sup>2-</sup>の測定に供する試水（地下水）は、地下水サンプラー容器のまま氷冷保存（約2°C）して実験室に持ち帰った。その他の分析に供する試水（地下水）は原則としてポリプロピレン製容器あるいはガラス製バイアルに分注し、氷冷保存して実験室に持ち帰った（第2-1図参照）。なお、各試料の分注に伴う共洗い回数は同位体分析用試料を除き5回行った。

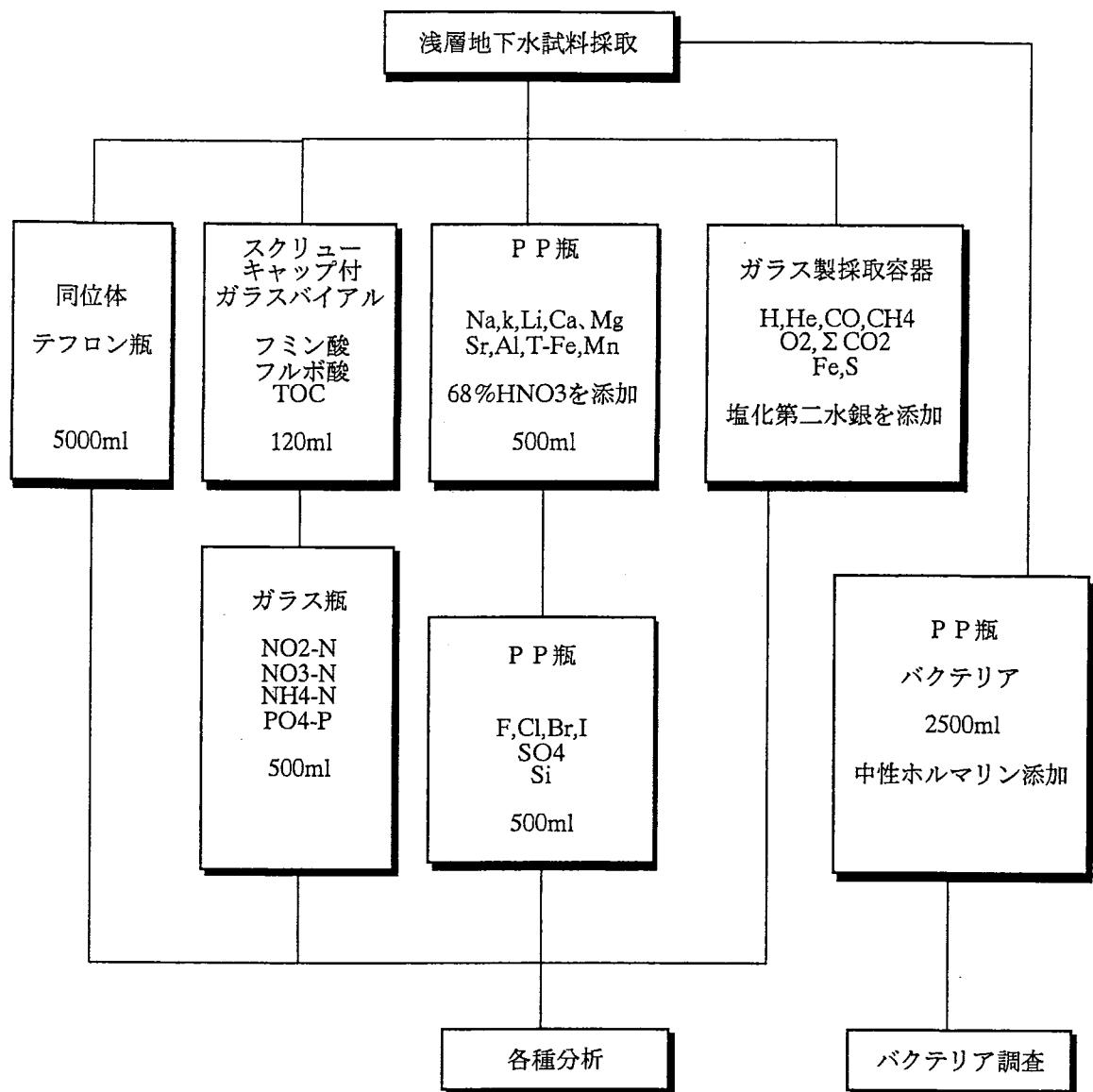
浅層地下水の採取のうち、溶存ガス成分については、ガラス製ガス採取容器（1ℓ）を減圧し使用した。採取した浅層地下水試料とも地下水試料と同様に氷冷保存し持ち帰った（第2-2図参照）。浅層地下水分析項目は、以下に示すとおりである。

- 1) O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, He, CH<sub>4</sub>, CO, ΣCO<sub>2</sub>
- 2) Fe<sup>2+</sup>, S<sup>2-</sup>
- 3) TOC, フミン酸, フルボ酸
- 4) Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, 全-Fe
- 5) Cl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, H<sub>2</sub>S, N(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), Si
- 6) <sup>3</sup>H, δ<sup>2</sup>H, δ<sup>18</sup>O
- 7) バクテリア調査

試料採取に関する手順および試料の前処理法等は以下の節（2.3.1～2.3.7）に詳述する。



第2-1図 深層地下水試料の採取から分析までの概略



第2-2図 浅層地下水試料の採取から分析までの概略

### 2.3.1 $O_2, N_2, He, H_2, CO, CH_4, \Sigma CO_2$ の定量用試料

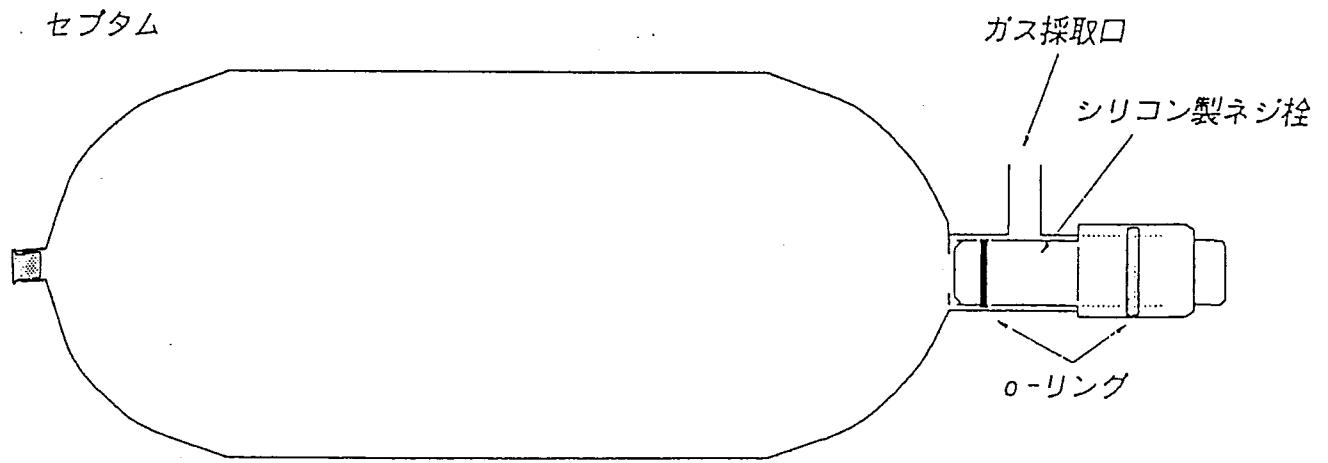
地下水サンプラーにより採取した深層地下水試料は、第2-3図に示すようなガラス製ガス採取管（1ℓ容量）に全量を移し、その後各分析に供試した。ステンレス製採水容器からガラス製ガス採取管に地下水試料を移す手順は以下のように行った。

- 1) ガラス製ガス採取管について真空引きおよび任意の純ガス ( $He, N_2$ ) 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-750mmHg (デジタルマノメータの指示値による) であった。
  - 2) 1) 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水管に移行させた (第2-4図参照)。さらに、両者を連結させた状態のままで、ステンレス製採水容器に任意のガスを充填したテドロ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すべてガラス製ガス採取管に移した。なお、このときのガラス製ガス採取管内の圧力は常圧であった。
  - 3) 試料に塩化第2水銀溶液 (1w/v%) を2ml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を使用し、水素、ヘリウム、一酸化炭素ガスおよびメタンガス測定用には窒素ガスを使用した。試料採取後から36時間以内に上記作業を完了した。

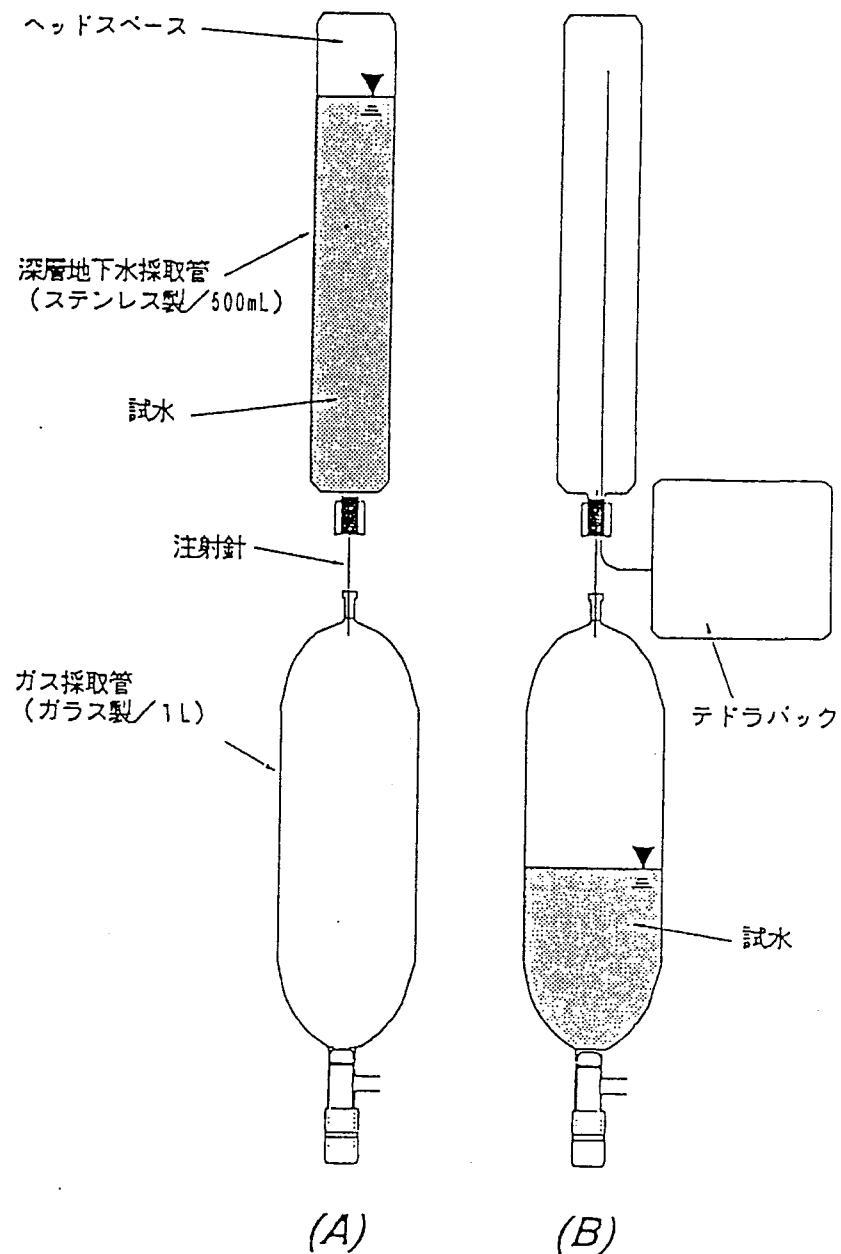
浅層地下水試料は、アルゴンパージしたガラス製ガス採取管 (1ℓ) にヘッドスペースを残さないように採取した。このバイアル瓶試料に注射器により塩化第二水銀溶液 (1w/v%) を添加し、生物活性を停止させ氷冷保存して持ち帰った。得られた水をシリンジにより採取し、別に任意のガス ( $He, N_2$ ) 置換を行い、減圧状態 (-200~-300mmHg) にしたバイアル瓶 (120ml) に約30~40ml分注し、その後、必要があればテドロバックを用いて任意のガス ( $He, N_2$ ) を充填しバイアル瓶内の圧力を1気圧に戻した。この作業のうち、試水をシリンジで採取する際には、バイアル瓶内が減圧状態にならないように、液相と気相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 ( $CH_3(CH_2)CH_3$ ) を緩やかに注入した (第2-5図参照)。

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由採取するときに応用している (項目3.1.2参照)。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。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およ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。浅層地下水試料について、上記作業を試料採取後36時間以内に完了した。

以上のように調製した深層地下水、浅層地下水試料を、酸素、窒素、ヘリウム、水素、一酸化炭素、全炭酸、メタンの各測定に供した。

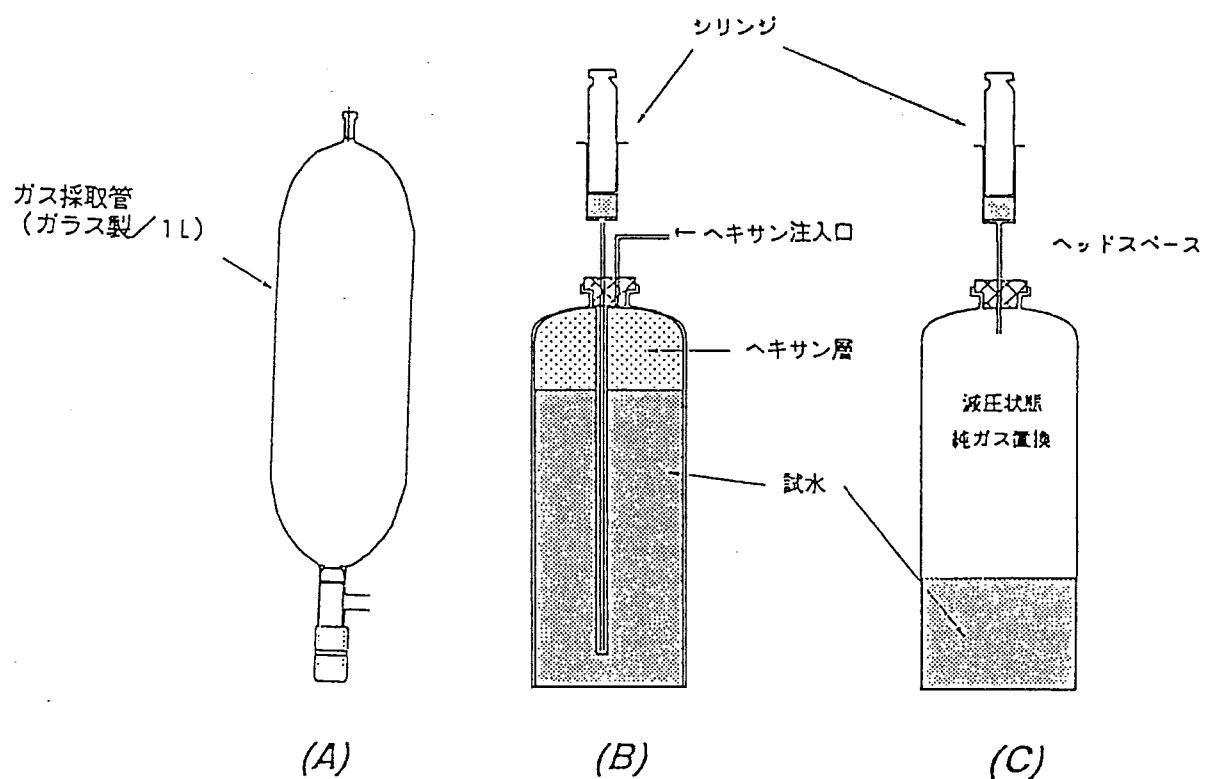


第2-3図 ガラス製ガス採取管の概略  
(採取容量: 約1ℓ)



第2-4図 地下水試料におけるヘッドスペース測定試料調製方法の概略

- (A) 深層地下水を汲み上げたステンレス製採水容器は10気圧程度の加圧状態である。一方ガラス製採水容器は任意の純ガスにより置換した後に減圧に保持した。これらの容器を注射針で連結すると試水およびヘッドスペース中のガスが移行する。
- (B) 試水およびガスがある程度移行し、両容器の圧力が等しくなった時点（減圧状態）でテドラバックにより任意の純ガスをステンレス製採取容器に導入する。この作業によりステンレス製採取容器内の試料ガスのほとんどがガラス製ガス採取容器へ移行し、同時にすべての系が常圧に戻ることになる。



第2-5図 浅層地下水試料におけるヘッドスペース測定試料調製方法の概略

(A) 浅層地下水を採取したガラス製ガス採取容器

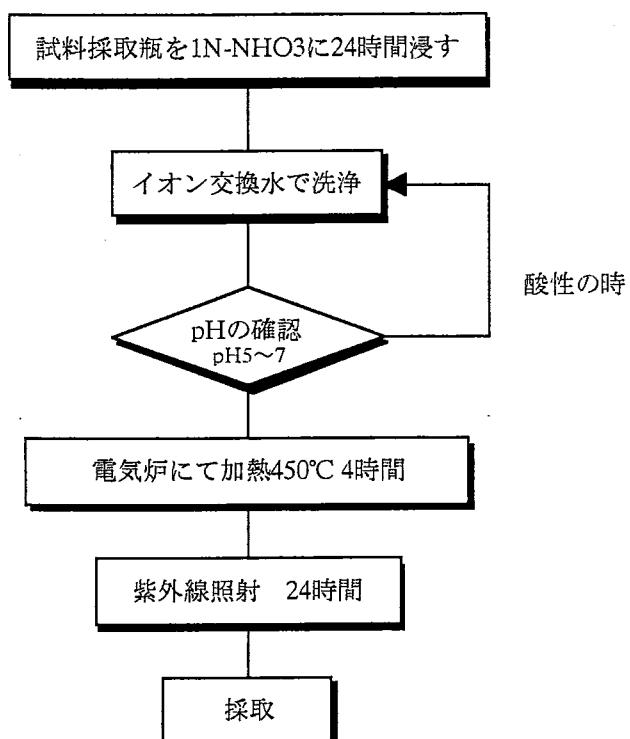
(B) (A) を注射針で任意の純ガスにより置換し減圧状態にした別のバイアル瓶にて連結することにより試料を採取する。このときのバイアル瓶内の圧力は常圧(大気圧)である。

### 2.3.2 $\text{Fe}^{2+}, \text{S}^{2-}$ の定量用試料

深層地下水における溶存態還元物質（遊離2価鉄および硫化物イオン）の測定に供する試料は、原則としてステンレス製地下水サンプラーのまま実験室に持ち帰り、その後、注射器（20ml）により採取して分析作業に供した。なお、地下水試料の採取および試料保存は溶存ガス成分と同様である。浅層地下水試料の採取は溶存ガスの場合と同様に行つた。

### 2.3.3 TOCおよびフミン、フルボ酸の定量用試料

深層地下水および浅層地下水ともに、酸処理、熱処理（450°C、4時間）および紫外線照射を施したスクリュ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、氷冷保存して実験室に持ち帰った。TOCおよびフミン、フルボ酸の定量用試料の採取までの操作概略を第2-6図に示す。

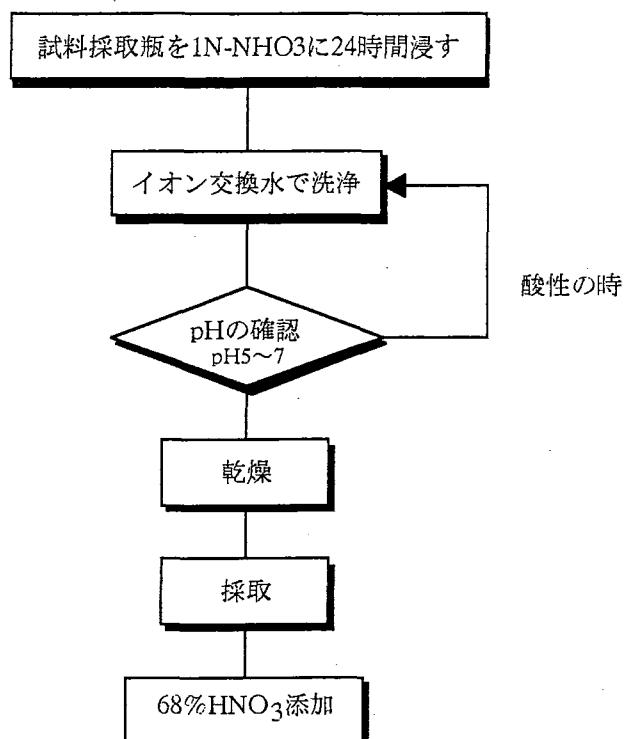


第2-6図 TOCおよびフミン、フルボ酸の定量用試料の採取までの操作概略

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

深層地下水および浅層地下水とともに、酸処理をしたポリプロピレン製容器に分注し、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て実験室に持ち帰った。

Na,K,Li,Ca,Mg,Sr,Al,全Fe,Mnの定量用試料採取までの操作概略を第2-7図に示す。

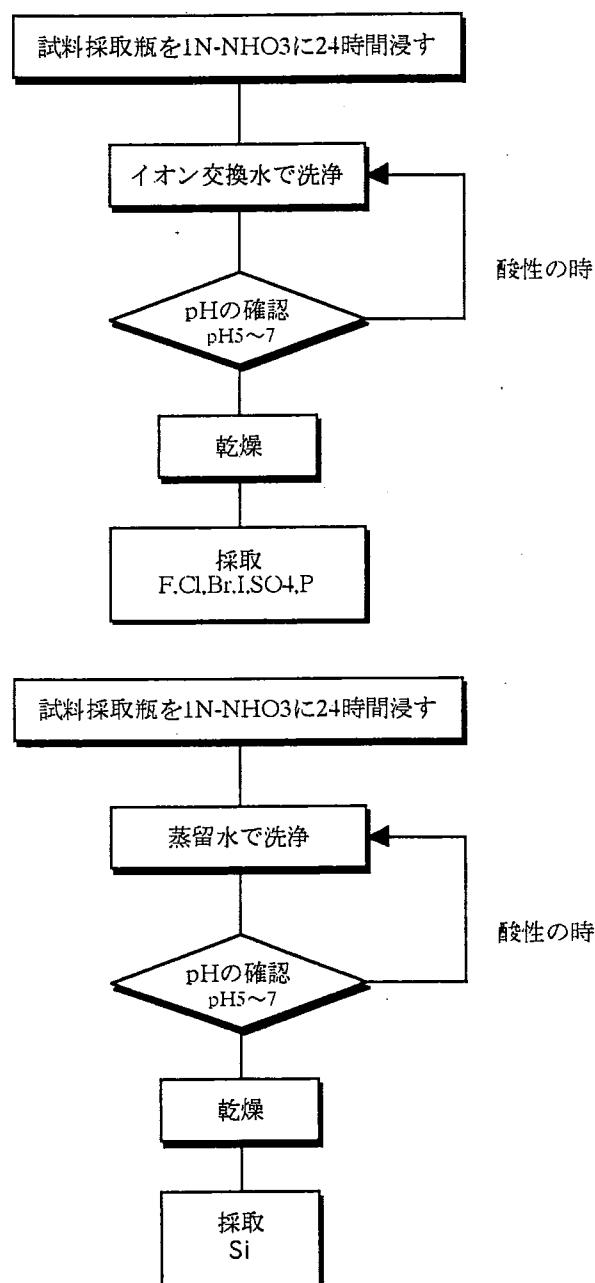


第2-7図 Na,K,Li,Ca,Mg,Sr,Al,全Fe,Mnの定量用試料の採取までの操作概略

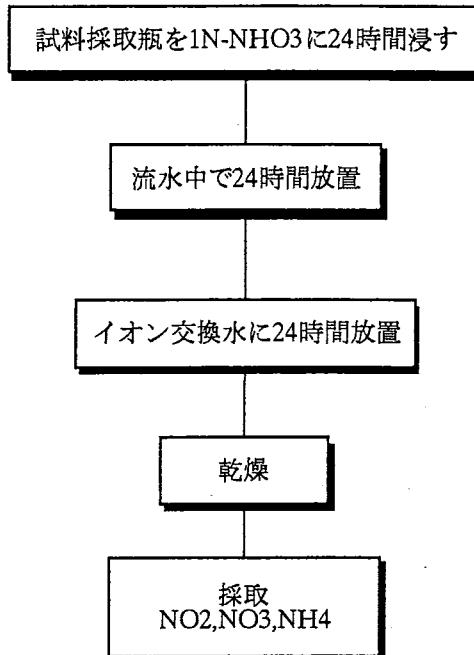
### 2.3.5 F,Cl,Br,I,SO<sub>4</sub>P,窒素化合物 (NO<sub>2</sub>,NO<sub>3</sub>,NH<sub>4</sub>),Siの定量用試料

深層地下水および浅層地下水とともに、酸処理したポリプロピレン製容器に分注し、氷冷保存して実験室に持ち帰った。

なお、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 (NO<sub>2</sub>,NO<sub>3</sub>,NH<sub>4</sub>) 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第2-8、2-9図に示す。



第2-8図 F,Cl,Br,I,SO<sub>4</sub>PおよびSiの定量用試料の採取までの操作概略



第2-9図  $\text{NO}_2, \text{NO}_3, \text{NH}_4$  の定量用試料の採取までの操作概略

### 2.3.6 ${}^3\text{H}$ , $\delta \text{D}$ , $\delta {}^{18}\text{O}$ の分析用試料

深層地下水および浅層地下水ともに、36時間1N有害金属測定用塩酸に浸したテフロン製広口瓶をイオン交換水によりよく洗浄し乾燥器によって乾燥したものに採取した。各成分における採取量それぞれ、 ${}^3\text{H}$ で5 l、 $\delta \text{D}$ および $\delta {}^{18}\text{O}$ で合計1.5 lである。また、同位体分析用試料採取における各採取瓶の共洗いは瓶容量の約10%程度の試水で各々10回行った。

### 2.3.7 バクテリア調査用試料

#### (1) 深層地下水

深層地下水は、オートクレーブ滅菌済みの地下水サンプラーにより採取した。深層地下水採水に際して地下水サンプラーは、減圧（真空引き）およびアルゴンガス（純度99.999%以上）充填を繰り返し、内部を完全にアルゴンガスに置換してから使用した。

##### 1) 全菌数計数用試料の採取

地下から採取した試料を、現場においてシリングにより地下水サンプラーから抜き出し、ポリプロピレン製瓶に分注した。その後、ただ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、オートクレーブ滅菌後、無菌水(0.2μm以下)で洗浄したものを使用した。

##### 2) 生菌数計数用試料の採取

採水管により採取した試料は、採取管そのまま氷冷保存（約2°C）し運搬した。持ち帰った採水管からシリングにより試料を採取し、各細菌の存在調査に供試した。

#### (2) 浅層地下水

##### 1) 全菌数計数用試料の採取

深層地下水と同様に無菌処理を施したポリプロピレン製瓶に試料を直接採取した。その後、ただちに中性ホルマリンを2%濃度となるように添加し、冷暗所に保存して持ち帰った。

##### 2) 生菌数計数用試料の採取

滅菌済みバイアルに直接採取し、空気が残らないように滅菌済みのシリコン栓で密封し、アルミシールを施した後、氷冷保存して実験室へ持ち帰り、各細菌の保存調査に供試した。

### 3. 化学分析の方法および結果

#### 3.1 化学分析の方法

##### 3.1.1 モニター期間における各測定項目の測定方法

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（含フルオレセインナトリウム）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安定を示し、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。

採取した地下水はただちに、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、溶存酸素の順で測定した。またモニター化学分析として $\text{Si}$ , $\text{Na}^+$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{HCO}_3^-$ , $\text{Cl}^-$ , $\text{F}^-$  フルオレセインナトリウムの8成分について採水量2.64 ごと（パッカー間容量）に分析を行った。

##### （1）水温、pH、電気伝導度、酸化還元電位、溶存酸素の測定方法

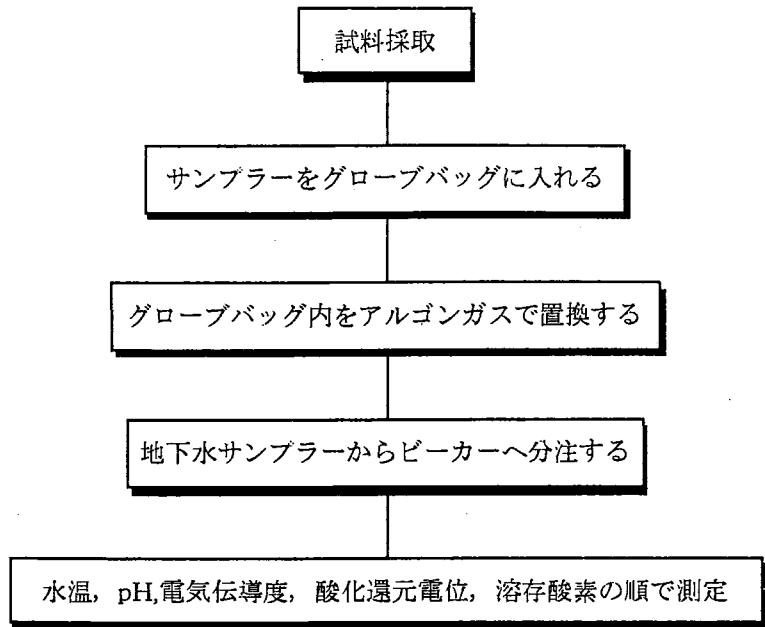
還元物質を含む溶液に対するpHおよび酸化還元電位の測定を大気中で行うと、還元物質と酸素の化合および、酸素の溶存によって重大な誤差を生じさせる原因となる。そこで、グローブバック内をアルゴンガスで十分に置換した。

水温、電気伝導度は東亜電波工業CM-60S、pHは東亜電波工業HM-12A、酸化還元電位は電気化学計器製HPH-110、溶存酸素は、TOA電波工業DO-30Aによって測定した。なお、pH、電気伝導度、酸化還元電位は、pH4.01、6.86標準公正液（関東化学2種）、塩化カリウム溶液、キンヒドロン飽和溶液にて各測定毎にドリフト補正を行った。それぞれの測定方法および誤差を第3-1表に示す。また以上の操作概要を第3-1図に示す。

第3-1表 水素、pH、電気伝導度、酸化還元電位、溶存酸素の測定方法および誤差

測定項目	測定方法	*精度
水温	水銀温度計および電極	±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)
溶存酸素	隔膜電極	±0.01 (mg/l)

\*カタログ値



第3-1図 モニタ期間における水温、pH、電気伝導度、酸化還元電位、溶存酸素の測定

## (2) その他の化学成分モニター分析方法

各種化学成分のモニター分析方法を第3-2表に示す。試料は採取後、ポリプロピレン製容器に移した。このとき、酸の添加等は行わず、できるだけ迅速に分析するように心掛けた。すべての試料は48時間以内に分析した。

第3-2表 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 <sup>+</sup>	ICP法
Ca <sup>2+</sup>	ICP法
Mg <sup>2+</sup>	ICP法
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	赤外吸収法、簡易滴定法
Cl <sup>-</sup>	イオンクロマトグラフ法
F	イオンクロマトグラフ法

### 3.1.2 地下水の化学分析方法

地下水にモニター期間における測定結果が大きな変動を示さず安定を示し、パッカー間が掘削等による汚染の無い地下水で満たされていると判断した後、化学分析用の地下水試料を採取し分析を行った。各測定項目における測定方法を以下に記す。

#### (1) 溶存窒素

深層地下水および浅層地下水ともに小山（1991）が示したように、ガスクロマトグラフ（島津GC14A）により測定した。なお、本方法はJIS K2301（燃料ガスおよび天然ガス分析法）に準じた。測定試料は前項（2.3.1）のように調製したヘッドスペース測定用試料について、その気相の任意容積をガスタイトシリンジにより採取し、ガスクロマトグラフにインジェクトした。本方法における窒素ガスの検出限界は試料水に対して1mg/lである。なお、測定に供する試料は一定温度（20°C）に保持した。

#### (2) 溶存酸素

深層地下水および浅層地下水の溶存酸素濃度は、隔膜電極法およびワインクラー法（Winkler, 1888）で行った。溶存酸素の検出限界は、ワインクラー法では1mg/lである。

また、隔膜電極法では電極の性能や試水の攪拌程度（溶存酸素の膜透過における物理的要因）に依存するが1mg/l以下の値は参考程度とするのが普通である。以上の操作を以下に示す。

##### a) 隔膜電極法

隔膜電極法にはYSI社製のDOメータを使用して、深層地下水試料について採取後ただちに窒素ガスにより置換したグローブボックス内において行った。このときのグローブバック内における気相中の酸素濃度はDOメータの指示値で0.1%以下であった。

##### b) ウィンクラー法

ワインクラー法により溶存酸素の測定において、浅層地下水試料についてはブチルゴム管を付けたディスポーザブルシリンジ（50m l容）によりバイアル瓶にオーバーフローさせながら採取し、ただちにブチルゴム栓とアルミシールにより密封した後に、注射器（1m l容）を用い固定液をバイアル瓶内に注入した。また、深層地下水試料は、ディスポーザブルイリング（50m l容）に抜き取り、ただちに注射器（1m l容）により固定液を注入した。ここで得られた溶存酸素固定済みシリンジは嫌気ガスパック（ベクトンディッキンソン社製）に保持して持ち帰った後に、ただちに滴定を行った。なお、深層地下水試料において、ステンレス製採水容器のまま氷冷保存して持ち帰った試料についてもワインクラー法による測定を行った。

### (3) 水素、ヘリウム

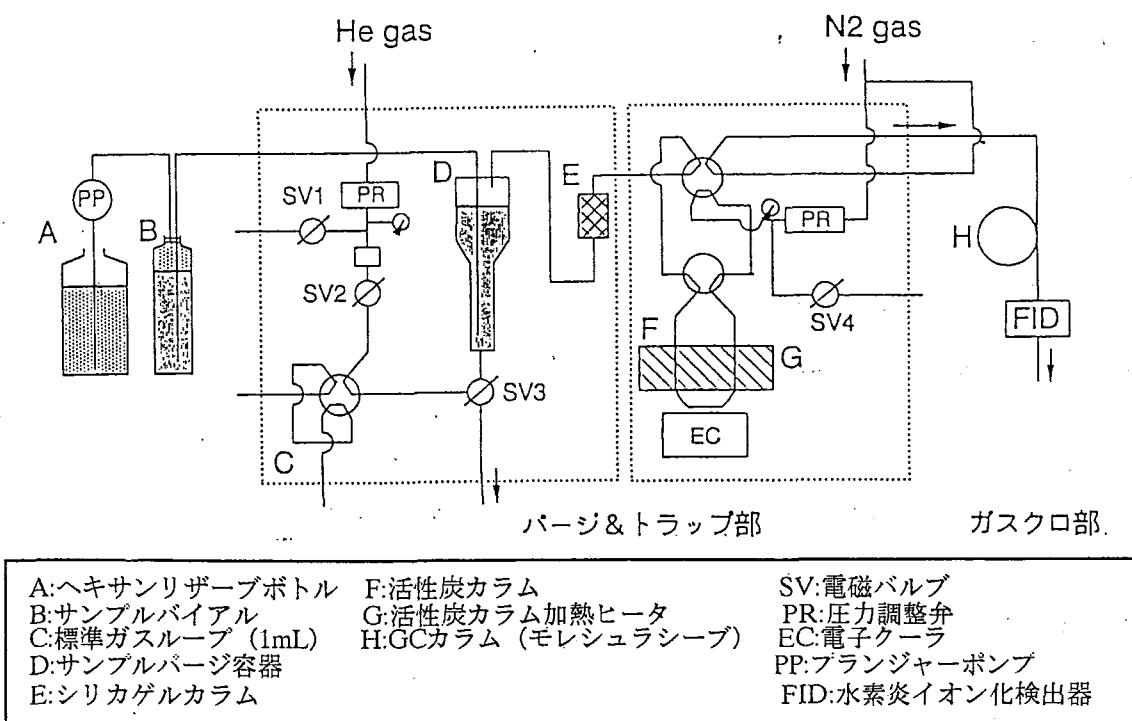
溶存水素およびヘリウムは、溶存窒素と同様にガスクロマトグラフィーにより測定した。測定条件はキャリアーガスに窒素を用いる以外は全て同じである。このときの水中における水素およびヘリウムガス濃度の検出限界は、各々0.2および0.4mg/lである。

### (4) メタン

2.3.1に前述したヘッドスペース測定用試料は、検出器にFIDを付したガスクロマトグラフ（島津GC14A）により測定した。

測定条件は、分離カラム：Molecular Sieve 13X 30/60、温度：50.0°Cの定温、流量：窒素40.0ml/minとして、FIDでメタンを検出した。なお、大気中に存在するメタンガスは1.6~1.8ppm前後であることが知られており、例えば25°Cにおける大気と平衡にある水中のメタン濃度は約2nmol (32ng/l) である。つまり、本調査において浅層地下水中のメタン濃度をヘッドスペース法により定量することは不可能である。したがって本調査では、浅層地下水については、パージアンドトラップ法により浅層地下水試料を濃縮した後にガスクロマトグラフに導いて定量を行った。

本方法は浅層地下水試料の約10mlをバイアル瓶からパージ容器に直接導入し、ヘリウムガスでパージし、活性炭トラップ（粒状活性炭60/80メッシュ、温度-30°C）に導く。トラップしたメタンを120°Cに加熱して窒素ガスにてガスクロマトグラフィー部に導入して測定する（第3-2図参照）。この手法では検出限界が約2nMであり、定量範囲については、 $\mu M$ 以上に及ぶ直線性を確認している。なお、メタン分析においてヘッドスペース法における検出限界は0.01ppmである。



第3-2図 水中メタン分析装置の概略

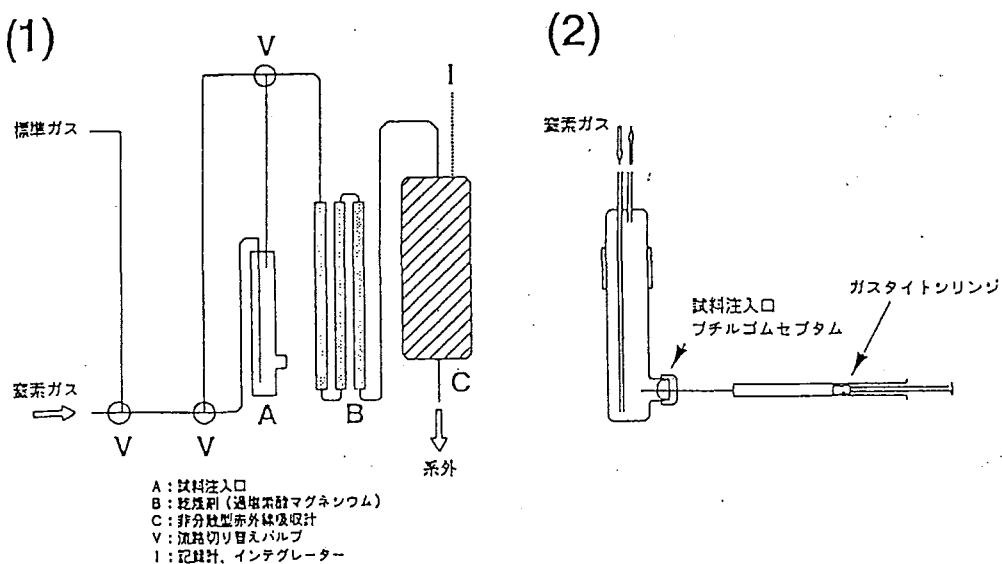
### (5) 一酸化炭素

一酸化炭素はガスクロマトグラフ法によりJIS K 0098（排ガス中の一酸化炭素分析方法）のうち、メタン化反応装置付きFIDにより前項（2.3.1）に示したヘッドスペース測定用試料について、その気相部を測定した。なお、一酸化炭素ガスはTCDによっても検出可能であるが、その検出能力は比較的低い。したがって、本調査では、一酸化炭素を水素ガスと触媒によりメタンに還元し、生成したメタンをFIDにより検出した。測定には島津社製ガスクロマトグラフ（GC14A）を使用し、測定条件は分離カラム：Molecular Sieve 13X 30/60、カラム温度：30.0°C、検出器温度：100°C、流量：水素 30.0ml/minとした。検出限界は水中濃度として0.05mg/lである。

### (6) 二酸化炭素

試料中の全炭酸濃度は前項（2.3.1）に示したヘッドスペース測定用試料について、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（国際電機社製）に導入して測定した（第3-3図参照）。ここで測定された気相中の炭酸濃度からヘンリーの法則に従い、Bunsenの吸収係数を用いて算出により試料水中の全炭酸濃度を求めた。

溶離液に0.1mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を用い、除去液には10mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を使用した。溶離液および除去液ともに流量は2ml/minとした。なお溶離液は純窒素（99.99%以上）によりバージしながら使用した。赤外線吸収法における検出限界は液相濃度で0.02mM（炭酸ガスの絶対量として1ppm）である。



第3-3図 非分散型赤外線吸収による炭酸ガス測定装置の概略

### (7) ヘッドスペース法による各種溶存気体濃度の計算方法

ヘッドスペース法により定量した各種溶存気体成分（窒素、酸素、水素、ヘリウム、メタン、一酸化炭素、二酸化炭素）の計算方法を以下に示す。

第3-4表および第3-5表に各温度における各ガス成分单一系のBunsenの吸収係数 $\alpha$ およびOstwaldの溶解度係数 $\beta$ を示す。ここでBunsenの吸収係数 $\alpha$ は水1m $l$ に溶解する気体の体積(m $l$ )を0°C、1気圧に換算した値であり、Ostwaldの溶解度係数 $\beta$ は水1m $l$ に溶解する気体の体積(m $l$ )をその温度における体積で表したものである。また、Bunsenの吸収係数 $\alpha$ とOstwaldの溶解度係数 $\beta$ の関係は以下の式のように表される。

$$\beta = \alpha \times \frac{273.15 + t}{273.15}$$

ここで、t: 実験温度(°C)とする。

今、試料を注入したヘッドスペース測定用容器内部の全圧とする。求めるガス成分の水に対する溶解度が小さくて、溶媒と反応しないとすればこの法則を適用することができる。すなわち、圧力が余り高くない範囲では一定温度での溶解度は分圧に比例することになる。したがって、求めるガス成分の分圧を1atmとすれば、吸収係数 $\alpha$ あるいは溶解度係数 $\beta$ を乗ずれば、分圧における溶解度が求められる。これらのことにより以下の計算例のように水中のガス成分濃度を計算により求められる。

#### 《計算例》

調整したヘッドスペース用試料の密閉容器内において

気層の体積 $V_g = 100\text{m l}$

液層の体積 $V_L = 20\text{m l}$

容器内の全圧 $\text{Pa} = 1\text{atm}$

温度=20°C(一定)

とする。

今、ヘッドスペース法によるガス成分の測定において

$N_2 = 6000\text{ppm}$

$O_2 = 2000\text{ppm}$

という結果が得られ、その他のガス成分は検出されなかつたか、あるいは $N_2, O_2$ の濃度に対して十分に無視できうる濃度であったとする。この場合、気層部分に含まれる $N_2$ および $O_2$ の絶対値は理想気体の状態方程式より以下のように求められる。

気層部分における $N_2$ の絶対量( $\mu\text{ mol}$ )

$$= \frac{1(\text{atm}) \times 6000 \times 10^{-6} \times 0.1(\text{l})}{0.0821 \times 293.15} = 24.9$$

気層部分における $O_2$ の絶対量( $\mu\text{ mol}$ )

$$= \frac{1(\text{atm}) \times 2000 \times 10^{-6} \times 0.1(\text{l})}{0.0821 \times 293.15} = 8.3$$

ここで、20°CにおけるN<sub>2</sub>およびO<sub>2</sub>のBunsen吸収係数 $\alpha$ は各々0.0152および0.031であるからN<sub>2</sub>およびO<sub>2</sub>の分圧を

$$P_{N_2} = 0.75 \times 0.6 (\%) = 0.0045$$

$$P_{O_2} = 0.25 \times 0.2 (\%) = 0.0005$$

と算出でき、各々の吸収係数を $6.84 \times 10^{-5}$ および $1.55 \times 10^{-5}$ を導ける。この値から液層20mlに溶けているN<sub>2</sub>およびO<sub>2</sub>の絶対量を算出すると

液層におけるN<sub>2</sub>の絶対量 ( $\mu\text{ mol}$ )

$$= 20 (\text{ml}) \times 6.84 \times 10^{-5} \times 10^{-3} / 22.4 (\text{l}) = 0.061$$

液層におけるO<sub>2</sub>の絶対量 ( $\mu\text{ mol}$ )

$$= 20 (\text{ml}) \times 1.55 \times 10^{-5} \times 10^{-3} / 22.4 (\text{l}) = 0.014$$

となる。したがって、調整したヘッドスペース測定用試料の液層中に溶解しているガス成分の濃度は気層中のそれぞれに比べて無視してよいことになる。

よって、もとの試料中に溶存していたN<sub>2</sub>およびO<sub>2</sub>濃度は

$$N_2 (\text{mg/l}) = 24.9 \times 10^{-3} \times 28.01 \times (1000/20) = 34.87$$

$$O_2 (\text{mg/l}) = 8.3 \times 10^{-3} \times 32.00 \times (1000/20) = 13.28$$

のように算出される。

第3-3表 水に対する気体の溶解度 (Bunsen吸収係数 $\alpha$ )

Temp. (°C)	$\alpha \times 10_2$						
	H <sub>2</sub>	He	N <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	CO	CO <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>
0	2.14	0.940	2.31	4.89	3.54	171.7	5.56
10	1.95	0.898	1.83	3.80	2.82	123.8	4.18
15	1.88	0.884	1.66	3.42	2.54	101.5	3.69
20	1.82	0.874	1.52	3.10	2.32	87.3	3.31
25	1.75	0.866	1.41	2.83	2.14	75.9	3.01

※化学便覧基礎編 改訂3版 (日本化学会、1984) より引用

第3-4表 水に対する気体の溶解度 (Ostwald吸収係数 $\beta$ )

Temp. (°C)	$\beta \times 10_2$						
	H <sub>2</sub>	He	N <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	CO	CO <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>
0	2.14	0.940	2.31	4.89	3.54	171.7	5.56
10	1.88	0.866	1.77	3.67	2.72	119.4	4.03
15	1.78	0.838	1.57	3.24	2.41	96.2	3.50
20	1.70	0.814	1.40	2.89	2.16	81.3	3.08
25	1.60	0.793	1.29	2.59	1.96	69.5	2.76

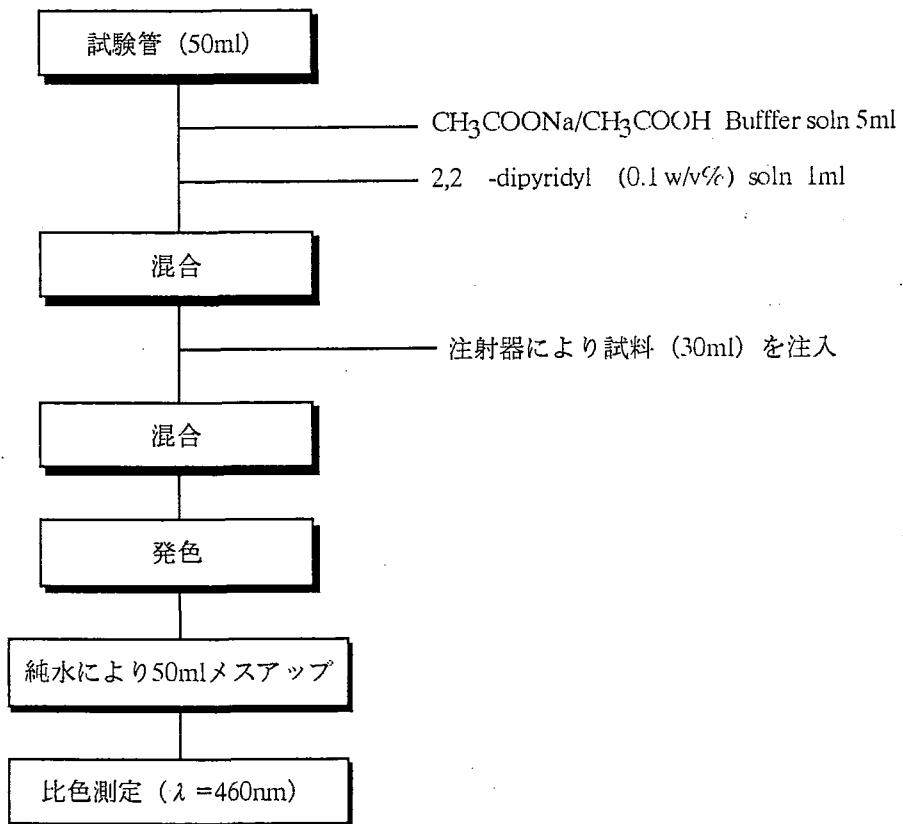
※化学便覧基礎編 改訂3版 (日本化学会、1984) より引用

### (8) 全有機性炭素 (TOC)

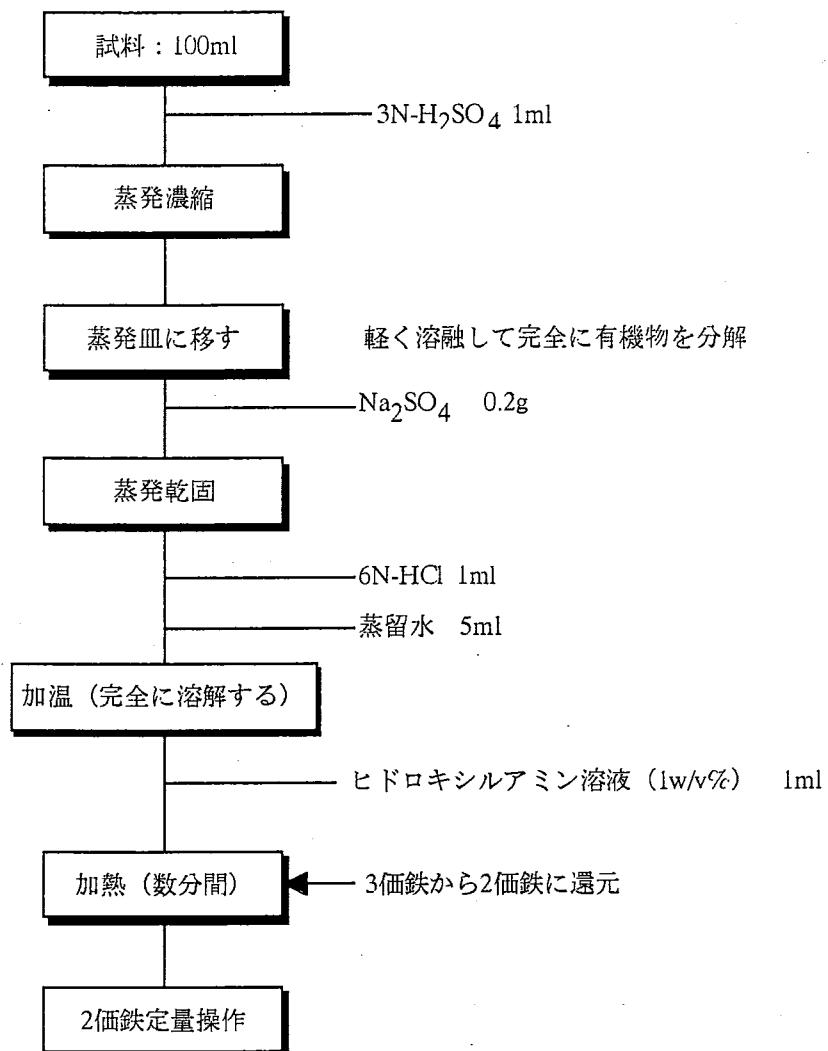
ガラス瓶にて持ち帰った試料を濾過せず分析装置（島津TOC-500）を用い赤外吸収による乾式法により測定した。すなわち、試水を希塩酸によりpH=4以下に調整し、その後純窒素ガスにてバーリングを行い炭酸ガスを除去する。この調整された試水をTOC測定系に導入して分析を行った。なお、本分析における検出限界は0.1mg/lである。

### (9) $\text{Fe}^{2+}$ および全-Fe

遊離2価鉄および全鉄は小山（1991）が示した比色法（吸光光度法）により分析した（第3-4および3-5図参照）。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460nmにおける吸光度を測定して求めた。比色法（吸光光度法）による遊離2価鉄の検出限界は0.06mg/lである。全鉄はICPによって測定を行った。



第3-4図  $\text{Fe}^{2+}$ の定量操作概略



第3-5図 全-Feの定量操作概略

(10) F,Cl,Br,SO<sub>4</sub>

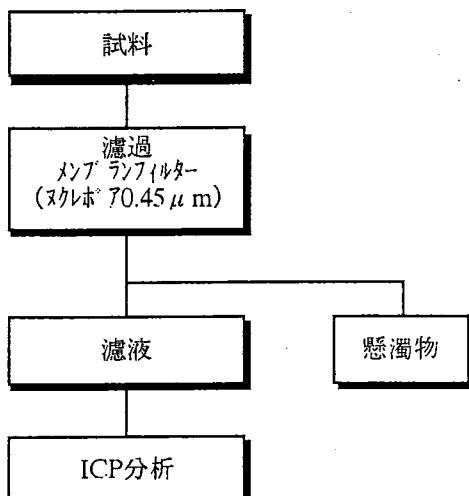
フッ素、塩素、臭素、硫酸イオンは、イオン排除型イオンクロマトグラフィー（横河電機IC7000）により測定した。イオンクロマトグラフィーによる無機イオンの検出限界は、目的物質により異なり、また、他のピークのテーリング等によつても異なるが、およそ0.1mg/lは十分に定量できると考えられる。

(11) Na,Li,Ca,Mg,Sr,Al,Mn,S,全-Fe,K

Na,Li,Ca,Mg,Sr,Al,Mn,S,全-Fe,Kの各金属成分はICP（セイコ-電子工業SPS-1200VR）を用い定量した。なお、Al,Mn,全-Feについては、標準添加法を取り入れた。また、Kは原子吸光（島津AA690.12）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0.05,0.09,0.001,0.005,0.005,0.01,0.005,0.05,0.01,0.5である。

(12) Si

Siの分析はICP法により求めた。ICP法によるSiの定量操作概略を第3-6図に示す。また、ICP法ではセイコ-電子工業SPS-1200VRにより定量した。検出限界(mg/l)は0.05である。濾過を施した試料に関する値をSiとした。



第3-6図 ICPによるSiの定量操作概略

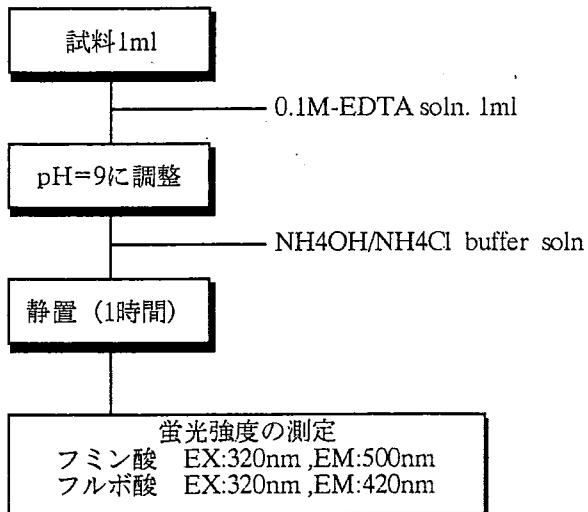
(13)  $\text{NH}_4\text{NO}_2\text{NO}_3\text{PO}_4$

アンモニウムイオンは、インドフェノール青改良型吸光光度法、亜硝酸イオンはスルファニルアミドとNエチレジアミンにより発色させる吸光光度法（JIS K 0102）、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。

オルトリン酸イオンは、モリブデン青吸光光度法と同じ原理である混合試薬吸光光度法（Murphy and Riley, 1962）により定量した。全リンは、ペルオキソ二硫酸（過硫酸）カリウムを用いてオートクレーブ（120°C、60分）分解を行う湿式分解法（環境庁告示第140号）により全てのリンをリン酸態リンに分解して測定を行った。なお、ペルオキソ二硫酸（過硫酸）カリウムは、栄養塩類測定用として販売されている和光製薬製のもとのを用いた。

(14) フミン酸およびフルボ酸

深層地下水および浅層地下水試料についてフミン酸およびフルボ酸の定量は松田ら（1979）の方法を一部改変して求めた（第3-7図参照）。すなわち、試料1mlに対して0.1M-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に調整し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）およびフルボ酸（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使用した。また、フルボ酸は東京化成のリグニンスルfonyl酸ナトリウムを標準試薬とした。蛍光光度計は日立F-1100を使用した。



第3-7図 フミン、フルボ酸の定量操作概略

### a) フミン酸およびフルボ酸の精製方法

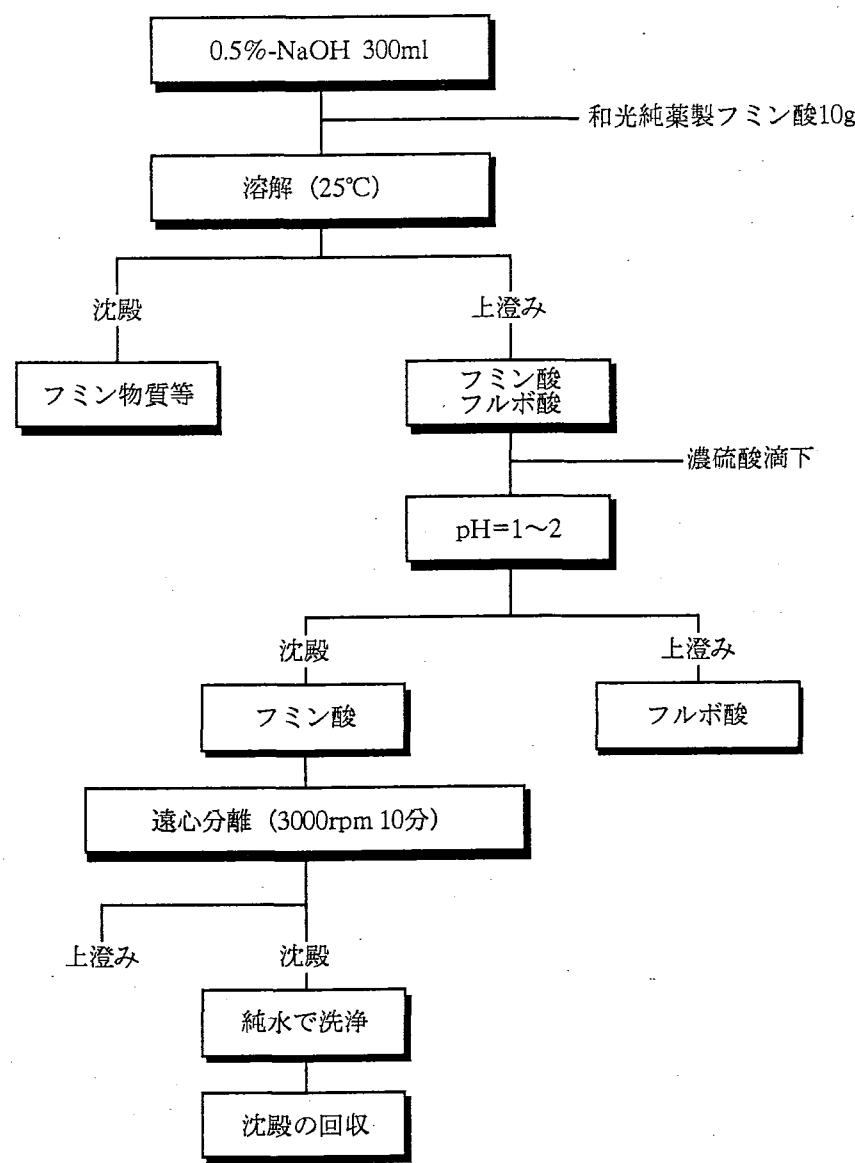
酸標準試薬について、定量・定性分析に使用する際には以下のことについて考慮しなくてはならない。

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およびAldrich Chemical Co.,Inc製のものが代表的である。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で置換したものであるが、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。いずれにしても、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ことが必要となってくる。

例えば、ある地域の溶存態フミン酸を定量するときは、目的とする土壤もしくは水を採取し、そこからフミン酸を抽出して標準試料とすることが望ましい。しかしながらフミン酸抽出および精製には試料水が大量に必要となるばかりでなく、抽出、精製に国際的に基準化された方法はない。さらに、一つの地域におけるモニタリングでは有効な手段であるが、目的とする地域が多岐にわたるときはデータの標準化の観点からも標準試薬として代表的なものを選択することが望ましいと考えられる。

以上の観点から本試験では和光純薬のフミン酸を第3-8図の方法で精製したものを標準試料の調製等に用いた。なおリグニンスルфон酸ナトリウムおよび精製したフミン酸のC : H : N含有量(%)は以下の通りである。

リグニンスルfon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



第3-8図 フミン酸の精製方法操作概略

### 3.1.3 同位体分析法

$\delta D$  は  $H_2$  ガス、  $\delta^{18}O$  は、  $CO_2$  ガスにして質量分析計を用いて行った。分析試料のガス化への前処理は以下の方法による。なお、安定同位体組成は、  $\delta$  値で表現され、次式で定義される。

$$\delta = (R_x - R_{st}) / R_{st} \times 1000$$

$x, st$  は、測定試料および標準試料を示し、  $R$  は対象とする同位対比 ( $D/H, {}^{18}O/{}^{16}O$ ) である。標準試料は  $\delta D, \delta^{18}O$  に SMOW (標準平均海水) が用いられる。

#### (1) $\delta D$

水試料はファインピペットを用いて  $5\mu l$  を採取し、反応容器内で約 0.1g の金属亜鉛と、真空下  $450^{\circ}C$  で反応させた  $H_2$  ガスを発生させる。誤差は 1 % である。

#### (2) $\delta^{18}O$

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、  $30m l$  の  $CO_2$  ガスを市販の  $CO_2$  ボンベより導入し、十分に振ったのち一度  $CO_2$  を捨てて溶存空気を追い出した後、新たに  $CO_2$  ガスを入れる。これを  $25^{\circ}C$  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  ${}^{18}O$  に富む同位体組成に固定される (Yoshida, N and Mizutani, Y : 1986)。この二酸化炭素ガスを真空装置を用いて水と空気を取り除いた後、質量分析計で測定することにより同位体比を算出する。その誤差は ±0.15 % である。

#### (3) ${}^3H$

$2l$  の水試料は、いったん濾過され、蒸留され電気濃縮される。これを繰り返して数  $m l$  まで濃縮し、パッカード社 2550TRI 液体シンチレーションカウンターで測定した。定量限界値は 0.3TR、誤差は 0.4TR である。

### 3.2 化学分析結果

#### 3.2.1 モニタ一期間中の測定結果

採水区間（深度220.00～222.00m）の地下水が掘削等による水質変化の影響が無くなつたと判定されるまで19.75 l の連続採水を地下水モニタ一期間として各種測定を行つた。以下にモニタ一期間における測定結果を示す。

##### (1) 水温

水温は、外気の影響を受けばらつきがあるものの、最高値で24.6°C、最低値で17.0°C、平均で20.5°Cであった。

##### (2) pH

pHは、ほぼ安定した値を示し、最高値で6.76、最低値で6.29、平均で6.45であった。

##### (3) 電気伝導度

電気伝導度は、ほぼ安定した値を示し、25°C換算値で最高値が61.1mS/cm、最低値で37.6ms/cm、平均で45.5mS/cmであった。25°Cにおける電気伝導度の換算値は以下の式に準じた。

$$EC\ (25^{\circ}\text{C}) = (EC \times (25-t) \times 2/100) + EC$$

ただし、EC：測定値

t：測定温度 (°C)

##### (4) 酸化還元電位

酸化還元電位は、Eh値で最高値が170.5mV、最低値で137.1mV、平均で155.4mVであった。また、No.15より測定器を変更したため、やや高い値を示すが、概ね160mVで安定している。なお、Ehの換算は以下の式に準じた。

$$Eh\ (\text{mV}) = - (t-10) \times 0.6 + 217 + ORP$$

ただし、ORP：測定値

t：測定温度 (°C)

##### (5) 溶存酸素

溶存酸素は、測定結果からみると明確な傾向が見られない。これは隔膜電極により測定を行つたための誤差と考える。また、今回行つた隔膜電極法による測定は、電極の性能や試水の攪拌度に依存し、通常 $1\text{mg/l}$ 以下を参考値として取り扱うこととされている。したがつて、今回の測定値は参考値として取り扱うこととする。

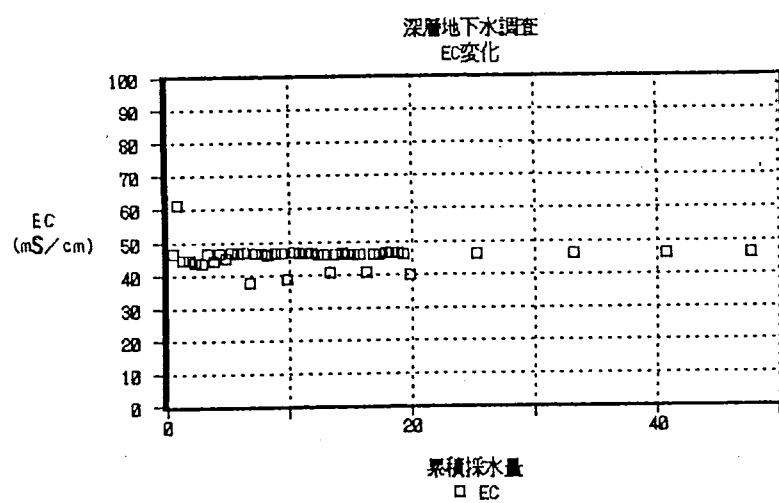
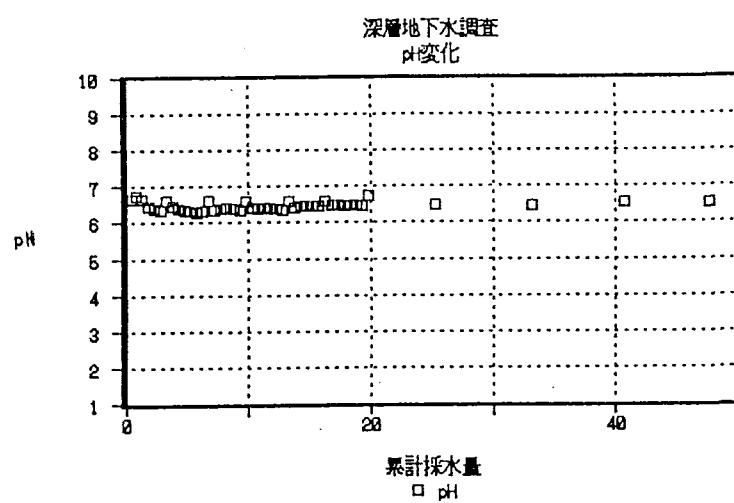
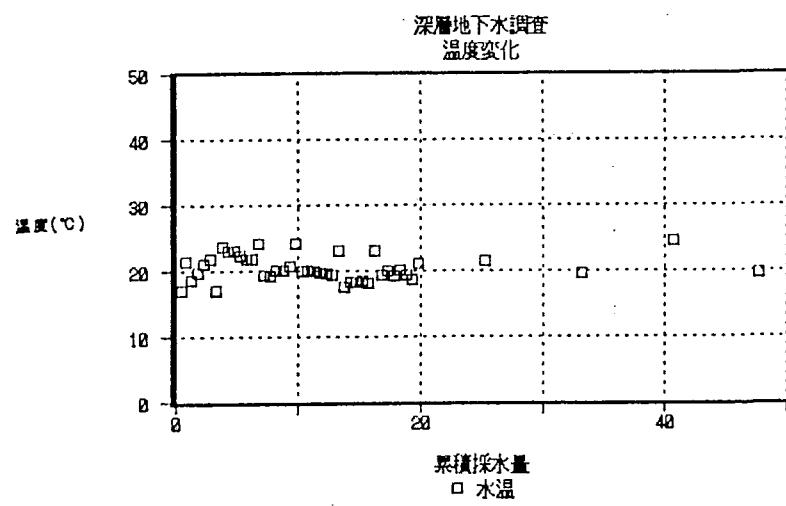
モニター測定結果を第3-5表および第3-9, 3-10図に示す。また、第3-6表にモニターパーク統計計算結果を示す。

第3-5表 モニター測定結果

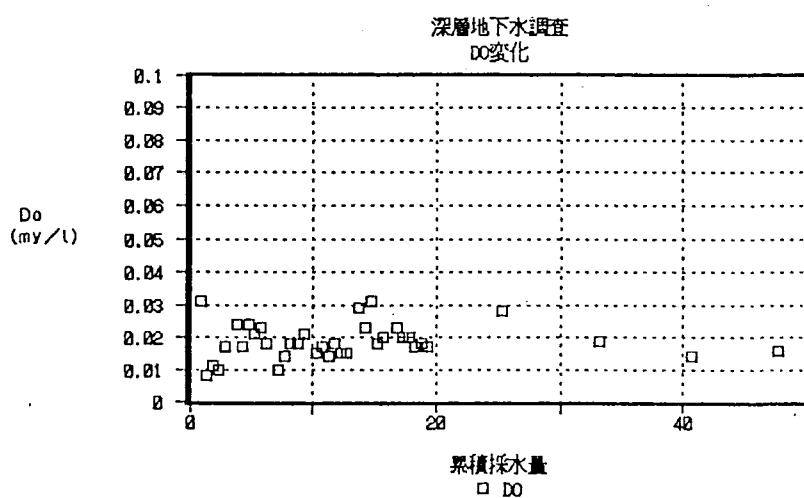
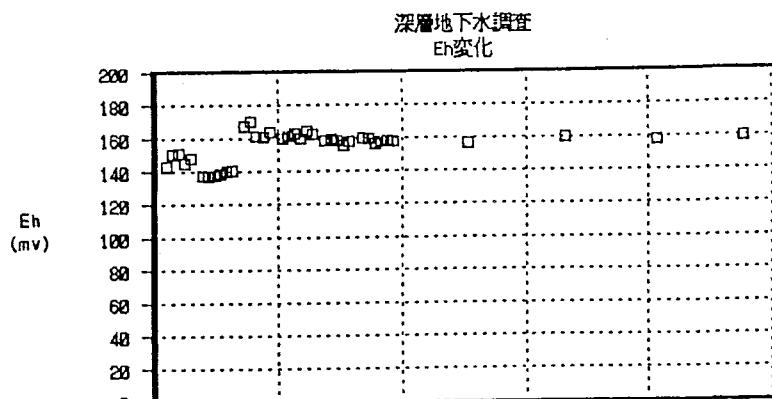
No.	月日	時刻	採水時間 (分)	採水量 (l)	累計 (l)	水温 (°C)	pH	ORP (mV)	Eh (mV)	EC (mS/cm)	EC(25) (mS/cm)	DO (mg/l)	備考
1		8:18	10	0.50	0.50	17.0	6.64			40.0	46.4		DV0
2		8:49	10	0.25	0.75	21.4	6.75	-67	143	57.0	61.1	0.031	
3		9:19	10	0.50	1.25	18.6	6.64	-61	151	39.5	44.6	0.008	
4		9:50	10	0.50	1.75	19.8	6.43	-60	151	40.5	44.7	0.011	
5		10:20	10	0.50	2.25	21.1	6.37	-65	145	40.7	43.9	0.010	
6		10:50	10	0.50	2.75	21.7	6.35	-62	148	40.7	43.4	0.017	
7		11:21	10	0.50	3.25	17.0	6.61			40.0	46.4		DV1
8		13:08	10	0.50	3.75	23.6	6.43	-71	138	43.2	44.4	0.024	
9		13:37	10	0.50	4.25	23.1	6.38	-72	137	44.9	46.6	0.017	
10		14:07	10	0.50	4.75	23.1	6.34	-71	138	43.5	45.2	0.024	
11		14:37	10	0.50	5.25	22.3	6.32	-71	139	44.3	46.7	0.021	
12		15:08	10	0.50	5.75	21.7	6.29	-70	140	43.7	46.6	0.023	
13		15:37	10	0.50	6.25	21.7	6.31	-69	141	43.8	46.7	0.018	
14		8:07	10	0.50	6.75	24.2	6.62			37.0	37.6		DV2
15		8:37	10	0.50	7.25	19.4	6.36	-44	167	41.7	46.4	0.010	ORPメータ交換
16		9:07	10	0.50	7.75	19.2	6.38	-41	170	41.6	46.4	0.014	
17		9:37	10	0.50	8.25	20.2	6.40	-49	162	42.2	46.3	0.018	
18		10:07	10	0.50	8.75	20.2	6.37	-50	161	42.5	46.6	0.018	
19		10:36	10	0.50	9.25	20.6	6.35	-47	164	42.9	46.7	0.021	
20		11:05	10	0.50	9.75	24.2	6.58			38.0	38.6		DV3
21		13:08	10	0.50	10.25	20.0	6.40	-51	160	42.6	46.9	0.015	
22		13:37	10	0.50	10.75	20.1	6.37	-49	162	42.4	46.6	0.017	
23		14:06	10	0.50	11.25	19.9	6.40	-48	163	42.1	46.4	0.014	
24		14:35	10	0.50	11.75	19.7	6.39	-51	160	42.1	46.6	0.018	
25		15:05	10	0.50	12.25	19.5	6.38	-47	164	41.5	46.1	0.015	
26		15:34	10	0.50	12.75	19.4	6.35	-49	162	41.5	46.1	0.015	
27		8:10	10	0.50	13.25	23.0	6.57			39.0	40.6		DV4
28		8:39	10	0.50	13.75	17.6	6.42	-54	158	40.2	46.1	0.029	
29		9:08	10	0.50	14.25	18.2	6.44	-53	159	40.8	46.3	0.023	
30		9:37	10	0.50	14.75	18.3	6.45	-53	159	40.6	46.0	0.031	
31		10:06	10	0.50	15.25	18.4	6.46	-56	156	40.9	46.3	0.018	
32		10:36	10	0.50	15.75	18.0	6.43	-54	158	40.6	46.3	0.020	
33		11:05	10	0.50	16.25	23.0	6.59			39.0	40.6		DV5
34		8:09	10	0.50	16.75	19.3	6.47	-51	160	41.3	46.0	0.023	
35		8:39	10	0.50	17.25	19.8	6.47	-52	159	41.9	46.2	0.020	
36		9:08	10	0.50	17.75	19.2	6.46	-55	156	41.5	46.3	0.020	
37		9:45	10	0.50	18.25	20.1	6.49	-53	158	42.2	46.3	0.017	
38		10:13	10	0.50	18.75	19.3	6.48	-53	158	41.8	46.6	0.018	
39		10:42	10	0.50	19.25	18.6	6.45	-54	158	41.0	46.2	0.017	
40		11:11	10	0.50	19.75	21.0	6.76			37.0	40.0		DV6
52		8:39	10	0.50	25.25	21.4	6.47	-54	156	43.1	46.2	0.028	
68		8:13	10	0.50	33.25	19.6	6.46	-51	160	41.7	46.2	0.019	
83		8:03	10	0.50	40.75	24.6	6.55	-50	158	45.8	46.2	0.014	
97		7:39	10	0.50	47.75	19.6	6.52	-52	159	41.7	46.2	0.016	

第3-6表 モニター測定結果統計計算結果

	水温 (°C)	pH	ORP (mV)	Eh (mV)	EC (mS/cm)	EC(25) (mS/cm)	DO (mg/l)
最大値	24.6	6.76	-41.0	170.5	57.0	61.1	0.031
最小値	17.0	6.29	-72.0	137.1	37.0	37.6	0.008
平均値	20.5	6.45	-55.4	155.4	41.8	45.4	0.018
標準偏差	2.00	0.11	8.72	9.37	3.00	3.47	0.005



第3-9図 モニタ一測定結果（1）



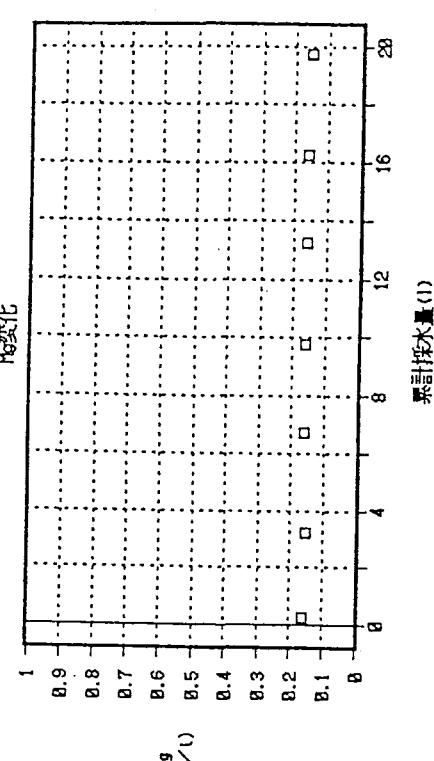
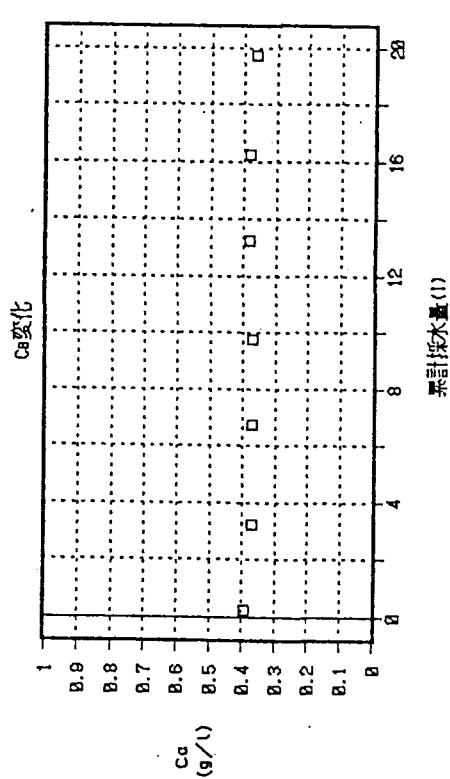
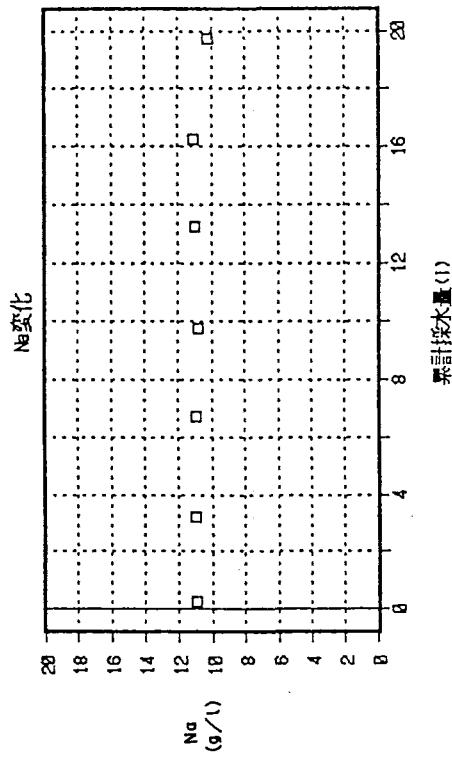
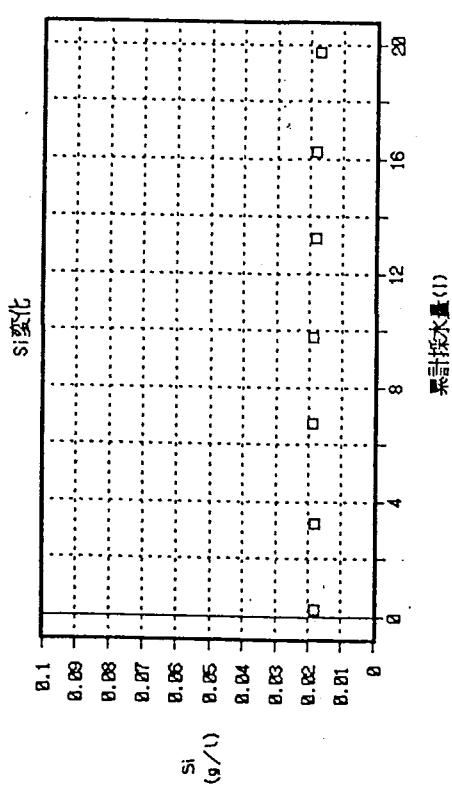
第3-10(2)

モニタ一測定結果 (2)

Dead Volume毎のモニターリング結果第3-7表および第3-11, 3-12, 3-13図に示す。

第3-7表 Dead Volume毎のモニターリング結果一覧表

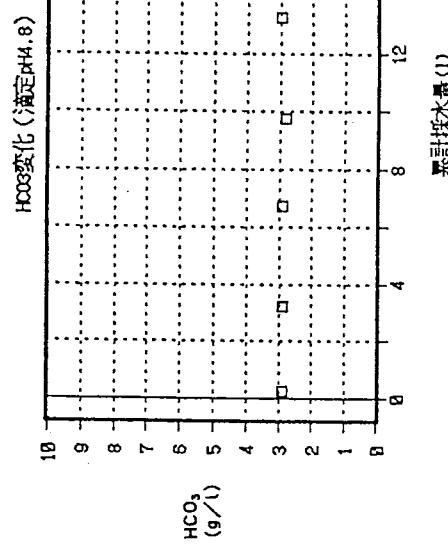
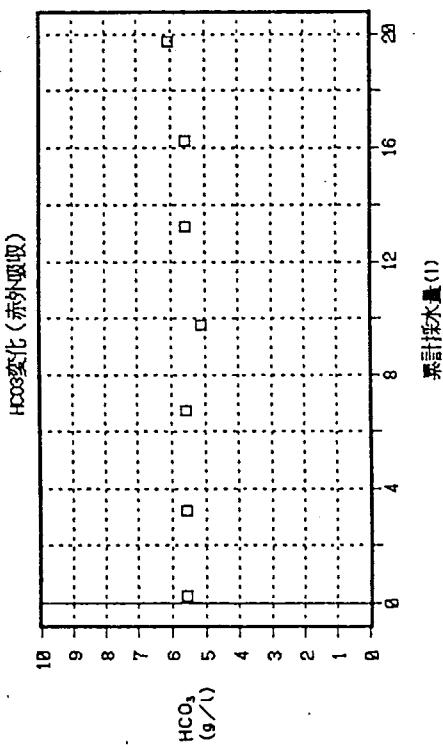
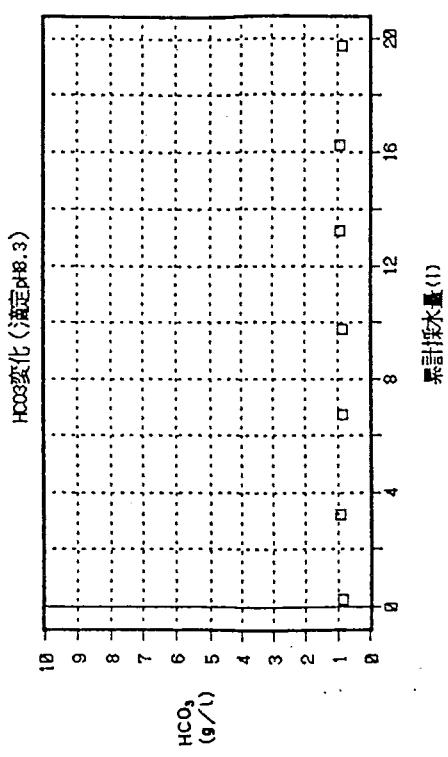
	単位	範囲	Dead Volume 0	Dead Volume 1	Dead Volume 2	Dead Volume 3	Dead Volume 4	Dead Volume 5	Dead Volume 6	分析法
Si	g/l	±0.002	0.018	0.018	0.019	0.019	0.018	0.018	0.017	ICP
Na	g/l	±0.9	10.9	11	10.9	10.8	11	11.1	10.2	
Ca	g/l	±0.03	0.39	0.37	0.37	0.37	0.38	0.38	0.36	
Mg	g/l	±0.01	0.16	0.15	0.16	0.16	0.16	0.16	0.15	
Cl	g/l	±0.5	14.1	14.1	14.6	14.6	14.6	14.3	14.1	IC
F	g/l		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	
電気伝導度	μS/cm	±3,000	40,000	40,000	37,000	38,000	39,000	39,000	37,000	電気伝導度計
pH測定時温度	°C		20.8	20.8	24.2	24.2	23	23	23	温度計
電気伝導度測定時温度	°C		17.4	17.4	24.2	24.2	23	23	23	21
無機C	g/l	±0.2	1.1	1.1	1	1.1	1.1	1.1	1.1	赤外吸収
HCO <sub>3</sub>	g/l	±1.0	5.5	5.5	5.0	5.5	5.5	5.5	5.5	6.0
アルカリ消費量 (pH8.3)	mgCaCO <sub>3</sub> /l	±100	1,400	1,500	1,400	1,400	1,500	1,500	1,400	滴定
HCO <sub>3</sub>	g/l	±0.06	0.84	0.90	0.84	0.84	0.90	0.90	0.90	0.84
酸消費量 (pH4.8)	mgCaCO <sub>3</sub> /l	±200	4,700	4,700	4,600	4,600	4,800	4,800	4,800	
HCO <sub>3</sub>	g/l	±0.22	2.82	2.82	2.82	2.76	2.88	2.88	2.88	2.88

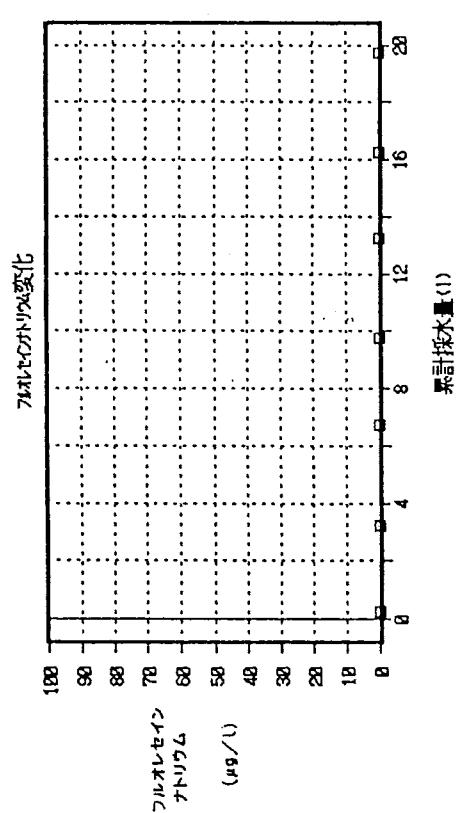
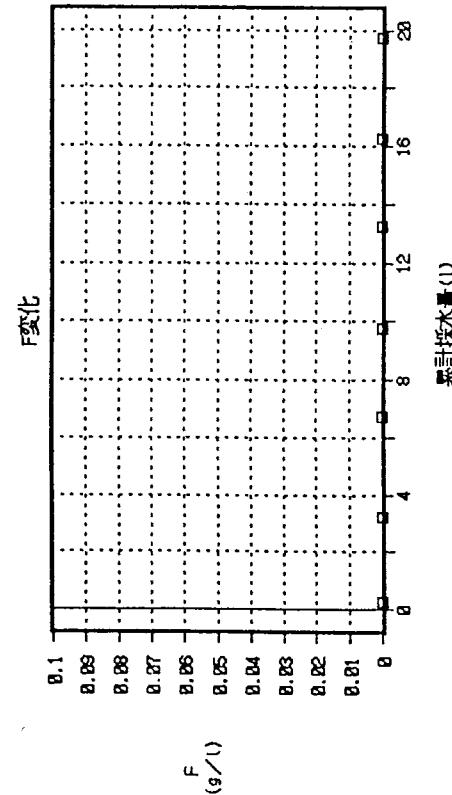
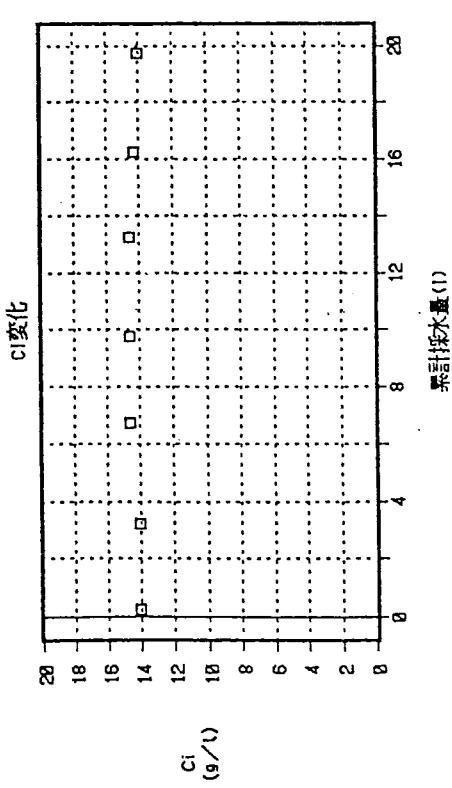


第3-11回

Dead Volume毎のモニター分析結果（1）

第3-12回 Dead Volume毎のモニターフラッシュ分析結果 (2)





第3-13[図]

Dead Volume毎のモニター分析結果(3)

#### (6) 陽イオン

陽イオンの成分は、 $\text{Si}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  の4項目である。各化学成分の変動を第3-11図に示す。モニターの結果、各成分ともほぼ安定している。

#### (7) 陰イオン

陰イオンの分析成分は、 $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$  の3項目である。各化学成分の変動を第3-12、3-13図に示す。モニターの結果、陽イオン同様に各成分ともほぼ安定しているが、 $\text{Cl}^-$ はややばらつきが見られる。

#### (8) フルオレセインナトリウム

フルオレセインナトリウム変動を第3-12図に示す。フルオレセインナトリウムは掘削水にトレーサーとして混入したが、モニター分析の結果いづれも検出限界以下 ( $10 \mu\text{g/l}$ ) であった。

#### (9) モニター分析のまとめ

本試験では、各種モニター分析を行い、今後採水を続けても変化のないと予想される時点を、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する。その安定採水量は、電気伝導度およびpHは、第9回モニター測定 (4.25 l) 以降に概ね安定している。しかしながら、酸化還元電位は第28回モニター測定 (13.75 l) 以降に安定し、その安定採水量は、第28回モニター測定 (13.75 l) と判断できるが、安全のため、本調査では、その約1.5倍程度 (19.75 l) 採水した。また、化学分析およびバクテリア調査用の採水時にもモニター測定を行い再確認を行った。

### 3.2.2 地下水の化学成分分析結果

モニター分析結果から、安定性が確認できた後。化学分析およびバクテリア調査のための採水を行った。

#### (1) 化学成分分析結果

分析結果一覧を第3-8表に示す。表中には各成分の分析方法と定量下限およびその誤差を示した。また、濃度の定量下限および精度は下記のとおり算出した。

##### ①定量下限

空試験溶液の変動（標準偏差  $\sigma b$ ）の10倍のシグナルに対応する濃度を定量下限とした。

##### ②精度（ばらつき）

繰り返し測定値の〔最大値－最小値〕の差から  $2\sigma$  をとって土を表示した。

$$\sigma = R_{\max} / d_2$$

$R_{\max}$  : 最大値－最小値の差

$d_2$  : 繰り返し測定によって決まる係数

第3-8表 主要元素等（化学成分）分析結果一覧表

	単位	深層地下水	浅層地下水	分析法	定量下限	精度		メーカー及び装置名
						深層地下水	浅層地下水	
pH		6.52	6.67	pH計		±0.02	±0.02	東亜電波HM-B
電気伝導度		39,000	420	伝導度計		±100	±10	東亜電波CM-2A
pH測定時温度	°C	16.8	17.9	温度計		±0.3	±0.3	
電気伝導度測定時温度	°C	14.5	16.9	温度計		±0.3	±0.3	
O2 (DOメーター)	mg/l	1	4	DOメーター	1	±1	±1	東亜電波DO30-A
O2 (ウイクレ法)	mg/l	検出不能	4	ウイクレ法	1	±0.5	±0.5	
N2	mg/l	5.5	67.7	GC	1	±1	±10	島津GC14A
H2	mg/l	<0.2	<0.2	GC	0.2			"
He	mg/l	<0.4	<0.4	GC	0.4			"
CH4	mg/l	<0.01	<0.01	GC	0.01			"
CO	mg/l	<0.05	<0.05	ガスクロ-GC	0.05			"
CO2	g/l	10	0.11	電量法	10	±0.5	±0.01	国際電機-ロマチック C
TOC	g/l	0.26	0.0015	TOC計	0.1	±0.01	±0.0005	島津 TOC-500
フミン酸	mg/l	<0.5	<0.5	蛍光光度計	0.5			日立 F-1100
フルボ酸	mg/l	<1	<1	蛍光光度計	1			"
Si	g/l	0.019	0.011	ICP	0.05	±0.001	±0.001	セイコ-電子工業 SPS-12000VR
Na	g/l	10.5	0.024	ICP	0.05	±0.5	±0.003	"
K	mg/l	1,000	2.9	A.A.	0.5	±30	±0.1	島津 A.A690.12
Li	mg/l	23	<0.09	ICP	0.09	±1		セイコ-電子工業 SPS-12000VR
Ca	g/l	0.37	0.034	ICP	0.001	±0.01	±0.001	"
Mg	g/l	0.15	0.014	ICP	0.005	±0.01	±0.001	"
Sr	mg/l	2	0.18	ICP	0.005	±0.1	±0.01	"
Al	mg/l	0.44	0.15	ICP	0.01	±0.02	±0.02	"
Mn	mg/l	0.55	<0.01	ICP	0.005	±0.01		"
全Fe	mg/l	29	0.16	ICP	0.01	±0.5	±0.01	"
Fe	mg/l	29	0.06	比色	0.05	±0.5	±0.03	日立 V-2000
Cl	g/l	14.5	0.021	IC	0.03	±0.5	±0.003	横河電機 IC7000
F	g/l	<0.01	0.0001	IC	0.03			"
Br	mg/l	39	0.08	IC	0.1	±1	±0.005	"
I	mg/l	0.49	<0.05	ICP-MS	0.00005	±0.01		セイコ-電子工業 SPQ6500
S	mg/l	<0.05	<0.05	ICP	0.05			セイコ-電子工業 SPS4000
SO4	mg/l	1,500	13	IC	0.05	±50	±1	横河電機 IC7000
PO4	mg/l	0.07	0.21	比色	0.01	±0.01	±0.02	日立O-2000
NO2	mg/l	0.02	0.01	比色	0.005	±0.005	±0.005	"
NO3	mg/l	0.19	21	比色	0.05	±0.01	±1	"
NH4	mg/l	78	0.08	比色	0.05	±2	±0.01	"
PO4	mg/l	<1	<1	IC	1			横河電機IC-7000
NO2	mg/l	<1	<1	IC	1			"
NO3	mg/l	<1	23	IC	1		±1	"
NH4	mg/l	72	<0.1	IC	0.1	±2		"
H2S	mg/l	<0.05	<0.05	計算				
HS	mg/l	<0.05	<0.05	計算				
フルオセイナトリウム	μg/l	<10	<10	蛍光光度計	10			日立 F-1100

DOメータ：溶存酸素メータ

GC：ガスクロマトグラフ法

TOC計：全無機炭素計

ICP：ICPプラズマ発光分光計

ICP-MS：ICP型発光分光質量分析計

A.A：原子吸光法

IC：イオンクロマトグラフ法

## (2) 同位体分析結果

同位体分析結果を第3-9表に示す。

第3-9表 地下水および河川水の同位体分析結果

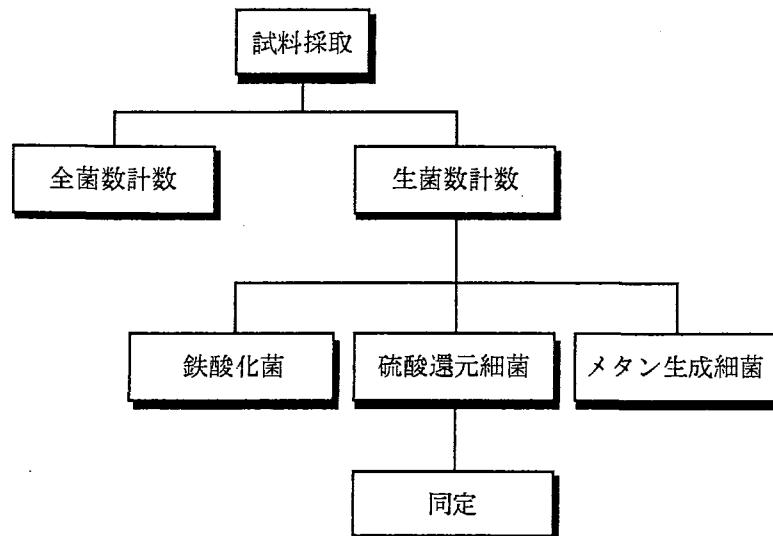
測定項目	試 料		測 定 方 法
	深層地下水	浅層地下水	
$\delta D (\text{\textperthousand})$	-24.1	-59.4	亜鉛バッヂ法
$\delta^{18}\text{O} (\text{\textperthousand})$	+6.4	-8.7	水-二酸化炭素ガス交換法
$^3\text{H} (\text{TR})$	0.8以下	7.2±0.4	

## 4. バクテリア調査の方法および結果

### 4.1 バクテリア調査方法

#### 4.1.1 分析フローシート

分析のフローシートを第4-1図に示す。本分析では、地下水と地表水各1件づつ計2件の試料について実施した。



第4-1図 バクテリア分析フローシート

#### 4.1.2 全菌数計数方法

全菌数の計数は、Hobbie (1977) らが示したアクリジンオレンジ染色法に準拠し行つた。その方法は以下の通りである。

直径25mmのスクレポアーフィルター（ポアサイズ： $0.2\mu\text{m}$ ）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倍にて計数を行つた。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。従つ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。

#### 4.1.3 生菌数計数方法

##### (1) 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 (1959, 山中, 1986) の計数培地を使用した。その組成を第1-1表に示す。この培地は次のようにして調製した。オートクレープ滅菌 (120°C, 15分間) した [A] 液に、 $\gamma$ 線滅菌済みのミリポアフィルター (ポアサイズ0.2  $\mu$ m) 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°C, 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【注1】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、希釀段階は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釀試料を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°C、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。

本分析試料は、*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、500mlの三角フラスコに200mlの液体培地を分注し、試料原液あるいは段階希釀試料の接種量を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。

## (2) 硫酸塩還元細菌

M P N (5本) 法と二重皿法【注2】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 (Wakao and Furusaka, 1972) 、その培地組成を第1-2表に示す。以下にM P N法及び二重皿法における手順を述べる。

M P N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が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°C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試料に付き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が、それ以外はM P N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M P N法の時と同様である。なお、培養計数は1試料、1希釈段階に付き3枚のプレートを作製し実施した。

M P N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。

### (3) メタン生成細菌

第4-3表に示す組成の培地を用い(門田, 1985)、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。

第4-3表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( $0.2\mu m$ )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。)試料の接種及び希釀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、希釀には、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、培地調製時と同様な滅菌及びガス置換操作により調整したものを用いた。培養は暗条件下、25°C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: Porapack Q 3m、温度: 45°C定温、キャリアーガス及び流量: 窒素、35ml/min、とした。

### 【注1】MPN法

濃度未知の細菌懸濁液を、たとえば10倍の倍率で順次希釀していき、各希釀液の一定量（例：1ml）ずつをそれぞれ培地の入った数本（例：5本）の試験管（培養器）に接種して培養したとする。その結果、 $10^{-5}$ 希釀液を接種したすべての培養器で生育が認められ、 $10^{-6}$ 希釀液では2本生育、 $10^{-7}$ 希釀液では全く生育がなかったとする。つまり、生育のあった培養器本数が $10^{-5}$ - $10^{-6}$ - $10^{-7}$ 希釀で5-2-0（コード）であったとすると、もとの細菌懸濁液濃度は $10^5$ ~ $10^6$ cells/mlの間にあることは見当づけられるが、統計的方法によればより正確に推定できる。

ここで推定される細菌濃度をMPN (most probable number) と呼ぶ。

### 【注2】二重皿法

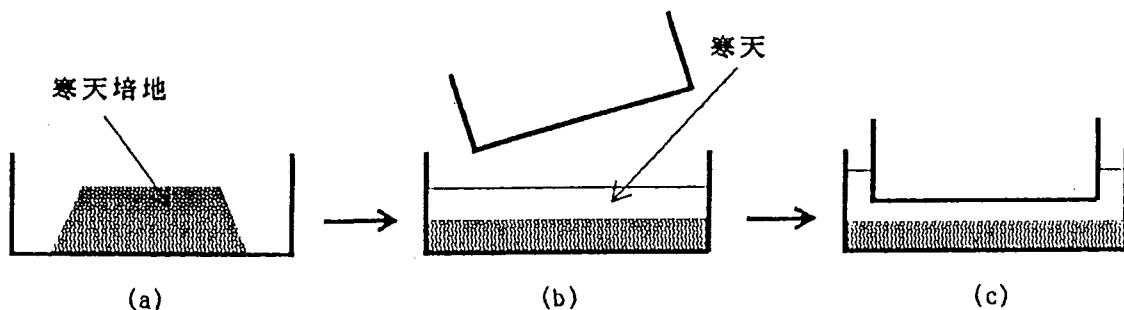
被検液の一定量をシャーレ内で寒天培地とよく混合して平板培養を行い、生成したコロニー数を数える平板培養コロニー計数法のうち、第4-2図のような培養を行うものである。この場合、すべての細菌が認められるようなコロニーをつくること、1個の細菌が1つのコロニーをつくることを前提としている。

今回行った二重皿培養法の試料接種手順の概略を、第4-2図で説明する。

(a) 乾熱滅菌（180°C、4時間）処理したガラスシャーレの裏蓋に、温度を38°Cに保持した寒天培地15mlを入れる。直ちに試料原液あるいは還元剤を添加した生理食塩水による段階希釀試料を1ml接種し、試料と培地が均一に混合されるように充分混ぜる。このとき気泡を作らないように注意する。

(b) 試料と混合した寒天培地が固まったら、還元剤を添加し温度を38°Cに保持した1.5W/V%寒天溶液15mlを重層する。

(c) 重層した寒天溶液が固まらない間に、シャーレの残りの一方を寒天に軽く押しつけるようにして密着させる。このように密着させることにより培地表面からの空気（酸素）の供給を閉ざし、培地内を嫌気状態に保持する。



第4-2図 二重皿培養法における試料接種手順の概略

第4-1表 *Thiobacillus ferrooxidans* 計数用培地

[A]	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.0 g
	KCl	0.1 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.01 g
	／Ion Exchanged Water	500 ml
	pH adjusted at 2.0 with H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
[B]	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10.0 g
	／Ion Exchanged Water	500 ml
	pH adjusted at 2.0 with H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	

第4-2表 硫酸塩還元細菌計数用培地

Yeast Extract(Difco)	1.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1.0 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.1 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> 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。

第4-3表 メタン生成細菌計数用培地

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 <sub>2</sub>	0.01 g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.01 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	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	1000ml
ビタミン混液 <sup>1)</sup>	2.0 ml
微量金属溶液 <sup>2)</sup>	10.0 ml
NaHCO <sub>3</sub> (8% soln.)	65.0 ml

- 注) ·接種時に還元剤として、新たにシステイン塩酸塩とNa<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>Oの混合液を加える。その方法は、50w/v%システイン塩酸塩及び30w/v%Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>Oの濾過滅菌溶液を、1000mlの培地に対してシリジで1ml加える。  
 従って、システイン塩酸塩の最終濃度は、0.02+0.05=0.07w/v%、Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>Oの最終濃度は0.03w/v%となる。
- 1)と2)は各々第4-4、4-5表に示す。

第4-4表 ビタミン混液の組成（メタン生成細菌用）

チアミン	0.25 g
アスコルビン酸	0.25 g
リボフラビン	0.25 g
ビオチン	0.50 g
ビタミンB <sub>12</sub>	0.06 g
ピリドキシン	0.05 g
葉酸	0.10 g
コリン	0.25 g
p-アミノ安息香酸	0.50 g
／イオン交換水	1000 ml

第4-5表 微量金属溶液の組成（メタン生成細菌用）

CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.004g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.004g
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.0 g
ZnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.06 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.08 g
Na <sub>2</sub> EDTA	6.0 g
／イオン交換水	1000 ml

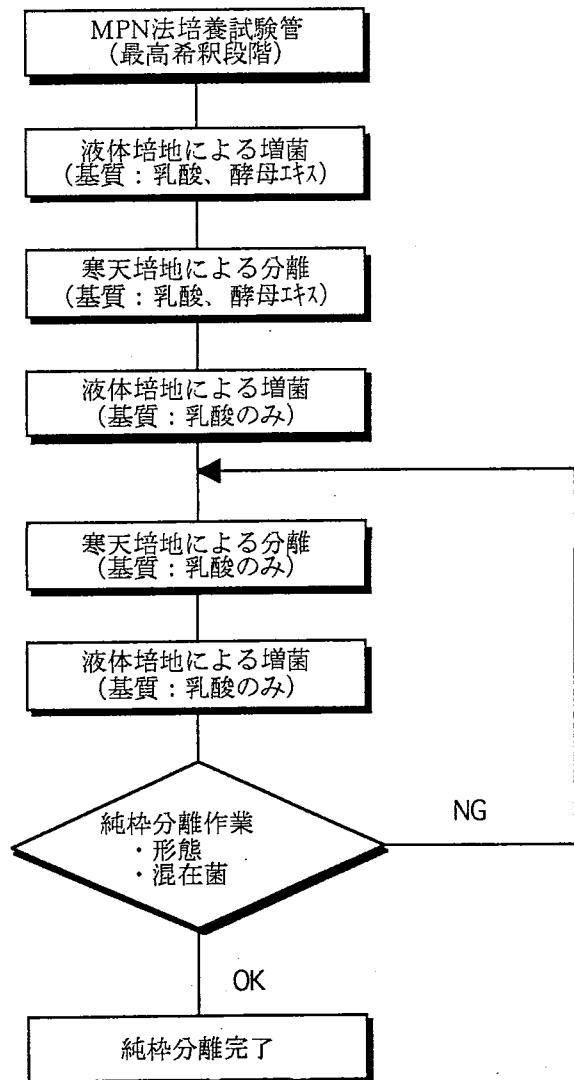
#### 4.1.4 硫酸塩還元細菌の同定

硫酸塩還元細菌の存在は、地下水試料のみで確認された。そこでこの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、純粋分離は前項目(2)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粋化を行った。従って、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、生理学的試験から種の同定を行った。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(キノンプロファイル法)及び遺伝学的手法(GC含量測定)についても試験を行った。以下の項目に分離、純粋化から同定にいたるまでの方法を記述する。

##### (1) 分離及び純粋化

硫酸塩還元細菌を分離するための試料は、前項(2)で示した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、パスト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°C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°C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、硫酸塩還元細菌の單一コロニーを得るために配慮である。以後、固体寒天培地と液体培地による培養を繰り返して、地下水試料から硫酸塩還元細菌の分離株を1株得た。

第4-3図に以上の分離及び純粋化のフローシートを示す。なお分離株については、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との混在のないことについて確認した(第4-6表参照)。すなわち他の細菌群との混在については、従属栄養細菌あるいは光合成硫黄細菌及び化学合成硫黄細菌の混在のないことを、培養と顕微鏡観察により確かめた。また、硫酸塩還元細菌の複数種の非存在確認は、顕微鏡観察により形態が单一であること、さらに、乳酸のみを有機物源(本試験ではPostgateの改変培地から粉末酵母エキスを除いた組成)とした単一培地で培養したときの対数増殖において増殖速度が一定であることから判断した。



第4-3図 硫酸塩還元細菌の純粹分離の操作手順

第4-6表 硫酸塙還元細菌の純粹化における混在菌(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 同培地に乳酸およびブドウ糖(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 (Rhodospirillaceae科)	BibleとPfennig(1981)の培地 (第1-8表参照) で寒天混釀法により嫌気・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 (Chromatiaceae科)	PfennigとTruper(1974)の培地 第1-9表参照) で寒天混釀法により嫌気・明培養 (30°C, 4週間) ▽判定方法：増殖コロニーの確認
光合成緑色硫黄細菌 (Chlorobiaceae科)	光合成紅色硫黄細菌と同じ
無色硫黄細菌群	光学顕微鏡(400倍)により観察 ▽判定方法：糸状性細胞の有無

## (2) 同定操作

前項で得られた分離株に関して、形態学的試験及び生理学的試験を行い属・種を同定した。さらに同定結果の裏付けとして、化学的分類手法（キノンプロファイル法）及び遺伝学的手法（G C含量測定）を実施した。以下にその試験の内容を記述する。

### 1) 形態学的試験

次の内容で試験を行った。

#### a. 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（S E M）観察試料の調整手順を第4-4図に示す。

#### b. 運動能観察

#### c. グラム染色

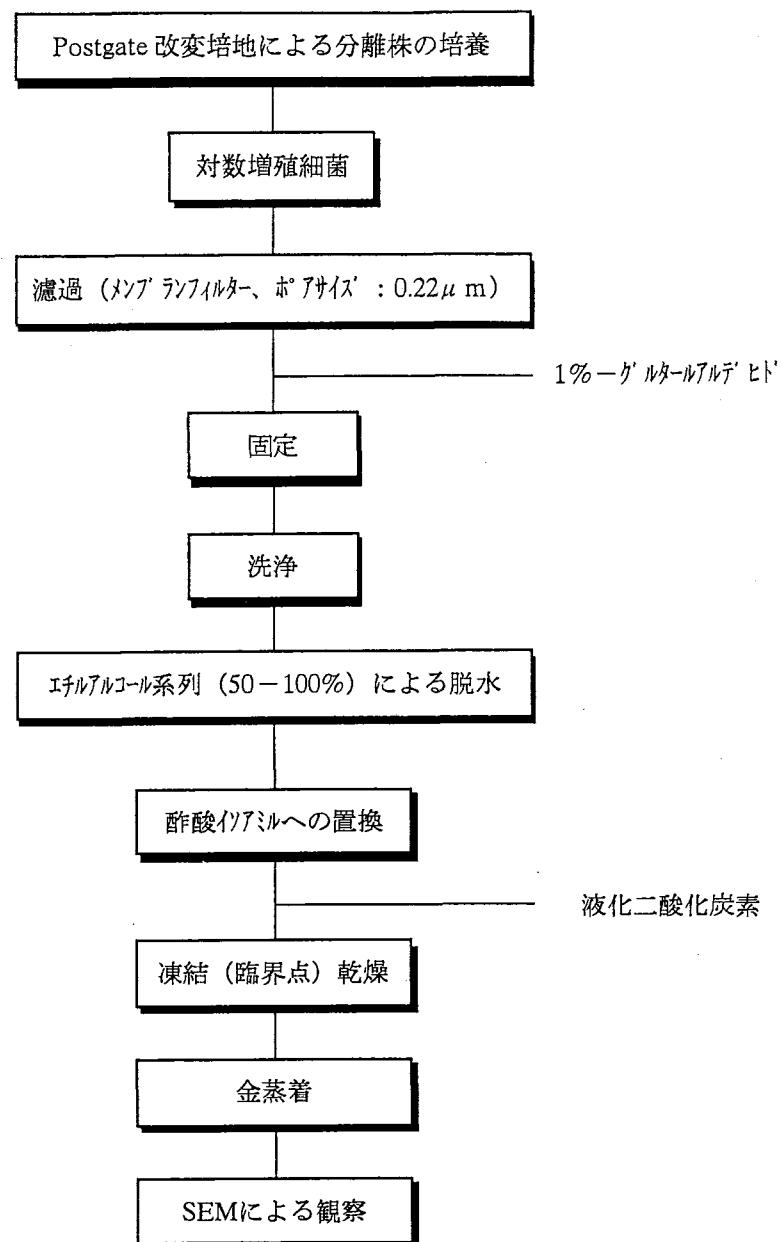
グラム染色の手順を第4-5図に示す。

#### d. 鞭毛観察

鞭毛染色の手順を第4-6図に示す。

#### e. 胞子形成能試験

胞子形成能試験は、メチレンブルーによる単染色後、検鏡により胞子の形成を観察した。さらに生細胞懸濁液を、85°Cで10分間加熱した後、Postgateの改変培地で培養し、生育の確認を行った。ここで胞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。

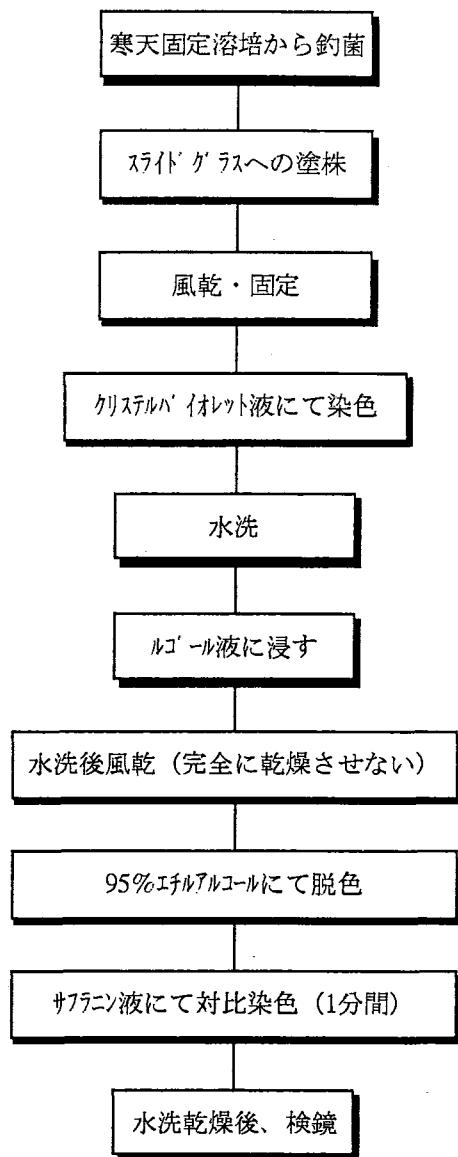


第4-4図 走査型電子顕微鏡（SEM）観察試料の調製手順

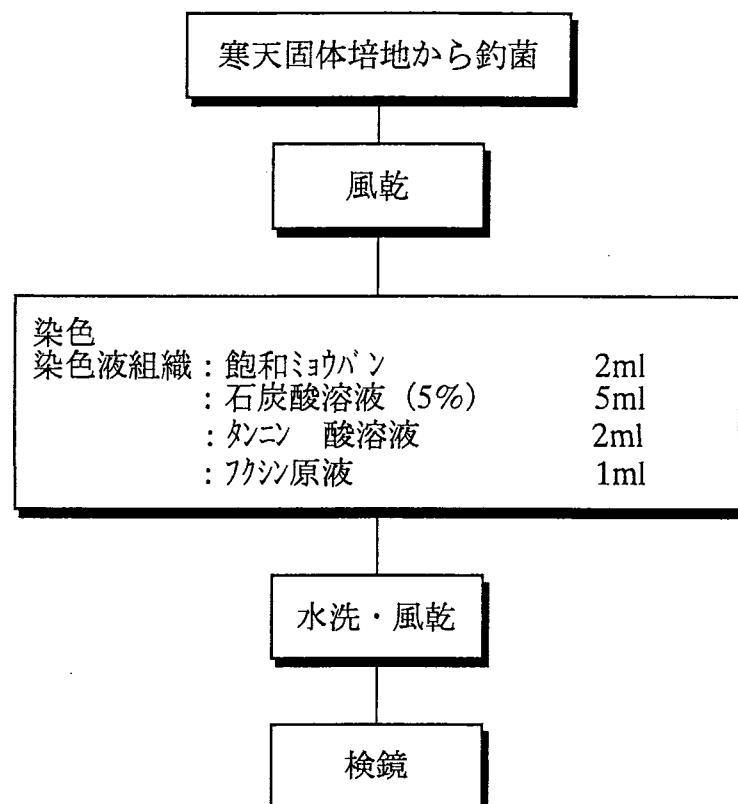
## 走査型電子顕微鏡観察の手順

分離、純粋化した菌株をPostgate改変培地(液体)により30°C、暗条件下で培養した細胞懸濁液を走査型電子顕微鏡(SEM)用の試料とした。SEM観察用試料の調製は以下の通りである。

- a 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 $0.22\mu\text{m}$ )により濾過し、適量の無菌水で洗浄する。
- b 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に調整)で固定し、無菌水で洗浄する。
- c 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。
- d 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。
- e 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 Coater SC-701(SANNYU-DENSHI製)を使用した。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)のものを使用した。



第4-5図 グラム染色の手順



第4-6図 鞭毛染色の手順

## 2) 生理学的試験

次の内容で試験を行った。

### a. 基質資化性（生育に利用できる炭素源の検討）

Postgateの改変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した。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った。この場合は、Postgateの改変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、生育を観察した。

### b. NaCl 要求性

第4-7表 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	スクリューキャップ試験管(20ml) (空気の混入を避けて、培養液を試験管に満たし密封)
培地組成	Postgateの改変培地を基本として、基質炭素及び硫酸塩の組成を変化させた 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	30℃, 暗所, 静置
増殖の判定	試験管のまま細胞の懸濁状況を経時的に測定した。 測定は比色計にて、波長660nmの吸光度を調べた。

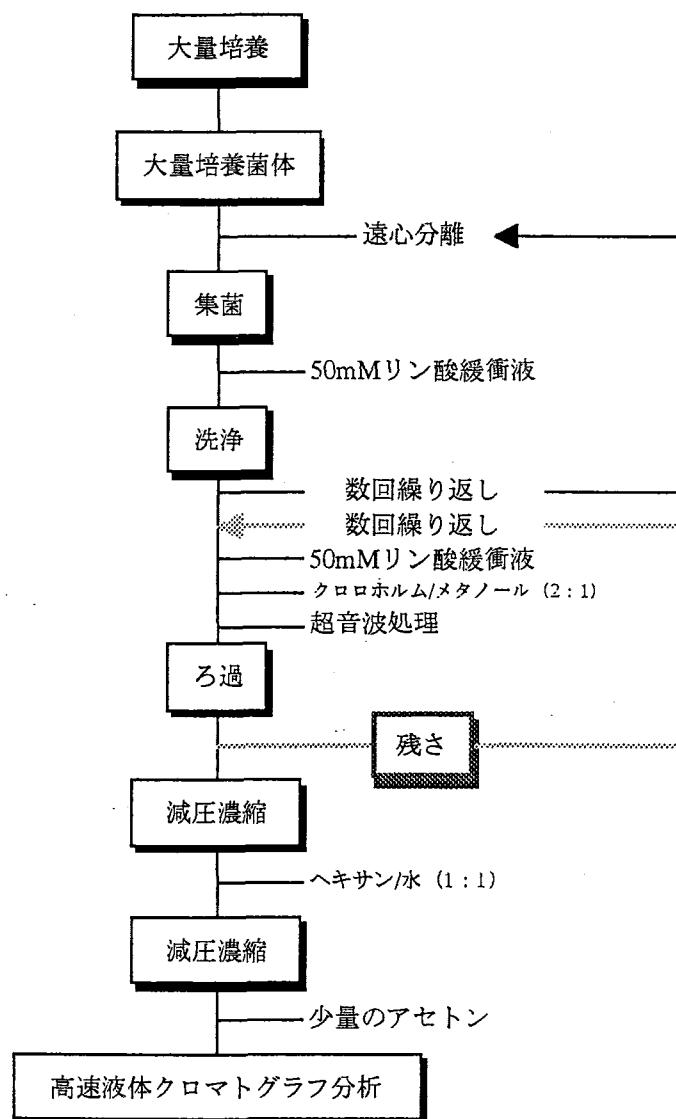
注) 培地に添加した全ての有機物基質は最終濃度を30mMとした。

### 3) 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。従つて、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*, *Thermodesulfobacterium*, *Desulfobulbus*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfobacterium*, *Desulfonema*の10属、約30種から成るが、各々の優占キノン種は属により異なる。すなわち、*Desulfovibrio*はMK-6を、*Desulfobulbus*はMK-5を、その他の属はMK-7を主に優占キノン分子種として有することが知られている(Collins and Widdel, 1986, Widdel, 1988)。従って、本分離株の優占キノン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・定性操作の概略を第4-7図に示す。



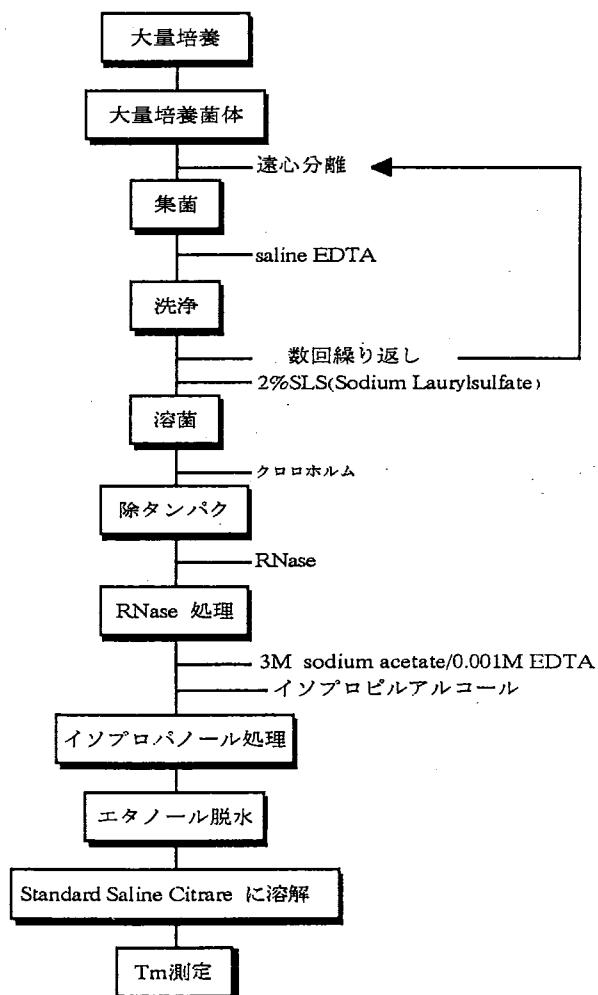
第4-7図 キノン分析操作の概略

#### 4) 遺伝学的手法 (G C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。従って、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）を第4-8図に示す。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。

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



第4-8図 DNAの抽出・精製からGC含量測定までの手順概略

第4-8表 光合成紅色非硫黃細菌用培地

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.5 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.6 g
$\text{NH}_4\text{Cl}^1)$	1.0 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}^2)$	0.2 g
NaCl	0.2 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05 g
Yeast Extract	0.1 g
Sodium Acetate	1.0 g
微量元素混液 <sup>3)</sup>	1.0 ml
ビタミン混液 <sup>4)</sup>	1.0 ml
イオン交換水	1000 ml
pH = 7	

1)、2) 原法では硫酸塩を用いるが、硫酸塩還元細菌の生育を抑えるために塩化物を使用した。

3) 第4-10表を参照

4) 第4-11表を参照

第4-9表 光合成硫黃細菌用培地  
[基礎培地]

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.0 g
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1.0 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05 g
微量元素混液 <sup>1)</sup>	1.0 ml
ビタミン混液 <sup>2)</sup>	1.0 ml
イオン交換水	1000 ml
[紅色硫黃細菌]	
1N-HCl	0.3 ml
8%- $\text{NaHCO}_3^3)$	0.5 ml
2%- $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	1.0 ml
基礎培地	18.2 ml
[緑色硫黃細菌]	
1N-NaOH	0.05 ml
8%- $\text{NaHCO}_3^3)$	0.5 ml
2%- $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0.25 ml
基礎培地	19.2 ml

1) 第4-10表を参照

2) 第4-11表を参照

3) 濾過滅菌後使用

第4-10表 微量元素溶液の組成 [光合成細菌用]

EDTA-2Na	2000 mg
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2000 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	100 mg
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	100 mg
ZnCl <sub>2</sub>	100 mg
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	100 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	20 mg
NiCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	20 mg
CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	10 mg
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	1 mg
イオン交換水	1000 ml

第4-11表 ビタミン混液の組成 [光合成細菌用]

チアミン-HCl	50 mg
ナイアシン	50 mg
p-アミノ安息紅酸	30 mg
ビタミンB <sub>12</sub>	5 mg
ピリドキシン-HCl	10 mg
ビオチン	5 mg
イオン交換水	100 ml

## 4.2 分析結果

### 4.2.1 種々細菌数計数結果

本分析で得られた種々細菌数の計数結果を、第4-12表に示す。

第4-12表 各種細菌数計数結果

項目	単位	試料名称		計数方法
		深層地下水	浅層地下水	
全菌数	cells/ml	$1.8 \times 10^4$	$9.8 \times 10^4$	AODC法
<i>T. ferrooxidans</i>	MPN/ml	N.D. *1	N.D. *1	MPN法
硫酸塩還元細菌	CFU/ml	$1.7 \times 10^0$	N.D. *2	二重皿法
	MPN/ml	$4.6 \times 10^0$	N.D. *3	MPN法
メタン生成細菌	MPN/ml	N.D. *4	N.D. *4	MPN法

\*1 <2.0×10-2MPN/ml

\*2 <1CFU/ml

\*3 <2.0×10-1MPN/ml

\*4 <4.0×10-2MPN/ml

## 4.2.2 硫酸塩還元細菌の同定結果

### (1) 各種試験結果

地下水試料から分離した硫酸塩還元細菌の同定のための各種試験結果を、第4-13表に示す。

第4-13表 地下水試料から分離した硫酸塩還元細菌に関する各種試験結果

#### ●形態学的試験

##### a. 形態

形態	ビブリオ型
幅 ( $\mu$ m)	0.5
長さ ( $\mu$ m)	2.5~3.5
b. 運動能	+
c. グラム染色	-
d. 鞭毛	単極毛
e. 胞子形成能	-

#### ●生理学的試験

##### a. 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	-

###### ▽without sulfate

ピルビン酸塩	+
コリン	-

##### b. NaCl要求性

-

#### ●化学分類手法

優占キノン種 MK-6

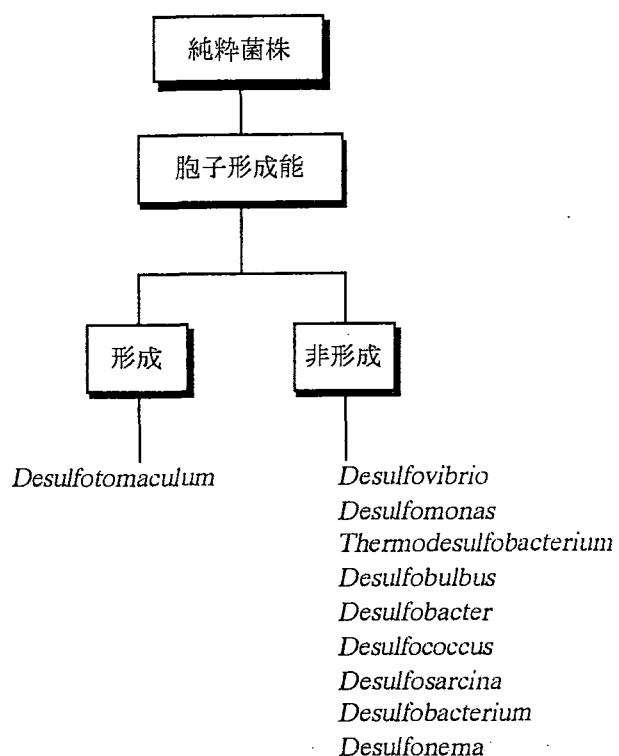
#### ●遺伝学的手法

G + C mole% 55.7

第 表の情報を基に、本分離株の属・種を決定する。

## (2) 属の同定

硫酸塩還元細菌は、胞子形成能により第4-9図の如く大別されており、胞子形成群には*Desulfotomaculum*、胞子非形成群は*Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Thermodesulfobacterium*, *Desulfovulbus*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfobacterium*, *Desulfonema*と判断することができる。本菌株について胞子形成能の有無を顕微鏡観察により調べた。その結果、胞子形成能の無いことが明らかとなつた。このことにより本菌株は*Desulfotomaculum*ではないと考えられる。



第4-9図 胞子形成能による硫酸塩還元細菌の分類

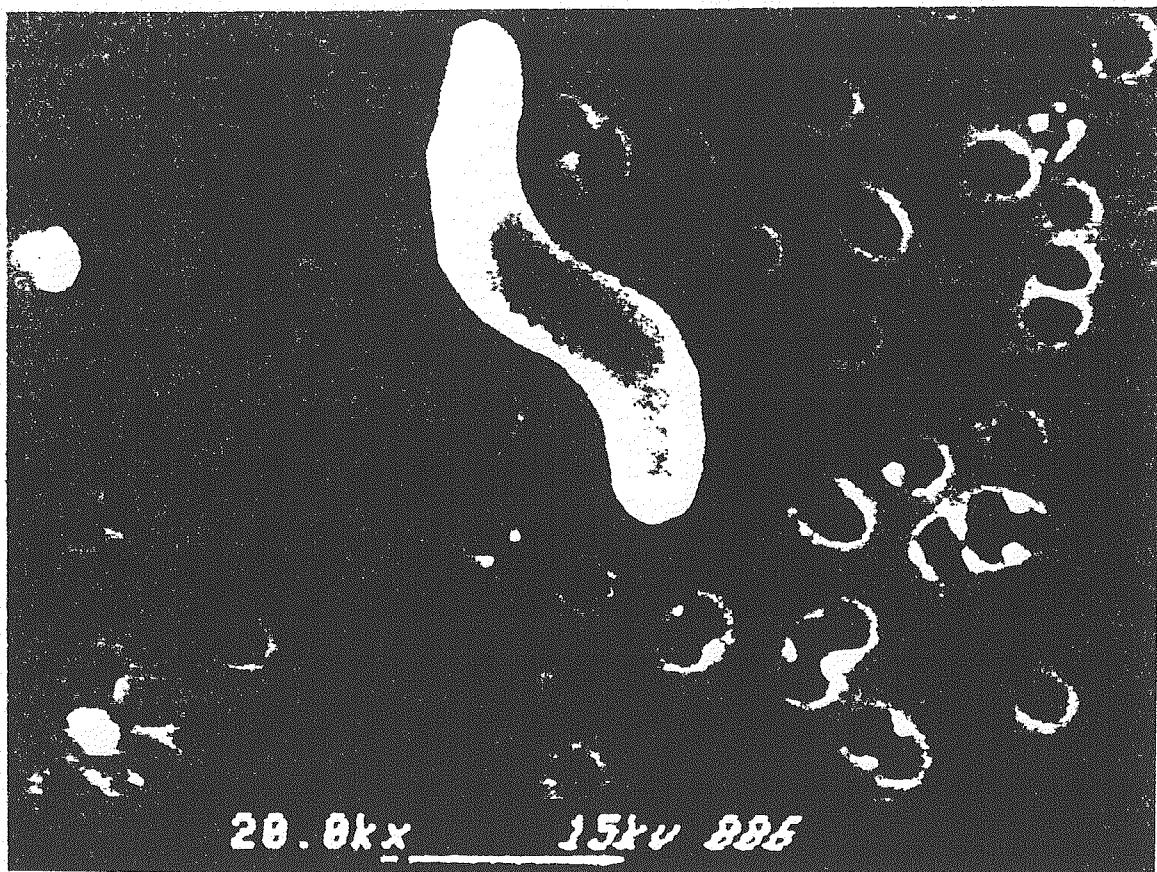
第4-10図に本分離株の電子顕微鏡写真を示す。これより明かなように、本分離株の形態はビブリオ型である。従って本菌株は形態的には、*Desulfovibrio*属の一種あるいは*Desulfobacter*属の一種 (*curvatus*) の可能性が高いことが示唆される。

また呼吸鎖キノンの測定においては、本菌株の優占キノン種がMK-6であることが明かとなつた。この情報からは、本菌株が*Desulfovibrio*属であることが強く示唆される。

### (3) 種の同定

前項から本菌株は、*Desulfovibrio*属の一種、次いで*Desulfobacter curvatus*であることが示唆された。

第4-15表に本菌株の形態、生理学的試験等の結果と、*Desulfovibrio*に属する代表的な種及び*Desulfobacter curvatus*についてBergy's Manual8thEditon(1974),Postgate(1979)及びWiddel(1988)の記述から引用したデータを併記し示した。第4-14表から明らかのように、本菌株は形態学的、生理学的及び遺伝学的にも*Desulfovibrio desulfuricans*であることが示唆された。



第4-10図 地下水試料から分離した硫酸塩還元細菌  
の走査型電子顕微鏡写真 (20,000倍)

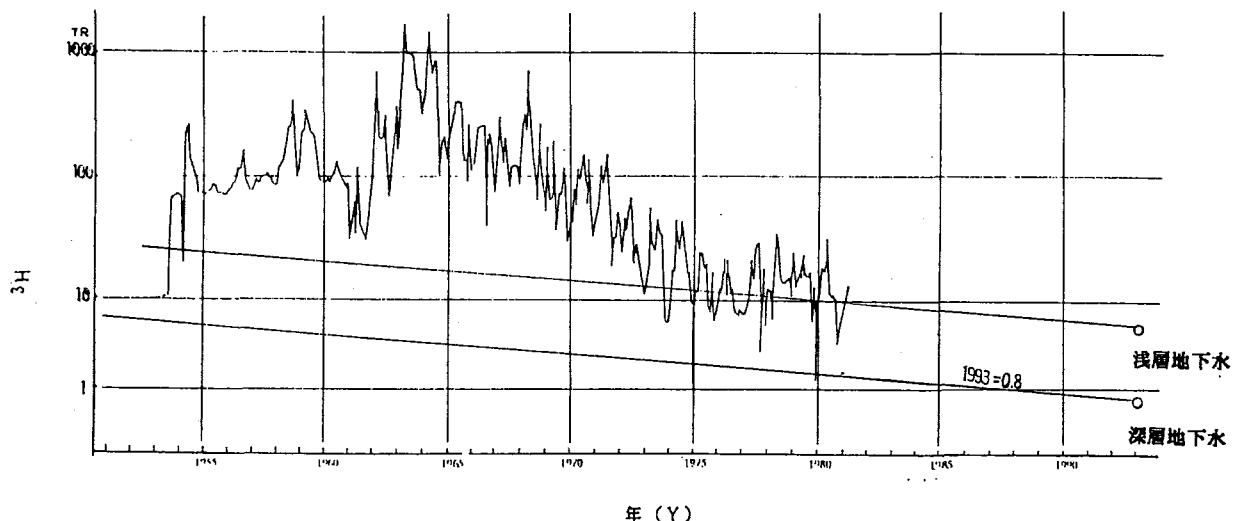
第4-14表 種の同定のための情報整理

分離株	<i>Desulfovobacter curvatus</i>	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> subsp. <i>aestuarii</i>	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	<i>Desulfovibrio salexigens</i>	<i>Desulfovibrio africanus</i>	<i>Desulfovibrio gigas</i>
形態	ビブリオ型	ビブリオ型	ビブリオ型	ビブリオ型	ビブリオ型	太いビブリオ型	シゲモイド型
幅(μm)	0.5	0.5~1	0.5~1	?	0.5~1	0.5~1	0.5
長さ(μm)	2.5~3.5	2~4	3~5	?	3~5	3~5	5~10
鞭毛	単極毛	単極毛	単極毛	単極毛	単極毛	束毛	束毛
グラム染色	—	—	—	—	—	—	—
<b>①基質質化性</b>							
(with sulfate)							
乳酸塩	+	—	+	+	+	+	+
リンゴ酸塩	+	+	+	+	+	+	+
ギ酸塩	—	—	±	±	±	±	±
酢酸塩	—	+	—	—	—	—	—
ブドウ糖	—	±	±	—	—	—	—
<b>②基質質化性</b>							
(without sulfate)							
乳酸塩	—	—	—	—	—	—	—
(without sulfate)							
ヒルピン酸塩	+	+	+	—	—	—	—
コリン	—	+	+	—	—	—	—
NaCl 要求性	—	—	+	—	+	—	—
優占キノン種							
G+C mole%							

## 5. 考察

### 5.1 地下水年代

地下水あるいは表流水中のトリチウムは、その滞留時間あるいは水の流動解析などに用いられる。第5-1図に1952～1983年の降水中のトリチウム濃度変化を示す。1952年以後のトリチウム濃度は、大気圏における核実験により急増しており、1963～1964年にかけて1000TRを超える濃度に達した。大気圏での核実験がほとんど行われなくなった1964年以降次第に減少している。降水中のトリチウム経年変化を第5-1図に示す。本試験で得られた深層地下水(<0.8TR)および浅層地下水(7.2±0.4TR)を本図プロットした。



第5-1図 降水中のトリチウム濃度経年変化

本試験で採取した深層地下水は0.8TR以下であるので、1952年から行われた核実験の影響を受けず、少なくとも41年以上前から地下に停滞した地下水であることがいえる。

なお、核実験の影響のない天然レベルの降水のトリチウムを10TRとすると本試験の深層地下水の年代(t)は次式により計算される。

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

$T_{2/1} = 12.43$  (年) トリチウムの半減期

$N_0 = 0.8$  (TR) 深層地下水のトリチウム濃度 (本調査)

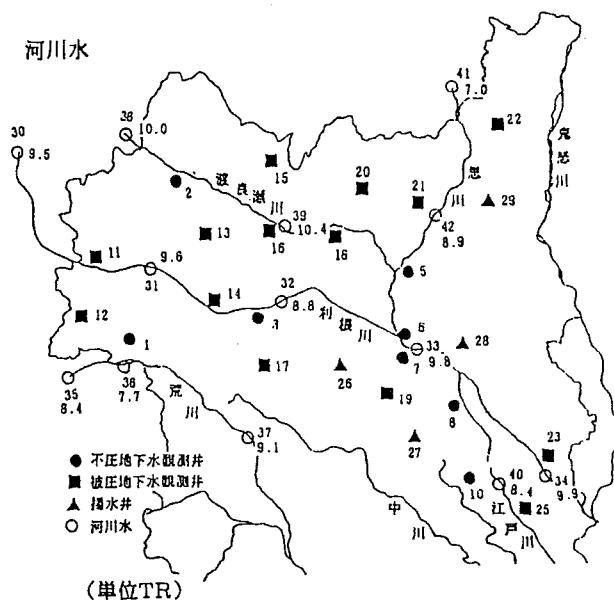
$N = 10.0$  (TR) 天然レベルのトリチウム濃度

上式から求めた地下水の年代は45年である。

しかしながら、最近の降水中のトリチウム濃度が0～20TRの範囲で変動する一方で、河川や地下水中のトリチウム濃度も全般に低く20TR以下との報告がされている。この

のような状況においては、継続的に観測をしなければトリチウム濃度だけによる地下水の年代測定は困難である。

浅層地下水のトリチウム濃度は、荒川上流（埼玉県）で測定されたトリチウム濃度とほぼ一致する。



第5-2図 関東平野北部における表流水トリチウム濃度  
建設省土木研究所河川部水文研究室 1991

## 5.2 地下水の同位体比

水の同位体組成は、水の起源や水の挙動の指標として幅広く使われている。

第5-3図に北関東における天水の同位体比を示す。グラフ上の直線は、 $\delta D$ 、 $\delta^{18}O$ の関係を示し、次式で与えられる。

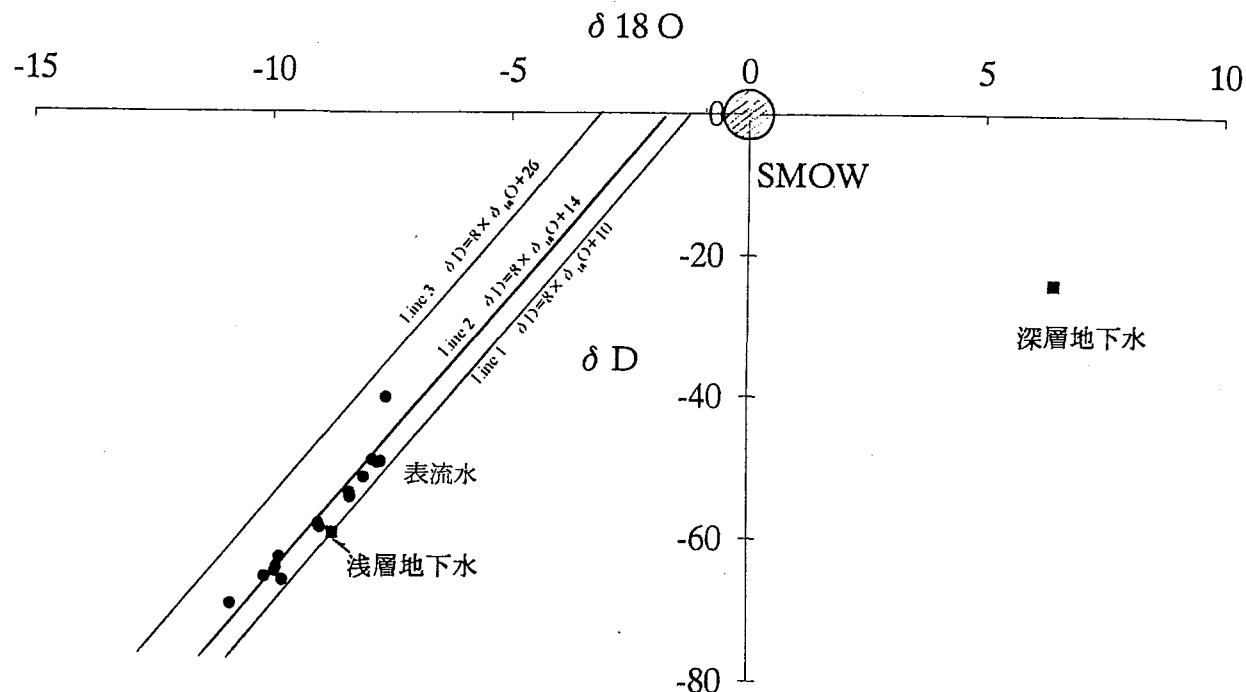
$$\delta D = 8 \delta^{18}O + 10 \quad (\text{Line1}) \quad \text{太平洋側の天水の } \delta D \text{ および } \delta^{18}O \text{ の関係}$$

上式の定数項=10は世界の天水平均値であり、この直線上にプロットされれば天水起源と判断される。また、この定数項はローカルな特色を持っており、日本海側では25～27であり、緯度および高度の効果によるものとされている。

これに対し、地球深部の水は高温で岩石と長時間接触しているので、その酸素同位体比は、岩石との酸素同位体交換の結果、 $\delta^{18}O$ で+7～+8%になっていると考えられる。

本調査での深層地下水の結果は（第3-9表）、天水起源のラインからはずれ、また、海水（SMOW）からもかけ離れており、深部起源の地下水であることを示している。

浅層地下水は、太平洋側における天水起源のライン上にプロットされ、一般的な天水起源であることを示している。



第5-3図 北関東平野部における天水の同位体比

建設省土木研究所河川部水文研究室 1991

### 5.3 地下水における酸化還元状態

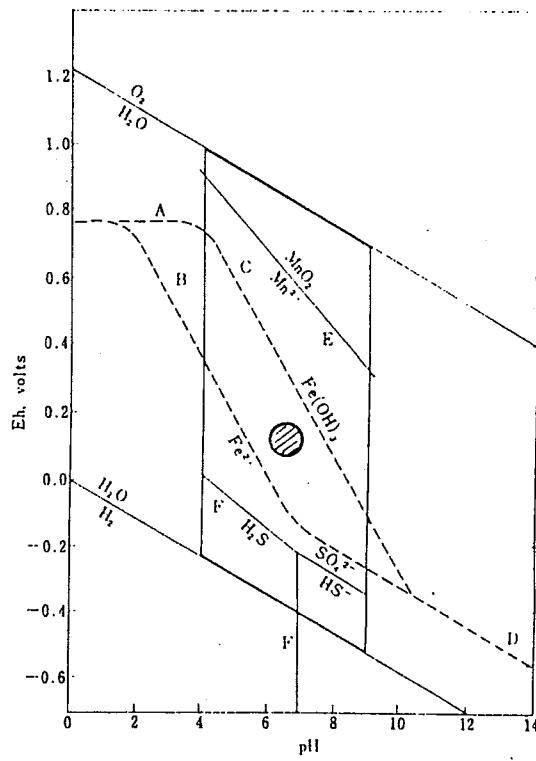
一般に、深層地下水における酸化還元状態は、バクテリアによる有機物の微生物的無機化作用や大気との閉鎖等により還元状態になっていることが推測される。

また、地下水の還元状態への変化は、地下水およびその接觸している岩層の遷移金属元素の相互作用を含めた挙動を大きく支配し、地下水の溶存化学種に大きく関与していると考えられる。

本調査における深層地下水（第3-8表）は、以下のような特徴を示す。

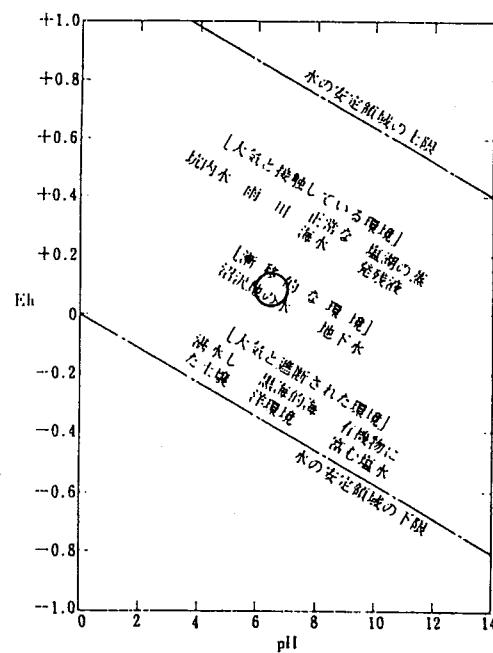
- 1) 深層地下水の溶存酸素濃度が定量限界以下である
- 2) 鉄は、全て遊離2価鉄の状態で存在する
- 3) マンガンイオンの含有量が比較的多い
- 4) 栄養塩類である窒素はほとんどアンモニア態である

第5-4図にEh-pHダイヤグラムを示す。Eh-pHダイヤグラムによると遷移的な環境であると考えられる。



第5-4図 鉄、マンガンの沈殿、硫酸イオンの還元反応におけるEh-pHの関係

Garrels,R.M.and Christ,C.L(1965)



第5-5図 Eh-pHによって位置づけられる天然水の環境

松井、一国 (1965)

## 5.4 地下水の化学成分の変化

地下水中の化学成分は、物理的作用、化学的、生物的作用によって変化する。地下水の化学成分の生成は、これらの作用が複雑に作用して各々地下水の化学成分を形成し、各々の作用が複雑過ぎるため、その地下水を体系的に論することは難しい。しかしながら、本調査では、地下水の化学および微生物調査を行った結果、その地下水の一面を示し、これらのデータを総合的に解析することによって、複雑な地下水形成解明へのアプローチとなることは間違いない。

### 5.4.1 溶存気体濃度の比較

第5-1表に深層地下水と浅層地下水の溶存気体濃度の比較を示す。

第5-1表　深層地下水と浅層地下水の溶存気体濃度と濃度比

	単位	浅層地下水	深層地下水	比(深層地下水/浅層地下水)
O <sub>2</sub>	mg/l	4	ND	—
N <sub>2</sub>	mg/l	67.5	5.5	0.08
CO	mg/l	ND	ND	—
H	mg/l	ND	ND	—
He	mg/l	ND	ND	—
CH <sub>4</sub>	mg/l	ND	ND	—
CO <sub>2</sub>	mg/l	0.11	10	90.91

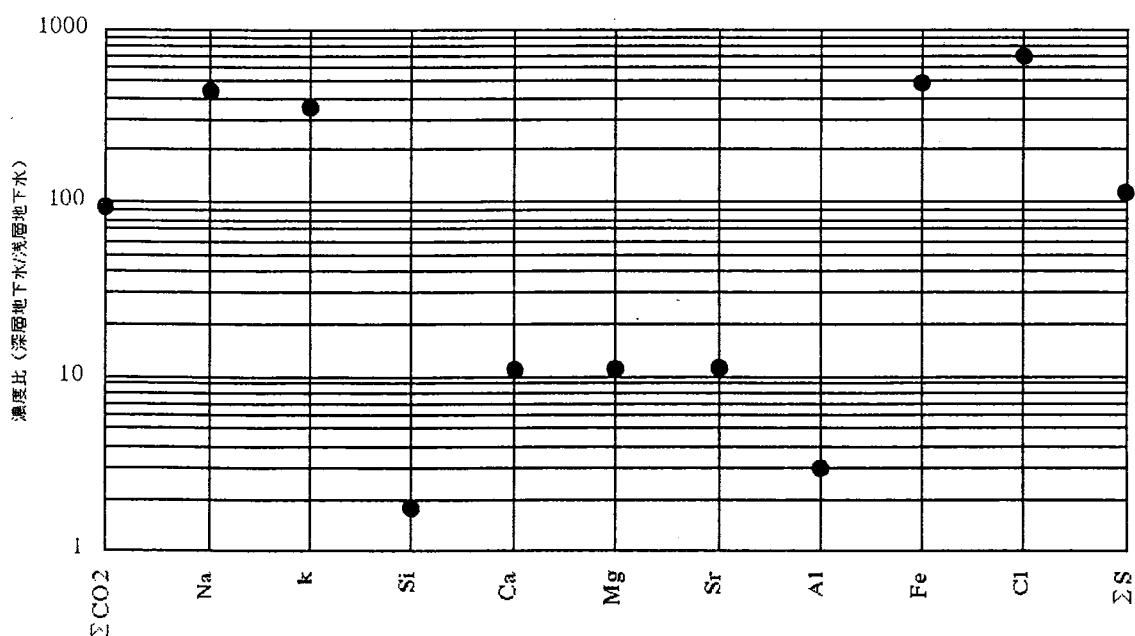
浅層地下水と深層地下水の溶存気体濃度を比較すると、O<sub>2</sub>、N<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub>に顕著な差がある。すなわち、深層地下水の方が浅層地下水と比べて、CO<sub>2</sub>が90倍と著しく高く、N<sub>2</sub>が0.08倍と低い。これらの溶存気体は、バクテリアによる有機物の微生物的無機作用に伴い変動し、溶存酸素量が減少し、二酸化炭素が増加していることも考えられる。

### 5.4.2 無機化学成分の比較

地下水中の溶存化学成分は、水一岩石間の相互作用（吸着、溶出）により増減する。ここでは、各無機化学成分の深層地下水濃度、浅層地下水濃度およびその濃度比を第5-2表および第5-6図に示した。なお、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{S}^{2-}$ を $\Sigma \text{S}$ 、炭酸塩化学種のものを $\Sigma \text{CO}_3$ とした。

第5-2表 試水中の溶存化学成分濃度比

	単位	浅層地下水	深層地下水	比（深層地下水/浅層地下水）
$\Sigma \text{CO}_2$	g/l	0.11	10	91
Na	g/l	0.024	10.5	438
K	mg/l	2.9	1000	345
Si	g/l	0.011	0.019	2
Ca	g/l	0.034	0.37	11
Mg	mg/l	0.014	0.15	11
Sr	g/l	0.18	2	11
Al	mg/l	0.15	0.44	3
Mn	mg/l	ND	0.55	—
Fe	mg/l	0.06	29	483
Cl	g/l	0.021	14.5	690
$\Sigma \text{S}$	g/l	13	1500	115



第5-6図 浅層地下水ー深層地下水中の化学成分比

以上の結果をもとにグルーピングを行うと

- 1) 深層地下水の方が著しく高い元素および成分  $\Sigma \text{CO}_2$ 、Na、K、Fe、Cl、 $\Sigma \text{S}$
- 2) 深層地下水の方が高い元素 Ca、Mg、Sr
- 3) 深層地下水と浅層地下水間に差の少ない元素 Sr、Al
- 4) 深層地下水の方が低い元素および成分 Mn

地下水中の溶存化学成分は、水—岩石間の相互作用により増減する。一般に、地下水中的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はよく知られている。これら岩石を構成する元素が、風化作用により溶出するとき、各元素はどのような移動しやすさを示すかという研究は古くから行われており、それらの研究結果を第5-3表にとりまとめた。

第5-3表 元素の移動し易さに関する研究例

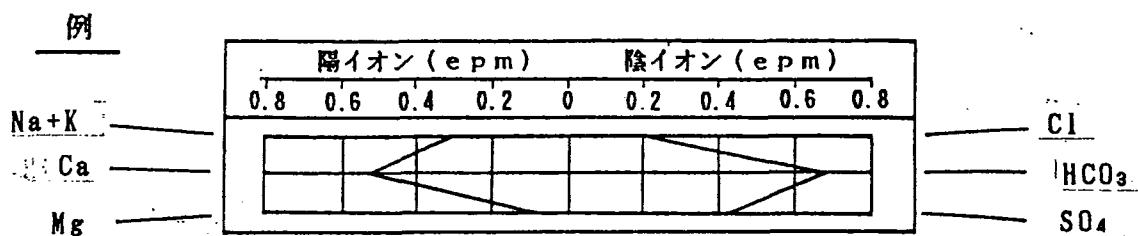
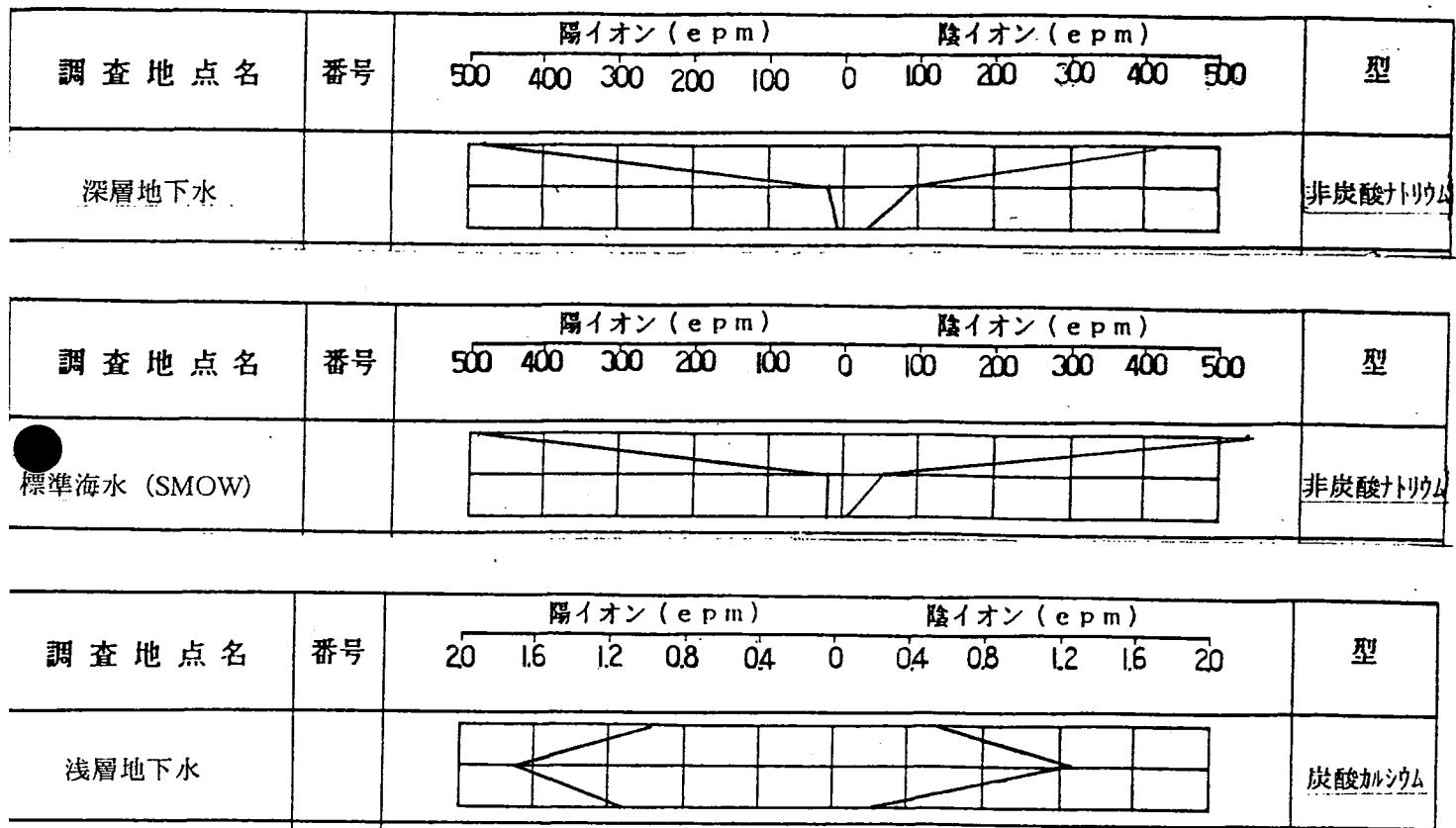
研究の方法	対象とした岩石	元素の移動し易さの順序	
Order of loss	片麻岩 石英閃綠岩 頁岩	$\text{Na} \approx \text{Ca} > \text{Mg} > \text{K} > \text{Si}$ $\text{Ca} > \text{Na} > \text{K} > \text{Si} \approx \text{Mg}$ $\text{Na} > \text{Mg} > \text{Ca} > \text{K} > \text{Si}$	④
Relative mobility	地殻岩 火成岩 片麻岩・花崗岩 花崗岩 砂岩	$\text{Ca} > \text{Na} > \text{Mg} > \text{K} > \text{Si}$ $\text{Ca} > \text{Na} > \text{Mg} > \text{K} > \text{Si}$ $\text{Mg} > \text{Ca} > \text{Na} > \text{K} > \text{Si}$ $\text{Ca} > \text{Mg} > \text{Na} > \text{K} > \text{Si}$ $\text{Ca} \gg \text{Na} > \text{K} > \text{Si}$	

出典：地下水ハンドブック

岩石種によって違いがあるが一般に、アルカリ金属、アルカリ土類金属の移動性が大きい。深層地下水は浅層地下水に比べいずれの元素も濃度が高く、特にNa、Kの濃度比が大きい。

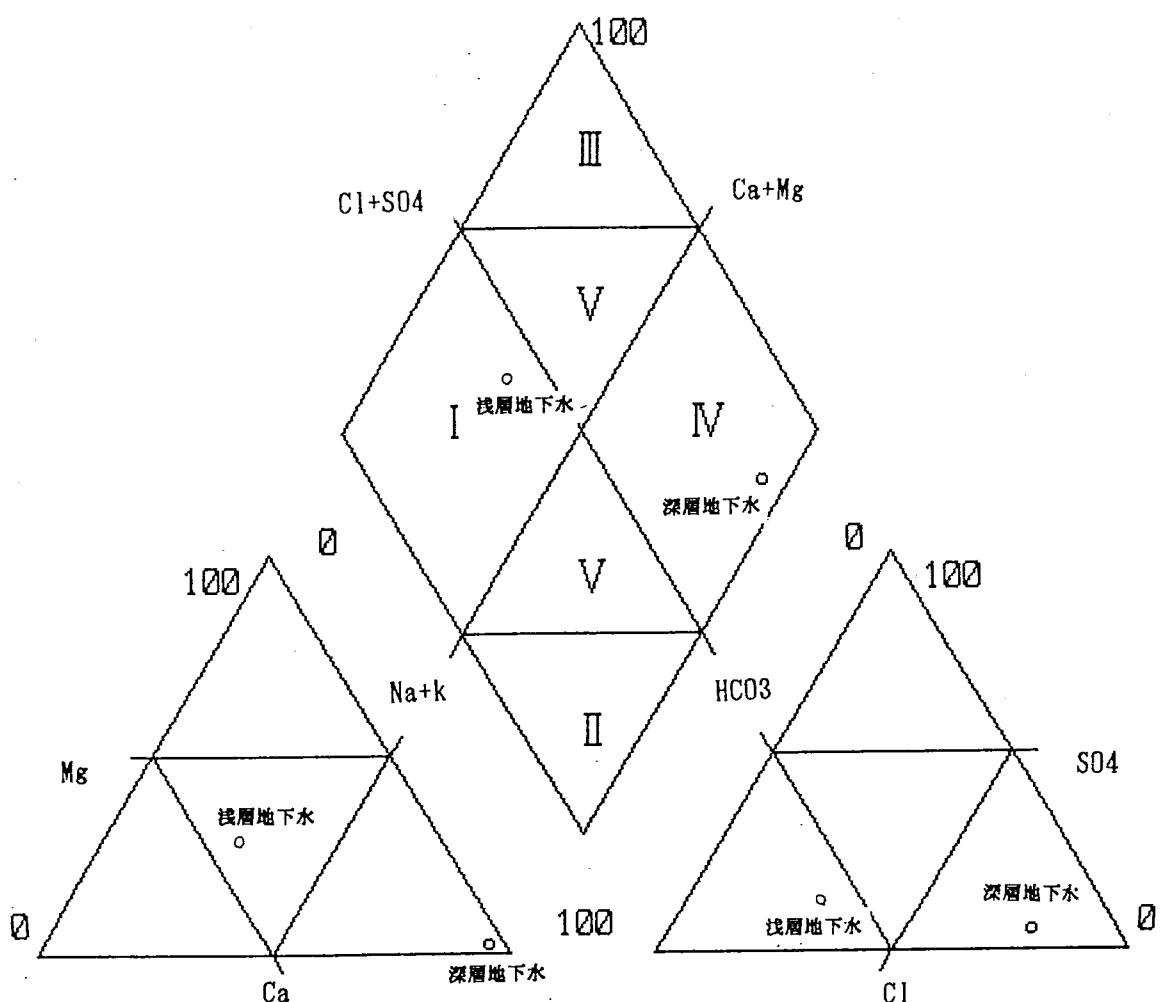
### 5.5 化学分析値からみた深層地下水の特性

第5-7図、第5-8図に浅層地下水および深層地下水について、ヘキサダイヤグラムおよびトリリニアダイヤグラムを作成した。ヘキサダイヤグラム、トリニニアダイヤグラムは、水の分類あるいはその起源～進化等を検討する一般的な図解法である。



第5-7図 浅層地下水および深層地下水のヘキサダイヤグラム

ヘキサダイヤグラムでは、深層地下水は、Cl、Na、Kの含有量が海水に近く、海水起源の地下水（化石水）に類似している。また、浅層地下水は、表流水の一般的な型である炭酸カルシウム型を示す。



#### 水質組成の型

- (I) 炭酸カルシウム型
- (II) 炭酸ナトリウム型
- (III) 非炭酸カルシウム型
- (IV) 非炭酸ナトリウム型
- (V) 中間的組成型

第5-8図 浅層地下水および深層地下水のトリリニアダイヤグラム

トリリニアダイヤグラムでは、深層地下水は、溶存成分として塩素イオン、ナトリウムイオン、カリウムイオンが過多となるため、非炭酸ナトリウム型となる。非炭酸ナトリウム型は、一般的に海水および火山起源の温泉水や鉱泉水等とされており、海水と類似の地下水であることを示唆する。

浅層地下水は、ヘキサダイヤグラム同様に表流水の一般的な型である炭酸カルシウム型を示す。

## 5.6 バクテリア調査結果に関する考察

### 5.6.1 全菌数について

全菌数は、生菌、死菌、休止菌の判定は難しいものの、浅層地下水の方が豊富であった。また、東北日本グリーンタフ地域新第三紀流文岩類の地下水調査（PNC 1992）では、嫌気的な環境で $1.3 \times 10^5$  cells/ml のバクテリアが検出されている。本調査における嫌気的な深層地下水でも全菌数は、 $1.8 \times 10^4$  cells/ml と同等のバクテリアが検出されている。

また、Van Es and Mayer Rile(1982)は、世界中の海洋環境における全菌数に関する文献の調査を行っている。これによると全菌数は、 $0.1 \sim 264 \times 10^5$  cells/ml と、本調査における深層地下水でも海水の値と同じ範囲内にあることが明かとなった。

### 5.6.2 鉄酸化細菌について

鉄酸化細菌 (*Thiobacillus ferrooxidans*) は、浅層地下水および深層地下水ともに不検出であった。鉄酸化細菌 (*Thiobacillus ferrooxidans*) は、化学独立栄養細菌で硫酸酸性下で  $\text{Fe}^{2+}$  を  $\text{Fe}^{3+}$  にする。今井 (1984) に従えば、深層地下水は嫌気的な環境であり、その成育環境でなかったと考えられる。

浅層地下水は、好気的な環境であるが  $\text{Fe}^{2+}$  、 pH がその成育環境でなかったと考えられる。

### 5.6.3 硫酸塩還元細菌について

硫酸塩還元細菌数は、MPN法と二重皿法の両方で計数した。計数値はどちらも差はないが、MPN法は確率的な値であるのに対し、二重皿法は形成されたコロニー数を計数するので二重皿法が一般的に信頼性が高いとされている。また、二重皿法で深層地下水中での全菌数に対する硫酸塩還元細菌の割合は約0.009%であった。

一般に自然環境における硫酸塩還元細菌数は、沿岸海域海水中や淡水中では、 $10^2 \sim 10^4$  cells/ml 程度、汽水域中で $10^4$  cells/ml 程度の菌数が存在することが報告されている（竹内ら1987、相崎ら1981、1990；Tanaka et al. 1990）。また、水中において増殖し得る硫酸塩還元細菌の最大菌数は、最大で $10^5$  CFU/ml 程度増殖することが報告されている（田中ら1990）。しかしながら、本調査における硫酸塩還元細菌数は、地下水が還元状態にあるにも係わらず、その菌数は1.7CFU/ml と非常に少ない。その理由として、以下の内容が考えられる。

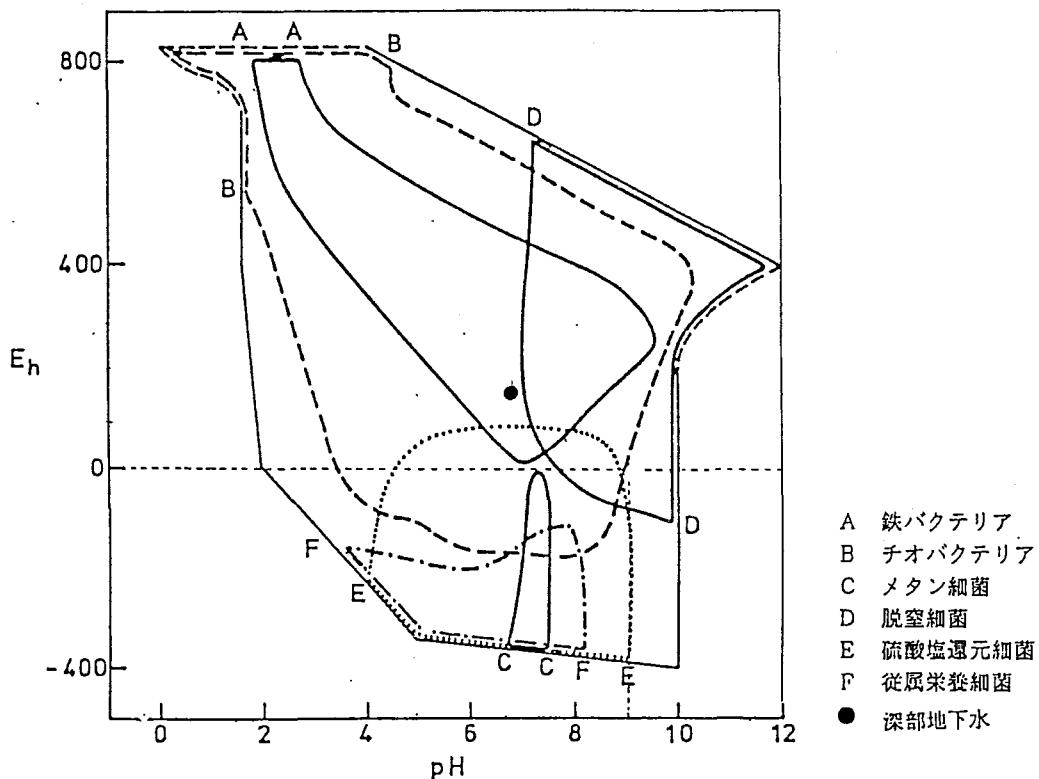
- 1) pHが低いこと
- 2) 有機物濃度が低いこと
- 3) 水温が低いこと

深層地下水では硫酸塩還元細菌 (*Desulfovibrio desulfuricans*) が同定され、この種は確率的に最も現存量の多い種である。また、硫酸塩還元細菌同定結果から、浅層地下水と深層地下水の硫酸塩還元細菌の生息環境が異なるため、浅層地下水から深層地下水への微生物導入はないと考えられる。

#### 5.6.4 メタン生成細菌について

メタン生成細菌は、一般に土壤全体や底泥中に計数されることが多く、自然水域中でメタン生成細菌が検出された例は非常に少ない。これは、硫酸還元細菌と同様に絶対嫌気細菌であり、物理的あるいは生理的酸素耐性を持っていないためである。

また、第5-9図に微生物成育の為のEhとpHの関係 (Zajic 1969) を示す。



第5-9図 微生物成育の為のEhとpHの関係 (Zajic 1969)

第5-9図に示すように、本調査における深層地下水および深層地下水は、メタン生成細菌の成育範囲 (Eh) が大きく外れており、絶対嫌気細菌メタン生成細菌は、還元状態にも係わらず存在しない。また、水温が低いこと、有機物濃度が低いなどメタン生成細菌の成育環境が異なった為と考える。

### 5.6.5 酸化還元状態とバクテリア

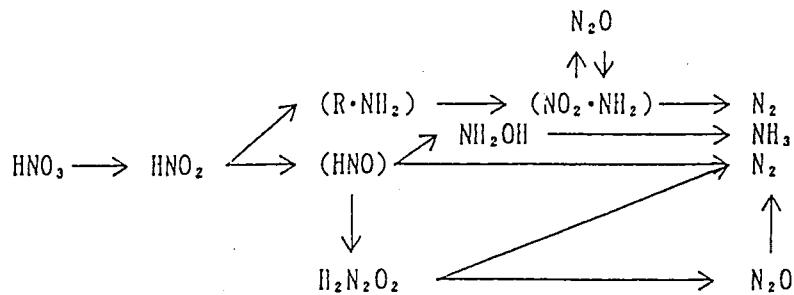
本調査の深層地下水は、還元状態であることがあきらかとなった。その根拠として、溶存酸素濃度が検出限界であることは勿論のこと、全鉄=（イコール）遊離性2価鉄であること、マンガンイオンの含有量が比較的多いこと、窒素はほとんどアンモニア態であることなどがあげられる。

深層地下水での硫酸塩は、硫酸イオン ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) の型で存在し、硫化物イオン ( $\text{S}^{2-}$ ) が検出限界であった。これは、硫酸塩還元菌が検出されたものの、その数は少なく、硫酸塩還元が極僅かしか行われなかつたものと考えられる。

また、生物作用には酸化呼吸、発酵、脱窒、硫酸還元、メタン発酵、メタン酸化などの様々な過程が挙げられる。特に酸素呼吸や硫酸還元は、酸素あるいは硫酸を消費すると同時に、炭酸ガス濃度を増加させる。

深層地下水では、硫化物イオンが検出されないことから、硫酸塩還元菌に起因する炭酸ガスよりも、酸素呼吸のバクテリアにより酸素が消費され炭酸ガスが増加したものと考えられる。

次に脱窒作用を考察すると、深層地下水中の窒素ガス濃度は、 $5.5\text{mg/l}$ と少ないものの、アンモニア態窒素と比較して硝酸態および亜硝酸態窒素が非常に少なく、脱窒作用を示唆する。しかしながら、地下水中的脱窒作用か否かは、 $\text{N}_2\text{O}$ 濃度の測定や脱窒細菌の計数を実施しないために確かなことは不明である。



第5-10図 脱窒作用模式図

## 6. 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（5）  
－物質代謝の特徴－ 国立公害研究所報告（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）（1990）

APHT-AWWA-WPCF:Standerd Method for Examination of Water and Wastwater  
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－（1983）

Bauman, E.W:Determination of parts per billion sulfide in water with the sulfideselectrode., Anal.Chim,46(9) (1974)

Bible and Pfening : Srarr M. P., Stolp H., Truper H. G., Balows A. and Schligel H. G.  
(eds.), The prokaryotes : A handbook on Habitats, Isolation and Identification  
of Bacteria, Vol.1, Springer-Verlag, Barlin/Heidelberg, New York, Chaps. 14,  
16,18(1981)

Bourg,A.C.M and P.W.Schindler: Ternary surface complexes.I.Complex formation in  
the system silica-Cu( )-ethylenediamine. Chimia,32(1978)

Broenkow,J.H and J.D.Cline :Colometric detemination of dissolved oxygen at low  
concentrations. Limnol.Oceanogr. 14(1969)

Burba ,J.R.and J.L.McAtee,Jr:The orientaion and interaction of ethylenediamine  
copper( )with montmorillonite. Clays Clay Miner.,25 (1977)

Collins M.D and Wideel F: Respiratory Quinones of Sulfate-Reducing and Sulphur  
Reducing (A Systematic Investigation).Syst.Appi.Microbiol.,8(1986)

Cypionka H., Windeel F. and Pfennig N. :Survival of Surface-Reducing Bacteria under  
Oxygen Stress and Growth in Sulfate-Free Oxygen-Sulfide Gradients.  
FEMS Microbiol. Ecol.,(1985)

Davis,J.A and J.O.Leckie :Effect of adsorbed complexing ligands on trace metal up  
take by hydrous Oxides. Environ.Sci.Tecnol.,12(1978)

Dudley D.J., Guentzel M.N., Ibarra M.J., Moore B.E and Sagik B.P:Enumeration of Prontentially Pathogenic Bacteria from Swage Sludges. Appl. Environ. Microbol.39 (1980)

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

Froelich,P.N.,G.P.Klinkhammer,M.L.Bender, N.A.Luedtke, G.R.Heath, D.Cullen, P.Dauphin: Geochim. Cosmochim. Acta,43(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 (1989)

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

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

G.J.Olson, W.P.Iverson,W.S.Docins, G.A.McFeter :Sulfate-Reducingand Methanogenic Bacteria from Deep Aquifers in Montana.Geomicrobiology Jurnal,vol2(1984)

半谷高久, 小倉紀雄, :水質調査法 (1985)

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

平谷明:キノンプロファイルによる活性汚泥細菌の生態学的研究. 用水よ廃水, 32 (1990)

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

Hobbie J. E., R. J. Daley and S. Jasper : Use of Nuclepore Filters for Counting Bacteriaby Fluorescence Microscopy, Appl. Environ. Microbiol., Vol.33(1977)

今井和民:独立栄養細菌. 化学同人, 京都 (1984)

一国雅巳, 鈴木励子, 鶴見実:水一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 (1982)

J. G. Zeikus : Bacteriol. Rev., Vol.41(1977)

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

門田 元, 多賀信夫編: 海洋微生物研究法, 学会出版センター, (1985)

金子太吉: 微生物の化学分類実験方一核酸一、駒形和夫編、学会出版センター(1985)

北野 康著: 地球環境化学 (1984)

工業用水試験法 : JIS K 0101, 日本規格協会 (1993)

工業用水試験法 : JIS K 0102,日本規格協会 (1993)

駒形和夫: 微生物の分類と道程 〈下〉 一の塩基組成及び細菌体脂肪酸の測定一、長谷川武治編、学会出版センター、 (1985)

小山忠四郎: 湖沼ガス代謝ー水の環境対策への基礎と応用ー (1991)

小山忠四郎, 半田 彦, 杉村行勇, : 湖水・海水の分析 (1972)

建設省土木研究所河川部水文研究室, 建設省関東地方建設局企画部企画課地方計画係,  
—関東平野北部地域における地下水の水質と同位体比ー: 地下水技術  
第33巻第8号

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蛍光  
法による同時同定ー堆積物中のフミン酸, フルボ酸の定量ー化学分析, 20 (1970)

メインス著 一国雅巳, 松井義人訳: 一般地球化学 (1970)

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

Murphy, J.and J.P.Riley :A modifide single solustion method for the determination of  
phosphate in natual waters,Anal Chem. Acta., 27(1962)

日本化学会編：土の化学，学会出版センター（1989）

日本化学会編：陸水の化学，学会出版センター（1992）

酒井均，本間弘次：地質学論文集第5号（1969）

竹内準一，滝井 進：涸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，  
Vol.29, No.11(1987)

玉利裕三，辻治雄，日下讓：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（1987）

田村紘基：水の分析，化学同人（1988）

Pfenning N. and Truper : Handbook of Microbiology, ed. by A. I. Laskin and H. A.  
Lechevalier, The Chemical Rubber Co., Cleveland, Vol.1(1974)

PNC：東北日本グリーンタフ地域新第三紀流紋岩類の深部地質環境データ（地下水）  
(1992)

Postgate J. R. : Bergy's Manual of Determinative Bacteriology Eighth Edition(1974)

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

Silverman M. P., Lundgren D. G., : J. Bacteriol., Vol.77(1959)

Whitfield.M :Thermodynamic limitations on the use of latinnum in Eh measurements.  
Limnol.Oceanogr.,19(1974)

Winkler,L.W.:Die Bestimmung des im Wasser gelosten sauerstoffers. Chem. Ber.,21  
(1988)

Yoshida,N. and Mizutani,Y.:Perparation of carbon dioxide for oxygen-18  
determination of water by use of aplastic syringe. Anal.Chem.58(1986)

山中健生：微生物のエネルギー代謝，学会出版センター（1986）