

JNC TY7400 2003-001

深部地質環境に対する微生物の影響に関する研究

-地下微生物群集の種組成と代謝の多様性に関する研究-

(先行基礎工学に係わる共同研究報告書)

2003年5月

広島大学

核燃料サイクル開発機構

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。

〒319-1194 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

Inquires about copyright and reproduction should be addressed to :

Technical Cooperation Section,

Technology Management Division,

4-49 Muramatsu, Naka-gun, Ibaraki 319-1194, JAPAN

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

2003

深部地質環境に対する微生物の影響に関する研究
-地下微生物群集の種組成と代謝の多様性に関する研究-

長沼毅¹⁾, 岩月輝希²⁾, 村上由記²⁾, 浜克宏²⁾, 岡本拓士¹⁾, 谷本大輔¹⁾
藤田夕佳¹⁾, 渡辺史子¹⁾, 足立奈保美¹⁾, 佐藤誠¹⁾

要旨

本報告書は、核燃料サイクル機構東濃地科学センターと広島大学生物生産学部間で行われた先行基礎工学共同研究「深部地質環境に対する微生物の影響に関する研究-地下微生物群集の種組成と代謝の多様性に関する研究」の成果を取りまとめるものである。概要を以下に示す。

岐阜県東濃地域において、地下深部の微生物の存在量と多様性に関する研究を行った。蛍光染色法による全菌数の計測、呼吸活性やエステラーゼ活性等に基づいて、生菌数を調査したところ、全菌数の約0.001%-100%と求められた。これらの微生物の存在量は、環境要因（岩盤中の割れ目本数、地下水の水理・地球化学条件等）に依存していた。ウラン鉱床を含む堆積岩深部においては、地下水中の酸化還元化学種、微生物生息数、硫酸イオンの硫黄同位体比から、硫酸還元菌による硫酸還元反応が主要な酸化還元反応であることが明らかになった。また、硫酸イオンと塩素イオンが良い相関を示しながら深度とともに増加しており、硫酸イオンの起源は堆積岩上部の海成層であると考えられた。このような地下水-鉱物-微生物システムにおける酸化還元プロセスは、海成層が陸地化してからも、硫酸還元菌が海成層から供給される硫酸イオンを堆積岩下部に豊富に存在する有機物で還元することで長期間続いてきたと推察される。硫酸イオンの供給速度と岩層中の硫酸態硫黄の含有量から、現在の水理条件が続く場合、硫酸還元菌による硫酸還元反応は今後数十万年間以上にわたって継続し、ウランを保持する還元環境が維持されると推察される。一方、花崗岩中の地下水においては、鉄関連細菌が鉄による酸化還元状態の形成に重要な役割を果たしていると考えられる。特に、花崗岩上部では鉄酸化菌が鉄コロイドの沈殿に関与していると考えられる。

1) 広島大学生物生産学部

2) 核燃料サイクル開発機構

Microbial activity in the subsurface environment of the Tono area and its
relation to geochemical conditions

- Study of the abundance and diversity of groundwater microorganisms -

Takeshi Naganuma¹⁾, Teruki Iwatsuki²⁾, Yuki Murakami²⁾, Katsuhiro Hama²⁾,
Takuji Okamoto¹⁾, Daisuke Tanimoto¹⁾, Yuka Fujita¹⁾, Fumiko Watanabe¹⁾,
Nahomi Adachi¹⁾, Makoto Sato¹⁾

Abstract

The abundance and diversity of groundwater microorganisms was studied in the Tono area, central Japan. Total cell counts were estimated by epifluorescence microscopy. Cell viability, based on cell membrane integrity, respiration-based metabolism, and esterase activity was estimated to be from 0.001% to approximately 100% of the total counts. The distribution of microbial abundance was related to a variety of environmental factors, including fracture numbers, hydrological, and geochemical conditions in the groundwater. In the groundwater, profiles of redox sensitive solutes such as sulphate and sulphide ions, abundance and viability of microbes, and sulphur isotope ratios of sulphate ions suggest that microbial sulphate reduction involving organic matter and subsequent pyrite precipitation are dominant redox reactions at the depths of the uranium ore body. Concentrations of both the sulphate and chloride increase with increasing depth. The dissolved sulphate is surmised to have originated from dissolution of sulphate and sulphide minerals in a geologic marine formation precipitated in marine environments, in the upper part of the sedimentary rocks. Such a redox process in the water-mineral-microbe system is inferred to have continued from the time when the marine formation underwent uplift above sea-level, because sulphate-reducing bacteria can use sulphate ions dissolved in fresh water that infiltrates from the marine formation and organic matter located in the deeper sedimentary rocks. Calculations by using the sulphate-S contents of the rocks and the sulphate dissolution rate suggest that microbial sulphate reduction alone could maintain sufficiently reducing conditions to preserve the uranium ore for several hundred thousand years, in the case where a hydrogeological system continues to exist without much change.

On the other hand, iron-oxidizing/reducing bacteria seem to play an important role in iron redox cycling in the granite groundwater. Iron-oxidizing bacteria may contribute to the formation and deposition of iron colloids in the upper part of Toki granite.

1) Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University

2) Japan Nuclear Cycle Development Institute

目次

要旨

1. はじめに	1
1. 1 共同研究の目的	1
1. 2 既存の知見の整理	1
1. 2. 1 地下環境における地球化学的反応経路と微生物群集	1
1. 2. 2 地下環境における地球化学的反応と微生物活性	2
1. 2. 3 生物活性測定法の現状	3
1. 2. 4 深部環境における微生物-鉱物の相互作用	5
2. 共同研究項目	6
2. 1 微生物研究のための岩石サンプリング手法の確立	6
2. 2 地下深部における微生物生態系の把握	6
2. 3 微生物活動と地球化学環境の関わりの把握	7
3. 微生物研究のための岩石サンプリング手法の確立	8
3. 1 研究の背景	8
3. 1. 1 「きれいな試料」ということ	8
3. 1. 2 トレーサーによる汚染のモニタリング	8
3. 1. 3 “微生物トレーサー”の有効性	9
3. 1. 4 微生物研究における試料およびデータの品質保証／品質管理	10
3. 2 材料と方法	11
3. 2. 1 00SE-03号孔における清水掘りによる掘削	11
3. 2. 2 岩石コア試料の採取	12
3. 2. 3 蛍光ビーズの計数	12
3. 2. 4 間隙率の測定	14
3. 2. 5 透水係数の測定	15
3. 2. 6 サブコアリング装置の開発	16
3. 3 結果と考察	17
3. 3. 1 掘削清水中の蛍光ビーズ濃度モニタリング	17
3. 3. 2 岩石学的特徴	19
3. 3. 3 岩石中の蛍光ビーズ濃度	19
3. 3. 4 岩石コア試料における間隙率および透水係数	20
3. 3. 5 掘削清水の汚染に影響を及ぼす要因	23
3. 3. 6 サブコアリング装置の開発	30
3. 3. 7 サブコアリング装置の有用性	32

4. 地下深部における微生物生態系の把握	33
4. 1 東濃地域の地質	33
4. 2 研究方法	33
4. 2. 1 地下水サンプリングにおける手法開発	33
4. 2. 2 東濃地域における地下水サンプリング	35
4. 2. 3 地下水の地球化学分析	36
4. 2. 4 微生物の現存量	36
1) 地下水中の全菌計数	36
2) 直接計数による地下水中の生菌数	39
3) BARTによる出現微生物種の検出	40
4) 好気的および嫌気的条件下でのMPN (Most Probable Number) 計数	41
4. 2. 5 分子系統学的手法に基づいた微生物の多様性解析	43
1) DNAの抽出および精製	43
2) 異化型亜硫酸還元酵素 (DSR) 遺伝子を対象とした酵素的遺伝子増幅 (PCR)	43
3) PCR産物のクローニング	44
4) DNAシーケンス	44
5) 分子系統学的解析	44
4. 3 結果と考察	45
4. 3. 1 堆積岩における地下水の地球化学的特性	45
4. 3. 2 花崗岩における地下水の地球化学特性	45
4. 3. 3 地下水中の全菌計数	46
4. 3. 4 微生物現存量の深度プロファイル	48
4. 3. 5 細胞形態	53
4. 3. 6 地下水における直接計数による生菌数の見積り	55
1) 膜透過性に基づいた生菌数-	55
2) 細胞呼吸活性に基づいた生菌数	56
3) エステラーゼ活性に基づいた生菌数	60
4. 3. 7 BART培養法に基づいた微生物深度プロファイルの推定	61
4. 3. 8 16S rDNAに基づいた系統学的解析	66
1) 呼吸多様性	69
2) 脱窒菌 (硝酸呼吸) の多様性	72
3) 硫酸還元菌 (硫酸呼吸) の多様性	76
5. 微生物活動と地球化学環境の関わりの把握	79
5. 1 ウラン鉱床が存在する堆積岩中の地下水-鉱物-微生物システム	79
5. 1. 1 研究アプローチと実験方法	80

図表目次

図 3-1	蛍光ビーズ計測に関わる前処理工程	13
図 3-2	岩芯中の蛍光ビーズ計測結果	22
図 3-3	岩石中の間隙率測定結果	24
図 3-4	岩石のかさ密度測定結果	25
図 3-5	間隙率とかさ密度の相関	26
図 3-6	岩石試料の透水係数測定結果	27
図 3-7	RQD と蛍光ビーズ混入量の関係	29
図 3-8	嫌気条件サブコアリング装置	31
図 4-1	全菌数の深度分布	50
図 4-2	全菌数と TOC 濃度の相関	51
図 4-3	DH-3 号孔における RQD プロファイル	52
図 4-4	花崗岩中の地下水から採取された微生物 (SEM 写真)	54
図 4-5	花崗岩中の地下水から採取された微生物 (染色写真)	54
図 4-6	各検出方法に基づく生菌数の見積もり	57
図 4-7	生菌数と全菌数の相関(その 1)	58
図 4-8	生菌数と全菌数の相関(その 2)	59
図 4-9	生菌数と全菌数の相関(その 3)	62
図 4-10	16S rDNA に基づく微生物の系統樹	67
図 4-11	16S rDNA に基づく窒素関連菌の系統樹	75
図 4-12	異化型硫酸還元酵素遺伝子に基づく硫酸還元菌の系統樹	78
図 5-1	堆積岩中の地下水組成の深度変化	82
図 5-2	微生物的硫酸還元反応に伴う硫黄同位体変化	84
図 5-3	堆積岩深部の地下水-鉱物-微生物システムの概観	84
図 5-4	硫酸還元反応に伴う黄鉄鉱、方解石の沈殿	86
図 5-5	地下水中の硫酸イオン、塩素イオン濃度、C-14 年代の相関	88
図 5-6	花崗岩中の地下水における鉄関連細菌の存在量とコロイド生成能力	92
図 5-7	鉄関連細菌により生成された鉄コロイド (SEM 写真)	94
図 5-8	浅部花崗岩の割れ目表面で観察される小粒状の水酸化鉄の沈殿	95
表 3-1	00SE-03 号孔掘削に用いられた掘削水中の蛍光ビーズ濃度	18
表 3-2	蛍光ビーズテスト結果	21
表 4-1	各試薬についての染色条件およびその特徴	38
表 4-2	堆積岩および基盤花崗岩中の地下水組成	47
表 4-3	地下水における微生物群集の全菌数	49
表 4-4	地下水中の微生物群集における BART を用いた全菌数の確定	64
表 4-5	クローンライブラリ中の OTU 分布	70
表 5-1	岩層中の硫酸態硫黄濃度と硫酸供給期間の見積もり例	88

5. 1. 2 結果と考察	81
1) 酸化還元化学種の深度分布	81
2) 地下水-鉱物-微生物システムにおける酸化還元プロセス	83
3) ウラン鉱化帯周辺の酸化還元緩衝能力	85
5. 2 花崗岩中の地下水-鉱物-微生物システム	90
5. 2. 1 花崗岩地下水における鉄関連細菌と酸化還元境界	90
5. 2. 2 鉄関連細菌によるコロイドの生成	93
6. まとめ (地層処分研究開発への反映)	97
参照文献	99

1. はじめに

1. 1 共同研究の目的

地下環境に生息する微生物は、代謝を行うにあたって、炭素源のみではなく地層中に存在する硫黄、鉄、マンガン、およびウランなどに関係する鉱物および地下水中の溶存物質を取り込んでいる (Amy and Haldeman, 1997; Fredrickson and Fletcher, 2001)。地下微生物が代謝活動をおこなう際、微生物が媒体となって起こる物質の酸化/還元および溶解/沈澱反応は、深部地下環境における地球化学的反応を促進させたり後退させる等の影響を与えている。例えば地下微生物が農業や産業、鉱業などの人間活動による地下水汚染および汚染の拡大に影響を及ぼしたり (Pillai, 1998; Schie et al., 1999)、石油や原油などの化石燃料およびガス生成、鉱床などにおける金属の溶解・沈澱反応等にも関わっている可能性が示唆されている (Fredrickson et al., 1998; Lovley, 2000)。さらに、微生物の増殖によって岩石の透水係数が増加するという報告もあり (Seki et al., 1998)、鉱物-微生物の相互作用は、地下における物質の循環だけでなく地下水の流動経路に影響を与える可能性が挙げられている。このような地下微生物の研究は、スウェーデンのエスポ鉱山など欧米を中心に世界中で進められている (West, 1995; Pedersen, 1996, 1999)。

本共同研究では、微生物が地下環境における地球化学的・地質水理的現象におよぼす影響を評価するための手法開発と開発された手法を用いて、地下微生物生態系と水理・地球化学環境との関わりについて基礎的知見を得る事を目的とする。

1. 2 既存の知見の整理

1. 2. 1 地下環境における地球化学的反応経路と微生物群集

深部地下環境における微生物の物質循環への関与を解明するにあたって、微生物が関与しうる生物地球化学的反応の“経路”および“速度”を明らかにする必要がある。生物地球化学的反応には、地下微生物の増殖によって一次的および二次的に反応が促進される硫酸還元、鉄還元、硫黄酸化、鉄酸化、硝酸還

元、ウランの還元等があげられ、それらの反応に伴って起こる鉱物の沈澱・溶解反応は水理状態にも影響を及ぼすと考えられる。微生物が触媒となって起こるこれらの“地球化学的反応”は、そこに生息する微生物の現存量および多様性に大きく依存しているものと思われる。そのため、地下環境における微生物の役割を理解するために、地下微生物群集の現存量および多様性に関する研究が盛んに行われている。また、地下微生物群集の多様性および活性に関する研究は、しばしば硫酸還元、硝酸還元および鉄還元反応等のような生物地球化学的反応と関連づけて研究されている（例えば、Pedersen, 1993; Nealson and Saffarini, 1994）。堆積岩、花崗岩、玄武岩およびそれらの帯水層における微生物の多様性については、一般的に *Comamonas*, *Pseudomonas*, *Desulfovibrio*, *Shewanella*, *Bacillus* などの微生物が検出されており（例えば Pedersen, 1993; Lehman et al., 2001）、ウラン鉱床などのウラン濃度の高い環境においては多様な硫酸還元菌群集が存在するという報告もある（Chang et al., 2001）。一方で、アフリカのガボン共和国オクロにあるウラン鉱床における地下微生物群集の解析結果では、*Acinetobacter* や *Zoogloea* などの種が多く得られており、得られたクローンに近縁な硫酸還元菌種としては *Desulfosarcina variabilis* のみで、必ずしも多様な硫酸還元菌群集が存在するという結果は得られていない（Pedersen et al., 1996）。このように、“地下生物圏”としての微生物多様性に関する一定の傾向はほとんど見られず、地下環境によって生息する微生物は異なっていると考えられる。

1. 2. 2 地下環境における地球化学的反応と微生物活性

微生物が関与する“地球化学的反応”に関しては、原位置環境における微生物活性の推定が重要になってくる。地下環境に想像以上の豊富なバイオマスが存在し、多様多様な反応経路があり得たとしても、それらの微生物がほとんど活動していなければ、地下環境に及ぼす微生物の影響を考慮する必要はない。地下環境の物質循環における微生物の役割を明らかにすることは、地下環境を研究する上での重要な知見の一つであるにもかかわらず、地下微生物の生菌および活性に関する報告はほとんどない。その理由として、生菌数の推定および微生物活性測定に関する技術的な問題が大きな壁になっていると考えられる。近年、環境中の微生物群集活性を測定す

る方法として様々な方法が検討されているが、単独で用いることのできる有効な方法は未だない。したがって、いくつかの手法を組み合わせた評価を行う必要がある。特に、無光・無酸素・強還元・高圧等の特殊な環境条件と考えられる深部地下の微生物活性に関する知見は、地下微生物の現存量および多様性に関する研究報告と比較すると驚くほど乏しい。現在までに報告されている例によると、地下の微生物活性はかなり低いと推察される。しかし、その活性は環境条件によって大きくばらついており、その範囲は 0%~100%と様々である (Kieft and Phelps, 1997)。例えば、Pedersen and Ekendahl (1990) は、花崗岩地下水中の微生物活性をマイクロオートラジオグラフィを用いて測定し、0~97.8%という生菌率を得ている。Chapelle et al. (1988) は、堆積岩地下水を対象としたナリジキシン酸による測定をおこない、28~100%という微生物活性値を得ている。地下微生物活性測定法の技術的な問題も原因の一つとなっている可能性はあるが、地下環境における微生物活性の分布は一様ではないことは明らかである。これらの地下微生物活性は地質・水理・地球化学等の原位置条件に大いに影響されていると考えられるため、調査の対象となる地下環境の様々な要因を考慮した上で、微生物活性を評価することが重要と考えられる。

1. 2. 3 生物活性測定法の現状

従来の微生物活性測定はプレートカウント法などの培養に依存する方法であったため、多くの問題が残されていた。例えば、VBNC 問題 (Kogure et al., 1979; Roszak and Colwell, 1987; Balkwill and Ghiorse, 1985) もそのうちの一つである。VBNC とは viable but nonculturable cells のことで、生存能力は保持しているが、培養できない微生物のことである。極限環境に生息する地下微生物を対象とした場合、培養法による検出は陸上の微生物を対象とするよりさらに難しくなると考えられる。また、地下環境には低栄養菌および独立化学栄養細菌が多く存在するため (Amy and Haldeman, 1997; Fredrickson and Fletcher, 2001)、培養にも時間がかかる。そのため、地下の微生物活性を見積もる場合、培養法のみのは活用は不適切と考えられる。

Kogure et al. (1979) は、環境中の微生物活性を測定する方法としてナリジキシン酸を用いた。ナリジキシン酸は、DNA gyrase の阻害剤であり、多くのグラム陰性菌はこれによって分裂が妨げられる。水試料中に炭素源とナリジキシ

ン酸を入れて微生物を培養することによって、培養細胞は膨張あるいは伸長するため、顕微鏡で観察することができる。しかし、活性の有無を細胞の形態によって見分けることから、糸状菌などの存在により計測は難しくなる。また、炭素源を添加した培養法に頼るので、環境中における真の微生物活性を反映しない可能性がある。

一方、近年、蛍光色素などの化学的試薬を用いて微生物を染色したり、あるいは化学的試薬を微生物の細胞内に存在する核酸や酵素などと反応させて生細胞および活性細胞を検出する方法が広く用いられるようになってきた。例えば、LIVE/DEAD Bacterial BacLight (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR)は細胞膜の健全性をもとに生菌と死菌を染め分けることのできる試薬である (Naganuma, 1996; Auty et al., 2001)。また、FDA (fluorescent diacetate) は、細胞内に存在するエステラーゼの検出をおこなう染色試薬で、細胞の代謝活性を見積もることができる (Chrzanowski et al., 1984; Brunius, 1980)。これらの方法では、顕微鏡観察による直接計数をおこなうことによって、培養法より正確な見積りができると考えられる。

Iturriaga (1979) および Zimmermann et al. (1978) は INT (2-(*p*-iodophenyl)-3-(*p*-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride) を改良し、微生物の代謝活性を検出できる試薬として用いたが、微生物活性によって還元された INT は蛍光を発しない。そのため、光学顕微鏡で観察する必要がある。それに対して、Rodriguez et al. (1992) は、呼吸活性細胞の検出法として CTC (5-cyano-2,3-ditolyl-tetrazolium chloride) を導入し、現在では地下水、海水、汚濁水、汽水、湖水などの環境試料を対象に広く用いられている。CTC は、呼吸・発酵などの酸化還元反応に必要な“脱水素酵素”を活性細胞内から検出することができる。脱水素酵素は CTC と反応することによって赤色蛍光色のホルマザン色素に分解される。この赤色沈殿物は、蛍光顕微鏡を用いて容易に検出することができる。また、Bhupathiraju et al. (1999) は、*Desulfovibrio desulfuricans*, *Geobacter sulfurreducens*, *Methanobacterium formicicum* などの嫌気呼吸をおこなう微生物にも CTC が有効であることを報告している。微生物活性を測定する方法は数多く存在するが、それらを単独で用いるのではなく、いくつかの方法を組み合わせることによって、より正確な見積りができると考えられる。

1. 2. 4 深部環境における微生物-鉱物の相互作用

分子状酸素の存在しない地下環境において、微生物は環境中に存在する Fe, S, Mn, C, U などの元素を利用した嫌氣的代謝をおこない、エネルギーを獲得している (Amy and Haldeman, 1997; Fredrickson and Fletcher, 2001)。これらの元素は地下環境における酸化還元電位に関与していると考えられるため (Drever, 1988)、微生物が地下の酸化還元電位に影響を及ぼす可能性がある。また、深度が深くなるにつれて、地下水中の炭酸塩、硫化物、硫酸塩、ケイ酸塩および粘土などはそのほとんどが過飽和状態で存在することが知られている (Plummer et al., 1990; McMahon and Chapelle, 1991, Walvoord et al., 1999)。しかし、たとえ深度に伴った温度増加によって上記のような塩類の沈澱反応が促進されたとしても、これらの鉱物の無機的な沈澱反応速度は、微生物が関与した鉱物-水反応速度に比べ、かなり遅いと考えられる。したがって、地下微生物の増殖によって生じる沈澱は、堆積物が固結してより硬い地層に変化していく岩石の続成作用において重要な役割を果たしている可能性が高い。このように、微生物による鉱物の沈澱および溶解への関与は、地下の水理学的状態をコントロールする要因の一つにもなり得る。

一方、*Gallionella*や*Leptothreax*などの微生物種は、鉄酸化をおこなうことでエネルギーを獲得することが知られているが (Hallbeck and Pedersen, 1991; Ehrlich, 1996a)、これらの微生物種は、鉄酸化をおこなう代謝過程で酸化鉄の沈澱およびコロイドを生成する。Hallbeck (1993) は、ある環境中の地下水に 2.7×10^5 cells ml⁻¹の*Gallionella*が存在していることを報告している。地下環境中にこれらのような水酸化鉄およびコロイド粒子 (鉄・硫黄) を生成する微生物は広く存在すると考えられるが、これらの微生物活動が地下環境に及ぼす影響はほとんど明らかにされていない。微生物由来のこれらの鉄・硫黄鉱物は、深部地下環境において物質循環・物質移動だけでなく、酸化還元のような地球化学的なプロセスにも影響を及ぼしているものと考えられる。

2. 共同研究項目

共同研究で行った研究項目は以下のように大別できる。

- 1) 微生物研究のための岩石サンプリング手法の確立
- 2) 地下深部における微生物生態系の把握
- 3) 微生物活動と地球化学環境の関わりの把握

以下にそれぞれの研究項目の概要について示す。

2. 1 微生物研究のための岩石サンプリング手法の確立

実際の岩盤においては、地下水は割れ目や礫岩部などの高透水性部分を優先的に流れている。このような地下水については、東濃地科学センターでこれまでに開発してきた蛍光染料を使用した地下水採水手法により、得られた試料に対する汚染の有無やその程度を定量的に把握する事が可能である。一方、低透水性の部分では既存の技術では地下水を採取することができず、ボーリングで得られた岩石が主要な研究対象となる。そのため、岩石試料中の微生物を汚染することなく採取する技術が必要となる。しかしながら、岩石試料中の微生物については、試料採取から分析までの間の微生物的汚染の程度を把握する手法が確立しておらず、岩石を用いた研究を行う前段階として、汚染の程度を定量的に把握しながら微生物試料を得るための手法開発を行った。

2. 2 地下深部における微生物生態系の把握

東濃ウラン鉱山周辺の堆積岩および花崗岩において、主に地下水試料を用いて、微生物の生菌／活性細胞およびそれらの多様性および役割に関する調査を行った。地下微生物の現存量（生菌・活性細胞数）推定法として、従来の培養法に加えて3種類の試薬を用いた直接計数法も用いた。これらの直接生菌計数は1) 微生物細胞膜の健全性, 2) 細胞の呼吸活性, 3) 細胞のエステラーゼ活性等に基づいて行った。また、深部地下環境における微生物の多様性を明らかにするために、培養法に依存しない分子生物学的手法を用いた。地下微生物の多様性に関しては、堆積岩環境において地球化学反応プロセスに重要な役割を果たしていると考えられる硫酸還元菌を対象とし、硫酸還元をおこなう微生物に

特異的な異化型亜硫酸還元酵素（DSR: Dissimilatory Sulfite Reductase）をターゲットとした遺伝子解析等を行った。

2. 3 微生物活動と地球化学環境の関わりの把握

微生物生態系の深度や岩相による変化とその場所の地球化学特性を比較し、微生物活動と地球化学環境の関わりについて解析した。また、地下水-岩石-微生物相互反応系という視点で、原位置の生物化学環境について考察し、微生物のコロイド生成能力や微生物が地球化学環境の形成・維持に与える影響評価を行った。

3. 微生物研究のための岩石サンプリング手法の確立

3. 1 研究の背景

3. 1. 1 「きれいな試料」ということ

地下生物圏における微生物の生息域は地下水および岩石の隙間である。したがって、地下微生物研究をおこなう際には地下水および試錐コア試料の両方を用いる。ここで懸念される問題の一つは、試錐孔掘削あるいはサンプリング過程で起こる化学的・生物的な汚染である。化学的汚染とは嫌気性微生物の生理活性および群集組成に影響を与え得る分子状酸素および代謝基質などの外来因子の混入である。一方、生物的汚染とは、掘削過程における陸上微生物の混入あるいは異なる深度の微生物の混交などである。これらの汚染は主に掘削作業中に発生するので、掘削に用いる機器の滅菌や掘削流体（清水・泥水）の品質管理ならびに採取した試料の嫌気保管や二次汚染の防止など、掘削前および掘削後において配慮が必要である。

3. 1. 2 トレーサーによる汚染のモニタリング

地下水・岩石コアの採取における重要な汚染源は、掘削作業で用いられる掘削流体である。掘削時に用いられる掘削流体中には大量の化学的外来因子だけでなく、多数の陸上微生物が存在している（地下水中の微生物現存量より、約10倍～100倍高い場合もある）。したがって、これらの掘削流体には混入物質および混入菌と挙動を共にする「トレーサー」を添加し、汚染を定量的に把握することが推奨される（ただし、現実的には経費や労力、掘削作業日数などの点において実施できない場合が多い）。トレーサーを導入する場合には、その行為によって地下試料汚染および研究の妨害が起きないように物質を選ぶ必要がある。理想的なトレーサーの条件としては、1) 低濃度でも検出できる、2) 化学的・微生物学的に不活性である、3) 吸着性を示さない、4) 毒性がない、5) トレーサーの定量技術が確立している、などがあげられる。このようなトレーサーの一つとして、パーフルオロカーボン（perfluoromethylcyclohexane, Sargent and Seffl, 1970）が挙げられる。このトレーサーは極微量（検出限界

値: 10^{-16} mol l⁻¹, Watson et al., 1987) でも検出することができ、吸着性や毒性も示さない。欠点としては、揮発性および難水溶性なので溶媒としてメタノールを用いる必要があり、導入後はできるだけ迅速な分析をおこなわなければならない。しかし、揮発性を持つことにより、ガスクロマトグラフィーにてより高感度の検出が可能であり、実用に優れたトレーサーとして広く用いられている (Watson et al., 1987; McKinley and Colwell 1996; Smith et al., 2000)。

3. 1. 3 “微生物トレーサー”の有効性

上記のようなトレーサーを仮に、分子レベル (分子サイズ) のトレーサーということで、化学トレーサーと呼ぶことにする。化学トレーサーの多くは、分子レベル (分子サイズ) での汚染の追跡には有効であるが、地下微生物の増殖や代謝に影響を及ぼしうるので、微生物汚染の追跡には別のタイプのトレーサーが必要である。つまり、化学トレーサーはそれ自体が微生物の増殖・代謝を促進あるいは阻害する可能性があり、結果として地下微生物群集の現存量や種組成、多様性を変化させ得るということである。これに対し、掘削流体 (清水・泥水) 中の微生物の混入、すなわち微生物汚染を追跡するには、掘削流体に微生物と同サイズで微生物と挙動をともにし、微生物に対して不活性であるような物質、すなわち微生物トレーサーを添加することが望ましい。ただし、これによってもなお、掘削孔内の異なる深度 (地層) の微生物集団間の混交 (これもまた汚染の一つである) を追跡することはできないという方法論的制約のあることに言及しておく。汎用される微生物トレーサーとしては、蛍光微粒子 (以下、蛍光ビーズと呼ぶ; Smith et al., 2000; Fredrickson et al., 1995; Fredrickson et al., 1993; Chapelle and McMahon 1991; Russell et al., 1992) および微生物菌体 (Wood and Ehrlich 1979) などが知られている。地下微生物の現存量測定や多様性解析等を主目的とした試錐孔では、よりよい微生物トレーサーとして生きた微生物が用いられることもある。この場合、生菌トレーサーには地下微生物と容易に区別できるもの、たとえば genetically engineered microorganisms (GEMs) の使用が望ましいが、GEMs の環境放出には慎重論もある。Wood and Ehrlich (1979) は微生物トレーサーとして、地下に見られない種類の酵母を用いた研究を行い成果を得ている。しかし、添加した微生物トレーサーは掘削終了後に回収されることが理想的であり、掘削作業中および掘削後なら

びに、試料採取後の微生物変化（現存量および微生物相）を極力避けるべきである。したがって、生菌トレーサーより微生物擬似トレーサーの使用の方が環境倫理的に妥当であり、蛍光ビーズの使用がより現実的であると考えられる。

3. 1. 4 微生物研究における試料およびデータの品質保証／品質管理

蛍光ビーズを使用するにあたり、価格と労力が現実的な問題となってくる。市販の蛍光ビーズをトレーサーとして使用するには、直径 0.2 μm の蛍光ビーズの場合、掘削流体 1 m^3 あたり 5 mlを添加する。調査区域の地質的・水理的特徴によっても異なるが、1000 mの試錐孔掘削で少なくとも 20 m^3 の掘削流体が使われるので、蛍光ビーズを連続添加すると少なくとも 100 ml以上必要となる。これは市販価格では 20 万円に相当する。また試錐孔調査は、微生物研究だけでなく地質・水理・地球化学などの他分野と共同でおこなわれることが多く、たとえば化学・生物学的に不活性であっても蛍光ビーズという異物（有機物）の使用が諸調査に支障を及ぼす恐れもある。したがって、トレーサーとしての蛍光ビーズの添加は、微生物汚染の追跡という目的を達せられる範囲で最小限におこなわれることが多い。

微生物トレーサーを用いるのは微生物汚染が起こるからである。理想的には、微生物汚染の心配がなくなれば、微生物トレーサーを使う必要もなくなる。したがって、汚染フリーのサンプリング基準を確立させることは、微生物学的な試料やデータの品質保証・品質管理（QA/QC）を確実化するために必要であるのはもちろんのこと、他分野との共同調査がおこないやすくなる点においても重要である。これにより、微生物学的データと他分野のデータの相互参照・クロスチェックの機会が向上し、より信頼性の高いデータとして使用、提供できることになる。そのためには、岩石の特性（岩相、間隙率、亀裂密度など）と汚染の度合の相関の把握が大変重要な情報となってくる。蛍光ビーズを微生物トレーサーとして用いた例はいくつか報告されているが、その蛍光ビーズ直径のほとんどは 1 μm (Fredrickson et al., 1995; Fredrickson et al., 1993; Chapelle and McMahon 1991) から 0.45 μm (Smith et al., 2000) であり、必ずしも環境微生物 (0.2 μm サイズも多い) と挙動をともにしない恐れがある。さらに、微生物汚染の度合を岩石の特性との相関において総合的に評価した例はほとんどない。そこで本研究では、環境微生物の挙動（移動）をより良く模

擬し、より精度の高い汚染評価を行うために、市販の直径 0.2 μm の蛍光ビーズを微生物トレーサーとして用いた。また、微生物汚染の度合、すなわち微生物トレーサーが掘削清水の岩石内部に侵入する度合と岩石の特性（岩相・岩石の硬さ・空隙・透水性など）との相関を明らかにし、地下微生物研究にとって現実的に応用可能なサンプリング方法および微生物汚染の評価方法を提示した。

掘削により得られた円筒状の岩石コアは表面が外来微生物によって汚染されているので、微生物学的に信頼できるデータを得るためには、汚染が浸透していない内側部分（サブコアと呼ぶ）を用いる必要がある。つまり、円筒状の岩石コアから一回りか二回り小さい円筒（サブコア）をくり抜く作業（サブコアリング）が必要である。さらに、この作業は嫌氣的かつ無菌的におこなわれなければならない。従来、堆積物や柔らかい堆積岩については、こうした作業が行われたこともあったが、硬い堆積岩や火成岩を対象とした嫌氣的かつ無菌的サブコアリングをおこなうための装置・施設は整備されてこなかった。そこで本研究では世界に先駆けて「嫌氣的無菌的サブコア回収システム」を設計・制作し、実際に使用して改良を加えた上で諸データを得た。

3. 2 材料と方法

3. 2. 1 00SE-03 号孔における清水掘りによる掘削

東濃鉦山敷地内に掘削された試錐孔 00SE-03 号孔を用いて、蛍光ビーズによる汚染度の確認と嫌氣的無菌的サブコア回収システムの性能試験を実施した。00SE-03 号孔は、東濃鉦山敷地内のやや北部に位置し、第三紀堆積岩とその基盤の土岐花崗岩に掘削されている。深度 104.4 m から風化花崗岩の礫岩が現れ、深度 134.2 m の不整合面の上部付近に基底礫岩（風化花崗岩）層が観察される。深度 145 m 以深は基盤岩である土岐花崗岩になる。この試錐孔は、掘削流体に清水を用いて掘削された。掘削水には、東濃鉦山坑内に湧出する地下水を揚水して使用している。この掘削清水（地下水）はドリルビットを冷却・潤滑させるため、また孔底から岩石の削りくず（cuttings という）を孔口まで上げて孔外に洗い出すために用いている。

ふつうの掘削では cuttings を上げやすくするために、掘削流体に泥剤（粘土鉱物や有機ポリマーなど）を添加して掘削流体の粘性と比重を高くする。この

ような掘削流体は掘削泥水 (drilling mud) と呼ばれる。しかし、東濃地科学センターではより信頼性の高い調査研究をおこなうために、掘削泥水ではなく掘削清水を使用している。

掘削水に導入するトレーサーとして、直径 0.2 μm の蛍光ビーズ, Latex fluorescent microspheres, (Fluoresbrite carboxylated YG, 直径 0.2 μm , Polysciences, Inc. Warrington, Pennsylvania) を用いた。掘削清水用の貯蔵タンクの中の清水に、濃度 10^6 beads ml^{-1} のオーダーになるように蛍光ビーズを添加した。蛍光ビーズを添加した後の清水は、よく攪拌後、掘削水として用いた。掘削水中の蛍光ビーズ濃度は毎日顕微鏡で計数し、タンクへの水追加時には適宜蛍光ビーズの添加もおこなった。濃度確認用の掘削水は50 mlチューブで採水し、直ちにアルミホイルにて遮蔽して実験室に持ち帰り、できるだけ早く蛍光顕微鏡にて計数した。

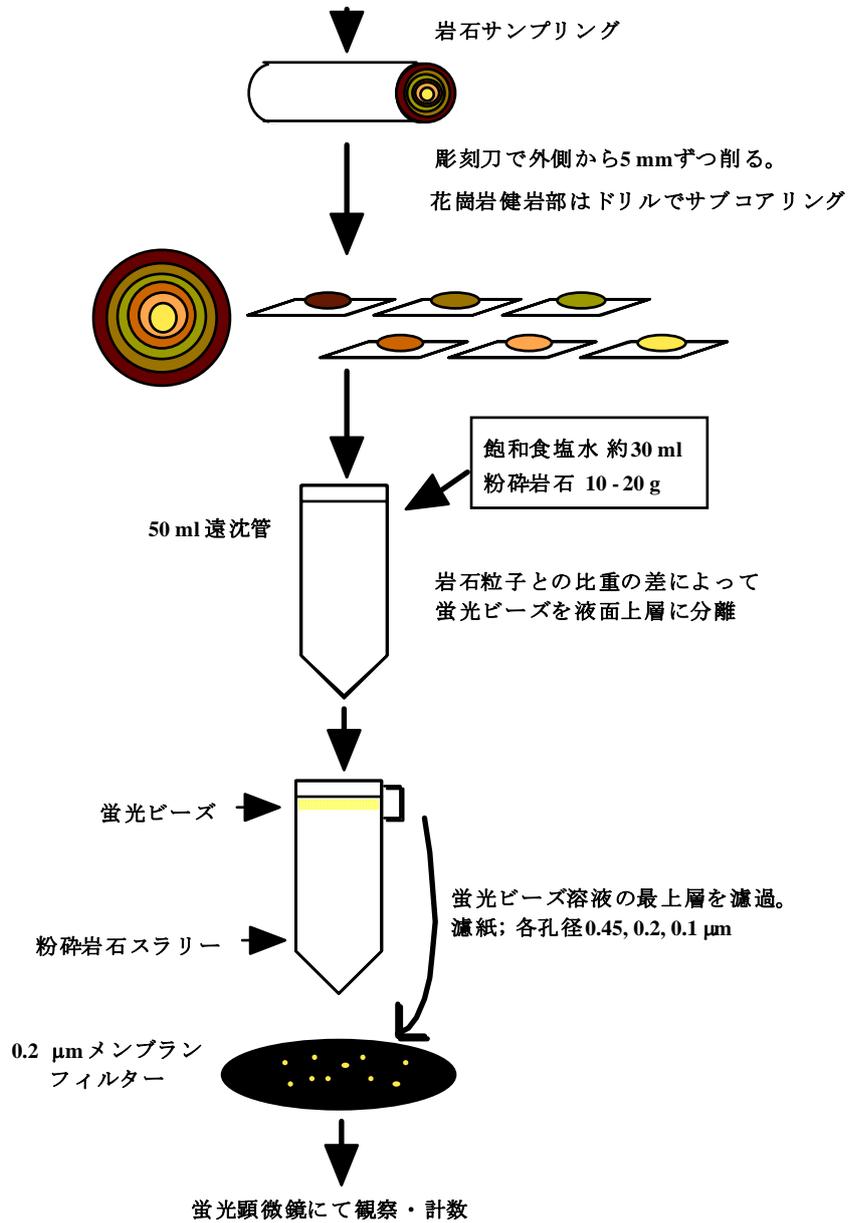
3. 2. 2 岩石コア試料の採取

00SE-03 号孔の掘削によって得られた岩石コアは、岩相記載をおこなった後、2週間以内に採取した。掘削長 186 mのうち、岩相の異なる 14カ所の深度を選定し、サンプリングをおこなう際は、回収された岩石表面から他の試料への2次汚染がおこらないように注意した。また、蛍光ビーズが退色しないように、採取後は直ちにアルミホイルにて遮光し、実験に用いるまで暗所にて保存した。採取した各岩石コアの岩相は、粒子サイズが異なる(細粒・中粒・粗粒)砂岩・凝灰質砂岩・シルト岩・礫岩・花崗岩健岩部(造岩鉱物の変質が全くなく、非常に新鮮な岩石部位)および風化花崗岩であった。本研究用には、各深度の岩石コアについて約 60 - 70 cmを採取し、そのうち約 30 - 40 cmを蛍光ビーズ計数用、約 15 cmを透水係数測定用、約 3 - 5 cmを間隙率測定用に用い、残りの岩石コアは暗所にて保存した。

3. 2. 3 蛍光ビーズの計数

蛍光ビーズを計数する際におこなった前処理の模式図を図 3-1 に示した。掘削された直径 6 cmの岩石コアについて、彫刻刀を用いて外側から 5 mmずつ削

蛍光ビーズ (Latex fluorescent microspheres; 直径 $0.2\ \mu\text{m}$) を掘削流体循環タンクに添加 (最終濃度: $\sim 10^6\ \text{beads ml}^{-1}$)



蛍光ビーズテストに関する実験手順

図 3-1 蛍光ビーズ計測に関わる前処理工程

り取った。その際、処理過程において、すでに汚染されていると思われるコア表面からの2次汚染を防ぐために、5 mm ごとに試料を回収し、手や実験器具、実験台等も洗浄を心がけることによって、汚染の防止に細心の注意を払った。粉砕された岩石は各 10 - 20 g ずつ計り取り、個別に 50 ml の遠沈管に収納した。これに約 30 ml の飽和食塩水を注いで岩石粒子より比重の軽い蛍光ビーズ粒子を浮かせ、また岩石細粉片を沈ませることで、蛍光ビーズ粒子と岩石片を分別した。蛍光ビーズを含む飽和食塩水の最上層をメンブランフィルター (Millipore) を用いて濾過し、濾紙上に蛍光ビーズを捕集した。飽和食塩水の最上層に懸濁する微細な岩石粒子を取り除くため、孔径の異なる 3 種類のフィルター (孔径 0.45, 0.2, 0.1 μm) で孔径の大きい方から別々に濾過し、それぞれの濾液はさらに孔径 0.1 μm のフィルターで濾過して、溶液中の蛍光ビーズをすべて捕集した。蛍光ビーズを捕集したフィルターを蛍光顕微鏡 (Leica DMLP, 励起波長 BP 450 - 490 nm) で検鏡し、蛍光ビーズを計数した。1 フィルターにつき 100 - 200 視野で計数した。岩石細粉を懸濁した飽和食塩水の中-下層の混濁層 (スラリー層) についても同様の操作で検鏡したが、スラリーからは蛍光ビーズは検出されなかった。

掘削清水中の蛍光ビーズ濃度のモニタリングをおこなうために、一視野あたりに 100 - 150 beads ml^{-1} の密度になるように、掘削清水を孔径 0.1 μm のメンブランフィルターで濾過し、上述のように蛍光顕微鏡にて検鏡した。

3. 2. 4 間隙率の測定

岩石コア試料における間隙率および細孔径分布は、水銀圧入法によって測定した。測定には水銀ポロシメーター (PoreMaster-60, YUASA, Kyoto, Japan) を用い、細孔径分布、間隙率およびかさ密度を求めた。水銀圧入法とは、著しく表面張力が大きいという水銀の特徴 (25°Cで 484.2 dyn cm^{-1} , 例えば水の場合 20°Cで 72.75 dyn cm^{-1}) を利用して、岩石コア試料を水銀液に浸漬し、加圧により岩石細孔内に水銀を圧入し、その際の圧力と圧入水銀体積から間隙率を求める方法である。Washburn (1921) により提案された以下の式により、細孔径へ換算でき、圧入体積から細孔容積を計算できる。

$$D = - \frac{4\gamma \cos(\theta)}{P}$$

P: 水銀の圧入圧力

D: 細孔直径,

γ : 水銀の表面張力 (484.2 dyn cm⁻¹)

θ : 接触角

測定用の岩石試料は、約 1 g 程度の立方体に切断、加工し、試料表面に付着している不純物を除去するための前処理として、切断処理後の各岩石試料をオーブンにて 120°C で 4 時間乾燥させた。その後、孔半径約 0.0033~274 μm までの細孔分布測定をおこなった。また、圧力方式の違いから、測定を 0.35~3.5 MPa の低圧領域 (大きい孔) および 0.14~420 MPa の低圧~高圧領域 (小さい孔) に分けて行った。

3. 2. 5 透水係数の測定

透水係数の測定は、定水位法 (深度 32 m) および、トランジェントパルス法 (中野, 齊藤, 1988) により行われた。定水位法は、岩石試料の両端を一定の圧力水頭差に保ち、試料内の飽和間隙水に動水勾配を与え、流れが定常状態 (単位時間あたりの透過水量が安定している状態) になった後、単位時間あたりの透過水量を測定して透水係数を求める方法である。この場合の透水係数は、次式で求められる。

$$K = \frac{Q}{A} \cdot \frac{\Delta l}{\Delta h}$$

K: 透水係数 (cm sec⁻¹)

Δl : 試料体長 (cm)

A: 試料断面積 (cm²)

Q: 単位時間あたりの透過水量 (cm³ sec⁻¹)

Δh : 試料両端の圧力水頭差 (cm)

分析は 9.99 cm に整形した岩石試料を用い、以下のような条件で行った。

有効応力: 10.5 kgf cm⁻²

室温変化: 24.7 \pm 0.5°C

拘束圧力: 12 kgf cm⁻²

間隙圧力: 2 kgf cm⁻²

背圧力: 1 kgf cm⁻²

圧力水頭差 Δ h: 1000 cm

透過水量: 20 cm³

算出時間: 3638 sec

単位時間あたりの透過水量Q: 5.50 x 10⁻³ cm sec⁻¹

一方、トランジェントパルス法は、定水位法では測定の困難な難透水性岩石を対象とした試験方法で、Brace (1968) によって提案されたものである。透水係数は次式によって求めることができる。

$$P_1 - P_f = \Delta P \cdot \frac{V_2}{V_1 + V_2} \cdot \exp(-\alpha t)$$

$$\alpha = \frac{KA}{\mu C_w L} \cdot \frac{V_1 + V_2}{V_1 V_2}$$

P₁ : 高圧側貯留槽の圧力 (kgf cm⁻²)

V₁ : 高圧側貯留槽の体積 (cm³)

P₂ : 低圧側貯留槽の圧力 (kgf cm⁻²)

V₂ : 低圧側貯留槽の体積 (cm³)

P_f : 圧力の収束値 (kgf cm⁻²)

Δ P : 圧力パルス (kgf cm⁻²)

A : tとP₁ - P_fとの傾き

t : 時間 (sec)

K : 透水係数 (darcy)

μ : 流体の粘性係数 (cp)

C_w : 流体の圧縮率 (cm² kgf⁻¹)

A : 試料の断面積 (cm²)

L : 試料の長さ (cm)

岩石コア試料の長さを 9.99 cm に整形し、以下の条件で測定をおこなった。

流体の圧縮率 β : 0.468 x 10⁻⁴ kgf cm² 室温変化: 24.5 ± 0.6°C

流体の粘性係数 μ : 1.002 cp 貯留槽温度 (V₁) : 25.0°C

有効応力: 12.5 - 16.5 kgf cm² 貯留槽温度 (V₂) : 24.3°C

拘束圧力: 21.0 - 35.0 kgf cm² 間隙圧力(P₁): 11.0 - 21.0 kgf cm²

圧力差 Δ P: 5.0 kgf cm² 間隙圧力(P₂): 6.0 - 16.0 kgf cm²

収束圧 (P_f) : 8.5 - 18.5 kgf cm² 貯留槽の体積 V₁: 1108 cm³

貯留槽の体積 V₂: 1108 cm³

3. 2. 6 サブコアリング装置の開発

岩石コアを採取した後、顕微鏡観察、培養、遺伝子解析および脂肪酸解析な

どの微生物研究をおこなうためには、切断、粉碎などの前処理を必要とする。地表面の土壌および堆積物などの“軟らかい”試料と異なり、花崗岩や固結堆積岩などの“硬い”岩石コア試料は、ナイフ、スパチュラ、ハンマー、あるいは鑿などによって内側の“未汚染”部分を削り取り、粉碎することは容易ではない。しかも、前処理（サブコア）作業そのものも、外来微生物や酸素による汚染を防ぎながら無菌的・嫌氣的に行うことが必要である。地下微生物を対象とした堆積物・堆積岩の前処理システムは Parks et al. (1995), Cragg et al. (1992), および Colwell et al. (1992) によって報告されている。Parks や Cragg らのシステムは、海底堆積物コアに直接窒素ガスを噴入しながらコアをカットするものである。この装置によって、閉鎖された嫌気空間（グローブボックス内）ではなく、ある程度オープンスペースでもコアのハンドリングをおこなうことができる。また、Colwell らのシステムは、無菌的に円柱状のコアをカットした後、中心部のみをくり抜くことができる。これらの装置の刃（ブレード）をはじめ、他のコア接触部はステンレス製であるため、オートクレーブによる滅菌が可能である。しかし、これらの装置は堆積物・堆積岩を対象としており、花崗岩・玄武岩などの火成岩を対象としたサブサンプリング装置は未だ報告されていない。花崗岩などの火成岩はかなり硬質であるため、ナイフや鑿などを用いた手作業でサブコアリングをおこなうことはほぼ不可能である。そこで本研究では、嫌氣的環境下に保ったグローブボックス内で、コアドリルを用いて岩石コアの内側部をサブコアリングする装置の開発をおこなった。この装置を用いることにより、表面汚染された岩石コアから、汚染のない岩石中心部のみのサブサンプリングを無菌的・嫌氣的におこなうことが可能となった。

3. 3 結果と考察

3. 3. 1 掘削清水中の蛍光ビーズ濃度モニタリング

00SE-03 号孔の掘削は、2000 年 7 月 10 日から 8 月 4 日まで行われた。試錐孔掘削作業中の、掘削水中の蛍光ビーズ濃度のモニタリング結果を表 3-1 に示す。蛍光ビーズのモニタリングのために、掘削清水中に含まれる掘削泥質物も

表 3-1 00SE-03 号孔掘削に用いられた掘削水中の蛍光ビーズ濃度

深度 (m)	蛍光ビーズ濃度 (x 10 ⁵ beads ml ⁻¹)	サンプリング日付
30.6	1.17	Jul. 10, 00
45.6	0.51	Jul.11, 00
48.6	0.04	Jul. 12, 00
63.6	11.7	Jul. 13, 00
70.2	16.8	Jul. 14, 00
77.6	15.1	Jul. 17, 00
82.9	7.96	Jul. 18, 00
88.7	7.31	Jul. 24, 00
106.5	3.98	Jul. 25, 00
116.1	0.82	Jul. 26, 00
127.4	0.20	Jul. 27, 00
145.7	3.94	Jul. 31, 00
153.3	0.91	Aug. 01, 00
166.8	1.59	Aug. 02, 00
169.9	12.8	Aug. 03, 00
186.0	13.1	Aug. 04, 00

採取した。合計 14 箇所の深度にて岩石コア試料を採取し、コア試料の外側から中心部までの蛍光ビーズの混入度合を調べた。サンプリングをおこなった掘削区間における蛍光ビーズ濃度は、掘削水中に約 $10^4 \sim 10^6$ beads ml^{-1} に保たれていた。

3. 3. 2 岩石学的特徴

採取された各岩石コア試料の記載結果を表 3-2 に示した。岩相の異なる岩石コア試料に対して、割れ目の数および RQD (Rock Quality Designations) 値が求められた。RQD とは、岩石コアを採取した際に、長さ 10 cm 以上の健全な部分の合計が 1 m あたりにどれだけ存在するかを 100% 表示したものである。この値が大きいほど、一般に割れ目の頻度は小さい。RQD 値は次のような式で求めることができる。

$$\text{RQD (\%)} = \frac{\text{単位区間長 (1 m) 中の 10 cm 以上の岩芯長の和}}{\text{単位区間長 (1 m)}} \times 100 (\%)$$

割れ目の数および RQD 値は岩相により異なっていたが、岩石コアの回収率は均一ではないため、割れ目の少ない層ほどコア回収率が高くなるという技術的バイアスがかかる。したがって、割れ目数と RQD 値はそれほど高い相関関係を示さなかった。花崗岩健岩部においては割れ目が観察されなかったため、試料の RQD 値は 100 であった。割れ目本数の比較的多い風化花崗岩および礫を含む岩石コア試料では、RQD 値は低く、深度 131 m における基底礫岩では 65%、深度 162.5 m における風化花崗岩では 24.5% であった。

3. 3. 3 岩石中の蛍光ビーズ濃度

各岩石試料中に混入していた蛍光ビーズの密度を表 3-2 に示した。外側を削り取られた岩石中には、ほとんどの岩石コア試料から蛍光ビーズが検出されたが、その混入密度は試料によって異なっていた。外側部分で最も蛍光ビーズの混入密度が高かった試料は、深度 115.0~115.5 m における中礫岩で、その密度は外側から 0~10 mm (これ以降、mm from the core surface, mmfs と記す。こ

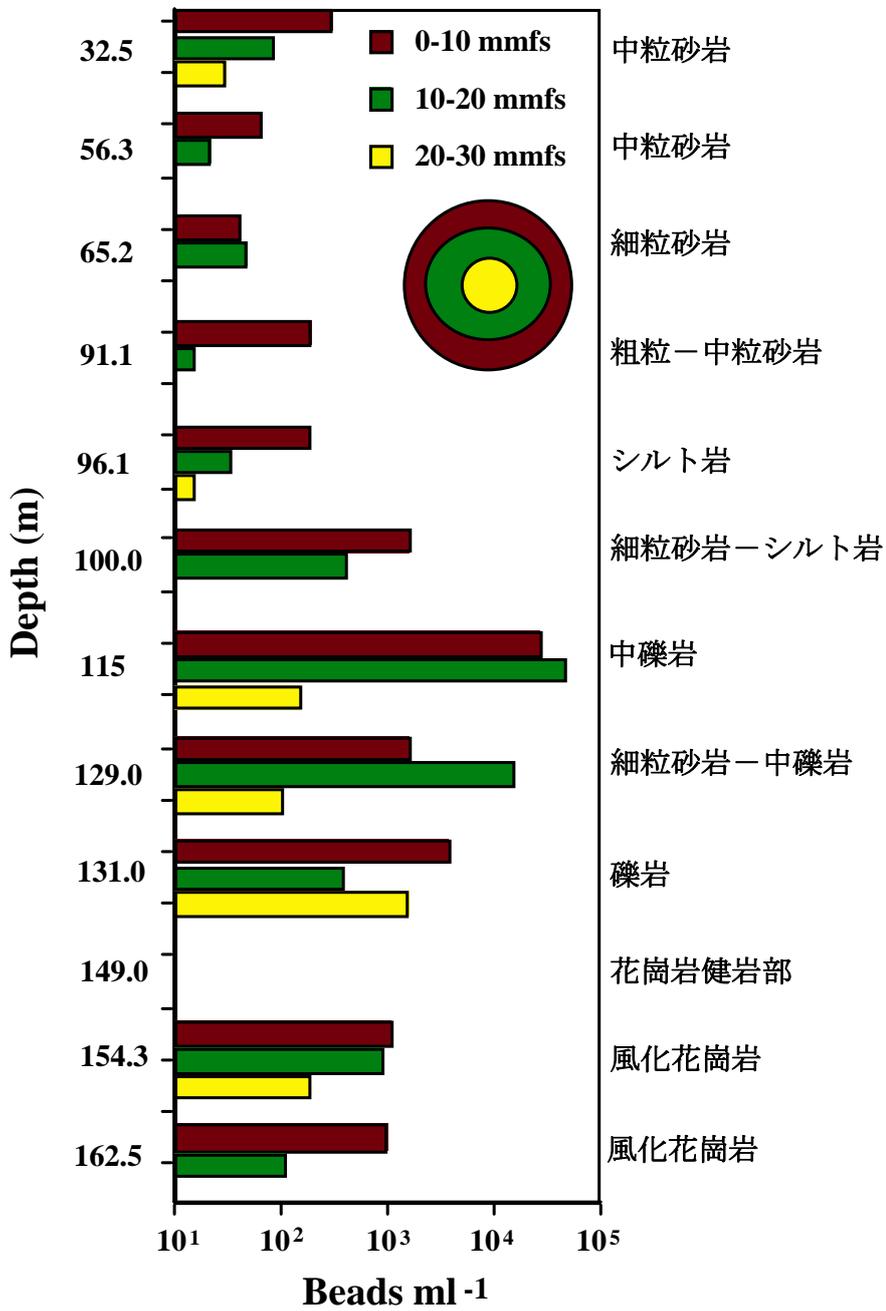
これは、国際深海掘削計画で用いているm below seafloor, mbsfに倣ったものである)の範囲において27820 beads g^{-1} であった。特に、この試料においては、0-10 mmfsよりも10-20 mmfs領域の方が蛍光ビーズの混入密度(すなわち掘削水の混入)が高くなっており、その密度は45689 beads g^{-1} にも上った。ほとんどの岩石コア試料において、外側から内側部分に向かうにつれて、蛍光ビーズの密度(すなわち掘削清水による汚染の程度)は低くなるという傾向を示した(図3-2)。また、岩石コア試料の内側部分では、4カ所の堆積岩コア試料の内側部分にて蛍光ビーズはまったく検出されなかった。深度149.0-149.5 mにおける花崗岩健岩部の試料では、0-15 mmfs領域においても、蛍光ビーズの混入は観察されなかった。中心部20 mm ϕ 領域(約20-30 mmsf)において全く蛍光ビーズが検出されなかった試料は、深度56.2 mにおける中粒砂岩、深度65.2 mにおける細粒砂岩、深度91.0 mにおける細粒/中粒砂岩、深度100.0 mにおけるシルト岩-細粒砂岩をそれぞれ岩相とする試料であった。礫岩、礫を含む岩石、および風化花崗岩に関しては、中心部分における蛍光ビーズの混入密度が他の岩相と比較して著しく高かった。

3. 3. 4 岩石コア試料における間隙率および透水係数

各試料における間隙率および透水係数の結果を表3-2に示した。00SE-03号孔における岩石試料の間隙率は、岩相変化を反映してほぼ23-59%の範囲でばらついた分布を示していたが、全体としては深度が増すにつれて間隙率は減少していた(図3-3)。礫岩部および花崗岩試料では、その間隙率は0.5-10%となり、堆積岩部と比較して著しい減少値を示していた。かさ密度は、コア試料の質量を試料の占有容積に間隙容積を加えた容積で割って求めた値である。かさ密度に関しても間隙率と同様に、全体としてばらついた値を示すが(図3-4)、傾向としては深度が増すにつれてその値は増加しており、間隙率の減少とかさ密度の増加には負の相関関係が見られた($r=0.902$, 図3-5)。唯一、深度129.0 mの礫岩を含む砂岩相において、低いかさ密度かつ低い間隙率という値を示していた。また、各岩石試料中のそれぞれの細孔分布についても同時に分析をおこなった結果、各岩石コアに分布する空隙容積の最も代表的な値(Mode)も同様に、深度が深くなるにつれて減少傾向にあった。以上の結果からも、堆積岩と花崗岩では微生物の生息空間としての環境が全く異なることが

表3-2 蛍光ビーズテスト結果

深度 (m)	岩相記載 ²⁾			1 細孔あたりの容積 のうち代表的な値 (MOD: cc mm-cc ⁻³)				蛍光ビーズデータ				ポンプ ⁶⁾			ビット ⁶⁾	
	岩石地質的特性	亀裂密度 (N/m)	RQD (%)	間隙率 (%)	かさ密度 (g cc ⁻³)	透水係数 ³⁾ (m sec ⁻¹)	外側からの距離 (mmfs) ²⁾	蛍光ビーズ密度 g ¹	細閉清水中の蛍 光ビーズ密度 (heads g ⁻¹)	水圧 (kg cm ⁻²)	細閉清水量 (L min ⁻¹)	細閉排水量 (L min ⁻¹)	重量 (kg)	rpm		
32.48-33.0	凝灰質中粒砂岩	2	82	57.28	1.029	0.410	2.80E-08	0-10 10-20	303 88	50754	10-12	123	123	200-250	72	
56.25-57.0	中粒砂岩	5	89.5	42.69	1.290	0.237	9.76E-13	0-10 10-15 15-30	31 22 0	1166197	8-10	68	65	250-300	288	
65.2-65.7	細粒砂岩	5	98.5	23.19	2.010	0.190	no data	1-10 10-20 20-30	43 49 0	1682052	10-12	123	120	300-500	288	
77.9-78.6	中粒砂岩	6	61.5	no data	no data	no data	7.86E-10	0-15 15-30	no data	796243	6-8	69	67	300-500	288	
81.4-82.0	細粒-中粒砂岩	5	72	31.75	1.593	0.206	1.93E-12	0-15 15-30	no data	796243	6-8	68	64	300-500	288	
91.0-91.5	粗粒-中粒砂岩	3	98.5	43.24	1.426	0.266	4.39E-12	0-10 10-20 20-30	196 15 0	397674	10-12	123	122	500-800	288	
96.0-96.5	シルト岩	5	89	44.66	1.350	0.274	1.07E-12	0-10 10-20	185 35	397674	10-12	123	122	500-800	288	
100.0-100.5	シルト岩-細粒 砂岩	4	100	51.61	1.180	0.330	6.42E-13	0-10 10-15 15-20	1704 414 0	397674	10-12	123	122	500-800	288	
115-115.5	中粒岩	7	72.5	0.52	2.643	0.004	3.95E-12	0-10 10-20	27820 45689	82401	12-16	123	122	500-800	288	
129.0-129.4	細粒砂岩-中粒 岩	3	100	6.01	1.584	0.032	6.92E-13	0-10 10-20 20-30	1656 15119 102	394091	12-16	123	122	500-800	288	
131.0-131.5	基礎礫岩	3	65	10.61	2.341	0.085	no data	0-10 10-20 20-30	3763 397 1629	394091	14-18	123	122	500-800	288	
149.0-149.5	花崗岩健岩部	0	100	0.9	2.660	0.006	1.07E-13	0-15 15-30	0 0	90760	6-8	69	67	500-800	288	
154.3-154.8	風化花崗岩	7	60.5	no data	no data	no data	no data	0-10 10-20 20-30	1118 911 185	158831	4	36	35	500-700	72	
162.5-163.0	風化花崗岩	9	24.5	10.45	2.413	0.091	2.71E-09	0-10 10-20 20-30	1084 111 11	158831	4	69	68	500-700	72	



岩石コア内部における蛍光ビーズ (beads) の深度 (depth) プロファイル。ほとんどの岩石コアサンプルにおいて、外側から内側部分に向かうにつれて、蛍光ビーズの混入密度は減少傾向を示した。花崗岩健岩部およびほとんどの砂岩コア中心部においては、蛍光ビーズの混入は検出されなかった。 mmfs; mm from the core surface 。

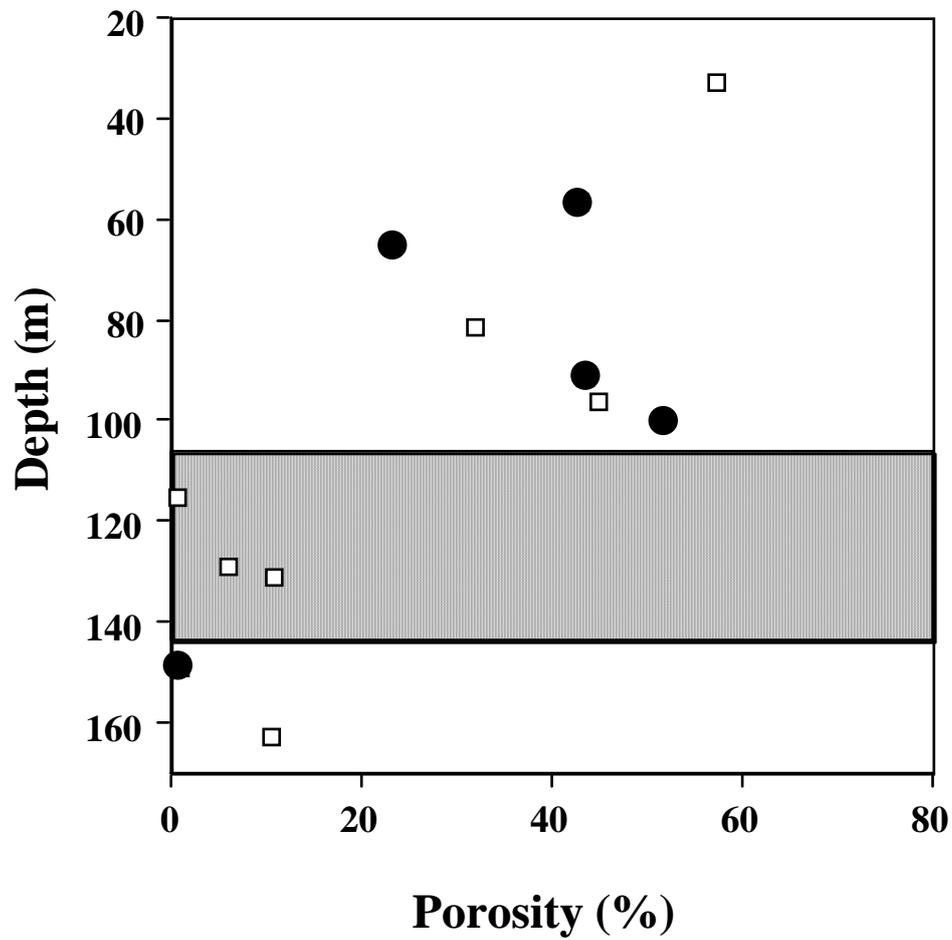
図 3-2 岩芯中の蛍光ビーズ計測結果

分かる。微生物にとって“住処”としやすいのは、空間（間隙）の多い堆積岩の方であろう。

一方、00SE-03 号孔における透水係数の深度プロファイルを見ると、岩相変化を反映してばらついた分布を示していたが (1.1×10^{-13} – $2.8 \times 10^{-8} \text{ m sec}^{-1}$)、深度が深くなるにつれて値が減少するという傾向は見られなかった（図 3-6）。各岩石コア試料における透水係数は、 9.8×10^{-13} – $2.8 \times 10^{-8} \text{ m sec}^{-1}$ の間でばらついており、堆積岩の深度 56.25 mにおいて最も低い値を示し、堆積岩の深度 32.48 mにおいて最も高い値を示した。両岩石コア試料とも中粒砂岩で形成されていた。花崗岩健岩部（深度 149 m）においては、 $1.1 \times 10^{-13} \text{ m sec}^{-1}$ と比較的低い透水係数値を示していた。それに対して風化花崗岩（深度 162.5 m）においては $2.7 \times 10^{-9} \text{ m sec}^{-1}$ となり、非常に高い値を示したが、礫岩を含む岩石コア試料は 4.0×10^{-12} – $6.9 \times 10^{-13} \text{ m sec}^{-1}$ と少し低めの値を示す結果が得られた。

3. 3. 5 掘削清水の汚染に影響を及ぼす要因

様々な視点から岩石の特性調査がおこなわれたが、地下微生物研究を対象としたサンプリングをおこなう際、唯一 RQD 値が「汚染フリー」の指標として有効である可能性が示唆された。その他の測定パラメーターと蛍光ビーズの混入密度との間に有意な相関関係は得られなかった。例えば、間隙率、かさ密度および透水係数の結果は、中心部への蛍光ビーズ混入密度とは全く相関を示さなかった。掘削水による汚染は、そのコア試料における間隙率および空隙のサイズ、そのサイズ分布、あるいはその岩石の透水性に大きく影響されているものと予想されがちであるが、実際には明白な傾向性を示さなかった。コア試料におけるこれらの物性パラメーターが、掘削清水の混入と少なからず関係することは想像に難くない。しかし、地下微生物研究用の岩石コアを採取する際の「汚染フリー」の指標として用いるには、間隙率や間隙サイズ分布、透水性などの岩石物性パラメーターは必ずしも適していない。



 岩石試料に礫岩を含む層

図 3-3 岩石中の間隙率測定結果

00SE-03 号孔における間隙率の深度プロファイル。●は岩石コア中心部 (20mm φ) において蛍光ビーズの混入が認められなかった深度。

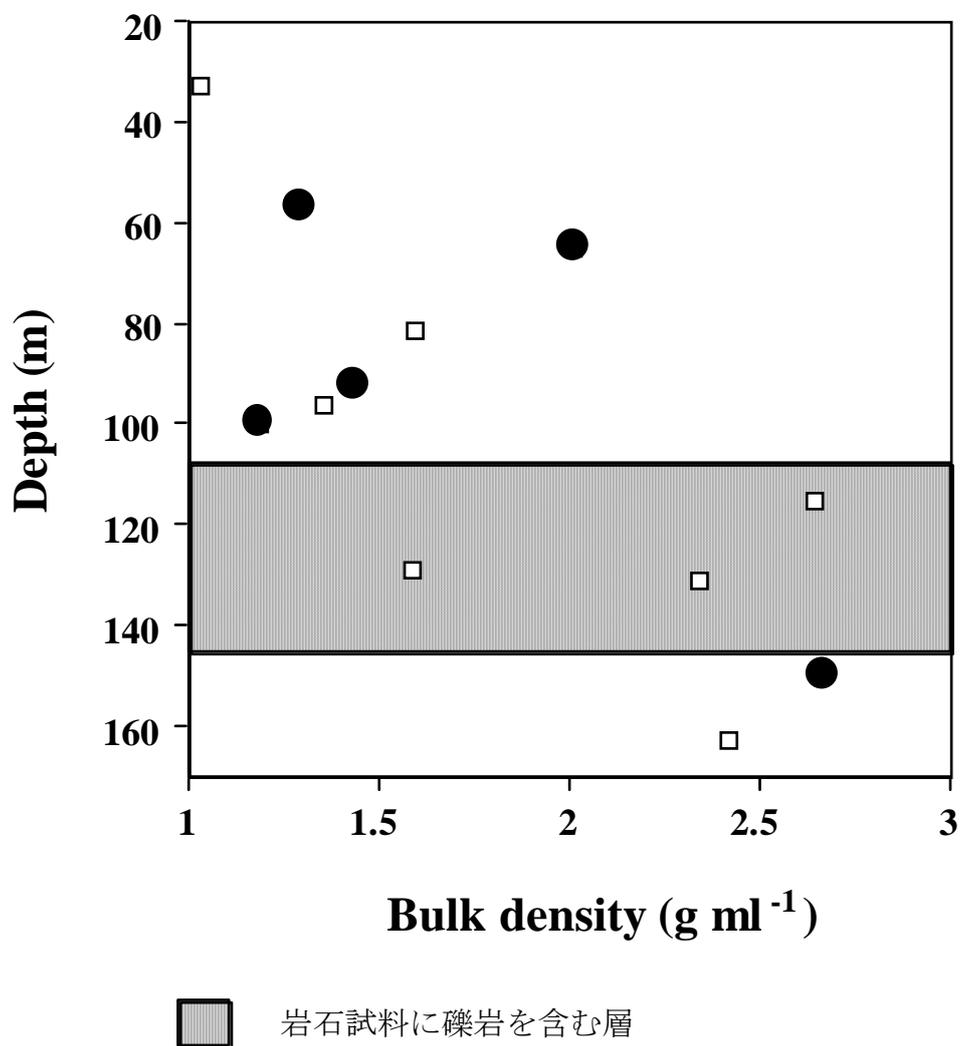
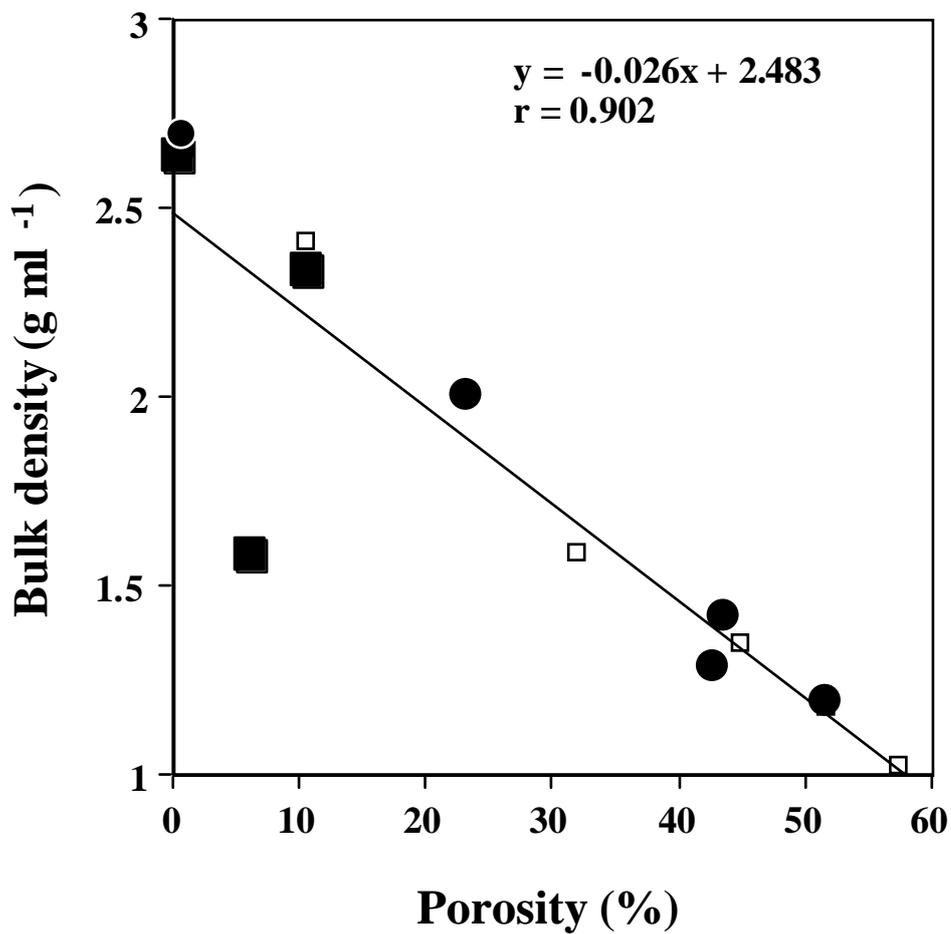


図 3-4 岩石のかさ密度測定結果

●は岩石コア中心部（20mm φ）において蛍光ビーズの混入が認められなかった深度。



00SE-03号孔における間隙率 (porosity) とかさ密度 (bulk density) の関係。●は岩石コア中心部 (20 mmφ) において蛍光ビーズの混入が認められなかったもの、■は岩石コア中に礫岩を含むものを示した。間隙率とかさ密度は、負の相関が見られた。

図 3-5 間隙率とかさ密度の相関

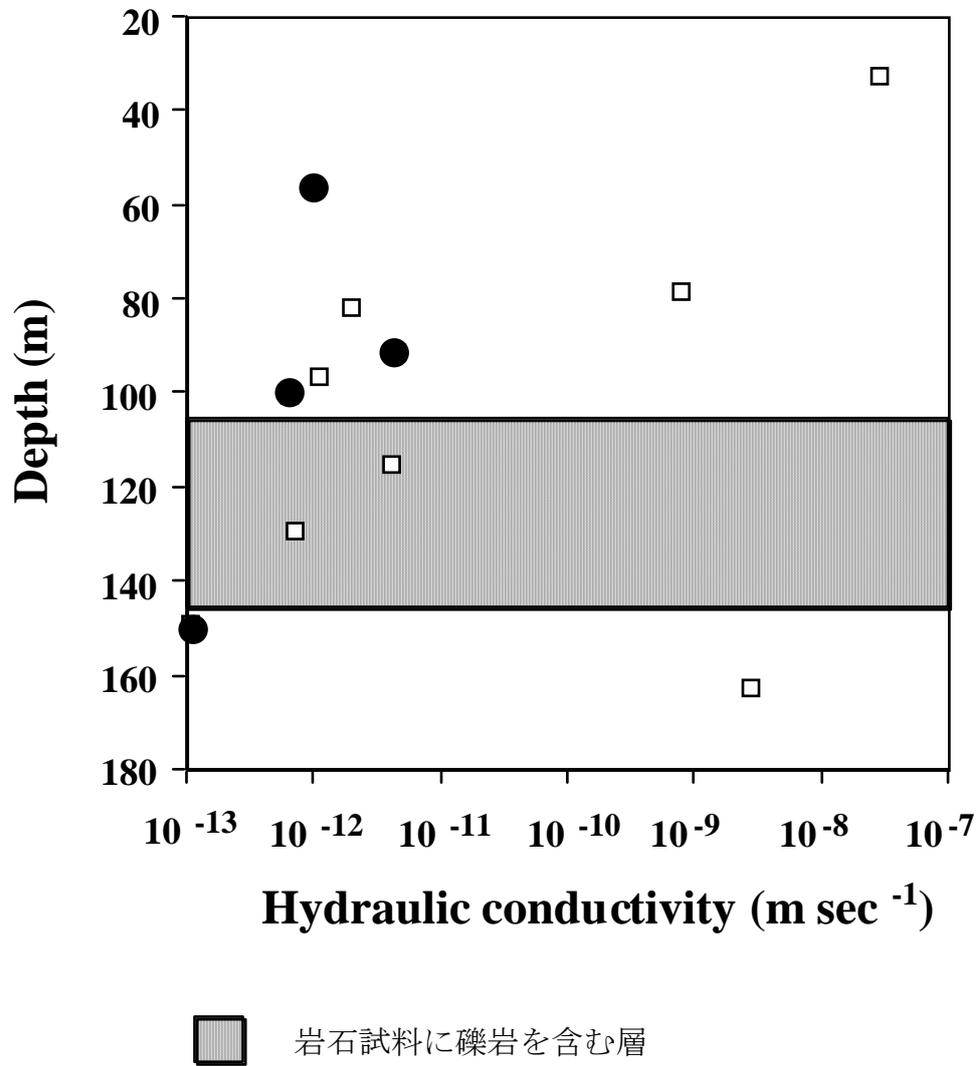
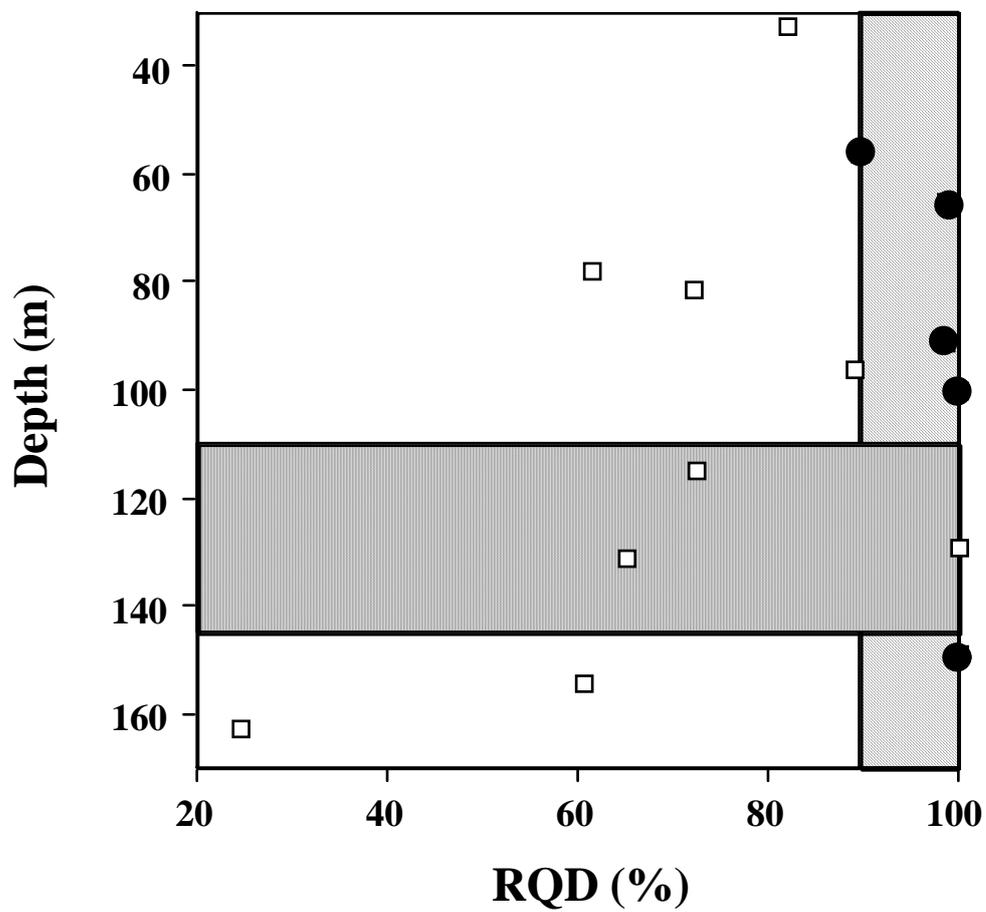


図 3-6 岩石試料の透水係数測定結果

●は岩石コア中心部（20mm φ）において蛍光ビーズの混入が認められなかった深度。

一方、コア試料の RQD 値と岩石中心部における蛍光ビーズの混入密度の関係を見ると、一定の規則性を見いだすことができる。岩相に礫岩を含まず、コア試料の RQD 値が 90%以上の場合、蛍光ビーズは岩石中心部 20 mmφ領域(約 20 - 30 mmsf) まで混入していないことが示唆された(図 3-7)。岩相に礫岩が含まれている場合、その岩石の低透水性・低間隙率とは関係なく掘削時にコア内部まで掘削清水が混入するようである。その理由として、比較的粒子の大きい礫によって膠結された岩石は、粒子の小さい砂・泥などによる膠結よりも一次開孔のサイズが大きくなると予想される。したがって、掘削水が大量に挿入された場合、礫岩部を含む岩相においては水が侵入しやすくなるものと思われる。この考察は一見、透水係数の結果と矛盾しているように思われるが、透水係数の値はあくまで室内実験値であり、これらの室内実験による透水係数値がすべての岩相を対象として有効であるかどうかという疑問は未だにぬぐい去られていないのが現状である。実際、室内実験から得られた透水係数および間隙率のデータは、原位置における測定結果と矛盾している場合が多いことが報告されている(Ota et al., 2001; Möri et al., 2001)。一方で、岩相記載の際に得られるデータの一つである割れ目本数も蛍光ビーズの混入密度に関係するものと予想されたが、実際にはサンプリングの指標になるような特性を見いだすことはできなかった。その理由として、RQD 値はコアの回収率が考慮された値であるのに対して、割れ目本数はコアの回収率とは無関係な値であるため、岩石の強度を反映しないものと思われる。ボーリングコアの回収率が低い場合、その岩石の強度は低いか、多数の割れ目が貫入しているものと予想される。したがって、コア回収率を考慮に入れた RQD 値の方が岩石強度・新鮮さの面で、より多くの情報を含んでいるためと考えられる。

微生物研究用の試料は新鮮さが重視されるため、そのサンプリングは迅速におこなわれる必要がある。RQD 値は、岩相記載としてボーリング後にまず第一に採取されるデータであるため、ボーリング後できるだけ早く微生物研究に適した試料を判断したい場合、その判断基準として大いに活用することができる。そのため、微生物研究用のサンプリングに RQD 値が有効であるという事実は、重要な知見であると考えられる。岩石の透水性および空隙などは、ボーリング直後に肉眼で得ることのできる RQD 値と異なり、その測定にある程度の時間が必要とされる。したがって、今後ますます室内実験の精度が向上したとしても、



- 岩石試料に礫岩を含む層
- RQD 値が 90%以上の領域

図 3-7 RQD と蛍光ビーズ混入量の関係

●は岩石コア中心部（20mmφ）において蛍光ビーズの混入が認められなかった深度。

微生物研究のための迅速な評価の指標としてはコアリング直後に指標として用いることのできる RQD 値の方が有効である。

ここで、現時点における岩石中の地下微生物研究の限界を述べておく必要がある。RQD を汚染評価の指標として用いることは、比較的割れ目の少ない健岩部の岩石を微生物研究の対象とすることを意味する。しかし、地下微生物は岩石の間隙および割れ目表面に生息していると考えられるため、割れ目の多い試料を対象とした研究が困難な場合、総合的な地下微生物の現存量および多様性を把握することができない可能性がある。しかし、現時点では汚染のない「高品質」な試料を対象とした研究をおこなうことが最も重要であると考えられる。したがって、割れ目を対象とした地下微生物研究に関しては、1) 掘削によって得られる岩石コアの直径を大きくするなどの掘削行程を改善する、2) 微生物研究の手法を考案する、3) 原位置に測定機器を挿入し、直接モニタリングする、などの対策案の検討が今後の課題である。

3. 3. 6 サブコアリング装置の開発

サブコアリング装置の外装を図 3-8 に示した。サブコアリング装置の外枠であるグローブボックス（型式：ANX-2(a)）は、内部に紫外線灯、アジテータに加えて掘削ドリル（ダイヤコアドリル DM120, Makita, Aichi）が備え付けられた。グローブボックス本体は、グローブチャンバー、エントリーボックス、鉄台で構成されている。グローブチャンバーは嫌気雰囲気でおこなう部分で、完全に外気と遮断され密閉構造になっている。取り付けられた操作グローブで各操作をおこなうことができる。また、内部で電気機器を使用できるよう、電源コンセントも付いている。エントリーボックスは、グローブチャンバーと外側とをつなぐように取り付けられ、自動の外扉と内扉があり、耐真空構造で内部の気体を置換できる機構を持っている。専用の鉄台は、グローブボックスを支える形で、移動用キャスターが付いている。また真空ポンプが設置されている。アジテーター、掘削ドリル、エントリー引出などが本体に組み込まれている。ドリル本体の仕様は、直巻整流子電動機、電圧：単相 100 V、電流：11 A、周波数：50-60 Hz、消費電力：1050 W、回転数：900 rpm、全高：575 mm、ベース寸法：167 x 130 mm、有効ストローク：315 mm（レギュレーター使用時 255 mm）、重量：9.0 kg である。掘削ドリルに装着されるビット



サブコアリング装置。ボーリングによって回収された岩石コアサンプルのうち、掘削水による汚染が起こっていないと考えられる内側部分のみを嫌氣的・無菌的にサブコアリングすることができる。サブサンプリングをおこなう岩石を、ドリル本体 (b) 底部に万力にて固定し、給水タンク (d) から水を導入しながら岩石コア中心部をくり抜いていく。サブコアリング (コア前処理) 作業はすべてグローブボックスの中で嫌氣的条件下でおこなうことができる。グローブボックス内は、 N_2 ガスおよび N_2 (80%) + H_2 (10%) + CO_2 (10%) の混合ガスで置換されており、内部の酸素濃度は 0% である。給水タンクの水は、ドリルによって生じる熱の冷却およびドリルビットの消耗防止のためである。給水タンク内の水は、あらかじめオートクレーブ滅菌およびフィルター濾過滅菌 (孔径 0.22 mm) をおこなっており、脱気装置を通すことで溶液内の酸素濃度を 0.5 ppm まで下げることができる。冷却用に使用した水は、グローブボックス下部から排水できるようになっている。

(a) グローブボックス本体 (グローブボックス: ANX-2 (H) Hirasawa Works, Tokyo, Japan) , (b) サブコアリング用ドリル (コアドリル: DM120, Makita, Aichi, Japan) , (c) 脱気装置 (NT-DO100, Nikkyo-Tekunosu, Ibaraki, Japan) , (d) 給水タンク

図 3-8 嫌気条件サブコアリング装置

は、ダイヤモンドコアビット（外径x深さ（mm）； ϕ 29 x 250）が用いられた。ビットおよび試料設置部分はステンレス製のため、すべてオートクレーブ滅菌可能である。ドリル作業中は掘削ドリルへの給水をおこなうことができる。導入される水はポリプロピレン製のタンク（10 リットル）内に詰められ、オートクレーブ後、0.2 μm のフィルターで濾過をおこなう。その後、窒素ガス通気（ページ）および脱気装置（NT-DO100，日京テクノス株式会社）によって滅菌水中の溶存酸素濃度を0.5 ppmまで下げ、その処理水をサブコア掘削流体として用いるシステムとなっている。グローブボックス内のガス雰囲気は、99.9% N_2 ガスおよび混合ガス（ N_2 : 80% + CO_2 : 10% + H_2 : 10%）によって嫌気条件を維持できる。

3. 3. 7 サブコアリング装置の有用性

今回の実験結果より、ほとんどのコア（直径 60 mm）において0 - 20 mmfs 領域は掘削清水中の0.2 μm サイズまでの微生物汚染が起こっている可能性が確認された。今回試験に用いられた岩石コアの直径は 60 mm であったため、回収された岩石のうち汚染されていない部分はわずかに最内部の20 mm ϕ （20 - 30 mmfs）領域であった。しかし、掘削孔径を大きくすることによって、この「未汚染領域」を拡大し、微生物研究に有用な試料量を確保することができる。少なくとも、ほとんどの岩石試料に対して「0 - 20 mmfs は汚染領域である」という知見があれば、他の研究サイトにおいても応用可能であると考えられる。この汚染テスト結果を踏まえた上で、サブコア回収装置を用いて膠結の進んだ堆積岩および新鮮な硬質結晶質岩の内側のみを回収することにより、真の意味での「無菌的・嫌氣的サンプリング」をおこなうことができるようになった。この事実は、今後の地下微生物学研究の発展に大変重要な意義をもたらすものと予想される。

4. 地下深部における微生物生態系の把握

4. 1 東濃地域の地質

岐阜県東濃地域の地質は、領家花崗岩類に属する白亜紀の土岐花崗岩を基盤とし、これらを不整合に覆う第四紀～新第三紀堆積岩類の瀬戸層群および瑞浪層群からなる（糸魚川，1980；1988）。東濃地域には我が国最大の砂岩型ウラン鉱床群が存在しており、約1千万年以上前に形成されたとされている（Ochiai et al., 1989）。ウラン鉱床は中新統を母層とし、土岐花崗岩を基盤とする地域およびその周辺部に分布している。今回採水をおこなった試錐孔のうち、TH-6号孔は東濃鉱山のやや北東に位置し、掘削深度は193 mである。DH-3号孔は東濃地科学センターの北に位置し、深度は約840 mである。

堆積岩の層厚は200 mより薄く、上部は鮮新世の瀬戸層群（70 - 500 万年前；以下 Ma）、下部は中新世の瑞浪層群（15 - 20 Ma）によって形成されている（糸魚川，1988）。瀬戸層群の上部は主に砂礫層および粘土層、下部は砂礫を含有した未固結の粘土層によって形成されている。瑞浪層群の上部（生俵累層・明世累層）は海成層、下部（土岐夾炭累層）は湖成層である。生俵累層は主に凝灰質泥岩、明世累層は主に凝灰質泥岩、シルト岩、砂岩、土岐夾炭累層上部は主に凝灰質砂岩からなり礫岩を含む。土岐夾炭累層下部は主に泥岩、砂岩、角礫岩からなり、数層の凝灰岩、亜炭を含む。土岐夾炭累層の基底部には礫岩が発達している。明世累層および生俵層からは、豊富な貝類の化石が発掘されている。ウラン鉱床は堆積岩の基底部付近の亜炭層に付随して見られる。DH-3号孔は基盤花崗岩中に掘削されている。深度約60 mまでは主に中～細粒黒雲母花崗岩が分布しており、それ以深では、深度約1000 mまで主に中粒～粗粒黒雲母花崗岩が分布している。

4. 2 研究方法

4. 2. 1 地下水サンプリングにおける手法開発

前章では“岩石”サンプリングの手法について述べた。ここでは、“地下水”サンプリングの手法について述べる。

地下水の微生物研究用サンプリングに関しては、原位置の状態（水圧および温度）を保ったままのサンプリング手法等（例えば Ruotsalainen et al., 1996; 岩月ほか, 1998）、諸外国の研究開発から数々の手法が報告されている（Rhén et al., 1997）。また、実際にそれらの技法を用いた地下水の微生物研究も報告されている（Haveman et al., 1999; 村上ほか, 1999）。

一方で、地下水採取における地下環境外からの汚染問題は、岩石のそれと比較するとかなり発展・改善されている。地下水への掘削水の混入に関しても、掘削時に蛍光染料などのトレーサーを掘削水中に混入させ、揚水時にその濃度をモニタリングすることによって、地下水における掘削水の混入度合を把握することができる。Rhén et al. (1997) の報告によると、掘削時の地下水のサンプリング方式はいくつかあるが、その中でも以下に記した 3 つの方法が比較的有効だと判断され、Äspö における深部地下研究で実際に活用されている。

SDD: Sampling during drilling of deep, cored holes, pumping for a minimum of 1 hour

SPT: Sampling during pumping tests, pumping for three days

CCC: Complete chemical characterization in separate campaigns, pumping for ten days

上記の 3 通りの手法はそれぞれ揚水時間が異なるものであるが、地下水研究の目的によって用いるべき方式が異なってくる。例えば、SDD 方式だと掘削後、試錐孔内に掘削水が混入したままの採水であるから、当然汚染の程度はひどいと考えられる。したがって、特に地球化学および微生物研究などには不向きである。しかし、例えば Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} などの主要化学成分元素に関する測定のみであれば、用いる掘削水中の各主要成分濃度をモニタリングしておくことによって、ある程度の影響は把握できると予測される。また、微量成分および ^{18}O や ^2H の安定同位体分析に関しては、陸上環境中に存在する濃度がある程度把握できているため、掘削水中のトレーサー濃度のモニタリングで対応できる。つまり、原位置の地下水に含まれる掘削水の濃度（すなわち地下水中のトレーサー濃度）が 5% 以下であれば、これらの項目に関しては分析可能である（Rhén et al., 1997）。しかし、微量元素およびトリチウム、 ^{14}C の同位体分析に関しては、掘削水および天水の汚染が 0.1% 以下の場合のみ、そのデータに信頼性があるとされ、これらの分析に関しては、CCC および SPT のサンプリング方式を用いる必要がある。また、Eh および酸化還元に影響を受けやすい元

素の分析に関しては、酸化還元電位などを電極を用いてモニタリングし、その測定値が安定し、Eh の値が地下水の値に置き換わるまで長期にわたって揚水する必要がある。この場合、サンプリング方式として、CCC のみが有効であると考えられる。

本研究で対象とした試錐孔は、掘削時に CCC 方式で揚水がおこなわれたポイントである。したがって、汚染の問題はいちばん軽減されている方法であるといえる。また、東濃地科学センターでは、試錐孔掘削後の地下水採水にあたって MP (Multiple piezometer monitoring) システム (Black et al., 1986) を設置しており、質の高い地下水サンプルを採水することができる。

4. 2. 2 東濃地域における地下水サンプリング

東濃地域の地下水サンプリングは、DH-3 号孔 (花崗岩) および TH-6 号孔 (堆積岩) でおこなった。これらの試錐孔は掘削水として泥水を用いる代わりに「清水」によって掘削されており、それゆえ地下水への泥およびそれに含まれる物質による汚染を防ぐことができる (岩月ほか, 1998)。これらの試錐孔においては掘削時に、トレーサーとしてウランが掘削水に添加され、掘削水による汚染のモニタリングが行われている。

各試錐孔における採水深度は、104, 132, 153, 177 m (以上 TH-6 号孔), および 130, 209, 330, 458, 485, 600, 645, 767, 790, 840 m (以上 DH-3 号孔) の 14 カ所であり、TH-6 号孔の深度 104, 132, 153 m は堆積岩で形成されている。TH-6 号孔の深度 104 m は明世累層に位置し、主に中粒砂岩で形成されている。深度 132 m は土岐夾炭累層上部に位置し、粗粒砂岩および礫岩で形成されている。深度 153 m は土岐夾炭累層下部に位置し、その下部から不整合面付近にはウラン鉱化帯が存在している。不整合面の下部に当たる深度 177 m 付近は土岐花崗岩で形成されている。一方、DH-3 号孔は地表面に土岐花崗岩が露出している領域に掘削されており、各採水地点はすべて土岐花崗岩である。

微生物調査用の地下水サンプルは、オートクレーブ滅菌したステンレスボトル (250 ml) および MP システムを用いて採取した (村上ほか, 1999)。採水は 1998 年から 2001 年の間に定期的におこなった。採水に用いるサンプルボトルは、嫌氣的条件下で採水をおこなうために、採水直前に真空引き・超純度窒素ガス (99.9999%) 置換処理を 3 回繰り返し、最後にサンプリングボトル内部を真空

にした状態で採水をおこなった。

4. 2. 3 地下水の地球化学分析

滅菌ボトルによって嫌氣的に採取された地下水サンプルは、窒素雰囲気保持了グローブボックス内で嫌氣的に回収した。回収した地下水サンプルの一部を用いて水質分析をおこなった。pH, Total Organic Carbon (TOC), Inorganic Carbon (IC), および電気伝導度に関しては、濾過処理をおこなわずに測定をおこない、その他の項目に関しては 0.45 μm フィルターを用いて濾過した試料を用いてそれぞれ分析をおこなった (S^{2-} については、0.22 μm フィルターで濾過)。各項目についての分析は、イオンクロマトグラフィー (DX-120, Dionex, Osaka, Japan)、全有機炭素分析計 (TOC-5000, SHIMADZU Co., Kyoto, Japan)、原子吸光分光分析 (Z-8100, Hitachi, Ibaraki, Japan)、プラズマ発光分析 (inductive coupled plasma spectrometry; SPS 1200A, Seiko I & E, Chiba, Japan) を使用した。(Iwatsuki and Yoshida, 1999)。硫黄および炭素に関する同位体のデータは、これまでの研究結果を引用した (Iwatsuki et al., 2001a; 2001b)。

4. 2. 4 微生物の現存量

1) 地下水中の全菌計数

地下水中の全菌数は蛍光顕微鏡を用いた直接計数法によって計数をおこなった。蛍光顕微鏡で観察するための細胞染色をおこなうにあたって、Acridine Orange (AO), 4',6-diamino-2-phenylindol (DAPI), および SYBR Green I (SYBR) の 3 種類の染色液を用いた。各試薬の特徴と染色手順を表 4-1 に示す。地下水中の微生物細胞染色には、一般的に AO および DAPI が用いられている。しかし、地下水にはしばしば微生物細胞以外の鉱物微粒子や浮遊物などが含まれている。これらの鉱物粒子等は紫外線照射によって自発発光してしまうため、DAPI では微生物と区別することが難しい。また、AO で染色をおこなった場合も、これらの鉱物微粒子が同様に赤く染色されてしまうため、サイズや形が同等のものに関しては微生物細胞との区別が難しく、正確なカウントが出来ないことがしばしばある。これらの問題を軽減するため、本研究では新たに SYBR Green I を用

いた染色も同様におこなった。SYBR Green I は核酸を検出するにあたってもっとも感度の高い染色液のひとつであり、一本鎖 DNA および RNA に対する親和力が弱く、鉍物微粒子に対する吸着作用も低い。また、微生物細胞のみを特異的に染色することができ、励起波長としても紫外線を用いる必要がないため、鉍物微粒子などと細胞をより正確に識別できると考えられる。それゆえ、細胞の過少もしくは過大見積を防ぐことができ、鉍物微粒子を含んだ地下水中の微生物細胞を染色するのに有効と考えられる。

MP システムによって採取した地下水を、直ちに終濃度 5% になるように中性ホルマリンで固定した。地下水サンプルは、それぞれ 0.1 - 0.5 ml の範囲内で Isopore Membrane filter (孔径 0.2 μm , Millipore) を用いて濾過し、地下水中の微生物細胞は濾紙上に捕集した。各地下水サンプルの濾過量を変化させることで、一視野中の観察細胞数が 30 - 50 細胞になるように調整した。集めた細胞はそれぞれの染色液を用いて染色した。染色条件はそれぞれ以下のおこなった: A0 (Sigma Chemical Co.): 終濃度 0.05%, 3 分、DAPI (Sigma Chemical Co.): 終濃度 0.005% ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$), 5 分、SYBR (Molecular Probes, Inc.): 終濃度 0.05%, 15 分。各染色液を滅菌蒸留水を用いて調整した。DAPI 染色をおこなった細胞は、プレパラートを作成する前に風乾させたが、A0 および SYBR を用いて染色した細胞は風乾させず、湿った状態のままプレパラートを作成した。A0 染色の場合、風乾させることによってほとんどの染色細胞は赤色に変化し、同染色液で染色した地下水中の鉍物粒子との判別が難しくなる。しかし、湿った状態のまま観察することにより、染色細胞は緑色を呈し、その結果鉍物粒子などの微生物細胞以外の粒子と細胞を見分けることが可能となる。また、SYBR 染色の場合も同様に、風乾させることによって染色細胞は黄色に変化する傾向があるが、湿った状態の場合、細胞は緑色として観察することができるため、観察がより容易になる。各地下水サンプルにつき、3 枚のプレパラートを作成し、1 プレパラートにつき約 50 - 100 視野の観察をおこなった。なお、各染色試薬条件の全菌数を調べるために用いた地下水サンプルは、2000 年 12 月に MP システムを用いて採取した。

表4-1 各試薬についての染色条件およびその特徴

染色対象物質		最終濃度	染色時間	乾燥	コメント
AO (Acridine Orange)	核酸	0.05%	3分	なし	風乾させずに、ろ過直後にプレパラートを作成する。それによって細胞が緑色として観察できるので、鉱物粒子と区別しやすい。
DAPI (4',6'-diamino-2-phenylindol)	DNA	0.005%	5分	風乾させる	サンプル中に鉱物粒子が混ざっていると、微生物細胞との区別が困難である。
SYBR Green I	核酸	0.05%	15分	軽く表面の水分がとぶ程度	フィルター表面から水分が飛ぶ程度に風乾させる。3秒ぐらい。風乾させすぎると、染色細胞は黄色に変化するが、湿った状態だと緑色を呈するので観察しやすい。
Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit	DNA	各0.0006%	15分	軽く表面の水分がとぶ程度	フィルター表面から水分が飛ぶ程度に風乾させる。3秒ぐらい。長時間乾燥させると、緑色の細胞が赤色に変化する。
CTC (5-cyano-2,3-ditolyl-tetrazolium chloride)	脱水素酵素	5.0 mM	4時間	風乾させる	特になし
FDA (Fluorescein Diacetate)	エステラーゼ	25 μM	15分	軽く表面の水分がとぶ程度	フィルター表面から水分が飛ぶ程度に風乾させる。3秒ぐらい。風乾させすぎると、フィルター全体が黄色に励起し、微生物細胞を観察しにくくなる。

2) 直接計数による地下水中の生菌数

直接計数法を用いた地下水中の生菌数に関する調査は、1) 細胞の膜健全性、2) 電子伝達系の活性（呼吸活性）、3) エステラーゼ活性、という 3 種類の方法に基づいておこなった。観察はすべて蛍光顕微鏡（Leica DMLP）を用いておこない、染色細胞は波長 450 - 490 nm で励起させた。

膜の健全性に基づく検出には、Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Inc.: L-7012) を用いた。この試薬キットは赤および緑の 2 種類の蛍光染料が含まれており、それぞれの染料は健全な膜および損傷を受けた膜に対して異なった膜透過性を示す。細胞膜が健全な菌（生菌）では、緑のみが細胞膜を透過し、赤は細胞内に入れない。細胞膜が損傷した菌（死菌）では、緑も赤も細胞膜を透過する。しかし、赤の色素の方が DNA との親和性が高いため、死菌の場合では細胞は赤く見える。一方、生菌の場合は緑の色素しか細胞内に入らないので、顕微鏡下では緑色として観察することができる (Naganuma, 1996)。地下水サンプル 1 ml に対して、2 種類の蛍光染料の混合液を 200 ml 添加し、染色をおこなった。染色には 1.5 ml のエッペンチューブを用い、15 分染色をおこなった。染色後、サンプル内の微生物細胞は Isopore Membrane filter (孔径 0.2 μm , Millipore) 上に回収され、軽く風乾させた後にプレパラートを作成した。

電子伝達系の活性（呼吸活性）に基づく検出は、5-cyano-2,3-ditolyl-tetrazolium chloride (CTC) を用いた。活性のある細胞内には、呼吸・発酵などの酸化還元反応に必要な酸化還元酵素である“脱水素酵素”が存在している。この脱水素酵素の作用によって、細胞内に浸透したテトラゾリウム塩はホルマザン色素に分解される。ホルマザン色素は蛍光の赤色沈澱を生成するため、蛍光顕微鏡を用いて容易に検出することができる。CTC は近年、呼吸活性微生物を視覚化して検出する方法として、地下水、海水、汚濁水、汽水、湖水などの環境サンプルを対象に広く導入されてきた (Rodriguez et al., 1992)。また、*Desulfovibrio desulfuricans*, *Geobacter sulfurreducens*, *Methanobacterium formicicum* などの嫌氣的に呼吸をおこなう微生物にも有効であるとの報告もある (Bhupathiraju et al., 1999)。今回採取された地下水中の微生物細胞は、Rodriguez et al. および Bhupathiraju et al. (1999) の手法に基づき、少し変更を加えて染色をおこなった。染色手順を以下に簡潔に述べる。環境サンプルは、終濃度が 5.0 mM になるように CTC を添

加し、1.5 - 15 ml の滅菌チューブを用いて3通りで培養をおこなった。培養は無酸素・窒素雰囲気のもとで、4時間、室温（約 23°C）の条件でおこなった。培養後の地下水サンプル中の微生物細胞は、Isopore Membrane filter（孔径 0.2 μm , Millipore）を用いて濾過・回収し、乾燥させた後に蛍光顕微鏡を用いて観察した。染色した微生物細胞は、青色波長で励起させた。コントロールとして、オートクレーブ処理およびホルマリン固定した地下水サンプルも同様に CTC 染色をおこなった（染色時間：Rodriguez et al., 1992; Bhupathiraju et al., 1999; Ullrich et al., 1996）。

エステラーゼ活性を持つ微生物細胞も同様に、Fluorescein diacetate (FDA) を用いて直接計数法によって検出した。FDA は疎水性の蛍光誘導物質であるが、それ自体は蛍光色を示さない。FDA は細胞の膜を通過し、細胞内に存在する様々なエステラーゼによって速やかに加水分解され、親水性の蛍光物質へと変化する (Lawrence et al., 1997)。変換された蛍光物質は親水性であるため、徐々に細胞内へと蓄積される。死細胞の場合、細胞膜は壊れている状態であるため、もし細胞内にエステラーゼが残っていたとしても蓄積されることはない。したがって、FDA はエステラーゼ活性を持ち、かつ細胞膜が健全な細胞を特異的に染めることができる (Tsuji et al., 1995)。この手法は微生物細胞内の代謝活性を検出する手法として用いられてきた (Chrzanowski et al., 1984; Breeuwer et al., 1995)。Dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解させた 5 mM の FDA stock solution をそれぞれの地下水サンプルに終濃度が 25 μM になるように添加し、15 分間染色をおこなった。培養後の地下水サンプル中の微生物細胞は、Isopore Membrane filter（孔径 0.2 μm , Millipore）を用いて濾過・回収し、軽く風乾させた後蛍光顕微鏡を用いて観察した。染色後の微生物細胞は、青色波長で励起させた。コントロールとして、オートクレーブ処理およびホルマリン固定した地下水サンプルも同様に FDA 染色をおこなった。

3) BART による出現微生物種の検出

ここでは、地下水中に存在する微生物を培養に基づいた方法で検出した。Biological Activity Reaction Tests (BART: HACH Company, USA) は、環境中に存在する微生物の数と種類の概要を迅速に見積もるのに有効な培養キットである。従属栄養性好気微生物 (Total Aerobic Bacteria: TAB-BART)、硫酸還元菌 (Sulfate-Reducing Bacteria: SRB-BART)、鉄関連細菌 (鉄酸化/還元細

菌, Iron-Related Bacteria: IRB-BART)、脱窒菌 (Denitrifying Bacteria: DN-BART)、硝化細菌 (Nitrifying Bacteria: N-BART) を対象とした培養調査を、採取した地下水を対象としておこなった。あらかじめ乾燥した栄養培地を添加してあるそれぞれのチューブに、採取した地下水サンプルを 15 ml 注ぎ入れた。サンプル注入後のチューブには、10 ml のヘッドスペースが形成されるため、計算上 2 ml もしくは 2.9 mg の分子状酸素 (O_2) が混入する可能性がある。したがって、TAB-BART 以外の培養 (SRB-BART, IRB-BART, DN-BART, N-BART) はヘッドスペースをなくすために地下水サンプルを 25 ml 注ぎ、できるだけ嫌気的な環境下においた。

それぞれの BART に含まれている培地成分を以下に示す (参照 ; material safety data sheets, HACH company)。

TAB-BART: 59.175 mg (per tube) of glycerol, 59.175 mg of peptone, 59.175 mg of tryptone, 29.925 mg of $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$, 8.775 mg of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, and 8.775 mg of K_2HPO_4 ; pH 7.0 (15 ml の蒸留水に溶解させた場合)。

SRB-BART: Na-lactate, $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NH_4Cl , $CaSO_4 \cdot 2H_2O$, yeast extract, K_2HPO_4 , and $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; pH 7.0.

IRB-BART: Ferric ammonium citrate, $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NH_4NO_3 , $NaNO_3$, K_2HPO_4 , $CaCl_2$; pH 6.8.

DN-BART: $NaCl$, KNO_3 , and tryptone; pH 7.2.

N-BART: $(NH_4)_2SO_4$, K_2HPO_4 , $NaCl$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$; pH 6.8.

等量の地下水サンプルは、それぞれ用意されたチューブに分注され、室温・遮光条件の下で 2 週間培養をおこなった。それぞれの BART チューブにはプラスチック製の浮球が入っており、酸素の拡散を出来るだけ防ぐ役割を果たしている。培養液の視覚的な色の変化、濁度、沈澱、気泡の発生およびバイオフィルムの形成状態を毎日観察した。その結果をもとに、チューブに付属のチャート表を指標として地下水サンプル内の微生物群集とその活性の推定をおこなった。各サンプルにつき、3 本のチューブを用いて培養し、結果は各培養サンプルの平均値を用いた。

4) 好気的および嫌気的条件下での MPN (Most Probable Number) 計数

培養法に基づいた生菌計数を、MPN 法によっても同様に試みた。従属栄養性嫌気および好気微生物、硫酸還元微生物、硫黄酸化微生物、硝酸還元微生物お

よび脱窒菌の培養は、後述の培地を用いておこなった。

MPN 法による生菌計数値は、それぞれ 10 倍ごとに希釈した地下水サンプルを用いて見積もった。

Aerobic and anaerobic heterotrophs (LB 培地にグルコースを添加してやや手を加えた). 5.0 g peptone, 0.25 g yeast extract, 0.1 g glucose; pH 7.0。

Aerobic and anaerobic (autotrophic) sulfur-oxidizers I (Tuttle and Jannasch, 1972; Naganuma et al., 1989). 10.0 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0.5 g NH_4Cl , 0.25g K_2HPO_4 , 0.25g KH_2PO_4 , 0.25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; pH 7.0。

Aerobic and anaerobic (autotrophic) sulfur-oxidizers II (*Thiobacillus* 培地にやや手を加えた; Atlas, 1997). 10.0 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 5.0 g KNO_3 , 1.8 g KH_2PO_4 , 1.2g Na_2HPO_4 , 0.5 g NaHCO_3 , 0.1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.03 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; pH 7。74 μM の Fe(III)が含まれているため、チオ硫酸の嫌気的な酸化反応が進むと考えられる。

(Anaerobic) sulfate-reducers (Postgate E 培地にやや手を加えた; Atlas, 1997). 3.5 g Na-lactate, 2.0 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0 g yeast extract, 1.0 g NH_4Cl , 1.0 g Na_2SO_4 , 0.5 g KH_2PO_4 , 0.2 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g Na-ascorbate, 0.1 ml 0.1% Na-resazurin solution; pH 7.3。硫酸還元菌の増殖によって発生した硫化水素が、培地中の鉄と反応して FeS の黒色沈澱を生じる。この黒色沈澱の有無によって硫酸還元菌の増殖を判定。

(Anaerobic) nitrate reducers and denitrifiers (nitrate broth にやや手を加えた; Atlas, 1997). 5.0 g KNO_3 , 5.0 g peptone, 1.7 g agar, 0.05 g KH_2PO_4 , 0.05 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 ml 1% bromothymol blue solution; pH 7。硝酸還元反応は、培地の色が青色に変化するかどうか (pH がアルカリにシフトするかどうか) で判断した。脱窒反応は、培地の青色変化および培養培地内に発生した気泡の有無によって判断した。

室温、遮光条件下で 30 日間培養した後、地下水サンプルにおけるそれぞれの微生物数は MPN 計数表 (微生物研究法懇談会編, 1975) に基づいて見積もった。

4. 2. 5 分子系統学的手法に基づいた微生物の多様性解析

1) DNA の抽出および精製

採取した地下水約 1 リットル中の微生物細胞は、滅菌済み Sterivex filter (0.22 mm, Millipore corp., Bedford, Mass.) を用いて捕集した。捕集した微生物細胞は、あらかじめ滅菌した SET Buffer (0.75 M sucrose, 40 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl [pH 8.3]) を用いて洗浄し、ベル型シリンジ内に SET Buffer 1.8 ml を注入した。微生物を捕集したシリンジフィルターは、DNA 抽出処理をおこなうまで -20°C にて冷凍保存した。

DNA の抽出は Somerville et al. (1989) および Bano and Hollibaugh (2000) の方法に基づいておこなった。地下水中の微生物細胞を捕集した Sterivex filter 中に、 50 ml l^{-1} lysozyme $40\ \mu\text{l}$ を注入し、 37°C で 60 分間培養した。その後 20 mg l^{-1} proteinase K $50\ \mu\text{l}$ 、20% SDS (sodium dodecyl sulfate) $100\ \mu\text{l}$ をそれぞれ注入した後、 55°C で 3 時間インキュベートした。インキュベーション後、シリンジ内の溶液を他の滅菌容器に回収し、シリンジ内の核酸残物をさらに 1 ml の SET Buffer を用いて洗浄した。洗浄後の溶液も同容器にすべて回収した。

回収した細胞抽出液は、等量のフェノール : クロロフォルム : イソアミルアルコール (25 : 24 : 1)、クロロフォルム : イソアミルアルコール (24 : 1)、*n*-ブタノールの順に用いて処理し、溶液中の核酸を精製した。精製後の核酸の精度は、PCR 反応に十分であった。

2) 異化型亜硫酸還元酵素 (DSR) 遺伝子を対象とした酵素的遺伝子増幅 (PCR)

DSR 遺伝子を対象とした配列 (1.4 kilo-base pairs にて増幅) は、抽出・精製した DNA から PCR 反応を用いて増幅した。DSR α -および β -サブユニット遺伝子部分を増幅させるためのプライマーは、以下のような配列を持つデオキシオリゴヌクレオチドを用いた (Karkhoff-Schweizer et al., 1995)。

P94-F (forward primer, middle of α -subunit gene, 26-mer)

5' -ATCGG (A/T) ACCTGGAAGGA (C/T) GACATCAA-3'

P93-R (reverse primer, middle of β -subunit gene, 26-mer)

5' -GGGCACAT (G/C) GTGTAGCAGTTACCGCA-3'

PCR 反応液は以下の組成でおこなった (各数字は終濃度を示す) : 全反応溶液

40 μ l 中に、200 mM deoxynucleoside triphosphates (dNTPs; dATP, dGTP, dCTP, および dTTP の混合溶液), 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM forward- および reverse-primer, 2 units Taq DNA polymerase (TaKaRa)。PCR は TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL を用いた。増幅に用いたプログラムは、熱変性; 96°C, 1 min., アニール; 52°C, 1 min., 伸長; 72°C, 2 min. をそれぞれ 30 サイクルおこなった。最後の伸長反応後、次段階のクローニングに備えて 3'-A 配列を余分に伸長させるため、72°C にて 10 分間の伸長反応をおこなった。PCR の増幅産物は、1 x TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1mM EDTA) の泳動層で 1.0%アガロースゲル (Sigma) を用いて、電気泳動によって確認した。

3) PCR 産物のクローニング

電気泳動後の 1.4 kb および 1.3 kb の PCR 増幅産物は、アガロースゲルから切り出され、液体窒素を用いた冷凍および解凍を繰り返した後、その上清をスピнкаラムによって洗浄・精製をおこなった。その後、マニュアルに従って、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, San Diego) を用いて精製産物を pCR II vector の中に組み込んだ。pCR II プラスミドによって、キット中に付属している *Escherichia coli* TOP 10 cells (Invitrogen) を用いて形質転換をおこさせた。形質転換を起こしたかどうかの確認は、blue/white plate selection 法によっておこなった。合計 41 (各深度につき 6 - 14) のクローン (形質転換を起こしたものを) を回収し、組み込まれた pCR II プラスミドは、それぞれのクローンから抽出した。

4) DNA シーケンス

インサートした 1400 base pairs (bp) もしくは 1300 bp の配列のうち、5' 末端から 400 bp の配列を Dye erminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit および 373A DNA Auto Sequencer (Applied Biosystems, Inc.) を用いて決定した。T7 forward primer (5'-TAATACGACTCACTATAGGAG-3') をシーケンス用 primer として用いた。PCR 反応の条件はマニュアルに従った。

5) 分子系統学的解析

それぞれの DSR units から得られた DNA 配列結果は、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) <<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>> の DNA データベースを参照にし、FASTA

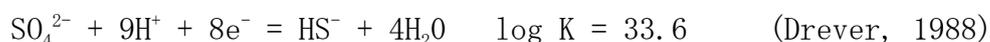
(Lipman and Person, 1985)および BLAST (Altschul et al., 1990)プログラムを用いてホモロジー検索をおこなった。系統樹は DSR 配列に基づいて、アプリケーション Tree View 68K を用いて作成した。

4. 3 結果と考察

4. 3. 1 堆積岩における地下水の地球化学的特性

地下深部における地下水の水質や物理化学パラメーターなどの地球化学特性は、地下水の起源および地下での土壌や岩石との相互反応などによって形成される (Drever, 1988)。MP システムを用いて採取された地下水の地球化学的深度プロファイルは、深度毎に差異が見られ、それぞれの深度で地質学的特性によって特徴づけられていた。また、深度が増すにつれて硫酸イオンなどが増加する傾向が見られた (表 4-2)。

TH-6 号孔の地下水はややアルカリ性を示しており (pH 7.56~9.63)、高濃度の硫酸イオンを含んでいた。この試錐孔における酸化還元電位を硫酸イオンおよび硫化物イオン濃度の比、pH から次式をもとに計算した。



その結果、TH-6 号孔における酸化還元電位は計算値で-391~-328mV を示しており、堆積岩最深部である 153 m で最低値を示していた。つまり、堆積岩では深度が深くなるにつれて酸化還元電位は低下する傾向にあるが、不整合面を経て花崗岩に到達すると酸化還元電位はやや高くなる。不整合面および花崗岩に発達する割れ目により、堆積岩の強還元帯と比較するとやや酸化性の地下水が流入するためと考えられる。

4. 3. 2 花崗岩における地下水の地球化学特性

基盤である土岐花崗岩では、割れ目や破碎帯が地下水の主な流動経路となっており、地下水の化学的性質に割れ目や破碎帯中の鉱物が大きく影響しているものと想定される。DH-3 号孔の花崗岩中の地下水は、酸素・水素の安定同位体比から天水起源であることが分かっている (JNC, 2000)。また、地下水中のトリチウム濃度は、深度 800 m 付近においても比較的高い値 (2.7 - 3.0 TU; 1 TU

= 10^{-18} T/H) で検出されている (Iwatsuki et al., 2001a)。花崗岩では深度 300 m 付近まで、割れ目表面において酸化性の鉱物が観察されている。また、天然の雨水中のトリチウム濃度は 10 TU 前後であることから、試錐孔掘削時の掘削水が完全に除去されていないか、表層水が短期間のうちに割れ目を通じて深度 800 m 付近まで浸透している可能性が示唆される。これらの可能性については、長期的な採水作業によりトリチウム濃度の変化を確認しておく必要がある。

4. 3. 3 地下水中の全菌計数

地下水中の全菌数は、それぞれ Acridine orange, DAPI および SYBR Green I で染色し、染色細胞を蛍光顕微鏡を用いて計数した。堆積岩を含む試錐孔, TH-6, における地下水中の全菌数は 3.9×10^5 (深度 132 m) - 8.4×10^6 (深度 104 m) cells ml⁻¹ の範囲で計数された。一方、花崗岩に掘削した試錐孔, DH-3, における地下水中の全菌数は 1.1×10^5 (深度 840 m) - 2.9×10^6 (深度 767 m) cells ml⁻¹ の範囲で計数された (表 4-3)。この数字は一般に知られている海洋細菌の現存量 $10^5 - 10^6$ cells ml⁻¹ (Cole et al., 1988)、地下生物圏のバイオマス見積りに用いられた値 1.54×10^5 cells ml⁻¹ (Whitman et al., 1998)、および各岩相における地下水中の値 $10^5 - 10^6$ cells ml⁻¹ (フェノスカンディア地域の火成岩; Pedersen, 2001)、 $4.5 \times 10^4 - 5.8 \times 10^5$ cells ml⁻¹ (ウラン鉱床; Pedersen et al., 1996)、とほぼ同等の現存量を示していた。

表 4-2 堆積岩および基盤花崗岩中の地下水組成 (東濃鉾山周辺)

Borehole	Formation	Depth (G.L.-m) (sea level m)	Altitude	Methods	pH	Eh (±10mV)	NO ₂ (μM)	NO ₃ (μM)	Mn (μM)	Total Fe (μM)	Fe ²⁺ (μM)	SO ₄ ²⁻ (mM)	HS ⁻ (mM)	Total organic carbon (mM)	Cl (mM)	δ ³⁴ S- _{SO₄²⁻ (‰)}	relative ¹⁴ C age (yrs. B. P.)
River water (n=27)		0			6.3	n.m.	n.m.	9.7	n.m.	3.57	n.m.	0.03	n.m.	0.11	0.04	3.2	
TH-1	Akeyo F.	34	253	MP system	7.6	n.m.	<0.43	<0.32	3.09	1.25	<0.36	0.04	<0.003	n.m.	0.03	n.m.	
TH-1	Toki lignite-bearing F. (upper)	71	216	MP system	8.0	n.m.	<0.43	<0.32	<0.18	1.61	<0.36	0.11	<0.003	n.m.	0.09	n.m.	
TH-1	Toki lignite-bearing F. (lower)	138	148	MP system	9.5	n.m.	<0.43	<0.32	<0.18	<0.36	<0.36	0.13	0.028	n.m.	0.05	n.m.	
TH-2	Akeyo F.	33	257	MP system	7.2	n.m.	<0.43	<0.32	4.55	10.36	<0.36	0.05	<0.003	n.m.	0.02	n.m.	
TH-2	Toki lignite-bearing F. (upper)	75	215	MP system	8.2	n.m.	<0.43	<0.32	<0.18	<0.36	<0.36	0.01	0.006	n.m.	0.03	n.m.	
TH-2	Toki lignite-bearing F. (lower)	110	180	MP system	8.6	n.m.	<0.43	<0.32	<0.18	<0.36	<0.36	0.10	<0.003	n.m.	0.06	n.m.	
TH-3	Akeyo F.	47	251	MP system	7.5	n.m.	<0.43	<0.32	3.45	0.71	<0.36	0.06	<0.003	n.m.	0.05	n.m.	
TH-3	Toki lignite-bearing F. (upper)	86	212	MP system	8.4	n.m.	<0.43	<0.32	<0.18	<0.36	<0.36	0.01	0.912	n.m.	0.04	n.m.	
TH-3	Toki lignite-bearing F. (lower)	124	174	MP system	8.8	n.m.	<0.43	<0.32	<0.18	<0.36	<0.36	0.18	0.779	n.m.	0.11	n.m.	
TH-4	Akeyo F.	61	249	MP system	7.6	n.m.	<0.43	<0.32	0.55	<0.36	<0.36	0.06	0.779	n.m.	0.08	n.m.	
TH-4	Toki lignite-bearing F. (upper)	83	227	MP system	7.6	n.m.	<0.43	1.45	<0.18	<0.36	<0.36	0.05	<0.003	n.m.	0.11	n.m.	
TH-4	Toki lignite-bearing F. (lower)	153	158	MP system	9.0	n.m.	<0.43	<0.32	<0.18	<0.36	<0.36	0.31	<0.003	n.m.	0.12	n.m.	
TH-6	Oidawara F.	68	245	MP system	7.8	n.m.	2.39	3.71	<0.18	1.61	<0.36	0.12	0.01	n.m.	0.08	n.m.	4000
TH-6	Akeyo F.	104	209	MP system	8.8	n.m.	<0.43	<0.32	<0.18	1.07	0.54	0.36	0.50	0.01	0.11	3.1	6800
TH-6	Toki lignite-bearing F. (upper)	132	181	MP system	8.7	n.m.	<0.43	<0.32	<0.18	0.71	<0.36	0.29	1.13	0.03	0.24	11.4	11900
TH-6	Toki lignite-bearing F. (lower)	153	160	MP system	9.0	n.m.	<0.43	<0.32	<0.18	<0.36	<0.36	0.24	0.46	0.11	0.12	6.0	13100
TH-6	Toki granite	178	136	MP system	7.8	n.m.	0.87	<0.32	1.81	<0.36	<0.36	0.76	0.16	0.05	0.34	0.8	
TH-8	Akeyo F.	64	212	MP system	8.1	n.m.	<0.43	<0.32	0.18	<0.36	<0.36	0.01	<0.003	n.m.	0.04	n.m.	
TH-8	Oidawara F.	29	246	MP system	7.7	n.m.	<0.43	<0.32	<0.18	<0.36	<0.36	0.00	<0.003	n.m.	0.03	n.m.	
TH-8	Toki lignite-bearing F. (upper)	91	185	MP system	7.6	n.m.	<0.43	<0.32	<0.18	<0.36	<0.36	0.05	<0.003	n.m.	0.05	n.m.	
TH-8	Toki lignite-bearing F. (lower)	121	155	MP system	7.9	n.m.	<0.43	<0.32	<0.18	<0.36	<0.36	0.04	0.005	n.m.	0.03	n.m.	
TH-8	Toki granite	160	116	MP system	7.9	n.m.	n.m.	0.81	n.m.	n.m.	n.m.	0.04	<0.003	n.m.	0.04	n.m.	
KN-A-6	Toki lignite-bearing F. (lower)	160	125	HMS	9.6	-360	<0.43	<0.32	<0.18	0.08	<0.36	0.01	0.003	n.m.	0.02	n.m.	
KN-A-6	Toki granite	180	105	HMS	8.3	0	<0.43	<0.32	0.18	0.13	<0.36	0.002	<0.003	n.m.	0.02	n.m.	

n.m.: not measured

HMS: Hydrochemical monitoring system

4. 3. 4 微生物現存量の深度プロファイル

全菌数は深度が深くなっても減少もしくは増加傾向は見られず、全菌数と深度の間には、明らかな相関は認められなかった(図 4-1)。また、全菌数および温度・圧力の間にも、相関は見られなかった。特に、DH-3 号孔においては最も浅い採水地点と最も深い地点の間で、深度差が 710 m あるにもかかわらず、深度による変動を観察することはできなかった。TH-6 号孔の深度 177 m の岩相は花崗岩であるが、この深度の全菌数は、DH-3 号孔(花崗岩)における地下水中の全菌数と比べて、およそ 1 オーダーほど高い値が観察された。この値は DH-3 号孔の深度 767 m における地下水中の全菌数とほぼ同数であるが、2 つの深度での圧力・温度条件などは著しく異なっている。Pedersen (2001)は、地下水中の全菌数と TOC (total organic carbon)以外の他の物理化学パラメーターとは相関は見られないと論じているが、ここでも同様に全菌数はどのパラメーターとも相関が見られなかった。Pedersen らの研究結果では、TOC は全菌数と相関を示す唯一の地球化学的パラメーターであったが、東濃地域の地下環境中における全菌数には、TOC とも相関が観察されなかった(図 4-2)。

DH-3 号孔(花崗岩)における全菌数の深度プロファイルとして、特に注目すべき現象は、深度 767 m および 790 m 付近における微生物の全菌数が、他の深度と比較して約 1 オーダーも高い値を示したことである。ここでの全菌数は TH-6 号孔(堆積岩)で得られた値とほぼ同等の値を示した。DH-3 号孔の地質構造的特徴を見ると、深度 600 m および 790 m 付近に強度の破砕帯が存在しており、全菌数に関して一番高い値が得られた深度 767 m においても、深度 790 m 付近と比べて小規模ではあるが、破砕帯が観察されている(図 4-3)。このため、破砕帯を経路として地表水とともに地表微生物が地下深部まで混入している、あるいは掘削水が破砕帯内部に浸透し残留している可能性が考えられ、この付近にて微生物の全菌数が高くなっているのは、これらの破砕帯が大きな要因になっていると考えられる。DH-3 号孔においてもっとも大規模な破砕帯が観察された深度 500 m 付近のサンプリング深度 485 m においても、全菌数がやや増加している傾向が見られる。

表4-3地下水における微生物群集の全菌数 (x 10⁶ cells ml⁻¹)

試錐孔	岩相	深度 (m)	蛍光染色液 ^b			平均値 (±SD)
			AO (±SD)	DAPI (±SD)	SYBR (±SD)	
TH-6	堆積岩	104	8.39 (±2.41)	2.71 (±0.45)	6.12 (±2.02)	5.74 (±2.94)
TH-6	堆積岩	132	0.77 (±0.11)	0.62 (±0.24)	0.39 (±0.07)	0.59 (±0.22)
TH-6	堆積岩	153	5.20 (±2.48)	0.21 (±0.19)	4.49 (±0.54)	3.91 (±1.91)
TH-6	花崗岩	177	3.01 (±1.24)	0.97 (±0.19)	2.71 (±0.29)	2.23 (±1.15)
DH-3	花崗岩	130	0.14 (±0.02)	0.31 (±0.06)	0.15 (±0.02)	0.20 (±0.09)
DH-3	花崗岩	209	0.26 (±0.05)	0.50 (±0.09)	0.63 (±0.11)	0.46 (±0.18)
DH-3	花崗岩	330	0.55 (±0.05)	0.90 (±0.14)	0.41 (±0.08)	0.62 (±0.23)
DH-3	花崗岩	458	0.16 (±0.03)	0.43 (±0.03)	0.24 (±0.03)	0.28 (±0.12)
DH-3	花崗岩	485	0.71 (±0.13)	0.97 (±0.16)	0.34 (±0.04)	0.68 (±0.29)
DH-3	花崗岩	600	0.24 (±0.02)	0.45 (±0.03)	0.20 (±0.02)	0.29 (±0.12)
DH-3	花崗岩	645	0.14 (±0.02)	0.39 (±0.01)	0.19 (±0.02)	0.24 (±0.11)
DH-3	花崗岩	767	2.92 (±0.11)	1.99 (±0.34)	2.13 (±0.12)	2.35 (±0.48)
DH-3	花崗岩	790	0.78 (±0.06)	0.84 (±0.17)	0.94 (±0.13)	0.86 (±0.13)
DH-3	花崗岩	840	0.16 (±0.02)	0.21 (±0.02)	0.11 (±0.01)	0.16 (±0.05)

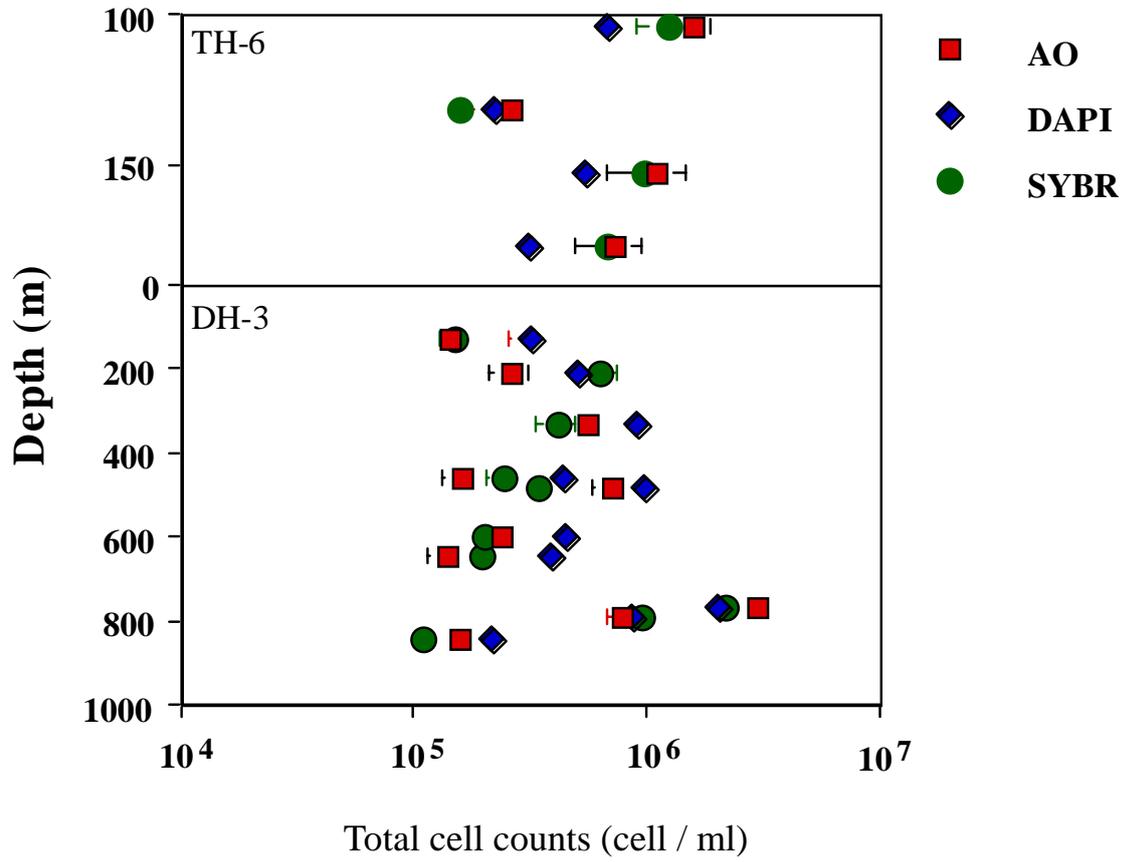
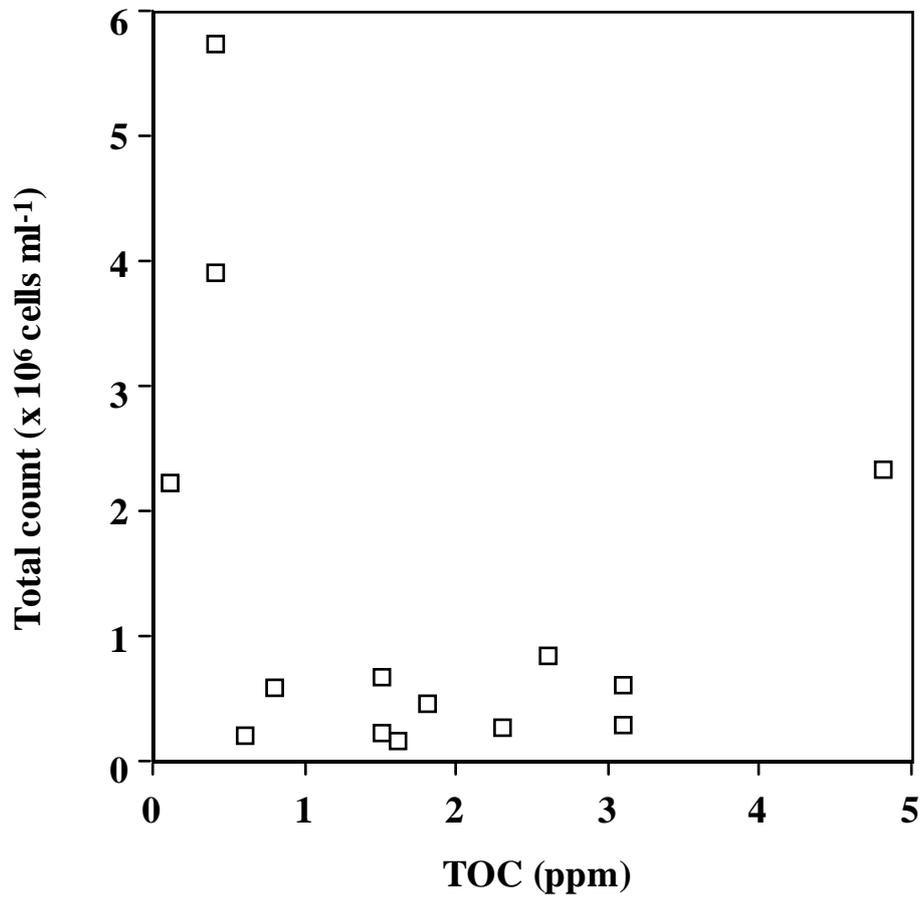
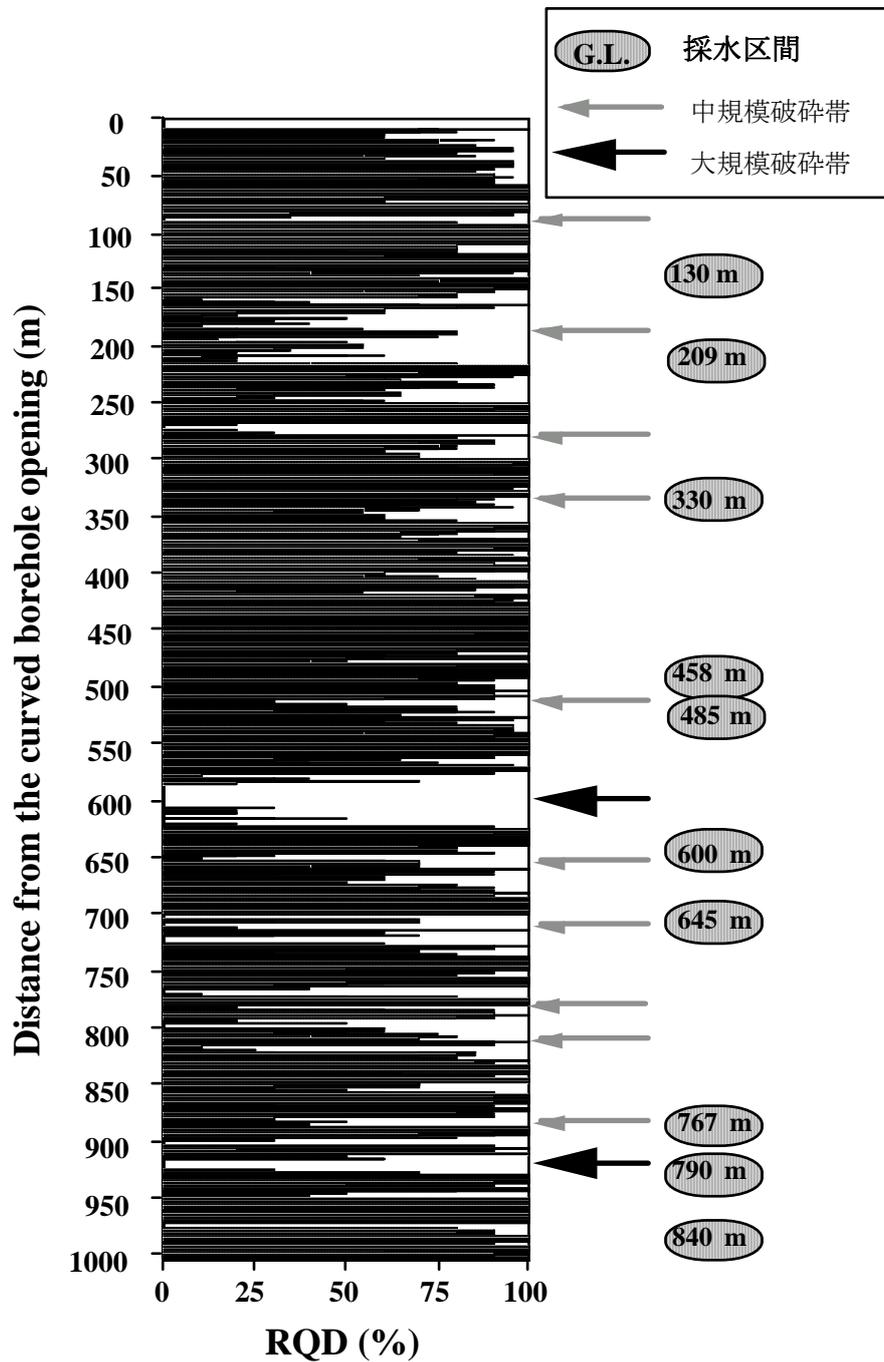


図 4-1 全菌数の深度分布



地下水中のTOC (Total Organic Carbon)濃度と全菌数 (total count) の関係。全菌数とTOCの間に明瞭な相関関係は認められなかった。

図 4-2 全菌数と TOC 濃度の相関



DH-3号孔におけるRQDの掘削深度プロファイル。Y軸は孔口からの掘削長を示したものである。掘削深度100 m付近および920 m付近に強度の破砕帯が確認された。

図 4-3 DH-3 号孔における RQD プロファイル

一般的には深度が深くなればなるほど、微生物数も減少傾向にあると予想されがちである。なぜなら地下深部になればなるほど温度・圧力などの物理化学条件が変化し、微生物にとって過酷な生息条件になると考えられるからである。地下微生物の現存量が深度依存性を示すと予想される理由として、温度・圧力条件が挙げられる。既存の生物の生育上限温度は約 113°C であり (Blöchl et al., 1997)、今後さらに高い温度で生育する微生物が発見されたとしても、その生育上限温度は 120 - 150°C であろうと考えられている。地下では深度が増すにつれて温度上昇がおこる。その上昇率は、一般的に、約 25 - 30°C km⁻¹ 前後 (海底下の浅い部分では 15°C km⁻¹) とされている。したがって、地下微生物の生息可能深度は、大陸地下では約 4 - 5 km、海底下では約 8 km であると予想され、深度が深くなるにつれて生育できる微生物は制限されると考えられる。また、圧力については、水圧上昇率は 100 気圧 km⁻¹、岩盤圧力上昇率は 250 (浅い岩盤) - 300 (マントル付近) 気圧 km⁻¹ である。既知の生物の生育上限圧力は少なくとも 2000 気圧なので、地下 8 km まで生育可能と予想される。しかし、温度条件と同様に、深度が深くなればなるほど深部地下において生育できる微生物はかなり制限されると考えられる。

しかしながら、少なくとも深度 1000 m までの花崗岩環境においては、微生物の全菌数は深度依存ではなく割れ目の数、すなわち地下水の移動経路の有無にも大きく左右されていることが示唆された。割れ目帯による地下水流動の攪乱がおこらない安定した地質構造においては、地下微生物の現存量は深度依存性を示す可能性はある。

4. 3. 5 細胞形態

蛍光顕微鏡下で観察された微生物の細胞形態は、ほとんどのサンプルにおいて短桿菌もしくは球菌が大半を占めていた。大きさは概ね、それぞれ直径 0.5 x 1 μm もしくは 0.5 μm であった (図 4-4)。地下水サンプル中の微生物細胞形態は、各深度によって特徴的であった。一部の深度においては、付属器付型およびフィラメント型のような形の異なる細菌が観察された。これは、各深度の地下水において種の異なる微生物群集が形成されている可能性を示唆している。付属器付細菌 (appendaged bacteria) の形態を持つ微生物細胞が、一部の深度 (TH-6-153, 177 m, DH-3-645 m) で観察された (図 4-5)。一般的に、付属



DH-3 号孔の深度 840 m における地下水中に存在する微生物。走査型電子顕微鏡によって観察をおこなった。一細胞あたりのサイズは、約 $0.5 \times 2.0 \mu\text{m}$ 。

図 4-4 花崗岩中の地下水から採取された微生物 (SEM 写真)



地下水サンプルから観察された、付属器付細菌の形態をもつ細胞。観察は蛍光顕微鏡によっておこなった。深度 645 m (DH-3 号孔) の地下水サンプル中の微生物。微生物細胞は、FDA によって染色した。

図 4-5 花崗岩中の地下水から採取された微生物 (染色写真)

器付細菌は出芽細菌 (budding bacteria) および有柄細菌 (stalked bacteria) など異なる付属器によって分類され、付属器のタイプによって細菌群も異なっていることが多々見受けられる。出芽細菌の中には *Rhodomicrobium* および *Hyphomicrobium*、有柄細菌では *Caulobacter* および *Gallionella* などが知られている。*Hyphomicrobium* や *Caulobacter* のような細菌は、しばしば貧栄養環境にて検出されることが多い (Poindexter, 1981)。これらの有柄細菌が存在するという事実は、その地下水環境中において微生物が利用できる溶存有機物が量的もしくは質的に不足している可能性を示唆している。ちなみに、スウェーデンに位置する Äspö Hard Rock Laboratory 内の花崗岩地下水中からも、これらの有柄細菌および出芽細菌の存在が確認されている (Hallbeck, 1993; Ferris et al., 1999; Haveman et al., 1999)。東濃地域の堆積岩 (瑞浪層群) はリグナイト (褐炭もしくは亜炭) を含んでおり、このリグナイトは TH-6 号孔では 153 m に比較的豊富に含まれている。TH-6-153 m の地下水中の TOC 濃度は 0.4 ppm であるが、おそらくその一部分はリグナイト由来の難溶解性腐植酸として存在している可能性がある。また、生物にとって利用されやすい形の有機物の大部分は、すでに分解されている可能性もある。また、*Hyphomicrobium* は嫌気的環境においてメタノール、メチルアミン、ホルムアルデヒドおよびギ酸などを単一炭素源とした脱窒をおこなう細菌群、*Rhodomicrobium* は紅色非硫黄細菌として知られており、この深度において脱窒菌および硫黄細菌が多く分布している可能性がある。

フィラメント状の細長い細胞 (長さ: 約 5 μm) は、深度 TH-6-153 m, DH-3-209, 600 m における地下水試料中で多数観察された。このような形態を持つ微生物としては、硫黄酸化をおこなう *Chloroflexus*, *Chloronema*, および *Oscillochloris* 属などの細菌が知られており、これらのサンプル中における硫黄酸化細菌の存在を示唆している。

4. 3. 6 地下水における直接計数による生菌数の見積り

1) 膜透過性に基づいた生菌数

Live/dead Bacterial BacLight (L/D) による生菌数は、堆積岩の試錐孔で 4.2×10^5 (深度 132 m) $\sim 1.8 \times 10^6$ (深度 177 m) cells ml⁻¹、花崗岩を岩相とした試錐孔では 6.7×10^4 (深度 840 m) $\sim 1.8 \times 10^6$ (深度 767 m) cells ml⁻¹ の範

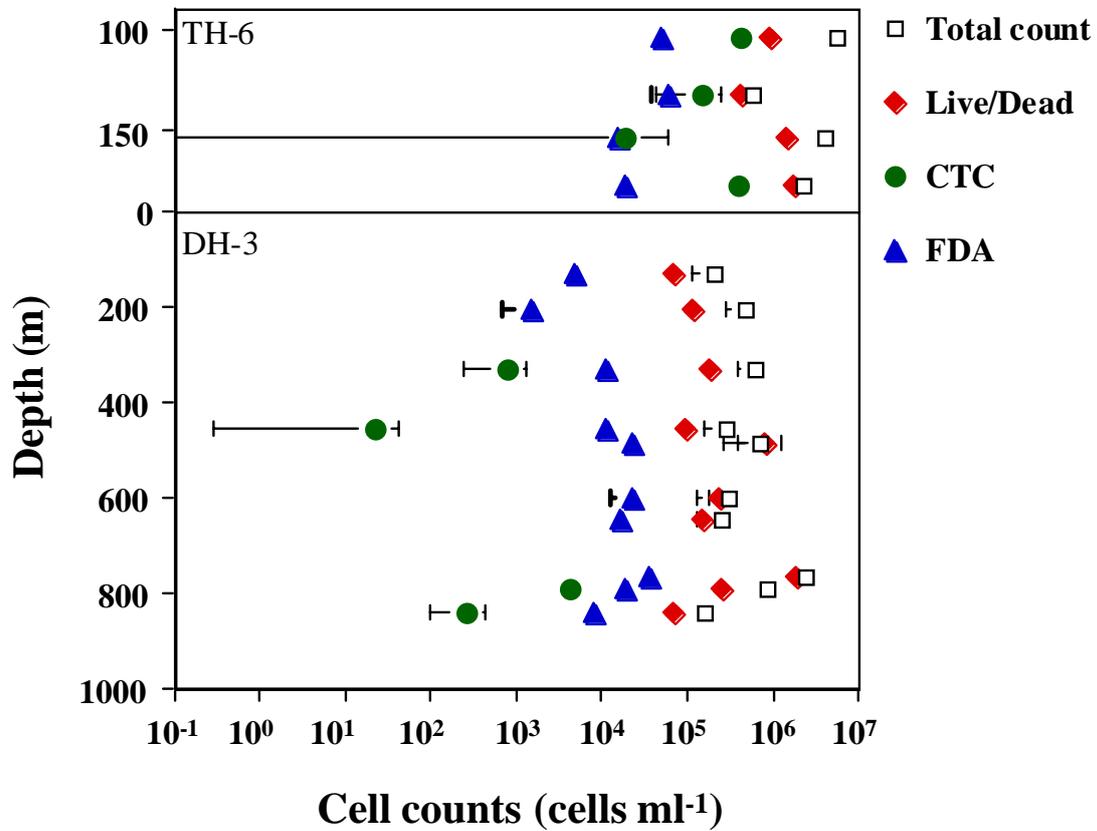
囲で計数された（表 4-3）。膜の健全性に基づいた生菌数は、DH-3 号孔の地下水において約 2 オーダーの範囲で大きな変動がみられたが、全体的に深度依存性は観察することができなかつた（図 4-6）。一方で、堆積岩における地下水中の生菌率（生菌数/全菌数）は、22.3%（深度 104 m）から 133.4%（深度 153 m）と、深度にともなって増加する傾向を示していた。一方、花崗岩における地下水中の生菌率は、24.6%（深度 209 m）から 115.4%（深度 485 m）となっており、深度との相関は見られなかつた。深度 153 m における生菌率に関して、133.4% という 100%を越える数字が見積もられた理由としては、生菌率の計算にそれぞれの試薬を用いて計算された全菌計数結果の平均値を用いたためと思われる。一部の全菌数の計数結果は試薬間で異なっていた。この深度における地下水は、多くの微小鉱物粒子を含んでいたため、DAPI による全菌数の計数値がやや低く見積もられているためと考えられる。なぜ堆積岩において生菌率が深度に伴った増加を示すのかどうかは明らかではない。しかし、深度が深くなるにつれて地下水の年代が古くなることから、深度が深くなるにつれて、外部と遮断された環境が確保され、微生物にとっての生息環境がより安定するのかもしれない。あるいは、より深度の深い環境に生息する微生物は、基盤岩および鉱物粒子などの複雑な環境中を長期間にわたって移動してきたため、膜の堅い細胞のみが選択的に生き残ることができた可能性もある。

全菌数と膜健全性に基づいた生菌数の間には、有意な相関は見られなかつた（ $r = 0.660$ ；図 4-7）。しかし、DH-3 の計数結果のみに関しては全菌数との間に相関関係を得ることができた（ $r = 0.941$ ；図 4-8）。

2) 細胞呼吸活性に基づいた生菌数

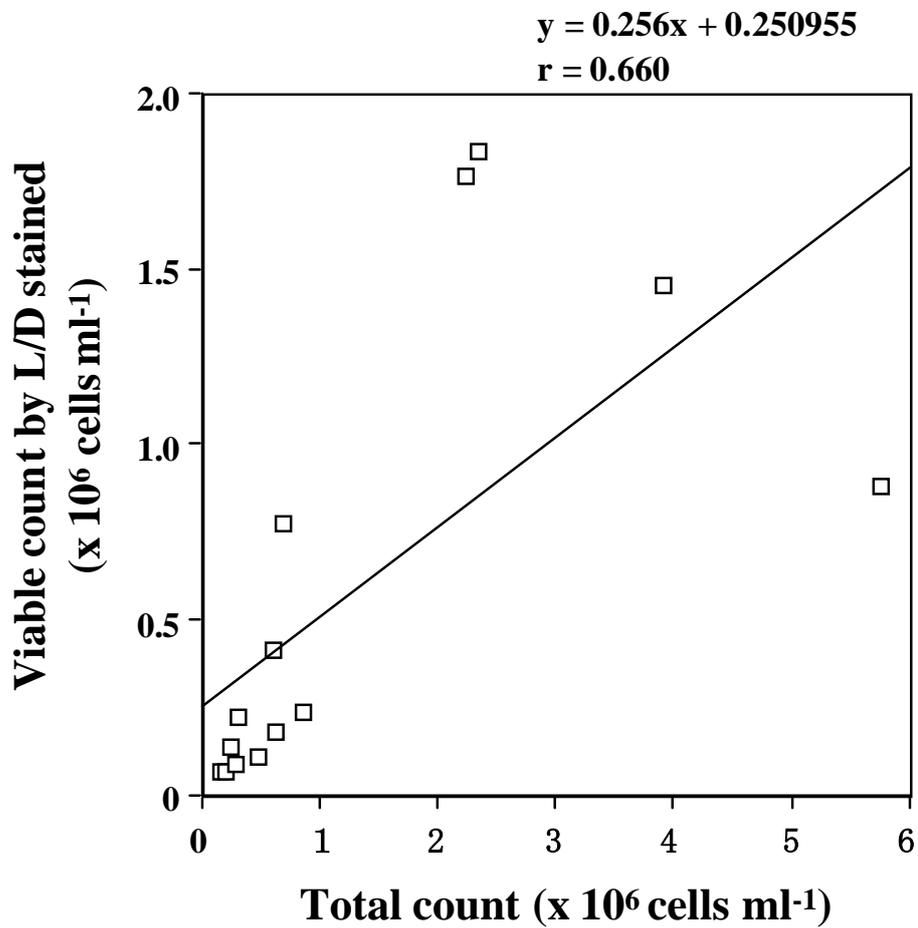
CTC を用いて検出可能な呼吸活性細胞（電子伝達系活性細胞）は、堆積岩を含む TH-6 では 1.9×10^4 cells ml⁻¹（深度 153 m） - 4.1×10^5 cells ml⁻¹（深度 104 m）であり、比較的高い生菌数が得られた。また、コントロール試料からは、微生物様の蛍光物質は観察されなかつた。

過去の研究例によると、一般的に CTC で検出される呼吸活性細胞の割合は、環境中において全菌数の約 10%以下であるという報告がある（Rodriguez et al., 1992; Schaule et al., 1993）。東濃地域の堆積岩地下水をみると、全菌数に対する生菌率は 1.8（深度 153 m） - 14.6（深度 132 m）%となっており、深度



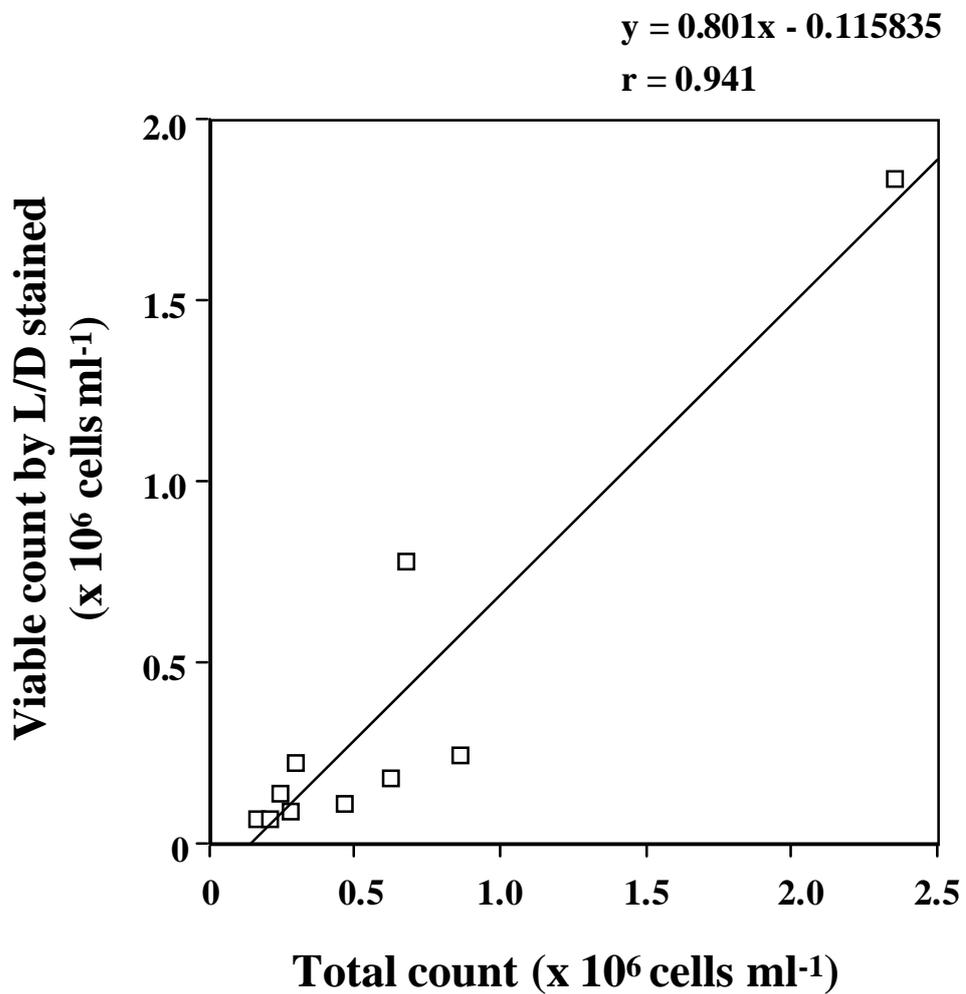
地下水における全菌数および生菌数 (cell counts) の深度 (depth) プロファイル。全菌数は、各深度における平均値を用いた。堆積岩 (TH-6) および花崗岩 (DH-3) のどちらの地下水においても、生菌数は深度依存性を示さなかった。Live/Deadによる膜健全性に基づく生菌数結果は、比較的全菌数と相関関係が見られた。花崗岩地下水の生菌数プロファイルとしては、深度767 mおよび790 mにおいて比較的高い値を示していた。

図 4-6 各方法に基づく生菌数の見積もり



Live/Deadを用いた生菌数（viable count by L/D stained）と全菌数（total count）結果の関係。全菌数と膜健全性に基づいた生菌数の間には、著しい相関関係は見られなかった。相関係数 $r = 0.660$ 。

図 4-7 生菌数と全菌数の相関(その1)



花崗岩地下水（DH-3号孔）におけるLive/Dead染色に基づいた生菌数（viable count by L/D stained）と全菌数（total count）の関係。相関係数は $r = 0.941$ であり、両者の間には明瞭な相関関係が認められた。

図 4-8 生菌数と全菌数の相関(その2)

153 mを除けば、この環境における生菌率は他の環境における研究報告とほぼ同様の傾向が見られた。深度 153 mにおける CTC (呼吸) 活性細胞数およびその生菌率は、他の深度と比較して著しく低い値が得られた。Fuller et al. (2000) によると、地下環境において一般的に広く検出されている *Comamonas* 属の細菌株は CTC では検出できないと報告されている。したがって、CTC は地下環境に広く分布していると考えられているこれらの属に対しては有効でないことが考えられる。しかし、16S rDNA 解析の結果より TH-6 号孔における地下水中の微生物群集は、必ずしも *Comamonas* 属が優占していないという結果が得られている。また、Bhupathiraju et al. (1999) によると、*Pseudomonas* 属、*Desulfovibrio* 属の細菌群および *Syntrophus aciditrophicus*, *Geobacter sulfurreducens*, *Methanobacterium thermoautotrophicum* などの嫌気呼吸および発酵をおこなう微生物は、CTC を CTC-formazan に還元することができたとの報告もある。したがって、153 m で細胞活性の低い結果がでてるのは、微生物種に依存する CTC の非有効性からくるものとは無関係であり、この深度の環境における地下水中の微生物代謝活性細胞数は、他の深度の微生物と比較して実質的に低いと考えられる。

一方、DH-3 号孔における花崗岩地下水中の呼吸活性細胞は、 2.2×10^1 cells ml⁻¹ (深度 458 m) - 4.1×10^3 cells ml⁻¹ (深度 790 m) となり、堆積岩と比較して 2-3 オーダー低い値で観察された。これらの数字は FDA に基づいた生菌数から比較するとかなり低い値である。Ullrich et al. (1996) の報告にもあるように、この試錐孔における地下水中には、1) 貧栄養の環境に生息する微生物は CTC を用いて活性を測定することは困難である可能性がある、2) CTC では検出できない微生物種が多数存在している、3) 細胞の呼吸速度が低すぎる場合検出できない可能性がある、等の理由により、過少見積もりになっている可能性も考えられる。しかし、この試錐孔における CTC 活性データは、サンプリングの都合により一部抜けている部分があるため、深度プロファイルを考察することは難しい。今後、さらなるデータの蓄積が必要である。

3) エステラーゼ活性に基づいた生菌数

FDA を用いて検出可能な代謝活性細胞 (エステラーゼ活性細胞) は、堆積岩を含む TH-6 では 1.5×10^4 cells ml⁻¹ (深度 153 m) - 6.1×10^4 cells ml⁻¹ (深度 132 m) であり、比較的高い生菌数が得られた。深度 153m におけるエステラー

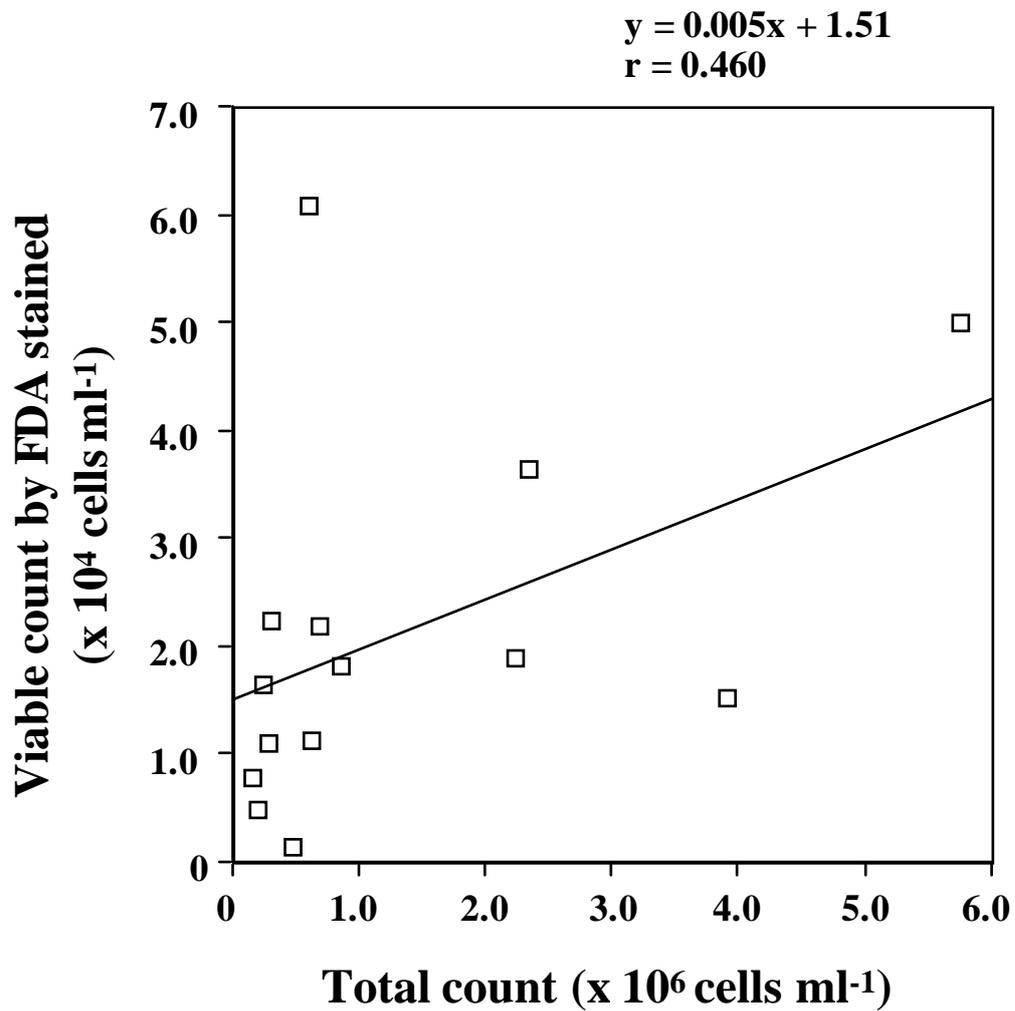
ゼ活性細胞数は、CTC を用いて検出した呼吸活性細胞の値 (1.9×10^4 cells ml⁻¹) とほぼ一致していた。どちらの方法も技術的な問題が残されているにもかかわらず、両値が一致している事実は、この深度における活性細胞数が真に低い可能性を示唆している。

一方、DH-3 号孔における花崗岩地下水中の呼吸活性細胞は、 1.5×10^3 cells ml⁻¹ (深度 209 m) - 3.6×10^4 cells ml⁻¹ (深度 790 m) となり、堆積岩における地下水中の FDA 活性細胞数と比較して、ほぼ同じか約 1 オーダー低い値が得られた。また、コントロール試料からは、微生物様の蛍光物質は観察されなかった。また、FDA 活性細胞数の深度依存性は全く観察されず、どちらかといえば浅い環境において比較的低い値が得られた。堆積岩および花崗岩地下水の FDA 活性細胞計数結果は、全菌数との明瞭な相関を示さなかった (図 4-9)。これは、各深度において現存する地下微生物の生菌率および活性が異なっていることを意味している。残念ながら、この試錐孔においてはサンプリングの問題により CTC 活性細胞の現存量調査が不完全であるため、FDA と CTC の活性細胞数を比較することができない。今後の研究が必要とされる。

FDA を用いた環境中の活性細胞数の見積もりは、いくつかの問題点が残されている (Tsuji et al., 1995; Chrzanowski et al., 1984)。FDA は細胞のエステラーゼ活性を検出するのに有効な手法であるが、土壌環境において特異的に観察されるある種の微生物細胞膜は FDA を浸透させることができない事が知られている。これらの微生物が地下水中で優勢かどうかは定かではないが、必ずしも多領域環境において有効な方法であるとは言えない。したがって、FDA によって環境中の活性微生物細胞を調査した場合、過少見積もりになる可能性がある。しかし、本研究で調査された地下水環境中においては、少なくとも 10^4 細胞の FDA-活性微生物が検出されており、この結果から少なくとも地下水中の微生物は 10^4 細胞以上は活性状態で存在しているという事実を示している。

4. 3. 7 BART 培養法に基づいた微生物深度プロファイルの推定

各種の BART を用いた培養試験は同一サンプルにつき 3 通りおこなったが、それぞれのサンプル間における変動はほとんど見られなかった。培養結果から得られた好気性微生物 (TAB-BART) の推定数は、ほとんどのサンプルで 5.0×10^6 cells ml⁻¹であった。BART を用いた調査は、培地成分組成が明らかにされてい



FDA染色による生菌数と全菌数の関係。全菌数は、3種類の染色液によって直接計数された全平均値を用いた。両者の間には明瞭な相関関係は認められなかった。

図 4-9 生菌数と全菌数の相関(その3)

ないためその培養試験を自らの手で再現することができない、BART による現存量の見積もりはあくまで目安の値である等の点で、技術的問題がいくつか残されている。微生物推定値に関しても技術的な検出限界値があり、それによって TAB-BART の推定値が $>5.0 \times 10^6$ cells ml⁻¹、すなわち“推定できるレベル以上”という表記のしかたをおこなった。一方で、 5.0×10^6 cells ml⁻¹ 以上という密度は全菌数計数結果を越えている。地下水の中には増殖能力を持っていてもサイズが小さすぎるために顕微鏡では検出できない細胞の存在が確認されており (Kieft, 2000)、本研究で用いられたサンプル中にもこれら“超極小細胞”が存在していた可能性を示唆している。地下水以外の環境中における報告例としては、 $0.33 \times 0.49 \mu\text{m}$ の芽胞状超極小細胞が水田の乾燥土壤中に約 10^5 cells g⁻¹ もの密度で存在していたとの報告もあり (Jansen et al., 1997)、検出されていない超極小細胞は環境中にさらに存在していると予想される。また、嫌気的環境から採取したサンプルにも関わらず、好気的条件下での TAB-BART による推定値が 10^5 cells ml⁻¹ にも上っているという事実は、地下環境に存在する微生物はほとんどが絶対嫌気性の微生物ではなく、何らかの形で嫌気的環境に適応している通性嫌気性微生物もかなりの割合で存在していることを示している。

硫酸還元菌 (SRB-BART) は、堆積岩試錐孔 (TH-6 号孔) の地下水において深度 104, 132, および 177 m にて $10^2 - 10^3$ cells ml⁻¹ の範囲内で検出された (表 4-4)。しかし、深度 153 m においては、SRB-BART を用いた培養法では硫酸還元菌を検出することができなかった。一方、花崗岩 (DH-3 号孔) 中の地下水においては、深度 458 m および 485 m でのみ $10^1 - 10^4$ cells ml⁻¹ の範囲で培養できた。それ以外の深度においては、SRB-BART では検出することができなかった。

鉄関連細菌 (IRB-BART) は、鉄酸化・鉄還元反応のどちらか、もしくは両方をおこなう微生物を示している。IRB-BART をもちいて調べられた堆積岩試錐孔 (TH-6 号孔) における鉄関連細菌の深度プロファイルは、堆積岩中においては推定数は 1.0×10^5 cells ml⁻¹ となり、どの深度の地下水でも同じ値を示していた。しかし、IRB-BART による目安の出現微生物種をみると、深度によって大まかな種類が異なっていた。この結果は、反応 (増殖) 過程の培養液における色、沈殿物、および気泡などによって判断したものであるため、詳細な種組成までは把握することができないが、少なくとも異なる多様性を持っている可能

表 4-4 地下水中の微生物群集における BART を用いた生菌数の推定

試錐孔	岩相	深度 (m)	BART による生菌推定値 ^b				DN	N
			TAB [culturable cells ml ⁻¹]	SRB [culturable cells ml ⁻¹]	IRB [culturable cells ml ⁻¹]	群集特性 [culturable cells ml ⁻¹]		
TH-6	堆積岩	104	>5 x 10 ⁶	4.2 x 10 ³	1.0 x 10 ⁵	IRB, 通性嫌気性菌, 腸内細菌	Very aggressive	ND
TH-6	堆積岩	132	>5 x 10 ⁶	2.0 x 10 ²	1.0 x 10 ⁵	好気性 IRB, 偏性嫌気性菌	Moderate	ND
TH-6	堆積岩	153	>5 x 10 ⁶	<1 x 10 ²	1.0 x 10 ⁵	好気性 IRB, 偏性嫌気性菌	Moderate	ND
TH-6	花崗岩	177	>5 x 10 ⁶	2.4 x 10 ²	7.5 x 10 ³	スライム形成微生物, IRB	Very aggressive	ND
DH-3	花崗岩	130	3.3 x 10 ⁶	<1 x 10 ²	1.0 x 10 ⁵	通性嫌気性菌	Background Levels	ND
DH-3	花崗岩	209	3.3 x 10 ⁶	<1 x 10 ²	4.5 x 10 ⁴	IRB, 通性嫌気性菌, 腸内細菌	Background Levels	ND
DH-3	花崗岩	330	1.0 x 10 ³	<1 x 10 ²	1.0 x 10 ⁵	IRB, 通性嫌気性菌, 腸内細菌	ND	ND
DH-3	花崗岩	458	5.0 x 10 ⁵	1.7 x 10 ⁴	1.8 x 10 ⁴	IRB, 偏性嫌気性菌	-d	ND
DH-3	花崗岩	485	1.0 x 10 ³	3.3 x 10 ¹	1.8 x 10 ⁴	IRB, 偏性嫌気性菌	Background Levels	ND
DH-3	花崗岩	600	5.0 x 10 ⁵	<1 x 10 ²	1.0 x 10 ⁵	IRB, 通性嫌気性菌, 腸内細菌	Background Levels	ND
DH-3	花崗岩	645	5.0 x 10 ⁵	<1 x 10 ²	1.0 x 10 ⁵	IRB, 通性嫌気性菌, 腸内細菌	Background Levels	ND
DH-3	花崗岩	767	1.0 x 10 ³	<1 x 10 ²	4.5 x 10 ⁴	IRB, 偏性嫌気性菌	Background Levels	ND
DH-3	花崗岩	790	5.0 x 10 ⁵	<1 x 10 ²	9.2 x 10 ³	IRB, 偏性嫌気性菌	ND	ND
DH-3	花崗岩	840	1.7 x 10 ⁵	<1 x 10 ²	1.8 x 10 ⁴	IRB, 偏性嫌気性菌	ND	ND

性がある。

一方、花崗岩における IRB-BART の結果からは、鉄関連菌の推定現存量および種組成は深度によって異なっていることが示唆された。鉄関連菌の推定現存量は、 $9.2 \times 10^3 - 1.0 \times 10^5$ cells ml⁻¹ の範囲で分布しており、深度 130, 330, 600, 645 m においてピークを示していた。また、深度 767 m 以深における鉄関連菌の増殖反応過程は、嫌気性微生物のそれと一致しており、深度に依存した分布が見られた。

嫌気呼吸反応の一つである脱窒をおこなう微生物の活性を DN-BART によって調べた結果、堆積岩試錐孔 (TH-6 号孔) の深度 104 m (堆積岩・明世累層) および 177 m (花崗岩) においては、脱窒は“強活性” (very aggressive) を示し、深度 132 m および 153 m では“適度な活性” (moderate) を示した。一方で、花崗岩試錐孔 (DH-3 号孔) においては、ほとんどの地下水試料でバックグラウンドもしくは“検出限界以下”という結果を示した。BART を用いた調査では、“aggressive” および “moderate” 等相対的な指標で示されるため、DN-BART を用いた場合、数値的な脱窒活性および脱窒菌数は明らかではない。しかし、上層を堆積岩に覆われた地質環境にある地下水の方が、比較的脱窒活性が高いことが示された。脱窒菌および硝酸還元菌には多くの従属栄養性が知られている。地下水中の有機物含有量は、花崗岩と堆積岩間で特記すべき差が見られないが、堆積岩体には花崗岩と比較すると陸由来の有機物が多く存在していると考えられる。そのうえ、本研究で対象にしている瑞浪層群には、亜炭層も含まれている。したがって、従属栄養性微生物にとっては、堆積岩環境の方がより生息しやすい可能性がある。また、一般的に脱窒活性は酸化還元境界および微好氣的環境などの比較的嫌気条件の厳しくない環境で起こることが知られている (Blackburn and Blackburn, 1992; Nealson, 1997; Lovley, 2001)。したがって、地表水の流動に比較的密接に関連している可能性がある堆積岩試錐孔の深度 104 m において、脱窒活性が見られる現象は、酸化還元環境と整合的である。また、深度 177 m 付近は不整合面の直下であり、風化花崗岩から形成されている。それゆえ、比較的酸化的な地下水の流動が起こっている可能性があり、脱窒がおこなわれる環境条件として適している。硫酸還元菌、鉄関連菌および脱窒菌に関しては、深度による微生物種の差が見られた。BART を用いた微生物現存量および種の推定には問題が残されているとはいえ、培養時の条件は一定である。したがって、各深度において存在する微生物種および相対的

な現存量は特徴的であり、地下環境における微生物の分布は一様ではないことが明らかになった。

4. 3. 8 16S rDNA に基づいた系統学的解析

堆積岩中の地下水サンプルから抽出した DNA を用いて、微生物分類の指標となる 16S rDNA の PCR 産物の遺伝子配列、1345 bp を決定した。各深度において 50 クローン（4 深度で合計 200 クローン）の解析を行った。各クローンライブラリーのクローン中で互いに高い相同性（96%以上）を示したクローンを同一の操作的分類単位（OTU）としてグループ化した結果、深度 104 m で 16 OTUs、深度 132 m で 17 OTUs、深度 153 m で 16 OTUs、および深度 177 m で 21 OTUs に分類することができた。この OTU の数から、深度 177 m の地下水の微生物相が高い多様性を持っていることが示唆された。深度 177 m は、地下水の通り道となる割れ目の多い花崗岩からなっており、原位置 (*in situ*) 地下水の微生物相に加えて、地表や浅部地下の微生物が運ばれてきた結果、多様な微生物種が存在していると考えられる。

近隣結合法 (neighbor-joining method) によって 4 深度の全ての OTU を含んだ系統樹および、深度ごとに OTU を分けた系統樹を作成した (図 4-10)。系統樹からは、グラム陽性低 G+C 含量細菌、グラム陽性高 G+C 含量細菌、緑色硫黄細菌 (Green sulfur bacteria)、緑色非硫黄細菌 (Green non-sulfur bacteria)、 α -プロテオバクテリア、 β -プロテオバクテリア、 δ -プロテオバクテリアに属すると思われる OTU が検出された。プロテオバクテリアは α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ の 5 個のサブグループに分類される。本研究ではプロテオバクテリアに属する OTU は数多く検出されたが、 γ -プロテオバクテリアおよび ϵ -プロテオバクテリアに属する OTU は全く検出されなかった。 γ -プロテオバクテリアは、地表および海洋などの好気的な環境で多く見つかる細菌群であるが、本研究ではそれに属すると思われる OTU が検出されなかったことは地下の嫌気的な環境を反映していると考えられる。また、培養することのできない既知の細菌、例えば uncultured bacterium SHA-7 (AJ249109) および uncultured bacterium SA34 (AF245349) などに近縁の OTU が調査した全深度から検出された。これは、現場の微生物相を知ろうとする多様性解析において、培養法では検出できない VBNC 菌について、その 16S rDNA を検出できたという例示になると考えられる。培

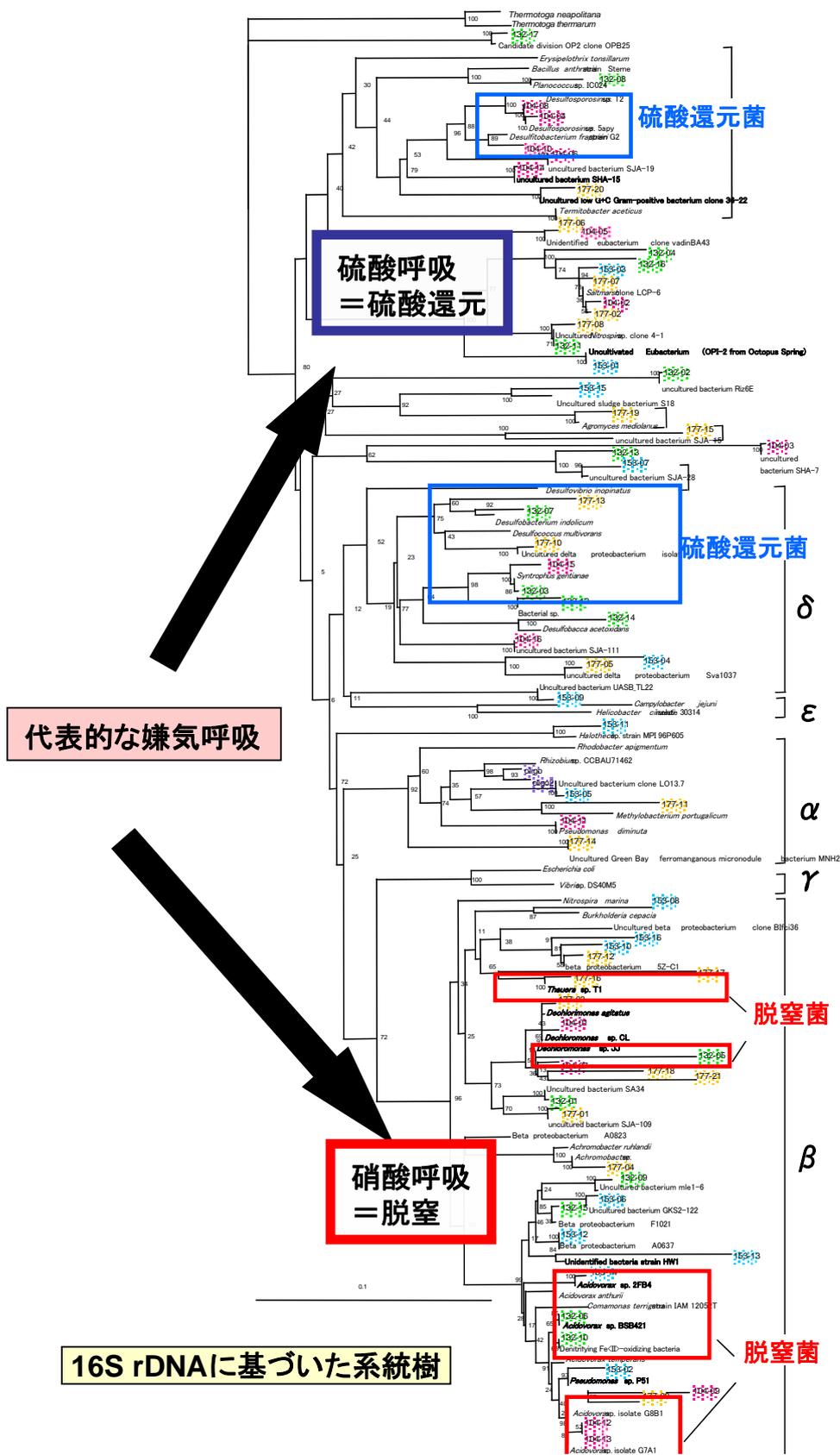


図 4-10 OUT に基づく系統樹

養法のみでは、用いた培地の有機栄養源、好気・嫌気、温度および圧力などの培養条件によって分離される微生物に偏りが生じる。そういった偏りをなくし、VBNC 菌の 16S rDNA を検出できたことは遺伝子解析手法を用いた成果であると考えられる。

各深度の OTU の出現頻度を表 4-5 に示した。各深度における OTU 頻度の最高値は 20-58%であり、最頻 OTU がその深度における優占微生物を代表すると考えられる。深度 104 m で最もクローンの出現頻度が高かった (30%) OTU 104-04 は *Desulfosporosinus* sp. 5apy (AF159120) に最も近縁で、97.2-99.5%という高い相同性 (おそらく同属) を示した。16S rDNA 配列を用いた解析においては、97%以上の相同性があれば類縁関係があり、99%以上であれば同種である可能性が高い。*Desulfosporosinus* sp. 5apy は、グラム陽性低 G+C 含量細菌に属し、硫酸還元を行う。深度 104 m からは、この他にも *Desulfosporosinus* sp. T2 (AF076526) および *Syntrophus gentianae* (X85132) などの硫酸還元菌に近縁の OTU が検出された。このことから深度 104 m の微生物相においては硫酸還元菌が優占している可能性が示唆される。ただし、これは優占度の高低であって、必ずしも硫酸還元活性の強弱を反映するものではない。

深度 132 m で最もクローンの出現頻度が高かった (58%) OTU 132-06 は *Acidovorax* sp. BSB421 (Y18617) に最も近縁で、98.5-99.8%の高い相同性を示した。*Acidovorax* sp. BSB421 は β -プロテオバクテリアに属し、ドイツの污水处理プラントの活性汚泥から分離された細菌で、硝酸還元 (脱窒) 能を持っている。深度 104 m で硫酸還元菌が優占していると考えられたのと同様に、深度 132 m では脱窒菌が優占している可能性が示唆される。

深度 153 m で最もクローンの出現頻度が高かった (42%) OTU 153-01 は uncultivated eubacterium (OPI-2 from Octopus spring) (L22045) に最も近縁で、94.9-98.7%の相同性を示した。OPI-2 は、イエローストーン国立公園の約 85°C の温泉 (Octopus spring) のバクテリアマットから検出された細菌で、新しい分類群に属するとされている。高温の温泉から検出された細菌に近縁の OTU が約 20°C の水温の地下水から検出されたことは、生物地理的な放散と生理的な適応放散の相互関係を考える上で非常に興味深い。

深度 177 m で最もクローンの出現頻度が高かった (24%) OTU 177-01 は Uncultured bacterium SJA-109 (AJ009484) に最も近縁で、98.7-99.3%と高い相同性を示した。Uncultured bacterium SJA-109 は β -プロテオバクテリアに属

し、トリクロロベンゼン (TCB) を脱塩素化するためのバイオリクターから検出された細菌である。この他にも深度 177 m からは β -プロテオバクテリアに属し、TCB などの揮発性有機塩素化合物の脱塩素化を行う *Dechloromonas* 属に近縁の OTU がいくつか検出された。

1) 呼吸多様性

本研究におけるクローン解析から、地下環境に多いと考えられる嫌気代謝のうち、脱窒（硝酸呼吸）と硫酸還元（硫酸呼吸）を行う細菌に近縁な OTU が多様に検出された。一方、鉄還元（鉄呼吸）、マンガン還元（マンガン呼吸）およびメタン生成 / 水素酸化（二酸化炭素を用いた呼吸）を行う細菌に近縁の OTU は検出されなかった。

好気呼吸に対して嫌気呼吸はその反応によって生成するエネルギーが減少する。好気呼吸によって生成するエネルギーを 100 として比較すると、脱窒が 93、マンガン還元が 87、鉄還元が 84、硫酸還元が 6、およびメタン生成が 3 となる。微好気および微嫌気条件（酸化還元電位 ± 0 V 付近）では脱窒菌が優勢になるが、強還元条件（酸化還元電位 -0.2 – -0.3 V 付近）では鉄還元細菌と硫酸還元細菌およびメタン生成細菌は、基質となる有機物を奪い合う。この場合、鉄還元細菌が利用し得る形態の鉄が十分量存在し鉄還元が有機物分解と共役する条件となれば、鉄還元細菌が優勢になるといわれている。その理由として、鉄還元細菌は硫酸還元細菌やメタン生成細菌よりも代謝によって生成されるエネルギーが大きく、速やかに有機物を消費できることが示唆されている。鉄還元の寄与の大きさは、電子受容体としての分子状酸素 (O_2) と硝酸塩が少ない嫌気条件ならば、微生物が利用できる鉄の量によって決まると考えられる。TH-6 号孔の地下水においては、鉄濃度が低いため、鉄還元細菌が優占しなかったと考えられる。

一般的に、脱窒は微好气的環境などの比較的嫌気条件の厳しくない環境（酸化還元電位 ± 0 V 付近）で起こることが知られている (Blackburn and Blackburn, 1992 ; Nealson, 1997 ; Lovley, 2001)。深度 104 m および深度 132 m において脱窒菌に近縁の OTU が多く検出されたことは、酸化還元電位が ± 0 V 付近の微好気–微嫌気条件において脱窒が行われている可能性を示すと考えられる。

表 4-5 クローンライブラリ中のOTU分布

depth	OUT	Closely matched sequence(Accetion no.)	No. of clones	Frequency of OUT(%)
104	104-01	Dechloromonas sp. CL (AF170354)	5	10
	104-02	Saltmarsh clone LCP-6 (AF286037)	2	4
	104-03	uncultured bacterium SHA-7 (AJ249109)	5	10
	104-04	Desulfosporosinus sp. 5apy (AF159120)	15	30
	104-05	Termitobacter aceticus (Z49863)	1	2
	104-06	uncultured bacterium SJA-19 (AJ009454)	1	2
	104-07	Beta proteobacterium A0823 (AF2360011)	1	2
	104-08	Desulfosporosinus sp. T2 (AF076526)	1	2
	104-09	Acidovorax temperans (AF078766)	1	2
	104-10	Desulfitobacterium frappieri strain G2 (AF320982)	1	2
	104-11	Pseudomonas diminuta (M59064)	1	2
	104-12	Acidovorax sp. G8B1 (AJ012070)	4	8
	104-13	Acidovorax sp. G7A1 (AJ012071)	7	14
	104-14	uncultured bacterium SHA-15 (AJ249098)	1	2
	104-15	Syntrophus gentianae (X85132)	3	6
	104-16	uncultured bacterium SJA-111 (AJ009485)	1	2
total		16	50	100

表 4-5 クローンライブラリ中のOTU分布

depth	OUT	Closely matched sequence(Acction no.)	No. of clones	Frequency of OUT(%)
132	132-01	Uncultured bacterium SA34 (AF245349)	1	2
	132-02	uncultured bacterium Riz6E (AJ244308)	1	2
	132-03	Syntrophus gentianae (X85132)	1	2
	132-04	Uncultured Nitrospira sp. Clone4-1 (AF351225)	2	4
	132-05	Dechloromonas sp. JJ (AY032611)	1	2
	132-06	Acidovorax sp. BSB421 (Y18617)	29	58
	132-07	Desulfobacterium indolicum strain DSM 3383 (AJ237607)	1	2
	132-08	Planococcus sp. IC024 (U85899)	1	2
	132-09	Uncultured bacterium mle1-6 (AF280845)	1	2
	132-10	Denitrifying Fe<II>-oxidizing bacteria (U51105)	1	2
	132-11	Uncultured Nitrospira sp. Clone4-1 (AF351225)	3	6
	132-12	Bacterial sp. (X87269)	1	2
	132-13	uncultured bacterium SJA-28 (AJ009458)	1	2
	132-14	Desulfobacca acetoxidans (AF002671)	1	2
	132-15	Beta proteobacterium F1021 (AF236005)	1	2
	132-16	Saltmarsh clone LCP-6 (AF286037)	3	6
	132-17	Candidate division OP2 clone OPB25 (AF027097)	1	2
total	17		50	100

表 4-5 クローンライブラリ中のOTU分布

depth	OUT	Closely matched sequence(Acction no.)	No. of clones	Frequency of OUT(%)
153	153-01	Uncultivated Eubacterium (OPI-2 from Octopus spring) (L22045)	21	42
	153-02	Pseudomonas sp. P51 (AF015487)	10	20
	153-03	Saltmarsh clone LCP-6 (AF286037)	4	8
	153-04	(AB04201)	1	2
	153-05	Uncultured bacterium clone LO13.7 (AF358021)	1	2
	153-06	Uncultured bacterium GKS2-122 (AJ290026)	1	2
	153-07	uncultured bacterium SJA-28 (AJ009458)	1	2
	153-08	Burkholderia cepacia (X80284)	3	6
	153-09	Uncultured bacterium UASB_TL22 (AF254403)	1	2
	153-10	Uncultured beta proteobacterium clone Bifci36 (AJ318116)	1	2
	153-11	Halothece sp. strain MPI 96P605 (AJ000724)	1	2
	153-12	Beta proteobacterium A0637 (AF236004)	1	2
	153-13	Unidentified bacteria strain HW1 (D89026)	1	2
	153-14	Acidovorax sp. 2FB4 (AF229859)	1	2
	153-15	Uncultured sludge bacterium S18 (AF234754)	1	2
	153-16	Achromobacter ruhlandii (AF205370)	1	2
total	16		50	100

表 4-5 クローンライブラリ中のOTU分布

depth	OUT	Closely matched sequence(Acction no.)	No. of clones	Frequency of OUT(%)
177	177-01	Uncultured bacterium SJA-109 (AJ009484)	13	26
	177-02	Saltmarsh clone LCP-6 (AF286037)	1	2
	177-03	Dechloromonas sp. CL (AF170354)	7	14
	177-04	Achromobacter sp. (AJ243604)	1	2
	177-05	uncultured delta proteobacterium Sva1037 (AJ240992)	1	2
	177-06	Unidentified eubacterium clone vadinBA43 (U81652)	1	2
	177-07	Saltmarsh clone LCP-6 (AF286037)	8	16
	177-08	Uncultured Nitrospira sp. Clone4-1 (AF351225)	3	6
	177-09	Acidovorax anthurii (AJ007013)	1	2
	177-10	Uncultured delta proteobacterium isolate Eel-BEC3 (AF354147)	3	6
	177-11	Uncultured bacterium O18E10 (AF220330)	1	2
	177-12	beta proteobacterium 5Z-C1 (AJ224618)	1	2
	177-13	Uncultured delta proteobacterium isolate Eel-BEC3 (AF354147)	1	2
	177-14	Uncultured Green Bay ferromanganous micronodule bacterium MNH2 (AF292998)	1	2
	177-15	uncultured bacterium SJA-15 (AJ009453)	1	2
	177-16	Thauera sp. T1 (U95176)	1	2
	177-17	Acidovorax sp.2FB4 (AF229859)	1	2
	177-18	Dechloromonas sp. CL (AF170354)	1	2
	177-19	Agromyces medianus (X77449)	1	2
	177-20	Uncultured low G+C Gram-positive bacterium clone 36-22 (AF351222)	1	2
	177-21	Dechloromonas sp. CL (AF170354)	1	2
total	21		50	100

2) 脱窒菌（硝酸呼吸）の多様性

地下で優占すると考えられる嫌気代謝の一つに硝酸呼吸、すなわち脱窒がある。脱窒は、硝酸塩 (NO_3^-) を嫌气的条件下で還元し、 N_2 または N_2O を生成する反応である。地下の窒素循環において重要な役割を果たすと考えられる脱窒菌は、 β -プロテオバクテリアの中の多様な微生物グループに分布していた。本研究で検出された OTU には脱窒菌として知られる *Acidovorax* 属の *Acidovorax* sp. G7A1 (AJ012070) 他、denitrifying Fe(II)-oxidizing bacteria (U51105)、*Thauera* sp. T1 (U95176) および *Dechloromonas* sp. JJ (AY032611) などに近縁なものが見られた。これら既知の脱窒菌と近縁 OTU の相同性は、それぞれ 99.3-99.8% という高い値であった。*Acidovorax* 属に近縁の OTU は、*Acidovorax* 属の 5 種類にわたって高い相同性を示したほか全深度において検出されたことが特徴的である。深度 104 m および 132 m では、各クローンライブラリー (50 クローン) 中に占める *Acidovorax* 属に近縁の OTU の割合はそれぞれ 24%、58% であった。これは、深度 132 m の微生物相においては、*Acidovorax* 属の細菌が圧倒的に優占するということであり、脱窒を盛んに行っているという可能性を示唆している。もちろん、16S rDNA クローンライブラリーにおける優占度が現場の活性と必ずしも相関するという根拠は無い。

地下における窒素循環に関与する微生物種について、これまであまり知られていなかった。本研究では、脱窒菌の他に、アンモニア酸化を行うことが知られている *Nitrospira* 属の未培養菌 Uncultured *Nitrospira* sp. Clone4-1 (AF351225) に近縁な OTU が検出された。また、別の試錐孔 KNA-6 号孔から、窒素固定を行うことが知られている *Rhizobium* 属の *Rhizobium* sp. CCBAU71462 (AF195031) に近縁な細菌 (低栄養細菌 ; oligo および oligo2) が分離されている。これらを図 4-11 の系統樹にまとめて示した。この結果から、地下における窒素循環の概念としては、次のような経路を想定することができる。①アンモニアを硝化細菌 (アンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌 ; *Nitrospira*) が酸化し、硝酸塩が生成する。②硝酸塩は地下の嫌气的条件下、あるいは比較的酸素の少ない条件下では脱窒菌 (*Acidovorax*) により還元されて分子状窒素 (N_2) になる。③ N_2 は窒素固定細菌 (*Rhizobium*) により有機窒素として同化され、その有機物が嫌气的に分解する結果、アンモニアが生成する。こうして、窒素循環が完結する。この経路における反応式を以下に示す。



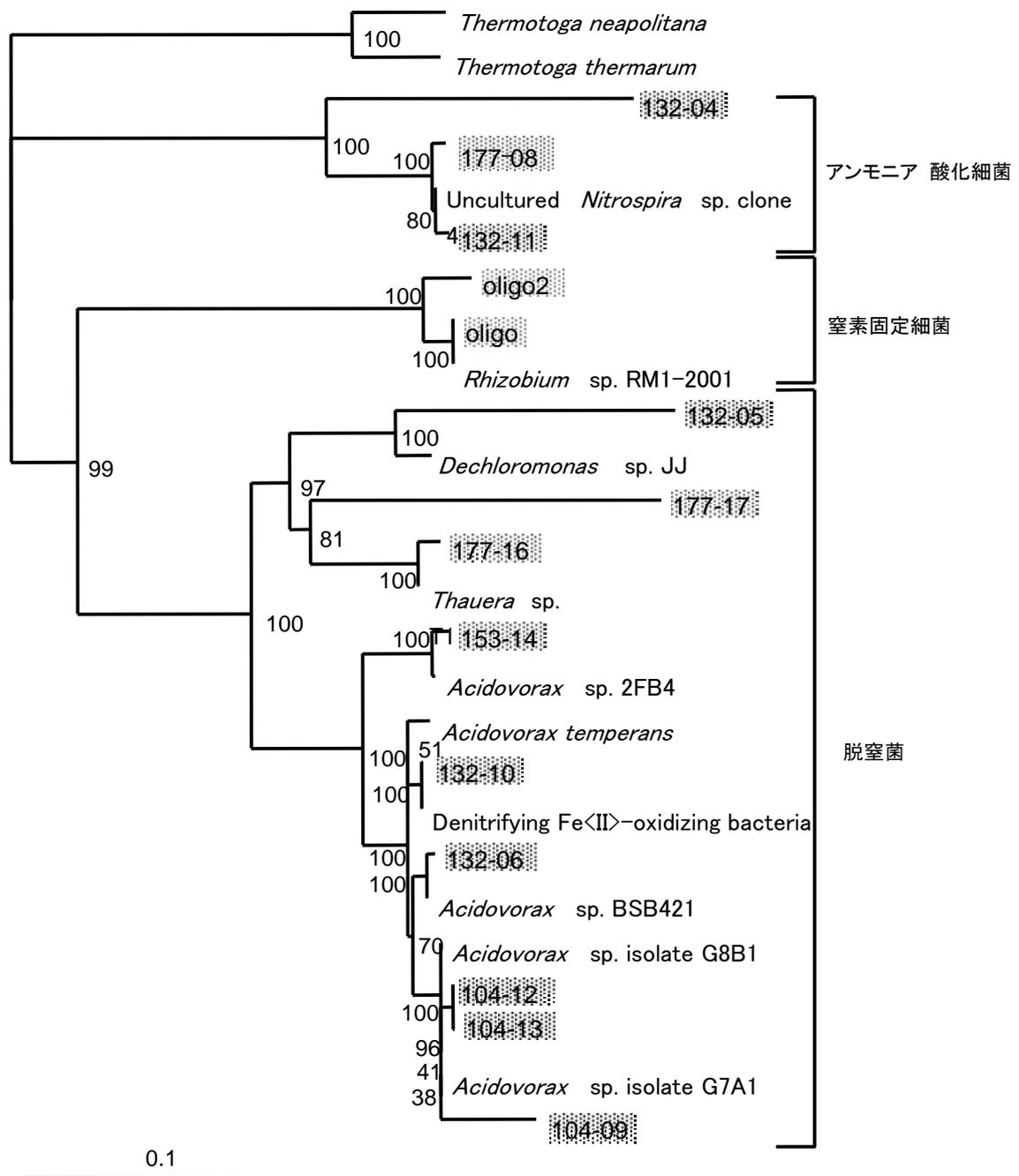
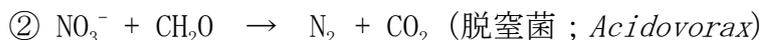


図 4-11 16S rDNA に基づいた系統樹 (窒素循環)



本研究の一環として、③の反応に関わる窒素固定細菌 *Rhizobium* sp. を試錐孔 KNA-6 から分離培養しており、②の脱窒菌も数種、試錐孔 TH-6 から分離できている。これから残りの①の *Nitrospira* の培養に成功し、これらが原位置でそれぞれの反応を行っていることが明らかになれば、地下における窒素循環のシステムを解明することができると思われる。

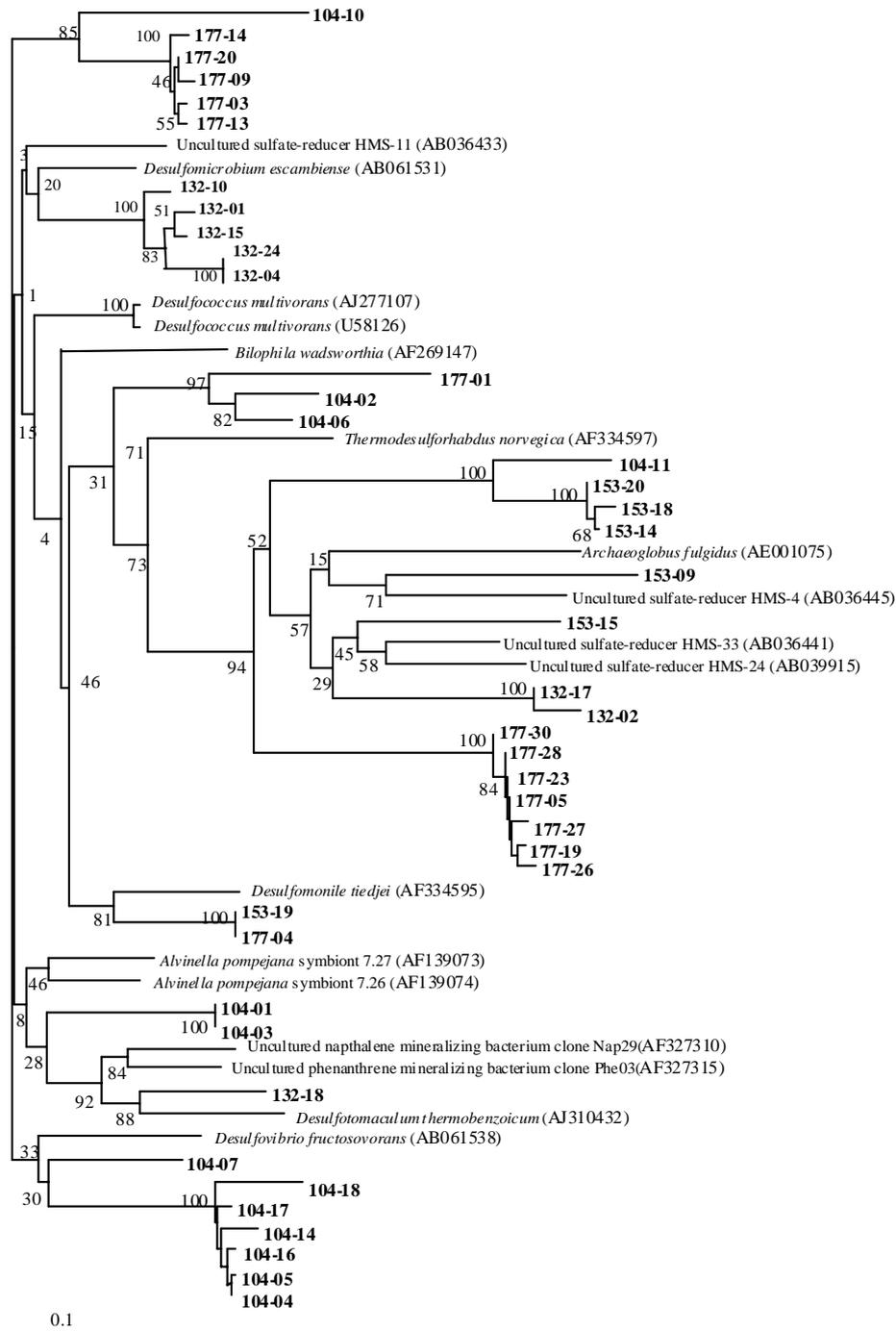
3) 硫酸還元菌 (硫酸呼吸) の多様性

嫌気環境でよく見られる微生物代謝として硫酸還元が挙げられる。TH-6 号孔からもグラム陽性低 G+C 含量細菌に属する *Desulfosporosinus* sp. 5apy など、および δ -プロテオバクテリアに属する *Desulfobacterium indolicum* などに近縁な OTU が数多く検出された。硫酸還元菌は、嫌気的条件下において分子状酸素 (O_2) の代わりに硫酸イオン (SO_4^{2-}) を最終電子受容体とした呼吸 (硫酸呼吸) を行う。 O_2 を最終電子受容体として呼吸を行う生物は O_2 を水分子 (H_2O) に還元するが、硫酸還元菌の場合は、硫酸イオンを硫化水素 (H_2S) あるいは硫化物イオン (S^{2-}) に還元する。こうして生成した硫化物イオンが重金属陽イオンと出会ると、結合して硫化物沈殿が析出する。このように、硫酸還元菌は硫化物の沈殿に深く関わっており、鉱床成因論などで注目されている。TH-6 号孔においては、堆積岩深部にウラン鉱化部が分布している。鉱化部周辺ではウランとパイライトの共沈が見られ、硫酸還元に伴う別反応 (例えばパイライト生成 $\text{FeS} + \text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{FeS}_2 + \text{H}_2$) に付随したウラン還元、すなわち U(IV) の沈殿があった可能性がある。

本研究で深度 153 m のクローンライブラリーから硫酸還元菌に近縁な OTU は検出されなかったが、培養法および 16S rDNA 以外の硫酸還元関連遺伝子 (異化型硫酸還元酵素 DSR 遺伝子) の解析からは硫酸還元菌が検出されているため、硫酸還元作用がウランの還元・沈殿に関与している可能性がある。TH-6 号孔深度 177 m の地下水中には硫酸イオンが多く含まれている。しかし、深度 177 m の地下水から検出された OTU には、硫酸還元菌に近縁なものは少なかった。これは、硫酸還元菌が少なく、硫酸還元活性が低いために硫酸イオン濃度が高く保たれていると考えることもできるが、それとは別に地下水の特質に関連する

とも考えられる。また、硫酸還元菌に近縁の OTU は深度 104 m で高い多様性が見られ、グラム陽性低 G+C 含量細菌および δ -プロテオバクテリアに広く分布していた。 δ -プロテオバクテリアに分類された OTU には、深度 132 m および 177 m からのものが多かった。そのため、比較的浅い深度 104 m においてはグラム陽性低 G+C 含量細菌グループの硫酸還元菌に近縁の OTU が優占し、深度 132 m および 177 m においては δ -プロテオバクテリアの硫酸還元菌に近縁の OTU が優占していることが想定された。

異化型硫酸還元酵素 (DSR) 遺伝子を用いた系統解析の結果、TH-6 号孔において、硫酸還元菌は各深度の地下水試料ごとに特徴的なクラスターを形成することがわかった (図 4-12)。その中でも、深度 153 m は古細菌型 DSR 遺伝子を持つクラスターに入った。本研究で行った 16S rDNA 解析は細菌 (Bacteria) を対象としており、古細菌 (Archaea) は対象としていない。そのため、深度 153 m で硫酸還元細菌の OTU が検出されなかったと考えられ、また、この深度の硫酸還元は主に硫酸還元古細菌によって行われていると推察された。



異化型硫酸還元酵素（DSR: Dissimilatory sulfite reductase）遺伝子に基づいた、堆積岩（TH-6号孔）地下水中の微生物に関する系統学的解析。地下水中に存在している硫酸還元菌種は、各深度ごとで異なっていた。深度153 mにおける地下水中の硫酸還元菌のDSR遺伝子は、古細菌型DSRをもつ硫酸還元菌クラスターに含まれ、他深度の地下水における微生物群集と顕著な相違が認められた。

図4—12 異化型硫酸還元酵素遺伝子に基づく硫酸還元菌の系統樹

5. 微生物活動と地球化学環境の関わりの把握

本章では、前章までに整理された東濃地域の地下深部の堆積岩および花崗岩中の微生物特性に関わる情報をもとに、地下水-鉱物-微生物相互反応システムという視点で、地球化学環境との関わりについて述べる。堆積岩においては、ウラン鉱床周辺の地下水-鉱物-微生物システムについて整理し、放射性廃棄物のアナログとしても扱えるウラン鉱床の長期的に保存に関わる地下微生物の役割について考察した。また、花崗岩においては、主要な地下水の流動経路である割れ目の周辺で起こり得る、コロイドの生成とそれ結果生じる割れ目充填の可能性について検討した。

5.1 ウラン鉱床が存在する堆積岩中の地下水-鉱物-微生物システム

東濃ウラン鉱床は、一千万年間以上に渡って地層中に保持されてきたと推察されている。酸化状態のウラン(U^{6+})は還元状態のウラン(U^{4+})に比べ、液相に対する溶解度が 10^7 倍も高くなるため(McKinley and Savage, 1996)、ウラン鉱化帯の存在する深度では、長期に渡って固相のウランが溶脱しない程度の還元状態が維持されてきたと推察される。このような環境は、地下深部におけるウランの移動と酸化還元状態・酸化還元緩衝能力の関わりを解析する上で最適の環境である。現在は現存の地層が堆積してから地盤の隆起侵食を経験し最も地表面の削剥が進んでいる状態であり、地史を考慮しながら現在の酸化還元状態を研究する事で、過去から現在までの長期にわたる表層の酸化的影響がどの程度の深度まで及んでいるのか、ウラン鉱床の長期的保存にどのように影響しているのかを明らかにすることができる。地下深部が長期にわたって還元状態に維持されてきた要因を明らかにするためには、主要な酸化還元反応や関連鉱物の量比、水-鉱物反応速度、地下微生物の存在量・活性等に基づいて定量的な酸化還元緩衝能力の解析を行う必要がある。特に、無機化学的な水-鉱物反応が比較的遅いのに対し、微生物による生物化学的反応は地質学的時間スケールでは瞬時に進行する。このような生物化学的な酸化還元反応は、微生物が死滅しない限り恒久的に続く反応であり、長期的にみて非常に大きな酸化還元緩衝能力を潜在している(Taylor et al. 1984)。

5. 1. 1 研究アプローチと実験方法

地下深部における酸化還元状態は、表層からの酸化物質の流入速度・量 (flux) と地下の還元物質存在量・還元速度等に影響を受けていると考えられる。東濃地域において長期間ウラン鉱床を保持し得る還元状態が維持されてきた事を考慮すると、表層からの酸化物質フラックスに対して、電子供与体として働き得る鉱物の水-鉱物反応と微生物による還元活性が十分に大きく、表層からの酸化フロントの移動速度が非常に遅い可能性がある。更に、これまでの研究 (JNC 2000) で堆積岩深部においては、現在の黄鉄鉱の溶解または硫酸/硫化水素イオン間の酸化還元反応が主要な酸化還元反応として挙げられているが、これらの反応がウラン鉱床の長期保存にどのように関与してきたのかは不明である。本研究では、地下水・鉱物データに基づいて地下水-鉱物-微生物の相互反応系における優勢な酸化還元反応の明確化およびウラン鉱床の長期的保存に関わる還元緩衝能力の定量的把握を試みた。

地下水試料は、ウラン鉱床周辺に掘削された7本のボーリング孔 (TH-1・2・3・4・6・8, KNA-6) で、パッカーシステムを備え原位置の化学条件を維持したまま地下水を採取できる採水機器により採取した (岩月ほか, 1998)。得られた地下水は $0.45\ \mu\text{m}$ スクレポアフィルターでろ過され、イオンクロマトグラフ法 (IC)、原子吸光光度法 (AAS)、誘導結合型高周波プラズマ分析法 (ICP) により、酸化還元に関わる化学種 (マンガンを硝酸・亜硝酸・アンモニア・鉄・硫酸・硫化物イオン: 以下、酸化還元化学種と記述) の化学分析を行った。各々の誤差は $\pm 0.02\text{ppm}$ (マンガンを鉄については $\pm 0.01\text{ppm}$) である。二価鉄については、大気に触れないように直接地下水試料をガラスバイアルビンに採取し、0-フェナントロリンにより発色させた後に吸光光度計により分析した。硫化物イオン (HS^-) については、地下水試料が大気に触れないように水酸化ナトリウムを加え pH12 以上に調整し、 S^{2-} 濃度を高速液体クロマトグラフにより測定した。 HS^- 濃度は HS^- と S^{2-} 濃度が平衡状態にあると仮定して濃度と pH の関係 ($\text{S}^{2-} + \text{H}^+ = \text{HS}^-$: $K = [\text{S}^{2-}][\text{H}^+]/[\text{HS}^-] = 1.259 \times 10^{-14}$) から、測定時の pH を実際の地下水の pH に換算しなおして算出した。

地下水中の硫酸イオンの硫黄同位体比については、試料を pH2-3 に調整し、塩化バリウムを加えた後、沈殿した硫酸バリウムを蒸発乾固後回収し、石英粉末、五酸化バナジウムとともに真空ライン中で 800 度に加熱して亜硫酸ガスを回収

した。回収されたガスを質量分析計により分析した。測定値は Canyon Diabolo Troilite (CDT) standard に対する δ 表示する。誤差は $\pm 0.2\%$ である。

また、岩石から地下水中へ供給される酸化物質について考察するために、岩石中の硫酸態硫黄の分析を行った。岩石試料は酸化による影響を避けるため、地下水を採取したボーリング孔付近に新たに掘削されたボーリング孔 (MIU-2 号孔) から 10–20m 間隔で採取した。採取された岩石の粉末約 0.1g を 0.1M NaCO₃ 溶液 5ml に入れ 40°C で約 2 時間攪拌し (Takamatsu et al., 1992)、溶出した硫酸イオンを地下水試料と同様にイオンクロマトグラフにより分析した。

5. 1. 2 結果と考察

1) 酸化還元化学種の深度分布

地下水中の酸化還元化学種の濃度は表 4-2、図 5-1 の様に求められた。亜硝酸・硝酸イオン濃度は、深度 60–70m の 2 地点を除いて検出限界 (0.02ppm) 以下である。マンガン濃度は深度とともに減少し、深度約 60m 以深で検出限界 (0.01ppm) 以下になる。一般的にマンガンは酸性–中性・還元的環境で Mn²⁺ イオンとして溶存し、酸化的環境において MnO₂ として沈澱する。また、弱アルカリ条件では、MnCO₃ として存在する。この地域では、地下水の pH が深度とともに中性から弱アルカリ性に変化しており、地下水の化学組成に基づいて熱力学的にマンガンの化学種の地下水に対する飽和指数を計算すると、MnO₂、Mn₃O₄、Mn(OH)₂ が地下水に対して未飽和状態、MnCO₃ が未飽和–飽和平衡状態にあると計算される。そのため、マンガンは MnCO₃ として存在している可能性がある。二価鉄イオンは主に表層部でのみ検出される。これまでの研究で、ボーリングコアにおいて、深度数 m–約 30m の位置に酸化鉄の沈澱が観察されており、二価鉄イオンの濃度プロファイルはボーリングコアの観察事実と整合的である。硫酸イオンは深度 100m 付近を境にそれ以浅と比べて濃度が高くなる傾向がある。硫化水素イオンは深度 60m 以深で検出された。

一方、不整合直下の風化花崗岩部では、亜硝酸・硝酸イオンが認められ上部の堆積岩に比べ酸化的な状態にある事が判る。この理由は、堆積岩が有機物などの還元性物質を多く含み、透水係数が低く地下水流動速度が遅いのに対して、花崗岩は有機物を含まず、割れ目帯等では透水係数が高く地下水流動速度が速

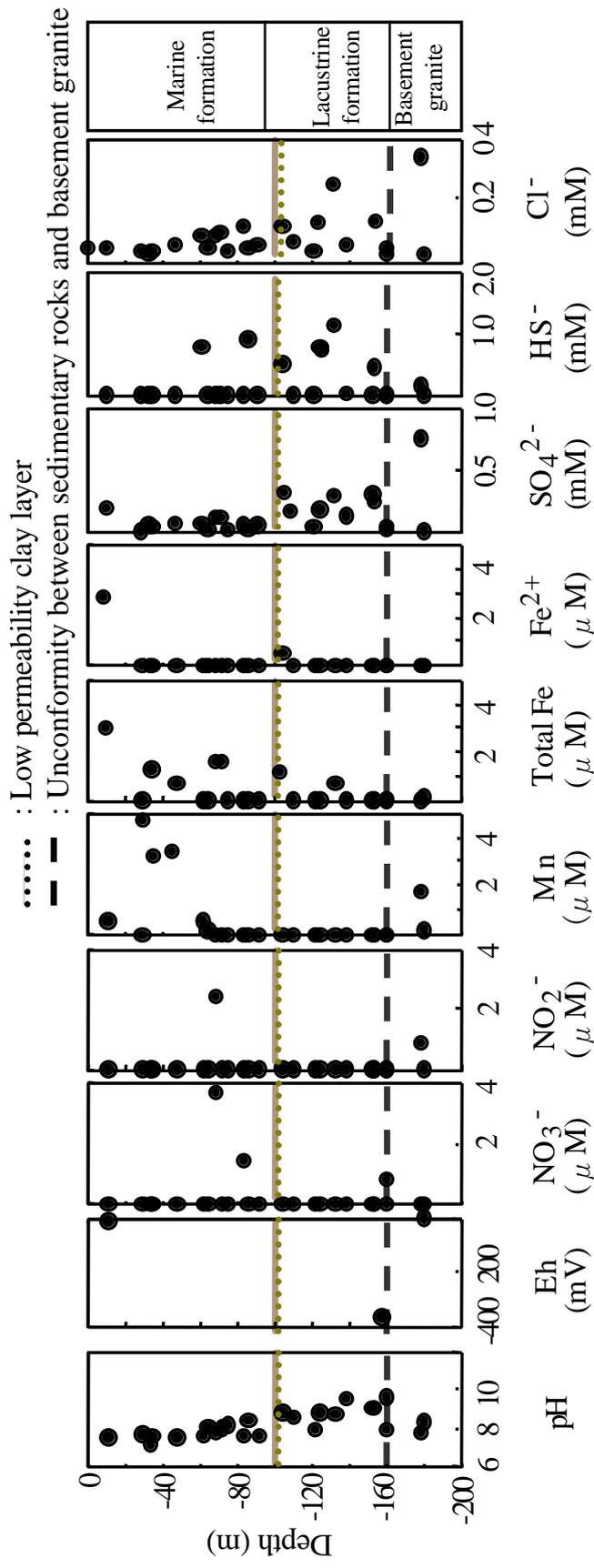


図 5-1 堆積岩中の地下水組成の深度変化

いといった（稲葉ほか，2002）、地球化学的緩衝能力や水理条件の違いに起因すると考えられる。

2) 地下水-鉱物-微生物システムにおける酸化還元プロセス

ウラン鉱床の存在する堆積岩では、これまでの研究で脱窒菌や鉄関連菌（手法上、鉄酸化菌と鉄還元菌の混合集団となっている）、硫酸還元菌が確認されている（Murakami et al., 2002）。これらの微生物と地下の化学環境との相関について考察すると、まず、亜硝酸・硝酸イオン濃度の変化については、一般的に水-鉱物反応による還元反応はなく、生物の呼吸作用により溶存酸素が消費され尽くした後に脱窒菌による脱窒作用が起こっていると考えられる。二価鉄イオンの濃度変化は、無機化学的な酸化・沈澱反応により容易に起こりうるが、鉄関連細菌による鉄酸化反応速度は無機化学的反応の約 100 倍に達することが明らかになっており（Ehrlich, 1996b）、これらの微生物が鉄の沈澱反応に何らかの影響を与えている可能性がある。硫化水素イオンの生成には堆積岩中の黄鉄鉱の溶解反応と微生物による硫酸還元反応の二つのプロセスが考えられる。硫酸還元菌の活動に適した酸化還元電位は-150mV以下（Postgate, 1984）と推測されており、堆積岩深部の酸化還元電位はこの条件を満たしている。また、一般に微生物が硫酸を還元する場合、同位体的に‘重い’硫酸イオン（ $^{32}\text{S}^{16}\text{O}_3^{18}\text{O}^{2-}$ や $^{34}\text{SO}_4^{2-}$ ）に比べ、‘軽い’硫酸イオン（ $^{32}\text{S}^{16}\text{O}_4^{2-}$ ）を優先的に還元する事が知られている（Harrison and Thode, 1958; Lloyd, 1968; Mizutani and Rafter, 1973）。その結果、還元されずに残留した硫酸イオンは‘重い’同位体に富むようになる。硫酸還元菌が確認されたボーリング孔の各深度の地下水について、硫酸イオンの硫黄同位体比を測定した所、硫酸イオン / （硫化水素イオン + 硫酸イオン）比と硫酸イオンの硫黄同位体比の間には負の相関が認められ（図 5-2）、硫酸還元菌により‘軽い’硫酸イオンが優先的に還元され‘重い’硫酸イオンが残留するという同位体濃縮が起こっている事がわかる。調査地域の堆積岩上部（生俵累層・明世累層）は 15-17Ma [百万年前] に堆積した海成層であり、微生物研究が盛んな海洋底における調査では硫酸還元菌が普遍的に観察されていることから、堆積岩中の硫酸還元菌は海成層（化石海水）由来である可能性がある。

以上の観察結果から、堆積岩深部の地下水-鉱物-微生物システムにおける酸化還元反応を図 5-3 の様に整理できる。ウラン鉱化部周辺の強還元環境は、

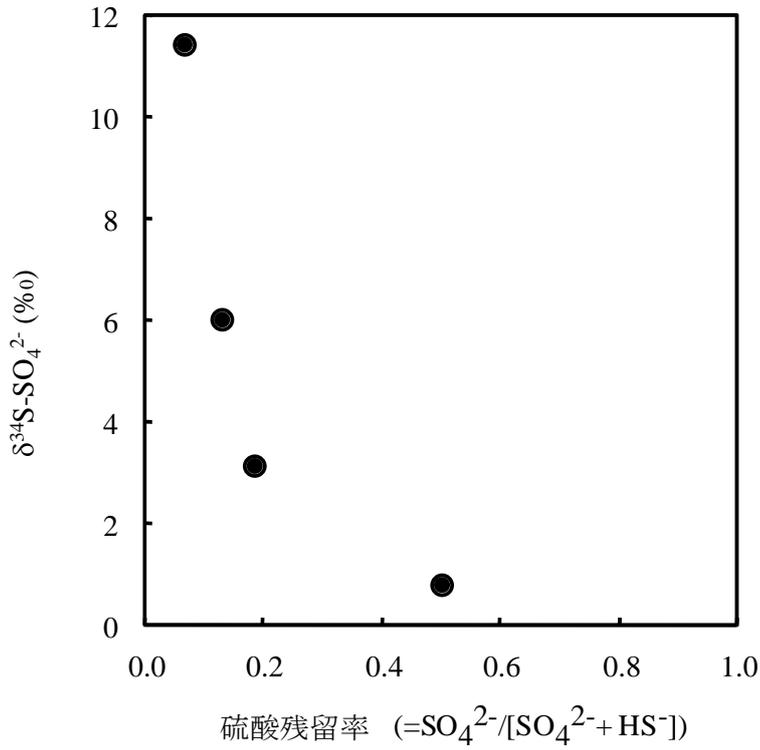


図 5-2 微生物的硫酸還元反応に伴う硫黄同位体変化

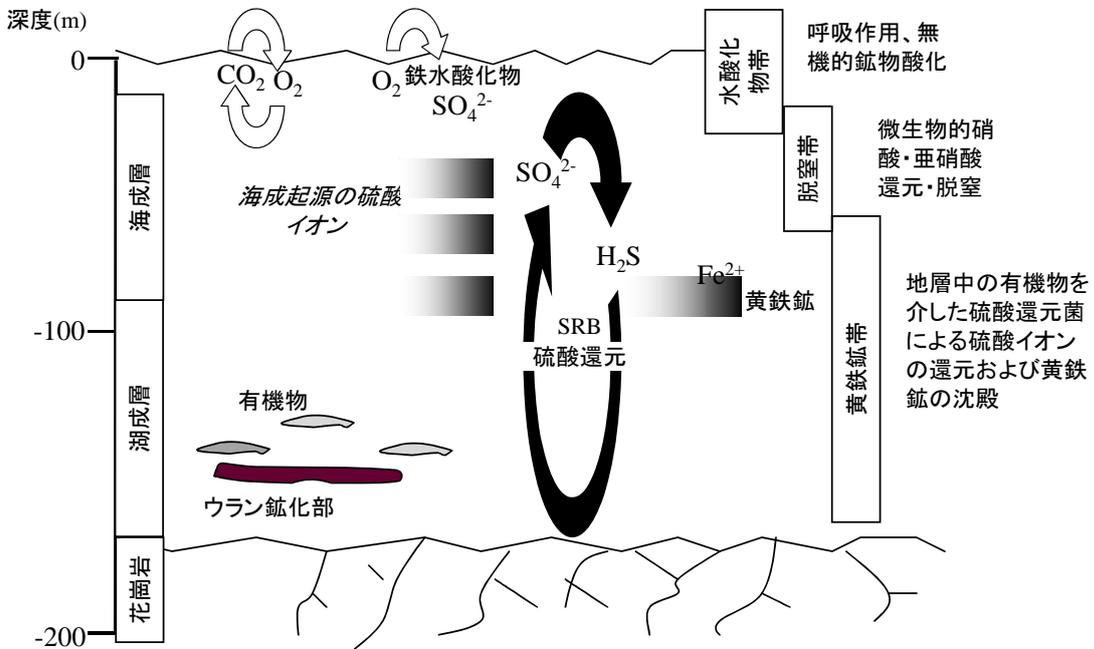
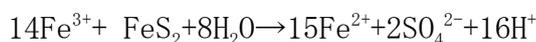


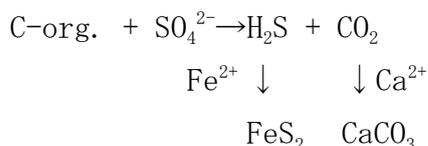
図 5-3 堆積岩深部の地下水-鉱物-微生物システムの概観

黄鉄鉱の溶解反応あるいは硫酸イオンと硫化水素イオン間の酸化還元反応により形成されている。しかしながら無酸素環境においては、黄鉄鉱の溶解は Fe^{3+} 濃度に律速される。



弱アルカリ性のpH条件では Fe^{3+} が液相に安定に存在しないため、無酸素条件下での黄鉄鉱の溶解速度は非常に遅く、 $1\sim 2 \times 10^{-8}$ ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)と求められている (McKibben and Barnes, 1986; Mose and Herman, 1991; Nordstrom and Southam, 1997)。一方、東濃地域の地下原位置の条件では、硫酸イオンを還元する水-鉱物反応は主要ではなく、有機物を還元剤とした微生物的な硫酸還元反応が重要であると考えられる。硫酸還元菌による硫酸還元反応では、細胞内の硫酸還元酵素が生体触媒として働いている。そのため水-鉱物-微生物システムにおける微生物は、無機化学的に想定される反応速度を飛躍的に加速する生体触媒として位置付けることができる。その速度は、栄養条件や硫酸イオン供給速度に依存するが、数日-数週間で反応が安定状態に達し (Berner, 1980; Howarth and Jørgensen, 1984; Westrich and Berner, 1984; Habicht and Canfield, 1997)、地質学的時間スケールでは微生物的な硫酸還元反応は瞬時に平衡状態に達すると見なせる。以上の事を考慮すると、堆積岩深部では黄鉄鉱の溶解反応よりも、硫酸還元菌による硫酸還元およびそれに伴う黄鉄鉱の沈殿反応が、強還元環境の形成に関与していると推察される。実際に堆積岩深部では、多くの黄鉄鉱が有機物の周辺に炭酸塩鉱物とともに沈殿する産状を示し (図 5-4)、このような産状は以下のような水-鉱物-微生物反応により形成されたと推測される。

Sulphate-reducing bacteria



3) ウラン鉱化帯周辺の酸化還元緩衝能力

ウラン鉱化帯深度には難分解性有機物であるリグナイトが含まれている。一方、予察的実験では、リグナイト抽出液で活動できる硫酸還元菌が岩層中に存在していることが確認されており、リグナイト抽出溶液を添加した状態で培養をおこなった場合、硫酸還元反応は著しく促進され、その速度はリグ

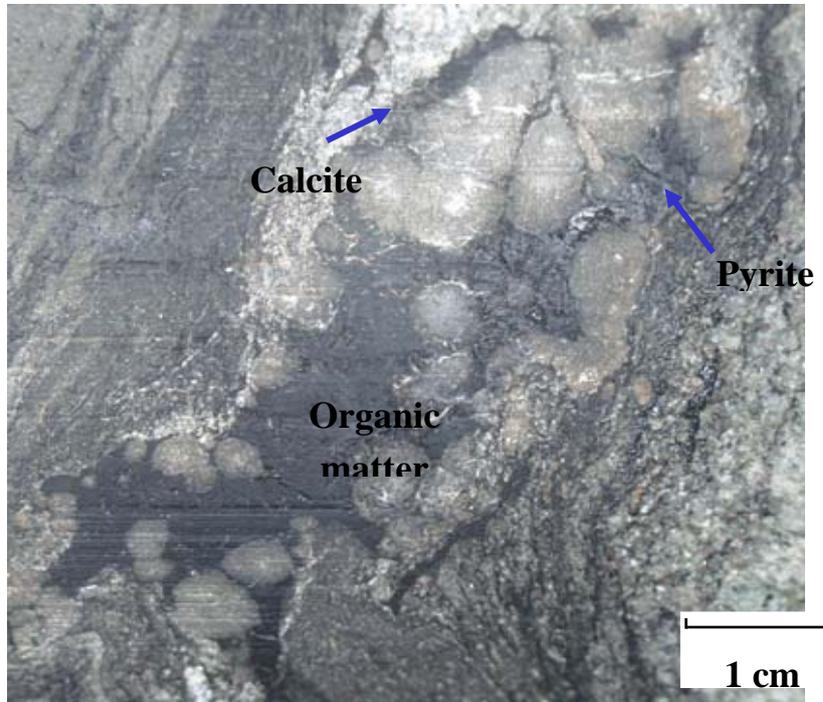


図 5-4 硫酸還元反応に伴う黄鉄鉱、方解石の沈殿

ナイト抽出溶液を添加しない場合に比べて最大約 40 倍に達することが示されている。そのため、地下深部においても実際にリグナイトを起源とする栄養物質を利用して硫酸還元菌が活動していると推察される。また、岩層中にはリグナイトが豊富に存在する事から有機物の供給が十分であり、主に硫酸イオンの供給フラックスが硫酸還元に関わる微生物活性を律速している可能性が考えられる。表層水中の硫酸イオン濃度は約 $0.03 \pm 0.02 \text{mM}$ であり、地下水中の硫酸イオン濃度に比べ低い。そのため、硫酸イオンの起源には中新世の堆積岩中に海水が浸透していた時代に海水から沈澱した海成硫酸塩や硫化物、堆積岩下部に豊富に含まれている有機物等が想定できる。岩石試料中の硫酸態硫黄の分析を行った結果、海成層である明世累層と湖成層でありリグナイトを豊富に含む土岐夾炭累層には明確な違いがあり、明世累層（表層から深度約 40m）は土岐夾炭累層に比べ硫酸態硫黄に富む事が明らかになった（表 5-1）。これは、海成層がもともと硫酸態硫黄を多く含んでいた、あるいは堆積岩上部は酸化的風化を受けやすく、海成硫酸塩や硫化物等から硫酸イオンが溶出しやすい環境にあるためと考えられ、硫酸イオンの起源は主に堆積岩上部の海成層であると推察される。また、地下水中の硫酸イオン濃度と塩素イオン濃度には正の相関 ($[\text{SO}_4^{2-}] = 2.07 [\text{Cl}^-] - 0.04$ 相関係数 $r = 0.91$) が認められる（図 5-5）。

Shikazono and Utada (1997) によると、この地域の堆積岩中の黄鉄鉱の硫黄同位体比は、中新世の海水中の硫酸イオンの硫黄同位体比 +20‰ (Claypool et al., 1980) に比べ -14‰ +43‰ と幅広い値を示している。このように幅広い値を示す理由としては、硫酸還元反応時の分別係数や反応進行度の違い、あるいは地層中の硫酸塩鉱物、硫化鉱物の再溶解により、黄鉄鉱の起源となった硫酸イオンの硫黄同位体比が幅広い値を持っていた可能性が考えられる。Shikazono and Nakata (1999) では、 ^{34}S に富む黄鉄鉱は堆積岩上部の海成層の堆積後、この地域が陸地化する過程で、海水／淡水境界の移動に附随した酸化還元環境の変化に伴い生物化学的な還元反応により沈殿し、沈殿後長期にわたって保存されていると推察している。しかしながら、現在観察される硫酸還元菌が海成層に由来すると仮定すると、Shikazono and Utada (1997) に示された黄鉄鉱の沈殿時期以降も海水が淡水に置き換わった後、海成層から硫酸イオンが溶脱して堆積岩下部に供給されることで同様の生物化学的硫酸還元反応により黄鉄鉱の沈殿反応が続いてきた可能性が示唆される。また、東濃地域の地史を考慮すると、幅広い値を示す黄鉄鉱の硫黄同位体比は、この地域が現在を含めて何度

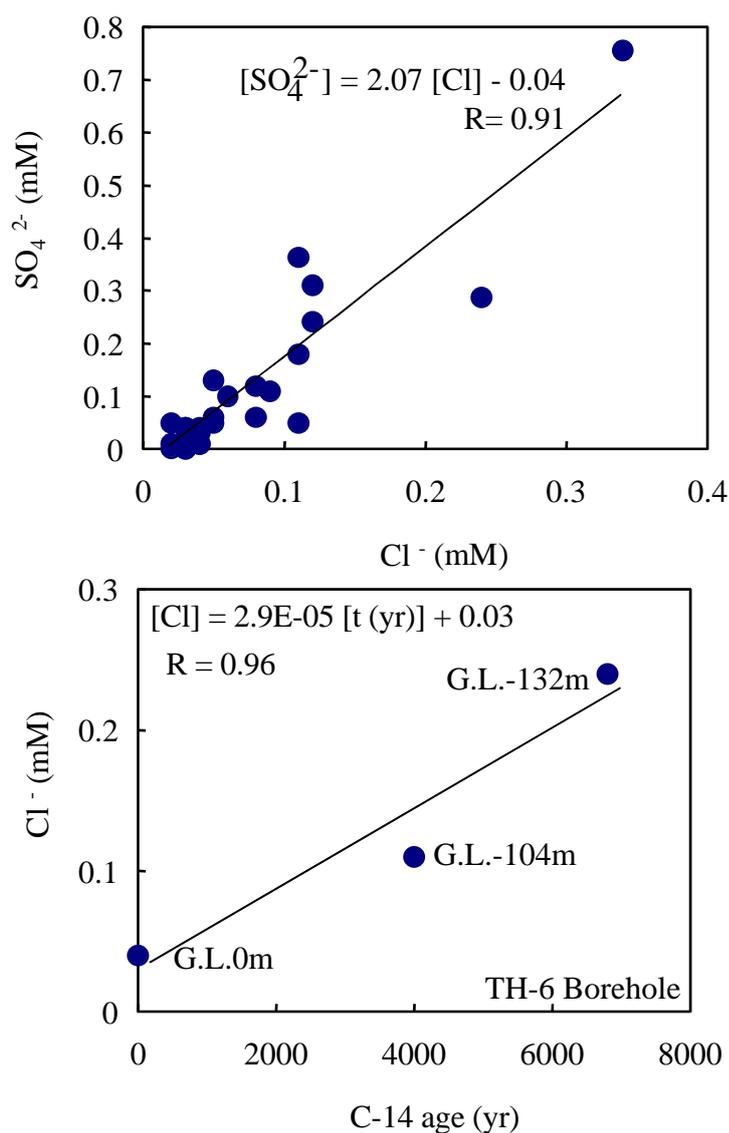


図 5-5 地下水中の硫酸イオン、塩素イオン濃度、C-14 年代の相関

表 5-1 岩層中の硫酸態硫黄濃度と硫酸供給期間の見積もり例

Borehole	Depth (m)	Formation	Rock type	S- so_4^{2-} content (m mol/g)	Duration of SO_4^{2-} dissolution (Ma)
MIU-2	13	Akeyo F.	Sandstone	0.0044	0.29
MIU-2	28	Akeyo F.	Sandstone	0.0023	0.15
MIU-2	37	Akeyo F.	Silt	0.0028	0.19
MIU-2	51	Toki F.	Lignite, sandstone	0.0009	0.06
MIU-2	62	Toki F.	Mudstone	0.0010	0.06
MIU-2	80	Toki F.	Sandstone	0.0007	0.05

か陸地化した間に地表面の削剥などに伴う酸化フロントの移動に伴って、一度沈殿した³⁴Sに富む黄鉄鉱が堆積岩浅部で再溶解し、地下水に供給された硫酸イオンが深部に至って再度生物化学的に還元され、更に³⁴Sに富む黄鉄鉱が沈殿するといった“硫黄のリサイクル還元”プロセスで形成された可能性も考えられる。この場合、現在までこの地域に起こってきた地盤の隆起、浸食に伴う地下水流動環境の変化に対して、堆積岩深部ではそれに応じた硫黄の化学種の酸化還元反応により還元環境が維持されてきたと推察できる。

地下水中の硫酸イオン濃度は既に微生物還元を受けた後の値であり、地下水年代と硫酸イオン濃度からその溶出速度を直接求める事はできない。一方、塩素イオンは、岩層から溶出した後地下水から無機的・有機的に除去されるメカニズムがないため地下水の流動年代と正の相関 ($[Cl^- (mM)] = 2.9 \times 10^{-5} [time (yr)] + 0.03$ 相関係数 $r=0.96$) がある。そのため、塩素イオンの溶出速度からみかけ上の硫酸イオンの溶出速度を見積もることができる。硫酸還元菌が確認されているボーリング孔のデータを用いると、海成層中の地下水の年代と塩素イオン濃度から塩素イオンの溶出速度は $2.9 \times 10^{-5} \text{ mM / yr}$ と見積ることができる。硫酸イオンが塩素イオンとともに溶出しているとする、硫酸イオン濃度-塩素イオン濃度の相関式 (上述) から、硫酸イオンの溶出速度は約 $6.0 \times 10^{-5} \text{ mM / yr}$ と算出できる。

現在は地表から浸透する淡水により堆積岩中の硫酸塩が硫酸イオンとして溶出され、地下水に絶えず供給される状態にあると推察され、この硫酸イオンが供給される限り微生物による硫酸還元が続き、地下の還元環境が維持されると予想される。今後も現在と同様の水理環境が持続した場合、堆積岩中の硫酸塩含有量と硫酸イオン溶出速度から、硫酸イオンが地下水中に供給され生物化学的硫酸還元反応の持続する期間を以下のように見積ることができる。

$$\text{硫酸イオンの溶出期間} = (S \times D) / (V \times W)$$

S : 岩層中の硫黄成分含有量 (mol/g)

D : 岩石比重 : $2.0 \text{ (g/cm}^3\text{)}$

V : 硫酸イオン溶出速度 : $6.0 \times 10^{-5} \text{ (m mol/l/yr)}$

W : 含水率 : 50%

岩石比重と含水率は東濃地域の代表的値を使用した。

各深度の岩石は 1 g 当たり数万年～数十万年間、硫酸イオンを供給する能力があると見積る事ができ (表 5-1)、岩盤全体では更に長期的に生物化学的硫酸還

元反応を継続させるのに十分な量の反応物質が存在している。見積られた値は、一本のボーリング孔の硫酸態硫黄含有量に基づく一例であり、正確には酸化フロントの移動に伴う硫化物の酸化も考慮に入れなければならない。また、地下水の滞留年代のデータが非常に少ないため地下水年代と塩素濃度の相関式の傾きによって結果が大きく変動するという欠点がある。しかしながら、無機化学的な反応のみでなく生物化学的な反応が大きく関与して酸化還元環境が決まっている自然界において長期的な酸化還元環境の変化を推測するためには、このような解析手法が有効と考えられ、ここでは、堆積岩中の水-鉱物-微生物システムによる酸化還元緩衝能力の評価方法の例として示した。今後の課題として、他のボーリング孔についても硫酸態硫黄含有量や地下水の滞留時間を把握し、硫酸イオンの溶出期間について代表的な値を求める必要がある。また、地表付近の浸蝕により酸化帯の深度が増していく事も予想されるが、その場合も酸化状態に晒された還元態硫黄が酸化され地下水中に硫酸イオンとして溶出し、地下深部に供給される事で深部の生物化学的硫酸還元反応は続くと推察される。

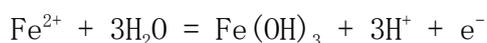
地下水-鉱物-微生物相互反応系の解析から、ウラン鉱床が長期間岩盤中に保持されうるための強還元状態を維持するために、硫酸還元菌が重要な役割を果たしている事が明らかになった。これらの硫酸還元菌による強還元状態の形成は、酸化剤（電子受容体）となる硫酸イオンと電子供与体となる有機物の供給量に律速される。この地域の堆積岩のように、岩層中に有機物が豊富にあり、地下水の総溶存成分濃度が低い環境においては、岩層から地下水へ長期にわたって供給される硫酸イオンを硫酸還元菌が有機物を使って還元する事で地下水の還元環境が維持され、ウラン鉱床が長期的に保存されてきた要因の一つと考えられる。岩層中の硫酸塩含有量とその溶出速度から、生物化学的な硫酸還元反応の持続する期間を推測する事ができ、この地域の堆積岩は、現在と同様の地下水理条件が維持された場合、今後も数十万年間以上の長期に渡って還元環境を維持する還元緩衝能力を持っていると推測される。

5.2 花崗岩中の地下水-鉱物-微生物システム

5.2.1 花崗岩地下水における鉄関連細菌と酸化還元境界

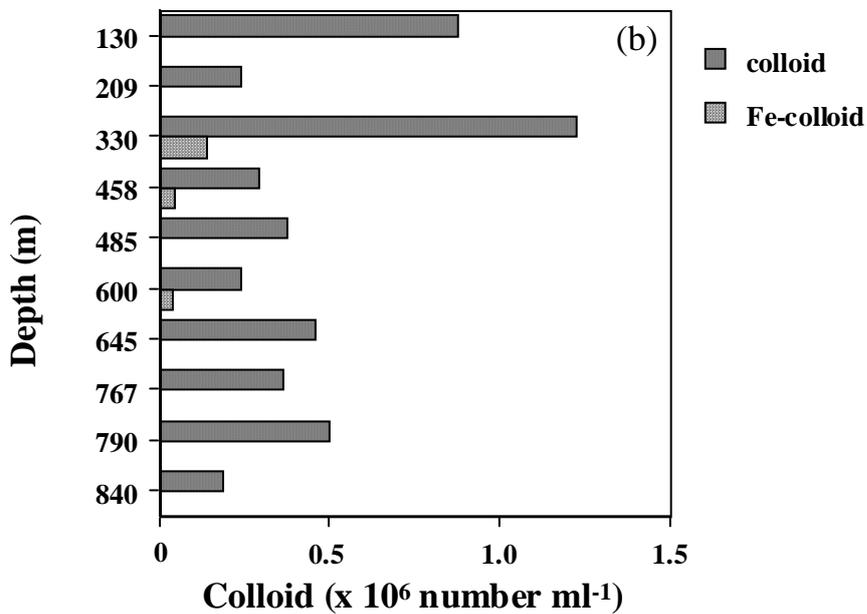
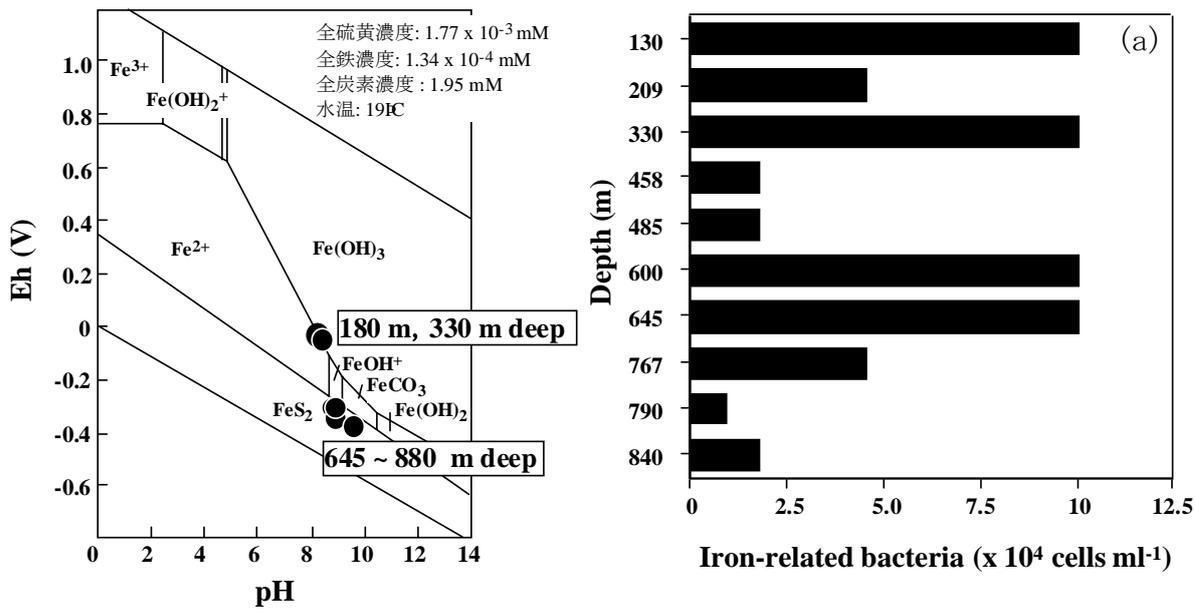
鉄関連細菌培養キット（IRB-BART）から得られた花崗岩（DH-3 号孔）地下水

中の鉄関連細菌密度は、特徴的な深度プロファイルを形成していた。一方、図5-6は東濃地域の花崗岩における鉄の化学種に関する酸化還元電位 (Eh)-pHダイアグラムを示したものである。孔内原位置測定プローブを用いて測定した酸化還元電位 (深度 180, 330 m付近において-16 - 0 mV, 深度 500 - 1000 mにて-385 - -260 mV) およびpHをもとに (JNC, 2000; 濱, 岩月, 1998)、それぞれの地下水中に存在する鉄の化学種の特性をダイアグラムから判断すると、深度 180 m, 330 m付近の地下水のpH, 酸化還元電位値は Fe^{2+} と Fe^{3+} の酸化還元境界に相当し、次式のような鉄の化学種の酸化還元反応が酸化還元電位に寄与していると考えられる。



これらの深度は、IRB-BARTによる培養結果から得られた鉄関連細菌のピークのうちの一つである 130 mおよび 330 mとほぼ一致していた。したがって、深度 130 mおよび 330 mにおいて高密度に検出された鉄関連細菌は、その代謝反応として主に前述した式のような鉄酸化反応をおこなっているものと推察される。しかし、深度 130 mおよび 330 mの間に位置する採水地点である深度 209 mにおいては、高密度の鉄関連細菌は検出されなかった。その理由として、深度 209 mにおけるpHは 11.1 であり、深度 130 mおよび 330 mと比較するとアルカリ性である。そのため、この深度における地下水は鉄の化学種の酸化還元境界とは一致していない。この酸化還元条件にて安定な鉄の化学種は $\text{Fe}(\text{OH})_3$ であり、おそらくこの付近の鉄はすでに3価の鉄として存在しており、微生物による鉄酸化は起こりにくい可能性が高い。深度 209 mでは鉄関連細菌の著しい増殖が見られなかったのはそのためであると考えられる。酸化還元境界を示す深度と鉄関連細菌の増殖の一致は、微生物が酸化還元境界という条件に影響を及ぼされているということを示唆する。一方で、微生物活動の影響によって環境中の鉄の化学種が左右され、酸化還元境界に影響しているという可能性もぬぐい去れない。少なくとも酸化還元境界が微生物の増殖にとって好条件であるという可能性は示唆された。

一方で、500 m以深の花崗岩における地下水の酸化還元電位は、鉄の化学種の酸化還元境界と一致しておらず、この付近の酸化還元電位は鉄ではなく硫黄の化学種に支配されている (JNC, 2000)。鉄関連細菌のピークが深度 600, 645 mにおいても確認された。この付近の鉄関連細菌は、酸化還元電位とは別の要因によって生存していると考えられる。



(a) DH-3号孔における鉄関連細菌 (iron-related bacteria) の深度 (depth) プロファイル。鉄関連細菌は、深度130, 330 mおよび600 - 645 mの2カ所において著しく高い密度を示していた。(b) 上図の鉄関連細菌の培養液中で観察されたコロイド粒子 (colloid) の深度 (depth) プロファイル。コロイド粒子密度が高い培養液の深度は、鉄関連細菌密度のピークのうち、浅い方と一致していた。

図 5-6 花崗岩中の地下水における鉄関連細菌の存在量とコロイド生成能力

5. 2. 2 鉄関連細菌によるコロイドの生成

微生物による鉄酸化反応は、 $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{FeOOH}$ もしくは $\text{Fe}(\text{OH})_3$ のような沈殿物の状態まで進むことがしばしばある (Madigan et al., 1999) . したがって、本研究では、花崗岩浅層部の地下水中に存在する微生物が、沈殿物形成まで反応を進めることができるかどうかを確認するため、鉄関連細菌の培養液を走査型電子顕微鏡 (JSM-5400LV, JEOL) で観察した. その結果、培養液中にはコロイド粒子が多数形成されており、その量は地下水を採取した深度によって異なっていた (図 5-7) . 微生物を殺した状態の培養液ではコロイド粒子が形成されていなかったため、培養液中のコロイド粒子は微生物由来だと考えられる. 観察された各コロイド粒子の組成を分析するために、エネルギー分散分析 (EDS: JED-2110, JEOL) をおこなったところ、主に鉄が検出されたことから、コロイド粒子は酸化鉄と推定された. コロイド粒子は、培養液 1 mlあたり $1.8 \times 10^5 - 1.2 \times 10^6$ 個存在し、深度 130 mおよび 330 mにおいて高密度のコロイド粒子が観察された. 以上のことから、花崗岩浅層部の地下水中には、酸化鉄コロイドを生成する能力をもつ細菌密度が高いことが示唆された. 微生物の中には、鉄を酸化することによってエネルギーを獲得し、その副産物として酸化鉄のコロイド粒子を生成するものが存在し、*Gallionella*, *Leptothrex*などがその種として知られている (Madigan et al., 1999; Ferris, et al., 1999) . 原位置の地下水には分子状酸素が存在しない. そのため、これらの細菌は分子状酸素の代替物として硝酸イオンを用いることによって、鉄の酸化をおこなうと考えられる. 硝酸と鉄を利用した微生物の代謝反応が、原位置における地下水中の地球化学的な酸化還元反応に関わっている可能性は十分に考えられる. 本研究で観察された鉄コロイドは、微生物の培養液から検出されたものであり、実際の地下水中で観察されたものではない. しかし、掘削によってDH-3 号孔の土岐花崗岩から回収された岩石コアを観察すると、深度 300 m付近にて小球状の酸化鉄の沈着が多数観察された (図 5-8) . DH-3 号孔のみでなく、東濃地域に基盤岩として分布する土岐花崗岩上部の割れ目近傍には、鉄酸化鉱物、あるいは水酸化鉄の沈着が観察されている (太田ほか, 1999) . これらの酸化鉄の沈着が認められた部分は、コロイド生成能力を持つ鉄酸化細菌が検出された地下水の深度とほぼ一致しており、これらの小球状鉄沈着に鉄酸化細菌の活動

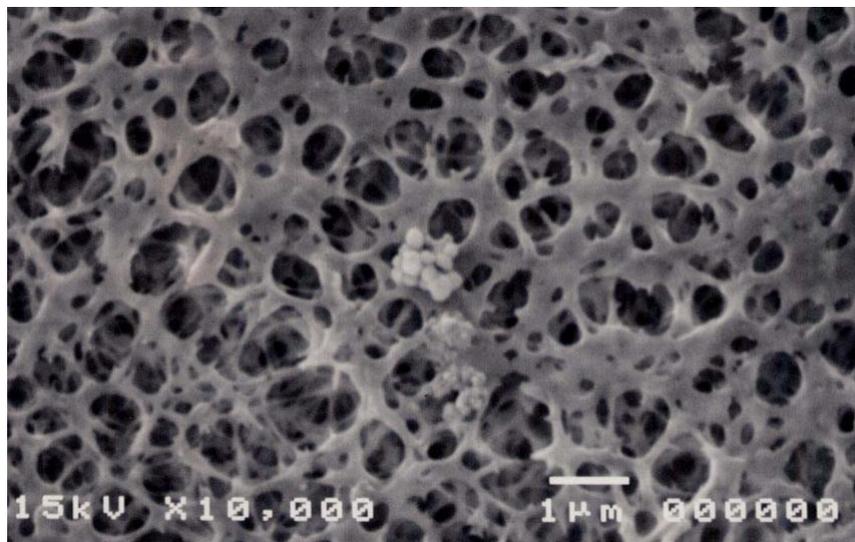
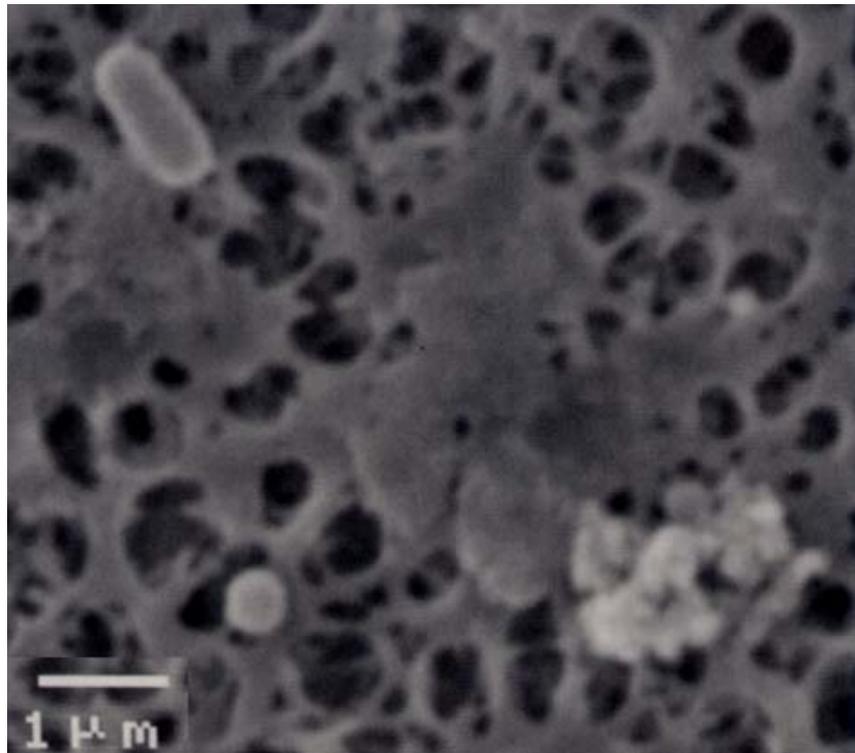


図 5-7 鉄関連細菌により生成された鉄コロイド (SEM 写真)



図 5-8 浅部花崗岩の割れ目表面で観察される小粒状の水酸化鉄の沈殿

が関与している可能性がある。つまり、鉄酸化細菌の増殖によって鉄コロイドが生成し、岩石に沈着したのではないかと推察される。このような現象は他の花崗岩においても観察されており、スウェーデンの Äspö 地下研究施設においても、鉄酸化細菌である *Gallionella ferruginea* が花崗岩の亀裂表面に酸化鉄の沈殿物を形成した痕跡が報告されている (Ferris, *et al.*, 1999)。地下に生息する鉄酸化細菌が地下水を媒体として鉱物の生成に関与している可能性は高く、今後は微生物の活性および影響の大きさを明らかにする必要がある。

6. まとめ（地層処分研究開発への反映）

本共同研究において以下の成果を得る事ができた。

・微生物研究のための手法開発

試錐孔掘削時に採取される地下水、岩石試料について、微生物調査の観点から品質を担保した試料を得るための、トレーサー選定・管理手法、岩石のサブコアリングシステム等の開発を行った。また、岩石中の微生物を分析するために、こういった岩石学的特徴をもった試料が適しているのか、汚染の定量的な把握手法について技術を確立した。これらの技術は、地下微生物の研究を行うにあたり不可欠な技術であり、今後の地下微生物研究の先行技術となるものである。

・地下深部における微生物生態系の把握

堆積岩および花崗岩中の地下微生物生態系について、深度分布や岩相毎の種組成、存在量、活性等を明らかにすることができた。地下微生物は概して、深度や地質構造毎に存在量や種組成が変化し、主に地下水の化学的条件や岩相（栄養物質等）により規制されていると推察された。地層処分システムの性能評価や安全評価に関連する事項としては、酸化還元状態に関わる微生物種が深度とともに変化し、各深度の地下水の酸化還元条件に適合した微生物種が酸化還元反応に関与する事で酸化還元状態に影響を与えていると考えられた。これらの酸化還元に関わる微生物の深度分布は、一般的に想定されている主要酸化還元反応の深度変化と整合的だった。

・微生物活動と地球化学環境の関わりの把握

ウラン鉱床周辺での微生物活動と地球化学環境の関わり、花崗岩の割れ目中の微生物の活動について把握する事ができた。ウラン鉱床周辺においては、長期的に微生物（特に硫酸還元菌）による酸化還元緩衝反応が、ウラン鉱床を保持してきた還元状態の形成に対して重要な役割を果たしてきたと考えられた。また、地下水-鉱物-微生物相互反応系という視点で地下深部の長期的酸化還元緩衝能力を評価する手法を例示する事ができた。花崗岩の割れ目部における微生物活動については、花崗岩上部で鉄関連細菌によるコロイド生成、割れ目充填の可能性について検討し、花崗岩中の鉄関連細菌が十分なコロイド生成能力

を持っている事が示された。この影響の程度については、今後の更なる研究が必要である。

以上、共同研究前には不明確であった点について、幾つかの点を明かにすることができた。本共同研究では、主に地下の酸化還元反応に関わる微生物種について、その影響評価の手法を開発してきた。しかしながら、地層処分研究開発上、評価が必要とされる、1) 微生物による水素ガス生成、2) 核種の移動挙動に微生物が直接的に与える影響(核種の取込み、コロイド化等)、3) 地下水・岩石中の有機物への影響(有機物の動態化等)、等については未解明である。そのため、これらの項目についても今後基礎的な研究を行っていく必要がある。

参照文献

- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Amy, P.S., and D.L. Haldeman (eds.). 1997. *The Microbiology of the Terrestrial Deep Subsurface*. CRC Press, Florida.
- Auty, M.A.E., G.E. Gardiner, S.J. McBrearty, E.O. O'sullivan, D.M. Mulvihill, J.K. Collins, G.F. Fitzgerald, C. Stanton, and R.P. Ross. 2001. Direct in situ viability assessment of bacteria in probiotic dairy products using viability staining in conjunction with confocal scanning laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 420-425.
- Balkwill, D.L., and W.C. Ghiorse. 1985. Characterization of subsurface bacteria associated with two shallow aquifers in Oklahoma. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 580.
- Bano, N., and J.T. Hollibaugh. 2000. Diversity and distribution of DNA sequences with affinity to ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class proteobacteria in the Arctic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1960-1969.
- Berner, R. A. 1980. A rate model for organic matter decomposition during bacterial sulfate reduction in marine sediments. In *Biochemistry of organic matter at the sediment-water interface. CNRS Int. Colloq.* 35-44.
- Bhupathiraju, V.K., M. Hernandez, D. Landfear, and L. Alvarez-Cohen. 1999. Application of a tetrazolium dye as an indicator of viability in anaerobic bacteria. *J. Microbiological Methods.* 37, 231-243.
- Black, W.H., H.R. Smith, and F.D. Patton. 1986. Multiple level groundwater monitoring with the MP System. In *Proc. NWWA-AGU Conf. On Surface and Borehole Geophysical Methods and Groundwater Instrumentation*, p. 41-61.
- Blackburn, T.H., and N.D. Blackburn. 1992. Model of nitrification and denitrification in marine sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 100, 517-522.
- Blöchl, E., R. Rachel, S. Buggraf, D. Hafenbradl, H.W. Jannasch and K.O. Stetter. 1997. *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113°C. *Extremophiles*, 1, 14-21.
- Brace, W.F. 1968. Permeability of granite under high pressure. *J. geophys. Res.* 73, 2225-2236.
- Breeuwer, P., J-L. Drocourt, N. Bunschoten, M.H. Zwietering, F.M. Rombouts, and T. Abee.

1995. Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1614-1619.
- Brunius, G. 1980. Technical aspects of the use of 3',6'-diacetyl fluorescein for vital fluorescent staining of bacteria. *Curr. Microbiol.* 4, 321-323.
- 微生物研究法懇談会編. 1975. VI 生理的性状観察法 1. 増殖測定法,「微生物学実験法」講談社サイエンティフィック, 205-217.
- Chang, Y-J., A.D. Peacock, P.E. Long, J.R. Stephen, J.P. McKinley, S.J. Macnaughton, A.K.M.A. Hussain, A.M. Saxton, and D.C. White. 2001. Diversity and characterization of sulfate-reducing bacteria in groundwater at a uranium mill tailings site. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3149-3160.
- Chapelle, F.H., and P.B. McMahon. 1991. Geochemistry of dissolved inorganic carbon in a coastal plain aquifer. 1. Sulfate from confining beds as an oxidant in microbial CO₂ production. *J. Hydrol.* 127, 85-108.
- Chapelle, F.H., J.T. Morris, P.B. McMahon, and J.L. Zelibor. 1988. Bacterial metabolism and the $\delta^{13}\text{C}$ composition of groundwater, Floridan aquifer system, South Carolina. *Geology* 16, 117.
- Chrzanowski, T.H., R.D. Crotty, J.G. Hubbard, and R.P. Welch. 1984. Applicability of the fluorescein diacetate method of detecting active bacteria in freshwater. *Microb. Ecol.* 10, 179-185.
- Claypool, G. E., Holser, W. T., Kaplan, T. R., Sakai, H. and Zak, I. 1980. The age curves of sulfur and oxygen isotopes in marine sulfate and their mutual interpretation. *Chem. Geol.* 28, 199-260.
- Cole, J.J., S. Findlay, and M.L. Pace. 1988. Bacterial production in fresh and saltwater ecosystem, a cross-system overview. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 63, 253-259.
- Colwell, F.S., G.J. Stormberg, T.J. Phelps, S.A. Birnbaum, J.P. McKinley, S.A. Rawson, C. Veverka, S. Goodwin, P.E. Long, B.F. Russell, T. Garland, D. Thompson, P. Skinner, and S. Grover. 1992. Innovative techniques for collection of saturated and unsaturated subsurface basalts and sediments for microbiological characterization. *J. Microbiol. Methods* 15, 279-292.

- Cragg, B.A., S.M. Harvey, J.C. Fry, R.A. Herbert, and R.J. Parkes. 1992. Bacterial biomass and activity in the deep sediment layers of the Japan Sea, hole 798B. *Proc. ODP Sci. Res.* 127/128, Pt. 1, 761-776.
- Drever, J.I. 1988. The geochemistry of natural waters (2nd ed.). Prentice Hall, New Jersey. p. 437.
- Ehrlich, H. L. 1996a. Geomicrobiology. (3rd ed.). New York: Marcel Dekker, Inc., p. 719.
- Ehrlich, H. L. 1996b. How microbes influence mineral growth and dissolution. *Chem. Geol.* **132**, 5-9.
- Ferris, F.G., K.O. Konhauser, B. Lyven, and K. Pedersen. 1999. Accumulation of metals by bacteriogenic iron oxides in a subterranean environment. *Geomicrobiol. J.* 16, 181-192.
- Fredrickson, J.K., F.J. Brockman, B.N. Bjornstad, P.E. Long, S.W. Li, J.P. McKinley, J.V. Wright, J.L. Conca, T.L. Kieft, and D.L. Balkwill. 1993. Microbiological characteristics of pristine and contaminated deep vadose sediments from an arid region. *Geomicrobiol. J.* 11, 95-107.
- Fredrickson, J.K., S.W. Li, F.J. Brockman, D.L. Haldeman, P.S. Amy, and D.L. Balkwill. 1995. Time-dependent changes in viable numbers and activities of aerobic heterotrophic bacteria in subsurface samples. *J. Microbiological Methods*, 21, 253-265.
- Fredrickson, J.K., J.M. Zachara, D.W. Kennedy, H. Dong, T.C. Onstott, N.W. Hinman, and S. Li. 1998. Biogenic iron mineralization accompanying the dissimilatory reduction of hydrous ferric oxide by a groundwater bacterium. *Geochim. Cosmochim. Acta* 62, 3239-3257.
- Fredrickson, J.K., and M. Fletcher (eds.) 2001. Subsurface Microgeobiology and Biogeochemistry. Wiley-Liss, Inc., New York.
- Fuller, M.E., S.H. Streger, R.K. Rothmel, B.J. Mailloux, J.A. Hall, T.C. Onstott, J.K. Fredrickson, D.L. Balkwill, and M.F. DeFlaun. 2000. Development of a vital fluorescent staining method for monitoring bacterial transport in subsurface environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4486-4496.
- Habicht, K. S. and Canfield, D. E. 1997. Sulfur isotope fractionation during bacterial sulfate reduction in organic-rich sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* **61**, 5351-5361.
- Hallbeck, L. 1993. On the biology of the iron-oxidizing and stalk-forming bacterium *Gallionella ferruginea*. Department of General and Marine Microbiology, University of Göteborg, Göteborg, Sweden.
- Hallbeck, L., and K. Pedersen. 1991. Autotrophic and mixotrophic growth of *Gallionella*

ferruginea. *J. Gen. Microbiol.* 137, 2657-2661.

濱 克宏, 岩月 輝希. 1998. 東濃地域における広域地下水流動研究—深部地下水の地球化学特性について—. 日本応用地質学会 平成 10 年度研究発表会講演論文集, p. 17-20.

Harrison, A. G. and Thode, H. G. 1958. Mechanism of bacterial reduction of sulfate from isotopic fractionation studies. *Trans. Farad. Soc.* **54**, 84-92.

Haveman, S.A., K. Pedersen, and P. Ruotsalainen. 1999. Distribution and metabolic diversity of microorganisms in deep igneous rock aquifers of Finland. *Geomicrobiol. J.* 16, 277-294.

Howarth, R.W. and Jørgensen, B. B. 1984. Formation of ³⁵S-labelled elemental sulfur and pyrite in coastal marine sediments (Limfjorden and Kysing Fjord, Denmark) during short-term ³⁵SO₄²⁻ reduction measurements. *Geochim. Cosmochim. Acta* **48**, 1807-1818.

稲葉薫, 三枝博光, Matthew J. White, Peter Robinson. 2002. 地下水流動の予測解析統合システム (GEOMASS システム) の概要と東濃地域への適用事例. 地下水学会誌, **44**, 105-123.

Iturriaga, R., 1979. Bacterial activity related to sedimenting particulate matter. *Mar. Biol.* **55**, 157-169.

糸魚川淳二 1980. 瑞浪地域の地質. 瑞浪市化石博物館専報, no. 1, p. 1-50.

糸魚川淳二 1988. 瀬戸内区の中新統. 「日本の地質 5 中部地方 II」, 共立出版, p. 116-120.

Iwatsuki, T., and H. Yoshida. 1999. Groundwater chemistry and fracture mineralogy in the basement granitic rock in the Tono uranium mine area, Gifu Prefecture, Japan, Groundwater composition, Eh evolution analysis by fracture filling materials. *Geochem. J.* **33**, 19-32.

岩月輝希, 豊島賢治, 吉田英一. 1998. 深地層を対象とした地下水の地球化学調査の現状. *原子力バックエンド研究* **4**, 73-81.

Iwatsuki, T., R. Metcalfe, K. Amano, K. Hama, N. Noda, R.C. Arthur, and H. Sasamoto. 2001a. Data book on groundwater chemistry in the Tono area. Japan Nuclear Cycle Development Institute Report, JNC TN 7450 2001-003, Tono Geoscience Center, Japan Nuclear Cycle Development Institute.

Iwatsuki, T., S. Xu, Y. Mizutani, K. Hama, H. Saegusa, and K. Nakano. 2001b. Carbon-14 study of groundwater in the sedimentary rocks at the Tono study site, central Japan. *Applied Geochemistry* **16**, 849-859.

- Jansen, P.H., A. Schuhmann, E. Morschell, and F.A. Rainey. 1997. Novel anaerobic ultramicrobacteria belonging to the Verrucomicrobiales lineage of bacterial descent isolated by dilution culture from anoxic rice paddy soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1382-1388.
- Japan Nuclear Cycle Development Institute. 2000. Project to Establish Scientific and Technical Basis for HLW Disposal in Japan, Project Overview Report. Supplement Report 1. JNC TN 1410 2000-002.
- Kieft, T.L., and T.J. Phelps. 1997. Life in the slow lane: activities of microorganisms in the subsurface. *In The Microbiology of the Terrestrial Deep Subsurface*. P.S. Amy, D.L. Haldeman (eds). CRC Press, Florida. p. 137-163.
- Kieft, T.L. 2000. Size matters, dwarf cells in soil and subsurface terrestrial environments. *In Nonculturable Microorganisms in the Environment*. R.R. Colwell and D.J. Grimes (eds.), ASM Press, Washington, DC, p. 19-46.
- Kogure, K., U. Simidu, and N. Taga. 1979. A tentative direct microscopic method of counting living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 25, 415-420.
- Kuznetsov, A.I., M.V. Ivanov, and N.K. Lyalikova. 1995. Introduction to Geological Microbiology. Engl. Ed. McGraw-Hill, New York, NY.
- Lawrence, J.R., D.R. Korber, G.M. Wolfaardt, and D.E. Caldwell. 1997. Analytical imaging and microscopy techniques. *In Manual of Environmental Microbiology*. C.J. Hurst, G.R. Knudsen, M.J. McInerney, L.D. Stetzenbach and M.V. Walter (eds). ASM Press, Washington, D.C. p. 29-51.
- Lehman, R.M., F.F. Roberto, D. Earley, D.F. Bruhn, S.E. Brink, S.P. O'connell, M.E. Delwiche, and F.S. Colwell. 2001. Attached and unattached bacterial communities in a 120-meter corehole in an acidic, crystalline rock aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2095-2106.
- Lipman, D.J., and W.R. Person. 1985. Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science*, 227, 1435-1441.
- Lloyd, R. M. 1968. Oxygen isotopic behavior in the sulfate-water system. *J. Geophys. Res.* 73, 6099-6110.
- Lovley, D.R. 2000. Environmental Microbe-Metal Interactions. ASM Press, Washington, DC.
- Lovley, D.R. 2001. Reduction of iron and humics in subsurface environments. *In Subsurface Microbiology and Biogeochemistry*. J.K. Fredrickson, M. Fletcher (eds), Wiley-Liss, Inc., New York, p. 193-217.

- Madigan, M.T., J.M. Martinko, and J. Parker. (eds.). 1999. Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall International, Inc. New Jersey.
- McKibben, M. A. and Barnes, H. L. 1986. Oxidation of pyrite in low temperature acidic solutions-Rate laws and surface textures. *Geochim. Cosmochim. Acta* **50**, 1509-1520.
- McKinley, J.P. and F.S. Colwell. 1996. Application of perfluorocarbon tracers to microbial sampling in subsurface environments using mud-rotary and air-rotary drilling techniques. *J. Microbiological Methods* **26**, 1-9.
- McKinley, I. G. and Savage, D. 1996. Comparison of solubility data bases used for HLW performance assessment. *J. Contamin. Hydrol.* **21**, 335-350.
- McMahon, P.B., and F.H. Chapelle. 1991. Microbial production of organic acids in aquitard sediments and its role in aquifer geochemistry. *Nature* **349**, 233.
- Mizutani, Y. and Rafter, T. A. 1973. Isotopic behavior of sulphate oxygen in the bacterial reduction of sulphate. *Geochemical Journal* **6**, 183-191.
- Mose, C. O. and Herman, J. S. 1991. Pyrite oxidation at circumneutral pH. *Geochim. Cosmochim. Acta* **55**, 471-482.
- Möri, A., M. Schild, S. Siegesmund, A. Vollbrecht, M. Adler, M. Mazurek, K. Ota, P. Haag, T. Ando, and W.R. Alexander. 2001. The Nagra-JNC in situ study of safety relevant radionuclide retardation in fractured crystalline rock IV, The in situ study of matrix porosity in the vicinity of a water-conducting fracture. Nagra Technical Report Series NTB 00-08, Nagra, Wetingen, Switzerland.
- 村上由記, 長沼毅, 岩月輝希. 1999. 深部地質環境における微生物群集—東濃地域を例として—. *原子力バックエンド研究* **5**, 59-66.
- Murakami, Y., Fujita, Y., Naganuma, T. and Iwatsuki, T. 2002. Abundance and viability of groundwater microbial communities from a borehole in the Tono uranium deposit area, central Japan. *Microbes and Environments* **17**, 63-74.
- Naganuma, T. 1996. Differential enumeration of intact and damaged marine planktonic bacteria based on cell membrane integrity. *J. Aquatic Ecosystem Health* **5**, 217-222.
- 中野勝志, 斉藤章. 1988. 難透水性岩石を対象とした室内透水試験装置の開発. その 1. 常温下での室内透水試験. PNC N7410 90-010, 動力炉・核燃料開発事業団.
- Nealson, K.H., and D. Saffarini. 1994. Iron and manganese in anaerobic respiration: environmental significance, physiology, and regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**, 311-

343.

- Nealson, K.H. 1997. Sediment bacteria: who's there, what are they doing, and what's new? *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 25,403-434.
- Nordstrom, D. K. and Southam, G. 1997. Geomicrobiology of sulfide mineral oxidation. Geomicrobiology: Interactions between microbes and minerals, *Reviews in Mineralogy* 35, Chapter 11, Eds. J.F.Banfield & K.H.Nealson, Mineralogical society of America.
- Ochiai, Y., M. Yamakawa, S. Takeda, and F. Harashima. 1989. A natural analogue study on Tono Uranium Deposit in Japan. CEC Natural Analogue Working Group 3rd Meeting, Snowbird near Salt Lake City, p. 126-138.
- Ota, K., W.R. Alexander, P.A. Smith, A. Möri, B. Frieg, U. Frick, H. Umeki, K. Amano, M.M. Cowper, and J.A. Berry. Building confidence in radionuclide transport models for fractured rock: the Nagra/JNC Radionuclide Retardation Programme. *Sci. Basis. Nucl. Waste Manag XXIV*. (in press)
- Parks, R.J., B.A. Cragg, S.J. Bale, K. Goodman, and J.C. Fry. 1995. A combined ecological and physiological approach to studying sulphate reduction within deep marine sediment layers. *J. Microbiol. Methods* 23, 235-249.
- Pedersen, K., and S. Ekendahl. 1990. Distribution and activity of bacteria in deep granitic groundwaters of southeastern Sweden. *Microbial. Ecol.* 20, 37-52.
- Pedersen, K. 1993. The deep subterranean biosphere. *Earth-Sci. Rev.* 34, 243-260.
- Pedersen, K. 1996. Investigations of subterranean bacteria in deep crystalline bedrock and their importance for the disposal of nuclear waste. *Can. J. Microbiol.* 42, 382-391.
- Pedersen, K., J. Arlinger, L. Hallbeck, and C. Pettersson. 1996. Diversity and distribution of subterranean bacteria in groundwater at Oklo in Gabon, Africa, as determined by 16S rRNA gene sequencing. *Molec. Ecol.* 5, 427-436.
- Pedersen, K. 1999. Subterranean microorganisms and radioactive waste disposal in Sweden. *Engineering Geology* 52, 163-176.
- Pedersen, K. 2001. Diversity and activity of microorganisms in deep igneous rock aquifers of the Fennoscandian Shield. *In Subsurface Microgeobiology and Biogeochemistry*. J.K. Fredrickson and M. Fletcher (eds). Wiley-Liss, Inc., New York. p. 120-121.
- Pillai, S.D. (ed.). 1998. Microbial pathogens within aquifers: principles and protocols. Springer, Texas.
- Plummer, L.N., J.F. Busby, R.W. Lee, and B.B. Hanshaw. 1990. Geochemical modeling of the

- Madison aquifer in parts of Montana, Wyoming, and South Dakota. *Water Resour. Res.* 26, 1981.
- Poindexter, J.S. 1981. The caulobacters: ubiquitous unusual bacteria. *Microbiol. Rev.* 45, 123-179.
- Postgate, J. R. 1984. The sulphate-Reducing Bacteria. 2nd ed., 208 pp, Cambridge Univ. Press.
- Rhén, I. (ed), G. Bäckbom (ed), G. Gustafson, R. Stanfors, and P. Wikberg. 1997. ÄSPÖ HRL - Geoscientific evaluation 1997/2, Results from pre-investigations and detailed site characterization. SKB Technical Report 97-03, p. 174-177. SKB Stockholm, Sweden.
- Rodriguez, G.G., D. Phipps, K. Ishiguro, and H.F. Ridgway. 1992. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1801-1808.
- Rozzak, D.B., and R.R. Colwell. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* 51, 356-379.
- Ruotsalainen, P., A. Alhonmäki-Aalonen, E. Aalto, J. Helenius, and R. Selge. 1996. Development of the pressurized groundwater sampling equipment. Posiva/Site investigations, work report PATU-96-82 (in Finnish with English abstract) Posiva Oy, Helsinki, Finland.
- Russell, B.F., T.J. Phelps, W.T. Griffin, and K.A. Sargent. 1992. Procedures for sampling deep subsurface microbial communities in unconsolidated sediments. *Ground Water Monit. Rev.* 12, 96-104.
- Sargent, J.W., and R.J. Seffl. 1970. Properties of perfluorinated liquids. *Fed. Proc.* 29, 1699-1703.
- Schaule, G., H.-C. Flemming, and H.F. Ridgeway. 1993. Use of 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloraide for quantifying planktonic and sessile respiring bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3850-3857.
- Schie, V., P.M. Fletcher, and M. Fletcher. 1999. Adhesion of biodegradative anaerobic bacteria to solid surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5082-5088.
- Seki. K., T. Miyazaki, and M. Nakano. 1998. Effects of microorganisms on hydraulic conductivity decrease in infiltration. *European journal of Soil Science* 49, 231-236.
- Shikazono, N. and Utada, M. 1997. Stable isotope geochemistry and diagenetic mineralization associated with the Tono sandstone-type uranium deposit in Japan. *Mineral. Dep.* 32, 596-606.

- Shikazono, N. and Nakata, M. 1999. Compositional variation of pyrite, diagenetic alteration and genesis of Tono sandstone-type uranium deposits in Japan. *Res. Geol. Special Issue* **20**, 55-64.
- Smith, D.C., A.J. Spivack, M.R. Fisk, S.A. Haveman, H. Staudigel, and ODP Leg 185 Shipboard Scientific Party. 2000. Tracer-based estimates of drilling-induced microbial contamination of deep sea crust. *Geomicrobiol. J.* **17**, 207-219.
- Somerville, C.C., I.T. Knight, W.L. Straube, and R.R. Colwell. 1989. Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acids from aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 548-554.
- Takamatsu, T., Boratynski, J. and Satake, K. 1992. Effect of volcanic acid deposition on soil chemistry: I. Status of exchangeable cations and sulfur. *Soil Science* **154**, 435-449.
- Taylor, B. E., Wheeler, M. C. and Nordstrom, D. K. 1984. Stable isotope geochemistry of acid mine drainage: Experimental oxidation of pyrite. *Geochim.Cosmochim. Acta* **48**, 2669-2678.
- Tsuji, T., Y. kawasaki, S. Takeshima, T. Sekiya, and S. Tanaka. 1995. A new fluorescence staining assay for visualizing living microorganisms in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3415-3421.
- Ullrich, S., B. Karrasch, H.-G. Hoppe, K. Jeskulke, and M. Mehrens. 1996. Toxic effects on bacterial metabolism of the redox dye 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride. *Appl. Environ. Microbiol.* **85**, 4587-4593.
- Walvoord, M.A., P. Pegram, F.M. Phillips, M. Person, T.L. Kieft, J.K. Fredrickson, J.P. McKinley, and J. Swenson. 1999. Groundwater flow and geochemistry in the southeastern San Juan Basin: Implications for microbial transport and activity. *Water Resources Res.* **35**, 1409-1424.
- Washburn, E.W. 1921. Note on a method of determining the distribution of pore sizes in a porous material. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **7**, 115-116.
- Watson, A.J., M.I. Liddicoat, and J.R. Ledwell. 1987. Perfluorodecalin and sulphur hexafluoride as purposeful marine tracers: some deployment and analysis techniques. *Deep-Sea Res.* **34**, 19-31.
- West, J.M. 1995. A review of progress in the geomicrobiology of radioactive waste disposal. *Radioactive Waste Management and Environmental Restoration* **19**, 263-283.
- Westrich, J. T. and Berner, R. A. 1984. The role of sedimentary organic matter in bacterial

- sulfate reduction: the G model tested. *Limnol. Oceanogr.* **29**, 236-249.
- Whitman, W.B., D.C. Coleman, and W.J. Wiebe. 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 6578-6583.
- Wood, W.W., and G.G. Ehrlich. 1979. Use of bakers yeast to trace microbial movement in ground water. *Ground Water* 16, 398-402.
- Zimmermann, R., R. Iturriaga, and J. Becker-Birck. 1978. Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration. *Appl. Environ. Microbiol.* 36, 926-935.