

本資料は 1993 年 7 月 25 日付で  
登録区分変更する。 [技術展開部技術協力課]

## 地下深部におけるバクテリアの存在調査

(動力炉・核燃料開発事業団 契約業務報告書)

1993年3月

同和工営株式会社

## 地下深部におけるバクテリアの存在調査

松嶋 英治\* 小坂 邦夫\* 大淵 聡\*\*

## 要 旨

本報告書は、岩手県釜石鉱山K G - 1孔から地下水を採取し、その化学分析とバクテリア調査を実施した結果をまとめたものである。

調査地は岩手県南西部に位置し、栗橋花崗閃緑岩中に掘削された試錐孔（深度約800m）である。調査試料は、この試錐孔において深度約738mの地下水を、採水器H G P - 10を利用し連続的に汲み上げArガス流送中の簡易グローブバッグ内で採取した（採水量約70ml/min）。

採取した地下水は、水温11.6℃でpH10.2のアルカリ性であった。溶存化学成分は、測定結果より、陽イオンは $\text{Na}^+$  (11.10) >  $\text{Ca}^{2+}$  (3.7) >  $\text{K}^+$  (1.42) >  $\text{Mg}^{2+}$  (0.17)、陰イオンは $\text{HCO}_3^-$  (6.56) >  $\text{CO}_3^{2-}$  (4.55) >  $\text{SO}_4^{2-}$  (2.6) >  $\text{Cl}^-$  (2.5)の順でそれぞれ高濃度となった（数値の単位はmg/l）。またTOCは12.8mg/lで比較的高い濃度で検出された。

バクテリア調査の結果から、全菌数は $1.0 \times 10^5$  cells/ml、生菌の鉄酸化細菌 (*Thiobacillus ferrooxidans*) は不検出 ( $< 1.0 \times 10^{-2}$  MPN/ml)、硫酸塩還元細菌は $0.8 \times 10^0$  MPN/ml、メタン生成細菌は $0.4 \times 10^0$  MPN/mlと各々計数された。全菌数の計数値の割には硫酸塩還元細菌とメタン生成細菌の現存量が少ないと考えられる。硫酸塩還元細菌については、特に本調査地下水の水温とpHがこの細菌の生息環境から大きく外れていることが、増殖制限因子として挙げられる。別途本調査地下水から分離した硫酸塩還元細菌は、*Desulfovibrio sp.*と同定された。

---

本報告書は同和工営株式会社が、動力炉・核燃料開発事業団人形峠事業所との契約により実施した業務の成果である。

契約番号：04C1906

事業団担当部課室：人形峠事業所 環境資源開発部 環境資源開発課（山名 智）

\* 同和工営株式会社 岡山支店 プラント部

\*\* 同和工営株式会社 資源事業部

## Survey on Bacteria Presence in Deep Underground Zones

E. Matsushima\* K. Kosaka\* S. Ohbuchi\*\*

### Abstract

This paper deals with the survey on the bacteria presence of in deep underground zones through sampling of underground water from KG-1 borehole and through chemical analysis of them.

The studied area is located southwestern part of Iwate, the observation borehole (approximately 800 m deep) was drilled in Kurihashi granodiorite. The samples were underground water continuously pumped up from a depth of approximately 738 m using HGP-10 and were collected into a simple glove bag swept with Ar gas. (The quantity of the sample was approximately 70 mL/min.)

The sampled groundwater was alkaline with pH 10.2 at 11.6°C, giving the chemical analysis row of

$\text{Na}^+$  (11.10) >  $\text{Ca}^{2+}$  (3.7) >  $\text{K}^+$  (1.42) >  $\text{Mg}^{2+}$  (0.17) of cation,

and  $\text{HCO}_3^-$  (6.56) >  $\text{CO}_3^{2-}$  (4.55) >  $\text{SO}_4^{2-}$  (2.6) >  $\text{Cl}^-$  (2.5) of anion,

which were a considerably high concentration level. (The unit is mg/l.) Also the TOC value was at a relatively high level, 12.8mg/l.

From the bacteria survey, the total numbers of bacteria was  $1.0 \times 10^5$  cells/mL, the viable cell count of Iron-Oxidising bacteria (*Thiobacillus ferrooxidans*) was not detected ( $<1.0 \times 10^{-2}$  MPN/mL); the Sulfate-Reducing bacteria count was  $0.8 \times 10^0$  MPN/mL; and the Methane-Producing bacteria count was  $0.4 \times 10^0$  MPN/mL. These figures indicate that the presence of Sulfate-Reducing bacteria and Methane-Producing bacteria was less for the count of total numbers of bacteria. Regarding Sulfate-Reducing bacteria, both the temperature and pH value of the sampled underground water were far out of the range of a viable environment for these bacteria, and those conditions presumably became the growth controlling factor. The Sulfate-Reducing bacteria isolated from the sampled groundwater was identified as *Desulfovibrio sp.*

---

Work performed by Dowa Engineering Co., LTD. under contract with Power Reactor and Nuclear Fuel Development Corporation.

PNC Liaison : Waste Isolation and Ore Processing Division.

Ningyo-Toge Works (Satoshi Yamana)

\* : Okayama Branch, Plant Division

\*\* : Geoscience Consulting Division

## 目 次

1. 調査概要	1
1.1 調査件名	1
1.2 調査目的	1
1.3 調査位置	1
1.4 調査期間	1
1.5 調査項目	1
2. 試料採取	6
2.1 地下水	6
2.2 地表水	7
3. 化学分析方法及び結果	8
3.1 化学分析の方法	8
3.1.1 現場測定項目及び測定方法	8
3.1.2 化学分析測定用地下水試料の採取方法	8
3.1.2 (1) 溶存ガス成分測定用試料	8
3.1.2 (2) 溶存態還元物質測定用試料	10
3.1.2 (3) TOC及びフミン, フルボ酸測定用試料	10
3.1.2 (4) 金属測定用試料	10
3.1.2 (5) 無機イオン成分測定用試料	10
3.1.3 地下水の化学分析方法	10
3.1.4 同位体分析方法	15
3.1.4 (1) $\delta D$	15
3.1.4 (2) $\delta^{18}O$	15
3.1.4 (3) $^3H$	15
3.2 化学分析結果	16
3.2.1 現場測定結果	16
3.2.2 地下水化学分析結果	17
3.2.3 地下水同位体分析結果	18
4. バクテリア調査方法及び結果	19
4.1 バクテリアの調査方法	19
4.1.1 調査フローシート	19
4.1.2 全菌数計数	20
4.1.3 生菌数計数	21
4.1.3 (1) 鉄酸化細菌	21

4.1.3 (2) 硫酸塩還元細菌	21
4.1.3 (3) メタン生成細菌	21
4.1.4 硫酸塩還元細菌の同定	27
4.1.4 (1) 分離及び純粋化	27
4.1.4 (2) 同定操作	29
4.2 バクテリア調査結果	36
4.2.1 種々細菌数計数結果	36
4.2.2 地下水試料から分離した硫酸塩還元細菌の同定結果	37
4.2.2 (1) 属の同定	37
4.2.2 (2) 種の同定	38
5. 考察	41
5.1 地下水化学分析結果に関する考察	41
5.1.1 地下水の化学成分	41
5.1.2 地下水の年代	44
5.1.3 地下水の同位体比	45
5.2 バクテリア調査結果に関する考察	46
5.2.1 全菌数について	46
5.2.2 鉄酸化細菌について	46
5.2.3 硫酸塩還元細菌について	46
5.2.3 (1) 温度	46
5.2.3 (2) 酸化還元電位	46
5.2.3 (3) pH	47
5.2.3 (4) 硫化物濃度	47
5.2.3 (5) 塩分濃度	47
5.2.3 (6) エネルギー源及び炭素源 (電子供与体)	47
5.2.3 (7) 硫酸塩濃度 (電子受容体)	47
5.2.4 メタン生成細菌について	48
5.2.5 バクテリア調査のまとめ	50
5.2.5 (1) 地下水の水質とバクテリアの存在性について	50
5.2.5 (2) 地下深部におけるバクテリアの調査について	53
参考文献	60

付帯資料 (写真集)

## 本文付図目次

第1- 1図	調査位置図 (その1)	2
第1- 2図	調査位置図 (その2)	3
第1- 3図	調査試錐孔周辺の地質図	4
第1- 4図	調査試錐孔周辺の地質断面図	5
第2- 1図	地下水試料採取概略	6
第2- 2図	地表水試料採取概略	7
第3- 1図	ガス成分測定用試料の採取方法	9
第4- 1図	バクテリア調査フローシート	19
第4- 2図	二重皿培養法における試料接種手順の概略	23
第4- 3図	硫酸塩還元細菌の純粹分離の操作手順	28
第4- 4図	走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察試料の調整手順	30
第4- 5図	グラム染色の手順	31
第4- 6図	鞭毛染色の手順	32
第4- 7図	分離菌株の種々温度における増殖特性	40
第5- 1図	地下水のトリリニアダイアグラム	42
第5- 2図	地下水のヘキサダイアグラム	42
第5- 3図	降水中のトリチウム濃度の経年変化	44
第5- 4図	天水の $\delta D$ と $\delta^{18}O$ の関係	45
第5- 5図	水界堆積物中で進行する微生物過程の深度による相違	51
第5- 6図	微生物生育のための pH と Eh の範囲	52
第5- 7図	深部地下水における細菌現存量の調査フロー	56
第5- 8図	深部地下水の細菌種調査フロー	59

## 本文付表目次

第1- 1表	調査項目	1
第3- 1表	水温, pH, ORP, 電気伝導度の測定方法及び測定機器	8
第3- 2表	溶存ガス成分測定項目毎に使用した置換ガス	9
第3- 3表	化学分析項目における分析方法及び測定機器	10
第3- 4表	水に対する気体の溶解度 (Bunsen吸収係数 $\alpha$ )	14
第3- 5表	水に対する気体の溶解度 (Ostwald溶解度係数 $\beta$ )	14
第3- 6表	現場測定結果	16
第3- 7表	化学分析結果	17
第3- 8表	同位体分析結果	18
第4- 1表	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i> 計数用培地	24
第4- 2表	硫酸塩還元細菌計数用培地	24
第4- 3表	メタン生成細菌計数用培地	25
第4- 4表	ビタミン混液の組成 (メタン生成細菌用)	26
第4- 5表	微量金属溶液の組成 (メタン生成細菌用)	26
第4- 6表	硫酸塩還元細菌の純粋化における混在菌(群)の判定	29
第4- 7表	基質資化性 (生育に利用できる炭素源) 試験の概要	33
第4- 8表	光合成紅色非硫黄細菌用培地	34
第4- 9表	光合成硫黄細菌用培地	34
第4-10表	微量元素溶液の組成 [光合成細菌用]	35
第4-11表	ビタミン混液の組成 [光合成細菌用]	35
第4-12表	各種細菌数計数結果	36
第4-13表	硫酸塩還元細菌の属名と形状	37
第4-14表	分離菌株の形態学的試験結果	37
第4-15表	本分離菌株の形態学的、生理学的試験結果及び <i>Desulfovibrio</i> 属の形態学的、生理学的特性一覧表	39
第5- 1表	降水起源と考えられる地下水の集計結果	43
第5- 2表	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i> の一般的特性	46
第5- 3表	主なメタン生成細菌の性状	48
第5- 4表	バクテリア調査結果と水質の関係	50
第5- 5表	微生物細胞の特殊染色法	53
第5- 6表	微生物の $O_2$ ならびに酸化還元環境依存性とエネルギー獲得法	54
第5- 7表	有機基質 1.5g/l 培地	55
第5- 8表	PTYG培地	55
第5- 9表	細菌のエネルギー代謝における無機物の利用	58

## 1. 調査概要

### 1.1 調査件名

地下深部におけるバクテリアの存在調査

### 1.2 調査目的

地下深部におけるバクテリアの存在に関するデータを取得し、地下深部の地質環境を把握することを目的とする。

### 1.3 調査位置

岩手県釜石鉱山地内。

調査位置図を第1-1, 2図に示す。地質図等を第1-3, 4図に示す。

### 1.4 調査期間

自・平成4年12月21日～至・平成5年3月12日

### 1.5 調査項目

調査項目を第1-1表に示す。

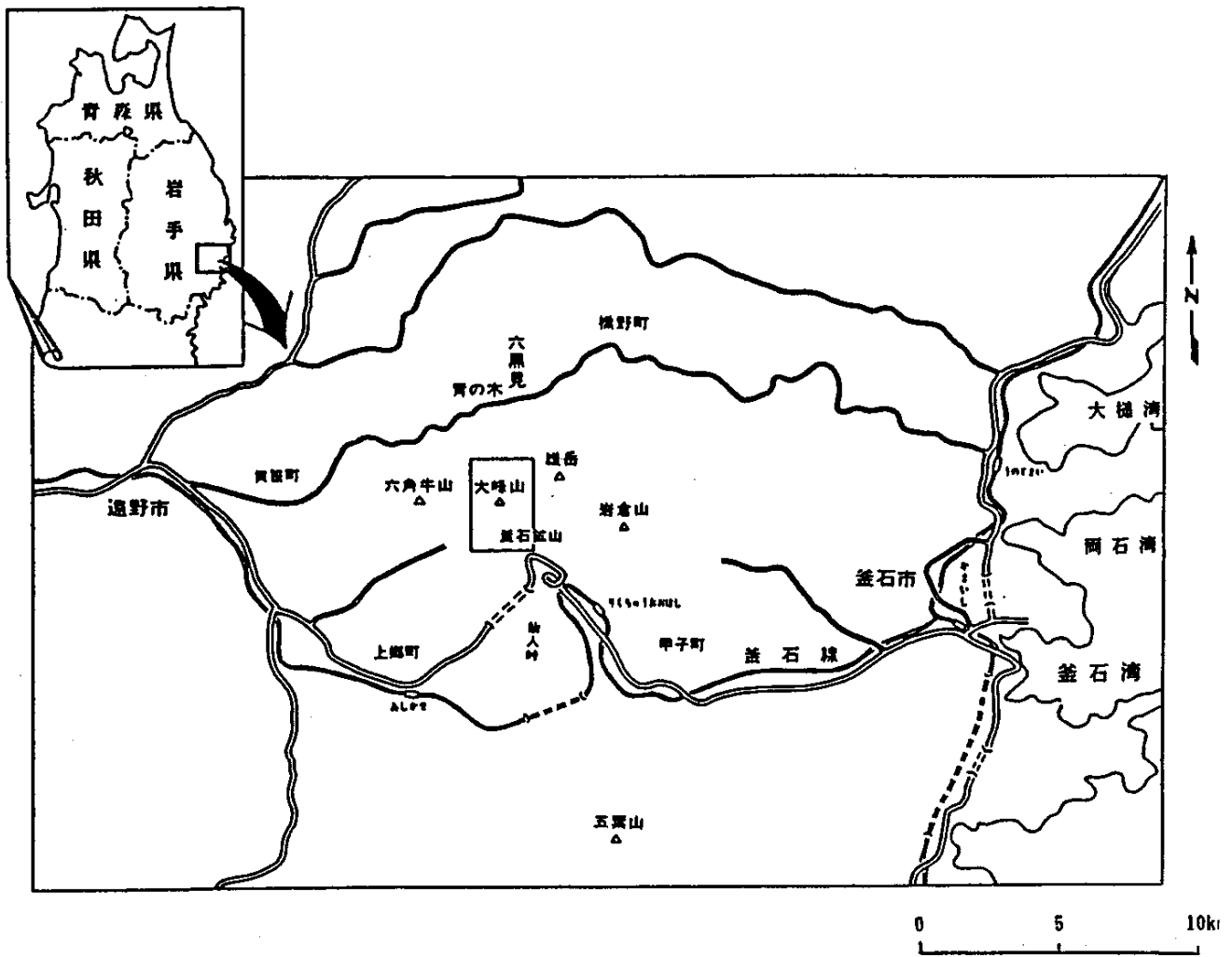
第1-1表 調査項目\*1

化学分析項目	pH, ORP, 電気伝導度, O <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> , He, CH <sub>4</sub> , CO, CO <sub>2</sub> , TOC, フミン酸, フルボン酸, SiO <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Li <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Sr <sup>2+</sup> , Al <sup>3+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , TOTAL-Fe, HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , Cl <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup> , I <sup>-</sup> , S <sup>2-</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , H <sub>2</sub> S, <sup>3</sup> H, δ <sup>2</sup> H, δ <sup>18</sup> O,
バクテリア調査項目	1. 全菌数計数 2. 特定バクテリアの存在調査 (菌数計数) a) 鉄酸化細菌 b) 硫酸塩還元細菌 c) メタン生成細菌 3. 硫酸塩還元細菌の同定

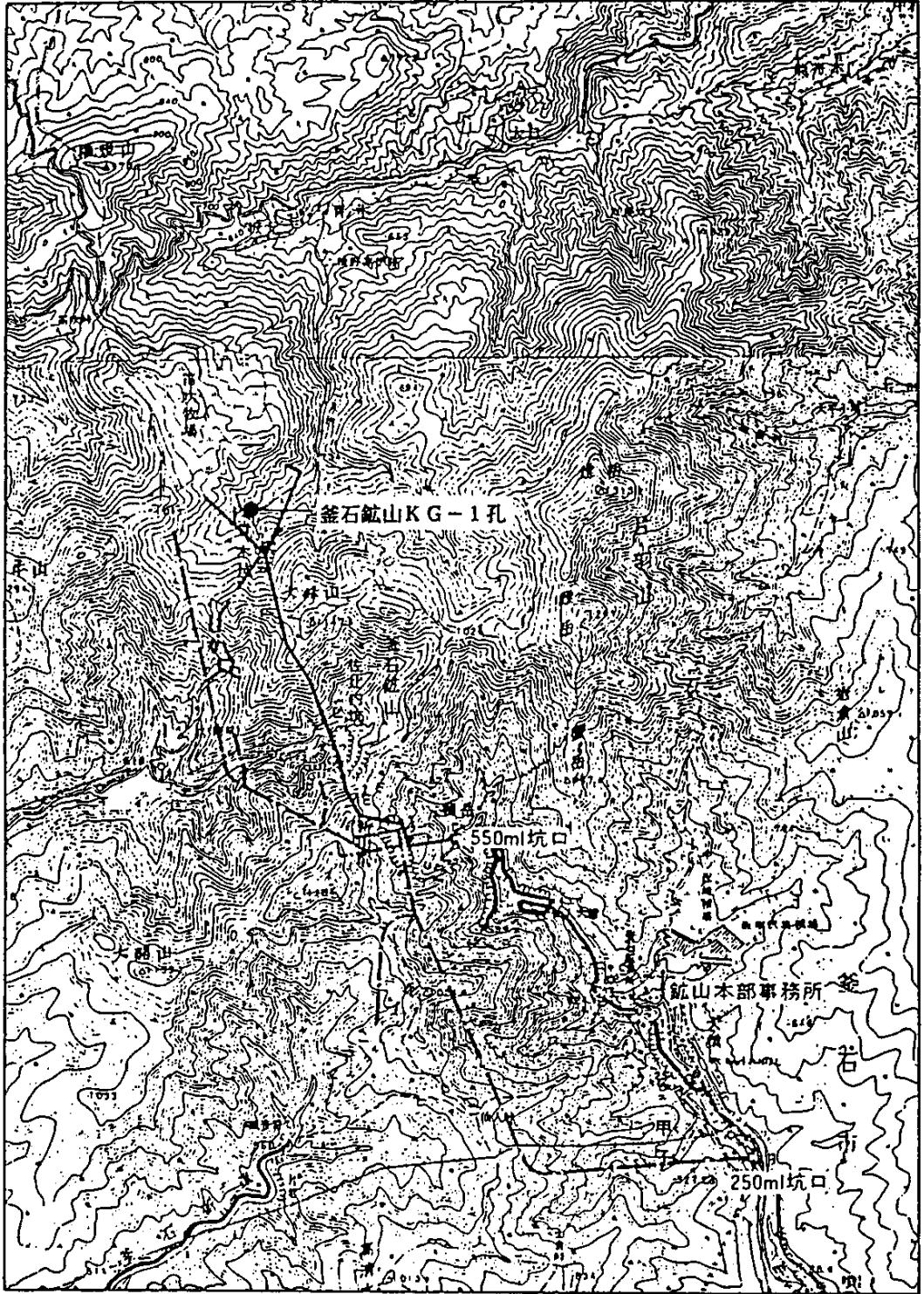
\*1 調査試料が地下水の場合の調査項目である。

オプションとして地表水試料について、pH, ORP, 電気伝導度の測定及び全菌数, 鉄酸化細菌, 硫酸塩還元細菌, メタン生成細菌の菌数計数を行った。





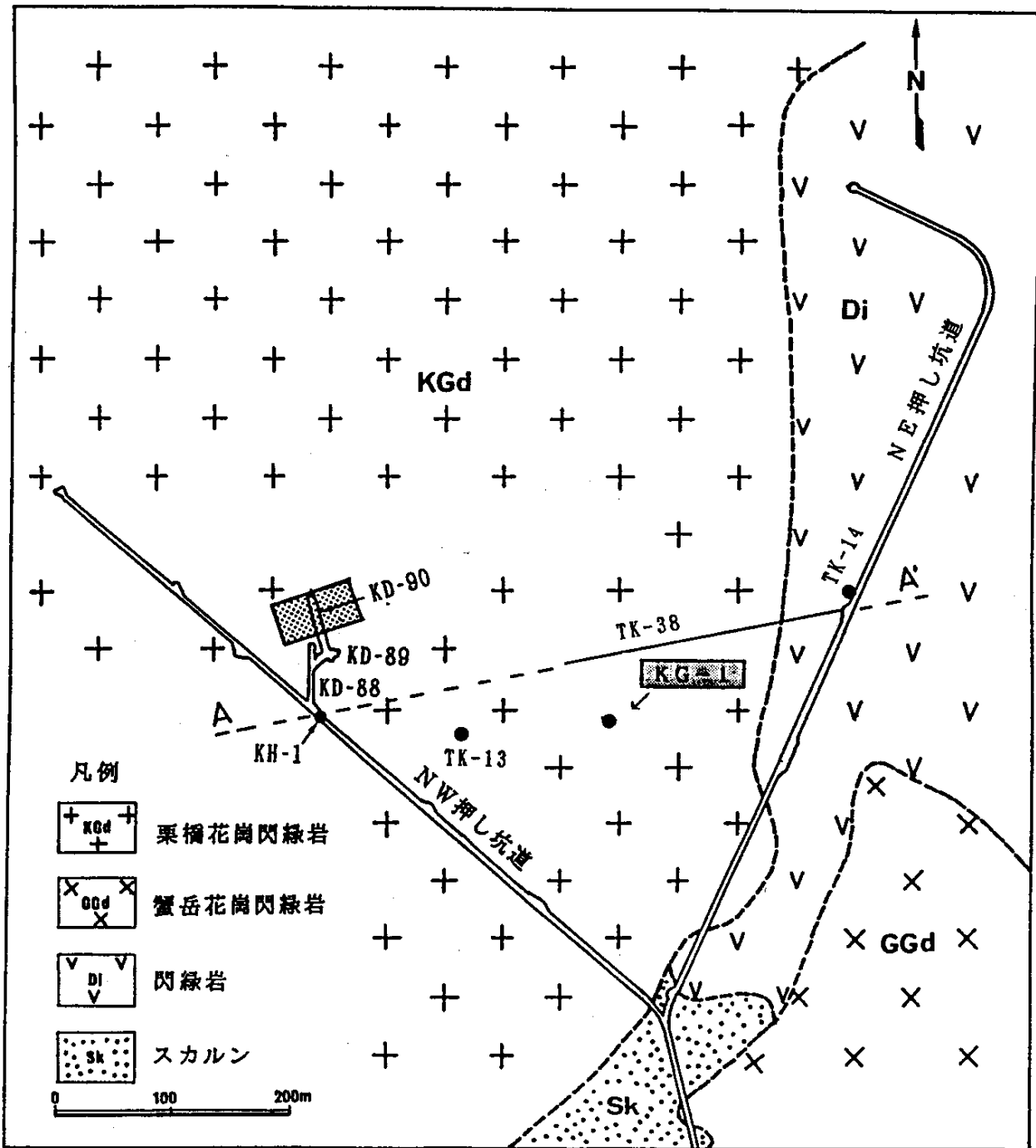
第1-1図 調査位置図 (その1)  
 [長方形で囲んだ範囲を第1-2図に示す]



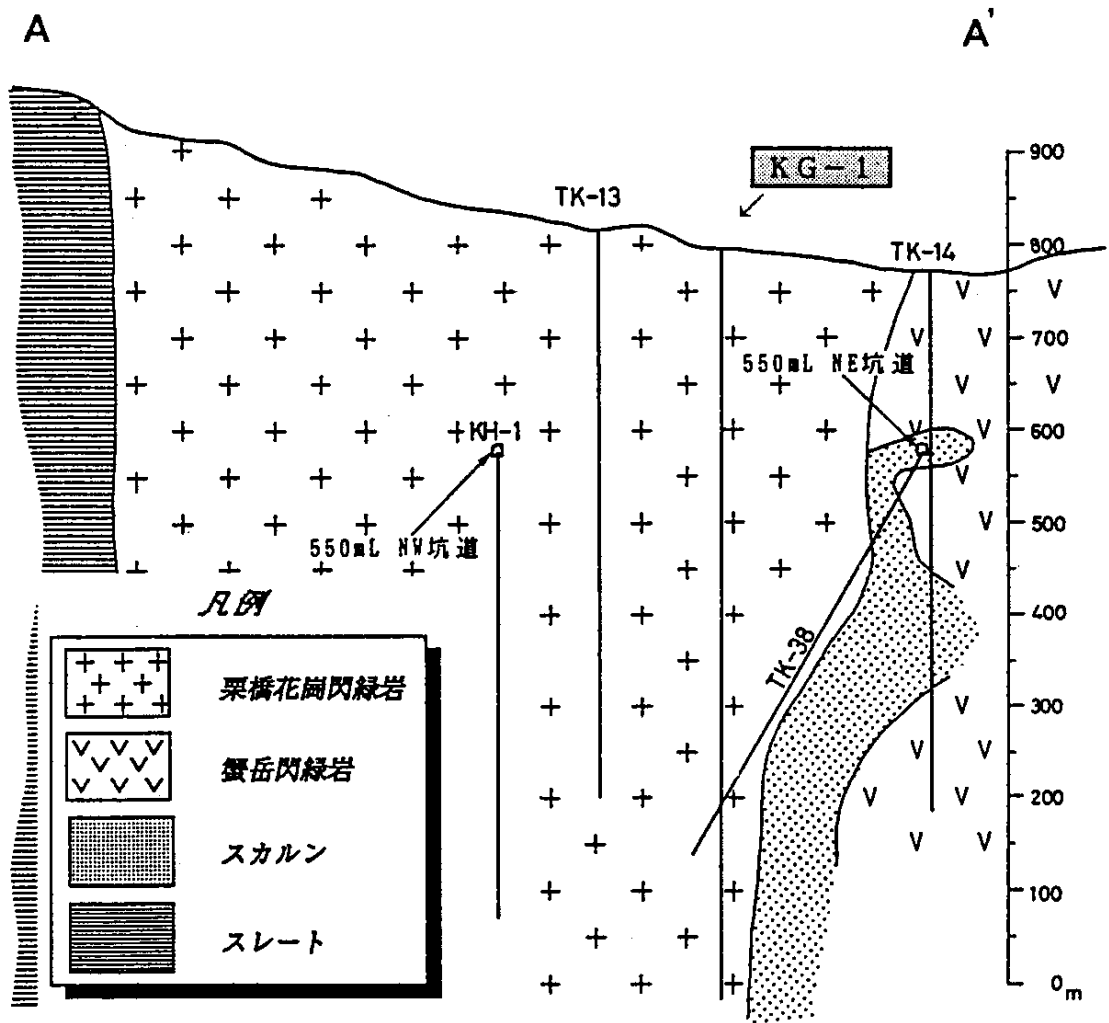
—— 550ml坑道  
 - - - 250ml坑道

0 1 2km

第1-2図 調査位置図 (その2)



第1-3図 調査試錐孔周辺の地質図



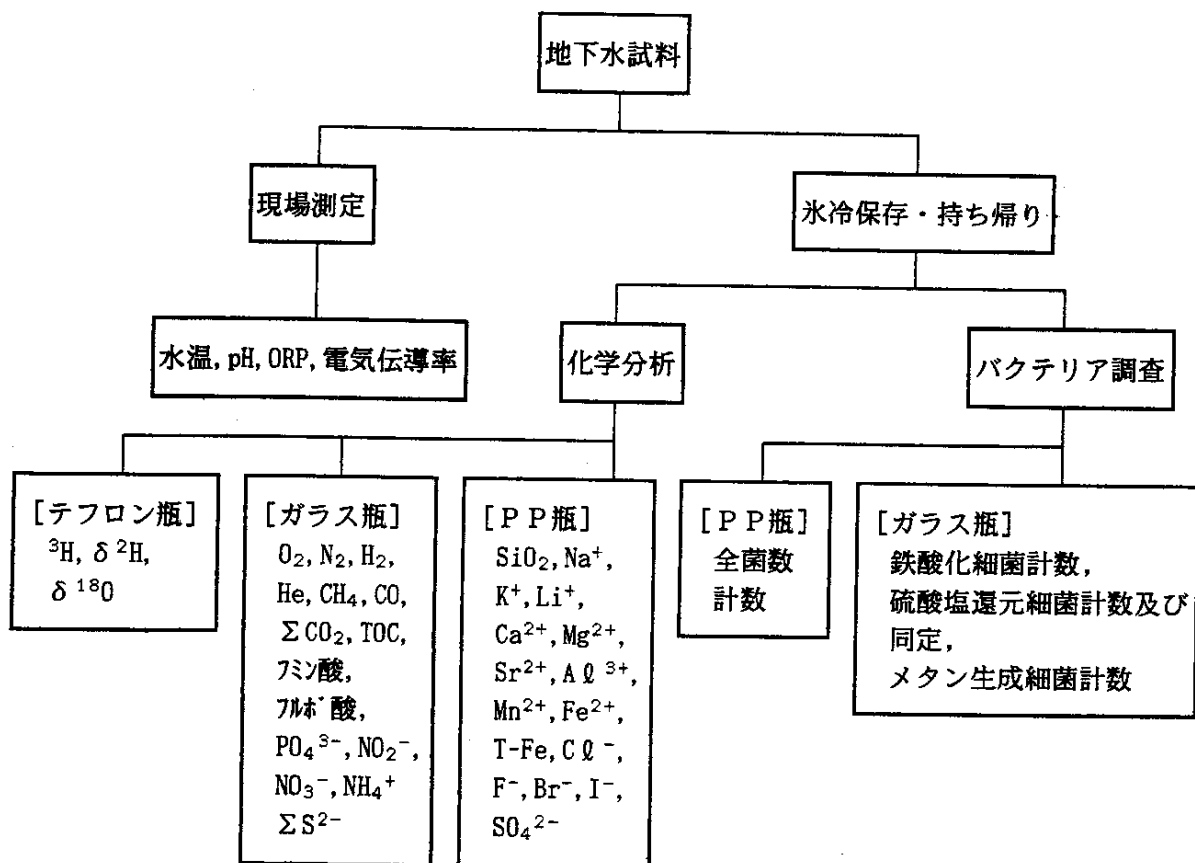
第1-4図 調査試錐孔周辺の地質断面図

## 2. 試料採取

### 2.1 地下水

試錐孔に設置された採水器（HGP-10）のテフロンチューブを簡易グローブバッグ内に導き、Arガス流送条件下で所定の容器に採水した。なお、 $O_2$ 及び $N_2$ の分析用試料は、流送ガスをHeガスに替え採水した。またバクテリアの調査用試料は、予めオートクレーブ等で滅菌（ $120^\circ\text{C}$ 、 $1.2\text{atm}$ 、 $20\text{min}$ ）した容器に採水した。

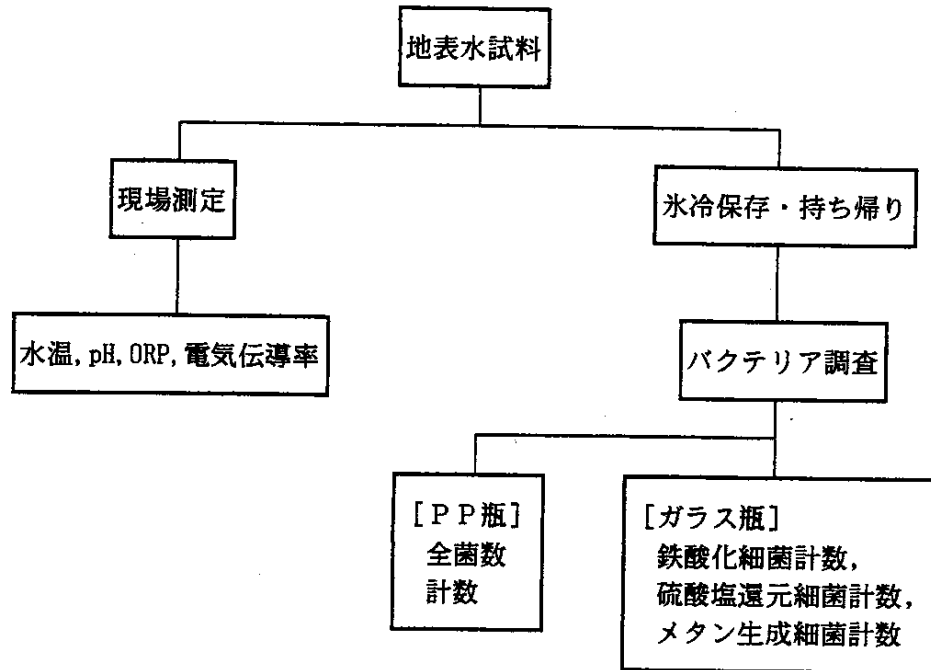
化学分析及びバクテリア調査用試料は原則としてポリプロピレン製容器あるいはガラス製バイアルに採取し、氷冷保存して実験室に持ち帰った（第2-1図参照）。



第2-1図 地下水試料採取概略

## 2.2 地表水

地表水は試錐孔の近くを流れる沢から導水している鋼鉄製のタンク（常時流入・溢流していた）より直接採水した。地表水の採取には、特別な手法は使用しなかった。ただしバクテリアの調査用試料は、予めオートクレーブ等で滅菌（120℃, 1.2atm, 20, min）した容器に採水した。バクテリア調査用試料はポリプロピレン製容器あるいはガラス製バイアルに採取し、氷冷保存して実験室に持ち帰った（第2-2図参照）。



第2-2図 地表水試料採取概略

### 3. 化学分析の方法及び結果

#### 3.1 化学分析の方法

##### 3.1.1 現場測定項目及び測定方法

試錐孔に設置された採水器（HGP-10）のテフロンチューブを簡易グローブバック内に導き、地下水をArガス（99.999%以上）流送条件下で測定容器内に満たし試料とした。現場測定項目として、水温、pH、ORP、電気伝導度を測定した。

地下水のような試料に対するpH及び酸化還元電位（ORP）の測定は、大気中で行うと、還元物質と酸素の化合及び、酸素の溶存によって誤差を生じさせる原因となる。また本調査では、地下約738mより地下水を汲み上げているため（約70ml/min）原位置から地上に上がって来るまでに水質が変化している可能性があるが、できるだけ安定な条件で測定するためグローブバック内をアルゴンガスで置換し測定することとした。

地表水は、試錐孔の近くを流れる沢から導水している鋼鉄性のタンクに直接測定機器のセンサーを入れ測定した。

現場測定項目の測定方法とそれぞれの測定機器を第3-1表に示す。

第3-1表 水温、pH、ORP、電気伝導度の測定方法及び測定機器

測定項目	測定方法	測定機器
水温	サーミスタ	
pH	ガラス電極法	東亜電波、HM-10P
ORP	白金電極法	東亜電波、RM-10P
電気伝導度	電極法	東亜電波、CM-11P

##### 3.1.2 化学分析測定用地下水試料の採取方法

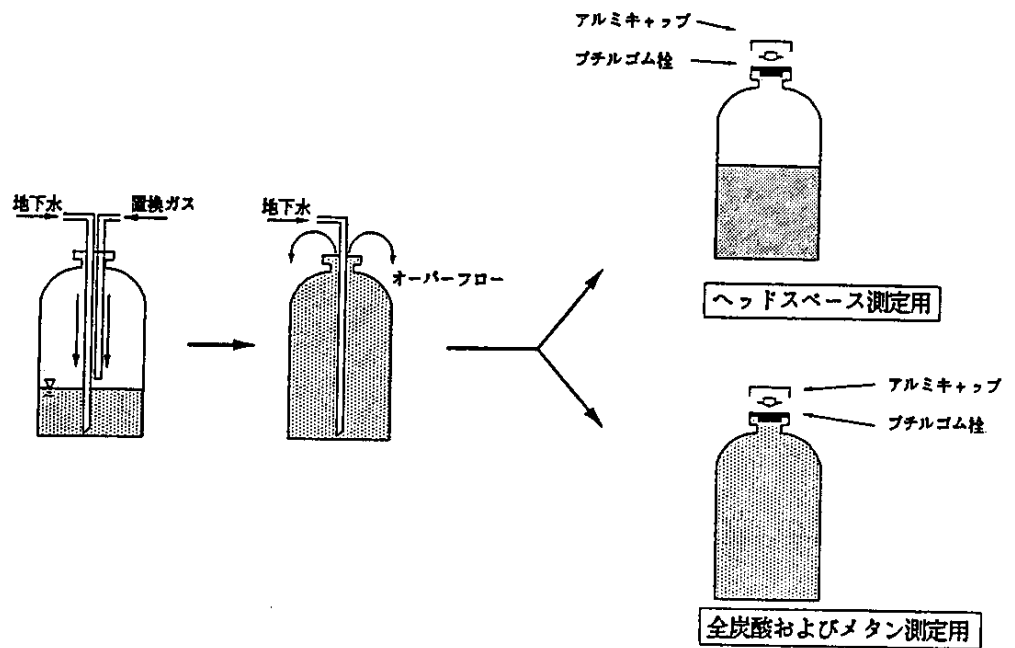
###### (1) 溶存ガス成分測定用試料

溶存ガス測定用の試料は、全てグローブバック内で採水作業をおこなった。なお、グローブバック内を置換するガスの種類は分析項目毎に変更し行った。測定項目毎に使用した置換ガスを第3-2表に示す。

試料は120mlあるいは60mlのガラス製バイアル瓶に第3-1図に示すような手順で採取した。すなわち、試料流出チューブをバイアル瓶底部に差し込み、容器容量の約3倍量をオーバーフローさせた後に、採取した試料の一部を捨て、直ちに生物活性を停止させるために塩化第2水銀（1w/v%）を試料容量に対して1（v/v%）添加した。その後、ブチルゴム栓とアルミシールにて密封し氷冷保存して持ち帰り、これをヘッドスペース測定用試料とした。なお、全炭酸測定用試料は試料採取の際、オーバーフローさせた後に気層部を残すことなく、完全にブチルゴム栓とアルミシールで密封し（塩化第2水銀溶液は無添加）氷冷保存して持ち帰った。一方、メタン測定には、ヘッドスペースサンプルの他に、パージアンドトラップ法に供するために、全炭酸と同様に気層部を残すことなく密封した試料（塩化第2水銀溶液は添加）も持ち帰った。

第3-2表 溶存ガス成分測定項目毎に使用した置換ガス

分析項目	置換ガス
酸素	He (99.9999%以上)
窒素	
-----	
ヘリウム	Ar (99.999%以上)
水素	
一酸化炭素	
全炭酸	
メタン	



第3-1図 ガス成分測定用試料の採取方法



## (2) 溶存態還元物質測定用試料

溶存態還元物質（遊離 2 価鉄及び硫化物イオン）の測定に供する試料は、溶存ガス成分と同様にグローブバック内で Ar ガス（99.999%以上）流送中でガラス製バイアル瓶（100ml）に採取（容器の 3 倍量をオーバーフローさせる）した。その後、ブチルゴム栓とアルミシールで気層部が残らないように密封し氷冷保存して持ち帰った。

## (3) TOC及びフミン、フルボ酸測定用試料

酸処理及び熱処理（450℃、4時間）を施したスクリュウキャップ付きバイアル瓶（120ml）に空気が残らないように分注し、氷冷保存して実験室に持ち帰った。

## (4) 金属測定用試料

酸処理をしたポリプロピレン製容器に分注し、最終濃度として 1 (v/v%) になるように精密分析用硝酸を添加した後に氷冷保存して実験室に持ち帰った。

## (5) 無機イオン成分測定用試料

酸処理したポリプロピレン製容器に分注し、氷冷保存して実験室に持ち帰った。なおいずれの試料においても、懸濁物質濃度が極めて低かったので、グラスファイバーフィルターあるいはメンブランフィルター等によるろ過は行わずに分析に供試した。

### 3.1.3 地下水の化学分析方法

化学分析用の地下水試料を採取し分析を行った。各測定項目における分析方法と使用した機器を第3-3表にまとめて以下に示す（\*ハットスペース法による各種溶存気体の計算方法も併せて示す）。

第3-3表 化学分析項目における分析方法及び測定機器

測定項目	測定方法	測定機器	備考
O <sub>2</sub> N <sub>2</sub>	ガスクロ分析 (ハットスペース法) 〔グローブバック内〕 置換ガス：ヘリウム	日立製、163	カラム : 内径3mm, 全長3m カラム充填剤 : モレキュラーシーブ 13X 60/80メッシュ カラム温度 : 30℃ 注入口温度 : 50℃ 検出器 : TCD 検出器温度 : 50℃ キャリアガス, 流量 : ヘリウム、30ml/min

(次ページへつづく)

測定項目	測定方法	測定機器	備考
H <sub>2</sub> He	ガスクロ分析 (ヘッドスペース法) 〔グローブバック内〕 置換ガス：アルゴン	日立製、163	カラム : 内径3mm, 全長3m カラム充填剤: モレキュラーシーブ 13X 60/80メッシュ カラム温度 : 30℃ 注入口温度 : 50℃ 検出器 : TCD 検出器温度 : 50℃ キャリアガス, 流量: 窒素、30mL/min
CH <sub>4</sub>	ガスクロ分析 (ヘッドスペース法) 〔グローブバック内〕 置換ガス：アルゴン	島津製、GC14A	カラム : 内径3mm, 全長3m カラム充填剤: Porapak Q カラム温度 : 45℃ 注入口温度 : 50℃ 検出器 : FID 検出器温度 : 100℃ キャリアガス, 流量: 窒素、35mL/min
CO	ガスクロ分析 (ヘッドスペース法) 〔グローブバック内〕 置換ガス：アルゴン	島津製、GC6A	カラム : 内径3mm, 全長3m カラム充填剤: モレキュラーシーブ 13X 60/80メッシュ カラム温度 : 30℃ 注入口温度 : 50℃ 検出器 : マン化反応装置付 水素炎イオン化検出器 検出器温度 : 100℃ キャリアガス, 流量: 窒素、30mL/min
ΣCO <sub>2</sub>	赤外線吸収法 (ヘッドスペース法) 〔グローブバック内〕 置換ガス：アルゴン	オシノグラフ製	ヘッドスペース測定試料について、 その気相部を赤外線吸収により無機 炭酸を定量するIC分析装置に導入し て測定した。 H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> } 計算値 (全炭酸濃度とpHの関係)
TOC	乾式法	島津製、 TOC-5000	試料を希塩酸によりpH=4以下に調整 し、その後純窒素ガスにてバブリング を行い炭酸ガスを除去しTOC測定系 に導入し分析した。
フミン酸 フルボ酸	蛍光法	日本分光製、 821FP	試料1mLに対して0.1M-EDTA溶液を 1mL、アンモニア水-塩化アンモニウム緩衝溶液 によりpHを9に調整し1時間静置した。 この溶液に対して励起波長320nmに おいてフミン酸(500nm)及びフルボ 酸(420nm)のそれぞれの蛍光強度を 測定した。
T-Si D-Si	ICP法	島津製、 ICPS-1000Ⅲ	直接試料を測定した場合(T-Si)と ろ過を施し測定した場合(D-Si)の 2通りの場合の分析を行った。
Na K Li	原子吸光法	セイコ電子製、 SAS-7500	

(次ページへつづく)

測定項目	測定方法	測定機器	備考
Ca Mg Sr Al T-Mn D-Mn T-Fe D-Fe	ICP法	島津製、 ICPS-1000Ⅲ	Mn、Feについては直接測定とろ過を施した場合について分析した。
Fe <sup>2+</sup>	比色法		2,2'-ジピリジルにより発色させた後波長460nmにおける吸光度を測定し分析した。
Cl <sup>-</sup> Br <sup>-</sup> I <sup>-</sup> SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	イオンクロマト	横河電気製、 IC-100	分離カラム : イオン交換カラム (SAM3-075) プレカラム : イオン交換カラム (PAM3-035) 溶離液 : 4.4mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /15mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 除去液 : 15mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 流量 : 溶離液、除去液とも 2mL/min
F <sup>-</sup>	イオン電極法 (ガラス電極法)	東亜電波製、 HM-20S	比較電極 : 東亜電波製 (HS-305DP) イオン電極 : 東亜電波製 (612F6617) F <sup>-</sup> イオンはイオンクロマトによる定量が不可能であったため、JISK0102に従い、蒸留後、電極により定量した。
Σ S <sub>2</sub> <sup>-</sup> *H <sub>2</sub> S	ヨウ素滴定法		JISK0102に従い分析した。 *H <sub>2</sub> Sは計算により求めた。
T-P PO <sub>4</sub> -P T-N NO <sub>2</sub> -N NO <sub>3</sub> -N NO <sub>4</sub> -N	比色法	テコン製、AAⅡ	全リンはペルオキシ二硫酸カリウムを用いて、オートクレーブ (120℃、60分間) 分解を行う湿式分解法により、ほとんど全てのリンをリン酸態リンに分解し測定した。 アンモニウムイオンはインドフェール青改良型吸光度法、亜硝酸イオンはスルファニルアミドとニチロジアミンにより発色させる吸光度法、硝酸イオンはカニウム還元法による還元法、全窒素はアルカリ性ペルオキシ二硫酸カリウム分解法により測定した。

## \* ) ヘッドスペース法による各種溶存気体濃度の計算方法

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

第3-4表及び第3-5表に各温度における各ガス成分単一系のBunsenの吸収係数 $\alpha$ 及びOstwaldの溶解度係数 $\beta$ を示す。ここでBunsenの吸収係数 $\alpha$ は水1mlに溶解する気体の体積(ml)を0℃, 1気圧に換算した値であり, Ostwaldの溶解度係数 $\beta$ は水1mlに溶解する気体の体積(ml)をその温度における体積で表したものである。また, Bunsenの吸収係数 $\alpha$ とOstwaldの溶解度係数 $\beta$ の関係は以下の式のように表される。

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

ここで,  $t$ : 実験温度(℃) とする。

今, 試料を注入したヘッドスペース測定用容器内部の全圧 $P_a = 1 \text{ atm}$ とする。求めるガス成分の水に対する溶解度が小さくて, 溶媒と反応しないとすればHenryの法則を適用することができる。すなわち, 圧力があまり高くない範囲では一定温度での溶解度は分圧に比例することになる。したがって, 求めるガス成分の分圧を $P_1$ とすれば, Bunsen吸収係数 $\alpha$ , あるいはOstwald溶解度係数 $\beta$ に $P_1/P_a$ を乗ずれば, 分圧 $P_1$ における溶解度が求められる。これらのことにより以下の計算例のように水中のガス成分濃度を計算により求められる。

### 【計算例】

調製したヘッドスペース用試料の密閉容器内において

気層の体積 $v_g = 100 \text{ ml}$

液層の体積 $v_L = 20 \text{ ml}$

容器内の全圧 $P_a = 1 \text{ atm}$

温度 = 20℃ (一定)

とする。

今, ヘッドスペース法によるガス成分の測定において

$N_2 = 6000 \text{ ppm}$

$O_2 = 2000 \text{ ppm}$

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

$$\begin{aligned} & \text{気層部分における } N_2 \text{ の絶対量 } (\mu \text{ mol}) \\ & = \frac{1 \text{ (atm)} \times 6000 \times 10^{-6} \times 0.1 \text{ (l)}}{0.0821 \times 293.15} = 24.9 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{気層部分における } O_2 \text{ の絶対量 } (\mu \text{ mol}) \\ & = \frac{1 \text{ (atm)} \times 2000 \times 10^{-6} \times 0.1 \text{ (l)}}{0.0821 \times 293.15} = 8.3 \end{aligned}$$

ここで, 20℃における $N_2$ 及び $O_2$ のBunsen吸収係数 $\alpha$ は各々0.0152及び0.031であるから $N_2$ 及び $O_2$ の分圧を

$$PN_2 = 0.75 \times 0.6(\%) = 0.0045$$

$$PO_2 = 0.25 \times 0.2(\%) = 0.0005$$

と算出でき、各々の吸収係数を $6.84 \times 10^{-5}$ 及び $1.55 \times 10^{-5}$ を導ける。この値から液層20mlに溶けている $N_2$ 及び $O_2$ の絶対量を算出すると

液層における $N_2$ の絶対量 ( $\mu\text{mol}$ )

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

液層における $O_2$ の絶対量 ( $\mu\text{mol}$ )

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

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

よって、もとの試料中に溶存していた $N_2$ 及び $O_2$ 濃度は、

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

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

のように算出される。

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

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

※ 化学便覧基礎編 改訂3版(日本化学会, 1984)より引用

第3-5表 水に対する気体の溶解度 (Ostwald溶解度係数 $\beta$ )

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

※ 化学便覧基礎編 改訂3版(日本化学会, 1984)より引用

### 3.1.4 同位体分析方法

水試料の同位体比分析は $\delta D$ は $H_2$ ガス、 $\delta^{18}O$ は $CO_2$ ガスにして、質量分析計 (Finogan MAT delta-E) を用いて行う。分析試料のガス化への前処理は下記の方法による。安定同位体組成は、 $\delta$  (デルタ) 値で表現され次の式で定義される。単位は‰ (パーミル) で表す。

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

x, s t は測定試料及び標準試料を示し、R は対象とする同位体比 ( $D/H$ ,  $^{18}O/^{16}O$ ) である。標準試料としては $\delta D$ ,  $\delta^{18}O$  に SMOW (標準平均海水) が用いられる。

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

水試料は、ファインピペットを用いて $5\mu l$ を採取し、反応容器内 (ケリルスストップ・フック付き石英段つき管) で約 $0.1g$ の金属亜鉛と、真空下 $450^\circ C$ で反応させ $H_2$ ガスを発生させる。誤差は $\pm 1.5\%$ である。

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

$5ml$ の水試料はポリエチレン製注射器内にとり、これに1気圧、 $30ml$ の $CO_2$ ガスを市販の $CO_2$ ボンベより導入し、よく振った後一度 $CO_2$ をすてて溶存空気を追い出した後、新しい $CO_2$ をいれる。これを $25^\circ C$ 付近の恒温室で6時間以上放置する。この結果水-二酸化炭素間での酸素同位体交換反応により、二酸化炭素ガスは水の酸素同位体比よりも $45.15\%$ ほど $^{18}O$ に富む同位体組成に固定される。この二酸化炭素ガスを真空装置を用いて水と空気を取り除いたのち、質量分析計で測定することにより試料水の同位体比を算出する (YOSHIDA AND MIZUTANI, 1989)。誤差は $\pm 0.15\%$ である。

#### (3) $^3H$

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

### 3.2 化学分析結果

#### 3.2.1 現場測定結果

現場測定結果を第3-6表に示す。

第3-6表 現場測定結果

測定項目	単位	試料名称	
		地下水	地表水
水温	℃	11.6	5.3
pH		10.2	7.7
ORP	mV	26	174
電気伝導度	μ S/cm	94.0	37.7

### 3.2.2 地下水化学分析結果

地下水化学分析結果を第3-7表に示す。

第3-7表 化学分析結果

測定項目	単位	試料名称	検出限界
		地下水	
O <sub>2</sub>	mg/ℓ	<1.0	1.0
N <sub>2</sub>	mg/ℓ	69.2	0.5
H <sub>2</sub>	mg/ℓ	<0.2	0.2
He	mg/ℓ	<0.4	0.4
CH <sub>4</sub>	μg/ℓ	0.620	0.005
CO	mg/ℓ	<0.05	0.05
ΣCO <sub>2</sub>	mg/ℓ	8.1	0.1
*H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	mg/ℓ	<0.01	
*HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	mg/ℓ	6.56	
*CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	mg/ℓ	4.55	
TOC	mg/ℓ	12.8	0.1
フミン酸	mg/ℓ	0.1	0.1
フルボン酸	mg/ℓ	0.3	0.1
T-Si	mg/ℓ	8.40	0.05
D-Si	mg/ℓ	8.20	0.05
Na	mg/ℓ	11.10	0.03
K	mg/ℓ	1.42	0.04
Li	mg/ℓ	<0.09	0.09
Ca	mg/ℓ	3.7	0.2
Mg	mg/ℓ	0.17	0.02
Sr	mg/ℓ	0.016	0.001
Al	mg/ℓ	0.63	0.01
T-Mn	mg/ℓ	0.008	0.001
D-Mn	mg/ℓ	<0.001	0.001
T-Fe	mg/ℓ	0.04	0.02
D-Fe	mg/ℓ	<0.02	0.02
Fe <sup>2+</sup>	mg/ℓ	<0.1	0.1
Cl <sup>-</sup>	mg/ℓ	2.5	0.1
F <sup>-</sup>	mg/ℓ	0.1	0.1
Br <sup>-</sup>	mg/ℓ	<0.1	0.1
I <sup>-</sup>	mg/ℓ	<0.1	0.1
ΣS <sup>2-</sup>	mg/ℓ	<0.1	0.1
*H <sub>2</sub> S	mg/ℓ	-	
T-P	mg-P/ℓ	0.15	0.01
PO <sub>4</sub> -P	mg-P/ℓ	0.035	0.005
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	mg/ℓ	2.6	0.1
T-N	mg-N/ℓ	1.49	0.01
NO <sub>2</sub> -N	mg-N/ℓ	<0.005	0.005
NO <sub>3</sub> -N	mg-N/ℓ	<0.005	0.005
NH <sub>4</sub> -N	mg-N/ℓ	0.054	0.005



### 3.2.3 地下水同位体分析結果

地下水の同位体分析結果を第3-8表に示す。

第3-8表 同位体分析結果

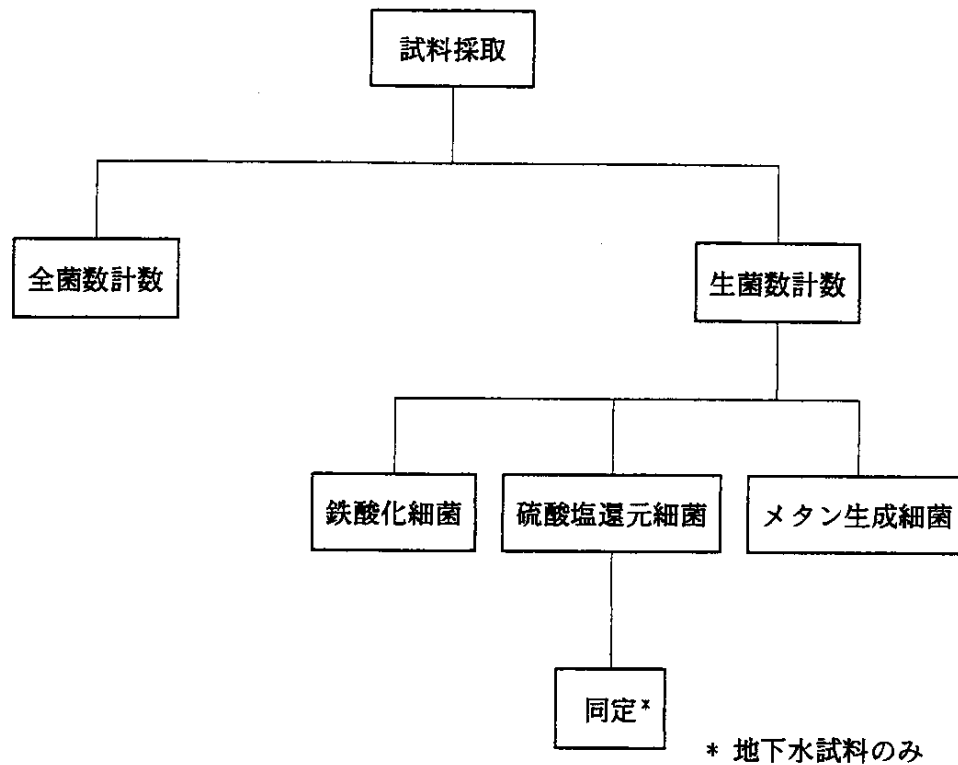
測定項目	単位	試料名称	測定方法
		地下水	
$\delta^{2}\text{H}$	‰	-65.9	亜鉛バッチ法
$\delta^{18}\text{O}$	‰	-10.6	水-二酸化炭素ガス交換法
$^3\text{H}$	TR	$4.4 \pm 0.1$	

#### 4. バクテリア調査方法及び結果

##### 4.1 バクテリアの調査方法

###### 4.1.1 調査フローシート

調査のフローシートを第4-1図に示す。本調査では、地下水と地表水各1件ずつ計2件の試料について実施した。



第4-1図 バクテリア調査フローシート

#### 4.1.2 全菌数計数

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

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

### 4.1.3 生菌数計数

#### (1) 鉄酸化細菌

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

*Thiobacillus ferrooxidans* の計数には、SilvermanとLundgrenの計数培地を使用した。その組成を第4-1表に示す。この培地は次のようにして調製した。オートクレーブ滅菌（120℃、15分間）した[A]液に、 $\gamma$ 線滅菌済みのミリポアフィルター（ポアサイズ0.2 $\mu$ m）により濾過滅菌をした[B]液を、無菌的に混合した。

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

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

#### (2) 硫酸塩還元細菌

MPN（5本）法と二重皿法【注2】の2種類の培養計数手法により、計数を行った。使用した培地はPostgateの培地を一部改変したもので、その培地組成を第4-2表に示す。以下にMPN法及び二重皿法における手順を述べる。

MPN法は、培地に寒天を0.3w/v%添加して半固体培地とし、全量が15mlの試験管に培地10mlを無菌的に分注して使用した。試料は、培地10mlに対して1mlの割合で接種し、ピペットの先端を培地中に挿入して空気との接触をできるだけ避けるようにした。接種後、直ちに還元剤としてチオグリコール酸ナトリウムとアスコルビン酸ナトリウムを0.01%添加した1.5%寒天溶液により培地表面をシール、空気との接触を無くし、無酸素状態が保持できるようにした。試料接種が完了した培養試験管を、暗条件下、30℃で静置培養し、培養開始後、7日目及び14日目に計数を行った。なお、培養計数は、1試料につき2連で実施した。

二重皿法には寒天を1.5w/v%添加した固体培地を使用した。それ以外はMPN法とまったく同じである。試料の接種量は培地15mlに対して1mlである。培養条件もMPN法の時と同様である。なお、培養計数は1試料、1希釈段階につき3枚のプレートを作製し実施した。

MPN法、二重皿法とも試料の希釈の際、希釈水には還元剤を培地と同様の割合で添加した生理食塩水（NaCl 0.85w/v%）を使用した。また、硫酸塩還元細菌の生育は、硫化鉄の生成による培地の黒変及び黒色コロニーの出現により判断した。

#### (3) メタン生成細菌

第4-3表に示す組成の培地を用い、MPN（5本）法により培養計数を行った。培養容器にはシリコン栓の付いたガラス製バイアル瓶（120ml容）を、アルミシールで密封して使用した。培地の調製手順と計数方法を以下に記す。

第4-3表に示す組成において、ビタミン混液、微量金属溶液及び炭酸水素ナトリウム溶液を除く組成の液体培地を、ガラス製バイアル瓶に分注し、アルミシールにて密封した後に、オートク

レーブ滅菌を行った。オートクレーブ滅菌終了後、まだ熱い間に、濾過滅菌したビタミン混液、微量金属溶液及び炭酸水素ナトリウム溶液をシリンジで添加し、その後、流水で冷却しながらバイアル瓶の内部を無菌的に水素／二酸化炭素（20/80）混合ガスで置換した。ガス置換は、クリーンベンチ内において、滅菌済み注射針と $\gamma$ 線滅菌済みミリポアフィルター（0.2 $\mu$ m）を用いて、減圧とガス充填を数回繰り返した。この時、培地に加えたレサズリンの薄赤色が発色していないことを確かめ、完全な無酸素状態であることを確認してから、培養計数に使用した。（ここで、レサズリンは、酸素が存在すると青～紫色を呈し、微好気環境下では薄赤色へと変わり、無酸素環境下では発色しない。すなわち、本培地の場合は透明となる。） 試料の接種及び希釈にはシリンジを使用し、グローブボックス内で作業を行った。なお、希釈液には、培地と等濃度の割合でレサズリンと還元剤を添加した生理食塩水を、培地調製時と同様な滅菌及びガス置換操作により調製したものをを用いた。培養は暗条件下、25℃で静置培養し、培養開始後、30日、45日、60日、80日目に生育の判定を行った。生育の判定は、バイアル瓶のヘッドスペース部におけるメタンガスの有無で行った。メタンガスの定性分析は、ヘッドスペース部のガスをガスタイトシリンジで採取し、FIDを検出器としたガスクロマトグラフィー（島津社製、GC-14A）で行った。ガスクロマトグラフィーの測定条件は、分離カラム：Porapak Q 3m、温度：45℃定温、キャリアーガス及び流量：窒素、35ml/min、とした。

### 【注1】MPN法

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

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

### 【注2】二重皿法

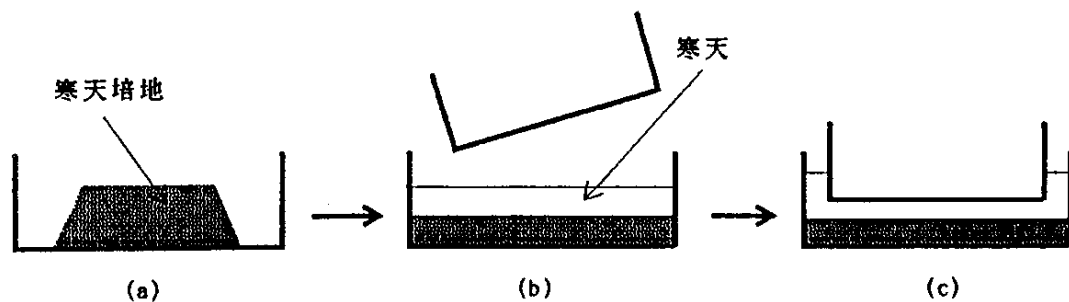
被検液の一定量をシャーレ内で寒天培地とよく混合して平板培養を行い、生成したコロニー数を数える平板培養コロニー計数法のうち、第4-2図のような培養を行うものである。この場合、すべての細菌が認められるようなコロニーをつくること、1個の細菌が1つのコロニーをつくることを前提としている。

今回行った二重皿培養法の試料接種手順の概略を、第4-2図で説明する。

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

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

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



第4-2図 二重皿培養法における試料接種手順の概略

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

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

第4-2表 硫酸塩還元細菌計数用培地

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

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

第4-3表 メタン生成細菌計数用培地

ギ酸ナトリウム	2.5 g
酢酸ナトリウム	2.5 g
メタノール	2.5 ml
CaCl <sub>2</sub>	0.01 g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.01 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.25 g
システイン塩酸塩	0.2 g
レサズリン	0.001g
イオン交換水	1000 ml
ビタミン混液 <sup>1)</sup>	2.0 ml
微量金属溶液 <sup>2)</sup>	10.0 ml
NaHCO <sub>3</sub> (8% soln.)	65.0 ml

注) ・接種時に還元剤として、新たにシステイン塩酸塩とNa<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>Oの混合液を加える。その方法は、50w/v%システイン塩酸塩及び30w/v%Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>Oの濾過滅菌溶液を、1000mlの培地に対してシリンジで1ml加える。

従って、システイン塩酸塩の最終濃度は、0.02+0.05=0.07w/v%、Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>Oの最終濃度は0.03w/v%となる。

・ 1)と2)は各々第4-4, 4-5表に示す。



第4-4表 ビタミン混液の組成 (メタン生成細菌用)

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

第4-5表 微量金属溶液の組成 (メタン生成細菌用)

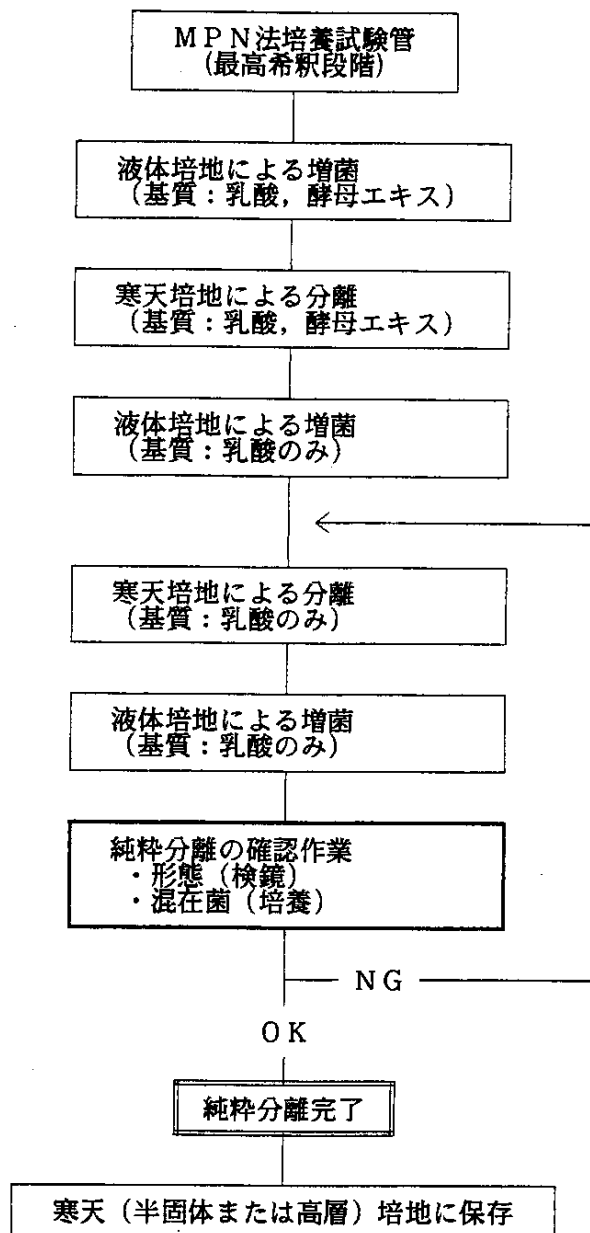
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.004g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.004g
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.0 g
ZnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.06 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.08 g
Na <sub>2</sub> EDTA	6.0 g
／イオン交換水	1000 ml

#### 4.1.4 硫酸塩還元細菌の同定

硫酸塩還元細菌を地下水試料から1株分離し、分離株についてその属及び種の同定を試みた。ここで、純粹分離は前項目[4.1.3(2)]に示したMPN法による硫酸塩還元細菌の計数の際、最高希釈段階に出現した培養試験管から釣菌して純粹化を行った。従って、得られた分離株は確率的に最も現存量の多い種である可能性が高いと考えられる。このようにして分離された菌株について、形態学的試験から属の同定を、生理学的試験から種の同定を試みた。なお、後に詳述するように、本調査において地下水試料から分離された硫酸塩還元細菌は生育(増殖速度及び増殖量)が極めて悪く、大量培養することが不可能であった。従って、硫酸塩還元細菌の属および種の決定の際に有力な情報源の1つとなる化学分類手法(キノプロファイル法)及び遺伝学的手法(GC含量測定)は実施することが出来なかったことに留意されたい。以下の項目に分離、純粹化から同定にいたるまでの方法を詳述する。

##### (1) 分離及び純粹化

硫酸塩還元細菌の分離は前項目4.1.3(2)に示したMPN(5本)法において最高希釈段階で出現した試験管の培地の黒変部分をパスツールピペットにより釣菌することから開始した。この試料をPostgateの培地から寒天を除いた組成の液体培地に接種し、暗条件下、30℃で増菌培養した。増菌させた培養液から1mlを採取し還元剤を添加した生理食塩水に懸濁(希釈)させ、希釈液の1mlを38℃に保持した固体寒天培地と混合し、シャーレにて嫌気培養(ベクトンディッキンソン社製、ガスバックパウチ)を行った。しかしこの方法では分離菌の生育が不良であったため、分離の際に半固体培地による純粹化作業も併用した。これは、本調査で分離した菌株が生育最適温度が20℃前後であり、一般的な硫酸塩還元細菌が良好に生育できる中温域(30℃前後)では極めて生育が悪くなることに対する配慮である。すなわち、固体寒天培地では菌体接種の際に、寒天を溶解させておく必要があるため、寒天の最低溶解温度である38℃の温度環境に菌体を一次的にさらすことになる。これに対し半固体培地は、常温で使用できるので(常温で半固体状となる)、固体培地の場合のように一次的高温接触による分離菌の失活を心配する必要がない。ここで、一連の分離作業において生理食塩水に懸濁させる際に、必要に応じて超音波処理をおこない、共生細菌との分離を計った。その後嫌気培養したシャーレ(固体培地)あるいは試験管(半固体培地)に出現したコロニー(半固体培地では硫酸塩還元細菌が生育すると、部分的にコロニーが出現する場所ができ、この部分を採取する)を再び液体培地に接種し増菌を行った。ただし、ここから先の段階で用いる培地には粉末酵母エキスは含まれていない。これは、共存する従属栄養細菌の増殖を抑え、硫酸塩還元細菌の単一コロニーを得るための配慮である。以後、固体寒天培地と液体培地による培養を繰り返して地下水試料からの純粹株を1株得た(第4-3図に本調査で実施した硫酸塩還元細菌の純粹分離の操作手順を示す)。なお、純粹株が得られたか否かのチェックは他の細菌群との混在のないこと、あるいは同じ硫酸塩還元細菌の複数種の混在のないことについて確認した(第4-6表参照)。すなわち、他の細菌群との混在(共生)については従属栄養細菌、光合成硫黄細菌あるいは化学合成硫黄細菌の混在のないことを培養および顕微鏡観察により確かめた。また、硫酸塩還元細菌の複数種の存在性は顕微鏡観察により形態が単一であることから判断した。



第4-3図 硫酸塩還元細菌の純粋分離の操作手順

第4-6表 硫酸塩還元細菌の純粋化における混在菌(群)の判定

対象細菌群	試験(判定)方法
好気性従属栄養細菌群	Nutrient (Difco社製) 培地及び同培地に乳酸(最終濃度30mM)を添加したもので寒天平板培養(30℃, 1~2週間) ▽判定方法: 増殖コロニーの確認
嫌気性従属栄養細菌群	Nutrient (Difco社製) 培地及び同培地に乳酸およびブドウ糖(最終濃度30mM)を添加したもので重層寒天によりガスバック嫌気培養(30℃, 2~3週間) ▽判定方法: 増殖コロニーの確認
光合成紅色非硫黄細菌 ( <i>Rhodospirillaceae</i> 科)	BibleとPfennig(1981)の培地(第4-8表参照)で寒天混釈法により嫌気・明培養(30℃, 3週間) ▽判定方法: 増殖コロニーの確認
光合成紅色硫黄細菌 ( <i>Chromatiaceae</i> 科)	PfennigとTruper(1974)の培地(第4-9表参照)で寒天混釈法により嫌気・明培養(30℃, 4週間) ▽判定方法: 増殖コロニーの確認
光合成綠色硫黄細菌 ( <i>Chlorobiaceae</i> 科)	光合成紅色硫黄細菌と同じ
無色硫黄細菌群	光学顕微鏡(400倍)により観察 ▽判定方法: 糸状性細胞の有無

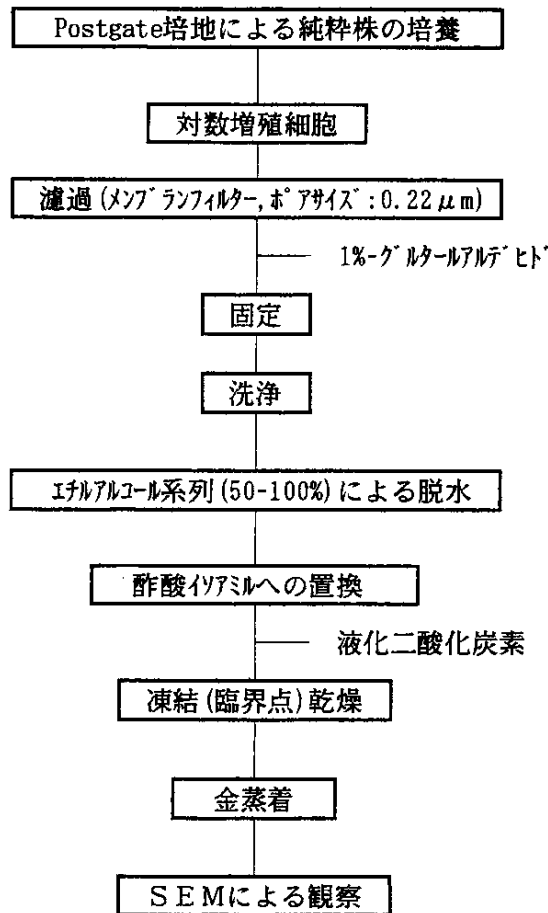
## (2) 同定操作

前項(1)で得られた純粋株に関して、形態学的試験及び生理学的試験を行い属・種の同定を試みた。以下にその試験の内容を詳述する。

### 1) 形態学的試験

次の内容で試験を行った。

- ① 光学顕微鏡及び電子顕微鏡による細胞の形態観察  
走査型電子顕微鏡(SEM)観察試料の調整手順を第4-4図に示す。
- ② 運動能観察
- ③ グラム染色  
グラム染色の手順を第4-5図に示す。
- ④ 鞭毛観察  
鞭毛染色の手順を第4-6図に示す。
- ⑤ 孢子形成能試験  
孢子形成能試験は、メチレンブルーによる単染色後、検鏡により孢子の形成を観察した。さらに生細胞懸濁液を、85℃で10分間加熱した後、Postgateの培地で培養し、生育の確認を行った。ここで孢子形成能の有る細菌であるならば熱処理後も生育するが、非形成の細菌なら生育しない。

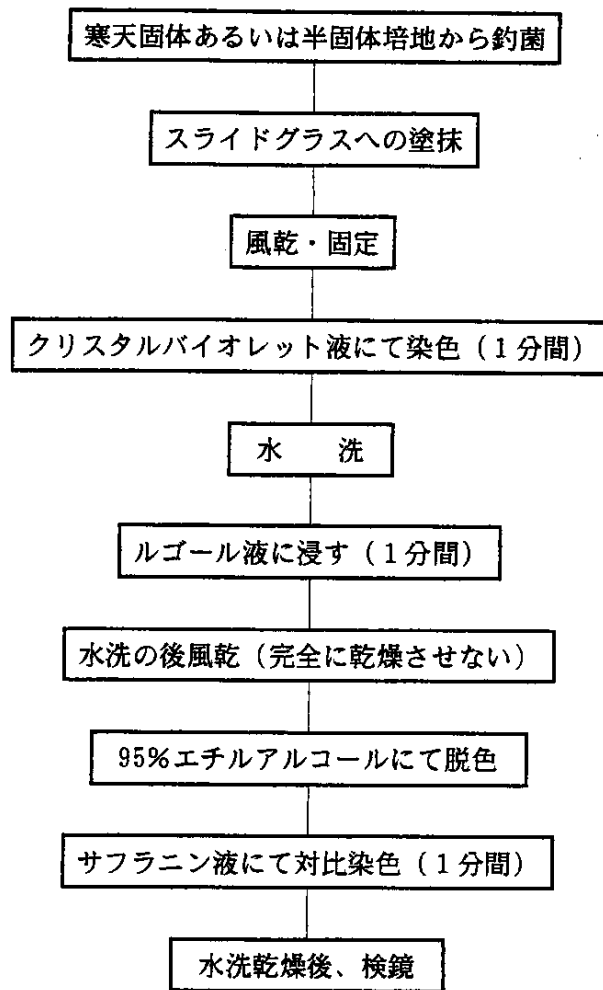


#### 走査型電子顕微鏡観察の手順

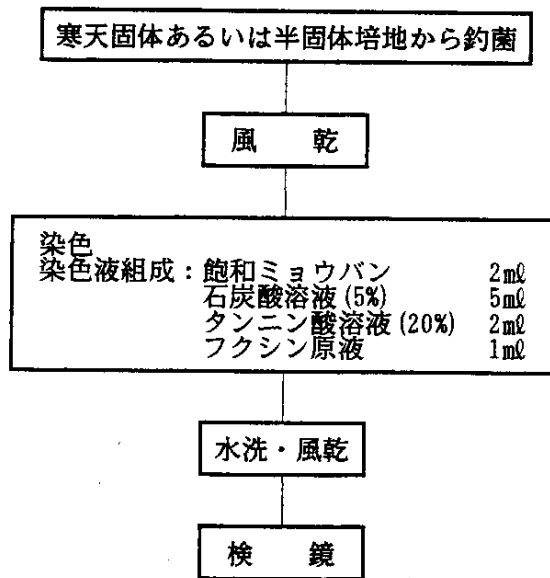
分離、純粋化した菌株をPostgate培地 (液体) により20℃、暗条件下で培養した細胞懸濁液を走査型電子顕微鏡 (SEM) 用の試料とした。SEM観察用試料の調製は以下の通りである。

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

第4-4図 走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察試料の調製手順



第4-5図 グラム染色の手順



第4-6図 鞭毛染色の手順

## 2) 生理学的試験

次の内容で試験を行った。

### ① 基質資化性（生育に利用できる炭素源の検討）

Postgateの培地から粉末酵母エキス及び乳酸を除き、これらの有機物源のかわりにリンゴ酸塩、ギ酸塩、酢酸塩、及びブドウ糖を添加した培地で培養を行い生育を観察した。また、硫酸塩の存在しない場合の基質の資化性についても試験を行った。この場合は、Postgateの培地の硫酸塩と有機物源を除き、かわりにピルビン酸あるいはコリンを添加した培地で培養を行い、生育を観察した。

### ② NaCl 要求性

### ③ 好温性

第4-7表 基質資化性（生育に利用できる炭素源）試験の概要

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

注) 培地に添加した全ての有機物基質は最終濃度を30mMとした。



第4-8表 光合成紅色非硫黄細菌用培地

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.5	g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.6	g
$\text{NH}_4\text{C}\ell$ <sup>1)</sup>	1.0	g
$\text{MgC}\ell_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ <sup>2)</sup>	0.2	g
$\text{NaC}\ell$	0.2	g
$\text{CaC}\ell_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05	g
Yeast Extract	0.1	g
Sodium Acetate	1.0	g
微量元素混液 <sup>3)</sup>	1.0	ml
ビタミン混液 <sup>4)</sup>	1.0	ml
イオン交換水	1000	ml
pH = 7		

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

3) 第4-10表を参照

4) 第4-11表を参照

第4-9表 光合成硫黄細菌用培地

[基礎培地]		
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.0	g
$\text{NH}_4\text{C}\ell$	1.0	g
$\text{MgC}\ell_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.2	g
$\text{CaC}\ell_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05	g
微量元素混液 <sup>1)</sup>	1.0	ml
ビタミン混液 <sup>2)</sup>	1.0	ml
イオン交換水	1000	ml
[紅色硫黄細菌]		
1N-HC $\ell$	0.3	ml
8%- $\text{NaHCO}_3$ <sup>3)</sup>	0.5	ml
2%- $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	1.0	ml
基礎培地	18.2	ml
[綠色硫黄細菌]		
1N-NaOH	0.05	ml
8%- $\text{NaHCO}_3$ <sup>3)</sup>	0.5	ml
2%- $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0.25	ml
基礎培地	19.2	ml

1) 第4-10表を参照

2) 第4-11表を参照

3) 濾過滅菌後使用

第4-10表 微量元素溶液の組成 [光合成細菌用]

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

第4-11表 ビタミン混液の組成 [光合成細菌用]

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

## 4.2 バクテリア調査結果

### 4.2.1 種々細菌数計数結果

本調査において得られた種々細菌の現存量の一覧を第4-12表に示す。

第4-12表 各種細菌数計数結果

項目	単位	試料名称		計数方法
		地下水	地表水	
全菌数	cells/mℓ	$1.0 \times 10^5$	$2.1 \times 10^4$	AODC法
鉄酸化細菌	MPN/mℓ	N. D. *1	N. D. *1	MPN法
硫酸塩還元細菌	CFU/mℓ	N. D. *2	N. D. *2	二重皿法
	MPN/mℓ	$0.8 \times 10^0$	$1.1 \times 10^1$	MPN法
メタン生成細菌	MPN/mℓ	$0.4 \times 10^0$	N. D. *3	MPN法

\*1  $<2.0 \times 10^{-2}$ MPN/mℓ

\*2  $<1$ CFU/mℓ

\*3  $<4.0 \times 10^{-2}$ MPN/mℓ

#### 4.2.2 地下水試料から分離した硫酸塩還元細菌の同定結果

##### (1) 属の同定

地下水試料から分離した硫酸塩還元細菌1株について以下の手順により、属名を決定した。

現在知られている硫酸塩還元細菌の属名と形状（中山大樹，1985）を第4-13表に示す。

第4-13表 硫酸塩還元細菌の属名と形状

属名	形状
<i>Desulfovibrio</i>	短ラセン状
<i>Desulfomonas</i>	かん状
<i>Desulfococcus</i>	球状
<i>Desulfobacter</i>	短かん状
<i>Desulfobulbus</i>	レモン状
<i>Desulfosarcina</i>	石垣状
<i>Desulfotomaculum</i>	有孢子かん状

一方地下水試料から分離した硫酸塩還元細菌の形態学的試験結果は次のようになった。

第4-14表 純粋分離株の形態学的試験結果

項目	結果
形態観察	電子顕微鏡写真を巻末の付帯資料に示す
・形状	シグモイド(S字)型 (一部ビブリオ型)
・幅	0.4 $\mu\text{m}$
・長さ	2~5 $\mu\text{m}$
運動能観察	運動能有り
グラム染色	陰性
鞭毛観察	単極毛
孢子形成能	非形成

属名の決定に際し有力な情報になるものとして、細胞の形状と孢子形成能が挙げられる。第4-13表と第4-14表から、本分離菌株は *Desulfovibrio* 属であることが示唆される。

## (2) 種の同定

*Desulfovibrio*属に同定された本分離菌株について形態、生理学的試験を行った結果について第4-15表に示す。なお、第4-15表には *Desulfovibrio*属に属する種についてBergey's Manual 8th Edition (1974) 及びPostgate (1979) の記述から引用したデータを比較の為に併記する。

本分離菌株の形態学的特徴は、巻末の付帯資料に示した電子顕微鏡写真から明確なように、シグモイド (S字) 型である。別に行った鞭毛観察では単極毛が観察された。また、生菌の顕微鏡観察において運動性が観察された。

生理学的試験において本分離菌株は、硫酸塩存在下において、乳酸塩、リンゴ酸塩、ギ酸塩、酢酸塩及びグルコースにより生育が認められた。しかしながら、いずれの基質においても生育は非常に悪く、なかでもリンゴ酸塩、ギ酸塩及びグルコースについては極めて微弱な生育であった。また、硫酸塩の非存在下においては、ピルビン酸塩、コリンのいずれの場合も生育が認められなかった。本分離菌株の生理的特徴としては酢酸塩を資化できそうであることが挙げられる。

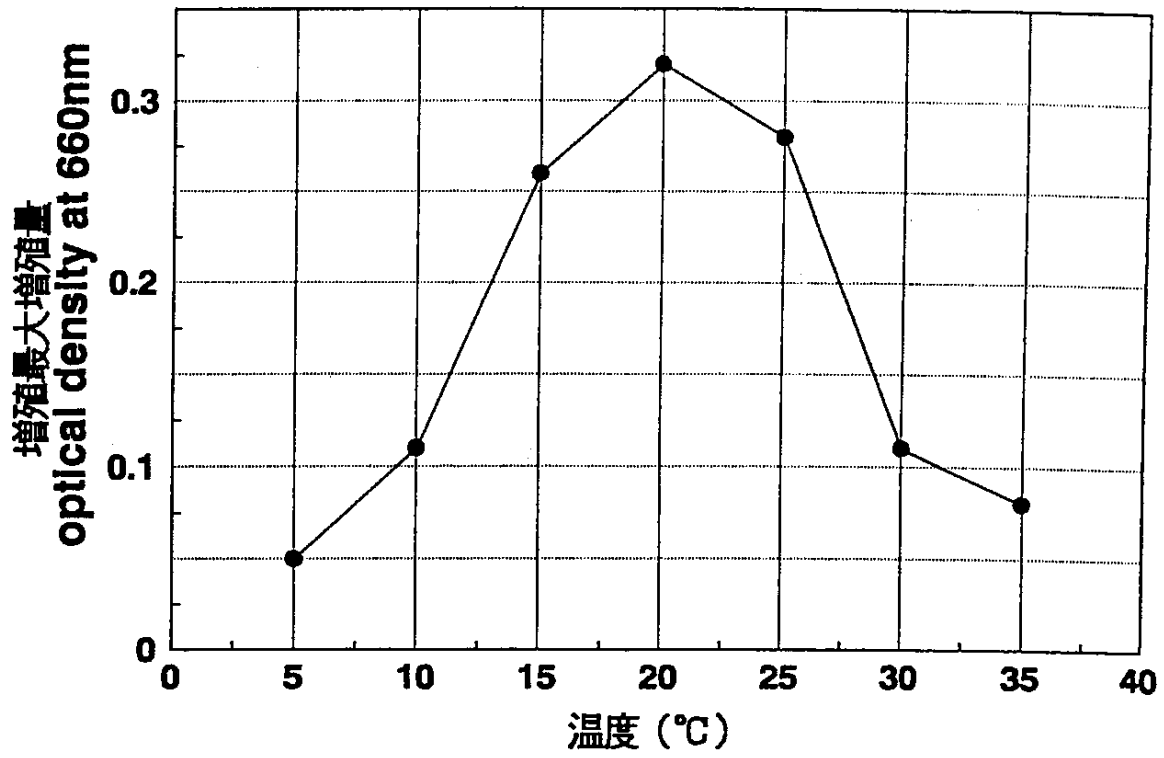
本分離菌株においてNaCl 要求性は認められなかった。さらに本菌株の温度と増殖の関係を第4-7図に示す。一般に硫酸塩還元細菌は35℃前後を最適生育温度とするが、第4-7図から明かなように本菌株は20℃前後を最適生育温度とする。

以上の結果より、本分離菌株は形態学的には *Desulfovibrio africanus*に近いが、生理学的には該当する基本種がみあたらない。

従って、本菌株は *Desulfovibrio*属と同定されるが、種に関しては同定不能であった。

第4-15表 本分離菌株の形態学的、生理学的試験結果及び *Desulfovibrio* 属の形態学的、生理学的特性一覽表

項 目	本分離菌株	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	<i>Desulfovibrio desulfuricans subsp. aestuarii</i>	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	<i>Desulfovibrio salexigens</i>	<i>Desulfovibrio africanus</i>	<i>Desulfovibrio gigas</i>
<b>形態学的特性</b> ・形状 ・幅 (μm) ・長さ (μm) ・運動能 ・グラム染色 ・鞭毛 ・孢子形成能	シグモイド型 (一部ビブリオ型)	ビブリオ /ラセン型	ビブリオ型	ビブリオ /ラセン型	ビブリオ /ラセン型	シグモイド型	ビブリオ /ラセン型
	0.4	0.5~1		0.5~1	0.5~1	0.5	1.2~1.5
	2~5	3~5		3~5	3~5	5~10	5~10
	有り	有り	有り	有り	有り	有り	有り
	-	-	-	-	-	-	-
	単極毛	単極毛	単極毛	単極毛	単極毛	束毛	束毛
	-	-	-	-	-	-	-
<b>生理学的特性</b> ・基質資化性 (with sulfate) 乳酸塩 リンゴ酸塩 ギ酸塩 酢酸塩 ブドウ糖 (without sulfate) ビルビン酸塩 コリン ・NaCl 要求性 ・最適生育温度 (°C)							
	+	+	+	+	+	+	+
	±?	+	+	-	+	+	-
	±?	±	?	±	±	±	±
	±?	-	-	-	-	-	-
	±?	±	±	-	?	?	?
	-	+	+	-	-	-	-
	-	+	+	-	-	-	-
	-	-	+	-	+	-	-
	15~25	25~30		25~30	25~30	25~30	25~30



第4-7図 分離菌株の種々温度における増殖特性

## 5. 考察

### 5.1 地下水化学分析結果に関する考察

#### 5.1.1 地下水の化学成分

地下水の化学分析から得た主成分の当量濃度からプロットしたトリリニアダイアグラムを第5-1図に示した。トリリニアダイアグラムは地下水の分類・起源・変化・進化等を考察する際、一般的に利用される。第5-1図ではトリリニアダイアグラムを5つの領域に区分しているが、各領域は次のように解釈されている（日本化学会編，1992）。

領域Ⅰ：重炭酸カルシウム・マグネシウムから成り、主として不圧地下水はこの領域となり、循環性の供給型地下水と考えられる。被圧地下水もこの領域にあるがもっと広範囲に散り、徐々にⅡに移行する傾向がある（Ⅰ→Ⅴ→Ⅱ）。

領域Ⅱ： $\text{Na}_2\text{CO}_3$ や $\text{K}_2\text{CO}_3$ から成り、被圧地下水はここに集まる。被圧地下水は停滞性のもので、この領域は停滞性の地下水の水質を示している。

領域Ⅲ：地下水がこの領域になることはあまりない。

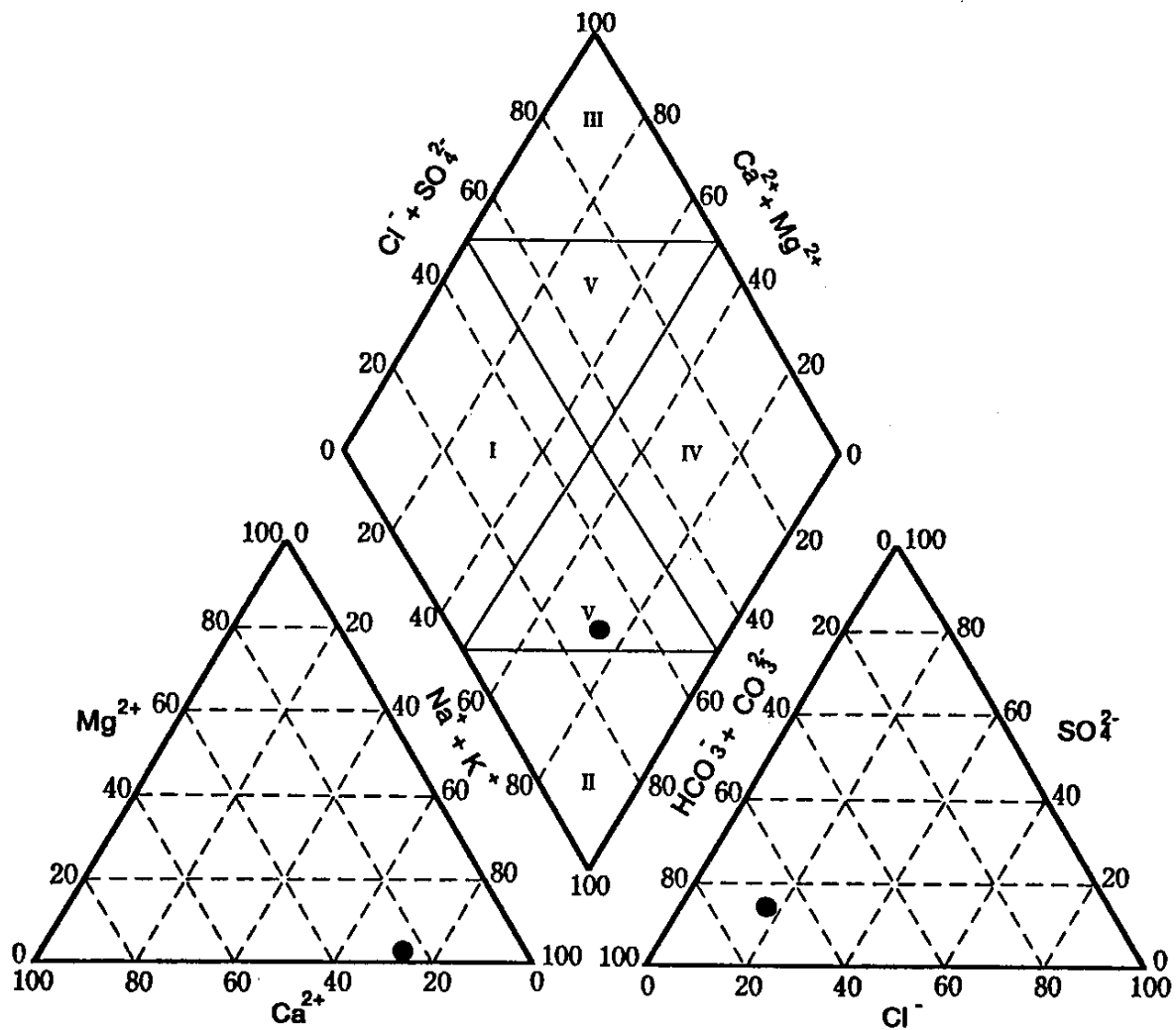
領域Ⅳ：塩化物、硫酸塩が主体で、海水の混入あるいは化石塩水の混入した地下水と考えてよい。

領域Ⅴ：Ⅱ及びⅢの中間的領域と考えられる。

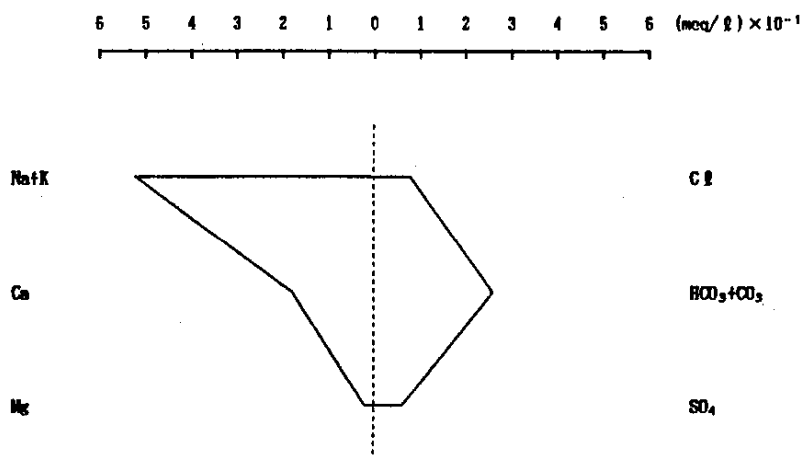
第5-1図から明らかなように、今回の地下水はⅡに近いⅤの領域となり、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム等の炭酸化学種で構成される被圧地下水と分類される。

トリリニアダイアグラムは地下水系の分類に極めて有効な方法であるが、溶存成分の絶対量を示していないという欠点がある。そこで第5-2図に、地下水主成分の当量濃度でヘキサダイアグラムを示しこの欠点を補った。第5-2図から明らかなように、本調査地下水は、カチオンとして $\text{Na}^+$ + $\text{K}^+$ が、アニオンとして $\text{HCO}_3^-$ + $\text{CO}_3^{2-}$ の含有量が多い地下水と理解できる。





第5-1図 地下水のトリリニアダイアグラム



第5-2図 地下水のヘキサダイアグラム

瀬尾、清水は我が国における地下水の水質を概略的に把握することを目的として、文献調査によるデータの収集及び解析を行っている（PNC TN7410 92-017, 1992）。これによると収集した文献は、過去36年間に公開された公共機関の報告書や地下水関係の学会誌など約3,600件で、このうち401件の文献から14,541件にのぼるデータを抽出し、各種の統計処理をほどこしている。第5-1表にこのなかから降水起源と考えられる地下水（5,127件）の集計結果を示し、併せて本調査地下水の水質と比較した。

第5-1表 降水起源と考えられる地下水の集計結果  
(PNC TN7410 92-017)

項目	降水起源と考えられる地下水			本調査地下水
	最小値	最大値	平均値	
pH	5.8	9.8	7.1	10.2
Na <sup>+</sup> (mg/ℓ)	—	653	29.9	11.10
K <sup>+</sup> (mg/ℓ)	—	124	4.3	1.42
Ca <sup>2+</sup> (mg/ℓ)	—	395	17.1	3.7
Mg <sup>2+</sup> (mg/ℓ)	—	267	7.7	0.17
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/ℓ)	—	2062	145.3	6.56
Cl <sup>-</sup> (mg/ℓ)	—	141	20.6	2.5
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg/ℓ)	—	95	9.0	2.6
SiO <sub>2</sub> (mg/ℓ)	—	231	42.5	17.5

上表より明らかなように、本調査地下水は一般的地下水と比較しても含有する塩類の濃度が希薄なものと同類別される。

### 5.1.2 地下水の年代

地下水中のトリチウム分析の主たる目的はその滞留時間の推定にある(近藤ら, 1983)。よく知られているように大気中のトリチウム濃度は1952年以後の大気中における熱核爆発実験によって急激に増加し1963年には最大値が観測された。1992年現在ではほぼ天然レベルの5~10TRまで回復している。そこで、1952年以後から1983年までの降水中のトリチウム濃度を第5-3図に示す。また第5-3図には、本調査において1992年に採取したK G - 1孔の地下水中のトリチウム濃度(4.4±0.1 TR)もプロットし、直線によってトリチウムの半減の様子を示した。

第5-3図から見ると、1952年から始まった大気圏内の核実験によるトリチウム濃度の異常を本調査地下水が受けている可能性は、直線が高異常地帯を横切ることから否定することはできない。

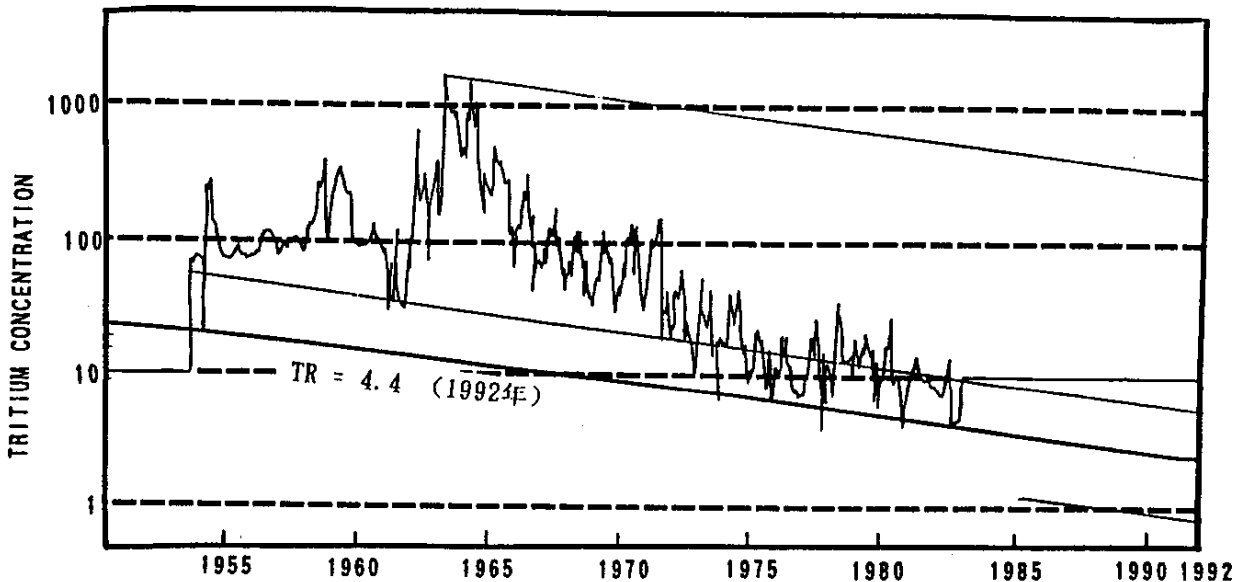
核実験の影響のない天然レベルの降水のトリチウム濃度を10TRと仮定すると、本調査地下水の年代 $t$ は、次式より計算される。

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

ただし  $T_{1/2} = 12.43$  (年) トリチウムの半減期  
 $N_0 = 10.0$  (TR) 天然レベルの降水のトリチウム濃度(推定値)  
 $N = 4.4$  (TR) 本調査地下水のトリチウム濃度

上式より求めた地下水の年代は14.7年となる。

実際には降水中のトリチウム濃度の時間的変動及び滞水層内における分散の効果により、多少の誤差が生じるはずである。また本調査地下水が核実験の影響を受けていると仮定するならば、40~14.7年前の地下水と考えることができる。



第5-3図 降水中のトリチウム濃度の経年変化  
 (データは近藤ら(1983)による。ただし1952年以前及び1983年以降は10TRとした。)

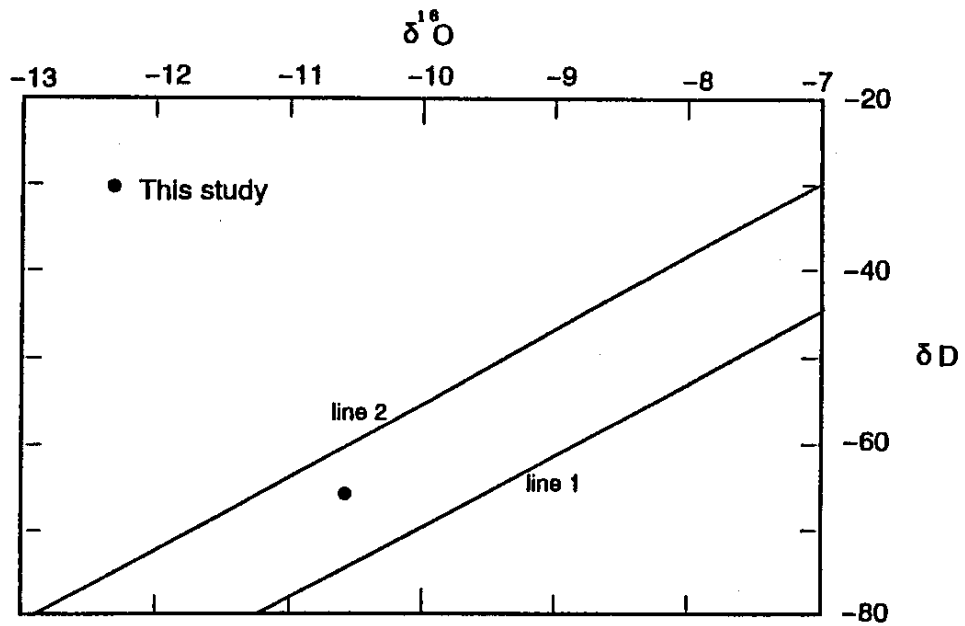
### 5.1.3 地下水の同位体比

水の構成要素である酸素及び水素同位体組成は、水の起源を推定するための有力な情報を提供する。松葉谷ら（1983）による日本の天水の値と、本調査地下水の分析値を第5-4図にプロットした。第5-4図の直線は各々以下の意味を表す。

line 1 :  $\delta D = 8 \delta^{18}O + 10$  : 太平洋側の天水の  $\delta D$  と  $\delta^{18}O$  の関係

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

第5-4図で明らかなように、本調査地下水はline1と2の間にプロットされる。これは本調査地下水が天水起源であることを示し、水-岩石間で酸素同位体交換を起こしていないことを示していると考えられる。



第5-4図 天水の  $\delta D$  と  $\delta^{18}O$  の関係  
(松葉谷ら、1983)

## 5.2 バクテリア調査結果に関する考察

### 5.2.1 全菌数について

地下水試料は $1.0 \times 10^5$  cells/ml、地表水試料は $2.1 \times 10^4$  cells/mlと計数され、地下水の方が微生物に富んでいた。水質的には地下水pHが10.2、地表水pHが7.7であり、地表水の方が中性に近く、微生物の生息環境としては適していると考えられるが、一方水温は、地下水が11.6℃であるのに対し地表水が5.3℃と低く、これが本調査地における地表水中の微生物の生息に関する制限因子となっていることが示唆される。

### 5.2.2 鉄酸化細菌について

本調査で計数した鉄酸化細菌は、*Thiobacillus ferrooxidans*である。この細菌の一般的特性を第5-2表に示す（伊藤一郎，1976）。

第5-2表 *Thiobacillus ferrooxidans*の一般的特性

細菌の大きさ ( $\mu\text{m}$ )	0.5×1.0
最適温度 (°C)	30
最適 pH	2.5~3.8
グラム染色	-
運動性	+

今回の調査では地下水、地表水共に *T. ferrooxidans* は検出されなかった。これは第5-1表に見られるように、地下水と地表水の水温及びpHが、*T. ferrooxidans* の生育環境から大きく外れていたためと考えられる。

### 5.2.3 硫酸塩還元細菌について

自然水域における硫酸塩還元細菌のおよその出現オーダーは、不検出から $10^4$ /ml、堆積物中では最高 $10^8$ /gに及ぶ。概して、有機物と $\text{SO}_4^{2-}$ に富む汽水域あるいは極度に富栄養化した水域から高い値が報告されている（竹内準一，滝井 進，1987）。硫酸塩還元細菌の生息に関する環境因子としては、温度、酸化還元電位、pH、硫化物濃度、塩分濃度、エネルギー源及び炭素源の存在などが挙げられる（竹内準一，1989）。これらの内容を次に示す。

#### (1) 温度

一般に硫酸塩還元細菌は15~45℃を生育範囲とするが、*Desulfovibrio vulgaris*など中温菌は30℃、*Desulfotomaculum nigrificans*など高温菌は55℃に至適温度がある。通常の水の中細菌が20~25℃で培養されることを考えれば、硫酸塩還元細菌の生育温度はやや高温側にシフトしていると考えられる。

#### (2) 酸化還元電位

硫酸塩還元細菌はすべて偏性嫌気性細菌であるが、ある種の硫酸塩還元細菌は曝気に耐えたり好気的な水体でも生存が可能であるという報告もある。しかしながら、増殖開始には-100mV程度

の低い酸化還元電位が必要である。従って、ことに純粋培養の場合、還元剤の添加によって予め培地の酸化還元電位を低く保っておくことが欠かせない。ただし、好気性細菌との混合培養であれば、共存菌の働きによって速やかに培地が還元されるので、還元剤の添加は必ずしも要しない。自然界では、局在する生物遺骸を核として硫酸塩還元細菌の増殖が開始されるものと考えられている。

### (3) pH

硫酸塩還元細菌の多くはpH4.5~9.5の範囲で生育でき、pH6.5~8.0の中性付近が至適条件である。

### (4) 硫化物濃度

硫酸塩還元細菌の活動に伴って生成する遊離の $H_2S$ が150mg/l程度になると、この菌自身の増殖を阻害するようになる。しかし、自然界では鉄塩と反応して硫化鉄として固定されるので、800mg/l程度まで集積しても阻害作用が認められないこともある。

### (5) 塩分濃度

硫酸塩還元細菌の分布は、塩分濃度が0から飽和状態まですべての範囲にわたるが、一般的には、陸水環境に由来する菌株（非好塩性）は塩分濃度1%未満に、海洋環境からの菌株（好塩性）は3%付近に至適濃度をもっている。

### (6) エネルギー源及び炭素源（電子供与体）

硫酸塩還元細菌が利用できる有機物の範囲は比較的狭く、乳酸、酪酸、プロピオン酸など炭素数が4ないし3程度の脂肪酸が中心になる。その後、炭素数2の酢酸や逆にもっと長鎖のパルミチン酸なども酸化できる菌種が見出され、有機物の利用範囲は徐々に広がっている。

硫酸塩還元細菌の多くの菌種がヒドロゲナーゼを有していて、分子状水素( $H_2$ )を用いて生育することが知られている。このことから硫酸塩還元細菌の独立栄養が信じられていた。しかし、現在ではこの場合も分子状水素の他に細胞の炭素源として酵母エキスなどの有機物が必要であり、混合栄養であることが明らかにされている。ただし、Widdelの分離した新しいタイプの硫酸塩還元細菌 *Desulfonema*, *Desulfosarcina*には独立栄養性があるとされている。

不完全なエネルギー源としては分子状水素と同様にイソプロパノールやオキサミン酸などが挙げられる。これらの有機物は硫酸塩の還元を進めるが、硫酸塩還元細菌の生育は支持しない。

乳酸利用性の一般の硫酸塩還元細菌は、乳酸を酢酸まで酸化する過程でピルビン酸を経由する。従って、in vivoには当初からピルビン酸が利用できる。菌種によっては電子受容体である $SO_4^{2-}$ がない条件でもピルビン酸を用いて発酵的に生育することが可能である。

以上の知見の多くは純粋培養系でのものであり、自然界のように硫酸塩還元細菌が他の従属栄養細菌と共存する場合には、純粋培養系とは異なりきわめて広範囲の有機物が利用可能である。

### (7) 硫酸塩濃度（電子受容体）

硫酸塩還元細菌の活動によって生成する $H_2S$ は、環境中の $SO_4^{2-}$ に由来する。増殖に必要な $SO_4^{2-}$ 濃度は、海洋起源の好塩性種でさえ海水の約1/100程度（標準塩素量の海水1kgに含まれる $SO_4^{2-}$ はおよそ2.65g、従って約27mg/l）で、硫酸塩還元細菌の自然界での分布を制限することはないと考えられている。しかし、生育環境中での硫化物集積量は $SO_4^{2-}$ 濃度に比例する傾向にある。

これらの環境因子が自然界における硫酸塩還元細菌の生息・分布に及ぼす影響度は、例えば水界の堆積物中においては、温度が最も重要で、次いで電子供与体濃度（有機物等）、電子受容体濃度（ $SO_4^{2-}$ ）の順に強いされている（Nedwell D.B. and Abram J.W., 1979）。

今回の調査試料における硫酸塩還元細菌の菌数は、地下水で $0.8 \times 10^9$ MPN/ml、地表水で $1.1 \times 10^1$ MPN/mlと計数され、地下水より地表水で豊富であったが、全菌数に占める硫酸塩還元細菌の割合を考えるまでもなく、硫酸塩還元細菌の存在性としては極めて希薄な試料であったと考えられる。地下水においては、TOCが12.8mg/lと地下水としては高く硫酸塩還元細菌の電子供与体になりうる

有機物の存在を示唆しているが、水温及びpHが硫酸塩還元細菌の生息環境から大きく外れているためこれが制限因子となっていると考えられる。また地表水においては地下水のような化学分析を実施していないため、電子供与体及び電子受容体の存在は不明であるが、水温が極めて低いためこれが制限因子になっていると考えられる。

#### 5.2.4 メタン生成細菌について

絶対嫌気性細菌はたとえ極限濃度でも、酸素の存在下では生育できない微生物であるが、メタン生成細菌はその中でも酸素に対して非常に感受性の高いグループに属する。すなわちメタン生成細菌は極限濃度の酸素の存在下で生育できないだけでなく、酸素との接触によって速やかに死滅していく。従って、分布する環境は嫌気的環境である。

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8版(1974)では、メタン生成細菌は *Methanobacteriaceae* という1つのfamily(科)の中に、3genus(属)、すなわち *Methanobacterium*, *Methanosarcina*, *Methanococcus* の9菌種として主に形態学的な性質別にまとめられている。また近年では分離技術の進歩に伴い、上記の3属に *Methanobrevibacter*, *Methanomicrobium*, *Methanogenium*, *Methanospirillum* の4属が新たに追加され、メタン生成細菌は全体として7属、13菌種に分類されている。これらのメタン生成細菌のうち主な菌種の性状を第5-3表に示す。

第5-3表 主なメタン生成細菌の性状  
(柳田友道, 1983)

メタン生成細菌	菌の性質	メタン生成の基質	独立栄養による増殖の可否
<i>Methanobacterium arbohilicum</i> **	グラム陽性、 かん菌	H <sub>2</sub> とCO <sub>2</sub>	可
<i>Methanobacterium formicicum</i>	グラム不定、 かん菌時に湾曲	H <sub>2</sub> とCO <sub>2</sub> または CO, HCOOH	可
<i>Methanobacterium ruminantium</i>	グラム陽性、 球菌ないし短かん菌	H <sub>2</sub> とCO <sub>2</sub> , HCOOH	否
<i>Methanobacterium mobile</i>	グラム陰性、 短かん菌	H <sub>2</sub> とCO <sub>2</sub> , HCOOH	否
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	グラム陽性、好熱性、 かん菌	H <sub>2</sub> とCO <sub>2</sub>	否
<i>Methanococcus vannielii</i>	グラム陽性、 球菌	H <sub>2</sub> とCO <sub>2</sub> , HCOOH	可*
<i>Methanosarcina barkeri</i>	グラム陽性、 球菌	H <sub>2</sub> とCO <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> OH	可
<i>Methanospirillum hungatei</i> **	グラム陰性、 螺旋菌	H <sub>2</sub> とCO <sub>2</sub> , HCOOH	可*

\* システイン、チオグリコール酸などの有機の還元性物質とビタミン以外には有機物は存在しないという条件下で独立栄養的に増殖する。

\*\* Bergey's Manual(8版)には記載されていない。

上述した酸素に対する感受性という点では、メタン生成細菌の中でもこれらの種類によってある程度差があると考えられている。

今回の調査試料におけるメタン生成細菌の菌数は、地下水で $0.4 \times 10^0$ MPN/ml、地表水で不検出であった。地表水の溶存酸素濃度は11.6mg/lであり、メタン生成細菌が生息できる環境ではなかった。



## 5.2.5 バクテリア調査のまとめ

### (1) 地下水の水質とバクテリアの存在性について

本調査地下水におけるバクテリアの調査結果と水質の関係を第5-4表に示す。

第5-4表 バクテリア調査結果と水質の関係

項目	単位	this study (釜石)
採水深度	m	-738
岩質		栗橋花崗閃緑岩
採水器		HGP-10
水温	℃	11.6
pH		10.2
ORP	mV	26
TOC	mg/ℓ	12.8
H <sub>2</sub>	mg/ℓ	<0.2
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	mg/ℓ	2.6
ΣCO <sub>2</sub>	mg/ℓ	8.1
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	mg/ℓ	6.56
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	mg/ℓ	4.55
全菌数	cells/ml	1.0×10 <sup>5</sup>
鉄酸化細菌	MPN/ml	N. D. *1
硫酸塩還元細菌	CFU/ml	N. D. *2
	MPN/ml	0.8×10 <sup>0</sup>
メタン生成細菌	MPN/ml	0.4×10 <sup>0</sup>

\*1 <2.0×10<sup>-2</sup>MPN/ml

\*2 <1CFU/ml

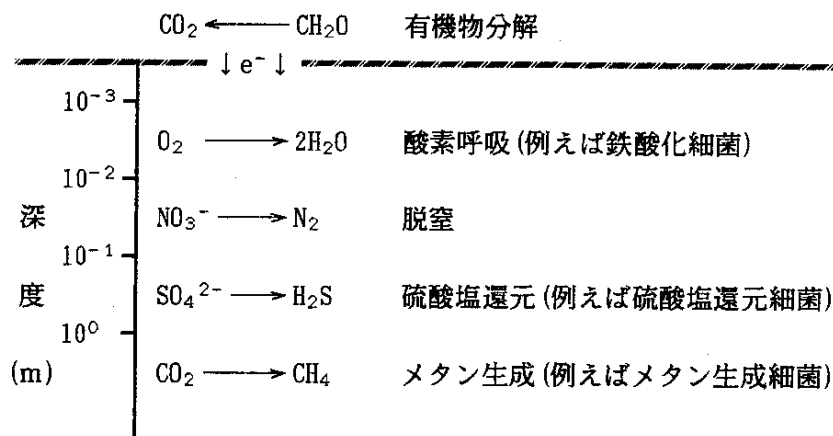
スウェーデン南東部前カンブリアン代の花崗岩岩盤を掘削した試錐孔から地下129~860mの地下水を採取し、本調査と同様の調査を行った報告がある (Karsten Pedersen, 1989, 1990)。この報告によると、調査された地下水の全菌数は0.75~17.5×10<sup>5</sup>cells/mlで、平均2.6×10<sup>5</sup>cells/mlであった。またVan EsとMayer Reil (1982) は、世界中の海洋環境における全菌数に関する文献を集め整理しているが、これによると全菌数は0.1~264×10<sup>5</sup>cells/mlの範囲内であることを明らかにしている。本調査地下水の全菌数計数値は、これらの値とほぼ同程度であり、その活性は別として、微生物的には豊富であると考えられる。水質的にはpHが約10のアルカリ側にシフトしたものであったが、このような地下水でも海洋と同程度の範囲内でバクテリアが存在することは新しい知見であると考ええる。

特定バクテリアとして表記の3菌種を調査したが、そのうち鉄酸化細菌 (*T. ferrooxidans*) は検出されなかった。これは前項で述べたように、この細菌の生育環境と本地下水の性状に大きな

隔たりがあったためと考えられる。

硫酸塩還元細菌は、TOCが地下水としては高く電子供与体の存在及び $\text{SO}_4^{2-}$ も検出され電子受容体の存在が確認され、この細菌自身も検出された。一方メタン生成細菌についても、TOCと $\text{HCO}_3^-$ 等の検出により電子供与体と電子受容体の存在が明らかにされ、この細菌自身も検出された。しかし、計数值としては低いものであった。これらの細菌数が制限されている要因としては、地下水の水温が低いこと、pHが高いこと、還元度がさほど高くないことなどが挙げられる。

硫酸塩還元細菌とメタン生成細菌の関係はしばしば論議の対象とされているが、例えば水界堆積物中では、これら2菌種以外の微生物活動も活発で、各々の微生物活動の発現は深度に応じて、第5-5図のように対応している。

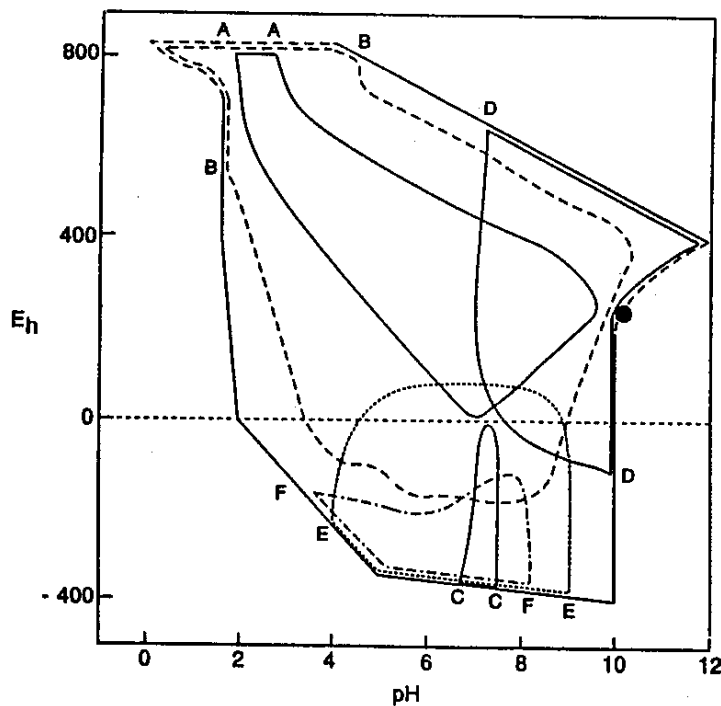


第5-5図 水界堆積物中で進行する微生物過程の深度による相違  
(Jorgensen B. B., 1980)

また、一般に硫酸塩還元反応及びメタン生成反応の起こり得る標準酸化還元電位 (pH7における理論値) は各々、0~-200mV、-200~-300mVとされている (高井, 1978) し、嫌氣的な有機物の分解過程としては、硝酸塩還元 (脱窒) → 硫酸塩還元 → メタン生成の順に起こることが明らかにされている (Widdel and Pfennig, 1977)。言い替えれば、硝酸塩還元 (脱窒) 反応が活発に起きている時には硫酸塩還元あるいはメタン生成反応が優占することはない、また硫酸塩還元反応が優占している時は、硝酸塩還元やメタン生成反応が活発に起こることはない。本調査では、硝酸塩還元細菌や脱窒細菌について計数を行っていないため、有機物の嫌気分解過程の優占反応を推定することは多少の困難を伴う。しかしながら、硫酸塩還元細菌がメタン生成細菌の2倍量計数されたが、全菌数の割にはこれらの細菌数が少ないこと、酸素呼吸を行う *T. ferrooxidans* が検出されなかったこと、及び測定された地下水のpHと酸化還元電位から、反応のピークが未だ硝酸塩還元の過程にあることが推測され、硝酸塩還元細菌及び脱窒細菌の存在が示唆される。

第5-6図にZajic (1969) が報告した微生物生育のためのpHとEhの範囲を示した。第5-6図には、今回の調査で検出された硫酸塩還元細菌とメタン生成細菌の存在範囲も併記した。Zajicが示したものは各微生物の生育範囲であるが、地下水における硫酸塩還元細菌とメタン生成細菌の存在範囲はこれよりpH, Ehともに上方に拡大する傾向にある。第5-6図では特にEhにおいてその傾向が顕著となるが、本調査での水質測定は原位置での測定ではなく、あくまで地表に汲み上げられた試料を対象としたものであることを考慮しなければならない。すなわち原位置から地表へ汲み上げる間に脱炭酸等を起こし水質変化があった可能性が否定できないので、少なくともpH, ORPなどの測定方法は今後の検討事項になると考える。また第5-6図からも、本調査地下水に脱窒細菌が存在している可能性を強く示唆される。

本調査で調査項目とした鉄酸化細菌、硫酸塩還元細菌、メタン生成細菌はいずれも地下構造物の健全性に影響を及ぼす可能性があり、国外の地下水調査においてその存在が報告されたバクテリアである。本調査により国内の地下水においても、少なくとも硫酸塩還元細菌とメタン生成細菌の存在が明らかにされ、日本国内の地下構造物に対してもこれらのバクテリアの影響が示唆される。



第5-6図 微生物生育のためのpHとEhの範囲

(Zajic, 1969)

- A 鉄バクテリア
- B チオバクテリア
- C メタン細菌
- D 脱窒菌
- E 硫酸塩還元細菌
- F 従属栄養細菌

● this study (釜石)

硫酸塩還元細菌とメタン生成細菌を検出

## (2) 地下深部におけるバクテリアの調査について

### 1) 現存量の測定 (項目及び方法について)

#### ①全菌数計数

生菌・死菌 (活性の有無) に係わらず総細胞数を計数することになる。このためには微生物細胞のみを識別・計数する必要があり、第5-5表に示すような染色法を用いるのが一般的である。このなかでも、本調査でも利用したAcridine Orangeによる蛍光染色が有効であるとされている。

第5-5表 微生物細胞の特殊染色法

染色法	概要
Tetrazolium chloride	デヒドロゲナーゼ活性を発色反応で検出
Phenol-aniline blue	微生物と他のもののコントラスト大
Acridine orange	核酸を選択的に染色
Fluorescein isocyanate	タンパク質を選択的に染色
蛍光抗体染色	特定菌種の蛍光抗体で選別的に蛍光染色

#### ②生菌数計数

生菌は好気性細菌と嫌気性細菌に区分され、さらに各々独立栄養細菌と従属栄養細菌に分けられる。しかし通性嫌気性細菌なども存在するので、好気性細菌数、嫌気性細菌数というのは曖昧な区分にすぎない (第5-6表参照)。また、本調査の対象は深部地下水であるので、特別な場合を除いて試料は還元的なものと考えられる。以上を勘案すれば、本調査における調査対象は嫌気性細菌になる。計数方法は培養による直接計数法と集落 (コロニー) 計数法があるが、次の問題点がある。

- ・独立栄養細菌も含めて考えるかどうか。
- ・栄養基質を有機物に限定するかどうか。
- ・栄養基質の濃度をどう決めるか。
- ・増殖速度 (観察期間)、その他の増殖特性 (pH, 塩分濃度, 温度, 圧力など) を培養条件の考慮に入れるかどうか。

独立栄養細菌を除外すれば自動的に栄養基質は有機物となる。深部地下水の有機物濃度は一般に低い (本調査地下水のTOCは12.8mg/l) と考えられるが、それでは計数培地に使用する有機物の種類と濃度をどうするかという問題になる。最も簡易な方法は、過去の研究事例を調査し、頻繁に利用されている培地を使用することがある。(このようにすると同じ方法であるので、調査データの比較に便利になる。) ただし、培養による計数法における「生存性」という言葉は、一定の培養時間内において供給された栄養塩で生育できるバクテリアを指すことになり、全生存性細菌数を過小評価する可能性もあることを理解しておかなければならない。

いずれにしても計数に使用する培地は慎重に選定する必要がある。

第5-6表 微生物のO<sub>2</sub>ならびに酸化還元環境依存性とエネルギー獲得法  
(柳田友道, 1984)

種類	環 境		O <sub>2</sub> 依存性	エネルギー獲得法*
	酸 化 的	還 元 的		
好気性： 偏性好気性	増 殖	増殖せず	要 求	呼吸 (O <sub>2</sub> )
微好気性	顕著でなければ増殖	顕著でなければ増殖	要 求 (<0.2気圧)**	呼吸 (O <sub>2</sub> )
通性嫌気性	増 殖	増 殖	O <sub>2</sub> 存在しても しなくても可	呼吸 (O <sub>2</sub> and/or NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) または発酵
嫌気性： 耐気性	増 殖	増 殖	要求せず 阻害もされず	発 酵
偏性嫌気性	死 滅	増 殖	阻 害	呼吸 (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , CO <sub>2</sub> , 77-ル酸など) または発酵

\* カッコ内は末端電子受容体

\*\* 空気中のO<sub>2</sub>分圧は0.2気圧

#### a 直接計数法

生存性のバクテリア細胞は生育のために栄養塩を与えるが、栄養塩溶液の中に細胞の生育を促すが、分裂を抑制する抗菌剤 (nalidixic acid) を添加する。こうすれば生存性細胞は一定の培養後、非常に大きくなっている。このような培養を行った後、例えばアクリジンオレンジなどで細胞を染色し顕微鏡で観察すれば、生存性の細胞と非生存性の細胞を簡単に識別し計数することができる。このような方法を直接計数法といい、現在、全菌数計数もこの方法を採用しているので、数値の対比は行い易い。

具体的な方法の一例 (Chapelle F.H. et al., 1987) を次に示す。

試料4mlをチューブに取り、0.02%nalidixic acid溶液 (シグマ製) の0.05mlと0.25%イーストエキス (ディフコ製) と0.25%酢酸ナトリウム溶液0.5mlを加える。試薬を添加している間、N<sub>2</sub>でチューブのヘッドスペースを洗い流すことと、0.02%硫化ナトリウム溶液の0.05mlを添加することにより、嫌気性を維持する (嫌気性条件・嫌気性細菌計数の場合)。nalidixic acidは、0.05N-NaOH溶液に溶解し、使用前に0.2μmのフィルターで素早く濾過・滅菌する。このチューブを25℃で12~18時間培養する。その後、ホルマリン (最終濃度2%) で固定、アクリジンオレンジで染色し、大きくなったバクテリアの数を顕微鏡下で直接計数する。

#### b 集落 (コロニー) 計数法

特定の培地でプレートを作成し、試料の接種・培養を行い、形成されるコロニー (Colony Forming Units : CFU) を計数する方法である。深部地下水中の細菌数の調査で利用された培地例を第5-7、5-8表に示す。この調査例における培養は、好気的あるいは嫌気的条件下で、30℃前後あるいは試料の原位置での温度で行っている。嫌気的条件下としては、例えば90%N<sub>2</sub>-10%CO<sub>2</sub>のようなガス条件としている。

第5-7表 有機基質1.5g/ℓ培地

(Karsten Pedersen, 1989, 1990)

ペプトン	0.5 g
イーストエキス	0.5 g
ブドウ糖	0.25g
デンプン	0.25g
CaCℓ <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1 g
NaCℓ	試料の塩分に調整
微量金属溶液*	1.0 ml
寒天	15.0 g
/Ion Exchanged Water	1 ℓ
pH adjusted at 7.5	
* 微量金属溶液	
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.2 g
CaCℓ <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	7.34g
MnCℓ <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2.5 g
CoCℓ <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.5 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5.0 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.2 g
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	50.0 g
/Ion Exchanged Water	1 ℓ
pH adjusted at 4.0	

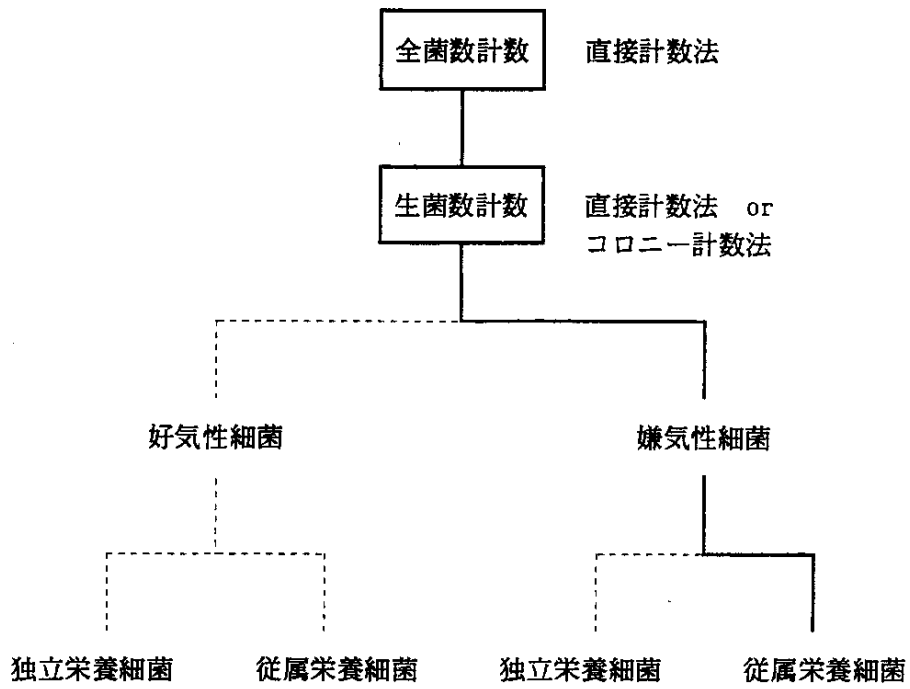
第5-8表 PTYG培地

(Carl B. Fliermans et al., 1989)

ペプトン	5.0 g
トリプトン	5.0 g
イーストエキス	10.0 g
ブドウ糖	10.0 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.6 g
CaCℓ <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.07g
/Ion Exchanged Water	1 ℓ

地下水の有機物濃度は極めて低い場合がある。このような場合は、利用する培地の有機物濃度により得られる細菌数が異なり、有機物濃度の低い方が高い細菌数を得ることがある。上表に示したPTYG培地では、これを100倍に希釈した1%PTYG培地（この場合はMgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>OとCaCℓ<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>Oも抜いている）というものもある。

以上をまとめて第5-7図に、深部地下水における細菌現存量の調査フローを示した。



第5-7図 深部地下水における細菌現存量の調査フロー

## 2)細菌種の識別(項目について)

細菌の現存量が分かれば、その細菌相がどのような種で構成されているか、また注目する生理作用を発揮する細菌種が何であるか知る必要がある。本調査において注目すべき生理作用としては、例えば次の事項が挙げられる。

- ①地下構造物の健全性に影響を及ぼす。
- ②核種の移行に影響を及ぼす。
- ③地下水中の物質移動に影響を及ぼす。

現在の調査で重視しているのは①の生理作用であるが、これでは例えば前項の脱窒細菌のように、地下水中の生存性の細菌相を考察する上で不都合がある。そこで調査の視点を③へ移行することを提案する。

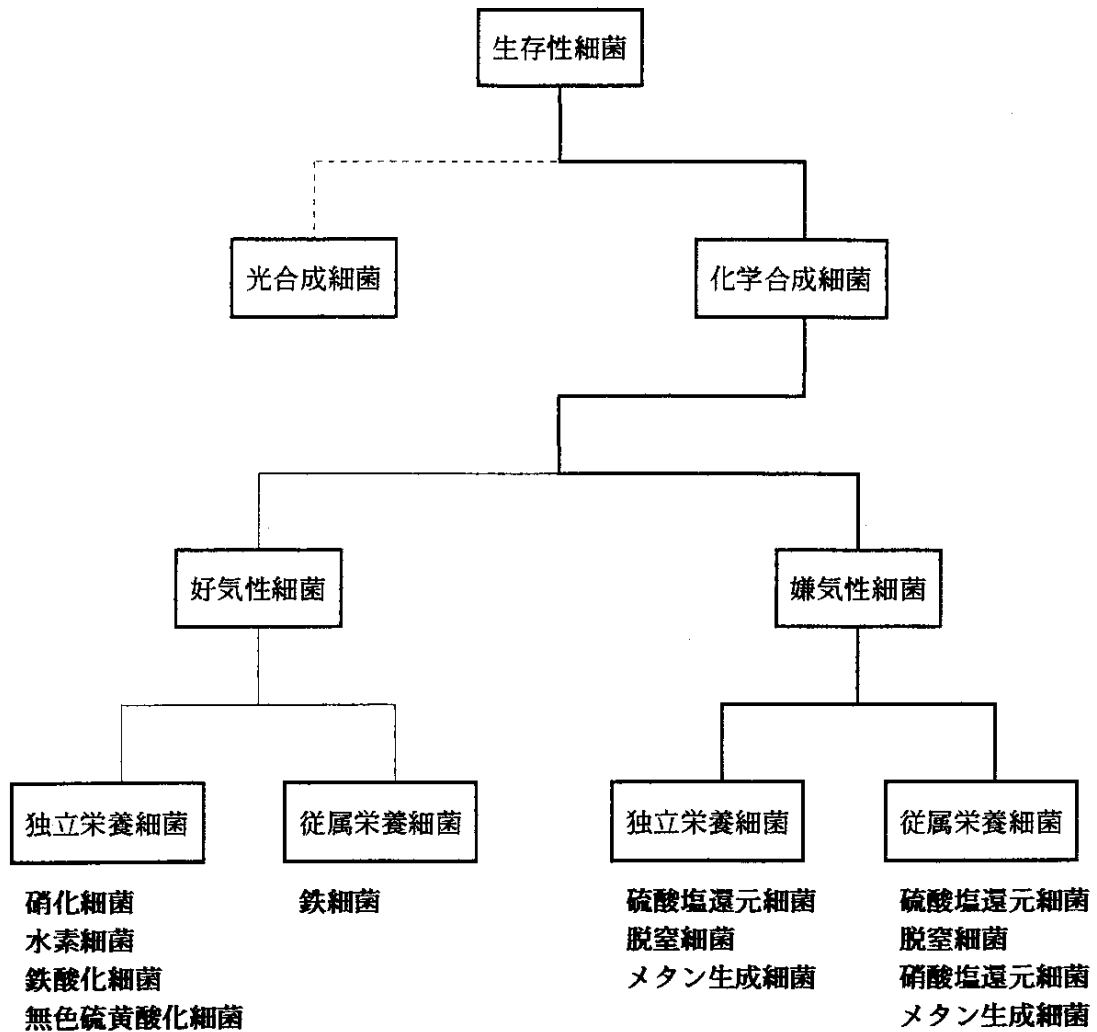
自然環境の地下水には微生物の基質となる無機物質が多数存在する。無機物質を基質として生育する細菌を第5-9表に示す。これらの細菌はエネルギー代謝により、第5-9表に示すように地下水の無機物質形態を変換する。

さらにこれらの細菌を栄養・代謝の特性に従い細菌種調査フローとして示したものが、第5-8図である。



第5-9表 細菌のエネルギー代謝における無機物の利用  
(柳田友道, 1984)

一般名	細菌名	栄養	O <sub>2</sub> 依存性	基質変化
<b>A. 無機物を電子供与体として利用するもの</b>				
硝化細菌				
亜硝酸細菌	<i>Nitrosomonas</i> <i>Nitrosococcus</i> <i>Nitrosolobus</i> <i>Nitrospira</i>	独立栄養	好気性	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> → NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
硝酸細菌	<i>Nitrobacter</i> <i>Nitrospina</i> <i>Nitrococcus</i>	独立栄養	好気性	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> → NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
水素細菌	<i>Hydrogenomonas</i> <i>Scenedesmus</i>	独立栄養 光合成	微好気性 好気性	H <sub>2</sub> → H <sub>2</sub> O
鉄細菌	<i>Ferrobacillus</i> <i>ferrooxidans</i> <i>Thiobacillus</i> <i>ferrooxidans</i> <i>Sphaerotillus</i> <i>Leptothrix</i> <i>Gallionella</i>	独立栄養 独立栄養 通性独立 栄養 従属栄養	好気性 好気性 好気性 好気性 好気性	Fe <sup>2+</sup> → Fe <sup>3+</sup> Fe <sup>2+</sup> → Fe <sup>3+</sup> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> → SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> Fe <sup>2+</sup> → Fe <sup>3+</sup>
無色硫黄細菌	<i>Thiobacillus</i> <i>thiooxidans</i> <i>thioparus</i> <i>novellus</i>	独立栄養 独立栄養	微好気性 好気性	Fe <sup>2+</sup> → Fe <sup>3+</sup> S <sup>2-</sup> → S <sup>0</sup> → SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
光合成細菌 (基本的には深部地下水調査では除外)				
紅色非硫黄細菌	<i>Rhodospirillum</i>	光合成 or 従属栄養	嫌気/明か 好気/明	H <sub>2</sub> → H <sub>2</sub> O
紅色硫黄細菌	<i>Chromatium</i>	光合成	嫌気性	S <sup>2-</sup> → S <sup>0</sup> → SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
綠色硫黄細菌	<i>Chlorobium</i>	光合成	嫌気性	S <sup>2-</sup> → S <sup>0</sup> → SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
<b>B. 無機物を電子受容体として利用するもの</b>				
硫酸塩還元細菌	<i>Desulfovibrio</i> <i>Desulfotomaculum</i>	従属栄養	嫌気性	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> → S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> → H <sub>2</sub> S
脱窒菌	<i>Thiobacillus</i> <i>denitrificans</i> <i>Paracoccus</i> <i>Pseudomonas</i>	独立栄養 従属栄養	通性 嫌気性 嫌気性	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> → N <sub>2</sub> NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> → N <sub>2</sub>
硝酸塩還元細菌	<i>Corynebacterium</i> <i>Bacillus</i>	従属栄養	通性 嫌気性	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> → NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
メタン生成細菌	<i>Methanobacterium</i> <i>Methanococcus</i> <i>Methanosarcina</i> <i>Methanospirillum</i>	独立栄養 or 従属栄養	嫌気性	CO <sub>2</sub> → CH <sub>4</sub>



第5-8図 深部地下水の細菌種調査フロー

第5-8図では、深部地下環境という条件を考慮し、光合成細菌は除外した。また細菌名は一般名で表記した。これらの細菌の多くは明確な機能を持ち、特定の培地に増殖できるので、例えばMPN法などを利用して地下水中の存在の確認、計数を行うことができる。ただ存在する各々の細菌を、属・種レベルまで踏み込み分類することは、多大の労力と時間を要するので避けるべきであろう。調査の方向性としては、地下水における物質移動を司る細菌種を押さえるという意味で、一般名の細菌種にとどめたい。そして、地下水の環境と調査手法を考慮し、嫌気性細菌を重視した次の細菌種の調査を提案する。ただし将来、現在行われている調査の視点である地下の構造物の健全性に影響を及ぼし得る細菌の影響評価も予想されるので、この面で関与し得る好気性細菌の代表的な次の細菌種も調査対象として挙げておく。

・好気性細菌

硝化細菌、無色硫黄酸化細菌、(鉄細菌)

・嫌気性細菌

硝酸塩還元細菌、脱窒細菌、硫酸塩還元細菌、メタン生成細菌

以上のように、地下水中の物質移動に影響を及ぼすという視点で調査対象とする細菌種を限定しても、現在の地下構造物の健全性に影響を及ぼすという視点で調査対象としている鉄酸化細菌 (*Thiobacillus*属として)、硫酸塩還元細菌及びメタン生成細菌は網羅されている。

## 参 考 文 献

- Yoshida N. and Mizutani Y. : Preparation of carbon dioxide for oxygen-18 determination of water by use of a plastic syringe, *Anal. Chem.* 58, p.1273, (1989)
- Hobbie J. E., R. J. Daley and S. Jasper : Use of Nuclepore Filters for Counting Bacteria by Fluorescence Microscopy, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.33, p.1225-1232, (1977)
- Silverman M. P., Lundgren D. G., : *J. Bacteriol.*, Vol.77, p.642-647, (1959)
- 山中健生 : 微生物のエネルギー代謝, p.148, 学会出版センター, (1986)
- Postgate J. R. : (1963)
- Wakao N. and Furusaka C. : A new agar plate method for the quantitative study of sulfate-reducing bacteria in soil, *Soil Sci. Plant Nutr.*, Vol.18, p.39-44, (1972)
- 竹内準一, 滝井 進 : 酒沼と水月湖の湖水中における硫酸還元菌の分布, 用水と廃水, Vol.29, No.11, p.3-7, (1987)
- J. G. Zeikus : *Bacteriol. Rev.*, Vol.41, p.514-541, (1977)
- 門田 元, 多賀信夫編 : 海洋微生物研究法, p.106, 学会出版センター, (1985)
- Bible and Pfening : Sarr M. P., Stolp H., Truper H. G., Balows A. and Schligel H. G. (eds.), *The prokaryotes : A handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*, Vol.1, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, New York, Chaps. 14, 16, 18 (1981)
- Pfening N. and Truper : *Handbook of Microbiology*, ed. by A. I. Laskin and H. A. Lechevalier, The Chemical Rubber Co., Cleveland, Vol.1, p.17-65, (1974)
- 中山大樹 : 微生物による鉱廃水処理, 発酵と工業, Vol.43, No.8, p.724-730, (1985)
- Postgate J. R. : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Eighth Edition*, p.418-421, (1974)
- Postgate J. R. : *The Sulphate-Reducing Bacteria*, Cambridge University Press, London, (1979)
- 日本化学会編 : 季刊 化学総説-陸水の化学-, p.79-89, 学会出版センター, (1992)
- PNC TN7410 92-017 : 我が国における地下水の水質に関するデータの収集・解析, 瀬尾俊弘, 清水和彦, 動力炉・核燃料開発事業団 中部事業所 環境地質課, (1992)

- 近藤昭彦, 鈴木裕一, 高山茂美: トリチウムによる地下水の停滞時間の推定 - 会津盆地北部の自噴井の場合 -, ハイドロロジー, 13, p.60-65, (1983)
- 松葉谷治, 越中 浩, 小室昭一: 秋田県温泉の同位体地球化学的調査報告, 秋田大学鉱山学部地下資源研究施設報告, 48, p.11-24, (1983)
- 伊藤一郎: バクテリアリーチング, p.28, 講談社, (1976)
- 竹内準一, 滝井 進: 酒沼と水月湖の湖水中における硫酸還元菌の分布, 用水と廃水, Vol. 29, p.1019-1023, (1987)
- 竹内準一: 硫酸塩還元細菌の生理生態, 用水と廃水, Vol. 31, p.294-305, (1989)
- Nedwell D.B. and Abram J.W.: Relative influence of temperature and electron donor and electron acceptor concentrations on bacterial sulfate reduction in saltmarsh sediment, Microb. Ecol., Vol.5, p.67-72, (1979)
- Bryant M.P.: Part 13. Methane-producing bacteria. In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., The Williams & Wilkins Co., (1974)
- 柳田友道: 微生物科学 1. 分類・代謝・細胞生理, p.160-163, 学会出版センター, (1983)
- Karsten Pedersen: Deep ground water microbiology in Swedish granitic rock and it's relevance for radio-nuclide migration from a Swedish high level nuclear waste repository, SKB TECHNICAL REPORT 89-23, p.1-13, (1989)
- Karsten Pedersen: Distribution and activity of bacteria in deep granitic ground waters of Southeastern Sweden, SKB TECHNICAL REPORT, p.1-28, (1990)
- Van Es FB, Meyer-Reil: Biomass and metabolic activity of heterotrophic marine bacteria, Marshall KC(ed) Advances in microbial ecology, Vol.6, p.111-170, (1982)
- Jorgensen B.B.: Mineralization and the bacterial cycling of carbon nitrogen and sulphur in marine sediments, Contemporary Microbial Ecology, Academic Press, p.239-251, (1980)
- 高井康男: 微生物の生態 5 - 環境汚染をめぐる -, p.1-21, 学会出版センター, (1978)
- Zajic J.E.: Microbial biogeochemistry, Academic Press, (1969)
- 柳田友道: 微生物科学 4. 生態, p.95, p.121, 学会出版センター, (1984)
- Chapelle F.H., Knobel L.L., Zeliber J.L., Grimes D.J.: Bacteria in deep coastal plain sediments of Maryland: a possible source of CO<sub>2</sub> to groundwater, Water Resour. Res., Vol.23, No.8, p.1625-1632, (1987)

Carl B. Fliermans, David L. Balkwill : Microbial Life in Deep Terrestrial Subsurfaces  
- Diverse abundant communities thrive 500 meters underground -, Bioscience, Vol.39,  
No.6, p.370-377, (1989)

# 写真集



写真1 地下水採取状況



写真2 地表水採取状況

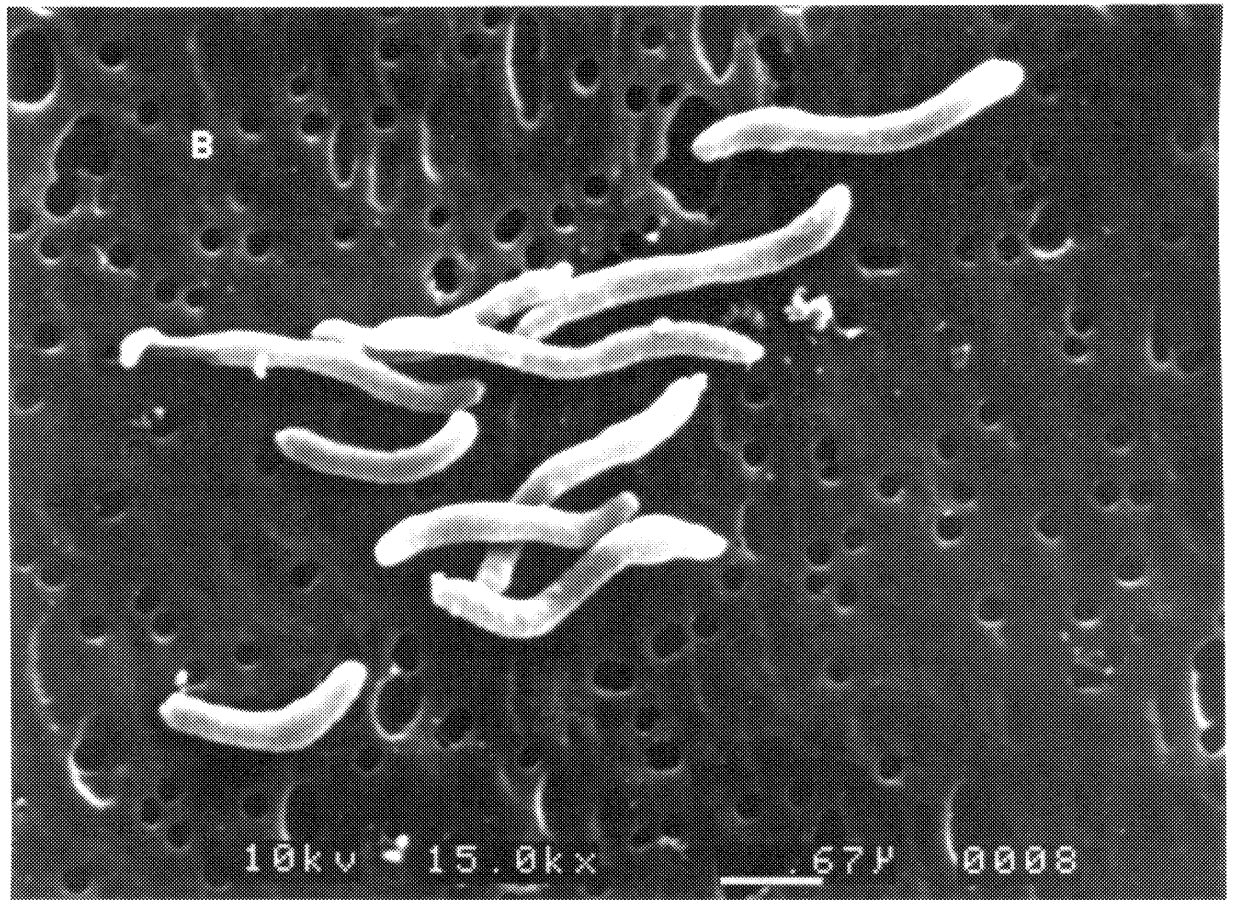


写真3 地下水試料から分離された硫酸塩還元細菌  
の走査型電子顕微鏡写真 (×15,000)