

PNC-^I2J6401 94-001

~~限定資料~~

本資料は 17 年 8 月 9 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研究

(動力炉・核燃料開発事業団 契約業務報告書)

1994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研究

松嶋 英治* 小坂 邦夫* 大淵 聡**

要 旨

本報告書は、岐阜県土岐市東濃鉦山内KNA-2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。

調査地は岐阜県南東部に位置し、堆積岩中に掘削された坑内の試錐孔である。調査試料は、この試錐孔において深度約120mから自噴している地下水を、Arガス流送中の簡易グローブバッグ内で採取した。

採取した地下水は、水温18.3℃でpH9.1のアルカリ性であった。溶存化学成分は測定結果より、陽イオンが Na^+ (44.2) > Ca^{2+} (2.97) > K^+ (0.36) > Mg^{2+} (0.06)、陰イオンが HCO_3^- (93) > CO_3^{2-} (7) > Cl^- (0.86) > SO_4^{2-} (N.D.) の順でそれぞれ高濃度であった(数値の単位はmg/l)。また一般的な微生物の環境因子となるTOC、T-N、T-Pはそれぞれ0.19mgC/l、0.078mgN/l、0.005mgP/lと低濃度であった。

バクテリア調査の結果から、全菌数は 1.6×10^5 cells/ml、生菌の鉄酸化細菌(*Thiobacillus ferrooxidans*)、メタン生成細菌、亜硝酸細菌、硝酸細菌及び脱窒細菌は不検出、硫酸塩還元細菌は 5.0×10^{-1} MPN/mlと各々計数された。脱窒細菌についてはアンモニア、亜硝酸及び硝酸態窒素の不足が、メタン生成細菌については電子供与体の不足が制限因子として示唆された。このように試料の嫌気条件が整っている割には、調査対象とした嫌気性細菌の現存量は微小であった。

一般細菌の分析では、一般細菌数が 3.0×10^0 CFU/mlと計数されたが、大腸菌群数、嫌気性菌数、芽胞形成亜硫酸還元嫌気性菌数、腸球菌数、緑膿菌数、放線菌数及びカビ数は不検出であった。別途本調査地下水から分離した硫酸塩還元細菌は、*Desulfovibrio desulfuricans*と同定された。

一方地表水は、水温4.1℃でpH8.2のアルカリ性で、溶存化学成分は測定結果より、陽イオンが Na^+ (3.12) > Ca^{2+} (0.98) > K^+ (0.51) > Mg^{2+} (0.16)、陰イオンが HCO_3^- (29) > CO_3^{2-} (5) > SO_4^{2-} (1.74) > Cl^- (1.36) の順でそれぞれ高濃度であった(数値の単位はmg/l)。そのバクテリア調査の結果からは、全菌数が 5.6×10^5 cells/ml、生菌の鉄酸化細菌(*Thiobacillus ferrooxidans*)、メタン生成細菌、亜硝酸細菌、硝酸細菌及び脱窒細菌が不検出、硫酸塩還元細菌が 3.3×10^1 MPN/mlと各々計数された。

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：05C2597

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

Groundwater was sampled from borehole KNA-2 in the Tono mine at Toki City, Gifu Prefecture. The water was chemically analyzed and identification of bacteria in the samples was carried out.

The site is located in the south-eastern part of Gifu Prefecture, and is a borehole in a tunnel in the sedimentary rocks. Samples were gathered from artesian flowing groundwater at a depth of about 120 meters using simple glove bags with argon gas sweeping.

The sampled groundwater showed an alkalinity of pH9.1 and a temperature of 18.3 °C. Chemical analysis revealed a high concentration of soluble matter including cations: Na^+ (44.2) > Ca^{2+} (2.97) > K^+ (0.36) > Mg^{2+} (0.06), and anions: HCO_3^- (93) > CO_3^{2-} (7) > Cl^- (0.86) > SO_4^{2-} (N.D.), by mg/l. The levels of TOC, T-N and T-P, which are requirements for bacterial growth, were 0.19mgC/l, 0.078mgN/l, and 0.005mgP/l, respectively, all of which were low.

Bacterial investigation was carried out. The total numbers of bacteria was 1.6×10^5 cell/s/ml. No live *Thiobacillus ferrooxidans*, methane-producing bacteria, nitrite bacteria, nitrate bacteria, or denitrifying bacteria were detected. The count of sulfate-reducing bacteria was 5.0×10^{-1} MPN/ml. The probable limiting factors include lack of ammonia, nitrite and nitrate-nitrogen for the denitrifying bacteria, and lack of electron donors for the methane-producing bacteria. The analysis indicated virtual absence of the anaerobic bacteria which were the targets of the study, although conditions were anaerobic. General bacterial analysis was carried out and resulted in a count of 3.0×10^0 CFU/ml of common bacteria. However, no coliform bacteria, anaerobic bacteria, spore-forming sulfite-reducing anaerobic bacteria, intestinal cocci, actinomycetes, or molds were detected. The sulfate-reducing bacteria isolated from the groundwater were separately analyzed and identified as *Desulfovibrio desulfuricans*.

The other side the sampled surfacewater showed an alkalinity of pH8.2 and a temperature of 4.1 °C.

Chemical analysis revealed a high concentration of soluble matter including cations: Na^+ (3.12) > Ca^{2+} (0.98) > K^+ (0.51) > Mg^{2+} (0.16), and anions: HCO_3^- (29) > CO_3^{2-} (5) > SO_4^{2-} (1.74) > Cl^- (1.36), by mg/l. Bacterial investigation was carried out. The total numbers of bacteria was 5.6×10^5 cells/ml. No live *Thiobacillus ferrooxidans*, methane-producing bacteria, nitrite bacteria, nitrate bacteria, or denitrifying bacteria were detected. The count of sulfate-reducing bacteria was 3.3×10^1 MPN/ml.

The work was 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)

- * Dowa Engineering Co., LTD Okayama Branch, Plant Division
- ** Dowa Engineering Co., LTD 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	4
2.1 地下水（中部事業所東濃鉦山坑内の試錐孔（KNA-2））	4
2.2 地表水（中部事業所構内地表水）	5
3. 化学分析の方法及び結果	6
3.1 化学分析の方法	6
3.1.1 現場測定項目及び測定方法	6
3.1.2 化学分析測定用地下水試料の採取方法	6
3.1.2 (1) 溶存ガス成分分析用試料（N ₂ , O ₂ , H ₂ , He, CH ₄ , CO, 全炭酸）	6
3.1.2 (2) Fe ²⁺ , 硫化物イオン（ΣS ²⁻ ）分析用試料	7
3.1.2 (3) TOC及びフミン、フルボ酸分析用試料	7
3.1.2 (4) Na, K, Li, Ca, Mg, Sr, Al, T-Fe, Mnの分析用試料	8
3.1.2 (5) F, Cl, Br, I, SO ₄ , P, N, Siの分析用試料	8
3.1.2 (6) ³ H, δ ² H（δD）, δ ¹⁸ Oの分析用試料	8
3.1.3 地下水の化学分析方法	9
3.1.4 同位体分析方法	13
3.1.4 (1) δD	13
3.1.4 (2) δ ¹⁸ O	13
3.1.4 (3) ³ H	13
3.2 化学分析結果	14
3.2.1 現場測定結果	14
3.2.2 地下水化学分析結果	15
4. バクテリア調査方法及び結果	16
4.1 バクテリアの調査方法	16
4.1.1 調査フローシート	16
4.1.2 全菌数計数	17
4.1.3 特定細菌の培養計数	18
4.1.3 (1) 鉄酸化細菌	18
4.1.3 (2) 硫酸塩還元細菌	18

4.1.3 (3) メタン生成細菌	18
4.1.3 (4) 亜硝酸細菌	19
4.1.3 (5) 硝酸細菌	19
4.1.3 (6) 脱窒細菌	19
4.1.4 一般細菌の分析	20
4.1.4 (1) 一般細菌数	20
4.1.4 (2) 大腸菌群数	20
4.1.4 (3) 嫌気性菌数	20
4.1.4 (4) 芽胞形成亜硫酸還元嫌気性菌数	20
4.1.4 (5) 腸球菌数	21
4.1.4 (6) 緑膿菌数	21
4.1.4 (7) 放線菌数	21
4.1.4 (8) カビ数	22
4.1.5 硫酸塩還元細菌の同定	32
4.1.5 (1) 分離及び純粋化	32
4.1.5 (2) 同定操作	34
4.2 バクテリアの調査結果	43
4.2.1 全菌数計数及び特定細菌の培養計数結果	43
4.2.2 一般細菌の分析結果	44
4.2.3 硫酸塩還元細菌の同定結果	45
4.2.3 (1) 各種試験結果	45
4.2.3 (2) 属の同定	46
4.2.3 (3) 種の同定	47
5. 考察	49
5.1 調査結果に関する考察	49
5.1.1 水質	49
5.1.1 (1) 地下水の水質組成	49
5.1.1 (2) 地下水の年代	51
5.1.1 (3) 地下水の同位体比	51
5.1.2 バクテリアの存在性	52
5.2 他鉱山調査データとの比較	55
5.2.1 水質	55
5.2.1 (1) 地下水の水質組成の比較	55
5.2.1 (2) 地下水の年代の比較	57
5.2.1 (3) 地下水の同位体比の比較	57
5.2.2 バクテリアの存在性	58
参考文献	62

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)	2
第1- 3図	調査試錐孔周辺の模式地質図	3
第1- 4図	地下水採水地点周辺の模式断面図 (KNA-2孔)	3
第2- 1図	地下水試料採取概略	4
第2- 2図	地表水試料採取概略	4
第3- 1図	ガス成分測定用試料の採取方法	7
第3- 2図	ヘッドスペース法における計算手順	11
第4- 1図	バクテリア調査フローシート	16
第4- 2図	ダーラム管試験管	19
第4- 3図	二重皿培養法における試料接種手順の概略	23
第4- 4図	硫酸塩還元細菌の純粹分離の操作手順	33
第4- 5図	走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察試料の調製手順	35
第4- 6図	グラム染色の手順	36
第4- 7図	鞭毛染色の手順	37
第4- 8図	キノン分析操作の概略	39
第4- 9図	DNAの抽出・精製からGC含量測定までの手順概略	40
第4-10図	胞子形成能による硫酸塩還元細菌の分類	46
第5- 1図	地下水のトリリニアダイアグラム	50
第5- 2図	地下水のヘキサダイアグラム	50
第5- 3図	天水の δD と $\delta^{18}O$ の関係	51
第5- 4図	地下水のトリリニアダイアグラム	56
第5- 5図	地下水のヘキサダイアグラム	56
第5- 6図	天水の δD と $\delta^{18}O$ の関係	57
第5- 7図	微生物生育のためのEhとpHの範囲	61

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	6
第3- 2表	化学分析項目における分析方法及び測定機器	9
第3- 3表	水に対する気体の溶解度 (Bunsen吸収係数 α)	12
第3- 4表	現場測定結果	14
第3- 5表	化学分析結果	15
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	亜硝酸細菌計数用培地	27
第4- 7表	硝酸細菌計数用培地	27
第4- 8表	脱窒細菌計数用培地	27
第4- 9表	標準寒天培地 (一般細菌計数用)	28
第4-10表	BGLB培地 (大腸菌群数計数用)	28
第4-11表	GAM寒天培地 (嫌気性菌数計数用)	28
第4-12表	亜硫酸一鉄加寒天培地 (芽胞形成亜硫酸還元嫌気性菌数計数用)	29
第4-13表	KFレンサ球菌寒天培地 (腸球菌数計数用)	29
第4-14表	胆汁-エスクリン-アジド寒天培地 (腸球菌数計数用)	30
第4-15表	mPA-B寒天培地 (緑膿菌数計数用)	30
第4-16表	放線菌アイソレーション培地 (放線菌数計数用)	31
第4-17表	クロラムフェニコール添加PDA培地 (カビ数計数用)	31
第4-18表	硫酸塩還元細菌の純粋化における混在菌(群)の判定	34
第4-19表	基質資化性 (生育に利用できる炭素源) 試験の概要	38
第4-20表	光合成紅色非硫黄細菌用培地	41
第4-21表	光合成硫黄細菌用培地	41
第4-22表	微量元素溶液の組成 (光合成細菌用)	42
第4-23表	ビタミン混液の組成 (光合成細菌用)	42
第4-24表	全菌数計数及び特定細菌の培養計数結果	43
第4-25表	一般細菌の分析結果	44
第4-26表	地下水と地表水の試料から分離した硫酸塩還元細菌の同定に関する各種試験結果	45
第4-27表	硫酸塩還元細菌の属名と形状	46
第4-28表	種の同定のための情報整理	48
第5- 1表	PGY寒天培地 (従属栄養細菌数計数用培地)	53
第5- 2表	R2A寒天培地 (従属栄養細菌数計数用培地)	53
第5- 3表	<i>Thiobacillus</i> 属の生育温度とpHの範囲	54
第5- 4表	他鉱山におけるバクテリア調査データとの比較	58
第5- 5表	硫酸塩還元細菌の最適生育温度	59
第5- 6表	他鉱山における化学分析結果との比較	60

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研究

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

岐阜県土岐市東濃鉦山地内

調査位置図を第1-1, 2図に示す。調査試錐孔周辺及び採水地点周辺の模式断面図を第1-3, 4図に示す。

1.4 調査期間

自・平成6年2月1日～至・平成6年3月18日

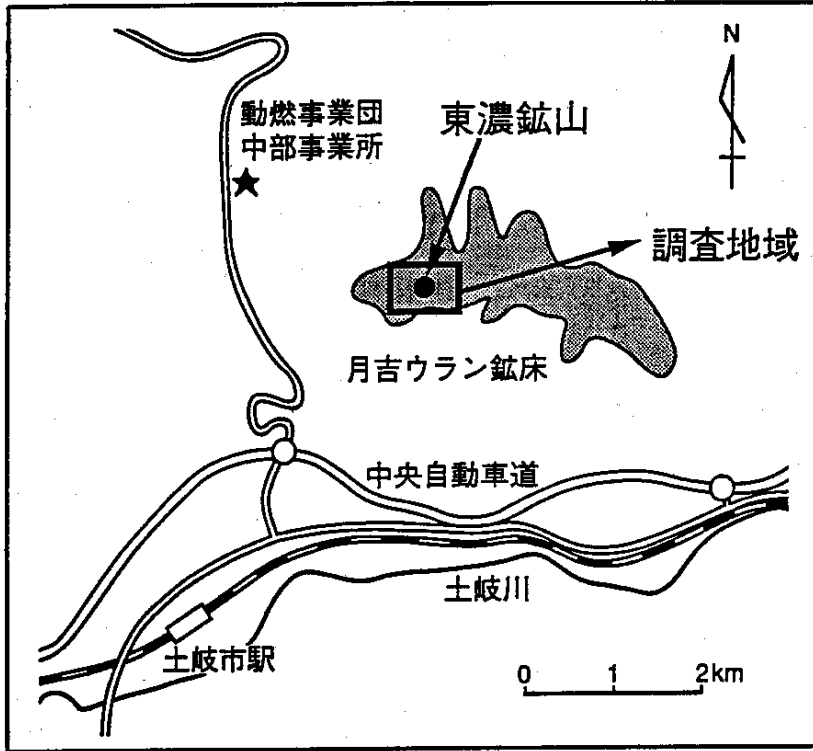
1.5 調査項目

調査項目を第1-1表に示す。

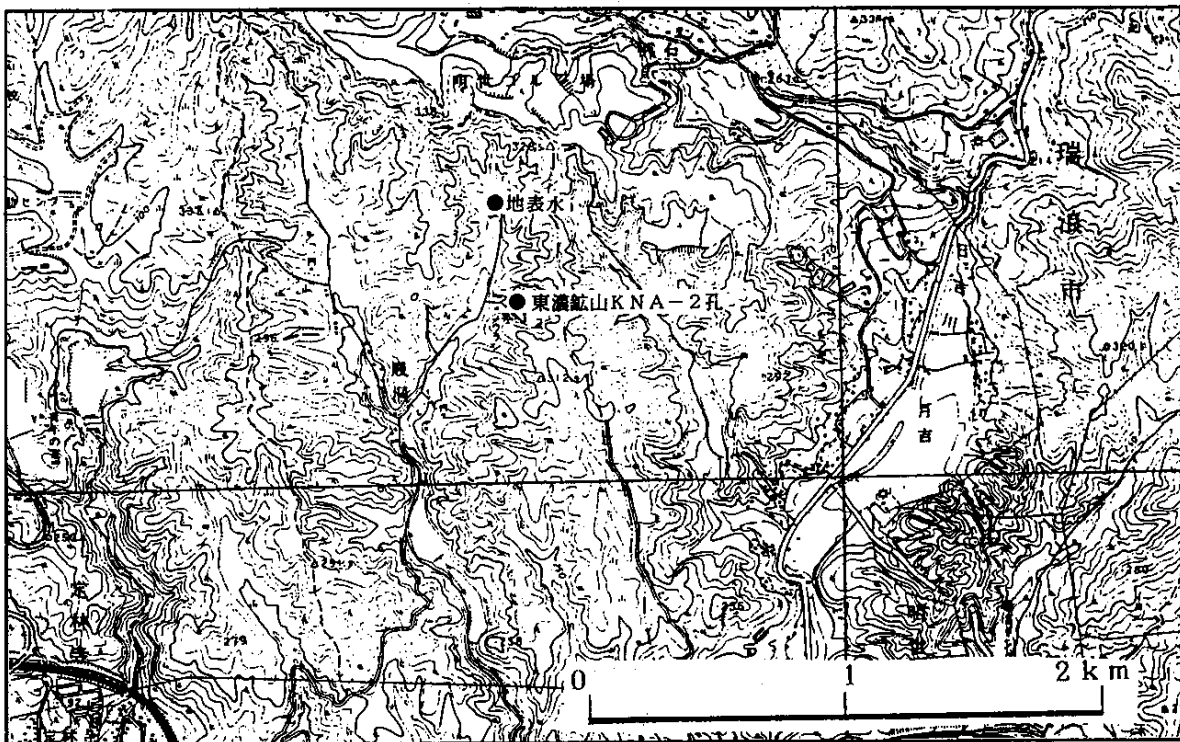
第1-1表 調査項目

化学分析項目	温度, pH, ORP, 電気伝導度, O ₂ , N ₂ ^{x)} , H ₂ , He ^{x)} , CH ₄ , CO, CO ₂ , TOC, アミン酸, 7味酸, SiO ₂ , Na ⁺ , K ⁺ , Li ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Sr ²⁺ , Al ³⁺ , Mn ²⁺ , Fe ²⁺ , 全Fe, HCO ₃ ⁻ , Cl ⁻ , F ⁻ , Br ⁻ , I ⁻ , S ²⁻ , PO ₄ ³⁻ , SO ₄ ²⁻ , CO ₃ ²⁻ , NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , T-N, T-P ³ H, δD, δ ¹⁸ 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 d) 亜硝酸細菌 e) 硝酸細菌 f) 脱窒細菌 3. 硫酸塩還元細菌の同定 4. 一般細菌の分析 a) 一般細菌数 b) 大腸菌群数 c) 嫌気性菌数 d) 芽胞形成亜硫酸還元嫌気性菌数 e) 腸球菌数 f) 緑膿菌数 g) 放線菌数 h) カビ数

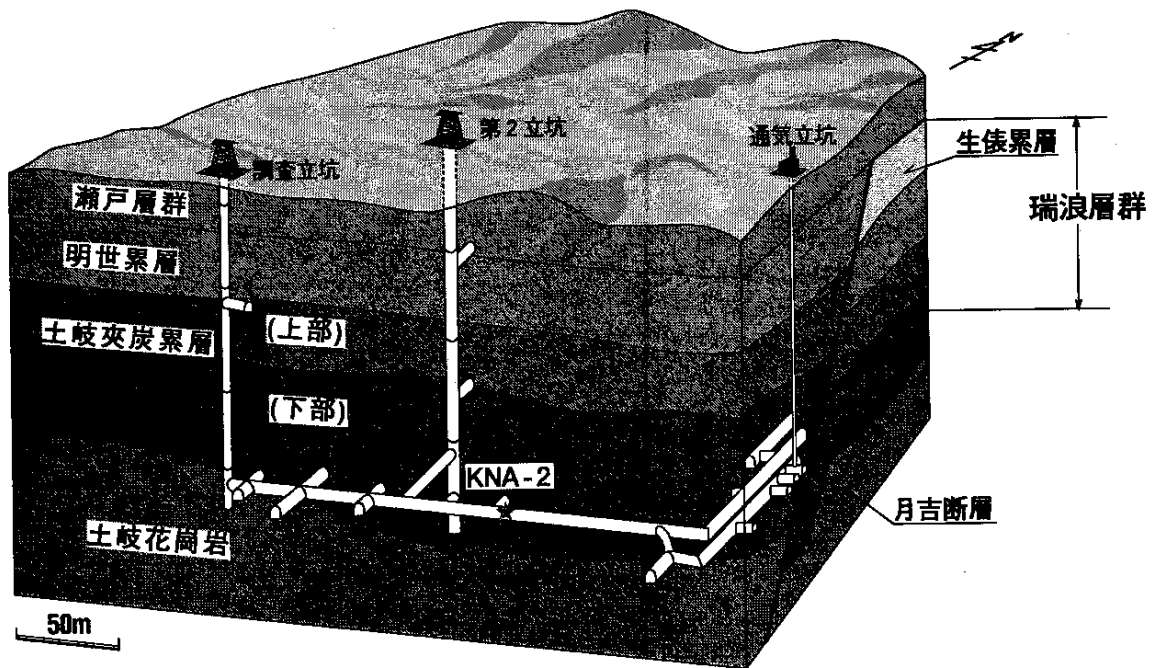
*) 調査試料が地下水の場合のみの調査項目



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]

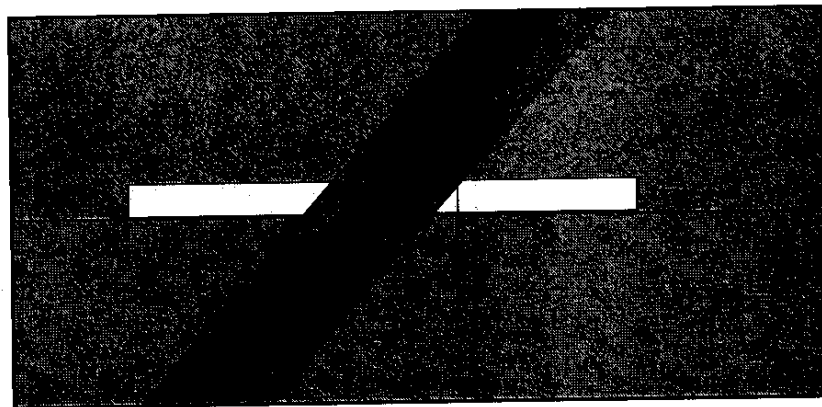


第1-2図 調査位置図 (その2)



★ 坑内におけるサンプリングポイント

第1-3図 調査試錐孔周辺の模式断面図



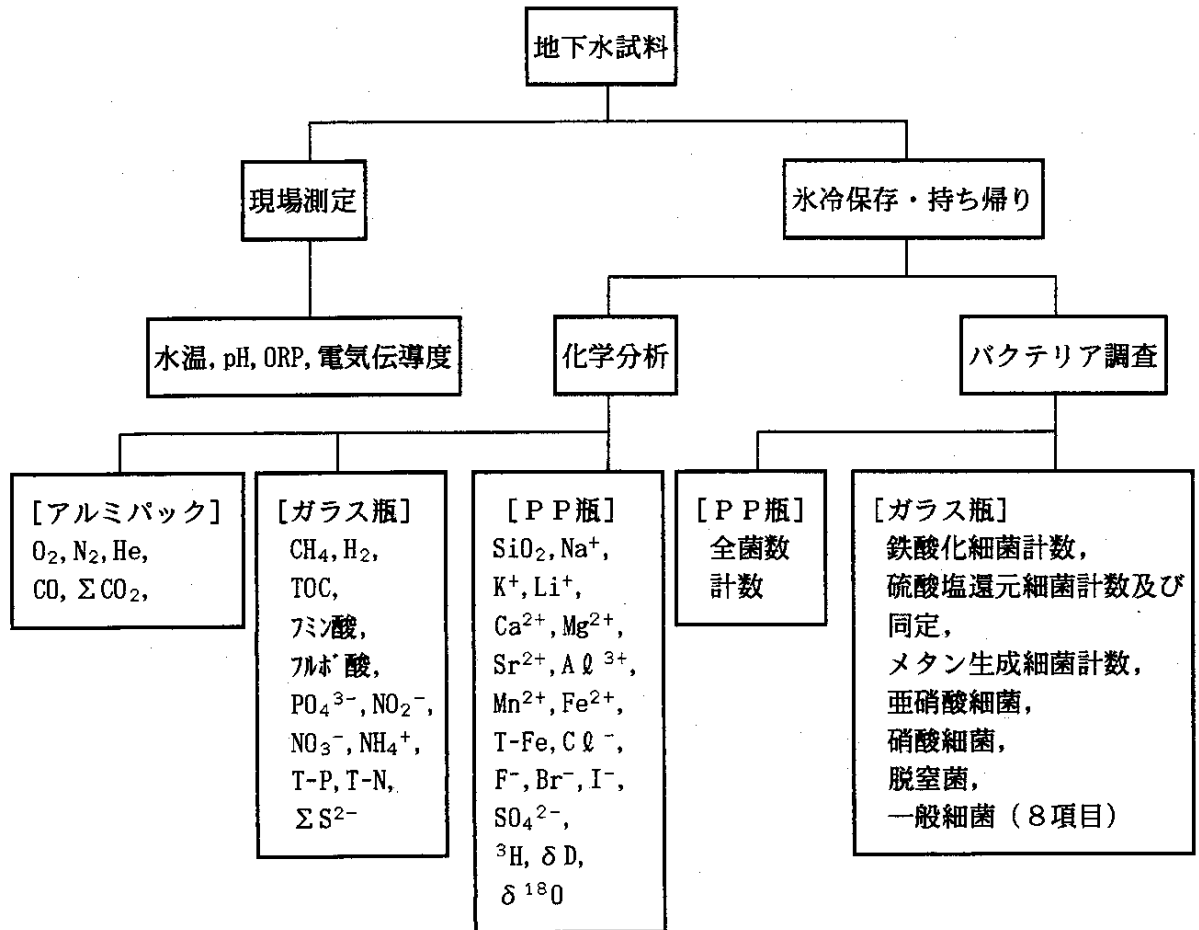
第1-4図 地下水採水地点の模式断面図 (KNA-2孔)

2. 試料採取

2.1 地下水（中部事業所東濃鉦山坑内の試錐孔(KNA-2)）

試錐孔に設置された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。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℃，1.2 atm, 20min）した容器に採水した。

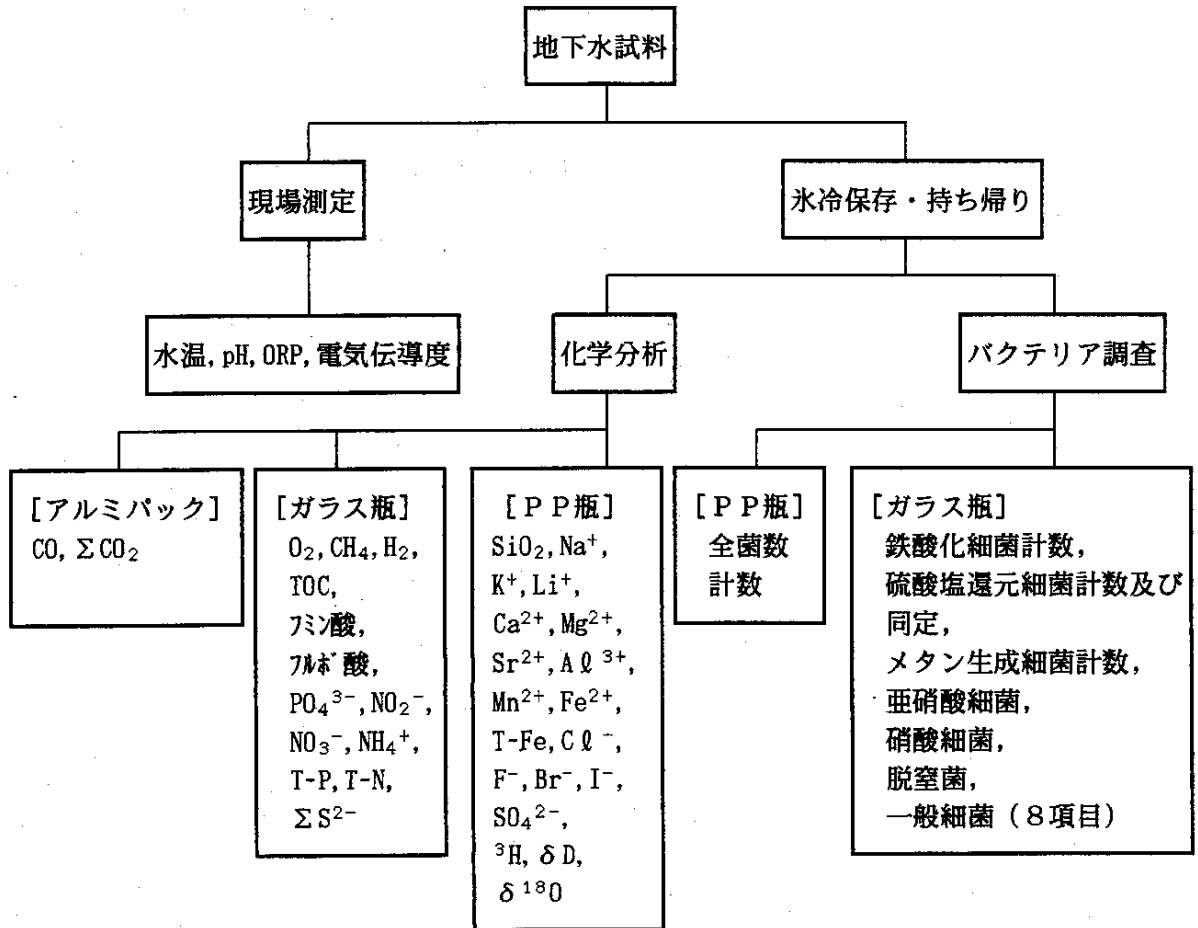
化学分析及びバクテリア調査用試料は原則としてアルミパック及びポリプロピレン製容器あるいはガラス製バイアルに採取し、氷冷保存して実験室に持ち帰った（第2-1図参照）。



第2-1図 地下水試料採取概略

2.2 地表水（中部事業所構内地表水）

地表水は試錐孔近くの池（財ヶ洞地内）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、20min）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アルミパック及び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

地下水は、試錐孔に設置された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。

地表水は、試錐孔の近くを流れる沢の水を集水している池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

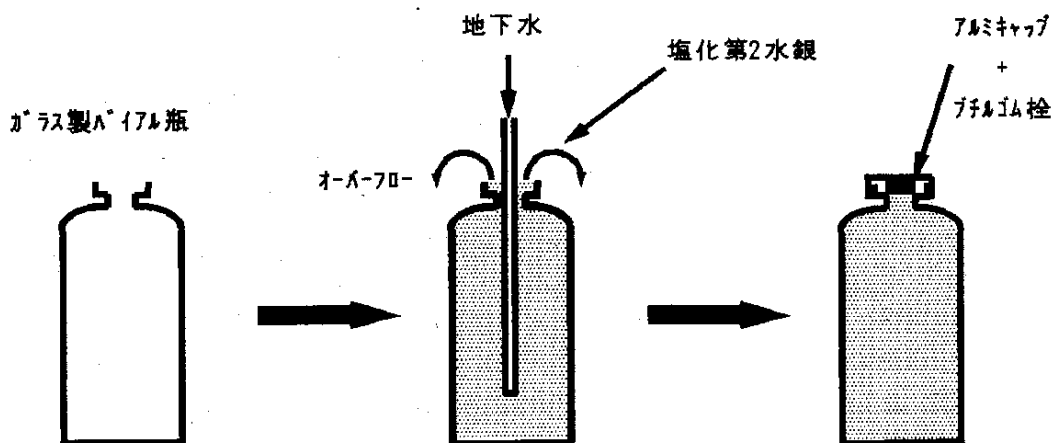
測定項目	測定方法	測定機器
水温	サーミスタ	堀場製作所、D-13
pH	ガラス電極法	堀場製作所、D-13
ORP	白金電極法	堀場製作所、ES-12
電気伝導度	電極法	飯島電子工業、F-102
DO	隔膜電極法	

3.1.2 化学分析測定用地下水試料の採取方法

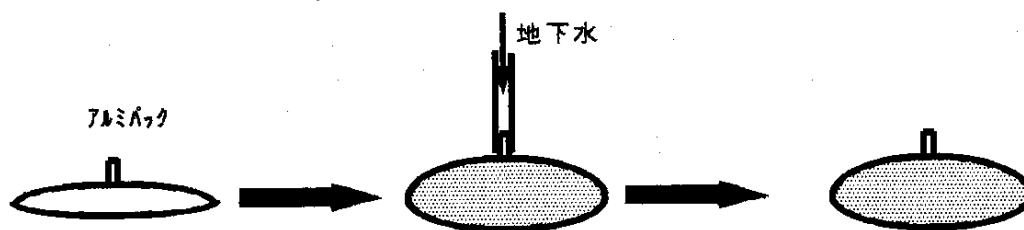
(1) 溶存ガス成分分析用試料 ($N_2, O_2, H_2, He, CH_4, CO, \Sigma CO_2$)

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はアルゴンガス(99.999%)を使用した。

試料は、メタンガス、水素ガス測定用に120ml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分析した。また、酸素、ヘリウム、窒素、 ΣCO_2 は、試料を直接アルミバック内に採取し氷冷保存して持ち帰った後、ヘッドスペース測定用試料として供試した。なお地表水の溶存酸素は、酸素ピンに採取し、ウインクラ法のアジ化ナトリウム変法により滴定した。



メタン及び水素ガス分析用試料採取方法



$O_2, N_2, He, CO, \Sigma CO_2$ ガス分析用試料採取方法

第3-1図 ガス成分測定用試料の採取方法

(2) Fe^{2+} 、硫化物イオン (ΣS^{2-}) 分析用試料

溶存態還元物質（酸素によって化学種が大きく変わる成分）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相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、フミン酸及びフルボ酸分析用試料

酸処理及び熱処理（450℃、4時間）を施したスクリー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) Na, K, Li, Ca, Mg, Sr, Al, T-Fe, Mnの分析用試料

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。全鉄及びマンガンについては、メンブランフィルター(孔径0.20 μ m)によるろ過を行ったものも持ち帰った。

(5) F, Cl, Br, I, SO₄, P, N, Siの分析用試料

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。

なお、リン分析用試料及び窒素化合物(NO₂⁻, NO₃⁻, NH₄⁺)分析用試料に関しては、ガラス性バイアル瓶に採取した。

(6) ³H, δ D, δ ¹⁸Oの分析用試料

酸処理したポリプロピレン製容器に採取し、氷冷保存して実験室に持ち帰った。各成分における採取量は、それぞれ³H分析用に5 ℓ 、 δ D、 δ ¹⁸O用に2 ℓ である。

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3-2表にまとめて以下に示す(*ヘッド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3-2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 ₂ N ₂	ガスクロ分析 (ヘッドスペース法) 〔グローブバック内〕 置換ガス:アルゴンガス	島津製 GC-14B	カラム : 内径3mm, 全長4m カラム充填剤: モレキュラーシーブ 5A 60/80メッシュ カラム温度 : 60℃ 注入口温度 : 60℃ 検出器 : TCD (10倍アンプ付き) 検出器温度 : 80℃ キャリアガス, 流量: アルゴン, 15ml/min
H ₂ He	ガスクロ分析 (ヘッドスペース法) 〔グローブバック内〕 置換ガス:アルゴン	島津製, GC-14B	カラム : 内径3mm, 全長8m カラム充填剤: モレキュラーシーブ 5A 60/80メッシュ カラム温度 : 60℃ 注入口温度 : 60℃ 検出器 : TCD (10倍アンプ付き) 検出器温度 : 80℃ キャリアガス, 流量: アルゴン, 30ml/min
CH ₄	ガスクロ分析 (パージ&トラップ) 〔グローブバック内〕 置換ガス:アルゴン	島津製, GC14B	カラム : 内径3mm, 全長8m カラム充填剤: モレキュラーシーブ 5A 60/80メッシュ カラム温度 : 60℃ 注入口温度 : 60℃ 検出器 : TCD (10倍アンプ付き) 検出器温度 : 80℃ 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 : メタン化反応装置付 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 ₂	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	ホヤクテラ製	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。(TOC-5000によるクロスチェック も行った。) H ₂ CO ₃ HCO ₃ ⁻ CO ₃ ²⁻ } 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ヘブリング を行い炭酸ガスを除去しTOC測定系 に導入し分析した。

(次ページへつづく)

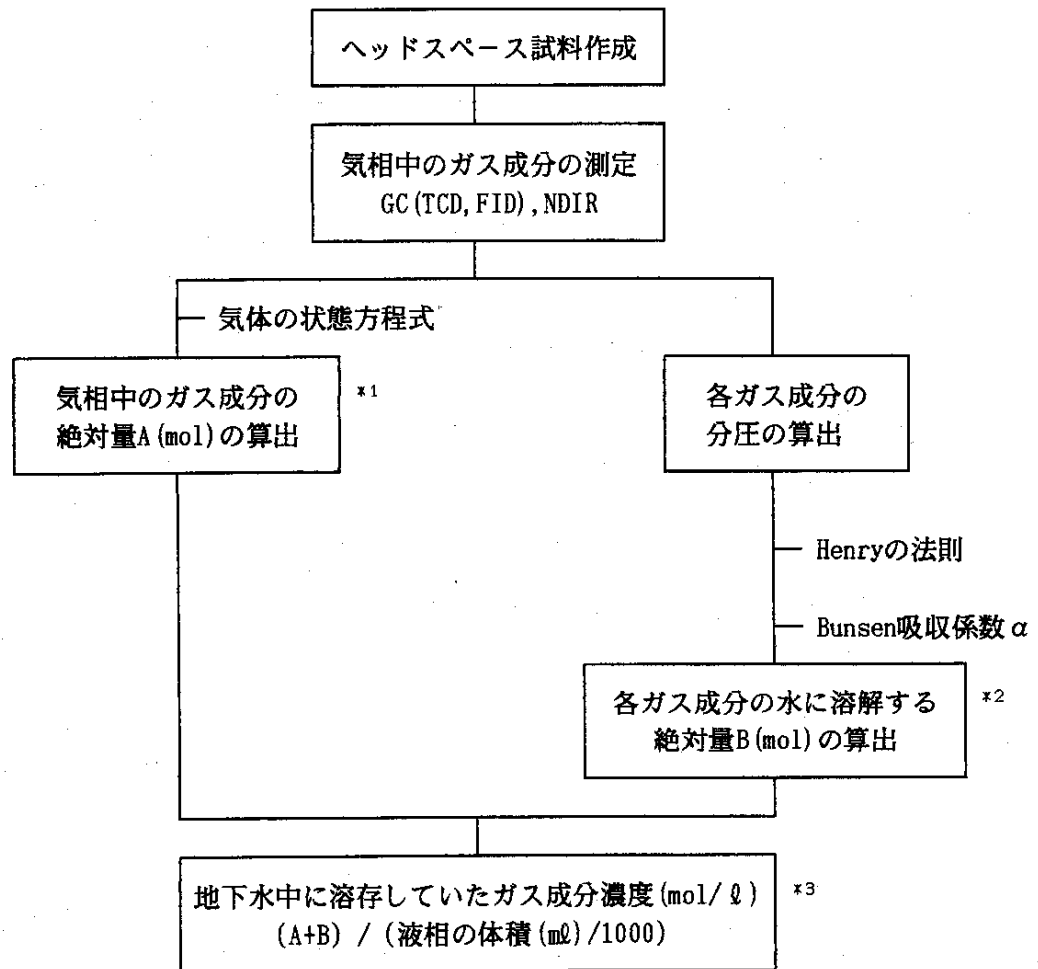
第3-2表 (つづき)

測定項目	測定方法	測定機器	備考
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	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	
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 ²⁺	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 ⁻ Br ⁻ I ⁻ SO ₄ ²⁻	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 ₂ CO ₃ /15mM H ₂ SO ₄ 除去液 : 15mM H ₂ SO ₄ 流量 : 溶離液、除去液とも 2ml/min
F ⁻	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 ⁻ 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。
ΣS ₂ ⁻ *H ₂ S	ヨウ素滴定法		JISK0102に従い分析した。 *H ₂ Sは計算により求めた。
T-P PO ₄ -P T-N NO ₂ -N NO ₃ -N NH ₄ -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ソフェノール青改良型吸光度法、亜硝酸イオンはスルファニルアミンとニチロソ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法による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。

ヘッドスペースサンプルの気相中の各ガス成分の濃度から分圧を算出し、液相中に溶存している各ガス成分量をHenryの法則に従いBunsenの吸収係数を用いて計算した。すなわち試料を注入したヘッドスペース測定用容器内部の全圧を $P_a=1\text{atm}$ とすると、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の法則により、圧力が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事になる。従って、求めるガス成分の分圧を P_1 とすれば、Bunsen吸収係数 α 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。以上から求める試料中に溶存していた各ガス成分濃度は気相と液相の各ガス成分量の和を試料液量で除したものとなる。第3-2図にヘッドスペース法における計算手順、第3-3表に水に対する気体の溶解度（Bunsen吸収係数 α ）を示す。



*1, *2, *3 : 数字は計算例の項目に対応する。

第3-2図 ヘッドスペース法における計算手順

第3-3表 水に対する気体の溶解度 (Bunsen吸収係数 α)

Temp. (°C)	$\alpha \times 10^2$						
	H ₂	He	N ₂	O ₂	CO	CO ₂	CH ₄
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

《計算例》

ヘッドスペース試料の条件及び分析結果を以下のような形で得られたとする。

気相の体積 : 500ml
 液相の体積 : 500ml
 容器内の全圧 : 1atm
 温度 : 20°C (一定)
 気相中のガス成分 : N₂=6000ppm=0.6%

1) 気相中におけるN₂の絶対量

気体の状態方程式 $PV = nRT$ より

$$n \text{ (mol)} = \frac{P \text{ (N}_2\text{ガスの分圧)} \times V \text{ (体積)}}{RT}$$

$$= \frac{1 \text{ (atm)} \times (0.6/100) \times (500/1000)}{0.0821 \times 293.15}$$

$$= 0.0001246 \text{ (mol)}$$

$$= 124.6 \text{ (}\mu\text{mol)}$$

2) 液相中のN₂の絶対量

Bunsen吸収係数によれば、気体の分圧が1atmのとき、溶媒1mlに溶解するN₂の体積(ml)は、20°Cにおいて0.0152ml (0°C, 1atmでの換算値)である。

N₂ガスの分圧P₁は以下のように計算できる。

$$P_1 = 1 \text{ (atm)} \times (6000\text{ppm}/10^6) = 1 \text{ (atm)} \times (0.6\%/100) = 0.006 \text{ (atm)}$$

ここで、Henryの法則により、N₂ガスの溶解度は分圧に比例するから溶媒1mlに対するN₂の溶解量はBunsen吸収係数 α を用い以下のように計算できる。

$$P_1 \times \alpha = 0.006 \text{ (atm)} \times 0.0152 \text{ (ml)} = 9.12 \times 10^{-6} \text{ (ml)}$$

更に、液相の体積は500mlであるから液相には

$$9.12 \times 10^{-6} \text{ (ml/ml)} \times 500 \text{ ml} = 0.0456 \text{ ml} = 4.56 \times 10^{-6} \text{ (}\ell\text{)}$$

のN₂がとけ込んでいる事になる。

ここで得られたN₂ガスの溶解量(ℓ)は、すべて0°C, 1気圧の標準状態における値である。液相中のN₂のmol数は以下の式で得られる。

$$4.56 \times 10^{-6} / 22.4 = 2.036 \text{ (}\mu\text{mol)}$$

3) 試料中濃度への換算

1) 及び2) より得られた値から以下の式により、本来の試料中に溶存していたガス濃度を求めると以下のようなになる。

$$\frac{\text{気相中の絶対量 (mol)} + \text{液相中の絶対量 (mol)}}{\text{液体の体積}} \\ = (124.6 (\mu\text{mol}) + 2.04 (\mu\text{mol})) / 0.5 (\text{L}) = 253.28 (\mu\text{mol/L}) \\ = 7.09 (\text{mg/L})$$

3.1.4 同位体分析方法

水試料の同位体比分析は δD は H_2 ガス、 $\delta^{18}O$ は CO_2 ガスにして、質量分析計 (Finogon 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、 δ (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 δD 、 $\delta^{18}O$ にSMOW (標準平均海水) が用いられる。

(1) δD

水試料は、ファインピペットを用いて $5\mu\text{L}$ を採取し、反応容器内 (ケリルスストップ コック付き石英段つき管) で約 0.1g の金属亜鉛と、真空下 450°C で反応させ 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 ポンベより導入し、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°C 付近の恒温槽で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 まで濃縮しパッカート社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3-4表に示す。

また、参考値として動力炉核燃料開発事業団中部事業所のモニタリングデータも併せて示す。

第3-4表 現場測定結果

測定項目	単位	試料名称		
		地下水	モニタリング	地表水
水温	℃	18.3	17.0	4.1
pH		9.1	9.1	8.2
ORP	mV	-180 (Pt)	-495 (Pt)	251 (Pt)
	mV		-512 (Au)	
電気伝導度	μS/cm	173	169	17
DO	mgO/ℓ	0.1	-	8.5

3.2.2 地下水化学分析結果

地下水化学分析結果を第3-5表に示す。

第3-5表 化学分析結果

測定項目	単位	試料名称		
		地下水	地表水	定量下限値
O ₂	mg/ℓ	N. D.	7.8±0.12	0.01
N ₂	mg/ℓ	16.5±0.52	22.6±0.49	0.01
H ₂	mg/ℓ	N. D.	N. D.	0.2
He	mg/ℓ	N. D.	N. D.	0.2
CH ₄	μg/ℓ	0.139±0.00097	0.022±0.0001	0.1
CO	mg/ℓ	N. D.	N. D.	0.1
ΣCO ₂	mgC/ℓ	19.6±0.12	6.81±0.033	0.1
HCO ₃ ⁻ (計算)	mgC/ℓ	18.2	5.77	
CO ₃ ²⁻ (計算)	mgC/ℓ	1.4	1.04	
TOC	mgC/ℓ	0.19±0.00085	1.1±0.0052	0.05
7ミノ酸	mg/ℓ	N. D.	N. D.	0.5
7ホト酸	mg/ℓ	N. D.	N. D.	0.5
T-Si	mg/ℓ	8.5±0.035	5.8±0.029	0.05
Na	mg/ℓ	44.2±0.20	3.12±0.015	0.03
K	mg/ℓ	0.36±0.0018	0.51±0.002	0.04
Li	mg/ℓ	0.012±0.00013	N. D.	0.05
Ca	mg/ℓ	2.97±0.0035	0.98±0.0055	0.2
Mg	mg/ℓ	0.06±0.0002	0.16±0.00071	0.02
Sr	mg/ℓ	N. D.	N. D.	0.001
Al	mg/ℓ	N. D.	N. D.	0.01
T-Mn	mg/ℓ	N. D.	N. D.	0.001
D-Mn	mg/ℓ	N. D.	N. D.	0.001
T-Fe	mg/ℓ	0.04±0.00045	0.09±0.00087	0.002
D-Fe	mg/ℓ	0.03±0.00032	0.06±0.00056	0.002
Fe ²⁺	mg/ℓ	N. D.	N. D.	0.1
Cl	mg/ℓ	0.86±0.0049	1.36±0.0036	0.05
Br	mg/ℓ	0.21±0.0011	N. D.	0.1
I	mg/ℓ	N. D.	N. D.	0.1
SO ₄	mg/ℓ	N. D.	1.74±0.0089	0.05
F	mg/ℓ	3.7±0.0025	1.4±0.0037	0.1
S	mg/ℓ	N. D.	N. D.	0.1
H ₂ S (計算)	mg/ℓ	N. D.	N. D.	
T-P	mgP/ℓ	0.005±0.000076	0.003±0.00008	0.01
PO ₄	mgP/ℓ	0.0049±0.000028	0.0016±0.000017	0.005
T-N	mgN/ℓ	0.078±0.000567	0.14±0.00063	0.01
NO ₂	mgN/ℓ	N. D.	0.0016±0.000012	0.005
NO ₃	mgN/ℓ	0.001±0.00001	0.039±0.00007	0.005
NH ₄	mgN/ℓ	0.076±0.000475	0.014±0.00024	0.005
トリチウム (³ H)	TR	<0.3	6.1±0.2	
δD	‰	-56.9	-53.8	
δ ¹⁸ O	‰	-8.6	-8.2	

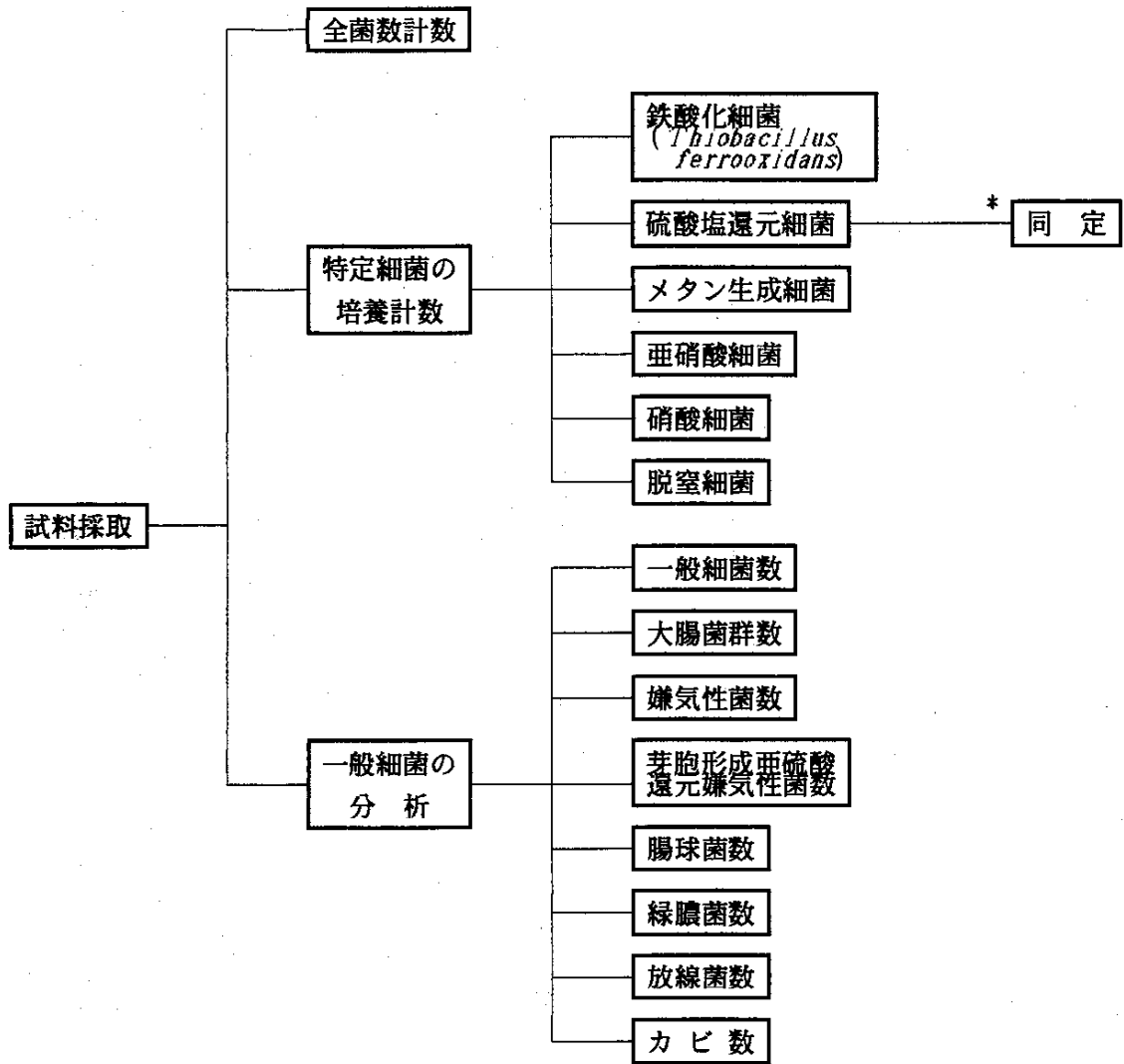
N. D. : 検出限界値以下

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。



* 硫酸塩還元細菌の存在が確認された場合

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 (Hobbie J.E. et al., 1977) らが示したアクリジンオレンジ染色法に準拠し行った。その方法は以下の通りである。

直径25mmのヌクレポアフィルター (ポアサイズ: $0.2\mu\text{m}$) により試料を濾過し、その後アクリジンオレンジ0.01w/v%溶液により染色した。染色をしてから約30分後に、1試料につき3枚のプレパラートを作製した。そして、蛍光用エマルジョンオイルを用いて、蛍光フィルター (BG12) を付した落射型蛍光顕微鏡 (オリンパス光学工業、model BH-RFL) により、倍率1500倍にて計数を行った。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 特定細菌の培養計数

(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、 γ 線滅菌済みのミリポアフィルター（ポアサイズ0.2 μ 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2枚のプレートを作製し実施した。

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

(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γ線滅菌済みミリポアフィルター(0.2μm)を用いて、減圧とガス充填を数回繰り返した。この時、培地に加えたレサズリンの薄赤色が発色していないことを確かめ、完全な無酸素状態であることを確認してから、培養計数に使用した。(ここで、レサズリンは、酸素が存在すると青～紫色を呈し、微好気環境下では薄赤色へと変わり、無酸素環境下では発色しない。すなわち、本培地の場合は透明となる。) 試料の接種及び希釈にはシリンジを使用し、グローブボックス内で作業を行った。なお、希釈液には、培地と等濃度の割合でレサズリンと還元剤を添加した生理食塩水を、培地調製時と同様に滅菌及びガス置換操作により調製したものをを用いた。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: Porapack 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。

(4) 亜硝酸細菌

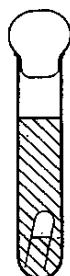
$\text{NH}_4\text{-N}$ を $\text{NO}_2\text{-N}$ へ酸化する無機栄養細菌をMPN法で計数した。亜硝酸細菌計数用培地の組成を第4-6表に示す。この培地で27℃において静置・暗条件下において40日間培養する。亜硝酸細菌の生育の有無は、亜硝酸生成の定性試験から判定する(須藤隆一, 1989)。

(5) 硝酸細菌

$\text{NO}_2\text{-N}$ を $\text{NO}_3\text{-N}$ へ酸化する無機栄養細菌をMPN法で計数した。硝酸細菌計数用培地の組成を第4-7表に示す。この培地で27℃において静置・暗条件下において60日間培養する。硝酸細菌の生育の有無は、硝酸生成の定性試験から判定する(須藤隆一, 1989)。

(6) 脱窒細菌

脱窒細菌とは、嫌気条件下で硝酸呼吸により $\text{NO}_2\text{-N}$ 及び $\text{NO}_3\text{-N}$ を N_2 や N_2O に還元する細菌の総称である。ここでは試料を嫌気条件下で培養し、ガス生成の有無からMPN法で脱窒細菌数を計数した。脱窒細菌計数用培地の組成を第4-8表に示す。この培地とダーラム管の入った試験管に検体を接種し、28℃で14日間培養する(須藤隆一, 1989)。培養前の培地は、プロムチモールブルーによって緑色を呈しているが、 NO_3^- が消失すれば培地がアルカリ性になるので濃青色となる。これが脱窒によるものであれば、ダーラム管中に気泡がたまる。従って、濃青色に変化し、かつ気泡がたまった試験管を陽性管とする(土壤微生物研究会, 1992)。



第4-2図 ダーラム管試験管

4.1.4 一般細菌の分析

(1) 一般細菌数

上水試験法に準拠し計数した。すなわちここでいう一般細菌とは、標準寒天培地を用いて $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で 24 ± 2 時間培養したとき、培地に集落を形成する生菌を指すことになる。標準寒天培地の組成を第4-9表に示す。計数手順は次の通りである。

検水及び各段階の希釈検水を各々シャーレ2枚以上に 1mL ずつ入れ、これに $45 \sim 50^\circ\text{C}$ に保温した標準寒天培地を約 15mL ずつ無菌的に加える。次いで、寒天培地が固まらないうちに前後左右に揺り動かして、検水と培地が十分に混和し、細菌がシャーレ一面によく拡散されるようにした後、暫時静置して培地を固まらせる。その後これを逆さにしてふ卵器内に収め、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で培養する。 24 ± 2 時間培養した後、各シャーレの集落数を計数し、試料 1mL 中の集落数に換算して一般細菌数とする。

この方法で計数された一般細菌は、清浄な水には少なく、汚染された水ほど多い傾向があるので、水の汚染程度を示す一指標となる。

(2) 大腸菌群数

公害対策基本法に基づく「水質汚濁に係わる環境基準」の測定方法に準拠し計数した。

「環境基準」では最確数による定量法を定めているが、次のものをいう。

検水 10mL , 1mL , 0.1mL , 0.01mL …… のように連続した4段階を5本ずつ BGLB 醗酵管に移植し、 $35 \sim 37^\circ\text{C}$ で 48 ± 3 時間培養する。ガス発生を認めたものを大腸菌群陽性管とし、各試料量における陽性管数を求め、これから 100mL 中の最確数を最確数表を用いて算出する。すなわちここでいう大腸菌群とは、乳糖を分解して酸とガスを生じる好気性または通性嫌気性の菌を指す。BGLB 培地 (ブリアントグリーン乳糖胆汁アイン培地) の組成を第4-10表に示す。

(3) 嫌気性菌数

衛生試験法に準拠し計数した。すなわちここでいう嫌気性菌数とは、GAM 寒天培地上で嫌気培養したときに生育する細菌の総数を指す。計数方法の概要は次の通りである。

検水及び各段階の希釈検水を各々シャーレ2枚以上に 1mL ずつ入れ、これに GAM 寒天培地を無菌的に加え混釈寒天平板を作成する。このとき試料をできるだけ空気と接触させないようにする。この寒天平板と市販のガスパック装置を嫌気ジャーに入れ、密封した後、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で培養する。 48 時間培養後、各シャーレ内の集落を釣菌する。その集落を GAM 寒天培地上に接種し、好氣的に発育しないことを確認する。嫌気条件で発生した集落数から、試料水 1mL 当たりの菌数を算出する。

GAM 寒天培地の組成を第4-11表に示す。

(4) 芽胞形成亜硫酸還元嫌気性菌数

「厚生省令第35号ミネラルウォーター類の成分規格基準」の測定方法に準拠し計数した。その方法は次の通りである。

メンブランフィルターろ過装置のファンネル内に検体 (芽胞形成亜硫酸還元嫌気性菌の試験では、 70°C で 20 分間加熱処理したもの、腸球菌と緑膿菌の試験では加熱処理無し) を 250mL 注いで吸引ろ過した後、滅菌水 $20 \sim 30\text{mL}$ で $2 \sim 3$ 回ファンネル内を洗浄し、吸引ろ過する。ろ過終了後、滅菌ピンセットを用いてフィルターホルダーからメンブランフィルターをはがし、これを試料とする。メンブランフィルターろ過装置、ファンネル及びフィルターホルダーは 121°C で 15 分間滅菌したものを使用し、メンブランフィルターは孔径が $0.22\mu\text{m}$ (腸球菌と緑膿菌の試験では $0.45\mu\text{m}$) で、予め滅菌し、滅菌水で予洗したものを使用する。試料を亜硫酸一鉄加寒天培地上に空気が残らないように密着させ、 $35.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ で 48 ± 3 時間嫌氣的に培養する。黒色の集落を認めたものを芽胞形成亜硫酸還元嫌気性菌陽性とする。亜硫酸一鉄加寒天培地の組成を第4-12表に示す。

(5) 腸球菌数

「厚生省令第35号ミネラルウォーター類の成分規格基準」の測定方法に準拠し計数した。その方法は次の通りである。

試料の調製方法は、芽胞形成亜硫酸還元嫌気性菌試験法と同じである。試料をKFレンサ球菌寒天培地上に空気が残らないように密着させ、 $35.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ で 48 ± 3 時間培養する。淡紅～赤色の集落を認めたものを推定試験陽性とする。淡紅～赤色の集落を釣菌し、胆汁－エスクリン－アジド寒天培地に画線し、独立した集落を発生させる。 $45.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ で 48 ± 3 時間培養した後、黄褐～黒色の集落を釣菌し、ブドウ糖寒天斜面に移植する。 $35.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ で24時間 \pm 2時間培養した後、発生した集落についてカタラーゼ試験(*)を行う。カタラーゼ試験において陰性を示したのものについてグラム染色を行い鏡検する。グラム陽性の球菌であれば、確定試験陽性(腸球菌陽性)とする。KFレンサ球菌寒天培地の組成を第4-13表に、胆汁－エスクリン－アジド寒天培地の組成を第4-14表に示す。

* カタラーゼ試験

好気性菌のチトクローム酸化酵素(呼吸酵素)の有無を確認する試験で、次のような方法がある。

スライドガラスの2箇所に生理食塩液と過酸化水素水(3w/v%)を1滴ずつ採り、発育した集落から細いガラス棒で少量の菌を生理食塩液に浮遊させる。次いで、この一部を過酸化水素水と混和する。このとき、細かい泡が発生したとき陽性と判定する。

(6) 緑膿菌数

「厚生省令第35号ミネラルウォーター類の成分規格基準」の測定方法に準拠し計数した。その方法は次の通りである。

試料の調製方法は、芽胞形成亜硫酸還元嫌気性菌試験法と同じである。試料をmPA-B寒天培地上に空気が残らないように密着させ、 $41.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で 48 ± 3 時間培養する。暗褐色または暗緑色の集落を認めたものを推定試験陽性とする。暗褐色または暗緑色の集落を釣菌し、セトリミド寒天培地上に画線し、独立した集落を発生させる。 $35.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ で48時間 \pm 3時間培養した後、類緑色または赤褐色の集落を釣菌し、普通寒天斜面に移植する。 $41.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で24時間 \pm 2時間培養した後、菌の発育の有無を観察し、発育を認めたものについてオキシダーゼ試験(*)を行う。オキシダーゼ試験において陽性を示したものについて、グラム染色を行い鏡検する。グラム陰性無芽胞のかん菌であれば、確定試験陽性(緑膿菌陽性)とする。mPA-B寒天培地の組成を第4-15表に示す。

* オキシダーゼ試験

カタラーゼ試験と同じく、呼吸酵素の有無を確認する試験で、次のような方法がある。微量の精製水で湿らせたオキシダーゼ試験紙(二塩化テトラメチルパラフェニレンジアミン20mg、アスコルビン酸2mgを無菌的にしみ込ませて乾燥させた $5 \times 5\text{mm}$ のろ紙)を、発育した集落に軽く接して付着させる。1分間以内に濃青色を呈したものを陽性とする。無変化の場合あるいは1分経過後の呈色は陰性とする。

(7) 放線菌数

放線菌とは、その生活史上の一時期に分枝した菌糸を形成するグラム陽性の細菌をいう。

計数方法は上水試験法に準拠した。その概要は次の通りである。

検水及び各段階の希釈検水を各々シャーレ2枚以上に1mlずつ採り、放線菌アイソレーション寒天培地を用いて混釈平板とし、これを逆さにしてふ卵器内に収め、約 30°C で培養する。5～7日間培養後、各シャーレ内に形成された集落の形態を実態顕微鏡で観察し、放線菌集落数を求め、試料水1ml当たりの菌数を算出する。放線菌アイソレーション培地の組成を第4-16表に示す。

(8) カビ数

衛生試験法に準拠し計数した。その概要は次の通りである。

試料液またはその希釈液の0.5mlを、クロラムフェニコール添加PDA培地の表面に塗布し、25℃で培養する。5～7日間培養後、各シャーレ内の真菌集落を求め、試料水1ml当たりの真菌数を算出する。クロラムフェニコール添加PDA培地の組成を第4-17表に示す。

【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

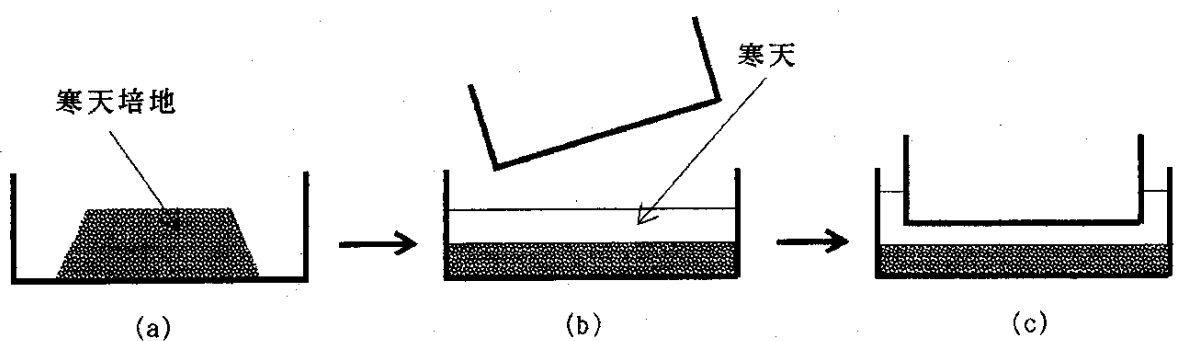
被検液の一定量をシャーレ内で寒天培地とよく混合して平板培養を行い、生成したコロニー数を数える平板培養コロニー計数法のうち、第4-3図のような培養を行うものである。この場合、すべての細菌が認められるようなコロニーをつくること、1個の細菌が1つのコロニーをつくることを前提としている。

今回行った二重皿培養法の試料接種手順の概略を、第4-3図で説明する。

(a) 乾熱滅菌（ 180°C 、4時間）処理したガラスシャーレの裏蓋に、温度を 38°C に保持した寒天培地15mlを入れる。直ちに試料原液あるいは還元剤を添加した生理食塩水による段階希釈試料を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°C に保持した1.5w/v%寒天溶液15mlを重層する。

(c) 重層した寒天溶液が固まらない間に、シャーレの残りの一方を寒天に軽く押し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4-3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 ₄) ₂ SO ₄	3.0 g
	KCℓ	0.1 g
	K ₂ HPO ₄	0.5 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
	Ca(NO ₃) ₂	0.01g
	/ Ion Exchanged Water	500 ml
	pH adjusted at 2.0 with H ₂ SO ₄	
[B]	FeSO ₄ ·7H ₂ O	10.0 g
	/ Ion Exchanged Water	500 ml
	pH adjusted at 2.0 with H ₂ SO ₄	

第4-2表 硫酸塩還元細菌計数用培地

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

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

第4-3表 メタン生成細菌計数用培地 (門田 元, 多賀信夫, 1985)

ギ酸ナトリウム	2.5 g
酢酸ナトリウム	2.5 g
メタノール	2.5 ml
CaCl ₂	0.01 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.01 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
KH ₂ PO ₄	0.25 g
システイン塩酸塩	0.2 g
レサズリン	0.001g
イオン交換水	1000 ml
ビタミン混液 ¹⁾	2.0 ml
微量金属溶液 ²⁾	10.0 ml
NaHCO ₃ (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Na₂S·9H₂O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%Na₂S·9H₂O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%、Na₂S·9H₂O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 ₁₂	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 ₂ ·6H ₂ O	0.004g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.004g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	1.0 g
ZnSO ₄ ·H ₂ O	0.06 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.08 g
Na ₂ EDTA	6.0 g
／イオン交換水	1000 ml

第4-6表 亜硝酸細菌計数用培地

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

1)ろ過滅菌して加える

第4-7表 硝酸細菌計数用培地

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

第4-8表 脱窒細菌計数用培地

[A]	
KNO ₃	1.0 g
アスパラギン	1.0 g
BTB溶液(1w/v%) ¹⁾	5 ml
/イオン交換水	500 ml
1)BTB溶液	
プロピルアルコール	1 g
エタノール	100 ml
[B]	
クエン酸ナトリウム	8.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0 g
FeCl ₂ ·6H ₂ O	0.05 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.2 g
/イオン交換水	500 ml
[A] と [B] を混合しpH7.0~7.2に調整する	

第4-9表 標準寒天培地 (一般細菌数計数用)

ペプトン	5	g
粉末酵母エキス	2.5	g
ブドウ糖	1	g
粉末寒天	15	g
ノイオン交換水	1000	ml
pH (滅菌後)	7.0±0.1	

今回の分析には市販の調整培地を使用した

第4-10表 BGLB培地 (大腸菌群数計数用)

ペプトン	10	g
乳糖	10	g
乾燥牛胆汁粉末	20	g
ノイオン交換水	900	ml
以上にブリアントグリーン溶液13.3mlとイオン交換水を加え全量を1000mlとする		
pH (滅菌後)	7.0±0.1	
1)ブリアントグリーン溶液		
ブリアントグリーン	0.1	g
ノイオン交換水	100	ml
この培地をダーラム醗酵管に分取し使用する		

今回の分析には市販の調整培地を使用した

第4-11表 GAM寒天培地 (嫌気性菌数計数用)

ペプトン	5	g
大豆ペプトン	3	g
プロトゼペプトン	5	g
消化血清末	10	g
酵母エキス	2.5	g
肉エキス	2.2	g
肝臓エキス末	1.2	g
ブドウ糖	0.5	g
溶性デンプン	5	g
L-トリプトファン	0.2	g
L-システイン塩酸塩	0.3	g
チオグリコール酸ナトリウム	0.3	g
L-アルギニン	1	g
ビタミンK ₁	5	mg
ヘミン	10	mg
リン酸二水素ナトリウム	2.5	g
塩化ナトリウム	3	g
炭酸ナトリウム	1.3	g
粉末寒天	15	g
ノイオン交換水	1000	ml
pH (滅菌後)	7.2±0.1	

今回の分析には市販の調整培地を使用した

第4-12表 亜硫酸一鉄加寒天培地（芽胞形成亜硫酸還元嫌気性菌数計数用）

亜硫酸ナトリウム溶液 ¹⁾	1	ml
硫酸第一鉄溶液 ²⁾	5	滴
／普通寒天培地 ³⁾	18	ml
1) 亜硫酸ナトリウム溶液		
亜硫酸ナトリウム	10	g
／イオン交換水	100	ml
2) 硫酸第一鉄溶液		
硫酸第一鉄	8	g
／イオン交換水	100	ml
3) 普通寒天培地		
ペプトン	10	g
肉エキス	5	g
NaCl	5	g
粉末寒天	15	g
／イオン交換水	1000	ml
pH（滅菌後）	7.0	

今回の分析には市販の調整培地を使用した

第4-13表 KFレンサ球菌寒天培地（腸球菌数計数用）

[A]		
ペプトン	10	g
酵母エキス	10	g
塩化ナトリウム	5	g
グリセリン酸ナトリウム	10	g
マルトース	20	g
乳糖	1	g
アジ化ナトリウム	0.4	g
プロモクレゾールブルー溶液 ¹⁾	1	ml
粉末寒天	15	g
／イオン交換水	1000	ml
1) プロモクレゾールブルー溶液		
プロモクレゾールブルー	15	g
エタノール	1000	ml
[B]		
TTC溶液 ²⁾	10	ml
2) TTC溶液		
2,3,5-トリフェニルテトラゾリウムクロリド	1	g
／イオン交換水	100	ml
<p>加熱溶解、5分間煮沸し50～60℃まで冷却した [A]液に、孔径0.45μmのメンブランフィルターでろ過した [B]液を加え、pH7.2に補正する</p>		

今回の分析には市販の調整培地を使用した

第4-14表 胆汁-エスクリン-アジド寒天培地 (腸球菌数計数用)

ペプトン	20	g
酵母エキス	5	g
牛胆汁粉末	10	g
塩化ナトリウム	5	g
エスクリン	1	g
クエン酸鉄アンモニウム	0.5	g
アジ化ナトリウム	0.15	g
粉末寒天	15	g
ノイオン交換水	1000	ml
pH (滅菌後)	7.0~7.2	

今回の分析には市販の調整培地を使用した

第4-15表 mPA-B寒天培地 (緑膿菌数計数用)

L-リジン	5	g
塩化ナトリウム	5	g
酵母エキス	2	g
ナトリウム硫酸ナトリウム	5	g
硫酸マグネシウム	1.5	g
ショ糖	1.25	g
キシロース	1.25	g
乳糖	1.25	g
粉末寒天	15	g
フェノール	0.08	g
クエン酸鉄アンモニウム	0.8	g
ノイオン交換水	1000	ml

加熱溶解し、滅菌後にpH7.0~7.2となるように補正し、115℃で10分間滅菌する。
その後50~60℃まで冷却し次のものを加える。

スルファピリジン	176.0	mg
硫酸カマイシン	8.5	mg
ナリジク酸	37.0	mg
アクチオン	150.0	mg

第4-16表 放線菌アイソレーション培地 (放線菌数計数用)

アスパラギン	0.1	g
カゼイン酸ナトリウム	2	g
プロピオン酸ナトリウム	4	g
リン酸一水素カルシウム	0.5	g
硫酸マグネシウム	0.1	g
硫酸第一鉄	0.001	g
グリセリン	5	g
粉末寒天	15	g
ノイオン交換水	1000	ml
pH (滅菌後)	8.1	

第4-17表 クロラムフェニコール添加PDA培地 (カビ数計数用)

クロラムフェニコール	0.1	g
ポトエキス	4	g
ブドウ糖	20	g
粉末寒天	15	g
ノイオン交換水	1000	ml
pH (滅菌後)	5.6±0.1	

今回の分析には市販の調整培地を使用した

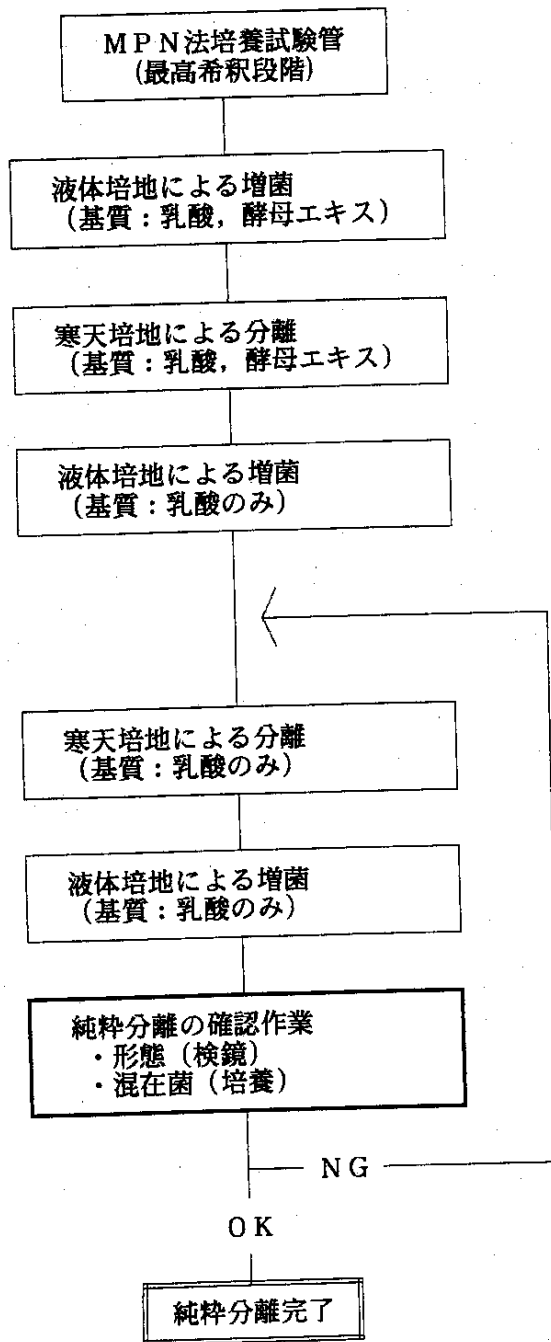
4.1.5 硫酸塩還元細菌の同定

硫酸塩還元細菌の存在は、地下水と地表水試料の両方で確認された。そこで両試料から硫酸塩還元細菌を各々1株分離し、分離株についてその属及び種の同定作業を行った。ここで、純粹分離は前項目 [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。このようにして得た分離株について、形態学的試験、生理学的試験から属・種の同定を試みた。さらに、硫酸塩還元細菌の属及び種の決定の際、有用な情報となる化学分類手法（キノプロファイル法）及び遺伝学的手法（GC含量測定）についても試験を行った。以下の項目に分離、純粹化から同定にいたるまでの方法を記述する。

(1) 分離及び純粹化

硫酸塩還元細菌を分離するための試料は、前項4.1.3(2)で示したMPN法における最高希釈段階で出現した試験管の培地の黒変部分を、パスツールピペットで採取することにより得た。これを計数培地から寒天を除いた組成の液体培地に接種し、暗条件下、30℃で増菌培養した。次に増菌した培養液から1mlを採取、還元剤を添加した生理食塩水で希釈し、希釈液の1mlを38℃に保持した固体寒天培地と混合してシャーレにて嫌気培養を行った。このシャーレから出現したコロニーを再び液体培地に接種し、増菌を行った。ただし、ここから先の段階で用いる培地には、粉末酵母エキスを除外した。これは、共存する従属栄養細菌の増殖を抑え、硫酸塩還元細菌の単一コロニーを得るための配慮である。以後、固体寒天培地と液体培地による培養を繰り返して、両試料から硫酸塩還元細菌の分離株を1株得た。

第4-4図に以上の分離及び純粹化のフローシートを示す。なお分離株については、他の細菌群との混在のないこと、あるいは同じ硫酸塩還元細菌の複数種との混在のないことについて確認した（第4-18表参照）。すなわち他の細菌群との混在については、従属栄養細菌あるいは光合成硫黄細菌及び化学合成硫黄細菌の混在のないことを、培養と顕微鏡観察により確かめた。また、硫酸塩還元細菌の複数種の非存在確認は、顕微鏡観察により形態が単一であること、さらに、乳酸のみを有機物源（本試験ではPostgateの改変培地から粉末酵母エキスを除いた組成）とした単一培地で培養したときの対数増殖において増殖速度が一定であることから判断した。



第4-4図 硫酸塩還元細菌の純粋分離の操作手順

第4-18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4-20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4-21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

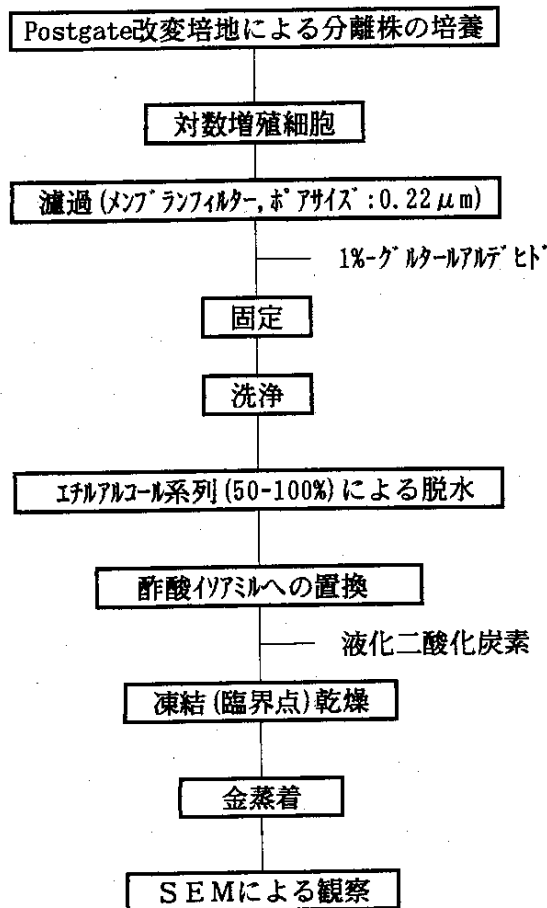
(2) 同定操作

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

1) 形態学的試験

次の内容で試験を行った。

- ① 光学顕微鏡及び電子顕微鏡による細胞の形態観察
走査型電子顕微鏡(SEM)観察試料の調製手順を第4-5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4-6図に示す。
- ④ 鞭毛観察
鞭毛染色の手順を第4-7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の改変培地で培養し、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。

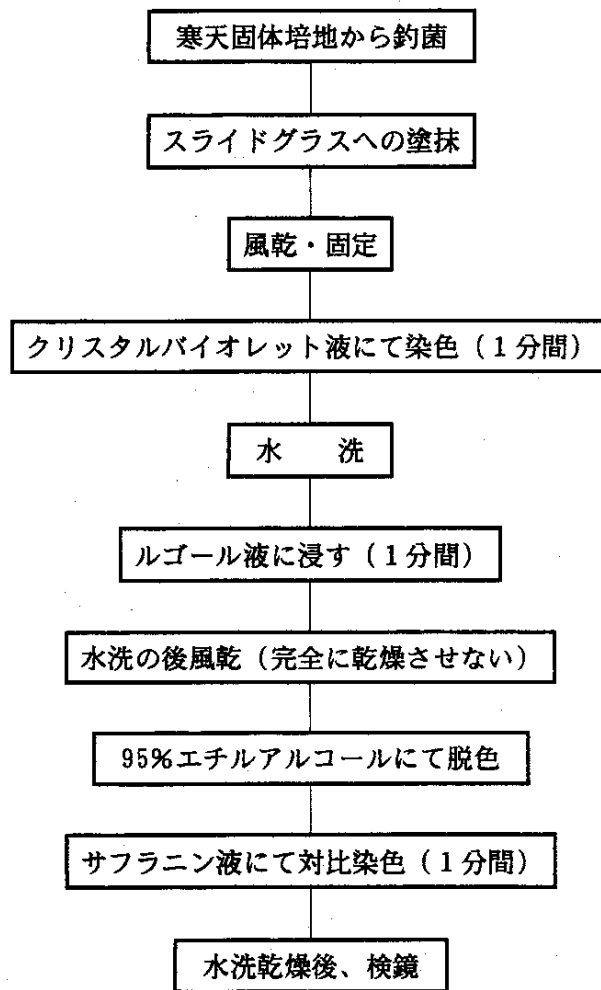


走査型電子顕微鏡観察の手順

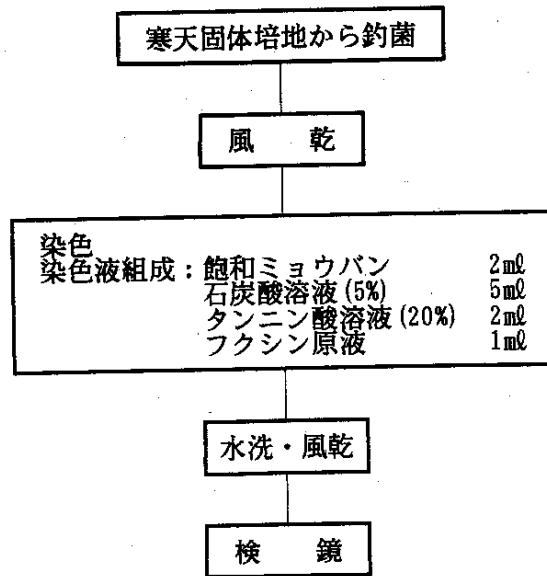
分離・純粋化した菌株をPostgate改変培地(液体)により30℃、暗条件下で培養し、細胞懸濁液を作成・走査型電子顕微鏡(SEM)用の試料とした。SEM観察用試料の調製は以下の通りである。

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

第4-5図 走査型電子顕微鏡(SEM)観察試料の調製手順



第4-6図 グラム染色の手順



第4-7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の改変培地から粉末酵母エキス及び乳酸を除き、これらの有機物源のかわりにリンゴ酸塩、ギ酸塩、酢酸塩、及びブドウ糖を添加した培地で培養を行い生育を観察した。また、硫酸塩の存在しない場合の基質の資化性についても試験を行った。この場合は、Postgateの改変培地の硫酸塩と有機物源を除き、かわりにリンゴ酸塩、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

第4-19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たし密封)
培地組成	Postgateの改変培地を基本として、基質炭素及び硫酸塩の組成を変化させた a 硫酸塩の存在下: 乳酸塩 リンゴ酸塩 ギ酸塩 酢酸塩 ブドウ糖 b 硫酸塩の非存在下: リンゴ酸塩 ピルビン酸塩 コリン
培養温度等	30℃, 暗所, 静置
増殖の判定	試験管のまま細胞の懸濁状況を経時的に測定した。 測定は比色計にて、波長660nmの吸光度を調べた。

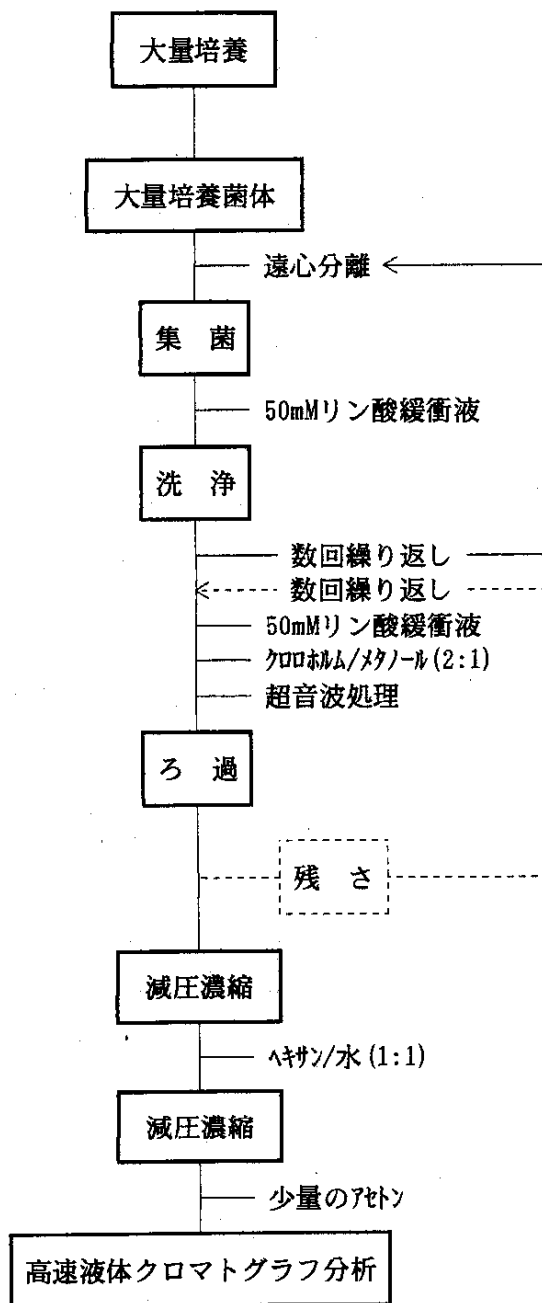
注) 培地に添加した全ての有機物基質は最終濃度を30mMとした

3) 化学分類手法 (呼吸鎖キノンの測定)

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

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

硫酸塩還元細菌は、*Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfomonas*, *Thermodesulfobacterium*, *Desulfobulbus*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfobacterium*, *Desulfonema*の10属、約30種から成るが、各々の優占キノン種は属により異なる。すなわち、*Desulfovibrio*の多くはMK-6を、*Desulfobulbus*はMK-5を、その他の属の大部分はMK-7を主に優占キノン分子種として有することが知られている (Collins and Widdel, 1986, Widdel, 1988)。従って、本分離株の優占キノン分子種を分析することにより、属レベルでの同定に関し有力な情報が得られると考えられる。細菌細胞からのキノンの抽出及び分離・定性操作の概略を第4-8図に示す。



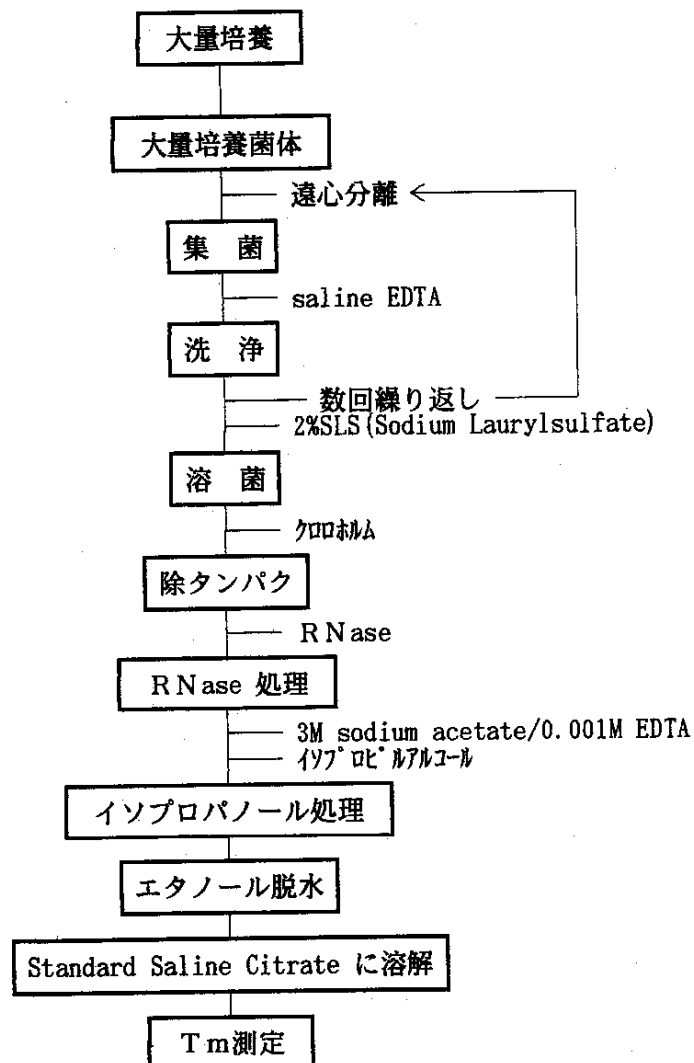
第4-8図 キノン分析操作の概略

4) 遺伝学的手法 (GC含量測定)

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

DNAの抽出・精製操作の概略 (駒形, 1985, 金子, 1985) を第4-9図に示す。DNAの熱変性曲線から全吸収増加の50%にあたる温度を変性温度 (T_m) と呼ぶが、これよりGC含量は次式で求まる。

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



第4-9図 DNAの抽出・精製からGC含量測定までの手順概略

第4-20表 光合成紅色非硫黄細菌用培地

KH ₂ PO ₄	0.5	g
K ₂ HPO ₄	0.6	g
NH ₄ Cℓ ¹⁾	1.0	g
MgCℓ ₂ ·6H ₂ O ²⁾	0.2	g
NaCℓ	0.2	g
CaCℓ ₂ ·2H ₂ O	0.05	g
Yeast Extract	0.1	g
Sodium Acetate	1.0	g
微量元素混液 ³⁾	1.0	ml
ビタミン混液 ⁴⁾	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4-22表を参照
- 4) 第4-23表を参照

第4-21表 光合成硫黄細菌用培地

[基礎培地]		
KH ₂ PO ₄	1.0	g
NH ₄ Cℓ	1.0	g
MgCℓ ₂ ·6H ₂ O	0.2	g
CaCℓ ₂ ·2H ₂ O	0.05	g
微量元素混液 ¹⁾	1.0	ml
ビタミン混液 ²⁾	1.0	ml
イオン交換水	1000	ml
[紅色硫黄細菌]		
1N-HCℓ	0.3	ml
8%-NaHCO ₃ ³⁾	0.5	ml
2%-Na ₂ S·9H ₂ O	1.0	ml
基礎培地	18.2	ml
[綠色硫黄細菌]		
1N-NaOH	0.05	ml
8%-NaHCO ₃ ³⁾	0.5	ml
2%-Na ₂ S·9H ₂ O	0.25	ml
基礎培地	19.2	ml

- 1) 第4-22表を参照
- 2) 第4-23表を参照
- 3) 濾過滅菌後使用

第4-22表 微量元素溶液の組成 (光合成細菌用)

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

第4-23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 ₁₂	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 バクテリアの調査結果

4.2.1 全菌数計数及び特定細菌の培養計数結果

全菌数計数及び特定細菌の培養計数結果を第4-24表に示す。

第4-24表 全菌数計数及び特定細菌の培養計数結果

項目	単位	試料名称		計数方法
		地下水	地表水	
全菌数	cells/ml	1.6×10^5	5.6×10^5	AODC法
<i>T. ferrooxidans</i>	MPN/ml	N. D. *1	N. D. *1	MPN法
硫酸塩還元細菌	CFU/ml	N. D. *2	1.3×10^1	二重皿法
	MPN/ml	5.0×10^{-1}	3.3×10^1	MPN法
メタン生成細菌	MPN/ml	N. D. *3	N. D. *3	MPN法
亜硝酸細菌	MPN/ml	N. D. *4	N. D. *4	MPN法
硝酸細菌	MPN/ml	N. D. *4	N. D. *4	MPN法
脱窒細菌	MPN/ml	N. D. *4	N. D. *4	MPN法

CFU : Colony Forming Units

MPN : Most Probable Number

*1 $< 2.0 \times 10^{-2}$ MPN/ml

*2 < 1 CFU/ml

*3 $< 4.0 \times 10^{-2}$ MPN/ml

*4 $< 2.0 \times 10^{-1}$ MPN/ml

4.2.2 一般細菌の分析結果

一般細菌の分析結果を第4-25表に示す。

第4-25表 一般細菌の分析結果

項目	単位	試料名称		分析方法
		地下水	地表水	
一般細菌数	CFU/ml	3.0×10^0	1.8×10^2	上水試験法
大腸菌群数	MPN/100ml	N. D. *1	2.0	水質汚濁に係わる 環境基準
嫌気性菌数	CFU/ml	N. D. *2	N. D. *2	衛生試験法
芽胞形成亜硫酸 還元嫌気性菌数	CFU/250ml	N. D. *3	N. D. *3	厚生省令第35号 ミネラルウォーター類の 成分規格基準
腸球菌数	CFU/250ml	N. D. *3	3	
緑膿菌数	CFU/250ml	N. D. *3	N. D. *3	
放線菌数	CFU/ml	N. D. *2	N. D. *2	上水試験法
カビ数	CFU/ml	N. D. *4	7	衛生試験法

CFU : Colony Forming Units

MPN : Most Probable Number

*1 <1.8MPN/100ml

*2 <1CFU/ml

*3 <1CFU/250ml

*4 <1CFU/0.5ml

4.2.3 硫酸塩還元細菌の同定結果

(1) 各種試験結果

地下水と地表水の試料から分離した硫酸塩還元細菌の同定のための各種試験結果を、第4-26表に示す。

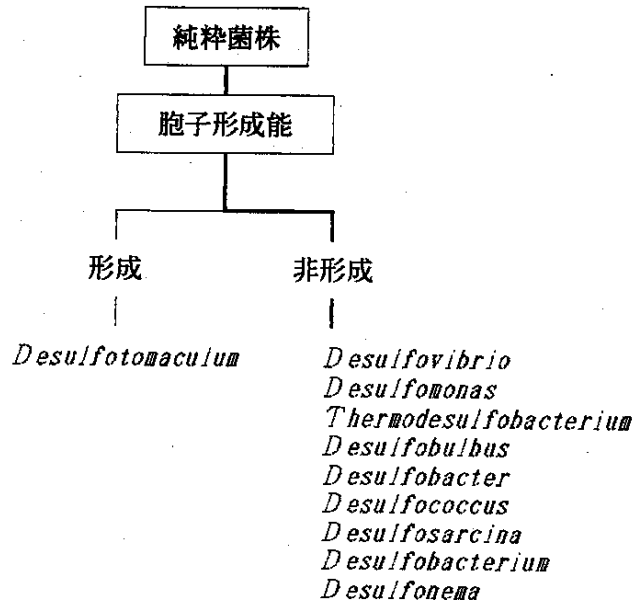
第4-26表 地下水と地表水の試料から分離した硫酸塩還元細菌の同定に関する各種試験結果

●試料	地下水	地表水
●形態学的試験		
①形態		
形態	ビブリオ型	ビブリオ型
幅 (μm)	0.6	0.5
長さ (μm)	2~3	2~3
②運動能	+	+
③グラム染色	-	-
④鞭毛	単極毛	単極毛
⑤孢子形成能	-	-
●生理学的試験		
①基質資化性		
▽with sulfate		
乳酸塩	+	+
リンゴ酸塩	+	+
ギ酸塩	+	+
酢酸塩	-	-
ブドウ糖	-	-
▽without sulfate		
リンゴ酸塩	-	-
ビルビン酸塩	+	+
コリン	+	+
②NaCl 要求性	-	-
●化学分類手法		
優占キノン種	MK-6	MK-6
●遺伝学的手法		
G+C mole%	55.0	56.1

第4-26表の情報を基に、両分離株の属・種の同定を試みた。

(2) 属の同定

硫酸塩還元細菌は、孢子形成能により第4-10図の如く大別されており、孢子形成群には *Desulfotomaculum*、孢子非形成群は *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Thermodesulfobacterium*, *Desulfobulbus*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfobacterium*, *Desulfonema*と判断することができる。両菌株について孢子形成能の有無を顕微鏡観察により調べた。その結果、孢子形成能の無いことが明らかとなった。このことにより両菌株は *Desulfotomaculum*ではないと考えられる。



第4-10図 孢子形成能による硫酸塩還元細菌の分類

*Thermodesulfobacterium*の最適温度は70℃であり (Friedrich Widdel, 1988)、今回の両試料の採取環境から除外できると考えられる。

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4-27表に示す。

第4-27表 硫酸塩還元細菌の属名と形状

属名	形状
<i>Desulfovibrio</i>	ビブリオ状
<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

両分離菌株の形態は、巻末に添付した電子顕微鏡写真から明確で、第4-26表に記したようにビブリオ状である。従って上述した情報から、両菌株は *Desulfovibrio* 属の一種である可能性が高いことが示唆される。*Desulfovibrio* の多くはMK-6を、*Desulfobulbus* はMK-5を、その他の属の大部分はMK-7を主に優占キノン分子種として有することが知られている (Collins and Widdel, 1986, Widdel, 1988) が、第4-26表のように両菌株の優占キノン種はMK-6であり、両菌株が *Desulfovibrio* 属であることを裏付けている。

(3) 種の同定

前項から両分離菌株が、*Desulfovibrio* 属の一種であることが示唆された。

第4-28表に両菌株の形態、生理学的試験等の結果と、*Desulfovibrio* に属する代表的な種について、Bergey's Manual 8th Edition (1974)、Postgate (1979) 及び Widdel (1988) の記述から引用したデータを併記し示した。第4-28表から明らかなように、両菌株は形態学的、生理学的及び遺伝学的にも *Desulfovibrio desulfuricans* であることが示唆された。

第4-28表 種の同定のための情報整理

	地下水 分離株	地表水 分離株	<i>Desulfovibrio</i> <i>desulfuricans</i>	<i>Desulfovibrio</i> <i>desulfuricans</i> subsp. <i>aestuarii</i>	<i>Desulfovibrio</i> <i>vulgaris</i>	<i>Desulfovibrio</i> <i>salalexigens</i>	<i>Desulfovibrio</i> <i>africanus</i>	<i>Desulfovibrio</i> <i>gigas</i>
形態	ビブリオ型	ビブリオ型	ビブリオ型	ビブリオ型	ビブリオ型	太いビブリオ型	シグモイド型	らせん型
幅(μm)	0.6	0.5	0.5~1	?	0.5~1	0.5~1	0.5	1.2~1.5
長さ(μm)	2~3	2~3	3~5	?	3~5	3~5	5~10	5~10
鞭毛	単極毛	単極毛	単極毛	単極毛	単極毛	単極毛	束毛	束毛
グラム染色	-	-	-	-	-	-	-	-
①基質資化性 (with sulfate)								
乳酸塩	+	+	+	+	+	+	+	+
リンゴ酸塩	+	+	+	+	-	+	+	-
ギ酸塩	+	+	±	?	±	±	±	±
酢酸塩	-	-	-	-	-	-	-	-
ブドウ糖	-	-	±	±	-	?	?	?
②基質資化性 (without sulfate)								
リンゴ酸塩	-	-	-	-	-	-	-	-
ビルビン酸塩	+	+	+	+	-	-	-	-
コリン	+	+	+	+	-	-	-	-
NaCl 要求性	-	-	-	+	-	+	-	-
優占キノ種	MK-6	MK-6	MK-6	?	MK-6	MK-6	MK-6	MK-6
G+C mole%	55.0	56.1	55.3±1	?	61.2±1	46.1±1	61.2±1	60.2

5. 考察

5.1 調査結果に関する考察

5.1.1 水質

(1) 地下水の水質組成

本調査地下水は、現場測定結果及び化学分析結果より弱アルカリ性 (pH9.1) で、溶存酸素がほとんど含まれていない極めて高い還元環境下の地下水であると考えられる。

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： Na_2CO_3 や K_2CO_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。

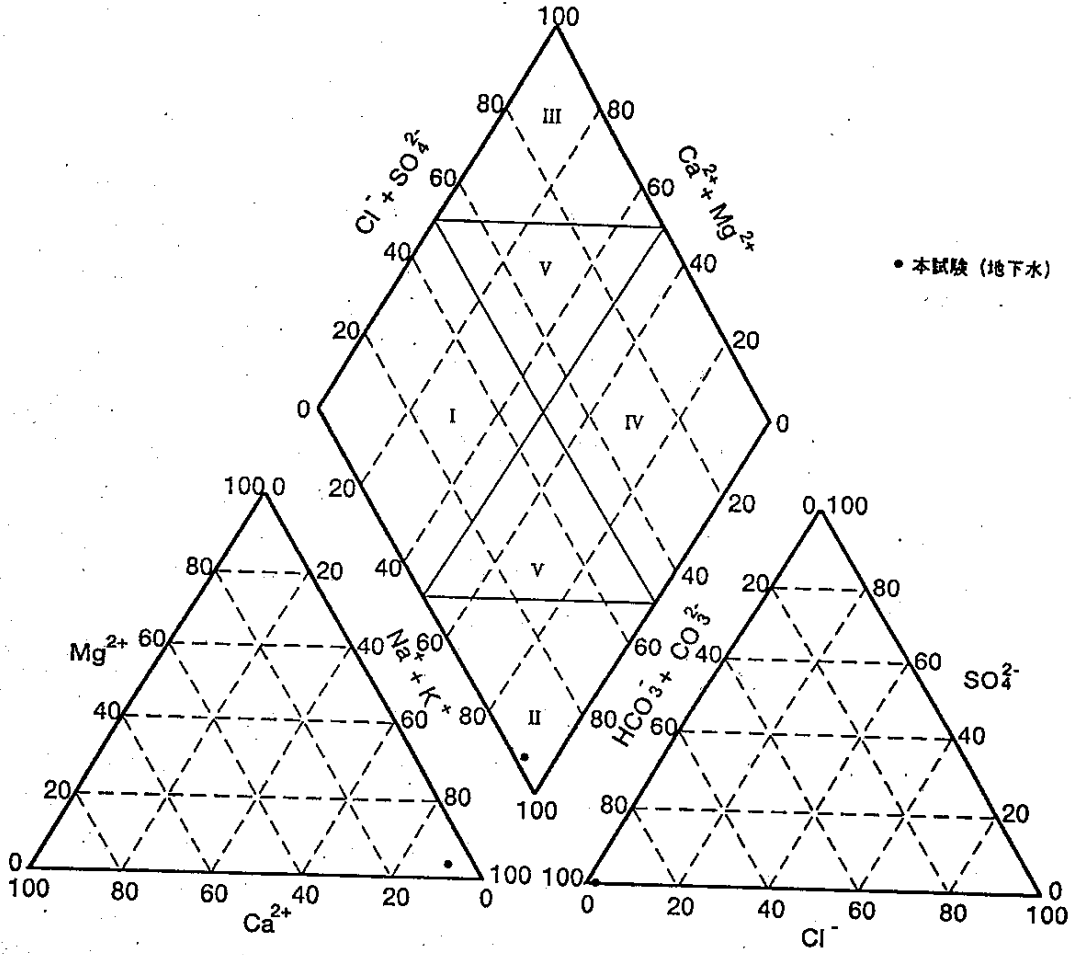
第5-1図から明らかなように、今回の地下水はⅡの領域となり、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム等の炭酸化学種で構成される被圧地下水と分類される。

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 Na^+ や K^+ が、アニオンとして HCO_3^- や CO_3^{2-} の含有量が多い地下水と理解できる。

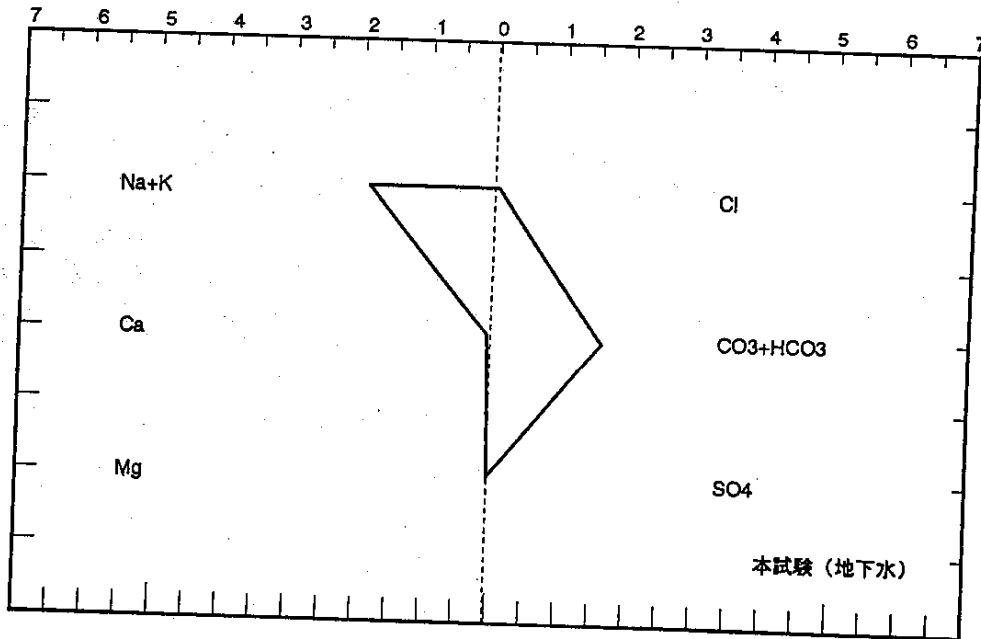
本調査地下水は、上記の結果より NaHCO_3 型の被圧地下水と考えられる。

本調査地下水の特徴として、F (フッ素) が高濃度 (3.7mg/ℓ) であった。一國ら (日本化学会編: 1992) の報告によると国内の深成岩-花崗岩中の地下水は、地表水の水質に比較してpH、アルカリ度の両者とも高く、イオン交換反応により、Na、Caが高く、K、Mgが少なくなっており、またFの含有量が多いことを指摘している。ホランドら (1979) によるとFの含有量が比較的高いと考えられる花崗岩地帯の地下水においても0.5mg/ℓ以下と報告されている。本調査で得られた値は、ホランドらによるものより約8倍高い値であった。また、瀬尾ら (1992) は東濃鉾山周辺の地下水について化学分析を行っており、それらのFの値は、土岐夾炭累層下部層の地下水のF含有量が上層の堆積層 (生俵累層、明世累層) より約5倍程度高い値であった。

また、Si (ケイ素) については、結晶質Siの飽和溶解度 (0.16mmol/ℓ) の約2倍 (0.26mmol/ℓ) 溶解しており、非結晶Siからの溶出があったものと推察される。



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

(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）。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ており、1993年現在ではほぼ天然レベルの5~10TRまで回復している。

今回の調査地点（KNA-2）の地下水は、0.3TR以下である。従って、核実験の影響の無い天然レベルの降水のTRを10と仮定すると本地下水の年代 t は次式より計算される。

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

$T_{1/2}$ = 12.43 (年) トリチウムの半減期

N_0 = 0.3以下 (TR) 本地下水のトリチウム濃度

N = 10 (TR) 天然レベルの降水のトリチウム濃度

上式より求めた地下水の年代は63年前となり、少なくとも1930年以前の地下水であると考えられる。（本調査付近の地表水のトリチウム濃度は 6.1 ± 0.2 TRであった。）

また、瀬尾ら（1992）は同じ地下水及び東濃鉾山周辺の地下水について ^{14}C による年代測定も併せて検討しており、東濃鉾山周辺の土岐夾炭累層下部層中の地下水の年代を13,000~15,000年としている（KNA-2は12,840年）。

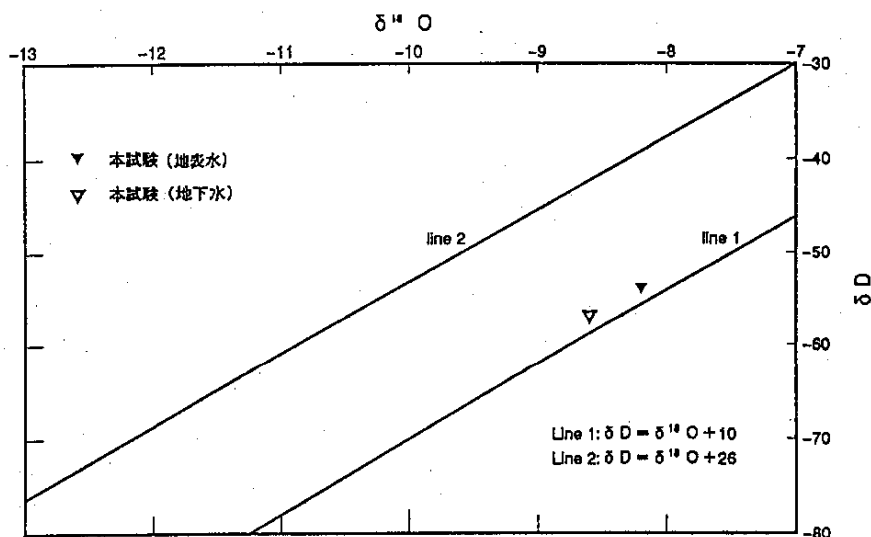
(3) 地下水の同位体比

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5-3図にプロットした。第5-3図の直線は各々以下の意味を表す。

line 1: $\delta D = 8 \delta^{18}O + 10$: 世界の天水の平均の δD と $\delta^{18}O$ の関係

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

図より本調査周辺の地下水及び地表水は、line1と2の間にプロットされる。これは地下水及び地表水が天水起源であることを示している。



第5-3図 天水の δD と $\delta^{18}O$ の関係
(松葉谷ら、1983)

5.1.2 バクテリアの存在性

アクリジンオレンジ染色ダイレクトカウントで計数した全菌数は、 1.6×10^5 cells/mlであった。本法で計数された全菌数は、生菌・死菌あるいは活性の有無に係わらず顕微鏡下で微生物の細胞と認識できる全てのものの総数である。別途、標準寒天培地を用いて混積平板培養で計数した一般細菌数は 3.0×10^0 CFU/mlであり、GAM寒天培地を用いて混積平板嫌気培養で計数した嫌気性菌数は不検出であった。

Karsten Pedersen (1989, 1990) が調査したスウェーデンの花崗岩層における地下水の全菌数は $0.75 \sim 17.5 \times 10^5$ cells/mlであり、Van EsとMayer Reil (1982) が文献で調査した海洋環境における全菌数は $0.1 \sim 264 \times 10^5$ cells/mlであった。今回調査した地下水は、これらと同程度の全菌数であり、微生物の存在性としては豊富と考えられる。しかし、一般細菌数と嫌気性菌数の値から推測すると、生菌はごく少数で、微生物活性は低いと考えられる。

ここで、今回計数した一般細菌数の考え方を上水試験法から抜粋すると次のようになる。

ここでいう一般細菌とは、標準寒天培地を用いて $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間培養したとき、培地に集落を形成するすべての細菌をいう。

本法は、高濃度の有機栄養物を含み、非選択性の標準寒天培地を用いて混積培養する方法である。一般細菌として検出される細菌の多くは、直接病原菌との関連はないが、一般細菌が多数検出される水は、糞便による病原菌に汚染されていることを疑わせるものである。地下水では一般細菌の急増は汚染を意味している。

上水試験法では、一般細菌を一般的な汚染指標、大腸菌群を糞便性汚染の指標として使用しているが、上記の如く、一般細菌は従属栄養細菌のうち、高濃度の有機栄養物及び温血動物の体温前後という条件下で比較的短時間に集落を形成する細菌のみを計数している。一方本調査が対象としているような地下水は、有機炭素濃度が数mg/lといった低有機栄養環境が想定される。この水環境を生息場所としている細菌は、それらの環境に適応して微量の有機物を利用できる能力を獲得している。これらの大部分は中温性のものが多く、また一般細菌試験で用いられる標準寒天培地のような高濃度の有機栄養を含む培地では増殖できないか、あるいは増殖できたとしても集落を形成するほどには増殖できないものが多い。このため、同じ組成の培地であっても栄養物濃度を低くしたり、培養温度を下げて長時間培養することにより、より多くの地下水中の生菌を検出できる可能性がある。同じ上水試験法を基準とするなら、「従属栄養細菌」と定義されている試験も今後検討することにより、より多くの情報を得ることができないだろうか。

次に上水試験法における従属栄養細菌の試験方法を参考に記す。

PGY寒天培地（桜井寒天培地）を用いて $20 \pm 1^\circ\text{C}$ で7日間培養する方法と、R2A寒天培地を用いて $20 \sim 28^\circ\text{C}$ で5~7日間培養する方法の2通りがある。PGY寒天培地は、標準寒天培地と同じ有機成分を低濃度に含むものである。一方R2A寒天培地は、PGY寒天培地の有機栄養成分にカザミノ酸、溶性デンプン、ピルビン酸ナトリウムを加えて、広範な微生物の栄養要求性を満たすとともに、その濃度をPGY寒天培地よりも更に低くして、低栄養性細菌の検出能力を高めたものである。各々の培地組成を、第5-1表と第5-2表に示す。

無機栄養細菌の生菌数は、鉄酸化細菌 (*Thiobacillus ferrooxidans*)、亜硝酸細菌、硝酸細菌で検討されているので、これらの培地を利用して、好気的あるいは嫌氣的に培養し、各々好気性従属栄養細菌数及び嫌気性従属栄養細菌数として計数することにより、有機栄養性細菌のデータが一層充実すると考える。ただし、通性嫌気性細菌は、好気・嫌気の両条件で生育するので、好気性菌と嫌気性菌の数値の取扱いには注意を要する。

第5-1表 PGY寒天培地 (従属栄養細菌数計数用培地)

ペプトン	2	g
粉末酵母エキス	1	g
ブドウ糖	0.5	g
粉末寒天	15	g
/イオン交換水	1000	ml
pH (滅菌後)	7.0±0.1	

第5-2表 R2A寒天培地 (従属栄養細菌数計数用培地)

粉末酵母エキス	0.5	g
プロトスプロプトンNo.3 or ホリハプトン	0.5	g
カザミノ酸	0.5	g
ブドウ糖	0.5	g
溶性デンプン	0.5	g
リン酸一水素カリウム	0.3	g
硫酸マグネシウム(7水塩)	0.05	g
ピリドン酸ナトリウム	0.3	g
/イオン交換水	1000	ml
pH	7.2±0.1	

pHの調整は、固形のリン酸一水素カリウムまたはリン酸二水素カリウムを用いる。
 以上に粉末寒天15gを加熱溶解し、高圧蒸気滅菌して使用する。

特定細菌の培養計数では、硫酸塩還元細菌のみが 5.0×10^{-1} MPN/mlと計数され、その存在が確認できた。

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1989) では、*Thiobacillus*属として13種が掲載され、各々の生育温度とpHの範囲は第5-3表のようになっている。

第5-3表 *Thiobacillus*属の生育温度とpHの範囲

<i>Thiobacillus</i> species	Optimum temperature (°C)	Growth temperature (°C)	Optimum pH	Growth at		
				pH3.0	pH5.0	pH8.0
<i>T. thioparus</i>	28	-	6.6-7.2	-	(+)	+
<i>T. neapolitanus</i>	28-32	8-39	6.5-6.9	-	(+)	+
<i>T. tepidarius</i>	43-45	20-52	6.8-7.5	-	-	+
<i>T. denitrificans</i>	28-32	-	6.8-7.4	-	-	+
<i>T. novellus</i>	25-30	10-37	7.0	-	-	+
<i>T. versutus</i>	30-35	17-40	7.5-7.9	-	-	+
<i>T. intermedius</i>	30-35	15-37	5.5-6.0	(+)	+	-
<i>T. perometabolis</i>	35-37	15-42	5.5-6.0	-	+	-
<i>T. delicatus</i>	30-35	15-42	5.5-6.0	-	+	-
<i>T. ferrooxidans</i>	30-35	10-37	about 2.5	+	+	-
<i>T. thiooxidans</i>	28-30	10-37	2.0-3.0	+	+	-
<i>T. albertis</i>	28-30	-	3.5-4.0	+	+	-
<i>T. acidophilus</i>	27-30	<25-37	2.5-3.0	+	+	-

今回の調査では選択性のある改変9K培地を利用して*T. ferrooxidans* (鉄酸化細菌) を計数したが、不検出であった。一方、地下水の水温とpHは各々18.3°Cと9.1であった。上表より明らかなようにpHがこの細菌の生育範囲と大きく異なっており、これがこの環境における制限因子になっていると考えられる。

そのほかメタン生成細菌、亜硝酸細菌、硝酸細菌、脱窒細菌を培養計数したが、いずれも不検出であった。嫌気度、栄養条件などが制限因子になっていると考えられる。

5.2 他鉱山調査データとの比較

5.2.1 水質

(1) 地下水の水質組成の比較

本調査地下水の値と、以前調査したY鉱山とS鉱山の地下水の値（地下深部におけるバクテリアの存在調査研究 PNC ZJ 4401 90-001）とを比較検討した。

それぞれの調査地域の地質及び採水深度は、以下の通りである。

- ・本調査地下水周辺（岐阜県）：堆積岩（瑞浪層群）+花崗岩（土岐花崗岩）（約120m）
- ・Y鉱山地下水周辺（岡山県）：輝緑岩（E（約370m））、石英閃緑岩（F（約390m））
- ・S鉱山地下水周辺（秋田県）：石英安山岩+凝灰岩（K（約550m））、石英安山岩（L（約550m））

本調査地下水は試錐孔の採水場所にダブルパッカーを施し採水場所を限定しているが、Y鉱山、S鉱山の地下水は、試錐孔からの湧水（Y鉱山E及びS鉱山K）又は、坑道内の壁（岩盤）等からの自然湧水（Y鉱山F及びS鉱山L）であり、それぞれの採水状況は異なる。また、本調査地域はウラン鉱山の調査坑道であり、Y鉱山は硫化鉄鉱山の採掘坑道、S鉱山は黒鉱山の調査坑道として掘られたものである。

これら地下水の主要な水質組成の比較を行うこととし、トリリニアダイアグラム（第5-4図）及びヘキサダイアグラム（第5-5図）にプロットした。それぞれの結果を①、②に示す。

① トリリニアダイアグラムによる比較

- 本調査地下水：領域Ⅱ
- Y鉱山地下水（E, F）：領域Ⅳ
- S鉱山地下水（K, L）：領域Ⅳ

② ヘキサダイアグラムによる比較

- 本調査地下水：Na-HCO₃型
- Y鉱山地下水：Na-Cl型（E）及びNa-Cl・SO₄型（F）
- S鉱山地下水：Na・Ca-Cl・SO₄型（K, L）

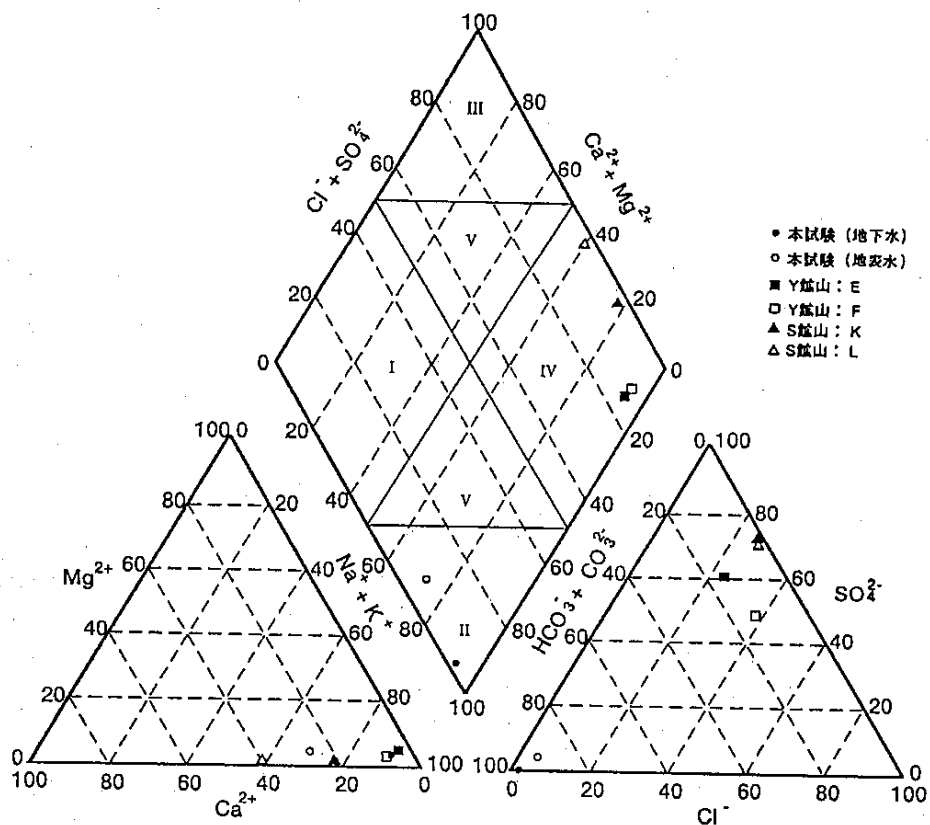
①、②より以下のことが言える。

- (1) トリリニアダイアグラムより、Y鉱山とS鉱山は、本調査地下水とは分類が異なる地下水である。
- (2) Y鉱山とS鉱山は領域Ⅳに属し、塩化物及び硫酸塩が主体である。
- (3) ヘキサダイアグラムより、Y鉱山とS鉱山は、イオン濃度に大きな差は見られるが、ほぼ同じタイプの地下水であると考えられる。

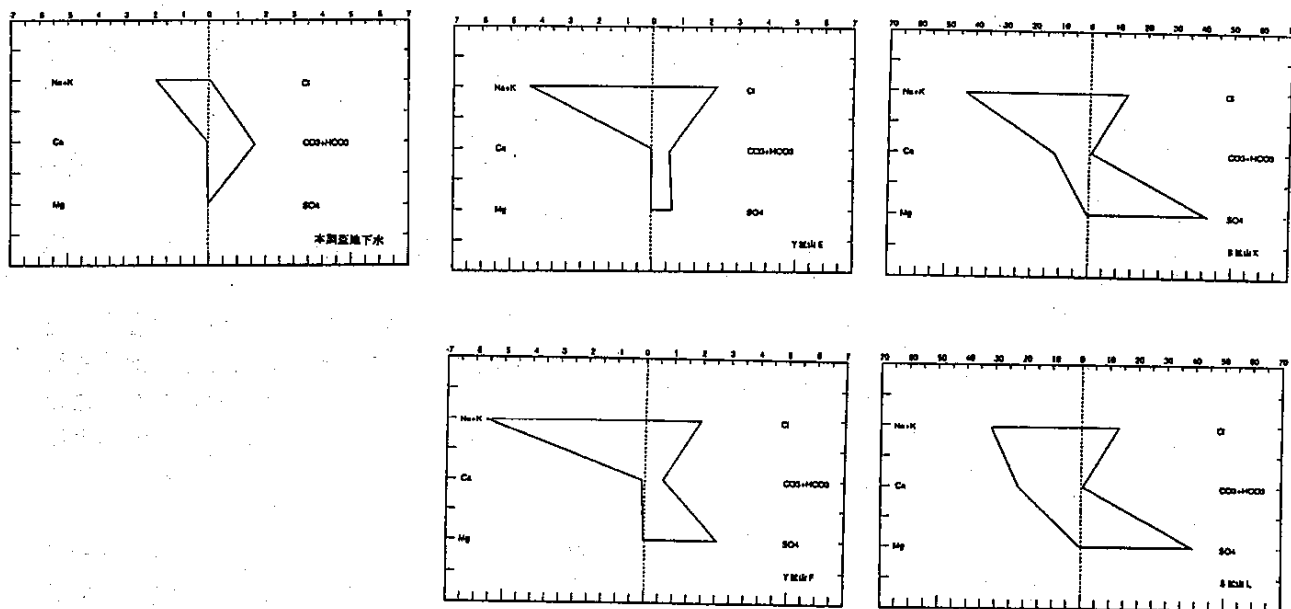
本調査地下水は、今までの調査により調査地域の地下水の水質進化が最も進んだ場合に見られるNa-HCO₃型であることが報告されている（水谷ら、1992）。

一般的に塩化物及び硫酸塩の濃度が高い地下水は、海水の混入あるいは化石塩水の混入した地下水と言われているが、Y鉱山、S鉱山の地下水は、硫化鉱物を産する金属鉱山もしくは、それに近い場所からの地下水であることを考慮すると、鉱床の影響を受けた地下水（鉱水）の混入によって形成されたとも考えられる。また、S鉱山については、水温が約40～50℃と高く、温度効果により地下水と岩石の反応がより促進され、岩石からのイオンの溶出量が増加したと考えられる。

上記のように、地下水の水質は胚胎している地層及び地下水の流速、温度等に大きく支配され形成されるため付近の地質学的特徴を反映する。また、これらの化学的及び物理的要因の他に生物学的作用も生じ、これら水質を決定する因子はそれぞれ独立に成り立っている訳ではなく密接に関連しているため地下水の水質はそれぞれ多彩な形をとることになる。



第5-4図 地下水のトリリニアダイアグラム



第5-5図 地下水のヘキサダイアグラム

(2) 地下水の年代の比較

それぞれの地下水中のトリチウム濃度の結果を以下に示す。

本調査地下水：0 (瀬尾ら, 1992)

Y 鉱山地下水：E ; <0.3, F ; <0.39±0.1

S 鉱山地下水：K, L ; <0.3

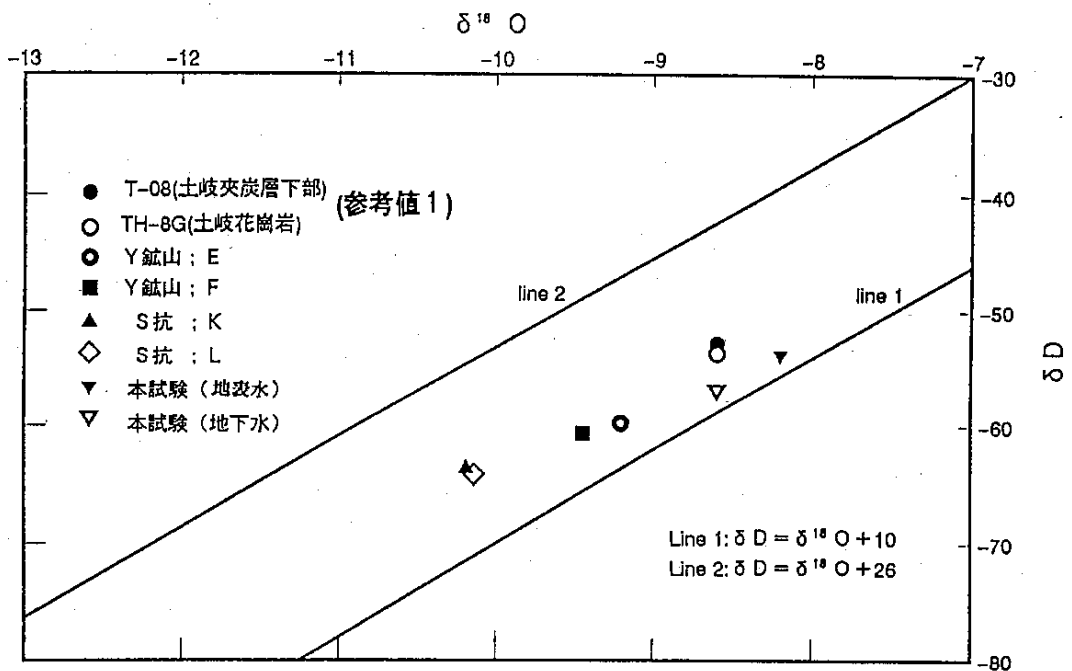
それぞれの地下水はトリチウム濃度が1~3T. U. 以下であるため、これらは、1953年以前の降水によって涵養されていると考えられる。

(3) 地下水の同位体比の比較

それぞれの地下水中の δD 、 $\delta^{18}O$ の値を第5-6図に示す。

第5-6図より以下のことが言える。

- (1) それぞれは、line1と2の間にあることから天水起源の地下水であると考えられる。
- (2) 採水された場所毎にそれぞれ近い値を示しており、それぞれの場所に於いて降水の起源又は地下水の起源として、近いもしくは似た環境によって形成された地下水と考えられる。



参考値 1 : 水谷ら, 1992

第5-6図 天水の δD と $\delta^{18}O$ の関係
(松葉谷ら, 1983)

5.2.2 バクテリアの存在性

過去、Y鉱山、S坑及びH鉱山M坑の各々の坑内で、自噴している地下水を採取し、硫酸塩還元細菌と鉄酸化細菌 (*Thiobacillus ferrooxidans*) が存在することを培養により確認している (PNC ZJ 4401 90-001, 1991)。その調査データと今回のものを併記して第5-4表に示す。

第5-4表 他鉱山におけるバクテリア調査データとの比較

調査場所	pH	Eh (mV)	水温℃	硫酸塩還元細菌 [主な制限因子]	鉄酸化細菌 (<i>T. ferrooxidans</i>)	
Y 鉱山	A地点	9.2	208	30.7	-	-
	B地点	9.3	176	32.0	-	-
	C地点	9.2	196	27.3	-	-
	D地点	8.6	332	26.2	+	-
	E地点	9.1	157	33.6	- [電子供与体の欠乏]	-
	F地点	9.1	161	21.4	- [電子供与体の欠乏]	-
	G地点	9.2	159	32.5	-	-
	H地点	2.0	652	21.0	-	+
S 坑	K地点	7.5	342	46.8	- [温度]	-
	L地点	7.3	361	33.6	+	-
	M地点	7.5	365	43.4	-	-
H 鉱山 M 坑	O地点	7.3	373	40.0	-	-
	P地点	7.1	375	28.7	+	-
	Q地点	6.9	325	29.3	+	-
this study	9.1	32	18.3	+	-	

+: 検出, 硫酸塩還元細菌はPostgate改変培地にてコロニー形成
*T. ferrooxidans*は9K培地にてコロニー形成

-: 不検出

鉄酸化細菌 (*T. ferrooxidans*) の存在が確認されたのはY鉱山H地点のみである。前項の第5-3表より明らかなように、その他の地下水では特にpHがこの細菌の生息環境と大きく異なっており、これがこの細菌の存在に関する制限因子になっていると考えられる。

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、エネルギー源と炭素源及び電子受容体 (硫酸塩) の存在などが挙げられる (竹内準一, 1989)。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-}) の順に強いとされている (Nedwell D.B. and Adram J.W., 1979)。Alexander J.B. Zehnder (1988) は硫酸塩還元細菌の種毎の最適生育温度を整理しているので第5-

5表に示す。また第5-4表の調査場所のうち、Y鉱山のEとF地点及びS坑のKとL地点で採取された地下水は、同時に化学分析も実施されているので、それを抜粋して第5-6表に示す。

第5-5表 硫酸還元細菌の最適生育温度

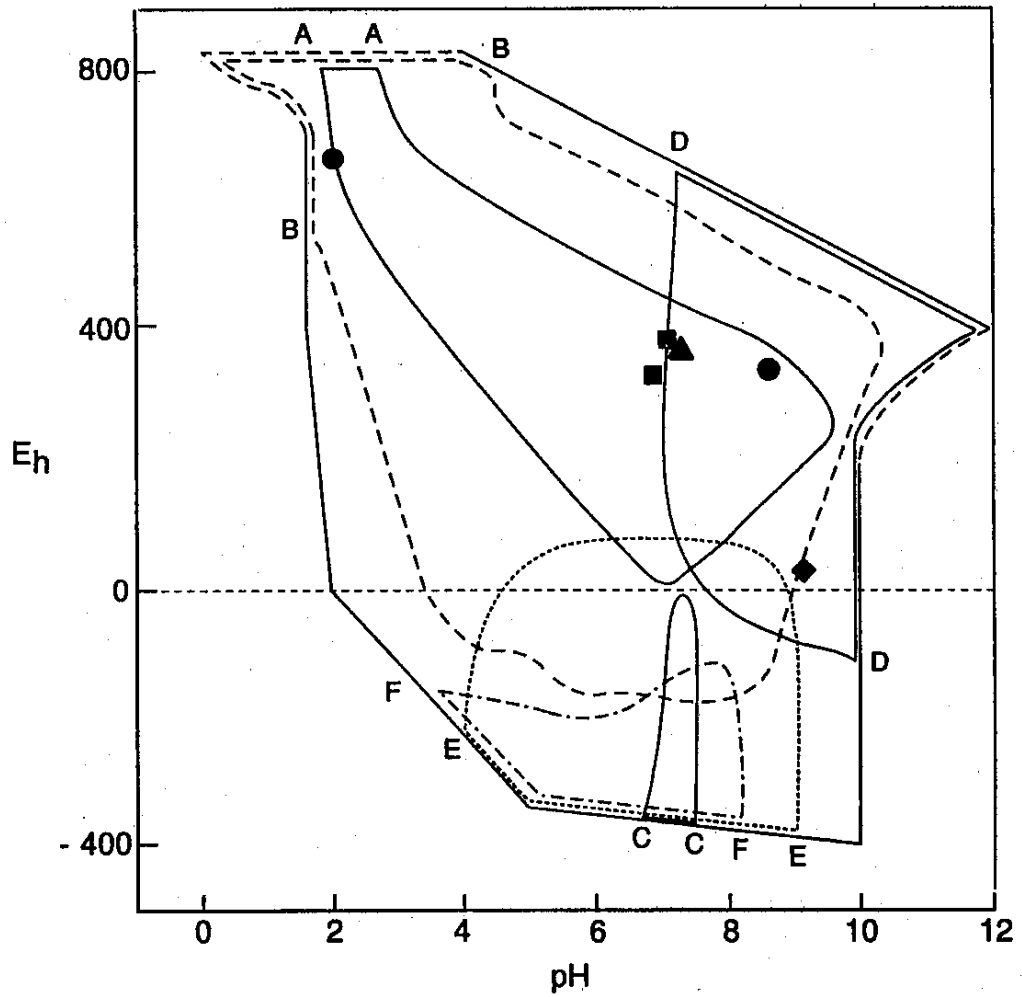
Species	Optimum Temperature (°C)
<i>Desulfotomaculum</i>	
<i>nigrificans</i>	55
<i>orientis</i>	37
<i>ruminis</i>	37
<i>antarcticum</i>	20-30
<i>acetoxidans</i>	35
<i>guttoideum</i>	31
<i>sapomandens</i>	38
<i>Desulfovibrio</i>	
<i>desulfuricans</i>	30-36
<i>vulgaris</i>	30-36
<i>gigas</i>	30-36
<i>africanus</i>	30-36
<i>salexigens</i>	30-36
<i>baculatus</i>	28-37
<i>sulfodismutans</i>	30-35
<i>thermophilus</i>	65
<i>sapovorans</i>	34
<i>baarsii</i>	35-39
<i>Desulfomonas</i>	
<i>pigra</i>	37
<i>Thermodesulfobacterium</i>	
<i>commune</i>	70
<i>Desulfobulbus</i>	
<i>propionicus</i>	28-39
<i>elongatus</i>	35
<i>Desulfobacter</i>	
<i>postgatei</i>	28-32
<i>hydrogenophilus</i>	28-32
<i>latus</i>	28-32
<i>curvatus</i>	28-30
<i>Desulfococcus</i>	
<i>multivorans</i>	35
<i>niacini</i>	29
<i>Desulfosarcina</i>	
<i>variabilis</i>	33
<i>Desulfobacterium</i>	
<i>autotrophicum</i>	20-26
<i>vacuolatum</i>	25-30
<i>phenolicum</i>	28
<i>indolicum</i>	28
<i>catecholicum</i>	28
<i>Desulfonema</i>	
<i>limicola</i>	30
<i>magnum</i>	32

第5-6表 他鉱山における化学分析結果との比較

調査場所		水温 (°C)	TOC (mg/l)	SO ₄ ²⁻ (mg/l)	硫酸塩還元細菌
Y 鉱山	E 地点	33.6	<0.1	39	-
	F 地点	21.4	<0.1	120	-
S 坑	K 地点	46.8	0.4	2000	-
	L 地点	33.6	0.7	1900	+
this study		18.3	0.19	N. D.	+

第5-5表より、硫酸塩還元細菌の多くは、その最適生育温度を30°C付近とし、50°C以上とするものは *Desulfotomaculum nigrificans* など3種に過ぎないことが分かる。S坑K地点における地下水では温度がこの細菌の制限因子として示唆される。また第5-6表より、Y鉱山EとF地点における地下水ではTOCが低く、電子供与体の欠乏が制限因子として示唆される。

Zajic (1969) が示した微生物生育のためのEhとpHの範囲に、第5-4表で硫酸塩還元細菌と鉄酸化細菌の存在が確認されたものをプロットし、第5-7図に示した。この図で、特に過去のデータの硫酸塩還元細菌において、Ehの範囲が上にずれたものになった。この原因として、調査場所における測定方法が挙げられる。各地下水は坑内で自噴していたものであったが、その多くが天盤や側壁を湧水点としていた。このため、試料を不活性ガスが流送された簡易グローブバッグ内に導入することが困難で、滴下する地下水を直接容器にうけ、測定せざるを得なかった。一方、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の報告もある(竹内準一, 1989)。自然界では好気性細菌との共存、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も考えられるので、酸化還元電位が高いという理由で、この細菌の存在を否定することはできない。



第5-7図 微生物生育のためのEhとpHの範囲

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

- Y 鉱山 (硫酸塩還元細菌と *T. ferrooxidans* を検出)
- ▲ S 坑 (硫酸塩還元細菌を検出)
- H 鉱山M 坑 (硫酸塩還元細菌を検出)
- ◆ this study (硫酸塩還元細菌を検出)

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 : 瀬沼と水月湖の湖水中における硫酸還元菌の分布, *用水と廃水*, 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)
- 須藤隆一編 : 環境微生物実験法, p.175-176, 講談社, (1989)
- 土壤微生物研究会編 : 土壤微生物実験法, p.221, 養賢堂, (1992)
- 厚生省生活衛生局水道環境部監修 : 上水試験方法, 日本水道協会, (1993)
- 通商産業省立地公害局監修 : 新訂・公害防止の技術と法規 [水質編], p.29, 産業公害防止協会, (1980)
- 日本薬学会編 : 衛生試験法・注解, 金原出版, (1990)
- Bible and Pfening : Srarr M. P., Stolp H., Truper H. G., Balows A. and Schligel H. G. (eds.), *The prokaryotes : A handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*, Vol.1, Springer-Verlag, 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)
- Hiraishi A. : Respiratory Quinone Profiles as Tools for Identifying Different Bacterial Populations in Activated Sludge, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 34, p.39-56, (1988)

- Dudley D. J., Guentzel M. N., Ibarra M. J., Moore B. E. and Sagik B. P. : Enumeration of Potentially Pathogenic Bacteria from Sewage Sludges, *Appl. Environ. Microbiol.*, 39, p.118-125, (1980)
- 平石 明：キノブ・ロフィル法による活性汚泥細菌の生態学的研究，用水と廃水，Vol. 32, p.13-24, (1990)
- 駒形和夫：微生物の分類と同定<下>—DNAの塩基組成および細菌体脂肪酸の測定—，長谷川武治編，p.181-194, 学会出版センター，(1985)
- 金子太吉：微生物の化学分類実験法—核酸—，駒形和夫編，p.227-239, 学会出版センター，(1985)
- Friedrich Widdel : Microbiology and Ecology of Sulfate- and Sulfur-Reducing Bacteria, Edited by Alexander J. B. Zehnder, *Biology of Anaerobic Microorganisms*, p.469-585, (1988)
- Collins M. D. and Wideel F. : Respiratory Quinones of Sulphate-Reducing and Sulphur-Reducing Bacteria (A Systematic Investigation) , *Syst. Appl. Microbiol.*, 8, p.8-16, (1986)
- 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)
- 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)
- 一國雅巳：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)
- H. D. ホランド著 山県登訳：大気・河川・海洋の化学，p.30-32, 産業図書株式会社，(1979)
- 水谷義彦，瀬尾俊弘，太田久仁雄，中井伸之，村井康浩：岐阜県東濃鉱山深層地下水の ^{14}C 年代，「加速器質量分析と炭素同位体の学際的応用」シンポジウム論文集，P.159-168, (1992)
- 瀬尾俊弘，水谷義彦，太田久仁雄：岐阜県東濃地域における地下水の ^{14}C 年代と起源について，日本原子力学会，1992年秋の年会
- 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)
- PNC ZJ 4401 90-001：地下深部におけるバクテリアの存在調査研究，同和工営株式会社，(1991)

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)

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)

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

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 3, p. 1842-1857, Williams & Wilkins, (1989)

Alexander J.B. Zehnder (edited) : *Biology of Anaerobic Microorganisms*, p. 477-481, John Wiley & Sons, Inc., (1988)

写 真 集



写真1 地下水採取状況



写真2 地表水採取状況

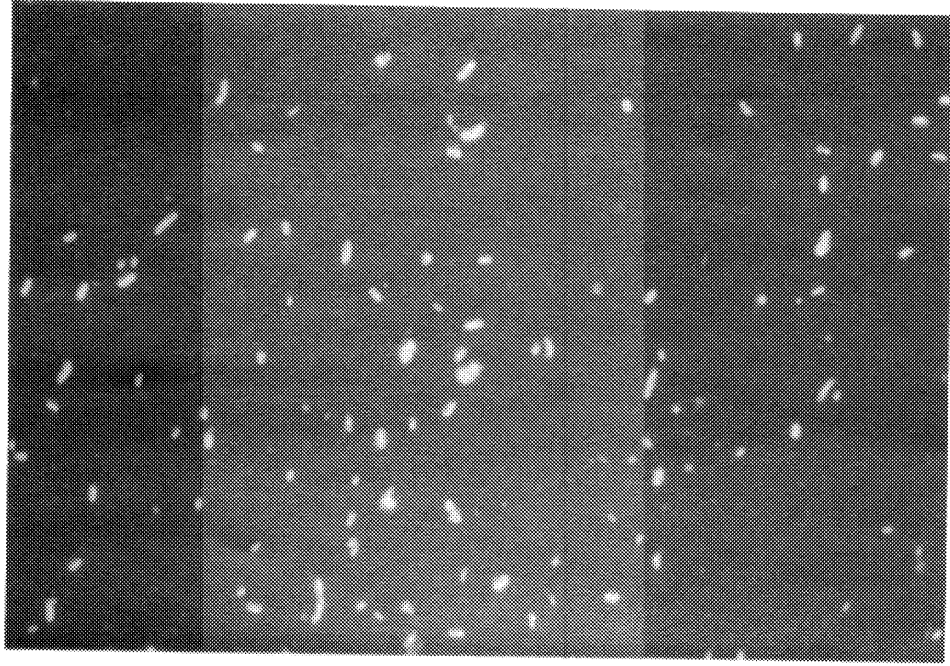


写真3 地下水試料の全菌数計数（アクリジンオレンジ染色した細菌細胞）

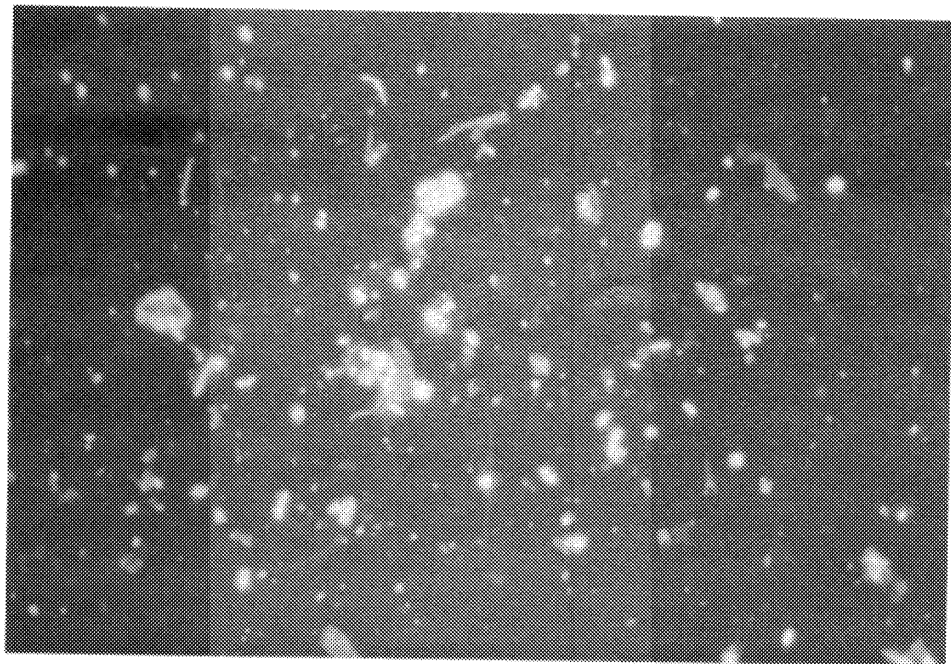


写真4 地表水試料の全菌数計数（アクリジンオレンジ染色した細菌細胞）

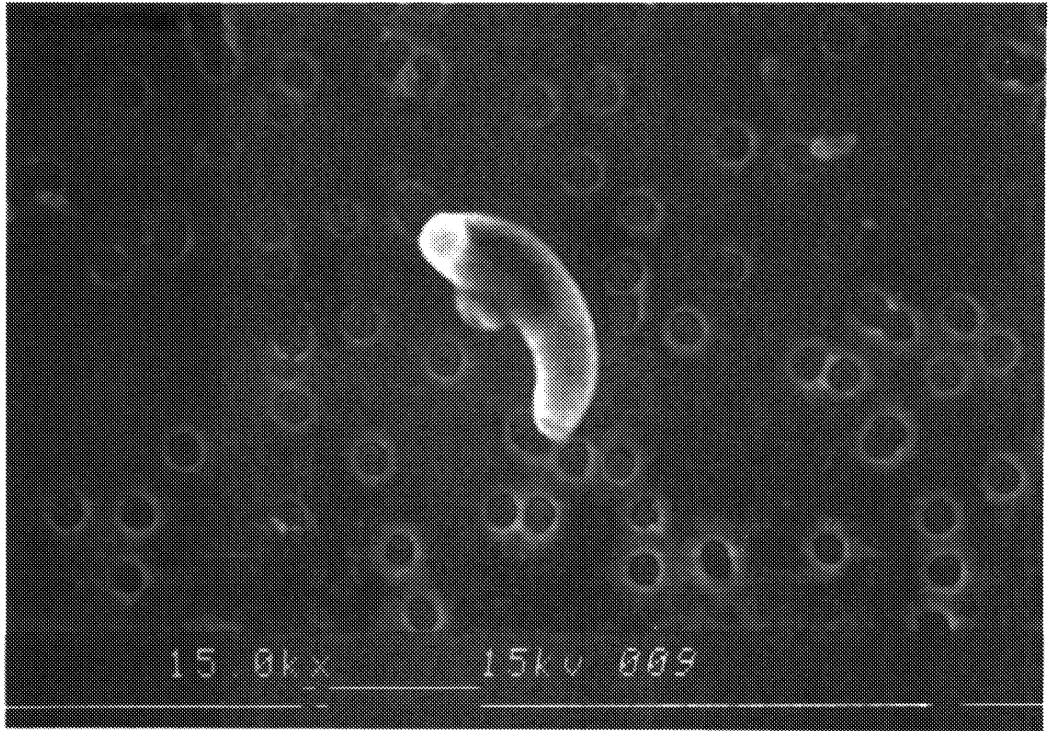


写真5 地下水試料から分離された硫酸塩還元細菌
の走査型電子顕微鏡写真 (×15,000)

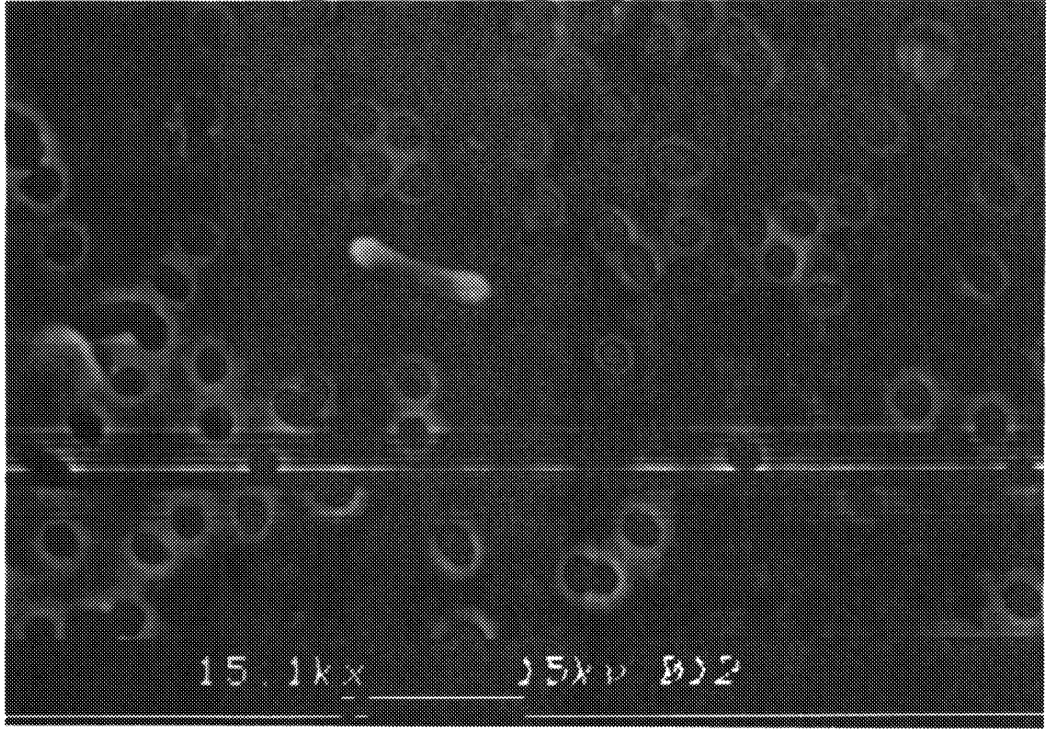


写真6 地表水試料から分離された硫酸塩還元細菌
の走査型電子顕微鏡写真 (×15,000)