地下水硝酸汚染研究における最新のトレンドと今後の方向性： 熊本地域の事例を通して*

細野高啓**・林 殷田***・アルバレス・ケリー**・森村 茂***・
曾 祥勇***・森 康二****・田原康博****・松永 緑****・
ホセイン・シャハダット***・嶋田 純***

Research trend and direction for groundwater nitrate pollution study: an insight from Kumamoto area*

Takahiro HOSONO**, In-Tian LIN***, Kelly ALVAREZ**, Shigeru MORIMURA***,
Xiang-Yong ZENG***, Koji MORI****, Yasuhiro TAWARA****,
Midori MATSUNAGA***, Shahadat HOSSAIN*** and Jun SHIMADA***

要 旨

熊本地域における地下水硝酸性窒素の由来ならびに帯水層中での硝酸イオンの振る舞いについて、最新の研究を通して明らかになってきた成果を解説する。特に、最新の同位体トレーサー法を駆使して解明されてきた、帯水層中における硝酸汚染の自然浄化機能として重要な脱窒現象の実態について解説する。合わせて、現在進行中の微生物培養実験、菌叢解析、不飽和帯土壌解析、地下水シミュレーションを応用した研究の進捗についても紹介する。地域地下水における硝酸汚染への対策に臨むに当たり、多角面からの解析結果を統合してその動態を理解することが望ましく、こうした概念が将来の研究に浸透していくことが期待される。

キーワード：熊本、地下水、硝酸性窒素、安定同位体比、脱窒、菌叢解析、シミュレーション

1. はじめに

地下水硝酸汚染は世界で最も広範かつ深刻な地下水環境問題の一つである。一度汚染が確認され

た地下水に対し、それ以上問題が深刻化しないための手段として、地表における窒素負荷量を削減するといった努力が20世紀後半から我が国でも地域の自治体を通して試されてきた。しかし、その

* 日本地下水学会2014年秋季講演会公開シンポジウムにて発表（2014年11月7日）

** 熊本大学大学院先端機構（〒860-8555 熊本県熊本市中央区黒髪2-39-1）

Priority Organization for Innovation and Excellence, Kumamoto University

*** 熊本大学自然科学研究科

Graduate School of Science and Technology, Kumamoto University

**** 株式会社地圏環境テクノロジー

Geosphere Environmental Technology Corp.

後のモニタリングにおいて、現地点までに明瞭な効果が確認できないケースも多く存在し、このことは、地下水は一旦汚染が顕在化してしまうと数年から10数年程度のスパンで早期回復することは困難を伴うことを示唆している。脱窒素の設置等、局所的には対策を講じることはできるが、広域水循環スケールでは範囲が広くその網羅的な適応が現実的でない現状において、より現実を直視した対策に関する更なるアイデアが必要とされている(田瀬, 2014a)。そもそも、涵養された地下水が不飽和帯を浸透して飽和帯水層へと至るまでに、場所によって数年から数十年以上の時間がかかることに鑑みると、地下水汚染が顕在化した時には既にその上部の不飽和帯や土壤中に窒素成分が蓄積してしまっており、今後も時間遅れを伴って汚染が進行するケースは十分予想されることである(田瀬, 2014b)。したがって、蓄積している窒素成分がどれくらいの量で、またどのくらいの時間差で帯水層へと到達するかを見定めることが一つの課題であろう。この問題の解決に向けては本論説の後半でご紹介する。

一方、帯水層中には汚染されていない地下水と混ざり合うことによる希釈や、帯水層中で硝酸塩呼吸することにより生きている微生物活動のような、いわゆる自然プロセスを通して、一旦汚染してしまった地下水が時間や流れと共に浄化していく能力を備えていることも事実である。したがって、地域が持つ硝酸汚染に対するバッファ能力を正しく理解した上で、既に進行している汚染の動向を地下水流れに沿って予測するアプローチは、地下水資源の持続的管理を模索する重要な方向性と考えられる(田瀬, 2006)。さて、帯水層において微生物による硝酸汚染浄化機能、いわゆる脱窒現象は古くから知られていた現象である。しかし、熊本地域のような広域的な循環系地下水に対し、涵養域から流出域にかけて、窒素の由来や硝酸の挙動を科学的に詳細に明らかにした研究例は実はあまりない。その理由として、調査地域が単に広いということだけでなく、窒素起源同定や脱窒有無判定のトレーサーツールとして欠かさない硝酸性窒素ならびに硝酸性酸素の安定同位体測定が、かつては低濃度硝酸試料に対して困難であった点が挙げられる。

近年、分析法の改良や新たな方法論の構築により、循環系地下水に対する窒素の由来や硝酸の挙動について、その詳細が明らかにされつつある。なお、本文中で述べる「硝酸」とは硝酸イオン(NO_3^-)のことを指す。本論説の前半では、この種の研究では世界的にもモデル研究となった熊本地域における実例と、研究を通して提案がなされた種々の安定同位体を用いた新たな方法論について整理してみる。またこれに続き、遺伝子解析技術を用いた微生物相解析の取り組みについてもご紹介する。先にも述べたが、最終的には帯水層が持つ汚染バッファ能力の分布や効力を実測や化学分析を通して科学的に理解した上で、かつ、地域の水文地質学的特徴や窒素負荷現状を踏まえ、窒素や硝酸の挙動を予測することが今後、問題への対策を講じる鍵となる。本特集でも多く取り上げられているように、その有効な方法の一つとして、地下水流動シミュレーションをベースとした硝酸挙動モデルの構築に期待が寄せられている。モデルの構築には、本論説で登場する様々なアプローチを駆使して、現実場における可能な限り詳細な実態把握を行うことが重要となる。この点について、最後に展望と注意点を述べる。

2. 同位体的手法により明らかとなってきた窒素の起源と硝酸の挙動

(1) 安定同位体分析技術の向上

周知の通り、脱窒とは硝酸のような窒素化合物が分子状窒素として大気中へ放散される作用または工程のことを指し(Knowles, 1982)、以下のような正味の反応式で表わされる：

嫌気性アンモニア酸化細菌によるいわゆるアナモックス反応(Strous and Jetten, 2004)を除き、脱窒には有機物を電子供与体及び炭素源として用いる従属栄養脱窒と、無機物を電子供与体かつ二酸化炭素を炭素源に用いる独立栄養脱窒の、主に二つの異なるプロセスが存在する(Korom, 1992; Rivett et al., 2008)。各脱窒反応にはそれぞれ異なる代謝プロセスを持つ微生物種が関与し、例えば

脱窒菌（通気性細菌として自然界に一般に存在するタイプ）による前者の脱窒反応は下記の式で表される：

一方、後者の脱窒において、電子供与体となる無機物質としては Fe^{2+} や、特に帯水層環境では黄鉄鉱に代表される硫化物が一般的である (Korom, 1992; Ottley et al., 1997)。帯水層中で一般に報告されている硫黄酸化脱窒菌による脱窒反応は例えば下記のように表される：

硝酸性窒素の安定同位体比 ($\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$) は目に見えない汚染の由来を特定するトレーサーとして、また、脱窒の有無やその程度を測り知る有効なツールとして古くから (1970年代から) 応用されてきた (Kreitler, 1979; Kaplan and Magaritz, 1986; Mariotti et al., 1988; Smith et al., 1991)。1990年代に入ると、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ のみならず硝酸中の酸素安定同位体比 ($\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$) も同時に扱うトレーサー手法が提案されるようになる (Böttcher et al., 1990; Wassenaar, 1995; Aravena and Robertson, 1998; Fukada et al., 2003)。ここでは $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ と $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$ の双方を持ち合わせた方法のことを、便宜上“硝酸同位体トレーサー法”と呼ぶことにする。一般的な原理として、起源物質が持つ同位体組成的特徴と問題としている地下水の硝酸同位体比を比較することで、汚染の起源推定を可能にし、なおかつ、脱窒時に同位体分別が起こる特性を生かし、帯水層における脱窒有無の判断を行う方法のことを指す (Kendall, 1998)。

2000年に入り、新しい硝酸同位体比測定方法である脱窒菌法が開発されたことで (Sigman et al., 2001; Casciotti et al., 2002)、非常に低い硝酸濃度の地下水 ($\sim 0.5 \text{ mg/L}$ 程度) についても $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ と $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$ が同時にかつ迅速に測定できるようになった。従来の濃縮法では、例えば硝酸濃度が 0.5 mg/L 程度の地下水試料の $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ を測定する

場合、 10 L 程度の水を濃縮しなければならず、脱窒菌法に要する試料量 (10 ml もあれば十分) に比べると膨大で、かつ、濃縮時に起こる同位体比の変化が懸念されていた (大和田ほか, 2004)。本方法による測定データを用いた場合、例えば数%の同位体組成の違いが起源判定を左右する状況下では、起源判別はしばしばシビアとなる。脱窒菌法の開発により、従来では困難であった脱窒の影響を受けた低濃度試料についても迅速かつ正確な同位体分析が可能となり (Umezawa et al., 2008; Otero et al., 2009; Hosono et al., 2011a)、後に紹介する熊本地域でも同方法を適応することで、これまでにない詳細な研究が実行に移された (Hosono et al., 2013)。

Sigman et al. (2001) や Casciotti et al. (2002) による脱窒菌法開発から10年以上が経過し、分析方法の改良も進んでいる。そもそも、分析機器が持つ制約として、ターゲットとしている窒素酸化物の窒素と酸素の同位体比を安定同位体質量分析装置で測定する際、これらを亜酸化窒素 (N_2O) ガス体に変化させる必要がある。実は、これまで紹介してきた脱窒菌法は、試料中の硝酸イオン (NO_3^-) のみならず、亜硝酸イオン (NO_2^-) についても同時に N_2O 化してしまうため、同位体測定値について NO_2^- が含まれている場合、その影響を除去できないという問題をはらんでいた。実際には、多くの場合地下水中に存在する NO_2^- は微量で、汎用濃度測定機器であるイオンクロマトグラフによる分析では殆ど検出限界以下であるため、この影響は考慮しなくても良い場合も多いが、当然その確認は必要である。特に脱窒域では NO_3^- 濃度が低いいため、 NO_2^- が含まれている場合、相対的にその影響は大きくなってしまうので、脱窒現象のより詳細を議論する上でこの問題は軽視できない。

近年、この影響を防ぐため試料中の NO_3^- だけをターゲットとしてその硝酸同位体比を分析する異なる二つの方法 (McIlvin and Altabet, 2005; Granger and Sigman, 2009) が提案されている。前者はアジ化水素 (N_3H) を用いて NO_2^- のみを N_2O へと還元して測定し、その後 NO_3^- の同位体比を脱窒菌法 (Sigman et al., 2001; Casciotti et al., 2002) やカドミウム法 (McIlvin and Altabet,

2005) によって求められた $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ の同位体比から計算によって求める方法である。後者は $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ 混合溶液試料にスルファミン酸 ($(\text{H}_2\text{N})\text{HSO}_3$) を加えることで NO_2^- を N_2 化させ、残りの溶液について脱窒菌法によりターゲットとして残っている NO_3^- の同位体比を測定するという方法である。今後、地下水研究において脱窒議論の精度を向上させるためにはこうした新たな分析法の導入が不可欠と言えよう。

(2) マルチ同位体法の提案

硝酸同位体トレーサー法の導入により、上記(2)と(3)のいずれの脱窒反応プロセスに対しても、脱窒の分布特性や汚染浄化の実態把握が可能となった。しかし、この手段のみでは反応式(2)と(3)のどちらのプロセスにより脱窒が進行したか、そのタイプまでを判別することはできない。近年、それぞれの反応系の生成物である無機溶存炭素 (dissolved inorganic carbon: DIC) (多くは HCO_3^- として存在)、および SO_4^{2-} イオン中の炭素と硫黄もそれぞれ安定同位体比 $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ と $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ を持つことに注目し、三つの同位体比をマルチに組み合わせることで、異なる脱窒反応タイプによる反応履歴を読み取ることができる新たな可能性が指摘されている (Aravena and Robertson, 1998; Otero et al., 2009)。マルチ同位体法のアイデアについては別途水環境学会誌の特集にて紹介したが (細野, 2013)、ここではその詳しい内容を紹介する。

Aravena and Robertson (1998) はカナダ・オンタリオ州南部の浅層地下水において鉛直方向の脱窒 ($\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ が 6.4‰ から 58.3‰ まで上昇) を確認するとともに、 $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ の値が -1.9‰ から -8.6‰ まで減少する傾向を見出した。彼らは、こうした傾向から、鉛直深部がより低い $\delta^{13}\text{C}$ 特徴を持つ有機物炭素 (-26～-29‰) の分解により生じた DIC が卓越している場になっていると予想し、帯水層が有機物に富み、従属栄養脱窒反応が進行しやすい環境に置かれていると解釈した。したがって、 $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ の減少は従属栄養脱窒反応進行の目安になると結論している。一方、Otero et al. (2009) は畜産由来の硝酸汚染が深刻なスペイン Osona 地方の深層

地下水において、顕著な脱窒 ($\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ が 10‰ から 35‰ まで上昇) に伴う、 $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ の 10‰ から -20‰ までの減少傾向を見出した。 $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ (-7～-16‰) に目立った変化傾向はみられなかった。 $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ の減少は低い $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ で特徴づけられる硫化物由来の硫黄の溶出を意味し、当地域では独立栄養脱窒が卓越していると結論している。以上の情報をまとめると、反応(2)および(3)に伴う地下水の $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ 、 $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ 変化は図1のように表現することができる。

上記観察に基づく理論モデルを検証するため、最近、我々の研究グループは従属栄養脱窒

図1 帯水層中における異なる脱窒反応 (従属栄養脱窒反応もしくは独立栄養脱窒反応) の反応促進に伴う $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ 、 $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ 、 $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ 進化パターンの変化を示した概念図 (細野, 2013 の図3を一部改編)。

菌 (*Pseudomonas aerofaciens*) ならびに独立栄養脱窒菌 (*Thiobacillus denitrificans*) のそれぞれの培養実験を行い、脱窒進行に伴う各同位体比 ($\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$, $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$) の進化パターンを調べた (図2; Hosono et al., 2015)。細かい議論の内容はここでは省くが、その結果、大局的には理論モデルとの整合性が確認され、仮に脱窒菌のみが、帯水層中の生化学変化に影響を及ぼす場合、異なる脱窒反応が進んだ地下水の $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$, $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$, $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ 組成は異なる進化パターンを辿ると判断される。したがって、図1に示した概念は、脱窒菌が主たる還元反応である現場において、そのタイプを区別する方法として用いることができる。

しかし、広域的な帯水層環境を見渡すと、現状はそのような単純なものではなく、地下水における $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$, $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$, $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ 組成の多様性は、それ

ぞれの同位体比によって構成される溶存イオンの起源の相違に加え、酸化的环境下で起こる微生物有機物分解や、脱窒、硫酸還元、メタン発酵に代表される、還元微生物反応による同位体分別効果との競合により決定されるはずである。脱窒同様、硫酸微生物還元は還元場において頻繁に報告される反応であり、例えば以下の式で表される：

この反応は有機物の存在する還元的帯水層で起こり (Rye et al., 1981; Strebel et al., 1990; Dogramaci et al., 2001; Yamanaka and Kumagai, 2006; Tuttle et al., 2009), 反応の進行に伴い地下水中に残存する硫酸の同位体比 ($\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ および $\delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4}$) は同位体濃縮効果により高くなるのが一般に知られている (Harrison and Thode, 1958; Kaplan and Rittenberg, 1964; Nakai and Jensen, 1964; Rees, 1973)。また、メタン発酵は帯水層で起こるもう一つのメジャーな還元微生物活動として取り上げることができる (Chapelle and Knobel, 1985; Lansdown et al., 1992; Martini et al., 1998; Cheung et al., 2010) :

式 (5) に示すように、例えば酢酸由来のメタン生成反応の促進に伴い、軽い同位体は CH_4 に、また逆に重い同位体は CO_2 に濃縮するため、結果として地下水中の $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ が上昇することが知られている (Chapelle and Knobel, 1985; Aravena et al., 2003; Conrad, 2005; Sharma and Frost, 2008)。これらは更なる還元場へ移行する過程で生じる代表的生化学反応であり (Korom, 1992), 脱窒域に隣接した帯水層場で起こる可能性は高い。 $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$, $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$, $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ を組み合わせて脱窒タイプの判断を行う際には、こうした脱窒とは別の還元微生物反応による影響も含め、総合的に論じる必要があるが、その方法論はまだ確立されていなかった。

最近、著者らのグループは、熊本地域の帯水層では脱窒、硫酸還元、メタン発酵の全ての反応系を含む、幅広いレベルでの還元場が形成され

図2 従属栄養脱窒菌 (*Pseudomonas aerofaciens*) ならびに独立栄養脱窒菌 (*Thiobacillus denitrificans*) のそれぞれの培養実験における、反応促進に伴う $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$, $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ 進化パターン (Hosono et al., 2015)。

ていることを見出し、こうした現場の実態調査を通して各還元反応組み合わせに応じた $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ 、 $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ 進化パターンのモデル化を行い、より実践的な脱窒タイプ判別に対するアプローチとして carbon-nitrogen-sulfur isotopic tracing 法（略して CNS-IT 法）を提案した（図3；Hosono et al., 2014）。任意の研究対象地域において仮に脱窒以外の還元微生物反応の痕跡が確認されない場合（図3の case 1）、脱窒タイプの区別は基本的には図1の概念に沿えば良い。ここで、涵養域において既に地下水の DIC が有機物由来炭素に卓越し低い $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ 値で特徴づけられる場合、脱窒に伴う $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ 値の低下は見られなくなる。これを想定し、DIC が有機物由来炭素に乏しい場合（図3中の a の列）と区別し、DIC が既に有機物由来炭素に富んでいるケースを、図中の b の列

に分けて示してある。

続いて、脱窒に加え、 $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ 値の上昇で特徴づけられる硫酸還元（case 2）や、 $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ 値の上昇で特徴づけられるメタン発酵が起こっている場合（case 3）、また全ての反応が存在した場合（case 4）、それぞれに応じた同位体進化が予想される（図3）。いずれのケースも顕著な $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ 値の減少が認められない場合、硫酸還元やメタン発酵同様、脱窒についても従属栄養型の反応が進んでいる可能性が高い。図にはそれぞれの脱窒反応が起こった場合示しうる同位体組成範囲も分けて示されている。本モデルは帯水層中で起こったメジャーな微生物還元反応の同定や脱窒タイプの判別に利用できる。注意する点として、帯水層によっては多く存在する炭酸塩や硫酸塩（海水成分の混入も然り）の影響が示唆される場合、異なる

図3 各還元微生物反応組み合わせについて、反応促進に伴う $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ 、 $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ 進化パターンを示したモデル図（Hosono et al., 2014の図6を一部改編）。ただし、炭酸塩や硫酸塩などの鉱物の溶解、また海水成分などの異なる起源物質の混入による影響を考慮しないものとする。aとbの列は $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ vs. $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ 図を、またcの列は $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ vs. $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ 図をそれぞれ示す。また、aとbの列は、それぞれDICが有機物由来の炭素に乏しい場合と富む場合の違いを示す。従属栄養型脱窒と独立栄養型脱窒のそれぞれの反応が起こった場合示しうる $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ 、 $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ 組成範囲は各図中の灰色塗パターンないし点々のハッチパターンで表され、幅広い酸化還元条件における地下水中で進行する脱窒反応のタイプ判別に利用できる。

起源物質の混入の観点から同位体組成変化を考察しなければならない。したがって、単純に採取した水試料を同位体ダイアグラム上にプロットし、直接モデルとの比較を行うには危険をはらんでいる。CNS-IT法は現場プロセスを十分理解した上で適応することが望ましい。

(3) 熊本地下水地域の概要

人口約100万人を抱える熊本地域(図4)は、水道水源のほぼ100%が地下水によって賄われている我が国最大の地下水都市域である(小嶋, 2010; Shimada, 2012)。熊本の地形、気候、地質、水文地質、地下水流動および年代、土地ならびに水利用に関して、詳しくは先行論文にまとめられているのでそちらを参照されたい(熊本県・熊本市, 1995; 熊本県地質図編集委員会, 2008; 小嶋, 2010; Shimada, 2012; Hosono et al., 2013)。簡単にその概要をまとめると、本地域は古生代の地質基盤岩ならびに未区分洪積層と新生代の火山岩類が難透水性水理地質基盤を、また

それらを不整合に覆う第四紀火砕流堆積物および溶岩(噴出年代の古い順にAso-1~4と名付けられている; 熊本県地質図編集委員会, 2008)が主な帯水層を構成している(熊本県・熊本市, 1995)。基本的に本地域の地下水は、Aso-4とAso-3火砕流堆積物の間に挟まれる湖成堆積性難透水層を境に、それより上位の不透水帯水層と下位の被圧帯水層に分類される(図5)。ただし、沿岸から平野部にかけて有明粘土層が分布する直下ではAso-4帯水層も被圧される。この点を考慮し、本論説では便宜的に沖積層ならびにAso-4帯水層に相当する地下水を浅層地下水、また、Aso-1~3帯水層に相当する地下水を深層地下水とよぶことにする。地下水は主に透水性の高いAso-4が分布する植木、菊池、高遊原の台地ならびに阿蘇西麓で涵養される(熊本県・熊本市, 1995; Taniguchi et al., 2003)(図4)。加えて、白川中流域では難透水層が欠如しているため地下水の下方浸透が極めて高く、深層地下水の一部は河川起源の水により涵養されている(Tanaka

図4 熊本地域の土地利用図上に示した主要な地下水流れA-A'およびB-B'の位置と試料採取地点(Hosono et al., 2014の図2を一部改変)。

et al., 2010)。また、丘陵地帯と平野部の境に位置する江津湖は、膨大な ($1.5 \times 10^8 \text{ m}^3/\text{y}$) 地下水が湧き出る、巨大な地下水流出池となっている (Shimada, 2012; Ono et al., 2013)。

熊本地域における最も主要な地下水流れは図4および図5に示したA-A'の地下水流れで、大きく四つのzoneに区分できる：A1. 菊池台地涵養域から白川中流域の低地部にかけての流れ、A2. 高遊原台地ならびに阿蘇西麓涵養域で涵養された水や、白川中流域から涵養された河川起源の水が合流するエリア、A3. Aso-2溶岩帯水層から江津湖流出域にかけての熊本地域で最もダイナミックな地下水流動、A4. 江津湖から沿岸部停滞域にか

けての流れ。もう一つの良く分かっている地下水流動系はB-B'の流れで、三つのzoneに区分できる：B1. 植木台地から涵養された水が金峰山東部と田立山に挟まれ基盤の高まっている地域へと流下する南方向の流れ、B2. 台地末端で基盤が高まっている部分から平野部にかけての流れ、B3. 沿岸部停滞域にかけての南西方向の流れ。

植木、菊池、高遊原の台地涵養域は、畑地や畜産が主な土地利用となっている (図4)。県や市による観測井の経年モニタリングによると、井戸によっては1970年頃から顕著な硝酸濃度増加が知られている (富家ほか, 2011)。また、平成17～19年頃から肥量の削減や畜産廃棄物投棄防止な

図5 図4に示した (a) A-A' および (b) B-B' 地下水流れの中心に描いた側線における水文地質断面。図中の矢印は地下水流れ方向と速度を表しており、国交省モデルに基づき surface and subsurface coupling flow simulator (GETFLOWS) を用いて作成した。各流れ場における硝酸性窒素同位体濃縮係数 ϵ も合わせて示す (本文説明参照)。図は Hosono et al. (2013) の図2を一部改変して作成。

ど、窒素負荷軽減への対策が講じられてきたが、汚染は多くの地点で現在も尚進行し続け、昨今の地域水資源に対する心配事となってきた（熊本県・熊本市，2005；熊本市水道局，2008；熊本市，2009；小嶋，2010）。これまで硝酸性窒素の安定同位体比を用いた起源同定に関する研究はなされてきたが（廣畑ほか，1999，2000；富家ほか，2011），広域地下水流動系における一部の地域について検証した事例が多く，結論についても統一の見解には至ってこなかった。また，脱窒菌法を用いた同位体測定も行われてこなかったため，脱窒現象を含めた汚染バッファ能力に関する研究が遅れていたのが現状であった。筆者らのグループはこうした問題をより明らかにするため，広域流動場を対象として詳細な同位体的研究を行ってきた（Hosono et al., 2013, 2014）。以降，この結果を基に，熊本地域の地下水硝酸性窒素汚染の起源や地下水中での硝酸挙動ならびにメカニズムについて解説を行う。

(4) 窒素の起源

熊本地域では2009年11月から2011年11月にかけて合計で350以上の水試料や比較物質試料が採取され，課題に対する精力的な研究が進められてきた。詳しいサンプリングや分析の内容についてはHosono et al. (2013) および Hosono et al. (2014) を参照されたい。一連の調査で明らかになった硝酸の分布傾向としては，採取した地下水の硝酸濃度（以降，硝酸濃度とは硝酸イオン体としての濃度を指す）は全体として0～73 mg/Lの範囲にあり，そのうち飲用水の水質基準の44.3 mg/Lを超過していたものは5試料であった。地下水硝酸濃度レベルは，浅層地下水と深層地下水の間に際立った相違点はなく，また，豊水期と渇水期による相違も殆どなかった。浅層地下水の硝酸濃度の分布は植木台地，菊池台地，高遊原台地の農業・畜産が集中する地下水涵養域で最も顕著であり，その後地下水流れに沿って減少する傾向が認められた。深層地下水も基本的には同様の濃度分布傾向を示す。

熊本地域では，硝酸濃度が30 mg/Lを超す涵養域地下水の溶存酸素濃度（Dissolved Oxygen: DO）は概して6 mg/L以上であった。したがっ

て，概ね30 mg/Lを超すような相対的に高い濃度レベルにある涵養域地下水の硝酸は，脱窒を経験することなく地下水に蓄積していると仮定し，考えられる起源物質との同位体比較により起源判別が試みられた（図6）。その結果，まず，こうした涵養域汚染地下水の $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ 組成は2～8‰の間に収まり，同位体分別による $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ と $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$ の組成変化が無いことも確認された。そしてその特徴は，化学肥料ならびに肥料が施されている畑地周辺の井戸水が示す $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ 組成範囲と合致し，地下水汚染は畜産排せつ物の浸透によって起こっているのではなく，主として農業で長年用いられてきた化学肥料の地下への浸透により進行している可能性が高いと考えられるに至った。同様に，湧水についても高い硝酸濃度を持つものは施肥による影響を受けていることが確認できる（図6）。

涵養域でも菊池台地の一地点において例外的に同位体比が高い地下水（ $\text{NO}_3^- = 31 \text{ mg/L}$ ， $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3} = 14.9\text{‰}$ ）も存在が確認された（図6）。農業・畜産地域では畜舎からの汚染の浸透は現在の

図6 熊本地域において採水した試料の硝酸同位体組成と寄与物質との同位体比較を示した図（Hosono et al., 2013 の図6 を一部改変して作成）。アスタリスクのデータは廣畑（1999）より引用。

ところスポット的に影響を及ぼしているものと考えられる。一方、こうした農地・畜産地域において人家の存在は限られている。仮に浄化槽が設置されていない自宅があったとしても、排水は地下ではなく基本的には河川へと排水される構造となっている。同様に、都市排水は下水処理施設に集約・処理された後、直接河川へと放流される。河川水の $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ 組成が全体として涵養域の地下水や湧水と比較して有意に高いものが見られることは(図6)、これらの影響によると考えると説明しやすい。流動に伴い流下してきた地下水は都市域へと到達する(図4)。都市域の帯水層では古い下水管からの汚染物質の漏出が硝酸汚染の引き金となることが知られている(Lerner, 2002; Wakida and Lerner, 2005)。しかし、都市域では下水管が巡っている不圧帯水層において目立った $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ の上昇を伴う硝酸濃度増加傾向は認められず、これによる問題は重要ではないことが明らかとなった。

これらの結果から、本地域で現在進行傾向にある地下水硝酸汚染の主たる原因は、過去長年にわたり蓄積し続けてきた台地での畑作農業で用いる化学肥料成分の地中への浸透負荷であるのではないかと考えている。植木、菊池、高遊台地周辺域に設置された観測井モニタリングは、硝酸汚染は井戸によっては1970年頃から顕在化し始め、その後今日に至る40年間、汚染前と比べ2～7倍にまでほぼコンスタントに硝酸濃度が増加していることを示している(富家ほか, 2011)。我々の結果は、近年実施されてきた減肥調整の明瞭な効果が現れるまでには更なる時間を要することを意味する。これに加え、1970年以降、化学肥料による窒素負荷と比べ、畜産排泄による負荷がよりウエイトを占めてきているという見解が報告されている(富家ほか, 2011)。今後、単なる濃度分析だけではなく、硝酸同位体トレーサー法に加え、最新のボロン同位体トレーサー等も効果的に用いることで(Widory et al., 2004; 細野, 2013)、畜産業による影響(家畜排せつ物ならびに有機系肥料)も評価しつつ、汚染の動向を注意深くモニタリングすることが重要だと考えられる。

(5) 硝酸の挙動

硝酸同位体トレーサー法を用いて広域地下水流動系における複雑な硝酸の挙動を追跡する際、その移動ルートである地下での水の動きが、対象とする研究地域で涵養から流出まで三次元的(時間ファクターを入れると四次的)に把握できているという点は、研究条件として極めて重要といえる(Böhlke and Denver, 1995; Böhlke et al., 2002; Hosono et al., 2011b)。この観点から、Hosono et al. (2013)は、熊本地域において主要な二つの地下水流動系A-A'とB-B'に注目し(図5)、涵養域から流出域にかけて硝酸濃度減少傾向や硝酸同位体組成変化傾向に大きな違いがあることを浮き彫りにすることで(図7)、流動に伴う汚染の減衰メカニズムや汚染バッファ能力の実態ならびにその空間分布を明らかにした。

まずA-A'の地下水流動に沿った汚染の減衰メカニズムの概略を説明する。涵養域からzone A1内での流動では $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ の変化は極めて僅かである(1～1.5‰)、DOの値も脱窒が期待される値にはないことが確認された(7.1～7.2 mg/L)(図7)。このことから、観察された汚染減衰は脱窒ではなく、地下への拡散や灌漑水による希釈である可能性が高いと考えられた。zone A2は菊池台地から南下する地下水流れが、他の異なる二つの地下水ならびに白川の河川水から涵養される水と合流し、様々な水が複雑に混合するエリアに相当する(図4)。エリア内での水質は非常に多様であるが(図7)、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ に大きな変動はないため(1.5～5.5‰)、zone A2での水質の変動は脱窒によるものではなく、異なる水が不均質に存在することに起因すると考えられた。続いてzone A3では NO_3^- 濃度が20 mg/Lから15 mg/L程度にまで緩やかに減少する(図7)。地下水中の主要イオンに関する従来の研究により、このzoneの地下水は上流域の地下水に3～4割程度の白川の水が混合した水質組成であることが知られている(永井ほか, 1983)。また、DOは平均8 mg/L程度と高く、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ 変動も殆どないため脱窒は起こっておらず、汚染減衰は希釈により起こっていると結論された。これまでのzone A1～A3に対する特徴は、浅層、深層両地下水に共通して見られた。一方、zone A4では、深層地下水では同じく脱窒

が起こった証拠は確認できなかったのに対し、浅層地下水は DO と NO_3^- 濃度低下に伴う顕著な $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ の上昇が見られ、脱窒が起こった事を示す結果となった (図7)。

A-A' 地下水流動系とは対照的に、B-B' 地下水流動系では随所で脱窒による顕著な汚染の減衰が確認された。まず、zone B1では流動に沿った硝酸の減衰 (約50 mg/L から1 mg/L)、DO の減少 (8 mg/L から1 mg/L)、それに伴う $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ の上昇 (4‰ から8‰) が見られ (図7)、脱窒の進行が示唆された。地下水が Aso-4 からなる植木台地の末端部分に到達すると、一度硝酸濃度 (～20 mg/L) と DO (～7 mg/L) が上昇し、逆に $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ が約3‰程度にまで減少する (図7)。ここでは難透水層の分布が顕著ではなく、かつ、台地から平野部にかけて地形が変化している地点であるため、表層からの水の下方移動ならびに物質の供給が起こったと解釈された。つづき、地下水が基盤の高まりから白川付近へと流下する変化エリアにおいて顕著な硝酸濃度 (20 mg/L から1.5 mg/L) と DO の低下 (7 mg/L から1 mg/L) に伴う急激な $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ の上昇 (～40‰) が見られ、特に顕著な脱窒が生じたことが分かる (図7)。

このゾーンは熊本地下水地域の“脱窒ホットスポット”と名付けられた (Hosono et al., 2013)。地下水は zone B3にて再び低い $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ 組成 (0～10‰) に戻る (図7)。このことは zone B1から始まり zone B2を移動してきた施肥に由来する硝酸汚染はほぼ脱窒してしまい、本地域まで達していないことを意味する。最後に zone B3では流動方向に沿った濃度減少を伴う (～0 mg/L) 顕著な $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ の増加が確認された (～30‰)。全体として DO も2 mg/L 以下と低く、脱窒の進行が示唆された。浅層、深層両地下水共に基本的には同様の特徴を示すプロファイルが確認された。

以上のように、各 zone における汚染減衰メカニズムを考察した結果、熊本地域では希釈による浄化と脱窒による浄化の二つのタイプが存在することが明らかになった。各 zone の最上流と最下流における濃度減衰を読み取ると、前者では最大60-80%程度、また後者では最大98%程度、流動の過程で運ばれてきた硝酸が浄化されたと考えられる (Hosono et al., 2013)。前者のタイプでは更なる窒素負荷に脆弱なのにに対し、後者のタイプでは、特に脱窒ホットスポットでは、更なる汚染負荷に対してもある程度は浄化に対するバッファ

図7 (a) A-A' および (b) B-B' の流動に沿った NO_3^- (上段), $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ (中段), DO (下段) の変化 (Hosono et al., 2013 の図7 を一部改変して作成)。

能力を持っている可能性が指摘できる。更に、主に脱窒によって浄化が起きている各 zone 内での濃度減衰と同位体濃縮の関係を調べ、次のレイリー式を用いて脱窒反応速度のパラメーターである同位体濃縮係数 ϵ が算出された (図5; Hosono et al., 2013)。

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3} = \delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_{30}} + \epsilon \ln (C/C_0) \quad (6)$$

上記 (6) 式の $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ と $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_{30}}$ ならびに C と C_0 は、それぞれ脱窒が進んだある地点で溶液中に残っている硝酸と、脱窒が始まる前に存在していた硝酸の、窒素安定同位体比ならびに濃度を指す。ここでは、各 zone 内で流動の過程で新たな硝酸の負荷がないものと仮定している。また、脱窒によって浄化が起きている zone でも実際には希釈も起きているはずなので、この値はあくまでも浄化効果の程度を読み取る目安となる。しかし、これらを考慮し押しなべて見ると ϵ 絶対値は下流域ほど高く、特に脱窒ホットスポットでは、他地域とは段違いに高い脱窒活性度が予想される (図5)。こうして明らかになってきた汚染減衰メカニズム、汚染浄化効率の実態、ならびにその空間分布は、地下水資源の管理や対策を行う上で非常に重要な基本情報となる。

では、こうした脱窒ホットスポットはどのように形成されたのだろうか？一般に、地下水中において脱窒が起こる要因には、硝酸や脱窒菌が存在する以外に、(1) 溶存酸素に乏しい還元的な環境であること、(2) 帯水層中に脱窒菌が活動するために必要な有機物が存在すること (従属栄養型の場合)、(3) 地形勾配が急激に減衰する場合や、また、長い滞留時間を生み出す地下水流動場を擁する水理地質条件が整っていること、の三つの条件が良く知られている (齋藤・小野寺, 2011)。A-A' と B-B' 地下水流れを比較すると、前者の地下水の方が、溶存酸素に富み (おおむね6 mg/L; 図7)、砥川溶岩を主たる帯水層とするため有機物に乏しく、かつ、流速は速く動水勾配も一定である (図5)。このことは、A-A' 地下水流れでは、流れの末端を除き、脱窒が起きている事実と矛盾しない。

一方、B-B' 地下水流れの地下水は、各サブ zone

図8 B-B' 地下水流動に沿った地下水中の DOC (溶存有機炭素)、DO、硝酸イオン、マンガ、鉄、硫酸イオン、重炭酸イオンの濃度変化。

の末端で溶存酸素濃度が減少し ($DO < 2 \text{ mg/L}$; 図7), かつ, 有機物濃度が高く (図8), そして特に zone B2では地形勾配や流速の変化が激しく (図5), これらのことを総じてみると, やはり B-B' 地下水は全体として脱窒の起こりやすい環境が整っていると考えても不自然ではない。ここで, 脱窒ホットスポットと判断された領域を注意深く見てみると (図4, 5), 確かに帯水層は還元的な環境にはあるが, その上流域と比べて特段地形勾配や流れが緩やかになっている箇所ではなく, むしろ, 流速が増している箇所に該当している (図5)。注目すべきは, 脱窒や他の還元反応が生じている各サブ zone の末端でもそうであるが, この脱窒ホットスポットでは DOC 濃度が他と比べて突出して高い傾向が見られる (図8)。このことから, 熊本地域で浮き彫りにされてきた脱窒ホットスポットの形成には, 帯水層中の有機物濃度が大きな鍵を握っている可能性が指摘される。脱窒ホットスポット領域は, 金峰山と立田山の基盤が高まり, 帯水層が薄くなっている箇所から下流側に分布する (図4, 5)。実は, この地域の地表には坪井川沿いに河畔湿地帯が広く分布している。一般に, 河畔帯は流域において脱窒による窒素除去が起こる格好の条件を有していることが知られている (楊, 2014)。こうした現場の状況を踏まえると, 比較的嫌気環境にあり, 多くの有機物も含むと考えられる河畔湿地帯が, 地表から地下への有機物の供給地帯となり, このことが活発な脱窒反応, そして続く高次元の還元反応を促進する要因になっているのではないかと考えられる。こうした仮説は今後より確証されることが望ましいが, いずれにせよ, 本研究の結果は, 帯水層中の溶存有機物の解析が脱窒研究にとって欠かせないステップであることを示唆している。

(6) 脱窒反応メカニズム

ここまで, 熊本地下水地域では特に B-B' 地下水流動系において流動に沿った脱窒反応の進行が顕著にみられること, また, 流れの中における脱窒程度の多様性について解説してきた。つづいて, 起こった脱窒の反応メカニズムについて従属栄養脱窒もしくは独立栄養脱窒のいずれの反応が卓越していたかに注目して, さらに掘り下げた解

説を進めていく。図8は B-B' 地下水流動に沿った地下水中の DOC (溶存有機炭素量), DO, 硝酸イオン, マンガン, 鉄, 硫酸イオン, 重炭酸イオンのそれぞれの濃度変化を示した図である。ここで, DOC の存在は帯水層内で有機物を酸化させて呼吸を行う微生物の存在可能性を知る指標として, また, DO, 硝酸イオン, マンガン, 鉄, 硫酸イオン, 重炭酸イオンの濃度は, 微生物が酸素の獲得を進める中で好気的な呼吸, 脱窒, マンガン還元, 鉄還元, 硫酸還元, メタン生成の順により還元的な環境で起こる反応の際変動する酸化還元パラメーターとして用いることができる。図8は脱窒反応以降の微生物還元反応が, B-B' 地下水流動系において認められるかを検証するために2013年に追加調査を行った結果をまとめたものになる。

先にも述べたように, 流動に沿って脱窒が確認された脱窒ホットスポットや停滞域の地下水は他地域と比べて DOC 濃度が高くなっており (図8), 有機物を酸化させて呼吸を行う微生物が存在しうる環境におかれている可能性が示唆される。さらに同地域において酸素や硝酸イオンの減少に加え, マンガンや鉄の上昇, 硫酸イオンの減少, 重炭酸イオンの上昇といった系統的な変化傾向が見て取れることから, 脱窒に加え, その後マンガン還元から鉄還元を経て硫酸還元まで微生物還元反応が進んだと考えられる。脱窒反応が確認された位置と DOC 濃度が高い位置が一致すること, また, 硝酸が消費された後も硫酸還元に至るまで有機物の酸化を通して微生物反応が還元的な方向へと進んだことを考慮すると, ここで起こっている脱窒は独立栄養脱窒ではなく従属栄養タイプの脱窒が卓越しているのではないかと推察される。これらのことから, この地において DOC は脱窒ならびにその他の還元微生物反応を律速する重要な要素であることが確認でき, また, 更なる硝酸の負荷に対してもある程度の浄化能力を有する可能性が指摘できる。

Hosono et al. (2014) は A-A' と B-B' の地下水流動系に沿って, $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ に加え, $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ と $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ の特徴を議論している (図9)。それによると, A-A' 地下水流動系では $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ に加え, $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ と $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ についても流動に伴う目立った

変化は確認されず、脱窒菌による活動のみならず、硫酸還元やメタン発酵といった更に高次の還元微生物反応は起こっていないと判断された。一方、B-B' 地下水流動系では脱窒反応の痕跡が認められた領域において、それよりもやや下流側で $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ の上昇が、またそれよりもやや下流側で

$\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ の上昇が認められ、上記の状況証拠からも、それぞれ硫酸還元反応とメタン発酵反応の存在が指摘される。 $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ の上昇に伴う $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ の減少が見られる地下水も存在したが、その頻度は非常に局所的であった。こうした同位体的証拠は起こっている脱窒の大部分は従属栄養的脱窒反応で

図9 (a) A-A' および (b) B-B' の流動に沿った $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$, および $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ の変化 (Hosono et al., 2014 の図4を一部改変して作成)。

図10 (a) $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ vs. $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ ならびに (b) $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ vs. $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ 図上における熊本地域から採水した試料の同位体組成 (Hosono et al., 2014 の図3を一部改変して作成)。

あるという考えを支持する。CNS-IT 法に基づき $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ vs. $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ ならびに $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ vs. $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ ダイアグラム上に熊本地域の水試料の組成をプロットしたのが図10である。そのプロット分布は図3におけるモデルを比較すると case 4の b と c に該当し、熊本地域の帯水層中で起こっている還元微生物反応は主に従属栄養型脱窒（独立栄養型脱窒は局所的）、硫酸還元、メタン発酵であることが予想され、先に紹介した解釈と整合する結果となっている。

硝酸汚染問題に焦点を充てた研究調査では、しばしば硝酸の濃度やその同位体比の特徴にのみ意識がいきがちであるが、一連の酸化還元反応の有無や溶存有機物量の分布特性を理解することは、脱窒反応のメカニズムや更なる窒素の負荷に対して、その土地が有するバッファ能力を見極めるという意味で大変重要となってくる。今後このような包括的な観点に基づき脱窒現象が議論されることが期待される。

3. 菌叢解析の取り組み

これまで説明してきた硝酸同位体トレーサ法は、地下水が採水地点に辿りつく過程で脱窒が起

こったか否か、またその活性レベルに対応した情報を与えてくれる。仮に、採水間隔を狭めて流動に沿った同位体変動を細かく知ることができれば、この方法だけでも脱窒菌による汚染浄化プロセスを詳細に描くことができよう。一方、同位体法はあくまで地下水流れの過程で起こった現象を読み解く方法であり、原位置における反応を直接確認する方法にはならない。したがって、このことについてより理解を深めるためには、分子生物学的手法により、遺伝子解析技術を用いて微生物相解析を行う必要がある。

現在我々のグループは、各種酸化還元パラメーターやマルチ同位体法を用い、流動に沿った還元反応シーケンスが確認された熊本 B-B' 地下水流れのうち、zone B1流れの最末端部分（深層地下水 2 地点について）と zone B2流れの末端部分（脱窒ホットスポットゾーンに該当する深層地下水 3 地点について）の地下水に注目し、微生物相の解析を進めており、この取り組みについて解説を行う。最初に、全バクテリアを対象としたクローン解析を行い、どのようなバクテリアが検出されるか調べた (Zeng et al, 2014)。Eu27F/518R のプライマーセットを用いて16S rRNA 遺伝子の部分配列を標的とした解析を行った結果、深層

図 11 B-B' の流動に沿った深層地下水中の微生物相の変化。図中の zone B1, zone B2, zone A の各比率は、それぞれ、zone B1 地下水流れの最末端部における代表 2 地点、zone B2 地下水流れの末端に位置する脱窒ホットスポットゾーンにおける代表 3 地点、zone A1 ならびに zone A2 における代表地点の合計 2 地点における、クローン解析結果の平均データを示す。

地下水では流れに沿った微生物相の変化が示唆された。深層地下水の微生物相について zone B1 と zone B2 末端部分の比較を図11に示す。図から明らかなように、zone B1の流動末端部においては α -Proteobacteria 綱の *Methylobacterium* 属が約半数を占め、他には Firmicutes 門に分類される *Bacillus* 属、*Lactobacillus* 属、*Tetragenococcus* 属と、Actinobacteria 門の *Corynebacterium* 属に近縁なクローンが多数を占めた。zone B2では地下水が流下するとともに微生物相が多様化し、*Methylobacterium* 属に加えて γ -Proteobacteria 綱の *Methylomonas* 属および *Methylobacter* 属が主要な methanotroph (メタン資化性細菌) として検出された。Firmicutes 門の近縁種も検出されたが、その比率は zone B1と比較して低下していた。比較のために zone A 流れの地下水 (zone A2および zone A3の微生物還元反応が起こっていない代表合計2地点について) の解析も行ったが、 β -Proteobacteria 綱の *Curvibacter* 属や *Sulfuritalea* 属に近縁なクローンが多数を占め、zone Bとまったく異なる微生物相を示した (図11)。このように、zone Bでは methanotroph が約半数を占めるとともに Firmicutes 門の近縁種も多く検出されるという特徴を示し、有機物の流入があって微好氣的からやや嫌氣的な環境にあると考えられた。

脱窒菌が有する亜硝酸還元酵素をコードする遺伝子として *nirK* および *nirS* の PCR を行った結果、すべての zone で *nirK* の増幅は認められず、*nirS* の増幅が見られた。増幅強度については、脱窒による硝酸性窒素同位体比の同位体分別が認められた試料の中でも、その程度が小さかった

zone B1末端部地下水では (図7, 8), PCR 画像においても顕著なバンドの増幅が確認されなかった (表1)。一方、極めて顕著な同位体分別が確認された zone B2の脱窒ホットスポットゾーンの地下水試料は (図7, 8), PCR 解析においても最も強い増幅を示し (表1), 全バクテリアに対する脱窒菌の比率が高いことが示唆された。増幅された *nirS* 遺伝子の塩基配列を解析し系統樹を作成したところ、大きく二つの uncultured bacterium group に分かれ、単離されている既知の脱窒菌とは異なるものと考えられた。これについてのより詳しい内容は、別途論文にて紹介する予定である。

最近、沖縄本島南部の琉球石灰岩帯水層を対象とした先駆的研究において (安元ほか, 2015; 安元ほか, 投稿中), 硝酸性窒素同位体比の同位体分別傾向と PCR 増幅強度との間には、明瞭な関係が存在することが明らかにされた。地域の脱窒特性を、硝酸同位体トレーサー法と遺伝子解析の、双方のアプローチにより解釈を試みる例はこれまでほとんどなかった。しかし、こうした試みが脱窒機構の実態解明に有効であることが示されつつあり、今後、他地域においても更なる追従研究が期待される。

続いて、硫酸還元菌が有する *dsrB* 遺伝子を標的とした PCR においても、zone B1では弱い DNA 増幅しか見られなかったのに対して zone B2では明瞭な DNA 増幅が見られ (表1), 嫌氣的環境における硫酸還元反応をより活発に行っているものと推測された。また、メタン生成細菌を含む Archaea に特異的な16S rRNA 遺伝子を標的としたクローン解析を行った結果、zone B1では

表1 zone B1 と zone B2 の地下水流れ末端部における深層地下水を対象とした PCR とクローン解析の結果

	zone B1 (流動末端の還元域)		zone B2 (脱窒ホットスポットゾーン)		
脱窒菌	unclassified	×	○	●	unclassified
硫酸還元菌	△	△	●	×	●
メタン生成菌	△	△	△	△	△

PCRバンドの見た目の増幅度 ●>○>△>×

少数の、zone B2では多数の *Methanobacterium* 属に近縁なクローンが検出され、特に zone B2では嫌気的環境におけるメタン生成反応も起こっていると推測された。以上のように、マルチ同位体法により各種微生物還元反応（脱窒反応、硫酸還元反応、メタン生成反応）が示唆された地下水では、それぞれの反応に対応する微生物が検出されやすい“傾向にある”ことが明らかとなってきた。

一般に、自然界の物質には様々な微生物種が存在しているため、注目している環境中で、こういった微生物がどれだけの重要性をもって系の水質形成や生化学反応に関与したか、微生物相解析を行うだけでは十分に分からないと考えられていた節がある。そもそも、広域循環地下水系においてどのような微生物世界が広がっているかを詳細に調べ上げた研究は著者の知る限りまだない。しかし、これまでの研究結果を見る限り、微生物解析の結果は同位体特徴によって明らかにされる酸化還元反応シーケンスとある程度調和するようである。予想された微生物の存在が確認されたという事実は、同位体手法による結果の直接的証拠として大変重要である。そればかりか、微生物の数は同位体トレーサーの数よりも格段に多いため、検出されたそれぞれの微生物に対して知られている生息適応環境の情報を逆に利用することで、環境水文科学分野の範疇ではこれまでわからなかった帯水層中における生化学的環境に対して、より理解を深めることができると指摘できる。同位体解析と微生物相解析のカップリング研究はまだほとんどみないが、帯水層硝酸汚染研究にとって効果的かつエキサイティングな試みといえる。

4. 水循環モデルを用いた硝酸挙動の可視化への取り組み

近年、地下水流動モデリングを応用させ、現状に即した硝酸性窒素の負荷情報や帯水層中での窒素の形態変化に対する生物化学的条件を加味して数値計算を進めることで、地下での硝酸の挙動を可視化しようという試みが活発化している（登坂ほか、1996；中川ほか、2011；竹本ほか、

2012）。さらに最近では、地下水資源利用や管理・保全といった、実社会へのニーズに対応する必要性から、小流域モデルケースや河畔域といった、単純かつ限定的な地下水流動の枠を超え、涵養域から海への流出域までを含む、より複雑かつ広域的な地下水循環系に対して、同様の取り組みが活発になってきている（竹本ほか、2012；森ほか、投稿中）。特に地下水資源の重要性が高い熊本地域では、国交省による地下水流動モデルをベースとし、市や県が中心となり、全国に先駆けてこうした取り組みを前向きに進めてきた経緯がある。この潮流にあり、熊本大学の水文学研究室でも、平成22年度から採択されたCREST研究の「持続可能な水利用を実現する革新的な技術とシステム」領域で採択された「地域水循環を踏まえた地下水持続利用システムの構築」プロジェクトを通して、先行事業の蓄積を継承・発展させる形で硝酸性窒素汚染の挙動の可視化に挑戦してきた。

我々の取り組みの概要として、まず、モデルの構築には、従来と同様に(株)地圏環境テクノロジーが所有する流体流動数値シミュレーターGETFLOWS (GEneral purpose Terrestrial fluid-FLOW Simulator) を用いた（登坂ほか、1996；Tosaka et al., 2000; 登坂, 2003）。モデルへの入力データとして必要な各種水理地質条件は、基本的には国交省により整理された情報（平成19～23年度に行われた熊本地域水循環検討事業の成果）に改良を加えたものを、また、窒素負荷量は、農林業センサスデータをベースとして熊本県、熊本市、公益社団法人くまもと地下水財団により整理されてきたデータ（平成22～24年度に行われた硝酸性窒素濃度シミュレーションモデル構築事業の成果）を用いた。後述の通り、地下水流動モデルについては、蓄積されてきた各種地下水トレーサーの実測値を概ね再現できるように、水理地質条件の決定に検討・吟味を重ね、より実情に合った流動場の再現を試みてきた。硝酸濃度モデルについても、従来、重要にもかかわらず考慮されてこなかった、場の持つ脱窒特性による効果を再現できるように、そのパラメーターをモデル中に組み込む取り組みを進めている。現在は、こうした可能な限り収集できる入力データを基に計算、調整されたモデル結果と、これまで国交省、熊本

県、熊本市が継続してモニタリングしてきた地下水硝酸濃度の経年変化データを比較することにより、より信頼性の高いモデル構築を目指している。模索段階ではあるが、本節では現段階における取り組み例と、今後の課題について解説する。

熊本地域を対象とした地下水流動モデルは、菊池川、白川及び緑川流域の源流から河口をカバーする範囲の地上・地下流体挙動を一体化した3次元水循環モデルであり、様々な地表面過程と地下地層の立体構造が組み込まれたものである。水循環モデルは、これまでに河川流量、地下水位、トリチウム濃度、 ^{85}Kr 濃度、水の酸素・水素安定同位体比及び温度等の実測値を矛盾なく再現できるよう調整と検証を続けてきている（濱里, 2009; Shimada et al., 2012; Ichiyanagi et al., 2012）。従来モデルでは、計算に基づく推定地下水滞留時間が、年代トレーサーの実測値に基づく解析結果よりも短く表現されてしまい、地下水流動の実態を的確に再現できていない問題をはらんでいることが分かってきた。この原因として、(1) 不飽和帯における土壤中の水の鉛直浸透速度が、理論計算に基づいて表現されているモデルの値よりも有意に遅いか、もしくは、(2) 難透水性と信じられてきた水理地質基盤には、実際にはある程度の透水性が存在する（古川ほか, 2000）、の二つの点が疑わしき可能性として浮上してきた。(1)の可能性の吟味については後述するとして、現段階の解析では、(2)の現場検証によって示された可能性に基づき、水理地質基盤に第二帯水層と同等レベルの透水性を設定することで、モデルと実測間の齟齬を見かけ上改善できたため、以降、このバージョンで解説を続ける。

こうして構築した地下水流動モデルの地表面へ、施肥や畜産等による窒素負荷を、土地利用と関連付けて過去から近年に至る時代変化を考慮して与え、流域内の硝酸の移動過程を解析した。脱窒パラメーターの設定に加え、我々のシミュレーション解析で取り入れた、従来の方法と異なるもう一つの特徴は、地上、地下の水の動きが一体化された流動場を複数の窒素化合物が無機化、硝化や脱窒等の諸反応を伴って移動する過程を考慮したモデルを適用している点にある。この詳しい内容、原理については本特集の森ほか（投稿中）に

よって論じられている。窒素負荷は主に農地等へ有機体窒素や化学肥料として与えられ、その場所の水の動きによって、すぐ近くの河川へ流出したり、地下へ浸透して帯水層へ到達したりする。当然、季節や他の要因による流動場の変動によっては環境中への実質的な窒素負荷が変化することとなる。この手法は、環境中へどれだけの窒素負荷があるかを発生源毎の原単位として表し、それをその場所の水の状態に無関係に与える従来の手法に対して、より実態に近いかたちで窒素負荷が与えられると期待できる（森ほか、投稿中）。脱窒反応は、硝酸の窒素・酸素安定同位体データと共にDO濃度が2 mg/Lより小さい領域で起こっていることが確認されたため（図7）、この事実に基づいて領域を特定し、また、脱窒速度は実測と最も良い一致を示した0.0012 (1/d)の値を用いて一次反応則によって考慮した（森ほか、投稿中）。

このようにして計算された帯水層中の硝酸分布を可視化した2010年における結果を図12に示す。モデルによる帯水層中の硝酸分布は、前述の二つの地下水流動系A-A'とB-B'及びそれぞれのzoneにおける汚染減衰の特徴的なパターン（図7）をおおむね捉えている。特に、脱窒の効果を考慮しない従来モデルに比べると、新たに試みた方法が現状に即したモデルの構築に有効であることが分かってきた。一方で、地下水流動モデル構築の工程で、従来水理地質基盤と考えられてきた地層に透水性を与えたことにより、特にB-B'断面における涵養域では、硝酸が地下深部にまで潜り込んでいる様子が見てとれる（図12）。このことが実態を反映しているかどうか、その妥当性について現段階では判断しがたい。今後、透水性の与え方やその範囲を含め、モデルの妥当性について更なる吟味が必要とされる。次に、こうした問題を含みつつも、これまで熊本市内外で約20～30年前から観測されてきた、可能な限り収集できる地下水硝酸濃度の実測データと、本研究で定めた条件において、実測データの採水年に対応して計算されたモデル上の硝酸濃度の比較を試みた（図13）。結果、浅層地下水、深層地下水ともに、図中の1:1ラインに沿ってプロットされる地下水もあれば、ラインから大きく外れてプロットされ

る地下水も存在することが読み取れた。つまり、現状のモデルでは、熊本地域の広域地下水流動系に対して、時間スケールでの実状を正確に再現しきれておらず、モデル値が場所によって、また、多くの場合、時間によって過小評価や過大評価をしてしまっていることが理解できる。このように、本研究により脱窒域の取り扱いについては一定の進展が見込まれたが、現段階では、こうしたモデル値の過小評価ならびに過大評価に対し、どのように理解、修正するか、といった問題が、解決すべき課題として残されている。

問題の原因として、(1) 詳細な土地利用や窒素

負荷の実情を把握しきれていない、また、(2) 脱窒域の設定が細部にまで再現しきれていない、といった点が容易に疑われる。まず、(1) の問題に関して、過去の統計データを覆すような信憑性をもった証拠を取り揃えることは通常困難と予想される。また、別の見方からいうと、例えば、最近懸念されている畜産活動が及ぼす窒素負荷への影響などについては、家畜排泄物の地表下への浸透過程や実態の把握が極めて難しくなる。松永ほか(2015)は、日本有数の畜産地域である都城盆地の帯水層について、家畜排泄物の負荷による影響を、単に農地ではなく、それぞれの畜舎の位置に

図12 図4に示した(a) A-A'および(b) B-B'断面における、2010年地点での帯水層地下水中のモデル計算による硝酸イオン濃度分布。図中の矢印は地下水の流れの方向と速度を表しており、国交省モデルを改良したモデル(水理地質基盤に透水性を考慮したモデル)を基にGETFLOWSを用いて作成した。詳しくは本文参照。

図13 熊本地域地下水の、それぞれ(a)浅層地下水および(b)深層地下水の観測地点における、過去20年間に対応した、観測に基づく硝酸濃度と、モデル計算に基づく硝酸濃度の対比関係を示した図。

細かく集中して割り当てることで、モデル結果の精度向上に成功している。通常、畑地も畜産も、土地利用としては一色単に“農地”と区分されるが、松永ほか(2015)によるアプローチは、窒素負荷の現状をより正確に表現する方法として有効であることを示している。一方、(2)の問題に関しては、観測井戸の地点間を補完する情報を直接得ることができないため、水理地質境界条件等、他の情報を併せ持ち、目を凝らして吟味することで、脱窒領域の範囲は試行錯誤的に修正を施す必要がある。ただし、この問題に関しては、地域的な境界をどのように選び出すか、といった問題であるため、全体の大まかな再現性を捉えたあとで個別に作業を行っても手順的には差し支えない。

先に述べた宮崎県都城盆地における地下水帯水層におけるシミュレーション研究の例に戻ると(松永ほか, 2015), 熊本地域で行ったトライアルと基本的には同様のアプローチにより入力、計算作業を行っているにも関わらず、実態とモデルの地下水硝酸濃度値との間には、おおむね良い整合性が認められている。同じく、本特集で取り上げられている佐田川扇状地地下水におけるトライアルでも(嶋田ほか, 2015), こちらはそもそも脱窒が起こっていない、より単純な系ではあるが、

実測とモデルは良い一致を示している。このような、実態を上手く捉えられている例を見るかぎり、熊本地域に対しても、恐らくアプローチとしてはそれ程の外れなトライをしている訳ではないように思える。それにもかかわらず、実測とモデルとの間に何倍もの濃度結果の乖離があるということは(図13), 土地利用の割与え方を改善するといったトライアル(松永ほか, 2015)も残されているが、実は、他地域では問題とならなかった熊本ならではの、条件設定に対する根本問題が存在しているのではないかと疑っている。

その原因の一つとして考えているのが、熊本地域の涵養域台地を厚く覆うAso-4火砕流堆積物からなる、“不飽和帯中の水ならびに窒素の挙動について、現状を的確に捉えられていないのではないか”, という問題である。本論説の冒頭に述べたが、不飽和帯における水と物質の動きは、観測井戸が存在しないため、簡単には手に取って確認することができないため、広域水循環系全体の中でも捉えどころが難しい。熊本地域の涵養域では特に不飽和帯が厚く、これにあたる部分の取り扱いとは厄介な存在となる。次節では、この“ブラックボックス”ともいえる不飽和帯中の硝酸の挙動について明らかにしようとする取り組みを交え、地下水硝酸汚染研究における今後の方向性に

図14 熊本地域における代表的な (a) 畑作地域および (b) 低地森林地域における土壌水中の硝酸濃度プロファイル (眞崎, 2012 を一部改編)。DFM 解析によって推定された (眞崎, 2012; Shimada et al., 2013), 各年の夏に涵養された水が保持されている深度も合わせて示した。

ついて、筆者が重要だと思われる点をまとめてみたいと思う。

5. これからの展望

冒頭において、今後の地下水管理や汚染対策への鍵として、帯水層が持つ汚染に対する自然バッファ能力の分布や効力を、実測や化学分析を通して科学的に理解した上で、窒素や硝酸の挙動を、地域の水文地質学的特徴や窒素負荷現状を踏まえ予測することが重要であることを述べた。これまで本論説ではその前半部分を扱い、学術的な視点における今後の課題を随所を含めながら説明してきた。また、窒素汚染挙動に対する可視化についても、シミュレーションを用いたモデル構築の重要性を紹介できたと思う。他方、アクセスが困難となる不飽和帯に対しては、窒素の挙動や帯水層への移動パターンについて分からないことが多く、現地点において時間遅れを伴い顕在化、深刻化してきている汚染の行く先について、より確証を持ったモデルを提案するための、解決すべき問題となっている。

この問題を解決する糸口を探るため、ここ数年我々のグループは不飽和帯の水の浸透速度と硝酸性窒素の鉛直分布を調べてきた (眞崎, 2012; Shimada et al., 2013)。降水の浸透プロセスは Andersen and Sevel (1974) によって提唱され、その後各地で応用されてきた (Shimada, 1988; Tsujimura, 1994; Gehrels et al., 1998; 藪崎ほか, 2011)、Displacement Flow Model (置き換え流モデル、以下 DFM と称す) を用いた。DFM の基本概念を簡単に述べると、まず、浸透水が混合せずに、以前に貯留された土壌水がピストン流で地中へ浸透するように、順次押し出される機構を想定する必要がある。一方で、土壌水のトレーサーとして、時間や季節によって規則的に、またはリズムカルに変動する、降水のトリチウムや酸素・水素同位体比について、その時間変化パターン (月ごとであることが望ましい) を把握しておく必要がある。実際には、土壌掘削によって得られる深度ごとの土壌に対して絞った土壌水中のトレーサー濃度と、濃度や同位体比の時系変化が分かっている雨水が押し出しピストン式で地中へ浸透した場合に想定される仮想鉛直プロファイルと

の相互比較を通し、実測とモデルが最もよく一致する浸透速度ならびに涵養量の推定を行う作業となる。ここで、用いる土壌水のトレーサーとして、降水中のトリチウム濃度は現在では濃度が減少したため、かつて行われたように (Shimada, 1988) これを用いることは現在では困難となっている。我々のグループは、その代用として酸素・水素安定同位体比を用い (Tsuji-mura, 1994; Gehrels et al., 1998; 藪崎ほか, 2011), その鉛直変化パターンと降水データの季節変化パターンを比較検討することで、不飽和帯土壌中の涵養・浸透プロセスを推定している。このように、水の浸透速度や年代推定を把握した上で、土壌水中の硝酸濃度プロファイルを検討してきた (眞崎, 2012)。

図14は、上記方法に基づき作成した (眞崎, 2012), 熊本地域内で数十年間継続して施肥が続けられている台地の畑作地域と、過去を通じて窒素負荷が乏しいと考えられる低地森林地域から、それぞれ採取した代表的な土壌コアプロファイルを示している。二つのプロファイルの比較から、畑地土壌は森林土壌と比較して窒素負荷が顕著であること、また、畑地における土壌中の硝酸は不飽和帯を鉛直浸透する過程で濃度が減少するが、それでも深度10 m 付近 (2005年頃に涵養された水が存在する深度) でも100 mg/L 程度の高い硝酸濃度を維持していることが見て取れる。同様の土壌プロファイルは、降水量や土地利用の異なる熊本地域の他の地域でも作り上げられつつある (工藤, 2015)。現在はそれらを統合して、不飽和帯の層厚、気象条件、地域土地利用に応じた、熊本地域全域における地下水涵養量、降下浸透速度、硝酸性窒素の全体像を浮き彫りにしつつある (Shimada et al., 2013)。これまでの見解から、不飽和帯中には特に畑地涵養地において窒素成分が高く残存しており、確かに時間遅れを伴って深部へと浸透していく様相が確認できている。これまでの地下水流動モデル構築では、実測に合った不飽和帯での窒素挙動について、再現性の検討が十分ではなかった可能性が指摘できる。今後は、この不飽和帯中での水の降下浸透速度と窒素移動、挙動も考慮した上で、広域水循環系における水や窒素の挙動を明らかにしていく必要がある。

硝酸汚染の分布や挙動、またその未来予測とい

うのは、今日の最新のシミュレーターを使用すれば如何様にも表現できる時代にあるわけだが、現実との整合性を確認することは簡単ではない。現象理解の観点から解決しなければならない第一級問題として帯水層における硝酸の挙動と不飽和帯における窒素成分の移動における実態把握の二つが挙げられ、こうした場の理解を抜きにしてシミュレーションモデルの実用は困難となる。我々科学者はこのブラックボックスを学術的に説明できるよう研究を進めるべきで、不確定要素を文章で説明できる前にシミュレーション結果が世に独り歩きすることが無いよう、水文学、同位体地球化学、微生物学の研究者と、モデル関連、行政担当者が一体となって情報の共有、理解を推進していくことが一層強く望まれる。一度汚染してしまった地下水を改善へと導くには、問題を受け入れ共存しながらも、現状推移を正しく理解するため、最新の同位体技術を取り入れたモニタリングを怠らず、同時に、シミュレーションの精度を向上させることが、これから益々重要になってくるだろう。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業チーム型研究 (JST, CREST) における研究領域「持続可能な水利用を実現する革新的な技術とシステム」の研究課題「地域水循環機構を踏まえた地下水持続利用システムの構築, H22～H27年度, 代表: 嶋田 純) ならびに科学研究費補助金若手研究 A (no. 24681007, H24-27年度, 代表: 細野高啓) の補助を受けた。ここに記して謝意をあらわす。

引用文献

- 大和田茂人・高津有美・津野田隆敏・大瀧 勝・山竹定雄 (2004): 窒素安定同位体比測定における水試料の濃縮法, 平成16年度愛媛衛環研年報, 7, 47-51.
- 工藤圭史 (2015): 湿潤温帯地域における植生が地下水資源に及ぼす影響の定量的評価—阿蘇外輪山西麓斜面の森林流域と牧草流域における比較観測研究—, 熊本大学自然科学研究科複合新領域科学博士論文.

- 熊本県・熊本市 (1995): 平成6年度熊本地域地下水総合調査報告書. 122pp.
- 熊本県・熊本市 (2005): 熊本地域地下水保全対策調査報告書. 86pp.
- 熊本県地質図編集委員会 (2008): 熊本県地質図 (10万分の1), 富士マイクロ株式会社.
- 熊本市 (2009): 第二次硝酸性窒素削減計画. 59pp.
- 熊本市水道局 (2008): 平成19年度水質試験年報 (第20集). 熊本市水道局, 246pp.
- 小嶋誠一 (2010): 熊本地域における地下水管理行政の現状について. 地下水学会誌, 52 (1), 49-64.
- 齋藤光代・小野寺真一 (2011): 地下水流動は脱窒過程の制御要因か?—現状と今後の課題—. 日本水文科学会, 41 (3), 91-101.
- 嶋田 純・伊藤沙希・荒川祐介・多田和広・森 康二・中野 慧・利部 慎・松永 緑 (2015): 二毛作水田地帯における施肥起源の窒素負荷による浅層不圧地下水中の窒素収支の検討—地下水観測結果を踏まえた地下水シミュレーションに基づいた考察—. 地下水学会誌, 57 (4), 467-482.
- 竹本麻理子・熊澤一正・富森 叡・奥村興平・浅見和弘・大塚康範・松本 聡 (2012): 流域スケールでの水・物質循環の評価—福島県大滝根川流域での窒素を対象とした事例—. 応用地質技術年報, 31, 43-63.
- 田瀬則雄 (2006): 地下水流動系からみた地下水汚染問題—ホットスポット, ホットパス, ホットパスゾーン—. 筑波大学陸域環境研究センター 電子モノグラフ, No. 2, 17-23.
- 田瀬則雄 (2014a): 流域スケールから見る窒素汚染対策—窒素の統合的管理に向けて—. 日本水文科学会誌, 44 (3), 147-154.
- 田瀬則雄 (2014b): 環境中の窒素の流れと地下水の硝酸性窒素汚染. 畜産環境情報, 54, 1-14.
- 登坂博行 (2003): 地圏における水環境モデリング. 地球環境, 8 (1), 37-48.
- 登坂博行・伊藤一誠・蛭原雅之・稲葉薫・伊藤 彰・小島圭二 (1996): 多成分多相型移流拡散モデルによる包括的な地下水汚染解析. 地下水学会誌, 38 (3), 167-180.
- 富家和男・糸満尚貴・松山賢司・柿本竜治・川越保徳 (2011): 熊本都市域における地下水中硝酸性窒素濃度の現状と地理情報システムおよび窒素安定同位体分析による窒素負荷要因の解明. 水環境学会誌, 34 (1), 1-9.
- 中川 啓・齋藤雅彦・舛井和郎 (2011): 同じ流域内の2つのシラス台地における地下水汚染機構についての数値計算. 土木学会論文集 B1 (水工学), 67 (4), 583-588.
- 濱里 学・中元道男・山田文彦・下津昌司・才田 進 (2009): 熊本地域拡大流域圏における統合型水循環モデル構築について. 日本水文科学会学術大会発表要旨集 24, 21-24, 2009年09月.
- 廣畑昌章・小笹康人・松崎達哉・藤田一城・松岡良三・渡辺征紀 (1999): 熊本県 U 町の硝酸性窒素による地下水汚染機構. 地下水学会誌, 41 (4), 291-306.
- 廣畑正章・小笹康人・榮田智志・藤田一城・永村哲也・松下裕・松岡良三 (2000): 熊本県にみられた硝酸性窒素による地下水汚染. 用水と廃水, 42, 19-28.
- 古川博恭・黒田登美雄・東風平朝司 (2000) 阿蘇西麓台地の地下水の光と影—熊本地域の地下水盆管理の問題点と新しい視点—. 応用地質学会九州支部会報, 21, 9-15.
- 細野高啓 (2013): 地下水研究における種々の安定同位比を用いた新たな取り組み. 特集『水環境評価に向けた安定同位体研究の最前線』. 水環境学会誌, 36 (7), 231-236.
- 眞崎美穂 (2012) 土壌プロファイルサンプルによる異なる土地利用がもたらす地下水涵養量変化とそれに伴う硝酸性窒素の挙動. 熊本大学理学部地球環境科学講座卒業論文, 96p.
- 松永 緑・嶋田 純・細野高啓・田原康博・岩佐耕次 (2015) 3次元地下水シミュレーションを用いた宮崎県都城盆地における硝酸性窒素の挙動の可視化. 地下水学会誌, 57 (4), 495-513.
- 森 康二・田原康博・多田和広・登坂博行 (2013): 流域水循環系における還元場形成過程の数値モデリング. 日本地下水学会2014年秋季学術大会公開シンポジウム予稿集, pp. 47-61.
- 森 康二・田原康博・多田和広・細野高啓・嶋田 純・松永 緑・登坂博行 (投稿中): 流域スケールにおける反応性窒素移動過程のモデル化と実流域への適応性検討.
- 安元 純・聖川健斗・細野高啓・廣瀬 (安元) 美奈・松永 緑・嶋田 純・中野拓治 (投稿中) 地下ダム流域における石灰岩帯水層中の脱窒の季節変動特性.
- 安元 純・廣瀬 (安元) 美奈・久手堅剛・宮城雄次・

- 大城要平・聖川健斗・細野高啓・嶋田 純・中野拓治 (2015): 琉球石灰岩帯水層における脱窒に係わる微生物相解析. 日本地下水学会誌, 57 (2), 153-169.
- 藪崎志穂・田瀬則雄・嶋田 純 (2011): 火山灰土層中における土壤水の同位体比プロファイルと地下水涵養量の推定, 地球環境研究, 13, 43-57.
- 楊 宗興 (2014): 流域における窒素除去過程としての脱窒の役割. 日本水文科学会誌, 44 (4), 185-195.
- Andersen, J. and T. Sevel (1974): Six years environmental tritium profiles in the unsaturated zones, Grønhøj, Denmark. In: Isotope Techniques in Groundwater Hydrology, edited by IAEA, v.1, 3-20.
- Aravena, R., S.M. Harrison, J.F. Barker, H. Abercrombie and D. Rudolph (2003): Origin of methane in the Elk Valley coalfield, southeastern British Columbia, Canada. Chemical Geology, 95, 219-227.
- Aravena, R. and W.D. Robertson (1998): Use of multiple isotope tracers to evaluate denitrification in ground water: study of nitrate from a large-flux septic system plume. Ground Water, 36, 975-982.
- Böhlke, J.K. and J.M. Denver (1995): Combined use of groundwater dating, chemical, and isotopic analyses to resolve the history and fate of nitrate contamination in two agricultural watersheds, Atlantic Coastal Plain, Maryland. Water Resource Research, 31, 2319-2339.
- Böhlke, J.K., R. Wanty, M. Tuttle, G. Delin and M. Landon (2002): Denitrification in the recharge area and discharge area of a transient agricultural nitrate plume in a glacial outwash sand aquifer, Minnesota, Water Resource Research, 38, 10-26.
- Böttcher, J., O. Strebel, S. Voerkelius and H. Schmidt (1990): Using isotope fractionation of nitrate-nitrogen and nitrate-oxygen for evaluation of microbial denitrification in a sandy aquifer. Journal of Hydrology, 114, 413-424.
- Casciotti, K.L., D.M. Sigman, M.G. Hastings, J.K. Böhlke and A. Hilkert (2002): Measurement of the oxygen isotopic composition of nitrate in seawater and freshwater using the denitrifier method. Analytical Chemistry, 74, 4905-4912.
- Chapelle, F.H. and L.L. Knobel (1985): Stable carbon isotopes of HCO_3^- in the Aquia Aquifer, Maryland: Evidence for an isotopically heavy source of CO_2 . Ground Water, 23, 592-599.
- Cheung, K., P. Klassen, B. Mayer, F. Goodarzi and R. Aravena (2010): Major ion and isotope geochemistry of fluids and gases from coalbed methane and shallow groundwater wells in Alberta, Canada. Applied Geochemistry, 25, 1307-1329.
- Conrad, R. (2005): Quantification of methanogenic pathways using stable carbon isotopic signatures: a review and a proposal. Organic Geochemistry, 36, 739-752.
- Dogramaci, S.S., A.L. Herczeg, S.L. Schiff and Y. Bone (2001): Controls on $\delta^{34}\text{S}$ and $\delta^{18}\text{O}$ of dissolved sulfate in aquifers of the Murray Basin, Australia and their use as indicators of flow processes. Applied Geochemistry, 16, 475-488.
- Fukada, T., K.M. Hiscock, P.F. Dennis and T. Grischek (2003): A dual isotope approach to identify denitrification in groundwater at a river-bank infiltration site. Water Research, 37, 3070-3078.
- Gehrels, J.C., J.E.M. Peeters, J.J. Devries and M. Dekkers (1998): The mechanism of soil water movement as inferred from ^{18}O stable isotope studies. Hydrological Sciences, 43 (4), 579-594.
- Granger, J. and D.M. Sigman (2009): Removal of nitrite with sulfamic acid for nitrate N and O isotope analysis with the denitrifier method. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 23, 3753-3762.
- Harrison, A.G. and H.G. Thode (1958): Mechanism of the bacterial reduction of sulphate from isotope fractionation studies. Transactions of Faraday Society, 53, 84-92.
- Hosono, T., R. Delin, T. Nakano, M. Kagabu and J. Shimada (2011b): Evolution model of $\delta^{34}\text{S}$ and $\delta^{18}\text{O}$ in dissolved sulfate in volcanic fan aquifers from recharge to coastal zone and through the Jakarta urban area, Indonesia. Science of the Total Environment, 409, 2541-2554.
- Hosono, T., K. Alvarez, I-T. Lin and J. Shimada (2015): Nitrogen, carbon, and sulfur isotopic change during heterotrophic (*Pseudomonas aureofaciens*) and autotrophic (*Thiobacillus denitrificans*) denitrification reactions. Journal of Contaminant Hydrology, 183, 72-81.

- Hosono, T., T. Tokunaga, M. Kagabu, H. Nakata, T. Orishikida, I-T. Lin and J. Shimada (2013): The use of $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{18}\text{O}$ tracers with an understanding of groundwater flow dynamics for evaluating the origins and attenuation mechanisms of nitrate pollution. *Water Research*, 47, 2661–2675.
- Hosono, T., T. Tokunaga, A. Tsushima and J. Shimada (2014): Combined use of $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, and $\delta^{34}\text{S}$ tracers to study anaerobic bacterial processes in groundwater flow systems. *Water Research*, 54, 284–296.
- Hosono, T., C-H. Wang, Y. Umezawa, T. Nakano, S. Onodera, T. Nagata, C. Yoshimizu and I. Tayasu (2011a): Taniguchi M. Multiple isotope (H, O, N, S and Sr) approach elucidates complex pollution causes in the shallow groundwater of the Taipei urban area. *Journal of Hydrology*, 379, 23–36.
- Ichiyanagi, K., J. Shimada, M. Kagabu, S. Saita and K. Mori (2012): Simulations of Tritium age and $\delta^{18}\text{O}$ distributions in groundwater by using surface-subsurface coupling full-3D distribution model (GETFLOWS) in Kumamoto, Japan. In: 39th Congress of the International Association of Hydrogeologists (IAH), Sherton on the Falls Conference Centre, Ontario, Canada.
- Kaplan, I.R. and S.C. Rittenberg (1964): Microbiological fractionation of sulphur isotopes. *Journal of General Microbiology*, 34, 195–212.
- Kaplan, N. and M. Magaritz (1986): A nitrogen-isotope study of the sources of nitrate contamination in groundwater of the pleistocene coastal plain aquifer, Israel. *Water Research*, 20, 131–135.
- Kendall, C. (1998): Tracing nitrogen sources and cycling in catchments. In: *Isotope Tracers in Catchment Hydrology*, edited by Kendall, C., McDonnell, J.J., Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp. 519–576.
- Knowles, R. (1982): Denitrification. *Microbiology Review*, 46, 43–70.
- Korom, S.F. (1992): Natural denitrification in the saturated zone: a review. *Water Resource Research*, 28, 1657–1668.
- Kreitler, C.W. (1979) Nitrogen-isotope ratio studies of soils and groundwater nitrate from alluvial fan aquifers in Texas. *Journal of Hydrology*, 42, 147–170.
- Lansdown, J.M., P.D. Quay, S.L. King (1992): CH_4 production via CO_2 reduction in a temperate bog: A source of ^{13}C -depleted CH_4 . *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 56, 3493–3503.
- Lerner, D.N. (2002): Identifying and quantifying urban recharge: a review. *Hydrogeology Journal*, 10, 143–152.
- Mariotti, A., A. Landreau and B. Simon (1988): ^{15}N isotope biogeochemistry and natural denitrification process in groundwater: Application to the chalk aquifer of northern France. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 52, 1869–1878.
- Martini, A.M., L.M. Walter, J.M. Budai, T.C.W. Ku, C.J. Kaiser, and M. Schoell (1998): Genetic and temporal relations between formation waters and biogenic methane: Upper Devonian Antrim Shale, Michigan Basin, USA. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 62, 1699–1720.
- McIlvin, M.R. and M.A. Altabet (2005): Chemical conversion of nitrate and nitrite to nitrous oxide for nitrogen and oxygen isotopic analysis in freshwater and seawater. *Analytical Chemistry*, 77, 5589–5595.
- Nakai, N. and M.L. Jensen (1964): The kinetic isotope effect in bacterial reduction and oxidation of sulfur. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 28, 1893–1912.
- Ono, M., T. Tokunaga, J. Shimada and K. Ichiyanagi (2013): Application of continuous ^{222}Rn monitor with dual loop system in a small lake. *Ground Water*, 51, 706–713.
- Otero, N., C. Torrentó, A. Soler, A. Menció and J. Mas-Pla (2009): Monitoring groundwater nitrate attenuation in a regional system coupling hydrogeology with multi-isotopic methods: the case of Plana de Vic (Osona, Spain). *Agricultural Ecosystem Environment*, 133, 103–113.
- Ottley, C.J., W. Davison and W.M. Edmunds (1997): Chemical catalysis of nitrate reduction by iron (II). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61, 1819–1828.
- Rees, C.E. (1973): A steady-state model for sulphur isotope fractionation in bacterial reduction processes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 37, 1141–1162.
- Rivett, M.O., S.R. Buss, P. Morgan, J.W.N. Smith and C.D. Bemment (2008): Nitrate attenuation in groundwater: A review of biogeochemical controlling processes.

- Water Research, 42 4215-4232.
- Rye, R.O., W. Back, B.B. Hanshaw, C.T. Rightmire and F.J. Pearson (1981): The origin and isotopic composition of dissolved sulphide in groundwater from carbonate aquifers in Florida and Texas. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 45, 1941-1950.
- Sharma, S. and C.D. Frost (2008): Tracing coalbed natural gas-coproduced water using stable isotopes of carbon. *Ground Water*, 46, 329-334.
- Shimada, J. (1988): The mechanism of unsaturated flow through a volcanic ash. *Hydrology Process*, 43-59.
- Shimada, J. (2012): Sustainable management of groundwater resources for 700,000-plus residents: a practical example of the transboundary management of groundwater resources in the Kumamoto area, Japan. In: *The Dilemma of Boundaries: Toward a New Concept of Catchment*, edited by Taniguchi, M.; Shiraiwa, T., Springer Japan, pp 235-246.
- Shimada, J., K. Ichiyanagi, M. Kagabu, S. Saita, and K. Mori (2012): Evaluation of long-term artificial groundwater recharge through leaky rice paddies with a 500 year history. 39th Congress of the International Association of Hydrogeologists (IAH), Sherton on the Falls Conference Centre, Ontario, Canada.
- Shimada, J., M. Masaki, K. Kudo, T. Hosono, M. Tanoue, Y. Tawara, and K. Mori (2013): Evaluation of the groundwater recharge rate for different land use by using stable water isotopes profiles in unsaturated soil. IAHS-IAPSO-IAPSEL, 22-26 July 2013 in Gothenburg, Sweden.
- Sigman, D.M., K.L. Casciotti, M. Andreani, C. Barford, M. Galanter and J.K. Böhlke (2001): A bacterial method for the nitrogen isotopic analysis of nitrate in seawater and freshwater. *Analytical Chemistry*, 73, 4145-4153.
- Smith, R.L., B.L. Howes and J.H. Duff (1991): Denitrification in nitrate-contaminated groundwater: Occurrence in steep vertical geochemical gradients. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 55, 1815-1825.
- Strelbel, O., J. Böttcher and P. Fritz (1990): Use of isotope fractionation of sulfate-sulfur and sulfate-oxygen to assess bacterial desulfurization in a sandy aquifer. *Journal of Hydrology*, 12, 155-172.
- Strous, M. and M.S.M. Jetten (2004): Anaerobic oxidation of methane and ammonium. *Annual Review of Microbiology*, 58, 99-117.
- Tanaka, K., Y. Funakoshi, T. Hokamura and F. Yamada (2010): The role of paddy rice in recharging urban groundwater in the Shira River Basin. *Paddy and Water Environment*, 8, 217-226.
- Taniguchi, M., J. Shimada and T. Uemura (2003): Transient effects of surface temperature and groundwater flow on subsurface temperature in Kumamoto Plain, Japan. *Physics and Chemistry of the Earth*, 28, 477-486.
- Tosaka, H., K. Itho and T. Furuno (2000): Fully coupled formulation of surface flow with 2-phase subsurface flow for hydrological simulation. *Hydrology Process*, 14, 449-464.
- Tsujimura, M. (1994): Dynamic Behavior of Soil Water Movement in a Headwater Basin. Ph.D. thesis, University of Tsukuba, Japan, 132p.
- Tuttle, M.L.W., G.N. Breit and I.M. Cozzarelli (2009): Processes affecting $\delta^{34}\text{S}$ and $\delta^{18}\text{O}$ values of dissolved sulfate in alluvium along the Canadian River, central Oklahoma, USA. *Chemical Geology*, 265, 455-467.
- Umezawa, Y., T. Hosono, S. Onodera, F. Siringan, S. Buapeng, R. Delinom, C. Yoshimizu, I. Tayasu, T. Nagata and M. Taniguchi (2008): Sources of nitrate and ammonium contamination in ground water under developing Asian megacities. *Science of the Total Environment*, 404, 361-376.
- Wakida, F.T. and D.N. Lerner (2005): Non-agricultural sources of groundwater nitrate: a review and case study. *Water Research*, 39, 3-16.
- Wassenaar, L.I. (1995): Evaluation of the origin and fate of nitrate in the Abbotsford Aquifer using the isotopes of ^{15}N and ^{18}O in NO_3^- . *Applied Geochemistry*, 10, 391-405.
- Widory, D., W. Kloppman, L. Chery, J. Bonnin, H. Rochdi and J-L. Guinamant (2004): Nitrate in groundwater: an isotopic multi-tracer approach. *Journal of Contaminant Hydrology*, 72, 165-188.
- Yamanaka, M. and Y. Kumagai (2006): Sulfur isotope constraint on the provenance of salinity in a confined aquifer system in the southwestern Nobi Plain, central Japan. *Journal of Hydrology*, 325, 35-55.

Zeng, X.Y., Hosono, T., Yoshida, C., Ohta, H., Niidome, T., Shimada, J. and Morimura, S. (2014) Phylogenetic analysis and distribution of bacterial community in groundwater in Kumamoto prefecture. The 66th

Annual Meeting of the Society for Biotechnology, Japan, p.233 (Sapporo, Japan).

(受付：2015年2月25日, 受理：2015年4月15日)