

3 調査研究

3・1 報 文

1) LC/MS/MS を用いたクワズイモ中シュウ酸の

迅速分析法の検討

西名武士 村川 弘 宇梶徳史 濱本 愛
松本理世 増永ミキ 野田康平

要旨

食中毒の原因を迅速に特定するため、試料に 10%塩酸又は水を加え、ろ過後 LC/MS/MS を用いて定量するクワズイモ中シュウ酸の迅速分析法の検討を行った。また、上記分析法について、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」に基づく妥当性評価試験を行ったところ、目標値を満たす良好な結果が得られた。

キーワード：LC/MS/MS，クワズイモ，シュウ酸，食中毒

はじめに

クワズイモは、四国南部から 中国南部，東南アジアの亜熱帯地域に分布しているサトイモ目サトイモ科クワズイモ属の常緑性多年草である。また，クワズイモは，不溶性のシュウ酸カルシウムを多量に含んでおり，喫食した場合，この針状結晶が粘膜に刺さり，口腔粘膜に激しい炎症を起こすなどの中毒症状を発症すると考えられている^{1, 2)}。

クワズイモは，葉及び葉柄の様子がサトイモとよく似ていることから，誤って喫食することによる食中毒事例が後を絶たず，過去10年間で40人以上の中毒患者が発生している¹⁾。このため，食中毒の原因食材としてクワズイモの分析が必要となるケースは多く，本県においても，平成27年9月に，クワズイモをサトイモと誤認して味噌汁として喫食したことによる食中毒事例が発生し，その対応が求められた。

クワズイモが原因と疑われる食中毒の発生時には，食品残品の確認により，形態形質から原因の特定が可能なこともあるが，クワズイモが調理過程を経て原型をとどめていないことも想定される。この場合，顕微鏡観察によるシュウ酸カルシウムの針状結晶の確認が

有効だが，サトイモ科の植物にはシュウ酸カルシウムの針状結晶が存在することがあり，これのみでは原因の特定は困難であると考えられる。なお，クワズイモは他のサトイモ科の植物に比べ不溶性シュウ酸の含有量が多く，また，そのほとんどがシュウ酸カルシウムとして存在している³⁾。このため，理化学試験により不溶性シュウ酸の含有量を明らかにすることは，食中毒の原因の特定において重要であると考えられる。

クワズイモ中の不溶性シュウ酸の分析は，シュウ酸の分析によって不溶性シュウ酸濃度を推定する手法が多く用いられ，シュウ酸の分析法としては，酵素法⁴⁾，高速液体クロマトグラフ法^{5, 6)}，ガスクロマトグラフ法⁶⁾，イオンクロマトグラフ法³⁾，キャピラリー電気泳動法⁷⁾などが報告されている。なお，これらの手法は，用いられる測定機器の性質上，迅速性，感度及び選択性の面で問題があることが多い。

そこで，今回，クワズイモが原因と疑われる食中毒の発生時に，迅速に原因の特定が可能な分析法の開発を目的に，高感度，かつ，高選択性のLC/MS/MSを用いたクワズイモ中シュウ酸の迅速分析法の検討を行った。また，本法について，「食品中に残留する農薬等

に関する試験法の妥当性評価ガイドライン⁸⁾（以下「ガイドライン」という。）に基づく妥当性評価試験を行ったところ、良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1 試薬等

1.1 標準品

シュウ酸：シュウ酸二水和物（和光純薬工業製特級）
シュウ酸カルシウム：シュウ酸カルシウム一水和物（和光純薬工業製特級）

1.2 その他の試薬等

アセトニトリル：和光純薬工業製（HPLC 用）
塩酸：関東化学製（有害金属測定用）
水：精製水
ガラスロート：IWAKI 製 11G2
ろ過フィルター：Agilent 製 (Econofltr PTFE, 0.2 μ m)
バイアル：GL Sciences 製(ポリプロピレン製, 1.5mL)

1.3 標準原液

シュウ酸二水和物を秤量後、水に溶解して 1000mg/L の標準原液を調製した。

1.4 標準溶液

標準原液を 10, 50, 100, 250 及び 500 μ g/L になるように、75%アセトニトリル溶液で希釈したものを用いた。

2 試料

2.1 検討用試料

サトイモをフードプロセッサーで細切したものを用いた。

2.2 妥当性評価試験用試料

過去のクワズイモ食中毒事例において検出されたシュウ酸濃度を参考に、上記 2.1 で示した試料に、シュウ酸又はシュウ酸カルシウムの標準品を 2500 μ g/g とするよう添加し、30 分間放置したものを用いた。

3 LC/MS/MS 測定条件

LC：Nexera X2（島津製作所社製）

- ・注入量：5 μ L
- ・分離カラム：Merck 社製 ZIC®-pHILIC (2.1 \times 50mm, 5 μ m)
- ・カラムオープン温度：60 $^{\circ}$ C
- ・移動相：10mM 酢酸アンモニウム含有水アセトニトリル溶液 (25:75)
- ・流量：0.6mL/min

MS/MS：TRIPLEQUAD5500(ABSCIEX 社製)

- ・イオン化法：ESI(negative)

- ・イオン化条件：CUR(20psi),CAD(7psi),TEM(650 $^{\circ}$ C), GAS1(80psi),GAS2(70psi),IS(-4500V),EP(-10V)
- ・分析モード：MRM（測定条件は表 1 のとおり。）

4 検討用分析法

4.1 不溶性シュウ酸の算出法

総シュウ酸（不溶性シュウ酸塩及び可溶性シュウ酸塩由来のシュウ酸）及び可溶性シュウ酸（可溶性シュウ酸塩由来のシュウ酸）の濃度から、不溶性シュウ酸（ \equiv シュウ酸カルシウム）を算出することとした。

$$\text{不溶性シュウ酸} = \text{総シュウ酸} - \text{可溶性シュウ酸}$$

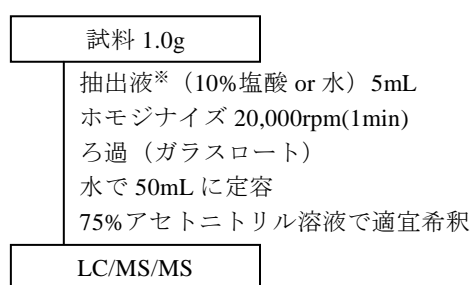
4.2 前処理法

小坂ら³⁾の報告を参考に、総シュウ酸と可溶性シュウ酸を個別に抽出する下記前処理法を考案し、分析法の検討を行った。

2 で調製した試料 1.0g に抽出液 5mL を加えてホモジナイズし、ガラスロートを用いてろ過後、水で 50mL に定容する。これを 75%アセトニトリル溶液で適宜希釈する。なお、抽出液は、総シュウ酸の場合は 10%塩酸を用い（以下「総シュウ酸系」という。）、可溶性シュウ酸の場合は水を用いる（以下「可溶性シュウ酸系」という。）（図 1）。

表 1 MS/MS 測定条件

Compound	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	CE (V)
oxalic acid	89.0	60.8	-45	-12
	89.0	45.0	-40	-12
	89.0	35.0	-40	-12



※総シュウ酸の場合は 10%塩酸、可溶性シュウ酸の場合は水を用いる。

図 1 前処理フロー

結果及び考察

1 測定条件の検討

まず、MS 部の測定条件を決定するため、シュウ酸標準溶液 50 μ g/L をインフュージョンにより直接 MS 部に導入し、イオン化条件を検討した。その結果、ESI 法、ネガティブモードで [M-H]⁻の脱プロトン化イオンが出現し、表 1 に示す条件が最適となった。

次に、HPLC のカラム及び移動相条件の検討を行った。シュウ酸は低分子量高極性化合物 (図 2) であり、HPLC 分析で広く用いられる逆相クロマトグラフィーではカラムでの保持は困難である。なお、近年、シュウ酸を親水性相互作用クロマトグラフィー (以下「HILIC」という。) を用いて分析する手法が報告⁹⁾¹⁰⁾されている。また、当所では、過去に、HILIC カラムを用いたヒスタミン等の低分子量高極性化合物の分析法を報告^{11~13)}していることから、これらを参考に Merck 社製 ZIC-pHILIC を用い、移動相条件の検討を行った。

その結果、シュウ酸は、水:アセトニトリル (25:75) 及び酢酸アンモニウム 10~200mM 程度の存在下で良好な保持が得られるが、脱プロトン化イオンをモニターしているため、酢酸アンモニウム濃度が上昇するとイオン化抑制により感度が低下する傾向を示した。また、モニターしているイオンの範囲が 35~89m/z と比較的小さく、ベースライン変動の影響を受けやすいため、グラジエント分析では測定が困難であった。このことから、保持と感度を両立させるため、移動相は 10mM 酢酸アンモニウム含有水アセトニトリル (25:75) 溶液を用い、イソクラテック分析を行うこととした。本条件で測定したシュウ酸のクロマトグラフを図 3 に示す。

なお、シュウ酸のピークはテーリングが大きかったため、測定再現性を確認するため繰り返し測定 (500µg/L, n=5) による評価を行った。また、定量範囲を確認するため、シュウ酸の各濃度の混合標準液 (10, 50, 100, 250 及び 500µg/L) を本条件で測定し、得られた検量線の相関係数及び定量限界に対応する濃度 (10µg/L, 以下「下限値」という。) から得られるピークの S/N 比を求めた。これらの結果を表 2 及び図 4 に示す。

表 2 に示すとおり、保持時間の変動 (RSD%) は 0.21%、ピーク面積の変動 (RSD%) は 0.22% であり、食中毒の原因検索分析に用いる測定条件としては十分な再現性が得られた。なお、測定範囲 10~500µg/L において良好な相関 (r=1.0000) 及び直線性が得られ、また、下限値の S/N 比がガイドラインに示されている定量限界の指標値 (S/N 比 ≥ 10) を満たしていることから、10~500µg/L の範囲で定量が可能であることが確認できた。

表 2 測定再現性等の評価結果

Compound	Rtime		Area		Correlation coefficient (r)	Signal/Noise ratio
	Ave.	RSD(%)	Ave.	RSD(%)		
Oxalic acid	4.05	0.21	4.3E+05	0.22	1.0000	26.4

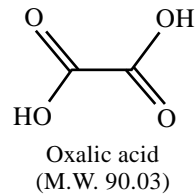


図 2 シュウ酸の構造式

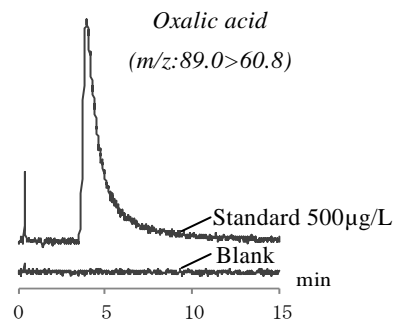


図 3 シュウ酸のクロマトグラフ

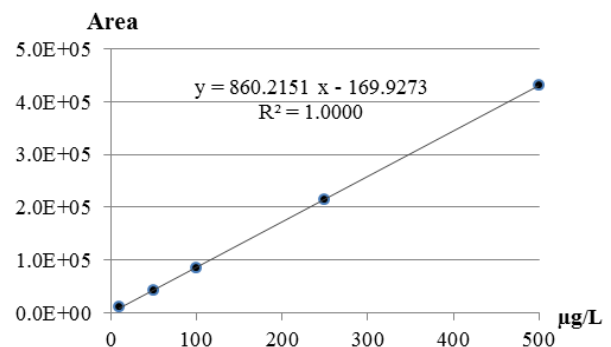


図 4 シュウ酸の検量線

2 希釈倍率の検討

LC/MS/MS を用いた分析では、試験溶液中の夾雑物の影響により、目的成分のイオン化抑制又はイオン化促進 (以下「マトリックス効果」という。) が起こり、その測定強度が変動するため、精製操作を行わない前処理法においては定量分析の障害となり易い。したがって、今回用いる前処理法も、精製操作を行わない簡易なものであることから、マトリックス効果による定量障害が懸念された。

なお、マトリックス効果による定量障害を防止する手法として、マトリックス一致標準溶液を用いたマトリックス検量線による定量法が知られているが、目的物質の濃度が既知のマトリックス用検体の確保が必要

であるため、食中毒の原因検索分析法としては現実的ではない。

一方で、一般的にマトリックス効果は、試験溶液中のマトリックス量が多いほど大きくなるため、試験溶液の希釈により試料由来のマトリックス効果を低減することができると考えられた。

そこで、クワズイモと同科のサトイモを用い、5.2 前処理法中の希釈段階において、希釈倍率を変化（最終希釈倍率として 500, 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000 倍）させ、マトリックス効果の検証を行い、最適な希釈倍率の検索を行うこととした。

なお、前処理は、総シュウ酸系では抽出液に 10%塩酸を用い、また、可溶性シュウ酸系では抽出液に水を用いるため、この抽出溶媒の違いによって LC/MS/MS に注入する試験溶液の組成が異なることになる。したがって、試料由来のマトリックス効果の他に、抽出溶媒由来のマトリックス効果の検証も必要であると考えられた。このため、各系のサトイモ抽出液を 1mL 分取し、シュウ酸濃度 250 μ g/L となるように標準溶液を添加したもの（以下「マトリックス標準」という。）と、別途同操作を行ったブランクに、同様に標準溶液を添加したもの（以下「ブランク標準」という。）をそれぞれ LC/MS/MS にて測定し、ピーク面積の比（%、以下「強度比」という。）を算出することにより、試料由来及び抽出溶媒由来のマトリックス効果の検証を行うこととした。マトリックス標準とブランク標準の関係を表 3 に、それぞれの強度比を図 5 に示す。

まず、試料由来のマトリックス効果を検証するため、抽出系ごとにマトリックス標準（総シュウ酸系：TM、可溶性シュウ酸系：SM）とブランク標準（総シュウ酸系：T、可溶性シュウ酸系：S）を比較した。その結果、それぞれ 500 倍及び 1,000 倍希釈では、TM/T 及び SM/S が 110~120% 程度となり、正のマトリックス効果が見られた。なお、2,000 倍希釈以上では強度比はほぼ 100% となり、マトリックス効果は無視できると考えられた。

次に、抽出溶媒由来のマトリックス効果を検証するため、T と S を比較したところ、500 倍から 5,000 倍希釈では、T/S が 50%~80% 程度となり、負のマトリックス効果が見られた。なお、希釈倍率 10,000 倍以上では強度比はほぼ 100% となり、マトリックス効果は無視できると考えられた。

さらに、試料と抽出溶媒由来双方のマトリックス効果を検証するため、TM と S を比較したところ、上記抽出溶媒由来のマトリックス効果と同様の傾向が見られた。

以上により、今回の前処理法では、希釈倍率が低い

場合は試料由来及び溶媒抽出由来のマトリックス効果があり、特に比較的溶媒由来のマトリックス効果が大きいことが明らかになった。一方で、希釈倍率を 10,000 倍以上にすると、その影響は無視でき、マトリックス検量線によらない定量が可能であることが示唆された。このことから、前処理に際しては、検出感度を考慮し、10,000 希釈を採用することとした。

また、S は、標準原液を単に 75%アセトニトリルで希釈したものと溶媒組成が等しいことから、75%アセトニトリルで希釈した標準溶液を用いることにより、総シュウ酸及び可溶性シュウ酸の定量が可能であると考えられた。

なお、試料を 10,000 倍希釈した場合の定量下限値は、クワズイモ中のシュウ酸濃度として 100 μ g/g となる。これは、過去のクワズイモ食中毒事例において検出された総シュウ酸濃度が 1,000~5,000 μ g/g 程度^{3, 5, 7)}であることから、その数 10 分の 1 であり、クワズイモを対象とした分析法としては十分と考えられる。

表 3 希釈倍率検討用標準液一覧

Name	Type		Extraction
	Oxalic acid	Sample	
TM	Total	Matrix	10% HCl
T	Total	Blank	10% HCl
SM	Soluble	Matrix	H ₂ O
S	Soluble	Blank	H ₂ O

Concentration of oxalic acid : 250 μ g/L
Solvent composition : 75% ACN

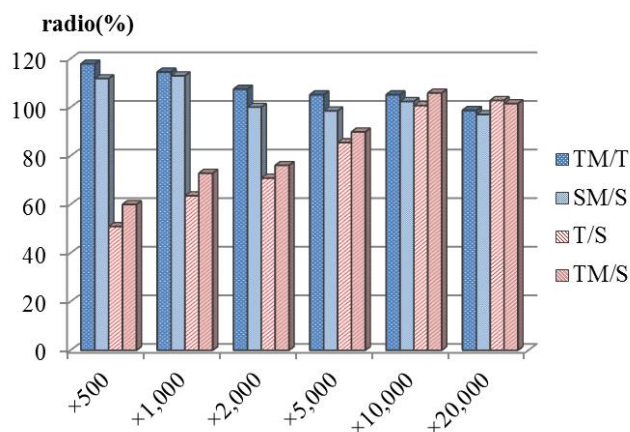


図 5 マトリックス効果の検証 (n=1)

以上の検討結果を踏まえ、クワズイモ中シュウ酸の迅速分析法（以下「本法」という。）を作成した（図 6）。

試料 1.0g
抽出液* (10%塩酸 or 水) 5mL ホモジナイズ 20,000rpm(1min) ろ過 (ガラスロート) 水で 50mL に定容 75%アセトニトリル溶液で 200 倍希釈 (最終希釈倍率 10,000 倍) ろ過 (フィルター)
LC/MS/MS

※総シュウ酸系：10%塩酸 可溶性シュウ酸系：水

図 6 分析法フロー

3 妥当性評価試験

本法について、2.2 妥当性評価試験用試料を用いて、ガイドラインに基づき、分析者 5 名、2 併行での添加回収試験を実施し、真度、併行精度及び室内精度を算出した。なお、添加回収試験において添加する標準品は、不溶性シュウ酸としてシュウ酸カルシウムを、可溶性シュウ酸としてシュウ酸を用い、それぞれを添加した試料について、総シュウ酸及び可溶性シュウ酸の定量を行った。また、試料に用いたサトイモにも、不溶性シュウ酸及び可溶性シュウ酸が含まれているため、真度等の算出に当たっては、それらの値を減算した値を用いた。その結果を表 4 に示す。

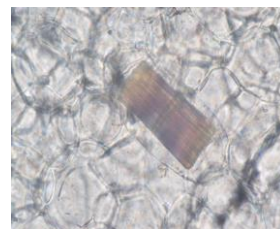
表 4 に示すとおり、総シュウ酸系においてシュウ酸カルシウムを添加した場合には、真度 (87.8%)、併行精度 (2.2%) 及び室内精度 (3.0%)、シュウ酸を添加した場合には、真度 (87.2%)、併行精度 (3.0%) 及び室内精度 (3.0%) となり、双方ともガイドラインに示される添加濃度 0.1mg/kg<の目標値 (真度：70～120%，併行精度：10%>，室内精度：15%>) を満たす良好な結果が得られた。このことから、総シュウ酸系では、総シュウ酸(不溶性シュウ酸+可溶性シュウ酸)

シュウ酸カルシウムを添加した場合には、真度 (0.0%) となり、可溶性シュウ酸系では不溶性シュウ酸は抽出されなかった。このことから、可溶性シュウ酸系では、可溶性シュウ酸を選択的に分析することが可能であると考えられる。

なお、本法を用いて、本県でのクワズイモ食中毒発生時に搬入された検体(未調理クワズイモの根茎部分、図 7 及び 8 参照) を、分析 (n=5) したところ、不溶性シュウ酸として 1000µg/g (RSD%：3.4%)、可溶性シュウ酸として 330µg/g (RSD%：6.3%) が検出され、過去のクワズイモ食中毒事例の報告値と同等であったとともに、良好な再現性が得られた。



図 7 クワズイモ写真



(防御的針状結晶)



(非防御的針状結晶)

図 8 細胞の顕微鏡観察 (×400, 透過処理：組織切片に 2N-NaOH 水溶液 1mL を加え 2 時間浸漬¹⁴⁾)。

表 4 妥当性評価試験結果

Type	Extraction	Compound	Colocasia esculenta		
			Trueness (%) ^{*1}	RSDr (%) ^{*2}	RSDwr (%) ^{*3}
Total	10%HCl	Calcium oxalate	87.8	2.2	3.0
		Oxalic acid	87.2	3.0	3.0
Soluble	H ₂ O	Calcium oxalate	0.0	—	—
		Oxalic acid	94.6	2.6	3.4

*1 Mean recovery rates(%)

*2 RSD(%) of repeatability

*3 RSD(%) of within-laboratory repeatability(n=2×5)

の分析が可能であると考えられる。

また、可溶性シュウ酸系においてシュウ酸を添加した場合には、真度 (94.6%)、併行精度 (2.6%) 及び室内精度 (3.4%) となり良好な結果が得られたが、シ

ま と め

食中毒の迅速な原因特定に資するため、試料に 10% 塩酸又は水を加え、ろ過後 LC/MS/MS を用いて定量するクワズイモ中シュウ酸の迅速分析法の検討を行った。

また、本法について、サトイモを用いた妥当性評価試験を行ったところ、ガイドラインの目標値を満たす良好な結果が得られ、総シュウ酸及び可溶性シュウ酸の分析が可能であった。

本法は、マトリックス一致標準溶液を用いないため、突発的に発生する食中毒に対して対応が可能であり、また、使用する溶媒等が少なく分析にかかる費用も安価で、かつ、操作が簡便なため、その前処理時間も1検体当たり30分程度と短いことから、クワズイモを原因とする食中毒発生時の原因検索分析法として非常に有効な手法であると考えられる。

文 献

- 1) 厚生労働省：自然毒のリスクプロファイル，http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryo/shokuhin/syokuchu/poison/（2016/7/1）。
- 2) 後藤哲久，佐藤吉朗，吉田充：食品危害要因その実態と検出法，（株）テクノシステム，343-349（2014）。
- 3) 小坂妙子，山本雄三，小野和則，武田攻：宮崎県衛生環境研究所年報，11，77-80（1999）。
- 4) 厚生労働省：平成12年3月30日付け厚生省生活衛生局食品化学課長通知，衛化第15号。
- 5) 熊野眞佐代，石飛栄二，石崎修造，八並誠：長崎県衛生公害研究所報，46，83-85（2000）。
- 6) 関口昭博，吉野功：群馬県産業技術センター研究報告，127，26-30（2013）。
- 7) 森岡浩文，樺山恭子，小玉義和：宮崎県衛生環境研究所年報，20，91-93（2008）。
- 8) 厚生労働省：平成22年12月24日付け厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知，食安発1224第1号。
- 9) MERCK KGaA：“A Practical Guide to HILIC”，p.22（2008）。
- 10) GL Sciences：LC Technical Note，109，（2012）。
- 11) 吉田達雄，濱田寛尚，吉元秀和，飛野敏明，村川弘：熊本県保健環境科学研究所報，40，20-24（2010）。
- 12) Tatsuo Yoshida, Hirotohi Hamada, Hiroshi Murakawa, Hidekazu Yoshimoto, Toshiaki Tobino, Kei Toda：ANALYTICAL SCIENCES，28，179-182（2012）。
- 13) 西名武士，飛野敏明，宇梶徳史，濱本愛，松本理世，増永ミキ，野田康平，村川弘：熊本県保健環境科学研究所報，44，38-47（2014）。
- 14) 田中政信，中島寿亀，森欣也：園芸学会雑誌，72，162-168（2003）。

2) 泗水・西合志地区における地下水中の硝酸性窒素と

他の無機成分との関係

永田 武史* 小林 亜由美 渡邊 和博 木庭 亮一

要 旨

菊池地域の菊池市泗水地区及び合志市西合志地区で井戸水の調査を実施し、硝酸性窒素と他の無機成分との関連を調査した。泗水西部及び西合志西部では井戸水中の硝酸性窒素濃度と硫酸イオン濃度及び臭化物イオン／塩化物イオン比に相関関係が見られた。一方、泗水東部では硝酸性窒素濃度と塩化物イオン濃度に相関関係が見られた。これらの結果より、地区によって硝酸性窒素の由来が異なることが示唆された。

キーワード：地下水，硝酸性窒素，相関係数，臭化物イオン

はじめに

菊池地域を含む熊本市周辺では、生活用水のほぼ100%を地下水に依存しているが、過剰な施肥や家畜排泄物等の不適切な処理等が原因と推測される、地下水の硝酸性窒素濃度の上昇がみられ、環境基準を超過する事例も見られる^{1),2)}。硝酸性窒素による地下水の汚染の状況を把握するには、湧水や井戸水などの地下水を調査し、地下水中の硝酸性窒素濃度の分布を把握することが不可欠である。

熊本県では平成7年以降、地下水における硝酸性窒素濃度の調査を実施するとともに^{3)~8)}、平成16年度に熊本地域硝酸性窒素削減計画を策定し汚染の拡大を防止する対策に取り組んできた。

硝酸性窒素による地下水汚染の実態を把握し、その原因を追究することは地域の地下水環境を保全し、地域住民の健康を保護するうえで非常に重要である。

筆者らはこれまで、菊池地域の湧水及び地下水の調査を実施し、硝酸性窒素、他の無機成分及び井戸深さとの関係について検討を行ってきた。その結果、菊池市旭志地区では、硝酸性窒素の汚染が第一帯水層にとどまり、深さ50mを超えるような深井戸では第二帯水層の地下水によって硝酸性窒素が希釈されている可能性を示唆した⁹⁾。

今回、平成27年度は、地下水概況調査と連携する形

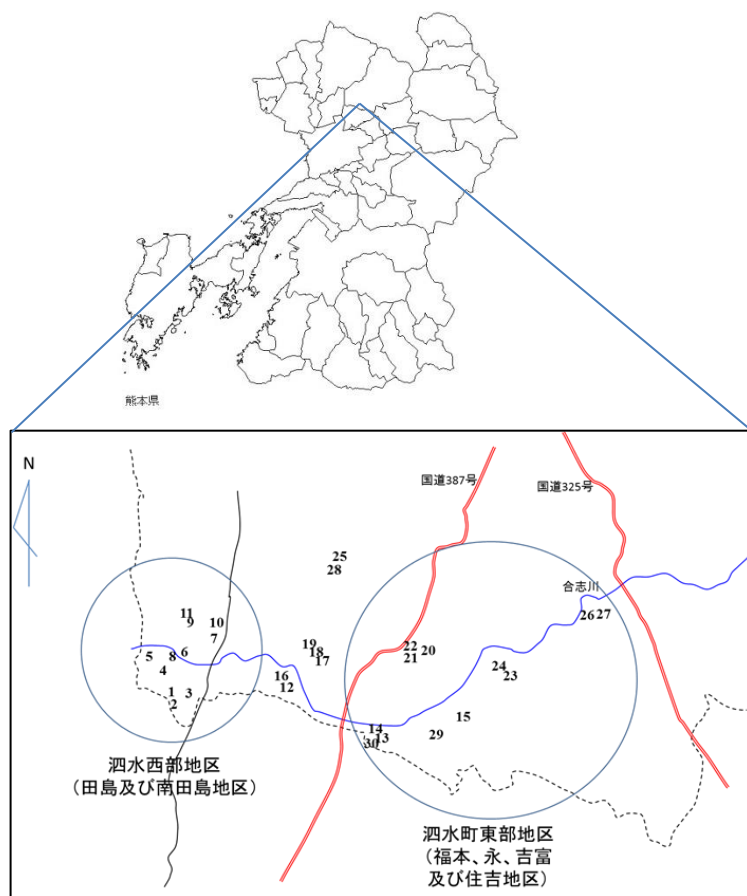


図1 泗水地区調査地点

*現環境生活部環境局循環社会推進課

で、菊池市泗水地区（旧泗水町）及び合志市西合志地区（旧西合志町）での調査を実施し、硝酸性窒素と他の無機成分との関連を調べたので報告する。

調査地点

1 泗水地区

図1に調査地点を示す。また、表1に地点の概要を示す。地点数は30地点であり、全て井戸水であった。平成28年1月18日、1月21日に採水された。

表1 泗水地区調査地点概要

No.	井戸深さ [m]	ストレーナー位置 [m]	海拔 [m] (地理院地図から推定)
1	30	15	45
2	30	18	49
3	不明	不明	60
4	45	43	46
5	40	16	39
6	100	不明	39
7	15	10	45
8	6	不明	39
9	不明	不明	43
10	50	30	56
11	不明	不明	44
12	20	4	45
13	60	不明	51
14	50	4	50
15	40	不明	64
16	4	4	44
17	40	8	48
18	50	12	49
19	不明	不明	50
20	30	不明	75
21	不明	不明	77
22	不明	不明	67
23	8	不明	67
24	12	10	65
25	47	25	62
26	不明	不明	74
27	13	11	77
28	5	4	52
29	60	38	61
30	50	不明	59

※ 調査地点は全て井戸水

2 西合志地区調査

図2に調査地点の概略図を示す。また、表2に地点の概要を示す。地点数は30でありすべて井戸水であった。平成28年1月28日、2月1日及び2月4日に採水された。

調査項目及び分析方法

調査項目は、pH、EC（導電率）、陽イオン（Na⁺、NH₄⁺、K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺）、陰イオン（F⁻、Cl⁻、NO₂⁻、Br⁻、

NO₃⁻、SO₄²⁻、HCO₃⁻、PO₄³⁻）、重金属類（21種類）であった。

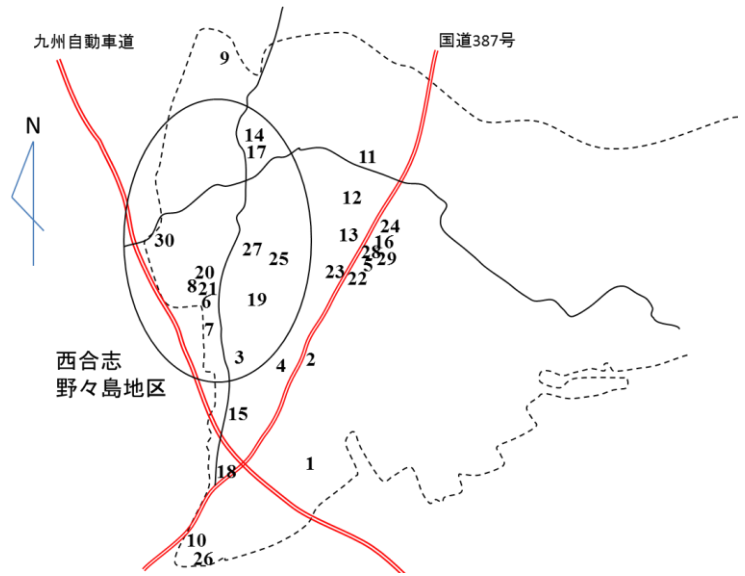


図2 西合志地区調査地点

表2 西合志地区調査地点概要

No.	井戸深さ [m]	ストレーナー位置 [m]	海拔 [m] (地理院地図から推定)
1	68	44-45, 49-50	45
2	97	67-68	49
3	80	50-51	60
4	120	不明	46
5	60	不明	39
6	75	65-70	39
7	75	65-70	45
8	100	65-70	39
9	50	7-17	43
10	27	20-27	56
11	100	64-90	44
12	100	15-32, 43-72, 84-93	45
13	23	10-20	51
14	80	50-65	50
15	100	50-100	64
16	100	50-100	44
17	70	26-34	48
18	100	不明	49
19	68.5	不明	50
20	80	不明	75
21	86	不明	77
22	84	不明	67
23	80	45-67	67
24	90	65-90	65
25	100	80-95	62
26	72	24	74
27	100	88-96	77
28	80	不明	52
29	80	不明	61
30	80	不明	59

※ 調査地点は全て井戸水

pH, EC, ORP は電極法, HCO_3^- , PO_4^{3-} を除くイオン成分はイオンクロマトグラフ法, HCO_3^- は硫酸滴定法, PO_4^{3-} はモリブデン青法により求めた。重金属成分については, 誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) 法で分析を行った。

表 3 各成分の平均値, 最大値及び最小値 (泗水地区)

調査日	H28.1.18, H28.1.21		
	平均値	最大値	最小値
水温 (°C)	18.3	21.5	16.0
pH	6.9	7.8	6.0
EC (μ S/cm)	251	394	155
Na ⁺ (mg/L)	13.9	52.4	7.5
NH ₄ ⁺ (mg/L)	< 0.1	< 0.1	< 0.1
K ⁺ (mg/L)	7.2	25.3	2.1
Ca ²⁺ (mg/L)	18.2	36.2	7.6
Mg ²⁺ (mg/L)	6.4	14.0	1.6
F ⁻ (mg/L)	0.06	0.41	0.01
Cl ⁻ (mg/L)	11.3	37.3	4.4
NO ₂ ⁻ (mg/L)	< 0.03	< 0.03	< 0.03
Br ⁻ (mg/L)	0.045	0.092	0.013
NO ₃ ⁻ (mg/L)	27.4	66.1	5.5
SO ₄ ²⁻ (mg/L)	17.8	56.9	1.7
HCO ₃ ⁻ (mg/L)	76.4	137.2	30.8
PO ₄ ³⁻ (mg/L)	0.051	0.161	0.004
NO ₃ -N (mg/L)	6.2	14.9	1.2
Li (μ g/L)	3.4	40.2	0.1
B (μ g/L)	34.6	267.6	4.3
Al (μ g/L)	10.0	65.1	0.5
V (μ g/L)	3.5	21.8	0.5
Cr (μ g/L)	0.16	0.60	0.00
Mn (μ g/L)	4.38	92.17	0.00
Fe (μ g/L)	20.2	242.1	0.0
Ni (μ g/L)	0.14	0.57	0.01
Cu (μ g/L)	5.01	15.07	0.15
Zn (μ g/L)	4.78	32.49	1.03
As (μ g/L)	7.64	186.4	0.00
Se (μ g/L)	0.18	0.64	0.00
Rb (μ g/L)	13.4	34.4	4.4
Sr (μ g/L)	210.2	425.3	94.5
Mo (μ g/L)	0.15	0.41	0.01
Cd (μ g/L)	0.00	0.01	0.00
Sb (μ g/L)	0.04	0.09	0.01
Cs (μ g/L)	0.05	0.25	0.00
Ba (μ g/L)	16.6	53.0	2.2
Pb (μ g/L)	0.33	1.32	0.01
U (μ g/L)	0.34	1.45	0.00

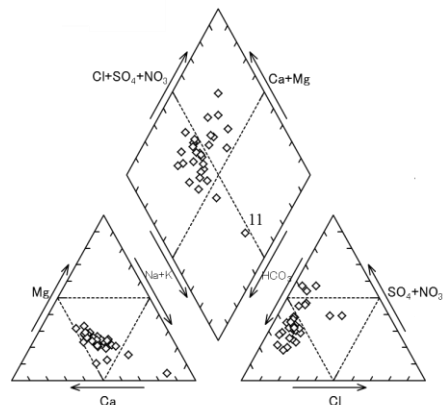


図 3 トリリニアダイアグラム (泗水地区)

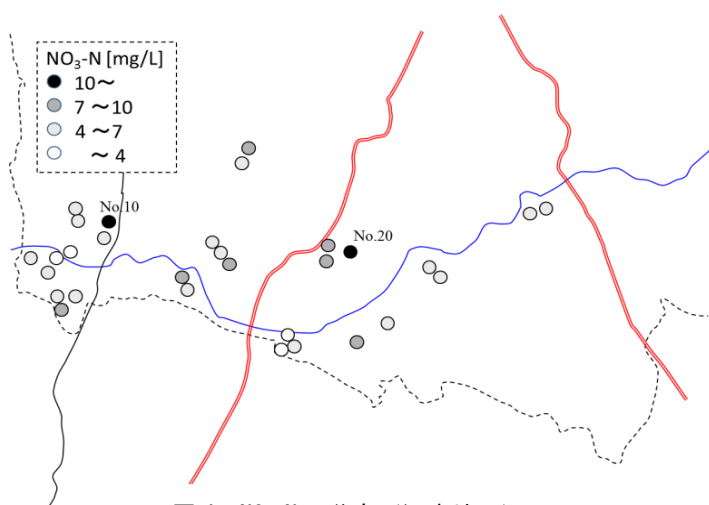


図 4 NO₃-N の分布 (泗水地区)

結果及び考察

1 泗水地区調査

1.1 水質の概要 (トリリニアダイアグラム)

各成分の分析結果の平均値, 最大値, 最小値を表 3 に示す。また, トリリニアダイアグラムを図 3 に示す。トリリニアダイアグラムが示すように, 大部分の地点は通常の地下水が多く分類されるアルカリ土類炭酸塩型あるいはアルカリ土類非炭酸塩型を示した。しかし, 地点 No.11 はアルカリ炭酸塩型を示した。このことから No.11 は, 地下における滞留時間が比較的長い深層地下水が含まれている可能性が示唆された。

1.2 硝酸性窒素の分布について

硝酸性窒素 (NO₃-N) の濃度の分布を図 4 に示す。

NO₃-N が環境基準 (10mg/L) より高かったのは 2 地点 (No. 10, No. 20) であり, 7~10mg/L の範囲にあったのが 7 地点 (No. 2, No. 16, No. 17, No. 21, No. 22, No. 25, No. 29) であった。

表 4 各成分間の相関係数（泗水地区，斜字は 0.8 以上）

	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	F ⁻	Cl ⁻	Br ⁻	SO ₄ ²⁻	HCO ₃ ⁻	Li	B	V	As	Se	Sr	PO ₄ ³⁻	NO ₃ -N
Na ⁺	0.022	-0.093	-0.091	0.893	0.319	0.423	0.269	0.394	0.956	0.722	0.115	0.922	0.137	-0.093	0.636	-0.056
K ⁺		0.013	0.062	-0.050	0.020	0.083	0.189	0.216	-0.099	-0.019	0.374	-0.124	0.099	0.510	0.101	-0.050
Ca ²⁺			0.943	-0.303	0.404	0.519	0.236	0.611	-0.212	0.056	-0.220	-0.294	0.231	0.705	-0.241	0.611
Mg ²⁺				-0.307	0.381	0.595	0.260	0.612	-0.194	0.040	-0.174	-0.287	0.289	0.677	-0.220	0.596
F ⁻					0.182	0.158	0.086	0.276	0.953	0.664	0.156	0.880	-0.001	-0.318	0.712	-0.285
Cl ⁻						0.322	0.398	0.150	0.214	0.060	0.004	0.171	-0.105	0.374	0.004	-0.082
Br ⁻							0.554	0.415	0.315	0.520	0.019	0.245	0.580	0.441	0.060	0.387
SO ₄ ²⁻								-0.130	0.134	0.572	-0.071	0.124	0.388	0.439	-0.060	-0.011
HCO ₃ ⁻									0.335	0.247	0.157	0.189	0.210	0.328	0.389	0.326
Li										0.700	0.125	0.955	0.076	-0.259	0.680	-0.125
B											-0.024	0.653	0.449	0.068	0.438	0.059
V												0.083	0.180	-0.221	0.440	-0.494
As													0.062	-0.284	0.588	-0.061
Se														0.163	0.049	0.186
Sr															-0.388	0.476
PO ₄ ³⁻																-0.324

表 5 NO₃-N 検出井戸周辺における NO₃-N と各成分の相関係数（泗水地区）

	No. 10周辺 11地点	No. 20周辺 12地点
Na ⁺	-0.029	0.424
K ⁺	-0.298	0.176
Ca ²⁺	0.503	0.709
Mg ²⁺	0.404	0.771
F ⁻	-0.286	-0.522
Cl ⁻	-0.433	0.059
Br ⁻	0.476	0.719
SO ₄ ²⁻	0.653	-0.356
HCO ₃ ⁻	-0.130	0.659
Li	-0.148	0.483
B	0.322	-0.247
V	-0.651	-0.450
As	-0.008	-0.363
Se	0.313	0.397
Sr	0.660	0.528
PO ₄ ³⁻	-0.487	-0.354
Br ⁻ /Cl ⁻	0.765	0.282

1.3 各成分の相関について

今回分析を実施した，主な成分の相関係数を表 4 に示す。本調査では Na⁺，F⁻，Li，As 間の相関係数が 0.8 の高い傾向を示した。また，これらの成分は B，PO₄²⁻とも 0.6~0.8 程度の相関係数を示した。既報のとおり⁹⁾，旭志地区の調査の結果からこれら Na⁺，F⁻，Li，As の成分は深い帯水層に比較的豊富に含まれる傾向があり，泗水地区でも同様の傾向が見られると考えられる。また，Ca²⁺，Mg²⁺，Sr の間でも比較的高い相関がみられた。これらはいずれもアルカリ土類金属であり，吸着・溶出等同じような挙動をとっているものと考えられる。

1.4 高濃度 NO₃-N 検出地点周辺における各成分濃度の関係について

環境基準（10mg/L）を超える NO₃-N を検出した井戸（No. 10，No. 20）の周辺の井戸について，他の無機成分との関係を調査した。

No. 10 に関して，泗水町田島地区及び南田島地区の（No. 10 を含む）11 地点（No. 1~11）での NO₃-N と主な成分との相関を表 5 左欄に示す。相関が高い SO₄²⁻との関係をプロットしたものを図 5 に，NO₃-N と Br⁻/Cl⁻の比との関係をプロットしたものを図 6 に示す。

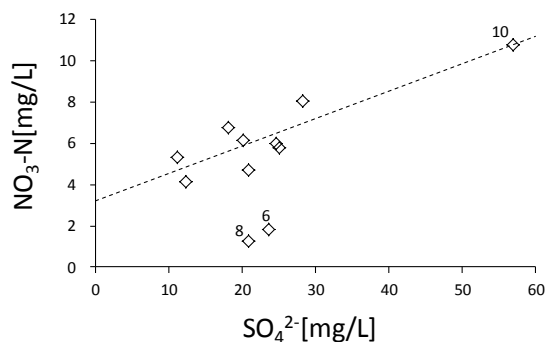


図 5 泗水地区 No. 10 周辺 11 地点における NO₃-N と SO₄²⁻との関係

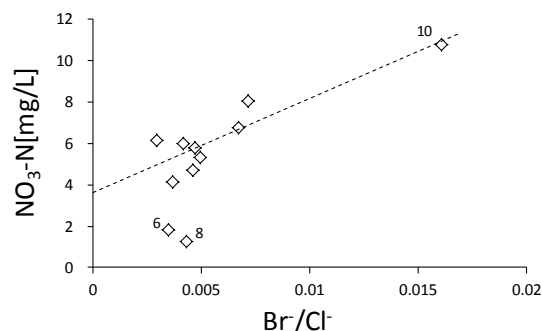


図 6 泗水地区 No. 10 周辺 11 地点における NO₃-N と Br⁻/Cl⁻比との関係

11 地点の $\text{NO}_3\text{-N}$ と SO_4^{2-} との相関係数は 0.653 であったが、合志川近傍に位置する No. 6 及び No. 8 を除外した 9 地点では 0.902 だった。また、 $\text{NO}_3\text{-N}$ と Br^-/Cl^- との相関係数は 11 地点では 0.765 であり、 SO_4^{2-} 場合と同様に No. 6 及び No. 8 を除外した 9 地点では 0.906 だった。 SO_4^{2-} は化学肥料と関連が深く、 Br^- は海水中では Cl^- に対して重量比で 0.003 程度含まれているが、畑作農地においては臭素を含む農薬の使用によって Cl^- に対する重量比が増加する事例が報告されている^{10)~12)}。No. 6 及び No. 8 が相関から外れる理由は不明だが、No. 6 については井戸が深く (100m)、深層地下水の影響を受けている (実際に F, As などの濃度が他の井戸と比較して高い。) 可能性があること、また、両地点とも河川水の影響を受けている可能性が考えられる。

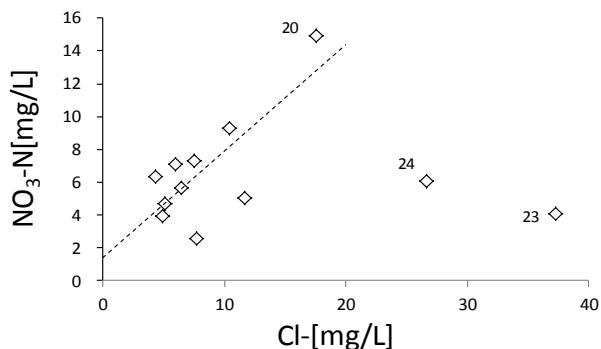


図 7 泗水地区 No. 20 周辺 12 地点における $\text{NO}_3\text{-N}$ と Cl^- との関係

No. 20 に関して、泗水町東部の福本、永、吉富及び住吉地区の (No. 20 を含む) 12 地点 (No. 13~15, No. 20~24, No. 26, No. 27, No. 29, No. 30) での $\text{NO}_3\text{-N}$ と主な無機成分との相関を表 5 右欄に示す。 $\text{NO}_3\text{-N}$ と Cl^- との関係を図 7 に示す。12 地点では $\text{NO}_3\text{-N}$ と Cl^- との相関係数は 0.059 であったが、永地区の No. 23, No. 24 を除外した 10 地点での相関係数は 0.762 であった。また、 Br^- については 12 地点で相関係数 0.719 であったが $\text{NO}_3\text{-N}$ と Br^-/Cl^- との相関係数は 0.282 と低く、No. 10 とは異なる傾向が見られた。 Cl^- は家畜ふん尿等に含まれるため、この地区での $\text{NO}_3\text{-N}$ は家畜ふん尿と関連があると考えられた。

2 西合志地区調査

2.1 水質の概要 (トリリニアダイアグラム)

各成分の分析結果の平均値、最大値、最小値を表 6 に示す。また、トリリニアダイアグラムを図 8 に示す。トリリニアダイアグラムが示すように、井戸水の大部

分はアルカリ土類炭酸塩型あるいはアルカリ土類非炭酸塩型を示した。しかし No. 18 については陽イオンにおけるアルカリ類の比率が高く、アルカリ土類を上回った。この地点では、泗水地域の No. 11 と同様に滞留時間が比較的長い深層地下水が含まれている可能性が示唆された。

表 6 各成分の平均値、最大値及び最小値 (西合志地区)

調査日	H28.1.28, H28.2.1, H28.2.4		
	平均値	最大値	最小値
水温 (°C)	18.6	22.0	10.5
pH	7.3	7.8	6.9
EC ($\mu\text{S/cm}$)	234	328	136
Na^+ (mg/L)	12.9	33.6	8.0
NH_4^+ (mg/L)	< 0.1	< 0.1	< 0.1
K^+ (mg/L)	5.3	7.4	3.6
Ca^{2+} (mg/L)	18.5	31.8	9.8
Mg^{2+} (mg/L)	6.8	12.8	3.4
F^- (mg/L)	0.07	0.50	0.02
Cl^- (mg/L)	10.2	33.0	4.8
NO_2^- (mg/L)	< 0.03	< 0.03	< 0.03
Br^- (mg/L)	0.082	0.243	0.004
NO_3^- (mg/L)	21.0	54.2	7.2
SO_4^{2-} (mg/L)	9.1	22.3	0.4
HCO_3^- (mg/L)	89.0	119.1	53.5
PO_4^{3-} (mg/L)	0.050	0.109	0.028
$\text{NO}_3\text{-N}$ (mg/L)	4.7	12.2	1.6
Li ($\mu\text{g/L}$)	3.8	40.2	0.5
B ($\mu\text{g/L}$)	48.5	266.2	5.0
Al ($\mu\text{g/L}$)	16.2	172.8	0.7
V ($\mu\text{g/L}$)	3.1	6.0	1.7
Cr ($\mu\text{g/L}$)	0.31	0.57	0.10
Mn ($\mu\text{g/L}$)	2.60	37.17	0.02
Fe ($\mu\text{g/L}$)	54.8	519.8	1.3
Ni ($\mu\text{g/L}$)	0.12	1.10	0.00
Cu ($\mu\text{g/L}$)	1.08	8.99	0.02
Zn ($\mu\text{g/L}$)	14.26	77.82	0.00
As ($\mu\text{g/L}$)	0.64	1.65	0.26
Se ($\mu\text{g/L}$)	0.25	0.99	0.03
Rb ($\mu\text{g/L}$)	13.2	18.2	8.9
Sr ($\mu\text{g/L}$)	182.3	285.1	89.9
Mo ($\mu\text{g/L}$)	0.18	0.53	0.08
Cd ($\mu\text{g/L}$)	0.01	0.08	0.00
Sb ($\mu\text{g/L}$)	0.04	0.07	0.03
Cs ($\mu\text{g/L}$)	0.29	4.15	0.01
Ba ($\mu\text{g/L}$)	11.9	29.1	3.9
Pb ($\mu\text{g/L}$)	0.19	1.26	0.00
U ($\mu\text{g/L}$)	0.74	1.99	0.07

表 7 各成分間の相関係数（西合志地区，斜字は 0.8 以上）

	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	F ⁻	Cl ⁻	Br ⁻	SO ₄ ²⁻	HCO ₃ ⁻	Li	B	V	As	Se	Sr	PO ₄ ³⁻	NO ₃ -N
Na ⁺	0.216	-0.016	-0.053	0.700	0.716	0.226	0.053	0.364	0.871	0.907	0.351	0.472	0.049	-0.053	0.433	-0.002
K ⁺		0.519	0.369	-0.058	0.171	0.201	0.802	0.209	0.056	0.064	-0.266	-0.144	0.336	0.549	-0.201	0.390
Ca ²⁺			0.870	-0.358	0.359	0.396	0.549	0.497	-0.056	-0.141	-0.517	-0.423	0.404	0.925	-0.583	0.711
Mg ²⁺				-0.348	0.328	0.323	0.482	0.526	-0.139	-0.135	-0.593	-0.531	0.562	0.887	-0.573	0.582
F ⁻					0.343	0.022	-0.171	0.018	0.616	0.697	0.622	0.689	-0.054	-0.391	0.658	-0.155
Cl ⁻						0.431	0.099	0.327	0.770	0.551	-0.002	0.075	0.266	0.317	-0.061	0.244
Br ⁻							0.383	-0.124	0.277	0.090	-0.095	0.110	0.568	0.431	-0.086	0.597
SO ₄ ²⁻								-0.037	-0.061	-0.115	-0.277	-0.106	0.500	0.620	-0.217	0.578
HCO ₃ ⁻									0.189	0.348	-0.159	-0.241	-0.104	0.361	-0.154	-0.099
Li										0.675	0.271	0.403	0.009	-0.055	0.201	-0.009
B											0.417	0.543	-0.067	-0.206	0.578	-0.090
V												0.825	-0.309	-0.657	0.821	-0.375
As													-0.082	-0.557	0.793	-0.112
Se														0.536	-0.225	0.604
Sr															-0.690	0.760
PO ₄ ³⁻																-0.341

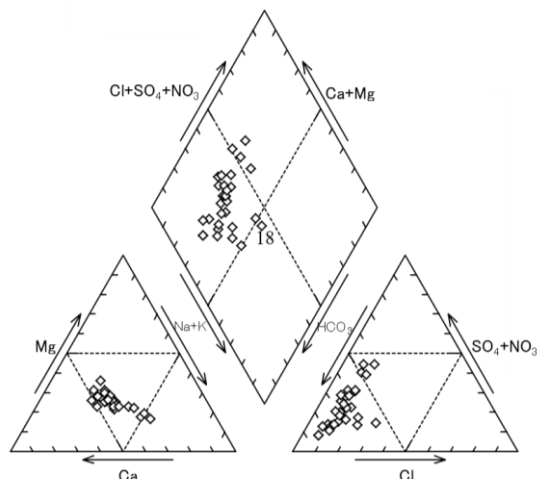


図 8 トリリニアダイアグラム（西合志地区）

2.2 NO₃-Nの分布について

今回の調査で得られた NO₃-N 濃度の分布を図 9 に示す。西合志地区では 30 地点中 2 地点（No. 6, No. 17）で環境基準の 10mg/L を超過し，3 地点（No. 8, No. 14, No. 30）で 7~10mg/L の範囲であった。環境基準を超過した 2 地点はいずれも西合志町東部の野々島地区だった。

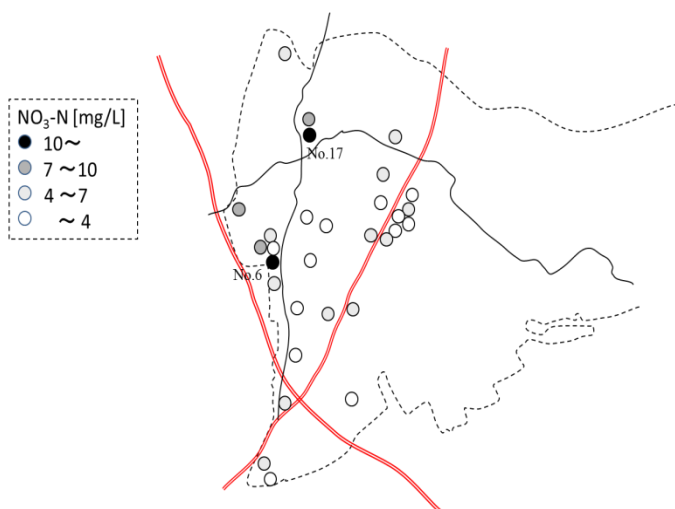


図 9 NO₃-N の分布（西合志地区）

表 8 西合志野々島地区における NO₃-N と各成分の相関係数

	野々島地区 12地点
Na ⁺	0.243
K ⁺	0.517
Ca ²⁺	0.722
Mg ²⁺	0.497
F ⁻	-0.396
Cl ⁻	0.203
Br ⁻	0.937
SO ₄ ²⁻	0.628
HCO ₃ ⁻	-0.020
Li	0.068
B	-0.267
V	-0.386
As	-0.125
Se	0.597
Sr	0.836
PO ₄ ³⁻	-0.596
Br ⁻ /Cl ⁻	0.874

2.3 各成分の相関について

今回分析を実施した，主な成分の相関係数を表 7 に示す。西合志地区でも，泗水地区と同様に深い帯水層に比較的含まれる Na⁺, Li, B の間及び As, V, PO₄³⁻ 間の相関係数が 0.8 以上の高い傾向を示した。これらの成分は F⁻ との間の相関係数が 0.6 程度を示した。また，泗水地区と同様に Ca²⁺, Mg²⁺, Sr の間でも高い相関がみられた。

2.4 高濃度 NO₃-N 検出地点周辺における，各成分濃度の関係について

環境基準を超過する濃度の NO₃-N が検出された野々島地区周辺 12 地点（No. 3, No. 6~8, No. 14, No. 17, No. 19~21, No. 25, No. 27, No. 30）での NO₃-N と主な無機成分との相関を表 8 に示す。

野々島地区では，泗水町田島・南田島地区と同様に，NO₃-N と Br⁻/Cl⁻ の比との関係をプロットしたもの

を図 10 に示す。NO₃-N と Br⁻ との相関係数は 0.937、NO₃-N と Br⁻/Cl⁻ 比との相関係数は 0.874 だった。また、NO₃-N と SO₄²⁻ との相関係数は 0.628 であり、ある程度の相関が認められた。泗水町田島・南田島地区と同様に NO₃-N と化学肥料及び農薬との関連が示唆された。

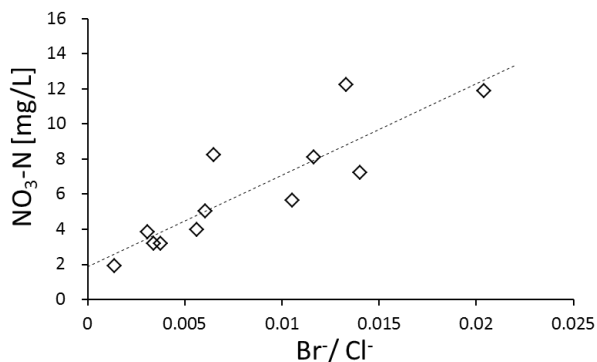


図 10 西合志野々島地区における NO₃-N と Br⁻/Cl⁻ 比との関係

ま と め

本報では平成 27 年度に実施した泗水地区調査、西合志地区調査について報告した。

泗水地区調査の結果、NO₃-N が環境基準を超過したのは 2 地点だった。泗水西部では NO₃-N と Br⁻/Cl⁻ 比、SO₄²⁻ との間に比較的高い相関係数が見られた。一方、泗水東部では NO₃-N と Cl⁻ との間に一定の相関が見られた。これらの結果は、地域によって地下水 NO₃-N の由来が異なることを示唆している。

西合志地区調査の結果、西合志西部の野々島地区に環境基準を超過する濃度の NO₃-N が検出され、泗水西部の場合と同様に、NO₃-N と Br⁻/Cl⁻ 比、SO₄²⁻ との間に相関が見られた。

謝辞

本報における、旭志地区調査及び合志地区調査につきましては、熊本県環境保全課の地下水概況調査事業に付随して行われ、熊本県環境保全課、熊本県菊池保健所、菊池市及び合志市によって調査地点の検討及び採水が実施されました。各所属の担当者の方々に深く感謝いたします。

引用文献

- 1) 熊本県：熊本地域硝酸性窒素削減計画，(2005).
- 2) 熊本県：平成 25 年度水質調査報告書（公共用水域及び地下水），(2014).

- 3) 小笹康人，廣畑昌章，吉永敏之，福留清秀，松岡良三：熊本県保健環境科学研究所報，25,35 (1995).
- 4) 廣畑昌章，松崎達哉，藤田一城，小笹康人，松岡良三：熊本県保健環境科学研究所報，26,59 (1996).
- 5) 廣畑昌章，松崎達哉，藤田一城，松下 裕，松岡良三：熊本県保健環境科学研究所報，27,71 (1997).
- 6) 廣畑昌章，松崎達哉，藤田一城，松下 裕，松岡良三：熊本県保健環境科学研究所報，27,77 (1997).
- 7) 廣畑昌章，藤田一城，永村哲也，松下 裕，松岡良三：熊本県保健環境科学研究所報，28,60 (1998).
- 8) 廣畑昌章，藤田一城，永村哲也，松下 裕，松岡良三：熊本県保健環境科学研究所報，28,66 (1998).
- 9) 永田武史，前田敏孝，藤本貴大，小笹康人，上本清次：熊本県保健環境科学研究所報，44, 75 (2014).
- 10) 寺尾宏，梶川正勝，森下有輝，加藤喜久雄：地球化学，18, 21 (1984).
- 11) 寺尾宏，梶川正勝，森下有輝，加藤喜久雄：地球化学，19, 31 (1985).
- 12) 小笹康人：熊本県保健環境科学研究所報，31, 66 (2001).

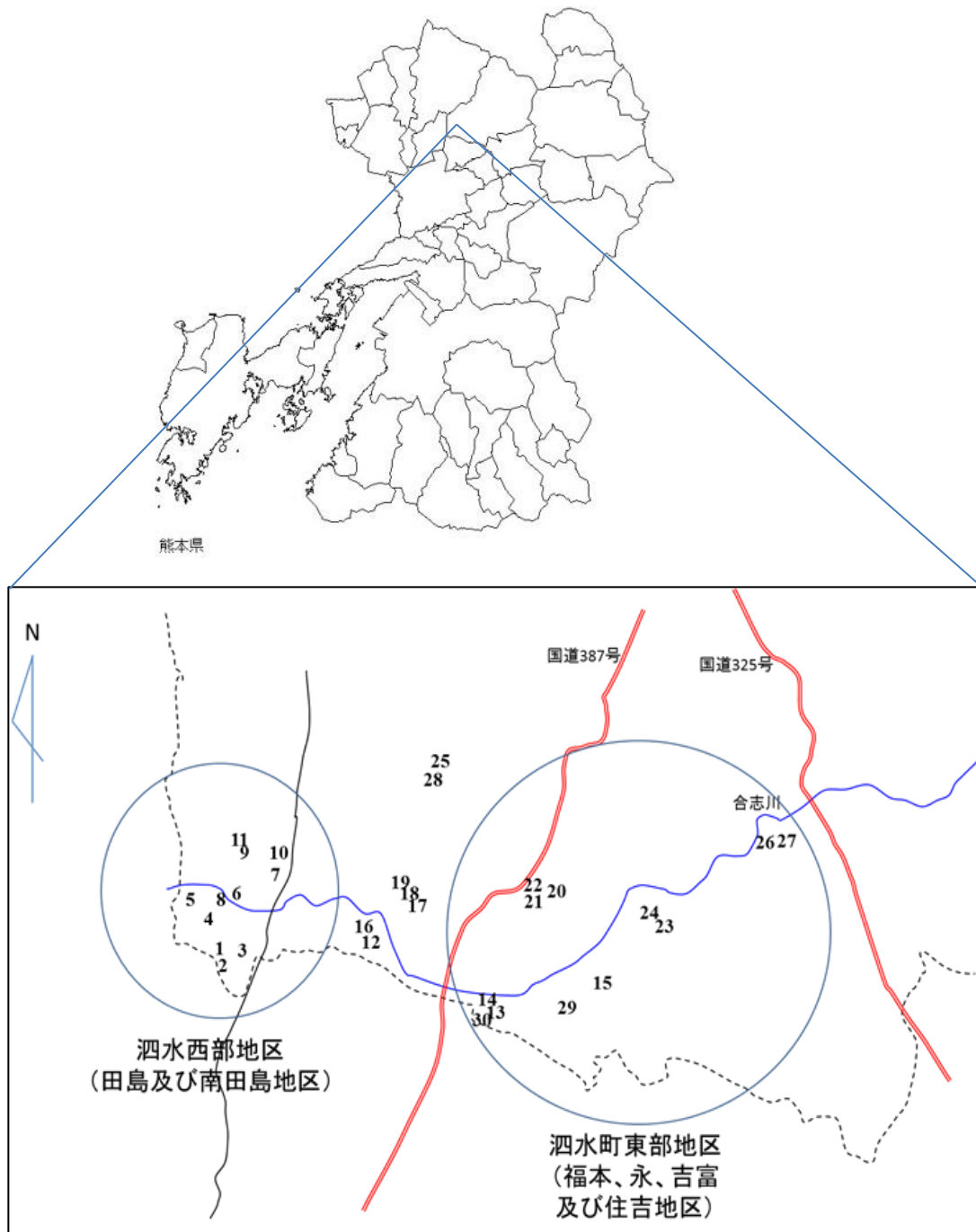


图1 泗水地区調査地点

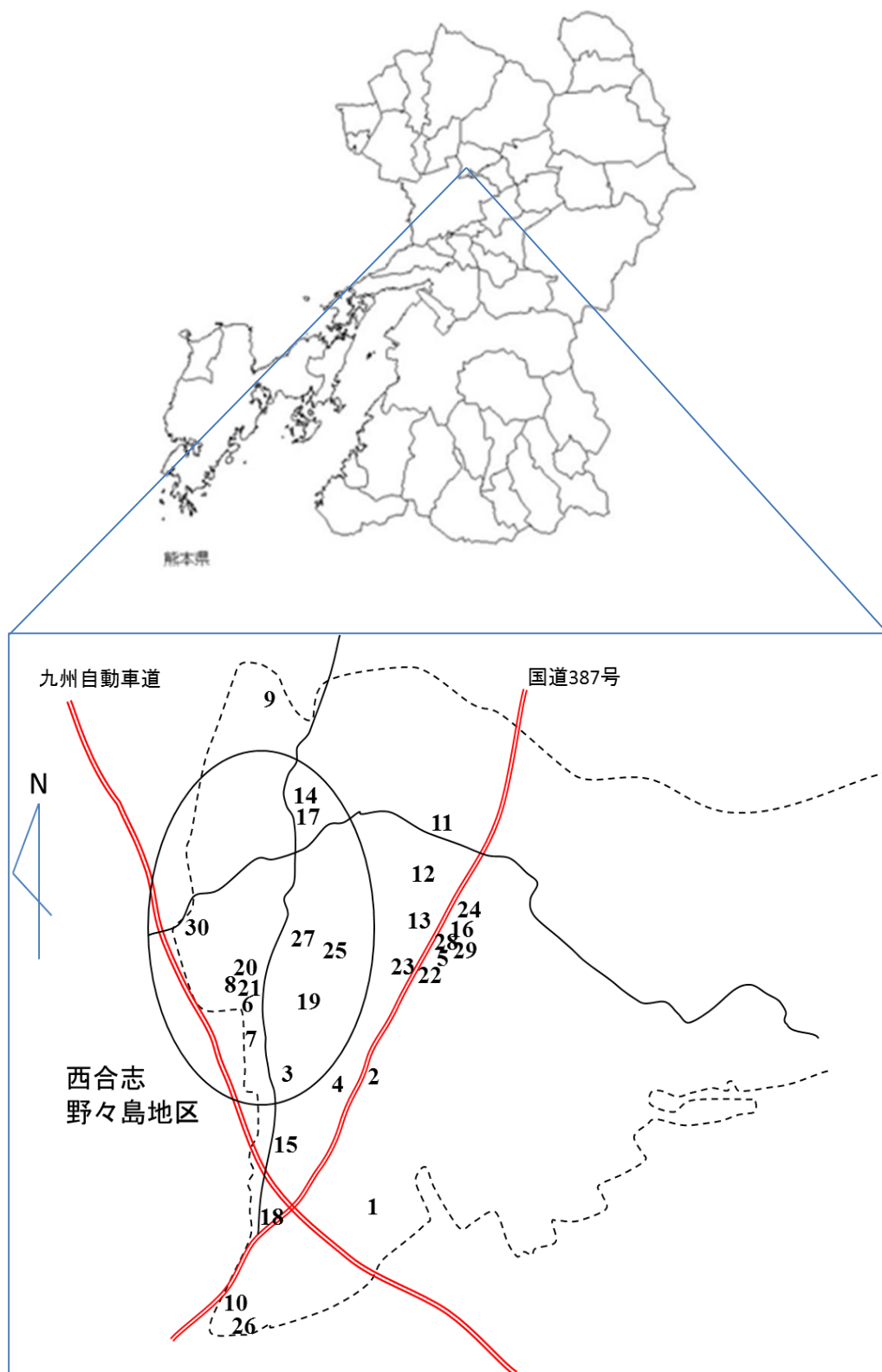


図2 西合志地区調査地点

別表1 泗水地区調査地点の概要及びイオン成分

No.	井戸深さ	ストレーナー位置	海拔 (地理院地図から推定)	陽イオン成分 (mg/L)					陰イオン成分 (mg/L)				
	[m]	[m]	[m]	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	NO ₂ ⁻	Br ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻
1	30	15	45	16	<0.1	12	7.4	17	12	<0.015	0.054	21	21
2	30	18	49	14	<0.1	8.2	10	25	11	<0.015	0.078	36	28
3	不明	不明	60	12	<0.1	6.8	8.6	23	12	<0.015	0.077	30	18
4	45	43	46	12	<0.1	5.9	4.9	13	9.8	<0.015	0.036	18	12
5	40	16	39	20	<0.1	6.3	8.6	22	19	<0.015	0.056	27	20
6	100	不明	39	26	<0.1	7.8	7.8	21	17	<0.015	0.059	8.0	24
7	15	10	45	13	<0.1	6.9	2.4	13	4.5	<0.015	<0.025	24	11
8	6	不明	39	13	<0.1	12	6.3	15	14	<0.015	0.063	5.5	21
9	不明	不明	43	9.5	<0.1	7.2	3.4	11	7.0	<0.015	0.033	26	25
10	50	30	56	16	<0.1	8.4	11	29	5.7	<0.015	0.092	48	57
11	不明	不明	44	52	<0.1	4.2	1.6	7.6	17	<0.015	0.070	26	25
12	20	4	45	17	<0.1	25	4.6	14	9.7	<0.015	0.035	26	20
13	60	不明	51	11	<0.1	5.3	5.5	17	12	<0.015	0.027	22	8.1
14	50	4	50	8.8	<0.1	4.5	3.4	12	7.8	<0.015	<0.025	11	5.3
15	40	不明	64	9.6	<0.1	2.1	3.4	11	6.4	<0.015	0.041	25	14
16	4	4	44	9.7	<0.1	5.9	7.0	20	7.6	<0.015	0.036	37	14
17	40	8	48	17	<0.1	7.4	9.1	22	14	<0.015	0.057	36	21
18	50	12	49	13	<0.1	5.6	6.9	19	10	<0.015	0.044	24	20
19	不明	不明	50	11	<0.1	7.4	5.5	16	7.4	<0.015	0.058	30	14
20	30	不明	75	13	<0.1	6.1	14	36	18	<0.015	0.071	66	6.8
21	不明	不明	77	8.7	<0.1	3.7	8.3	18	6.0	<0.015	0.027	31	5.6
22	不明	不明	67	11	<0.1	2.9	4.9	14	7.5	<0.015	0.062	32	14
23	8	不明	67	14	<0.1	3.2	9.3	25	37	<0.015	0.046	18	42
24	12	10	65	11	<0.1	12	7.2	22	27	<0.015	0.049	27	29
25	47	25	62	9.5	<0.1	5.3	6.2	18	6.9	<0.015	0.029	40	4.5
26	不明	不明	74	8.6	<0.1	5.6	5.3	19	5.1	<0.015	<0.025	21	12
27	13	11	77	7.5	<0.1	9.0	3.0	7.8	4.4	<0.015	<0.025	28	15
28	5	4	52	14	<0.1	3.7	2.1	16	8.5	<0.015	<0.025	19	6.9
29	60	38	61	13	<0.1	8.4	11	28	10	<0.015	0.042	41	1.7
30	50	不明	59	7.7	<0.1	6.3	3.5	12	4.9	<0.015	<0.025	18	20

別表2 西合志地区調査地点の概要及びイオン成分

No.	井戸深さ	ストレーナー位置	海拔 (地理院地図から推定)	陽イオン成分 (mg/L)					陰イオン成分 (mg/L)				
	[m]	[m]	[m]	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	NO ₂ ⁻	Br ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻
1	68	44-45, 49-50	45	9.4	<0.1	4.2	6.2	15	6.2	<0.015	<0.025	13	2.3
2	97	67-68	49	18	<0.1	5.4	6.2	16	10	<0.015	0.058	18	7.4
3	80	50-51	60	9.0	<0.1	3.6	6.9	16	4.8	<0.015	<0.025	14	0.5
4	120	不明	46	23	<0.1	5.1	6.9	18	12	<0.015	0.059	18	5.1
5	60	不明	39	10	<0.1	5.0	4.2	14	6.7	<0.015	0.057	10	2.8
6	75	65-70	39	11	<0.1	4.6	10	26	11	<0.015	0.215	53	12
7	75	65-70	45	12	<0.1	5.5	13	25	16	<0.015	0.094	22	14
8	100	65-70	39	10	<0.1	4.2	5.5	20	9.3	<0.015	0.1304	32	6.3
9	50	7-17	43	12	<0.1	6.0	8.8	27	14	<0.015	0.076	28	10
10	27	20-27	56	13	<0.1	4.8	6.2	17	8.7	<0.015	0.044	18	6.7
11	100	64-90	44	13	<0.1	6.1	7.3	21	8.2	<0.015	0.090	19	22
12	100	15-32, 43-72, 84-93	45	12	<0.1	7.4	7.5	22	8.0	<0.015	0.095	23	14
13	23	10-20	51	12	<0.1	6.2	6.4	18	7.1	<0.015	0.087	7.9	16
14	80	50-65	50	12	<0.1	6.6	8.2	23	12	<0.015	0.144	36	21
15	100	50-100	64	10	<0.1	3.9	6.4	15	11	<0.015	0.243	13	4.4
16	100	50-100	44	20	<0.1	5.5	4.3	13	9.4	<0.015	0.153	24	13
17	70	26-34	48	12	<0.1	6.7	9.3	26	14	<0.015	0.190	54	18
18	100	不明	49	34	<0.1	5.7	5.9	18	33	<0.015	0.156	19	6.9
19	68.5	不明	50	15	<0.1	5.2	8.8	22	21	<0.015	0.070	14	6.0
20	80	不明	75	10	<0.1	6.9	5.4	15	6.4	<0.015	0.068	25	21
21	86	不明	77	11	<0.1	4.7	6.0	16	7.8	<0.015	0.044	18	9.6
22	84	不明	67	11	<0.1	5.0	7.9	19	8.4	<0.015	0.034	25	13
23	80	45-67	67	12	<0.1	6.5	8.0	19	6.1	<0.015	0.034	24	14
24	90	65-90	65	10	<0.1	4.6	4.4	14	7.1	<0.015	0.055	12	2.1
25	100	80-95	62	8.0	<0.1	3.9	3.4	10	5.4	<0.015	<0.025	8.5	0.39
26	72	24	74	17	<0.1	5.0	4.0	11	7.5	<0.015	0.030	13	5.4
27	100	88-96	77	9.0	<0.1	3.9	5.1	15	13	<0.015	0.040	17	1.8
28	80	不明	52	10	<0.1	5.1	6.0	16	5.1	<0.015	0.034	7.3	2.1
29	80	不明	61	10	<0.1	5.0	5.9	16	5.1	<0.015	0.034	7.2	2.1
30	80	不明	59	13	<0.1	6.5	9.9	32	13	<0.015	0.082	36	15

3) 熊本市周辺畑地土壌における脱窒遺伝子の検出と解析について

前田 敏孝 永田 武史* 上本 清次**

要 旨

合志市竹迫及び熊本市東区戸島の畑地のボーリング調査で得られた土壌試料を用いて脱窒遺伝子 (*nirS*, *nirK*) に関する調査を行った。両地点とも表層で各遺伝子を検出し、その分布には硝酸イオンなどの土壌中の成分が関係していると考えられた。また、得られた *nirS* 遺伝子の配列をもとに系統樹解析を行ったところ、特定の微生物に近縁という傾向は見られず、畑地土壌には様々な脱窒菌が存在していることが示唆された。

キーワード: 硝酸性窒素, 畑地土壌, 脱窒菌, 亜硝酸還元酵素遺伝子 (*nirK*, *nirS*)

はじめに

地下水の硝酸性窒素は、過剰な施肥、家畜排せつ物の不適正な処理及び生活排水の地下浸透等によって濃度が上昇する¹⁾。一方、微生物による脱窒や地下水流動における混合希釈等により硝酸性窒素濃度は減少するため²⁾、各地点の汚染状況を測定するだけでなく、その地点での浄化能力を把握することも必要である。

汚染浄化機構のひとつである脱窒は、酸素に乏しい還元状態下において、有機物や硫化物などの電子供与体が存在する場合に微生物の働きで硝酸や亜硝酸が還元される反応のことで、この反応に関わる微生物は脱窒菌とよばれる²⁾。近年、分子生物学的手法により脱窒菌が有する亜硝酸還元酵素遺伝子 (*nirK*, *nirS*) や亜酸化窒素還元酵素遺伝子 (*nosZ*) を対象に、水田や地下水などの自然環境中の脱窒菌を解析する研究が進みつつある^{3),4)}。

筆者らは、硝酸性窒素削減対策に資する基礎資料を得ることを目的に、熊本市東区戸島及び合志市竹迫の畑地土壌におけるボーリングコア試料の解析を行い、前報⁵⁾では土壌溶出試験結果について報告した。今回、土壌における脱窒遺伝子に関する解析を行ったので報告する。

調査地点

図1に調査地点及び名称を示す。今回の調査は合志

市竹迫地区及び熊本市東区戸島地区の畑地(各1地点。以下それぞれ「竹迫」及び「戸島」と記す。)で実施された。調査地点はどちらも収穫後のトウモロコシ畑で、肥料として家畜ふん尿が使用されている。詳細については前報⁵⁾のとおりである。



図1 調査地点

調査試料

平成26年11月、熊本県環境保全課及び国立大学法人熊本大学大学院自然科学研究科水文学・嶋田研究室が竹迫及び戸島で不攪乱土壌ボーリングを実施し、竹迫は深さ15m、戸島は深さ14mまでのコア試料が採取された。これを分取したものを調査試料とした。

* 現熊本県環境生活部環境局循環社会推進課 ** 現熊本県北広域本部玉名地域振興局保健福祉環境部

既往の研究^{6),7)}で、深さ 2~3m の浅い土壌や地下水で硝酸イオン濃度の減少が見られた事例について脱窒菌の関与が推察されるとの報告があったため、深さ 0~4.0m までのコア試料は密な深度間隔で解析を行えるよう 0.4m ごとに 1 つの試料として区切り、深さ 4.0m 以降のコア試料は 2m ごとに区切って混合し、試料を調製した。

調査方法

1 土壌試料からの DNA 抽出

DNA の抽出は、ISOIL for Beads Beating (Nippon gene) を用いた。加藤ら⁸⁾によると、スキムミルクの添加が DNA 抽出効率を向上させるとのことであったため、DNA 抽出キット付属のマニュアルに記載されている土壌 0.5g にスキムミルク 20mg を添加する改変プロトコルで実施した。得られた溶液は 260nm の吸光度を測定し、DNA 量を算出した。

2 PCR 法による脱窒遺伝子の検出

今回、Throback ら⁹⁾の文献を参照して、*nirK* 遺伝子及び *nirS* 遺伝子のタンパク質コード領域の一部を増幅するプライマー、反応液組成及び条件を決定した。採用したプライマー等の詳細は表 1 から表 3 に示した。

なお、反応溶液はアガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロミドで染色し、目的遺伝子の増幅の有無を調べた。

3 脱窒遺伝子の塩基配列解析

2 で増幅した *nirS* 遺伝子の PCR 産物は、DynaExpress TA PCR Cloning Kit (BioDynamics Laboratory Inc) を用いてライゲーション及び大腸菌の形質転換を行い、アンピシリン添加 LB 培地で培養した。コロニーダイレクト PCR で目的遺伝子の挿入が確認されたクローンは、1 サンプルにつき 2 クローンを対象にシークエンス解析で塩基配列を決定した。

得られた塩基配列はアミノ酸配列に変換し、BLAST 検索により近縁種を推定した。また、MEGA6 を用いて近隣結合法による系統樹解析を行った。

表 1 プライマーの塩基配列

標的遺伝子	プライマー名	塩基配列
<i>nirS</i>	cd3aF	5'-G TSAACG TSAAGGARACSGG-3'
	R3cd	5'-GASTTCGGRTGSGTCTTGA-3'
<i>nirK</i>	F1aCu	5'-ATCATGGTCTGCGCG-3'
	R3Cu	5'-GCCTCGATCAGRTTGTGGTT-3'

※ S = C or G , R = A or G

表 2 反応液組成

試薬	添加量 (μL)
5×PCR Buffer	5
2mM dNTP mixture	2.5
0.1mM Fw primer	0.1
0.1mM Rev primer	0.1
20mg/mL BSA	0.5
GoTaq DNA polymerase	0.2
Template DNA	20ng となる量
DW	-
total	25

表 3 反応条件

温度	時間	
94°C	2min	
94°C	30sec	} 35cycles
51°C	1min	
72°C	1min	
72°C	10min	
4°C	Hold	

結果及び考察

1 土壌中の微生物 DNA 量

採取した土壌の深さに対する DNA 量を表 4 に示す。

竹迫では、0~0.4m の試料でおよそ 9000ng の DNA 量が最大となったが、それ以降の試料では 82ng~830ng の範囲で推移した。戸島では、深さ 1.6m までの 4 つの試料で 1000ng を超す DNA 量となり、それ以降の試料では 110ng~400ng の範囲で推移した。

260nm の吸光度から算出する DNA 量は、その波長に吸収をもつ土壌由来の夾雑物の影響などで、濃度が実際より高く見積もられてしまう場合があるものの、竹迫は深さ 0.4m まで、戸島は深さ 1.6m までの土壌表層に多くの微生物が存在することが考えられた。

2 脱窒遺伝子の検出とイオン成分の関係

表 4 土壌試料における DNA 抽出量

竹迫

試料	深さ(m)	DNA 量 (ng)
(1)	0-0.4	9300
(2)	0.4-0.8	410
(3)	0.8-1.2	830
(4)	1.2-1.6	460
(5)	1.6-2.0	500
(6)	2.0-2.4	140
(7)	2.4-2.8	82
(8)	2.8-3.2	210
(9)	3.2-3.6	95
(10)	3.6-4	230
(11)	4-6	160
(12)	6-8	100
(13)	8-10	150
(14)	10-11*	290
(15)	11-13	100
(16)	13-15	220

戸島

試料	深さ(m)	DNA 量 (ng)
(1)	0-0.4	3400
(2)	0.4-0.8	1100
(3)	0.8-1.2	2100
(4)	1.2-1.6	1100
(5)	1.6-2.0	220
(6)	2.0-2.4	400
(7)	2.4-2.8	190
(8)	2.8-3.2	130
(9)	3.2-3.6	110
(10)	3.6-4	230
(11)	4-6	130
(12)	6-8	130
(13)	8-10	130
(14)	10-12	150
(15)	12-14	320

※ 試料（14）においては、区切る深さを誤ったため、2m 単位ではなく 1m 分の試料となっている。

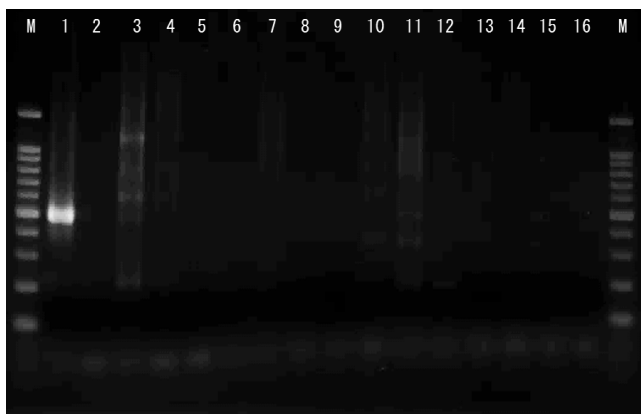


図 2 *nirK* 遺伝子泳動結果（竹迫）

1~16 : 竹迫の試料（1）～（16）

M : 100bp ラダーマーカー



図 3 *nirK* 遺伝子泳動結果（戸島）

1~15 : 戸島の試料（1）～（15）

M : 100bp ラダーマーカー

PCR法で *nirK* 遺伝子の塩基配列の一部 (472bp) を増幅後、アガロースゲル電気泳動により PCR 産物を確認した結果を図 2 及び図 3 に示す。竹迫では (1) 0~0.4m の試料で、戸島では (1) 0~0.4m 及び (3) 0.8~1.2m の2つの試料で *nirK* 遺伝子の増幅が見られた。

一方、*nirS* 遺伝子の塩基配列の一部 (425bp) を増幅後、アガロースゲル電気泳動により PCR 産物を確認した結果を図 4 及び図 5 に示す。竹迫では (1) 0~0.4m の試料で、戸島では (1) 0~0.4m, (3) 0.8~1.2m, (4) 1.2~1.6m の3つの試料で *nirS* 遺伝子の増幅が見られた。なお、竹迫の (4) 1.2~1.6m 以降及び戸島の (8) 2.8~3.2m 以降では非特異的な増幅と考えられる複数のバンドが確認された。

ここで、前報⁵⁾で本調査地点における土壌溶出試験を実施していることから、脱窒遺伝子が検出された深さと土壌に含まれるイオン成分との関連について考察した。

表 5 に前報⁵⁾の表 1 を一部改変したものを再掲した。脱窒菌の活動には硝酸が不可欠であることから、まず硝酸イオン溶出量に注目した。竹迫では表層の 1 試料 (0~0.4m) で脱窒遺伝子を検出したのに対し、硝酸イオン溶出量は表層の 1 試料 (0~1m) でのみ 100 μ g/g を超える値を示した。戸島では深さ 1.6m までの試料で脱窒遺伝子を検出したのに対し、硝酸イオン溶出量は深さ 2m までの試料で 100 μ g/g を超える値を示した。土壌溶出試験では深さ 1m 単位で試料を調製し、分析を実施しているため、深さの完全な一致が見られたわけではないものの、土壌に含まれる硝酸イオン濃度の大きさと脱窒遺伝子の検出にはある程度の相関があると考えられた。

さらに、戸島の各イオン成分の溶出量に注目すると、カリウムイオンと塩化物イオンにおいて、硝酸イオンと同様に 2m を境に溶出量が急減する傾向が見られた。この2つのイオンは家畜ふん堆肥に含まれる主要な成分である¹⁰⁾ ことから、2m までの深さには家畜ふん尿由来の成分がよく浸透していると考えられた。これらのことから、戸島では家畜ふん尿の土壌への浸透により、脱窒菌が必要とする硝酸イオン、電子供与体 (有機物など) が供給されたため、竹迫より深い土壌においても脱窒遺伝子を検出した可能性が考えられた。

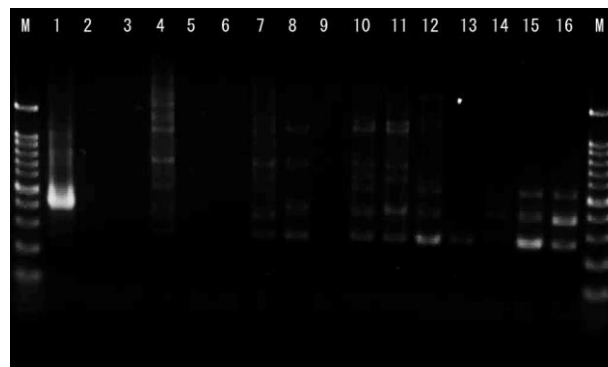


図 4 *nirS* 遺伝子泳動結果 (竹迫)

1~16: 竹迫の試料 (1) ~ (16)

M: 100bp ラダーマーカー

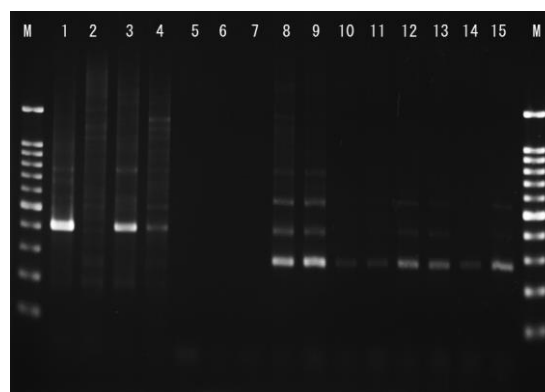


図 5 *nirS* 遺伝子泳動結果 (戸島)

1~15: 戸島の試料 (1) ~ (15)

M: 100bp ラダーマーカー

3 *nirS* 遺伝子の塩基配列解析

Ishii ら¹¹⁾によると、熊本の水田及び水田から転換したダイズ畑土壌を脱窒活性が高まる条件下で培養すると、*Pseudogulbenkiania* 属、*Dechloromonas* 属、*Azoarcus* 属などのベータプロテオバクテリア綱に属する脱窒菌が優占することが明らかとなっている。そこで、今回の土壌でこういった脱窒遺伝子をもつ菌が存在するかを調べるため、得られた PCR 産物の塩基配列情報を用いて遺伝子解析を行った。

表 6 に *nirS* 遺伝子の塩基配列をアミノ酸配列に変換し BLAST 検索を行った結果を示す。すべてのクローンにおいて、種々の uncultured bacterium の配列との相同性が最大となり、その配列をもつ菌についての十分な情報が得られなかった。一方で、データベースに登録されていた配列の環境的、地理的な由来等を示す Isolation source によると、海洋や河川、廃水等ではなく、主に農耕地の土壌由来の微生物の配列であったこ

とから、今回の実験で得られた *nirS* 遺伝子配列は妥当な結果であると考えられた。

次に、系統樹解析の結果を図 6 に示す。各クローンは、脱窒活性が高い条件で優占すると報告があったベータプロテオバクテリア綱だけでなく、アルファプロテオバクテリア綱に属するものも見られた。このことから、土壌には多様な菌が存在していることが考えられた。

なお、今回は硝酸イオン中の各種安定同位体比の測定やアセチレンブロック法による脱窒活性の測定などの脱窒の有無や程度を検証する実験を行っておらず、実際の土壌で脱窒が起きていたかは明らかでない。したがって、脱窒遺伝子の検出や解析した脱窒菌の情報のみで脱窒の有無を判断することは難しい。しかしながら、脱窒菌の活動に必要な要素がいくつか揃っていることから、土壌の還元状態の進行や酸素濃度の低下などの環境が整うことで脱窒が起きるものと考えられる。

ま と め

合志市竹迫及び熊本市東区戸島で得られたボーリング土壌の脱窒遺伝子 (*nirK*, *nirS*) に関する分析を行った。

両地点とも *nirK* 遺伝子、*nirS* 遺伝子を検出し、その分布は高濃度の硝酸イオンが含まれる土壌の深さと概ね一致していた。また、戸島において竹迫より深い土壌で脱窒遺伝子を検出したことについては、脱窒菌に必要な成分が家畜ふん尿の土壌への浸透により供給された可能性が示唆された。

実験で得られた *nirS* 遺伝子の塩基配列情報を用いた解析からは、竹迫及び戸島の土壌中の脱窒菌は特定の菌に近縁という傾向はなく、多様な種が存在すると考えられた。なお、遺伝子解析の結果は脱窒菌の存在を示すものであり、土壌中で脱窒が起きていることを証明するものではないため、今回の結果をもとに土壌表層で脱窒が起きていると結論づけることには注意が必要である。

今後、脱窒菌解析の対象を硝酸性窒素汚染が問題となっている地下水にも広げることで、新たな知見が得られることが期待される。

謝辞

本調査の実施については、国立大学法人熊本大学大学院先導機構の細野准教授及び熊本県環境保全課の榮田智志氏に多大なご協力をいただきました。

また、分析にあたり技術指導及び機器等の使用を快諾していただいた古川真斗氏 (現 薬務衛生課) 始め微生物科学部の方々に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 環境省：硝酸性窒素による地下水汚染対策手法技術集，(2009).
- 2) 齋藤光代，小野寺真一：日本水文学会誌，41 (3)，91-101 (2011).
- 3) 石井聡，多胡香奈子，妹尾啓史：化学と生物，49 (7)，479-484 (2011).
- 4) 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：地下水学会誌，57 (2)，153-169 (2015).
- 5) 永田武史，前田敏孝，藤本貴大，上本清次：熊本県保健環境科学研究所報，44，67-74 (2014).
- 6) 糟谷真宏，恒川歩，前田美恵子：愛知県農業総合試験場研究報告，39，89-94 (2007).
- 7) 八槇敦，楠田隆，香川淳，古野邦雄：千葉県農林総合研究センター研究報告，5，41-46 (2013).
- 8) 加藤芳章，内田真理子，青木智子，野村暢彦，中島敏明，内山裕夫：環境バイオテクノロジー学会誌，10 (2)，109-114 (2010).
- 9) Throback IN, Enwall K, Jarvis A, Hallin S. : *FEMS Microbiol Ecol*, 49, 401-417 (2004).
- 10) 小柳渉：畜産環境技術情報，41，13-15 (2008).
- 11) Ishii S, Yamamoto M, Tago K, Otsuka S, and Senoo K. : *Soil Sci. Plant Nutr*, 56, 220-224 (2010).

表 5 竹迫及び戸島の土壤溶出液における各イオン成分の溶出量

竹迫

深さ(m)	溶出量(μg/g)											
	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	F ⁻	Cl ⁻	NO ₂ ⁻	Br ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	PO ₄ ³⁻
0-1	9.19	0.22	116.3	5.2	37.9	3.3	9.1	0.25	0.05	121.6	136.8	0.15
1-2	17.9	0.01	26.2	18.1	133.1	1.3	23.1	0.03	0.01	18.2	425.4	< 0.01
2-3	38.8	< 0.01	3.0	11.4	59.8	0.8	5.6	0.02	0.01	7.1	277.3	< 0.01
3-4	32.6	< 0.01	3.2	4.7	12.8	0.6	1.6	0.01	< 0.01	0.6	128.2	< 0.01
4-5	36.6	< 0.01	5.7	3.8	9.0	0.7	2.1	0.02	< 0.01	0.6	124.2	< 0.01
5-6	37.7	< 0.01	8.8	3.0	6.6	0.6	3.2	0.01	< 0.01	2.0	114.3	0.03
6-7	32.0	< 0.01	11.0	3.5	6.6	0.7	6.2	0.03	< 0.01	5.3	95.5	0.22
7-8	27.9	< 0.01	7.6	3.9	4.9	0.8	11.2	0.02	< 0.01	12.6	53.5	0.41
8-9	25.7	< 0.01	6.6	4.0	5.6	0.8	10.3	< 0.01	0.01	14.4	39.3	0.33
9-10	20.8	< 0.01	6.7	3.1	5.2	0.7	6.2	< 0.01	0.01	11.8	20.2	0.28
10-11	15.7	0.01	10.1	2.3	4.9	0.5	4.5	< 0.01	0.01	10.3	17.8	0.29
11-12	13.5	0.01	10.9	2.1	5.4	0.3	3.3	< 0.01	0.01	9.9	18.2	0.21
12-13	13.0	< 0.01	11.5	2.2	5.3	0.3	2.8	< 0.01	< 0.01	10.4	16.9	0.13
13-14	12.6	< 0.01	11.1	1.8	4.3	0.2	2.7	< 0.01	0.01	10.6	15.6	0.13
14-15	11.9	0.01	10.9	1.8	4.1	0.2	3.0	< 0.01	0.01	9.9	18.5	0.22

戸島

深さ(m)	溶出量(μg/g)											
	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	F ⁻	Cl ⁻	NO ₂ ⁻	Br ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	PO ₄ ³⁻
0-1	23.0	1.83	243.4	16.7	53.5	2.0	28.1	0.24	0.07	176.2	346.5	0.04
1-2	26.7	0.24	173.1	24.4	96.7	1.1	24.5	0.08	0.06	183.0	448.9	< 0.01
2-3	50.3	0.02	11.4	17.5	79.3	0.9	9.9	0.02	0.02	75.1	332.1	< 0.01
3-4	41.2	< 0.01	2.2	4.5	16.9	0.4	6.8	0.01	0.01	37.0	124.4	< 0.01
4-5	47.1	< 0.01	3.6	2.9	7.7	0.4	7.4	< 0.01	0.01	48.2	95.3	0.05
5-6	45.1	< 0.01	4.4	1.8	3.7	0.4	6.8	0.01	0.02	54.4	66.0	0.07
6-7	28.1	0.01	3.7	1.2	1.8	0.6	7.5	0.01	0.01	41.8	9.5	0.32
7-8	27.0	0.01	5.6	1.8	3.4	0.6	6.2	0.01	0.01	30.2	0.3	0.23
8-9	24.7	< 0.01	7.1	1.5	3.0	0.7	6.9	< 0.01	0.01	36.4	0.3	0.39
9-10	17.5	0.03	12.8	1.6	3.3	0.4	6.1	0.01	0.01	38.1	0.3	0.16
10-11	16.5	0.02	15.5	2.3	5.5	0.3	7.8	0.02	0.02	50.0	0.5	0.22
11-12	17.4	0.02	16.8	2.8	7.3	0.3	7.4	0.09	0.02	52.4	0.9	0.21
12-13	15.8	0.02	16.5	2.6	6.5	0.2	8.5	0.03	0.02	55.9	0.5	0.16
13-14	29.6	0.02	19.0	2.0	6	0.9	7.5	0.05	0.02	62.5	1.5	0.65

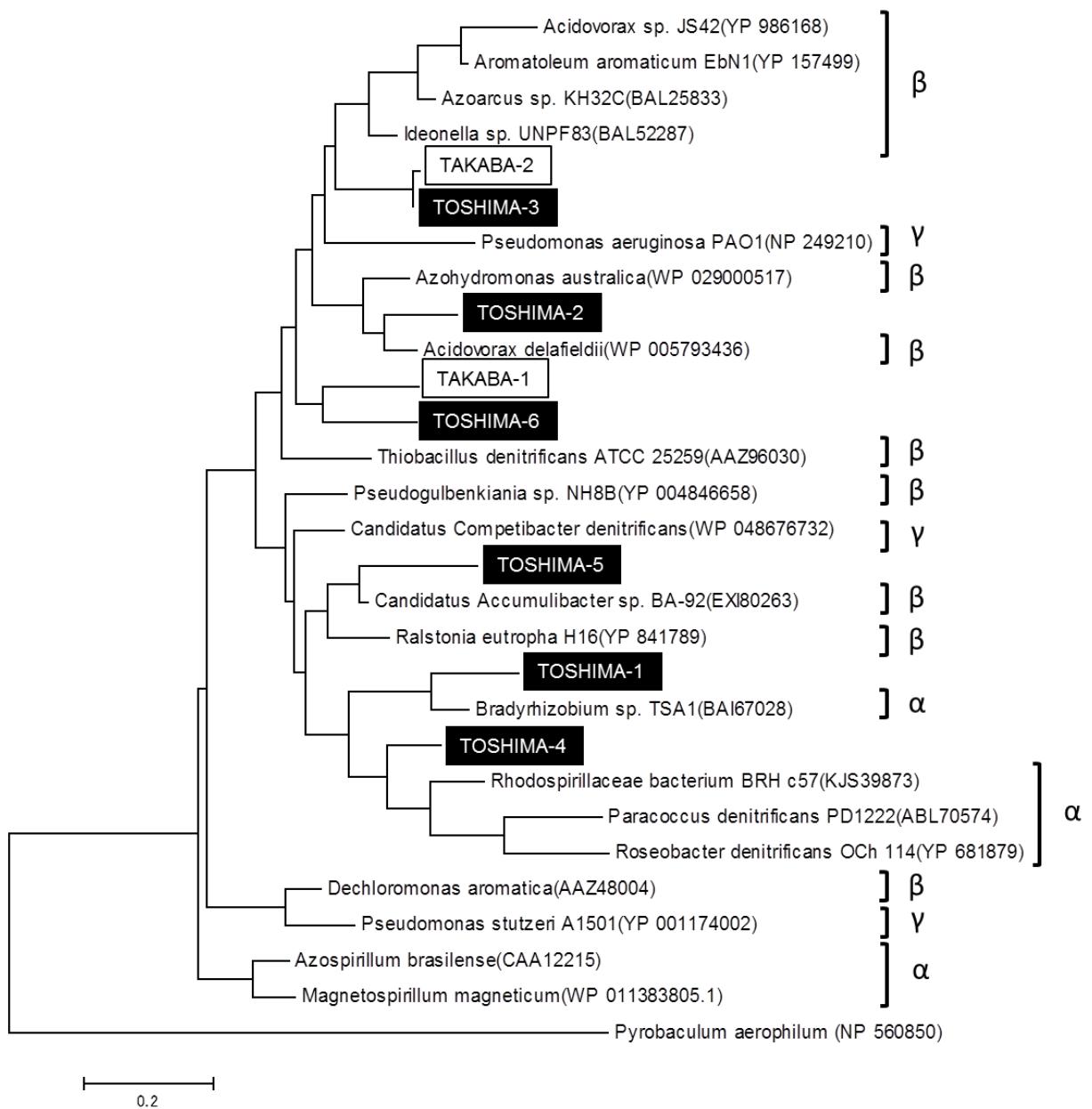


図6 *nirS* 遺伝子のアミノ酸配列に基づく系統樹解析結果

(図中の α , β , γ はそれぞれアルファプロテオバクテリア綱, ベータプロテオバクテリア綱, ガンマプロテオバクテリア綱を示す)

表 6 *nirS* 遺伝子のアミノ酸配列に基づく BLAST 検索結果

Origin	Sample name	Depth (m)	Genebank accession No.	Identities	Closest relative	Isolation source
戸島土壌	TOSHIMA-1	0 - 0.4	AGI99822	90% (101 bp/112 bp)	uncultured bacterium	wetland soil (China: Qinghai-Tibet Plateau)
	TOSHIMA-2		ALE65832	97% (110 bp/113 bp)	uncultured bacterium	agricultural soil (-)
	TOSHIMA-3	0.8 - 1.2	BAN58619	100% (110 bp/110 bp)	uncultured bacterium	an Andosol upland field soil (Japan: Kumamoto)
	TOSHIMA-4		BAR90742	93% (100 bp/108 bp)	uncultured bacterium	grassland soil (China: Inner Mongolia)
	TOSHIMA-5	1.2 - 1.6	AHY29485	98% (109 bp/111 bp)	uncultured bacterium	arable soil (-)
	TOSHIMA-6		ADB24976	96% (107 bp/112 bp)	uncultured bacterium	potato field (Canada)
竹迫土壌	TAKABA-1	0 - 0.4	ACF98445	96% (107 bp/111 bp)	uncultured bacterium	agricultural soil under corn (Canada: Ontario)
	TAKABA-2		BAN58619	99% (109 bp/110 bp)	uncultured bacterium	an Andosol upland field soil (Japan: Kumamoto)

※ Isolation source のカッコ内はその遺伝子配列が得られた場所の国や地域を示す。(-)は国や地域に関する記述がなかったもの。

4) 熊本県内廃棄物不法投棄事例における湧水・表流水の 長期モニタリング

永田 武史* 木庭 亮一

要 旨

熊本県内において、1995年7月に下水処理汚泥を中心とする廃棄物の不法投棄が発覚した。原野周辺における環境基準を大幅に超過する硝酸性窒素が検出されたため、1996年から2016年までの20年にわたり湧水3地点、表流水3地点の水質調査を実施した。調査開始後、湧水中の硝酸性窒素濃度は徐々に低下し、問題発覚から19年を経過して、全ての調査地点で硝酸性窒素濃度が地下水の水質汚濁に係る環境基準を下回ったことが確認された。

キーワード：不法投棄，湧水，硝酸性窒素，長期モニタリング

はじめに

熊本県内において、1995年7月に産業廃棄物処理業者（以下業者Aという。）による下水処理汚泥を中心とする廃棄物の不法投棄が発覚した。最終的には、熊本県と汚泥の排出事業者（10者）が実施主体となり2003年1月までに約10,000 m³の汚泥を除去し、業者Aが除去したものをあわせて約15,000 m³の汚泥を撤去した。

原野周辺の湧水で地下水の水質汚濁に係る環境基準を超過する硝酸性窒素が検出されたため、1996年1月から2016年2月に至るまで、湧水3地点及び表流水3地点の水質の定期的な調査を実施した。今回、硝酸性

窒素濃度の推移と他成分との相関を中心とした調査結果について報告する。

不法投棄問題の概要及び経緯

図1に不法投棄の現場となった原野の略図を示す。原野は、阿蘇外輪山西側の海拔470 m～650 mに位置した丘陵の尾根に草地が広がっている部分で、東西約1600 m、南北約850 mの範囲にわたっている。原野は西に向かって海拔が低くなっている。草地の北側と南側は沢になっており、西に向かって谷川が流れている。草地周辺の地質は、後述の投棄汚泥量調査時の地質調査により、全体的に溶結凝灰岩層（Aso-2）あるいは凝

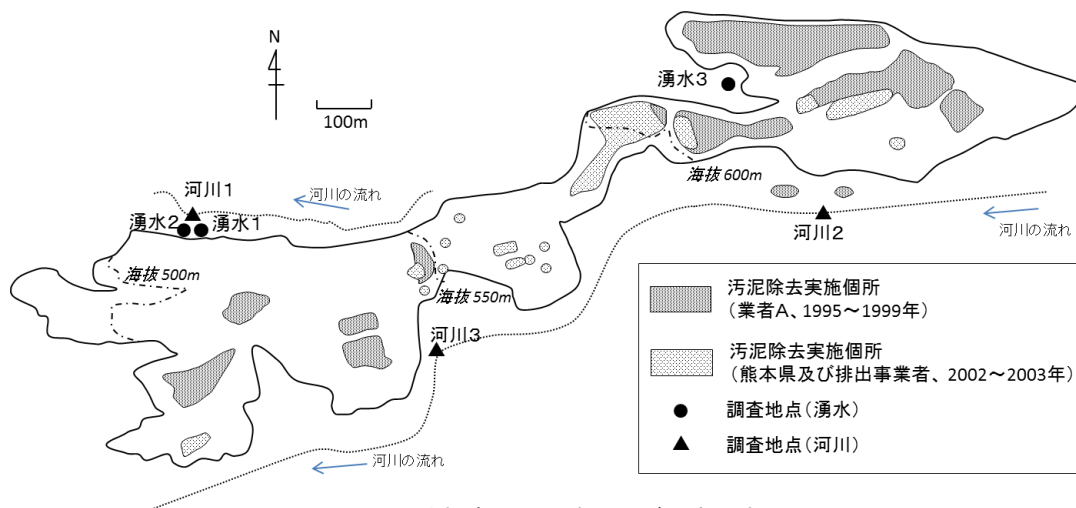


図1 不法投棄現場の略図及び調査地点

* 現環境生活部環境局循環社会推進課

灰角礫岩層の上に黒ボク、赤ボク土からなるローム層が数 m～10m の厚さで堆積していると推定された。

業者Aは草地の 70 カ所以上で最大 5 m の深さの穴を掘り、汚泥を投棄していた。汚泥の大半は下水処理施設から排出されたものであり、動植物性残さなども含まれていた。1995 年の不法投棄発覚後、熊本県は業者Aに対して汚泥の除去を求め、業者Aも一部汚泥を撤去したが、1997 年に新たな汚泥埋設が発覚したうえ、資金難などのため汚泥の除去は進まなかった。1999 年末までに業者Aによって除去された汚泥は約 5,000 m³であった。

地元自治体(町)が、2000 年 11 月～2001 年 8 月にかけて投棄汚泥量の調査を行った結果、撤去が必要な汚泥の量が約 10,000m³と推定され、熊本県(業者Aの資金難のため行政代執行)及び排出事業者が実施主体になり 2002 年 11 月から 2003 年 1 月にかけて、除去を実施した。図 1 の網かけの部分が、業者A、熊本県、排出事業者が汚泥の除去を実施した部分である

調査の概要

調査地点は図 1 に示すとおりである。不法投棄が発覚した後の 1996 年 1 月から 2016 年 2 月まで、不法投棄現場に隣接する湧水 3 地点、表流水(河川水) 3 地点で調査を実施した。調査項目は、水素イオン濃度(pH)、生物化学的酸素消費量(BOD)、全窒素、硝酸性及び亜硝酸性窒素、塩化物イオン、シアン化合物、有害重金属類(カドミウム、鉛、ヒ素、六価クロム、水銀)、有機リン、揮発性有機化合物類(1,1,1-トリクロロエタン、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレン)である。

表 1 硝酸性窒素(NO₃-N)の検出状況

調査地点	濃度範囲 (mg/L)	最大値を示した調査年月
湧水1	6.4 ~ 45	1997年10月
湧水2	4.5 ~ 43	1997年10月
湧水3	1.4 ~ 29	1997年7月
河川1	0.51 ~ 17	2004年10月
河川2	0.08 ~ 0.55	1996年1月
河川3	0.09 ~ 2.4	2005年11月

調査結果

調査期間中、すべての地点で、硝酸性窒素(NO₃-N)、塩化物イオン以外の項目は不検出または環境基準を大幅に下回る状況が続いた。

硝酸性窒素の検出状況を表 1 に示す。特に湧水 3 地点では、地下水の水質汚濁に係る環境基準(10 mg/L)を大幅に上回る硝酸性窒素が検出された。

1 湧水における硝酸性窒素濃度の推移

硝酸性窒素が検出された湧水 1、湧水 2 及び湧水 3 における硝酸性窒素濃度及び塩化物イオン(Cl⁻)濃度の推移を図 2、図 3 及び図 4 にそれぞれ示す。

湧水 1 と湧水 2 における硝酸性窒素の濃度変化は、かなり類似していた。硝酸性窒素濃度は不法投棄発覚(1995 年 7 月)後、しばらくの間上昇し、1997 年から 1999 年にかけて高い値が維持された後、徐々に低下するという経過をたどった。前述のとおり 2002 年 11 月から 2003 年 1 月にかけて、行政代執行等により汚泥の除去を実施した。その結果、汚泥除去完了後は湧水 1、湧水 2 のいずれも硝酸性窒素濃度が 30mg/L を下回るようになり、湧水 1 は 2014 年 7 月、湧水 2 は 2012 年 2 月に初めて環境基準(10 mg/L)を下回った。

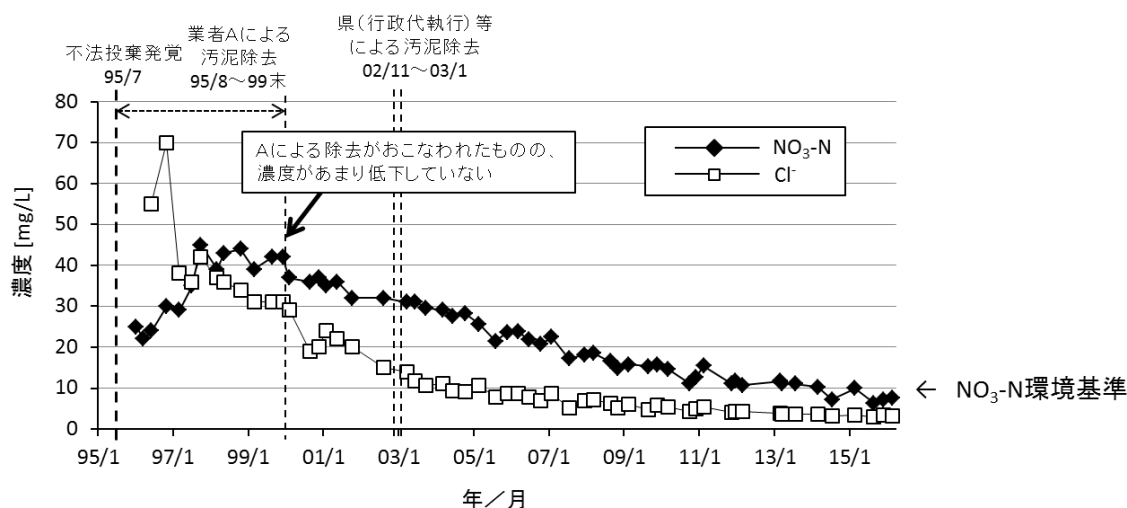


図 2 硝酸性窒素(NO₃-N)及び塩化物イオン(Cl⁻)の濃度推移(湧水1)

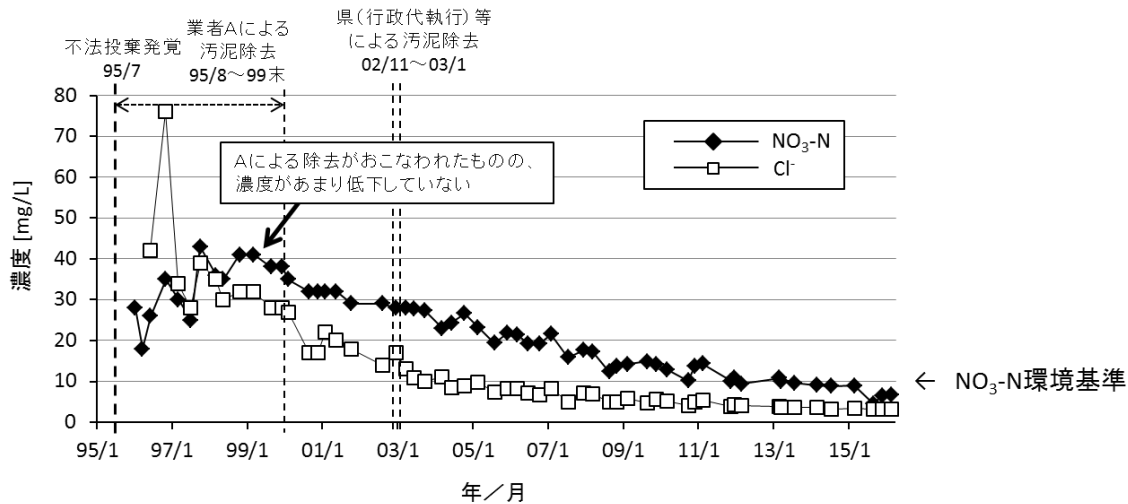


図3 硝酸性窒素 (NO₃-N) 及び塩化物イオン (Cl⁻) の濃度推移 (湧水 2)

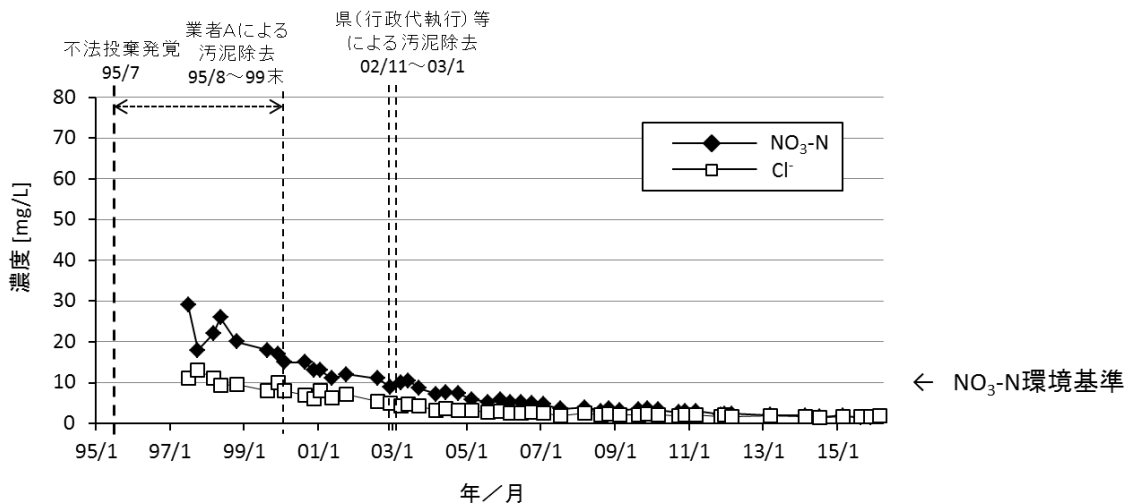


図4 硝酸性窒素 (NO₃-N) 及び塩化物イオン (Cl⁻) の濃度推移 (湧水 3)

湧水 1 と湧水 2 の塩化物イオン濃度は、硝酸性窒素濃度と同様に不法投棄発覚後にいったん上昇し、その後低下するという経過をたどった。しかし、塩化物イオンは硝酸性窒素と比較して早く最高濃度に達し (1996 年)、低下に転じた。

湧水 3 は、湧水 1、湧水 2 と比較して硝酸性窒素の最高濃度が低く、早い時期 (2002 年) に環境基準を下回った。また、塩化物イオン濃度の変動も湧水 1、湧水 2 と比較して小さかった。これは湧水 3 の海拔が約 620m であり、不法投棄汚泥が埋設された多くの地点よりも高い位置にあること、湧水 3 周辺の原野北部では不法投棄の際、穴を深く掘らず散布していたため地

下水への影響が小さかったこと、及び湧水 3 の周辺の汚泥は業者 A により比較的早い時期に除去されたことが関係しているものと考えられる。

2 硝酸性窒素と他成分との相関について

イオンクロマトグラフの詳細なチャート等が確認可能な、2004 年 6 月以降の調査において、同時に測定した水素イオン濃度 (pH)、電気伝導度 (EC)、硝酸性窒素以外の主要イオン成分 (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cl⁻, SO₄²⁻, HCO₃⁻) について、硝酸性窒素との相関を調べた。湧水 3 地点における相関係数を表 2 に示す。

3 地点とも、硝酸性窒素は電気伝導度 (EC) との間

表 2 硝酸性窒素と他の主要イオン成分との相関係数 (2004 年 6 月以降)

※ 斜字は 0.8 以上を示す。

	pH	EC	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	HCO ₃ ⁻
湧水1	-0.246	0.974	0.912	0.519	0.934	0.945	0.970	-0.036	0.086
湧水2	-0.246	0.962	0.939	0.559	0.950	0.941	0.963	0.004	-0.055
湧水3	-0.152	0.912	0.893	0.441	0.727	0.808	0.932	-0.437	-0.570

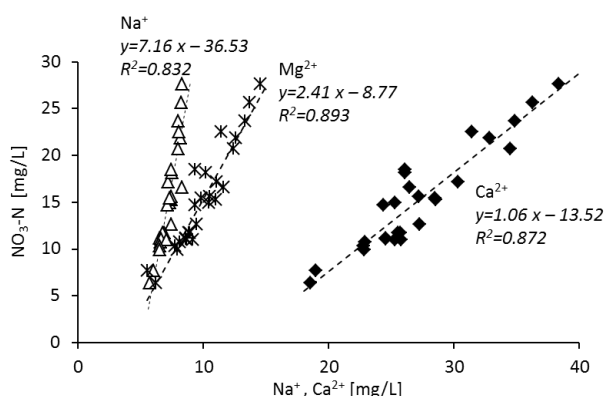


図 5 硝酸性窒素 (NO₃-N) と Na⁺, Ca²⁺及び Mg²⁺との関係 (湧水 1)

に高い相関があった。陽イオンについては Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺との相関係数が比較的高く、pH, K⁺との相関係数は高くなかった。一方、陰イオンについては Cl⁻との間の相関係数が高かったが、SO₄²⁻, HCO₃⁻との相関係数は低かった。相関係数が高かったイオン成分については、不法投棄された汚泥に含有されていたものに由来するものと考えられる。

例として、湧水 1 における硝酸性窒素と Na⁺, Ca²⁺及び Mg²⁺との関係を図 5 に示す。

ま と め

本事例では、下水汚泥を主成分とした産業廃棄物の不法投棄地点周辺の湧水において、硝酸性窒素濃度の上昇が見られ、最も高い時期で環境基準の 4 倍を超える濃度の硝酸性窒素が検出された。不法投棄を行った業者、県、排出事業者が汚泥除去を行った結果、湧水中の硝酸性窒素濃度が徐々に低下し、問題発覚から 19 年、汚泥除去の完了から 11 年を経過して、全ての調査地点で硝酸性窒素濃度が地下水の水質汚濁に係る環境基準を下回ったことが確認された。

湧水中の硝酸性窒素濃度は Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, 及び Cl⁻との相関係数が高く、これらのイオン成分は汚泥に由来する可能性が示唆された。このうち、Cl⁻は硝酸性窒素と比較して速く濃度が低下した。

なお、この調査は全ての地点で硝酸性窒素の濃度が環境基準を満たす状態が 2 年間継続し、今後も低減傾向が続くと判断されることから、2016 年 2 月の調査をもって長期モニタリングを終了した。