

# 分解菌集積木質炭化素材を用いた農薬吸着・ 分解技術の汚染現場への適用

農業環境技術研究所化学環境部 たか  
有機化学物質研究グループ 木 和 広  
高木和広

## はじめに

難分解性化学物質が海棲哺乳類に濃縮されたり、それらが使用されていない極地で検出されたこと、いわゆる環境ホルモンは生物の生育ステージによっては低濃度で影響が出る可能性があるとの懸念により 2001 年に POPs (Persistent Organic Pollutants) 条約が採択された。この条約により 1970 年代半ばに製造・使用が禁止された有機塩素系農薬 6 種類 (DDT 剤, アルドリン剤, ディルドリン剤, エンドリン剤, クロルデン剤, ヘプタクロール) を含む 12 物質が POPs に指定され、各国では国際的枠組みの中で適正な管理・処理を進めることになった。

このように、従来のリスク評価では問題にならなかつた超微量での化学物質による広範囲の環境汚染が社会問題化しており、農薬等化学物質の環境リスク削減技術の開発が求められている。化学物質の環境リスクは毒性と暴露量（環境中濃度）の両者から評価される。つまり、化学物質の毒性あるいは暴露量を低下させれば、環境リスクは削減できる。

暴露量の削減法としては汚染物質の分解除去が考えられるが、農薬等の合成有機化合物による環境汚染は汚染範囲が広く、汚染濃度が低いことから、従来の物理的・化学的手法（客土や土壤洗浄等）では汚染除去が困難であり、多額の経費を必要とする。そこで、これらの汚染物質の除去技術として、微生物等の生物機能（特に分解能）を利用するバイオレメディエーションに期待が寄せられている。

筆者らは、民間企業と共同で開発した木質炭化素材（有機化合物吸着能が高い細菌の住みか）を用い、土壤中の難分解性農薬分解細菌の迅速集積・純化法を開発し、除草剤 CAT 剤（シマジン）や殺菌剤 PCNB（キントゼン）の分解細菌を土壤から単離した。また、単離

した分解細菌を再び木質炭化素材細孔内に集積させた分解菌集積炭化素材を農薬残留土壤に混和することにより、土壤中で安定的に農薬分解能を発現させることにも成功した（高木, 2000 a, 2000 b）。今回はこれらの研究成果（室内試験）を野外環境下で実証するため、CAT 分解細菌群を集積させた木質炭化素材をゴルフ場下層土に埋設した。そして、散布された CAT 剤の分解除去能を 2 年間調査し、良好な試験結果を得たので報告・解説する。

## I 分解菌集積木質炭化素材

分解菌集積木質炭化素材（図-1）とは、簡単にいえば特殊な木炭細孔内に分解・除去したい有機汚染物質の分解細菌だけを高密度 ( $10^8$  cfu/g 乾物レベル) に集積させた複合素材である。特殊な木炭とは、pH, 比表面積、細孔分布、を人工的な細菌の住みかとして最適に制御した木炭である。このため、燃料用・除湿用等の一般の木炭と区別するため「木質炭化素材」と名付けている。

筆者らが開発した木質炭化素材 A (高木, 2000 a) の物性は、pH が 8、比表面積が  $100 \text{ m}^2/\text{g}$ 、直径 5~20  $\mu\text{m}$  の細孔の容積が全細孔容積の 10% 以上である。CAT 剤分解細菌群 CD 7 (*Arthrobacter* sp., *Bradyrh-*

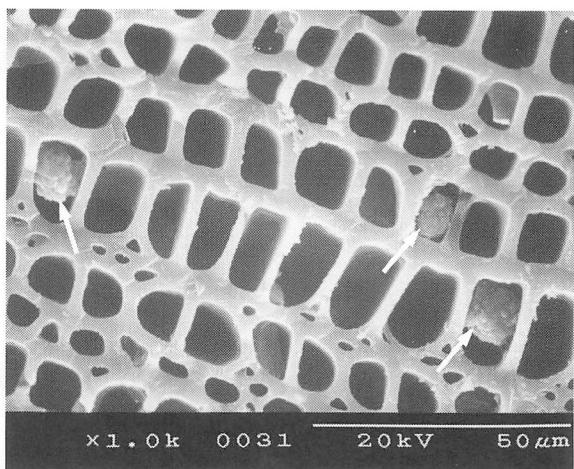


図-1 木質炭化素材細孔内に集積した CAT 剤分解細菌群 CD 7 (倍率: ×1,000)

*In Situ* Bioremediation of Pesticide Contaminated Soil in a Golf Course Using Degrading Bacteria-enriched Charcoal.  
By Kazuhiro TAKAGI

(キーワード：分解菌集積木質炭化資材、難分解性農薬、CAT 剤、吸着・分解技術、原位置バイオレメディエーション）

*izobium japonicum* および beta-proteobacteria に属する新菌株 CDB 21 からなる複合微生物系) をこの素材 A 7.5 g に接種し、CAT 剤 (5 mg/l) を唯一の C・N 源とする無機塩培地 300 ml を 3 週間程度環流させれば (環流液は 1 週間ごとに交換), CD 7 を素材細孔内に  $10^8$  cfu/g 乾物レベルまで集積させることができる。PCNB 分解細菌である *Burkholderia cepacia* KTYY 97 も同様な方法で素材 A に高密度の集積が可能である。

分解菌集積木質炭化素材の特徴は、①土壤に比べ数十倍程度高い吸着係数 (Kf) を有するため、汚染土壤中に導入すると水とともに移動 (拡散、移行) する有機汚染物質を速やかに吸着・集積することができること、②吸着・集積した有機汚染物質はそれを餌とする細菌により分解されることである。従来、活性炭のような炭化物は有機汚染物質の吸着除去剤として、汚染環境で使用されたが、すぐに吸着飽和に達し、頻繁に交換しなければならなかった。しかし、筆者らが開発した分解菌集積木質炭化素材は吸着した有機汚染物質を速やかに分解するため、長期間の使用が可能である。現在は、中規模な環流装置を開発し、一度に 60 kg 程度の分解菌集積木質炭化素材を製造することができる。

## II 分解菌集積木質炭化素材を用いた原位置バイオレメディエーション

分解菌集積木質炭化素材は、汚染現場設置型バイオリアクターとして次のような活用・応用場面が考えられる。例えは水系に関しては、生活排水路、水田地帯の農業排水路やゴルフ場の排水路など、土壤系に関しては難分解性有機化合物で汚染された表層および下層土壤、ゴルフ場グリーンやフェアウェーの下層土壤、産業廃棄物処理場の下層土壤など、さらに、流出油汚染海浜地域の土壤などに分解菌集積木質炭化素材を直接適用することで、汚染物質が吸着・分解除去され、汚染環境の修復が図れる可能性がある。ただし、これらの可能性を現実の

ものとするには、温度や水分条件等が変動する野外環境下での実証試験と知見の集積が不可欠である。

そこで、筆者らは 2000 年 10 月からゴルフ場関連企業と共にゴルフ場を使った 2 年間の野外実証試験を行い、実用化に向けて有用な知見を集積した。図-2 は実証試験現場の模式図である。対象薬剤には、難分解性農薬 CAT 剤を選んだ。CAT 剤はゴルフ場等の雑草管理に広く使用されていたが、1994 (平成 6) 年に水質汚濁性農薬に指定されたため、使用量は減少している。しかし、土壤中半減期が長く土壤吸着係数が低いためゴルフ場の排水や水道原水から最も多く検出された化学物質の一つである (丸、1998)。

強力な CAT 剤分解活性を有し、CAT 剤を無機化できる細菌群 CD 7 (高木ら、2003) を集積させた木質炭化素材 (菌数  $7.5 \times 10^7$  cfu/g 乾物) を約 60 kg 作成し、ゴルフ場フェアウェー ( $2 \times 3$  m) の下層土 (深さ 15 cm) に 1 cm の厚さで敷き詰めた (処理区)。その後、芝管理のため年 2 回 (春と秋) 散布する CAT 剤による下層土および河川・地下水汚染防止の野外実証試験を行った。

分解菌未集積の木質炭化素材を同様に敷き詰めた対照区を 1 m 幅の緩衝帯を設けて設営し、木炭層直下の浸透水を吸引採取するため、両区にガラス製ポーラスカップを各 4 か所挿入した。また、分解菌の活性や生残性に影響を与える地温・水分をモニタリングするため、木炭層にセンサーを挿入し、データロガーで 1 時間ごとに記録・解析した。浸透水、土壤 (木炭層上層および下層)、木炭層は定期的に各区 2 か所から採取し、それぞれの CAT 剤残留量と木炭中の CAT 剤分解菌数の変動を調査した。

木質炭化素材埋設 (2000 年 10 月 16 日) 後、CAT 剤は 2000 年 10 月 21 日 (1 回目)、2001 年 3 月 31 日 (2 回目)、2001 年 10 月 13 日 (3 回目)、2002 年 3 月 30 日の計 4 回、慣行量 (50% 水和剤 25 g/a) 散布した。図-

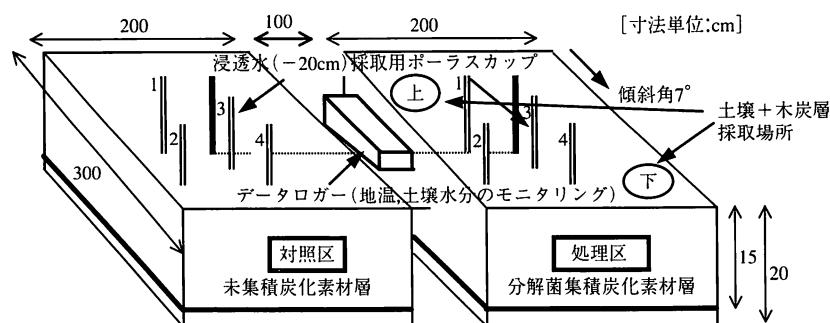


図-2 分解菌集積炭化素材埋設ゴルフ場での CAT 剤吸着・分解除去実証試験の模式図

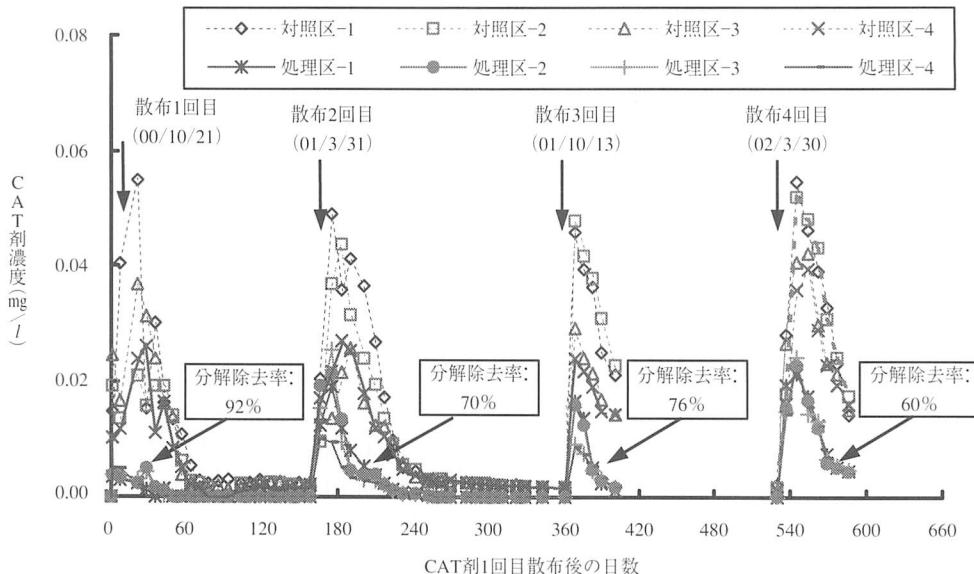


図-3 ゴルフ場浸透水中のCAT剤濃度の経時変化とCAT剤分解除去率(高木ら, 2003)

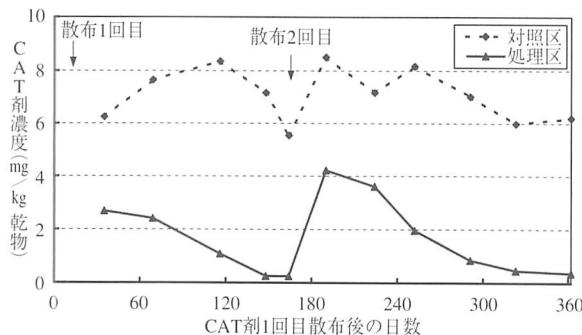
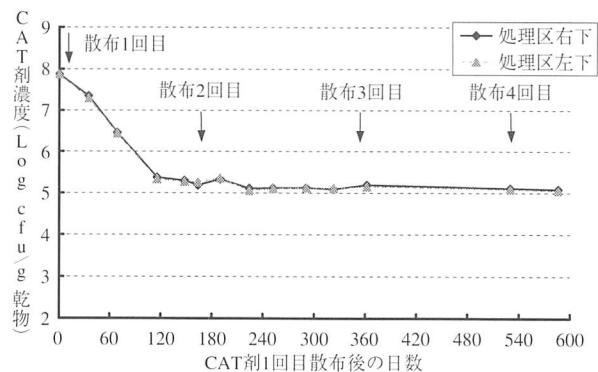


図-4 木質炭化素材中のCAT剤濃度の経時変化(高木ら, 2003)

3は両区の浸透水中のCAT剤濃度の変動である。処理区浸透水中のCAT剤分解除去率は対照区と比較して、散布1回目では92%に達した。散布2回目以降では、分解除去率は若干低下し、それぞれ70%, 76%, 60%になったが、60%以上の分解除去率を維持した(TAKAGI and YOSHIOKA, 2002; 高木, 2003)。

図-4は木質炭化素材中のCAT剤濃度の経時変化を示している。対照区では炭化素材中のCAT剤は吸着により高濃度(6~8 mg/kg乾物)を維持しているが、処理区では予想どおり吸着されたCAT剤が分解されるため、濃度は散布6か月後には0.3 mg/kg以下まで低下した。

散布2回目以降での分解除去率低下の要因としては、炭化素材中のCAT剤分解菌数が接種後4か月で $7.5 \times 10^7$  cfu/g乾物から $10^5$  cfu/g乾物まで減少したことが考

図-5 木質炭化素材中のCAT剤分解菌数の推移  
(TAKAGI et al., 2002)

えられる(図-5)。つまり、散布2回目以降は分解菌数の減少により、表層から溶脱し炭化素材層に吸着されたCAT剤の分解速度が低下したため、炭化素材の吸着量を超えたCAT剤が炭化層から下層に溶脱したと考えられる。分解速度の低下は分解菌数の低下だけでなく地温の低下によっても引き起こされる。図-6はゴルフ場実証試験区の気温および地温(-15 cm)のモニタリング結果であるが、散布2回目(春散布)の散布後2週間の平均地温が10.2°Cであるのに対し散布3回目(秋散布)では平均地温は15.3°Cと5°C上昇していた。炭化素材中のCAT剤分解菌数は散布2回目直前と3回目直前では同レベル( $10^5$  cfu/g乾物)であったが、散布3回目と比べ平均地温が5°C低かった散布2回目では浸透水中的CAT剤分解除去率も6%低下していた。特に、散

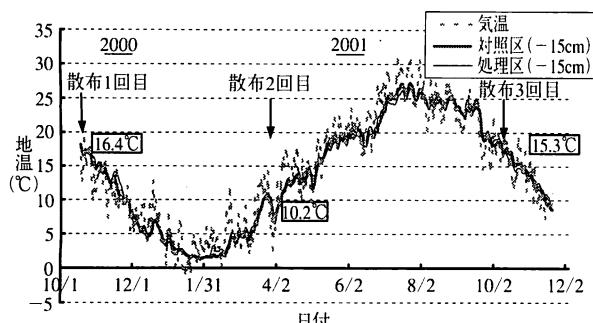


図-6 分解菌集積炭化素材埋設後のゴルフ場の気温および地温（-15 cm）の変動（TAKAGI et al., 2002）

布後2週間の分解除去率を比較すると散布3回目が65.3%であるのに対して、散布2回目は18.4%と47%も低下していた。実際に、室内実験でCD7のCAT剤分解速度を調べると、培養温度15~25°CでのCD7のCAT剤分解速度は非常に速い（半減期0.7~0.9日）が10°C以下になると、分解速度は急激に低下し、半減期は10°Cで3.2日、5°Cで16.5日になった。

野外（今回は下層土壤）に設置した分解菌集積炭化素材の有機汚染物質分解除去能力は、埋設後の分解菌密度の低下および地温の低下により若干低下する。しかし、ゴルフ場下層にCAT剤分解菌集積炭化素材を敷き詰めれば、年2回散布されるCAT剤の下層土および河川・地下水汚染のリスクを1年間通じて大幅にしかも長期間（2年間）削減できることが実証された。今回の野外での分解菌接種によるバイオレメディエーション（Bio-augmentation）の成功は、日本初であり海外でもほとんど例がない。

筆者らの開発したバイオレメディエーション技術は野外実証試験例および成功例がほとんどないBio-augmentationに属するが、従来のBio-augmentationにない二つの優れた点がある。

一つ目は、従来の方法が、有機汚染物質の土壤中での分解速度だけを高めることによる分解プロセスの制御であるのに対し、この方法は、吸着定数（K<sub>f</sub>）が土壤より20倍程度高く、分解菌を高密度で集積させた層を土壤中に作ることにより、有機汚染物質の挙動に大きく影響する「吸着と（微生物）分解」の2大プロセスを同時に制御できるため、従来の方法より効率よく汚染物質を分解除去できる。

二つ目は、木質炭化素材という有機化合物吸着能の高い人工的な細菌の住みかに分解菌を集積させて土壤に導入するため、土着菌との競合や原生動物の捕食による減少と分解菌の餌である有機汚染物質の十分な供給によ

り、分解菌の生残性が高まる点である。先にも述べたが、木質炭化素材中のCAT剤分解菌数は接種20か月後まで10<sup>5</sup> cfu/g乾物レベルを維持している（図-5）。一方、γ-BHC分解菌（蒸留水中に懸濁）をその基質であるγ-BHC（10 mg/kg乾土）とともに野外試験畑圃場（黒ぼく土）に10<sup>5</sup> cfu/g接種（従来の接種法）すると、接種後5か月で菌数は10 cfu/g乾土まで減少することが報告されている（SENOO and WADA, 1990）。分解菌集積木質炭化素材の野外汚染環境中での耐用年数であるが、分解菌数は埋設600日後でも10<sup>5</sup> cfu/g乾物レベルを維持しており、かなりの長期間（数年間）有機汚染物質を吸着・分解除去できると推察される。

### III 今後の研究課題

筆者らが研究開発した技術を普及させるためには、いくつか問題点がある。まず、第一に木質炭化素材を用いて土壤中から単離した分解菌が分解できる有機化合物の種類が、有機塩素系農薬（PCNB剤、PCP剤：登録失効済、HCB剤；国内登録なし）やトリアジン系除草剤（CAT剤、アトラジン剤）に限定されている点である。この点に関しては、対象化合物を広げるために、酸アミド系除草剤（プレチラクロール剤、メフェナセット剤）や水稻用のトリアジン系除草剤（シメトリン剤、ジメタメトリン剤）分解菌の探索を民間企業と共同で進めており、いくつかの有望な分解菌株を得つつある。また、POPsに指定されているディルドリン剤分解菌の探索も計画している。将来的には、単離した分解菌を系統的に分類し、有機汚染物質に対応した分解菌のライブラリーを構築する必要がある。

次に、複数の汚染物質や单菌では無機化（無毒化）できない汚染物質を分解除去するため、木質炭化素材中に数種の分解菌のコンソーシア（複合微生物系）を構築する技術の開発が必要である。CAT剤分解菌群CD7の例からわかるように、複合微生物系を用いることにより、有機汚染物質を短時間で効率よく無機化（無毒化）できる。また、複合微生物系は单菌に比べ環境中での増殖速度や生残性が高いことが知られており、原位置バイオレメディエーションには適した系である。現在、筆者らは、単離した数種の分解菌を木質炭化素材に高密度で集積させる研究に取り組んでいる。また、CD7菌群の2種の未同定細菌の同定や各細菌のCAT剤分解代謝経路の解明にも取り組んでいる。

有機汚染物質のバイオレメディエーションに用いられる分解菌の研究開発は遺伝子組換え技術を用いた分解能の増強や新たな分解系の作出が主流である。しかし、組

換え微生物 (GMOs) の野外放出の安全性評価に関しては、今でも研究や議論が続けられており、パブリックアクセプタンスも得にくい状況にある。複合微生物系の構造と分解機能の解析を進め、それを対象汚染物質に合わせて人為的に再構築できれば、GMOs を使わなくてもより自然に近い形でバイオレメディエーションができる。

複合微生物系によるバイオレメディエーションの研究開発は始まったばかりで、大きな可能性を秘めている。今後の研究開発の推進が強く望まれる。

### おわりに

21世紀の新産業の一つに環境産業が挙げられている。汚染環境を修復するバイオレメディエーションは環境産業の中の目玉とされている。また、21世紀の製造業のあり方として、ゼロエミッション型への移行が叫ばれている。農業は人類の生存に必要な食糧を製造する製造業であり、その過程で多くの資材（農薬や化学肥料等）を農地に投入する。資材の一部には、農業生産の系外に流

出し、環境負荷物質となって環境汚染を引き起こしたものもあった。今後は、農業といえども系外に環境負荷物質を放出しないゼロエミッション型へと移行すべきである。今回筆者らが研究開発した技術は、バイオレメディエーションとゼロエミッション型農業を支える基盤技術になると確信している。この技術を発展・進化させ、汚染環境の修復と環境汚染の防止に貢献し、すべての生命を育むかけがえのない地球環境を次世代に引き継ぐことが筆者らの課題であり、夢である。

### 引用文献

- 1) 丸 諭 (1998) : 農薬環境科学研究 6: 9~14.
- 2) SENOO, K. and H. WADA (1990) : Soil Sci. Plant Nutr. 36: 593~598.
- 3) 高木和広 (2000 a) : 農業技術体系土肥編第3巻, 追録第11号, pp. 49~55.
- 4) \_\_\_\_\_ (2000 b) : 農林水産技術研究ジャーナル 23(3): 10~15.
- 5) TAKAGI, K. and Y. YOSHIOKA (2002) : 10th IUPAC International Congress on the Chemistry of Crop Protection, Book of Abstracts, Vol. 2, p. 56.
- 6) 高木和広ら (2003) : 農業環境研究成果情報, No. 19, pp. 24~25.
- 7) \_\_\_\_\_ (2003) : 先端化学シリーズII環境ケミカルサイエンス, 丸善, 東京, pp. 250~258.

### 中央だより

#### ○試験研究独立行政法人技術移転事業者 (TLO) の認定について

農林水産省は、6月2日、(社)農林水産技術情報協会を、農林水産省所管の試験研究独立行政法人の保有する特許等を民間事業者に移転し、社会における有効活用を促進する技術移転事業者 (TLO) に認定した。これにより、事業者は、八つの試験研究独立行政法人（農業技術研究機構、農業生物資源研究所、農業環境技術研究所、農業工学研究所、食品総合研究所、国際農林水産業研究センター、森林総合研究所、水産総合研究センター）の特許技術ライセンス契約等につき、情報協会という一つの窓口に相談することができるようになった。8法人の所有する特許権は887件（平成15年3月末時点）で、その用途は農林水産業等幅広い分野が想定されている。植物防疫に活用できる特許技術は、農業技術研究機構、農業生物資源研究所、農業環境技術研究所、国際農林水産業研究センター及び森林総合研究所に所有されているが、いずれの独法の特許も情報協会を通じてライセンス交渉が可能。

独法特許技術の活用例に、発芽玄米がある。農業技術

研究機構の特許「 $\gamma$ -アミノ酪酸を富化した食品素材（特許番号2590423）」の許諾を受け発芽玄米は製造されており、各食品業界紙は市場規模が150億円（平成14年度小売ベース）に達したとしている。こうした、広く活用されている特許技術がある一方、未活用の特許も多いのが現状。研究開発によって生まれた特許技術は事業化され利益が社会へ還元されてその使命を全うする。特許技術の「セールスマン」であるTLOが認定されたのはこうした事情による。

ライセンス可能な特許技術は情報協会のホームページに掲載しており (<http://www.afttis.or.jp>)、想定される適用製品も示し、特許公報よりも利用者にわかりやすい内容となっている。植物防疫関係の特許は、「化学・薬品」、「植物バイオ」、「有機材料」及び「機械・加工・装置」の中に分類されている。情報協会は独法との共同研究の斡旋も行う。情報協会には、民間企業でのライセンス実務の経験があるスタッフがおり、ライセンスの相談に親身に対応すること。地域や中小の事業者の活用も歓迎することである（連絡先：(社)農林水産技術情報協会内、AFFTIS（あふていす）アイピー、電話：03-3668-8931(代)、e-mail: [tokkyo@afttis.or.jp](mailto:tokkyo@afttis.or.jp)）。