

吉備国際大学
政策マネジメント学部研究紀要
第3号, 79-89, 2007

環境ホルモン様化学物質のファイトレメディエーションに関する研究 —植物の収奪機能による Atrazine の浄化—

村本 茂樹

Research on phyto-remediation of some kind of endocrine disrupters chemical (EDs)
—Purification of atrazine in polluted water by absorption with plants—

Shigeki MURAMOTO

はじめに

環境ホルモン様化学物質の一つとして対象とした Atrazine はトリアジン系の除草剤の一種で、内分泌攪乱作用が疑われている難分解性化学物質である⁵⁾。トウモロコシやサトウキビ、アスパラガスなどの栽培に使用され、日本の河川でも検出されている。往来アトラジンは高濃度の場合のみ影響が問題とされてきたが、最近低濃度の Atrazine が発達中のカエルの生殖腺や発声器官の発達に影響を与えることが報告されている⁷⁾。また、ラットの実験において子宮癌や乳癌を促進するという報告もあり⁹⁾、EU 諸国では既に使用禁止されている。Atrazine は環境水中への残留性が高く、個体のみならず生態系攪乱などの影響も疑われており、生物影響の低減あるいは未然に防ぐためにも何らかの適切な対策が切望される¹⁻⁴⁾。そこで本研究では Atrazine を特異的に吸収する特定植物を探索し、Atrazine のファイトレメディエーションにおける基礎的データを得る目的で、植物の探索・選抜・暴露の手順で実験を行った。

1. 材料と方法

被験物質には除草剤の Atrazine (関東化学株式会社) を用いた。Atrazine の化学構造式および特徴を殺虫剤の Benomyl とともに Table 1, 2 に示す。

1-1 HPLC 分析手法

1 mg/L 以上における Atrazine の濃度の測定は

有害化学物質(環境ホルモン)暴露実験

供試植物: *Ocimum basilicum*, *Corchorus olitorius* はじめハーブ20種、イネ18種、オオムギ2種を対象とした。

供試薬および暴露濃度:

1) Benomyl

2) Atrazine

methyl 1-(butylcarbamoyl)-2-benzimidazolecarbamate - chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazine



水面栽培法: 暴露設定低濃度区10, 100, 500 $\mu\text{g/L}$ とし、高濃度区2,700, 6,000 $\mu\text{g/L}$ としステンレス水槽に水量各1.5Lの水面にネットを掛け、200-500粒を播種。発芽後1週間目に暴露実験を開始。

水中濃度測定: 暴露開始後、7, 14, 21日目にAtrazine, Benomylの水中濃度を低濃度区はELISA法、高濃度区はHPLCにより測定した。

Table 1 Atrazine の化学構造式及び暴露栽培法

農薬の環境水中の相対的持続性

(McEwen & Stephenson, 1979)

持続性無^a 持続性小^b 持続性中^c 持続性大^dCaptan aldrin atrazine benomyl

Malathion diazinon carbofuran dieldrin

Methiocarb thionazin toxaphene endrin

2,4-D swep aldicarb heptachlor

(半減期)

無: 2週間内、b: 2~6週間、c: 6週~6月、d: 6月以上

Table 2. 環境水中の農薬の持続性比較

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (HITACHI D7000型) に特殊 pre-column を取り付け使用した。Cosmonice Filter W Poresize: 0.45 μ m, diameter: 4 mm, MILLPORE, U.S.A) でろ過し、前処理したサンプルを HPLC の試料とした。分析は岡山大学資源生物科学研究所の機器を借用し 1 処理区につき 3 回繰り返し測定で行った。

1-2 ELISA 分析手法 (酵素免疫測定法)

低濃度 (0.5mg/L 以下) のサンプルは ELISA 法により測定した。ELISA (Enzyme linked Immuno-Sorbent Assay) 法は、動物が有する免疫機能における抗原抗体反応を利用し、対象とする物質の濃度を測定する方法である。固定化する物質の差異により、抗体を固定化する直接競合 ELISA と、抗原を固定化する間接競合 ELISA に分類される。直接競合 ELISA は抗体をマイクロプレートや試験管にコーティングしたものに、対象物質および標識抗原を添加して競合させ、抗体に結合しなかった対象物質や標識抗原を洗浄除去後、酵素基質を添加して酵素による発色反応を促進し、対象物質の標準品の発色度と比較することにより対象物質の濃度を測定するものである。一方、間接競合 ELISA は、免疫原に使用した抗原や免疫原とは異なるタンパク質と結合させたハプテン (抗原の誘導体) をマイクロプ

レートや試験管にコーティングしたものに対象物質および一次抗体を添加して競合反応させ、固層化抗原と結合しなかった対象物質や一次抗体を洗浄除去後、二次抗体を加えて一次抗体と結合させる方法である。ELISA 法と HPLC の検量線はほぼ一致した。

2 ハーブによる高濃度 Atrazine の吸収浄化

2-1 実験材料及び方法

供試植物として用いたハーブの種子は種苗会社から入手した。オオムギの種子は岡山大学資源生物科学研究所で継代栽培されているものの提供を受けて実験に供した。2 L のステンレス製コンテナに 1.5 L の水を入れ、プラスチック製ネット (穴: 1 cm \times 1 cm) を浮かべた。ネットの上にガーゼをひき、各処理区にハーブ 500 粒、オオムギは 200 粒播種した。水に肥料 (ハイポネックス 1 mL) を加えた栽培水を調整し、交換は週に一度行った (Fig. 1)。設定気温 25℃ の温室で 2 週間生育させた後、栽培水に Atrazine を添加し、濃度を 2.5mg/L、6.0mg/L に調節した。生育調査は週に一度行い、各処理区から 10 個体を選んで地上部と地下部の長さを測定した。サンプリングはそれぞれ Atrazine 添加から、0、7、12 日目に行い、分析に供するまで冷蔵庫で保存した。



Fig. 1 幼苗植物の暴露実験風景の一部

2-2 実験結果及び考察

高濃度の Atrazine に暴露されると、供試植物の多くは4日目から白化や根腐れ現象が認められたが、ディル、フェンネル、コリアンダー、チャービルなどのセリ科、イネ科のふじ二条オオムギは白化や根腐れはほとんど認められず、暴露から12日目まで生存した。また、ミカン科のルーにおいては暴露終了まで全く白化も根腐れも認められなかった。

暴露開始から終了までの地上部及び地下部の伸長量から、根の伸長量はコリアンダー、チャービル、バジルで大きかった。地上部の伸長量はオオムギが大きく、ハーブ類ではフェンネルで大きかった。よって、ハーブ類で初期成育が旺盛である種はウォータークレス、ディル、コリアンダー、バジルであった。暴露終了時における地上部及び地下部（根部）の長さをみると、根の長さはジャーマンカモミールやコリアンダー、バジルで長かった。地上部の長さはオオムギが他の植物に比べて極めて大きく、全体の長さもオオムギが最も長かった。暴露終了時の各植物の生重から、オオムギはハーブに比べて生重が極めて大きく、生育初期の生産量が大きいことが判明した。ハーブでは、ウォータークレス、ローマンカモミール、ディル、チャービル、バジルの成育が良好であり、生重が大きかった。また、オオムギの生育初期段階における成長量は極めて大きく、Atrazine に対しても耐性が高いことが示唆された。

各植物を Atrazine 2.5mg/L 及び6.0mg/L で水面栽培した時の水中の Atrazine 濃度変化をみると、ジャーマンカモミールとダイヤーズカモミールではほとんど濃度の変化は認められなかったが、それ以外の全ての植物において、水中 Atrazine 濃度は低下していた。チャービル、ディルでは7日目以降ほぼ濃度は一定であったが、コリアンダー、ふじ二条オオムギは7日目以降も水中濃度が低下していた。これらに対しふじ二条オオムギは、暴露の早い段階

から水中濃度の低下が著しく、濃度低下も顕著であった。一方、6.0mg/Lにおいて、ほとんどの植物で水中濃度の低下が認められた。6.0mg/Lは2.5mg/L濃度区に比べて濃度の低下が穏やかで小さい傾向が認められた。

また暴露終了時の対照区に対する各植物による水中 Atrazine 除去率から、6.0mg/Lと2.5mg/Lの両濃度において、最も除去率が高いのはふじ二条オオムギであった。また、2.5mg/Lではアブラナ科のウォータークレス、セリ科のディル、フェンネル、コリアンダー、チャービル、シソ科のバジルで除去率が高く、ハーブ類ではセリ科が Atrazine に対して耐性が高い傾向が認められた。

高濃度暴露実験の結果から、オオムギは初期生長が極めて旺盛で Atrazine に対する耐性が高く、浄化能力が極めて大きいことが示唆された。セリ科植物およびルーは、Atrazine に対する耐性が強いことが判明し、浄化能力が高いことが示唆された。一方、アブラナ科のウォータークレス、シソ科のバジルは初期生育が旺盛であるが、高濃度の Atrazine に対する耐性は低いことが推察された。そこで、高濃度 Atrazine におけるスクリーニングの結果を踏まえ、低濃度 Atrazine における吸収能力をみるために、ウォータークレス、カモミール、ディル、チャービル、バジル、ルー、ふじ二条オオムギを選出し、さらに新たにルバーブチャードも加えた8種類について比較実験を行った。

3 ハーブおよびオオムギによる低濃度 Atrazine の吸収浄化

3-1 実験材料及び方法

7種類のハーブ（ウォータークレス、ローマンカモミール、ディル、チャービル、スウィートバジル、ルー、ルバーブチャード）及びふじ二条オオムギを供試植物とした（Table.3）。2Lのステンレス製コンテナに1.5Lの水を入れ、プラスチック製

Table 3 供試植物の品名および学名

科	No.	品名	学名
アブラナ科	A	ウォータークレス	<i>Nasturtium officinalis</i> (cruciferae)
キク科	B	エリカンペーン	<i>Inula helenium</i> L.
キク科	C	カモミール (ジャーマン)	<i>Matricaria chamomilla</i> (compositae)
キク科	D	カモミール (ローマン)	<i>Chamaemelum novile</i> (compositae)
キク科	E	カモミール (ダイヤーズ)	<i>Anthemis</i> sp. (compositae)
キク科	F	ロシアタラゴン	<i>Artemisia dracunculus</i> (タラゴン)
セリ科	G	ディル	<i>Anethum graveolens</i> var. <i>esculentum</i>
セリ科	H	フローレンスフェンネル	<i>Foeniculum Vulgare</i> (フェンネル)
セリ科	I	コリアンダー	<i>Coriandrum strivum</i>
セリ科	J	チャービル	<i>Anthriscus cerefolium</i>
シソ科	K	バジル・スイートバジル	<i>Ocimum basillicum</i>
シソ科	L	ミント・ペパーミント	<i>Mentha spicata</i> (ミント)
シソ科	M	マウンティンミント	<i>Mentha spicata</i> (ミント)
シソ科	N	タイム	<i>Thymus vulgaris</i>
アマ科	O	フラックスブルー*	<i>Linum</i> sp. (フラックス)
ミカン科	P	ルー (ヘンルーダ)	<i>Ruta graveolens</i>
バラ科	Q	ワイルドストロベリー	<i>Fragaria vesza</i> L.
シソ科	S	セイジ	<i>Salvia officinalis</i>
シソ科	T	ローズマリー	<i>Rosmarinus officinalis</i>
アカザ科	U	ルバーブ・チャード	
オオムギ	R	ふじ二条オオムギ	<i>Hordeum vulgare</i> L.

ネット (穴: 1 cm×1 cm) を浮かべた。ネット上にガーゼをひき、各処理区にハーブ500粒、オオムギは200粒播種した (Fig.2)。水に肥料 (ハイポネックス 1 mL) を加えた栽培水を調整し、換水は



Fig.2 Atrazine 高濃度曝露実験風景の一部

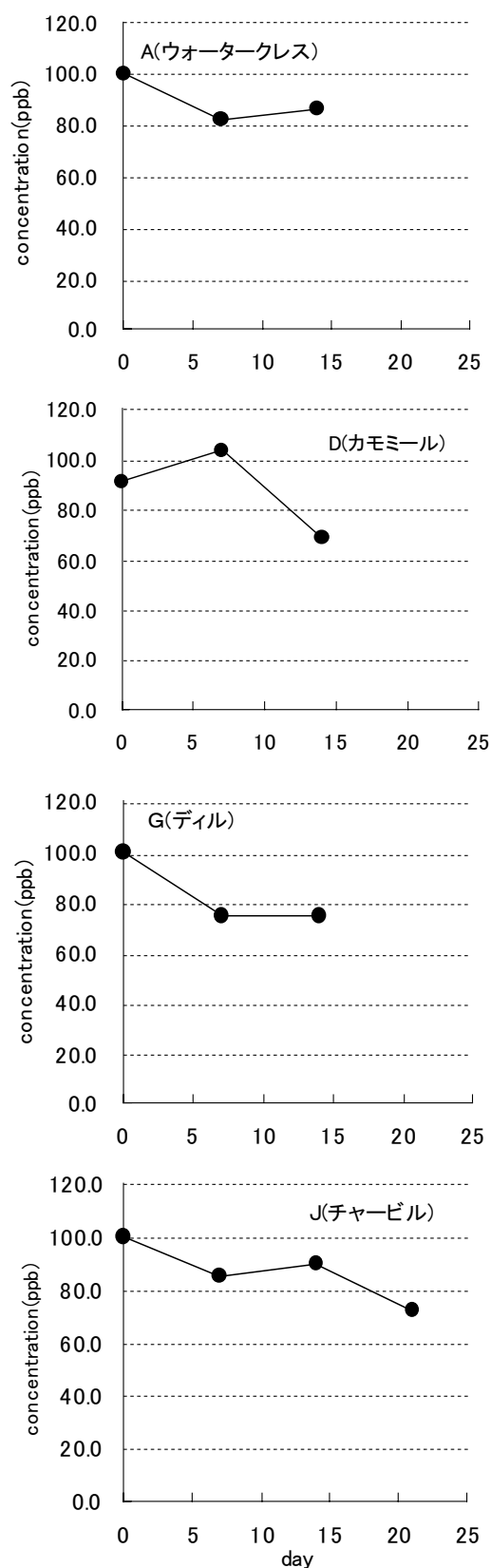
週に一度行った。設定気温25℃の温室で2週間生育させた後、栽培水に Atrazine を添加し、Atrazine の濃度を15μg/L、100μg/L、500μg/Lに調節した。生育調査は週に一度行い、各処理区から10個体を選んで地上部と地下部の長さを測定した。サンプリングはそれぞれアトラジン添加から0、7、14、21日目に行い、分析に供するまで冷蔵個で保存した。アトラジン濃度の測定はELISA 法によって行った。測定には RaPID Assay Atrazine Test Kit を使用した。

3-2 実験結果及び考察

各植物の暴露期間中における地上部及び地下部の長さをみると、ルーは Atrazine 濃度が高い場合でも伸長量は変化しなかったことから、Atrazine 耐性が高いと考えられた。それ以外の全ての植物におい

て、Atrazine 濃度の上昇に伴い伸長が阻害される傾向が、地上部、地下部ともに認められた。また、オオムギでは水中 Atrazine 濃度の上昇に伴い地上部地下部とも長さは減少するものの、他の植物に比べて極めて大きい値を示した。実験期間中における地上部及び地下部の伸長量から、ルー以外の植物では、 $15\mu\text{g/L}$ において伸長量は大きく、特にウォータークレス、ディル、チャービル、スイートバジルで顕著であった。ほとんどの植物は Atrazine の濃度が高くなると地上部及び地下部の伸長量が抑制される傾向が認められたが、ふじ二条オオムギは $100\mu\text{g/L}$ （なお図中では $\mu\text{g/L}$ を ppb と示した）の濃度区においても地上部で高い伸長量を維持していた。

実験終了時の各植物の全体生重をみると、Atrazine 濃度の上昇に伴い、生重生産量が減少する傾向が認められたが、オオムギは各濃度区において最も生重量が大きかった。これはオオムギが他の植物に比べ生育初期の成長が活発であるためと考えられる。また、バジルやウォータークレスも初期成長が旺盛であり、 $15\mu\text{g/L}$ の低濃度では高い生重生産量を示した。ルーは Atrazine による影響は受けにくいものの、生産量が小さかった。また各植物 $500\mu\text{g/L}$ の Atrazine 水溶液で各植物を水面栽培したときの水中 Atrazine の濃度変化をみると (Figs.3)、ディル、チャービル、バジルは暴露時間に伴い直線的に濃度が低下したが、ふじ二条オオムギとルーは14日目まで直線的に低下し、その後一定となった。ふじ二条オオムギおよびルーにおいて、Atrazine の濃度の低下は著しく、Atrazine の吸収が多いことが示唆された。これは、Atrazine に対する耐性が高く、光合成や蒸散などの生産活動も活発であるため、吸収量が大きくなったと考えられる。ローマンカモミールは濃度の低下がほとんどみられなかったことから、Atrazine による生育阻害および Atrazine の植物体への吸収はほとんどないと考えられる。ふじ二条オオムギとルーは暴露終了まで枯死すること

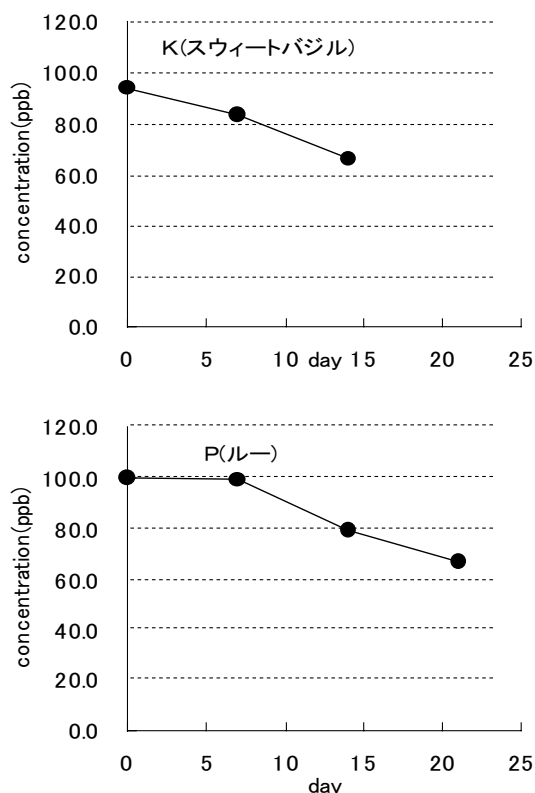


Figs. 3 ハーブ（ウォータークレス～チャービル）による水中 Atrazine 濃度（ 100ppb ）の低減推移

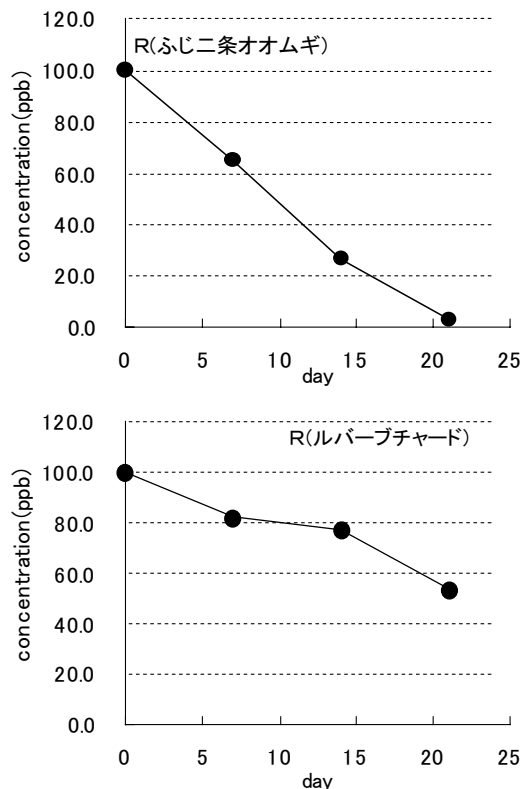
はなかったが、ウォータークレス、ローマンカモミールは葉の白化や根腐れ等が認められ、7日目までに枯死した。また、ディルとバジルは暴露から14日目までに枯死し、Atrazine に対し敏感であることが判明した。

各植物を100 $\mu\text{g/L}$ の Atrazine 水溶液で各植物を水面栽培した時の水中アトラジン濃度の変化をみると、ウォータークレス、ディル、チャービル、暴露開始から徐々に濃度が減少し、濃度は一定となった。バジル、チャード、ルーは暴露から14日目までゆっくりと濃度が低下し、21日目までに濃度がさらに低下した (Figs.4)。オオムギは暴露開始から直線的に濃度が低下し続け、21日目には検出できない濃度にまで低下した。よって、オオムギは100 $\mu\text{g/L}$ の Atrazine 濃度であれば、3週間でほとんどの Atrazine を吸収可能であることが示唆された。ローマンカモミールは500 $\mu\text{g/L}$ の場合と同様に

濃度の低下がほとんど認められなかったことから、100 $\mu\text{g/L}$ の Atrazine 濃度においても Atrazine の吸収は起きていないと考えられる。100 $\mu\text{g/L}$ の濃度下において、チャービル、ルー、スイートバジル、ふじ二条オオムギ、ルバーブチャードは暴露終了まで枯死することはなかったが、その他の植物は7日目から14日目までに枯死した。これらの結果から、ふじ二条オオムギが Atrazine 浄化植物として最適であることが判明した (Figs.5)。各植物を15 $\mu\text{g/L}$ の Atrazine 水溶液で各植物を水面栽培したときの水中 Atrazine 濃度の変化から、15 $\mu\text{g/L}$ の濃度においては、暴露期間中に枯死する植物はなかった。ローマンカモミール、ディル、チャービル、ルー、チャードは栽培時間に伴い濃度が直線的に低下した (Figs.7)。一方、ウォータークレス、バジル、ふじ二条オオムギは暴露から7日目までに急激に濃度が低下し、その後は一定となった。ウォータークレ



Figs. 4 ハーブ (スイートバジル, ルー) による水中 Atrazine 濃度 (100ppb) の低減推移

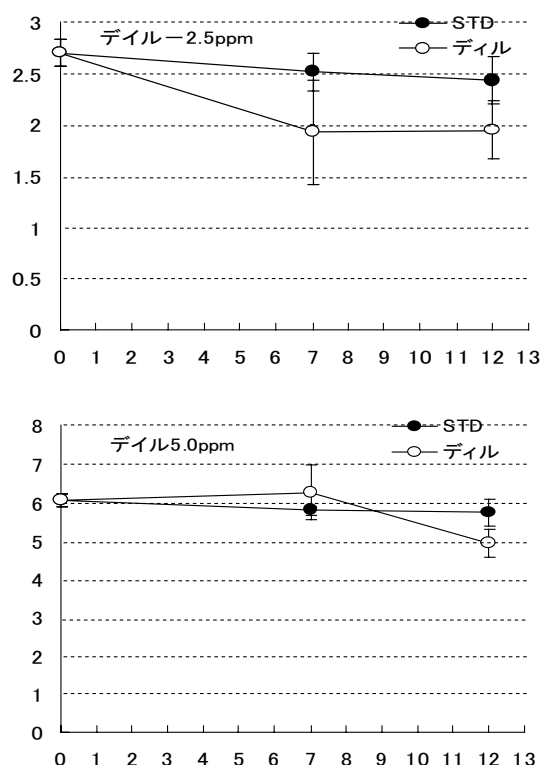
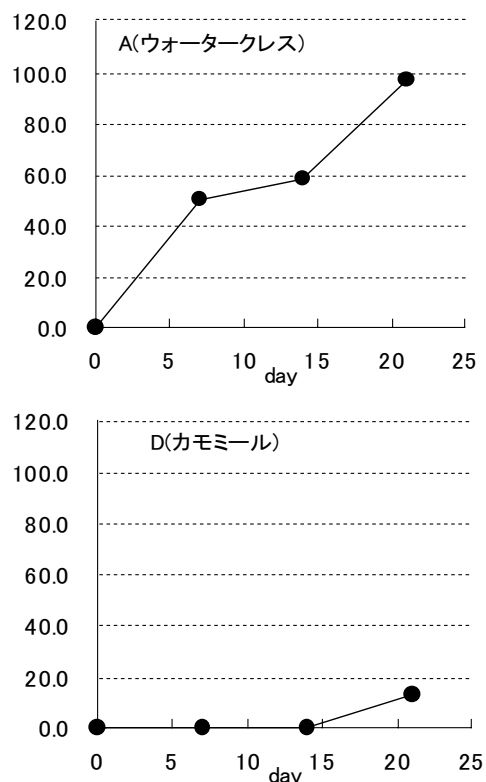


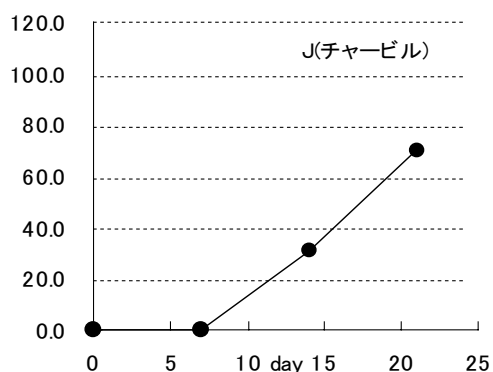
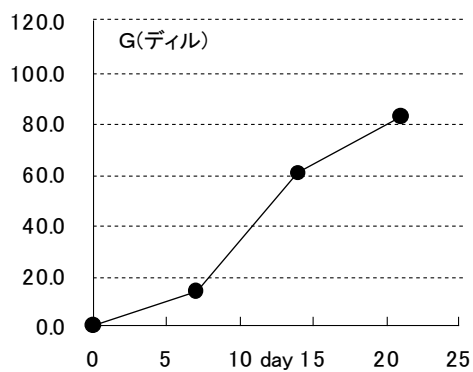
Figs. 5 ふじ二条オオムギ, ルバーブチャードによる水中 Atrazine 濃度 (100ppb) 低減推移



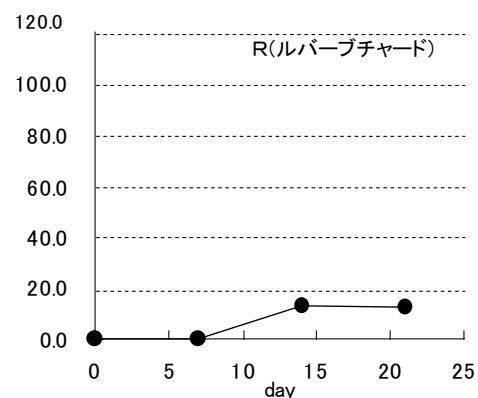
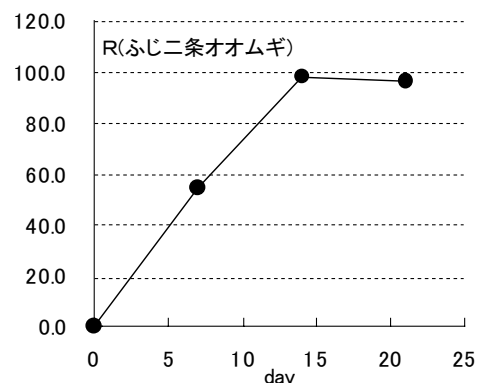
Fig. 6 バジルの実験終了時の根部の写真

ス、ディル、バジル、ふじ二条オオムギは最終的に $5\mu\text{g/L}$ 以下にまで低下した (Figs. 8)。特にふじ二条オオムギではほぼ $0\mu\text{g/L}$ まで濃度が減少した。 $15\mu\text{g/L}$ の濃度においては、他の濃度に比べて速やかに低下し、その程度も大きかった。すなわち Atrazine の吸収除去能力は極めて大きく、除去システムへの導入を期待可能であることが判明した。またそれぞれの濃度における各植物の水中 Atrazine 除去率をみると、 $15\mu\text{g/L}$ と低濃度の場合では、ウォータークレス、ディル、チャービル、バジル、ルーでは除去率が80%を超え、高い浄化能力が示唆された (Figs. 9)。これらの植物は、 $100\mu\text{g/L}$ 以上の場合いずれの植物も除去率は50%以下に低下した。またルーは Atrazine に対する耐性は高いが初期成長が遅いため、Atrazine の吸収が少なく、幼苗期における浄化能力は低かった (Figs. 10)。したがって植物を利用した水浄化システムに利用する場合は、高濃度水域は避け、低濃度水域に適用することが有効と考えられる。これらに対し、ふじ二条オオムギは、全ての濃度域において除去率が70%以上であり、比較的高濃度でも高い浄化能力を持つことが判明し、環境ホルモン様化学物質の Atrazine に対して、植物の吸収収奪能力を利用した水浄化システムへの活用および汚染の未然防止を図る水際浄化策としても活用できる可能性が認められた (Figs. 11~Figs. 15)。また、Atrazine の耐性や収

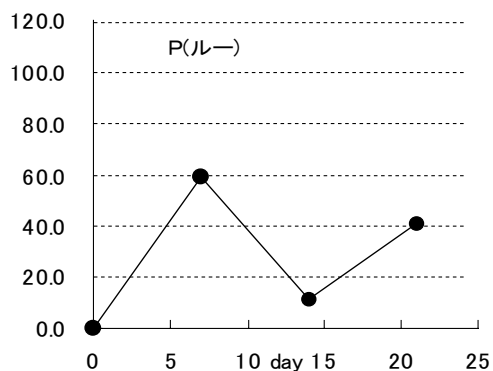
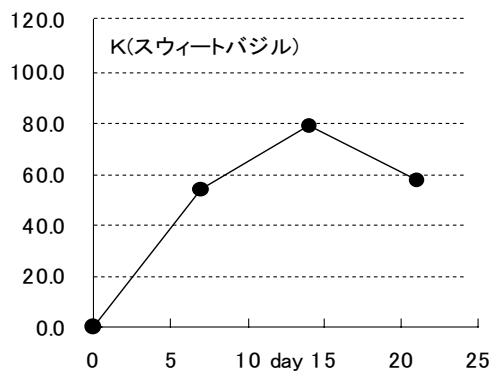
Figs. 7 ディルによる水中 Atrazine 濃度 (2.5mg/L , 5.0mg/L) の低減推移Figs. 8 ウォータークレス、カモミールによる水中 Atrazine (10mg/L) 除去率 (%) の推移



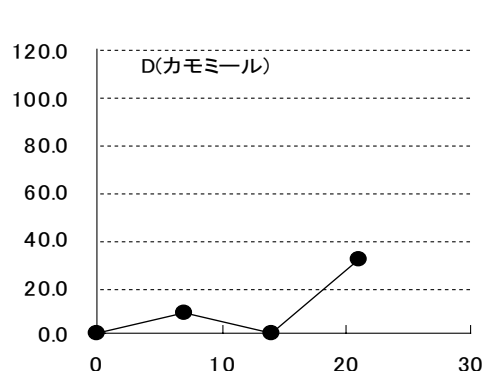
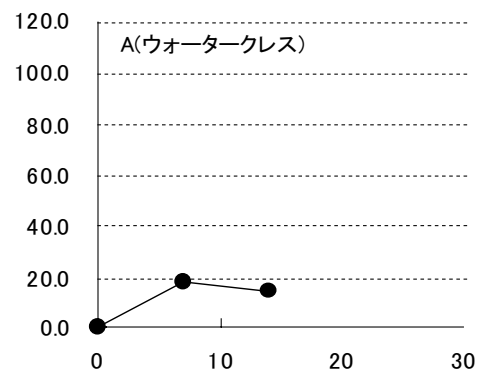
Figs. 9 デイル、チャービルによる水中 Atrazine (10mg/L) 除去率 (%) の推移



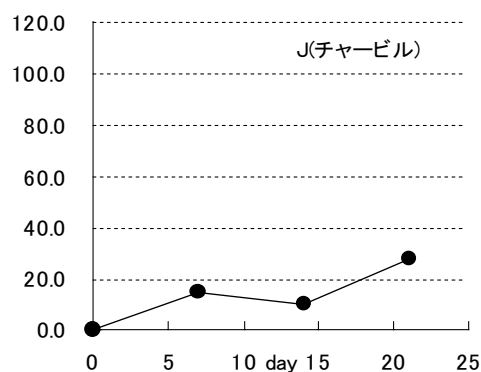
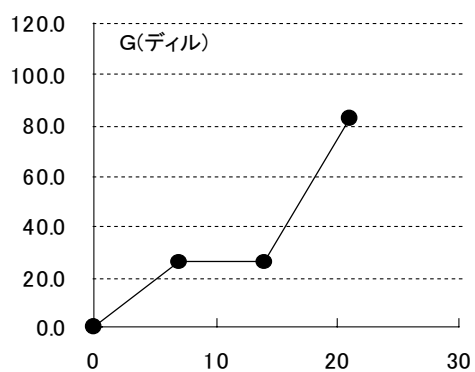
Figs. 11 ふじ二条オオムギ、ルバーブチャードによる水中 Atrazine (10mg/L) 除去率 (%) 推移



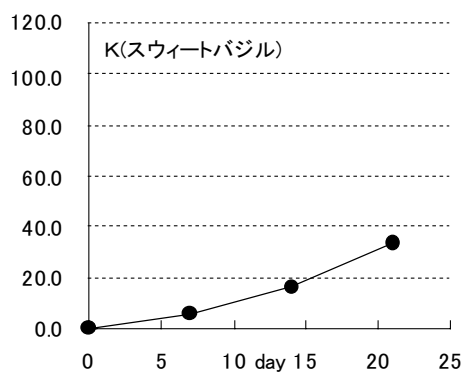
Figs. 10 ウォータークレス、ルーによる水中 Atrazine (10mg/L) 除去率 (%) の推移



Figs. 12 ウォータークレス、カモミールによる水中の Atrazine (10mg/L) 除去率 (%) 推移



Figs. 13 ディル、チャービルによる水中 Atrazine (100mg/L) 除去率(%)の推移



Figs. 14 スウィートバジル、ルーによる水中 Atrazine (100mg/L) 除去率(%)の推移

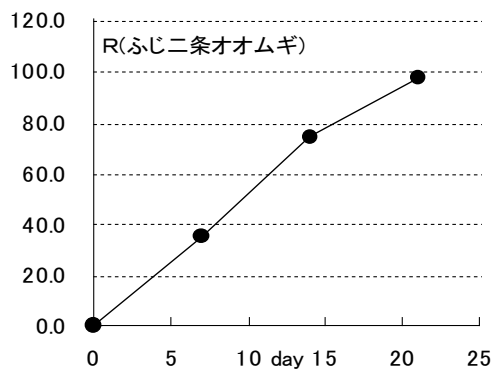


Fig. 15 ふじ二条オオムギによる水中 Atrazine (100mg/L) 除去率(%)の推移

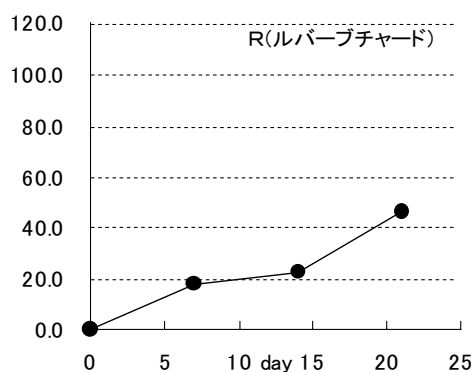
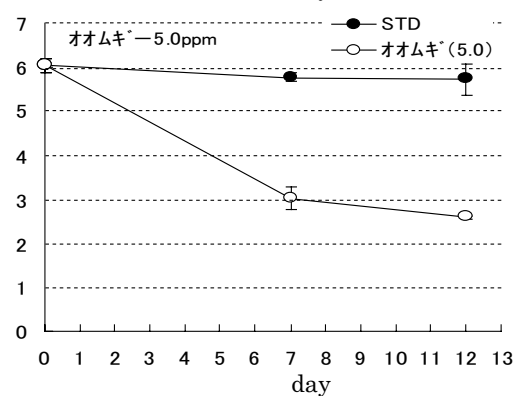
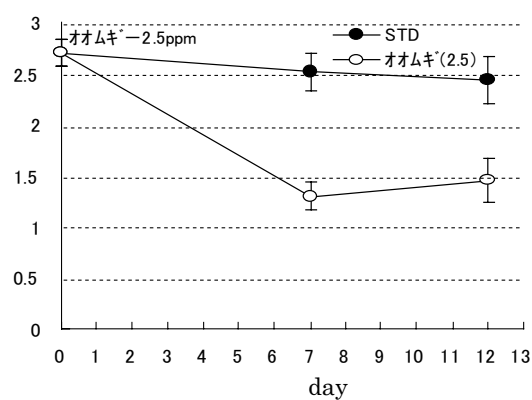


Fig. 16 ルバーブチャードによる水中 Atrazine (100mg/L) 除去率(%)の推移



Figs. 17 ふじ二条オオムギによる水中 Atrazine 濃度 (2.5mg/L, 5.0mg/L) の低減推移

奪能力に応じた植物種の植栽により、各汚染水域に適した植物を利用するゾーニングシステムの構築の可能性が示唆された。

まとめ

環境ホルモン様化学物質の1種である Atrazine による汚濁環境水による生物影響などを防ぐ浄化策

の検討が切望されており、本研究では特定植物の収奪能力を利用するファイトレメディエーションによる浄化および予防策を種子から幼苗期における極めて厳しい条件下でその可能性を検討した⁸⁾。その結果ウォータークレスとバジルは初期成育が旺盛であり、低濃度では高い浄化能力を示した。しかし、Atrazine に対する耐性は弱く、高濃度では吸収力が低かった。これに対し、ふじ二条オオムギは初期成長が極めて大きく、Atrazine に対する耐性も高いため、高度でも Atrazine の吸収浄化能力が大であった。以上のことから、比較的高濃度の Atrazine 汚染に対するファイトレメディエーションには、Atrazine に対する耐性の高いふじ二条オオムギ及びルーが適しており、低濃度の Atrazine 汚染の場合には初期成育の旺盛なバジルやウォータークレス、そしてふじ二条オオムギが適していることが明らかになった。特殊機能を持つこれらの特定植物の水質浄化への適用の有効性が示唆された。今後は、水質浄化のシステムを構築するために植物の成株期における特定植物の耐性能力および一定の水域における収奪量の試算を行い、水域毎のゾーニングシステムの構築のための基礎・応用データを集積する計画である^{1-4,6)}。

参考文献

1. S.Muramoto, Y.Oki, H.Nishizaki, Variation in some element contents of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) due to cadmium or nickel treatment with or without surface active agents., J.Environ. Sci. Health., b24, 559-568 (1989).
2. Wetzel L.T., L.G.3rd. Breckerenridge C.B., Tisdell M.O., Stevens J.T., Thakur A.K., Extrom P.J., and Eldridge C.B, Chronic effects of atrazine on estrus and mammary tumor formation in female Sprague-Dawley and Fischer 344 rats., J.Toxicol .Environ. Health, Oct. 43(2), 169-182 (1994.)
3. S.Muramoto, I.Aoyama,G.Kungolos, K.Hashimoto, Distribution and fate of surface active agents in river and lake water, affected by domestic and agricultural wastewater in an area, Japan., J.Environ.Sci.Health., A 31,91-116 (1996).
4. S.Muramoto, S.Tezuka,W.Agata, Effect of anionic surface active agents on the uptake of aluminum by *Cyperus alternifolius* L. exposed to water containing high levels of aluminum., Bull. Contam. Toxicol, 64, 122-129 (2000).
5. 本山直樹、農業学辞典 p370-379, 朝倉書店、東京 (2001).
6. S.Muramoto, F.Kubota, X.Song, G.Zou, W.Agata, Water quality of L. Taihu in China and the possibility of water cleaning by plant floating culture system. Environment Research and Control, 23, 17-21 (2001).
7. Hays T., Hanson T., Tsuji M. Hoang A. and Haffle, Vonk A., Herbicides: Feminization of male frog in the wild. Water-borne herbicide threatens amphibian populations in parts of United States., Nature, 419, 895-896 (2002).
8. 縣和一、宋祥甫、水面利用の植物生産 水質浄化と水辺の修景、p58-101,ソフトサイエンス社(2002).
9. Tavera-Mendoza L., Ruby S., Brousseau P., Fournier M. and Cyr D., Response of the amphibian tadarida (*Xenopus laevis*) to atrazine during sexual differentiation of the testis., Environmental Toxicology and Chemistry, 21(3), 527-531 (2002).

Abstract

The examination of the purification plan that prevents the living thing influence with the polluted water by atrazine, one kind of endocrine disrupters chemical (EDs). As for *Hordeum vuigare* L., because initial growth was extremely large, and the tolerance to atrazine was also high, the absorption purification ability of atrazine was large though it was advanced compared with other plants including many kinds of herb plants, especially basil and *Nasturtium officinailis* (cruciferae) were guessed to be suitable to the phyto-remediation to high level of atrazine pollution, and the effectiveness of the application of these plants for the water quality purification was suggested.

Keyword : Phyto-remediation, Endocrine disrupters chemical (EDs), Atrazine, Water purification system

