

報告番号 乙第 4006 号

①

殺虫剤サリチオンの土壌および土壌微生物による
立体特異的な代謝・分解に関する研究

序	1
第1章 緒言	2
第2章 材料と方法	5
第3章 結果と考察	10
第4章 結論	15
参考文献	18
謝辞	20
著者略歴	21
索引	22
和名索引	23
英名索引	24
抄録	25
要旨	26
おわりに	27

井藤和人

1991

目次

第 1 章 序 論	1
第 2 章 サリチオンとその代謝分解物および関連化合物の 同定および定量	7
第 1 節 はじめに	7
第 2 節 供試化合物	8
第 3 節 放射能の定量	16
第 4 節 クロマトグラフィーおよびスペクトロスコーピー	16
第 5 節 要約	21
第 3 章 サリチオンの畑地土壤中における分解	22
第 1 節 はじめに	22
第 2 節 実験方法	23
第 3 節 結果	26
第 4 節 考察	30
第 5 節 要約	34
第 4 章 土壤中のサリチオン分解菌相の特徴	35
第 1 節 はじめに	35
第 2 節 実験方法	36
第 3 節 結果	38
第 4 節 考察	47
第 5 節 要約	52

第 5 章	サリチオンの畑地土壌中における立体選択的分解	53
第 1 節	はじめに	53
第 2 節	実験方法	54
第 3 節	結果	56
第 4 節	考察	63
第 5 節	要約	66
第 6 章	サリチオン光学異性体の土壌との吸脱着	67
第 1 節	はじめに	67
第 2 節	実験方法	68
第 3 節	結果	69
第 4 節	考察	72
第 5 節	要約	74
第 7 章	土壌から単離した <i>Agrobacterium</i> sp. および <i>Acinetobacter</i> sp. によるサリチオンの立体選択 的代謝・分解	75
第 1 節	はじめに	75
第 2 節	実験方法	76
第 3 節	結果	77
第 4 節	考察	88
第 5 節	要約	90

第 1 章 緒言 1

第 2 章 サリチオン分解菌の分離と培養 10

第 3 章 サリチオン分解菌の生理特性 20

第 4 章 サリチオン分解菌の代謝産物の分析 30

第 5 章 サリチオン分解菌の生態 40

第 6 章 サリチオン分解菌の応用 50

第 7 章 結論 60

参考文献 70

謝辞 80

索引 90

第 8 章 サリチオン分解菌によるフェニトロチオン、パラ
チオンおよびシアノホスの代謝・分解 91

第 1 節 はじめに 91

第 2 節 実験方法 91

第 3 節 結果 92

第 4 節 考察 98

第 5 節 要約 101

第 9 章 総合考察 102

第 1 節 サリチオンの土壤中における挙動 102

第 2 節 サリチオン光学異性体の土壤中における挙動 106

第 3 節 土壤微生物によるサリチオンの代謝・分解 109

第 4 節 要約 119

第 10 章 要約 121

謝辞 127

引用文献 128

第1章 序論

農薬は病害虫や植物病原菌からの農作物の保護、雑草防除の面で現代の農業生産に大きく貢献し、世界人口を支える上で必要不可欠なものになっているといっても過言ではない。このような需要のもとに1988年の1年間でわが国ではおよそ製剤として54万トン、有効成分量にしておよそ10万トンの農薬が使用され、これを農耕地1 m²当りに使用された農薬活性物質の量に換算すると約2 gとなる¹⁾。

このように、生理活性を持つ生体異物であるところの農薬が多量に環境中に放出されていることから、農薬の自然生態系に及ぼす影響や環境中における挙動を解明することは環境保全のうえからも重要となってくる。特に、散布された農薬の大部分が直接的あるいは間接的に土壌に到達することを考えると、農薬の土壌環境中における挙動を解明することは、農薬の環境全体での動態を把握することになり、また、農薬を有効かつ安全に使用するためにも重要な研究課題である。

このような観点から、農薬の土壌中における分解挙動に関する研究は膨大な数に及び、種々の農薬について土壌での分解に影響する土壌因子、分解機構および分解経路等が明らかにされ、多数の成書²⁻⁶⁾および総説⁷⁻¹⁴⁾が出されている。これらの研究の結果から、大部分の農薬の土壌中での分解には土壌微生物(農薬分解菌)が大きな役割を演じていることが明らかとなり、農薬の土壌中での分解機構を解明するためには、その分解菌の性質および挙動の解明などの研究が重要であることが明らかとなった。

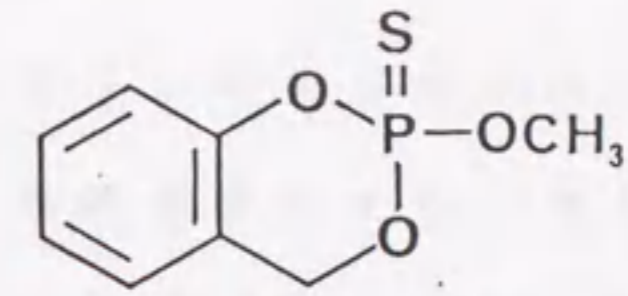
さらに、農薬のほとんどが新しく合成された生体異物であるにも

かわらず、微生物はそれらを代謝・分解し、最終的にCO₂にまで無機化する能力を持っている。微生物の生体異物に対する適応能力は、微生物の代謝の多様性だけではなく、新規な代謝反応が見出されることもあり、微生物学的にも興味深い問題である。

1930年代にSchradlerが殺虫性有機リン化合物を発見して以来、現在までに多数の合成有機リン酸エステルが殺虫剤、殺菌剤および除草剤等として開発されてきた^{15,16)}。これら多くの有機リン系農薬の環境中における分解・挙動については膨大な研究結果が蓄積され、多くの総説^{7-14,16-19)}が出されている。すなわち、一般的に有機リン系農薬は環境中での残留性が低く、P=OのP=Sへの酸化、P-O-アリアルおよびP-O-アルキル結合の開裂、フェニル環やヘテロ環など脱離基の酸化、還元等の変換により分解・消失することが知られている。

本研究で取り上げたサリチオン(2-methoxy-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin 2-sulfide)は、可塑剤・潤滑油等として使用されているtri-O-tolyl phosphateの毒性発現機構の研究を通して1963年にわが国で発見された、特徴的な環状リン酸エステル構造をもつ有機リン殺虫剤^{15,16,20-22)}(Fig. 1-1)で、これまでに開発された有機リン系農薬の中でこのような環状エステル構造を持つ化合物は本サリチオンが知られているのみである。サリチオンは1968年以降、国内を中心に果樹園や畑地における広範囲な害虫を防除するために広く使用されている。

しかし、この特異な化学構造を有するサリチオンの環境中における安全性評価の観点からの研究は、これまでに哺乳動物および高等植物における代謝²³⁾、水中および土壌表面における光分解²⁴⁾に



Salithion

Fig. 1-1 Chemical structure of salithion.

ついて報告されているだけであった。サリチオンの土壤中における分解挙動については、サリチオン登録時の試験結果²⁵⁾から、およそ1週間の半減期で消失することが報告されていただけで、土壤中での分解要因、分解経路および分解菌等についてはまだ詳しく研究されていなかった。

また、本論文の中心課題である分子内に不斉原子をもつ有機リン化合物の立体特異的な代謝・分解に関しては、殺虫活性、毒性の観点から、昆虫、哺乳動物における代謝については多数報告されており²⁶⁻³⁰⁾、ほとんどの光学活性有機リン剤はその生物活性、毒性および代謝様式等において立体特異性をもつことが知られている。このような農薬が環境中に放出される場合には、農薬が標的とする病害虫や雑草のような生物に対する活性ばかりでなく、人間をも含めた非標的生物に対する毒性が光学異性体間において異なっていることから、農薬の有効的な利用といった面からだけではなく、安全性評価の観点からも、それぞれの光学異性体の環境中における挙動を明らかにしておくことは重要なことであると考えられる。

しかし、これまでに光学活性な農薬について環境中における挙動を光学異性体間の違いに着目して比較研究した例はほとんど見あた

らないのが現状である。

サリチオンには不斉リン原子が分子内に存在するため、 $(R)_p$ 体および $(S)_p$ 体の光学異性体が存在する。サリチオン光学異性体の絶対配置はS.-Y. Wuら³¹⁾ およびHirashima & Eto³²⁾により明らかにされ(Fig. 1-2), 生物活性についても $(S)_p$ 体が $(R)_p$ 体と比較してイエバエに対して約2倍の殺虫活性を有することが報告されている³³⁾。

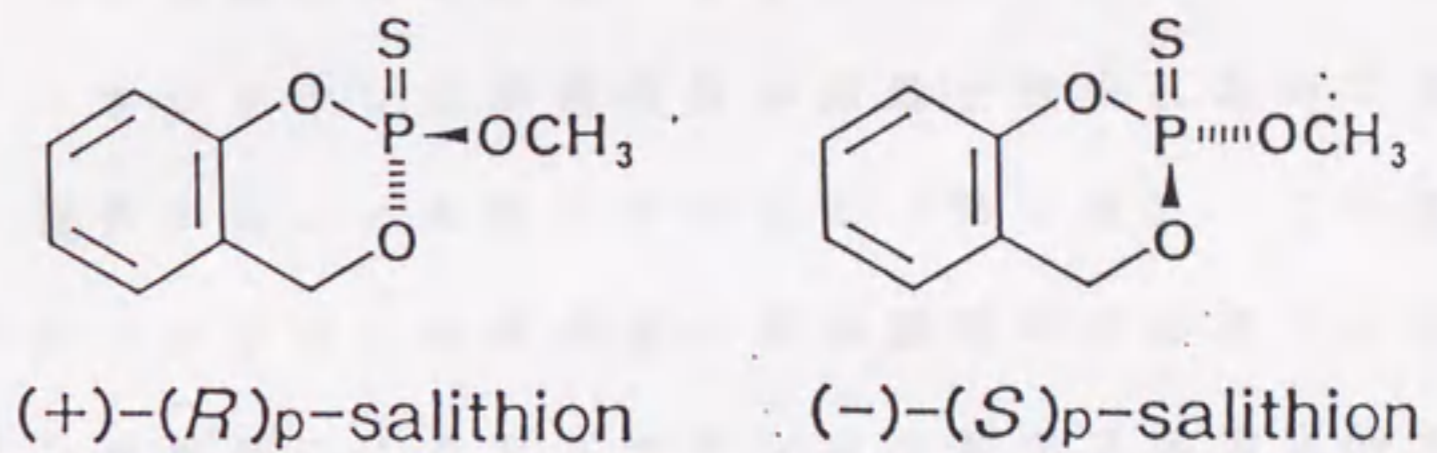


Fig. 1-2 Absolute configurations of the enantiomers of salithion.

Hirashimaら³³⁾は, saligenin cyclic phosphorochloridothioateとL-プロリンメチルエステルとの誘導体(ジアステレオマー)からサリチオンの光学異性体を得たが, 近年, 種々の光学異性体を簡便に分割・分析するためのHPLC用光学活性カラムの開発がめざましく³⁴⁾, 多種類の光学活性カラムが入手できるようになった。これらのカラムの中で, CHIRALCEL OT(+)³⁵⁾(ダイセル化学工業)がサリチオンの光学分割に有効であることが判明し, 簡便にしかも光学純度の高い光学異性体を分取できるようになった。

本研究では, まず, サリチオンの畑地土壌中における分解挙動の解明を目的に, 成因の異なる2種類の畑地土壌を用いた室内試験により, サリチオンの分解経路, 化学的および微生物的分解過程を明

らかにした（第3章）。その結果、サリチオンは畑地土壤中において主に土壤微生物の働きにより速やかに分解することが明らかとなったので、サリチオンを分解する細菌、放線菌および糸状菌を土壤から単離し、それらの分解菌によるサリチオンの分解活性および分解経路を明らかにすることにより、畑地土壤中におけるサリチオン分解微生物相の特徴を明らかにした（第4章）。

続いて、光学活性カラムを用いて分取したサリチオンの光学異性体を用いて、サリチオン光学異性体が畑地土壤中において立体選択的に分解・消失することを明らかにした（第5章）。この要因として、サリチオンの土壤との吸脱着が立体選択的であることと土壤中のサリチオン分解菌によるサリチオンの分解が立体選択的であることを推定した。そこで、まず、サリチオンの土壤との吸脱着過程を光学異性体間で比較し、それらの過程が立体選択的でないことを明らかにした（第6章）。さらに、土壤から単離した高いサリチオン分解能を持つ4株の分解菌を用いて、サリチオン光学異性体の代謝速度および代謝経路を比較することにより、これらの分解菌によるサリチオンの立体選択的代謝様式を明らかにした（第7章）。また、サリチオン分解菌による、他の有機リン殺虫剤であるフェニトロチオン[0,0-dimethyl 0-(3-methyl-4-nitrophenyl) phosphorothioate], パラチオン(0,0-diethyl 0-4-nitrophenyl phosphorothioate)およびシアノホス(0,0-dimethyl 0-4-cyanophenyl phosphorothioate)の代謝能を調べることにより、単離した分解菌によるリン酸エステルのP-0-アールまたはP-0-アルキル結合の断裂における基質特異性がサリチオンに特異的であることを明らかにした（第8章）。

... (faint, illegible text) ...

これらの研究を通じ、サリチオンの土壌環境中での分解挙動を光学異性体間の違いに着目して解明し、さらに、サリチオン分解菌がそれぞれの光学異性体を異なる経路で代謝するという新しい代謝様式を明らかにした。得られた知見は、サリチオンに限らず農薬一般の土壌環境における動態を解明するうえで有用であるばかりでなく、微生物による生体異物の代謝機構を理解するうえで有用であると考えられる。

... (faint, illegible text) ...

第2章 サリチオンとその代謝分解物および関連化合物の同定および定量

第1節 はじめに

本研究では ^{14}C 標識サリチオンおよび非標識サリチオン, または(R)_p体および(S)_p体に光学分割した ^{14}C 標識サリチオンの光学異性体を用いて, 土壤中での分解(第3章および第5章), 土壤との吸脱着(第6章)および土壤微生物による代謝・分解(第4章および第7章)における立体選択性について検討した. さらに, 単離したサリチオン分解菌によるフェニトロチオン, パラチオンおよびシアノホスの代謝・分解を調べることにより, サリチオン分解菌が有機リン殺虫剤を代謝・分解する際の基質特異性について検討した(第8章).

本章では本論文の研究で用いた各種化合物の合成法および物理化学的性質について記載し, また, 各章に共通するこれら供試化合物の同定および定量法について記載する.

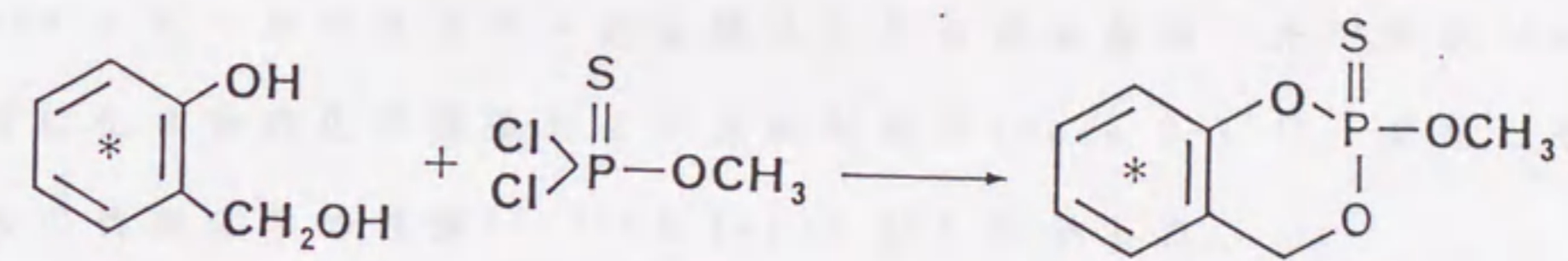
^{14}C 標識体およびそれらから生じた標識代謝分解物は, 標品とのシリカゲル薄層クロマトグラフィー(TLC)により分離・同定した後, それらの放射能を測定することにより定量した. (R)_p体および(S)_p体のサリチオン光学異性体は, 光学活性カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により分離・定量した. 非標識サリチオンは, ガスクロマトグラフィー(GC)により定量した. また, TLCクロマトグラフィーにおいて標品と一致しなかった代謝分解物については, TLCにより精製後, NMRおよびマススペクトルを測定することにより同定した.

第2節 供試化合物

第1項 放射性化合物

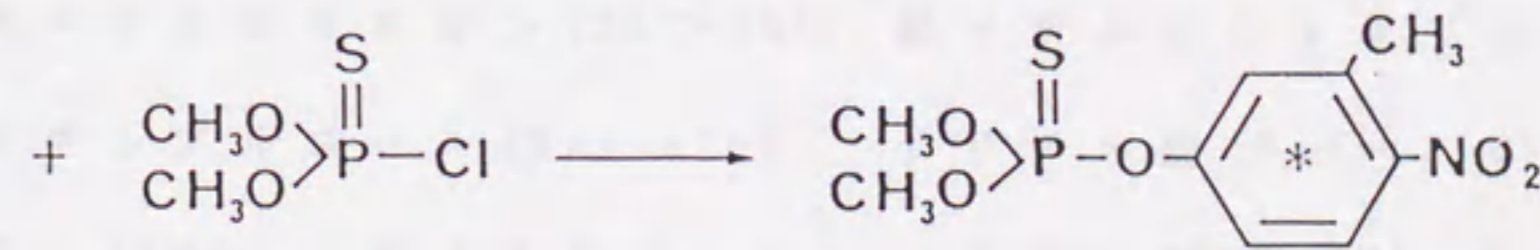
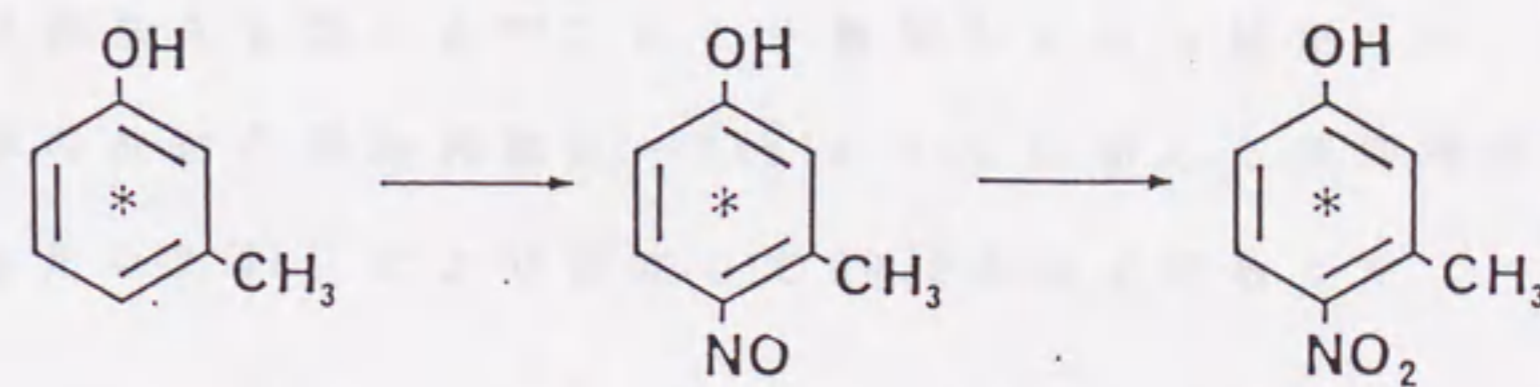
フェニル環を¹⁴Cで一様に標識したサリチオン(SLT)、フェニトロチオン(SMT)およびシアノホス(CYN)は、住友化学工業(株)生物環境科学研究所で合成されたものを使用した。各標識化合物の合成方法の概略を以下に示す。

サリチオン



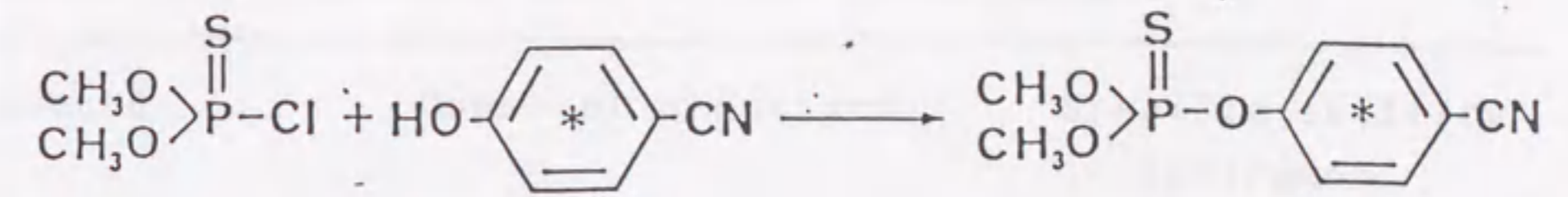
*:Labeled position

フェニトロチオン



*:Labeled position

シアノホス



*: Labeled position

また、フェニル環を ^{14}C で一様に標識したパラチオン(PRT)は、NEN リサーチプロダクトから購入したものを使用した。供試した放射性化合物の化学構造および比放射能を Table 2-1 に、また、それらの物理化学的性質^{36,37)}を Table 2-2 に示した。

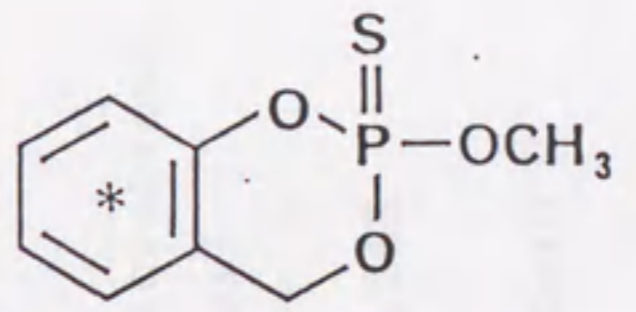
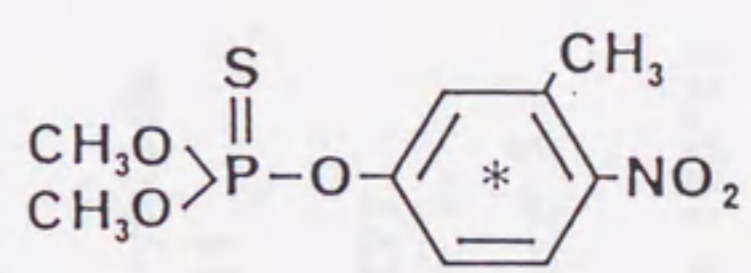
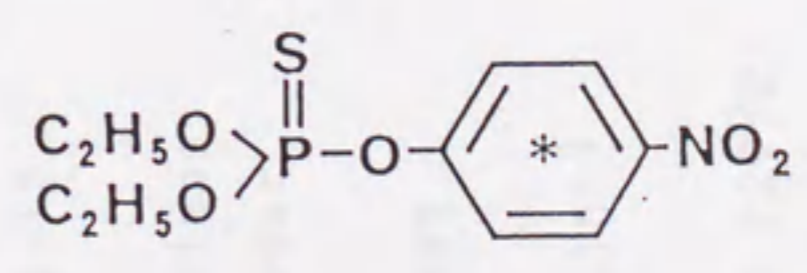
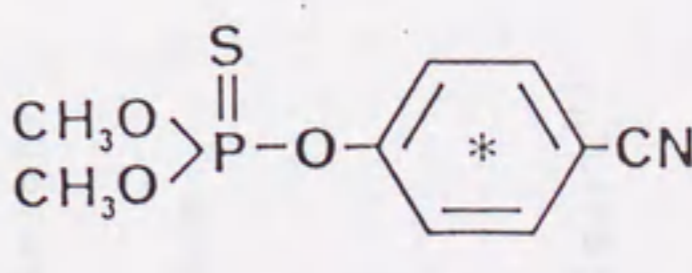
(R)_p体および(S)_p体の ^{14}C -サリチオンは、光学活性カラムを用いたHPLCにより分離して調製した。それぞれのサリチオン光学異性体の光学純度は、HPLCにより測定して99%以上であった。

供試したそれぞれの ^{14}C 標識化合物は、Table 2-4 に示した展開溶媒系Aを用いたTLCにより精製してから使用した。 ^{14}C 標識化合物の放射化学的純度は、Table 2-4 に示した展開溶媒系AおよびBを用いたTLCにより測定して99.9%以上であった。

第2項 非放射性化合物

以下に示す非標識化合物：サリチオン(SLT)、サリオキソン(SLO)、脱メチルサリチオン(SLT-DM)、脱メチルサリオキソン(SLO-DM)、サリチルアルコール(Sal-alc)、サリチル酸(Sal-acid)、フェニトロチン(SMT)、脱メチルフェニトロチオン(SMT-DM)、3-メチル-4-ニトロフェノール(MNP)、アミノフェニトロチオン(SMT-NH₂)、アセチルアミノフェニトロチオン(SMT-NHAc)、パラチオン(PRT)、脱エ

Table 2-1 Chemical structure and specific activity of radiolabeled compounds used in the experiments.

Compound	Chemical structure	Specific activity (mCi/mmol)
Salithion(SLT)		42.5
Fenitrothion(SMT)		60.5
Parathion(PRT)		19.0
Cyanophos(CYN)		30.2

*:Labeled position.

Table 2-2 Physicochemical properties of radiolabeled compounds used in the experiments.

	SLT	SMT	PRT	CYN
Molecular formula	C ₈ H ₉ O ₃ PS	C ₉ H ₁₂ NO ₅ PS	C ₁₀ H ₁₄ NO ₅ PS	C ₉ H ₁₀ NO ₃ PS
Molecular weight	216.19	277.24	291.27	243.22
Physical form	colorless powder	pale yellow oil	yellow-brown oil	pale yellow oil
Density	1.385	1.323	1.265	1.260
Vapour pressure ^{a)}	4.2x10 ⁻³	7.0x10 ⁻⁵	5.0x10 ⁻⁵	1.1x10 ⁻³
Water solubility	43.4ppm (20°C)	30.0ppm (20°C)	24.0ppm (25°C)	46.0ppm (30°C)

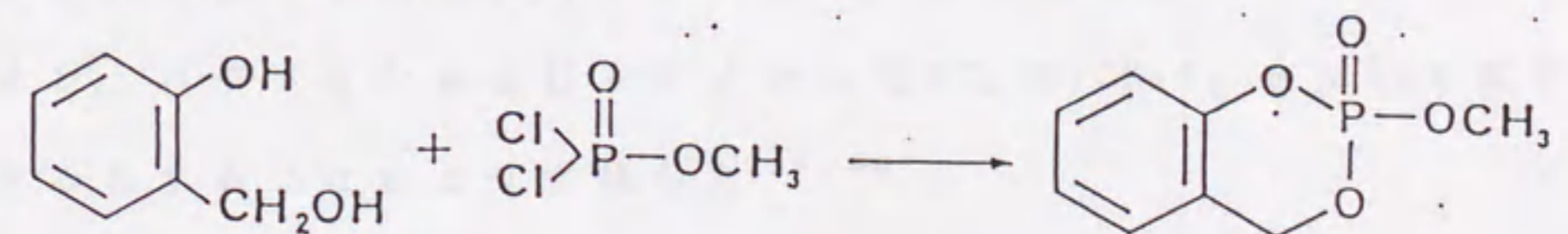
a) mbar at 20°C.

チルパラチオン (PRT-DE), 4-ニトロフェノール (NP), アミノパラチオン (PRT-NH₂), アセチルアミノパラチオン (PRT-NHAc), シアノホス (CYN), 脱メチルシアノホス (CYN-DM), 4-シアノフェノール (CP), カルバモイルシアノホス (CYN-CONH₂) およびカルボキシルシアノホス (CYN-COOH)を標品として用いた。

サリチオン, サリチルアルコール, サリチル酸, フェニトロチン, 3-メチル-4-ニトロフェノール, パラチオン, 4-ニトロフェノール, シアノホスおよび4-シアノフェノールは, 和光純薬工業(株)から購入し使用した。また, その他の標品は, 以下に示したように, これまでに報告された方法^{15, 38-41)} およびそれらをわずかに修正した方法により合成した。

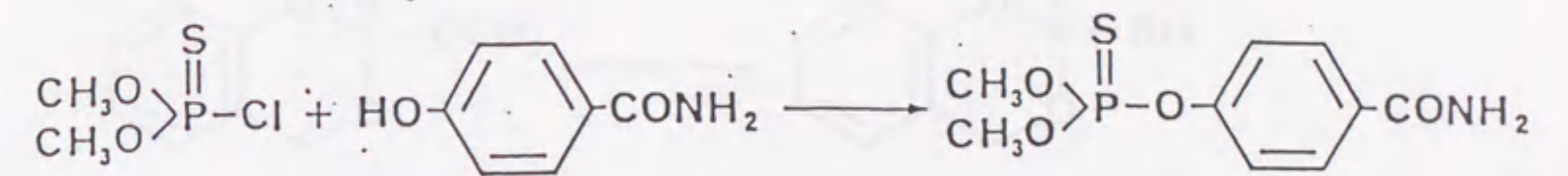
サリオキソンは, メチルジクロロホスフェートとサリチルアルコールとの脱塩素反応により合成した³⁸⁾。

サリオキソン (SLO)

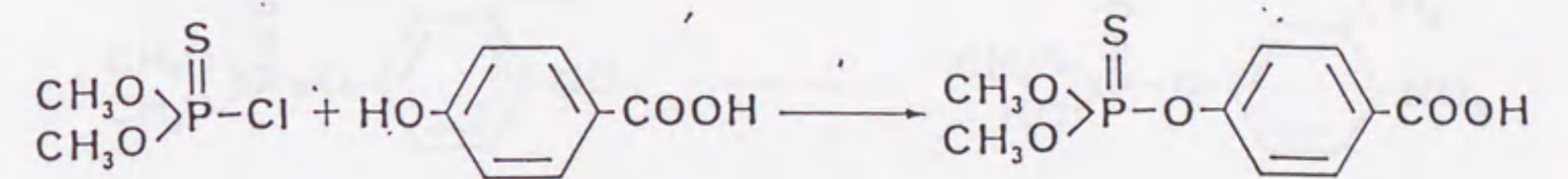


カルバモイルシアノホスおよびカルボキシルシアノホスは, それぞれ, ジメチルクロロチオホスフェートと4-ヒドロキシベンズアミドおよび4-ヒドロキシ安息香酸との脱塩素反応により合成した^{15, 38, 39)}。

カルバモイルシアノホス (CYN-CONH₂)

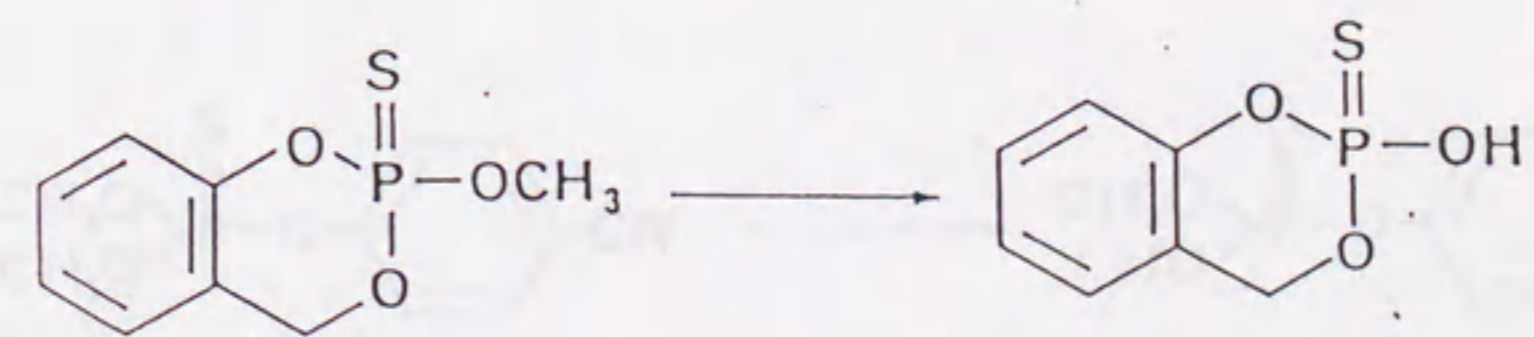


カルボキシシルシアノホス (CYN-COOH)

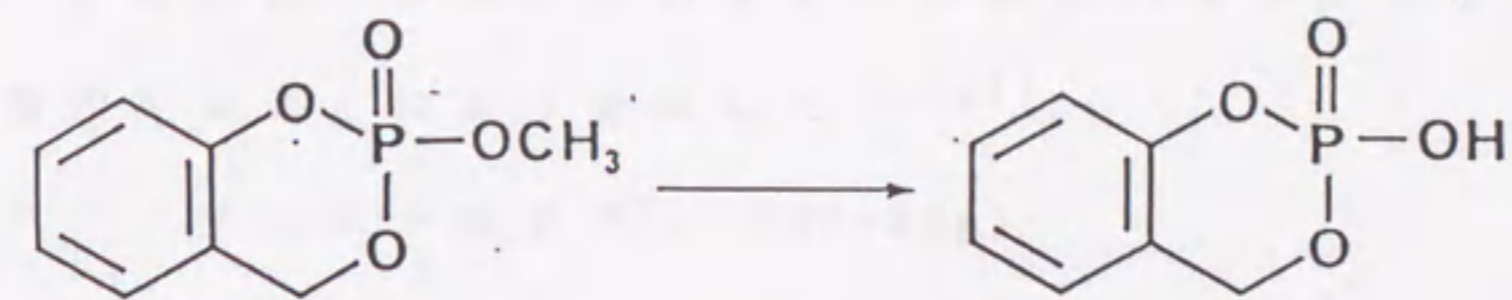


脱アルキル誘導体：脱メチルサリチオン，脱メチルサリオキソン，脱メチルフェニトロチオン，脱エチルパラチオンおよび脱メチルシアノホスは，それぞれ，サリチオン，サリオキソン，フェニトロチオン，パラチオンおよびシアノホスを $\text{KS}_2\text{CN}(\text{CH}_3)_2$ を用いて脱アルキル化することにより合成した^{15,39)}。

脱メチルサリチオン (SLT-DM)



脱メチルサリオキソン (SLO-DM)



脱メチルフェニトロチオン (SMT-DM)



脱エチルパラチオン (PRT-DE)



脱メチルシアノホス (CYN-DM)



アミノ誘導体：アミノフェニトロチオンおよびアミノパラチオンは、それぞれ、フェニトロチオンおよびパラチオンを亜鉛末を用いて還元することにより合成した^{40, 41)}。

アミノフェニトロチオン (SMT-NH₂)

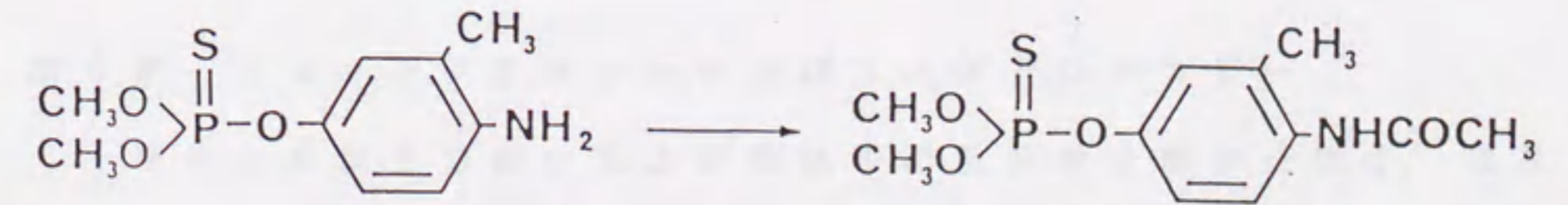


アミノパラチオン (PRT-NH₂)

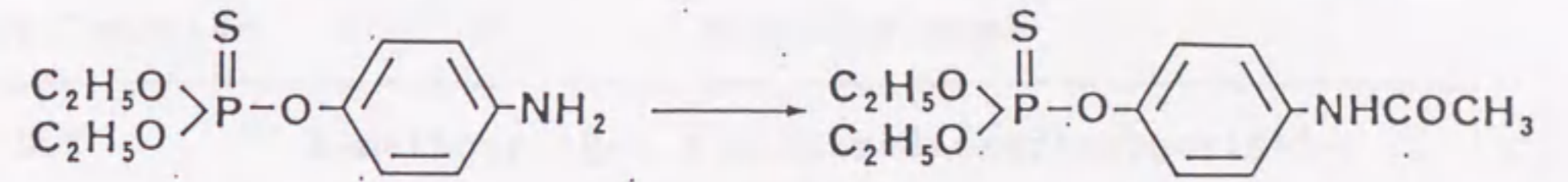


アセチルアミノ誘導体：アセチルアミノフェニトロチオンおよびアセチルアミノパラチオンは、それぞれ、アミノフェニトロチオンおよびアミノパラチオンを無水酢酸を用いてアセチル化することにより合成した⁴⁰⁾。

アセチルアミノフェニトロチオン (SMT-NHAc)



アセチルアミノパラチオン (PRT-NHAc)



供試したそれぞれの化合物の化学名をTable 2-3に、また、種々の展開溶媒系で展開したときのR_f値をTable 2-4に示す。

第3節 放射能の定量

シリカゲルプレートからかき取ったゲル、有機溶媒および水溶液中の放射能は、10mlのEmulsifierシンチレーター299（バッカード社）を加えて、バッカード460CD型液体シンチレーションスペクトロメーター（LSC）を用いて定量した。有機溶媒で抽出されない未抽出土壌残渣中の放射能は、土壌抽出残渣を乾燥後、その一部をバッカード306型サンプルオキシダイザーを用いて燃焼させ、生成する¹⁴C₂O₂を9mlのCarbo-sorb CO₂ absorber（バッカード社）でトラップした後、15mlのPermafluor V オキシダイザー用シンチレーター（バッカード社）を加え、LSCを用いて定量した。

第4節 クロマトグラフィーおよびスペクトロスコピー

土壌からの抽出溶媒中および培地中の放射性分解生成物は、標品とのTLCコクロマトグラフィーにより分離・同定した。シリカゲル60F₂₅₄クロマトプレート（20×20cm、0.25mm厚、メルク社）を用い

Table 2-3 Chemical names of the compounds used in the experiments.

Designation	Chemical name
SLT	2-methoxy-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-2-sulphide
SLO	2-methoxy-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-2-oxide
SLT-DM	2-hydroxy-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-2-sulphide
SLO-DM	2-hydroxy-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-2-oxide
Sal-alc	2-hydroxybenzyl alcohol
Sal-acid	2-hydroxybenzoic acid
SMT	O,O-dimethyl O-(3-methyl-4-nitrophenyl) phosphorothioate
SMT-DM	O-methyl O-hydrogen O-(3-methyl-4-nitrophenyl) phosphorothioate
SMT-NH ₂	O,O-dimethyl O-(3-methyl-4-aminophenyl) phosphorothioate
SMT-NHAc	O,O-dimethyl O-(3-methyl-4-acetylamino-phenyl) phosphorothioate
MNP	3-methyl-4-nitrophenol
PRT	O,O-diethyl O-4-nitrophenyl phosphorothioate
PRT-DE	O-ethyl O-hydrogen O-4-nitrophenyl phosphorothioate
PRT-NH ₂	O,O-diethyl O-4-aminophenyl phosphorothioate
PRT-NHAc	O,O-diethyl O-4-acetylamino-phenyl phosphorothioate
NP	4-nitrophenol
CYN	O,O-dimethyl O-4-cyanophenyl phosphorothioate
CYN-DM	O-methyl O-hydrogen O-4-cyanophenyl phosphorothioate
CYN-CONH ₂	O,O-dimethyl O-4-carbamoylphenyl phosphorothioate
CYN-COOH	O,O-dimethyl O-4-carboxylphenyl phosphorothioate
CP	4-cyanophenol

Table 2-4 Thin-layer chromatographic properties of the compounds used in the experiments.

Compounds	<u>R_f</u> values with indicated solvent systems ^{a)}				
	A	B	C	D	E
SLT	0.73	0.71	0.66	0.51	0.32
SLO	0.67	0.57	0.42	0.18	0.14
SLT-DM	0.06	0.41	0.13	0.01	0.00
SLO-DM	0.01	0.19	0.07	0.01	0.00
Sal-alc	-	0.65	0.42	0.32	-
Sal-acid	0.48	0.65	0.54	0.11	0.18
SMT	0.72	0.79	0.72	0.56	0.38
SMT-DM	0.03	0.37	0.17	0.01	0.00
SMT-NH ₂	0.65	0.71	0.30	0.21	0.25
SMT-NHAc	0.52	0.63	0.45	0.18	0.10
MNP	0.49	0.74	0.55	0.21	0.27
PRT	0.71	0.81	0.74	0.61	0.37
PRT-DE	0.03	0.49	0.22	0.01	0.00
PRT-NH ₂	0.60	0.71	0.21	0.14	0.18
PRT-NHAc	0.53	0.67	0.50	0.15	0.09
NP	0.49	0.73	0.54	0.19	0.25
CYN	0.74	0.75	0.68	0.44	0.32
CYN-DM	0.02	0.33	0.13	0.01	0.00
CYN-CONH ₂	0.40	0.66	0.48	0.21	0.03
CYN-COOH	0.24	0.72	0.53	0.37	0.04
CP	0.47	0.72	0.51	0.15	0.21

a) A:chloroform/methanol (9/1),
 B:toluene/ethyl acetate/2-propanol/acetic acid (8/12/5/3),
 C:toluene/ethyl formate/formic acid (5/7/1),
 D:toluene/acetic acid(7/1),
 E:n-hexAne/acetone (5/2).

試料	検出波長	保持時間	検出器	移動相	流速	カラム	カラム温度
1	254nm	10.4分	アロカRLC-551	メタノール	0.5ml/min	CHIRALCEL OT(+) ³⁵⁾	5℃
2	254nm	12.4分	アロカRLC-551	メタノール	0.5ml/min	CHIRALCEL OT(+) ³⁵⁾	5℃
3	254nm	1.9分	島津FTD-8	ヘリウム	50ml/min	MEGABORE DB-5	230℃
4	254nm	1.9分	島津FTD-8	ヘリウム	50ml/min	MEGABORE DB-5	230℃
5	254nm	1.9分	島津FTD-8	ヘリウム	50ml/min	MEGABORE DB-5	230℃
6	254nm	1.9分	島津FTD-8	ヘリウム	50ml/min	MEGABORE DB-5	230℃
7	254nm	1.9分	島津FTD-8	ヘリウム	50ml/min	MEGABORE DB-5	230℃
8	254nm	1.9分	島津FTD-8	ヘリウム	50ml/min	MEGABORE DB-5	230℃
9	254nm	1.9分	島津FTD-8	ヘリウム	50ml/min	MEGABORE DB-5	230℃
10	254nm	1.9分	島津FTD-8	ヘリウム	50ml/min	MEGABORE DB-5	230℃

て、Table 2-4 に示した展開溶媒系で一次元または二次元に展開した。

放射性のスポットは、コダック X 線フィルム SB-5 を用いたオートラジオグラフィーにより検出した。非放射性の標品は紫外線によるクエンチングにより検出した。また、2%塩化パラジウム 2N HCl 水溶液を P=S 化合物の検出のために使用した。

サリチオン光学異性体を光学分割するための HPLC は以下の条件で行った。液体クロマトグラフ：日立 655A-11，カラム：CHIRALCEL OT(+)³⁵⁾ (4.6×250mm, ダイセル化学工業)，移動相：メタノール，流速：0.5ml/min，カラム温度：5℃，紫外線検出器：日立 655A-21，検出波長：254nm，放射能検出器：アロカ RLC-551。この条件において、(R)_p体および(S)_p体サリチオンの保持時間は、それぞれ、10.4分および12.4分であった (Fig. 2-1)。

非放射性のサリチオンを定量するためのガスクロマトグラフィー (GC) は、以下の条件で行った。ガスクロマトグラフ：島津 GC-7A，カラム：MEGABORE DB-5 (15m×0.548mm, 1.5μm厚, J & W Scientific社)，キャリアガス：ヘリウム，流速：50ml/min，水素ガス：0.7Kg/cm²，空気：0.5Kg/cm²，インジェクター温度：250℃，カラム温度：230℃，検出器：島津 FTD-8 フレームサーミオニック検出器。この条件において、サリチオンの保持時間は1.9分であった。

NMR スペクトルは、日立 R-90H 型フーリエ変換核磁気共鳴装置を用いて測定した。電子イオン (EI) および 2 次イオンマススペクトル (SIMS) は、日立 M-80B 型質量分析計を用いて測定した。液体培養液中の細菌の濁度は、ベックマン DU-50 型分光光度計を用いて、波長

610nm で測定した。

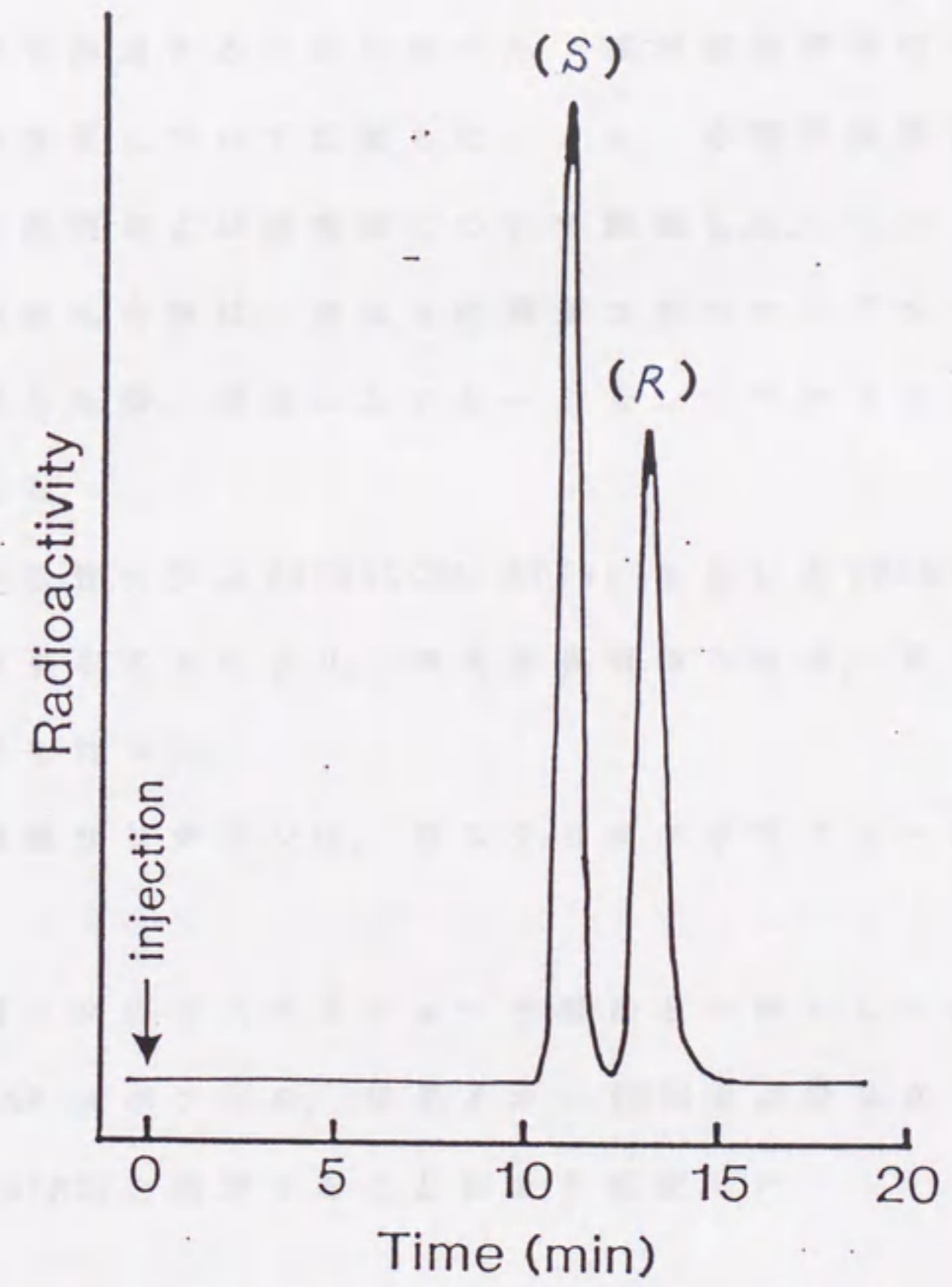
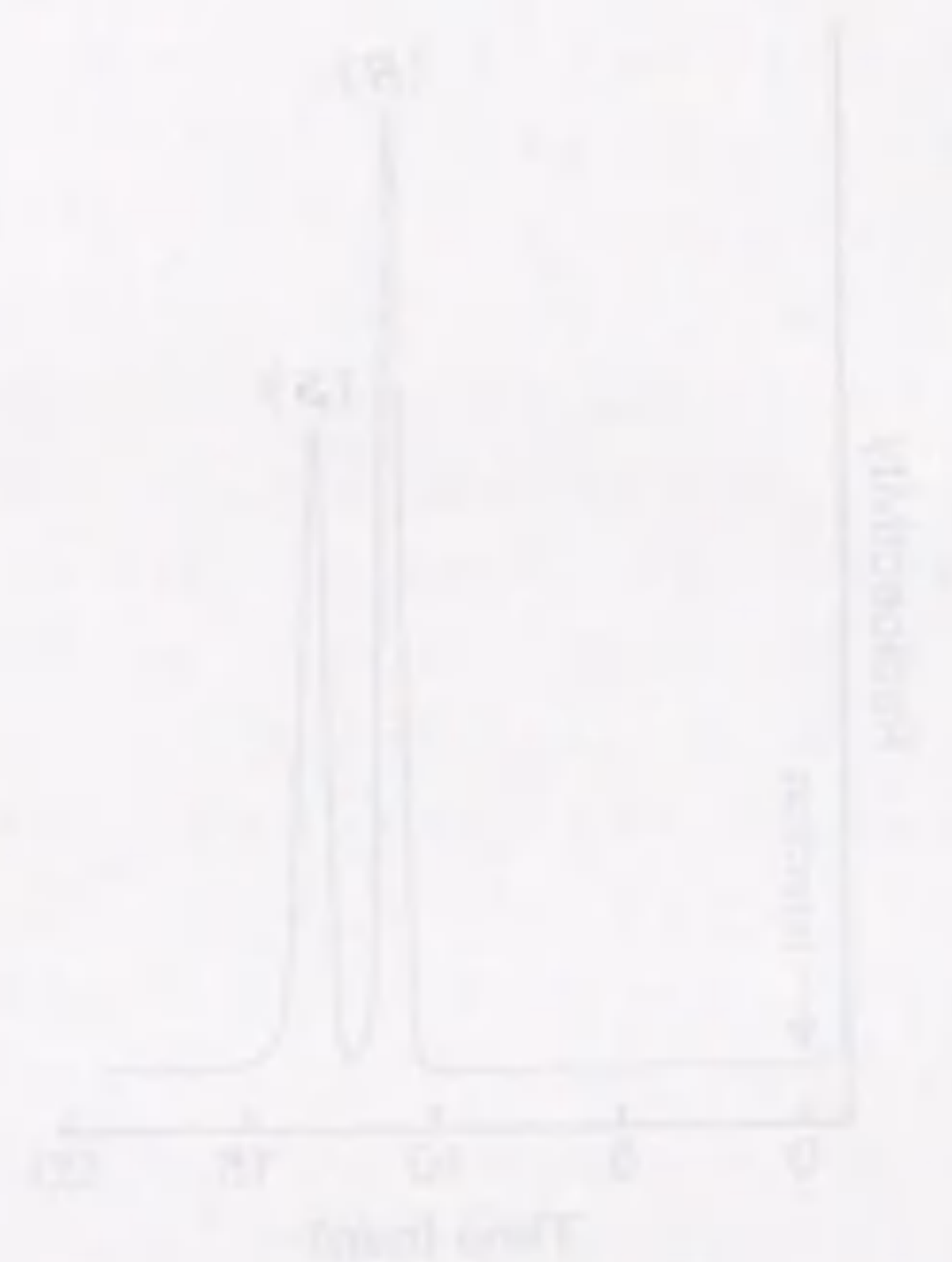


Fig. 2-1 Representative HPLC chromatogram of salithion with a chiral stationary phase.



第 5 節 要約

本章では本研究で用いた 4 種類の ^{14}C 標識化合物, サリチオン (ラセミ体, (R)_p体および(S)_p体), フェニトロチオン, パラチオンおよびシアノホス, およびそれらの標識化合物から生成する代謝・分解物を同定するために用いた各種非標識標品の合成法および物理化学的性質について記載した. また, 各章に共通するこれら供試化合物の同定および定量法について記載した.

放射性化合物は, 標品との薄層クロマトグラフィーにより分離・同定した後, 液体シンチレーションスペクトロメーターを用いて定量した.

光学活性カラム CHIRALCEL OT(+) を用いた HPLC でサリチオンを光学分割することにより, 両光学異性体を分取, または光学異性体比の分析を行った.

非標識サリチオンは, ガスクロマトグラフィーにより分離・定量した.

薄層クロマトグラフィーで標品と一致しない代謝・分解生成物は, NMR スペクトル, 電子イオン (EI) および 2 次イオンマススペクトル (SIMS) を測定することにより同定した.

第3章 サリチオンの畑地土壌中における分解⁴²⁾

第1節 はじめに

農薬の土壌中における分解挙動に関する研究は数多くなされているが²⁻¹⁴⁾、この問題を考えるうえで重要なことは次の3点であると思われる。第1は土壌中に処理された農薬の消失速度で、土壌残留性を評価するうえで重要な要素である。第2は土壌中における農薬の分解経路および分解生成物の挙動で、農薬の分解過程および分解生成物を明らかにすることは、代謝物をも含めた農薬の土壌環境中における運命を知るうえで重要なことである。第3は農薬の分解要因で、どのような要因により農薬が土壌から消失していくのかを明らかにすることは、種々の土壌環境中における農薬の挙動を推測するうえで重要である。

サリチオン^{15,16,20-22)}は、特徴的な環状エステル構造を持つ有機リン殺虫剤で、果樹園や畑地における広範囲な害虫を駆除するために広く用いられているが、環境中における安全性評価の観点からは、これまでに哺乳動物および高等植物における代謝²³⁾、水中および土壌表面における光分解²⁴⁾について報告されているだけで、土壌中における分解様式についてはまだ詳しく研究されていない。

本章では、環境中における安全性評価の観点から、サリチオンの畑地条件下における分解速度および分解経路をその¹⁴C-標識化合物を用いることにより明らかにした。また、サリチオンの滅菌土壌と非滅菌土壌中における挙動を比較することにより、サリチオンの化学的および微生物的分解過程を明らかにした。

第2節 実験方法

第1項 供試土壌

成因の異なる2種類の畑地土壌（茨城県牛久火山灰土壌および高知県野市鉱質土壌）を本実験に供試した。両土壌の物理化学的性質をTable 3-1に示す。土壌は細かく砕き、生土のまま2mmの篩を通してから使用した。

Table 3-1 Characteristics of soils used.

	Ushiku	Noichi
Soil group	Andosol	Gray Lowland soil
Soil texture	loam	sandy clay loam
sand(%)	51.0	72.5
silt(%)	40.8	8.1
clay(%)	8.2	19.4
Clay mineral	allophane	kaolinite
Organic matter(%) ^{a)}	4.1	2.4
CEC(me/100g) ^{a, b)}	19.6	8.8
pH(H ₂ O)	6.4	5.7
MWHC(%) ^{a, c)}	126.3	71.4

a) Dry soil basis,

b) Cation exchange capacity,

c) Maximum water-holding capacity.

第2項 土壌分解試験

50ml容ビーカーに乾土換算で30gの牛久および野市土壌をとり、蒸留水を加えて最大容水量の50%に調整した。25℃の暗所で2週間保温静置した土壌に5.0 μ lのジメチルスルホキシドに溶解した 14 C-サリチオンを1.25ppmとなるように添加し、よく混合した。処理濃度は圃場における実際の散布量(125g a.i./10a)が表層土壌10cmに均一に分布したものと想定して設定した。

14 C-サリチオンを添加した土壌は、アルミホイルで遮光した3Lの褐色ビンの中に入れ、25℃で60日間保温静置した。その期間中はCO₂を含まない空気を25-30ml/minで流し、ポリウレタンプラグと400mlの0.5N水酸化ナトリウム水溶液を入れた洗気ビンを通して 14 CO₂を含む揮散性 14 Cを捕集した。ポリウレタンとアルカリ水溶液は2週間毎に交換した。また、2週間毎に蒸留水を土壌に滴下して土壌の水分含量を初期の値になるように調整した。土壌分解試験に用いた装置の概要をFig. 3-1に示す。

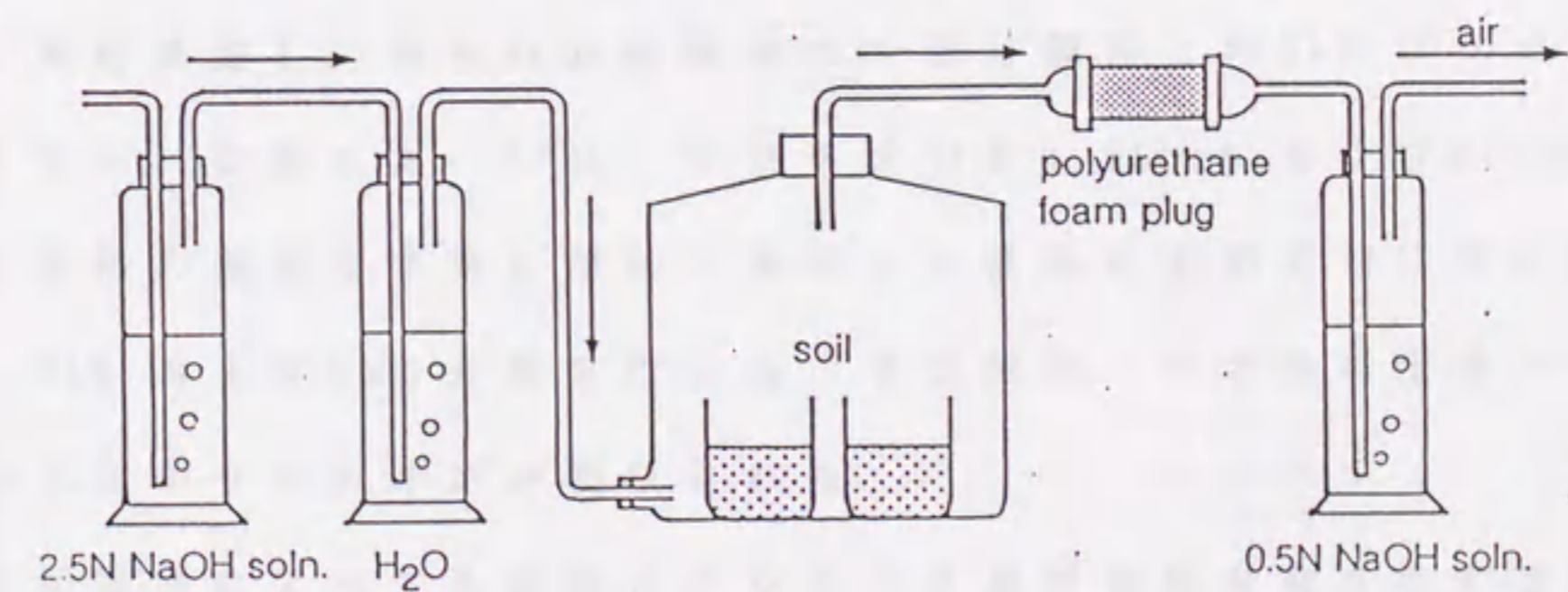


Fig. 3-1 The apparatus used in the experiment.

一方、隔日で2回オートクレーブ殺菌(120℃, 1時間)した土壌にも ^{14}C -サリチオンをクリーンベンチ内で同様に添加・混合し、アルミホイルで覆い、25℃の暗所で無菌的に保温静置した。

揮散性 ^{14}C はポリウレタンを30mlのメタノールで3回抽出することにより回収した。また、 $^{14}\text{CO}_2$ 量の測定は以下のようにして行った。まず、水酸化ナトリウム水溶液の放射能を測定し、次に、水酸化ナトリウム水溶液(30ml)に2N BaCl_2 水溶液(10ml)を加えて $^{14}\text{CO}_2$ を $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ として、遠心分離(3000rpm, 10分間)により沈澱させた後の上澄液の放射能を測定した。それぞれの放射能の差を $^{14}\text{CO}_2$ 量とした。

^{14}C -サリチオンおよびその分解生成物の土壌からの抽出は、化合物を添加後、1, 3, 7, 14, 28および60日目に次のように行った。土壌に80mlの酢酸エチル: 0.1N HCl混合液(7:1)を加えて10分間振盪した後、遠心分離(5000rpm, 10分間)をして抽出液を得た。この抽出操作を3回繰り返して得られた抽出液を混合し、その一部(1ml)をとり放射能を定量した。残りの抽出液は飽和食塩水で洗浄後、減圧濃縮し、得られた濃縮液の一部を標品とのTLCコクロマトグラフィーに供した。 ^{14}C -サリチオンを1.25ppm および0.124ppmの2段階の濃度で土壌に添加・混合した直後に上記方法に従い抽出し、TLC およびLSC分析を行った。その結果、いずれの土壌からも99%以上のサリチオンが回収された。

上記操作によっても抽出されなかった放射性化合物を含む土壌残渣は、減圧乾燥後、乳鉢で均一になるように粉碎し、その一部(300mg)を燃焼法(第2章)による放射能の定量に供した。

第3節 結果

第1項 土壤中における分解

いずれの土壤中においても、サリチオンはFig. 3-2に示したように速やかに消失した。牛久および野市土壌における消失半減期は、それぞれ、3日および1.5日であった。28日間の保温静置の後に回収されたサリチオンは処理放射エネルギーの3%以下であった。サリチオンの消失は滅菌条件下では大きく抑制され、牛久土壌における消失半減期は9日であった。また、野市土壌においては最小自乗法による計算の結果、29日と推定した。

第2項 土壤中における分解生成物

牛久および野市土壌中に検出されたサリチオンとその分解生成物の処理放射エネルギーに対する割合の経時変化をそれぞれTable 3-2 および3-3に示す。好気条件下において両土壌から抽出された ^{14}C の大部分はサリチオン(SLT)であった。サリチルアルコール(Sal-alc)が主分解生成物として処理後1日目に2.4%(野市土壌)検出されたが、その後、速やかに消失した。脱メチルサリチオン(SLT-DM)、脱メチルサリオキソン(SLO-DM)およびサリチル酸(Sal-acid)が試験期間の初期に微量検出されたが、それらはいずれも3日目には0.5%以下となった。処理放射エネルギーの大部分は $^{14}\text{CO}_2$ にまで無機化され、処理後60日目には38.8~44.9%に達した。その他の揮散性 ^{14}C は処理放射エネルギーの2%以下であった。未抽出土壌残渣 ^{14}C は徐々に増加し、処理後7~14日目に48.4~58.5%に達したが、その後、緩やかに減少した。

滅菌条件下において抽出された ^{14}C の大部分はサリチオンであっ

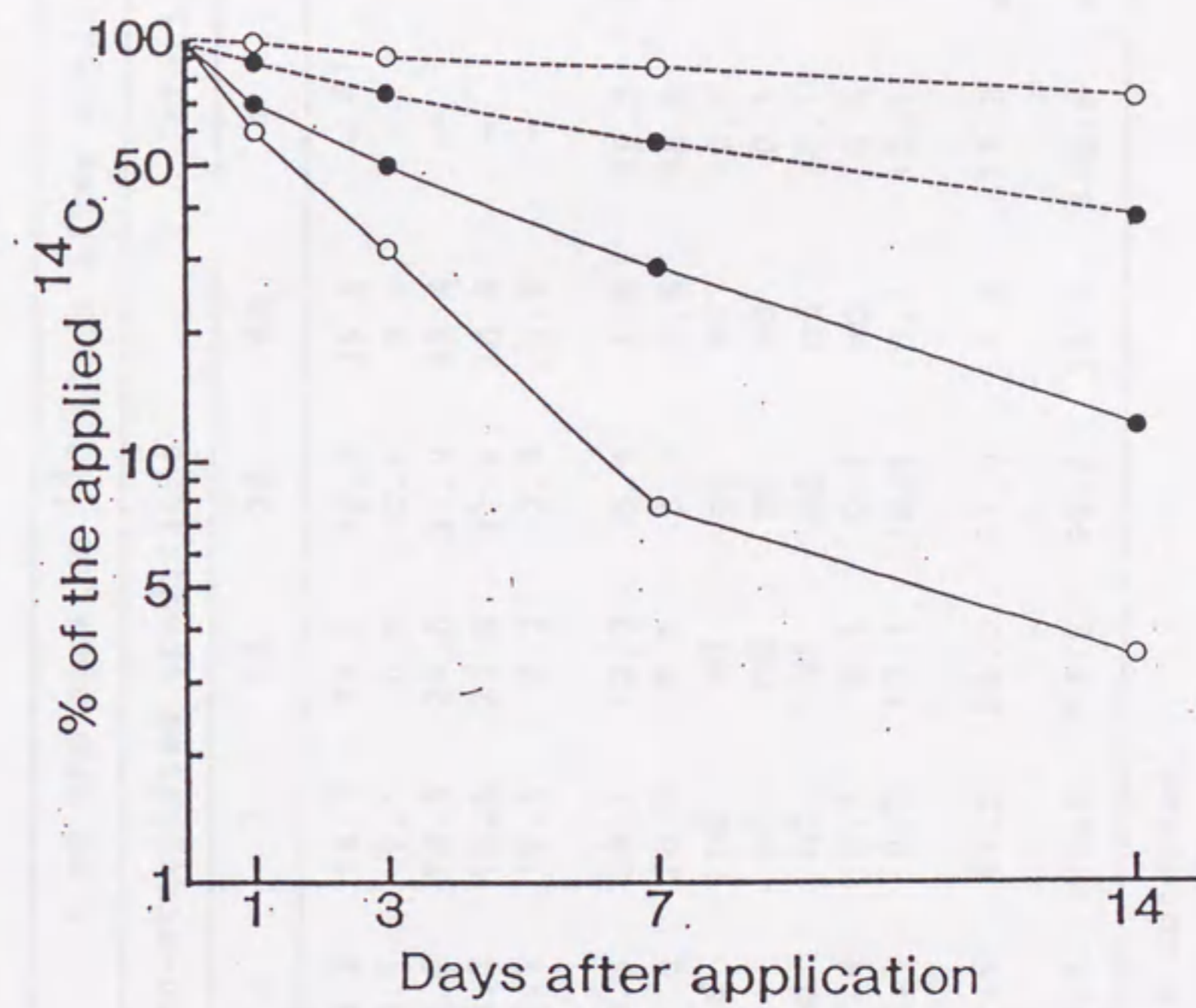


Fig. 3-2 Decline curves of salithion under aerobic and sterilized upland conditions.

— , Aerobic conditions; - - - - , Sterilized conditions;
 ● , Ushiku soil; ○ , Noichi soil.

Table 3-2 Degradation of ¹⁴C-Salithion in Ushiku soil under non-sterilized and sterilized upland conditions.

	% of the applied ¹⁴ C (days after application)															
	non-sterilized conditions							sterilized conditions								
	1	3	7	14	28	60	1	3	7	14	28	60	1	3	7	14
Volatile ¹⁴ C	2.7	8.3	18.7	24.1	32.0	39.5	- a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Polyurethane plug	<0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaOH soln. trap	2.7	8.2	18.6	24.0	31.9	39.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
¹⁴ CO ₂	2.7	8.2	18.6	23.7	31.6	38.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Others	<0.1	<0.1	<0.1	0.3	0.3	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extractable ¹⁴ C	69.4	50.3	28.7	12.2	3.4	1.6	89.3	75.4	59.5	41.9						
SLT	68.7	49.8	28.5	12.1	3.3	1.6	88.8	74.2	56.9	37.4						
SLO	ndb)	nd	nd	nd	nd	nd	<0.1	nd	nd	nd						
SLT-DM	0.1	<0.1	nd	nd	nd	nd	0.1	0.1	0.1	0.2						
SLO-DM	<0.1	nd	nd	nd	nd	nd	<0.1	nd	nd	nd						
Sal-alc	0.5	0.4	0.1	0.1	0.1	nd	0.4	1.1	2.5	4.3						
Others	0.1	0.1	0.2	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1						
Bound ¹⁴ C	24.8	36.5	44.5	58.5	57.0	55.4	11.3	23.0	35.8	53.1						
Total ¹⁴ C	96.9	95.1	92.0	94.8	92.4	96.5	100.6	98.4	95.3	95.0						

a) Not tested.

b) Not detected.

Sample	14C		14C		14C		14C		14C	
	1	3	7	14	28	60	1	3	7	14
Volatiles	6.8	18.8	31.2	35.8	41.4	46.4	-	-	-	-
Polyurethane plug	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	-	-	-	-
NaOH soln. trap	6.7	18.7	31.1	35.7	41.3	46.3	-	-	-	-
14CO2	6.6	18.3	30.5	35.0	40.5	44.9	-	-	-	-
Others	0.1	0.4	0.6	0.7	0.8	1.4	-	-	-	-
Extractable 14C	64.8	33.3	9.2	3.6	2.0	1.2	98.0	92.1	87.0	75.9
SLT	60.3	31.5	7.7	3.5	1.8	1.2	97.8	91.2	85.0	71.4
SLO	nd b)	nd	nd	nd	nd	nd	<0.1	nd	nd	nd
SLT-DM	1.4	0.4	0.1	nd	nd	nd	<0.1	0.2	0.3	0.7
SLO-DM	0.1	<0.1	0.2	nd	nd	nd	<0.1	<0.1	<0.1	0.1
Sal-alc	2.4	1.2	1.1	0.1	0.1	nd	0.1	0.5	1.2	2.0
Sal-acid	0.4	0.2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.2
Others	0.2	<0.1	0.2	<0.1	0.1	<0.1	0.1	0.2	0.5	1.5
Bound 14C	22.4	38.3	48.4	47.8	44.5	41.8	3.1	6.8	8.5	14.1
Total 14C	94.0	90.4	88.8	87.2	87.9	89.4	101.1	98.9	95.5	90.0

Table 3-3 Degradation of 14C-Salithion in Noichi soil under non-sterilized and sterilized upland conditions.

	% of the applied 14C (days after application)									
	non-sterilized conditions			sterilized conditions						
	1	3	7	14	28	60	1	3	7	14
Volatile 14C	6.8	18.8	31.2	35.8	41.4	46.4	- ^{a)}	-	-	-
Polyurethane plug	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	-	-	-	-
NaOH soln. trap	6.7	18.7	31.1	35.7	41.3	46.3	-	-	-	-
14CO2	6.6	18.3	30.5	35.0	40.5	44.9	-	-	-	-
Others	0.1	0.4	0.6	0.7	0.8	1.4	-	-	-	-
Extractable 14C	64.8	33.3	9.2	3.6	2.0	1.2	98.0	92.1	87.0	75.9
SLT	60.3	31.5	7.7	3.5	1.8	1.2	97.8	91.2	85.0	71.4
SLO	nd b)	nd	nd	nd	nd	nd	<0.1	nd	nd	nd
SLT-DM	1.4	0.4	0.1	nd	nd	nd	<0.1	0.2	0.3	0.7
SLO-DM	0.1	<0.1	0.2	nd	nd	nd	<0.1	<0.1	<0.1	0.1
Sal-alc	2.4	1.2	1.1	0.1	0.1	nd	0.1	0.5	1.2	2.0
Sal-acid	0.4	0.2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.2
Others	0.2	<0.1	0.2	<0.1	0.1	<0.1	0.1	0.2	0.5	1.5
Bound 14C	22.4	38.3	48.4	47.8	44.5	41.8	3.1	6.8	8.5	14.1
Total 14C	94.0	90.4	88.8	87.2	87.9	89.4	101.1	98.9	95.5	90.0

a) Not tested. b) Not detected.

た。分解生成物のサリチルアルコールは、非滅菌条件下においては生成後速やかに消失したのに対して、滅菌条件下では経時的に増加し、14日後には2.0-4.3%となった。滅菌条件下における未抽出土壌残渣 ^{14}C の量は土壌間で異なり、牛久土壌では処理後14日目には処理放射エネルギーの53.1%に達し、非滅菌条件下における55.4%とほとんど差がなかったのに対し、野市土壌では14.1%と非滅菌条件下における41.8%と比較して大きな差が認められた。

第4節 考察

有機リン殺虫剤は有機塩素系殺虫剤等と比較すると、土壌中において残留性が低く、いくつかの例外を除けば、処理後2、3週間で消失することが一般的に知られている^{8, 43-47}。本試験の結果から、サリチオンは、他の有機リン剤と同様に土壌からの消失が速く、土壌残留性が低い農薬であることが確認された。試験期間を通じて、 $^{14}\text{CO}_2$ 以外の揮散性 ^{14}C は処理放射エネルギーの2%以下であったことから、サリチオンの土壌からの消失は、揮散によるものではなく、土壌中における速やかな分解の結果であることが明らかとなった。

農薬の土壌中における分解過程には、一般的に、化学的な分解と土壌微生物による分解とが関与していることが知られており、これまでにそれぞれの分解過程を明確にするための多くの研究がなされてきた。その中で、滅菌土壌と非滅菌土壌中における農薬の挙動を比較することは有効な方法として一般に用いられてきた^{7, 10, 13, 14, 17, 19, 48}。滅菌土壌中において認められる分解は非生物学的な分解と考えることができるし、また、土壌の滅菌処理によって分解が抑制される場合には、土壌微生物による分解が大きく関与していると

考えることができる。

このような考えに基づき、有機リン殺虫剤のマラチオン[S-1,2-bis(ethoxycarbonyl)ethyl 0,0-dimethyl phosphorodithioate]やダイアジノン[0,0-diethyl 0-(2-isopropyl-6-methylpyrimidin-4-yl) phosphorothioate]は、土壤中においてエステル結合の化学的な加水分解と土壤微生物による加水分解により分解・消失すると考えられている⁴⁸⁻⁵²⁾。一方、パラチオンは主に土壤微生物によるP-0-アリル結合の加水分解やニトロ基のアミノ基への還元を経て分解・消失することが確かめられている^{10,48,52-56)}。サリチオンの滅菌土壤中の分解速度は、非滅菌土壤中の分解速度と比較すると、牛久および野市土壤で、それぞれ、およそ1/3 および1/18に減少した。滅菌土壤中における分解の抑制と非滅菌条件下における38.8~44.9%に達する¹⁴C₂O₂の発生は、土壤中におけるサリチオンの分解が主に土壤微生物による分解であることを示唆している。しかしながら、滅菌条件下においても14日間の保温静置で、53.1% (牛久土壤) および14.1% (野市土壤)の未抽出残渣¹⁴Cが形成したことから、非生物的反応による未抽出残渣¹⁴Cの形成も、特に牛久土壤において、サリチオンの消失に大きく関与していることが明らかとなった。滅菌処理によるサリチオン分解の抑制効果が牛久土壤では野市土壤と比較してそれほど大きくなかった原因として、牛久土壤における非生物的反応による未抽出残渣¹⁴Cの形成が大きく影響したものと考えられる。また、滅菌土壤中において、分解生成物のサリチルアルコールが14日間で2.0-4.3%にまで経時的に増加したことから、サリチオンは徐々にではあるが化学的にもエステル結合の開裂により分解していることが認められた。

以上の結果から、サリチオンの土壌中における消失は、次に示した要因により進行していると考えた。牛久土壌においては、滅菌条件下における非生物的で急速な未抽出残渣の形成と非滅菌条件下における多量の $^{14}\text{C}\text{O}_2$ の発生から、サリチオンは土壌への不可逆的吸着と土壌微生物による分解とが同時に進行して消失するものと考えた。これに対し、野市土壌においては、サリチオンの未抽出残渣形成能が弱いため、大部分のサリチオンは土壌微生物に利用可能な状態で存在し、主に土壌微生物による分解を経て消失するものと考えた。野市土壌の非滅菌条件下における未抽出土壌残渣 ^{14}C の量が滅菌土壌中と比較してかなり多かった原因は、サリチオンの分解生成物が未抽出土壌残渣を形成したためと推定した。

サリチオンの強い吸着が認められた牛久土壌は火山灰土壌で、多孔質で中空球状のアロフェンを主な構成成分としている。アロフェンは他の結晶質粘土鉱物と比較すると、吸着表面積が大きく、また、有機物やリン酸の吸着能が高いことが知られている(8, 57-61)。このような土壌の性質は、農薬の吸着を促進することが知られており(8, 13, 59, 62-71)、サリチオンの強い吸着は、牛久土壌のこのような火山灰土壌特有の物理化学的特性に起因したものと考えられる。

本試験で同定された分解生成物から、サリチオンは畑地条件下において、これまでに報告された他の有機リン剤の場合(7, 10, 17, 14, 19, 72)と同様に、 P-O -アール結合および P-O -アラルキル結合の開裂、脱メチル化および P=S から P=O への酸化を経て CO_2 にまで分解することが確認された。サリチオンの分解生成物のいずれもが土壌中において速やかに消失したことから、サリチオンの主分解経路は特定できなかった。土壌中において同定されたほとんどの分解生成

物は、哺乳動物および植物における代謝物の中に認められたものであったが²³⁾、サリチル酸は土壤中においてのみ認められた。哺乳動物ではサリチルアルコールが最終代謝物として尿中に排出され、また、植物中ではサリチルアルコールがグルコースとの抱合体の形で蓄積される²³⁾のに対して、土壤中においてはサリチルアルコールがさらにサリチル酸にまで酸化されることが認められた。芳香族化合物の微生物による分解に関するこれまでの知見⁷²⁻⁷⁶⁾から、サリチル酸はさらにカテコールに酸化され、それに続くオルトまたはメタ開裂を経てCO₂にまで無機化されたものと考えた。サリチオンの好氣的畑地条件下における予想分解経路をFig. 3-3に示した。

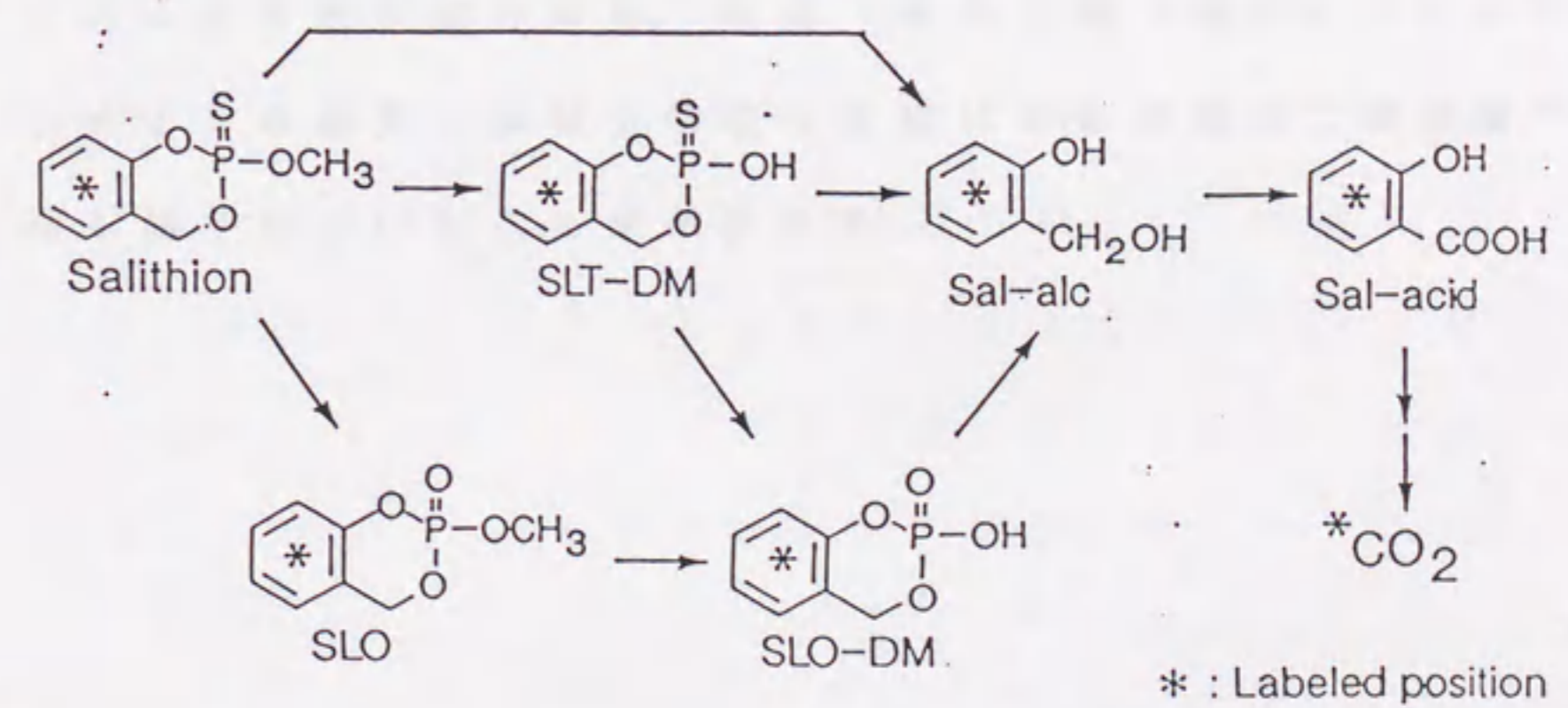


Fig. 3-3 Proposed degradation pathways for salithion in soils.

サリチオンは畑地条件下において、3日以内の半減期で速やかに消失し、最終的には $^{14}\text{C}\text{O}_2$ にまで無機化されるか、未抽出土壌残渣 ^{14}C を形成した。主な分解経路はP-O-アリアルおよびP-O-アラルキル結合の開裂、脱メチル化およびP=SからP=Oへの酸化で、分解生成物として、サリチルアルコール、脱メチルサリチオン、脱メチルサリオキソンおよびサリチル酸が検出されたが、それらの分解生成物は速やかに消失した。



第5節 要約

フェニル環を ^{14}C で標識したサリチオンを用いて、土壌特性が大きく異なる2種類の畑地土壌中における分解について室内実験により研究した。

サリチオンは畑地条件下において、3日以内の半減期で速やかに消失し、最終的には $^{14}\text{C}\text{O}_2$ にまで無機化されるか、未抽出土壌残渣 ^{14}C を形成した。主な分解経路はP-O-アリアルおよびP-O-アラルキル結合の開裂、脱メチル化およびP=SからP=Oへの酸化で、分解生成物として、サリチルアルコール、脱メチルサリチオン、脱メチルサリオキソンおよびサリチル酸が検出されたが、それらの分解生成物は速やかに消失した。

滅菌条件下においてはサリチオンの分解が大きく抑制されたことから、サリチオンの土壌中における分解には微生物が大きく関与していることが示唆された。また、牛久土壌(黒ボク土)におけるサリチオンの消失には非生物的反応による未抽出土壌残渣 ^{14}C の形成も関与していることが示された。

第4章 土壤中のサリチオン分解菌相の特徴⁷⁷⁾

第1節 はじめに

有機リン殺虫剤の土壤中における分解が主として土壤微生物によることはよく知られている^{8,10,13,43,78)}。そして、これは種々の有機リン殺虫剤の分解能を持つ細菌、放線菌、糸状菌、酵母および藻類などが土壤から単離されている^{8,10,13,78-80)}ことから支持されている。

ところで、農薬を土壤中に添加したときの土壤中における農薬分解菌の挙動と農薬の分解との関係は、2,4-D [(2,4-dichlorophenoxy) acetic acid]⁸¹⁻⁸⁶⁾、MCPA [(4-chloro-2-methylphenoxy)acetic acid]⁸⁶⁾、ベンチオカーブ [S-4-chlorobenzyl diethyl(thiocarbamate)]^{87,88)}、モリネート [S-ethyl hexahydro-1H-azepine-1-carbothioate]⁸⁹⁾およびイソウロン [3-(5-tert-butyl-3-isoxazolyl)-1,1-di-methylurea]⁹⁰⁾などの除草剤の分解菌についてはよく調べられており、それらの除草剤のうち、モリネートを除く除草剤の分解菌は、薬剤の添加以前には比較的少数が土壤中に存在しているだけであるが、除草剤が土壤に添加されるとそれらは急速に増加し、除草剤もそれに伴い急速に分解されることが知られている^{81-88,90)}。一方、モリネートの場合⁸⁹⁾には、添加以前から土壤中の細菌、放線菌および糸状菌のそれぞれ約30%が分解能を有し、薬剤の添加によっても分解菌数は増加しない。このように薬剤の種類により土壤中の分解菌数の挙動には差があることが報告されている。以上のような、土壤中における除草剤の分解菌の挙動に関する研究例と比較すると、有機リン殺虫剤の分解菌の挙動についてはま

だよく調べられていない。

第3章では、有機リン殺虫剤サリチオンが畑地土壤中において主に土壤微生物により、脱メチル化、 $P-O$ -アリールおよび $P-O$ -アラキル結合の開裂、 $P=S$ の酸化的脱硫化を経て速やかに CO_2 にまで分解されることを明らかにした。この実験でサリチオンをあらかじめ土壤に添加していない場合においても、サリチオンは土壤中に添加されると3日以内の半減期で速やかに分解したことから、サリチオン分解菌は土壤中に普遍的に多数存在していることを推定した。

本章では、サリチオンを分解する細菌、放線菌および糸状菌を土壤から単離し、それぞれの全菌数に対する割合を明らかにした。さらに、それらの単離した分解菌によるサリチオンの分解活性および分解経路を明らかにすることにより、畑地土壤中におけるサリチオン分解微生物相の特徴を明らかにした。また、高い分解能を持つ数種類の微生物(細菌)については同定を行った。

第2節 実験方法

第1項 サリチオン分解菌の単離と同定

50ml容ビーカーに乾土換算で30gの牛久畑土壤(採取場所および物理化学的特徴は第3章に記載)をとり、蒸留水を加えて最大容水量の50%に調整した。25℃の暗所で2週間保温静置したのち、全土壤を270mlの滅菌蒸留水に懸濁し、10分間振とうした。その土壤懸濁液の一部(1ml)を滅菌蒸留水で10倍ずつ希釈して、 $10^{-1} \sim 10^{-7}$ の希釈液を調製した。それぞれの希釈液の0.1mlを寒天平板上に塗布し、細菌と放線菌は28℃で9日間の培養後に、糸状菌は25℃で5日間の培養後にそれぞれ計数した。細菌と放線菌には1/10に希釈し

た Nutrient Agar 培地 (Difco), 糸状菌にはローズベンガル寒天培地⁹¹⁾をそれぞれ用いた。計数後に、各グループの微生物の中から任意にコロニーを選択し、新しい培地への植え継ぎを繰り返してそれぞれのコロニーを純化した。

サリチオンを 20ppm の濃度で含む試験管中、5ml の 1/10 に希釈した Nutrient Broth (Difco) に単離した微生物の 1 白金耳を接種し、30°C で 7 日間振とう培養した。その後、培地中に残存するサリチオンを等容量の酢酸エチルで抽出し、GC-FTD により定量した。微生物を接種しないコントロール区と比較して、サリチオンの残存量が 80% 以下となった微生物をサリチオン分解菌とした。高い分解能を持つ数種の細菌はミニテック同定システムおよび Bergey のマニュアル⁹²⁾を用いて同定した。

第 2 項 単離した分解菌による分解試験

単離したそれぞれのサリチオン分解菌を試験管中 5 ml の 1/10 希釈 Nutrient Broth に接種し 30°C で一昼夜振とう培養した。その後、10 μ l のジメチルスルホキシドに溶解した ¹⁴C - サリチオンを 10ppm となるように添加し、引続き同じ条件で培養を続けた。分解菌を接種しない培地にも同様に ¹⁴C - サリチオンを添加し、コントロール区として培養を行った。化合物を添加後、0, 4, 8, 24, 48 時間後に培養液の一部 (10 μ l) を直接 LSC および TLC 分析に供した。

TLC コクロマトグラフィーで標品と一致しない代謝物は、機器分析により同定した。¹⁴C - サリチオン (0.43 mCi/mmol) を 20ppm の濃度で含む 1/10 希釈 Nutrient Broth (200ml \times 15本) に単離した分解菌 (B-17) を接種し、30°C で 3 日間振とう培養した。その後、培養

液を凍結乾燥し、 ^{14}C -サリチオンおよびその代謝生成物をメタノールで抽出した。抽出液は濃縮後、展開溶媒系：酢酸エチル/エタノール/水=4/2/1を用いたTLCにより分離・精製し、 $^1\text{H-NMR}$ およびSIMS-MS スペクトロスコピーにより分析した。

単離したそれぞれのサリチオン分解菌のサリチオン資化性を調べるため、サリチオンを単一炭素またはリン源として含む無機塩培地中におけるサリチオン分解菌の生育の有無を調べた。培地の組成はそれぞれ以下のとおりとした(g/l)： K_2HPO_4 0.5, NaNO_3 0.5, MgSO_4 0.2, FeSO_4 痕跡, サリチオン 0.05, pH 7.0 または KCl 0.5, NaNO_3 0.5, MgSO_4 0.2, FeSO_4 痕跡, グルコース 0.1, サリチオン 0.05, pH 7.0。これを 30°C で10日間培養した後、サリチオンの添加区と非添加区で、細菌の場合は培養液の OD_{610} を、放線菌および糸状菌の場合は菌の生育を肉眼で比較した。

第3節 結果

第1項 牛久土壤中のサリチオン分解菌数

Table 4-1 に示したように牛久土壤中における細菌、放線菌および糸状菌の乾土1gあたりのコロニー形成菌数は、それぞれ、 9.5×10^7 , 1.8×10^7 および 2.8×10^5 であった。それらの細菌、放線菌および糸状菌から任意に選んだ69, 32および38個のコロニーについてサリチオンの分解活性を調べると、それぞれ、10, 14および6株の微生物が分解能を有していた。サリチオン分解菌の乾土1gあたりの菌数は細菌で 1.3×10^7 と最も多かったが、各微生物グループの全菌数に対するサリチオン分解菌の割合は放線菌で44%と最も高かった。単離された細菌と糸状菌の全菌数に対するサリチオン

分解菌の割合は、およそ15%であった。

Table 4-1 Population of salithion-degrading microorganisms in Ushiku soil.

	Total microbes ^{a)}	Isolated ^{b)}	Degrader ^{c)}
Aerobic bacteria	9.5×10^7	69	10(14) ^{d)}
Actinomycetes	1.8×10^7	32	14(44)
Fungi	2.8×10^5	38	6(16)

a) Colony-forming units/g dry weight soil.

b) Number of colonies isolated.

c) Number of salithion-degrading microorganisms.

d) Numbers in parentheses indicate % of the degrader in the corresponding isolated microorganisms.

第2項 単離した土壌微生物による分解

各微生物グループの分解菌による代表的なサリチオンの分解曲線を Fig. 4-1 に示す。細菌の中では、1株(B-60)が高い分解能を示し、8時間の培養で82%のサリチオンを分解した。この菌株は、以下に示す結果から *Acinetobacter* sp. と同定した：グラム陰性、好気性桿菌、運動性陰性、オキシダーゼ陰性、カタラーゼ陽性、糖類からの酸の非生成。3株の細菌(B-7, B-15およびB-17)は比較的高いサリチオンの分解能を示し、以下に示す結果から *Agrobacterium* sp. と同定した：グラム陰性、好気性桿菌、運動性陽性、オキシダーゼ陽性、カタラーゼ陽性、糖類含有培地上での多量の細胞外粘質物を

ともなった生育。これらの分解菌は、48時間の培養で51.0~62.0%のサリチオンを分解した。この他の6株の細菌は比較的低い活性を示した。また、単離したいずれの放線菌と糸状菌も上記した4株の細菌のような高い分解活性を示さなかった。

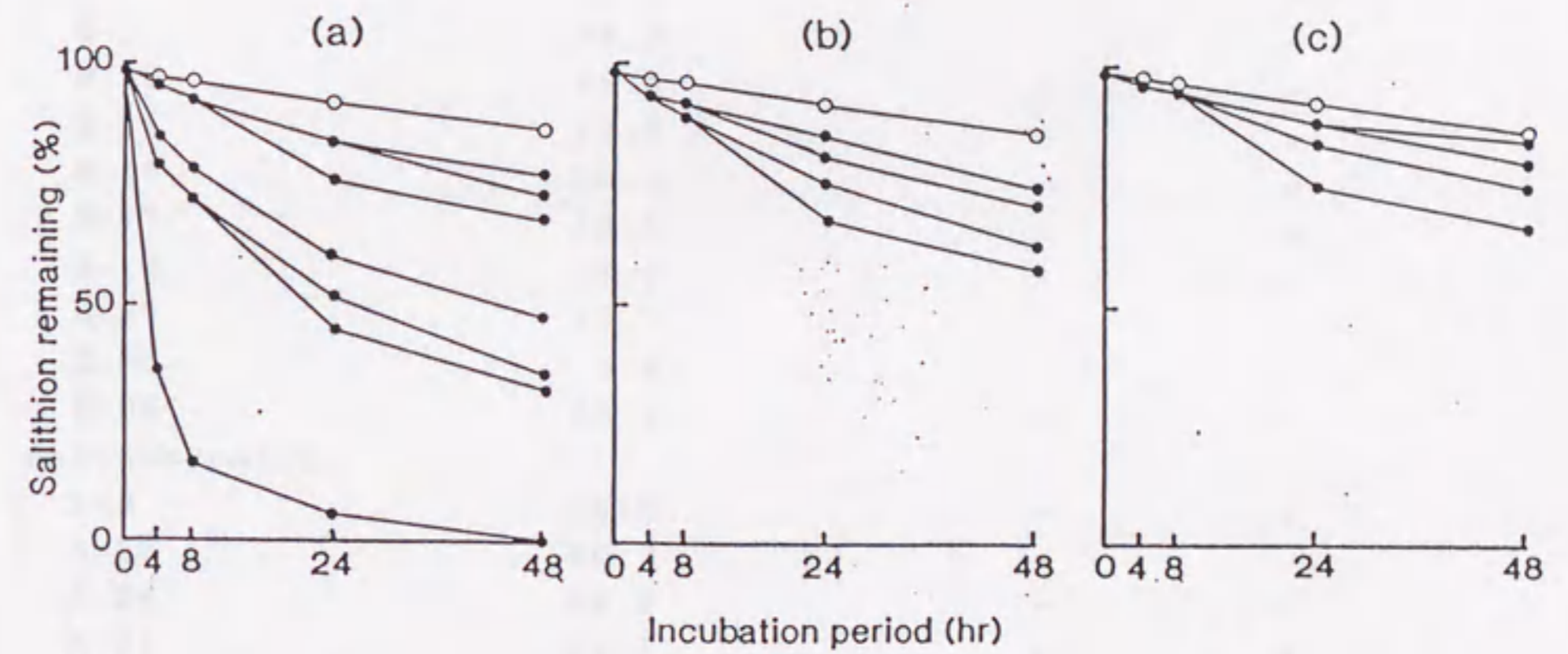


Fig. 4-1 Degradation of salithion by the representative (a) bacteria, (b) actinomycetes and (c) fungi isolated from the Ushiku soil.

-○-, control without inoculation.
 -●-, degradation in inoculated cultures.

単離したいずれのサリチオン分解菌もサリチオンを単一炭素源として含む無機塩培地において生育できなかったが、2株の細菌、5株の放線菌および1株の糸状菌はサリチオンを単一リン源として含む無機塩培地において、サリチオンを含まない培地よりもよく生育した。しかし、Table 4-2 に示したように、栄養源としてサリチオ

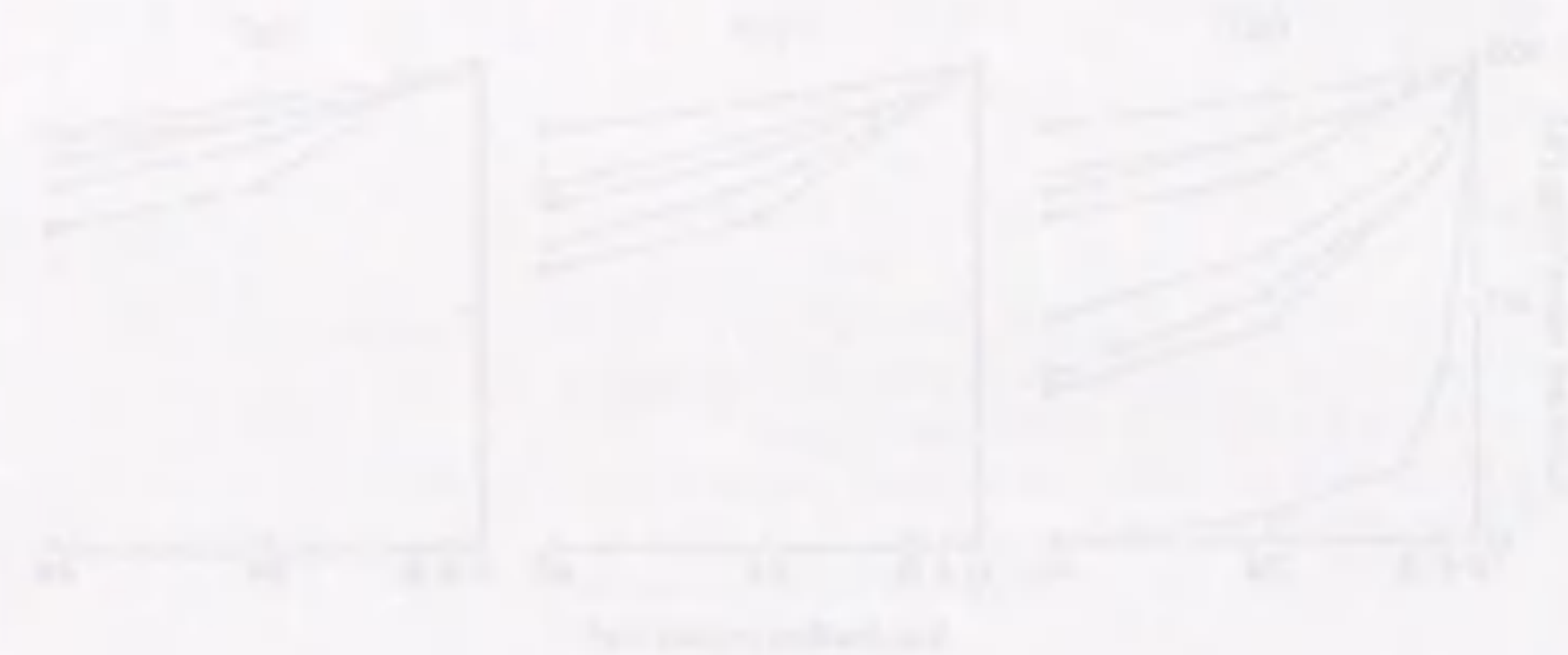


Table 4-2 Property of salithion-degrading microorganisms on degrading and utilizing salithion.

Microorganisms	Degrading ability ^{a)}	C source ^{b)}	P source ^{b)}
Aerobic bacteria			
B-3	65.3	-	+
B-7	62.9	-	-
B-10	69.5	-	-
B-11	82.9	-	-
B-15	39.9	-	-
B-17	48.3	-	+
B-18	87.2	-	-
B-57	77.7	-	-
B-60	5.4	-	-
B-86	85.4	-	-
Actinomycetes			
A-9	66.6	-	+
A-23	80.5	-	-
A-24	68.5	-	+
A-27	82.1	-	+
A-28	79.7	-	+
A-35	84.4	-	-
A-42	67.0	-	-
A-43	76.5	-	-
A-46	83.7	-	-
A-56	91.6	-	-
A-68	85.5	-	-
A-91	75.1	-	+
A-93	71.7	-	-
A-98	65.6	-	-
Fungi			
F-7	81.9	-	-
F-14	84.1	-	-
F-17	85.2	-	-
F-28	77.5	-	+
F-34	78.6	-	-
F-35	86.4	-	-

a) Remaining SLT (% of the applied ¹⁴C) after 24 h of incubation.

b) Growth on SLT as a sole carbon or phosphorus source.

ンを利用する能力とサリチオンを分解する能力とは無関係であった。

第3項 培地中の分解生成物

サリチオン分解菌を接種した培地中において、7種類の分解生成物が認められた。それらの中の3種類は標品とのTLCコクロマトグラフィーにより、脱メチルサリチオン(SLT-DM)、サリチルアルコール(Sal-alc)およびサリチル酸(Sal-acid)と同定した。

M-1は以下に示す結果から O-methyl O-(2-hydroxymethylphenyl) hydrogen phosphorothioate と同定した (Fig. 4-2): $^1\text{H-NMR}$ [$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] δ ppm; 3.8 (3H, d, $J=13.2\text{Hz}$, $-\text{OCH}_3$), 4.6 (2H, s, $-\text{CH}_2\text{OH}$), 7.0-7.6 (4H, m, aromatic), SIMS m/z ; 279 [$(\text{M}+2\text{Na})^+$], 257 [$(\text{M}+\text{Na})^+$], 塩化パラジウム陽性。

M-2は以下に示す結果から O-methyl O-(2-hydroxybenzyl) hydrogen phosphorothioate と同定した (Fig. 4-3): $^1\text{H-NMR}$ [$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] δ ppm; 3.6 (3H, d, $J=12.3\text{Hz}$, $-\text{OCH}_3$), 4.0 (2H, d, $J=12.1\text{Hz}$, $-\text{CH}_2-$), 6.6-7.4 (4H, m, aromatic), SIMS m/z ; 279 [$(\text{M}+2\text{Na})^+$], 塩化パラジウム陽性。

極性代謝物のM-3およびM-4は同定できなかった。サリチオンおよびその代謝物標品、M-1～M-4を各種展開溶媒系で展開したときのRf値をTable 4-3に示した。脱メチルサリチオン、サリチルアルコール、M-1およびM-2はいずれの培養液中においても検出されたが、その他の3種類の代謝物はいくつかの分解菌の培養中でのみ認められた。分解菌を接種しない対照区においては、脱メチルサリチオン、サリチルアルコール、M-1およびM-2が少量認められた。各微生物グループの中で代表的なサリチオン分解菌を接種した培養液

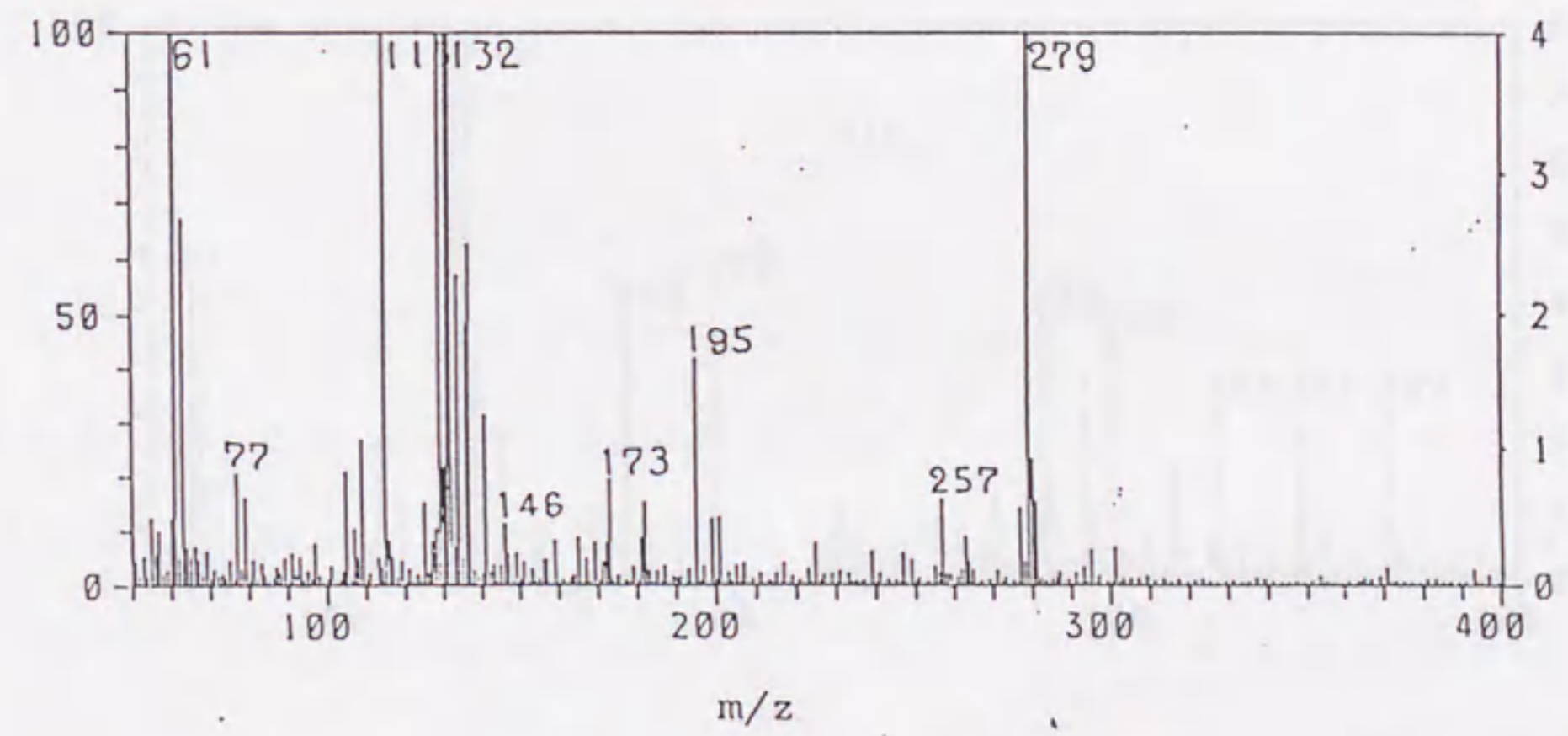
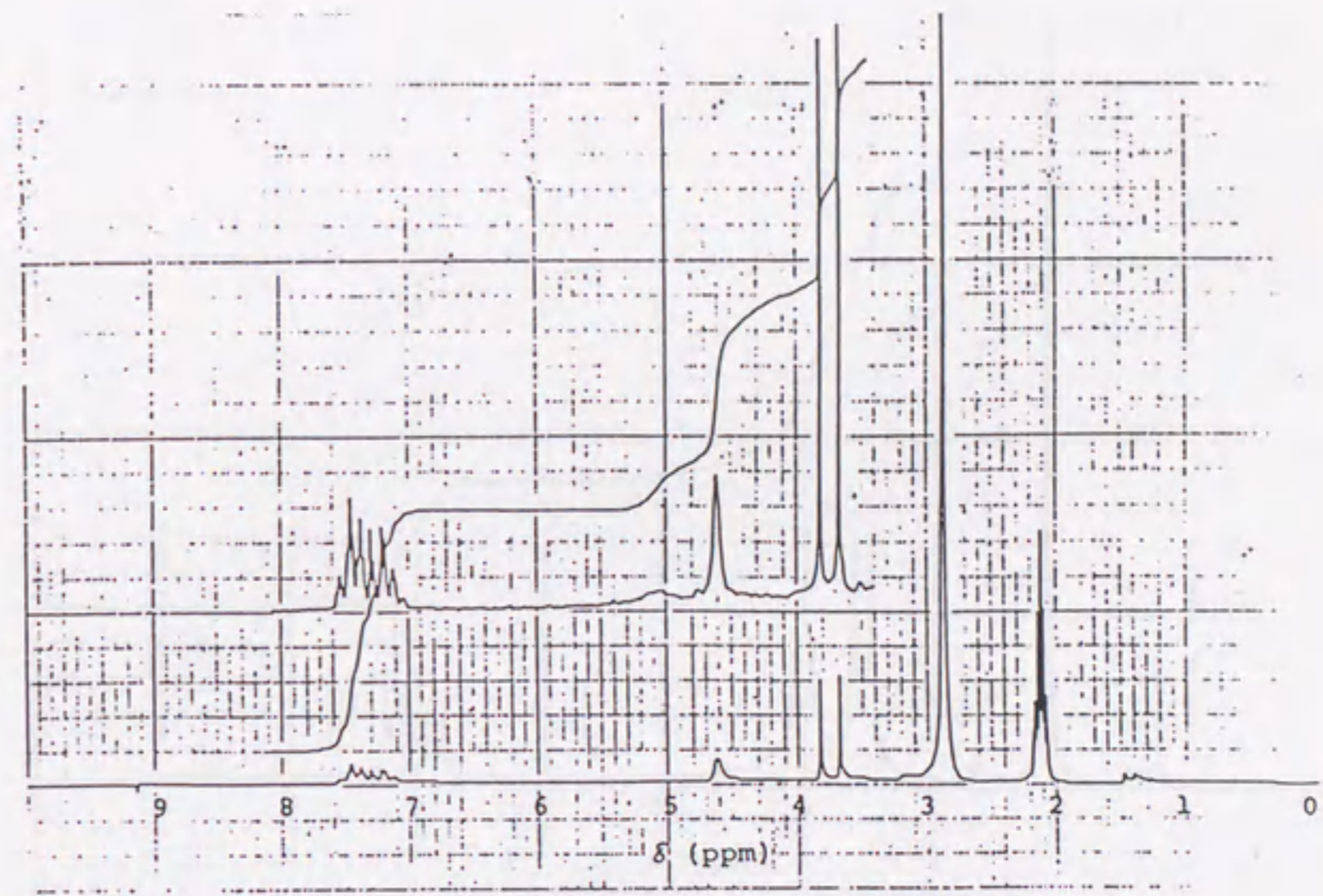


Fig. 4-2 ¹H-NMR and SIMS spectra of metabolite M-1.

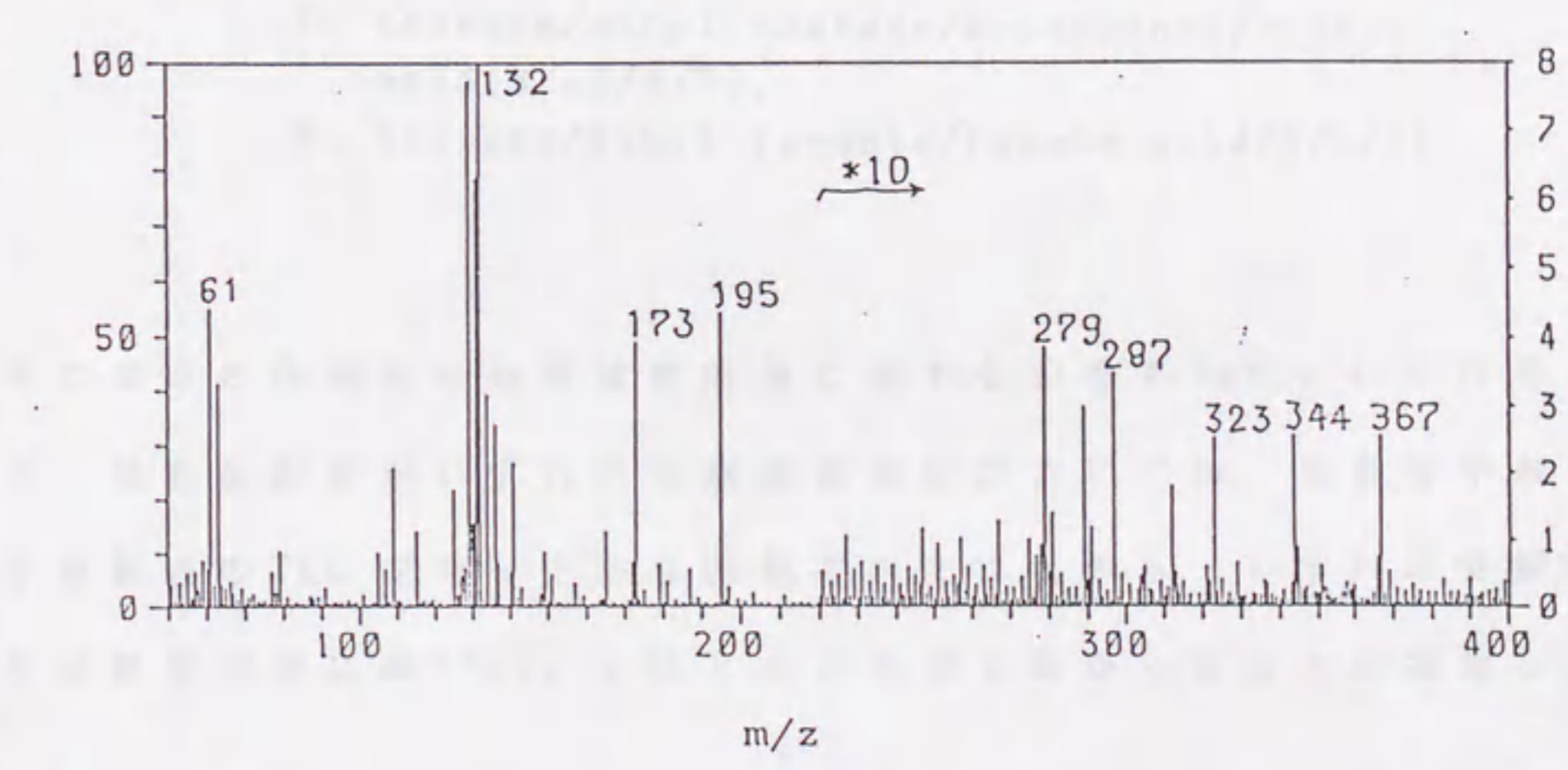
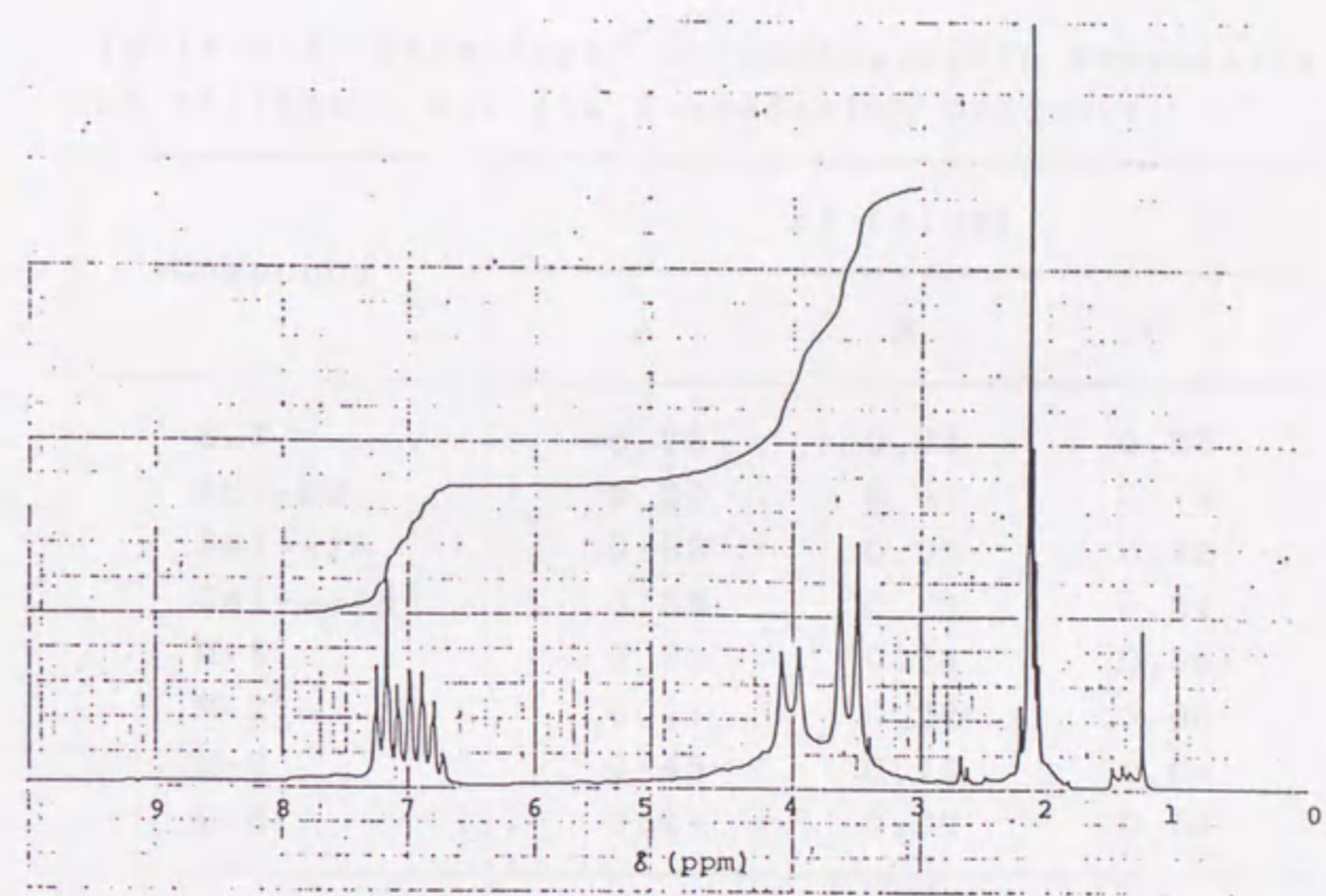
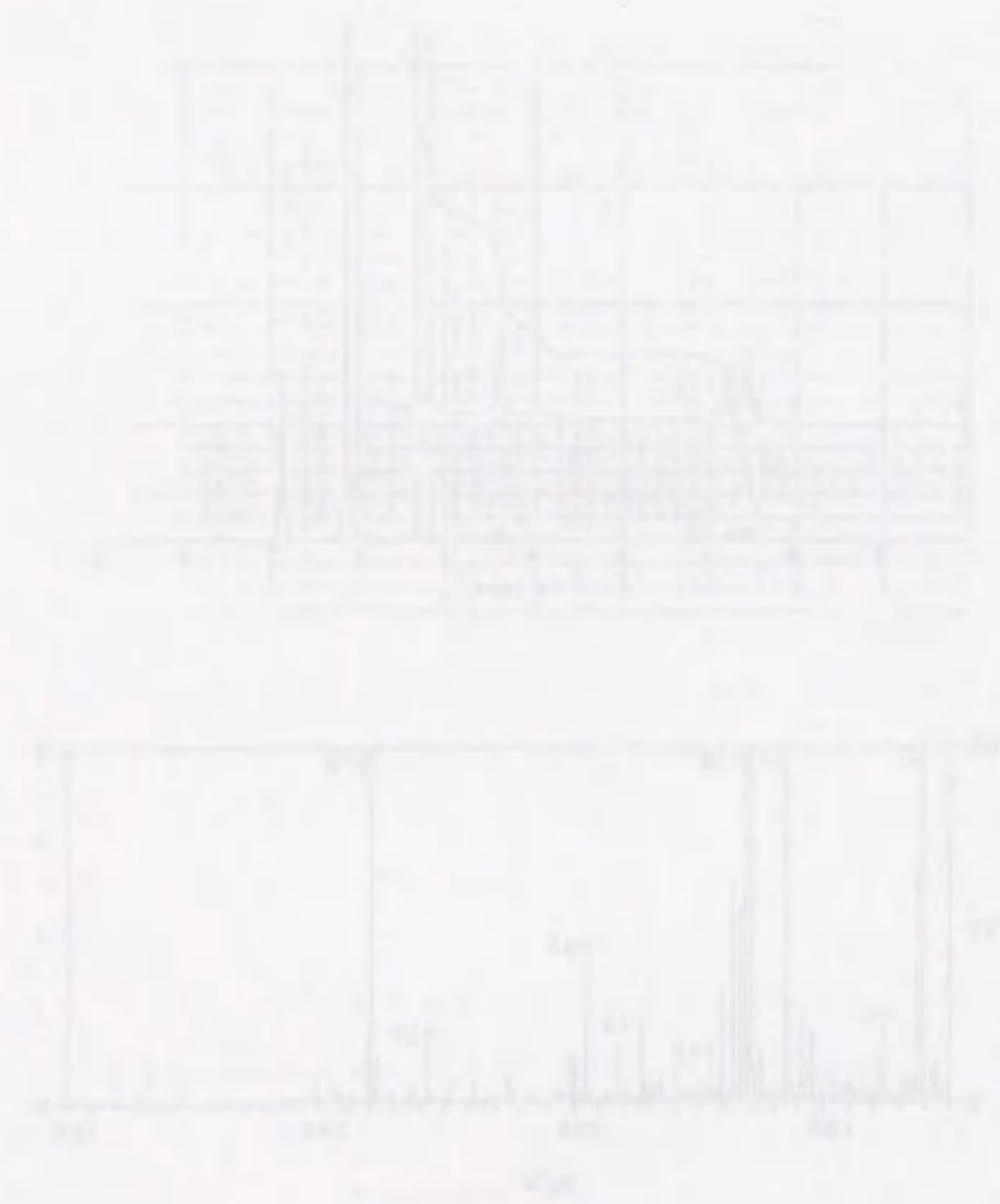


Fig. 4-3 ¹H-NMR and SIMS spectra of metabolite M-2.

Table 4-3 Thin-layer chromatographic properties of salithion and its degradation products.

Compound	R _f values		
	A	B	C
SLT	0.85	0.71	0.66
SLT-DM	0.60	0.41	0.13
Sal-alc	0.82	0.65	0.42
Sal-acid	0.58	0.65	0.54
M-1	0.51	0.24	0.06
M-2	0.41	0.22	0.06
M-3	0.45	0.15	0.04
M-4	0.27	0.07	0.04

Solvent systems:

A: ethyl acetate/ethanol/water(4/2/1),

B: toluene/ethyl acetate/2-propanol/acetic acid(8/12/5/3),

C: toluene/ethyl formate/formic acid(5/7/1).

中における代謝物の処理放射能に対する割合を Table 4-4 に示した。処理放射能がいずれの分解菌接種区においても、培養液中および展開後の TLC プレートから回収されたことから、いずれの分解菌も試験期間中には $^{14}\text{C}\text{O}_2$ をほとんど生成しなかったものと推定した。

Table 4-4 Metabolite distributions in the cultures after 24 hr of incubation.

Compound	% of the applied ¹⁴ C									
	Bacteria			Actinomycetes			Fungi		Control	
	B-7	B-17	B-60	A-93	A-98	F-28	F-34	C-1		
SLT	62.9	48.3	5.4	71.7	65.6	77.5	78.6	89.4		
SLT-DM	3.1	4.4	39.4	7.5	9.8	4.6	7.1	2.2		
Sal-alc	12.5	14.7	29.2	8.2	8.0	7.9	4.0	2.6		
Sal-acid	1.3	3.9	nd ^{a)}	nd	nd	nd	1.4	nd		
M-1	2.6	2.6	1.9	2.4	2.0	2.0	2.3	1.4		
M-2	8.3	17.1	13.9	7.4	6.1	5.9	4.5	0.3		
M-3	2.7	2.1	nd	0.7	nd	nd	nd	nd		
M-4	nd	0.7	1.3	nd	1.1	0.4	nd	nd		
Origin	9.4	10.0	13.0	6.4	4.0	4.0	4.3	1.2		
Others	1.5	0.8	1.5	1.3	1.5	0.6	0.8	0.9		
Total	104.3	105.0	105.5	105.7	98.1	102.9	103.1	97.9		

a) Not detected.

第4節 考察

これまでの土壌中における農薬分解菌数に関する研究から、多くの場合、土壌に農薬を添加していない場合には、農薬分解菌の数は全微生物数の0.1%以下であるが、農薬の添加にともないその数が増加することが知られており、この現象は土壌中の除草剤分解菌の性質としてこれまでによく報告されている^{81-88,90)}。また、有機リン殺虫剤の場合にも、水田土壌中におけるパラチオン加水分解微生物数が、パラチオンの反復処理により、検出限界以下から土壌1グラム当り 4×10^9 MPNにまで増加した例が報告されている⁹³⁾。

これに対し、本研究の結果から、サリチオンを分解する細菌、放線菌および糸状菌は、サリチオンを添加していない土壌中においても多数存在していることが明らかとなった。農薬未添加土壌においても多数の分解菌が存在している例は、除草剤モリネートの分解微生物の場合⁸⁹⁾等に報告されている。モリネートの場合、単離された土壌微生物の30%以上がモリネートを分解し、モリネート分子の化学構造の一部と類似した構造を持つ化合物が土壌環境中に広く分布し、その化合物の代謝に関与した酵素を広範囲の微生物が持っていることが推定された⁸⁹⁾。土壌中には多量の天然有機リン酸エステルが存在している^{94,95)}ことから、サリチオン分解菌が牛久土壌中において、数多く、多種類の微生物種にわたって認められたことは、モリネート分解菌の場合と同様な理由によるものと考えられる。サリチオン分解菌が土壌中に数多く存在していることは、サリチオンが土壌中において、主として土壌微生物により速やかに分解された結果(第3章)をよく反映していると考えられる。

単離したいずれのサリチオン分解菌もサリチオンを単一炭素源と

して生育することができなかった。この結果は、それらの分解菌がサリチオンをコメタボリズム^{96,97)}により分解したことを示している。しかし、いくつかの細菌、放線菌および糸状菌はサリチオンを単一リン源として利用した。これまで多数の有機リン殺虫剤の資化性菌が環境中から単離されているが^{13,43,78-80)}、それらの資化性菌は有機リン殺虫剤のP-O-アリアル結合を開裂し、生じたフェノールを開環し、炭素源として利用した。本研究で単離したサリチオン分解菌は、サリチオンの代謝生成物であるサリチルアルコールやサリチル酸を代謝することができなかつたので、それらの分解菌はサリチオンを単一炭素源として増殖に利用できなかったものと推定した。有機リン殺虫剤を単一リン源としての微生物の生育は、土壌や下水から単離された細菌についてこれまでも報告されている^{98,99)}。

単離されたサリチオン分解菌の中では、Acinetobacter sp. および Agrobacterium sp. が高い分解活性を有していた。有機リン殺虫剤の分解菌に関するこれまでの報告^{13,78-80)}では、単離された分解菌(細菌)の大部分は、Arthrobacter sp., Bacillus sp., Flabobacterium sp., Pseudomonas sp. および Xanthomonas sp. であった。Acinetobacter sp. は、これまでに農薬分解菌として報告された例はない。Agrobacterium sp. は、DDT [1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl) ethane], ダラボン (2,2-dichloropropionic acid), トリクロロ酢酸 (trichloroacetic acid) およびクロルプロファム (isopropyl 3-chlorophenyl carbamate) の分解菌としてこれまでに単離されており¹³⁾、これらの農薬を、それぞれ、脱水、脱ハロゲンおよびフェニルカーバメート結合の開裂により分解した。

これらの代謝反応に加えて、この属の細菌による有機リン殺虫剤サリチオンのエステル加水分解および脱メチル化反応が本研究により明らかとなった。

培養液中に認められた分解生成物は、牛久土壌から単離されたほとんどのサリチオン分解菌が、サリチオンを脱メチル化、P-O-アリアルおよびP-O-アラルキル結合の開裂により分解したことを示している。サリチルアルコールのサリチル酸への酸化はいくつかの分解菌において認められたが、サリチル酸のカテコールへの酸化はいずれの分解菌においても認められなかったため、サリチルアルコールまたはサリチル酸が、単離された分解菌によるサリチオンの代謝における最終産物であった。最も高いサリチオンの分解活性を持つ Acinetobacter sp. (B-60)の培養液中においては多量の脱メチルサリチオンが認められたため、この菌の高い分解活性が高い脱メチル化活性に起因したことを推定した。比較的高い分解活性を示した Agrobacterium sp. (B-7, B-15およびB-17)の培養液中には他の細菌、放線菌および糸状菌と比較してより多くのサリチルアルコールおよびM-2が認められたため、これらの菌の高い分解活性がP-O-アリアルおよびP-O-アラルキル結合の開裂に対する高い活性に起因したことを推定した。

サリチオンの土壌中の分解試験(第3章)において認められた分解生成物に加え、微生物による分解試験において、サリチオンからサリチルアルコールにいたる中間代謝物としてM-1およびM-2を新しく検出・同定した。このことは、それらの代謝物が土壌中においては速やかに分解されるか、または土壌画分に吸着されるためであると考へた。また、土壌中においては¹⁴C-サリチオンの大部分が

$^{14}\text{CO}_2$ に無機化されたが、単離されたサリチオン分解菌はサリチオンをサリチルアルコールまたはサリチル酸にまでしか分解しなかった。微生物による芳香族化合物の代謝に関するこれまでの研究結果⁷²⁻⁷⁶⁾に基づくと、土壌中にはサリチルアルコールまたはサリチル酸を CO_2 にまで代謝する多くの微生物が存在していることが推定され、サリチオンが土壌中では多種類の微生物の働きにより CO_2 にまで無機化されたものと考えた。本研究の結果より、土壌微生物および土壌中（第3章）におけるサリチオンの予想分解経路をFig.4-4に示した。

単離した分解菌によるサリチオンの代謝・分解経路は以下の3点を除いて動物および植物における代謝経路²³⁾と同様であった。すなわち、1)微生物による代謝においてはサリチオンの P-0-アラルキル結合の解裂が第一段階の代謝経路の一つとして認められた、2)微生物による代謝においてはP=S からP=0 への酸化反応は認められなかった、3)サリチルアルコールは動物では尿中に排泄され、植物ではグルコースとの抱合を受けたのに対し、微生物ではサリチル酸にまで酸化された。

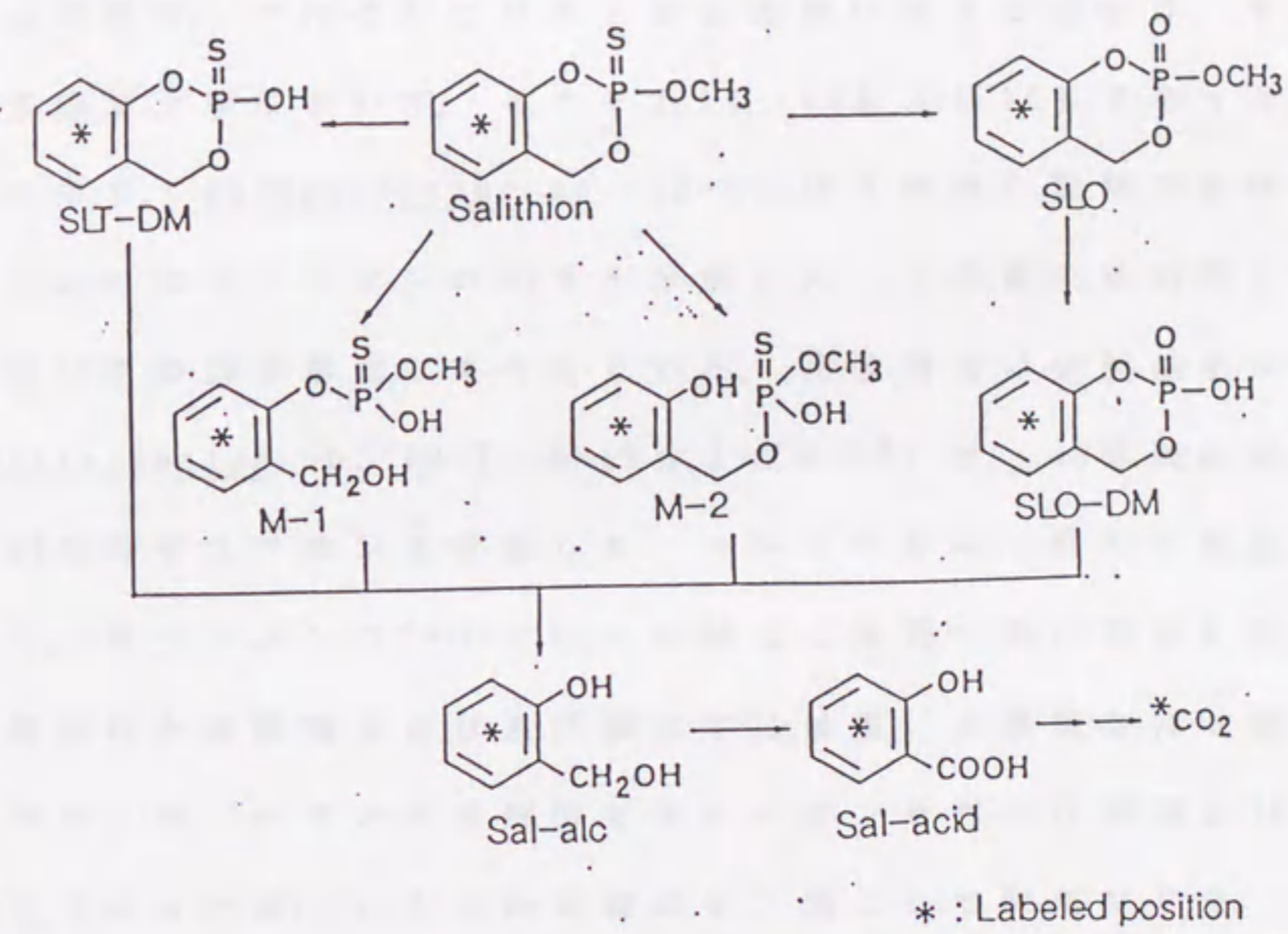


Fig. 4-4 Proposed degradation pathways of salithion by soil microorganisms and in soils.



第5節 要約

牛久畑地土壤中におけるサリチオンを分解する細菌，放線菌および糸状菌の，それぞれに対応する全菌数に対する割合は，サリチオン未添加土壌において，それぞれ14，44および16%であった。分解菌の中で，*Acinetobacter* sp. (B-60)は8時間の培養で液体培地中の10ppmのサリチオンの82%を分解した。この菌の高い脱メチル化活性がその高分解能に寄与していた。比較的高い分解能を示した *Agrobacterium* sp. (B-7, B-15およびB-17)は，48時間の培養で51~62%のサリチオンを分解した。これらの菌は，他の分解菌と比較して，サリチオンの P-O-アリール結合の開裂に高い活性を示した。単離された放線菌および糸状菌の中には高い分解能を持つ菌は存在しなかった。いずれの分解菌もサリチオンを単一炭素源として利用できなかったが，いくつかの菌はリン源として利用できた。土壌から単離された微生物によるサリチオンの最初の代謝反応は，脱メチル化， P-O-アリールおよび P-O-アラルキル結合の開裂であった。

第1節 はじめに

分子内に不斉リン原子をもつ有機リン系農薬は、その生物活性、毒性および代謝様式等において立体特異性をもつことがこれまでに多数報告されている²⁶⁻³⁰⁾。すなわち、立体選択的な殺虫^{33,101-107)}および除草活性^{108,109)}、哺乳動物に対する急性毒性^{103,104)}および鶏に対する遅延性神経毒性¹⁰⁷⁾、哺乳動物および昆虫における代謝^{105,106)}等が報告された。このように、光学的に活性な農薬は、農薬が標的とする病虫害や雑草のような生物に対する活性ばかりでなく、人間をも含めた非標的生物に対する毒性が光学異性体間において異なっていることが多いので、これらが使用される場合には、農薬の有効的な利用といった面からだけではなく、安全性評価の観点からも、それぞれの光学異性体の環境中における挙動について明らかにしておくことは重要である。しかし、これまでに光学活性な農薬について環境中における挙動を光学異性体間の違いに着目して比較研究した例はほとんど見あたらない。

ところで、サリチオンには不斉リン原子が分子内に存在するため、 $(R)_P$ 体および $(S)_P$ 体の光学異性体が存在する。S.-Y. Wuら³¹⁾およびHirashima & Eto³²⁾は、(+)体および(-)体サリチオンの絶対配置が $(R)_P$ および $(S)_P$ であることを示し(Fig. 5-1)、この結果に基づき、 $(S)_P$ 体サリチオンは $(R)_P$ 体サリチオンと比較して、イエバエに対して約2倍の殺虫活性を有することを明らかにした³³⁾。

第3章において、サリチオンは畑地土壤中において主に土壤微生物により速やかに分解されること明らかにしたが、本章では、サリ

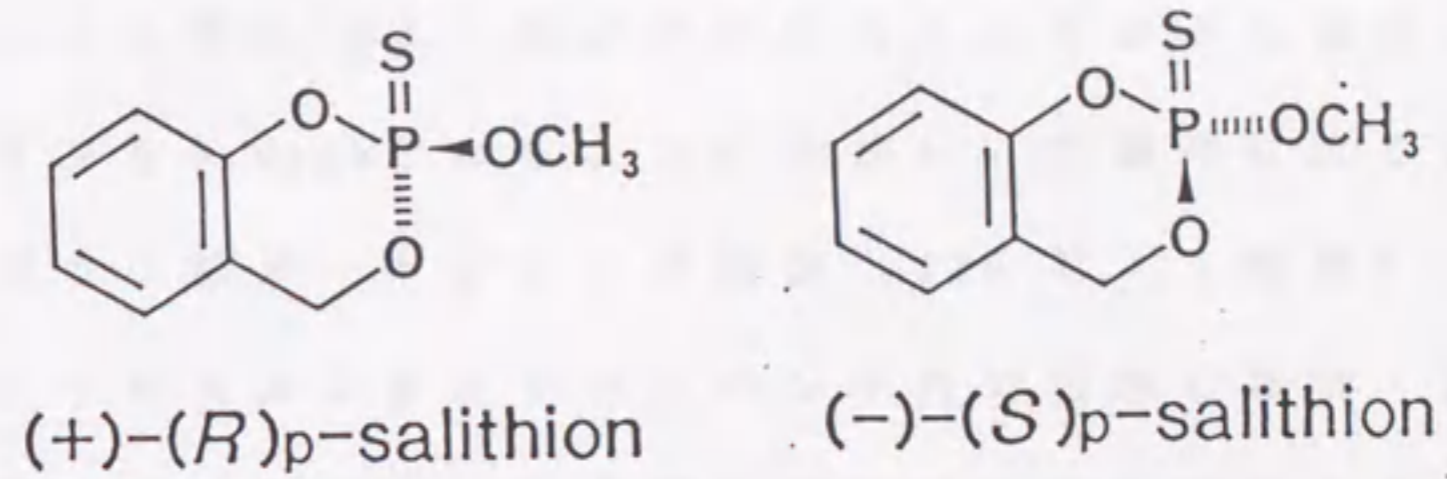


Fig. 5-1 Absolute configurations of the enantiomers of salithion.

チオン光学異性体が畑地土壤中において立体選択的に分解・消失することを明らかにした。第一の試験では、ラセミ体のサリチオンを添加した土壌から回収された親化合物の(R)_p/(S)_p比を光学活性カラムを用いたHPLCにより測定し、いずれの光学異性体が選択的に分解するのかを調べた。第二の試験では、(R)_p体と(S)_p体のサリチオンを別々に土壌に添加した後、それぞれの光学異性体の土壌中における分解挙動を比較した。

第2節 実験方法

第1項 供試土壌

第3章で用いた土壌と同じ、成因の異なる2種類の畑地土壌（茨城県牛久火山灰土壌および高知県野市鉢質土壌）を本実験に供試した。土壌は細かく砕き、生土のまま2mmの篩を通してから使用した。

第2項 ラセミ体サリチオンの土壌分解試験

50ml容ビーカーに乾土換算で30gの牛久および野市土壌をとり、蒸留水を加えて最大容水量の50%に調整した。25℃の暗所で2週間



Figure 1. Chemical structures of salicylic acid and its enantiomers.

Faint, illegible text on the left page, likely bleed-through from the reverse side of the paper.

保温静置した土壌に50 μ lのジメチルスルホキシドに溶解した¹⁴C-サリチオンを5.0ppmとなるように添加し、土壌中によく混合した。一方、隔日で2回オートクレーブ殺菌(120 $^{\circ}$ C, 1時間)した土壌にも¹⁴C-サリチオンをクリーンベンチ内で同様に添加・混合した。¹⁴C-サリチオンを添加した土壌を含むビーカーはアルミホイルで覆い、25 $^{\circ}$ Cの暗所で保温静置した。添加後1, 3, 7日目に¹⁴C-サリチオンを第3章に記載した方法に従い抽出した。得られた抽出液は放射能を定量した後、標品とのTLCコクロマトグラフィーにより分析した。さらに、抽出液中の¹⁴C-サリチオンは、クロロホルム/メタノール(9/1)を展開溶媒系としたTLC(Table 2-4)により精製し、その(R)_p/(S)_p比をHPLCにより測定した。

第3項 (R)_p体および(S)_p体サリチオンの土壌分解試験

HPLCにより分割した¹⁴C-サリチオンの(R)_p体および(S)_p体の光学異性体を、それぞれ非滅菌土壌と滅菌土壌にラセミ体サリチオンの場合と同様な方法により添加・混合し、非滅菌土壌の場合にはアルミホイルで遮光した3Lの褐色ビンの中に入れ、25 $^{\circ}$ Cで7日間保温静置した。試験期間中はCO₂を含まない空気を25~30ml/minで流し、ポリウレタンプラグと400mlの0.5N水酸化ナトリウム水溶液を入れた洗気ビンを通して¹⁴CO₂を含む気散性¹⁴Cをトラップした。滅菌土壌の場合にはアルミホイルで覆い、25 $^{\circ}$ Cの暗所で無菌的に保温・静置した。抽出画分、未抽出土壌残渣画分および揮散性¹⁴Cの分析は、第3章に記載した方法に従い実施した。土壌中におけるサリチオン光学異性体のエピマー化は、(R)_p体および(S)_p体サリチオンを添加した土壌から抽出したそれぞれの親化合物を前述した条件

による TLC により精製し、HPLC 分析を行うことにより調べた。

第 3 節 結果

第 1 項 土壌中における分解

ラセミ体の ^{14}C -サリチオン $[(\underline{\text{R}})_p / (\underline{\text{S}})_p = 46 / 54]$ を添加した土壌を畑地条件下で保温静置すると、 $(\underline{\text{R}})_p$ 体の割合が高いサリチオンが両土壌から回収された (Table 5-1)。牛久土壌および野市土壌の処理後 1 日目において、処理放射能量の 19.0% および 34.3% のサリチオンが回収され、それらの $(\underline{\text{R}})_p / (\underline{\text{S}})_p$ 比は、それぞれ、75 / 25 および 69 / 31 であった。同様な $(\underline{\text{R}})_p / (\underline{\text{S}})_p$ 比が 3 日目および 7 日目においても認められた。これに対し、滅菌土壌から回収されたサリチオンの $(\underline{\text{R}})_p / (\underline{\text{S}})_p$ 比は、試験期間中を通じて 44 / 56 ~ 47 / 53 と添加した ^{14}C -サリチオンの $(\underline{\text{R}})_p / (\underline{\text{S}})_p$ 比とほぼ同じ値を示した。添加した ^{14}C -サリチオン、滅菌および非滅菌の牛久土壌に添加後 1 日目に回収された ^{14}C -サリチオンの HPLC クロマトグラムを Fig. 5-2 に示す。

Table 5-1 Recovery and $(R)_P/(S)_P$ ratio of ^{14}C -salithion in Ushiku and Noichi soils under nonsterilized and sterilized upland conditions.^{a)}

	Days after application					
	Nonsterilized			Sterilized		
	1	3	7	1	3	7
Ushiku soil						
Recovery(%) ^{b)}	19.0	4.6	2.4	82.2	69.3	57.7
$(R)_P/(S)_P$ ratio	75/25	72/28	68/32	46/54	44/56	45/55
Noichi soil						
Recovery(%) ^{b)}	34.3	10.1	4.0	89.6	84.0	82.5
$(R)_P/(S)_P$ ratio	69/31	75/25	66/34	45/55	46/54	47/53

a) The $(R)_P/(S)_P$ ratio of applied ^{14}C -salithion was 46/54.

b) % of the applied ^{14}C .

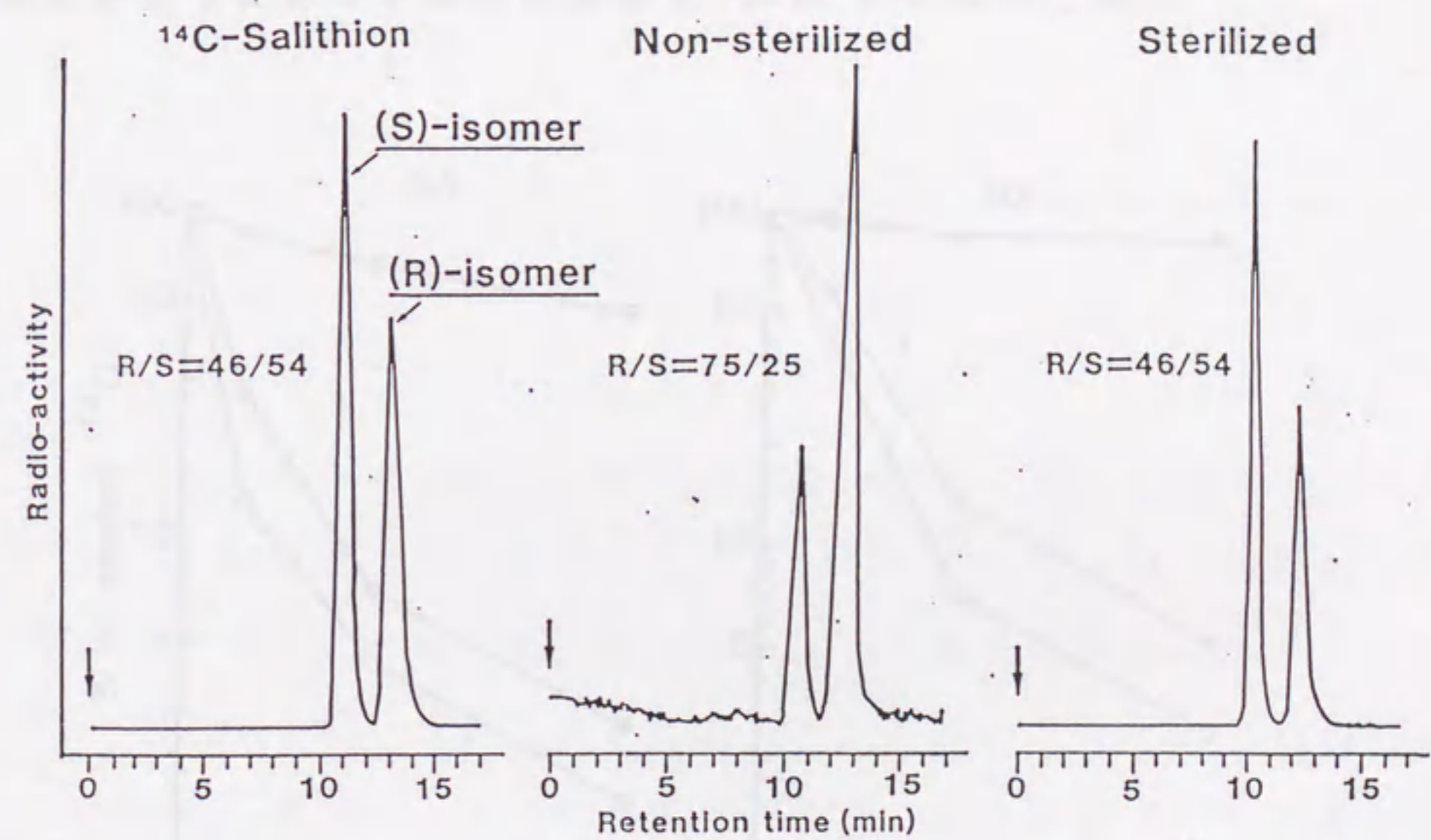


Fig. 5-2 HPLC chromatograms of salithion recovered from Ushiku soil at 1 day after application.

サリチオンの (R)_P体と (S)_P体を別々に添加すると, Fig.5-3 に示したように両土壌において (S)_P体が (R)_P体よりも速い速度で減少した. 牛久土壌の処理後1日目において検出された (R)_P体および (S)_P体のサリチオンはそれぞれ27.3%および12.8%であった. また, 野市土壌においてはそれぞれ57.3%および44.2%であった. サリチオンの両光学異性体の消失速度は滅菌土壌中において著しく抑制され, また, それらの消長は, 両異性体間で同様な傾向が認められた. 最小二乗法により推定したサリチオンの両光学異性体の滅菌および非滅菌条件下における消失半減期を Table 5-2 にまとめた.

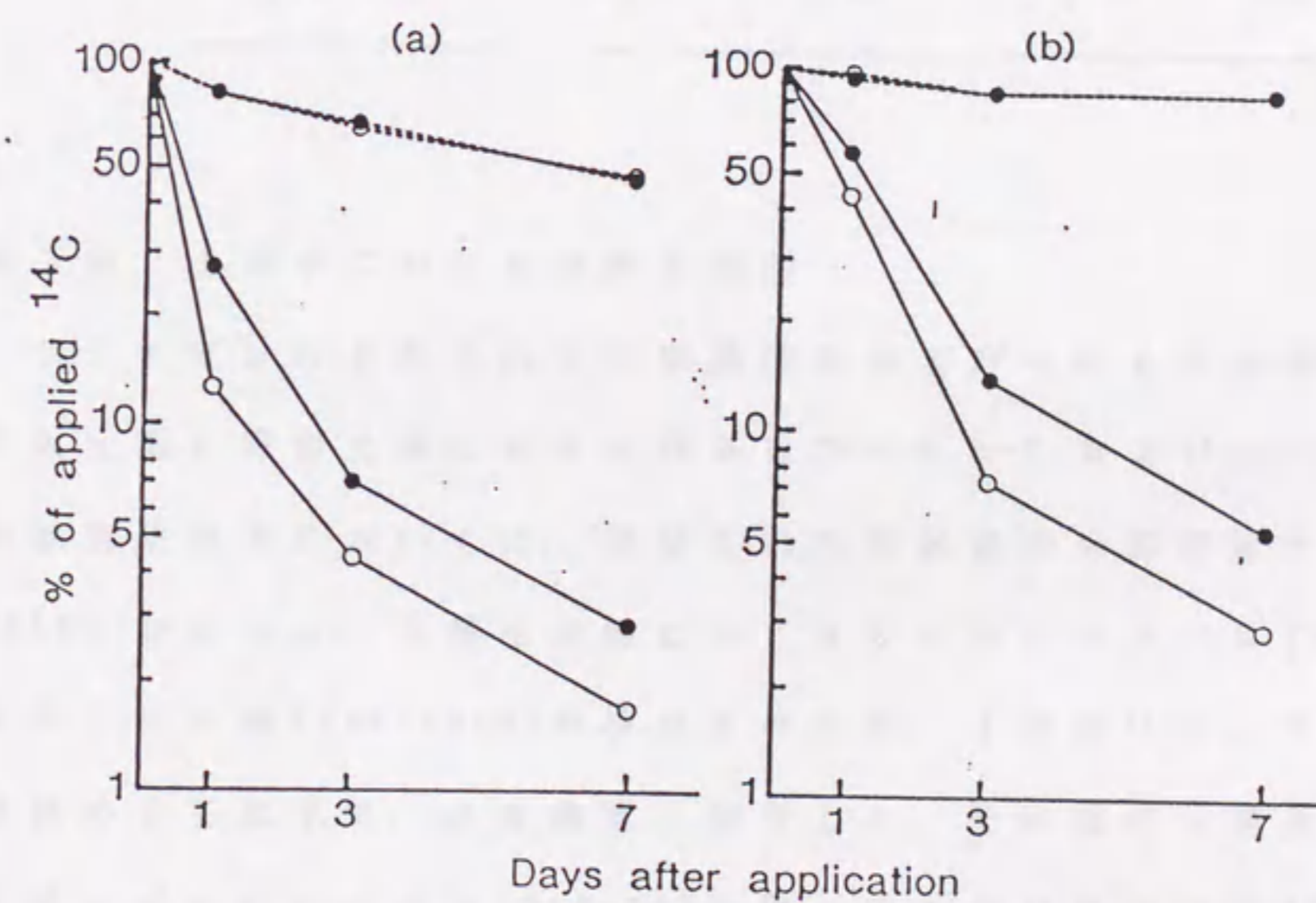


Fig. 5-3 Decline curves of the enantiomers of salithion in (a) Ushiku and (b) Noichi soils under non-sterilized and sterilized upland conditions.
 —, non-sterilized conditions; , sterilized conditions;
 ●, (R)_P-enantiomer; ○, (S)_P-enantiomer.

Figure 5-1 and 5-2 (faint text) showing experimental results related to salithion degradation.

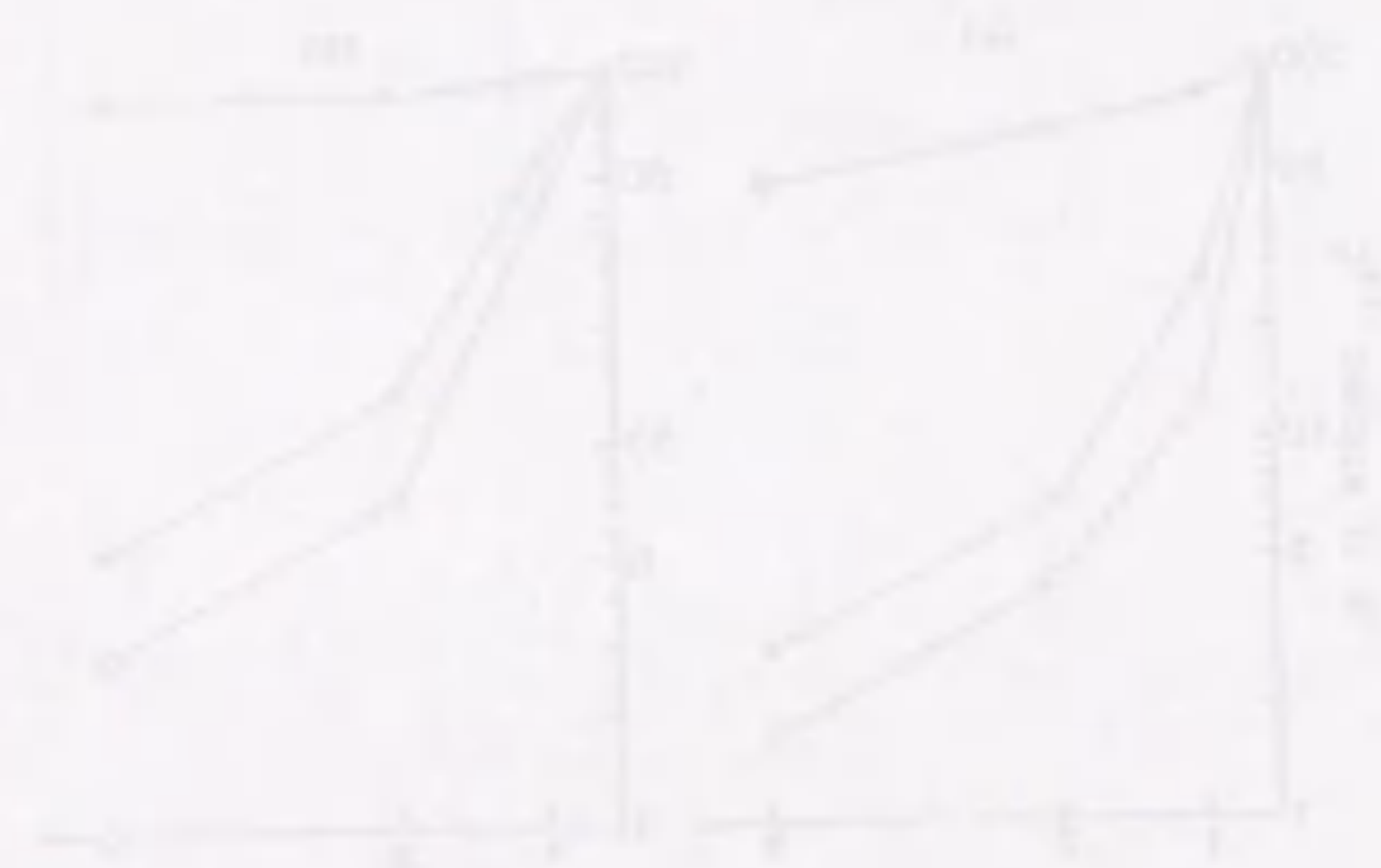


Table 5-2 Half-lives of the enantiomers of salithion under nonsterilized and sterilized upland conditions.

Compound	Half-life (days)			
	Nonsterilized		Sterilized	
	Ushiku	Noichi	Ushiku	Noichi
(<u>R</u>) _P -SLT	0.5	1.2	6.3	28
(<u>S</u>) _P -SLT	0.3	0.8	6.4	26

第 2 項 土壤中における分解生成物

サリチオンのそれぞれの光学異性体およびそれらの分解生成物の牛久土壤と野市土壤における消長を Table 5-3 および 5-4 に示す。非滅菌条件下においては、抽出された放射能の大部分はサリチオン (SLT) であった。分解生成物としてサリチルアルコール (Sal-alc) とサリチル酸 (Sal-acid) が検出されたが、1 日目においても処理放射能の 2% 以下で、以後急速に減少した。その他の分解生成物として脱メチルサリチオン (SLT-DM) と脱メチルサリオキソン (SLO-DM) が試験期間の初期にのみ検出された。7 日間の保温静置で、処理放射能の大部分は ¹⁴C₂ にまで無機化されるか、または未抽出土壤残渣を形成した。(R)_P 体と (S)_P 体の分解生成物を比較すると、分解の速い (S)_P 体を添加した土壤中においてより多量の未抽出土壤残渣が認

Table 5-3 Degradation of the enantiomers of ^{14}C -salithion in Ushiku soil under nonsterilized and sterilized upland conditions.

	% of the applied ^{14}C (days after application)											
	Nonsterilized conditions						Sterilized conditions					
	(R)p-enantiomer			(S)p-enantiomer			(R)p-enantiomer			(S)p-enantiomer		
	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7
Volatile ^{14}C												
$^{14}\text{CO}_2$	3.0	9.4	14.3	3.7	9.7	14.8	— a)	—	—	—	—	—
Others	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	—	—	—	—	—	—
Extractable ^{14}C												
SLT	29.8	7.9	3.2	16.0	5.4	2.0	82.4	68.8	51.1	82.6	67.0	51.4
SLT-DM	27.3	7.2	2.9	12.8	4.4	1.7	81.6	66.9	46.9	81.9	65.0	47.8
SLO-DM	<0.1	nd ^{b)}	nd	<0.1	nd	nd	nd	<0.1	<0.1	nd	<0.1	<0.1
Sal-alc	0.1	<0.1	nd	0.1	<0.1	nd	nd	nd	<0.1	nd	nd	<0.1
Sal-acid	1.1	0.2	0.1	0.9	0.2	0.1	0.5	1.7	3.6	0.6	1.7	3.1
Others	0.6	0.1	<0.1	1.2	0.2	<0.1	0.2	nd	0.3	nd	nd	0.2
	0.7	0.4	0.2	1.0	0.6	0.2	0.1	0.2	0.3	0.1	0.3	0.3
Bound ^{14}C	62.2	75.2	73.3	72.8	77.6	75.6	16.5	29.2	45.1	14.9	27.3	41.5
Total ^{14}C	95.0	92.5	90.8	92.5	92.7	92.4	98.9	98.0	96.2	97.5	94.3	92.9

a) Not tested.

b) Not detected.

Table 5-4 Degradation of the enantiomers of ¹⁴C-salithion in Noichi soil under nonsterilized and sterilized upland conditions.

	% of the applied ¹⁴ C (days after application)											
	Nonsterilized conditions						Sterilized conditions					
	(R) _p -enantiomer			(S) _p -enantiomer			(R) _p -enantiomer			(S) _p -enantiomer		
	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7
Volatile ¹⁴ C	7.6	18.7	23.5	9.4	18.8	22.5	— ^{a)}	—	—	—	—	—
¹⁴ CO ₂	7.6	18.7	23.5	9.4	18.8	22.5	—	—	—	—	—	—
Others	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	—	—	—	—	—	—
Extractable ¹⁴ C	61.3	16.2	5.9	49.9	9.0	3.6	93.3	86.2	86.6	96.2	86.5	86.4
SLT	57.3	14.3	5.3	44.2	7.4	2.9	92.8	84.7	83.8	95.7	85.2	83.5
SLT-DM	0.2	0.1	nd ^{b)}	0.4	nd	nd	0.1	0.4	0.7	0.1	0.3	0.8
SLO-DM	0.4	0.1	0.1	0.6	0.1	nd	<0.1	nd	0.1	<0.1	nd	0.1
Sal-alc	1.6	0.5	0.1	2.0	0.4	0.2	0.2	0.5	0.9	0.2	0.5	0.9
Sal-acid	0.9	0.3	0.1	1.2	0.2	0.1	nd	nd	0.1	nd	nd	0.2
Others	0.9	0.9	0.3	1.5	0.9	0.4	0.2	0.6	1.0	0.2	0.5	0.9
Bound ¹⁴ C	27.3	63.0	64.2	37.2	67.5	68.5	3.9	7.4	9.8	3.1	5.4	9.8
Total ¹⁴ C	96.2	97.9	93.6	96.5	95.3	94.6	97.2	93.6	96.4	99.3	91.9	96.2

a) Not tested.

b) Not detected.

められたが、他の抽出された分解生成物は量が少なかったためほとんど差が認められなかった。

滅菌土壌中において、サリチオンは主に未抽出土壌残渣の形成により減少し、未抽出土壌残渣は7日目の保温静置で、牛久土壌および野市土壌において、それぞれ41.5~45.1%および9.8%に達した。また、脱メチルサリチオンが野市土壌において、サリチルアルコールが両土壌において経時的に増加し、7日間でそれぞれ0.7~0.8%および0.9~3.6%に達した。滅菌土壌中におけるそれらの分解生成物の割合は両異性体間においてほとんど差はなかった。

第3項 土壌中におけるエピマー化

サリチオンの(S)_p体および(R)_p体を個々に添加した土壌から、それぞれの光学異性体である(R)_p体および(S)_p体は検出されなかったことから、両土壌中におけるサリチオンの両異性体のエピマー化は起こらなかったことが示された。

第4節 考察

サリチオンの両光学異性体の土壌中における分解速度を比較すると、(S)_p体が(R)_p体よりも1.5~1.7倍の速さで分解した(Table 5-2)。いずれの光学異性体を添加した土壌中においても分解生成物として、サリチルアルコール、脱メチルサリチオンおよび脱メチルサリオキソンが検出されたことから、サリチオンの両光学異性体はP=0-アールおよびP=0-アラルキル結合の開裂、脱メチル化およびP=SからP=0への酸化により分解したことが認められたが、検出された各分解生成物の量が非常に少なく、また、短時間で消失したた

め、いずれの分解経路における分解速度の差が原因で、土壌中における光学異性体間の分解速度に差が生じたかについては明確にならなかった。より速かに分解した(S)_p体を添加した土壌では、より多くの未抽出土壌残渣が生成したことから、分解されたサリチオンは、速やかに未抽出土壌残渣を形成したことが示唆された。

滅菌条件下における農薬の変換は非生物的反応と考えられるが、サリチオンは滅菌土壌中において、サリチルアルコールや脱メチルサリチオンに変換されたり、未抽出土壌残渣を形成した。これらの反応が両光学異性体間で同様に進行したので、滅菌土壌中におけるP-O-アールおよびP-O-アラルキル結合の開裂、脱メチル化および未抽出土壌残渣¹⁴Cの形成は、非立体選択的な化学反応であると推定した。非滅菌土壌中で認められたサリチオン光学異性体間の分解速度の差が滅菌土壌中では認められず、また、両光学異性体のエピマー化が土壌中では起こらなかったことから、分解速度における光学異性体間の差は、土壌中のサリチオン分解菌がサリチオンを分解する際の立体選択性に起因したものと推定した。

サリチオンは主に土壌微生物により土壌中から速やかに分解・消失し、その際、2種類の土壌において(S)_p体が(R)_p体よりも速やかに分解した。この結果から、サリチオン分解菌が土壌中に広く分布し、それらはサリチオンを分解する際に(S)_p体をより速く分解するという立体選択性をもっていることが示唆される。しかし、土壌中には多種類のサリチオン分解菌が存在し、それらの分解活性や、分解様式および分解における立体選択性が微生物種により異なり、それらが環境条件にも影響される可能性についても考慮する必要がある。さらには、土壌による吸脱着などのサリチオンの消長に影響す

る土壌の性質が立体選択性に関係している可能性も考えられる。

土壌中の農薬の分解における光学選択性については、これまでにほとんど報告されていない。Miyamoto & Mikami¹¹⁰⁾ はピレスロイド系殺虫剤の土壌中における立体選択的な加水分解について検討し、シベルメトリン [(RS)- α -cyano-3-phenoxybenzyl(1RS)-cis, trans-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate], デルタメトリン [(S)- α -cyano-3-phenoxybenzyl(1R)-cis-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate] およびフェンバレレート [α -cyano-3-phenoxybenzyl 2-(4-chlorophenyl)-3-methylbutyrate] の消失速度は、光学異性体間において約2倍の差があることを報告した。また、Bewick¹¹¹⁾ および Wink & Luley¹¹²⁾ は、フェニルプロピオン酸系除草剤 fluazifop-butyl [butyl-(RS)-2-(4-(5-trifluoromethyl-2-pyridyloxy) phenoxy) propionate], diclofop-methyl [methyl-(RS)-2-(4-(2,4-dichlorophenoxy) phenoxy) propionate] および fenoxaprop-ethyl [ethyl-(RS)-2-(4-(6-chlorobenzoxazol-2-yloxy)-phenoxy) propionate] の土壌中におけるそれぞれの加水分解生成物である fluazifop, diclofop および fenoxaprop が光学選択的にエピマー化することを報告した。これらの報告でも、土壌中における立体選択的な光学異性体の挙動には土壌微生物が大きく関与していることが示唆されている。

土壌から単離したサリチオン分解菌がサリチオンを分解する際の立体選択性については第7章に、また、サリチオン光学異性体の土壌との吸脱着については第6章に述べる。

第5節 要約

フェニル環の炭素を ^{14}C で標識したラセミ体、 $(\underline{\text{R}})_p$ 体および $(\underline{\text{S}})_p$ 体のサリチオンを用いて、2種類の畑地土壤中における分解について光学異性体間で比較した。ラセミ体のサリチオン $[(\underline{\text{R}})_p / (\underline{\text{S}})_p = 46 / 54]$ を土壤に添加し、畑地条件下で保温静置すると、 $(\underline{\text{R}})_p$ 体の割合が高いサリチオン $[(\underline{\text{R}})_p / (\underline{\text{S}})_p = 75 / 25 \sim 69 / 31]$ が両土壤から回収された。これに対し、滅菌土壤から回収されたサリチオンはラセミ体 $[(\underline{\text{R}})_p / (\underline{\text{S}})_p = 46 / 54]$ であった。 $(\underline{\text{R}})_p$ 体と $(\underline{\text{S}})_p$ 体を個々に添加すると、 $(\underline{\text{S}})_p$ 体が $(\underline{\text{R}})_p$ 体と比較して1.5～1.7倍の速さで分解し、 $(\underline{\text{S}})_p$ 体を添加した土壤に、より多量の未抽出土壤残渣 ^{14}C が認められた。分解生成物として、サリチルアルコール、脱メチルサリチオンおよび脱メチルサリオキソンが検出されたことから、サリチオンの両光学異性体は $\underline{\text{P}}-\underline{\text{O}}$ -アリアルおよび $\underline{\text{P}}-\underline{\text{O}}$ -アラルキル結合の開裂、脱メチル化および $\text{P}=\text{S}$ から $\text{P}=\text{O}$ への酸化により分解したことが認められたが、検出された各分解生成物の量が非常に少なく、また、短時間で消失したため、いずれの分解経路における分解速度の差が原因で、土壤中における光学異性体間の分解速度に差が生じたかについては明確にならなかった。非滅菌土壤中では認められたサリチオン光学異性体間の分解速度の差が滅菌土壤中では認められず、また、両光学異性体のエピマー化が土壤中では起こらなかったことから、分解速度における差は、土壤中のサリチオン分解菌がサリチオンを分解する際の立体選択性に起因したものであることが示唆された。