

## 第6章 サリチオン光学異性体の土壌との吸脱着

### 第1節 はじめに

第5章では、サリチオンが2種類の畑地土壌中において立体選択的に分解することを明らかにした。その際、サリチオンの両光学異性体は土壌中で異性化されず、また、土壌を滅菌するとサリチオン光学異性体間の分解速度の差がなくなったことから、分解速度における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であると推定した。

もう1つの要因として、サリチオンの土壌との吸脱着に立体選択性がある可能性が考えられた。土壌に吸着された農薬は微生物による分解を受けにくくなるため、土壌との吸脱着の過程において光学異性体間で差があれば、分解速度にも差が生じることになる。

有機化合物の吸脱着反応は純粋な化学平衡であるため、吸着体の立体構造に光学異性がない限り光学異性体間で差が生じることはない。しかし、土壌との吸脱着を考えると、多くの農薬は有機物含量が大きい土壌ほどよく吸着すること<sup>8, 13, 59, 62-71)</sup>、また、土壌有機物は糖やアミノ酸など天然の光学活性な有機物を構成成分として<sup>57, 113, 114)</sup>いることから、光学活性な農薬の土壌との吸脱着過程が立体選択的である可能性も否定できない。

本章では、ラセミ体、(R)<sub>p</sub>体および(S)<sub>p</sub>体サリチオンの牛久および野市土壌との吸脱着過程を比較し、それらの過程における立体選択性について検討した。

## 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）を供試した。土壌は細かく碎き，生土のまま2mmの篩を通して使用した。

### 第2項 土壌への吸着試験

50ml容ガラス性遠心管に乾土換算で1gの牛久および野市土壌をとり，ラセミ体，(R)<sub>p</sub>体および(S)<sub>p</sub>体の<sup>14</sup>C-サリチオンの0.1ppm水溶液を，それぞれ個別に10mlずつ加え，ガラス栓をして室温で振とうした。0.5，1，2，4および6時間後に3000rpmで10分間遠心分離をして土壌を沈降させた後，上澄液の200μlをLSC分析に供した。土壌への吸着量は，添加した放射エネルギーから上澄液の放射エネルギーを差し引くことにより求めた。

### 第3項 土壌からの脱着試験

50ml容ガラス性遠心管に乾土換算で1gの牛久および野市土壌をとり，ラセミ体，(R)<sub>p</sub>体および(S)<sub>p</sub>体の<sup>14</sup>C-サリチオンの0.1ppm水溶液を，それぞれ個別に10mlずつ加え，ガラス栓をして室温で6時間振とうした。その後，3000rpmで10分間遠心分離をして土壌を沈降させたのち，上澄液の200μlをLSC分析に供した。さらに上澄液を5mlとり，そこに新たに蒸留水を5ml加え，ガラス栓をして室温で振とうした。0.5，1および2時間後に3000rpmで10分間遠心分離をして土壌を沈降させ，上澄液の200μlをLSC分析に供した。

### 第3節 結果

ラセミ体, (R)<sub>P</sub>体および(S)<sub>P</sub>体のサリチオンの牛久および野市土壌への吸着と脱着割合の経時変化をFig. 6-1および6-2に示す。牛久土壌では, 振とう時間の経過にともない土壌への吸着量が増加し, 6時間後には添加した放射能の52.6~53.9%に達した。これに対し野市土壌では, 牛久土壌と比較すると土壌への吸着割合はやや低く, 添加した放射能の39.8~41.5%が6時間で吸着した。

両土壌への吸着量およびその経時変化にサリチオンのラセミ体および光学異性体間で大きな差はなく同様な挙動をとることが認められた。

サリチオンを土壌に吸着させた後, 上澄液の一部を蒸留水と入れ換えると, サリチオンは速やかに土壌から脱着した。牛久土壌では30分間の振とうでほぼ平衡に達し, 吸着したサリチオンの7.9~10.8%が土壌から脱着した。野市土壌でも振とう30分間で平衡となり, 9.6~10.9%のサリチオンが脱着した。吸着割合とは異なり, 脱着割合は両土壌で同様な値となった。両土壌からの脱着量およびその経時変化においてもサリチオンのラセミ体および光学異性体間で大きな差はなく同様な挙動をとることが認められた。

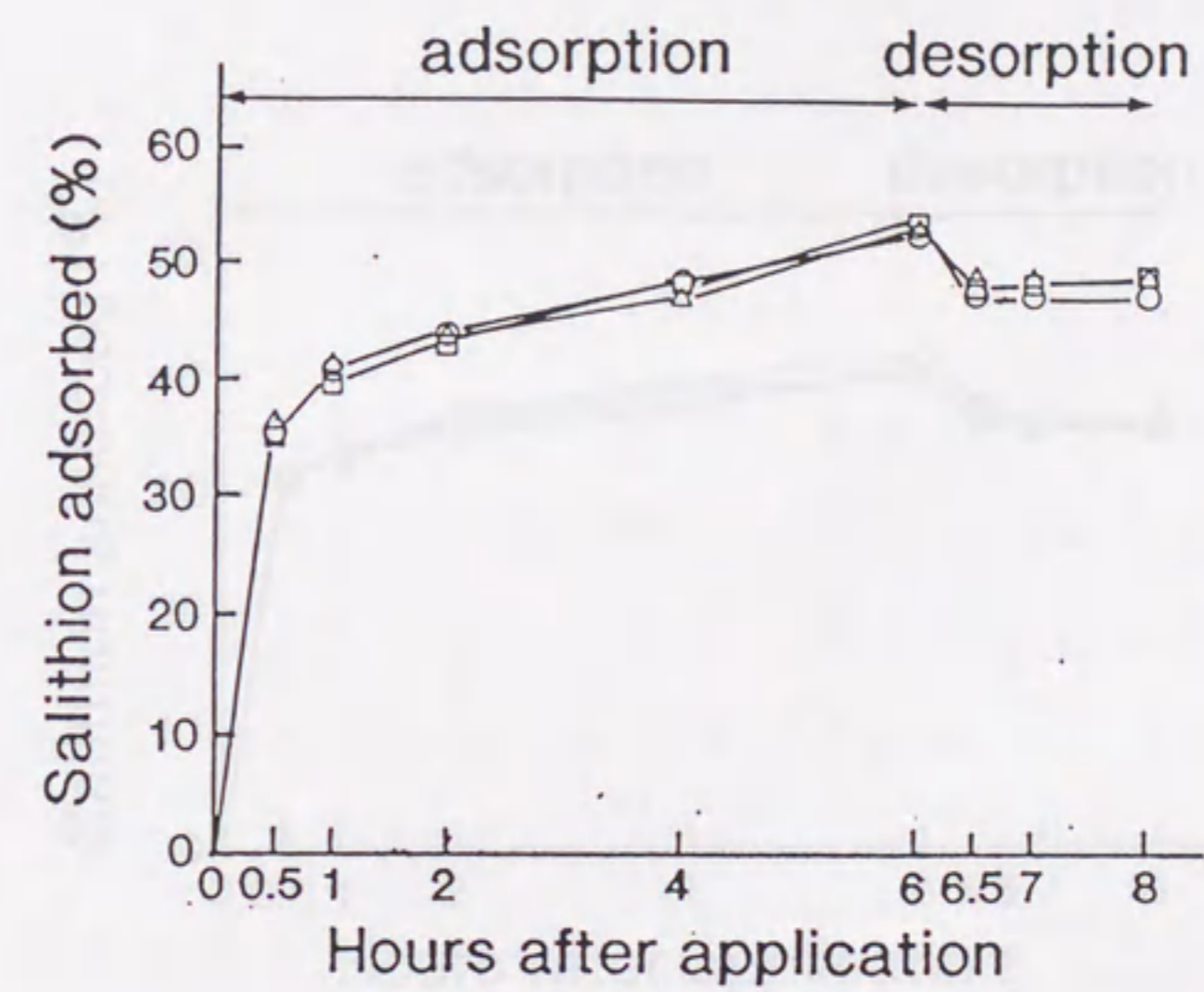


Fig. 6-1 Adsorption and desorption of salithion enantiomer in water-soil suspension systems with Ushiku soil.

- - : (R)p-salithion
- - : (S)p-salithion
- △ - : (RS)p-salithion

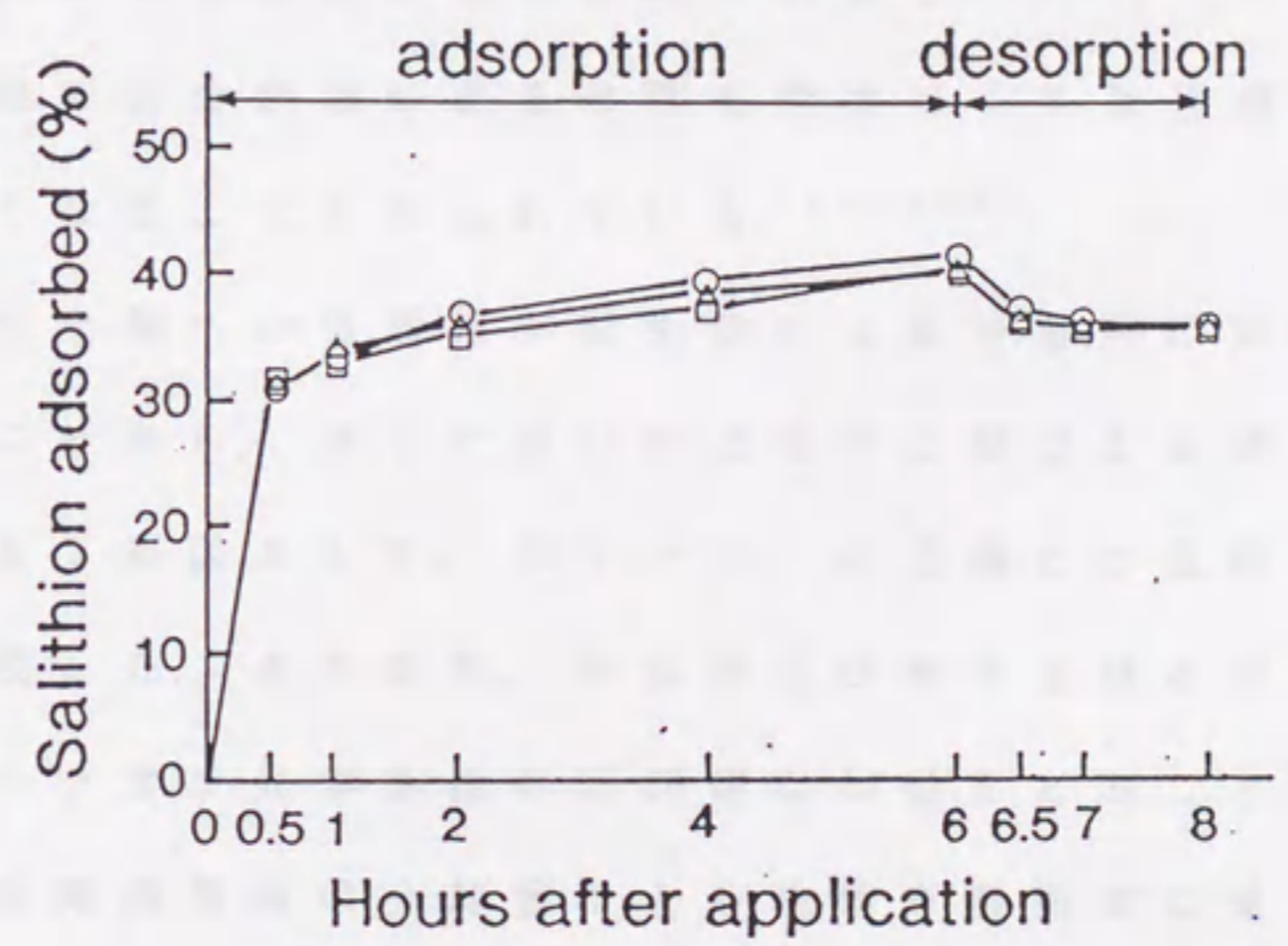
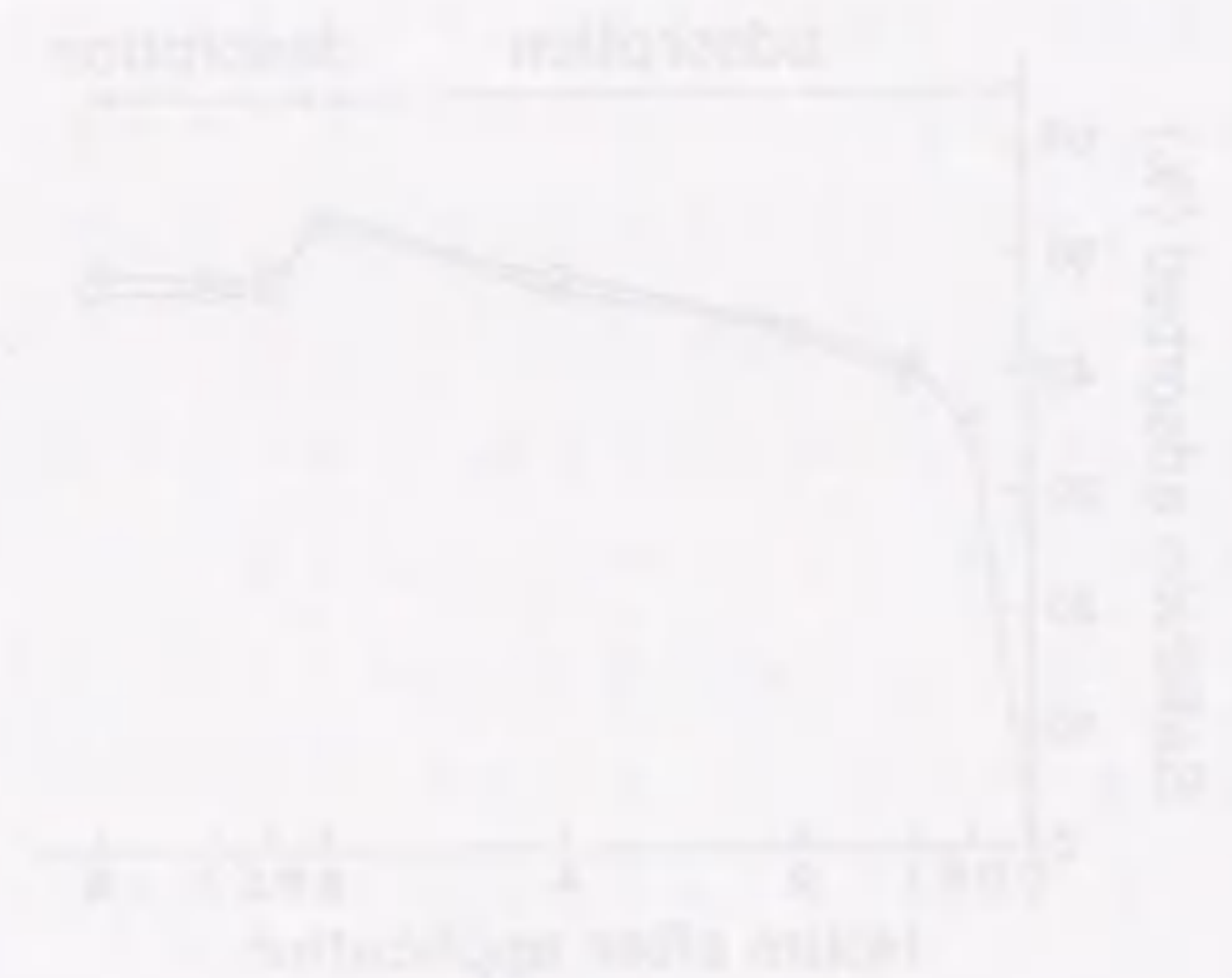


Fig. 6-2 Adsorption and desorption of salithion enantiomer in water-soil suspension systems with Noichi soil.

- - : (R)p-salithion
- - : (S)p-salithion
- △ - : (RS)p-salithion

#### 第4節 考察

農薬の土壌との吸脱着は、農薬の土壌中での移行性、特に土壌水の移動にともなう下方への移動に大きく影響しているため、これまでによく研究されている<sup>8,13,59,64-70,115</sup>。また、農薬の土壌との吸脱着は、農薬と生物との相互作用の点においても重要な因子である。すなわち、農薬の土壌吸着が大きいと生物との相互作用が低下する。例えば、多くの除草剤の殺草活性が土壌の吸着性に大きく影響されることは多数報告されているし<sup>65,68,116</sup>、土壌吸着が大きい土壌では分解菌による攻撃を受けにくくなり残留性および残効性が高くなることも知られている<sup>117-119</sup>。

農薬の土壌への吸着性が微生物による分解性に少なからず影響を及ぼすことから、サリチオンの土壌中における立体選択的分解の考えられる1要因として、サリチオンの土壌との吸脱着を光学異性体間で比較した。その結果、牛久および野市土壌との吸脱着過程においてサリチオン光学異性体は同様な挙動をとることが明らかとなり、土壌中の両異性体は分解菌による攻撃を同程度に受けることが推定された。以上のことから、サリチオン光学異性体の土壌中における分解速度の差の原因は光学異性体の土壌との吸脱着過程の違いにあるのではなく、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ていることが支持された。

サリチオンの吸着を土壌間で比較すると、牛久土壌により多くのサリチオンが吸着し、この傾向は土壌中での分解試験(第3章)における土壌への吸着性とよく一致した。これは第3章で考察したように、火山灰土壌である牛久土壌の物理化学的特性、すなわち、構成成分であるアロフェンによる有機物やリン酸の高い吸着能<sup>8,57-</sup>

Figure 10-10

Figure 10-11

Figure 10-12

Figure 10-13

Figure 10-14

Figure 10-15

Figure 10-16

Figure 10-17

Figure 10-18

Figure 10-19

Figure 10-20

Figure 10-21

Figure 10-22

Figure 10-23

Figure 10-24

Figure 10-25

Figure 10-26

Figure 10-27

Figure 10-28

Figure 10-29

Figure 10-30

Figure 10-31

Figure 10-32

Figure 10-33

Figure 10-34

Figure 10-35

Figure 10-36

Figure 10-37

Figure 10-38

Figure 10-39

Figure 10-40

Figure 10-41

Figure 10-42

Figure 10-43

Figure 10-44

Figure 10-45

Figure 10-46

Figure 10-47

Figure 10-48

Figure 10-49

Figure 10-50

Figure 10-51

Figure 10-52

Figure 10-53

Figure 10-54

Figure 10-55

Figure 10-56

Figure 10-57

Figure 10-58

Figure 10-59

Figure 10-60

Figure 10-61

Figure 10-62

Figure 10-63

Figure 10-64

Figure 10-65

Figure 10-66

Figure 10-67

Figure 10-68

Figure 10-69

Figure 10-70

Figure 10-71

Figure 10-72

Figure 10-73

Figure 10-74

Figure 10-75

Figure 10-76

Figure 10-77

Figure 10-78

Figure 10-79

Figure 10-80

Figure 10-81

Figure 10-82

Figure 10-83

Figure 10-84

Figure 10-85

Figure 10-86

Figure 10-87

Figure 10-88

Figure 10-89

Figure 10-90

Figure 10-91

Figure 10-92

Figure 10-93

Figure 10-94

Figure 10-95

Figure 10-96

Figure 10-97

Figure 10-98

Figure 10-99

Figure 10-100

61) に起因したものと推定した。

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章に述べる。

#### 第5節 要約

$^{14}\text{C}$ でフェニル環を標識したサリチオンのラセミ体、 $(R)_P$ 体および $(S)_P$ 体を用いて、牛久および野市土壌との吸着および脱着過程を光学異性体間で比較した。土壌1gに10mlの0.1ppmサリチオン水溶液を加え振とうすると、牛久土壌には6時間で52.6~53.9%のサリチオンが吸着した。これに対し、野市土壌に吸着したサリチオンは39.8~41.5%であった。同様にして6時間の振とうでサリチオンを吸着させた土壌から蒸留水でサリチオンを脱着させると、牛久土壌からは30分間の振とうで吸着したサリチオンの7.9~10.8%が脱着した。また、野市土壌からは9.6~10.9%のサリチオンが脱着した。サリチオンのラセミ体および光学異性体の牛久および野市土壌への吸着量、両土壌からの脱着量およびそれらの経時変化に大きな差はなかった。



第7章 土壌から単離した Agrobacterium sp. および Acinetobacter sp. によるサリチオンの立体選択的代謝・分解<sup>120)</sup>

第1節 はじめに

サリチオンは畑地土壌中において主に土壌微生物の影響により、脱メチル化、P-O-アリアルおよびP-O-アラルキル結合の解裂、および  $P=S$  の  $P=O$  への酸化を経てすみやかに  $CO_2$  にまで分解した(第3章)。また、その際サリチオンの (S)<sub>P</sub> 体が、(R)<sub>P</sub> 体よりも 1.5~1.7 倍速く分解・消失した(第5章)。滅菌土壌中においてはサリチオンの分解が大きく抑制され、また、両光学異性体が同様な代謝挙動を示したことから、土壌中におけるサリチオンの立体選択的分解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選択性に起因することが示唆された。もう1つの要因として、サリチオン光学異性体の土壌との吸脱着が立体選択的であるために土壌中での分解に差が生じる可能性も考えられたが、サリチオンの土壌との吸脱着過程が光学異性体間で差がないことが明らかとなり、サリチオンの立体選択的分解の原因が分解菌の代謝における立体選択性起因することが示唆された(第6章)。

第4章では、サリチオン未添加土壌から単離した細菌、放線菌および糸状菌の14~44%がサリチオンを分解することを明らかにし、それらの分解菌の中で高いサリチオン分解能を持つ4株の細菌を Agrobacterium sp. (B-7, B-15およびB-17) および Acinetobacter sp. (B-60) と同定した。

本章では、これらの4株の分解菌によるサリチオンの (R)<sub>P</sub> 体および (S)<sub>P</sub> 体の代謝速度および代謝経路を比較することにより、それら

の分解菌によるサリチオンの立体選択的な代謝様式を明らかにした。

## 第2節 実験方法

### 第1項 供試微生物

牛久畑地土壌から単離した、サリチオンの高い分解活性を持つ3株の *Agrobacterium* sp. (B-7, B-15 および B-17) と1株の *Acinetobacter* sp. (B-60) を本実験に供試した。それぞれの菌株は、1/10希釈 Nutrient Agar (Difco) の斜面培地に 4°C で保存した。

### 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 6 ml の 1/10 希釈 Nutrient Broth (Difco) に接種し、試験管中 30°C で一昼夜振とう培養した。その後、培養液を 3 ml ずつ 2 本の試験管に分注し、10  $\mu$ l のジメチルスルホキシドに溶解した  $^{14}\text{C}$ -(R)<sub>p</sub> 体および (S)<sub>p</sub> 体サリチオンをそれぞれ 10 ppm 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  $^{14}\text{C}$ -(R)<sub>p</sub> 体および (S)<sub>p</sub> 体サリチオンを同様に添加し、対照区として培養を行った。化合物を添加後、0, 4, 8, 24, 48 および 72 時間後に培養液の一部 (10  $\mu$ l) を直接 LSC および標品との TLC コクロマトグラフィーにより分析した。培養液中におけるサリチオン光学異性体のエピマー化は、(R)<sub>p</sub> 体および (S)<sub>p</sub> 体サリチオンを添加した培地から抽出したそれぞれの親化合物をクロロホルム/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、HPLC 分析を行うことにより調べた。

第3節 結果

第1項 微生物による代謝・分解

それぞれの菌株を接種した培養液中におけるサリチオンの消失曲線を Fig. 7-1 に示す。2株の *Agrobacterium* sp. (B-7および B-17) は (S)<sub>P</sub>体サリチオンを (R)<sub>P</sub>体よりも速く分解した。72時間の培養の後、B-7を接種した培養液中において検出された (R)<sub>P</sub>体および (S)<sub>P</sub>体サリチオンはそれぞれ65.1および28.1%であった。また、B-17を接種した培養液中においてはそれぞれ48.9および17.3%であった。*Agrobacterium* sp. (B-15) は、72時間の培養で、

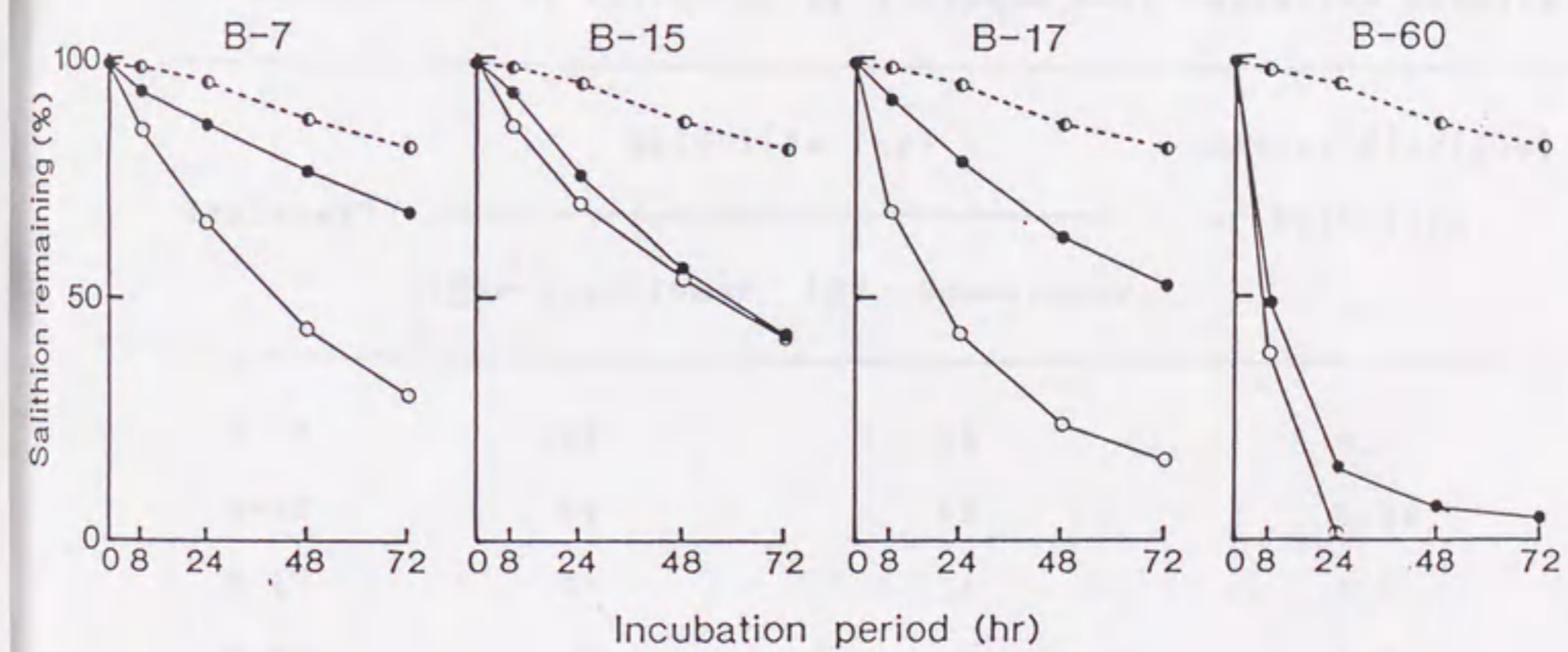


Fig. 7-1 Degradation of the enantiomers of salithion by isolated soil bacterial strains. B-7, B-15, and B-17 were *Agrobacterium* sp., and B-60 was *Acinetobacter* sp.

- , degradation in inoculated cultures;
- ....., control without inoculation.
- , (R)<sub>P</sub>-enantiomer; ○, (S)<sub>P</sub>-enantiomer;
- ⊙, (R)<sub>P</sub>- and (S)<sub>P</sub>-enantiomers.

サリチオンの両異性体をおよそ40%にまで同様な速度で代謝した。単離した細菌の中で最も高い分解能を持つ *Acinetobacter* sp. (B-60) は、両異性体を速やかに代謝したが、ほとんどの (S)<sub>P</sub>体サリチオンが24時間後には消失したのに対し、(R)<sub>P</sub>体は72時間後においても6.2%が検出された。分解菌を接種しない培養液中においては、両異性体は同様な速度で徐々に分解し、72時間後には82%に達した。最小二乗法により推定されたサリチオン両異性体の消失半減期とそれらの (R)<sub>P</sub>/<sub>(S)</sub><sub>P</sub>比を Table 7-1 にまとめた。

Table 7-1 Half-life and its ratio [<sub>(R)</sub><sub>P</sub>/<sub>(S)</sub><sub>P</sub>] in metabolism of the enantiomers of salithion by isolated soil bacterial strains.

Isolates <sup>a)</sup>	Half-life (hr)		Ratio[ <sub>(R)</sub> <sub>P</sub> / <sub>(S)</sub> <sub>P</sub> ] of half-life
	<u>(R)</u> <sub>P</sub> -enantiomer	<u>(S)</u> <sub>P</sub> -enantiomer	
B- 7	123	40	3.1
B-15	55	59	0.93
B-17	73	21	3.5
B-60	6	8	1.3

a) B-7, B-15, and B-17 were *Agrobacterium* sp., and B-60 was *Acinetobacter* sp.

第2項 代謝分解物

培地中におけるサリチオン (SLT) およびその分解生成物の割合を Table 7-2 ~ 7-6 に示す。分解生成物の脱メチルサリチオン (SLT-DM), サリチルアルコール (Sal-alc), サリチル酸 (Sal-acid), M-1, M-2, M-3 および M-4 は, 第4章に示した微生物によるサリチオンの代謝試験において認められたものと同様であった (Fig. 7-2)。M-1 および M-2 は, 第4章で同定したように, それぞれ, O-methyl O-(2-hydroxymethylphenyl) hydrogen phosphorothioate および O-methyl O-(2-hydroxybenzyl) hydrogen phosphorothioate であった。M-3 および M-4 は M-1 および M-2 よりも極性の高い未同定の代謝物であった。

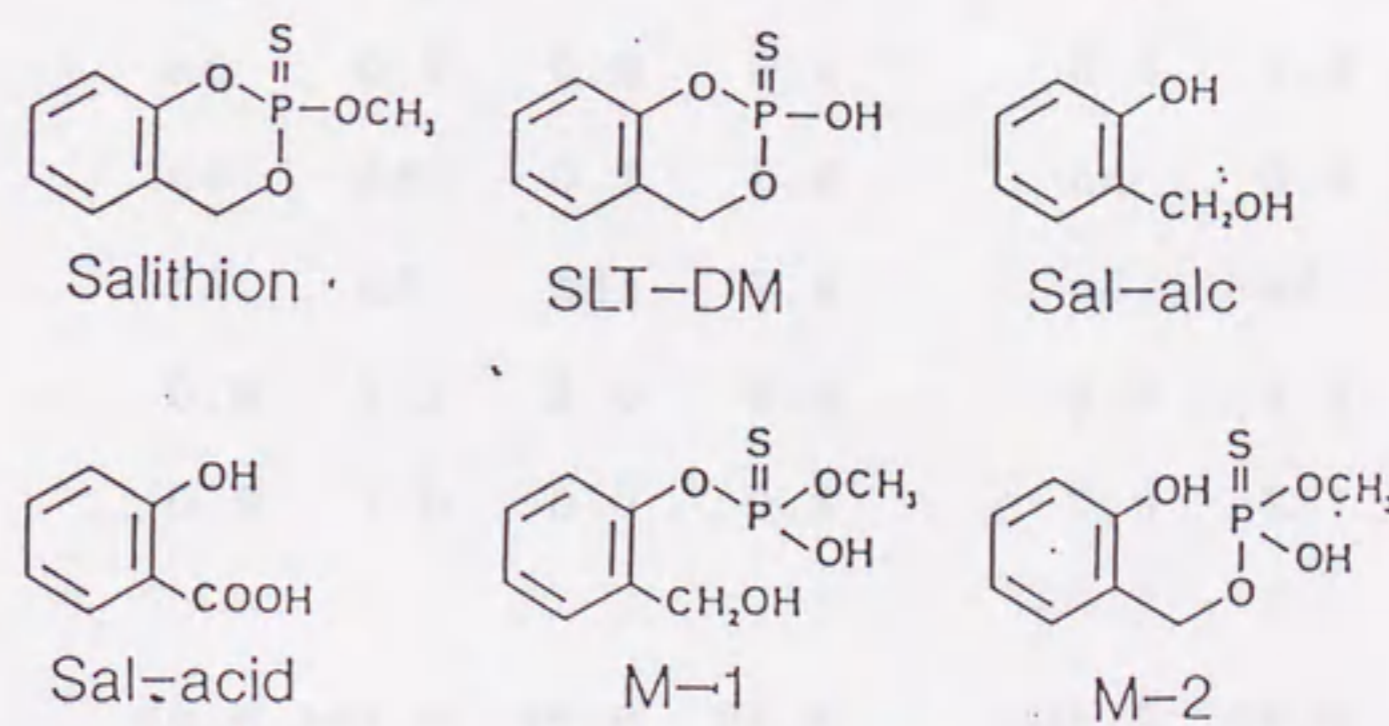


Fig. 7-2 Chemical structures of salithion and its metabolites.

Table 7-2 Degradation of the enantiomers of  $^{14}\text{C}$ -salithion by *Agrobacterium* sp. (B-7) isolated from Ushiku loam upland soil.

	% of the applied $^{14}\text{C}$ (hr after application)							
	<u>(R)</u> <sub>P</sub> -enantiomer				<u>(S)</u> <sub>P</sub> -enantiomer			
	4	8	24	72	4	8	24	72
SLT	95.6	94.4	84.1	65.1	93.0	81.8	62.2	28.1
SLT-DM	0.3	0.7	2.0	5.4	0.4	0.6	2.1	5.3
Sal-alc	2.0	4.0	5.1	8.4	3.0	4.8	10.7	20.0
Sal-acid	nd <sup>a)</sup>	nd	0.3	3.3	nd	0.6	1.1	3.9
M-1	nd	0.3	1.3	3.4	0.3	0.7	2.2	4.9
M-2	nd	0.2	0.5	2.1	0.4	1.0	2.5	7.1
M-3	nd	nd	0.5	1.0	nd	0.3	1.6	2.8
M-4	nd	nd	nd	0.4	nd	nd	1.1	2.2
Origin	0.8	1.2	2.0	6.2	3.5	4.3	8.3	17.0
Others	0.9	1.0	0.7	0.3	0.9	1.7	2.4	2.2
Total	99.6	101.8	96.5	95.6	101.5	95.8	94.2	93.5

a) Not detected.

Table 7-3 Degradation of the enantiomers of <sup>14</sup>C-salithion by *Agrobacterium* sp. (B-15) isolated from Ushiku loam upland soil.

	% of the applied <sup>14</sup> C (hr after application)							
	<u>(R)<sub>F</sub>-enantiomer</u>				<u>(S)<sub>F</sub>-enantiomer</u>			
	4	8	24	72	4	8	24	72
SLT	91.2	90.1	69.9	39.2	89.9	84.3	65.8	40.2
SLT-DM	0.6	0.7	2.0	4.8	nd <sup>a)</sup>	0.6	1.8	4.5
Sal-alc	1.6	2.7	8.2	17.4	3.4	5.3	11.1	16.6
Sal-acid	nd	nd	0.5	3.6	nd	0.3	0.9	4.3
M-1	0.2	0.5	1.3	2.8	nd	0.6	1.2	2.8
M-2	nd	0.2	1.4	5.1	0.5	0.9	2.4	4.8
M-3	0.4	0.9	3.4	8.1	1.1	1.9	3.9	7.5
Origin	0.6	1.2	3.7	11.1	1.7	2.7	5.5	12.2
Others	0.4	0.4	1.1	1.1	1.4	1.6	1.6	1.8
Total	95.0	96.7	91.5	93.2	98.0	97.6	94.2	94.7

a) Not detected.

Table 7-4 Degradation of the enantiomers of  $^{14}\text{C}$ -salithion by *Agrobacterium* sp. (B-17) isolated from Ushiku loam upland soil.

	% of the applied $^{14}\text{C}$ (hr after application)							
	<u>(R)</u> <sub>P</sub> -enantiomer				<u>(S)</u> <sub>P</sub> -enantiomer			
	4	8	24	72	4	8	24	72
SLT	94.5	87.3	74.2	48.9	79.3	66.3	40.4	17.3
SLT-DM	0.7	1.9	6.9	19.6	nd <sup>a)</sup>	0.9	2.1	4.0
Sal-alc	1.4	1.6	2.9	2.5	6.0	10.2	17.3	26.0
Sal-acid	0.4	0.9	3.6	9.4	1.9	2.5	4.8	6.8
M-1	nd	0.5	1.5	3.4	nd	1.2	3.2	5.8
M-2	nd	0.2	0.8	3.3	0.6	6.6	10.5	9.9
M-3	nd	nd	0.5	nd	1.0	1.3	1.9	3.2
M-4	nd	nd	nd	nd	nd	1.3	0.9	1.6
Origin	0.7	1.0	2.3	5.2	4.6	6.7	12.4	19.2
Others	1.5	1.0	1.3	0.7	5.8	1.1	0.7	0.5
Total	99.2	94.4	94.0	93.0	99.2	98.1	94.2	94.3

a) Not detected.



Table 7-5 Degradation of the enantiomers of <sup>14</sup>C-salithion by *Acinetobacter* sp. (B-60) isolated from Ushiku loam upland soil.

	% of the applied <sup>14</sup> C (hr after application)							
	<u>(R)<sub>P</sub>-enantiomer</u>				<u>(S)<sub>P</sub>-enantiomer</u>			
	4	8	24	72	4	8	24	72
SLT	71.6	46.3	12.8	6.2	70.9	39.7	2.3	nd <sup>a)</sup>
SLT-DM	nd	1.2	2.2	3.1	18.4	38.7	66.8	63.8
Sal-alc	11.8	19.0	34.5	40.5	6.1	11.5	17.8	17.5
M-1	0.9	1.9	2.4	2.5	0.6	nd	nd	nd
M-2	2.8	8.4	14.8	8.4	1.0	2.6	4.1	1.6
M-4	0.2	0.6	1.3	3.5	nd	nd	nd	nd
Origin	6.6	13.4	21.7	27.7	2.8	5.6	9.2	9.6
Others	2.9	3.0	0.8	0.6	1.9	2.7	2.9	2.0
Total	96.8	93.8	90.5	92.5	101.7	100.8	103.1	94.5

a) Not detected.

Table 7-6 Degradation of the enantiomers of <sup>14</sup>C-salithion in uninoculated control culture.

	% of the applied <sup>14</sup> C (hr after application)							
	<u>(R)</u> <sub>P</sub> -enantiomer				<u>(S)</u> <sub>P</sub> -enantiomer			
	4	8	24	72	4	8	24	72
SLT	98.7	97.5	93.8	81.7	98.2	97.3	93.5	81.2
SLT-DM	0.3	0.7	1.9	5.6	0.3	0.7	1.9	5.7
Sal-alc	0.5	0.9	2.1	6.0	0.7	0.9	2.2	6.0
M-1	0.2	0.5	1.4	4.3	0.3	0.5	1.5	4.0
Origin	0.1	0.1	0.3	1.1	0.1	0.2	0.4	1.1
Others	0.2	0.4	0.4	1.3	0.4	0.4	0.5	0.8
Total	100.0	100.1	99.9	100.0	100.0	100.0	100.0	98.8

(S)<sub>p</sub>体サリチオンを処理したB-7の培養液中では、(R)<sub>p</sub>体を処理した培養液中と比較して、より多くのサリチルアルコール、サリチル酸、M-1およびM-2が検出され、サリチオンの(S)<sub>p</sub>体のP-0-アリアルおよびP-0-アラルキル結合の開裂が(R)<sub>p</sub>体よりも速く進行したことが認められた。脱メチルサリチオンの形成は、異性体間において同様に、72時間の培養で5.3～5.4%に達した。培養液中における脱メチルサリチオンの量は、対照区において検出された脱メチルサリチオンの量と同じであったため、B-7はサリチオンの脱メチル化能をほとんど持たないことが認められた。以上の結果から、B-7によるサリチオンの立体選択的代謝が、サリチオンのP-0-アリアルおよびP-0-アラルキル結合の立体選択的な開裂に起因することが示された。

B-15はサリチオンの両光学異性体を同様な速度で代謝し、代謝物の割合も異性体間で同じであった。この分解菌もエステル結合の開裂によりサリチオンを代謝し、脱メチル化能をほとんど持たなかった。

B-17はサリチオンのそれぞれの光学異性体の代謝において異なる代謝様式を示した。サリチルアルコール、サリチル酸、M-1およびM-2を生成するP-0-アリアルおよびP-0-アラルキル結合の開裂は(S)<sub>p</sub>体サリチオンの主代謝経路であったのに対し、脱メチルサリチオンを生成するサリチオンの脱メチル化が(R)<sub>p</sub>体の主代謝経路であった。72時間の培養後において、(R)<sub>p</sub>体および(S)<sub>p</sub>体のサリチオンを処理した培養液中におけるサリチルアルコール、サリチル酸、M-1およびM-2の総量は、各異性体でそれぞれ18.6および48.5%であった。これに対し、それぞれの培養液中における脱メチルサリチオ

ンの量は、それぞれ19.6および4.0%であった。

B-60はサリチオンの両光学異性体を速やかに代謝したが、それらの代謝経路はB-17のように光学異性体間で異なっていた。しかし、それぞれの異性体に対する代謝様式はB-17によるものとは反対であった。(R)<sub>p</sub>体サリチオンを処理した培養液中においては、より多くのサリチルアルコール、サリチル酸およびM-1が認められた[(R)<sub>p</sub>: 51.4%, (S)<sub>p</sub>: 19.1% (72時間後)]。これに対し、(S)<sub>p</sub>体を処理した培養液中では、より多くの脱メチルサリチオンが認められた[(R)<sub>p</sub>: 3.1%, (S)<sub>p</sub>: 63.8% (72時間後)]。

分解菌を接種しない対照区では、サリチオンの両異性体は脱メチル化、P-0-アリアルおよびP-0-アラルキル結合の開裂を経て徐々に分解した。72時間後に検出され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はそれぞれ5.6~5.7, 6.0, 4.0~4.3および1.2%であった。また、両異性体間でほぼ同じ量の分解生成物が認められた。

単離された菌株によるサリチオンの分解、脱メチル、P-0-アリアルおよびP-0-アラルキル結合の開裂における立体選択性をTable 7-7にまとめた。

### 第3項 分解菌によるエピマー化

(S)<sub>p</sub>体および(R)<sub>p</sub>体のサリチオンをそれぞれ処理した各培養液中のいずれにも(R)<sub>p</sub>体および(S)<sub>p</sub>体のサリチオンは検出されなかったことから、供試した分解菌によるサリチオンのエピマー化は起こらなかったことが示された。

Table 7-7 Stereoselectivity in degradation, desmethylation, and ester cleavages of salithion by isolated soil microorganisms.

Isolates <sup>a)</sup>	Degradation	Desmethylation	Ester cleavages
B-7	( <u>R</u> ) <sub>P</sub> < ( <u>S</u> ) <sub>P</sub>	- <sup>b)</sup>	( <u>R</u> ) <sub>P</sub> < ( <u>S</u> ) <sub>P</sub>
B-15	( <u>R</u> ) <sub>P</sub> = ( <u>S</u> ) <sub>P</sub>	-	( <u>R</u> ) <sub>P</sub> = ( <u>S</u> ) <sub>P</sub>
B-17	( <u>R</u> ) <sub>P</sub> < ( <u>S</u> ) <sub>P</sub>	( <u>R</u> ) <sub>P</sub> > ( <u>S</u> ) <sub>P</sub>	( <u>R</u> ) <sub>P</sub> < ( <u>S</u> ) <sub>P</sub>
B-60	( <u>R</u> ) <sub>P</sub> ≤ ( <u>S</u> ) <sub>P</sub>	( <u>R</u> ) <sub>P</sub> < ( <u>S</u> ) <sub>P</sub>	( <u>R</u> ) <sub>P</sub> > ( <u>S</u> ) <sub>P</sub>

a) B-7, B-15 and B-17 were *Agrobacterium* sp., and B-60 was *Acinetobacter* sp.

b) weak or no ability.

#### 第4節 考察

牛久土壌から単離されたサリチオン分解菌は、サリチオンを代謝する際に種々の立体選択性を示した。分解菌はサリチオンを脱メチル化およびエステル結合の開裂によって代謝したが、それらの反応における立体特異性はそれぞれの分解菌に特徴的であった (Table 7-7)。

B-17およびB-60はサリチオンの脱メチルにおいて異なった立体特異性を有していた。前者の株は(R)<sub>p</sub>体のみを脱メチルしたのに対して、後者の株は(S)<sub>p</sub>体のみを脱メチルした。有機リン殺虫剤の脱メチル化反応は、哺乳動物<sup>121, 122</sup>、昆虫<sup>121-124</sup>および植物<sup>121, 122</sup>においては、グルタチオン-S トランスフェラーゼによって触媒されることが報告されているが、この酵素の立体特異性についてはあまりよく調べられていない。Donninger<sup>125</sup>とMiyazakiら<sup>126</sup>が、アキラルな有機リン剤からキラルな脱メチル体が生成する立体特異的な脱メチル化を報告した例があるだけである。分解菌の持つどのような酵素がサリチオンの脱メチル化反応に関与しているかは検討を行っていないが、それらの酵素の立体特異性がかなり高いことが推定された。

(S)<sub>p</sub>体サリチオンのエステル結合は、B-7 およびB-17によって(R)<sub>p</sub>体のエステル結合よりも速やかに開裂された。また、これとは反対の立体選択性がB-60では認められたが、エステル結合の開裂における立体選択性は脱メチル化における立体選択性ほど高くはなかった。

微生物による立体選択的な代謝はこれまで数多く報告されており<sup>127, 128</sup>、微生物の代謝において特徴的であると思われるが、1菌

株が1組の光学異性体をそれぞれ異なった様式で代謝することはこれまでに見ない。単離された2菌株のサリチオン分解菌(B-17およびB-60)がサリチオンのそれぞれの光学異性体を異なった様式で代謝し、しかも、それらの立体選択的な代謝様式が2菌株間で逆であったことは興味深いことである。さらに、単離された4株の分解菌がサリチオンを分解する際に、それぞれ異なった立体特異性を有していたことも興味深いことである。

土壌中におけるサリチオン光学異性体の分解試験(第5章)において、両異性体の分解速度には差が認められたが、それらの分解過程における差異は明らかにできなかった。これは、分解生成物の量が少なく、また、速やかに消失したためであるが、これらの原因に加えて、サリチオン分解菌がそれぞれ異なる立体特異性を持っていることも別の理由として考えられた。

## 第5節 要約

牛久畑地土壌から単離した *Agrobacterium* sp. (B-7, B-15およびB-17) と *Acinetobacter* sp. (B-60) による (R)<sub>p</sub>体および (S)<sub>p</sub>体のサリチオンの代謝について、フェニル環の炭素を<sup>14</sup>Cで標識した化合物を用いて比較検討した。B-7は (S)<sub>p</sub>体を (R)<sub>p</sub>体より3.1倍速く分解し、その立体選択性は P-O-アリアルおよび P-O-アラルキル結合の立体選択的開裂に起因していた。B-15は両光学異性体を同様な速度および代謝様式で分解した。B-17は (S)<sub>p</sub>体を (R)<sub>p</sub>体より3.5倍速く分解し、両光学異性体間で代謝様式が異なっていた。(S)<sub>p</sub>体では P-O-アリアルおよび P-O-アラルキル結合の開裂が主代謝経路であったのに対し、(R)<sub>p</sub>体では脱メチル化が主代謝経路であった。B-60は両光学異性体をすみやかに分解し、それらの代謝経路における立体特異性は、B-17の場合とは逆であった。すなわち、(S)<sub>p</sub>体を脱メチル化により分解し、(R)<sub>p</sub>体を 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。また、いずれの分解菌においてもサリチオン光学異性体のエピマー化は認められなかった。分解菌によるサリチオン光学異性体の代謝における立体選択性は、土壌中におけるサリチオンの立体選択的な分解の結果とよく一致した。



第 8 章 土 壌 から 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<sup>130)</sup>

第 1 節 は じ め に

牛久畑地土壌から単離した 3 株の *Agrobacterium* sp. (B-7, B-15 および B-17) と 1 株の *Acinetobacter* sp. (B-60) は, サリチオンを  $P-O$ -アリールおよび  $P-O$ -アラルキル結合の開裂および脱メチル化により代謝し (第 4 章), また, サリチオン分解菌による代謝は立体選択的であった (第 7 章). すなわち, B-7 および B-17 は ( $S$ )<sub>P</sub> 体サリチオンの  $P-O$ -アリールおよび  $P-O$ -アラルキル結合を ( $R$ )<sub>P</sub> 体よりも速く開裂したのに対し, B-60 は ( $R$ )<sub>P</sub> 体サリチオンのエステル結合をより速く開裂した. さらに, ( $R$ )<sub>P</sub> 体および ( $S$ )<sub>P</sub> 体サリチオンは, それぞれ, B-17 および B-60 により立体選択的に脱メチル化された.

本章では, 4 株のサリチオン分解菌による他の有機リン殺虫剤の代謝能を調べることにより, これらの分解菌によるリン酸エステルの  $P-O$ -アリールまたは  $P-O$ -アルキル結合の開裂における基質特異性を明らかにした. 化合物はフェニル環を <sup>14</sup>C で標識したサリチオン, フェニトロチオン, パラチオンおよびシアノホスを用いた.

第 2 節 実 験 方 法

第 1 項 供 試 微 生 物

牛久畑地土壌から単離した, サリチオンの高い分解活性を持つ 3 株の *Agrobacterium* sp. (B-7, B-15 および B-17) と 1 株の *Acinetobacter* sp. (B-60) を本実験に供試した. それぞれの菌株は, 1/10 希釈 Nutrient Agar (Difco) の斜面培地に 4 °C で保存した.

## 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100ml 三角フラスコ中の30ml 1/10 希釈 Nutrient Broth (Difco)に接種し、30°Cで一昼夜振とう培養した。その後、培養液を3mlずつ4本の試験管に分注し、10 $\mu$ lのジメチルスルホキシドに溶解したサリチオン、フェニトロチオン、パラチオンまたはシアノホスの<sup>14</sup>C標識体をそれぞれ20ppmとなるように添加し、引き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それぞれの<sup>14</sup>C標識体を添加し、対照区として培養を行った。処理後0、4、8、24および48時間後に培養液の一部(10 $\mu$ l)を直接、LSCおよび標品とのTLCコクロマトグラフィーにより分析した。

## 第3節 結果

供試したいずれの有機リン殺虫剤も、サリチオン分解菌によって、サリチオンほど速く分解されなかった。48時間後の培養液中における代謝物の割合をTable 8-1 ~ 8-4に示す。

第7章で報告したように、それぞれの分解菌はサリチオン(SLT)をP-O-アールおよびP-O-アラルキル結合の開裂および脱メチル化によって代謝し、代謝物としてサリチルアルコール(Sal-alc)、脱メチルサリチオン(SLT-DM)およびサリチル酸(Sal-acid)が検出された。また、その他の代謝物として、M-1 ~ M-4が検出された。第4章に記載したとおり、M-1およびM-2は、それぞれ、0-methyl 0-(2-hydroxymethylphenyl) hydrogen phosphorothioate および 0-methyl 0-(2-hydroxybenzyl) hydrogen phosphorothioateと同定され、M-3 および M-4 は、M-1 および M-2 よりも極性の高い未同定の

代謝物であった。

フェニトロチオン(SMT)は4株のサリチオン分解菌によってほとんど分解されず、48時間後においても91.8~95.6%のフェニトロチオンが回収された。この場合、フェニトロチオンのP-O-アリール結合の開裂により生成する3-メチル4-ニトロフェノール(MNP)が0.7~2.6%検出され、分解菌はフェニトロチオンの加水分解に対して弱い活性を有していた。脱メチルフェニトロチオン(SMT-DM)は、対照区を含む全ての培養液中で2.7~3.7%に達したことから、フェニトロチオンは培養液中において主に非生物学的な反応によって脱メチル化されたことが認められた。また、B-60はフェニトロチオンのニトロ基のアミノ基への還元、および生成したアミノフェニトロチオンのアミノ基のアセチル化に対して弱い活性を有しており、48時間後に、微量のアミノフェニトロチオンおよびアセチルアミノフェニトロチオンが検出された。他の3株の分解菌はフェニトロチオンの還元的代謝において活性を示さなかった。

パラチオン(PRT)はB-60によってのみ、P-O-アリール結合の開裂およびニトロ基の還元、生成したアミノ基のアセチル化を経て代謝された。それらの分解活性は弱く、検出された4-ニトロフェノール(NP)、アミノパラチオン(PRT-NH<sub>2</sub>)およびアセチルアミノパラチオン(PRT-NHAc)は、それぞれ、2.8、1.5および0.8%であった。また、対照区を含む全ての培養液中でほとんど同量(0.8~1.1%)の脱エチルパラチオン(PRT-DE)が検出されたことから、パラチオンの培養液中における脱エチル化もフェニトロチオンの脱メチル化と同様に非生物学的な反応であることが示された。

Table 8-1 Metabolite distributions in the cultures<sup>a)</sup> applied with salithion after 48 hr of incubation.

Compound	% of the applied <sup>14</sup> C				
	B-7	B-15	B-17	B-60	Control
SLT	70.6	73.7	57.7	1.3	88.1
SLT-DM	3.0	2.6	4.7	27.3	2.7
Sal-alc	10.2	9.1	12.8	33.6	3.5
Sal-acid	1.3	1.0	4.0	0.5	nd <sup>b)</sup>
M-1	2.3	1.9	3.6	2.3	2.0
M-2	4.5	3.7	8.6	22.2	0.5
M-3	2.6	2.1	1.8	nd	nd
M-4	0.5	0.4	0.6	1.0	nd
Origin	6.1	4.2	6.9	11.5	0.7
Others	1.4	0.8	1.3	2.1	0.7
Total	102.5	99.5	102.0	101.8	98.3

a) B-7, B-15, and B-17 were *Agrobacterium* sp.,  
and B-60 was *Acinetobacter* sp.

b) Not detected.

Table 8-2 Metabolite distributions in the cultures<sup>a)</sup> applied with fenitrothion after 48 hr of incubation.

Compound	% of the applied <sup>14</sup> C				
	B-7	B-15	B-17	B-60	Control
SMT	95.1	95.6	94.1	91.8	100.5
SMT-DM	3.2	3.2	3.4	3.7	2.7
MNP	0.7	1.0	1.0	2.6	nd <sup>b)</sup>
SMT-NH <sub>2</sub>	nd	nd	nd	0.4	nd
SMT-NHAc	nd	nd	nd	0.2	nd
Origin	0.1	0.1	0.1	0.2	nd
Others	0.6	0.4	0.5	0.8	0.7
Total	99.5	100.3	99.1	99.7	103.9

a) B-7, B-15, and B-17 were *Agrobacterium* sp., and B-60 was *Acinetobacter* sp.

b) Not detected.

Table 8-3 Metabolite distributions in the cultures<sup>a)</sup> applied with parathion after 48 hr of incubation.

Compound	% of the applied <sup>14</sup> C				
	B-7	B-15	B-17	B-60	Control
PRT	91.0	89.9	92.9	93.3	98.2
PRT-DE	0.9	0.9	0.9	1.1	0.8
NP	nd <sup>b)</sup>	nd	nd	2.8	nd
PRT-NH <sub>2</sub>	nd	nd	nd	1.5	nd
PRT-NHAc	nd	nd	nd	0.8	nd
Origin	0.3	0.4	0.2	1.2	nd
Others	2.4	2.9	2.4	2.2	1.0
Total	94.6	94.1	96.4	102.9	100.0

a) B-7, B-15, and B-17 were Agrobacterium sp., and B-60 was Acinetobacter sp.

b) Not detected.

Table 8-4 Metabolite distributions in the cultures<sup>a)</sup> applied with cyanophos after 48 hr of incubation.

Compound	% of the applied <sup>14</sup> C				
	B-7	B-15	B-17	B-60	Control
CYN	95.2	85.6	93.9	92.7	98.5
CYN-DM	3.1	2.8	3.1	3.9	2.5
CP	0.4	0.2	0.5	2.1	nd <sup>b)</sup>
CYN-CONH <sub>2</sub>	2.4	9.7	2.0	0.2	nd
CYN-COOH	0.2	0.3	0.1	nd	nd
Origin	0.1	0.1	<0.1	<0.1	nd
Others	0.3	0.5	0.2	0.6	0.9
Total	101.7	99.2	99.9	99.6	101.9

a) B-7, B-15, and B-17 were *Agrobacterium* sp., and B-60 was *Acinetobacter* sp.

b) Not detected.

フェニトロチオンにおける代謝と同様に、シアノホス(CYN)のP-0-アリールおよびP-0-メチル結合は全てのサリチオン分解菌によってわずかに開裂された。一方、シアノホスのカルバモイルシアノホス(CYN-CONH<sub>2</sub>)を経たカルボキシルシアノホス(CYN-COOH)へのシアノ基の加水分解が、特に *Agrobacterium* sp. (B-7, B-15およびB-17)において主代謝経路として認められた。供試した分解菌の中で最も高い活性を持つB-15の培養液中では、48時間後に9.7%のカルバモイル体が検出された。

#### 第4節 考察

4株のサリチオン分解菌は、フェニトロチオンのP-0-アリール結合の開裂に対して弱い活性を示し、代謝物として3-メチル4-ニトロフェノールを生成した。また、B-60はこの分解経路の他にフェニトロチオンのニトロ基のアミノ基への還元、および生成したアミノフェニトロチオンのアミノ基のアセチル化において弱い活性を示した。脱メチル化活性は、分解菌を接種した培養液中に検出された脱メチルフェニトロチオンの量が対照区において検出された量とほとんど同様であったため、主に非生物的反応であることが示された。本試験で同定された全ての代謝物は、フェニトロチオンの土壤中<sup>131)</sup>、<sup>132)</sup>およびフェニトロチオン分解菌による代謝試験<sup>131)</sup>において認められたものであった。

B-60はパラチオンの代謝においても弱い分解活性を示し、代謝物として、4-ニトロフェノール、アミノパラチオンおよびアセチルアミノパラチオンが検出された。4-ニトロフェノールおよびアミノパラチオンはパラチオン分解菌により生成される分解物としてこれま



で多数報告されている<sup>10,79</sup>). また, アミノパラチオンのアミノ基の微生物によるアセチル化はこれまでに報告を見ないが, アミノフェニトロチオンのアミノ基のアセチル化と同様な代謝様式によるものであると推定した.

供試した全てのサリチオン分解菌, 特に *Agrobacterium* sp. (B-7, B-15およびB-17) は, シアノホスのシアノ基の加水分解に対して活性を有していた. 土壌中に添加されたシアノホスは, 主にエステル結合の開裂により分解し, シアノ基の変換は認められなかった<sup>133</sup>). また, シアノホスのシアノ基の変換は, 哺乳動物<sup>134</sup>)および植物<sup>133</sup>)における代謝や光分解<sup>135</sup>)においても認められなかった. しかし, 芳香族ニトリルの微生物による加水分解は, プロモキシニル<sup>136-138</sup>)およびアイオキシニル<sup>137,139</sup>)のようなニトリル系除草剤の代謝においてよく調べられている. すなわち, ニトリルの微生物による加水分解は, 2種類の型の変換を経て進行することが報告されており, 1つはシアノ基のアミド中間体を経たカルボキシル基への2段階の加水分解であり<sup>140,141</sup>), 他の1つはシアノ基からカルボキシル基への1段階の代謝である<sup>136,137,142,143</sup>). サリチオン分解菌によるシアノホスのニトリルの変換は, 前者の型の代謝様式により進行していることが認められた.

有機リン殺虫剤分解酵素であるパラチオン加水分解酵素を用いた最近の研究<sup>144</sup>)で, この酵素がジアルキルチオリン酸に対して広い基質特異性を有していることが報告された. パラチオンに加えてメチルパラチオン[0,0-dimethyl 0-(4-nitrophenyl) phosphorothioate], ダイアジノン[0,0-diethyl 0-(2-isopropyl-6-methylpyrimidin-4-yl) phosphorothioate], フェニトロチオン, シアノホス,

クロルピリホス [0,0-diethyl 0-(3,5,6-trichloro-2-pyridyl) phosphorothioate]およびクマホス [0,0-diethyl 0-(3-chloro-4-methylumbelliferone) phosphorothioate]がこの酵素により加水分解された。土壌および底質から単離された別の2株の *Pseudomonas* は8種類の有機リン殺虫剤を単一リン源として利用し、広い基質特異性を有していることを示した<sup>145)</sup>。また、Munnecke<sup>146)</sup>は細菌の混合培養液から得たホスホエステラーゼが少なくとも9種類の有機リン剤を加水分解したと報告している。

サリチオン分解菌である3株の *Agrobacterium* sp. (B-7, B-15 および B-17) は、フェニトロチオンおよびシアノホスの分解に対して弱い活性しかなく、パラチオンを分解することはできなかった。最も高いサリチオン分解活性を持つ *Acinetobacter* sp. (B-60) は、フェニトロチオン、シアノホスおよびパラチオンの分解に関して *Agrobacterium* sp. よりもわずかに高い活性を有していた。供試したサリチオン分解菌の P-0-アリアル結合の開裂酵素が、環状の有機リン殺虫剤であるサリチオンにかなり特異的で、前述したリン酸エステル加水分解酵素とは基質特異性の点において異なっているものと推定した。また、B-60がフェニトロチオン、シアノホスおよびパラチオンの P-0-アルキル結合をほとんど開裂しなかったことから、B-60のもつサリチオン脱メチル酵素もかなり基質特異性が高いものと推定される。このような高い基質特異性は、サリチオンの独特な環状構造に起因するものと推定した。

第5節 要約

サリチオンを  $P-O$ -アリアルおよび  $P-O$ -アラルキル結合の開裂、および脱メチル化により分解する3株の *Agrobacterium* sp. および1株の *Acinetobacter* sp. は、フェニトロチオン、パラチオンおよびシアノホスの  $P-O$ -アリアルおよび  $P-O$ -アルキル結合の開裂においてほとんど活性を示さないか弱い活性しか示さず、単離されたサリチオン分解菌が基質特異性の高い分解関連酵素を有していることが推定された。一方、*Acinetobacter* sp. はフェニトロチオンおよびパラチオンのニトロ基のアミノ基への還元、およびそれに引き続くアミノ基のアセチル化に弱い活性を示した。また、3株の *Agrobacterium* sp. はシアノホスのシアノ基を2段階に加水分解し、シアノホスのカルバモイル体およびカルボキシル体が培養液中に認められた。このような高い基質特異性は、サリチオンの独特な環状構造に起因するものと推定した。

現在、農薬は作物保護の目的で多量に環境中に放出されている。それらのほとんどが人工合成有機化合物で、直接あるいは間接的に土壤環境中に到達するため、土壤生態系の保全の観点から農薬の土壤における挙動を明らかにすることは重要な研究課題である。

また、農薬が光学活性体である場合には、その生理活性が光学異性体間で異なることが多いため、それがラセミ体で使用されていてもそれぞれの異性体の環境中での挙動を明らかにすることは、農薬の効率的な使用のためばかりでなく安全性の観点からも重要である。

本研究では環状有機リン酸エステルである殺虫剤サリチオンの土壤における挙動を光学異性体間で比較研究した。さらに、土壤中におけるサリチオンの分解（立体選択的な分解も含む）に関与しているサリチオン分解菌を単離し、それらの立体選択的な代謝・分解過程を明らかにした。

これらの研究結果に基づき、サリチオン（ラセミ体および光学異性体）の土壤における挙動および分解菌による分解過程について総合的に考察した。

#### 第1節 サリチオンの土壤における挙動

本来、農薬の土壤における挙動を評価しようとする場合には、種々の要因を考慮することが必要である。すなわち、土壤環境中における農薬の消失には、非生物学的な化学分解、土壤微生物による分解、光分解、土壤からの揮散、流亡および溶脱、土壤への吸着等が主な消失要因として考えられるが、それらの要因は気象条件、土壤

の性質、散布条件や剤型の種類等により影響を受けるため、実際の圃場においてこれらの要因を解析することは容易なことではない。

本研究（第3章）では、複雑な環境要因を取り除いた一定条件下での容器内試験を暗所で行うことにより、サリチオンの土壤中における消失速度を測定するとともに、消失に関与する非生物学的な化学分解、土壤微生物による分解、土壤からの揮散および土壤への吸着の各消失要因についてその影響の度合を解明した。さらに、サリチオンの分解生成物を同定して土壤中における分解経路を推定し、分解生成物をも含めたサリチオンの挙動を明らかにした。

一般的に有機リン殺虫剤は、有機塩素系殺虫剤等と比べ土壤中における残留性が低く、速やかに分解し消失することが知られている(8, 43-47)。本研究で供試したサリチオンも、成因の異なる2種類の畑地土壤に添加すると、いずれの土壤においても3日以内の消失半減期で速やかに消失し、他の有機リン剤と比較しても土壤残留性の低い農薬であることが明らかとなった。

サリチオンは蒸気圧が $4.8 \times 10^{-3} \text{ mmHg}^{37)}$ と有機リン剤の中ではやや高いので、土壤からの揮散による消失も予想されたが、最終分解生成物である $^{14}\text{CO}_2$ 以外に揮散した放射能は、試験期間を通じて処理放射能の2%以下であった。このことから、サリチオンの土壤からの消失は、揮散によるものではなく、土壤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。

土壤微生物は、多くの農薬の土壤中における分解過程に大きな役割を果たしており、土壤を殺菌すると農薬の分解が抑制され、また、これまでに多種類の農薬分解菌が土壤から単離されている。一方、農薬によっては非生物学的な化学分解が土壤中での消失の大きな要因

となることもある。すなわち、土壤環境中において化学的に不安定なものは微生物の関与なしに分解していく。これらの要因を明らかにするために、滅菌土壤と非滅菌土壤中における農薬の挙動を比較することが有効な方法としてよく用いられてきていた(7, 10, 13, 14, 17, 19, 48)。本研究においてもサリチオンについて滅菌土壤と非滅菌土壤中における挙動を比較することにより、その要因について解析した。

サリチオンの滅菌土壤中における分解速度は、非滅菌土壤中における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。このことから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が示唆された。しかし、火山灰土壤の牛久土壤では滅菌土壤中における未抽出残渣の形成量が多く、非生物的な未抽出残渣の形成もサリチオンの消長に大きく影響することが明らかとなった。

以上の結果から、サリチオンの土壤中における消失は、土壤の性質により異なった機構で進行することを推定した。すなわち、サリチオンは牛久土壤のような火山灰土壤においては土壤への不可逆的吸着と土壤微生物による分解とが競合して同時に進行することにより消失する。これに対し、野市土壤のような鉍質土壤においては、サリチオンの未抽出残渣の形成能が弱いため、大部分のサリチオンは土壤微生物に利用可能な状態で存在し、主に土壤微生物による分解を経て消失するものと推定した。

無機リン酸塩が火山灰土壤に強く吸着することは周知のことで(8, 57-61)、有機リン剤も火山灰土壤へ強く吸着することは多数報告されている(8, 59, 68)。有機リン化合物の火山灰土壤への吸着の機構は

まだよく解明されていないが、火山灰中に多量に存在するアルミニウム化合物およびその主要な粘土鉱物であるアロフェンおよびイモゴライトの性質に起因していると推定されている<sup>58)</sup>。いずれにせよ有機リン剤の土壤中における挙動を評価する際には土壤の成因を重要な因子として考慮することが必要である。

本研究で同定した分解生成物から、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<sup>7, 10, 17, 14, 19, 72)</sup>と同様に、 $P-O$ -アリアル結合および $P-O$ -アラルキル結合の開裂、脱メチル化および $P=S$  から  $P=O$  への酸化を経て最終的には $CO_2$ にまで分解することが明らかとなった。しかし、サリチオンの分解生成物のいずれもが土壤中において速やかに消失したので、サリチオンの主たる分解経路は特定できなかった。

サリチオンの土壤中における分解経路は、動植物における代謝経路<sup>23)</sup>とほぼ同様であったが、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たのに対して、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、最終的には $CO_2$ にまで無機化された点が大きく異なっていた。芳香族化合物の微生物による開裂・分解に関してはこれまで多数報告されており<sup>72-76)</sup>、それらの能力は土壤環境中に投入された農薬(有機物)を分解し、無機化する上で大きな役割を果たしているものと考えられる。

本研究の結果から、サリチオンの畑地土壤中における挙動を次のように推定した。土壤に到達したサリチオンはそのほとんどが土壤微生物の攻撃を受けて分解されていく。火山灰土壤の場合には土壤

への不可逆的な吸着も微生物による分解と競合して少なからず起こる。その一方で、土壤表面上のサリチオンの一部は土壤から揮散したり、光分解<sup>24)</sup>により消失する。本研究で実施した容器内試験でのサリチオンの消失半減期は3日以内であったが、散布後、土壤に到達するサリチオンのほとんどが土壤表面上に存在することを考えれば、圃場では揮散や光分解の影響を大きく受け、室内実験での消失速度より速く消失することが予想される。サリチオンは土壤中においてP-O-アリアル結合および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への酸化を経て分解し、生成するサリチルアルコール、脱メチルサリチオン、サリオクソン、脱メチルサリオクソンおよびサリチル酸は速やかに土壤に吸着するか、またはさらに分解を受けて、土壤中に蓄積することなく大部分は最終的にCO<sub>2</sub>にまで無機化されるか、あるいは未抽出土壤残渣を形成する。形成した未抽出土壤残渣も徐々にCO<sub>2</sub>にまで無機化される。

## 第2節 サリチオン光学異性体の土壤中における挙動

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<sup>26-30)</sup>。すなわち、光学的に活性な農薬は、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が多い。このため、農薬の有効的な利用といった面からだけでなく、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なことである。



サリチオンは分子内に不斉リン原子が存在するため、(R)<sub>p</sub>体および(S)<sub>p</sub>体の光学異性体が存在し、イエバエに対する殺虫活性は光学異性体間で約2倍の差があることが報告されている<sup>33)</sup>。本研究(第5章)では、サリチオンの両光学異性体の土壌中における分解挙動を比較し、(S)<sub>p</sub>体が(R)<sub>p</sub>体よりも1.5～1.7倍の速さで分解することを明らかにした。さらに、両光学異性体をそれぞれ添加した土壌中の分解生成物を比較することにより、いずれの分解過程において差が生じたかを明らかにしようとしたが、分解生成物である脱メチルサリチオン、脱メチルサリオキソン、サリチルアルコール、サリチル酸がわずかにしか検出されず、また、短時間で消失したため明確にすることはできなかった。ただし、分解が速かった(S)<sub>p</sub>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ものと推定した。

滅菌土壌にサリチオンを添加すると、分解速度における立体選択性が消失したことから、滅菌土壌中における非生物的な分解反応は、非立体選択的な化学反応であることを確認した。また、サリチオンの両光学異性体のエピマー化が滅菌および非滅菌のいずれの土壌中에서도起こらなかったことから、土壌中におけるサリチオンの分解速度に光学異性体間で差が生じた原因として、次の2つの可能性を仮定した。

第1の仮定はサリチオンの土壌粒子との吸脱着平衡が光学異性体間で異なる場合である。土壌中のサリチオン分解菌は土壌水中に溶解しているサリチオンを分解することから、サリチオンの土壌粒子と土壌水の間で平衡に光学異性体間で差があれば、それらの分解速

度に差が生じることになる。すなわち、(S)<sub>p</sub>体が(R)<sub>p</sub>体よりも吸着しにくい、あるいは脱着しやすければ、分解菌による攻撃を受けやすくなり、(S)<sub>p</sub>体が(R)<sub>p</sub>体よりも速く消失することになる。

第2の仮定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に立体選択性を有することである。微生物による有機化合物の変換は立体特異的に進行することが多いことから<sup>128, 129)</sup>、サリチオン分解菌(相)がサリチオンを分解する際に(S)<sub>p</sub>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を仮定した。

第1の可能性については第6章でサリチオンの土壌との吸脱着について光学異性体間で比較し、吸着および脱着のいずれの過程においても異性体間で差がないことを明らかにした。土壌中においてサリチオンの両光学異性体が吸脱着に関して同様な挙動をすることは、土壌中におけるサリチオン光学異性体間の分解速度の差がサリチオン分解菌によるサリチオン分解の際の立体選択性に起因することを支持した。事実、土壌から単離した高分解能を持つサリチオン分解菌は、それぞれの菌に特徴的な立体選択性を有しており(第7章)、この推定が裏付けられた。この点に関しては次節に述べる。

本研究の結果から、サリチオン光学異性体の畑地土壌中における挙動の違いを次のように推定した。土壌に添加された両異性体は、土壌粒子との吸着平衡により土壌粒子に吸着する画分と土壌水に溶解する画分に分配して存在するが、その割合には光学異性体間で差がない。また、一部は不可逆的に土壌に吸着したり(特に火山灰土壌の場合)、化学的に分解したりするが、これらの反応も光学異性体間で同様に進行する。添加されたサリチオン光学異性体の大部分は、土壌微生物の働きにより、P-0-アリアル結合および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=Oへの酸化を経て分解されるが，その際，(S)<sub>p</sub>体が(R)<sub>p</sub>体よりも1.5～1.7倍速く分解される。両異性体から生成した分解物が微量にしか検出されず，また，短時間で消失したため，いずれの分解過程において差が生じるかについては明らかではないが，分解が速い(S)<sub>p</sub>体を添加した土壌ではより多くの未抽出土壌残渣を形成する。

サリチオンの場合，両光学異性体とも土壌中で速やかに分解したため，分解過程における差異は確認できなかったが，土壌中において一方の異性体が，わずかな差ではあるが選択的に分解されることは興味深い。光学活性な農薬の土壌中における挙動を異性体間で比較研究した例はほとんどなく，それらの農薬の生理活性が光学異性体間で異なることが多いことを考慮すれば，この点に着目した環境影響評価も今後重要になってくることが考えられる。

### 第3節 土壌微生物によるサリチオンの代謝・分解

サリチオンは畑地土壌中において3日以内の半減期で分解したが，土壌を滅菌すると分解が大きく抑制されたことから，土壌微生物による分解がサリチオンの土壌中における分解に大きく影響していることが明らかになった(第3章)。また，サリチオンは畑地土壌中において(S)<sub>p</sub>体が(R)<sub>p</sub>体よりも1.5～1.7倍速く立体選択的に分解したが，滅菌土壌中では分解が大きく抑制されると同時にその選択性が消失した。これらの結果から，土壌中におけるサリチオンの立体選択的分解は，土壌中のサリチオン分解菌(相)がサリチオンを分解する際の立体選択性に起因することが示唆された(第5章)。また，土壌中においてサリチオンの両光学異性体が吸脱着に関して

同様な挙動をすることは、立体選択的な分解がサリチオン分解菌の立体選択性に起因するという推定を支持した(第6章)。

そこで、牛久土壌を例にとりて、土壌中のサリチオン分解菌相の特徴を明らかにするとともに単離した分解菌によるサリチオンの分解経路を解明した(第4章)。さらに、高い分解能を持つ4種の細菌によるサリチオンの立体選択的な代謝・分解様式を明らかにし(第7章)、また、それらの分解菌の基質特異性についても検討を加えた(第8章)。

その結果、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全菌数に対して、それぞれ14, 44および16%と多数存在していることが明らかとなり、サリチオンが土壌中で速やかに分解した結果とよく対応した。

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<sup>81-90)</sup>、農薬を土壌に添加したときの土壌中における農薬分解菌の挙動を2種類の型に分類することができる。1つは農薬の添加以前には比較的少数の分解菌が土壌中に存在しているだけであるが、農薬が土壌に添加されるとそれらは急速に増加し、農薬もそれに伴い急速に分解される型のもので、除草剤の2,4-D<sup>81-86)</sup>、MCPA<sup>86)</sup>、ベンチオカーブ<sup>87,88)</sup>およびイソウロン<sup>90)</sup>の分解菌がこの型の特徴を持つ。このような型の分解菌として単離された微生物には薬剤を資化して増殖できるものが多いこともそれらの特徴である。また、添加された農薬は数日間の誘導期の後、急速に分解される場合が多い。他の1つは、農薬を土壌に添加する以前から、多くの割合の微生物が分解能を有し、農薬の添加によっても分解菌数は増加しない型のもので、除草剤モリネートの分解菌がこの型であることが報告されてい

る<sup>99)</sup>。前者の型の分解菌とは異なり、単離されたモリネート分解菌はいずれも他のエネルギー源を添加してはじめて分解するコマタボリズム<sup>96,97)</sup>によりモリネートを分解した。また、土壌に添加されたモリネートは、誘導期がなく急速に分解した。

本研究で得られた結果から、サリチオン分解菌が後者の型の特徴を持つことが明らかとなった。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<sup>94,95)</sup>ことから、サリチオン分解菌が土壌中に数多く生息し、多種類の微生物種にわたっていることが認められたことは、サリチオン分子の化学構造の一部と類似した構造を持つ天然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ためであると推定した。しかし、サリチオンと同じ有機リン殺虫剤のパラチオンの場合には、水田土壌中における分解菌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1g当り $4 \times 10^9$ MPNにまで増加した例が報告されている<sup>93)</sup>。ベンチオカーブとモリネートが同じチオカーバメート剤であってもそれらの分解菌相の特徴が異なっているのと同様に、同じ有機リン剤であるサリチオンとパラチオンの分解菌相も別の型に属することを考えると、土壌中において分解菌がどのような挙動をとるかは、添加される農薬の分類上での基本構造ではなく、個々の農薬に依存することが示唆される。

培養液中に認められた分解生成物から、牛久土壌から単離したほとんどのサリチオン分解菌(細菌、放線菌および糸状菌)が、サリチオンを脱メチル化、 $P-O$ -アリールおよび $P-O$ -アラルキル結合の開裂により分解することが明らかとなった。また、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（第4章）においてはM-1 (O-methyl O-(2-hydroxymethyl-phenyl) hydrogen phosphorothioate) およびM-2 (O-methyl O-(2-hydroxybenzyl) hydrogen phosphorothioate) が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新しく検出された。このことは、それら代謝物が、土壤中においては速やかに分解されるか、または土壤粒子に強く吸着されるためであると推定した。

土壤中での分解試験と微生物による分解試験の結果で大きく異なるもう1つの点は、土壤中においては $^{14}\text{C}$ -サリチオンの $^{14}\text{CO}_2$ への無機化が認められたのに対し、単離し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ことである。単離した分解菌はサリチオンの分解により生成するサリチルアルコールまたはサリチル酸を開環して代謝することができなかつたためであるが、微生物による芳香族化合物の代謝に関してはこれまで多数報告されており<sup>72-76)</sup>、土壤中には生成したこれらの芳香族化合物を $\text{CO}_2$ にまで代謝する多くの微生物が存在していることが容易に推定できる。以上のことから、サリチオンは土壤中では多種類の微生物の働きにより $\text{CO}_2$ にまで無機化されるものと推定した。

サリチオンの土壤中における分解試験の結果（第3章および第5章）から、土壤中のサリチオンはおもに土壤微生物により分解され、その際(S)<sub>p</sub>体が選択的に分解されることが示唆されたので、単離した分解菌の中で高い分解活性を持つ4株の細菌についてサリチオン光学異性体の代謝様式を明らかにし、土壤中での選択的分解と分解菌の関係を解明しようとした（第7章）。

Acinetobacter sp. (B-60) および Agrobacterium sp. (B-7, B-15)

およびB-17)が単離したサリチオン分解菌の中では高い分解活性を有していた。それぞれの培養液中の分解生成物を同定・定量した結果、Acinetobacter sp. (B-60)の高い分解活性は高い脱メチル化活性に起因し、Agrobacterium sp. (B-7, B-15およびB-17)の高い分解活性は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が明らかとなった。

これらの分解菌によるサリチオンの代謝様式を光学異性体間で比較すると、それぞれの菌は個々に特有な立体特異性を有することが明らかとなった。

すなわち、B-7は(S)<sub>p</sub>体を(R)<sub>p</sub>体より3倍速く分解し、その立体選択性はB-7が(S)<sub>p</sub>体サリチオンのP-O-アリアルおよびP-O-アラルキル結合を選択的に開裂することに起因していた。

B-15はP-O-アリアルおよびP-O-アラルキル結合の開裂によりサリチオンを代謝したが、両光学異性体を同様な速度で代謝し、代謝生成物の割合も両異性体間で同じであった。

B-17は(S)<sub>p</sub>体を(R)<sub>p</sub>体より3.5倍速く分解し、サリチオンのそれぞれの光学異性体を異なる様式で代謝した。(S)<sub>p</sub>体サリチオンの主代謝経路がP-O-アリアルおよびP-O-アラルキル結合の開裂であったのに対し、脱メチルサリチオンを生成するサリチオンの脱メチル化が(R)<sub>p</sub>体の主代謝経路であった。

B-60はサリチオンの両光学異性体を速やかに代謝したが、それらの代謝経路はB-17のように光学異性体間で異なっていた。しかし、それぞれの光学異性体に対する代謝様式はB-17によるものとは反対で、(S)<sub>p</sub>体を脱メチル化により、(R)<sub>p</sub>体をP-O-アリアルおよびP-O-アラルキル結合の開裂により代謝した。

単離した菌株によるサリチオンの分解, 脱メチル, P-O-アリアルおよびP-O-アラルキル結合の開裂における立体選択性を Table 9-1 に示す.

Table 9-1 Stereoselectivity in degradation, desmethylation, and ester cleavages of salithion by isolated soil microorganisms.

Isolates <sup>a)</sup>	Degradation	Desmethylation	Ester cleavages
B-7	( <u>R</u> ) <sub>R</sub> < ( <u>S</u> ) <sub>R</sub>	- <sup>b)</sup>	( <u>R</u> ) <sub>R</sub> < ( <u>S</u> ) <sub>R</sub>
B-15	( <u>R</u> ) <sub>R</sub> = ( <u>S</u> ) <sub>R</sub>	-	( <u>R</u> ) <sub>R</sub> = ( <u>S</u> ) <sub>R</sub>
B-17	( <u>R</u> ) <sub>R</sub> < ( <u>S</u> ) <sub>R</sub>	( <u>R</u> ) <sub>R</sub> > ( <u>S</u> ) <sub>R</sub>	( <u>R</u> ) <sub>R</sub> < ( <u>S</u> ) <sub>R</sub>
B-60	( <u>R</u> ) <sub>R</sub> ≧ ( <u>S</u> ) <sub>R</sub>	( <u>R</u> ) <sub>R</sub> < ( <u>S</u> ) <sub>R</sub>	( <u>R</u> ) <sub>R</sub> > ( <u>S</u> ) <sub>R</sub>

a) B-7, B-15 and B-17 were *Agrobacterium* sp., and B-60 was *Acinetobacter* sp.

b) weak or no ability.

微生物が有機化合物を立体選択的に代謝する例はこれまで数多く報告されており<sup>127, 128)</sup>, 生体異物の代謝に限らず生体内の代謝反応を考えれば有機化合物の微生物による変換が立体選択的に進行することはあるいは当然かもしれない。しかし, 1菌株が1組の光学異性体をそれぞれ異なった様式で代謝した例はこれまでに報告されていない。本研究で単離した2菌株のサリチオン分解菌(B-17およびB-60)がサリチオンのそれぞれの光学異性体を異なった様式で代謝し, しかも, それらの立体選択的な代謝様式が2菌株間で逆であったことはこれまでに例がなく, きわめて興味深い。また, 単離し



た4株の分解菌がサリチオンを分解する際に、それぞれ異なった立体特異性を有していたことも土壤微生物相の多様性を示して興味深い。

土壤中におけるサリチオン光学異性体の分解試験(第5章)の結果から、土壤中では(S)<sub>p</sub>体がより速く分解することが明らかとなったが、この立体選択性は高い分解活性を持つ分解菌がサリチオンを代謝する際の立体選択性、すなわち、4株の分解菌のうち3株が(S)<sub>p</sub>体をより速く分解したこととよく一致した。

しかし、1)実験室内の培地培養条件下で測定された分解菌の分解活性等の性質が、栄養条件や水分条件の異なる土壤環境中でどれほど機能しているかが不明である、2)土壤微生物の全てが特定の培地上でコロニーを形成しないため、土壤から単離された分解菌が土壤中の分解菌相をどれほど代表しているかが不明である、といった点から、単離したサリチオン分解菌に見いだされた性質が必ずしもサリチオンの土壤中における分解挙動に反映しているものではないことを考慮しておく必要がある。以上の2点は今後に残された大きな研究課題であり、本研究で扱ったサリチオン分解菌についても解明していくことが必要であると考える。

本研究で単離したサリチオン分解菌は、立体特異的な代謝様式によりサリチオンを脱メチル、P-O-アリールおよびP-O-アラルキル結合の開裂により分解したが(第7章)、分解菌による代謝反応はサリチオンの光学的な立体構造に対して特異的であるだけでなく、サリチオンの化学構造に対しても特異性が高いことが明らかとなった(第8章)。

B-17およびB-60によるサリチオンの脱メチル化反応は立体特異的

で、前者の株は(R)<sub>p</sub>体のみを脱メチルしたのに対して、後者の株は(S)<sub>p</sub>体のみを脱メチルした。さらにこれらの分解菌は、有機リン殺虫剤のフェニトロチオン、シアノホスの脱メチル化およびパラチオンの脱エチル化に対してはほとんど活性を有していなかった。以上の結果から、両分解菌の持つ脱メチル化酵素の立体特異性はかなり高いことを推定した。

単離した4株全ての分解菌がサリチオンを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が、フェニトロチオン、パラチオンおよびシアノホスのP-O-アリアル結合の開裂に対しては弱い活性しか示さなかった。以上の結果から、分解菌の持つエステル加水分解酵素の立体特異性も高いことを推定した。

有機リン殺虫剤分解菌または分解酵素を用いた最近の研究<sup>144-146)</sup>は、それらがジアルキルチオリン酸に対して広い基質特異性を有していることを報告している。これに対して、単離したサリチオン分解菌は、フェニトロチオン、パラチオンおよびシアノホスの分解に対しては弱い活性しかなく、分解菌の持つ分解酵素が、環状の有機リン殺虫剤であるサリチオンにかなり特異的で、前述したリン酸エステル加水分解酵素とは基質特異性の点において異なっているものと推定した。

サリチオンはフェニトロチオンやマラチオンに抵抗性のイエバエやネダニに対しても卓効を有していることが報告されている<sup>147-149)</sup>。Shiotsukiら<sup>150)</sup>は、そのメカニズムとしてイエバエが持つグルタチオン-S-トランスフェラーゼの脱メチル化活性(解毒代謝活性)がサリチオンに対して低いことを報告した。このような各種酵素の高い選択性は、サリチオンの独特な環状構造に起因するもの

と推定した。

単離され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<sup>23)</sup>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-O-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=O 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が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。

本研究およびこれまでに報告された動植物による代謝試験<sup>23)</sup>および光による分解試験<sup>24)</sup>の結果から推定したサリチオンの代謝・分解過程の概略をFig. 9-1にまとめた。

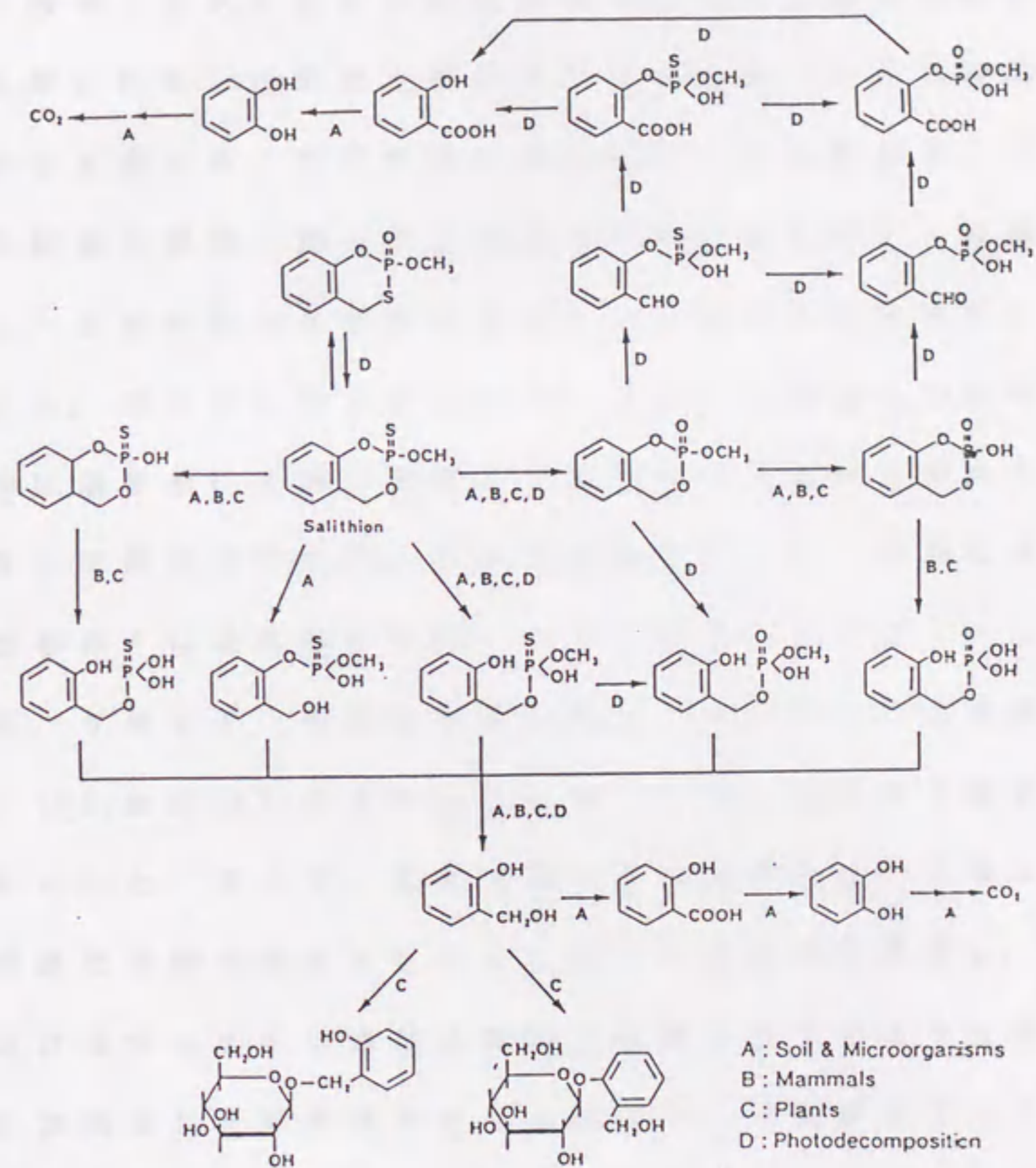


Fig. 9-1 Proposed degradation pathways of salithion in the environment.

#### 第4節 要約

本研究では殺虫剤サリチオンの畑地土壤中における消失速度、消失要因および分解生成物を明らかにすることにより、土壤環境中におけるサリチオンの挙動について考察し、以下のように推定した。

土壤に到達したサリチオンはそのほとんどが土壤微生物の攻撃を受けて分解される。火山灰土壤の場合には土壤への不可逆的な吸着も少なからず起こる。サリチオンはP-O-アリアル結合およびP-O-アルキル結合の開裂、脱メチル化およびP=SからP=Oへの酸化を経て分解し、生成するサリチルアルコール、脱メチルサリチオン、サリオクソン、脱メチルサリオクソン、サリチル酸およびそれらの分解生成物は速やかに土壤に吸着して未抽出土壤残渣を形成するかまたはさらに分解を受けてCO<sub>2</sub>にまで無機化される。形成した未抽出土壤残渣も徐々に最終的にはCO<sub>2</sub>にまで無機化される。

続いて、サリチオンの両光学異性体の土壤中における分解挙動を比較し、(S)<sub>P</sub>体が(R)<sub>P</sub>体よりも1.5～1.7倍の速さで分解することを明らかにした。そこで、滅菌土壤中での挙動および土壤との吸脱着を光学異性体間で比較することによりその要因を考察し、土壤環境中におけるサリチオン光学異性体の挙動を以下のように推定した。

土壤に添加された両異性体は、土壤粒子との吸着平衡により土壤粒子に吸着する画分と土壤水に溶解する画分に分配して存在するが、その割合は光学異性体間で差がない。また、一部は不可逆的に土壤に吸着したり（特に火山灰土壤の場合）、化学的に分解したりするが、これらの反応も光学異性体間で同様に進行する。添加されたサリチオン光学異性体の大部分は土壤微生物により分解されるが、その際、(S)<sub>P</sub>体が(R)<sub>P</sub>体よりも1.5～1.7倍速く分解される。分解が

速い(S)<sub>p</sub>体を添加した土壤ではより多くの未抽出土壤残渣が形成される。

さらに、サリチオンの土壤中での分解に大きな役割を果たしているサリチオン分解菌を単離し、分解菌相の特徴を明らかにするとともに単離した分解菌による代謝経路を明らかにした。また、高分解能を持つ4株の細菌によるサリチオンの代謝における速度および経路を光学異性体間で比較することにより、単離した4株の分解菌がサリチオンを分解する際に、それぞれ異なった立体特異性を有していることを明らかにした。本研究で明らかにしたサリチオン分解菌の代謝における立体特異性から、サリチオンの土壤中における立体選択的な分解挙動について考察した。また、他の有機リン殺虫剤（フェニトロチオン、パラチオンおよびシアノホス）の代謝との比較から、分解菌による代謝反応はサリチオンの光学的な立体構造に対して特異的であるだけでなく、サリチオンの化学構造に対しても特異性が高いことが明らかとなり、このような高い基質特異性はサリチオンの独特な環状構造に起因するものと推定した。

本研究およびこれまでに報告されたサリチオンの動植物による代謝試験および光による分解試験の結果から、環境中に放出されたサリチオンの代謝・分解経路を推定した。

農薬は病虫害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。その結果、農薬が多量に環境中に放出され、そ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、農薬を有効かつ安全に使用するためにも農薬の土壌環境中における挙動を解明することは重要な研究課題である。

このような観点から、農薬の環境中における分解挙動に関する研究は膨大な数に及んでいるが、これまでに光学活性な農薬の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。多くの光学活性体はその生理活性において立体特異性をもつことが知られていることから、このような農薬が環境中に放出される場合には、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。

本研究では分子内に不斉リン原子を持つ環状有機リン殺虫剤サリチオンの $^{14}\text{C}$ 標識体を用いて、土壌中および土壌微生物による立体選択的な代謝・分解過程を明らかにした。研究結果の要約を以下に示す。

## 1. サリチオンの畑地土壤中における分解 (第3章)

- (1)  $^{14}\text{C}$ -サリチオンは成因の異なる2種類の日本の畑地土壤中において、3日以内の半減期で速やかに消失し、最終的に、一部は $^{14}\text{CO}_2$ にまで無機化され、一部は未抽出土壌残渣を形成した。未抽出土壌残渣も徐々に減少し、最終的には $^{14}\text{CO}_2$ にまで無機化された。
- (2) 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。それらの分解生成物も速やかに消失し土壌中に蓄積することにはなかった。
- (3) 滅菌土壌中で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土壌微生物(サリチオン分解菌)が大きな役割を果たしていることが示唆された。
- (4) 牛久土壌(火山灰黒ボク土)におけるサリチオンの消失には非生物的な未抽出土壌残渣の形成も関与していることが示唆された。

## 2. 土壌中のサリチオン分解菌相の特徴 (第4章)

- (1) 牛久畑地土壌中から単離した細菌、放線菌および糸状菌のそれぞれ14.44および16%がサリチオンを分解した。
- (2) いずれの分解菌もサリチオンをコマタボリズムにより分解し、サリチオンを単一炭素源として増殖できなかったが、いくつかの菌はサリチオンを単一リン源として利用した。



(3) 分解菌はサリチオンを脱メチル化,  $\underline{P}$ - $\underline{O}$ -アリールおよび $\underline{P}$ - $\underline{O}$ -アラルキル結合の開裂により分解した。分解生成物として脱メチルサリチオン, サリチルアルコール, およびサリチル酸が検出された。これらに加えて, 土壌中では検出できなかった分解生成物として,  $\underline{O}$ -methyl  $\underline{O}$ -(2-hydroxymethylphenyl) hydrogen phosphorothioate および  $\underline{O}$ -methyl  $\underline{O}$ -(2-hydroxybenzyl) hydrogen phosphorothioate を同定した。

(4) 単離した分解菌の中で, 4株の細菌が高い活性を有していた。放線菌および糸状菌の中には次に示すような高い分解能を持つ菌は存在しなかった。

(5) 分解菌の中で, Acinetobacter sp. (B-60)が最も高い分解能を有し, 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。

(6) 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 $\underline{P}$ - $\underline{O}$ -アリール結合の開裂に高い活性を有していた。

### 3. サリチオンの畑地土壌中における立体選択的分解 (第5章)

(1) ラセミ体のサリチオン [ $(\underline{R})_P / (\underline{S})_P = 46 / 54$ ] を牛久および野市の畑地土壌に添加し保温静置すると, いずれの土壌からも $(\underline{R})_P$ 体の割合が高いサリチオン [ $(\underline{R})_P / (\underline{S})_P = 75 / 25 \sim 69 / 31$ ] が回収された。これに対し, 滅菌土壌からは添加したラセミ体が回収された。

- (2) (R)<sub>P</sub>体と(S)<sub>P</sub>体を個々に添加すると、(S)<sub>P</sub>体が(R)<sub>P</sub>体よりも1.5～1.7倍の速さで分解した。滅菌土壤中では分解が大きく抑制されるとともに非滅菌土壤中では認められた光学異性体間の分解速度の差が認められなかった。
- (3) 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が、それら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できなかった。
- (4) (S)<sub>P</sub>体がより速く分解した結果として、(S)<sub>P</sub>体を添加した土壤により多量の未抽出土壤残渣<sup>14</sup>Cが認められた。
- (5) サリチオンのそれぞれの光学異性体のエピマー化は土壤中では起こらなかった。

#### 4. サリチオン光学異性体の土壤との吸脱着 (第6章)

- (1) 6時間の振とうで、サリチオン(0.1ppm水溶液)の52.6～53.9%が牛久土壤に吸着し、39.8～41.5%が野市土壤に吸着した。これら土壤への吸着量およびその経時変化にサリチオンのラセミ体および光学異性体間で大きな差はなかった。
- (2) 6時間の振とうでサリチオンを吸着させた土壤から蒸留水でサリチオンを脱着させると、牛久土壤では30分間の振とうで吸着したサリチオンの7.9～10.8%が、野市土壤からは9.6～10.9%のサリチオンが脱着した。両土壤からの脱着量およびその経時変化にサリチオンのラセミ体および光学異性体間で大きな差はなく同様な挙動をとることが認められた。

5. 土壌から単離した Agrobacterium sp. および Acinetobacter sp. によるサリチオンの立体選択的代謝・分解 (第7章)

(1) Agrobacterium sp. (B-7) はサリチオンの (S)<sub>P</sub> 体を (R)<sub>P</sub> 体よりも 3.1 倍速く分解し, その立体選択性は P-0-アリールおよび P-0-アラルキル結合の立体選択的開裂に起因していた.

(2) Agrobacterium sp. (B-15) は両光学異性体を同様な速度および代謝様式で分解した.

(3) Agrobacterium sp. (B-17) は (S)<sub>P</sub> 体を (R)<sub>P</sub> 体よりも 3.5 倍速く分解し, 光学異性体間で異なる代謝様式を有していた. すなわち, (S)<sub>P</sub> 体では P-0-アリールおよび P-0-アラルキル結合の開裂が主代謝経路であったのに対し, (R)<sub>P</sub> 体では脱メチル化が主代謝経路であった.

(4) Acinetobacter sp. (B-60) は両光学異性体をすみやかに分解したが, それらの代謝様式は光学異性体間で異なっていた. また, B-60の代謝反応における立体特異性は, B-17のものとは逆であった. すなわち, (S)<sub>P</sub> 体を脱メチル化により代謝し, (R)<sub>P</sub> 体を P-0-アリールおよび P-0-アラルキル結合の開裂により代謝した.

(5) サリチオン分解菌によるサリチオン光学異性体のエピマー化は認められなかった.

6. 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 (第8章)

- (1) サリチオンを  $P-O$ -アリールおよび  $P-O$ -アラルキル結合の開裂, および脱メチル化により分解する3株の *Agrobacterium* sp. および1株の *Acinetobacter* sp. は, フェニトロチオン, パラチオンおよびシアノホスの  $P-O$ -アリールおよび  $P-O$ -アルキル結合の開裂においてほとんど活性を示さないか弱い活性しか示さず, これらの有する分解関連酵素は高い基質特異性を持つことが示された.
- (2) *Acinetobacter* sp. は, フェニトロチオンおよびパラチオンのニトロ基のアミノ基への還元と, それに引き続くアミノ基のアセチル化に弱い活性を有していた.
- (3) *Agrobacterium* sp. はシアノホスのシアノ基をカルバモイル体を経てカルボキシル体に変換する2段階の反応によりシアノホスを代謝した.

謝 辞

本研究を行うにあたり、終始懇切なるご指導、ご校閲の労を賜りました名古屋大学農学部教授、歟塚昭三博士に深く感謝の意を表します。また、研究の遂行にあたり多大なるご援助を賜った住友化学工業株式会社、生物環境科学研究所、山田宏彦所長および有益なるご助言、ご鞭撻を賜った同研究所、三上信可博士、南部健二主任研究員、片木敏行博士ならびに格別なるご支援を賜った同研究所環境科学研究室の研究員の方々に深く感謝致します。

引用文献

- 1) 農林水産省農蚕園芸局植物防疫課監修：農薬要覧 1990年版，日本植物防疫協会，1990
- 2) D. D. Kaufman, G. G. Still, G. D. Paulson & S. K. Bandal (ed.): "Bound and Conjugated Pesticide Residue," American Chemical Society, Washington, D. C., 1976
- 3) R. Haque & V. H. Freed (ed.): "Environmental Dynamics of Pesticides," Plenum Press, New York and London, 1975
- 4) W. D. Guenzi (ed.): "Pesticides in Soil and Water," Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, 1974
- 5) C. A. I. Goring & J. W. Hamaker (ed.): "Organic Chemicals in the Soil Environment," Vol.1 and 2, Marcel Dekker, New York, 1972
- 6) P. C. Kearney & D. D. Kaufman (ed.): "Degradation of Herbicides," Marcel Dekker, New York, 1969
- 7) 鉄塚昭三：農薬－デザインと開発指針，山本 出・深見順一編，ソフトサイエンス社，p.539，1979
- 8) 鉄塚昭三：農薬－デザインと開発指針，山本 出・深見順一編，ソフトサイエンス社，p.1082，1979
- 9) 鉄塚昭三：微生物の生態（5）－環境汚染をめぐる，微生物生態研究会編，学会出版センター，P.65，1977

- 10) N. Sethunathan, R. Siddaramappa, K. P. Rajaram, S. Barik & P. A. Wahid: Residue Rev. 68, 91 (1977)
- 11) 高瀬 巖: 植物防疫, 30, 302 (1976)
- 12) 上杉康彦, 塚野 豊, 松中昭一, 里見朝正, 宮本純之: 化学生態学の展望, 日本化学会編, 東京大学出版会, p.57, 1973
- 13) C. S. Helling, P. C. Kearney & M. Alexander: Adv. in Agronomy 23, 147 (1971)
- 14) P. C. Kearney & C. S. Helling: Residue Rev. 25, 25 (1969)
- 15) 江藤守総: 農薬の生有機化学と分子設計, 江藤守総編, ソフトサイエンス社, p.3, 1985
- 16) M. Eto: "Organophosphorus Pesticides: Organic and Biological Chemistry," CRC Press, Cleveland, Ohio, 1974
- 17) C. A. I. Goring, D. A. Laskowski, J. W. Hamaker & R. W. Meikle: "Environmental Dynamics of Pesticides," ed. by R. Haque & V. H. Freed, Plenum Press, New York and London, p.135, 1975
- 18) D. E. Armstrong & J. G. Konrad: "Pesticides in Soil and Water," ed. by W. D. Guenzi, Soil Science Society of America, Madison, Wis., p.123, 1974
- 19) J. W. Hamaker: "Organic Chemicals in the Soil Environment," Vol.1, ed. by C. A. I. Goring & J. W. Hamaker, Marcel Dekker, New York, p.253, 1972
- 20) 江藤守総: 日本農薬学会誌, 6, 365 (1981)

- 21) M. Eto: Rev. Plant Protec. Res. 9, 1 (1976)
- 22) M. Eto, Y. Kinoshita, T. Kato & Y. Oshima: Nature 200,  
171 (1963)
- 23) K. Mihara & J. Miyamoto: Agric. Biol. Chem. 38, 1913  
(1974)
- 24) N. Mikami, H. Ohkawa & J. Miyamoto: J. Pesticide Sci.  
2, 279 (1977)
- 25) 環境庁土壤農薬課編: 農薬登録保留基準設定調査Ⅱ (1974),  
IV (1975)
- 26) 宮崎昭雄: 生物と化学, 25, 56 (1987)
- 27) 佐々木 満: 農薬の生有機化学と分子設計, 江藤守総編, ソ  
フトサイエンス社, p.210, 1985
- 28) H. Ohkawa: "Insecticide Mode of Action," ed. by J. R.  
Coats, Academic Press, New York, p.163, 1982
- 29) 大川秀郎: 日本農芸化学会誌, 52, 263 (1978)
- 30) 大川秀郎: 日本農薬学会誌, 1, 325 (1976)
- 31) S. -Y. Wu, A. Hirashima, M. Eto, K. Yanagi, E.  
Nishioka & K. Moriguchi: Agric. Biol. Chem. 53, 157  
(1989)
- 32) A. Hirashima & M. Eto: Agric. Biol. Chem. 47, 2831  
(1983)
- 33) A. Hirashima, I. Ishaaya, R. Ueno, Y. Ichiyama, S. -Y.  
Wu & M. Eto: Agric. Biol. Chem. 53, 175 (1989)
- 34) L. Crane & M. Zief (ed.): "Chromatographic Chiral  
Separation," Marcel Dekker, New York, 1988



- 35) Y. Okamoto, S. Honda, I. Okamoto, & H. Yuki: J. Am. Chem. Soc. 103, 6971 (1981)
- 36) D. Hartley & H. Kidd (ed.): "The Agrochemicals Handbook," The Royal Society of Chemistry, England, 1983
- 37) 富沢長次郎, 上路雅子編: 最新農薬データブック, ソフトサイエンス社, 1982
- 38) M. Sasaki, T. Ooishi, T. Kato, C. Takayama & K. Mukai: J. Pesticide Sci. 9, 737 (1984)
- 39) 江藤守総: 新農薬創製法, 山本亮・野口照久編, 南江堂, p. 50, 1965
- 40) N. K. Van Alfen & T. Kosuge: J. Agr. Food Chem. 22, 221 (1974)
- 41) J. Miyamoto, K. Kitagawa & Y. Sato: Jap. J. Exptl. Med. 36, 211 (1966)
- 42) K. Itoh: J. Pesticide Sci. 15, 561 (1990)
- 43) C. A. Edwards: "Organic Chemicals in the Soil Environment," Vol.2, ed. by C. A. I. Goring & J. W. Hamaker, Marcel Dekker, New York, p.513, 1972
- 44) C. R. Harris & J. L. Hitchon: J. Econ. Entomol. 63, 2 (1970)
- 45) C. R. Harris: J. Econ. Entomol. 62, 1437 (1969)
- 46) P. C. Kearney, R. G. Nash & A. R. Isensee: "Chemical Fallout," ed. by M. W. Miller & G. G. Berg, Charles C Thomas, Springfield, Ill., p.54, 1969

- 47) C. A. Edwards: Residue Rev. 13, 83 (1966)
- 48) J. R. W. Miles, C. M. Tu & C. R. Harris: Bull. Environ. Contam. Toxicol. 22, 312 (1979)
- 49) N. Sethunathan & I. C. McRae: J. Agr. Food Chem. 17, 221 (1969)
- 50) N. Sethunathan & T. Yoshida: J. Agr. Food Chem. 17, 1192 (1969)
- 51) L. W. Getzin: J. Econ. Entomol. 61, 1560 (1968)
- 52) L. W. Getzin & I. Rosefield: J. Agric. Food Chem. 16, 598 (1968)
- 53) N. Sethunathan: J. Agr. Food Chem. 21, 602 (1973)
- 54) N. Sethunathan & T. Yoshida: J. Agr. Food Chem. 21, 504 (1973)
- 55) R. M. Sacher, G. F. Ludwik & J. M. Deming: J. Econ. Entomol. 65, 329 (1972)
- 56) E. P. Lichtenstein, T. W. Fuhremann & K. R. Schlz: J. Agr. Food Chem. 16, 870 (1968)
- 57) H. L. Bohn, B. L. McNeal & G. A. O'connor: "Soil Chemistry," A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, New York, p122, 1985
- 58) 日本土壤肥料学会編: 火山灰土 - 生成・性質・分類 -, 博友社, 1983
- 59) 鉄塚昭三: 土壌の吸着現象 - 基礎と応用 -, 日本土壤肥料学会編, 博友社, p.129, 1981
- 60) S. Aomine & H. Otsuka: Trans. Int. Congr. Soil Sci.,

- 9th, Vol. 1, 731 (1968)
- 61) G. W. Bailey & J. L. White: J. Agr. Food Chem. 12, 324 (1964)
- 62) A. Felsot & P. A. Dahm: J. Agr. Food Chem. 27, 557 (1979)
- 63) P. A. Wahid & N. Sethunathan: J. Agr. Food Chem. 26, 101 (1978)
- 64) R. Haque: "Environmental Dynamics of Pesticides," ed. by R. Haque & V. H. Freed, Plenum Press, New York and London, p.97, 1975
- 65) J. B. Weber & S. B. Weed: "Pesticides in Soil and Water," ed. by W. D. Guenzi, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, p.223, 1974
- 66) S. B. Weed & J. B. Weber: "Pesticides in Soil and Water," ed. by W. D. Guenzi, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, p.39, 1974
- 67) R. S. Adams Jr.: Residue Rev. 47, 1 (1973)
- 68) 鉄塚昭三: 植物の化学調節, 8, 72 (1973)
- 69) S. Saltzman, L. Kliger & B. Yaron: J. Agr. Food Chem. 20, 1224 (1972)
- 70) J. W. Hamaker & J. M. Thompson: "Organic Chemicals in the Soil Environment," Vol.1, ed. by C. A. I. Goring & J. W. Hamaker, Marcel Dekker, New York, p.49, 1972
- 71) G. W. Bailey & J. L. White: Residue Rev. 32, 29 (1970)
- 72) R. W. Meikle: "Organic Chemicals in the Soil

- Environment," Vol.1, ed. by C. A. I. Goring & J. W. Hamaker, Marcel Dekker, New York, p.145, 1972
- 73) K. -M. Yen & I. C. Gunsalus: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 874 (1982)
- 74) 矢野圭司: 発酵工学, 56, 57 (1978)
- 75) A. M. Chakrabarty: J. Bacteriol. 112, 815 (1972)
- 76) D. T. Gibson: Science 161, 1093 (1968)
- 77) K. Itoh: J. Pesticide Sci. 16, 000 (1991)
- 78) C. M. Tu & J. R. W. Miles: Residue Rev. 64, 17 (1976)
- 79) I. C. MacRae: Rev. Environ. Contam. Toxicol. 109, 1 (1989)
- 80) D. D. Kaufman: "Pesticide in Soil and Water," ed. by W. D. Guenzi, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, p.133, 1974
- 81) N. Miwa & S. Kuwatsuka: Soil Sci. Plant Nutr. 36, 261 (1990)
- 82) S. Kuwatsuka & N. Miwa: Soil Sci. Plant Nutr. 35, 535 (1989)
- 83) E. R. I. C. Sandmann, M. A. Loos & L. P. van Dyk: Rev. Environ. Contam. Toxicol. 101, 1 (1988)
- 84) D. R. Cullimore: Weed Sci. 29, 440 (1981)
- 85) J. C. Fournier: Chemosphere 9, 169 (1980)
- 86) M. A. Loos, I. F. Schlosser & W. R. Mapham: Soil Biol. Biochem. 11, 377 (1979)
- 87) Y. H. Moon & S. Kuwatsuka: J. Pesticide Sci. 12, 11

- (1987)
- 88) 阿部洋, 飯塚昭三: 日本農薬学会講演要旨集, 4, 207  
(1979)
- 89) Y. Imai & S. Kuwatsuka: J. Pesticide Sci. 11, 57  
(1986)
- 90) M. Ozaki, Y. Tanaka & S. Kuwatsuka: J. Pesticide Sci. 11, 409 (1986)
- 91) 土壤微生物研究会編: 土壤微生物実験法, 養賢堂, p.21, 1981
- 92) N. R. Krieg: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology," Vol.1, Williams & Wilkins, Baltimore, London, 1984
- 93) S. Barik, P. A. Wahid, C. Ramakrishna & N. Sethunathan: J. Agric. Food Chem. 27, 1391 (1979)
- 94) G. Anderson: "Soil Biochemistry," Vol.1, ed. by A. D. McLaren & G. H. Peterson, Marcel Dekker, New York, p.67, 1967
- 95) D. J. Cosgrove: "Soil Biochemistry," Vol.1, ed. by A. D. McLaren & G. H. Peterson, Marcel Dekker, New York, p.216, 1967
- 96) R. S. Horvath: Bacteriol. Rev. 36, 146 (1972)
- 97) M. Alexander: "Agriculture and the Quality of our Environment," ed. by N. C. Brady, Amer. Assoc. Advan. Sci. Washington, D. C., p.331 1967
- 98) A. Rosenberg & M. Alexander: Appl. Environ. Microbiol.

37, 886 (1979)

- 99) A. M. Cook, C. G. Daughton & M. Alexander: Appl. Environ. Microbiol. 36, 668 (1978)
- 100) K. Itoh: J. Pesticide Sci. 16, 000 (1991)
- 101) M. Ueji & C. Tomizawa: J. Pesticide Sci. 11, 447 (1986)
- 102) R. Allahyari, J. G. Hollingshaus, R. L. Lapp, E. Timm, R. A. Jacobson & T. R. Fukuto: J. Agric. Food Chem. 28, 594 (1980)
- 103) A. A. Nomeir & W. C. Dauterman: Pestic. Biochem. Physiol. 10, 121 (1979)
- 104) P. W. Lee, L. Allahyari & T. R. Fukuto: Pestic. Biochem. Physiol. 8, 146 (1978)
- 105) H. Ohkawa, N. Mikami & J. Miyamoto: Agric. Biol. Chem. 42, 445 (1978)
- 106) H. Ohkawa, N. Mikami & J. Miyamoto: Agric. Biol. Chem. 41, 369 (1977)
- 107) H. Ohkawa, N. Mikami, Y. Okuno & J. Miyamoto: Bull. Environ. Contam. Toxicol. 18, 534 (1977)
- 108) H. Ohkawa, N. Mikami, A. Mine & J. Miyamoto: Agric. Biol. Chem. 39, 2265 (1975)
- 109) T. W. Holmsen: Weed Sci. 17, 187 (1969)
- 110) J. Miyamoto & N. Mikami: "Pesticide Chemistry, Human Welfare and the Environment," ed. by J. Miyamoto & P. C. Kearney, Vol.2, Pergamon Press, New York, p.193,

1983

- 111) D. W. Bewick: Pestic. Sci. 17, 349 (1986)
- 112) O. Wink & U. Luley: Pestic. Sci. 22, 31 (1988)
- 113) J. M. Bremner: "Soil Biochemistry," Vol.1, ed. by A. D. McLaren & G. H. Peterson, Marcel Dekker, New York, p.19, 1967
- 114) U. C. Gupta: "Soil Biochemistry," Vol.1, ed. by A. D. McLaren & G. H. Peterson, Marcel Dekker, New York, p.19, 1967
- 115) C. S. Helling: Residue Rev. 32, 175 (1970)
- 116) C. I. Harris & T. J. Sheets: Weeds 13, 215 (1965)
- 117) H. H. Funderburk Jr. & G. A. Bozarth: J. Agr. Food Chem. 15, 563 (1973)
- 118) A. Calderbank: Adv. in Pest Contr. Research. 8, 127 (1968)
- 119) J. J. Menn, G. G. Patchett & G. H. Batchelder: J. Econ. Entomol. 53, 1080 (1960)
- 120) K. Itoh: J. Pesticide Sci. 16, 000 (1991)
- 121) T. Shiotsuki, R. Takeya & M. Eto: Agric. Biol. Chem. 51, 1851 (1987)
- 123) T. Shishido & J. Fukami: Bull. Natl. Inst. Agric. Sci., Ser. C32, 1 (1978)
- 124) K. Usui & J. Fukami: Pestic. Biochem. Physiol. 7, 249 (1977)
- 125) T. Shishido & J. Fukami: Botyu-Kagaku 28, 69 (1963)

- 126) C. Donninger: Bull. Wld. Hlth. Org. 44, 265 (1971)
- 127) A. Miyazaki, M. Kawaradani, S. Marumo & C. Tomizawa:  
J. Pesticide Sci. 8, 115 (1983)
- 128) G. K. Skryabin & L. A. M. Golovleva: "Microorganisms  
in Organic Chemistry," Nauka, Moscow, 1976.
- 129) 前田英勝, 山崎幸苗, 大淵 薫, 梶原 茂: 不斉合成バイオ  
リアクター, 学会出版センター, 1988
- 130) K. Itoh: J. Pesticide Sci. 16, 000 (1991)
- 131) Y. Takimoto, M. Hirota, H. Inui & J. Miyamoto: J.  
Pesticide Sci. 1, 131 (1976)
- 132) N. Mikami, S. Sakata, H. Yamada & J. Miyamoto: J.  
Pesticide Sci. 10, 491 (1985)
- 133) M. Chiba, S. Kato & I. Yamamoto: J. Pesticide Sci. 1  
179 (1976)
- 134) A. Wakimura & J. Miyamoto: Agr. Biol. Chem. 35, 410  
(1971)
- 135) N. Mikami, H. Ohkawa & J. Miyamoto: J. Pesticide Sci.  
1, 273 (1976)
- 136) K. E. McBride, J. W. Kenny & D. M. Stalker: Appl.  
Environ. Microbiol. 52, 325 (1986)
- 137) D. B. Harper: Biochem. J. 167, 685 (1977)
- 138) A. E. Smith & D. R. Cullimore: Can. J. Microbiol. 20,  
773 (1974)
- 139) J. C. Hsu & N. D. Camper: Can. J. Microbiol. 22, 537  
(1976)



- 140) P. A. Collins & C. J. Knowles: J. Gen. Microbiol. 129,  
711 (1983)
- 141) J. M. Miller & C. J. Knowles: FEMS Microbiol. Lett.  
21, 147 (1984)
- 142) D. B. Harper: Biochem. J. 165, 309 (1977)
- 143) A. K. Bandyopadhyay, T. Nagasawa, Y. Asano, K.  
Fujishiro, Y. Tani & H. Yamada: Appl. Environ.  
Microbiol. 51, 302 (1986)
- 144) P. C. Kearney, J. S. Karns & W. W. Mulbry: "Pesticide  
Science and Biotechnology," ed. by R. Greenhalgh & T.  
R. Roberts, Blackwell Scientific Publications, London,  
p.591, 1987
- 145) A. Rosenberg & M. Alexander: Appl. Environ. Microbiol.  
37, 886 (1979)
- 146) D. M. Munnecke: Appl. Environ. Microbiol. 32, 7 (1976)
- 147) T. Shiotsuki & M. Eto: J. Pesticide Sci. 12, 17 (1987)
- 148) 下松明雄, 佐藤朋子, 林晃史, 加納六朗: 衛生動物, 30,  
255 (1979)
- 149) 桑原雅彦: 日本応用動物昆虫学会誌, 30, 290 (1986)
- 150) T. Shiotsuki, R. Takeya & M. Eto: Agr. Biol. Chem. 51,  
1851 (1987)

論文目錄

- 1) K. Itoh (1990). Degradation of Organophosphorus Insecticide Salithion in Soils. J. Pesticide Sci. 15, 561-566.
- 2) K. Itoh (1991). Stereoselective Degradation of Organophosphorus Insecticide Salithion in Upland Soils. J. Pesticide Sci. 16, 35-40.
- 3) K. Itoh (1991). Characteristics of Microflora Degrading Insecticide Salithion in Soil. J. Pesticide Sci. 16, 77-83.
- 4) K. Itoh (1991). Stereoselective Metabolism of Insecticide Salithion by Agrobacterium sp. and Acinetobacter sp. Isolated from Soil. J. Pesticide Sci. 16, 85-91.
- 5) K. Itoh (1991). Metabolism of Fenitrothion, Parathion and Cyanophos by Isolated Salithion-Degrading Bacteria from Soil. J. Pesticide Sci. 16, 97-100.