

農薬をめぐる土壤微生物の諸問題

東北大学農業研究所長 古 坂 澄 石

戦後の農業生産の安定化と発展は稲の生理的特性や土壤の化学的解析に負うと同時に、農薬による病虫害の防除や除草効果に負うところ大なるものがある。

しかしながら、その反面において、農薬の乱用によって残留農薬にもとづく人畜の被害や生物相の著しい変化がひき起こされ、又そのことによる二次的な各種の影響が問題とされ、工業および都市の諸種の排棄物汚染と相まって、人間の生存そのものがおびやかされる段階にいたっている。その一例として、 γ -BHCの施用量と残留に関する立川⁷⁴⁾の分析結果を示すことにする(図1,2参照)。施用量と残留量は、荒くみて比例関係をもっているように見受けられる。そして、残留については諸種の要因が複

雑にからみ合って、その量が決定されているものと推察される。

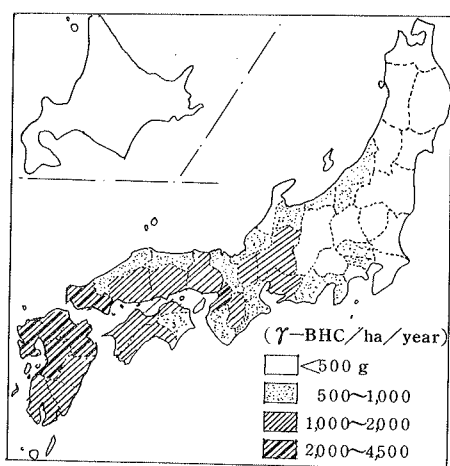


図1 γ -BHCの耕地面積1ha当りの年間使用量

(昭和43農業年度立川⁷⁴⁾による)

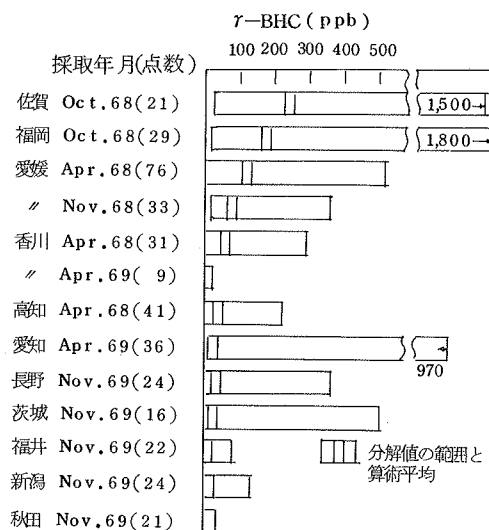


図2 水田土壤中の γ -BHC

(立川⁷⁴⁾による)

土壤に直接施用するくん蒸剤、除草剤や殺菌剤はもちろんのこと、作物の葉面に散布する殺虫剤の場合でも、その多くの部分は土壤に入るようになる。したがって、これらの農薬が土壤中でどのように移動し、どのような化学変化や微生物による分解を受けるか、また土壤中の生物相にどのような変化を与えるかを知ることには、上に述べた農薬によってひき起こされる変化の全体像を明らかにする上に欠くことのできない基礎を与えるものである。

このような考えの下に、農薬の残留、微生物相に与える影響、ならびに微生物による分解に

ついて述べることにする。

I 土壤に添加した農薬の移動とそれに関与する諸子

土壤中に入った農薬の移動は、土壤が成分的に複雑な内容を持ち、さらに構造的にもきわめて不均一であることに加えて、農薬の化学的諸性質も多様であることと相まって、非常に複雑な様相をとる。

これまで多くの研究者によって数多くの研究がなされてきたが、それらの間には互いに矛盾する結果も見られ、一般的な姿を描きだすことは困難である。その困難性の一端は、室内実験の結果を圃場に一般化することが困難なことからもうかがい知ることができる。Vaartaya¹⁾は室内実験で有効な14種の非揮発性殺菌剤を圃場に適用した場合、27回は発病を制御できたが、14回は失敗、20回は不明確な結果を得た。彼は不成功の理由の1つとして、毒物の作用を変化させる因子を軽視したことをあげている。しかしそれらの因子を明確にしようと努力したとしても解明には非常な困難をとまなうであろう。農薬の移動に関与するものとして検討されてきた諸要因には溶脱、拡散、吸着、揮発などがある。それらは決して単独に起こっているわけではなく、互に関連を保ちながら起こっている。

1. 溶脱 降雨によって土壤に大量の水があたえられると、土壤中を重力の作用によって自由に移動しうる重力水があたえられることになる。農薬の移動はこの水への農薬の溶解度、土壤コロイドの性質、土壤固相の幾何学的構造、および流速に主として関係する。そして水による農薬の移動が最も長距離の移動に関与する。水に対する溶解度が極端に低い除草剤である

Chlorinated hydrocarbon(aldrin, lindane, DDT)は17か月後においても60~95%が0~3インチの土層中にとどまっていた²⁾。

2. 揮散 揮散による移動は薬剤の揮発性、温度、および土壤の拡散抵抗に主として依存している。

3. 拡散 くん蒸剤の移動には拡散が最も主要な因子として働き、水の下降運動はそれほど大きく関係しない。水はむしろ土壤孔隙をせめたりふさいだりして、ガス孔隙を通しての拡散を阻害する形で働く。一般的にいて水中の拡散速度はガス中の拡散速度に比べて $1 \sim 0.3 \times 10^5$ 倍遅い。

4. 吸着 土壤は粘土や腐植のような無機および有機のコロイドを含んでいるので、その保有する界面は膨大な面積に達する。したがって土壤中の諸反応を考える場合、界面の影響を無視することはできない。前記の溶脱、揮散、および拡散を考える場合にも、必ず吸着現象を考慮に入れなければならない。

もし土壤粒子が薬剤分子を単分子層として吸着すると仮定するならば、Langmuirの等温吸着式に従い、濃度と吸着量は Γ 型の曲線を描くはずである。ところが乾燥土壤によるEDB(ethylene dibromide)の吸着の場合はS型の曲線を描く(図3参照)。そして、この曲線は薬剤分子が単分子層ではなく、van der Waals力によって多分子層として吸着すると仮定することによって理解でき、その意味でBET平衡式を適用することができる。

吸着に関与する土壤成分の主体は土壤有機物と粘土であり、前者が特に重要である。Call⁴⁾は粗砂から粘土および重泥炭土に至る20種類の土壤を用いて、水分含量を圃場溶水量に等しくし、EDBの吸着を検討した。その結果の一部

を図4に示したが、土壌有機物が吸着に特に重要な役割りを演じていることが示されている。それと同時に水分含量および土壌の全表面積が重要な関係を持ち、粘土はそれより低い役割りを演じている。

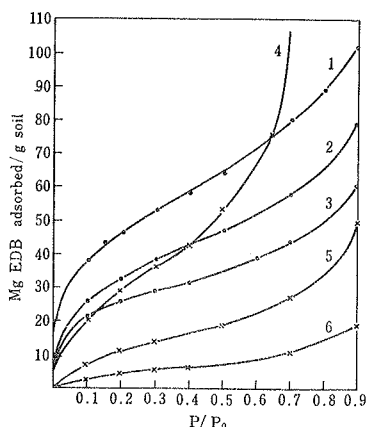


図3 各種土壌によるEDBの吸着
土壌の種類：モンモリロナイト系
1. Yolo Silty Clay
2. Meloland Clay Loam
3. Yolo Loam
カオリンおよびイライト系
4. Aiken Clay Loam
5. Staten Peat Muck
6. Hanford Sandy Loam
P：測定時のEDBの分圧、P₀：EDBの飽和圧。
(Jurniak と Volman⁹⁾ による)

水分含量と吸着との関係は、さらにくわしく検討された⁶⁾ 10%以下の水分含量の時は水分分子はEDB分子と拮抗して置換する。10～20%以上になって水の単分子層が完成されると、おそらくEDBは水の層の上に吸着される。そして圃場容水量近くの水分含量になると、水はbulk waterの性質を帯び、この水へのEDBの溶解が著しく高まる。

また、Ca-montmorilloniteの場合非常に興味あることは水分含量が5～10%のとき、0%に比べて吸着されたEDB量が著しく高くなることである。これは、この粘土は乾燥状態のと

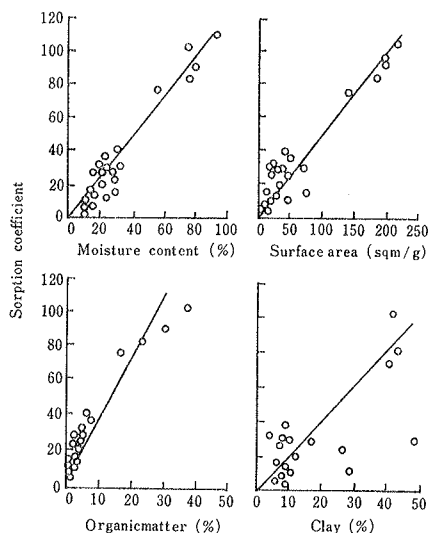


図4 吸着係数と水分含量、表面積、有機物含量、粘土含量との関係
吸着係数(sorption coefficient)は等温吸着直線の傾斜(Call¹⁰⁾による)

きはlattice間隔が3Åであったものが、5～10%の水分含量のとき中の層が膨潤してlattice間隔が9Åとなり、水とともにEDBがlattice層間に入ったことを示している。このような現象はkaoliniteやilliteのような1:1型粘土では起らず、montmorilloniteのような2:1型粘土の特性である。

一度lattice間に入ったEDBは再び粘土が乾燥するとlattice間に封じ込まれた形となり、このことがEDBが長期間土壌中に保持される原因の1つと考えられる⁶⁾。

吸着に影響をあたえる因子としてpHがある。低pH(4前後)ではすべての薬剤は非常に強く吸着されるが弱アルカリ性においては陰イオン化合物は負に吸着され、また非イオン性化合物は弱く吸着される。たとえばchlorazin, trietozine, simazineはsodium montmorilloniteによつて、pH4以下では非常によく吸着されるが、pH9で

は著しく減少し、pH8ではpH6の場合の約半分である。

II 土壤微生物のフロラに及ぼす農薬の影響

土壤に施用された農薬は、微生物フロラに対して大別して2つの影響を持つと考えられる。その1つは殺菌性の薬剤による部分殺菌効果であり、いま1つは施用された農薬を栄養源とする微生物フロラの成立である。もとよりこれらの影響は独立したものではなく、部分殺菌にもなって新しく優位になったフロラが農薬分解性によるものである場合もありうる。この場合、フロラ出現の機構や農薬の残留の問題が土壤微生物のフロラを決定する重要な意味を持つ。

1. 部分殺菌効果

古く Russel と Hutchinson⁷⁾ は、土壤に高温、急激な乾燥、有機溶媒などの処理をすると、微生物数や活性が一時的に減少したのち、回復して無処理の場合よりも高い水準に達することを観察して、これを部分殺菌効果と呼んだ。土壤殺菌に用いられる農薬が土壤に施用された場合、しばしば典型的な部分殺菌効果が観察される。

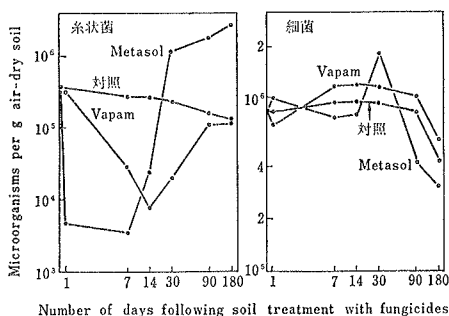


図5 種々の殺菌剤で土壤を処理したのちの微生物群の変化
(Cordon と Young⁸⁾ による)

図5には土壤を各種の殺菌剤で処理したのちの菌数変化の1例を示す⁸⁾。

表1 糸状菌フロラの種構成に及ぼす D-D 処理の影響
(Martin⁹⁾ による)

	未 処 理		処 理	
	5日後	6ヵ月後	5日後	6ヵ月後
全菌数 (1g 当り)	6.3×10^4 (%)	5.0×10^4 (%)	$< 10^3$ (%)	1.65×10^4 (%)
<i>Aspergillus sydowi</i>	3	2	0	0
<i>A. versicolor</i>	7	14	0	0
<i>Fusarium solani</i>	13	24	0	3
<i>Fusarium</i> sp. 3	0	0	0	0
<i>Monospora brevis</i>	0	2	0	0
<i>Oospora variabilis</i>	3	3	0	0
<i>Penicilla</i> , blue green	12	11	0	0
<i>Penicillium</i> sp. 1	0	0	0	0
<i>Phoma</i> sp.	0	0	0	0
<i>Trichoderma lignorum</i>	1	< 1	0	82
<i>Fungus</i> D 1	27	11	0	0
Other species	34	33	0	15

一般的に、このような部分殺菌処理ののちに増殖して成立するマイクロフロラは、処理前と比較して単純化される。Martin⁹⁾ がカンキン畑の土壤を用いて行なった実験によると、dichloropropene (D-D) で処理した土壤では、糸状菌フロラは著しく単純化され、そのほとんどが、*Trichoderma*で占められるようになった(表1)。また、日高¹⁰⁾によれば chloropicrin で処理した土壤から分離された微生物の大部分は、*Bacillus* に属する細菌であった。これらの結果は、農薬による部分殺菌効果が農薬に耐性を示す微生物、あるいは何らかの理由で農薬の作用から保護されていた微生物が、競争者がいなくなったために急速に増殖して優位を占めることと考えられる。しかし、部分殺菌効果そのものの機構に関しては不明の点が多い。

2. 農薬分解性のマイクロフロラの集積土壤の形成

土壤中で起こる微生物による種々の反応は、大量の有機物が一時に添加された場合を除いて、

きわめて微弱である。その原因として、i) 一般的にいて、土壤中で微生物の栄養源となりうる物質、特に炭素、窒素、リン、イオウ化合物は欠乏状態にあるといえることができる¹¹⁾。

ii) それらのうち特に炭素源は微生物の大きさおよびその移動範囲からみてきわめて不均一に土壤中に存在すると考えられる。したがって、微小部位としては中間的あるいはかなり高い活性を示す部位があることは否定できないが、土壤全体としてはたとえそれがグラム単位の量であっても活性の低い部位との平均化によって低く抑えられることになる。iii) 微生物は一般に吸着によって活性が低下する、などをあげることもできる。

Lees と Quastel¹²⁾ は土壤の不均一性を少なくし、かつその生化学的活性を高め、土壤を組織切片と同様に扱えるようにする手段として還流技法を開発した。この方法は2~4 mmの土壤粒子を篩別して円筒につめ、特定の物質溶液を空気とともに還流してあたえた物質の分解過程を、還流液中の変化を中心に追跡するものである。彼らはこの技法を用いて硝酸化成反応、イオウ酸化、アミノ酸代謝などの生化学的検討を行なったが、微生物の変化については間接的推定を行なったのみであった。しかしながら、この技法は微生物の生育、特に混合状態における微生物相とあたえた栄養物質の間の規則性の解明にまで発展させるならば、実験生態学の技法として使いうると思われる¹³⁾。このような観点から、還流技法を用いて農薬の分解を検討した Audus¹⁴⁾ の結果について述べよう。

土壤を2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) で還流すると、約2週間の誘導期の後に2,4-Dは急速に代謝されるようになる。還流液中の2,4-Dがまったく消失した後、還流

液のみを新しい2,4-Dを含む還流液に替えて還流を続けると、土壤はもはや誘導期を示さず急速に2,4-Dを代謝する。そして代謝の速度は同様の操作を何回繰り返してもほぼ一定の最高値を維持する(図6)。このような土壤を Quastelらは、アンモニア酸化の際に「集積土壤」と名づけ、この土壤はアンモニア酸化菌によって飽和されていると考えた。その後の多くの研究によって、他の基質についても同様の現象がみられることから、この考えは一般化されている。ここで注意しておきたいことは、その土壤の細菌の生息場所が細菌細胞で飽和されたことを意味するのではなく、単に生化学的代謝活性がその条件での最大値に達したことを意味することである。

この現象は、あたえた2,4-Dに対応して2,4-Dを急速に代謝しうる細菌細胞が集積されたことによって起こっていることは、次の2つの点から明らかにされている。第1は集積土壤が形成された時期の還流液を新たな未処理土壤に接種して2,4-D溶液で還流すると、誘導期が無接種のものに比べて約半分に短縮されることである。第2は2,4-Dを単一の炭素源とし

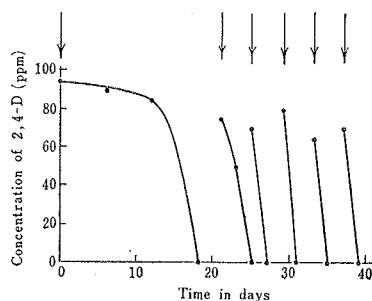


図6 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid 溶液で、圃場の土壤を繰り返し還流を行なった際の集積現象

矢印は、2,4-D 溶液の添加時期を示す。
(Audus¹⁴⁾ による)

た寒天培養基を用いて単離された細菌 (*Bacterium dlobiforme* 群) はこの培地上でゆるやかではあるが確実に生育し、この菌の純粋培養を還流液に加えると誘導期なしに 2, 4-D を代謝することである。

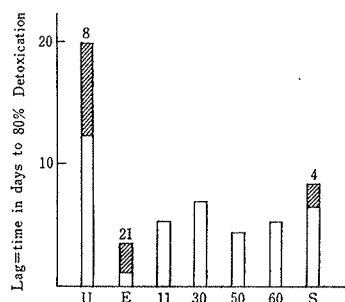


図 7 あらかじめ 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid で集積培養した土壌を、水還流あるいは湿潤状態で長期間保存した場合の分解活性
 U: 未処理土壌
 E: 新たに集積培養した土壌
 11, 30, 50, 60: 2, 4-D で集積培養を行なった後、それぞれ 11, 30, 50 および 60 日間蒸留水で還流した土壌
 S: 湿潤状態で 1 年間保存した集積土壌
 U, E および S の上の黒い部分は標準偏差を示す。なお、その上の数字は実験例数を示す。(Audus¹⁴⁾ による)

さらに興味あることは、一度生成された集積土壌はその後 60 日間水のみで還流しても、また湿潤状態で 1 年間放置しても、きわめて短い誘導期しか必要としないことである¹⁵⁾ (図 7)。このことは、一度集積された 2, 4-D 分解菌群が少なくとも 1 年間の長期にわたって活性な状態で保たれることを示唆する。このような、一度達成された集積が長期間保持されることは、圃場条件下においても認められている¹⁶⁾。

特定の農薬に対して特定のマイクロフロラが成立することは、その後多くの研究者によって検討された (表 2)。使用した土壌の質的な差によって必ずしも同一の微生物相が成立しないようであるが、このことは最も数多く検討された 2, 4-D の場合に見られる。それぞれの場

合に成立する 2, 4-D 分解菌の相は比較的単純である。非常に分解し難い、すなわち特殊な代謝系を持たなければ分解できない物質に対応して生成する菌相が比較的単純になることは、佐藤¹³⁾ が指摘したことと一致する。

3. 集積機構

どのような機構でこのような集積現象が起こるのかは目下のところあまり明らかにされていないが、2つの立場からの研究がある。第 1 は偶発的に起こる変異によって特定の農薬を代謝できる菌株が生じ、それが農薬を代謝して増殖し、他のものはその農薬を代謝することができないために増殖しないから優占するという考えである。第 2 は土壌中に存在する多くの種類から成る細菌細胞のかなりの部分が、あたえられた農薬に対応して、それを分解する酵素系を誘導的に作るという考えである。

第 1 の考えによると、第 1 回還流における誘導時間の長さは 2, 4-D の分解が可能となった細胞が増殖するのに必要な時間であると理解できる。しかし、Audus¹⁴⁾ の研究室での結果によると、まったく異なった時期に採った土壌でも生成される分解菌相は同一であり、*Bacterium dlobiforme* または *Nocardia sp.* であった。このことは突然変異に基づくとする、もっと他の種が現われてもよく、理解し難い点である。

第 2 の考えによると、誘導期は酵素形成に必要な時間となるが、2, 5-dichlorophenoxy acetic acid に見られるような、60 日にも及ぶ誘導期をどう理解してよいかわからない。また、第 1 回還流が終了し、還流液中の 2, 4-D がまったく認められなくなった後に第 2 回還流を行なっても、誘導期なしに分解が起こることは理解できない。

表 2 殺菌剤を分解する土壌微生物 (表中の数字は文献番号を示す)

(Audus¹⁴⁾ による)

	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)	2-Methyl-4-chlorophenoxyacetic acid (MCPA)	2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)	γ (2,4-Dichlorophenoxy) butyric acid (2,4-DB)	γ (2-Methyl-4-chlorophenoxy) butyric acid (MCPB)	Monochloroacetic acid	Dichloroacetic acid	α, α -Dichloropropionic acid (dalapon)	Trichloroacetic acid (TCA)	2,4-Dinitro- <i>o</i> -cresol (DNC)	3-(<i>p</i> -Chlorophenyl)-N',N'-dimethylurea(monuron)	Allyl alcohol
EUBACTERIALES												
Pseudomonadaceae												18
<i>Pseudomonas fluorescens</i>												
<i>P. putida</i>												18
<i>Pseudomonas</i> sp.						30					31	
<i>Mycoplana</i> sp.	21	21	21									
Rhizobiaceae												
<i>Agrobacterium</i> sp.							17, 19	17, 19				
Corynebacteriaceae												
<i>Corynebacterium simplex</i>										32		
<i>Corynebacterium</i> sp.	22											
<i>Bacterium globiforme</i>	23											
<i>Bacterium</i> "2"	20	20										
" <i>Bacterium</i> 3 C1" (<i>Arthrobacter</i> sp.)								17, 19				
Achromobacteriaceae	24, 25, 26	25, 26	24									
<i>Achromobacter</i> sp.	27	27										
<i>Flavobacterium aquatile</i>	20											
<i>F. peregrinum</i>	25, 26, 27											
ACTINOMYCETALES												
<i>Nocardia coeliaca</i>	20											
<i>N. opaca</i>				29	29							
<i>N. corallina</i>												18
<i>Nocardia</i> sp.	28											
FUNGI												
<i>Trichoderma viride</i>						17 19	17 19		17 19			
<i>Clonostachys</i> sp.						17						

誘導基質がなくなってしまった後においては、誘導酵素活性は急速に消失するのが通常である。

単離した細菌を用いた実験室内の研究でも、細菌は一定の誘導期間の後に農薬を分解するようになる例が多く報告されている。*Arthrobacter* の場合は、2,4-D に対し 2,4-dichlorophenol を経る代謝系が誘導される³³⁾。また、Kearney と Kaufman³⁴⁾によれば、土壌から単離した *Pseudomonas* 属細菌において、phenyl carbamate 系の農薬で誘導された分解酵素は、かなり広い基質特異性を持っていることが認められている(表3)。これらの結果は、これら農薬の微生物による分解が、農薬によって誘導された酵素によるものであることを示している。

最近、ある種の除草剤が、それを活発に分解するのに適応を必要としないような土壌固有微生物 (soil constitutive microorganisms) によって分解される例が明らかになった³³⁾ことは興味深い。

表3 *Pseudomonas* sp. の酵素標品の示す
基質特異性

(Kearney と Kaufman³⁴⁾による)

Carbamate	生成した 3-chloroaniline ($\mu\text{g}/20$ 分)
Isopropyl-N-(3-chlorophenyl)	21.5
2-Chloroethyl-N-(3-chlorophenyl)	13.0
2-(1-Chloropropyl)-N-(3-chlorophenyl)	10.0
2-Ethylhexyl-N-(3-chlorophenyl)	3.0

4. 一度形成された農薬分解能が長期にわたって保持されること

一般的に言えば、土壌に添加された特定の物質に対応して形成された菌相は、その物質が消失すると比較的早い時間内に死滅して添加前の菌相にもどるとされている。先に述べたように、あたえた基質が還流液中から消失して、1年た

ってもまだほぼ同一の分解性が認められたという事は、どのような内容を持っているのかについて2,3検討を加えてみたい。

まず、還流液中に農薬が認められなくなった時期においてもなお土壌中に基質が残留する場合である。土壌が農薬を保持する機構はいくつか考えることができる。前節で述べたように農薬が土壌粒子の表面に強く吸着され還流液への溶出がきわめて徐々に行なわれる場合、かなり長期にわたって希薄ではあるが基質が供給し続けられる可能性がある。ことに2:1型粘土鉱物に富む土壌において、膨潤にともなって層間に入り込んだ農薬は溶出に時間がかかるであろう。もっとも、吸着され、あるいは層間に入り込んだ基質も細菌によって代謝されうることは、服部³⁵⁾ および Esterman ら³⁶⁾によって指摘されているので、このような推定は可能性の指摘にとどまる。

他の可能性の1つとして、代謝基質そのものは消失してしまった時期においても、中間代謝産物がなお微生物に利用されうる状態で残存していることである。この可能性を検討した研究は未だないが、純粋培養を用いて農薬の分解過程の解明がかなり行なわれつつある現在、これについて積極的な検討を加える必要があろう。

これらの過程が実際に起こっているならば、あえて突然変異の概念を導入しなくても、農薬分解の性質は長期にわたって維持されると考えられる。いずれにしても、農薬分解能を持つミクロフロアが優位を占める機構についてはまだ不明の点が多く、土壌の持つ多様な性質と施用された農薬の種類との関連で、個々の場合かなり異なっていると考えられる。

Ⅲ 農薬の分解に関係する要因

土壌微生物群を特徴づける1つの大きな性質は、広範な物質分解能である。これは、微生物のもつ柔軟な環境適応性（たとえば*Pseudomonas*属のある株は数百種にも及ぶ有機化合物のいずれをも、唯一の炭素源として生育できることが知られている）と、群を構成する種の多様性によると考えられる。すでに述べたように、土壌では一般に微生物にとって栄養分の不足状態が維持されているとみられるので、外部から添加された有機物に対し、微生物は絶えずそれを栄養分として生育しようとする傾向を示す。

表4 土壌中における農薬の残存
(Alexander²⁴⁾による)

農 薬	残 存 期 間
Aldrin	<9 年
Atrazine	17 月
Captan	>65 日
Chlordane	>12 年
2-(2,4-DB)	>103 日
DDT	10 年
Dieldrin	6 年
Diuron	>15 月
2-(2,4-DP)	>103 日
Endrin	>9 月
Fenac	>18 月
HCH, BHC	>11 年
Heptachlor	>9 年
Ipazine	>15 月
Monuron	>3 年
Parathion	1 日 (Rumen), 5 年
PCP	>5 年
Propazine	>15 月
Simazine	>2 年
2,4,5-T	166~190 日<
2,3,6-TBA	>18 月
Tordon	>568 日
Toxaphene	>5 年
2-(2,4,5-TP)	>103 日
2,3,6-Trichlorobenzyl-diisopropylidithio-carbamate	>6 年
Trithion	>6 月
Zineb	>75 日

このような土壌の持つ広範な物質の分解性にもかかわらず、ある種の農薬はかなり長期間にわたって土壌中に残存することが知られている。表4には、種々の研究者によって得られた、各

種農薬の土壌中における残存期間の結果を示す。

これらにはその化学構造上、本来微生物の分解を受けにくい化合物も多く含まれていると考えられるが、土壌中における農薬の分解においては、なお微生物の環境要因（土壌構造、水分やpH、共存する有機物、他の微生物群など）が分解の程度や代謝過程に重要な役割りを果たしているのはいうまでもない。

1. 農薬の化学構造と分解性

農薬の残留毒性をできるだけ少なくするために、微生物の分解できる農薬を作りたいという要請が強く出されている。そして、農薬の化学構造と微生物による分解性の間に何等かの規則性が見出しうるか否か、既存の農薬の分解の仕方の中で検討することは必要なことであろう。その意味において、文献調査を行なったが、一般化しうる規則性はきわめて僅かであった。

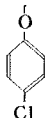
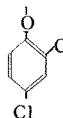
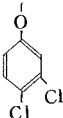
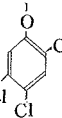
(1) phenoxy alkanolic acids の分解

phenoxy alkanolic acids は葉の広い雑草の除草剤として有効である。その中で最も有名なものは2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) である。多くの phenoxy alkanolate は微生物によって分解されるが Alexander³⁸⁾ が示したように benzene 核の meta の位置に chlorine をもつものは、ほとんど分解されない。また aliphatic moiety が ring に α -carbon で結合しているものは、分解されにくい。それに反して ω -carbon で ring に結合している side chain をもち、かつ meta の位置に halogen をもたないものは急速に代謝される。(表5)

また Audus¹⁴⁾ によれば、2-chlorophenoxy acetic acid は微生物の分解に対してかなり抵抗性があり、土壌中に1年以上も残存していたが、para の位置に塩素がつくことによって非

常に分解されやすくなるという。

表 5. Soil suspension 中における phenoxy-alkanoates の残存に及ぼす化学構造の効果
(芳香環に特有の UV 吸収が全くなくなるまでの日数)
(Alexander³⁸) による)

				
-CH ₂ COOH	11	26	>205	>205
-(CH ₂) ₂ COOH	11	4	>81	>81
-(CH ₂) ₃ COOH	53	11	>205	>205
-CH< COOH CH ₃	>205	>205	>205	>205
-CH< COOH (CH ₂) ₂ CH ₃	>81	>81	>81	>81

(2) Phenylcarbamate の分解

N-Phenylcarbamates, phenylureas と acylanilides は $C_6H_5-NH \cdot CO-R$ の一般式をもち除草剤、殺虫剤として広く用いられている。

N-Phenylcarbamates の場合 R は alkoxy group であり, acylanilide の場合は alkyl, phenylureas の場合は alkylamine である。N-Phenylcarbamates と phenylureas は化学構造上はよく似ているが, その分解過程はいちじるしく異なっている。

Kaufman⁵⁵ は黒泥土壤を CEPC (2-chloroethyl-N-3-chlorophenylcarbamate) あるいは CIPC (isopropyl-N-3-chlorophenyl carbamate) 0.2 % 水溶液で還流することによってその分解を調べた。(図 8)。分解過程で還流液中に 1 時的に 3-chloroaniline の集積が認められ, やがて塩素が集積して行くことが認められた。

また isopropyl C に ¹⁴C-U-label したものから benzene 核の C に ¹⁴C-U-label したものから

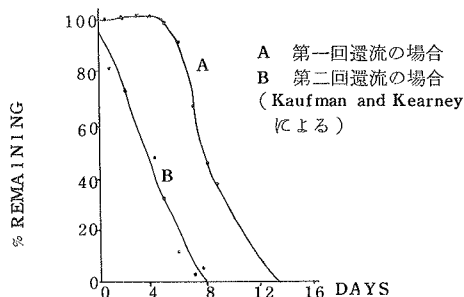


図 8 還流土壤による CIPC の分解

からも ¹⁴CO₂ が放出されたことから全成分が分解されていることが証明された。³⁴⁾

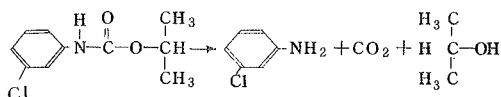
最初の還流では約 1 週間の誘導期の後に, そして第 2 回の還流からは直ちに分解が始まった。

このような土壤は両者の分解菌を数多く含んでおり, 多くの有効菌を取り出した。CIPC を炭素源として利用しうるものは *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Agrobacterium*, *Achromobacter* 属菌に属するものであったが, 中でも *Pseudomonas striata chester* が強い分解能を示した。CEPC 還流土壤からは *Achromobacter* 属菌と *Arthrobacter* 属菌が見出された。このように非常に類似した化合物でも還流してそこに成立する微生物相には差異を生ずる。

CEPC 還流土壤から isolate した菌は CIPC を急速に分解したが, CIPC から分離した菌は CEPC を分解することはするが, その速度は遅かった。

彼の共同研究者である Kearney⁵⁶⁾ は *Ps. striata* から CIPC を加水分解して 3-chloroanilin を生成する酵素を抽出精製してその諸性質を精査した。

その結果, 反応は



の形であることが推定された。反応の第1段階が ester linkage と amide-linkage のいずれの結合を切ることによって起こるかは明らかでないが、いずれにしても中間物が不安定なため、end products は 3-chloroaniline, isopropyl alcohol と CO_2 になる。

彼等は多くの phenylcarbamates についてその水解速度と構造について検討した。Kearney³⁴⁾ は Cluett^{57) 58)} の方法に従って phenylamide の酸性度を n-butylamine 中で 0.1N tetrabutyl ammonium hydroxide methoxide で滴定することによって求め、carbamate の酸性度と活性の関係を検討した。

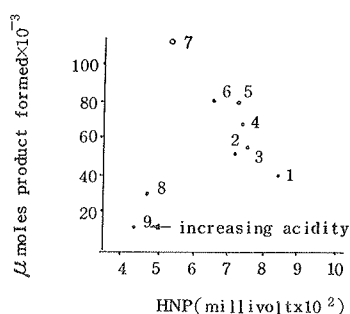


図9 9種のN-phenylcarbamatesの水解速度とHNPの関係

1. isopropyl N-phenylcarbamate
2. Isopropyl N-(2-chlorophenyl) carbamate
3. Isopropyl N-(3-chlorophenyl) carbamate
4. Propyl N-(3-chlorophenyl) carbamate
5. Ethyl N-(3-chlorophenyl) carbamate
6. Propynyl N-(3-chlorophenyl) carbamate
7. Isopropyl N-phenylthiono carbamate *
8. 1-chloroisopropyl N-(3-chlorophenyl) carbamate
9. 1,3-Dichloroisopropyl N-(3-chlorophenyl) carbamate

*Compound 7, designated by o, was not equimolar to CIPC in assay system. (Kearneyによる)

その結果、図9に示すように(相対的)酸性度が高ければ高い程分解が早まる結果を得た。この現象は電子論的には carbonyl あるいは amide-N 近傍の電子濃度を低下させるような置換基が入ることによって ester 結合が切れ易くなると説明されている。もし電子的な力のみが水解の速さを決定しているとすれば、1-chloroisopropyl- や 1,3-dichloroisopropyl-N-(3-chlorophenyl) carbamate の水解速度が遅いことが理解出来ない。この場合は steric effect が electronic effect より上廻ったためと考えられている。steric effect の例を表に示した。表6にはアルコール基の大きさを変えた場合の N-(3-chlorophenyl) carbamic acid の ester の水解速度を示してある。⁵⁹⁾ 置換基が大きくなればなるほど水解速度が低くなることは steric effect と理解される。

表6. アルコール基の大きさを変えた場合の水解速度

Group	Rate
C_2H_5	8.0
$n\text{-C}_3\text{H}_7$	6.8
$iso\text{-C}_3\text{H}_7$	5.5
$\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2^*$	1.3

* benzyl alcohol の場合は ring 上に chlor 置換を行っていないので N-phenyl carbamate と比較のこと (isopropyl-N-phenyl carbamate の 1/2 の速度)

表7. N-phenyl carbamic acid の Isopropylesters の meta-置換基を変えた場合の水解速度

Substituent	Rate
NO_2	6.5
$\text{CH}_3\text{CO-}$	6.0
Cl	5.6
$\text{CH}_3\text{-O-}$	3.9
H	2.6

meta の位置の置換基を変えた場合は余り大きな影響をもたない。

meta 及び Para-置換の場合は恐らく反応の起こる部位からかなり速くなるので steric effect はそれ程大きくなく表 7 に示された水解速度の変化は inductive あるいは electron withdrawing effect によるものであろう。

IV 自然の場における農薬の微生物

による分解に関与する諸要因

ある化合物を微生物がどのような経路によってどのような機構によって分解するかを明らかにするためには土壌系から酵素系に至る多くの段階の研究を必要とするが、これまでの研究は主として微生物の細胞段階或いは酵素段階の研究に重点がおかれてきた。しかしながら、農薬の分解性が実際に問題とされる場合は農地あるいは林地の土壌中である。そのような場での農薬の分解性は純粋培養の結果のみによっては決定されず、混合微生物系での分解、雨水による流亡、土壌粒子による吸着や固定、あるいは好気度等に依存していると考えられる。以下土壌微生物の立場から或化合物の分解を考える場合考慮に入れなければならない諸要因について解説を試みることにする。

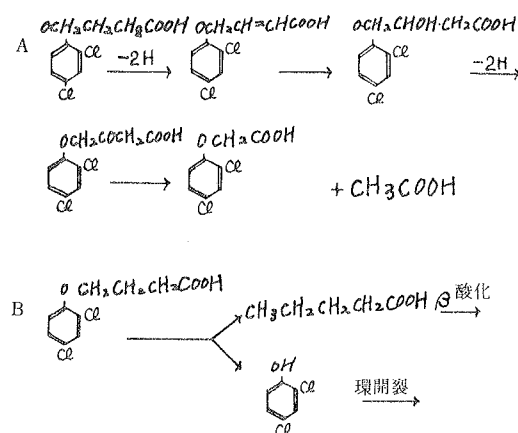
1. 混合系の微生物による分解

自然系における微生物の作用を特徴づける問題点の 1 つは、それが混合培養の状態にあるということである。さきの CIPC の分解に際して還流土壌では側鎖の C も benzene 核の C も共に分解されたが、*Pseudomonas striata* の純粋培養では benzene 核の分解のみが起こることが指摘されている。この不一致の原因は *Pseudomonas striata* は 3-chloroaniline は分解できて

も isopropylalcohol は分解出来ないことを示している。還流土壌においては isopropylalcohol を分解しうる他の微生物種が存在して全分解が行なわれていると考えることができる。このような例は Phenoxy alkanoic acid 系の除草剤の分解にも見ることが出来る。4-(2,4-dichlorophenoxy)butyric acid (4(2,4-DB) は土壌に施用された場合、それ自身は除草効果をもたないが土壌細菌によって β -酸化をうけ、2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) に変化することによって除草効果を発揮する。⁶⁰⁾

しかし Mac Rae などによって土壌から単離された細菌 *Flavobacterium* はこれと全く異な

表 8. 微生物による 4-(2,4-dichlorophenoxy) butyric acid の分解経路



た経路で 4-(2,4-DB) を代謝することが明らかにされた (表 8, B)。⁶¹⁾ この経路によれば 4-(2,4-DB) は活性化される段階を経ないで分解される。すなわち 4-(2,4-DB) の反応 4-(2,4-DB) $\rightarrow$ 2,4D $\rightarrow$ 2,4-dichlorophenol $\rightarrow$ 環開裂において、多くの土壌細菌はこの反応を進行させることによって解毒するが、*Flavobacterium* においてはこの経路を通らない事によって毒性の発現を抑える。したがって施用された 4-(2,4-DB) の除草剤としての効果の発現あるいは残存度は No-

cardia, Pseudomonas, Micrococcus など 2,4-D を経る経路を通る細菌と Flavobacterium との相互関係によってきめられる複雑なものとなる。土壌中では同一の反応が微小な部位の違いによって種々の速度で進行する。その結果, 10 g の土壌中においても種々の段階の中間産物が同時にあらわれることがある。図 10 は phen-oxy-alkanoic acid 系除草剤である 7-(2,4-dichlorophenoxy)heptanoic acid (7-(2,4-DH)) を土壌中に添加して保温したときの中間産物の消長を示したものである。³⁸⁾ 1 日目の終りには, すでに β 酸化の中間生成物である 5-(2,4-dichlorophenoxy)valeric acid (5-(2,4-DV)) や 3-(2,4-dichlorophenoxy)propionic acid (3-(2,4-

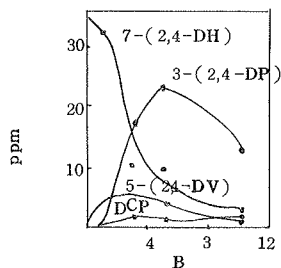


図 10. 土壌中における 7-(2,4-dichlorophenoxy)heptanoic acid の代謝

3-(2,4-DP): 3-(2,4-dichlorophenoxy)-propionic acid
 5-(2,4-DV): 5-(2,4-dichlorophenoxy)-valeric acid
 7-(2,4-DH): 7-(2,4-dichlorophenoxy)-heptanoic acid
 DCP : 2,4-dichlorophenol
 (Alexander³⁸⁾ による)

DP)) があらわれ, さらに 2,4-dichlorophenol (DCP) も検出されるようになる。もっとも, DCP の生成が酸化の結果か, 芳香環の OH の位置における エーテル結合の直接の切断の結果であるかは不明である。このような混合系においては 1 つの化合物から同時に種々の中間産物が生成し, おのおのは異なった毒性や残存度を示

す。このことは, 混合系における農薬の代謝を, 単一の微生物を用いて得られた結果の集積のみからは推定することができないことを示している。農薬の効果は分解生成物とその毒性, おのおのの安定性などを含めて評価しなくてはならない。

2. 土壌構造と微生物による農薬の分解

土壌は成分として有機, 無機の数多くの物質を含むばかりでなく, 粒子の大きさからみても大小の一次鉱物の破片から二次鉱物である粘土や腐植に至る微小な colloid 粒子を含んでいる。しかもそれらは, 相集って成分的にも形態的にも異なる多様な粒団を形成している。粒団はその大きさによって種々の大きさの孔隙をもっている。粒団のもつ孔隙と豊富な界面によって種々の強さで保持された水分は, 他の栄養物質や酸素あるいは物理的諸因子と相まって, 土壌微生物にとって特徴的なすみかを形成している。

土壌に施用された農薬と微生物の相互関係の研究には, このような場における微生物および農薬の存在状態と機能についての理解が必要である。言葉を換えていえば, 微生物の大きさに対応したミクロの場における微生物の存在様式と機能の理解が必要であるということが出来る。しかしながら, このような立場からの研究はきわめて僅かであり, 特に農薬の分解を素材として行なった研究は殆んどない。したがって, 一般的な例にもとづいて農薬の問題を類推することにする。

(1) 微生物のすみかとしての土壌団粒の内外区分への分画

土壌を音波処理すると手で振盪分散させた場合にくらべていちぢるしい細菌細胞数の増大が認められる (図 11)。このことは細菌細胞は

単に土壤粒子表面に附着しているだけではなく、構造体の中にとじ込められて存在するか、あるいは集落を形成して存在することを推測させる。

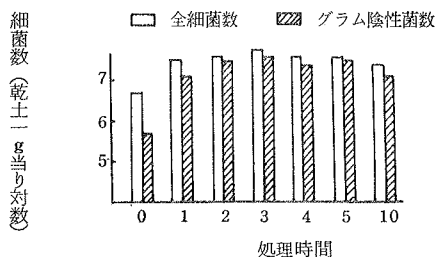


図11 土壤細菌数と音波処理 (服部⁶²) による)

またその際グラム陰性細菌数の増大率は全菌数の増大率にくらべて一層いちじるしいことが認められた。一方土壤粒団を水で洗浄して上澄に放出されてくる細胞数を計測すると図12のような洗浄曲線が得られる。そして残った土壤を音波処理すると最初の細胞数に数倍する細胞数を計測することができる。

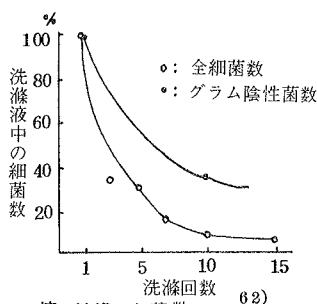


図12 土壤の洗浄と細菌数(服部⁶²) による)

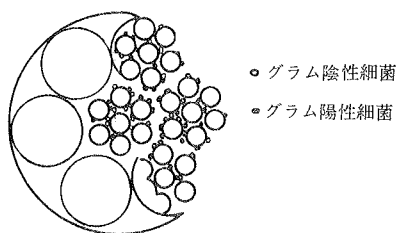


図13 団粒と細菌 (服部⁶²) による)

このことは前の推定を裏付けるだけでなく、

土壤団粒中の細菌細胞を水で容易に洗い出しうる区分と、洗い出し得ない区分に分画しうることを意味する。服部⁶²)はこれらの事実及びグラム陰性細菌が乾燥によってより早く死滅し、湿潤によって、より早く生育することの検討にもとづいて微生物のすみ場としての土壤粒団は粗大孔隙に富み、風乾湿潤によって容易に影響される「粒団外部」と毛管孔隙に富み、水分保持力が強く比較的外界の影響をうけにくい「粒団内部」とに分化しているという仮説を提出した。(図13の模式参照)一方山岸⁶³)は土壤粒団を soluble blue で染色の後合成樹脂で固め、土壤粒団の薄片標本を作成して、水分及び栄養物を与えた場合急速に多数の細胞集団が増大するのは「粒団外部」であることを示した。

(2) 細菌集落形成のための最低構造単位

水田土壤中での硫酸還元菌の点的分布⁶⁴)や微小電極を用いて測定した酸化還元電位の不均一な分布⁶⁵)から考えると土壤粒団も質的に異なる微小粒団から成り立っていると推定することができる。このことを検討するため、土壤を懸濁・沈降法によって種々の大きさの粒子集団に分画し、各分画粒子の大きさと細菌細胞の分布をみた。その結果、直径2~5 μ 前後の粒団では粒子100~1,000個当り1個の細胞が附着しているにすぎない。又直径10~20 μ の大きさの粒団では1個につき1個の細胞が検出された。それらの粒子を音波処理して細菌数の増大率を見ると、約20 μ 前後を境として、それ以上大きな粒子では菌数は10~数10倍増大した。これにくらべて、より小さな粒団では2~3倍の増大にすぎなかった(図14)。また粒径を異にする小粒子集団あるいは大粒子1個1個を音波処理して、その各々からそれぞれ約50株の菌を単離同定した。その結果表8.9

に見られるように、16 μ と374 μ の粒子ではそこに存在する細菌の種類にかなりの偏りが、認められた。

これらの結果を考え合わせると、土壌中には

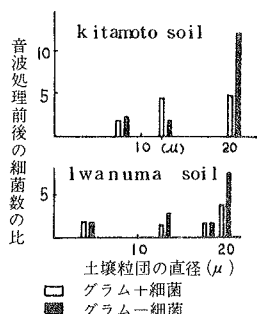


図 14. 音波処理後の土壌粒団での細菌数の増加

ある構造単位があり、その中に比較的少ない種類の細菌が集落を形成して存在しかつ構造単位内に存在する菌種は構造単位ごとに同一であったり異なったりすると推定することができる。

以上述べたような粒団の構造性を考慮に入れると、先ず外から与

えた薬剤が細菌集落に到達する仕方が問題とされなければならない。降雨によって土壌に大量の水が与えられると土壌中を重力の作用によって自由に移動しうる重力水が与えられることになる。薬剤の移動はこの水への薬剤の溶解度、

表 9 土壌小団粒から分離された細菌

		A	B	C	D
Spore formers	<i>Bacillus pumilus</i>	1		6	1
	<i>Bacillus licheniformis</i>	1			
	<i>Bacillus pulvificiens</i>				2
	<i>Bacillus circulans</i>				1
	<i>Bacillus megaterium</i>				
	group I				5
	II				7
	III				3
	<i>Clostridium</i>				
	histolyticum				2
Gram negative bacteria	<i>Achromobacter</i>				2
	<i>guttatus</i>				
	<i>Acaligenes faecalis</i>		1		
	Not identified				
	group I			6	
	others	3	1		1
	Total	5	2	12	24

表 8 土壌小粒団から分離された細菌

		A	B	C	D
Gram positive bacteria, spores not formed	Micrococcus caseolyticus	6	3	9	
	Micrococcus colpogenes	2		4	
	Micrococcus candidus	2			
	Micrococcus rubens	1			2
	Micrococcus flavus	1		1	
	Staphylococcus aureus			1	
	Not identified				2
	Brevibacterium imperiable	3	16		
	Brevi·vitarumen	3			
	Brevi·quale group I	3	2	5	1
	II			4	1
	III	1	1	3	
	Brevi·legumenticola	1	3	2	1
	Corynebacterium sps.	1	2		
	Not identified group I	2	1	4	
	II				1
	III		1		1
	IV				2
	V		2		
VI	1				
Total		27	31	35	11

土壌コロイドの性質、土壌固相の幾何学的構造、および流速に主として関係する。土壌中における薬剤の移動の最も長距離なものはこの自由水の移動に伴うものである。粒団外部は自由水の動きによって容易に薬剤が到達することが可能であろう。しかし、粒団内部への薬剤は自由水の動きによらず大部分が外部からの拡散によらなければならない、非常に遅いものとなる。薬剤がくん蒸剤のような気体の場合は、水の下降運動はそれ程大きく関係しない。水はむしろ土壌孔隙をせばめたりふさいだりして、ガス孔

隙を通しての拡散を阻害する形で働く。一般的にいて水中の拡散速度はガス中の拡散速度に比べて $1 \sim 0.3 \times 10^5$ 倍遅い。このような事情は、酸素についても生ずる。

Greenwood⁶⁶⁾ は水で飽和した直径 3 mm 以上の粒団ではその中心部に無酸素の部位が生成しうることを示した。この結果は一見好氣的と考えられる畑状態土壌においても嫌氣的部位が存在しないし生成され、嫌氣的にのみ分解される薬剤が分解を受けることを示している。土壌細菌が微小粒団内でも比較的単純な集落を形成して存在することから予想されることは外部から薬剤が投与されても、すべての粒団がその分解に関与するのではなからうということをしさする。又集落を形成している全細胞が反応に与えるのでもないことが西尾ら⁶⁷⁾⁶⁸⁾の亜硝酸酸化菌の研究によって示された。特に狭い孔隙内に閉じ込められて集落が形成される場合、集落の表層を形成する細胞のみが反応に関与し菌数が増大するにもかかわらず土壌としての活性は一定である。

(3) 界面の影響

界面が微生物の増殖や活性にどのような影響を与えるかについては、最近研究がよく集積されてきている。それによれば、界面付近では表面電荷によるイオン層の生成による水素イオン濃度の変化、細胞の吸着による活性低下、基質の吸着による濃縮あるいは不活性化などが観察され、微生物はこれらの影響を受ける。⁶⁹⁻⁷²⁾

農薬の分解に界面がどのような影響を持つかについては、よくわかっていない。しかし、粘土鉱物は一般に顕著な吸着性を示し、種々の化合物が外部表面や lattice 構造の内部に吸着あるいは固定される。施用された農薬もおそらく界面あるいは粘土鉱物の lattice 内に捕促され

るであろうが、そのことが農薬の作用あるいは分解にどのように影響するかは報告により異なる。たとえば、側鎖を ^{14}C で標識した simazine 溶液中で生育している *Aspergillus fumigatus* からの $^{14}\text{CO}_2$ 放出は、200mesh の bentonite を加えることによって抑制された。⁷³⁾ また、Zentmyer は糸状菌の *Phytophthora cinnamomi* を試験株として種々の殺菌剤の効果を土壌 (fine sandy loam) と寒天上とで比較したところ、captan, nabam, vapam およびある種の水銀化合物においては土壌の存在下のほうが大きな効果を示したが、oxyquinolones, ferbam, maneb および semesan の効果は、土壌によって部分的に抑制されたと述べている。

このような土壌あるいは粘土鉱物の効果が、はたして界面による吸着のみの効果であるかどうかは明らかでない。しかし、界面への吸着が農薬の効果の発現や分解過程に大きな影響を持つことが当然推定されるので、さらに多くの研究の集積が望まれる。

土壌の pH, 水分含量, イオン交換容量が農薬の分解にあたえる影響については断片的な知見しか得られていないが、一般に土壌微生物の活性を高めるような環境条件は農薬の分解に好都合に作用するといわれる。⁷³⁾

V 結 語

以上、土壌中に入った農薬の移動、土壌微生物フロアに及ぼす農薬の影響、農薬が土壌微生物によって分解される際の規則性ならびに分解に関与する諸要因について述べ、また自然の場においてそれらの因子がどのようにからみ合っているかについて考察を加えてきた。

しかしながら、自然の場においては、微生物以外に各種の動植物が存在しており、それらのすべてが多かれ少なかれ土壌に撒布された農薬

とかゝわり合いをもっていると考えられる。

したがって、現実の場において農薬の残留を制御しようとする場合には、前記の微生物的ないは徴視的立場からの追求のみでなく、もっと巨視的な立場からも追求する必要がある。このような立場からの研究方法として、高等動物の生態学的方法がある。現状においては、

両者を統一的に握える方法論については、2, 3の

試みはあるが未だ確立されていない状態にある。農薬の効果と残留の問題は、自然の場を制御する方途を見出す上で方法論を確立する意味においても好適な素材と見做すことができ、今後の野心的試みが大いに期待される問題であろう。

文

献

- 1) O.Vaartaya: *Botan. Rev.*, 30, 1 (1964).
- 2) E.P.Lichstein: *J. Econ. Entomol.*, 51, 380 (1958).
- 3) J.J.Jurinak, D.H.Volman: *Soil. Sci.*, 83, 487 (1957).
- 4) F.Call: *J. Sci. Food Agric.*, 8, 137 (1957).
- 5) F.Call: *J. Sci. Food Agric.*, 8, 630 (1957).
- 6) M.J.Frissel: *Fungicides*, Vol. I, ed. by Torgeson, Acad. Press, London, (1967), p.509.
- 7) E.J.Russel, H.B.Hutchinson: *J. Agric. Sci.*, 5, 152 (1913).
- 8) M.E.Cordon, R.Y.Yonug: *Soil Sci.*, 99, 272 (1965).
- 9) J.P.Martin: *Soil Sci.*, 69, 107 (1950).
- 10) 日高 醇: 土と微生物, 5, 17 (1963).
- 11) G.Stozky, A.G.Norman: *Arch. Mikrobiol.*, 40, 341, 370 (1961).
- 12) H.Lees, J.H.Quastel: *Biochem. J.*, 40, 803 (1946).
- 13) 佐藤 匡: 東北大学農学博士学位論文 (1967).
- 14) L.J.Audus: *Herbicides and the Soil* (review) Blackwell, Oxford, England, 1960, p.1.
- 15) N.Brownbridge: ph.D.Thesis, University of London (1956).
- 16) A.S.Newman, J.R.Thomas, R.L.Walker: *Soil Sci Soc. Amer. Proc.*, 16, 21 (1952).
- 17) H.L.Jensen: *Nature*, Lond., 180, 1416 (1957).
- 18) H.L.Jensen: *Nature*, Lond., 183, 903 (1957).
- 19) H.L.Jensen: *Tidskr. Planteavl.*, 63, 470 (1959).
- 20) H.L.Jensen, H.I.Peterson: *Acta Agric. Scand.*, 2, 215 (1952).
- 21) T.I.Steenon, N.Walker: *J. Gen. Microbiol.*, 18, 692 (1958).
- 22) R.E.Ogle: Doctoral Thesis, Purdue University, Lafayette (1953).
- 23) L.J.Audus: *Nature*, Lond., 166, 356 (1951).
- 24) G.R.Bell: *Canad. J. Microbiol.*, 3, 821 (1957).
- 25) R.Y.Stanier: *J. Bacteriol.*, 54, 339 (1947).
- 26) C.Stapp, C.Wetter: *Phytopathol. Z.*, 20, 227 (1953).
- 27) T.I.Steenon, N.Walker: *Plant and Soil*, 8, 17 (1956).
- 28) A.S.Newman, H.R.DeRose, H.T.DeRigo: *Soil Sci.*, 66, 393 (1948).
- 29) K.V.Symonds: ph.D.Thesis, University of London (1958).
- 30) H.L.Jensen: *Canad. J. Microbiol.*, 3, 151 (1957).
- 31) G.D.Hill, J.W.McGahan, H.M.Baker, D.W.Finnerty, C.W.Bingeman: *Agron. J.*, 47, 93 (1955).
- 32) K.Gundersen, H.K.Jensen: *Acta Agric. Scand.*, 6, 100 (1956).

- 33) P.C.Kearney, D.D.Kaufman, M.Alexander: *Soil Biochemistry*, ed. by A.D.McLaren and G.H.Peterson, Dekker, New York, 1967, p.318.
- 34) P.C.Kearney, D.D.Kaufman: *Science*, 147, 740(1965).
- 35) R.Hattori, T.Hattori: *Ecol Rev.*, 16, 63(1963).
- 36) E.F.Estermann, G.H.Peterson, A.D.McLaren: *Soil Sci.Soc.Amer.Proc.*, 23, 31(1959).
- 37) M.Alexander: *Adv.Appl.Microbiol.*, 7, 35(1965).
- 38) M.Alexander: *Soil Sci.Soc.Amer.Proc.*, 29, 1(1965).
- 39) J.W.Cook: *J.Agr.Food Chem.*, 5, 859(1957).
- 40) A.W.MacPhee, D.Chisholm, C.R.MacEachern: *Can.J.Soil Sci.*, 40, 59(1960).
- 41) 服部 勉: 東北大学農学研究所報告, 18, 159(1967).
- 42) J.H.Warcup: *Trans.Brit.Mycol.Soc.*, 35, 248(1952).
- 43) O.Agundis, R.Behrens: *Weed Soc.Amer.Abstr.*, p.70(1966).
- 44) S.J.Parka, J.E.Tepe: *Weed Soc.Amer.Abstr.*, p.40(1966).
- 45) I.C.MacRae: *Annual Report of the IRRI, Soil Microbiology*, p.119(1966).
- 46) D.J.Greenwood: *Plant and Soil*, 17, 378(1962).
- 47) A.D.McLaren: *Science*, 125, 697(1957).
- 48) A.D.McLaren: *Enzymol.*, 21, 356(1960).
- 49) T.Hattori, C.Furusake: *Nature*, 184, 1966(1959).
- 50) T.Hattori, C.Furusake: *J.Biochem.*, 48, 831(1960).
- 51) 青峰重範: 土肥誌, 34, 131(1963).
- 52) G.A.Zentmyer: *Phytopath.*, 45, 398(1955).
- 53) H.F.Tayler, R.L.Wain: *Proc.Roy.Soc.B.*, 268, 172(1962).
- 54) I.C.MacRae, M.Alexander, A.D.Rovira: *J.Gen.Microbiol.*, 32, 69(1963).
- 55) D.D.Kaufman: *Appl.Microbiol.* 13, 443(1965).
- 56) P.C.Kearney: *J.Agr.Food Chem.* 13, 561(1965).
- 57) M.L.Cluet: *Anal.Chem.* 31, 610(1959).
- 58) M.L.Cluet: *Anal.Chem.* 34, 1491(1962).
- 59) P.C.Kearney: *J.Agr.Food Chem.* 15, 568(1967).
- 60) H.F.Tayler & R.L.Wain: *Proc.Roy.Soc.B.*, 268, 172(1962).
- 61) I.C.MacRae, M.Alexander & A.D.Rovira: *J.gen.Microbiol.*, 32, 69(1963).
- 62) 服部 勉: 東北大農研報 18, 159(1967).
- 63) 山岸, 古坂: 日本土肥学会 春季大会講演(1970).
- 64) 古 坂: 東北大農研報. 19, 101(1968).
- 65) 西 垣: 第3回日本アイソトープ会議報文集 912, 918(1955).
- 66) Greenwood: *Plant and Soil* 17, 378(1962).
- 67) 西尾, 古坂: 日本土肥. 40, 327(1969).
- 68) 西尾, 古坂: 日本土肥. 40, 364(1969).
- 69) A.D.McLaren: *Science*, 125, 697(1957).
- 70) A.D.McLaren: *Enzymol.*, 21, 356(1960).
- 71) T.Hattori & C.Furusake: *Nature* 184, 1966(1959).
- 72) T.Hattori & C.Furusake: *J.Biochem.*, 48, 831(1960).
- 73) P.C.Kearney, D.D.Kaufman & M.Alexander: *Soil Biochemistry* ed. by McLaren & G.H.Peterson, Dekker, New York, 1967. p.318.
- 74) 立川 源: 化学と生物 8, 539-547(1967).