

殺菌剤 TPN による畑土壌中のアンモニア酸化阻害

千葉県農林総合研究センター ^{やま}山 ^{もと}本 ^{ゆき}幸 ^{ひろ}洋

はじめに

農業は、農業生産において問題となる病害虫や雑草を防除するうえで必要不可欠な資材である。一方、農業は、一定量以上の暴露により生理活性を示す合成化学物質であり、その使用にあたっては、農作物における残留量はもちろん、農地や周辺環境における動態および標的生物以外に及ぼす影響について十分に把握する必要がある。

硝酸化成は、好気的な土壌中でアンモニアが酸化されて硝酸になる現象であり、大別して二つの反応からなる。すなわち、アンモニア酸化細菌によるアンモニアから亜硝酸への酸化と、亜硝酸酸化細菌による亜硝酸から硝酸への酸化である。硝酸化成は、畑地で栽培される農作物の多くが好硝酸性植物であること、アンモニアから硝酸に変化することにより溶脱や脱窒が生じやすくなること、反応の途中で温室効果ガスである亜酸化窒素を生じることから、農業生産と環境保全の両面で重要な微生物反応である。このため、農業の施用により硝酸化成をかく乱することは避けなければならない。

ここでは、硝酸化成の最初の反応であるアンモニア酸化に及ぼす殺菌剤の影響を調べ、その中で顕著な阻害活性を示した TPN (一般名:クロロタロニル, 化学名:テトラクロロイソフタロニトリル, 商品名:ダコニール, ダコソイル等) について詳細に検討した(山本ら, 2007)。

I 10種の殺菌剤による土壌中のアンモニア酸化阻害

供試薬剤による畑土壌中のアンモニア酸化阻害活性は、特に記載しない限り以下の方法で評価した(図-1)。まず、乾土 10 g 相当の黒ボク土を 100 ml のビーカーにとり、供試薬剤を添加後混合した。供試薬剤の添加量は、有効成分に換算して乾土当たり 50 mg/kg である。この添加量は、供試した殺菌剤の中で散布量が多い TPN10.0%含有粉剤(商品名:ダコソイル)とトルクロ

ホスメチル 5.0%含有粉剤(商品名:リゾレックス粉剤)の散布量を想定している。次に、土壌の水分条件を最大容水量の 60%に調整し、基質として硫酸アンモニウムを窒素に換算して乾土当たり 200 mg/kg 添加後、混合した(木村, 1986)。その後、アルミ箔で軽くふたをして暗黒条件下、30℃の恒温器内で 21 日間培養した。培養終了後、土壌中のアンモニア態窒素(以下、 $\text{NH}_4\text{-N}$)含量および亜硝酸+硝酸態窒素(以下、 $(\text{NO}_2 + \text{NO}_3)\text{-N}$)含量を測定した。

最初に数系統の殺菌剤について土壌中のアンモニア酸化阻害活性を検証した。供試薬剤は、TPN(有機塩素系)、チウラム(有機硫黄系)、トリフルミゾール(エルゴステロール生合成阻害剤)、トルクロホスメチル(有機リン系)、イプロジオン(ジカルボキシイミド系)、フルトラニル(カルボキシアミド系)、ヘキサコナゾール(エルゴステロール生合成阻害剤)、イソプロチオラン(ジチオラン系)、ベノミル(ベンズイミダゾール系)およびメタラキシル(フェニルアמיד系)の 9 系統 10 種とした(図-2)。また、対照として硝化抑制剤配合肥料に最も多く使用されているジシアンジアミドを用いた。

その結果、培養後の土壌の $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量は、TPN とチウラムが最も高く、ジシアンジアミドとほぼ同等であった(図-3)。次いで、トリフルミゾール、トルクロホスメチル、イプロジオンおよびフルトラニルが高く、ヘキサコナゾール、イソプロチオラン、ベノミルおよびメタラキシルは薬剤無添加と差がなかった。土壌の $(\text{NO}_2 + \text{NO}_3)\text{-N}$ 含量は、TPN とチウラムが最も低く、ジシアンジアミドと同等であった。次いで、トリフルミゾール、トルクロホスメチルおよびイプロジオンが低く、フルトラニル、ヘキサコナゾール、イソプロチオラン、ベノミルおよびメタラキシルは薬剤無添加と有意差がなかった。

これらの結果から、TPN とチウラムは土壌中のアンモニア酸化阻害活性が高いと考えられた。その理由としては、植物病原菌に対する作用機構が共に SH 酵素阻害であり、呼吸をはじめ多くの生化学反応を阻害することが挙げられる。他の殺菌剤は、作用機構が SH 酵素阻害ではなく、より特異的である(図-2)。実際の圃場に散布する TPN の有効成分量は、最大 4 kg/10 a で、チウラムの 1.2 kg/10 a と比べて多い(米山ら, 1990)。この

Inhibition of Soil Ammonia Oxidation by a Fungicide, Chlorothalonil (Tetrachloroisophtharonitrile, TPN). By Yukihiro YAMAMOTO

(キーワード: TPN, 硝酸化成, アンモニア酸化, アンモニア酸化細菌)

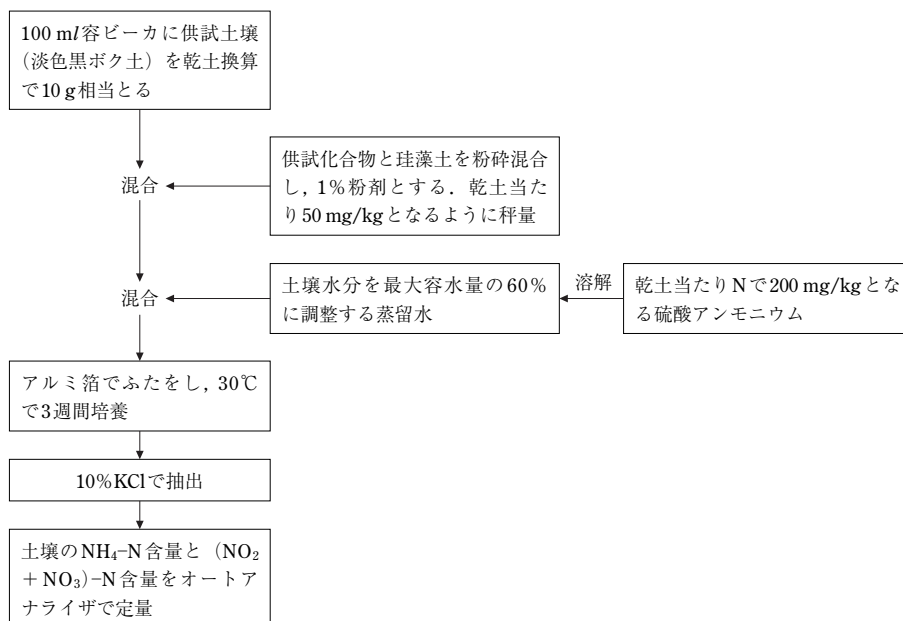


図-1 土壌中のアンモニア酸化阻害活性評価法

ことから、TPN は土壌中のアンモニア酸化を阻害する可能性がチウラムと比べて高いと考えられ、以後の試験に供した。

II TPN によるアンモニア酸化阻害持続期間

TPN が土壌中のアンモニア酸化を阻害する持続期間を調べた。培養期間は最長で 70 日とした。

培養後の土壌の $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量は、薬剤無添加およびジシアンジアミドがそれぞれ培養 21 日後と 49 日後で約 10 mg/kg に低下し、添加した $\text{NH}_4\text{-N}$ のほとんどが消失した (図-4)。これに対し、TPN は、薬剤無添加およびジシアンジアミドと比べて常に高く推移し、70 日後でも 68.7 mg/kg が残存した。土壌の $(\text{NO}_2 + \text{NO}_3)\text{-N}$ 含量は、薬剤無添加およびジシアンジアミドが培養 35 日後でそれぞれ 196 mg/kg と 163 mg/kg に達した。これに対し、TPN は、薬剤無添加およびジシアンジアミドと比べて常に低く推移し、培養 35 日後で 61.9 mg/kg、70 日後では 151 mg/kg であった。

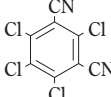
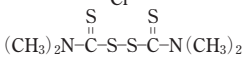
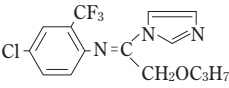
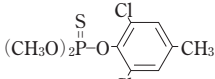
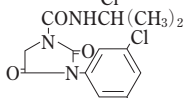
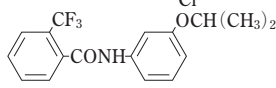
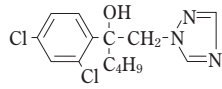
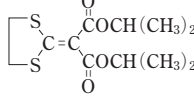
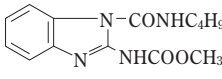
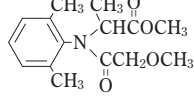
これらの結果から、TPN による土壌中のアンモニア酸化阻害は、ジシアンジアミドと比べて活性が高く、しかも長期間持続すると考えられた。

III TPN の添加量が土壌中のアンモニア酸化に及ぼす影響

TPN の添加量が土壌中のアンモニア酸化に及ぼす影響を調べた。添加量は、乾土当たり 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50 mg/kg とした。また、対照としてジシアンジアミドを乾土当たり 50 mg/kg 添加するジシアンジアミド区を設けた。試験方法は、添加量以外は上記方法と同じで、培養期間は 21 日である。

その結果、培養後の土壌の $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量は、TPN の添加量が多いほど高く、5 mg/kg 以上で薬剤無添加 (0 mg/kg) との有意差が認められた (図-5)。TPN を 5 mg/kg または 10 mg/kg 添加するとジシアンジアミド区と差がなく、50 mg/kg を添加するとジシアンジアミド区より高かった。土壌の $(\text{NO}_2 + \text{NO}_3)\text{-N}$ 含量は、TPN の添加量が多いほど低く、0.1 mg/kg でも薬剤無添加との有意差が認められた。また、TPN を 5 mg/kg 以上添加するとジシアンジアミド区と差がなかった。

これらの結果から、TPN による土壌中のアンモニア酸化阻害活性は、添加量に依存すると考えられ、添加量が 5 mg/kg 以上のときに薬剤無添加と比べて土壌の $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量と $(\text{NO}_2 + \text{NO}_3)\text{-N}$ 含量の両方に影響を及ぼすと考えられた。

一般名	系統 ¹⁾	構造式	作用機構 ^{1, 6)}	作用する菌の範囲 ^{6, 8)}
TPN	有機塩素系		SH酵素阻害	作用する菌の範囲が広い
チウラム	有機硫黄系		金属酵素, SH酵素阻害	作用する菌の範囲が広い
トリフルミゾール	エルゴステロール 生合成阻害剤		エルゴステロール 生合成阻害	担子菌, 子のう菌, 不完全菌
トルクロホスメチル	有機リン系		接触的に作用し, 菌糸 細胞の内容物が漏出し て死滅する	担子菌
イプロジオン	ジカルボキシイミド系		細胞膜の透過機能と細胞 壁の合成を阻害する	主に灰色かび病菌, 菌核病菌
フルトラニル	カルボキシアミド系		呼吸阻害	担子菌
ヘキサコナゾール	エルゴステロール 生合成阻害剤		エルゴステロール 生合成阻害	担子菌, 子のう菌, 不完全菌
イソプロチオラン	ジチオラン系		リン脂質合成阻害	主にイネいもち病菌
ベノミル	ベンズイミダゾール系		有糸核分裂阻害	担子菌, 子のう菌
メタラキシル	フェニルアמיד系		RNA合成阻害	疫病菌, <i>Pythium</i> 属菌, べと病菌

*片括弧内の数値は, 引用文献の番号を示す。

図-2 供試した殺菌剤の系統と植物病原菌に対する作用機構および抗菌スペクトラム

IV TPNが土壌中のアンモニア酸化細菌に及ぼす影響

TPNがアンモニア酸化細菌に及ぼす影響を調べた。この試験では, アンモニア酸化細菌に対する供試薬剤の影響を把握しやすくするため, あらかじめ供試土壌にアンモニア酸化細菌の基質である硫酸アンモニウムを14日間隔で3回添加し, アンモニア酸化細菌の増殖を促した(以下, アンモニア酸化細菌集積土壌)。TPNは, アンモニア酸化細菌集積土壌に乾土当たり100 mg/kg添加した。対照としてタンパク質合成阻害剤クロラムフェニコールを500 mg/kg添加する区と薬剤無添加区を設けた。培養期間は最長で21日とした。また, 土壌中

のアンモニア酸化細菌数は最確値法により測定した(木村, 1986)。

その結果, 土壌のNH₄-N含量は, 薬剤無添加では経時的に低下した(図-6)。これに対し, TPNとクロラムフェニコールは, 培養21日後まで当初のNH₄-N含量に近い約200 mg/kgで推移し, アンモニア酸化は認められなかった。土壌中のアンモニア酸化細菌数は, 培養開始時で乾土1g当たり10⁴オーダーであった。クロラムフェニコールと薬剤無添加は, 培養21日後まで10⁴オーダーで推移し, 減少は認められなかった。これに対し, TPNは, 培養7日後で10³オーダーに減少し, 14日後, 21日後では測定下限値以下となった。

以上のように両薬剤とも土壌中のアンモニア酸化を阻

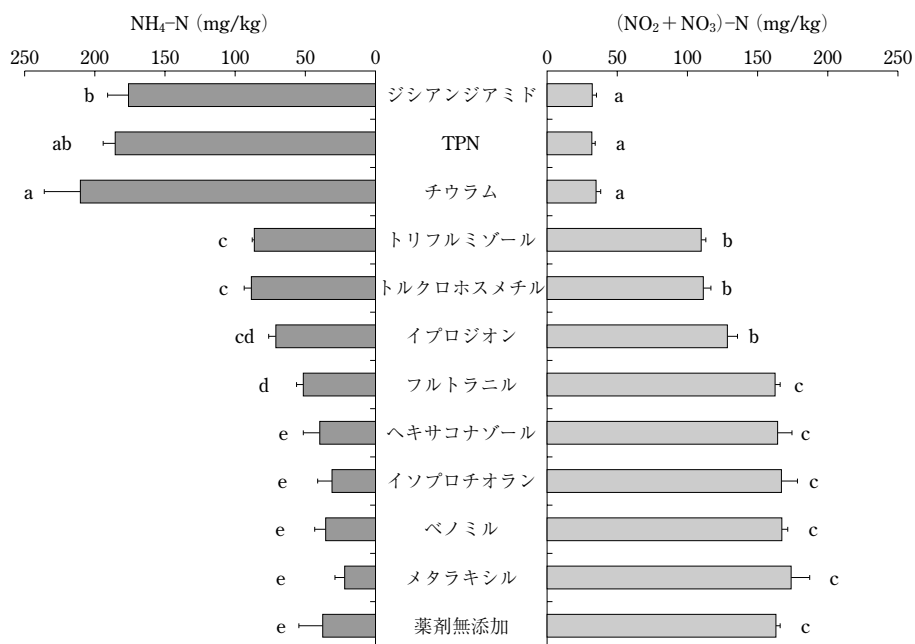


図-3 土壌中のアンモニア酸化に及ぼす殺菌剤の影響
エラーバーは標準偏差 ($n = 3$) を、同一英小文字は Tukey 法により 5%水準で有意差がないことを示す。

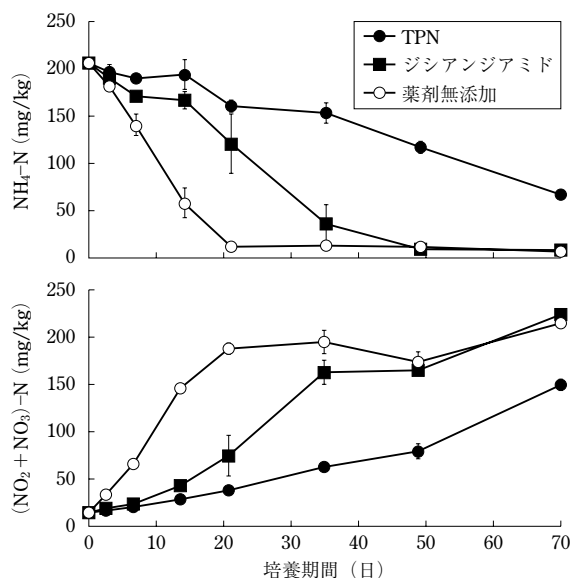


図-4 TPN による土壌中のアンモニア酸化阻害期間
エラーバーは標準偏差 ($n = 3$) を示す。

害したが、TPN はクロラムフェニコールと比べて土壌中のアンモニア酸化細菌数を急激に減少させた。このことから、TPN はクロラムフェニコールと比べてアンモニア酸化細菌に対する致死作用が強いと考えられた。タンパク質合成阻害剤であるクロラムフェニコールは、土壌中のアンモニア酸化細菌数を減少させなかったことから、本試験で用いた添加量では酸化に関与する酵素タンパク質の合成を阻害するにとどまり、静菌作用を示したと推定される。これに対し、TPN は作用機構が SH 酵素阻害であること、クロラムフェニコールより親油性であるために生体膜を透過しやすいこと等の理由によりアンモニア酸化細菌に対してより致命的に作用したと考えられた。

おわりに

殺菌剤は、一定の範囲の微生物相に対して生理的な影響を及ぼす薬剤であり、標的以外の微生物に対しても生理活性を示す可能性がある。ここでは、TPN による土壌中のアンモニア酸化阻害について紹介した。TPN を積極的に硝酸化成抑制剤として利用することも考えられるが、長期連用により土壌中での分解速度が低下し、残留性が高まるとの報告があることから (TAKAGI et al., 1991; KATAYAMA et al., 1991), 適当ではないと考える。ま

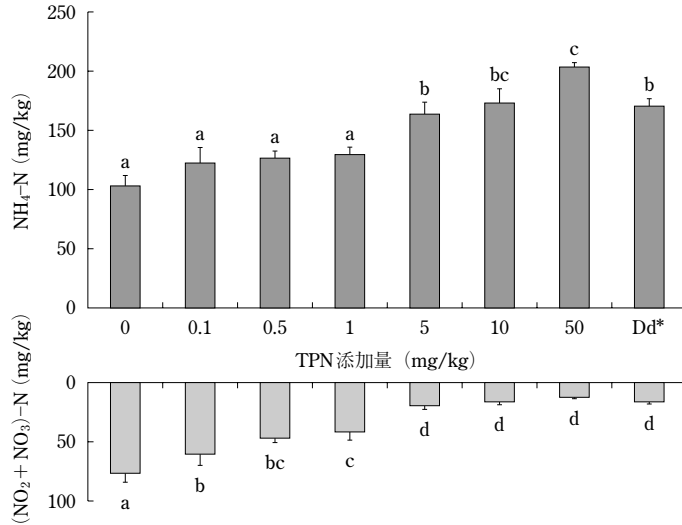


図-5 土壤中のアンモニア酸化に及ぼす TPN 添加量の影響
*ジシアンジアミド区を示す。エラーバーは標準偏差 (n = 3) を、同一英小文字は Tukey 法により 5%水準で有意差がないことを示す。

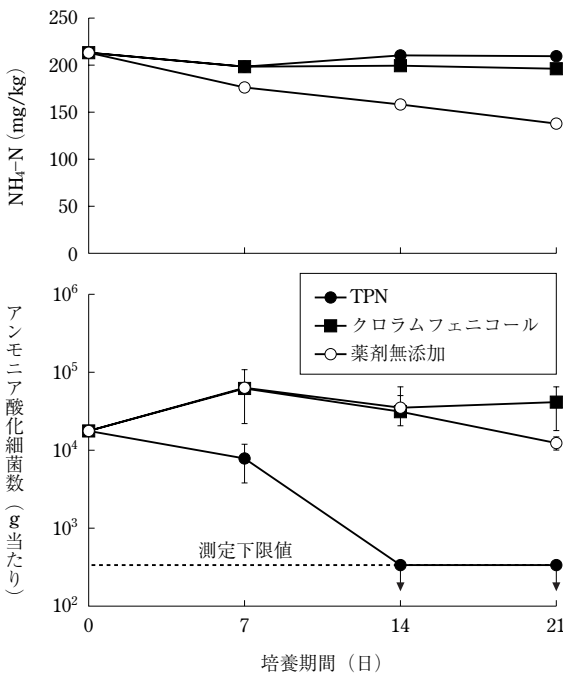


図-6 アンモニア酸化細菌に及ぼす TPN の影響
エラーバーは標準偏差 (n = 3) を、↓印は測定下限値以下を示す。

た、畑地で栽培される農作物の多くが好硝酸性植物であることから、TPN による土壤中のアンモニア酸化阻害により作物の生育が抑制されることが懸念される。この対策としては、硝酸化成抑制剤配合肥料の施用を控える、施肥窒素における硝酸態の比率を高める、土壌における TPN の分解を促進するとともにアンモニア酸化能の回復を図るために有機物を圃場に施用するといったことが考えられる (孫ら, 1985)。

農薬は、農業生産上非常に有用な資材であり、特性をよく知り、上手に使うことが肝要である。今回紹介した TPN による土壤中のアンモニア酸化阻害に関しても、そうした性状を認識し、上記のような対策を実施することで作物生育への影響を抑えることができると考える。農薬を上手に使いこなすため、今後も農薬の安全使用に向けた試験研究の推進と生産現場への情報提供が必要である。

引用文献

- 1) JA 全農肥料農業部農薬技術・安全課編 (2004) : クミアイ農業総覧 2005, 全国農村教育協会, 東京, p. 1977 ~ 2054.
- 2) KATAYAMA, A. et al. (1991) : J. Pesticide Sci. 16 : 233 ~ 238.
- 3) 木村龍介 (1986) : 土壌標準分析・測定法, 博友社, 東京, p. 312 ~ 320.
- 4) 孫 鉄珩ら (1985) : 土肥誌 56 : 31 ~ 36.
- 5) TAKAGI, K. et al. (1991) : Soil Sci. Plant Nutr. 37 : 583 ~ 590.
- 6) 上杉康彦ら (1995) : 植物病理学事典, 養賢堂, 東京, p. 797 ~ 808.
- 7) 山本幸洋ら (2007) : 土肥誌 78 : 15 ~ 22.
- 8) 米山伸吾ら (1990) : 農薬便覧 10, 農文協, 東京, p. 2 ~ 395.