

## 第IV章 クロロタロニルによる土壤中のアンモニア酸化阻害

### 第1節 緒言

硝酸化成は、好氣的な土壤中アンモニアが硝酸に酸化される現象であり、大別して2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(甲斐, 1994)。土壤中の硝酸化成は、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から(河崎・森次, 1990)、極めて重要な微生物反応である。硝酸化成を薬剤を用いて意図的に制御することは、主に溶脱や脱窒による窒素肥料の損失を減らす目的で行われてきた(栗原, 1991)。近年では、亜酸化窒素の温室効果に対する懸念から、硝酸化成に由来する亜酸化窒素の発生を抑制する目的で硝酸化成抑制剤の利用が試みられている(赤井ら, 2001; 渡辺ら, 1999)。

土壌生態系に及ぼす農薬の影響は、比較的古くから多くの研究が行われてきた(Hellingら, 1971)。特に硝酸化成は、農業生産上重視されているため、土壌に農薬を施用した時の影響を調べる重要な指標とされている。また、土壌中の硝酸化成は、一般に除草剤や殺虫剤と比べて殺菌剤により強く阻害されるといわれている(佐藤, 1994)。上述のように、農作物の生産性と環境保全の両面から硝酸化成を適正に管理する必要性が高まる中、農薬の施用により硝酸化成を攪乱することは避けなければならない。そのためには、農薬が土壌中の硝酸化成に及ぼす影響を把握する必要がある。

そこで、本章では数系統の殺菌剤による土壌中のアンモニア酸化阻害活性を確認するとともに、その中で顕著な活性を示したクロロタロニルの阻害活性について詳細に検討した(山本ら, 2002; 山本ら, 2003; 山本ら, 2007)。

### 第2節 材料および方法

#### 1. 土壌中のアンモニア酸化阻害活性評価法

各試験において、供試薬剤による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(第4-1図)。

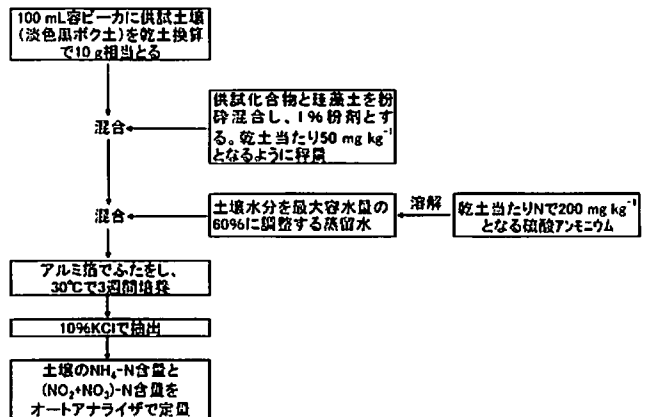
供試土壌は、淡色黒ボク土(大川口統、土性: CL, pH(H<sub>2</sub>O): 5.39、T-C: 53g kg<sup>-1</sup>、T-N: 3.7g kg<sup>-1</sup>、アンモニア態窒素含量: 9mg kg<sup>-1</sup>、亜硝酸+硝酸態窒素含量: 11mg kg<sup>-1</sup>、採取地: 茨城県つくば市観音台)とし、2mm

の篩を通したものをを用いた。供試土壌の採取場所は、小麦を20年間栽培した圃場(基肥窒素70kg ha<sup>-1</sup>、追肥窒素30kg ha<sup>-1</sup>を硫酸アンモニウムで毎作施用)の地表から深さ20cmまでである。供試薬剤は、珪藻土(VARIAN社製CHEM TUBE-HYDROMATRIX)とともに粉碎・混合し、1%の粉剤としたものをを用いた。

乾土10g相当の供試土壌を100ml容ビーカーにとり、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50mg kg<sup>-1</sup>である。この添加量は、供試した殺菌剤の中で施用量が多いクロロタロニル10.0%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)の施用量、それぞれ0.40Mg ha<sup>-1</sup>と1.00Mg ha<sup>-1</sup>を想定している(Katayamaら, 1991; Takagiら, 1991; 高木, 1991; 米山ら, 1990)。さらに、蒸留水で土壌の水分条件を最大容水量の60%に調整し、硫酸アンモニウムを添加後、混合した。硫酸アンモニウムの添加量は、窒素に換算して乾土当たり200mg kg<sup>-1</sup>である(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。培養中の土壌含水量は、試料の全重量を週2回測定して把握し、蒸発による減少量を蒸留水で補充した。試験は全て3反復で行った。

各供試薬剤による土壌中のアンモニア酸化阻害活性は、培養終了時における土壌中のアンモニア態窒素(以下、NH<sub>4</sub>-N)含量及び亜硝酸+硝酸態窒素(以下、(NO<sub>2</sub>+NO<sub>3</sub>)-N)含量で評価した。土壌中のNH<sub>4</sub>-Nと(NO<sub>2</sub>+NO<sub>3</sub>)-Nは、10%塩化カリウム溶液で抽出し、NH<sub>4</sub>-Nはインドフェノール法で、(NO<sub>2</sub>+NO<sub>3</sub>)-Nは銅・カドミウム還元-ナフチルエチレンジアミン法でそれぞれ発色後(千葉県, 2005)、オートアナライザ(ブラン・ルーベ社製TR AACS800型)により定量した。



第4-1図 土壌中のアンモニア酸化阻害活性評価法

2. 10種の殺菌剤による土壌中のアンモニア酸化阻害

供試薬剤は、幅広い系統を網羅する観点から選定し、クロロタロニル（和光純薬社製、純度99.0%以上、有機塩素系（JA全農肥料農薬部農薬技術・安全課、2004b））、チウラム（和光純薬社製、純度98.0%以上、有機硫黄系）、トリフルミゾール（日本曹達社製、純度99.7%、エルゴステロール生合成阻害剤）、トルクロホスメチル（関東化学社製、純度98%以上、有機リン系）、イプロジオン（RHONE-POULENC社製、ジカルボキシイミド系）、フルトラニル（日本農薬社製、純度99.9%、カルボキシアミド系）、ヘキサコナゾール（ICI社製、純度77.5%、エルゴステロール生合成阻害剤）、イソプロチオラン（日本農薬社製、純度99.97%、ジチオラン系）、ベノミル（デュボン社製、純度99%、ベンズイミダゾール系）およびメタラキシル（関東化学社製、純度99%以上、フェニルアמיד系）の9系統10種とした（第4-1表）。

試験区の構成は、これら供試薬剤を添加する区、対照

として、現在、硝酸化成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（ナカライテスク社製、純度99%）を添加するジシアンジアミド区および薬剤無添加区とした（JA全農千葉、2005）。ジシアンジアミドの添加量は、他の供試薬剤と同じく乾土当たり50mg kg<sup>-1</sup>であるが、窒素に換算すると添加する全窒素量の14%に相当し、市販されているジシアンジアミド配合肥料の10%と比較しても妥当である（樋口、1999；JA全農千葉、2005）。

3. 硝酸化成抑制剤とクロロタロニルを同時施用した場合の土壌中のアンモニア酸化阻害

供試薬剤は、クロロタロニルとジシアンジアミドとした。試験区の設定は、ジシアンジアミドとクロロタロニル各50mg kg<sup>-1</sup>を同時に添加するジシアンジアミド+クロロタロニル区、ジシアンジアミドとクロロタロニルを単独で添加するジシアンジアミド区、クロロタロニル区及び薬剤無添加区とした。培養期間は21日間及び42日間とした。

第4-1表 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

一般名	系統 <sup>1)</sup>	構造式 <sup>2)</sup>	作用機構 <sup>1,3)</sup>	抗菌スペクトラム <sup>3,4)</sup>
クロロタロニル	有機塩素系		SH酵素阻害	抗菌スペクトラム広い
チウラム	有機硫黄系		金属酵素、SH酵素阻害	抗菌スペクトラム広い
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、Pythium属菌、べと病菌

1) JA全農肥料農薬部農薬技術・安全課（2004b）より引用。  
 2) 上杉ら（1997）より引用。  
 3) 上杉ら（1995）より引用。  
 4) 米山ら（1990）より引用。

4. クロロタロニルによる土壤中のアンモニア酸化阻害持続期間

培養期間は70日とした。試験区の構成は、クロロタロニルを添加するクロロタロニル区、ジシアンジアミド区および薬剤無添加区とした。

5. クロロタロニルの添加量が土壤中のアンモニア酸化に及ぼす影響

試験区の構成は、クロロタロニルを乾土当たり0、0.1、0.5、1、5、10、50mg kg<sup>-1</sup>添加する7区およびジシアンジアミドを乾土当たり50mg kg<sup>-1</sup>添加するジシアンジアミド区とした。

6. クロロタロニルの土壤中の分解産物TPN-OHによるアンモニア酸化阻害

試験区の構成は、畑土壌におけるクロロタロニルの主要分解産物であるTPN-OHを添加するTPN-OH区(第4-2図)(Motonaga, 1998)、クロロタロニル区、ジシアンジアミド区および薬剤無添加区とした。

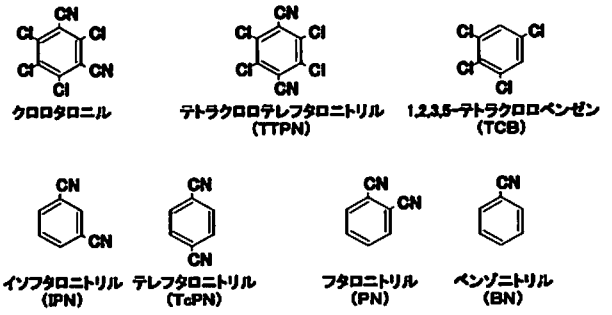


第4-2図 TPN-OHの化学構造

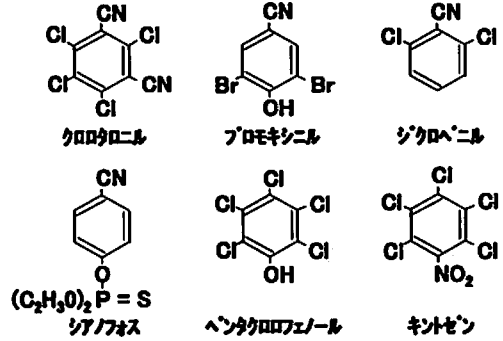
7. クロロタロニルの化学構造と土壤中のアンモニア酸化阻害との関係

供試薬剤として、クロロタロニルのメタ位のニトリル基がパラ位に配位した構造異性体テトラクロロテレフタロニトリル(東京化成社製、純度98%、以下、TTPN)、ニトリル基が脱離した1,2,3,5-テトラクロロベンゼン(Accu Standard社製、以下、TCB)、逆に塩素が脱離したニトリル系化合物のイソフタロニトリル(和光純薬社製、純度98.0%以上、以下、IPN)、テレフタロニトリル(和光純薬社製、純度95.0%以上、以下、TePN)、フタロニトリル(和光純薬社製、純度97.0%以上、以下、PN)およびベンゾニトリル(和光純薬社製、純度98.0%以上、以下、BN)を用い、それらのアンモニア酸化阻害活性をクロロタロニルと比較した(第4-3図)。

試験区の構成は、化学構造の相違が土壤中のアンモニア酸化阻害活性に及ぼす影響を検討するため、供試薬剤を乾土当たり0.2mmol kg<sup>-1</sup>(クロロタロニルで53mg kg<sup>-1</sup>相当)添加する区及び薬剤無添加区とし、さらに、ベンゾニトリルでは、構造中のニトリル基が1つであることから0.4mmol kg<sup>-1</sup>添加する区を設けた(以下、BN0.4区)。



第4-3図 供試したクロロタロニルと類縁化合物の化学構造



第4-4図 供試したハロゲンとニトリル基を含有する農薬の化学構造

8. ハロゲンとニトリル基を含有する農薬による土壤中のアンモニア酸化阻害作用

供試薬剤は、ベンゼン環に塩素が置換したキントゼン(殺菌剤、農林水産省登録名PCNB)、ペンタクロロフェノール(除草剤・殺菌剤)、ニトリル基とハロゲン元素が置換したプロモキシニル(除草剤)、ジクロベニル(除草剤)、ニトリル基が置換したシアノフォス(殺虫剤)およびクロロタロニルとした(第4-4図)。試験区の構成は、これら供試薬剤を乾土当たり0.2mmol kg<sup>-1</sup>添加する区および薬剤無添加区とし、さらに、ジクロベニルとシアノフォスは構造中のニトリル基が一つなので、0.4mmol kg<sup>-1</sup>添加区を設けた(以下、ジクロベニル0.4区、シアノフォス0.4区)。

9. クロロタロニルが土壤中のアンモニア酸化細菌に及ぼす影響

供試土壌に予め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集積土壌とした。添加1回当たりの硫酸アンモニウムの量は、窒素に換算して乾土当たり200mg kg<sup>-1</sup>であり、その都度蒸留水で土壌の水分条件を最大容水量の60%に調整した。アンモニア酸化細菌集積土壌のpH(H<sub>2</sub>O)は4.62であった。

試験区の構成は、上記アンモニア酸化細菌集積土壌にクロロタロニルを乾土当たり100mg kg<sup>-1</sup>添加するクロロタロニル区、タンパク質合成阻害剤クロラムフェニコー

ルを500mg kg<sup>-1</sup>添加するクロラムフェニコール区および薬剤無添加区とした (Kuroshima・Hayano, 1982)。クロロタロニルの添加量は、アンモニア酸化細菌集積土壌に添加することを考慮して他の試験の倍量とした。

また、土壌中のアンモニア酸化細菌数を最確値法により測定した (木村, 1986)。

### 第3節 結果

#### 1. 10種の殺菌剤による土壌中のアンモニア酸化阻害

培養後の土壌のNH<sub>4</sub>-N含量は、クロロタロニル区とチウラム区が最も高く、ジシアンジアミド区とほぼ同等であった。次いで、トリフルミゾール区、トルクロホスメチル区、イプロジオン区及びフルトラニル区が高く、ヘキサコナゾール区、イソプロチオラン区、ベノミル区及びメタラキシル区は薬剤無添加区と差がなかった (第4-5図)。

また、培養後の土壌の(NO<sub>2</sub>+NO<sub>3</sub>)-N含量は、クロロタロニル区とチウラム区が最も低く、ジシアンジアミド区と同等であった。次いで、トリフルミゾール区、トルクロホスメチル区及びイプロジオン区が低く、フルトラニル区、ヘキサコナゾール区、イソプロチオラン区、ベノミル区及びメタラキシル区は薬剤無添加区と差がなかった (図4-5)。

以上から、クロロタロニルとチウラムは、土壌中のアンモニア酸化阻害活性が高いことが明らかとなった。実際の圃場におけるクロロタロニルの施用量は、有効成分に換算して最大40kg ha<sup>-1</sup>であり、チウラムの12kg ha<sup>-1</sup>と比べて多い (米山ら, 1990)。これらのことから、クロロタロニルは、圃場において土壌中のアンモニア酸化を阻害する可能性が最も高いと考えられ、以後の試験で阻害活性の強度と作用機構について詳細に検討した。

また、培養後の土壌の無機態窒素含量 (NH<sub>4</sub>-N含量と(NO<sub>2</sub>+NO<sub>3</sub>)-N含量の合計) は、チウラム区が244mg kg<sup>-1</sup>で最も高く、供試土壌の無機態窒素含量と添加量の合計 (220mg kg<sup>-1</sup>) より高かった。その他の試験区では、クロロタロニル区の216mg kg<sup>-1</sup>からメタラキシル区の195mg kg<sup>-1</sup>までの範囲にあり、区間で有意差が認められなかった。

#### 2. 硝化成抑制剤とクロロタロニルを同時施用した場合の土壌中のアンモニア酸化阻害

土壌のNH<sub>4</sub>-N含量は、培養21日後ではジシアンジアミド+クロロタロニル区、クロロタロニル区及びジシアンジアミド区が薬剤無添加区より有意に高かった。また、薬剤を添加した3区間で有意差は無く、170mg kg<sup>-1</sup>以上を維持した。培養42日後では、ジシアンジアミド+クロ

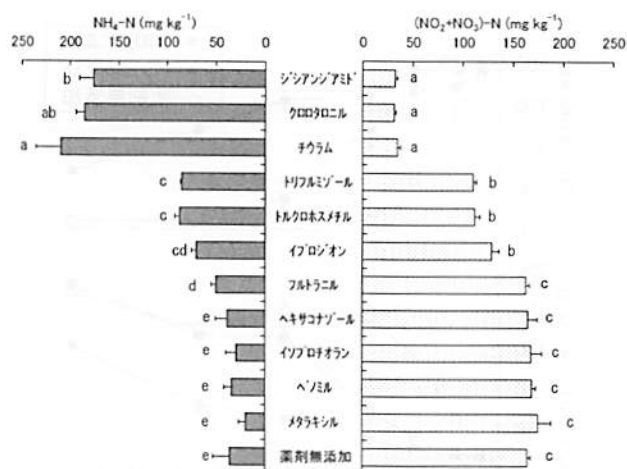
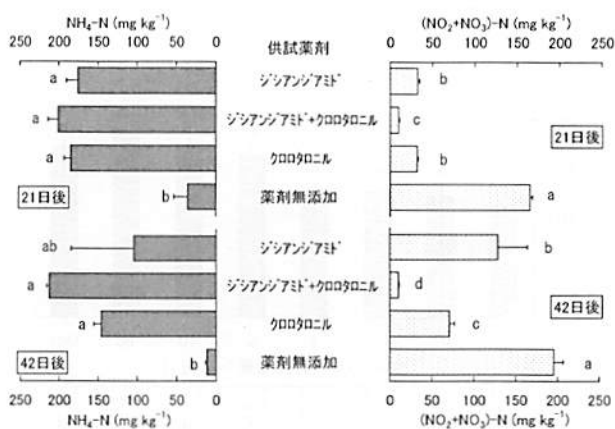


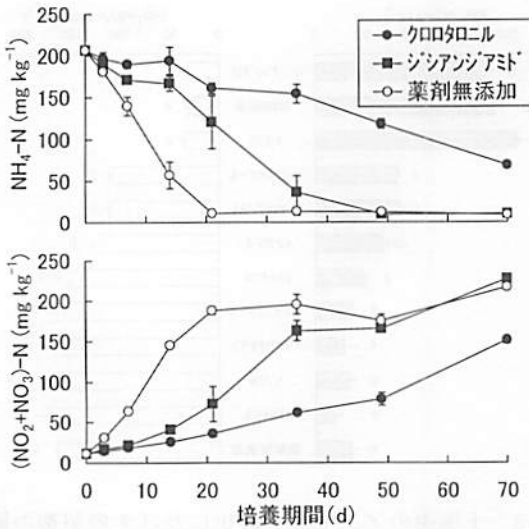
図4-5 土壌中のアンモニア酸化に及ぼす殺菌剤の影響  
エラーバーは標準偏差(n=3)を、同一英小文字はTukey法により5%水準で有意差がないことを示す。



第4-6図 ジシアンジアミドとクロロタロニルの同時施用が土壌中のアンモニア酸化に及ぼす影響  
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。

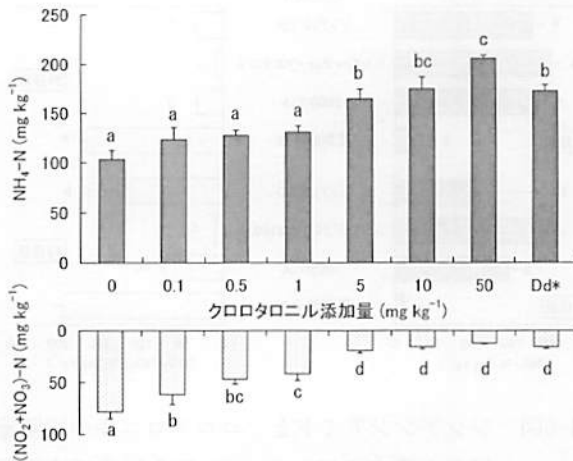
クロロタロニル区とクロロタロニル区が薬剤無添加区より有意に高かった。特にジシアンジアミド+クロロタロニル区は、初期濃度とほぼ同じ213mg kg<sup>-1</sup>を維持した。ジシアンジアミド区は反復間のばらつきが大きく、他の3区との有意差が検出されなかった (第4-6図)。

土壌の(NO<sub>2</sub>+NO<sub>3</sub>)-N含量は、培養21日後ではジシアンジアミド+クロロタロニル区が初期濃度とほぼ同じ9.91mg kg<sup>-1</sup>で最も低く、次いでクロロタロニル区とジシアンジアミド区が約30mg kg<sup>-1</sup>と低く、薬剤無添加区が165mg kg<sup>-1</sup>で最も高かった。培養42日後では、ジシアンジアミド+クロロタロニル区が初期濃度とほぼ同じ9.99mg kg<sup>-1</sup>で最も低かった。次いでクロロタロニル区とジシアンジアミド区がそれぞれ70.4mg kg<sup>-1</sup>と128mg kg<sup>-1</sup>で低く、薬剤無添加区が195mg kg<sup>-1</sup>で最も高かった (第4-6図)。



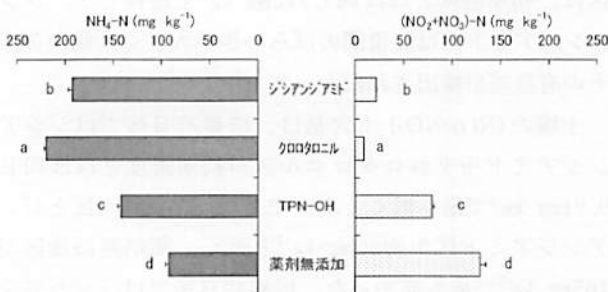
第4-7図 クロロタロニルによる土壌中のアンモニア酸化阻害持続期間

エラーバーは標準偏差 (n=3) を示す。



第4-8図 土壌中のアンモニア酸化に及ぼすクロロタロニル添加量の影響

\* 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。



第4-9図 土壌中のアンモニア酸化に及ぼすクロロタロニルとTPN-OH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。

### 3. クロロタロニルによる土壌中のアンモニア酸化阻害持続期間

土壌の $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量は、薬剤無添加区及びジシアンジアミド区がそれぞれ培養21日後と49日後で約 $10\text{mg kg}^{-1}$ に低下し、添加した $\text{NH}_4\text{-N}$ のほとんどが消失した。これに対し、クロロタロニル区は、薬剤無添加区及びジシアンジアミド区と比べて常に高く推移し、培養21日後と49日後ではそれぞれ $161\text{mg kg}^{-1}$ と $118\text{mg kg}^{-1}$ が残存し、70日後でも $68.7\text{mg kg}^{-1}$ が残存した (第4-7図)。

土壌の $(\text{NO}_2+\text{NO}_3)\text{-N}$ 含量は、薬剤無添加区及びジシアンジアミド区が培養35日後でそれぞれ $196\text{mg kg}^{-1}$ と $163\text{mg kg}^{-1}$ に達した。これに対し、クロロタロニル区は、薬剤無添加区及びジシアンジアミド区と比べて常に低く推移し、培養35日後で $61.9\text{mg kg}^{-1}$ 、70日後では $151\text{mg kg}^{-1}$ であった (第4-7図)。

### 4. クロロタロニルの添加量が土壌中のアンモニア酸化に及ぼす影響

培養後の土壌の $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量は、クロロタロニルの添加量が多い区ほど高く、 $5\text{mg kg}^{-1}$ 以上の区で薬剤無添加区との有意差が検出された。また、 $5\text{mg kg}^{-1}$ 区と $10\text{mg kg}^{-1}$ 区における土壌の $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量は、ジシアンジアミドを $50\text{mg kg}^{-1}$ 添加した区と差が無く、同量の $50\text{mg kg}^{-1}$ を添加した区ではジシアンジアミド区より高かった (第4-8図)。

培養後の土壌の $(\text{NO}_2+\text{NO}_3)\text{-N}$ 含量は、クロロタロニルの添加量が多い区程低く、 $0.1\text{mg kg}^{-1}$ 区でも薬剤無添加区との有意差が検出された。また、 $5\text{mg kg}^{-1}$ 以上の区では、ジシアンジアミド区と差がなかった (第4-8図)。

### 5. クロロタロニルの土壌中の分解産物TPN-OHによるアンモニア酸化阻害

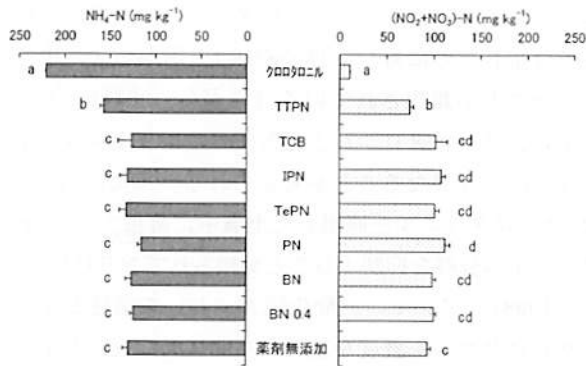
培養後の土壌の $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量は、クロロタロニル区が最も高く、次いでジシアンジアミド区、TPN-OH区、薬剤無添加区の順であった (第4-9図)。

培養後の土壌の $(\text{NO}_2+\text{NO}_3)\text{-N}$ 含量は、クロロタロニル区が最も低く、次いでジシアンジアミド区、TPN-OH区、薬剤無添加区の順であった (第4-9図)。

### 6. クロロタロニルの化学構造と土壌中のアンモニア酸化阻害との関係

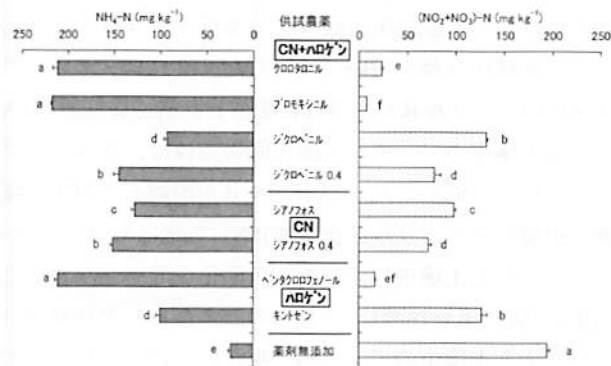
培養後の土壌の $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量は、クロロタロニル区が最も高く、次いでTPN区が高かった。TCB区、IPN区、TePN区、PN区、BN区およびBN0.4区は薬剤無添加区と差がなかった (第4-10図)。

培養後の土壌の $(\text{NO}_2+\text{NO}_3)\text{-N}$ 含量は、クロロタロニル区が最も低く、次いでTPN区が低く、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量の傾向と矛盾しなかった。薬剤無添加区と比べてTCB区、IPN区、TePN区、BN区およびBN0.4区は差が無く、PN区ではわずかに高かった (第4-10図)。



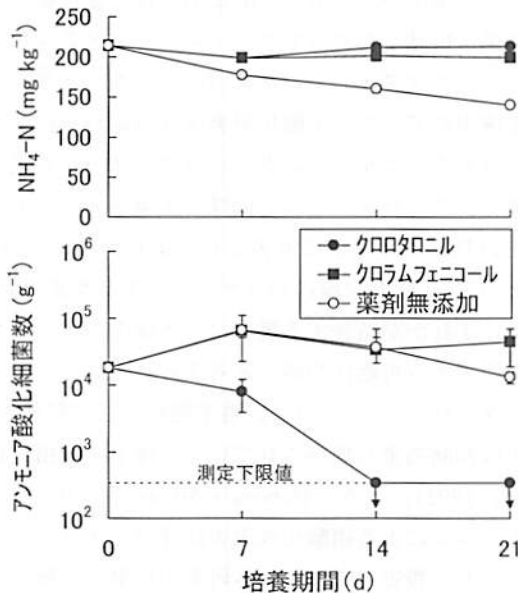
第4-10図 土壌中のアンモニア酸化に及ぼすクロロタロニル類緑化合物の影響

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。



第4-11図 ハロゲンとニトリル基を含有する農薬による土壌中のアンモニア酸化阻害作用

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1%水準で有意差がないことを示す。



第4-12図 アンモニア酸化細菌に及ぼすクロロタロニルの影響

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。

## 7. ハロゲンとニトリル基を含有する農薬による土壌中のアンモニア酸化阻害作用

培養後の土壌のNH<sub>4</sub>-N含量は、供試薬剤を添加した全ての区で薬剤無添加区に対して有意に高かった。クロロタロニル区とプロモキシニル区およびペンタクロロフェノールが最も高く、次いでシアノフォス0.4区、ジクロベニル0.4区、シアノフォス区、ジクロベニル区、キントゼン区の順であった(第4-10図)。

培養後の土壌の(NO<sub>2</sub>+NO<sub>3</sub>)-N含量は、供試薬剤を添加した全ての区で薬剤無添加区に対して有意に低かった。プロモキシニル区とペンタクロロフェノール区が最も低く、次いでクロロタロニル区が低く、シアノフォス0.4区、ジクロベニル0.4区、シアノフォス区、ジクロベニル区、キントゼン区の順でありNH<sub>4</sub>-N含量の傾向と矛盾しなかった(第4-11図)。

## 8. クロロタロニルが土壌中のアンモニア酸化細菌に及ぼす影響

土壌のNH<sub>4</sub>-N含量は、薬剤無添加区では経時的に低下した。これに対し、クロロタロニル区とクロラムフェニコール区では、培養21日後まで、当初のNH<sub>4</sub>-N含量に近いほぼ200mg kg<sup>-1</sup>で推移し、アンモニア酸化は認められなかった(第4-12図)。

アンモニア酸化細菌集積土壌における細菌数は、培養開始時には乾土1g当たり10<sup>4</sup>オーダーに達していた。以後、アンモニア酸化細菌数は、クロラムフェニコール区と薬剤無添加区では培養21日後まで10<sup>4</sup>オーダーで推移し、減少は認められなかった。これに対し、クロロタロニル区では、培養7日後で10<sup>3</sup>オーダーに減少し、14日後、21日後では測定下限値の10<sup>2</sup>オーダー以下となった(第4-12図)。

## 第4節 考察

### 1. クロロタロニルによる土壌中のアンモニア酸化阻害

土壌中のアンモニア酸化に及ぼす10種の殺菌剤の影響について試験した結果から、クロロタロニル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。これらに比べ、トリフルミゾール、トルクロホスメチル、イブロジオンのアンモニア酸化阻害活性は低く、フルトラニル、ヘキサコナゾール、イソプロチオラン、ベノミル及びメタラキシルについてはアンモニア酸化阻害活性が認められなかった(第4-1表、第4-5図)。

また、チウラム区の無機態窒素含量が供試土壌の初期含量と添加量の合計よりも高かったことから、チウラムは土壌中のアンモニア酸化を促進すると考えられた。これは、チウラムが土壌微生物に対して選択的に作用する



ことで生じた部分殺菌効果によるものと考えられる (佐藤, 1994)。チウラム区以外の試験区の無機態窒素含量は、供試土壌の無機態窒素含量と添加量の合計より低く、硝酸化成に伴う亜酸化窒素の生成や脱窒により揮散したと考えられた。

農業生産現場において最も問題となることは、クロロタロニルの使用者が土壌中のアンモニア酸化が阻害されることを認識せず、本薬剤と硝酸化成抑制剤配合肥料を同時に施用した場合と考えられる。ジシアンジアミド+クロロタロニル区は、それぞれの薬剤を単独で添加した区と比べて土壌中のアンモニア酸化阻害活性が高く、培養42日後でもアンモニア酸化をほぼ完全に阻害した。このことから、クロロタロニル散布時は、硝酸化成抑制剤配合肥料の使用を控えるなど、使用者の注意を喚起する必要があると考えられた (第4-6図)。

クロロタロニルによる土壌中のアンモニア酸化阻害の持続期間を調査したところ、クロロタロニルを添加した土壌の $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量は、ジシアンジアミドと比べて常に高く推移し、また、 $(\text{NO}_2+\text{NO}_3)\text{-N}$ 含量は常に低く推移した (第4-7図)。このことから、クロロタロニル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。また、添加量が多いほど土壌の $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量が高く、 $(\text{NO}_2+\text{NO}_3)\text{-N}$ 含量が低かった。薬剤無添加区との間に有意差が検出された最小の添加量は、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量が  $5 \text{ mg kg}^{-1}$ 、 $(\text{NO}_2+\text{NO}_3)\text{-N}$ 含量が  $0.1 \text{ mg kg}^{-1}$ であった (第4-8図)。このことから、クロロタロニル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  $5 \text{ mg kg}^{-1}$ 以上のときに土壌の $\text{NH}_4\text{-N}$ 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。

## 2. クロロタロニルによる土壌中のアンモニア酸化阻害作用機構

尿素系除草剤リニュロンとディウロンは硝酸化成を阻害しないが、その分解産物3-(3,4-ジクロロフェニル)-1-メチルウレアと3,4-ジクロロアニリンは、それぞれ土壌中の亜硝酸酸化とアンモニア酸化を阻害する (Corke・Tompson, 1970)。このことから、土壌中の硝酸化成に及ぼす農薬の影響を評価する上で分解産物の寄与を把握することは重要である。そこで、本研究では、畑土壌におけるクロロタロニルの主要分解産物であるTPN-OHによる土壌中のアンモニア酸化阻害を検証した。その結果、TPN-OHによるアンモニア酸化阻害活性は、クロロタロニルと比べて低いことが明らかとなった (第4-9図)。このことから、クロロタロニルによる土壌中のアンモニア酸化阻害におけるTPN-OHの寄与は、クロロタロニルと比べて小さいと考えられた。一方、クロロタロニルを

連用した土壌において、クロロタロニルは表層から10cmまで分布したのに対し、TPN-OHは表層から60cmまで分布したことが報告されている (元永ら, 2001)。このことから、クロロタロニルとTPN-OHの存在比率は、土壌の深さにより異なることが考えられる。また、TPN-OHは、クロロタロニルを連用した土壌中に蓄積され、クロロタロニルの分解を抑制することが知られており (Motonagaら, 1998)、アンモニア酸化阻害において活性がより高いクロロタロニル濃度を維持する間接的な役割を果たしていると考えられる。今後、クロロタロニルによる土壌中のアンモニア酸化阻害におけるTPN-OHの寄与は、クロロタロニルとの存在比率やクロロタロニル分解速度への影響といった面を含めて評価する必要がある。

また、本研究では、クロロタロニルの化学構造と土壌中のアンモニア酸化阻害活性との関係をクロロタロニルとその類縁化合物を用いて検証した。クロロタロニルのメタ位のニトリル基がパラ位に配位した構造異性体TTPNによる土壌中のアンモニア酸化阻害活性は、クロロタロニルと比べて低かった。ニトリル基が脱離したTCBや塩素が脱離したニトリル系化合物IPN、TePN、PNおよびBNは、いずれも土壌中のアンモニア酸化を阻害しなかった (第4-3図, 第4-10図)。これらのことから、クロロタロニルによる土壌中のアンモニア酸化阻害には、構造中のニトリル基と塩素の存在が必須であり、それらの分子内での配置が活性の強度に大きく関与すると考えられた。

また、クロロタロニルと同様にベンゼン環にハロゲンとニトリル基の両方、またはいずれかが結合する農薬について、土壌中のアンモニア酸化阻害作用を検証した。その結果、供試したプロモキシニル、ペンタクロロフェノール、シアノフォス、ジクロベニル、キントゼンの全てで土壌中のアンモニア酸化阻害活性が認められた。特に、プロモキシニルとペンタクロロフェノールの阻害活性が高く、クロロタロニルと同様に土壌中のアンモニア酸化を21日間ほぼ完全に阻害した (第4-11図)。これらのことから、ベンゼン環にハロゲンとニトリル基の両方、またはいずれかが結合する農薬は、土壌中のアンモニア酸化を阻害する可能性が高いと考えられた。

ペンタクロロフェノールは、農薬肥料として利用され、硝酸化成抑制効果も期待されていた (橋本・岡田, 1964; 栗原, 1991)。また、Debona・Audus (1970) は、プロモキシニルによる硝酸化成阻害活性がジクロベニルより高いことを報告しており、本研究の結果と一致した。Caseley・Broadbent (1968) は、キントゼンなど塩素とニトロ基を有する5種の殺菌剤が硝酸化成を阻害することを報告し、ベンゼン環に結合する塩素数が減り、アミノ基が導入されたりニトロ基が増えると硝酸化成細菌に

対する毒性が高まるとしている。また、Tu (1970) は、ニトリル基を含まないダイアジノンなど4種の有機リン系殺虫剤が土壌中の硝酸化成を抑制することを報告している。このため、シアノフォスによる土壌中のアンモニア酸化阻害におけるニトリル基の寄与については、今後検討する必要がある。

アンモニア酸化細菌集積土壌にクロロタロニルとクロラムフェニコールを添加したところ、両薬剤とも土壌中のアンモニア酸化を阻害したが、クロロタロニル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、クロロタロニルは、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(第4-12図)。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、本研究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留まり、静菌作用を示したと推定される。これに対し、クロロタロニルは、作用機構がタンパク質合成阻害以外であること、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などの理由により(鈴木、1979；上杉ら1995)、アンモニア酸化細菌に対してより致死的に作用したと考えられた。

供試した殺菌剤のうち、土壌中のアンモニア酸化阻害活性が高かったクロロタロニルとチウラムは、植物病原菌に対する作用機構が共にSH酵素阻害であり、呼吸を始め多くの生化学反応を阻害する多作用点阻害であるため、抗菌スペクトラムが広い。これらに比べ、他の殺菌

剤は、作用機構がSH酵素阻害以外で一次作用点により特異的であり、抗菌スペクトラムが狭い(JA全農肥料農薬部農薬技術・安全課、2004b；上杉ら、1995；米山ら、1990)(第4-1表)。また、クロロタロニルによるSH酵素阻害は、1,3位にニトリル基が配位していることにより、4位または6位の塩素がSH基と速やかに置換して生じると考えられている(Vincent・Sisler、1968)。本研究においても、クロロタロニル構造中のニトリル基と塩素の分子内配置が土壌中のアンモニア酸化阻害活性に関与することが明らかとなった。これらのことから、クロロタロニルによる土壌中のアンモニア酸化阻害の作用機構は、SH酵素阻害と推定した。

本研究により、クロロタロニルは、土壌中のアンモニア酸化阻害活性が高いこと、構造中のニトリル基と塩素の存在がアンモニア酸化阻害に必須で、それらの分子内での配置が活性の強度に大きく関与することが明らかとなった。また、クロロタロニルは、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して致死的に作用することが確認された。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、非標的微生物に対しても生理活性を示す可能性がある。特に、非特異的な作用機構を有する殺菌剤の場合はより可能性が高い。今後、クロロタロニルによる土壌中のアンモニア酸化阻害に関する詳細な作用機構の検討を行うとともに、土壌の種類や水分、pHなど様々な条件において(甲斐、1994；鉄塚、1998)、広範囲の農薬とそれらの分解産物が硝酸化成に及ぼす影響を明らかにする必要がある。