

畑土壤における殺菌剤クロロタロニルの
動態と生理作用に関する研究

山 本 幸 洋

目 次

第I章 序 論

第1節 研究の背景	53
第2節 供試薬剤「クロロタロニル」	53
第3節 研究の目的	54

第II章 砂質露地畑におけるパンライシメータ法によるクロロタロニル鉛直浸透量の測定

第1節 緒 言	55
第2節 材料および方法	55
第3節 結 果	56
第4節 考 察	57

第III章 畑土壌中のクロロタロニル消失過程における炭素同位体分別

第1節 緒 言	59
第2節 材料および方法	59
第3節 結果および考察	60

第IV章 クロロタロニルによる土壌中のアンモニア酸化阻害

第1節 緒 言	62
第2節 材料および方法	62
第3節 結 果	65
第4節 考 察	67

第V章 クロロタロニルによる土壌中のアンモニア酸化阻害が作物生育に及ぼす影響

第1節 緒 言	70
第2節 材料および方法	70
第3節 結 果	72
第4節 考 察	75

第VI章 総合考察

要 旨	78
-----------	----

謝 辞	79
-----------	----

引用文献	80
------------	----

Summary	84
---------------	----

第 I 章 序 論

第 1 節 研究の背景

農薬は、農業生産を維持する上で必要不可欠な資材である (松中、1998)。一方、農薬は、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る。このため、その使用に当たっては、農作物に対する薬害や残留は勿論、農地や周辺環境の汚染、非標的生物への影響等、農薬が持つ危険性を適切に管理する必要がある。そのためには、農薬による農地と環境への負荷の実態と許容水準の解明、流出対策の策定等に関する研究が重要である。

Rachel Carson (1989) は、1962年に「SILENT SPRING (邦訳：沈黙の春)」を著し、DDT、BHC等の化学物質による環境汚染問題に警鐘を鳴らした。我が国でも環境中の化学物質に対する規制が進められ、現在、農薬に関係するものとして、水質汚濁に係る環境基準 (環境庁、1993)、地下水の水質汚濁に係る環境基準 (環境庁、1997)、水道法における水質管理目標設定項目 (厚生労働省健康局水道課長、2003)、オゾン層保護法における臭化メチルの指定 (平成 6 年政令、1994) などが制定されている。また、1999年にはPRTR制度が導入され、化学物質の排出源と排出量をより厳格に監視する体制が採られるようになった (平成11年法律、1999a)。

1996年にはTheo Colbornら (1996) が、「OUR STOLEN FUTURE (邦訳：奪われし未来)」を発表し、内分泌攪乱化学物質による微量域での生殖異常などの問題を提起した。我が国では、この問題に対応するため1998年に「環境ホルモン戦略計画SPEED'98」を立ち上げた。この中で、複数の農薬が「内分泌攪乱作用を有すると疑われる化学物質」としてリストアップされ (環境庁、2000)、環境における農薬の動態に対して社会的関心を高めた。

我が国の植物防疫を法制度の面から支える農薬取締法は、1948年に不正粗悪な農薬の取締りとその品質向上を目的として制定された。しかし、上述のような環境汚染問題に対する社会的な関心の高まりとともに改正され、作物残留性、土壌残留性、水質汚濁性に問題がある農薬の登録や使用が規制されるようになった (石谷、1997)。さらに、2003年に施行された改正農薬取締法では、農薬の使用者に対し、「航空散布時のドリフト」、「住宅に近接した農地で散布する際のドリフト」、「水田からの流出」、「土壌消毒時の揮散」に対して対策を講じるよう求めている (農林水産省・環境省、2003)。

また、食品衛生法では、飲食に起因する衛生上の危害

の発生を防止するため、残留農薬基準を定めている (石谷、1997)。2006年にはその残留農薬基準にポジティブリスト制度が導入されたことから (平成15年法律、2003)、隣接農地からドリフトした農薬により農作物の残留濃度が基準値を超過する可能性が高まり、農業関係者の間で重要な問題となっている。

一方、農薬と並んで重要な農業資材である肥料の分野、特に、窒素肥料を取り巻く環境に視点を移すと、窒素肥料を施用した農地から発生する亜酸化窒素 (N_2O) は、温暖化ポテンシャルが二酸化炭素の296倍という強力な温室効果ガスであり、その発生抑制が望まれる (秋山、2005)。また、1999年に水質汚濁に係る環境基準 (環境庁、1999a) と地下水の水質汚濁に係る環境基準 (環境庁、1999b) に「硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素」が追加され、基準値が 10mg L^{-1} 以下と定められた。1999年に施行された家畜排せつ物法では、家畜排せつ物の利用促進が謳われており (平成11年法律、1999b)、今後、農地に家畜排せつ物由来の有機物資材を施用する機会が増えると考えられる。畑土壌中の有機態窒素は、アンモニア化 (無機化) と硝酸化成を経て作物に吸収され、一部が脱窒作用を受ける (甲斐、1994)。この中で、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 (河崎・森次、1990)、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、また、反応途中で亜酸化窒素を生じることから重要である (陽ら、1983)。環境への窒素負荷を減らし、法令を遵守しながら農業生産を維持するには、窒素肥料の有効利用により施用量を削減すると共に (松丸、2003)、窒素循環における各作用の活性を適切に管理する必要がある。

第 2 節 供試薬剤「クロロタロニル」

有機塩素系殺菌剤クロロタロニル (tetrachloroisophthalonitrile、農林水産省登録名TPN、商品名ダコニール、ダコソイル等) は、抗菌スペクトラムが広く、野菜、花、芝、水稻、果樹など広範な作物の病害防除に用いられている (第1-1表)。剤型は多様で、水和剤、フロアブル剤、粉剤、くん煙剤などがある (米山ら、1990)。茎葉処理剤として広く普及している他、キントゼン (農林水産省登録名PCNB) の農薬登録失効 (農林水産省生産局、2002) と前節で述べた臭化メチルの規制から、土壌処理剤としても重要度を増している。平成16年度におけるクロロタロニルの国内への出荷量は、有効成分換算で

445.4Mg、製剤換算で1912.8Mgであり、「殺菌剤」と「殺虫殺菌剤」の合計に占める割合で2.1%（製剤換算）である（日本植物防疫協会、2005）。

クロロタロニルは、水質汚濁に係る要監視項目に指定されており、公共用水域および地下水における指針値が $50\mu\text{g L}^{-1}$ 以下となっている（環境省水環境部長、2004）。我が国における農薬による地下水汚染事例としては、各務原台地におけるEDB汚染（各務原市地下水汚染研究会、1990）、浅間山北麓におけるPCNB汚染（田瀬ら、1989）、沖永良部島における数種類の農薬による汚染（田代・谷山、1996）などが報告されている。このため、農地におけるクロロタロニルの鉛直浸透について実態を把握する必要がある。

土壌中のクロロタロニルは、主に土壌微生物によって分解されるが（Katayamaら、1991）、物理化学的な分解機構についても報告されている（Katayamaら、1995）。クロロタロニルは、連用により土壌中の分解速度が低下することが報告されており（Katayamaら、1991；Takagi、1991；高木1991）、その理由が土壌中の分解産物（4-hydroxy-2,5,6-trichloroisophthalonitrile、以下、TPN-OH）の蓄積によることが明らかにされている（Motomuraら、1998）。これらのことから、今後、実際の農地やその周辺環境において農薬の動態を調査するに当たり、濃度低減の機構と分解産物の動態を明らかにすることが重要と考える。このために、確立すべき方法の一つが、物質の反応過程における安定同位体自然存在比の変化、すなわち、同位体分別の利用である。同位体分別は、物理化学的または生化学的反応において、軽い同位体を含む分子の反応

が重い同位体を含む分子の反応より速いことにより生じる（程・中島、2005）。同位体分別の程度は、反応の種類により一定の範囲に収まることから、自然生態系における物質循環の解析等に利用されてきた（米山、1987；米山、1994）。しかし、従来、自然界に混在する特定の物質の安定同位体自然存在比を測定することは、単離・精製の操作中に同位体分別を生じやすく、注意と熟練を要した。近年、こうした問題点が、ガスクロマトグラフ/燃焼/安定同位体比質量分析計（gas chromatograph/combustion/isotope ratio massspectrometry、以下、GC/C/IRMS）の開発により改善された（田中ら、2000；米山、1996）。テトラクロロエチレン等の有機塩素系化合物で汚染された地下水の修復技術では、脱塩素の際に生じる同位体分別を利用して分解が確実に進行しているか否かを評価されている（Hunkeler、1999）。この手法は、農地と環境における農薬の動態把握、汚染修復技術の評価等に利用できると思われる。しかし、現在までに、農薬の消失過程における同位体分別を報告した事例はない。

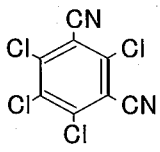
土壌中の硝酸化成の重要性については前節で述べたが、農作物の生産性と環境保全の両面から硝酸化成を適正に管理する必要性が高まる中、農薬の施用により硝酸化成を攪乱することは避けなければならない。そのためには、農薬が土壌中の硝酸化成に及ぼす影響を把握する必要がある。現在までにクロロタロニルが硝酸化成に及ぼす影響については、高木（1991）がクロロタロニルの長期連用圃場において土壌中の硝酸化成能が著しく低下したことを報告し、堆肥の施用により回復したことを報告している。加藤・豊田（1991）とTu（1993）は、クロロタロニルによる土壌中の各種微生物活性への影響を調査する中で、硝酸化成阻害は認められなかったとしている。

以上のように、本研究では、農業生産現場で広く使用され、今後も殺菌剤として重要な位置を占めること、水質汚濁に係る要監視項目の一つとなっていること、土壌における挙動や分解経路、分解産物の挙動の研究が進んでいること等の理由により、クロロタロニルを供試薬剤とした。

第3節 研究の目的

本研究は、畑土壌におけるクロロタロニルの動態と生理作用を明らかにすることを目的とした。具体的には、地下水への負荷を考察するため、砂質露地畑における鉛直浸透状況を調査すること、環境における濃度低減の機構を推測する上で有用と考えられる同位体分別の存在を確認すること、畑土壌中の硝酸化成と作物生育に及ぼす影響を明らかにすることである。また、比較対照区に他の農薬を供試し、物性や生理活性の相違から各種考察を加えた。

第1-1表 クロロタロニルの性状*

一般名	chlorothalonil
農林水産省登録名	TPN
化学名	tetrachloroisophthalonitrile
分子式	$\text{C}_6\text{Cl}_4\text{N}_2$
分子量	265.9
化学構造	
融点	250-251 °C
沸点	350 °C
蒸気圧	1.3 Pa (40°C)
オクタノール・水分配係数	4.34
水溶解度	0.6 mg L ⁻¹
毒性指定	普通物
魚毒性	C類
ADI	0.003 mg

*上杉ら（1997）から引用。

第Ⅱ章 砂質露地畑におけるパンライシメータ法による クロロタロニル鉛直浸透量の測定

第1節 緒言

農耕地に施用された農薬は、その一部が土壌中を鉛直浸透して地下水を汚染することが懸念される。農薬による地下水汚染に対する規制としては、1997年に「地下水の水質の汚濁に係わる環境基準」が告示され、1,3-ジクロロプロペン、チウラム、シマジン、チオベンカルブの環境基準値が設定された（環境庁、1997）。今後、この基準値を遵守し、農薬による地下水汚染を未然に防止するために、農耕地における農薬の鉛直浸透の機作を明らかにする必要がある。

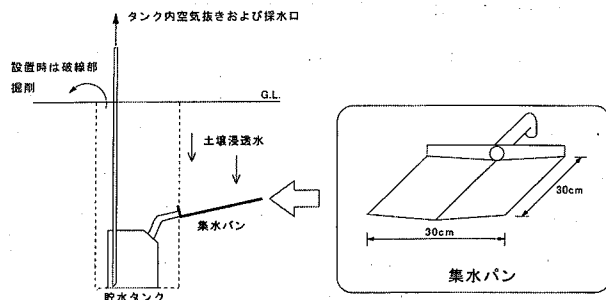
これまでに、土壌中における農薬の移動性は、土壌の有機炭素含量が少ないほど大きくなることが報告されている（McCallら、1980；奴田原・市原、1990）。千葉県の実験地である砂質露地畑は、他の畑耕地に比べて有機炭素含量が少なく、上記の知見から農薬が鉛直浸透しやすいと考えられる。また、実際の生産圃場では土壌中の粗大孔隙や大量降雨など、農薬の鉛直浸透がより生じやすい環境が存在する。

そこで、本章では、砂質露地畑において、クロロタロニルを始めとする農薬鉛直浸透の実態を明らかにするために、土壌の成層構造を破壊せず、壁面の影響が無い、パンライシメータ法（金子・山本、1999；金子ら、2002；山本ら、1997；山本、1999a；山本、1999b；山本、1999c；山本・金子、2000；山本、2004）を用いた試験を実施した。

第2節 材料および方法

1. パンライシメータの構造

パンライシメータの構造は、土壌浸透水を採取するステンレス製の集水パンとポリエチレン製の貯水タンクを



第2-1図 パンライシメータ概念図

接続したものとした（第2-1図）。集水パンは一辺30cmの正方形で、一辺に高さ3cmの壁を立て、その直角方向中央を2度の角度で折り曲げた。壁中央には穴を開けて直径3cmの管を接続し、内部にロックウールを充填して採水管とした。集水パンの設置方法は、縦穴を掘削後、地表面から深さ50cmの土壌断面に約5度の傾斜をつけて挿入した。貯水タンク内の土壌浸透水の採水は、ビニールチューブを空気抜き用の塩化ビニル製パイプからタンク底面に通し、真空ポンプ（サンケイ理化社製SK-5401型）で吸引して行った。

2. 試験区および耕種概要

試験場所は千葉県農業試験場（現 千葉県農林総合研究センター）砂地野菜研究室圃場（千葉県匝瑳郡野栄町、現 千葉県匝瑳市）とした。土壌は中粗粒褐色低地土（長崎統）であり、その理化学性は、土性が砂土、有機炭素含量が 12g kg^{-1} 、粘土含量が 41g kg^{-1} 、CECが 9cmolc kg^{-1} 、全孔隙率が $0.547\text{m}^3\text{ m}^{-3}$ 、仮比重が1.264である（千葉県、1978）。試験圃場の面積は 35m^2 （ $7\times 5\text{m}$ ）とし、圃場中央にパンライシメータを設置した（1995年8月23日）。

試験期間は、供試農薬を散布した1996年6月18日から10月21日までの125日間とし、採水日を農薬施用3、10、20、24、34、62、94、101、125日後とした。

耕種概要は、集水パン直上に畦が位置するように、畦高30cm、畦間100cmの畦立てをし、供試農薬を施用後、慣行の栽培法によりサツマイモを栽培した。

3. 供試薬剤

供試農薬は、クロロタロニル40.0%フロアブル剤（施用量は成分換算で 80mg m^{-2} 、水溶解度 0.9mg L^{-1} （金澤、1996）、以下、表記同じ）とし、比較対照のためにシマジン1.0%粒剤（ 80mg m^{-2} 、 6.2mg L^{-1} ）、ダイアジノン40.0%乳剤（ 80mg m^{-2} 、 40mg L^{-1} ）、メトラクロール45.0%乳剤（ 180mg m^{-2} 、 488mg L^{-1} ）、ジメトエート43.0%乳剤（ 86mg m^{-2} 、 $25,000\text{mg L}^{-1}$ ）を用いた（第2-1表）。乳剤とフロアブル剤の施用は、水10Lで希釈して試験圃場全面に均一に行った。

また、農薬の土壌中における移動性を評価するために、トレーサーとして塩素イオン（以下、 Cl^- ）を使用し、農薬施用直後に2.5%塩化カリウム溶液20Lを試験圃場全面に施用した。

4. 分析法

採取した土壌浸透水は、ガラス瓶に約1L分取して分析に供した。各供試農薬は、試料400mLに塩化ナトリウ

第2-1表 供試農薬一覧

一般名	農水省登録名	商品名	有効成分含有量 (%)	散布量 (有効成分 mg m^{-2})	水溶解度* (mg L^{-1})
クロロタロニル	TPN	ダコニール1000	40.0	80	0.9
シマジン	CAT	シマジン粒剤1	1.0	80	6.2
ダイアジノン	ダイアジノン	ダイアジノン乳剤40	40.0	80	40
メトラクロール	メトラクロール	デュアール乳剤	45.0	180	488
ジメトエート	ジメトエート	ジメトエート乳剤	43.0	86	25000

*金澤 (1996) より引用。

ム40gを加え、ジクロロメタンで転溶後、脱水・濃縮し、2 mLのアセトンで定容とし、ガスクロマトグラフ(ヒューレットパッカード社製HP-6890、検出器NPD、分離カラムDB-1701)を用いて定量した。検出限界値はクロロタロニル $3 \mu\text{g L}^{-1}$ 、シマジン $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ 、ダイアジノン $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ 、メトラクロール $3 \mu\text{g L}^{-1}$ 、ジメトエート $0.3 \mu\text{g L}^{-1}$ であった。 Cl^{-} の定量は、チオシアン酸第二水銀比色法で発色後、オートアナライザー(テクニコン社製TRAACS-800型)を用いて定量した。

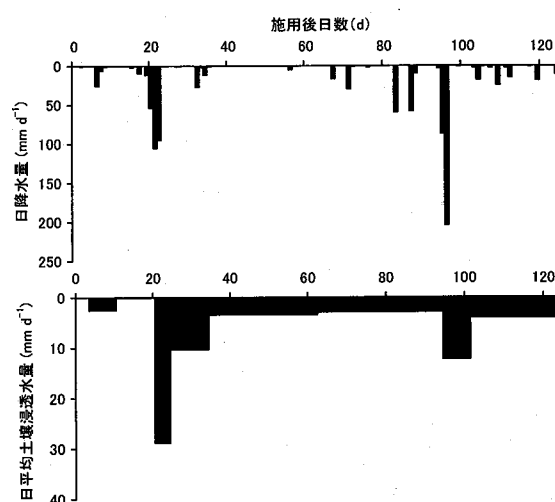
また、試験終了時に、パンライシメータ直上の土壌を深さ10cmごとに採取し、供試農薬の土壌残留濃度を測定した。各供試農薬は、生土30gからアセトンと水の混合液で抽出し、アセトン留去後ジクロロメタンで転溶し、脱水・濃縮後、2 mLのアセトンで定容とし、土壌浸透水と同様に定量した。検出限界はクロロタロニル $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ 、シマジン $7 \mu\text{g kg}^{-1}$ 、ダイアジノン $0.7 \mu\text{g kg}^{-1}$ 、メトラクロール $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ 、ジメトエート $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ であった。

第3節 結 果

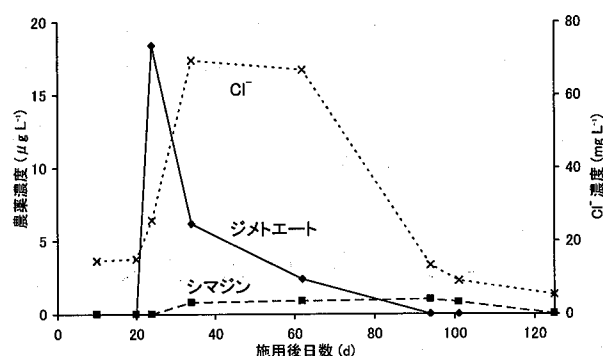
1. 土壌浸透水量

試験期間中に採取された総土壌浸透水量は608.2mmであり、総降水量938mmの65%に相当した。

また、土壌浸透水量の経時的な変化を評価するために、土壌浸透水量を採水間隔日数で除し、日平均土壌浸透水量を算出した(第2-2図)。試験期間中において、大量降雨が農薬施用21日後と96日後に発生し、降雨開始から降雨終了までの降水量は、それぞれ266.0mm(農薬散布19~22日後)と295.7mm(農薬散布94~96日後)であった。これらの大量降雨により畦間が湛水し、表面流出水が発生した。日平均土壌浸透水量は、2回の大量降雨に対応し、農薬施用21日後から24日後および95日後から101日後に顕著に増加した(第2-2図)。



第2-2図 日降水量および日平均土壌浸透水量

第2-3図 土壌浸透水中の農薬および Cl^{-} 濃度

2. 土壌浸透水中の農薬および塩素濃度

試験期間を通じて、土壌浸透水中からクロロタロニル、ダイアジノンおよびメトラクロールは検出されなかった。一方、土壌浸透水中のジメトエート濃度は、農薬施用24日後に最高濃度の $18.4 \mu\text{g L}^{-1}$ に達し、その後低下して94日後には検出限界以下となった。また、シマジン濃度は、農薬施用34日後から101日後までの期間に $0.8 \mu\text{g L}^{-1}$ から $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ の範囲で推移し、125日後に検出限界値以下となった(第2-3図)。

土壌浸透水中の Cl^- 濃度は、農薬施用10日後は 14.6 mg L^{-1} であったが、24日後に 25.7 mg L^{-1} と上昇し、34日後には最高濃度の 69.5 mg L^{-1} に達し、94日後には 13.4 mg L^{-1} に低下した（第2-3図）。

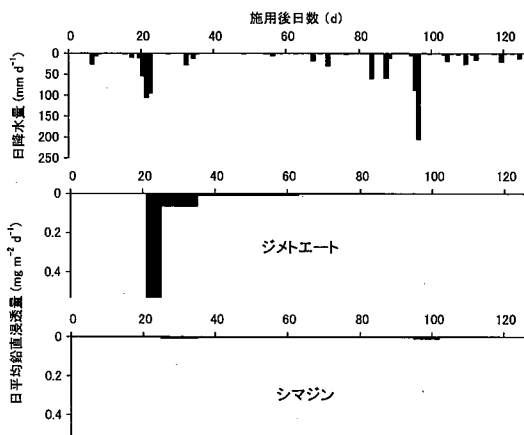
3. 農薬鉛直浸透量

農薬濃度と土壌浸透水量の積を農薬鉛直浸透量とし、農薬散布量に対する農薬鉛直浸透量の割合を流出率とした。その結果、試験期間中における総農薬鉛直浸透量は、ジメトエートが 2.99 mg m^{-2} 、シマジンは 0.33 mg m^{-2} となり、流出率はそれぞれ3.5%と0.4%であった。

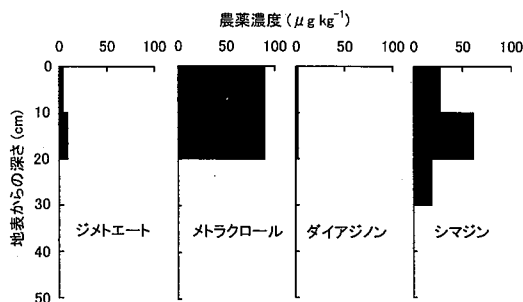
また、ジメトエートとシマジンの鉛直浸透量の経時的な変化を評価するために、両農薬濃度に日平均土壌浸透水量を乗じ、日平均鉛直浸透量を算出した（第2-4図）。ジメトエートとシマジンの日平均鉛直浸透量は、大量降雨に対応して増加した。特に、農薬施用21日後から24日後におけるジメトエートの日平均鉛直浸透量は、散布21日後の大量降雨に対応して顕著に増加した。

4. 土壌残留農薬量

試験終了時の土壌残留濃度は、クロロタロニルではいづれの土層においても検出されなかった。その他の農薬では、メトラクロールの深さ0～10cmおよび10～20cmにおける $90 \mu\text{g kg}^{-1}$ が最も高く、次いでシマジンの深さ10～20cmにおける $61 \mu\text{g kg}^{-1}$ が高かった（第2-5図）。



第2-4図 日降水量と農薬の日平均鉛直浸透量



第2-5図 試験終了時（施用125日後）における土壌中の農薬濃度

供試農薬の土壌残留濃度に各土層の体積と仮比重を乗じ、5層の総和を圃場単位面積あたりの土壌残留農薬量とし、農薬施用量に対する土壌残留農薬量の割合を土壌残留率とした。その結果、土壌残留農薬量はジメトエートが 1.5 mg m^{-2} 、メトラクロールが 20 mg m^{-2} 、ダイアジノンが 0.53 mg m^{-2} 、シマジンは 13.4 mg m^{-2} となり、土壌残留率はそれぞれ1.7%、10%、0.66%、および17%であった。

第4節 考 察

1. 砂質露地畑における農薬鉛直浸透状況

クロロタロニルは、試験期間中に土壌浸透水から検出されず、また、試験終了時の土壌中からも検出されなかった。このことから、砂質露地畑においてクロロタロニルが鉛直浸透し、地下水まで到達する可能性は低いと考えられた。

農薬の土壌有機炭素吸着定数（ K_{oc} ）と土壌中半減期は、農薬の鉛直浸透に大きく影響するといわれている（Gustafson, 1989；鉄塚・山本, 1998）。一方、非イオン性農薬は、水溶解度と K_{oc} の間に負の相関があることが知られている（Kanazawa, 1989）。本研究において供試したクロロタロニル、ダイアジノン、メトラクロール及びジメトエートは非イオン性農薬であり、この中で水溶解度が最も高いジメトエートは K_{oc} が最も低いと考えられる。以上から、ジメトエートは、土壌に吸着されにくいために鉛直浸透が認められたと考えられた。また、シマジンは、水溶解度がメトラクロールとダイアジノンより低いにもかかわらず鉛直浸透が認められた。この理由としては、シマジンの土壌中半減期が、試験終了時の土壌残留率から供試農薬の中で最も長いと推定されることや、シマジンの土壌吸着特性が側鎖にあるNH基の影響で他の供試農薬と異なることなどが考えられるが、今後検討する必要がある。

本研究においてトレーサーとして用いた Cl^- は、土壌中において水とほぼ同時に移動する（佐久間ら, 1976）。土壌浸透水中におけるジメトエートと Cl^- の濃度推移を比較すると、ジメトエート濃度は、 Cl^- 濃度が上昇し始めた農薬施用24日後に最高値 $18.4 \mu\text{g L}^{-1}$ に達し、 Cl^- が最高値に達した34日後以降は急激に減少した。これらのことから、ジメトエートは、土壌中の湿润前線において高濃度であったと考えられ、砂質露地畑における移動性が極めて高いと考えられた。これに対し、土壌浸透水中におけるシマジンの濃度推移は、ジメトエートと比べて検出時期が農薬施用34日後から101日後と遅延し、濃度が最高値で $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ と低く、ピークの形状が不明瞭で

あった。このことから、シマジンはジメトエートよりも砂質土における移動性が低いと考えられた。

また、ジメトエートの日平均鉛直浸透量は、農薬施用21日後の大量降雨に対応して顕著に増加した。このことから、砂質露地畑における農薬鉛直浸透に影響を及ぼす重要な要因として、農薬施用後の降雨条件が考えられた。

試験終了時における供試農薬の土壌残留率は、シマジンとメトラクロールが10%以上と高かった。このことから、砂質露地畑においてこれら農薬の鉛直浸透量を測定する場合は、試験期間をさらに長くする必要があると考えられた。

2. パンライシメータ法の有効性と課題

今後、農薬による地下水汚染を未然に防止するために、農家の圃場において農薬の鉛直浸透量を調査する必要がある。しかし、従来の土壌浸透水採取方法であるライシメータ法は、側壁が地上に露出するため通常の耕うん作業が不可能であり、農家の圃場における調査は困難であった。また、ライシメータ法は土壌の成層構造を破壊す

る上、壁面の影響により農薬の鉛直浸透量を過大評価しやすい短所があった(高木ら、2001)。これに対し、パンライシメータ法の長所は、通常の耕うん作業が可能で農家の圃場における調査が容易であること、土壌の成層構造を破壊しないこと、壁面の影響が無いことが挙げられる。パンライシメータ法の短所は、集水パン上部で発生した重力水域の土壌浸透水を採取しており(金子・山本、1999)、それより高いpF域の土壌浸透水を採取しにくいことである。しかし、砂質露地畑を用いた本研究において、総土壌浸透水量は総降水量の65%に相当し、日平均土壌浸透水量は日降水量に対応した変化が認められた。

以上のことから、パンライシメータ法は、砂質露地畑における農薬鉛直浸透量を調査する手法として有効と考えられた。今後は、農家の圃場において利用できる特徴を生かしながら、パンライシメータ法の集水特性をさらに改善することが必要であろう。

第Ⅲ章 畑土壌中のクロロタロニル消失過程における炭素同位体分別

第1節 緒言

一般に、環境中における農薬の消失過程には、蒸発、流亡、分解等、複数の要因が関与する（金澤、1992）。このような複数の要因が関与する現象において、特定の要因の寄与を推定する方法の一つが、同位体分別を利用する方法である。この方法は、同位体分別の程度を表す濃縮係数（enrichment factor）を用いて、同位体分別を伴う要因の寄与を推定する（朴ら、1996；川西ら、1991）。しかし、現在までに、環境中における農薬の消失過程において同位体分別は確認されておらず、従って、濃縮係数も明らかにされていない。

そこで、本章では、畑土壌中のクロロタロニル消失過程における炭素同位体分別の存在を確認する（山本ら、2004）。

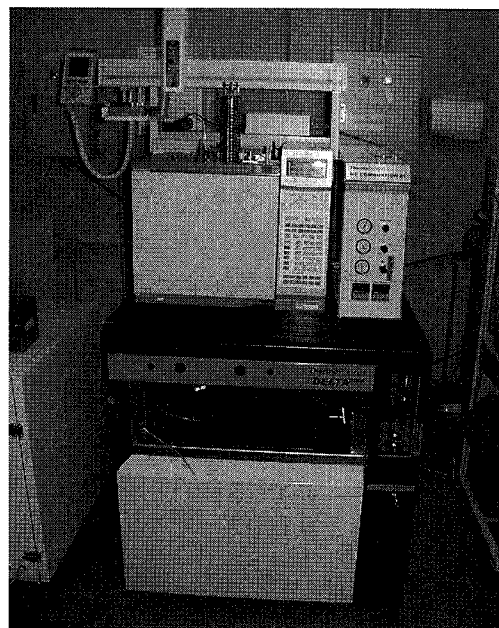
第2節 材料および方法

供試薬剤は、クロロタロニル（和光純薬社製、残留農薬試験用、純度99.0%以上）とし、珪藻土（VARIAN社製 CHEM TUBE-HYDROMATRIX）と共に粉碎混合して1%（W/W）の粉剤としたものを用いた。供試土壌は、淡色黒ボク土（大川口統、土性：CL、pH（H₂O）：5.39、T-C：53g kg⁻¹、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、供試薬剤を有効成分で0.5mg添加後混合した。この添加量は、クロロタロニル10.0%粉剤（商品名：ダコソイル）の施用量（0.40Mg ha⁻¹）を想定している。さらに、蒸留水を添加して土壌の水分条件を最大容水量の60%に調整し、慣行施肥窒素量に相当する硫酸アンモニウム9.43mgを添加後混合した。アルミ箔で軽くふたをして暗黒条件下、30℃の恒温器内で培養した。培養期間は、培養開始から0、7、21、35、49、70日とした。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補充した。試験は全て3反復で行った。

培養後の土壌からクロロタロニルを回収する方法は、操作中に炭素同位体分別が生じることを回避するため、以下のように従来法（上路ら、2001）と比べて工程数を減らしたものとした。試料1gと珪藻土0.2g（VARIAN社製 CHEM TUBE-HYDROMATRIX）を10mL容ねじ口付き試験管にとり、酢酸エチル5mLで2回振とう抽出し、無水硫酸ナトリウムを少量加えろ紙を用いて脱水、ろ過後、減圧濃縮して酢酸エチルで1mLに定容した。定量には、ガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS、ヒューレットパッカード社製HP-5971、分離カラムUltra ALLOY-5）を用いた。添加回収率は50mg kg⁻¹添加相当で47%、10mg kg⁻¹添加相当で42%、2mg kg⁻¹添加相当で50%であった。定量値は、50mg kg⁻¹添加相当の回収率で補正した。GC/MSによる定量後、抽出液をクロロタロニル濃度が約30～50mg L⁻¹となるまで窒素気流下で濃縮し、炭素安定同位体の分析に供した。炭素安定同位体自然存在比の



第3-1図 GC/C/IRMS

第3-1表 クロロタロニルの炭素安定同位体自然存在比分析条件

安定同位体比質量分析計	Thermo Finnigan DELTA plus (GC部 Agilent Technologies 6890)
注入量	4 μ L
キャリアガス	He
注入口	250℃, スプリットレス, 1.5mL min ⁻¹ , コンスタントフロー
カラム	HP-5, 内径 0.32mm, 長さ 30m, 膜厚 0.25 μ m
オープン温度	50℃ (1 min) - 20℃ min ⁻¹ - 250℃ (5 min)
保持時間	692 s
燃焼炉温度	850℃
還元炉温度	650℃

分析には、GC/C/IRMS (サーモ・フィニガン社製DELTA plus) を用いた (図3-1)。分析条件は表3-1に示した。炭素安定同位体自然存在比は、(1)式による $\delta^{13}\text{C}$ 値で示した (単位はパーミル、‰)。

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = (R_{\text{sample}} / R_{\text{standard}} - 1) \times 1000 \cdots (1)$$

ここで R_{sample} と R_{standard} は、それぞれ試料と標準物質の $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比を示し、標準物質にはPDB (アメリカ白亜紀Pee Dee層の巻貝化石であるBelemnite、 CaCO_3 、 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = 0.01124$) を用いた (米山、1987)。GC/C/IRMSは、測定毎に $\delta^{13}\text{C}$ 値が既知の CO_2 で補正した。GC/C/IRMSの分析精度は、クロロタロニル標準品の $\delta^{13}\text{C}$ 値の変動係数で1.9%であった。土壌に添加前と添加直後のクロロタロニルの $\delta^{13}\text{C}$ 値は、それぞれ-26.4‰と-26.5‰であり、土壌からの抽出と濃縮による炭素同位体分別は無視できると考えられる。

第3節 結果および考察

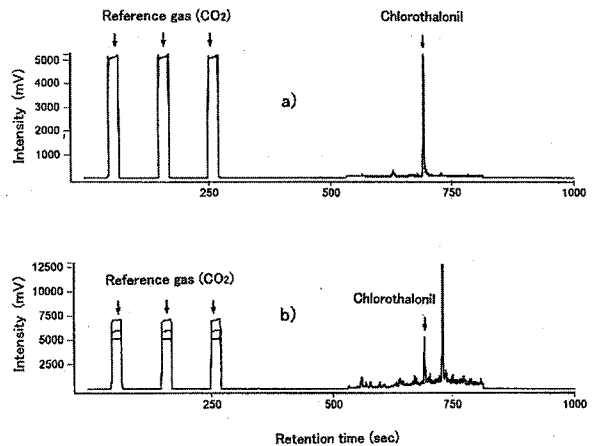
1. 畑土壌中のクロロタロニル消失過程における炭素同位体分別の有無

GC/C/IRMSによるクロロタロニルの分析例を第3-2図に示した。a)は標準試薬 (50mg L^{-1}) であり、b)は培養期間70日の試料である。クロロタロニルのピークは、土壌由来の他のピークから十分に分離していた。

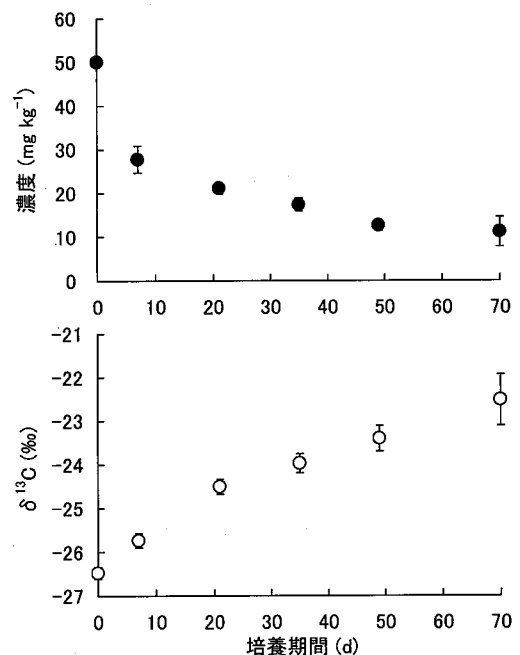
土壌中におけるクロロタロニルの濃度推移を図3-3に示した。クロロタロニルの濃度は、培養期間が長くなるほど低下し、その半減期 (丸、1991) は12.5日であった。クロロタロニルの土壌中半減期は5~36日といわれており (British Crop Protection Council, 2000)、本研究における結果もその範囲内にあった。

土壌中におけるクロロタロニルの $\delta^{13}\text{C}$ 値の推移を第3-3図に示した。クロロタロニルの $\delta^{13}\text{C}$ 値は、培養開始時では-26.5‰であったが経時的に高くなり、培養期間70日では-22.5‰まで上昇した。すなわち、土壌中に残存するクロロタロニル中の炭素は、消失したクロロタロニル中の炭素と比べて ^{13}C の比率が高くなった。3連の培養処理間における $\delta^{13}\text{C}$ 値の標準偏差は、培養期間が長くなる程大きくなったが、培養開始時と培養期間21日以降の $\delta^{13}\text{C}$ 値は有意に差があった (Scheffe's F検定、危険率1%)。以上のことから、畑土壌におけるクロロタロニルの消失過程において炭素同位体分別が生じていると考えられた。

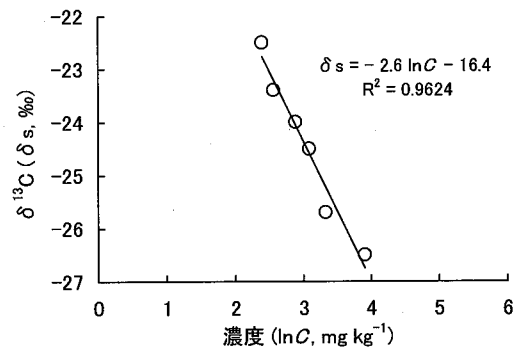
他の有機塩素化合物のテトラクロロエチレンやトリクロロエチレンでは、微生物による脱塩素の過程で炭素同位体分別が生じることが知られている (Bloomら、2000; Hunkeler, 1999)。畑土壌におけるクロロタロニルが消



第3-2図 クロロタロニルのGC/C/IRMSクロマトグラム
a)標準品 (50mg L^{-1})、b)試料 (培養期間70日)



第3-3図 クロロタロニルの土壌中濃度と炭素安定同位体比の推移



第3-4図 畑土壌におけるクロロタロニルの濃度と $\delta^{13}\text{C}$ 値との関係

失する要因の一つが微生物による分解であり (Katayama ら, 1991)、代謝産物として 1 塩素が OH 基に置換した 4-hydroxy-2,5,6-trichloroisophthalonitrile 等が生成する (片山, 2000; Motonaga, 1998)。これらのことから、本研究における炭素同位体分別は、クロロタロニルの微生物分解により生じた可能性がある。炭素同位体分別が生じるメカニズムとしては、クロロタロニルの消失に関与する部位における ^{13}C の結合力が、 ^{12}C と比べて強いことが考えられる (Hunkeler, 1999)。

2. 畑土壌中のクロロタロニル消失過程における炭素同位体分別の利用

本研究における炭素同位体分別の程度を評価するため、濃縮係数 ϵ を Mariotti らにより導かれた、いわゆる Rayleigh の式により求めた (朴ら, 1996; 川西ら, 1991; Mariotti ら, 1981; Mariotti ら, 1988)。

$$\delta s = \delta s_0 + \epsilon \ln C/C_0 \dots (2)$$

ここで

δs : 試料の $\delta^{13}\text{C}$ 値 (‰)、

δs_0 : 測定開始時の試料の $\delta^{13}\text{C}$ 値 (‰)、

C : 試料のクロロタロニル濃度 (mg kg^{-1})、

C_0 : 測定開始時の試料のクロロタロニル濃度 (mg kg^{-1})。

$a = \delta s_0 - \epsilon \ln C_0$ とすると (2) 式より、

$$\delta s = a + \epsilon \ln C \dots (3)$$

ただし、 a 、 ϵ は定数である。

本研究における結果を (3) 式に当てはめると次の回帰直線が得られる (第 3-4 図)。

$$\delta s = -16.4 - 2.6 \ln C \quad R^2 = 0.9624$$

よって、濃縮係数 ϵ は -2.6‰ と推定される。この値は、Bloom ら (2000) が求めたトリクロロエチレンの脱塩素過程における濃縮係数 -2.5‰ と同等であった。

さらに、炭素同位体分別の利用例を以下に示す。ここでは、本研究におけるクロロタロニルの消失と炭素同位体分別が、ある A という要因でのみ生じたと仮定する。

上記の濃縮係数 ϵ を (2) 式に当てはめると、

$$\delta s = \delta s_0 - 2.6 \ln C/C_0$$

となる。すなわち、濃度 C_1 から C_2 までのクロロタロニル消失による $\delta^{13}\text{C}$ 値の変化を $\Delta \delta^{13}\text{C}$ 値とすると、

$$\begin{aligned} \Delta \delta^{13}\text{C} (\text{‰}) &= \delta^{13}\text{C}_2 - \delta^{13}\text{C}_1 \\ &= 2.6 \ln C_2/C_1 \end{aligned}$$

となる。環境中におけるクロロタロニルの消失に要因 A と他の炭素同位体分別を伴わない要因が関与した場合、この式と $\delta^{13}\text{C}$ 値の差 ($\Delta \delta^{13}\text{C}$) から要因 A による消失量のみを推定できる (朴ら, 1996)。

本研究により、畑土壌におけるクロロタロニルの消失過程において炭素同位体分別が生じていることが確認された。今後、同位体分別という現象を環境中における農薬の動態研究に利用するため、各種農薬の消失要因と同位体分別との関係を明らかにする必要がある。

第IV章 クロロタロニルによる土壌中のアンモニア酸化阻害

第1節 緒言

硝酸化成は、好気的な土壌中で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)。土壌中の硝酸化成は、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探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)。

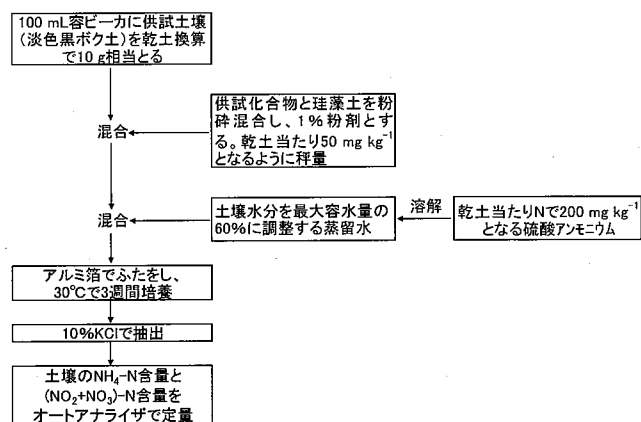
供試土壌は、淡色黒ボク土(大川口統、土性: CL、pH (H₂O): 5.39、T-C: 53g kg⁻¹、T-N: 3.7g kg⁻¹、アンモニア態窒素含量: 9mg kg⁻¹、亜硝酸+硝酸態窒素含量: 11mg kg⁻¹、採取地: 茨城県つくば市観音台)とし、2mm

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⁻¹、追肥窒素30kg ha⁻¹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⁻¹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⁻¹と1.00Mg ha⁻¹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⁻¹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、NH₄-N)含量及び亜硝酸+硝酸態窒素(以下、(NO₂+NO₃)-N)含量で評価した。土壌中のNH₄-Nと(NO₂+NO₃)-Nは、10%塩化カリウム溶液で抽出し、NH₄-Nはインドフェノール法で、(NO₂+NO₃)-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

4. 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

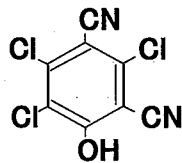
培養期間は70日とした。試験区の構成は、クロロタロニルを添加するクロロタロニル区、ジシアンジアミド区および薬剤無添加区とした。

5. クロロタロニルの添加量が土壌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⁻¹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⁻¹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壌中の分解産物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。

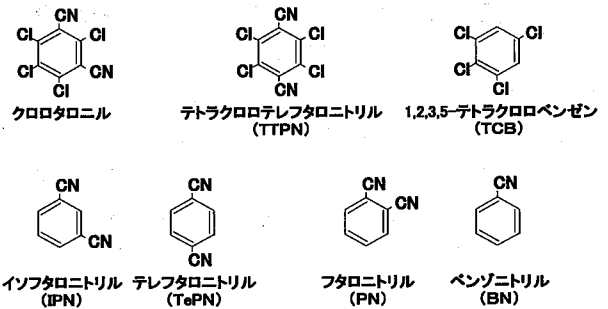


第4-2図 TPN-OHの化学構造

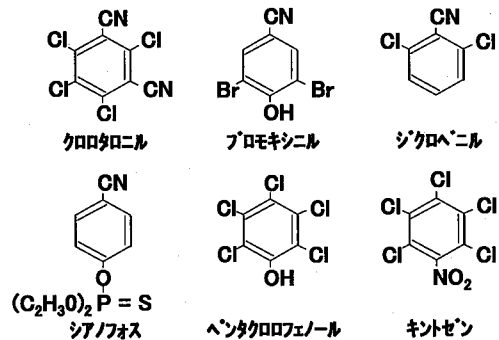
7. クロロタロニルの化学構造と土壌中のアンモニア酸化阻害との関係

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壌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⁻¹(クロロタロニルで53mg kg⁻¹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⁻¹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壌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ブロモキシニル(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⁻¹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⁻¹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壌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⁻¹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(H₂O)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⁻¹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⁻¹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NH₄-N含量は、ク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(NO₂+NO₃)-N含量は、ク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タロニルの施用量は、有効成分に換算して最大40kg ha⁻¹であり、チウラムの12kg ha⁻¹と比べて多い (米山ら, 1990)。これらのことから、クロタロニルは、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 (NH₄-N含量と(NO₂+NO₃)-N含量の合計) は、チウラム区が244mg kg⁻¹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⁻¹) より高かった。その他の試験区では、クロタロニル区の216mg kg⁻¹からメタラキシル区の195mg kg⁻¹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NH₄-N含量は、培養21日後ではジシアンジアミド+クロタロニル区、ク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⁻¹以上を維持した。培養42日後では、ジシアンジアミド+クロ

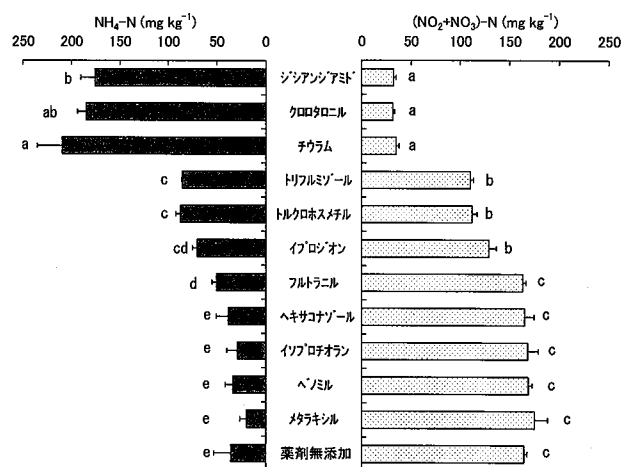
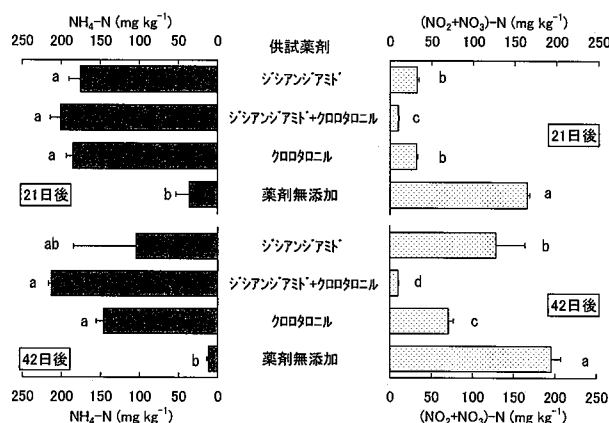


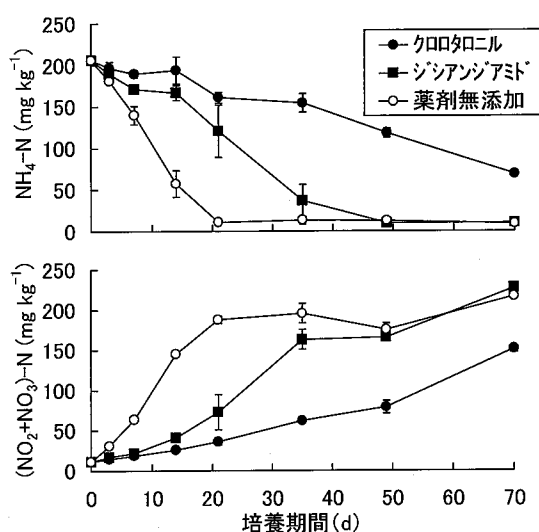
図4-5 土壌中のアンモニア酸化に及ぼす殺菌剤の影響
エラーバーは標準偏差 (n=3) を、同一英小文字はTukey法により5%水準で有意差がないことを示す。



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。

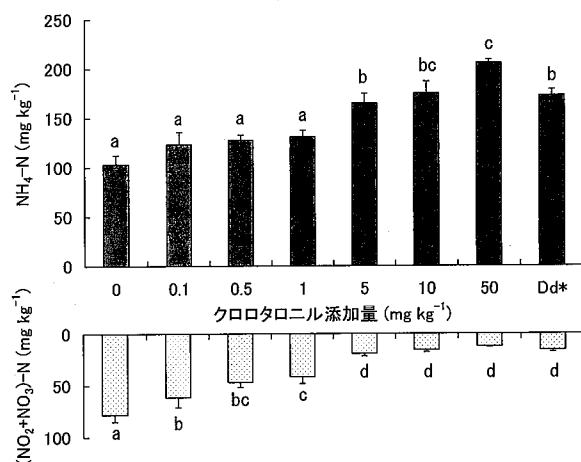
クロタロニル区とクロタロニル区が薬剤無添加区より有意に高かった。特にジシアンジアミド+クロタロニル区は、初期濃度とほぼ同じ213mg kg⁻¹を維持した。ジシアンジアミド区は反復間のばらつきが大きく、他の3区との有意差が検出されなかった (第4-6図)。

土壌の(NO₂+NO₃)-N含量は、培養21日後ではジシアンジアミド+クロタロニル区が初期濃度とほぼ同じ9.91mg kg⁻¹で最も低く、次いでクロタロニル区とジシアンジアミド区が約30mg kg⁻¹と低く、薬剤無添加区が165mg kg⁻¹で最も高かった。培養42日後では、ジシアンジアミド+クロタロニル区が初期濃度とほぼ同じ9.99mg kg⁻¹で最も低かった。次いでクロタロニル区とジシアンジアミド区がそれぞれ70.4mg kg⁻¹と128mg kg⁻¹で低く、薬剤無添加区が195mg kg⁻¹で最も高かった (第4-6図)。



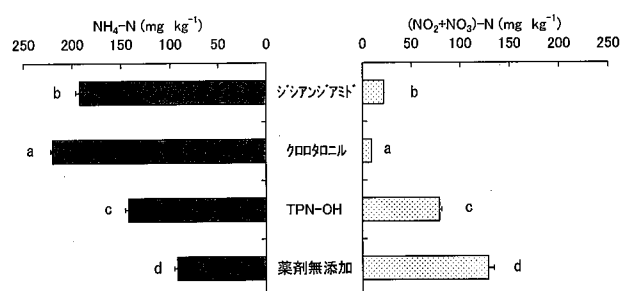
第4-7図 クロロタロニルによる土壌中のアンモニア酸化阻害持続期間

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 10mg 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 161mg kg^{-1} と 118mg kg^{-1} が残存し、70日後でも 68.7mg 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 196mg kg^{-1} と 163mg 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 61.9mg kg^{-1} 、70日後では 151mg 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、 5mg 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、 5mg kg^{-1} 区と 10mg 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 50mg kg^{-1} 添加した区と差が無く、同量の 50mg 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、 0.1mg kg^{-1} 区でも薬剤無添加区との有意差が検出された。また、 5mg 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

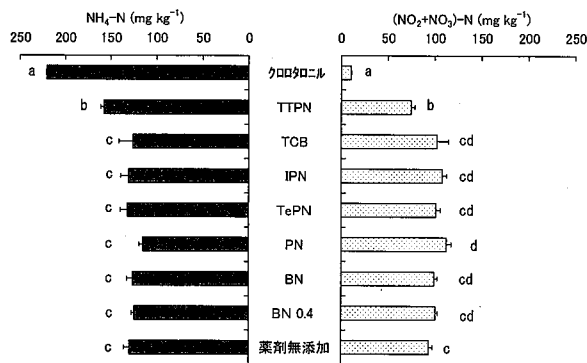
培養後の土壌の $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量は、クロロタロニル区が最も高く、次いでジシアンジアミド区、TPN-OH区、薬剤無添加区の順であった (第4-9図)。

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

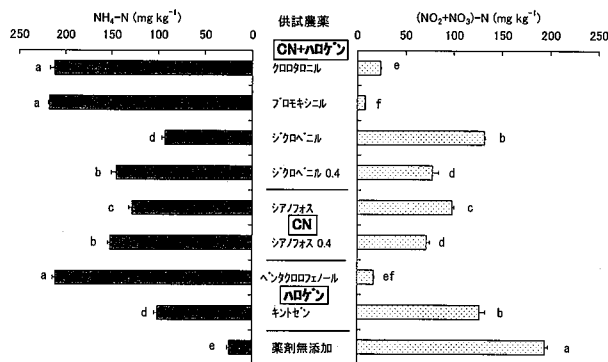
培養後の土壌の $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量は、クロロタロニル区が最も高く、次いでTPN区が高かった。TCB区、IPN区、TePN区、PN区、BN区およびBN0.4区は薬剤無添加区と差がなかった (第4-10図)。

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)。



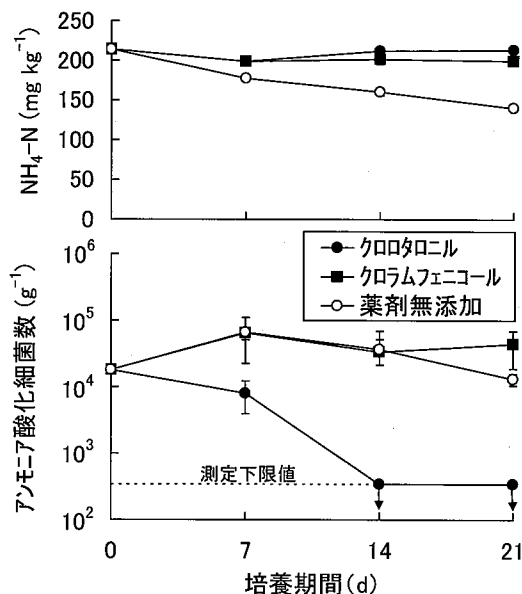
第4-10図 土壌中のアンモニア酸化に及ぼすクロロタロニル類縁化合物の影響

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NH₄-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ブ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、ジクロロベニル0.4区、シアノフォス区、ジクロロベニル区、キントゼン区の順であった(第4-11図)。

培養後の土壌の(NO₂+NO₃)-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。ブ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、ジクロロベニル0.4区、シアノフォス区、ジクロロベニル区、キントゼン区の順でありNH₄-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NH₄-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NH₄-N含量に近いほぼ200mg kg⁻¹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10⁴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、クロロタロニル区では、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の10²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、イプ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化成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 mg kg^{-1} 、 $(\text{NO}_2+\text{NO}_3)\text{-N}$ 含量が 0.1 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 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TPPN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、供試したブロモキシニル、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、ブ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、ブ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がよく特異的であり、抗菌スペクトラムが狭い(JA全農肥料農業部農業技術・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; 鉦塚、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。

第V章 クロロタロニルによる土壌中のアンモニア酸化阻害が作物生育に及ぼす影響

第1節 緒言

第4章において、クロロタロニルが土壌中のアンモニア酸化を阻害することが明らかとなった。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（河崎・森次、1990）、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が作物生育に影響を及ぼすことが懸念される。

そこで、実際にクロロタロニルの農薬登録上の対象作物であるコカブについて（米山ら、1990）、クロロタロニルの施用が生育量と施肥窒素の吸収に及ぼす影響を調査することとした。また、近年、作物が窒素を吸収する時の化学的形態が作物の生育量に加えて、硝酸濃度などの品質に影響を及ぼすことが知られてきた。特に、ハウレンソウでは施用する無機態窒素の形態の相違、すなわち $\text{NH}_4\text{-N}$ と $(\text{NO}_2+\text{NO}_3)\text{-N}$ の比率が、生育量と品質に及ぼす影響が明らかとなっている（池田・大沢、1980；河崎・森次、1990；建部、1999）。そこで、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がハウレンソウの生育量と品質に及ぼす影響についても併せて検討した。

第2節 材料および方法

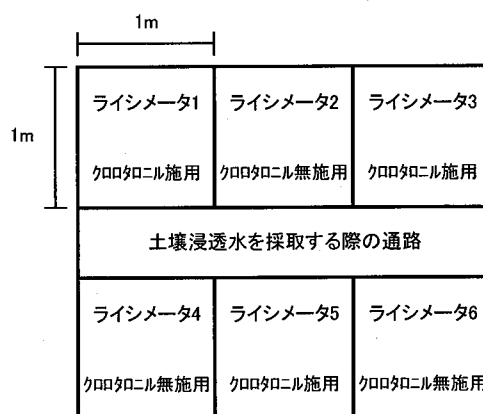
1. 試験の概要

試験は、2001年10月16日から12月20日まで、中央農業総合研究センター（つくば市観音台）のライシメータ施設において実施した。ライシメータの構造は、平面が一边1mの正方形で、深さが0.6mであり、内部には細粒灰色低地土（多多良統、 $\text{pH}(\text{H}_2\text{O})$ 6.22、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量 6.8mg kg^{-1} 、 $(\text{NO}_2+\text{NO}_3)\text{-N}$ 含量 4.9mg kg^{-1} 、仮比重0.867）が充填されている。

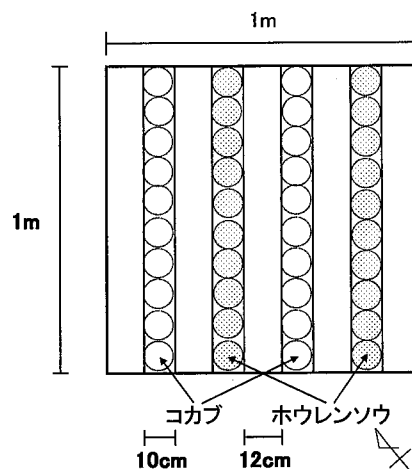
試験区の設定は、供試農薬であるクロロタロニル10.0%含有粉剤（商品名：ダコソイル）を 40g m^{-2} 作条施用するクロロタロニル施用区とクロロタロニル無施用区とし、それぞれ3基のライシメータを使用した（第5-1図、第5-3図）。クロロタロニル施用区における供試農薬の処理は、ライシメータ毎に4条（幅10cm、 0.1m^2 ）を設置し、条当たり10g施用後、地表から深さ10cmまで混和した（第5-4図）。各ライシメータに2種類の作物をそれぞれ2条ずつ栽培し、各条を一反復とした（第5-2図）。供

試作物はコカブとハウレンソウとした。コカブの品種は千葉県で一般的に栽培されている‘CR白涼’（トーホク）とした（宮本、1997）。ハウレンソウの品種は、施肥窒素の $\text{NH}_4\text{-N}$ 比率を高めても生育量が低下しない‘リード’（サカタのタネ）とした（建部、1999）。これは、ハウレンソウの品質を評価する際に、クロロタロニルの効果で土壌中の無機態窒素の形態に差が生じても、生育量が極端に異なることを避けるためである。

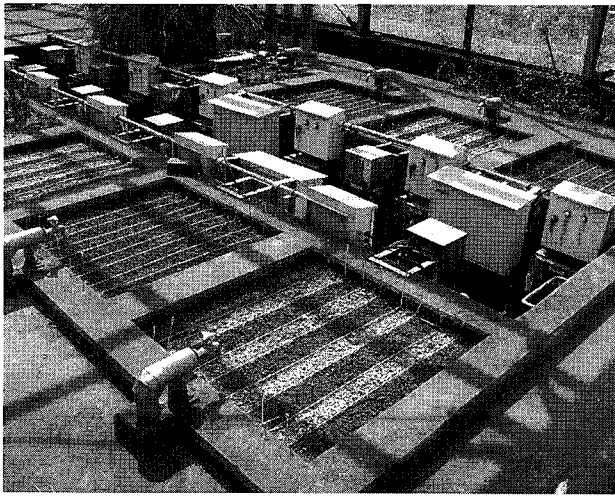
施肥は、全量基肥とし、一条ごとに施用した。窒素については、施肥窒素の作物への吸収および試験系における収支を土壌由来窒素と区別して精密に解析するため、重窒素標識硫酸アンモニウム（3.10atom%）を用いた。施用量は、非標識窒素に換算して 2.5g を 0.1m^2 の条内にのみ施肥した（ライシメータ当たり 10g m^{-2} ）。リン酸及びカリ肥料は、過リン酸石灰及び塩化カリウムを用い、施用量を P_2O_5 及び K_2O 換算でそれぞれ条当たり 2.5g とし、



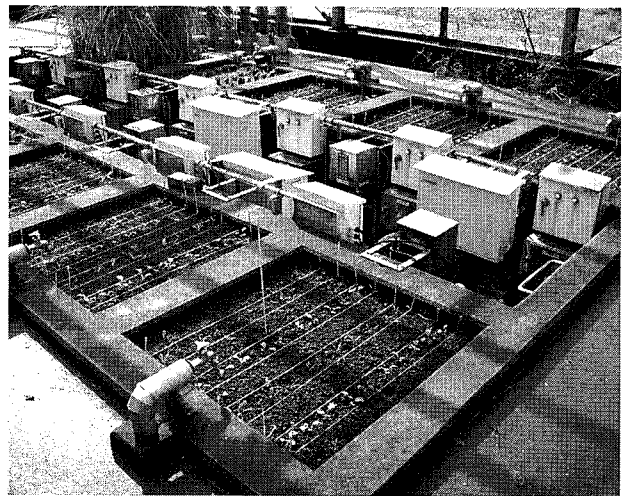
第5-1図 試験区の配置



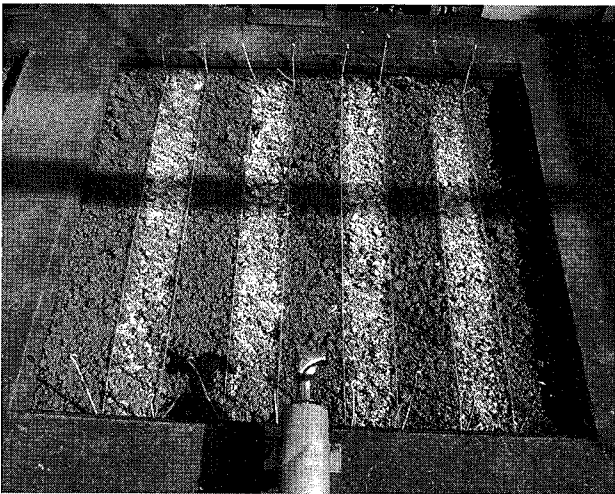
第5-2図 ライシメータにおける作物栽培の状況



第5-3図 試験に用いたライシメータ設備



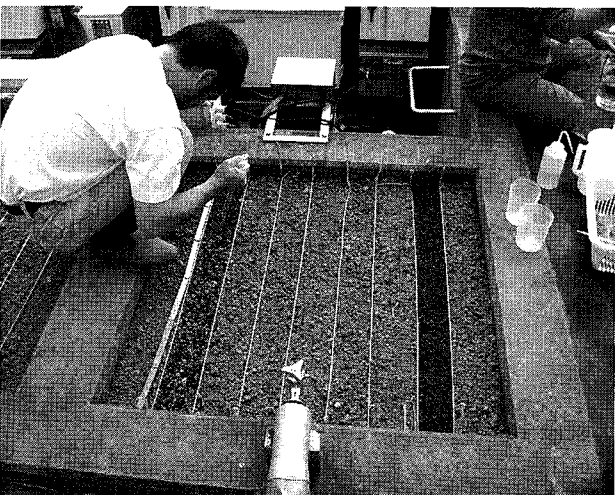
第5-6図 間引き直後の状況



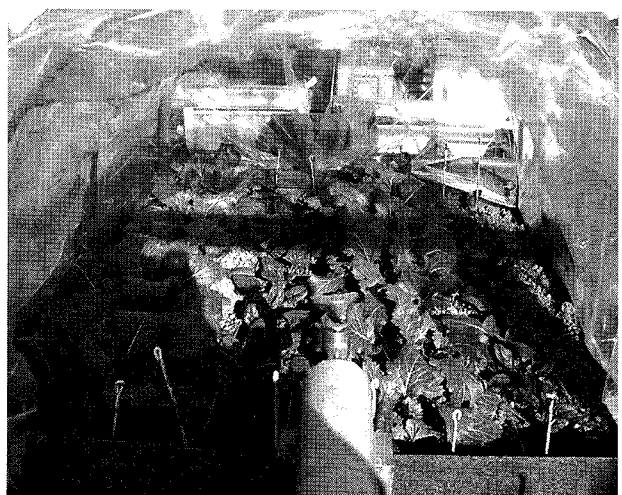
第5-4図 供試農薬施用直後の状況



第5-7図 トンネル被覆の状況



第5-5図 重窒素標識硫酸アンモニウム施用状況



第5-8図 収穫時の状況

窒素と同様に条内に施用した。重窒素標識硫酸アンモニウムと塩化カリウムは、条当たり0.1Lの蒸留水に溶解し、播種、覆土後、ピペットを用いて条全体に均一に施用した(第5-5図)。過リン酸石灰は、播種前に条内に施用し、地表から深さ10cmまで耕起した。

コカブ、ハウレンソウともに播種を2001年10月16日に行い、間引きを11月2日と21日に行った(第5-6図)。この際、両作物ともに条当たりの株数を10とした。また、有孔トンネル(商品名: ぽかぽかシート穴あき、ポリオレフィン製、厚さ0.04mm、穴径45mm)による被覆を11月6日から収穫日まで行った(第5-7図)。収穫日は、コカブが12月19日、ハウレンソウが12月20日であった(第5-8図)。

2. 作物体の分析方法

作物体の窒素含量と窒素同位体組成の分析は、乾燥・微粉碎後、昭光通商に依頼し、元素分析計-安定同位体比質量分析計(deltaplusadvantage サーモエレクトロン、ブレーメン、ドイツ)により行った。また、作物体の施肥窒素吸収量は、次式により求めた(程・中島、2005)。

$$\text{施肥窒素吸収量} = \text{作物の窒素含量} \times \frac{\text{作物の}^{15}\text{N比} - 0.369}{2.73}$$

・・・(1)

このとき、0.369はバックグラウンド(供試ライシメータ内土壌の試験開始前の値)、2.73は供試した重窒素硫酸アンモニウムの ^{15}N 比(3.10atom%)からバックグラウンドを差し引いた値である。

ハウレンソウの $(\text{NO}_2 + \text{NO}_3)\text{-N}$ 含量は、蒸留水を加えて磨細し、抽出液を銅・カドミウム還元-ナフチルエチレンジアミン法で発色後(千葉県、2005)、試料をオートアナライザ(ブラン・ルーベ社製TRAACS800)により定量した。

ハウレンソウの水溶性シュウ酸含量と還元型アスコルビン酸含量は、収穫後直ちに新鮮試料5~10gを精密に計り、それぞれ蒸留水50mLと10%メタリン酸25mLを加えて磨細し、抽出液を小型反射式光度計(関東化学社製、RQフレックスシステム)を用いて測定した(森田・太田、2001; 建部・米山、1995)。

3. 土壌の分析方法

土壌は、収穫後の2001年12月25日に地表から5cmまでを採土管を用いて採取した。各条毎に3地点をランダムに採取し、よく混合して1試料として分析に供した。

土壌窒素の分析は上述の作物に準じて、元素分析計-安定同位体比質量分析計で行った。また、土壌における施肥由来の窒素の残存量を以下の式で求めた。

$$\text{土壌中施肥由来窒素} = \text{土壌の全窒素} \times \frac{\text{土壌の}^{15}\text{N比} - 0.369}{2.73}$$

・・・(2)

なお、0.369及び2.73は(1)式と同様である。

土壌の $\text{NH}_4\text{-N}$ と $(\text{NO}_2 + \text{NO}_3)\text{-N}$ は、土壌10gを10%塩化カリウム溶液50mLで抽出し、 $\text{NH}_4\text{-N}$ はインドフェノール法で、 $(\text{NO}_2 + \text{NO}_3)\text{-N}$ は銅・カドミウム還元-ナフチルエチレンジアミン法で発色後(千葉県、2005)、オートアナライザ(ブラン・ルーベ社製TRAACS800)により定量した。

土壌中のクロロタロニル濃度の測定は、以下の方法によった。試料20gに10%リン酸溶液10mLとアセトン100mLを添加後30分間振とうし、吸引ろ過した。残さを容器に戻し、アセトン50mLを添加して同様の操作を繰り返した後、ろ液を合わせてロータリーエバポレータでアセトンを留去後、多孔性珪藻土カラム(VARIAN社製CHEMELUT-CE1020)に移し、*n*-ヘキサン80mLで溶出し、無水硫酸ナトリウムで脱水、ろ過後、濃縮し、アセトンで1mLに定容した。定量は、ガスクロマトグラフ法(HP-6890、検出器NPD、ヒューレットパッカード社、US、分離カラムDB-5MS)によった。検出限界値は 0.02mg kg^{-1} 、添加回収率は76%であった。

また、試験開始前の土壌からクロロタロニルは検出されなかった。

第3節 結果

1. クロロタロニルの施用が作物の草丈に及ぼす影響

ハウレンソウは、クロロタロニルを施用したライシメータの1基において発芽数が不足し、追加播種したものの生育が著しく劣った。このため、以下の結果では、このライシメータの2反復分のデータを除いた4反復を集計した。

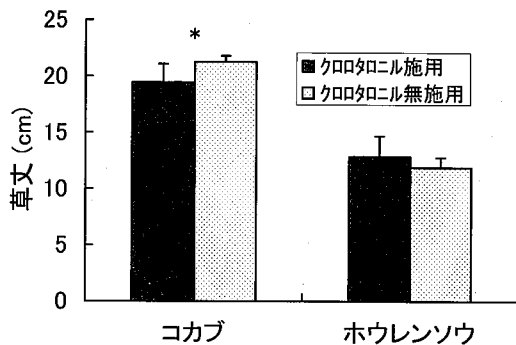
収穫時におけるコカブとハウレンソウの形態及び葉色は、両区の間で相違が観察されなかった。

コカブの草丈は、クロロタロニル無施用区が21.2cmであったのに対し、クロロタロニル施用区が19.4cmと有意に短かった(*t*検定、危険率5%)。また、この時の減少率は、8.49%であった(第5-9図)。

ハウレンソウの草丈は、クロロタロニル無施用区が11.9cmであったのに対し、クロロタロニル施用区が12.9cmであり、有意な差がなかった(第5-9図)。

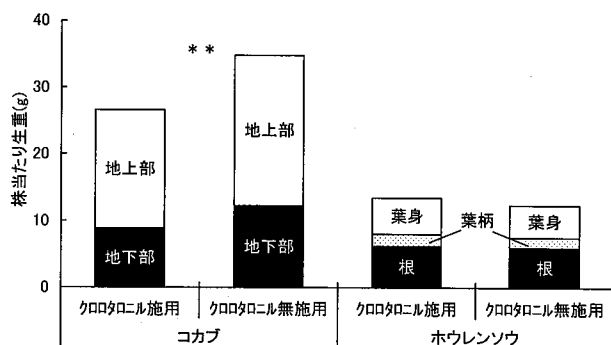
2. クロロタロニルの施用が作物の重量に及ぼす影響

コカブ1株当たりの生重は、クロロタロニル無施用区が34.9gであったのに対し、クロロタロニル施用区が26.58gで有意に小さかった(*t*検定、危険率1%)。また、この時の減少率は、23.8%であった。部位別にみると、地上部がクロロタロニル無施用区22.55gに対し、クロロタロニル施用区17.73g、地下部がクロロタロニル無



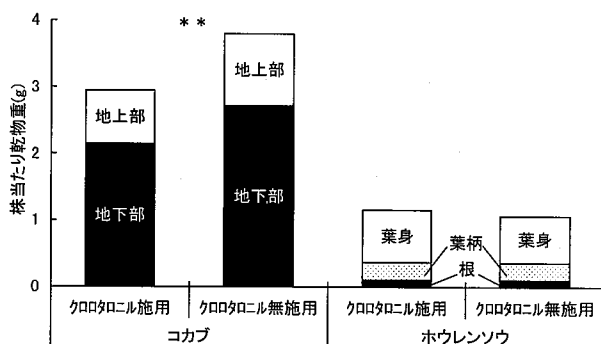
第5-9図 クロロタロニルの施用が作物の草丈に及ぼす影響

* 5%水準で有意差あり (t検定)。エラーバーは標準偏差を示す。



第5-10図 クロロタロニルの施用が作物の生重に及ぼす影響

** 1%水準で有意差あり (t検定)。



第5-11図 クロロタロニルの施用が作物の乾物重に及ぼす影響

** 1%水準で有意差あり (t検定)。

施用区12.3gに対し、クロロタロニル施用区8.85gであり、それぞれ5%の水準で有意差が検出された(第5-10図)。

ホウレンソウ1株当たりの生重は、クロロタロニル無施用区が12.35gであったのに対し、クロロタロニル施用区が13.42gであり、有意な差はなかった。また、葉身、葉柄、根のいずれの部位でも両区間に有意な差はなかった(第5-10図)。

コカブ1株当たりの乾物重は、クロロタロニル無施用区が3.79gであったのに対し、クロロタロニル施用区が2.94gであり、有意に小さかった(t検定、危険率1%)。また、この時の減少率は、22.3%であった。部位別では、地上部がクロロタロニル無施用区2.712gに対し、クロロタロニル施用区2.147g、地下部がクロロタロニル無施用区1.08gに対し、クロロタロニル施用区0.796gであり、それぞれ1%の水準で有意差が検出された(第5-11図)。

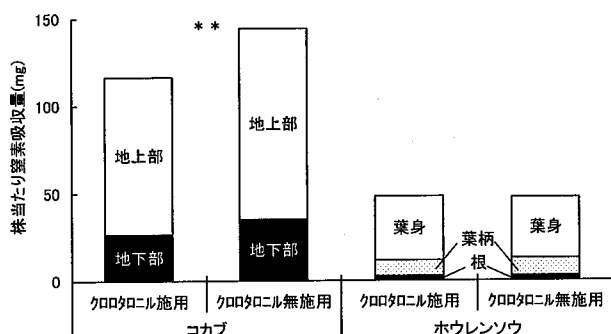
ホウレンソウ1株当たりの乾物重は、クロロタロニル無施用区が1.06gであったのに対し、クロロタロニル施用区が1.15gであり、有意な差はなかった。また、葉身、葉柄、根のいずれの部位でも両区間に有意な差はなかった(第5-11図)。

3. クロロタロニルの施用が作物の窒素吸収量に及ぼす影響

コカブ1株当たりの窒素吸収量は、クロロタロニル無施用区が144mgであったのに対し、クロロタロニル施用区が116.6mgで有意に少なかった(t検定、危険率1%)。また、この時の減少率は、19.0%であった。部位別では、地上部がクロロタロニル無施用区109mgに対し、クロロタロニル施用区90.1mg、地下部がクロロタロニル無施用区35.2mgに対し、クロロタロニル施用区26.5mgであり、それぞれ5%と1%の水準で有意差が検出された(第5-12図)。

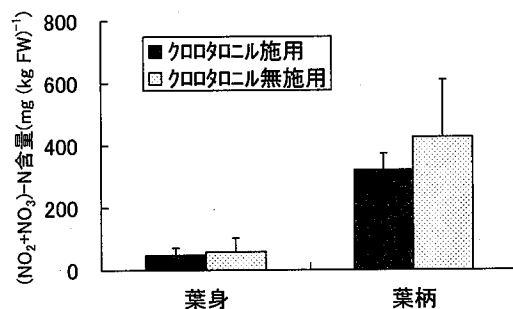
ホウレンソウ1株当たりの窒素吸収量は、クロロタロニル無施用区が47.6mgであったのに対し、クロロタロニル施用区が48.1mgであり、有意な差はなかった。また、葉身、葉柄、根のいずれの部位でも両区間に有意な差はなかった(第5-12図)。

窒素吸収量のうち施肥由来についてみると、コカブ1株当たりでは、クロロタロニル無施用区が116.6mgであったのに対し、クロロタロニル施用区が90.8mgで有意に少なかった(t検定、危険率1%)。また、この時の減少率は、22.1%であった。部位別では、地上部がクロロタロニル無施用区88.1mgに対し、クロロタロニル施用区70.0mg、地下部がクロロタロニル無施用区28.5mgに対し、クロロタロニル施用区20.8mgであり、それぞれ5%と1%の水準で有意差が検出された(第5-13図)。



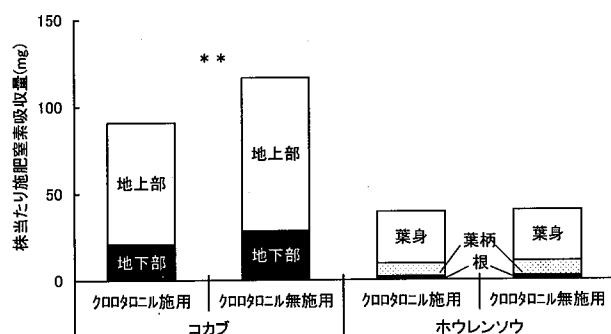
第5-12図 クロロタロニルの施用が作物の窒素吸収量に及ぼす影響

** 1%水準で有意差あり (t検定)。



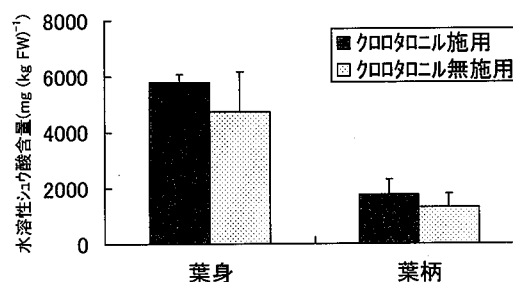
第5-14図 クロロタロニルの施用がホウレンソウの($\text{NO}_2 + \text{NO}_3$)-N含量に及ぼす影響

エラーバーは標準偏差を示す。



第5-13図 クロロタロニルの施用が作物の施肥窒素吸収量に及ぼす影響

** 1%水準で有意差あり (t検定)。



第5-15図 クロロタロニルの施用がホウレンソウ作物体の水溶性シュウ酸含量に及ぼす影響

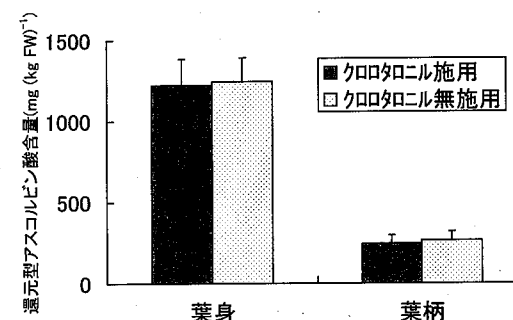
エラーバーは標準偏差を示す。

ホウレンソウ1株当たりの施肥窒素吸収量は、クロロタロニル無施用区が40.2mgであったのに対し、クロロタロニル施用区が39.2mgであり、有意な差がなかった。また、葉身、葉柄、根のいずれの部位でも両区の間には有意な差はなかった (第5-13図)。

4. クロロタロニルの施用がホウレンソウの品質に及ぼす影響

ホウレンソウの($\text{NO}_2 + \text{NO}_3$)-N含量は、葉身より葉柄で高かった。葉身の($\text{NO}_2 + \text{NO}_3$)-N含量は、クロロタロニル無施用区の58.7mg (kg FW)⁻¹に対して、クロロタロニル施用区が48.8mg (kg FW)⁻¹であり、有意差は検出されなかった。また、葉柄では、クロロタロニル無施用区の426mg (kg FW)⁻¹に対して、クロロタロニル施用区が320mg (kg FW)⁻¹であり、有意差は検出されなかった (第5-14図)。

水溶性シュウ酸含量は、葉柄より葉身で高かった。葉身の水溶性シュウ酸含量は、クロロタロニル無施用区の4730mg (kg FW)⁻¹に対して、クロロタロニル施用区が5780mg (kg FW)⁻¹であり、有意差は検出されなかった。また、葉柄では、クロロタロニル無施用区の1310mg (kg FW)⁻¹



第5-16図 クロロタロニルの施用がホウレンソウの還元型アスコルビン酸含量に及ぼす影響

エラーバーは標準偏差を示す。

に対して、クロロタロニル施用区が1760mg (kg FW)⁻¹であり、有意差はなかった (第5-15図)。

還元型アスコルビン酸含量は、葉柄より葉身で高かった。葉身の還元型アスコルビン酸含量は、クロロタロニル無施用区の1240mg (kg FW)⁻¹に対して、クロロタロニル施用区が1220mg (kg FW)⁻¹であり、有意差はなかった。また、葉柄では、クロロタロニル無施用区の260mg (kg FW)⁻¹

に対して、クロタロニル施用区が $240\text{mg}(\text{kg FW})^{-1}$ であり、有意差が検出されなかった（第5-16図）。

5. 土壌中の窒素含量とクロタロニル濃度

土壌に残存した施肥窒素含量は、コカブ栽培跡地でクロタロニル無処理区の 215mg kg^{-1} に対してクロタロニル施用区が 294mg kg^{-1} 、ハウレンソウ栽培跡地でクロタロニル無処理区の 223mg kg^{-1} に対してクロタロニル施用区が 203mg kg^{-1} であり、ともに有意な差はなかった（第5-17図）。

また、土壌に残存した $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量は、コカブ栽培跡地でクロタロニル無処理区が 116mg kg^{-1} であったのに対してクロタロニル施用区が 201mg kg^{-1} 、ハウレンソウ栽培跡地でクロタロニル無処理区が 120mg kg^{-1} であったのに対してクロタロニル施用区が 126mg kg^{-1} であり、ともに有意な差はなかった。 $(\text{NO}_2+\text{NO}_3)\text{-N}$ 含量は、コカブ栽培跡地でクロタロニル無処理区が 44.3mg kg^{-1} であったのに対してクロタロニル施用区が 61.7mg kg^{-1} 、ハウレンソウ栽培跡地でクロタロニル無処理区が 56.3mg kg^{-1} であったのに対してクロタロニル施用区が 74.4mg kg^{-1} であり、ともに有意な差はなかった（第5-18図）。

また、施肥窒素の収支をみると、土壌、作物体、間引き及び雑草を合わせた比率が、コカブでは両区とも約90%であり、ハウレンソウでは両区とも60%以下であった（第5-19図）。

収穫後のクロタロニル施用区における土壌中のクロタロニル濃度は、平均 64.20mg kg^{-1} であった。

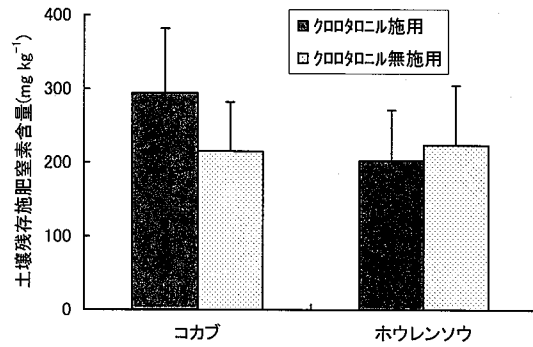
第4節 考 察

1. クロタロニル施用が作物の生育量に及ぼす影響

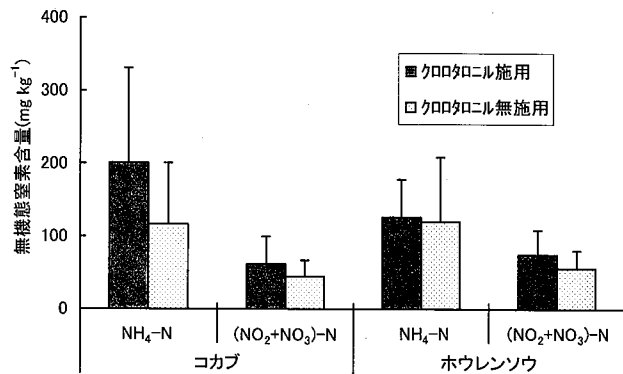
第4章の結果から、クロタロニルが土壌中のアンモニア酸化を阻害することが明らかとなり、クロタロニルの施用が好硝酸性植物の生育に影響を及ぼすことが懸念された。そこで、本章では、クロタロニルの施用がコカブの生育量およびハウレンソウの生育量と品質に及ぼす影響について検討した。

クロタロニル施用区における栽培跡地土壌中のクロタロニル濃度は、 64.20mg kg^{-1} と第4章で用いた添加量 50mg kg^{-1} を上回った。このことから、試験期間をとおして土壌中のアンモニア酸化能は、強く阻害されていたと推察される。

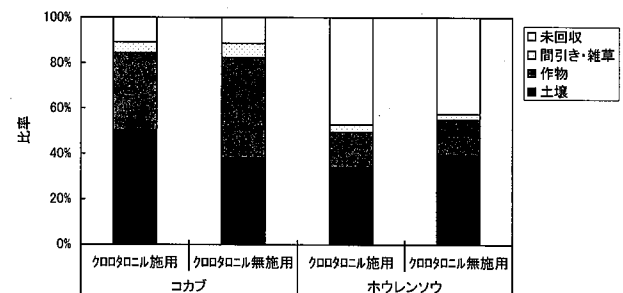
クロタロニル施用区におけるコカブの生育量は、クロタロニル無施用区と比べて草丈が短く、生重と乾燥重が小さく、土壌由来を含めた窒素吸収量および施肥窒素吸収量が少なかった。コカブは好硝酸性植物であることが知られており（池田・大沢、1981）、こうした生育



第5-17図 土壌に残存した施肥窒素含量
エラーバーは標準偏差を示す。



第5-18図 土壌に残存した無機態窒素含量
エラーバーは標準偏差を示す。



第5-19図 試験終了時の施肥窒素の収支

量の減少は、クロタロニルによる土壌中のアンモニア酸化阻害作用の結果もたらされたものと考えられた。なお、土壌由来を含む窒素吸収量の減少率は19%であり、施肥窒素吸収量の減少率は22%であった。土壌由来窒素が後期に吸収されると考えると、生育初期により生育が抑制されたと推定される。クロタロニル施用区においてコカブの生育量が減少した機作についてさらに考察すると、土壌中のアンモニア酸化阻害によりコカブ体内に $\text{NH}_4\text{-N}$ が蓄積して障害を起こしたこと（岩田、1958；松丸ら、1989）、および $\text{NH}_4\text{-N}$ の吸収速度が $(\text{NO}_2+\text{NO}_3)\text{-N}$ と比べて遅いために窒素吸収量が減少したことが考えら

れる(河崎・森次、1990)。作物体内の $\text{NH}_4\text{-N}$ 蓄積による生育障害は、水耕栽培ではしばしば認められるが、土耕栽培では硝酸化成が速やかに進むこと、 $\text{NH}_4\text{-N}$ の多くが土壤に吸着保持されること、作物根と養分の接触が植物根の伸長に負うといった理由で一般的ではない(森次・河崎、1981)。クロロタロニル施用区において、土壤中の硝酸化成は阻害されていると考えられるが、それ以外の上記理由から、コカブの生育量が減少した主な機作は、コカブによる $\text{NH}_4\text{-N}$ の吸収速度が $(\text{NO}_2+\text{NO}_3)\text{-N}$ と比べて遅いためと考えられた。

一方、ハウレンソウでは生育に差が認められなかった。本来、ハウレンソウはコカブと同様に好硝酸性植物なので(池田・大沢、1980; 河崎・森次、1990)、硝酸化成が抑制されれば生育が劣るものと考えられる。しかし、建部(1999)は、水耕培地中の $\text{NH}_4\text{-N}$ の比率を高めると一般のハウレンソウの生育量は減少したが、品種‘リード’のみは生育量が減少しなかったことを報告している。本章における試験結果でも、アンモニア酸化阻害に十分な量のクロロタロニルが土壤中に存在したが、ハウレンソウの生育量は両区で差が認められなかった。この理由として、アンモニア比率が高い条件でも生育できる品種を供試したこと他に、ハウレンソウの生育速度がコカブと比べて遅いことから、アンモニア酸化阻害を受けた土壤条件でも生育に必要な $(\text{NO}_2+\text{NO}_3)\text{-N}$ は供給されていたことが考えられる。

2. クロロタロニル施用が施肥窒素の動態に及ぼす影響

本章のクロロタロニル施用区では、第4章の結果及び栽培跡地土壤中のクロロタロニル濃度から土壤中のアンモニア酸化の阻害活性が認められる濃度で推移したと考えられる。コカブでは生重、乾物重、窒素吸収量および施肥窒素吸収量が低下し、作物への $(\text{NO}_2+\text{NO}_3)\text{-N}$ 供給に対する障害があったことが推定される。しかし、コカブ栽培跡地土壤の $(\text{NO}_2+\text{NO}_3)\text{-N}$ 含量では区間の差は認められなかった。また、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量についてもクロロタロニル施用区がクロロタロニル無施用区と比べて1.7倍残存し、アンモニア酸化を阻害した傾向をうかがわせたもののサンプル間の振れが大きいため有意差は認められず、コカブの窒素吸収量が低下した現象と矛盾する結果となった。この理由として、土壤に残存する窒素は、作物による吸収、間引きや雑草による吸収、溶脱や脱窒等による揮散といった複数の要因の影響を受けたことによりばらつきが大きくなったことが考えられた。また、コカブ栽培跡地土壤の $(\text{NO}_2+\text{NO}_3)\text{-N}$ 含量において区間の差がなかった理由は、 $\text{NH}_4\text{-N}$ のプールから硝酸化成が起るとコカブが直ちに吸収したことが考えられる。

ハウレンソウ栽培跡地土壤では $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量、 $(\text{NO}_2+\text{NO}_3)\text{-N}$ 含量ともにクロロタロニルの施用による差がなかった。施肥窒素収支中の「未回収」の部分は、亜酸化窒素の生成、溶脱及び脱窒等が考えられるが、それらは硝酸化成の過程もしくは $(\text{NO}_2+\text{NO}_3)\text{-N}$ の形態で生じる(秋山、2005; 金子ら、2002)。ハウレンソウは、コカブと比べて生育が遅く、施肥窒素収支中の作物の比率が低く、未回収の比率が高い(第5-19図)。このことから、クロロタロニル施用区における土壤中の硝酸化成能でも余剰の $(\text{NO}_2+\text{NO}_3)\text{-N}$ が供給され、溶脱または脱窒しやすい環境にあったと考えられる。このことは、好硝酸性植物の中でも生育が早い作物ほどクロロタロニル施用による影響が現れやすいことを示唆している。

3. クロロタロニル施用がハウレンソウの品質に及ぼす影響

ハウレンソウの $(\text{NO}_2+\text{NO}_3)\text{-N}$ 含量、水溶性シュウ酸含量および還元型アスコルビン酸含量のいずれも、クロロタロニル施用区と無施用区で差はなかった。このことから、本試験ではハウレンソウの主要な品質関連成分はクロロタロニルの施用による影響は受けないと結論できた。建部(1999)は、水耕培地中の $\text{NH}_4\text{-N}$ の比率を高めることにより品種‘リード’を含むハウレンソウの $(\text{NO}_2+\text{NO}_3)\text{-N}$ 含量とシュウ酸含量が減少し、アスコルビン酸含量が増加することを報告している。しかし、本試験における土壤中の $\text{NH}_4\text{-N}$ と $(\text{NO}_2+\text{NO}_3)\text{-N}$ の比率は、両区間でハウレンソウの品質関連成分に影響する程の差を生じなかったと推定される。

以上のように、クロロタロニルの施用はコカブの生育量を抑制することが明らかとなり、クロロタロニルによる土壤中のアンモニア酸化阻害の関与が示唆された。一方で、ハウレンソウの生育量と品質関連成分では、クロロタロニル施用による影響は認められなかった。今後、クロロタロニルの農薬登録上施用の対象となっている作物を中心に、クロロタロニル施用による生育量への影響を検証する必要がある。また、本章で供試したクロロタロニル10%含有粉剤施用後3ヵ月以内に後作としてトマトとハウレンソウを作付けると、それらの生育が抑制されることが知られている(JA全農肥料農薬部農薬技術・安全課編、2004a)。この現象とクロロタロニルによる土壤中のアンモニア酸化阻害との関係を明らかにすると共に、ハウレンソウを含めた後作作物に対するクロロタロニル施用の影響をさらに詳細に検証する必要がある。

第VI章 総合考察

本研究は、畑土壌における有機塩素系殺菌剤クロロタロニルの動態と生理作用を明らかにすることを目的とした。また、比較対照区に他の農薬を供試し、物性や生理活性の相違等から各種考察を加えた。

第2章では、パンライシメータ法を用いた砂質露地畑におけるクロロタロニルの鉛直浸透状況について調査した。地下水の水質の汚濁に係る要監視項目では、クロロタロニルの指針値が $50 \mu\text{g L}^{-1}$ 以下となっている（環境省水環境部長、2004）。また、本研究を実施した砂質露地畑は、有機炭素含量と粘土含量が低いことから、農薬が最も鉛直浸透しやすい土壌条件と考えられる。その結果、クロロタロニルは、地表下50cmにおいて土壌浸透水中から検出されなかった。また、クロロタロニルは試験終了時に土壌中から検出されなかった。奴田原ら（1990）は、土性が異なる4種の土壌を充填したカラムを用いて農薬鉛直浸透に関する試験を実施し、100mm灌水後でもクロロタロニルの大部分は表層から5cmに留まったことを報告している。また、環境省が公表している地下水水質の測定結果では、平成6～15年に全国で延べ2000以上の井戸が調査されているが、クロロタロニルの濃度が指針値を超過した井戸はない（環境省環境管理局水環境部、2004）。これらのことから、地下水におけるクロロタロニルの濃度が上述の指針値を上回る可能性は低いと考えられた。今後は、施用量がより多い土壌処理剤を想定した試験が必要と考える。

農薬の鉛直浸透を屋外で評価する方法としては、大別して土壌浸透水を採取する方法と土壌を採取する方法がある。前者にライシメータ法（丸、1991；中村、1993）、パンライシメータを含む埋設型ライシメータ法（金子・山本、1999；金子、2002；金子ら、2002；谷川・西村、1999；山本ら、1998；山本ら、2000；山本ら、2001；山本ら、2005）およびポーラスカップ法があり（Suzuki、2000）、後者に土壌コア法がある（荻山ら、2002）。また、複数のライシメータを設置して土壌浸透水を採取すると共に、その内数基を定期的に回収し、層別に土壌採取した事例もある（Weber・Keller、1994）。それぞれの方法の特徴としては、ライシメータ法では物質収支を測定することに最も適し、埋設型ライシメータ法では壁面の影響が無く、パンライシメータ法では土壌の成層構造を破壊しない、ポーラスカップ法は最も簡便であり、土壌コア法では鉛直浸透し難い農薬や土壌条件でも浸透状況を確実に把握できること等が挙げられる。このように、農薬鉛直浸透の調査方法はそれぞれ特徴があり、研究の目

的、供試薬剤、土壌条件などにより選択するべきと考える。また、これら調査法を補完し、精度をさらに高めるために、本研究で用いた Cl^{-} など水分移動を把握するトレーサーを投入する、ダルシーの法則を用いて土壌浸透水量を推定する（フラックス法）、蒸発散量を含む水収支を把握するといった他の手法を併用することが望まれる（長谷川、2002）。

また、第2章では、クロロタロニルを含めて、供試農薬の分解産物は対象としなかった。しかし、農薬の分解産物は、親化合物と比べて鉛直浸透し易い場合がある（Somasundaram、1991）。クロロタロニルの主要分解産物TPN-OHについても、クロロタロニルと比べて鉛直浸透しやすいことが報告されている（元永ら、2001）。今後、農薬の鉛直浸透を調査するに当たっては、分解産物の挙動や分解機構に及ぼす環境要因、物質収支などを視野に入れる必要がある。

第3章においては、畑土壌におけるクロロタロニルの消失に関与する要因の寄与を判断する手法として、炭素同位体分別の利用を採り上げた。本研究により、畑土壌におけるクロロタロニル消失過程において炭素の安定同位体自然存在比が上昇し、同位体分別が生じていることが明らかとなった。

今後の課題としては、クロロタロニルの分解や移動など消失に関与する要因ごとに同位体分別の有無を確認すると共に、農地と環境における挙動解析への利用、他の農薬への応用などが考えられる。

第4章では、土壌中の窒素循環の中で重要な位置を占める硝酸化成を採り上げ、クロロタロニルが土壌中のアンモニア酸化に及ぼす影響を検討した。その結果、クロロタロニルは、土壌中のアンモニア酸化を強く阻害した。

硝酸化成に対するクロロタロニルの影響については、現在までに幾つか報告されているが、その評価は分かれている。高木（1991）は、クロロタロニルの長期連用圃場において土壌中の硝酸化成能が著しく低下したことを報告しており、本研究の結果と一致する。一方、加藤・豊田（1991）とTu（1993）は、クロロタロニルによる土壌中の各種微生物活性への影響を調査する中で、硝酸化成阻害は認められなかったとしており、本研究の結果と一致しない。この理由としては、本研究では土壌中のアンモニア酸化阻害に焦点を当て、施肥に該当する $\text{NH}_4\text{-N}$ を供試土壌に添加したのに対し、加藤らとTuは、広範囲の土壌微生物に対する影響を調査するために $\text{NH}_4\text{-N}$ を添加しなかったことが挙げられる。すなわち、 $\text{NH}_4\text{-N}$ を

供試土壌に添加しなかったためにクロロタロニル添加土壌と無添加土壌における硝酸化成の差を検出できなかったものと考えられる。今後は、土壌中の硝酸化成におけるもう一つの微生物反応である亜硝酸酸化能についてもクロロタロニルの影響を検証する必要がある。

ペンタクロロフェノール（農林水産省登録名PCP）は、除草剤及び殺菌剤として用いられたが、硝酸化成抑制剤としても期待され、農薬肥料として市販されていた（橋本・岡田、1964；栗原、1991）。本研究においてクロロタロニルは、添加量 5 mg kg^{-1} 以上で土壌の $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量と $(\text{NO}_2+\text{NO}_3)\text{-N}$ 含量の両方に影響したが、これはペンタクロロフェノールと同じレベルである（Hellingら、1971）。このように、クロロタロニルも他の条件を満たせば、新たに硝酸化成抑制剤としての利用が考えられる。しかし、硝酸化成抑制剤が具備すべき条件の一つに人畜、魚及び作物に対して毒性を示さないことが挙げられる（栗原、1991）。クロロタロニルは、魚毒性がC類と高いこと（米山ら、1990）、また、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（Katayamaら、1991；Takagiら、1991；高木、1991）、硝酸化成抑制剤としての利用は適当ではないと判断する。

現在までに、クロロタロニル施用による植物体への影響としては、長期連用による雑草植生の単純化と生育抑制が報告されており、原因の一つとして土壌の窒素代謝の攪乱が指摘されている（Takagiら、1991；高木、1991）。

第5章では、クロロタロニルの施用が作物生育に及ぼす影響をコカブとハウレンソウを用いて検証した。その結果、ハウレンソウの品質には影響を及ぼさなかったが、コカブの生育量が減少した。このことから、クロロタロニルの施用は、土壌中のアンモニア酸化を阻害し、作物の生育を抑制する場合があると考えられた。クロロタロニルによる土壌中のアンモニア酸化阻害による作物生育抑制の対策としては、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、土壌におけるクロロタロニルの分解を促進し、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（高木、1991；孫ら、1985）。

本研究により、現在広く普及し、今後も殺菌剤として重要な位置を占めるクロロタロニルについて、農業生産と環境保全の両面からより適切な使用方法を策定するための知見を得ることができた。農業生産を維持する上で必要不可欠な資材である農薬を有効に使用するには、使用者が農薬の利便性と危険性を十分に理解することが重要である。今後、農地と環境における農薬の動態と生理作用に関する研究をさらに進めるとともに、使用者であ

る農業者に積極的に情報を提供し、より適切な使用方法の実践を促す必要がある。

要 旨

本論文は、我が国で使用されている代表的な殺菌剤クロロタロニル（tetrachloroisophthalonitrile）を採り上げ、畑土壌における動態と生理作用を明らかにすることを目的とした。また、比較対照区に他の農薬を供試し、物性や生理活性の相違から各種考察を加えた。

第1章では、環境における農薬動態に関する課題を整理し、供試薬剤としてクロロタロニルを採り上げた理由を述べるとともに、本研究の目的を示した。

第2章では、パンライシメータ法を用いて砂質露地畑における農薬の鉛直浸透量を測定した。パンライシメータの集水パン（ $30 \times 30 \text{ cm}$ ）は、地表下 50 cm に設置した。試験期間中（125日間）における総土壌浸透水量は 608.2 mm で、総降水量の65%に相当した。供試農薬はクロロタロニル、シマジン、ダイアジノン、メトラクロール及びジメトエートとし、トレーサーとして Cl^- を用いた。その結果、土壌浸透水中からは、クロロタロニル、ダイアジノン及びメトラクロールが検出されず、ジメトエートとシマジンは最高でそれぞれ $18.4 \mu\text{g L}^{-1}$ と $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ 検出された。試験期間における総農薬鉛直浸透量は、ジメトエートが 2.99 mg m^{-2} 、シマジンが 0.33 mg m^{-2} であり、流出率はそれぞれ3.5%と0.4%であった。

第3章では、環境中の農薬の炭素同位体分別の存在を確認するため、畑土壌における農薬の炭素安定同位体自然存在比の経時変化を測定した。クロロタロニルを淡色黒ボク土に添加（ 50 mg kg^{-1} ）し、暗黒条件下、 30°C で70日間培養した。クロロタロニルの $\delta^{13}\text{C}$ 値は、培養期間中に -26.5‰ から -22.5‰ にまで上昇した。この時の濃縮係数は、 -2.6‰ であった。以上から、畑土壌における本薬剤の消失過程において炭素同位体分別が生じていることが確認された。

第4章では、10種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し、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。供試薬剤の中で、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かった。これらに比べ、トリフルミゾール、トルクロホスメチル、イプロジオン、フルトラニル、ヘキサコナゾール、イソプロチオラン、ベノミルおよびメトラキシルは、阻害活性が低いか、または認められなかった。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長く持続した。また、その活性は添加量に依存し、添加量が5

供試土壌に添加しなかったためにクロロタロニル添加土壌と無添加土壌における硝酸化成の差を検出できなかったものと考えられる。今後は、土壌中の硝酸化成におけるもう一つの微生物反応である亜硝酸酸化能についてもクロロタロニルの影響を検証する必要がある。

ペンタクロロフェノール（農林水産省登録名PCP）は、除草剤及び殺菌剤として用いられたが、硝酸化成抑制剤としても期待され、農薬肥料として市販されていた（橋本・岡田、1964；栗原、1991）。本研究においてクロロタロニルは、添加量 5 mg kg^{-1} 以上で土壌の $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量と $(\text{NO}_2+\text{NO}_3)\text{-N}$ 含量の両方に影響したが、これはペンタクロロフェノールと同じレベルである（Hellingら、1971）。このように、クロロタロニルも他の条件を満たせば、新たに硝酸化成抑制剤としての利用が考えられる。しかし、硝酸化成抑制剤が具備すべき条件の一つに人畜、魚及び作物に対して毒性を示さないことが挙げられる（栗原、1991）。クロロタロニルは、魚毒性がC類と高いこと（米山ら、1990）、また、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（Katayamaら、1991；Takagiら、1991；高木、1991）、硝酸化成抑制剤としての利用は適当ではないと判断する。

現在までに、クロロタロニル施用による植物体への影響としては、長期連用による雑草植生の単純化と生育抑制が報告されており、原因の一つとして土壌の窒素代謝の攪乱が指摘されている（Takagiら、1991；高木、1991）。

第5章では、クロロタロニルの施用が作物生育に及ぼす影響をコカブとハウレンソウを用いて検証した。その結果、ハウレンソウの品質には影響を及ぼさなかったが、コカブの生育量が減少した。このことから、クロロタロニルの施用は、土壌中のアンモニア酸化を阻害し、作物の生育を抑制する場合があると考えられた。クロロタロニルによる土壌中のアンモニア酸化阻害による作物生育抑制の対策としては、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、土壌におけるクロロタロニルの分解を促進し、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（高木、1991；孫ら、1985）。

本研究により、現在広く普及し、今後も殺菌剤として重要な位置を占めるクロロタロニルについて、農業生産と環境保全の両面からより適切な使用方法を策定するための知見を得ることができた。農業生産を維持する上で必要不可欠な資材である農薬を有効に使用するには、使用者が農薬の利便性と危険性を十分に理解することが重要である。今後、農地と環境における農薬の動態と生理作用に関する研究をさらに進めるとともに、使用者であ

る農業者に積極的に情報を提供し、より適切な使用方法の実践を促す必要がある。

要 旨

本論文は、我が国で使用されている代表的な殺菌剤クロロタロニル（tetrachloroisophthalonitrile）を採り上げ、畑土壌における動態と生理作用を明らかにすることを目的とした。また、比較対照区に他の農薬を供試し、物性や生理活性の相違から各種考察を加えた。

第1章では、環境における農薬動態に関する課題を整理し、供試薬剤としてクロロタロニルを採り上げた理由を述べるとともに、本研究の目的を示した。

第2章では、パンライシメータ法を用いて砂質露地畑における農薬の鉛直浸透量を測定した。パンライシメータの集水パン（ $30 \times 30 \text{ cm}$ ）は、地表下 50 cm に設置した。試験期間中（125日間）における総土壌浸透水量は 608.2 mm で、総降水量の65%に相当した。供試農薬はクロロタロニル、シマジン、ダイアジノン、メトラクロール及びジメトエートとし、トレーサーとして Cl^- を用いた。その結果、土壌浸透水中からは、クロロタロニル、ダイアジノン及びメトラクロールが検出されず、ジメトエートとシマジンが最高でそれぞれ $18.4 \mu\text{g L}^{-1}$ と $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ 検出された。試験期間における総農薬鉛直浸透量は、ジメトエートが 2.99 mg m^{-2} 、シマジンが 0.33 mg m^{-2} であり、流出率はそれぞれ3.5%と0.4%であった。

第3章では、環境中の農薬の炭素同位体分別の存在を確認するため、畑土壌における農薬の炭素安定同位体自然存在比の経時変化を測定した。クロロタロニルを淡色黒ボク土に添加（ 50 mg kg^{-1} ）し、暗黒条件下、 30°C で70日間培養した。クロロタロニルの $\delta^{13}\text{C}$ 値は、培養期間中に -26.5‰ から -22.5‰ にまで上昇した。この時の濃縮係数は、 -2.6‰ であった。以上から、畑土壌における本薬剤の消失過程において炭素同位体分別が生じていることが確認された。

第4章では、10種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し、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。供試薬剤の中で、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かった。これらに比べ、トリフルミゾール、トルクロホスメチル、イプロジオン、フルトラニル、ヘキサコナゾール、イソプロチオラン、ベノミルおよびメトラキシルは、阻害活性が低いか、または認められなかった。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長く持続した。また、その活性は添加量に依存し、添加量が5

mg kg⁻¹以上のときに土壌のNH₄-N含量と(NO₂+NO₃)-N含量の両方に影響を及ぼした。クロロタロニルの畑土壌における主要分解産物4-ヒドロキシ-2,5,6-トリクロロイソフタロニトリル (TPN-OH) は、土壌中のアンモニア酸化を阻害するが、その活性はクロロタロニル及びジシアンジアミドと比べて低かった。クロロタロニルの類縁化合物テトラクロロテレフタロニトリル (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。他の類縁化合物1,2,3,5-テトラクロロベンゼン (TCB)、イソフタロニトリル (IPN)、テレフタロニトリル (TePN)、フタロニトリル (PN) 及びベンゾニトリル (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。アンモニア酸化細菌集積土壌において、クロロタロニル区 (添加量100mg kg⁻¹) のアンモニア酸化細菌数は、クロラムフェニコール区 (添加量500mg kg⁻¹) と比べて急激に低下した。以上から、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あり、それらの分子内での配置が阻害活性の強度に大きく関与すること、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明らかとなった。

第5章では、クロロタロニルの農薬登録上の対象作物であるコカブについて、クロロタロニルの施用が作物の生育量と施肥窒素の吸収に及ぼす影響を実際に調査した。また、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がハウレンソウの生育量と品質に及ぼす影響についても併せて検討した。クロロタロニル施用区におけるコカブの生育量は、クロロタロニル無施用区と比べて減少した。この時の減少率は、草丈8.49%、生重23.8%、乾物重22.3%、窒素吸収量19.0%、施肥窒素吸収量22.1%であった。クロロタロニル施用区におけるハウレンソウの生育量、(NO₂+NO₃)-N含量、水溶性シュウ酸含量および還元型アスコルビン酸含量は、クロロタロニ

ル無施用区と差がなかった。以上から、クロロタロニルの施用はコカブの生育量を抑制することが明らかとなり、クロロタロニルによる土壌中のアンモニア酸化阻害の関与が示唆された。一方で、ハウレンソウの生育量と品質関連成分では、クロロタロニル施用による影響は認められなかった。

第6章では、各章で得られた知見を踏まえ、農薬の環境動態調査法やクロロタロニルの安全使用に向けた提言をした。

謝 辞

本研究を実施するに当たり、独立行政法人農業技術研究機構 (現 農業・食品産業技術総合研究機構) 中央農業総合研究センター藤原伸介博士と田中福代博士に御指導を賜った。独立行政法人農業環境技術研究所高木和広博士には、土壌におけるクロロタロニルの挙動に関する貴重な御助言を賜った。千葉県農業総合研究センター (現 千葉県農林総合研究センター) 金子文宜博士には、終始懇切丁寧な御指導を賜った。また、同センター (現 ㈱化学分析コンサルタント) 丸 論博士には、環境中の農薬動態研究に関する貴重な御助言を賜った。

本研究のとりまとめに当たっては、宇都宮大学教授 (現 名誉教授) 竹内安智博士、東京農工大学大学院教授 (現 名誉教授) 安部 浩博士、宇都宮大学教授奥田誠一博士、茨城大学教授 (現 名誉教授) 河野芳樹博士、宇都宮大学教授米山弘一博士、千葉県農業総合研究センター (現 千葉県農林総合研究センター) 松丸恒夫博士の御指導を賜った。

本研究の実施に当たり、千葉県農業試験場、農業総合研究センター (現 農林総合研究センター) の職員各位、特に生産環境研究室と生産環境部環境機能研究室の皆様にご多大なる御支援を賜った。ここに記して深く感謝の意を表する。

mg kg⁻¹以上のときに土壌のNH₄-N含量と(NO₂+NO₃)-N含量の両方に影響を及ぼした。クロロタロニルの畑土壌における主要分解産物4-ヒドロキシ-2,5,6-トリクロロイソフタロニトリル (TPN-OH) は、土壌中のアンモニア酸化を阻害するが、その活性はクロロタロニル及びジシアンジアミドと比べて低かった。クロロタロニルの類縁化合物テトラクロロテレフタロニトリル (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。他の類縁化合物1,2,3,5-テトラクロロベンゼン (TCB)、イソフタロニトリル (IPN)、テレフタロニトリル (TePN)、フタロニトリル (PN) 及びベンゾニトリル (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。アンモニア酸化細菌集積土壌において、クロロタロニル区 (添加量100mg kg⁻¹) のアンモニア酸化細菌数は、クロラムフェニコール区 (添加量500mg kg⁻¹) と比べて急激に低下した。以上から、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あり、それらの分子内での配置が阻害活性の強度に大きく関与すること、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明らかとなった。

第5章では、クロロタロニルの農薬登録上の対象作物であるコカブについて、クロロタロニルの施用が作物の生育量と施肥窒素の吸収に及ぼす影響を実際に調査した。また、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がハウレンソウの生育量と品質に及ぼす影響についても併せて検討した。クロロタロニル施用区におけるコカブの生育量は、クロロタロニル無施用区と比べて減少した。この時の減少率は、草丈8.49%、生重23.8%、乾物重22.3%、窒素吸収量19.0%、施肥窒素吸収量22.1%であった。クロロタロニル施用区におけるハウレンソウの生育量、(NO₂+NO₃)-N含量、水溶性シュウ酸含量および還元型アスコルビン酸含量は、クロロタロニ

ル無施用区と差がなかった。以上から、クロロタロニルの施用はコカブの生育量を抑制することが明らかとなり、クロロタロニルによる土壌中のアンモニア酸化阻害の関与が示唆された。一方で、ハウレンソウの生育量と品質関連成分では、クロロタロニル施用による影響は認められなかった。

第6章では、各章で得られた知見を踏まえ、農薬の環境動態調査法やクロロタロニルの安全使用に向けた提言をした。

謝 辞

本研究を実施するに当たり、独立行政法人農業技術研究機構 (現 農業・食品産業技術総合研究機構) 中央農業総合研究センター藤原伸介博士と田中福代博士に御指導を賜った。独立行政法人農業環境技術研究所高木和広博士には、土壌におけるクロロタロニルの挙動に関する貴重な御助言を賜った。千葉県農業総合研究センター (現 千葉県農林総合研究センター) 金子文宜博士には、終始懇切丁寧な御指導を賜った。また、同センター (現 ㈱化学分析コンサルタント) 丸 論博士には、環境中の農薬動態研究に関する貴重な御助言を賜った。

本研究のとりまとめに当たっては、宇都宮大学教授 (現 名誉教授) 竹内安智博士、東京農工大学大学院教授 (現 名誉教授) 安部 浩博士、宇都宮大学教授奥田誠一博士、茨城大学教授 (現 名誉教授) 河野芳樹博士、宇都宮大学教授米山弘一博士、千葉県農業総合研究センター (現 千葉県農林総合研究センター) 松丸恒夫博士の御指導を賜った。

本研究の実施に当たり、千葉県農業試験場、農業総合研究センター (現 農林総合研究センター) の職員各位、特に生産環境研究室と生産環境部環境機能研究室の皆様にご多大なる御支援を賜った。ここに記して深く感謝の意を表する。

引用文献

- 赤井直彦・石橋英二・大家理哉・森次真一 (2001). 牛尿への硝酸化成抑制剤添加が草地からの環境負荷に及ぼす影響. 土肥誌. 72 : 206-213.
- 秋山博子 (2005). 4-Ⅲ黒ボク土畑からの N_2O , NO および NO_2 のフラックスのモニタリングと発生削減. 続・環境負荷を予測する. 波多野隆介・犬伏和之編. pp.187-204. 博友社. 東京.
- Bloom, Y., Aravena, R., Hunkeler, D., Edwards E. and Frape, S. K. (2000). Carbon isotope fractionation during microbial dechlorination of trichloroethene. *cis*-1,2-dichloroethene and vinyl chloride: implications for assessment of natural attenuation. *Environ. Sci. Technol.* 34 : 2768-2772.
- 朴光来・山本洋司・中西康博・熊澤喜久雄 (1996). アンモニウム溶液よりのアンモニア揮散に伴う残留アンモニア態窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 値の変化. 土肥誌. 67 : 314-316.
- British Crop Protection Council (2000). 141 chlorothalonil. In: The Pesticide Manual 12th ed. (C. D. S. Tomlin ed.) pp.168-169. British Crop Protection Council. Farnham.
- Caseley, J. C. and Broadbent F. E. (1968). The effect of five fungicides on soil respiration and some nitrogen transformations in Yolo fine sandy loam. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 3 : 58-64.
- 千葉県 (1978). 全国土壌統名: 長崎. 地力保全基本調査総合成績書. pp.152-153.
- 千葉県 (2005). Ⅲ土壌分析及び測定法. 土壌、水質及び作物分析診断. 千葉県農林水産技術会議技術調整部会土壌・肥料分科会編. pp.10-107. 千葉県農林水産技術会議. 千葉.
- Corke, C. T. and Thompson F. R. (1970). Effects of some phenylamide herbicides and their degradation products on soil nitrification. *Can. J. Microbiol.* 16 : 567-571.
- Debona, A. C. and Audus L. J. (1970). Studies on the effects of herbicides on soil nitrification. *Weed Res.* 10 : 250-263.
- Gustafson, D. I. (1989). Groundwater ubiquity score; A simple method for assessing pesticide leachability. *Environ. Toxicol. Chem.* 8 : 339-357.
- 長谷川周一 (2002). I 土壌浸透水のモニタリングと予測. 環境負荷を予測するーモニタリングからモデリングへ. 長谷川周一・波多野隆介・岡崎正規編. 13-22. 博友社. 東京.
- 橋本雄司・岡田秀男 (1964). 複合肥料に混入したPCPの作物への影響 (水稻の元肥の場合). 土肥誌. 35 : 90-94.
- 平成6年政令 (1994). 第308号.
- 平成11年法律 (1999a). 第86号.
- 平成11年法律 (1999b). 第112号.
- 平成15年法律 (2003). 第55号.
- Helling, C. S., Kearney, P. C. and Alexander M. (1971). Behavior of pesticides in soils. *Adv. Agron.* 23 : 147-240.
- 樋口太重 (1999). 2. 硝化抑制材と肥効. 加除式農業技術体系土壌施肥編7-①. pp.147-150. 農文協. 東京.
- Hunkeler, D., Aravena, R. and Butler, B. J. (1999). Monitoring microbial dechlorination of tetrachloroethene (PCE) in groundwater using compound-specific stable carbon isotope ratios: Microcosm and field studies. *Environ. Sci. Technol.* 33 : 2733-2738.
- 池田英男・大沢孝也 (1980). 施用窒素形態とそ菜の適応性 (第2報) 水耕栽培において硝酸, アンモニア, 亜硝酸を窒素源とした葉菜の生育並びにアンモニア態及び硝酸態窒素蓄積の差異. 園学雑. 48 : 435-432.
- 池田英男・大沢孝也 (1981). 施肥窒素形態とそ菜の適応性 (第3報) 水耕栽培において NO_3 , NH_4 , NO_2 をN源とした根菜の生育並びに $\text{NH}_4\text{-N}$ 及び $\text{NH}_3\text{-N}$ 蓄積の差異. 園学雑. 49 : 563-570.
- 石谷秋人 (1997). 2 農薬の登録と取り締まり. 植物防疫講座第3版-雑草・農薬・行政編-. pp.479-488. 日本植物防疫協会. 東京.
- 岩田正利 (1958). 窒素形態の差異と蔬菜の生育 (第2報) 各種形態窒素の施用濃度がコカブの生育に及ぼす影響. 園学雑. 27 : 21-31.
- JA全農千葉 (2005). 肥料品目特性一覧. 126pp. 千葉.
- JA全農肥料農薬部農薬技術・安全課編 (2004a). 薬害注意事項解説. クミアイ農薬総覧2005. pp.1895-1970. 全国農村教育協会. 東京. 2004.
- JA全農肥料農薬部農薬技術・安全課編 (2004b). 有効成分特性一覧表, クミアイ農薬総覧2005. pp.1975-2054. 全国農村教育協会. 東京.
- 各務原市地下水汚染研究会 (1990). 第4章農薬. 各務

- 原台地の地下水汚染. pp.236-246.
- 甲斐秀昭 (1994). 第11章土壌の生化学. 土の微生物. 微生物研究会編. pp.341-387. 博友社. 東京.
- Kanazawa, J. (1989). Relationship between the soil sorption constants for pesticides and their physicochemical properties. *Environ. Toxicol. Chem.* **8** : 477-484.
- 金澤 純 (1992). 第5章農薬の土壌中における動態. 農薬の環境科学. pp.93-140. 合同出版. 東京.
- 金澤 純編 (1996). 農薬の環境特性と毒性データ集. 382pp. 合同出版. 東京.
- 金子文宜・山本幸洋 (1999). パンライシメーター法による砂質露地畑における窒素収支の測定. 土肥誌. **70** : 190-193.
- 金子文宜 (2002). II 黒ボク露地畑における硝酸態窒素溶脱のモニタリング. 環境負荷を予測するーモニタリングからモデリングへー. 長谷川周一・波多野隆介・岡崎正規編. pp.23-36. 博友社. 東京.
- 金子文宜・大塚英一・山本幸洋・大谷邦洋・犬伏和之・戴 偉 (2002). パンライシメータ法による関東ローム堆積露地畑における土壌水および硝酸態窒素の浸実態. 土肥誌. **73** : 501-507.
- 環境庁 (1993). 環境庁告示第16号.
- 環境庁 (1997). 環境庁告示第10号.
- 環境庁 (1999a). 環境庁告示第14号.
- 環境庁 (1999b). 環境庁告示第16号.
- 環境庁 (2000). 内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針についてー環境ホルモン戦略計画SPEED'98ー2000年11月版. pp.35-36.
- 環境省環境管理局水環境部 (2004). 平成15年度地下水質測定結果. 50pp.
- 環境省水環境部長 (2004). 環水企発第040331003号, 環水土発第040331005号.
- Katayama, A., Isemura, H. and Kuwatsuka, S. (1991). Suppression of chlorothalonil dissipation in soil by repeated application. *J. Pestic. Sci.* **16** : 233-238.
- Katayama, A., Mori, T. and Kuwatsuka, S. (1995). Abiotic dissipation of chlorothalonil in soil accelerated by amendment with high applications of farmyard manure. *Soil Biol. Biochem.* **27** : 147-151.
- 片山新太 (2000). 土壌中の農薬分解に関与する微生物群の構造と挙動. 農薬誌. **25** : 300-309.
- 加藤 保・豊田一郎 (1991). 殺菌剤、除草剤が土壌微生物活性に及ぼす影響. 愛知農総試研報. **23** : 303-312.
- 川西琢也・木村展治・尾崎保夫・米山忠克 (1991). カラムによる脱窒過程¹⁵N/¹⁴N分別係数の測定. 土肥誌. **62** : 424-426.
- 河崎利夫・森次益三 (1990). II 培地のアンモニア態窒素および硝酸態窒素と植物の生長, 養液栽培と植物栄養. 日本土壌肥科学会編. 29-53. 博友社. 東京.
- 木村龍介 (1986). 49 硝化能, 土壌標準分析・測定法. 土壌標準分析・測定委員会編. pp.312-320. 博友社. 東京.
- 厚生労働省健康局水道課長 (2003). 健水発第1010001号.
- 栗原 淳 (1991). 肥料の種類と性質. 最新土壌・肥料・植物栄養辞典 (増訂版). 三井進午監修. pp.229-298. 博友社. 東京.
- Kuroshima, T. and Hayano, K. (1982). Phospholipase C activity in soil, *Soil Sci. Plant Nutr.* **28** : 535-542.
- 鯨塚昭三・山本広基 (1998). III. 土壌中における農薬の挙動, 土と農薬. pp.45-122. 日本植物防疫協会. 東京.
- Mariotti, A., Germon, J. C., Hubert, P., Kaiser, P., Letolle, R., Tardieux, A. and Tardieux P. (1981). Experimental determination of nitrogen kinetic isotope fractionation : some principles ; illustration for the denitrification and nitrification processes, *Plant and Soil* **62** : 413-430.
- Mariotti, A., Landreau, A. and Simon, B. (1988). ¹⁵N isotope biogeochemistry and natural denitrification process in groundwater : Application to the chalk aquifer of northern France, *Geochim. Cosmochim. Acta* **52** : 1869-1878.
- 丸 論 (1991). 水系環境における農薬の動態に関する研究, 千葉農試特報. **18** : 1-62.
- 松丸恒夫・米山忠克・松岡義浩 (1989). トマトおよびコムギを用いた窒素過剰障害の発生機作の解明. 土肥誌. **60** : 391-398.
- 松丸恒夫 (2003). 窒素肥料有効利用のための施肥法, 農林水産技術研究ジャーナル. **26** : 15-20.
- 松中昭一 (1998). 第4章 農薬の効用 (経済性). 新農薬学 21世紀農業における農薬の新使命. pp.41-50. ソフトサイエンス社. 東京.
- McCall, P. J., Swann, R. L., Laskowski, D. A., Unger, S. M., Vrona, S. A. and Dishburger, H. J. (1980). Estimation of chemical mobility in soil from liquid chromatographic retention. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* **24** : 190-195.
- 陽 捷行・大西 将・福士定雄 (1983). 土壌中の硝酸化成の過程で発生するN₂O. 土肥誌. **54** : 277-280.
- 宮本史明 (1997). コカブ (秋どり栽培). 最新野菜ハンドブック. 最新野菜ハンドブック編集委員会編.

- pp.342-343. 千葉県農業改良協会. 千葉.
- 森田明雄・太田 充 (2001). 小型反射式光度計システムによるチャのシュウ酸の簡易測定法. 土肥誌. 72 : 274-276.
- 森次益三・河崎利夫 (1981). 作物生育ならびに無機養分吸収に及ぼす窒素源の影響 2. 窒素限定供給栽培法の場合. 土肥誌 52 : 20-26.
- Motonaga, K., Takagi, K. and Matsumoto, S. (1998). Suppression of chlorothalonil degradation in soil after repeated application. Environ. Toxicol. Chem. 17 : 1469-1472.
- 元永 圭・高木和広・松本 聡 (2001). 殺菌剤TPNおよび代謝物の農薬連用圃場における垂直分布. 土肥誌. 72 : 432-434.
- 中村幸二 (1993). 農耕地の土壌・水圏環境における農薬の動態に関する研究. 埼玉農試研報. 46 : 1-124.
- 日本植物防疫協会編 (2005). 農薬の生産, 出荷, 農薬要覧-2005-. 農林水産省消費・安全局農産安全管理課・植物防疫課監修. pp.3-204. 日本植物防疫協会. 東京.
- 農林水産省・環境省 (2003). 農林水産省・環境省令第5号.
- 農林水産省生産局 (2002). 農薬に含まれるダイオキシン類の調査結果について.
- 奴田原誠克・市原 勝 (1990). 土壌中における農薬の残留性と縦移動. 高知農林研報. 22 : 17-24.
- 荻山和裕・角田 泰・田中 薫・高橋義行・藤田俊一・小林裕子・杉山 浩 (2002). 畑圃場における農薬鉛直浸透評価法としての土壌コア試験. 農薬誌 27 : 24-30.
- レイチェル・カーソン (1989). 沈黙の春, 青樹築一訳. 309pp. 新潮社. 東京.
- 佐久間敏雄・飯塚文男・岡島秀夫 (1976). 畑土壌における水分と無機塩類の挙動 (第2報) イオン交換をともなう流出過程の検討. 土肥誌. 47 : 470-476.
- 佐藤 匡 (1994). 第12章 農薬と土壌の微生物. 土の微生物. 微生物研究会編. pp.389-419. 博友社. 東京.
- Somasundaram L., Coats J. R. and Racke K. D. (1991). Mobility of pesticides and their hydrolysis metabolites in soil. Environ. Toxicol. Chem. 10 : 185-194.
- 孫 鉄珩・橋本知義・和田秀徳・高井康雄 (1985). 各種有機質資材の投与が農薬連用土壌の微生物相および活性に及ぼす影響. 土肥誌. 56 : 31-36.
- 鈴木直治 (1979). IV-3.2 殺菌剤. 農薬—デザインと開発指針—. 山本 出・深見順一編. pp.929-977. ソフトサイエンス社. 東京.
- Suzuki, S. (2000). Leaching of several pesticides in andosol upland field under natural rain conditions. J. Pesticide Sci. 25 : 1-9.
- Takagi, K., Wada, H., Yamazaki, S. (1991). Effect of longterm application of a fungicide, chlorothalonil (TPN) on upland ecosystem. Soil Sci. Plant Nutr.. 37 : 583-590.
- 高木和広 (1991). 農薬の長期連用が土壌生態系に及ぼす影響とその変動解析. 学位請求論文. 東京大学大学院農学研究科. 1-136.
- 高木和広・渡辺裕純・石坂眞澄 (2001). 二重構造大型ライシメーターを用いた黒ボク畑土壌での酸アミド系除草剤の降下浸透実態調査. 日本農薬学会第26回大会講演要旨集. 130.
- 建部雅子・米山忠克 (1995). 作物栄養診断のための小型反射式光度計システムによる硝酸および還元型アスコルビン酸の簡易測定法. 土肥誌. 66 : 155-158.
- 建部雅子 (1999). 窒素栄養の制御による作物品質成分の改善に関する研究. 農研センター研報. 31:19-83.
- 田中福代・金 太恒・米山忠克 (2000). ガスクロマトグラフ—燃焼—同位対比質量分析計によるハウレンソウ中のシュウ酸の炭素同位体組成分析法. 日本農芸化学会誌 74 : 3-5.
- 谷川元一・西村憲三 (1999). 水田に散布した除草剤の水および土壌中の濃度推移. 奈良農試研報. 30 : 17-22.
- 田瀬則雄・佐伯明義・伏脇裕一 (1989). 浅間山北麓における殺菌剤PCNBによる地下水汚染. 地下水学会誌. 31 : 31-37.
- 田代 豊・谷山鉄郎 (1996). 集約的農業地域・奄美群島沖永良部島における地下水への農薬混入. 日作紀. 65 : 77-86.
- 程 為国・中島泰弘 (2005). 4-II 窒素負荷の同位体利用. 続・環境負荷を予測する. 波多野隆介・犬伏和之編. pp.172-186. 博友社. 東京.
- シーア コルボーン・ダイアン ダマノスキ・ジョン ピーターソン マイヤーズ (1998). 奪われし未来. 長尾 力訳. 364pp. 翔泳社. 東京.
- Tu, C. M. (1970). Effect of four organophosphorus insecticides on microbial activities in soil. Appl. Microbiol. 19 : 479-484.
- Tu, C. M. (1993). Effect of fungicides, captafol and chlorothalonil, on microbial and enzymatic activities in mineral soil, J. Environ. Sci. Health. B28 : 67-80.
- 上杉康彦・有江 力・山口 勇・岡崎 博 (1995). 3. 殺菌剤. 植物病理学事典. 日本植物病理学会編. pp.

- 797-808. 養賢堂. 東京.
- 上杉康彦・上路雅子・腰岡政二編 (1997). 最新農薬データブック. pp.34-413. ソフトサイエンス社. 東京.
- 上路雅子, 小林裕子, 中村幸二編著 (2001). Chlorothalonil (TPN, ダコニール). 2002年版 残留農薬分析法. pp.112-113. ソフトサイエンス社. 東京.
- Vincent, P. G. and Sisler, H. D. (1968). Mechanism of antifungal action of 2,4,5,6-tetrachloro-isophthalonitrile. *Physiol. Plant.* **21** : 1249-1264.
- 渡辺 武・石川隆之・陽 捷行 (1999). 肥効調節型肥料および硝酸化成抑制剤入り肥料による亜酸化窒素の発生抑制効果. *土肥誌*. **70**. 747-753.
- Weber J. H. and Keller K. E. (1994). Mobility of Pesticides in Field Lysimeters. *Mechanisms of Pesticide Movement into Ground Water*. Ed. by Honeycutt, R. C. and Schabacker D. J. pp.43-62. CRC Press. inc.. Boca Raton.
- 山本幸洋・金子文宜・丸 論 (1997). パンライシメータ法による砂質露地畑における農薬鉛直浸透量の測定. *日本農薬学会第22回大会要旨集*. 105.
- 山本幸洋・金子文宜・尾崎保夫・高崎 強 (1998). 砂質露地畑における農薬鉛直浸透量のキャピラリーライシメータ法とパンライシメータ法による測定の比較. *日本農薬学会第23回大会要旨集*. 98.
- 山本幸洋 (1999a). 埋設型ライシメータによる農薬鉛直浸透量の測定. 畑地からの硝酸態窒素溶脱量のモニタリングに関する実務問題検討会. 109-111.
- 山本幸洋 (1999b). 水田からの農薬流出のモニタリング. 農工研特別セミナー「限りなき地球・・・次世代に残したいもの」. 48-51.
- 山本幸洋 (1999c). 埋設型ライシメータによる農薬鉛直浸透量の測定. *農薬環境科学研究*. **7** : 49-51.
- 山本幸洋・金子文宜 (2000). 砂質露地畑におけるパンライシメータ法による農薬鉛直浸透量の測定. *農薬誌*. **25** : 207-211.
- 山本幸洋・大塚英一・尾崎保夫・金子文宜・松丸恒夫 (2000). 土における埋設型ライシメータ集水部の壁高の検討. *日本土壌肥料学会関東支部大会講演要旨集*. 6.
- 山本幸洋・大塚英一・尾崎保夫・松丸恒夫 (2001). 自然降水条件下の黒ボク土における埋設型ライシメータ集水部壁高の検討とその集水特性. *日本土壌肥料学会関東支部大会講演要旨集*. 30.
- 山本幸洋・田中福代・藤原伸介・高木和広・松丸恒夫 (2002). 殺菌剤クロロタロニルによる土壌のアンモニア酸化能抑制作用. *日本農薬学会第27回大会要旨集*. 43.
- 山本幸洋・田中福代・藤原伸介・高木和広・松丸恒夫 (2003). 殺菌剤クロロタロニルによる土壌のアンモニア酸化能抑制作用(2) -抑制に関与する化学構造とアンモニア酸化細菌への影響-. *日本農薬学会第28回大会要旨集*. 116.
- 山本幸洋・田中福代・藤原伸介・松丸恒夫 (2004). 畑土壌中のクロロタロニル消失過程における炭素同位体分別. *農薬誌*. **29** : 53-56.
- 山本幸洋 (2004). 砂質露地畑における埋設型ライシメータ法を用いた農薬鉛直浸透量の測定. *植調*. **38** : 282-285.
- 山本幸洋・金子文宜・大塚英一・松丸恒夫 (2005). 砂質露地畑における牛ふん炭施用による農薬鉛直浸透抑制効果. *日本農薬学会第30回記念大会講演要旨集*. 64.
- 山本幸洋・藤原伸介・田中福代・高木和広・松丸恒夫 (2007). 殺菌剤クロロタロニルによる土壌中のアンモニア酸化阻害. *土肥誌*. **78** : 15-22.
- 米山伸吾・安東和彦・都築司幸 (1990). 殺菌剤. *農薬便覧*. 第10版. pp.2-395. 農文協. 東京.
- 米山忠克 (1987). 土壌-植物系における炭素, 窒素, 酸素, 水素, イオウの安定同位体自然存在比: 変異, 意味, 利用. *土肥誌*. **58** : 252-268.
- 米山忠克・笹川英夫 (1994). 土壌-植物系における炭素, 窒素, 酸素, 水素, イオウの安定同位体自然存在比: 1987年以降の研究の進歩. *土肥誌*. **65** : 585-598.
- 米山忠克 (1996). GC/C/MSによるナノモル量化合物の¹³C/¹²Cおよび¹⁵N/¹⁴Nの自然存在比のオンライン分析. *化学と生物*. **34** : 464-465.

Summary

The Behavior and Physiological Actions of the Fungicide Chlorothalonil in Upland Soil

Yukihiro YAMAMOTO

The present study was undertaken in order to clarify the behavior and physiological actions of chlorothalonil (tetrachloroisophthalonitrile, a major fungicide in Japan) in upland soil. In addition, the physico-chemical and physiological properties of chlorothalonil were compared with those of other chemicals as controls.

1. Measurement of chlorothalonil leaching using the pan lysimeter method on a sandy upland field

The extent of chlorothalonil leaching was measured by using the pan lysimeter method on a sandy upland field. A collecting pan (30×30 cm) in the lysimeter was installed into the soil profile horizontally at 50 cm below the soil surface. The total volume of leachate and its ratio to the total rainfall during the monitoring period (125 days) were 608.2 mm and 65 %, respectively. The test chemicals were chlorothalonil, simazine, diazinon, metolachlor, dimethoate and Cl^- as a tracer. Chlorothalonil, diazinon and metolachlor were not detected in the leachate. The maximum concentrations of dimethoate and simazine were 18.4 ppb and 1.0 ppb, respectively. During the monitoring period, the total mass of pesticide leaching and its ratio to the application rate for dimethoate were 2.99 mg/m² and 3.5 %, respectively. The corresponding values for simazine were 0.33 mg/m² and 0.4 %, respectively.

2. Carbon isotope fractionation during chlorothalonil dissipation in an upland soil

A change in the standing of the $\delta^{13}\text{C}$ value of a pesticide during its dissipation in an upland soil was investigated. Chlorothalonil as a test chemical was added to the soil (light-colored Andosol) and incubated at 30 °C in the dark. The $\delta^{13}\text{C}$ value of chlorothalonil in the soil increased from -26.5 to -22.5 ‰ during the incubation period of 70 days. The enrichment factor in this study was -2.6 ‰. These results suggest the occurrence of carbon isotope fractionation during the dissipation of chlorothalonil in the soil environment.

3. Inhibition of soil ammonia oxidation by a fungicide, chlorothalonil

We investigated the mechanisms by which soil ammonia oxidation is inhibited by chlorothalonil, as well as the degrees of inhibition. Chlorothalonil, thiram, triflumizole, tolclofos-methyl, iprodione, flutolanil, hexaconazole, isoprothiolane, benomyl, and metalaxyl (50 mg kg⁻¹) were applied to the soil (light-colored Andosol) in combination with ammonium sulfate (200 mg N kg⁻¹). Chlorothalonil and thiram strongly inhibited soil ammonia oxidation among the fungicides tested. The duration of the inhibition induced by chlorothalonil was longer than that induced by a nitrification inhibitor, dicyandiamide. The activity of the inhibition of soil ammonia oxidation by chlorothalonil depended on its application rate. The inhibitory activity of 4-hydroxy-2,5,6-trichloroisophthalonitrile (TPN-OH), a

major metabolite of chlorothalonil in upland soils, was lower than those of chlorothalonil and dicyandiamide. The activity of tetrachloroterephthalonitrile (TTPN), an isomer of chlorothalonil, was lower than that of chlorothalonil. Isophthalonitrile (IPN), terephthalonitrile (TePN), phthalonitrile (PN), benzonitrile (BN), and 1,2,3,5-tetrachlorobenzene (TCB) did not inhibit soil ammonia oxidation. Chlorothalonil (100 mg kg^{-1}) and chloramphenicol (500 mg kg^{-1}) were added to soil in which ammonium-oxidizing bacteria had been accumulated by repeated application of ammonium sulfate. Both chemicals inhibited soil ammonia oxidation. The number of ammonium-oxidizing bacteria in the chlorothalonil-treated soil decreased from 10^4 g^{-1} to 10^2 g^{-1} or less for 14 days, while the number of those in the chloramphenicol-treated soil was maintained at 10^4 g^{-1} for 21 days. These results suggest that chlorothalonil inhibits soil ammonia oxidation by acting on ammonium-oxidizing bacteria lethally, that both nitrile and chlorine in the structure of chlorothalonil are indispensable to its inhibitory action and that their arrangement in the molecules significantly affects chlorothalonil's activity.

5. Influence of chlorothalonil application on the growth and quality of crops

We investigated the effect of chlorothalonil on the growth and N uptake of turnip (*Brassica rapa* L.) and spinach (*Spinacia oleracea* L.). Furthermore, the effects of chlorothalonil on the concentrations of nitrate, oxalic acid and ascorbic acid in spinach were analyzed. These crops were cultivated with or without chlorothalonil application (4 g m^{-2}) in the soil (Gray lowland soil). To determine the difference in the fertilizer nitrogen absorption of the crops, ^{15}N -labeled ammonium sulfate (3.10 atom%, 10 g N m^{-2}) was used. The growth of the turnip was reduced by chlorothalonil application, and the reductions of plant length, fresh weight and fertilizer nitrogen absorption were 8.49, 23.8 and 22.1%, respectively. On the other hand, chlorothalonil application did not affect the growth of spinach, nor the concentrations of nitrate, water-soluble oxalic acid or ascorbic acid in spinach.