

寒天培地に添加した農薬の熱安定性および保存性

中西 充

キーワード：農薬，残留，寒天，薬剤抵抗性

Thermostability and longevity of pesticides added to nutrient agar

Mitsuru NAKANISHI

Key words: pesticide, residue, agar, pesticide resistance

摘 要

寒天培地を用いた農薬の害虫抵抗性および耐性菌検定を行う際の有益な情報として、寒天培地に添加した農薬の熱安定性および保存性を調査したところ、供試した41農薬のうち37農薬を評価できた。イプロジオン以外の36農薬（殺虫剤18農薬，殺菌剤18農薬）は、添加した寒天の熱による安定性は高かった。メチダチオン，ピフェナゼート，シエノピラフェン，クロラントラニリプロール，クレソキシムメチル，シアゾファミド，トリフルミゾールの7農薬は、加熱処理による安定性は低かった。以上より、29農薬（殺虫剤14農薬，殺菌剤15農薬）は熱安定性が高く、添加寒天培地の加熱処理が可能であると考えられた。また、37農薬中27農薬（殺虫剤12農薬，殺菌剤15農薬）は、寒天培地中の保存性が高く、少なくとも90日間暗所冷蔵保存が可能であると考えられた。

緒 言

農薬は、農作物の病害虫の防除に不可欠な資材である（浜²⁾，桜井⁸⁾）。一方、病害虫側の薬剤抵抗性の発達は、農薬による防除を行う際の重要な課題となっている。害

虫に関しては農薬感受性の低下，病害に関しては耐性菌出現により，薬剤効果減退の要因の一つとなる。したがって，抵抗性の発達の実態を早期に検定し，その結果に基づき適正な農薬による適切な防除を指導することが極めて重要である。

寒天を用いた薬剤抵抗性の検定方法として，病害に関しては，寒天平板希釈法（日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会⁸⁾），阻止円法（桜井¹⁰⁾）があり，害虫に関しては，本県で検討中の「微小害虫薬剤感受性簡易検定キット」（Aizawa et al.⁵⁾，中井ら⁶⁾）が，検定方法の有効な手段の一つとして注目されている。

寒天平板希釈法や阻止円法，微小害虫薬剤感受性簡易検定キットによる検定を行う際の注意点や新たな提案，キットの商品開発の基礎データを収集する目的で，農薬の熱に対する安定性や寒天培地中の保存性を調査した。

材料および方法

1. 供試農薬

殺虫剤21剤および殺菌剤20剤を供試し，表1に示した。供試農薬の標準品をアセトニトリルもしくはメタノールで溶解した。その後，メタノールで希釈した溶液を1 mL（希釈後の濃度は表1のとおり。添加濃度は，

LC-MS/MSの分析感度により決定した。), 50mLのガラス製遠沈管に分注した。分注後, ただちに, 調整した寒天(寒天15gに蒸留水500mLを加えて95℃ 15分高圧蒸気滅菌器(アルプ製CLS-32LDP型)で加熱し, 溶解させたもの)を約15g, 先の遠沈管に加えた。常温で静置し固体になったものを分析に供試した。

2. 分析方法

アセトニトリルを寒天培地の入ったガラス製遠沈管に25mL入れた後, ULTRA TURRAX T25 basic (IKA LABORTECHNIK製)を用いて5分間ホモジナイズした。次に, アセトニトリル10mLで洗いこみ, 遠沈管のふたをして, 上下に振とうし, アドバンテック製ろ紙NO.3を, 桐山ロートに敷いて吸引ろ過した。さらに, アセトニトリル25mLを加えて, ホモジナイズし, 同様の振とう操作を行い, ろ過した。すべてのろ液をまとめて減圧濃縮し, 窒素ガスで乾固した後, メタノール10mL加えて超音波処理し, その後, 蒸留水10mL加えて超音波処理して残留物を溶解した。シリンジフィルターでろ過した後, LC-MS/MS(島津製作所製LCMS-8030)に注入し, 絶対検量線法で, 定性・定量を行った。

試料の分析前に, 調整した寒天培地を暗所5℃で冷蔵保存したものに, 供試農薬を添加した後, 無添加の試料と共に前述の分析を行い, 回収率と回収率の変動係数を算出し, 添加回収試験結果(表2)にまとめ, 分析方法の妥当性の確認を行った。

3. 寒天培地中の農薬の熱安定性および保存性の評価

分析は, 処理当日, 7日後, 15日後, 30日後, 60日後, 90日後に行った。処理7日後以降の試料は, 分析まで5℃の暗所で保存した。併せて, 処理当日の試料を, さらに95℃ 15分間高圧蒸気滅菌器で加熱し, 放冷後, 直ちに分析した。全て3連で行なった。前述した分析方法で, 供試農薬の残留量を求めた後, 添加量に対する回収率を算出することで, 供試農薬の寒天培地中の熱安定性および保存性を評価した。

結果および考察

1. 分析方法の妥当性の確認

回収率が70%未満の農薬は, クロルピリホス, ルフェスロン, ププロフェジン, シフルメトフェン, フルベンジアミド, トルクロホスメチル, ミクロブタニルの7農薬だった。この他の34農薬は, 良好な結果であった(表2)。また, ルフェスロン, フルベンジアミドおよび

ミクロブタニルの3農薬は, 寒天培地に添加した当日の回収率が70%を超えていた。添加回収試験とは, 農薬を添加するタイミング以外は全て同じであり, 寒天培地に添加した農薬を分析する方法としては充分であると考えられた。以上より, 37農薬を対象に寒天培地中の農薬安定性および保存性の評価を行った。

2. 寒天培地中の熱安定性の評価

添加当日の回収率が70%を下回った農薬は, イプロジオンのみだった。供試農薬は, 全て, 熱に対して安定とされており(表1), イプロジオン以外の農薬は, 添加した寒天の熱により分解されておらず, 想定通りの結果だと考えられた。イプロジオンも熱に対して安定とされており, 分析方法が妥当ではない可能性はある。次に, 95℃ 15分間高圧蒸気滅菌器で加熱後の回収率が70%を下回った農薬は, メチダチオン, ピフェナゼート, シエノピラフェン, クロラントラニリプロール, クレソキシムメチル, シアゾファミド, トリフルミゾールの7農薬であった。熱に安定ではあるものの, 今回の条件では分解が促進されたと考えられた(表2)。市販の防除薬剤を用いた際の結果とは異なる可能性はあるものの, これら以外の29農薬(殺虫剤14農薬, 殺菌剤15農薬)は, 寒天添加や加熱により分解されないの, 農薬を含む寒天培地を, 検定に供試する前に加熱処理することが可能と考えられた。

3. 寒天培地中の保存性の評価

寒天添加により直ちに分解したと思われるイプロジオンと分析データを取得できなかったミクロブタニルの2農薬は, 評価対象外とした。添加7日後に回収率が70%を下回った農薬は, ルフェスロン, ピフェナゼートの2農薬だった。これら2農薬は寒天中の安定性が低く, 寒天添加後に直ちに抵抗性検定に用いる必要があると考えられた。添加15日後に回収率が70%を下回った農薬はなかった。添加30日後に回収率が70%を下回った農薬は, フルフェノクスロン, シエノピラフェンの2農薬だった。添加60日後に回収率が70%を下回った農薬は, トリフルミゾールだった。添加90日後に回収率が70%を下回った農薬は, メチダチオン, エトフェンブロックス, エトキサゾールの3農薬だった。市販の防除薬剤を用いた際の結果とは異なる可能性はあるものの, これらの農薬は, 回収率70%を下回らない期間の暗所冷蔵保存は可能であり, それ以外の27農薬(殺虫剤12農薬, 殺菌剤15農薬)は, 90日間の暗所冷蔵保存が可能だと考えられた(表2)。

表－１ 供試対象農薬

対象成分	殺虫 殺菌	作用 機構 分類 ¹⁾	RAC ²⁾ コード	添加 濃度 (ppm)	熱安定性 ³⁾
DMTP（メチダチオン）	殺虫	1	1B	0.1	150℃まで安定
クロルピリホス	殺虫	1	1B	0.5	180℃以上で分解
マラソン（マラチオン）	殺虫	1	1B	0.1	約210℃付近から分解
エトフェンブロックス	殺虫	3	3A	0.5	25～150℃の範囲で安定
アセタミプリド	殺虫	4	4A	0.1	200℃以上で分解
イミダクロプリド	殺虫	4	4A	0.5	200℃以上で分解
クロチアニジン	殺虫	4	4A	0.5	150℃以下で安定
ジノテフラン	殺虫	4	4A	0.5	安定（150℃）
チアクロプリド	殺虫	4	4A	0.1	安定
チアメトキサム	殺虫	4	4A	0.5	150℃まで安定
エトキサゾール	殺虫	10	10B	0.1	255℃で蒸発
フルフェノクスロン	殺虫	15	15	0.1	約170℃で分解
ルフェスロン	殺虫	15	15	10.0	150℃まで安定
ブプロフェジン	殺虫	16	16	0.1	安定（20～250℃）
ビフェナゼート	殺虫	20	20D	0.1	安定（230℃付近から分解および蒸発開始）
トルフェンピラド	殺虫	21	21A	0.1	安定
ピリダベン	殺虫	21	21A	0.1	室温で安定、200℃付近で分解
シエノピラフェン	殺虫	25	25A	0.1	274℃以下で安定
シフルメトフェン	殺虫	25	25A	0.5	室温～293℃で安定
クロラントラニリプロール	殺虫	28	28	0.5	330℃まで安定
フルベンジアミド	殺虫	28	28	1.0	255℃まで安定
メトラキシルM	殺菌	A1	4	0.1	150℃付近まで安定
ジエトフェンカルブ	殺菌	B2	10	0.1	150℃まで安定
ペンチオピラド	殺菌	C2	7	0.1	安定（室温～300℃）、300℃以上は測定困難
ボスカリド	殺菌	C2	7	0.5	約300℃で分解
アゾキシストロビン	殺菌	C3	11	0.1	150℃で安定
クレソキシムメチル	殺菌	C3	11	0.5	約310℃で分解
ピラクロストロビン	殺菌	C3	11	0.1	約200℃で分解
シアゾファミド	殺菌	C4	21	0.1	25～150℃で安定
メパニピリム	殺菌	D1	9	0.5	180℃まで安定
フルジオキシニル	殺菌	E2	12	1.0	室温から150℃まで安定
イブロジオン	殺菌	E2	2	10.0	164.5℃で分解
トルクロホスメチル	殺菌	F3	14	10.0	117℃から分解（空气中）
ジフェノコナゾール	殺菌	G1	3	0.1	約150℃以下で安定
テブコナゾール	殺菌	G1	3	0.1	安定、350℃以上で分解
トリフルミゾール	殺菌	G1	3	0.1	150℃まで安定
ミクロブタニル	殺菌	G1	3	1.0	150℃まで安定
フェンヘキサミド	殺菌	G3	17	0.5	230℃以上で発熱分解
フェノキサニル	殺菌	I2	16.2	1.0	263.4℃で分解
シフルフェナミド	殺菌	U	6	0.1	室温から300℃までの範囲で分解や化学変化による発熱は確認されず安定
フルチアニル	殺菌	U	13	0.1	280℃まで安定、280℃付近から気化

1) 殺虫剤はIRAC作用機構分類体系第10.3版⁴⁾の主要グループを、殺菌剤はFRAC作用機構分類一覧表2022¹⁾の標的部位コードを記載した。

2) 殺虫剤はIRAC作用機構分類体系第10.3版⁴⁾のサブグループを、殺菌剤はFRAC作用機構分類一覧表2022¹⁾のFRACコードを記載した。

3) 農業ハンドブック2021⁷⁾の物理化学的性状のうち、安定性の項から転記した。

表－２ 寒天培地に添加した農薬の熱安定性および保存性

対象成分	項目	添加回収 ¹⁾ 試験結果	熱安定性 ²⁾	保存性					
				添加 当日	添加 7日後	添加 15日後	添加 30日後	添加 60日後	添加 90日後
DMTP（メチダチオン）	平均値	98%	3%	102%	89%	92%	97%	83%	66%
	変動係数	6.0%	19.2%	2.9%	6.2%	12.1%	8.0%	12.3%	6.6%
マラソン（マラチオン）	平均値	102%	103%	101%	101%	92%	97%	101%	82%
	変動係数	3.4%	2.9%	3.6%	0.6%	9.8%	5.1%	4.3%	8.7%
エトフェンブロックス	平均値	100%	93%	98%	95%	89%	84%	86%	67%
	変動係数	3.6%	8.1%	2.1%	4.6%	14.0%	6.6%	5.5%	8.2%
アセタミプリド	平均値	99%	97%	98%	100%	95%	96%	100%	81%
	変動係数	3.2%	3.6%	4.4%	1.5%	9.6%	3.7%	5.5%	6.1%
イミダクロプリド	平均値	107%	99%	100%	107%	107%	108%	100%	108%
	変動係数	1.9%	2.0%	2.0%	2.4%	9.4%	4.2%	4.6%	12.0%
クロチアニジン	平均値	109%	87%	93%	95%	94%	85%	91%	89%
	変動係数	2.9%	3.5%	1.6%	3.4%	8.0%	6.6%	1.7%	8.8%
ジノテフラン	平均値	105%	96%	98%	100%	94%	81%	107%	87%
	変動係数	2.2%	2.6%	1.2%	3.8%	11.8%	5.6%	6.1%	8.0%
チアクロプリド	平均値	99%	101%	100%	96%	97%	101%	96%	81%
	変動係数	7.7%	4.3%	5.5%	1.2%	7.2%	6.5%	3.9%	9.6%
チアメトキサム	平均値	109%	84%	96%	103%	97%	85%	97%	89%
	変動係数	1.1%	2.4%	1.0%	4.4%	10.9%	7.2%	3.7%	9.4%
エトキサゾール	平均値	94%	80%	98%	96%	88%	79%	81%	57%
	変動係数	1.6%	5.6%	1.2%	5.8%	13.7%	6.5%	1.9%	13.7%
フルフェノクスロン	平均値	84%	28%	71%	83%	89%	38%	62%	61%
	変動係数	26.3%	12.4%	8.3%	6.6%	6.3%	22.4%	30.4%	20.6%
ルフエヌロン	平均値		4%	70%	64%	79%	36%	60%	59%
	変動係数		80.4%	20.4%	5.4%	18.3%	45.8%	21.8%	30.5%
ブプロフェジン	平均値	67%	54%	65%	66%	56%	49%	63%	62%
	変動係数	10.8%	5.6%	4.9%	2.6%	23.6%	11.4%	10.6%	9.8%
ビフェナゼート	平均値	84%	27%	100%	17%	19%	0%	5%	8%
	変動係数	0.7%	16.1%	3.0%	15.6%	8.0%		34.6%	33.1%
トルフェンピラド	平均値	100%	95%	92%	104%	88%	89%	98%	86%
	変動係数	4.5%	7.4%	7.6%	2.8%	12.3%	11.3%	1.6%	6.7%
ピリダベン	平均値	96%	89%	96%	96%	89%	97%	99%	74%
	変動係数	3.7%	6.5%	5.3%	7.3%	3.4%	6.8%	3.8%	3.6%
シエノピラフェン	平均値	98%	47%	95%	76%	77%	51%	37%	18%
	変動係数	3.1%	3.7%	10.4%	10.5%	14.3%	11.8%	16.5%	41.7%
クロラントラニリプロール	平均値	105%	50%	103%	102%	86%	84%	93%	81%
	変動係数	4.2%	3.1%	3.5%	3.4%	2.7%	1.2%	3.9%	10.5%
メタラキシルM	平均値	94%	99%	96%	94%	99%	103%	98%	80%
	変動係数	1.6%	5.6%	1.6%	2.8%	6.9%	10.9%	0.6%	9.0%
ジエトフェンカルブ	平均値	104%	102%	101%	102%	91%	104%	97%	76%
	変動係数	4.4%	2.5%	0.6%	6.0%	7.8%	6.7%	3.6%	7.3%
ベンチオピラド	平均値	102%	94%	97%	97%	99%	98%	99%	75%
	変動係数	4.8%	1.8%	4.2%	5.4%	11.1%	7.7%	5.6%	6.7%
ボスカリド	平均値	95%	98%	97%	98%	92%	84%	94%	82%
	変動係数	7.6%	5.1%	4.9%	9.7%	10.9%	6.9%	1.6%	9.9%
アゾキシストロビン	平均値	105%	99%	100%	100%	94%	111%	101%	82%
	変動係数	5.0%	5.2%	3.0%	1.5%	6.4%	11.2%	2.9%	5.3%
クレソキシムメチル	平均値	94%	40%	101%	92%	93%	86%	89%	71%
	変動係数	8.9%	5.0%	3.2%	2.7%	9.9%	6.5%	6.2%	13.6%
ピラクロストロビン	平均値	95%	95%	95%	98%	86%	95%	94%	78%
	変動係数	4.7%	5.0%	9.1%	1.0%	6.4%	9.6%	6.5%	10.5%
シアゾファミド	平均値	89%	0%	108%	96%	104%	106%	115%	113%
	変動係数	7.9%		5.1%	1.6%	8.9%	13.4%	6.6%	9.9%
メバニピリム	平均値	100%	100%	99%	98%	98%	88%	93%	80%
	変動係数	2.1%	4.0%	0.6%	1.8%	11.2%	6.9%	3.3%	7.6%
フルジオキシニル	平均値	111%	107%	105%	105%	111%	95%	96%	71%
	変動係数	6.4%	5.4%	3.1%	9.4%	12.4%	20.9%	4.7%	2.2%
イプロジオン	平均値	80%	4%	59%	53%	0%	40%	35%	26%
	変動係数	14.1%	14.4%	23.0%	13.9%		8.0%	17.8%	55.0%
ジフェノコナゾール	平均値	85%	92%	100%	79%	89%	85%	94%	71%
	変動係数	3.4%	5.0%	9.6%	3.3%	15.7%	19.4%	6.8%	7.8%
テブコナゾール	平均値	113%	96%	93%	112%	95%	92%	92%	80%
	変動係数	8.0%	6.9%	5.4%	6.3%	14.9%	1.7%	4.4%	9.5%
トリフルミゾール	平均値	88%	49%	96%	84%	86%	72%	68%	47%
	変動係数	10.1%	7.4%	4.8%	4.3%	18.3%	3.5%	4.4%	6.8%
ミクロブタニル	平均値		88%	87%					
	変動係数		13.5%	21.5%					
フェンヘキサミド	平均値	99%	97%	97%	101%	104%	93%	89%	77%
	変動係数	4.4%	5.3%	3.6%	3.5%	11.9%	5.9%	2.3%	6.5%
フェノキサニル	平均値	105%	99%	98%	95%	95%	93%	98%	84%
	変動係数	4.4%	4.6%	2.9%	4.4%	6.3%	4.5%	3.1%	11.7%
シフルフェナミド	平均値	83%	82%	82%	78%	83%	83%	81%	73%
	変動係数	10.3%	10.7%	9.5%	3.4%	13.3%	9.9%	9.3%	11.2%
フルチアニル	平均値	96%	105%	100%	97%	102%	100%	99%	79%
	変動係数	13.3%	5.9%	8.5%	9.5%	4.5%	8.1%	9.1%	7.4%

1) 調整した寒天培地を暗所5℃で冷蔵保存したものに、供試農薬を添加した後、分析した結果。

2) 処理当日の試料を95℃ 15分間高圧蒸気滅菌器で加熱し、放冷後、直ちに分析した添加農薬の回収率を示す。

3) 空白は、データを取得できなかったもの。

引用文献

- 1) Fungicide Resistance Action Committee (2022) :
FRAC作用機構分類一覧表2022：交叉耐性パターンと
作用機構で分類された殺菌剤（FRACグループの分類
含む）.
- 2) 浜弘司（1996）：農業害虫：連載にあたって. 植物
防疫. 50（7）. 297-298.
- 3) 浜弘司（1996）：農業害虫：薬剤感受検定法の基礎.
植物防疫. 50（8）. 343-345.
- 4) IRAC International作用機構作業部会（2022）：
IRAC作用機構分類体系.
- 5) Misato Aizawa・Kiyohiro Nakai・Takeo
Watanabe・Akemi Kumano・Kumie Tamagaki・
Shoji Sonoda（2018）：A simple method of
monitoring for cypermethrin resistance in *Thrips
tabaci* (Thysanoptera: Thripidae) using agar-coated
glass pipettes. Applied Entomology and Zoology. 53.
165-170.
- 6) 中井清裕・相澤美里・森充隆（2019）：吸虫管を用
いたアザミウマ類における簡易薬剤感受性検定手法の
開発－薬剤感受性検定容器の保存性の検討につい
て－. 香農試研報. 70. 59-63.
- 7) 日本植物防疫協会（2021）：農薬ハンドブック2021.
- 8) 日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会（2009）：植
物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル.
- 9) 農業害虫の薬剤感受性検定マニュアル編集委員会
（2013）：農業害虫の薬剤感受性検定マニュアル.
- 10) 桜井寿（1977）：植物病原菌における薬剤耐性菌の
検定法とその疫学. 日農誌. 2. 177-186.