

微生物法による土壌微量元素の検定：第一報. *Aspergillus niger* による土壌中の可給態銅の定量

平井, 敬蔵
九州大学農学部植物栄養学教室

甲斐, 秀昭
九州大学農学部植物栄養学教室

<https://doi.org/10.15017/21393>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 15 (4), pp.447-455, 1956-03. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

微生物法による土壤微量元素の検定*

第一報. *Aspergillus niger* による土壤中の可給態銅の定量

平井敬藏・甲斐秀昭

Studies on trace elements in soils by
microbiological method. (Part 1)

Determination of available copper in soils
by *Aspergillus niger* method

Keizo Hirai and Hideaki Kai

土壤中の微量元素の欠乏問題は、最近著しく注目をあびるに到つたが、そのものの検索定量等については化学的方法、物理化学的方法と種々提唱されている。

一方、高等植物について必須である微量元素は恐らく下等植物、少くとも菌類の生育にも同等に必須であるとも考えられる。しかも一般に菌類の重金属に対する反応は化学的或は物理的反應よりも遙かに鋭敏である事¹⁾もあげられている。

よつて菌の特徴ある生活現象と重金属との間の関係を明かにし、逆にそれを利用して Bioassay で土壤中の微量元素を検索定量する事が容易に、且つ結果に於ても或程度の正確を期し得るであろうと思われるので研究を始めた。

Asp. niger による土壤中の植物養分の Bioassay は Butkewitsch (1909)²⁾ に依つて提案せられ、Koszeleskii (1909)³⁾ をはじめ数氏⁴⁾⁵⁾⁶⁾ は有効態磷酸・加里及び苦土の定量を試みた。Mulder (1938)⁷⁾ は Niklas 法を改良して土壤中の可給態銅及び苦土の定量を行い、其の後 Edson, Smith (1949)⁸⁾ 等⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾ は Cu, Zn, Mn, Fe 及び Mo に關する報告を出している。

著者等はこれ等の報告を参考として下記の如き方法により *Asp. niger* を利用して可給態銅の定量に就て行つた結果を第一報としてここに報告する。

I. 定 量 法

(A) *Asp. niger* 法

1) 使用菌株

九大農学部構内数ヶ所より採取した土壤から Waksman, Fred の synthetic acid medium¹³⁾ を使用し純粋分離した *Asp. niger* sp. の7株の中で、*Asp. niger* I 及び *Asp. niger* II が後述の方法で培養した場合に存在する Cu 量とその胞子の着色度との相関が最も良好である事を認めた。試験には *Asp. niger* I を使用菌株として選択した。

使用菌株は純粋性を保つ事に注意しつつ、Czapeck の synthetic solution agar に培養、冷蔵保存し、2月毎に植継ぎを行つた。

* 文部省科学研究助成補助金による研究の一部である。明記して厚く謝意を表する。

2) 器具の洗滌と殺菌

硝子器具よりの重金属の溶出、或は逆に硝子面による吸着に対しては充分注意し、使用するテックス硝子及び硬質硝子器具はすべて一昼夜王水に浸漬した後、硝子器具による再蒸溜水で洗滌し、乾燥後 10 lb. 15 分間 autoclave, 又は 150°C 20 分間乾熱して殺菌を行つた。

3) 培養液の調製

第一表の如き組成の培養液を使用した。

Table 1. Composition of Culture Solution.

Basal medium			Trace metals	
Sucrose	(C. P.)	50.0g	Fe	320 γ (as FeSO ₄ ·7H ₂ O)
KNO ₃	(A. R.)	5.0	Zn	250 (as ZnSO ₄ ·7H ₂ O)
K ₂ HPO ₄	(C. P.)	2.5	Mn	8 (as MnSO ₄ ·4H ₂ O)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	(A. R.)	0.75	Mo	3.2 (as (NH ₄) ₂ MoO ₄)
Twice distilled water		1000cc		

培養液の純化に関しては再結晶法、吸着法、⁽¹¹⁾⁽¹²⁾ 硫化物として沈澱させる方法、⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾ オキシソ法、⁽¹⁵⁾ イオン交換樹脂法⁽¹⁶⁾ や電解法等と種々の方法があるが、本研究では再結晶法と吸着法とを併用した。即ちクロマトグラフ用活性アルミナ及び炭酸石灰の種々の量を使用して検討した所 15g/l アルミナ或は 5 g/l 炭酸石灰の場合に良好な結果が得られた。従つてアルミナ 15 g/l を使用し 10 lb., 20 分間 autoclave し一夜放置後 Porosity No. 4 の glass filter で濾過して純化した Basal medium を再蒸溜塩酸にて pH 7 に調整し、之に再結晶製した微量要素の塩類を加えて培養液を調製した。

4) 接種及び培養

内径3寸のシャーレに 25cc 宛の培養液を加え、硫酸銅液で Cu の 0, 0.025, 0.05, 0.10, 0.30, 0.50, 1.0, 2.0 及び 3.0 γ /25cc medium の Cu standard series を作る。一方土壤試料は風乾後孔径 0.5mm の篩を通過した部分から一定量を秤量してシャーレに入れ 10 lb. 15 分間 autoclave にて殺菌し、之に 25cc 宛の同じ培養液を加える。

保存培養から接種用培養に移植し 30°C で 5 日間培養した後、滅菌再蒸溜水にて作成せる Spore suspension (約 5×10^6 spore/cc) 3 滴を接種し、30°C の恒温器中で 7 日間培養する。Standard series と含土壤培養液における *Asp. niger* の発育とを比較して銅量をきめる。(詳細後述)

(B) 化学的定量法

1) 土壤中の可給態銅の定量法

Hibbard 法⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾ に従い、風乾土壤 5g に 200cc の溶剤 (0.05 N KCl, 醋酸を含み pH 3.2) を加えて密栓しよく振盪したる後一夜放置し、サイフォンにて上澄液を採り残渣には再び同量の溶剤を加えて同様に浸出を行い、両者を合し之を可給態銅の浸出液とする。

2) 土壤中の全銅の定量法

Bogg, Alben 法¹⁷⁾に従い風乾土壌 1 g を採り 4 g のピロ硫酸加里を加えて熔融し、冷却後塩酸 (100cc の水に HCl 10 cc を添加) 30 cc を加え温浴上で加熱して熔融物を溶した後、100 cc メスフラスコに濾過し、上記塩酸を用いて洗滌し一定容にする。

3) 土壌中の水溶性銅の定量法

風乾土壌 10 g を採り再蒸留水を用いて可給態銅の浸出の場合と同様に 200 cc 宛にて 2 回繰返し浸出し、両者を合して水溶性銅の浸出液とする。

之等浸出液中の銅の定量は、主として Sandell 法¹⁸⁾に従い、一部森田¹⁹⁾ 志波氏²⁰⁾ 等の方法を加味して行つた。即ち浸出液に 10% クエン酸ソーダ 4 cc を加え、NH₄OH で pH 約 8.5 に調節した後、0.01% 四塩化炭素・ヂチゾン液 5 cc 宛を用い四塩化炭素層が緑色を失わない迄数回にわたり抽出する。抽出液は全部を合し之に HCl (1:1000) 10cc を加えて振盪、この操作を 2 回反覆して Zn 及び Pb を HCl の方に移行させて除き、四塩化炭素・ヂチゾン液に pH 3.0 の醋酸塩緩衝液 10cc と数滴の稀薄臭素水を加えて振盪し Copper dithizonate を分解して銅を醋酸塩系液中に遊離せしめる。この操作も 2 回反覆した後、0.001% 四塩化炭素・ヂチゾン液を用い混合色法により銅量を求めた。

II. 実験結果及び考察

1) *Asp. niger* 法の測定法

Asp. niger の銅に対する response の測定法として次の四つの方法について検討してみた。

a) 培養液の pH の変化 (pH of Culture Solution)

培養終了直後の培養液の pH を測定した結果は第二表に示す如く、培養中に培養液の pH は著しく低下はするが、Cu 濃度の変化に対応する差はなく、測定法として培養液の pH による方法は用いられない。

Table 2. Comparison of pH of Culture Solution, Mycelial Weight, Degree of Sporulation and Spore Colour of *Asp. niger* Cultures in Response to Copper Added. (average of seven cultures)

Cu added (μ /25cc)	pH of culture solution	Mycelial weight (mg)	Degree of sporulation **	Spore Colour ***
—all*	3.47	12.3	0.5	1
0	2.86	162.1	2	1.5
0.025	2.96	235.1	3	2
0.05	2.90	295.4	3.5	3
0.10	2.99	385.1	4	4
0.50	3.20	304.9	5	5
1.0	3.16	275.3	5.5	6
2.0	3.22	262.3	7	7
3.0	3.18	228.4	5	7

* Without all heavy metals

** Sporulation code: 0=none, 7=maximum

*** Colour code: 1 ← 2 — 3 — 4 — 5 — 6 — 7

white, yellow, tan, brown, dark brownish black,
brown, black,

b) 菌体乾燥重量 (Mycelial Weight)

生成した菌体を Porosity No. 3 の glass filter に濾別し蒸留水にて丁寧に洗滌したる後、70°C で 10 時間、その後 103~105°C で 2 時間乾燥したものを秤量する。此の場合には第二表及び第一図に見る如く Cu の低濃度では Cu 濃度の増加に比例して直線的関係を示して菌体量も増加するが、それ以上の濃度になると両者の間には比例的関係がなくなり、且つ 0.1 γ /25cc の場合を最高としてそれ以上の濃度では却つて菌体量は減少して行く事が判る。

c) 分生芽胞着生度 (Degree of Sporulation) 便宜上 non sporulation=0; maximum sporulation=7 としてこの間 7 階段にわけた Sporulation code で記録した。(図版 11 参照)

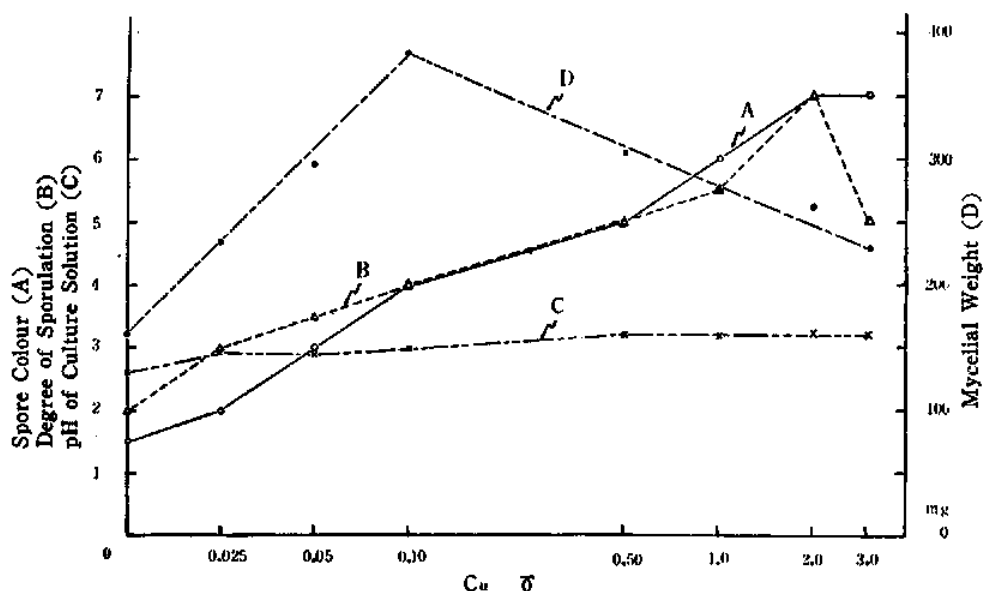


Fig. 1. Spore Colour, Degree of Sporulation, Mycelial Weight and pH of Culture Solution (at harvest) of *Asp. niger*-Cu Standard Cultures.

d) 胞子の色調 (Spore Colour)

便宜上 white=1, yellow=2, tan=3, brown=4, dark brown=5, brownish black=6, black=7 とした Colour code で表示した。

第二表及び第一図に見る如く、分生芽胞着生度は存在 Cu 量に対してかなり明確な相関関係を示すが、就中胞子の色調は white から black の間にわたり存在 Cu 量との相関が最も明確で且つ安定である事が認められた。

従つて各試料につき培養した *Asp. niger* の孢子の色調を Cu standard series のそれと比較する事により、土壤中の可給態銅の定量が可能である事を確めた。尙この場合孢子着生度も勘案するならば更に好都合であると思われる。

2) *Asp. niger*-spore colour-method による土壤中の可給態銅の定量

a) この定量法の再現性については、3点の土壤につき夫々 0.5, 0.25, 0.10, 0.075, 0.05 g/25cc の5つの段階の4ヶ宛定量した結果は第三表にみる如く、

Table 3. Reproducibility of Copper Determination by *Asp. niger*-Spore Colour-Method.

Soil Number	Soil taken (g/dish)	Cu determined									
		r per dish				r per g soil				Average	
		1	2	3	4	1	2	3	4		
1	0.05	0.4	0.4	0.4	0.4	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	7.8±0.15
	0.075	0.5	0.6	0.6	0.6	6.7	8.0	8.0	8.0	7.7	
	0.10	0.7	0.8	0.8	0.8	7.0	8.0	8.0	8.0	7.8	
	0.25	1.8	1.8	1.8	1.8	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	
	0.50	>2	>2	>2	>2	>4	>4	>4	>4	>4	
2	0.05	0.2	0.2	0.2	0.2	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0±0
	0.075	0.3	0.3	0.3	0.3	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	
	0.10	0.4	0.4	0.4	0.4	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	
	0.25	0.9	0.9	0.9	0.9	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	
	0.50	1.8	1.9	1.8	1.7	3.6	3.8	3.6	3.4	3.6	
3	0.05	0.5	0.5	0.5	0.5	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.3±0.35
	0.075	0.8	0.8	0.8	0.8	10.7	10.7	10.7	10.7	10.7	
	0.10	1.0	1.0	1.0	1.1	10.0	10.0	10.0	11.0	10.3	
	0.25	>2	>2	>2	>2	>8	>8	>8	>8	>8	
	0.50	>2	>2	>2	>2	>4	>4	>4	>4	>4	

一般に Bioassay に於ては±5~10%の偏差は止むを得ないものとされている様であるが、²¹⁾²²⁾この場合 *Asp. niger* による土壤中の可給態銅の定量も亦ビタミン及びアミノ酸の Bioassay と同じ程度の正確は期し得られるのではなからうかと思われる。

b) sample の使用量については 第三及び第4表に示される如く、0.25g/25cc 以上の場合には scale out する場合もかなりある様であり、従つて通常の土壤では 0.05 乃至 0.10 g/25 cc medium 位がよく一致した結果を示し適当と思われるが、果樹園土壤の如く銅含量が明かに多いと思われる土壤については更に少量が適量の様である。

3) *Asp. niger* 法と化学的定量法による結果の比較

Asp. niger による土壤中の可給態銅の定量及び化学的方法による土壤中の全銅、可給態及び水溶性銅の定量結果を第四表に示す。

即ち *Asp. niger* による可給態銅の定量値は Hibbard 法によるそれとかなり同一の傾

Table 4. Comparison of Results Obtained for Copper Contents in Soils by *Asp. niger* Method and Chemical Analyses.

Soil Number	Soil taken (g/dish)	<i>Asp. niger</i> —spore colour—method						Chemical analyses		
		Available Cu τ /g soil						Total Cu τ /g soil	Availa-ble Cu τ /g soil	Water soluble Cu τ /g soil
		0.01	0.025	0.05	0.075	0.10	average			
1				8.0	7.7	7.8	7.8	74.5	3.0	0.4
2				4.0	4.0	4.0	4.0	44.5	2.7	0.1
3				10.0	10.7	10.3	10.3	52.0	3.7	0.4
4				4.0	4.0	4.0	4.0	49.5	2.4	0.7
5				3.2	3.3	3.0	3.2	49.5	2.0	0.2
6				2.5	2.7	2.5	2.6	44.5	1.5	0.08
7				3.0	3.3	3.0	3.1	35.8	2.0	0.1
8				4.0	4.0	4.0	4.0	61.0	2.8	0.2
9				4.0	4.0	3.5	3.8	42.5	2.4	0.2
10				4.0	4.6	4.0	4.2	39.5	2.4	0.2
11				4.0	4.0	4.0	4.0	78.0	3.2	0.2
12	30	32					31	112	15	0.8
13	50	48					49	125	28	1.7
14	40	36					38	118	21	1.0
15				1.6	1.6	1.5	1.6	24.5	1.2	0.2
16				3.0	2.7	3.0	2.9	34.5	2.0	0.2
17				3.0	3.3	3.2	3.2	32.0	2.4	0.2
18				2.0	2.0	2.0	2.0	37.0	1.1	0.1
19				6.0	6.0	6.0	6.0	44.5	3.2	0.4
20				4.0	4.0	4.0	4.0	42.0	2.4	0.2
21				5.0	5.3	5.0	5.1	32.0	2.7	0.3
22				6.0	5.3	6.0	5.8	29.5	3.2	0.4
23				4.0	4.0	4.0	4.0	29.5	2.0	0.7
24				16.0	16.0	15.0	15.7	43.0	5.6	0.7
25				3.0	2.7	3.0	2.9	42.0	1.6	0.2
26				3.0	2.7	3.0	2.9	22.0	1.6	0.07
27				4.0	4.0	4.0	4.0	44.5	2.8	0.1
28				4.0	4.0	4.0	4.0	125	3.2	0.1
29				16.0	18.7	16.0	16.9	69.5	5.2	0.5
30				8.3	7.3	7.0	7.4	52.0	3.2	0.2
31				3.0	3.3	3.0	3.1	18.3	2.3	0.1
32				1.8	2.0	2.0	1.9	10.8	1.3	0.1
33				4.0	4.0	4.0	4.0	17.0	2.8	0.2
34	30	32					31	145	12	0.5
35	20	18					19	92.0	8.0	0.5
36				4.0	4.0	4.0	4.0	40.8	2.0	0.07

向を示している。若干の例外を除けば大約1.5~2倍の値を示している、Jensen, Henriksen²³⁾は *Asp. niger* による可給態苦土と NH_4Cl による置換性苦土とに於いて之と類似した結果を報告し、Nicholas,¹⁰⁾ Dole¹¹⁾ 等も *Asp. niger* 法により得られた結果は化学的方法による可給態苦土及び銅の定量値よりも高い値を示す事を報告している。

又 Hibbard 法による可給態銅の浸出に際して Bioassay の場合と同様に 30°C の定温器に入れ1, 4及び7日間と夫々 incubation の期間を変えて浸出した結果は第五表に示す如く、incubation 1日間では Hibbard 法による可給態銅量とほぼ等しい値であるが、4日間の場合は浸出量は増大して *Asp. niger* 法による値にかなり近い値を示し、7日間で

Table 5. Effects of Temperature and Period of Incubation on the Extraction of Available Copper in Soils with 0.05 N KCl (pH 3.2).
(at 30°C, after 1, 4 or 7 days' incubation)

Soil Number	Period of incubation (day)	Cu γ /g soil			
		1	4	7	7-4*
1		3.6	6.0	6.2	8.8
7		2.2	2.8	3.0	4.6
8		2.8	3.2	3.4	5.6
12		17.6	25.0	26.0	39.0
13		29.0	39.0	42.0	50.0
15		1.4	1.6	1.5	2.4
16		2.2	2.6	2.8	5.4
20		2.6	3.6	3.8	5.8
24		6.6	10.4	11.6	14.0
29		6.4	11.6	12.4	18.4

* Four hundreds cc of 0.05 N KCl used for extraction of available copper in soils are divided into four portions, and three portions are incubated for two days respectively and the last portion for one day. After incubation four portions are combined together.

はもはやそれ以上には殆ど増加を示さない。併し浸出剤 400cc を4回に分け 100cc 宛で初めの3回は2日間宛、最後の1回は1日間、計4回7日間にわたり 30°C で incubate して繰返し浸出した結果は何れも *Asp. niger* 法よりも高い値を示した。之等の結果から *Asp. niger* による可給態銅の定量値が Hibbard 法のそれに比して高い結果を示す理由として、

- i) *Asp. niger* 法では Hibbard 法より incubation の期間が長く且つ温度も高い事。
- ii) *Asp. niger* はその培養中に種々の有機酸を培養液中に生産する事。
- iii) *Asp. niger* は生育に伴い培養液中に溶解置換して来た銅を吸収し奪い去るため、土壌粒子と培養液間の銅イオンの置換溶解の平衡は崩れて次々と培養液中に浸出されて来る事等が考えられる。

III. 要 約

1) 九大農学部構内の土壌より分離した *Asp. niger* を試験菌とし、再結晶法とクロマトグラフ用活性アルミナによる吸着法の併用により純化した培養液を用いて 30°C で7日間培養後、その胞子の色調を Standard series のそれと比較する方法によつて土壌中の可給態銅の Bioassay を行つた。

2) sample の使用量は通常の土壌では 0.05~0.10 g/25cc medium 位、果樹園土壌の如く銅含量が明かに多いと思われる土壌では更に少量が適当と思われる。

3) *Asp. niger* 法による可給態銅の定量値は、Hibbard 法による化学的定量の結果とかなり同一の傾向を示すが、若干の例外を除いてその絶対値は大約 1.5~2 倍の値を示した。

文 献

- 1) Steinberg, R. A., J. Agr. Res., 51, 413 (1935).
- 2) Vandecaveye, S. C., Diagnostic Techniques for Soils and Crops, 218, The American Potash Institute, Washington D. C. (1948).
- 3) 松木五楼, 土肥誌, 11, 240 (1937).
- 4) Benecke, W., and Söding, H., Ztschr. Pflanzenernähr., Düng. u Bodenk., (A) 10, 129 (1928).
- 5) Niklas, H., Poschenrieder, H., and Trischler, J., Ibid., 18, 129 (1930).
- 6) Mehlich, A., Truog, E., and Fred, E. B., Soil Sci., 35, 259 (1933).
- 7) Mulder, E. G., C. A., 41, 7300f (1947), 43, 8083 e (1949), 44, 8036 f (1950).
- 8) Edson, S. N., and Smith, F. B., C. A., 45, 9108 a (1951), Soils Fert., 15, 109 (1952).
- 9) Nicholas, D. J. D., C. A., 45, 3106 h, 4388 i (1951).
- 10) Nicholas, D. J. D., and Fiedling, A. H., C. A., 44, 10981 b (1950), 45, 6783e (1951).
- 11) Dole, M. W., Soil Sci., 73, 135 (1952).
- 12) Donald, C., Passey, B. I., and Swaby, R. J., Aust. J. Agr. Res., 3, 305 (1952).
- 13) Waksman, S. A., and Fred, E. B., Soil Sci., 14, 27 (1922).
- 14) Spicher, G., Zbl. Bakter., II. Abt., 108, 259 (1954).
- 15) Hibbard, P. L., Soil Sci., 49, 63 (1940).
- 16) Hibbard, P. L., Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 10, 615 (1938).
- 17) Bogg, H. M., and Alben, A. B., Ibid., 8, 97 (1936).
- 18) Sandell, E. B., Ibid., 9, 464 (1937).
- 19) 森田修二, 日化, 69, 174 (1948).
- 20) 志波清尚, 土肥誌, 22, 26 (1951).
- 21) 有馬 啓, 化学の領域, 4, 30 (1950).
- 22) 有馬 啓, 農 学, 2, 3 (1948).
- 23) Jensen, H. L., and Henriksen, A., C. A., 49, 7788h (1955).

S u m m a r y

In this paper, the quantitative determination of available copper in soils by *Aspergillus niger* method and comparison of the results with chemical methods are described.

Satisfactory purification of the basal medium is obtained by autoclaving with 15 g/l Al₂O₃ (chromatographic analysis material) for 20 min. at 10 lb. pressure.

The spore colour sensitivity of *Asp. niger* to trace amount of copper is confirmed, and the amount of available copper in soils can be estimated by visual comparison of the spore colour of similar cultures with from 0.05 to 0.10 g of dry soil replacing copper with that of series of copper standard cultures

containing from 0 to 3.0 γ of added copper per 25 cc nutrient solution after 7 days' incubation at 30° C.

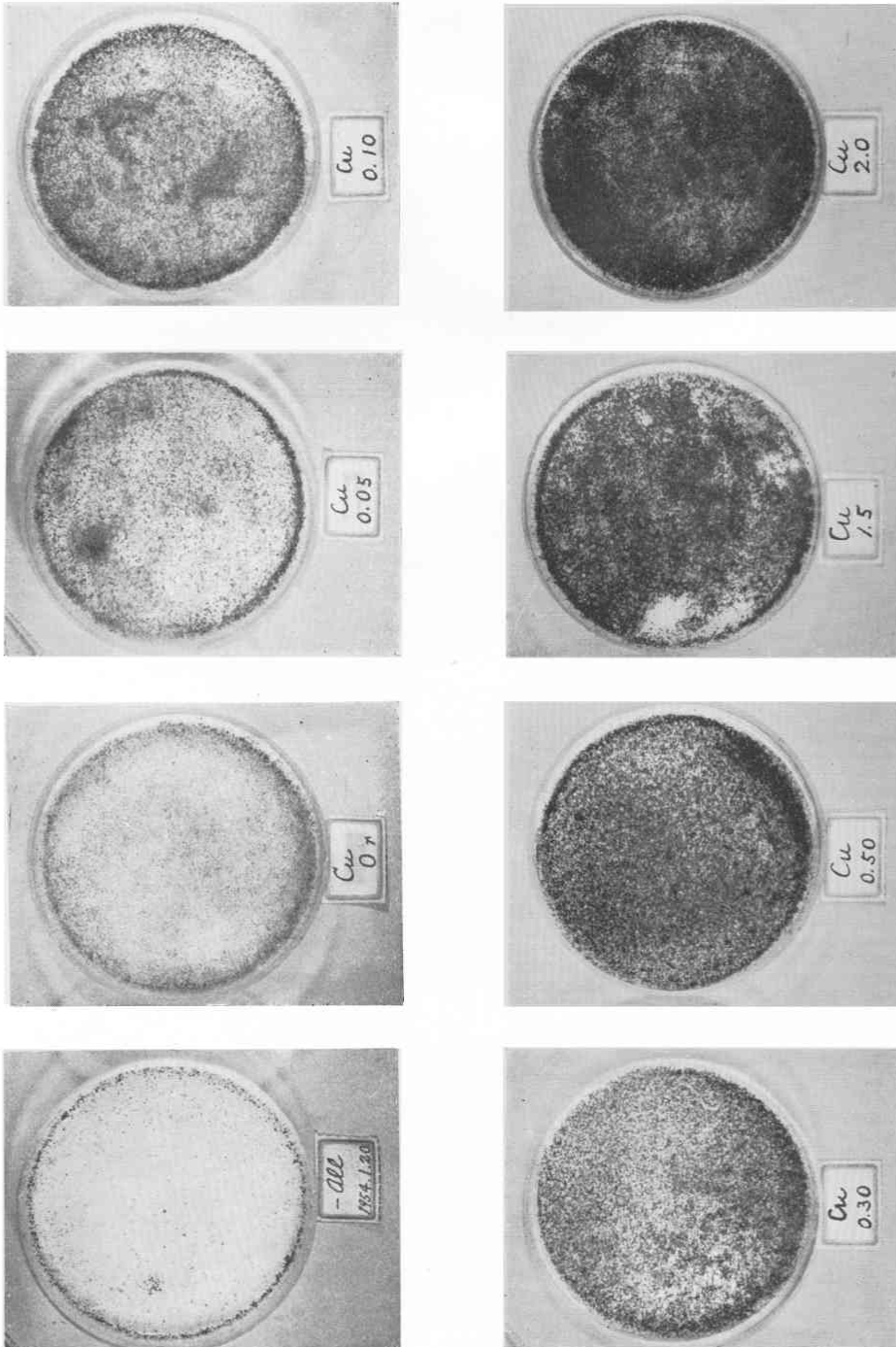
The results obtained by *Asp. niger* method compare fairly favorably with the chemical method, and except in a few soils the bioassay generally gives from $1\frac{1}{4}$ to 2-fold as high values as the available copper contents by chemical method (Hibbard's method.)

These higher values are probably attributable to the fact that organic acids produced by *Asp. niger* may release more copper than chemical exchanging solution and the soils remain in contact with the acid nutrient solution during several days of incubation.

Laboratory of Manures, Plant Nutrition,
Faculty of Agriculture,
Kyushu University

Explanation of Plate 11

Response of *Asp. niger* to increasing amounts of Cu (γ per 25cc medium)—Cu standard series, 7 days at 30° C.



微生物法による土壌微量元素の検定