

微生物法による土壌微量元素の検定：第二報. *Aspergillus niger* による土壌中の可給態亜鉛の定 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/10.15017/21394>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 15 (4), pp.457-464, 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*

第二報. *Aspergillus niger* による土壤中の可給態亜鉛の定量

平井敬藏・甲斐秀昭

Studies on trace elements in soils by
microbiological method. (Part 2)

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

Keizo Hirai and Hideaki Kai

著者等は *Asp. niger* を使用して、土壤中の可給態銅の検索に当つた際、培養せる *Asp. niger* の孢子の着色度と存在銅量との相関が最も明確である事から、*Asp. niger* spore colour method による土壤中の可給態銅の定量を行い、且つその方法により得られた値は Hibbard 法による化学的定量値とかなり同一の傾向を示し、絶体値としてはその大約 1.5 ~ 2 倍の結果を示した事を前報¹⁾に於て報告したが、引続き *Asp. niger* による土壤中の可給態亜鉛の検索に当つた結果を茲に第二報として報告する。

I. 定 量 法

試験菌の保存培養、器具の洗滌と殺菌、培養液の調製、接種及び培養等に関しては前報の銅における場合と全く同様であるので、茲では極く簡単にその概要を述べる。

亜鉛に対しては *Asp. niger* III を使用菌株とし、Basal medium の純化にはクロマトグラフ用活性アルミナ 15 g/l を用いて 10 lb. 20 分間 autoclave し、一夜放置後 Porosity No. 4 の glass filter で濾過する方法を用いて調製せる第一表の如き組成の培養液 25cc に Zn standard series として硫酸亜鉛液で Zn の 0, 0.10, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 及び 4.0 γ 、一方土壤試料は Zn 液の代りに風乾後孔径 0.5mm の篩を通過した部分の一定量を加え、*Asp. niger* spore suspension を接種した後 36°C で 7 日間

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	Cu	80	(as CuSO ₄ ·5H 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			

* 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。

培養する。

土壌中の亜鉛の化学的定量法については、可給態亜鉛に対しては Hibbard 法²⁾ 全亜鉛には Bogg, Alben 法³⁾ に従つて浸出を行い、之等浸出液中の亜鉛の定量は Sandell 法⁴⁾ によつて行つた。

II. 実験結果及び考察

1) *Asp. niger* 法の測定法

Asp. niger の Zn に対する response の測定法としては、胞子の色調は Cu の場合と異り、常に black であるため spore colour method は用いられず、第二表及び第一図

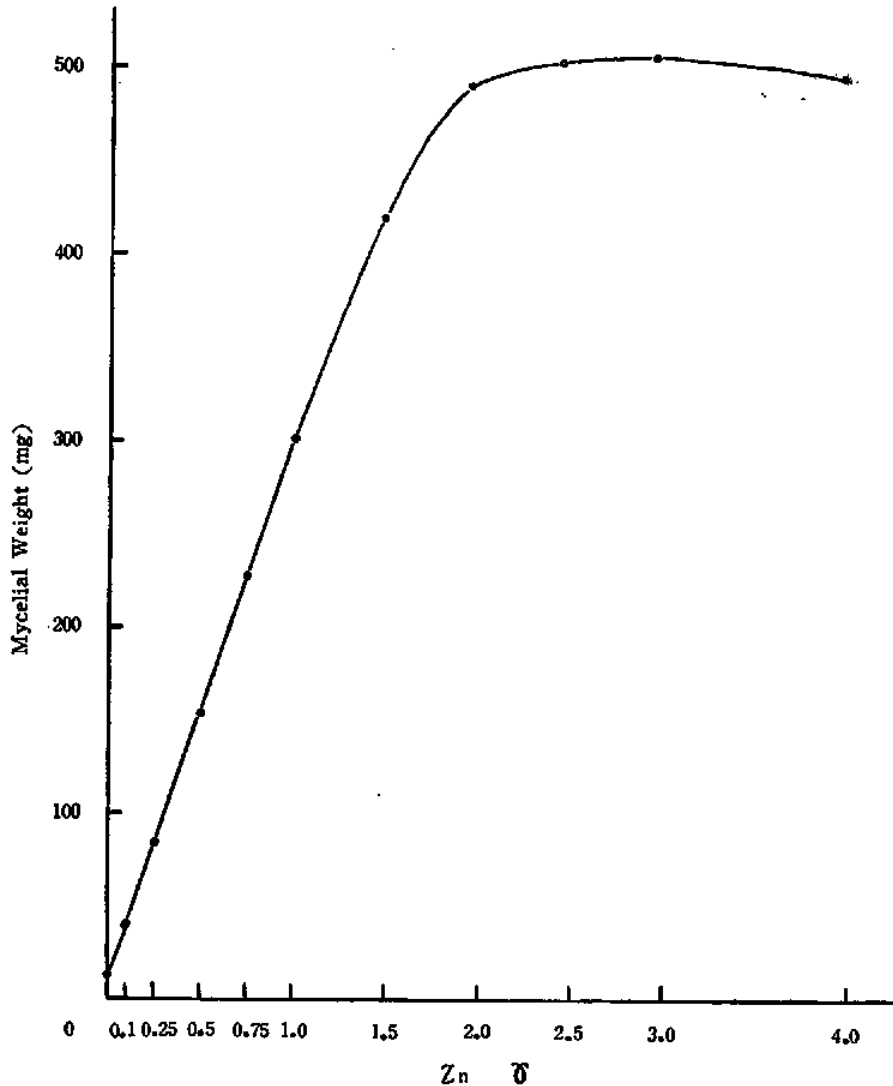


Fig 1. Relation between Added Zinc and Mycelial Dry Weight of *Asp. niger*.

Table 2. Mycelial Dry Weight of Zinc Standard Series

Zn added (γ /dish)	Mycelial weight (mg)						pH of culture solution at harvest
	1	2	3	4	5	average	
-all *	8.9	8.6	9.8	10.9	10.3	9.7	3.51
0	12.1	11.8	13.6	13.4	14.1	13.0	3.55
0.10	42.5	37.9	39.4	43.2	38.0	40.2	3.57
0.25	85.0	79.3	82.1	86.5	89.6	84.5	3.59
0.50	151.3	143.9	156.1	160.4	161.8	154.7	3.60
0.75	223.9	219.1	226.5	239.4	235.1	228.8	3.45
1.0	301.1	291.4	299.8	306.2	311.5	302.0	3.47
1.5	413.0	405.2	422.8	428.8	428.7	419.7	3.30
2.0	486.9	479.4	487.8	493.1	493.8	488.2	3.35
2.5	495.3	488.4	494.0	506.6	503.2	497.5	3.37
3.0	489.9	495.2	501.7	502.9	504.3	498.8	3.18
4.0	483.3	480.1	474.6	491.4	483.6	482.6	3.21

* Culture without all heavy metals.

に示す如く、0~2.0 γ /25 cc の範囲にわたりほぼ直線的相関関係を示す菌体乾燥重量⁽¹³⁾により行つた。尙分生芽胞着生度も存在 Zn 量に対してかなり明確な相関関係を示して居り、従つて分生芽胞着生度及び菌体の生育程度の肉眼的観察によつても簡便な方法として測定し得るものと思われる。(図版 12 及び 13 参照)

2) *Asp. niger* 法による土壤中の可給態亜鉛の定量

この定量法の再現性及び回収率については夫々 3 点宛の土壤につき degree of sporulation method 或は mycelial weight method により行つた結果を第三及び第四表に示

Table 3. Reproducibility of Zinc Determination by *Asp. niger*—Degree of Sporulation—Method.

Soil Number	Soil taken (g/dish)	Zn determined						
		γ per dish			γ per g soil			
		1	2	3	1	2	3	average
1	0.05	0.5	0.5	0.5	10.0	10.0	10.0	10.00
	0.075	0.8	0.75	0.8	10.7	10.0	10.7	10.47
	0.10	1.1	1.1	1.0	11.0	11.0	10.0	10.67
	0.25	>2	>2	>2	>8	>8	>8	>8
	0.50	>2	>2	>2	>4	>4	>4	>4
2	0.05	0.25	0.25	0.2	5.0	5.0	4.0	4.67
	0.075	0.4	0.4	0.35	5.3	5.3	4.7	5.10
	0.10	0.5	0.5	0.5	5.0	5.0	5.0	5.00
	0.25	1.2	1.1	1.1	4.8	4.4	4.4	4.53
	0.50	>2	>2	>2	>4	>4	>4	>4
3	0.05	0.7	0.7	0.7	14.0	14.0	14.0	14.00
	0.075	1.1	1.1	1.0	14.7	14.7	13.3	14.23
	0.10	1.4	1.4	1.3	14.0	14.0	13.0	13.67
	0.25	>2	>2	>2	>8	>8	>8	>8
	0.50	>2	>2	>2	>4	>4	>4	>4

す如く, *Asp. niger* による可給態亜鉛の定量も亦ビタミンやアミノ酸の Bioassay と同程度の正確さは期し得られる様に思われる。

又 sample の使用量についても Cu の場合と同様に通常の土壌に対しては, 0.05~0.10 g/25 cc, 特に含量の多い土壌については更に少量が適當の様である。

3) *Asp. niger* 法と化学的方法により得られた結果の比較

Table 5. Comparison of Results Obtained for Zinc Contents

Soil Number	Analytical method Zn content Soil taken (g/dish)	<i>Asp. niger</i> —mycel weight—method					0.01
		Available Zn τ /g soil					
		0.01	0.025	0.05	0.10	average	
1				10.46	10.58	10.52	
2				4.96	5.51	5.24	
3				13.36	13.65	13.51	
4				2.96	3.20	3.08	
5				5.02	4.87	4.99	
6				8.28	7.82	8.05	
7				2.20	1.98	2.09	
8				4.16	4.53	4.35	
9				4.08	3.93	4.01	
10				4.58	4.40	4.49	
11				6.98	7.50	7.24	
12				8.06	8.72	8.39	
13				7.32	7.35	7.34	
14				9.30	9.55	9.43	
15				1.16	1.07	1.12	
16				14.48	15.14	14.81	
17				4.90	5.13	5.02	
18				1.20	1.09	1.15	
19				7.04	6.63	6.84	
20				9.86	9.08	9.47	
21				6.04	5.84	5.94	
22				7.30	6.78	7.04	
23				9.70	10.94	10.32	
24		40.5	43.2			41.85	40.0
25				2.54	2.80	2.67	
26				10.36	11.67	11.02	
27				2.84	3.07	2.96	
28				2.38	2.18	2.28	
29				20.56	18.82	19.69	
30				14.06	15.23	14.65	
31				2.24	2.08	2.16	
32				2.46	2.65	2.51	
33				4.04	4.13	4.09	
34				10.10	9.14	9.62	
35				10.66	10.30	10.48	
36				1.98	2.03	2.01	
37		44.8				44.8	40.0
38		101.0				101.0	110.0

Asp. niger 法 (mycelial weight method 及び degree of sporulation method) による土壤中の可給態亜鉛, 及び化学的方法による全亜鉛, 可給態及び水溶性亜鉛の定量結果は第五表に示す。

即ち *Asp. niger* 法については mycelial weight method 或は degree of sporulation method の何れによるも殆ど等しい結果が得られ, 又其等と Hibbard 法による可給

in Soils by *Asp. niger* Method and Chemical Analyses.

<i>Asp. niger</i> —degree of sporulation—method					Chemical analyses		
Available Zn τ /g soil					Total Zn	Available Zn	Water soluble Zn
0.025	0.05	0.075	0.10	average	τ /g soil	τ /g soil	τ /g soil
	10.0	10.5	10.7	10.4	79.4	6.6	0.3
	4.7	5.1	5.0	4.9	66.9	3.2	0.3
	14.0	14.2	13.7	14.0	35.7	8.2	0.4
	3.0	3.3	3.0	3.1	71.9	1.2	0.7
	5.0	5.3	5.0	5.1	74.4	2.2	0.1
	8.0	8.0	7.5	7.8	34.4	4.1	0.2
	2.0	2.0	2.0	2.0	58.2	1.4	0.1
	4.0	4.0	4.0	4.0	60.7	2.6	0.1
	4.0	4.0	4.0	4.0	54.4	2.2	0.1
	5.0	4.0	4.0	4.3	74.4	2.2	0.1
	6.0	6.7	7.0	6.6	144.0	3.2	0.2
	8.0	8.0	9.0	8.3	54.4	4.1	0.3
	7.0	8.0	7.0	7.3	46.9	3.8	0.3
	10.0	9.3	9.0	9.4	61.9	5.8	0.3
	1.0	1.3	1.0	1.1	41.9	0.9	0.04
	14.0	14.7	15.0	14.6	86.9	8.6	0.1
	5.0	5.3	5.0	5.1	46.9	2.2	0.1
	1.0	1.1	1.0	1.0	43.2	0.6	0.03
	8.0	6.7	7.0	7.2	53.2	2.6	0.3
	10.0	9.3	9.0	9.4	36.9	3.6	0.1
	6.0	6.7	6.0	6.2	24.4	2.6	0.1
	8.0	8.0	7.0	7.7	31.9	3.4	0.1
	10.0	9.3	10.0	9.8	34.4	5.6	0.2
44.0	3.0	2.7	2.5	2.7	124.4	17.4	0.3
	10.0	12.0	11.0	11.0	44.4	1.2	0.3
	3.0	3.3	3.0	3.1	71.9	5.7	0.2
	2.0	2.7	2.5	2.4	59.4	1.4	0.03
	22.0	18.7	18.0	19.6	69.4	1.0	0.04
	14.0	14.7	14.0	14.2	74.4	11.0	0.1
	2.0	2.0	2.5	2.2	66.9	7.8	0.1
	3.0	2.7	3.0	2.9	16.9	1.4	0.1
	4.0	4.0	4.0	4.0	48.2	1.1	0.1
	10.0	10.7	9.0	9.9	49.4	1.8	0.1
	12.0	10.7	11.0	11.2	56.9	3.8	0.1
	2.0	2.0	2.0	2.0	124.0	4.6	0.1
40.0				40.0	59.4	1.4	0.03
>80				110.0	61.2	41.4	0.2
					165.0	86.2	1.2

Table 4. Recovery of Zinc Added to Soils, Determined by *Asp. niger*—Mycelial Weight—Method.

Soil Numbre	Soil taken (g/dish)	Zn added (γ /dish)	Zn determined (γ /dish)	Zn recovered (γ /dish)	Recovery of Zn added (%)
1	0.05	0	0.520	—	—
		0.1	0.619	0.099	99.0
		0.3	0.802	0.282	94.0
		0.5	1.061	0.541	108.2
		0.8	1.344	0.824	103.0
2	0.10	0	0.580	—	—
		0.1	0.690	0.110	110.0
		0.3	0.860	0.280	93.3
		0.5	1.101	0.521	104.2
		0.8	1.418	0.838	104.8
3	0.075	0	1.034	—	—
		0.1	1.139	0.105	105.0
		0.3	1.342	0.308	102.7
		0.5	1.516	0.482	96.4
		0.8	1.760	0.726	90.8
average					100.95

態亜鉛量とは、銅における場合と同様に、かなり同一の傾向を示し、若干の例外を除き大よ2倍前後の値を示している。

又 Hibbard 法による可給態亜鉛の浸出に際して、Bioassay におけると同様に 30°C の定温器中に入れ、1、4 及び7日間夫々 incubation の期間を変えて浸出を行つてみると、第六表に示す如く、incubation 1 日間では soil no. 24 を除く他は大体に Hibbard 法による可給態亜鉛量に近い値であるが、incubation 4 日間の場合には浸出量は増大して *Asp. niger* 法による定量値にかなり近い値を示し、incubation 7 日間では最早それ以上には大した増加を示さない。併しこの際 400 cc の浸出液を4回に分け 100 cc 宛にて浸出し、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 に incubation 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。

従つて亜鉛の場合も *Asp. niger* 法による可給態亜鉛の定量値が Hibbard 法のそれに比して高い結果を示す理由としては、銅における場合と同様の理由が考えられる。即ち、

i) *Asp. niger* 法では Hibbard 法に比し、incubation の期間が長く且つ温度も高い事。

ii) *Asp. niger* は培養中に種々の有機酸を培養液中に生成し、sample がかかる酸性の培養液と数日にわたり接触しているため、より多くの亜鉛が浸出される事。

iii) *Asp. niger* はその生育に伴つて培養液中に溶解置換されて来た亜鉛を吸収し奪い去るため、土壌粒子と培養液との間の亜鉛イオンの溶解置換の平衡関係が崩れて次々と培養液中に浸出されて来る事。

Table 6. Effects of Temperature and Period of Incubation on the Extraction of Available Zinc 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)	Zn τ /g soil			
		1	4	7	7-4 *
1		7.4	8.2	8.6	13.8
7		1.3	1.8	1.8	3.6
8		3.0	3.8	4.0	8.0
12		5.8	7.4	7.6	11.4
13		5.4	7.0	7.0	11.0
15		1.0	1.6	1.6	2.6
16		8.6	9.4	9.8	15.8
20		4.6	6.6	7.0	10.6
24		27.8	43.8	43.8	57.8
29		14.2	17.8	18.6	24.8

* Four hundreds cc of 0.05 N KCl used for extraction of available zinc 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.

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、再結晶法及び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 日間培養した後、その菌体乾燥重量を Zn standard series のそれと比較する方法によつて土壌中の可給態亜鉛の Bioassay を行つた。

2) 此の場合、分生芽胞着生度及び菌体の生育程度の肉眼的観察による方法も簡便的に用いられると思われる。

3) sample の使用量は通常の土壌では 0.05~0.10 g/25 cc medium 位が適当である。

4) *Asp. niger* による土壌中の可給態亜鉛の定量値は、銅の場合と同様に、Hibbard 法による化学的な可給態亜鉛定量の結果とかなり同一の傾向を示すが、若干の例外を除きその絶対値は大約 2 倍前後の結果を示した。

文 献

- 1) 平井敬蔵, 甲斐秀昭, 九大農学部学芸雑誌, 15, 447 (1956).
- 2) Hibbard, P. L., Soil Sci., 49, 63 (1940).
- 3) Bogg, H. M., and Alben, A. B., Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 8, 97 (1936).
- 4) Sandell, E. B., Ibid., 9, 464 (1937).
- 5) Tucker, T. C., Kurtz, L. T., and Lynch, D. L., Soil Sci. Soc. Amr. Proc., 17, 111 (1953).

S u m m a r y

Satisfactory purification of the basal medium is obtained by autoclaving with 15 g/l Al_2O_3 (chromatographic analysis material) for 20 min. at 10 lb. pressure.

Although *Asp. niger* spore colour method have been used for copper assay, the technique are not convenient with zinc. Mycelial dry weight are used as the criterion of evaluation in this work, and visual comparison of degree of sporulation and mycelial growth with those of zinc standard series may be used as a rapid and simple method of measuring available zinc in soils.

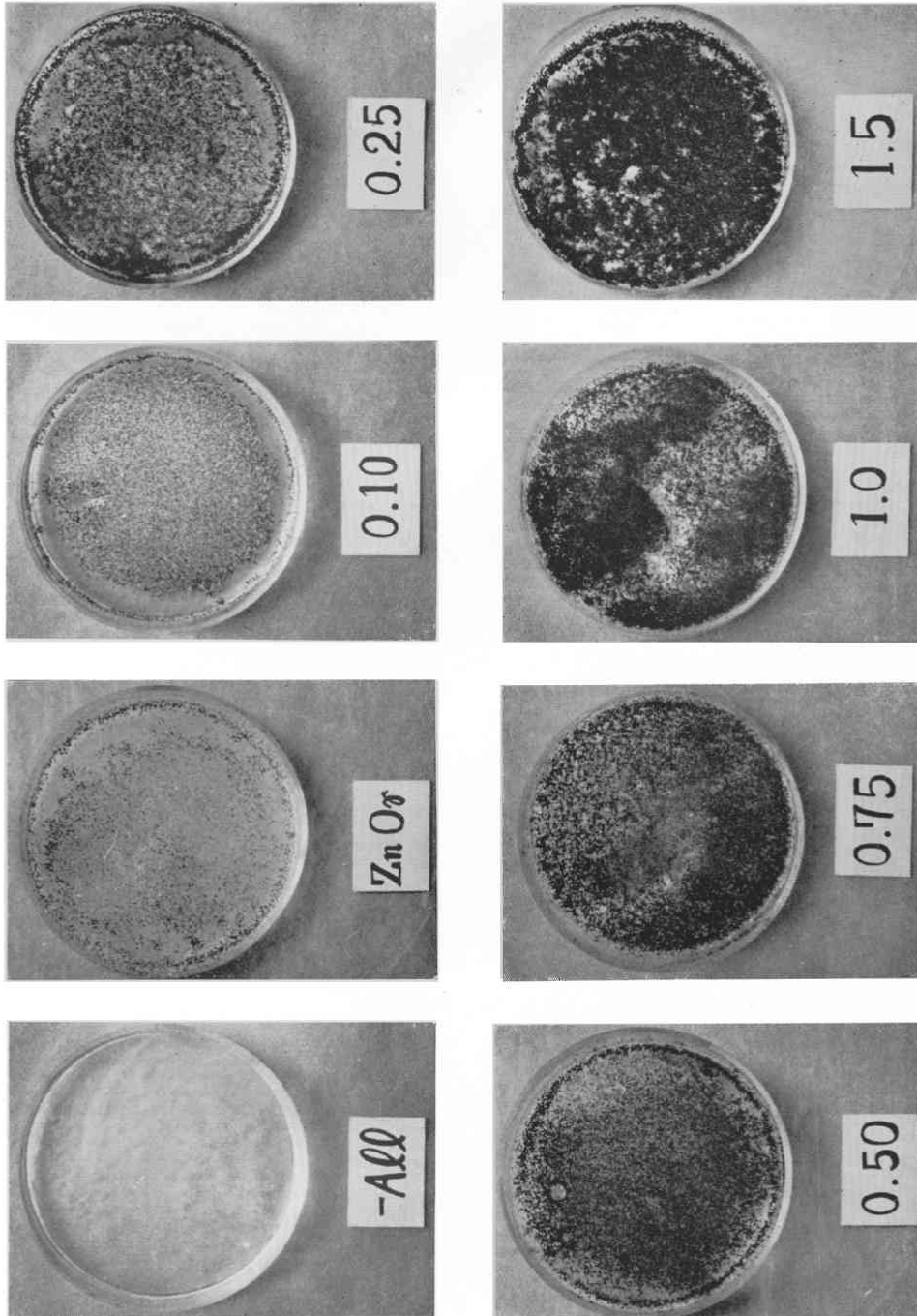
Samples of 0.01–0.50 g are employed, depending on the zinc status of the soil tested, and for most soils 0.05–0.10 g samples are used.

The results obtained by *Asp. niger* method compare fairly favorably with the chemical method and, like in copper assay, except in a few soils the bioassay generally gives about twice as high values as the available zinc contents determined by chemical method (Hibbard's method.)

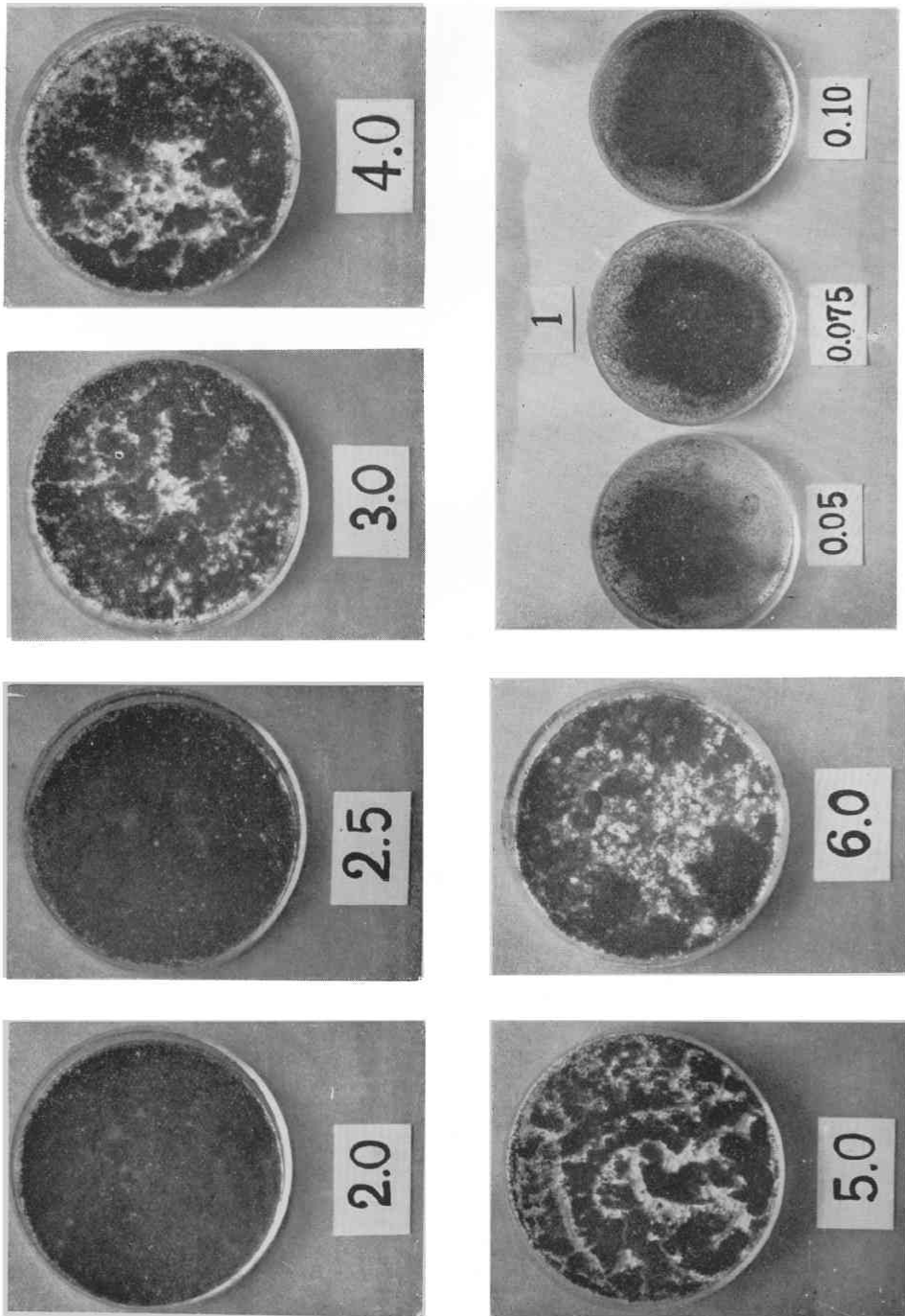
Laboratory of Manures, Plant Nutrition,
Faculty of Agriculture,
Kyushu University

Explanation of Plates 12 and 13

Zn standard series (γ per 25 cc medium) and cultures of sample soil No. 1 (g. of dry soil per 25 cc medium). 7 days at 30°C.



微生物法による土壌微量要素の検定



微生物法による土壤微量元素の検定