

國立中山大學農學院

農林研究委員會

叢刊 第三類

農林化學系專刊第二號

用黑麴菌試驗土壤有效磷鉀法
之研究及廣東土壤檢定之結果

彭家元 蘇旭光 陳禹平



發行者

國立中山大學農學院農林化學系

民國廿五年八月

國立中山大學農學院

校 長 鄒 魯

院 長 鄧 植 儀

農林研究委員會

農林化學系

SUN YATSEN UNIVERSITY

OFFICERS OF THE ADMINISTRATION

CHOU, LOU	President
TANG, TSIC-YEE	Dean, College of Agriculture

RESEARCH COMMITTEE OF AGRICULTURE AND FORESTRY

TANG, TSIC-YEE	Chairman, Professor of Soils
CHANG, NOON	Professor of Agricultural Economics
CHEN, WOON-YOUNG	Professor of Agricultural and Forest Botany
FUNG, TZU-CHANG	Professor of Agricultural Chemistry
HAU, KUO	Professor of Forestry
HUANG, FAN-HSIO	Professor of Forestry
HUANG, KU-TUNG	Professor of Agricultural Economics
LAU, WING-KEI	Professor of Animal Husbandry
LEE, YING	Professor of Agricultural Chemistry
LING, CHIA-CHIH	Assistant Professor of Agronomy
LIN, LIANG-TUNG	Lecturer and Specialist in Phytopathology
LO, TA-FAN	Professor of Agricultural Statistics
PAN, CHIA-YUAN	Professor of Soils
TING, YING	Professor of Agronomy
WANG, YU-TSAN	Professor of Forestry
WEN, WAN-KWAN	Professor of Horticulture
JUNG, GOEY-PARK	Professor of Entomology
WONG, KWAN-LUN	Assistant Professor of Entomology
YEUNG, PANG-CHIEH	Professor of Sericulture
WONG, PO-CHUAN	Assistant Professor of Soils
WONG, SHU-FAI	Assistant Professor of Agriculture Chemistry

Staffs of the Dept. of Agri. Chemistry

Pan, C. Y.	Prof. Head of Dept.
Li-yen	Professor
Tang, T. Y.	Professor
Fong, T. T.	Professor
Wong, Poo-Chuan	Assistant Prof.
Wong, S. W.	Assistant Prof.
Wong, S. Z.	Instructor
Wong T. F.	Instructor
Soo, S. K.	Research assistant
Chen, Y. P.	Research assistant
Hsieh, N. J.	Research assistant
Chen, K. P.	Junior assistant
Chen, W. C.	Junior assistant
Lim, S. F.	Junior assistant
Lau, J. P.	Junior assistant
Wong, W. M.	Junior assistant

目 錄

一、緒言	1
二、黑麴菌試驗法之沿革及其理論基礎	1
三、黑麴菌之形態及其生活	3
四、前人對於本試驗法之研究	4
1. 關於黑麴菌品種齡代及接種法之研究	4
2. 關於菌絲組織之研究	9
3. 關於培養基之研究	19
4. 關於土壤殺菌,土壤用量,培養液用量及培養時間之研究	25
5. 黑麴菌法與其他有效養分試驗法之比較	28
五、本系對於本試驗法之研究	30
1. 關於品種之研究	30
2. 關於土壤殺菌之溫度與時間	31
3. 關於土壤之用量	34
4. 關於培養之時間	34
六、結果推算之討論	35
七、本系採用之試驗方法	38
八、廣東土壤黑麴菌試驗法檢定結果	41
九、結論	43
十、參攷文獻	45
十一、附表	47

(一) 緒 言

欲知土壤中有効磷鉀之供給量，以爲施肥之參攷，最可靠者當爲田間試驗法，其次爲盆栽試驗法。然皆需長久時間及經費人力，尤以前者難作普遍之試驗，且有難滿吾人急迫之慾望者。因於田間試驗之外，更依種種簡捷之方法以求廣東各系土壤有效磷鉀之供給量。前次報告用 Cunninghamella 法⁽¹⁹⁾測定廣東土壤有效磷酸之供給量即其中之一。茲篇所述乃用 *Aspergillus niger* 法測定有效鉀之結果。在磷酸方面經與 Cunninghamella 法比較，如將該法所得之結果減爲一半則兩者頗爲接近，簡而言之若依一般之標準則廣東土壤中有効磷酸供給量除少數在正常或正常以上外，大多數均在正常以下，有效鉀則多在正常或正常以上。此種標準是否合乎廣東情形，殊成問題。証之實際情形，所用暫定之標準，是否合乎田間試驗，則待將來多方面之証明而改正確定也。

(二) 黑麴菌試驗之沿革⁽²⁾及其理論基礎

黑麴菌最初由 Nikitorgky, Dale, Werkenthin 三氏從英, 美, 德, 等國土壤分離培養于蔗糖凝菜培養基, Butkewitsch 移植于蛋白質培養液內, 發見黑麴菌有氨化作用。Perotti 氏遂依 Butkewitsch 氏之暗示, 培植于二精化銨培養液 (Dicyanamide Medium), 結果黑麴菌生長與前大異。其後 Dox, Neiging, Lauent, Schellenbery 四氏同時報告黑麴菌有分解纖維, 蛋白質, 糖類, 及硝化還原作用。Butkewitsch 氏乃

培養黑麴菌于含有硝酸鹽類,糖類,纖維,蛋白質等之培養液,其生長反不如 Perotti 氏培養液之繁茂。然倘加入相當量溶解性磷鉀,生長極其蓬勃;氏因用之爲生物指示劑,以測驗土中有效性磷鉀,時爲 1909 年。同年 Kozelskii 氏亦利用黑麴菌以測定土壤有效磷鉀,氏用二十五克土壤,及 10% 葡萄糖 1% Asparagine, 0.5% 硫酸鎂, 0.1% 氯化鉀,或 0.1% 磷酸二鈣, 0.001% 硫酸鋅構成之培養液 100c.c., 接種黑麴孢子,所得結果與 1% 檸檬酸或草酸銨頗接近。

1924 年 Pantanelli 氏,又有關於用黴類以測定土壤磷質之報告,氏用 10% 甘蔗糖及 2% 硫酸銨加于土壤,以培養黑麴菌,黃麴菌 (*Aspergillus Oryge*) 等黴類數種,從菌叢之菌絲體上之磷質而測定土壤之有效磷質,得知黴類中以黑麴菌,黃麴菌結果爲最佳。至 1928 年 Benecke 與 Söding 二氏根據 Butkewitsch 氏之啓示,亦作黑麴菌及其他微生物之試驗,其法取培養液 50cc, 盛三角瓶中,其一加 0.00025—0.002% 之氯化鉀,其他加于攝氏 150 度下經殺菌 15 分鐘之土壤 0.12—5 克,一一接種 (*Aspergillus Niger*) 黑麴菌孢子,培養於 35°C 六天,結果將加土壤之菌絲體與加氯化鉀者比較之,以決定土壤中有効性鉀之含量,有效磷之試驗法亦同。至 1931 年 Lohniann 氏之有效性磷鉀試驗報告,大部即由前二氏法改良而成,其法將土壤與養料置瓶中,接種黑麴菌孢子,六天後將菌絲移入漏斗中洗滌,乾燥,由乾菌絲重估量自土中吸收之磷鉀。Lohniana 氏試驗報告未發表前,約 1929—1930 年左右, Niklas 氏, Poschenrieder, Trischler 氏已分頭研究,其後同在德國華漢斯特勞農業研究院 (Agrikultur Chem-

ischen Institutin Weihestephan) 合作試驗各種不同營養料及能影响于黑麴菌絲體之因子,知在種種環境下試驗,均甚迅速而便利,以後各國農業研究機關爭相採用研究試驗。

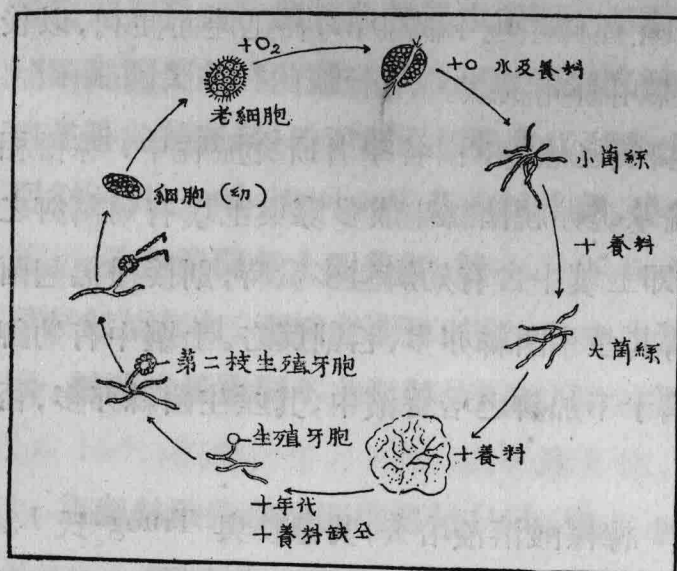
黑麴菌對於磷酸或鉀質之感應,由各學者研究歷程中,尋得相當價值,故本試驗之理論基礎亦視菌絲生成多寡與土壤有效磷鉀之含量直接相關。換言之,即土壤中含有有效磷酸多量時,則接種黑麴菌于不加磷酸之培養液中,其產生菌絲亦多,否則反之。土壤中有有效鉀質存量多,則接種黑麴菌于不加鉀之培養液中,其產生菌絲亦多,否則反之。

同時試驗土壤用 1% 檸檬酸溶液培養,其意使與 Truog 氏 1% 檸檬酸抽出法所認為有效磷酸相近,適合實際情形,且其反應適于黑麴菌繁殖,更可遏制其他多種菌類生長也。

(三) 黑麴菌之形態及其生活

從形態上的分類,黑麴菌屬 Fungi (絲狀菌) 類 Mold (黴) 屬。生理上的分類則屬獨生好氣性菌 (Aerobic) 黑麴菌散佈於自然界種類甚多,水與空中難于生存,多藏於肥沃土壤中,全體可分為菌絲體 (Mycellium) 柱頭 (Sterigmata)。柱頭又可分孢子囊 (Swelling Globose),子柄 Conidiophores, 生殖孢子 (Conidia), 孢子 (Spores)。菌絲體生長初期呈白色,漸老漸變鮮黃色。各種 *Asp. niger* 其菌絲之基部 (Substram) 則皆呈黃色。子柄 (Conidio-phore) 達 2m.m. 直徑 8.5 μ —15 μ , 孢子囊直徑大 35—43 μ 。生殖細胞長 16—19 μ 闊 4—4.5。生殖

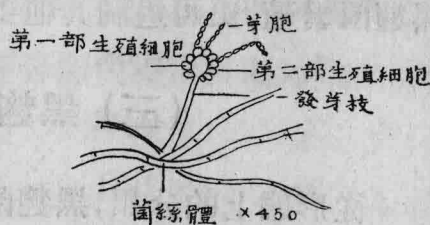
孢子幼滑老疣，單獨生長時呈褐色，團聚時呈黑色。孢子成串狀，⁽⁴⁾



第一圖

從表面觀之，菌皮底黃褐色粘滑，面部平部整。生長旺盛無地伸展時，則起皺褶。孢子滿佈為養料缺乏之象徵也。黑麴菌在適當環境之下，能于十小時完成一世代（觀察結果）。所謂適當環境乃培養液酸度，pH

最良為 3.1。超過 6 則受抑制，培養溫度以 35°C 為最佳，培養時間定為四天。第一圖為黑麴菌一世代生長變遷形態，第二圖為菌絲等之放大。



第二圖

(四) 前人對於本試驗法之研究

本試驗法自經 Niklas, Poschenrieder 及 Trischler 三氏發表以後，各國學者均繼起研究，工作最力者有 Vilsmeier, Poschenrieder, Truog, F.B. Smith 等氏。其研究之要點亦多，如品種齡代，接種法，菌絲組織，培養基，土壤處理等均有詳細研究，如下所述：

1. 關於麴菌品種，齡代及接種法之研究

Truog 氏⁽²⁾曾以七種不全產地之黑麴菌試驗其鉀質吸收力量及菌絲重之差異。其七品種之來源如下：第一號菌種在美國細菌研究部取來；第二，三，六，七各號菌為最近分離所得；第五號菌種來自德國 Weihenstephan 試驗場，為 Niklas 及 Poschenrieder 二氏所採用。此外更有 *Aspergillus fischeri* 5041 一種，為美國土壤局所培養，其試驗法取交換性鉀含量甚低之土壤，遞加可溶性鉀鹽，由其試驗結果，可見無論任何濃度培養下，不同麴菌品種產生不同重量之菌絲，示如下表：（表一）

品種	每100 gm ₁ 加入 K ₂ O 量所得四個培養菌絲總重			
	10 mgm.	20 mgm.	30 mgm.	40 mgm.
<i>Asp. niger</i>				
1	0.96	2.29	3.51	3.81
2	0.92	1.68	3.30	4.33
3	1.31	2.20	3.10	3.90
4	1.43	3.05	3.86	4.05
5	1.08	2.56	3.50	4.45
6	1.58	3.20	3.56	3.78
7	1.70	3.60	3.90	3.55
<i>Asp. fischeri</i>	1.63	2.36	2.89	3.64

由此試驗顯示第五號菌種對鉀質之感應最佳，因此種經過前人一番選擇也。第四號菌種亦頗相近，惜菌塊生成甚脆，持洗困難。第

二號菌種與第五號菌種所得更為接近，然在大規模土壤試驗時，其收穫四個菌之總重甚少超過 1.70gm（即不能指示最高含量）。第六第七兩號菌種，則在低濃度時產生多量菌塊，故亦不適用。至於 *Asp. Fischeri* 則更無論矣。Vilsmeier 及 Poschenrieder 二氏亦主張用 *Weihenstephan* 試驗場所分離之純種，本系亦曾將美國菌種及德國菌種與廣東菌種比較，成績見 31 頁。

麴菌齡代之關係，Mehlich 氏⁽²⁾曾取上述第五號菌種作一組試驗，於室溫內培養分別培養 20 日，40 日，60 日後取出接種結果在 20—60 日間所接種者，其菌絲量之產生，甚為近似，頗與 Fred 及 Poschenrieder 兩氏之試驗相符。Fred 及 Poschenrieder 二氏之試驗法：取 Stamm Wehmer (WII), Neuer Gottinger Stamm (NG) Berlluer Stamm (B) 及 Stamm Zipfel (ZII) 等四品種，一方面比較各菌種在各濃度之下，其產生菌絲量之差異，一方研究各品種各齡代接種與菌絲量之關係，其結果如下表：

(表二) 品種與齡代對於菌絲產量之關係

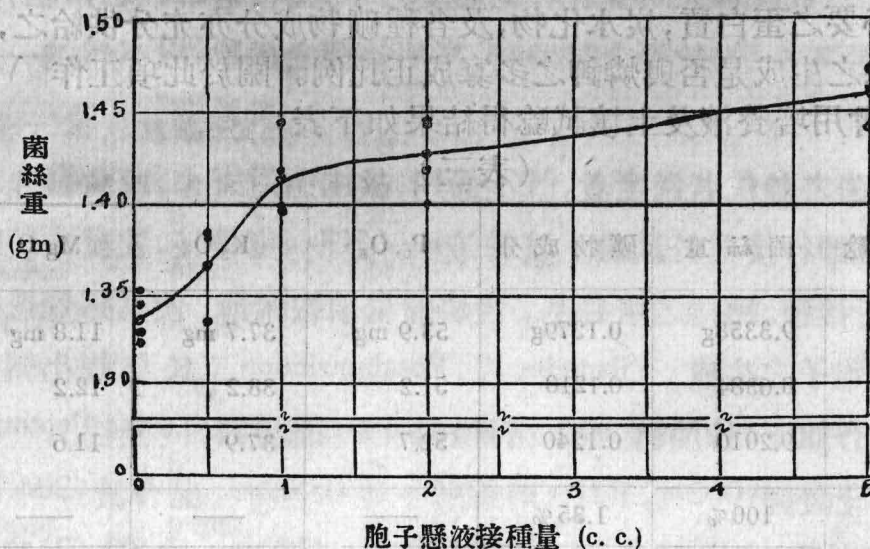
菌 種	K ₂ O% (用 K ₂ SO ₄)	各 齡代菌胞接種培養六日每四個菌絲總重			
		5½月	3½月	1½月	1 月
Stamm WII	0.	0.28	0.31	0.30	0.20
	0.002	1.24	1.27	1.25	1.27
	0.006	2.35	2.46	2.44	2.50
	0.01	2.65	2.65	2.60	2.83
Stamm ZII	0	0.20	0.18	0.27	0.22
	0.002	1.04	1.12	1.23	1.03
	0.006	2.08	2.06	2.79	1.93
	0.01	2.90	2.76	3.20	2.89
Stamm NG	0.	0.28	0.21	0.27	0.52
	0.002	1.42	1.54	1.60	1.64
	0.006	2.54	2.82	2.69	3.05
	0.01	3.08	3.14	2.78	3.05
Stamm B	0.	0.49	0.29	0.63	0.33
	0.002	1.03	0.99	1.33	1.01
	0.006	3.00	2.28	3.43	3.30
	0.01	2.80	2.73	3.08	3.21

於此可見雖在德國一隅，分離所得之品種，同法培養接種試驗，其菌絲之產生已各不相同，何況世界之大；可知引用試驗品種，甚有

關係也。於此試驗更可見在任何濃度之下，接種老齡代之菌胞，其產生菌絲極不一致，故吾人試驗時，採用接種之菌胞，以不超過一月者為佳。

麴菌之齡代若過老者，既不適用，故由遠道寄來，或藏過久之種菌，不宜即行接種於試驗土壤養液中，須經一度轉接，俟發生新鮮芽胞，再行接種，轉接之培養基，含磷酸量須較稀薄，使其感覺營養缺乏而速孢子之生成。Vilsmeier 及 Poschenrieder 二氏⁽⁹⁾提出轉接培養液配合如下：甘蔗糖 10%，檸檬酸 1%，硫酸鉍 0.6%，Pepton 1%， K_2O (用硫酸鉀) 0.002%， P_2O_5 (用磷酸一鉍) 0.002%，混合液 (204.76gm. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 1.9641gm $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 1.4570gm, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 及 1.6596gm $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 作成 1000c.c. 水) 3.c.c. 依此份量配得之培養液，取 30c.c 入 75c.c. 之三角瓶中，用白金線接種，放入 $35^\circ C$ 定溫箱內二三日後，即有黑色孢子生成，此新鮮孢子即可接種試驗。接種之手術有二：(1) 用白金線醱取前述菌塊上生成之新鮮菌胞，直接介紹於試驗土壤養液中。然此法祇適於少量試驗，若大規模試驗，種瓶啓閉頻仍，醱接亦頗費事，倒不如用第二法為便也。(2) 此法將前述已生芽胞之菌塊，輕輕取出，以 80—100c.c. 蒸溜水沖洗其菌胞使入另一瓶中，搖勻即成孢子懸液 (Sporesuspension) 然後吸取懸液接種於試驗土壤培養液中。至於孢子懸液接入量之多寡對菌絲重亦有影響，Smith 氏⁽⁶⁾曾作一試驗測定 0.1—, 0.5—, 1.0—, 2.0—, 及 5.0—c.c. 五組不同量之孢子懸液接入 200 P.P.M. P_2O_5 — 用 $CaH_4(PO_4)_2$ 之磷酸培養液 60c.c. 中，每組四瓶得結果如下圖：

第三圖 孢子懸液用量與菌絲生產量之關係



由此試驗可見用 0.1c.c, 0.5c.c, 1c.c, 芽胞懸液接種三者差異極為顯著, 過 1c.c 者菌絲之產量相差甚微, 故吾人試驗時若採用芽胞懸液接種法, 每個最少須接 1.c.c. 為佳。

2. 關於菌絲組織之研究

據 Peterson 氏之研究⁽³⁾謂黑麴菌菌絲組織之化學成分: 含碳 44.5—47.3%, 含氫 69.7—80%, 含氮 4.2—47%, 含灰分 40—64%。又據 Zopf 氏之研究⁽³⁾謂一般高等菌類乾物中含蛋白質 11—51%, 灰分 2.15%, 脂肪 1—10%, 碳水化合物 37—82%, 可見菌絲體之化學物質組成未必成一定比例, 蓋品種齡代不同, 環境影響, 與夫營養物質之缺乏等, 均足以左右菌絲之質與量也。本試驗法之理論即基於此, 前人經從多種黑麴菌中撰擇其對磷鉀之感應最敏, 而齡代最壯者而

接種之，已如上述。此外更給適宜之環境如溫度，pH 等。至於形成菌肌體必要之蛋白質，炭水化物，及各種礦物成分亦充分供給之，視研究菌絲之生成是否與磷鉀之多寡成正比例。關於此項工作 Vilsmeier⁽⁸⁾ 曾用培養液及土壤試驗得結果如下表：

(表三)

培養液試驗	菌絲重	礦物成分	P ₂ O ₅	K ₂ O	MgO
1	9.3358g	0.1279g	53.9 mg	37.7 mg	11.8 mg
2	8.6384	0.1218	51.2	38.2	12.2
3	9.2010	0.1240	52.7	37.9	11.6
%	100%	1.35%	—	—	—
		100%	42.5	30.5	9.5

由此試驗可知黑麴菌在培養液試驗時，菌絲中所含之礦物成分比率頗為一致，平均約為 1.35%，而 P₂O₅ 又相當於礦物成分之 42.5%；K₂O 30.5%；MgO 9.5%；簡言之即每 1gm. 之菌絲中，約含 P₂O₅ 5.7mg，K₂O 4.0mg；MgO 1.3mg. 也。Vilsmeier 氏更試驗黑麴菌在生長期中其所含之礦物成分與菌絲重是否同一比例，得結果如下表：

(表四)

日期	菌絲重		灰分重		灰分%		平均
	a.	b.	a.	b.	a.	b.	
2	3.3113	2.9116	0.0464	0.0418	1.40	1.42	1.36%
3	3.6517	3.4565	0.0511	0.0501	1.41	1.45	
4	3.8573	3.6573	0.0514	0.0507	1.34	1.39	
5	4.5184	4.5732	0.0588	0.0604	1.30	1.32	
6	4.6045	—	0.0664	—	1.40	—	

由上試驗之成績，可見黑麴菌在二日至六日生長期間，其菌絲之增長，與其中礦物成份之吸收量，成正比例。誠如此，似即可由菌絲重而推求其磷鉀含量，為法殊簡。然而在土壤試驗則不盡相符，蓋土壤之礦物組成不如培養液之簡單也。尤以石灰含量愈多，其差愈大，且涉及土壤中矽酸吸收問題。茲舉 Vilsmeier 氏土壤試驗結果如下表：

(表五) 石灰質含量與所產菌絲量及其灰分組成之影響

土 壤	CaO%	菌絲重(g)	灰 分	
			g	%
a	0.0	1.6048	0.0361	2.30
a'	0.0	1.5615	0.0370	2.40
b	0.1	3.5667	0.0927	2.59
b'	0.1	3.3401	0.0837	2.50
c	0.2	7.2214	0.1935	2.68
d	1.4	5.8021	0.2056	3.54
e	26.9	2.6622	0.4123	15.40
e'	26.9	2.5963	0.3914	15.10
f	48.9	3.6649	0.3970	10.80
f'	48.9	3.5559	0.3618	10.10

(續表五)

土 壤	P ₂ O ₅		K ₂ O		CaO		SiO ₂	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
a	20.2	55.9	3.9	10.8	0.5	1.5	10.0	27.6
a'	20.9	56.8	3.8	10.3	0.8	2.0	11.7	32.0
b	42.1	45.4	5.0	4.3	2.0	2.2	30.3	32.6
b'	40.8	47.5	3.9	4.6	1.6	2.0	22.8	27.2
c	48.9	25.3	12.7	0.65	4.6	2.4	49.8	25.8
d	53.1	25.8	10.7	—	4.8	4.2	29.3	14.2
e	31.2	7.5	4.5	0.10	256.1	62.1	24.2	5.8
e'	28.9	7.4	—	—	248.1	63.4	22.1	5.6
f	40.3	10.2	5.9	0.15	226.9	57.2	29.7	7.4
f'	39.2	10.8	6.0	0.17	211.2	58.3	27.8	7.7

由此可見菌絲組織除上述 P₂O₅, K₂O, MgO 等外, 石灰 (CaO) 矽酸 (SiO₂) 亦為菌絲中之重要成分, 且可見 CaO 與 SiO₂ 在菌絲中成一負相關之現象。即土壤中含石灰質多, 則其菌絲中含石灰亦多; 矽酸之含量則減少。土壤石灰含量少, 菌絲中 CaO 之含量亦少; 而 SiO₂ 之含量則增高。至生長中所含之礦物成分與菌絲重之比例, 亦頗一致, Vilsmeier 以含 0.1% CaO 之土壤試驗所得成績如下表:

(表六) 在培養液與在土壤所產菌綫之不同

日 期	菌 絲 重		灰 分 重		灰 分 %		平 均
	a.	b.	a.	b.	a.	b.	
2	1.3522	1.3758	0.0284	0.0273	2.10	2.08	2.2%
3	1.9873	1.9893	0.0476	0.0525	2.20	2.40	
4	2.4322	2.4692	0.0526	0.0502	2.20	2.16	
5	2.7930	2.7796	0.0578	0.0541	2.06	1.96	
6	3.0208	3.0410	0.0655	0.0705	2.17	2.31	

由上兩試驗可証明菌絲組織中所含之礦物成分，在培養液所得與在土壤試驗所得絕不符合；土壤試驗所得之灰分率加增實因菌絲尚可加入 CaO 及 SiO_2 也。

Vilsmeyer 更作一試驗⁽⁸⁾ 在各不同石灰含量各鉀質濃度之培養液下接種後，培養四日，再檢定菌絲中含磷酸之差異，得結果如下表：

(表七) 石灰含量及鉀質濃度與菌絲中磷酸之差異

CaCO ₃ %	K ₂ O 之 濃 度											
	0.002			0.005			0.008			0.02		
	菌絲重 (g)	P ₂ O ₅	CaO	菌絲重 (g)	P ₂ O ₅	CaO	菌絲重 (g)	P ₂ O ₅	CaO	菌絲重 (g)	P ₂ O ₅	CaO
0	1.4136	9.8	—	1.8112	9.8	—	1.9116	7.9	—	2.5431	15.1	—
0.05	1.3435	14.7	3.0	2.2614	22.2	sp.	2.2461	7.9	sp.	2.7642	21.9	1.0
0.10	1.3205	16.0	4.0	2.3664	26.0	2.6	2.4727	6.9	1.5	3.2010	27.8	2.1
0.25	1.3325	26.2	6.0	2.4697	24.2	5.2	3.1760	48.6	2.4	3.5210	31.8	10.6
0.50	1.4818	28.4	—	2.0854	61.1	25.2	3.1636	62.8	24.0	4.3620	41.6	32.1