

國立中山大學農學院

農林研究委員會

叢刊 第三類

農林化學系專刊第一號

白黴菌法測定廣東重要土系

有效磷質之結果

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

白黴菌法測定廣東重要土系有效磷質之結果

目 次

(一) 引言	1
(二) 前人之研究	1
(I) 研究歷史	1
(II) 試驗前之預備	2
1. 菌種之培養	
2. 培養液與樣土之預備	
3. 培養皿之構造	
4. 試驗程序	
5. 培養時期之研究	
6. 菌落量度法	
(III) 石灰土之處理	5
(IV) 吸收磷質之研究	5
(V) 本法與他法之比較	6
(VI) 實際土壤有效磷質之含量	7
(三) 本系之研究	10
(I) 白黴菌之形態	11
(II) 白黴菌之特性	12

(III)	培養溫度之影响	...	...	...	...	...	...	...	...	12
(IV)	土壤酸度對於白黴菌生長之影响	...	...	...	...	...	...	...	...	13
(V)	富於有機質土壤對於白黴菌生長之影响	...	...	...	...	...	...	...	...	14
(VI)	培養皿之改良	...	...	...	...	...	...	...	...	15
(四)	測驗廣東重要土系有效磷質之結果	...	...	...	...	...	...	...	...	15
(I)	各系各縣土壤有效磷質之比較	...	...	...	...	...	...	...	...	15
(II)	化學法黑麴菌法白黴菌法測驗珠江系土壤有效 磷質之比較	...	...	...	...	...	...	...	...	21
(五)	摘要	...	...	...	...	...	...	...	...	22

參考書

成績附錄

(一) 引 言

欲知某地土壤需要某種肥料之程度如何，通常用田間法以試驗之。此為最適合天然情形，亦最可靠之方法。惟需要長時期及多量人力、經濟、土地，及嚴密之管理不易成功。在目前之現狀，有急迫不能久待，及經濟人力之不容許以作普遍之試驗時，因於田間試驗，盆栽試驗諸法外，更佐以幼苗法，化學法微生物法。一方面可以互證所得結果之準確程度，他方面以迅速簡便之方法，短期中可作多數之試驗，以滿吾人之慾望，微生物法即本報告之所涉及者也。

微生物法中有 *Aspergillus Niger* 及 *Cunninghamella* 兩種。此皆新穎之方法，能於數日間決定數十個樣本之有效磷鉀之缺乏與否。*Cunninghamella* 法乃試驗磷質最簡捷方法之一，於 1934 年 Mehlich, Fred, Truog 等首先發用 *Cunninghamella blackesleeana* 試驗土中有效磷酸，幾經改良，認為良好之方法，蓋與 Truog 化學法，Neubauer 幼苗法頗能一致也。去冬本院鄧院長由美帶回 Truog 教授贈給之白黴菌種，因作廣東重要土壤有效磷酸之試驗，更與其他方法所得之結果互相比較，覺其簡而易行，相當可靠，特報告如下：此次所試驗者代表 239 個樣本，十縣面積，十三系土壤，雖不能代表全省，亦可知概略也。

(二) 前 人 之 研 究

(I) 研究歷史

白黴菌 *Cunninghamella* 法測驗土壤有效性磷質，創於美國威士康辛教授 A. Mehlich, E. B. Fred, E. Truog 氏等，初選採數種黴類如 *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus* 以供試驗，結果對於有效性磷質反應較為迅速者，以白黴菌為最顯著，尤以 *Cunninghamella Elegans*, *C. blackesleeana* 最適宜於此項試驗，*C. Eehinalata* 次之，最不適宜者為 *C. berthellette*。氏等曾經長時間之研究，如影响白黴菌生長各種因子試驗，及與其他方法比較試驗，結果成績甚佳，尤與田間試驗比較更為接近。即田間試驗表示有效性磷酸鹽饒足時，白黴菌生長必繁茂，極少例外。欲知其詳，可參考 Mehlich⁽¹⁾ 氏等原著。然氏等尤恐未臻完善，仍繼續研究改良工作，於去年 (1935) 提出國際土壤學會討論⁽⁴⁾，僉認為測驗有效性磷質方法中之最迅速簡便者也。

(II) 試驗前之預備

1. 菌種之培養

白黴菌對於磷質反應之速緩，與其生長年齡有關，據 Mehlich⁽¹⁾ 氏等之研究，年齡愈近，生長愈佳，至少一星期至多四星期。故菌種應以發芽力最強時，較為適當。具此條件，可培養於麥芽汁凝菜斜面上，(麥芽汁 2.5%，凝菜 2%)，每四個月至少轉植一次，藏於溫度較低地方，至試驗前一星期，移植於新鮮麥芽汁凝菜培養基上，其後加入培養液 1—2 c. c. 振盪之，務使孢子溶液 (Spore Suspension) 均勻，以供接種之用。然必須臨時行之，方為合理也。

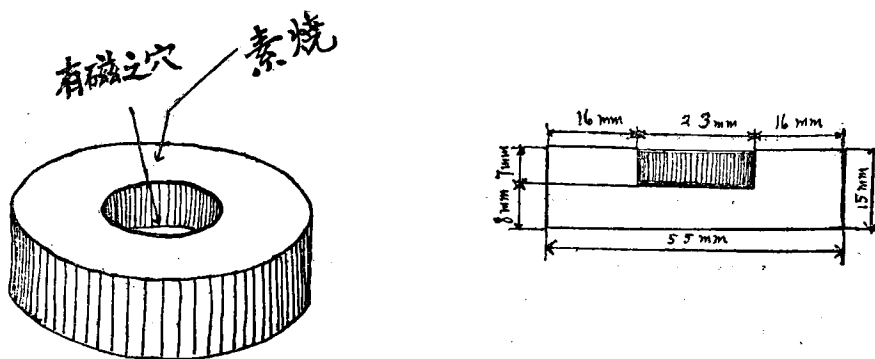
白黴菌試驗之培養液，絕對不加入磷質，使其取給於土壤，培養液分爲 (A) (B) 二種，(A) 可事前製備保藏之以待應用，(B) 必須臨時調製。

[illegible][illegible]

供試樣土無須特殊調製或經殺菌手續，惟必須將土風乾，磨砂之使其盡能通過 60 篩，即可應用也。

白黴菌試驗用之培養皿，乃 Mehlich 氏等最近改善者，爲一種

粘土燒成之紅色圓皿，直徑 55 m.m. 高 15 m.m.，中有入圓孔，直徑 23 m.m.，高 7 m.m.，孔內盪以白磁，水不能浸入，其他部份毛管水可自由滲透，使有相當濕度以供白黴之需要，其形式如下圖：



(圖 一)

4. 試驗程序

稱風乾幼土(通過 60 號篩者) 10 克，置於玻璃杯內，加入培養液 2—3 c.c. 使至飽和為度，此時濕度，最宜於白黴菌之發育。過多過少，均受抑制。用玻璃條搓磨之，使土粒互相黏附成團狀為止，充塞於培養皿穴內，稍為壓實，用刀邊或玻片光滑土面，勿使土黏於不光滑部份，多餘之土不要。用白金線環(約 3 m.m.) 挑取孢子溶液一滴(太濃太淡均不宜)，放於土面正中，置於玻璃器內，(此器可通空氣，能避免雜菌侵入)，內貯水高約 8 m.m.，接種後，放入 28 度至 29 度(攝氏)定溫器內培養四十八小時。

5. 培養時間之研究

一般絲狀菌(Fungi)最適宜溫度約在攝氏 30 至 32 度之間生長最爲旺盛，依此溫度培養 4—6 天爲最適當。然據 Mehlich 氏等之研究，似有未盡然者，須視菌種年齡，適宜培養液，恆溫等而定。白黴菌之生長，亦不能逃此限制。除此而外，白黴菌更受土壤種類之影響。惟在普通土壤試驗於攝氏 28—29 度 48—50 小時即可收穫。至於坭炭土或腐植土則須增至 50 小時以上至 72 小時，蓋四十八小時不能將有機態有效磷盡利用也。

6. 菌落量度法

培養時間充足後，用圓規量度菌落直徑，量度時應注意菌絲生長不一定成整齊圓形，則量度主要部份直徑爲最適當，其少許差參之處無須計較。用圓規兩腳測得菌落之直徑後，以米突尺度之，取其記錄與標準相較，定該土需要磷肥程度。

(III) 石灰土之處理

石灰質土其酸度恒在 pH 7.5 以上，極不適於 *C. elegans* 之生長，必須加以調節，使達於中性反應，方可遂其生機。惟用 *C. blakesleeana* 似無多費此種工作，生長亦如常態。現有一完滿手續，以簡單方法測定碳酸鈣之大概含量，加入適量之檸檬酸，然後試驗較爲妥善云⁽¹⁾。

(IV) 吸收磷質之研究

白黴菌對於有效性磷之反應，雖極靈敏，然其吸收磷量，恒受土壤磷質固定力之影響，更視其利用與消化能力而定。據 Mehlich 氏之解釋，土壤固定磷質力量愈強，白黴菌生長愈受抑制。換言之，白黴菌吸磷有限定範圍所維繫。處此範圍內，磷質供給雖多，亦難於利用云。關於此項問題研究，經 F. B. Smith, P. E. Brown 及 H. C. Millar 三氏試驗報告⁽²⁾。氏等培養白黴菌於各種不同含磷量之培養液內，共組成如下：

Dextrose...	1.0 %	此種培養	0.0123 尅
Peptone...	0.5 %	液內加入	0.123 „
硫酸鎂...	0.5 %	左列不同	1.230 „
硝酸鈉...	0.1 %		24.60, 36.9,
硫酸鉀...	0.1 %	份量之磷質	49.2, 73.8 等。

結果白黴菌吸磷最高量約 60 尅，由此觀之，白黴菌吸磷只在 60 尅內菌絲體之重量方隨磷質之多寡而遞升，在土壤培養生長之直徑亦依磷質而變動云。

(V) 本法與他法之比較

據 Mehlich 氏等之研究，測驗有效磷質所得結果，與其他方法如 Truog 氏化學法，Neubauer 幼苗法，Niklas 等氏黑麴菌法，Mitscherlich 氏盆栽法，Winograsky 氏固淡菌法，及田間試驗，均有同一反應。換言之，其他方法測驗某種土壤有效性磷質高者，白黴菌側向生長之直徑亦大。反之其他方法均證實某種土壤磷酸缺乏者，白黴菌

側向生長直徑亦小。而與田間試驗結果最爲近似。此種田間試驗成績，是美國各地試驗場及 Rothamsted 農事試驗場積多年之紀錄，甚有價值。然以白黴菌法測驗之，殊無多大差異，即田間試驗決定該土有效性磷或高或低，白黴菌側向生長直徑亦隨之以或大或小，抑尤有進者，如某種土壤栽植某種作物，施用某種磷肥，結果此種磷肥是否有效，作物產量能否因施磷肥而增加，甚難決定。然有時在實情之下，施用磷肥，未必即能表現其效力，如欲測驗其肥效，利用白黴菌法無以尚之。倘施用磷肥後取土測驗之，白黴菌之直徑在 22 m.m. 以下可證明此種磷肥之有效程度微之又微也。據 Mehlich 氏等之研究，施磷肥於小麥大麥、薯類、玉蜀黍、牧草等作物，白黴菌側向生長直徑在 24 m.m. 以下者，該肥效力極微。豆科，根類等作物，一經施用磷肥，白黴菌側向生長直徑大至 26—28 m.m.。馬鈴薯、葱、蕃茄、胡甜、蘿蔔大至 30 m.m.。然以大概而論，施磷之土壤，白黴菌側向生長直徑超出 36 m.m. 以上者，預期該作物必大大收穫也。此外 Mehlich 氏等又迭採鹼性及酸性土壤用 Neubauer 幼苗法與白黴菌法測驗其有效磷質以作比對，觀其所得結果，幼苗法測驗有效磷質在 5 尅以上算爲豐富，適與白黴菌落直徑 25 m.m. 相當。雖幼苗生長較白黴菌生長力爲強，而兩者所得之結果有同一之趨勢云。

(VI) 實際土壤有效磷質之含量

應用白黴菌法測驗土壤有效磷質之含量，雖可從菌絲菌體側向生長直徑大小之略值，以推測土壤有效磷質之需要量，惜無準確數

值,亦不過一種大概表示. Mehlich 等氏即利用密采西朱氏 (Mitscherlich) 試驗法⁽³⁾ 代入公式, 求出每畝土壤含有效性磷之磅數, 或每百萬磅含有效性磷若干磅, 其試驗法係採取十種土壤, 加入不同份量磷酸如 X_1, X_2 , 假定白黴菌落直徑為 Y_1, Y_2 , 而未加磷之菌落直徑為 Y_0 , 代入下式求出菌落直徑最大長度 A ,

$$A = \frac{(A - Y_0)(A - Y_2)}{(A - Y_1)^2}$$

A 既求出再代入下公式以求效果率

$$C = \frac{\text{Log}(A - y_1) - \text{Log}(A - y_2)}{(X_2 - X_1)}$$

最大生產 A 與效果率既知, 從下方程式關係可計算每百克土壤含有磷質有效量 b . (p. p. m.).

$$b = \frac{\text{Log} A - \text{Log}(A - y_0)}{C}$$

y_0 係未加磷質所得之菌落直徑, 表三為 Mitscherlich, Fred, Truog 三氏對於十種土壤試驗之結果; 並從此結果作成密氏生長弧線圖 (表四), 以後只量度白黴菌側面生長直徑, 再從弧線圖尋求有效磷質, 而決定土壤磷質之需要量, 大概標準如下:

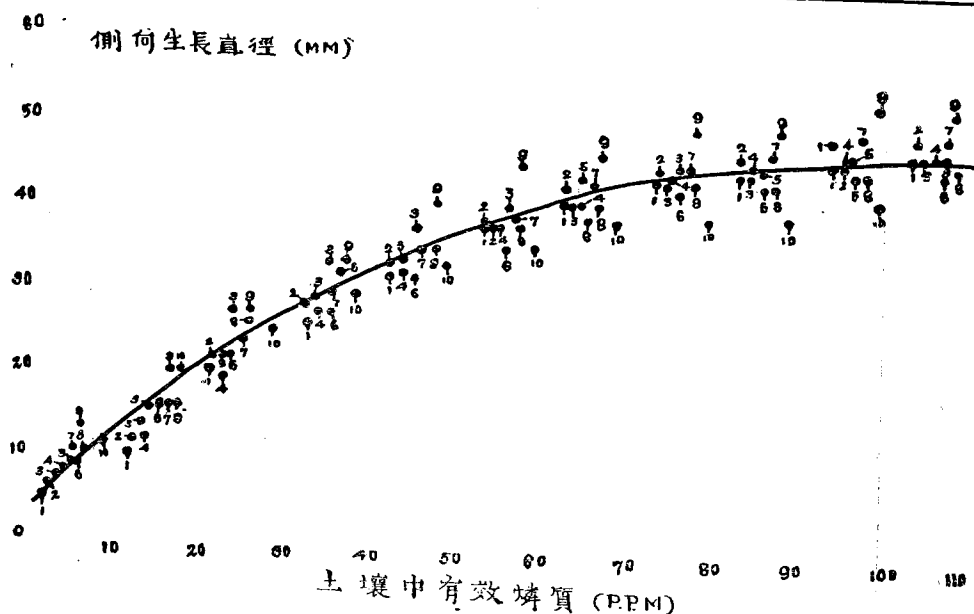
(表 一)

白黴菌在各種土壤上側向生長之直徑										
加入 磷質之 量	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Maro- hall	Miami	Carri- ngton	FOX	Maimi	Coloma	Dodg- eville	Plain- field	Knox	Wau- kesha
	埴質 壤土	埴質 壤土	埴質 壤土	埴質 壤土	埴質 壤土	砂質 壤土	埴質 壤土	砂土	埴質 壤土	砂質 壤土
P.P.m.	m.m.	m.m.	m.m.	m.m.	m.m.	m.m.	m.m.	m.m.	m.m.	m.m.
0	4	5	6	7	8	8	10	10	12	11
10	10	11	13	11	16	16	16	20	16	20
20	20	22	22	19	27	22	24	26	27	25
30	26	28	29	27	33	27	30	32	34	30
40	32	34	34	33	38	32	35	35	41	34
50	38	39	38	38	41	35	39	38	45	36
60	41	43	41	41	44	39	43	41	47	38
70	44	45	43	44	45	42	45	43	50	39
80	45	47	45	45	46	44	47	44	51	40
90	47	49	47	48	48	46	50	46	53	42
100	48	50	48	48	48	46	50	47	53	42
b *	2.4	2.9	3.6	4.2	5.0	5.2	6.1	6.6	7.0	8.5
c †	.158	.159	.155	.166	.172	.169	.151	.159	.155	.150

b* = 由下公式求得之有效性磷質 (P.P.m.)

$$b = \frac{\log A - \log (A - y_0)}{c}$$

c† = 每種土壤平均效果率



(圖 二)

由弧線讀出少於 8.5 p.p.m.

需磷特多

少於 9.5—14 p.p.m.

需磷正常

少於 15—21 p.p.m.

需磷少

大於 23 p.p.m.

不需磷

爲便利計可直接以側向生長直徑爲標準

直徑小於 10 m. m.

需磷特多

小於 11—15 m. m.

需磷正常

小於 16—21 m. m.

需磷最少

大於 22 m. m.

不需磷

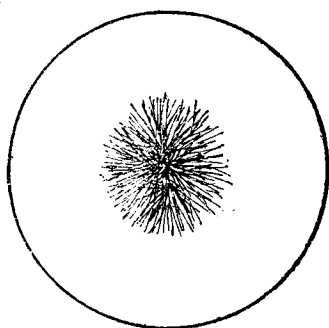
(三) 本系之研究

關於白黴之研究，不過最近數年之事，究竟可靠程度何如，我

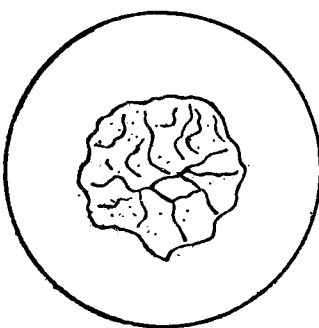
國人尙未加研究。惜關於此種參考書籍甚少，除已介紹其方法外，茲更下列數種試驗，答述於后。

(I) 白黴菌之形態

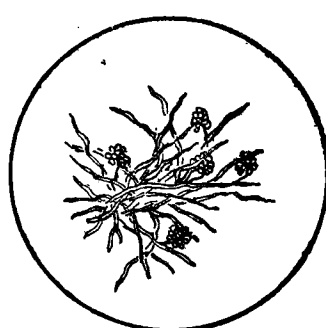
白黴菌直屬 Fungi 類 Rhizopus, 種類頗多, 已發現者有 *Cunninghamella elegans*, *C. blakesleeana*, *C. echinulata*, *C. herttiolotiae*, 現在本系所用者爲 *C. blakesleeana*, 欲觀察白黴生整個生物體, 或部份形態, 頗屬困難, 必須培養於凝菜(薄層)玻璃片上, 經 24—28 小時後, 用 100 倍顯微鏡, 觀察整個菌落 (Colonies) 之概形, 再用 450 倍觀察各部份之組織。若研究其生活史, 須每半小時觀察一次。白黴菌全體可分爲菌絲體 (Mycellium) 生長枝 (Globase) 生殖細胞 (Conidia) 孢子囊 (Ascophores) 四部份。其形態略如四圖。孢子囊幼時白色, 老變灰白, 用一百倍顯微鏡觀之呈綠色, 改用 1000 倍顯微鏡則呈褐色。形狀有圓形腎形數種, 幼時水份含量最高, 孢子囊亦較大, 直徑由 7—8u。成熟時直徑由 6.4—6.8 u, 至老反爲增大。直徑由 10—12.8 u, 孢子囊內含孢子 20—60 個, 構造單簡, 每個細胞, 直徑約 0.16—0.8 u。孢子枝 (又名生長枝) 與高等植物莖部相似, 直徑 2—4 u, 高約 6—12u, 生殖細胞爲生長孢子囊器官。菌絲體如帶狀或水稻葉狀, 色雪白。在高倍顯微鏡觀之, 透明無節。菌絲蔓延力極強, 能分泌粘液, 容易倒伏, 遇水則互相團結成菌皮。



(圖 三)



(圖 四)



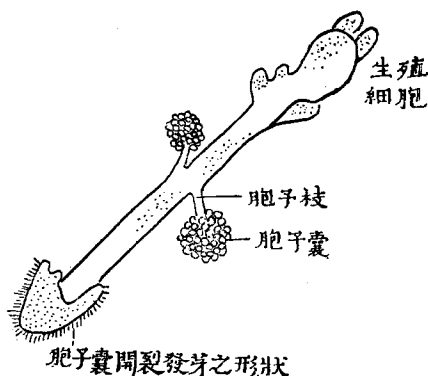
(圖 五)

(II) 白黴菌之特性

無論何種生物,均有一種特性,白黴菌亦有其特殊之點,其生長特別容易。一般絲狀菌 (Fungi) 大都於酸度較高之培养基亦易於繁殖,而白黴 *Cunninghamella blakesleeana* 生長於 pH7.5—8 反特別適宜,並且成熟期極速,普通三小時即能完成一世代,故在此短時間經接種白黴菌孢子之斜面凝榮試管,雜菌極難侵入。又白黴菌之孢子,菌絲,均呈雪白色,菌絲呈叢族狀,向上平鋪於培养基或土壤面上,若織蓆然(上圖三)。培養於液體培养基則成菌皮(如圖四),培養於扁平碟凝榮上,其菌絲及孢子之狀態有如第五圖。 (圖 六)

(III) 培養溫度之影响

關於白黴菌培養溫度問題,據 Mehl-ich 氏等之研究最適宜者由攝氏 28—29 度,然實際上本系從來試驗似覺未十分完善,蓋實驗結果 28—29 度,培養 48



小時，菌絲末端從未發現孢子（試驗法用水與菌絲混合以顯微鏡檢查之），既未顯現孢子，即菌發育未完全，菌絲有繼續生長之表示。然何由致此，豈因培養時間未足，抑因溫度未適宜耶？因作一試驗得結果如下表。由下表可知白黴菌在 30—32 度，四十八小時即生孢子，但菌落之直徑較小，表示此種環境不甚適合其生長，是則溫度不可高過三十度，時間不妨延長至七十二小時似較妥當。

土 系	培 養 溫 度 C°	培 養 時 間	菌 體 直 徑	生 長 狀 態
順 字 珠 江 系 3048	25°—26°	48 小 時	9 m.m.	未 生 孢 子
		72 ” ”	10 ” ”	同 上
	28°—29°	48 ” ”	11.0 ” ”	同 上
		72 ” ”	11.8 ” ”	生 孢 子
	30°—32°	48 ” ”	6.5 ” ”	同 上
番 字 珠 江 系 414	25°—26°	48 ” ”	9 m.m.	未 生 孢 子
		72 ” ”	9.5 ” ”	同 上
	28°—29°	48 ” ”	9.5 ” ”	同 上
		72 ” ”	10 ” ”	生 孢 子
	30°—32°	48 ” ”	7.5 ” ”	同 上

(IV) 土壤酸度對於白黴菌生長之影响

土壤酸度影響白黴菌生長，乃在無意中得見，因初時試驗一種紅色（羅崗系）腐殖土（龍眼洞系），接種白黴菌孢子溶液數次，均不生長，當時即可決定該土非因磷質太缺乏，即因酸度太高所致，乃取該土用 Quinhydrone electrode 法測驗之，前者為 pH3.3，後者為 pH3.1。由此可知白黴菌之生長亦受酸度之影响無疑矣。乃取樣土數種加入相當量檸檬酸，測驗其酸度。檸檬酸是加於培養液內用電極

測定其酸度，然後接種白黴菌。結果在 pH3 以下者生長極為羸弱，而前二種土壤所以不能使白黴菌生長者，固因有機質量多，磷酸或缺乏所致，酸度太低是其主要原因。下表乃此次試驗結果。由此可知酸性反應在 pH4.0 以下，則白黴之生長大受阻碍矣。

			百 黴 菌 側 向 生 長 直 徑 m.m.					
土 號	土 系		PH 7.0	PH 6.0	PH 5.0	PH 4.0	PH 3.0	PH 2.0
番 3016	珠 江		8.5	8.4	8.6	8.2	3.2	2.0
番 7001	珠 江		7.8	7.8	8.0	7.4	3.3	痕跡
中 3037	珠 江		11.28	11.0	10.9	11.5	4.1	3.0
莞 3010	珠 江		6.9	6.7	7.0	7.2	2.8	痕跡

(V) 富於有機質土壤對於白黴菌生長之影响

據 Mehlich 氏等之報告⁽³⁾，關於腐植土或坭炭土之培養時間必須由四十八小時延長至七十二時，蓋氏等之解釋則以白黴菌對於腐植土或坭炭土有效磷質較難利用也。此種解釋雖不能否認，亦嫌其不甚充份，因白黴菌善於吸收礦物性有效磷質，有機性磷質大部份為未分解者，較難吸收，白黴菌必須其本身分泌酵素或酸液溶解之。蓋培養液所能溶解者極為有限，即不然，亦須賴其他細菌分解後，方可利用之。同時富於有機質之土壤，雖含有富裕之磷質，受酸度之影响終變為難溶解性物質，白黴菌亦不能利用。倘欲為白黴菌所利用，延長培養時間，亦非良策，則調節之方有二：(1) 施入石灰質，(2) 燒去土中有機質。在理論上施用石灰可中和酸度，交換不溶解性磷