

微生物学实验法

〔日〕微生物研究法讨论会 编



科学出版社

内 容 简 介

为了在自然界现场中研究微生物,以期尽可能认识微生物的本来面目,本书着重介绍了许多把微生物和自然界直接联系起来进行研究的实验方法;也叙述了通常使用的和新近发展起来的方法。

全书共分九章。它们是:取样和直接观察,微生物的分离,菌株保藏,微生物细胞的观察,培养,生理性状观察,生物化学研究,遗传学研究,菌种鉴定。书末附有实验室设备、常用培养基、染色液和缓冲液的介绍。

本书可供微生物学科研究和教学工作者作为工具书和参考书。

微生物学实验法

微生物研究法懇談会編

講 談 社

1975

微生物学实验法

〔日〕微生物研究法讨论会 编

程光胜 李玲阁 张启先 樊洪业 译

责任编辑 王惠君

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

石家庄地区印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1981年12月第一版 开本:787×1092 1/16

1981年12月第一次印刷 印张:23

印数:0001—5,530 字数:520,000

统一书号:13031·1756

本社书号:2394·13—9

定价:3.55元

執 筆 者

相田徳二	郎	(茨城大学農学部農芸化学科)
阿部重	雄	(京都府立大学農学部農芸化学科)
伊崎和	夫	(東北大学農学部農芸化学科)
石川辰	夫	(東京大学応用微生物研究所)
市村輝	宜	(東京大学応用微生物研究所)
大嶋泰	治	(大阪大学工学部醸酵工学科)
岡見吉	郎	(財)微生物化学研究所)
笠原秀	夫	(日本醸造協会・聖徳栄養短期大学)
門田元	元	(京都大学農学部食糧科学研究所)
小嶋尚	夫	(株式会社ニッピ研究所)
後藤昭	二	(山梨大学工学部付属発酵化学研究施設)
駒形和	男	(東京大学応用微生物研究所)
斎藤日	向	(東京大学応用微生物研究所)
佐藤匡	匡	(東北大学農学研究所)
菅間誠	之助	(国税庁醸造試験所)
杉山純	多	(三菱化成(株)中央研究所)
須藤恒	二	(農林省家畜衛生試験場)
須藤隆	一	(国立公害研究所)
高橋甫	甫	(東北大学農学部農芸化学科)
竹内雄	雄	(財)微生物化学研究所)
田中健	治	(東京大学応用微生物研究所)
坪由	宏	(神戸大学教養部生物学科)
都留信	也	(農林省農業技術研究所)
中瀬	崇	(味の素(株)生物科学研究所)

仁	王	以	智	夫	(東京大学農学部付属愛知演習林)
西			荒	介	(富山大学薬学部製薬化学科)
西	尾		道	徳	(農林省農事試験場畑作部)
西	澤		義	矩	(東京大学応用微生物研究所)
野	白	喜	久	雄	(国税庁醸造試験所)
服	部			勉	(東北大学農学研究所)
長	谷	川	武	治	(財)発酵研究所)
林	部		正	也	(大阪市立大学理学部生物学科)
日	野		精	一	(広島大学理学部生物学科)
樋	渡		宏	一	(東北大学理学部生物学科)
福	井		作	蔵	(東京大学応用微生物研究所)
古	坂		澄	石	(東北大学農学研究所)
別	府		輝	彦	(東京大学農学部農芸化学科)
丸	山		洋	一	(東京都立大学理学部生物学科)
水	島		昭	二	(名古屋大学農学部農芸化学科)
湊			一	一	(農林省家畜衛生試験場)
宮	地		重	遠	(東京大学応用微生物研究所)
村	田			晃	(佐賀大学農学部農芸化学科)
村	田		伸	夫	(農林省農業技術研究所)
百	瀬		洋	夫	(高松国税局)
柳	田		友	道	(富山大学薬学部薬学科)
山	里		一	英	(東京大学応用微生物研究所)
山	田		雄	三	(静岡大学農学部農芸化学科)

译 者 的 话

将对象放到其本来所处的环境中来研究,大概是最易接近其本来面目的。因此,我们认为这本微生物学实验书,较之目前所能见到的其它同类书籍,有其不易多得的长处。诚然,本书只有不到一半的篇幅尽可能做到了这一点,但这足以给我们相当多的借鉴了。本书的其它部分,虽然是一些常规方法,但能在这不太大的篇幅里,尽可能详细地介绍更多的方法,又列出了供查索的大量文献,这对于读者,也将大有助益。

在为实现科学技术现代化的我国微生物学科科研工作者和教学工作者面前,我们奉献这本译作,希望能够被用作一件小小的工具。

译者才疏识短,熟悉的和曾经了解过的内容,所占比例不大。为了尽可能消除讹误,我们曾请有关同志审阅过部分章节,但是,难免仍有错译之处,我们诚恳地欢迎各方面的读者批评指正。

译 者

1979年4月于北京

前 言

现在多数从事微生物研究的人,一说起微生物,大概就会想到它们是在试管内培养出来的。然而,在试管内生长着的微生物,假若寻根溯源,也还是在自然界的某一地方生息过的。现在,大多数微生物用不着花多大力气就可以在试管内培养,并供作实验材料之用。微生物学之所以能发展到今天这般地步,正是前人非凡努力的结果。

十七世纪后期 Leewenhoeck 发明显微镜以后,跨入十八世纪时,关于生物自然发生说的争论,从动物界转到了微生物界。又经过了一百多年,好不容易由 Pasteur 和 Tyndall 等人收了场。在这场争论中,人们得到了一个印象:微生物相当普遍地存在于自然界中。因此,从十八世纪中叶起,人们开始怀疑:这些微生物是否是使人和动植物致病的原因呢?到十九世纪中叶,终于搞清楚了动植物传染病的起因是细菌。Koch 从患炭疽病家畜的血液中进行了病原菌的纯化分离,并成功地把所分离的菌接种健康家畜而使之发病,进一步又从该动物体内分离出了同样的病原菌,这就完全弄清了炭疽病的病因。差不多与此同时,不仅建立了植物病理的研究方法,而且到十九世纪后半叶,已经证明,在农业上很重要的硝化、氨化、固氮等过程是由于细菌的作用。

在这壮丽的微生物学的黎明时期,所建立的研究方法,正是生态学上称之为个体生态学的研究手段。但是,微生物的个体(细胞)微小,要处理它,简直无从下手,因而非使其个体数目增多不可,这就要进行纯培养。在 Koch 开展划时代的研究之前,前人已奠定了细菌灭菌法和培养法的基础。现在通常使用的加压灭菌法、棉塞、明胶或琼脂固体培养基,用接种针涂布培养和斜面培养等许多基本实验技术,在临近十九世纪末已基本上建立起来了。

随着为数众多的微生物被人们从自然界分离出来,对它们的鉴定和分类便成了大问题。就动植物分类学来说,十九世纪中叶达尔文发表《物种起源》后,以 Haeckel 为中心,使闢入了有关种的系统和进化思想的系统分类学,从以往的鉴定分类学中脱颖而出,并发展起来了。但是,微生物形态微小,基本没有组织上的分化,特别是细菌,连种的概念也不明确,所以还不得不完全采用鉴定分类学的手段。于是,根据各类微生物的特征,相应地确定了进行描述、鉴定、分类和命名的程序。另一方面,随着微生物遗传学的进展,到最近,已做了至少可以说是接近系统分类学的种种尝试。细胞 GC 含量的测定和 DNA 分子杂种形成实验等,从分类学上来看也正不断取得重大成果。

自十九世纪末 Buchner 偶然发现酵母菌的无细胞提取液进行的酒精发酵以来,开辟了现在称之为“破碎细胞的生物化学”这条道路,这是众所周知的事。以此为转机,向着分子水平挺进的生物化学发展起来了,而电子显微镜的发明带来了微生物细胞学的发展。到本世纪四十年代,由 Beadle, Tatum, Lederberg 等建立起微生物的遗传学方法以来,伴随着生物化学的蓬勃发展,带来了今天分子生物学的飞速发展。这样,微生物学就被融化进近代生物学中去了。在这类研究工作中,获得特殊的变异菌株,培养、收集菌体,破碎细胞,分部分离和提取等操作,已经常规化;同时,微生物的纯培养,从培养物中提取和

精制必要物质等工作,也活跃地开展起来。如果说得偏激些,在近代微生物学中,把微生物看作只不过是供研究或生产用的各种试剂或工具的看法,已经成了一股风潮。

最近这些年代,被认为是科学技术高度发展的时代,环境问题等给社会生活带来了不良的作用,这已为众目所瞩。在这种形势下,对微生物学来说,也正在出现应引起反省的事态。当感到涉及环境问题而必须从微生物学角度重新看待自然界时,人们已领悟到,自然环境的复杂程度,绝非试管内的环境所能相比。从个体生态学方面来说,借助纯培养可以在一定程度上了解自然状态下的微生物。但是,从群体生态学入手,因为构成群落的个体(细胞)微小,连掌握群落都是困难的。由于还不能从迄今所采用的纯培养方法中摆脱出来,所以还不能进行直接与自然界相联系的研究。可见,对于只和纯培养的微生物打过交道的研究者来说,甚至有关土壤或水中微生物的数目或重量这样一个极初步的问题,都会束手无策。不能说迄今为止就不存在以自然界为对象的微生物学,十九世纪末,Winogradsky 和 Beijerinck 发明了划时代的富集培养技术,从土壤中成功地分离了化能合成细菌;后来又有了迴流实验等许多技术,但是这种进展是迟缓的。这是因为人们还没有顾到这个带土腥味的领域。

针对这种状况,已故植村定治郎先生曾打算出版一本使工作返回到自然界中去的微生物实验书籍。尽管过去也有几本出色的微生物实验书,但它们或以医学微生物为中心,或只与发酵生产有关,却没有直接与自然界联系起来。植村先生把我们召集起来,在一起进行了讨论。我们对自然条件下微生物的认识,还很肤浅,但我们把讨论时的发言整理了出来,作为归纳前一阶段成果的界碑,这就是本书的基础。大家一齐动手编写时,植村先生逝世了,实令人悲痛至极。微生物学向自然界的复归,正是它走向现代化的新途径,从此出发,才能开拓出打破陈规的普通微生物学的道路,同时,这又是通向崭新的应用微生物学的道路。这就是植村先生的信念。如果本书稍微体现了这一信念,作者们就会感到欣慰。

根据这一宗旨,本书首先叙述由自然界采样的方法和直接观察样品的方法,接下去是叙述微生物的分离和分离出的微生物的保藏方法。这几章大概可以说是符合本书宗旨的一个具有特色的部分。以后的内容在以往的实验书中都写过,这就是观察法、培养法、生理、生化、遗传学研究法及鉴定方法。在这些章节中,尽量详述基本方法,也尽可能介绍近代技术。由于篇幅所限,无法详细罗列各项尚在改进中的技术,所以不少地方仅仅列出了文献。尤其是生物化学研究法一章,由于有关书籍很多,就只限于日常实验所必需的内容上。另外,在医学微生物学中很重要的免疫学问题,亦未涉及。

(下略)

柳田友道

1975年8月

目 录

第一章 取样方法和样品的直接观察	1
I. 岩圈表层	1
一、取样地点的选择	1
二、取样方法	2
三、观察时的处理方法	3
II. 表层土壤及植物体	4
一、取样地点的选择	4
二、取样方法	5
三、观察时的处理方法	7
III. 海水和海底沉积物	14
一、取样地点的选择	14
二、取样方法	15
三、观察时的处理方法	16
IV. 淡水、污泥、空气	17
一、取样地点的选择	17
二、取样方法	18
三、观察时的处理方法	20
V. 反刍动物第一胃	22
一、取样地点的选择	22
二、取样方法	23
三、观察时的处理方法	24
VI. 发酵食品	28
一、取样地点的选择	28
二、取样方法	29
三、观察时的处理方法	31
第二章 微生物的分离	37
I. 无菌操作	37
一、分离微生物时必备的器具	38
二、接种操作	39
三、无菌箱	40
II. 灭菌	40
一、干热灭菌	40
二、蒸汽灭菌	40
三、高压灭菌	41
四、过滤灭菌	42
五、药剂灭菌	42

III. 培养基的配制和种类	42
一、营养成分	42
二、其它因子	44
三、配制培养基的注意事项	45
四、培养基的种类	46
五、培养基的基本材料	47
IV. 分离	49
一、好氧性微生物	49
二、厌氧性微生物	51
三、噬菌体	53
V. 富集培养	58
一、一般技术	58
二、土壤迴流法	59
三、选择培养基	61
VI. 显微操作法	61
一、显微操作器的种类和特点	62
二、机械操作方法	62
三、解剖针的制作方法	63
四、单胞分离法	64
五、四分体分析	65
VII. 膜过滤	66
一、无菌过滤器	66
二、操作	67
VIII. 细胞分部法	67
第三章 菌种保藏	69
I. 菌株和培养物、保藏	69
II. 菌种保藏方法	70
一、传代培养保藏	70
二、降低代谢速度保藏	71
三、冷冻保藏	72
四、干燥保藏	75
第四章 微生物细胞的观察	88
I. 光学显微镜的一般操作方法	88
一、光学部分	88
二、机械部分	91
三、盖玻片和载玻片	92
四、照明	93
五、显微镜的种类	93
II. 显微镜照相	95
一、一般的显微镜摄影法	95
二、彩色照相	98
III. 微生物细胞的观察	99

一、细胞大小的测定	99
二、用血球计数板测定细胞数	100
三、未染色样品的观察	100
四、染色样品的观察	101
五、载片培养	104
IV. 电子显微镜	105
一、投影法	107
二、负染法	107
三、超薄切片法	107
四、冰冻蚀刻法	111
五、扫描电子显微镜	112
第五章 培养	114
I. 培养的一般问题	114
一、培养基的选择	114
二、种龄和接种量	114
三、培养时间	115
四、培养装置和温度	116
II. 培养	116
一、表面培养	116
二、深层培养	118
三、同步培养	122
四、连续培养	127
五、透析培养	134
六、研究细胞分化的培养方法	138
III. 细胞的收获方法	141
一、收获时的一般注意事项	141
二、离心法	142
三、用纱布或滤纸过滤收集菌体	143
四、特殊的菌体收集方法	143
五、微生物悬浊液的制备和保藏	144
六、培养液中高分子物质的浓缩	145
第六章 生理学性状的观察方法	149
I. 增殖的测定方法	149
一、细胞总数的测定	149
二、活细胞数的测定	152
三、比色法和比浊法	154
四、重量测定	155
五、叠集细胞体积的测定	155
六、ATP 的微量测定	156
七、统计处理法	156
II. 生理活性的测定方法	164
一、膜透性	165

二、呼吸与发酵	167
三、光合作用和光化学反应	172
四、固氮作用	176
III. 表面性状的测定方法	178
一、细胞表面的带电状态	178
二、与固体表面的相互作用	179
IV. 生长抑制物质活性的测定方法	180
一、稀释法	180
二、扩散法	181
三、自显术	184
四、微生物测定法	185
第七章 生物化学研究方法基础	192
I. 细胞成分的提取和定量	192
一、蛋白质	192
二、核酸	194
三、脂类	196
四、糖类	198
II. 细胞结构的分部分离	200
一、一般注意事项	200
二、细胞的破碎方法	201
三、细菌细胞结构物的制备方法	206
四、酵母菌和霉菌细胞结构的制备方法	211
第八章 遗传学研究法	217
I. 突变	217
一、突变的诱发	217
二、突变菌株的分离	221
三、营养缺陷型菌株所需营养物的确定	227
四、突变的分类	228
II. 杂交方法	231
一、细菌的杂交	231
二、酵母菌的杂交	241
三、霉菌的杂交	249
四、原生动物的杂交	261
第九章 鉴定	269
I. 目的	269
II. 各类微生物的检索表	270
一、细菌	270
二、厌氧细菌	277
三、放线菌	278
四、霉菌	286
五、酵母菌	292
六、微细藻类	296

七、原生动植物	298
Ⅲ. 鉴定的化学方法	302
一、免疫学方法	302
二、化学方法	306
附录一 实验室和实验室设备	319
附录二 培养基	324
附录三 染色液	342
附录四 缓冲液	344
索引	346

第一章 取样方法和样品的直接观察

无论是试图阐明自然生境*中微生物区系的变化规律，还是从自然生境中分离微生物，首先遇到的问题便是在什么时候、用怎样的手段从何处取得样品。

从组成自然生境的基本材料方面看，它不仅包含多种无机及有机化合物，其结构与存在状态也是多种多样的。而且，构成生境的成员，一方面受生境的制约，同时，与生境的改变有关的生物群落(包括微生物)的具体组成又因生境不同而有着显著不同。

所以，将这种生境作为研究对象时，有必要依其目的进行生境的划分和层次化。在地球微生物学中，可将生境分为大气圈、水圈及岩石圈；水田土壤微生物学中，可分为田面水、耕作层、犁底层和心土层。得以这样进行划分所根据的知识，主要是包括其它学科在内的过去科学成果的积累。预先区分这些被认为包含了化学、物理或生物性质上明显不同物质的对象，是为了最大限度地避免把不同性质的物质看成相同和作同样处理而引起的混乱。在这里要注意的是，这种划分毕竟是渐臻完善的。应该牢记，随着微生物研究的进展，原来认为性质不同的东西有可能在微生物学方面的性质是相同的，亦可能出现相反的情况。

所谓层次化，是指将生境加以简化，以便使分析某特定微生物特性的工作更易进行。与该种简化过程相应，便要将生境划分为几个水平。例如，在处理稻田这样一种生境时，就要分成若干个水平，以便明确稻田本身所包括的，并对分析稻田生境有重要意义的各个方面。如舍弃水稻这个层次，处理团粒水平的微生物，以至于舍弃团粒结构来处理菌落水平的微生物。各个水平中微生物的变化规律一般是既包含相同之点，又包含相异之点。为了使低水平上的规律与高水平上的规律相统一，就有必要进行再组成的过程，以便判断不同水平之间的异同点。关于这种方法论的详细介绍，请参考其它书籍^[1]。

层次的划分，也和生境的划分一样，不是绝对的。在开始进行研究时，难免有颇多的主观臆断，而随着研究的发展就可逐渐明确其客观位置。换言之，将生境划分为层次时，需要充分发挥研究者的敏锐观察力和洞察力，以及文献知识。

下面选取自然界中有代表性的生境，来说明对生境的观察、划分及层次化的实例。

I. 岩 圈 表 层

一、取样地点的选择

调查研究自然生态系统中无机和有机化合物的转化与微生物作用的相互关系，为地球微生物学提供了许多基本资料。沉积环境中地球微生物学的研究，和地球上未被利用的矿物资源，首先是可燃性气体、化石燃料资源的探索、开发有关，因而受到人们的重视。

* 这里所说的自然生境不仅指未经人为干预的环境，还包括组成、结构、存在状态、以至于连微生物组成方面都很复杂的那种人为的混合培养状态，例如酒醪、青贮饲料等。

地球微生物学假定,有关微生物作用的生境是大气圈的下层、整个水圈和岩圈表层。这些调查研究的对象也是和生物圈的概念相统一的。但是,取样地点则是由调查研究的目的及技术的进步所决定。这里,只限于叙述岩圈表层,特别是地壳表层。关于水圈请参照Ⅲ、Ⅳ两节。至于大气圈,在日本还未进行过全面研究。

岩圈表层,特别是地壳表层,由于物理的、化学的及生物的风化过程而决定着无机、有机化合物的重新分布。地壳表层的重要作用因子与水的存在状态及其移动有关。为了调查研究地球微生物在生物圈内的作用,必须考虑水的动态。

各种微生物类群通过其多样化的功能参与自然生态系统中无机、有机化合物的转化过程,但是,参与各种重要转化反应的微生物种类一般有一定程度的限制。影响地球上未能被利用矿物资源的重新分布的微生物——细菌、丝状菌、微细藻类、原生动物等,正是我们调查研究的对象(参见表 1-1)。

表 1-1 参与铁、锰转化的微生物

	化 学 式	起 源	矿物生成菌	矿物分解菌
菱 锰 矿	MnCO_3	沉积性	硫酸盐还原菌	细菌、丝状菌
菱 铁 矿	FeCO_3	沉积性, 热水性	细菌	细菌、丝状菌
水 锰 矿	$\text{Mn}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	} 沉积性	细菌	细菌
方 锰 矿	MnO		丝状菌	
黑 锰 矿	Mn_3O_4		原生动物	
针 铁 矿	$\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$			
赤 铁 矿	Fe_2O_3			
磁 铁 矿	Fe_3O_4			
硫 锰 矿	MnS	} 沉积性、热水性	? 硫酸盐还原菌	? 铁氧化菌 硫磺氧化菌
陨 硫 铁	FeS			

二、取 样 方 法

微生物取样方法按其对象大致可分为以下三类: ① 从表层露头取样; ② 从沉积环境取样, 以及③从地壳深层取样。

(一) 从表层露头取样

除去露头表面, 使其露出新鲜的岩面。即使是在相邻接的地层, 如果岩相不同, 就可以看到微生物群落的构成也会有很大的变化。在一个层理面之内, 水平方向较之垂直方向由于部位不同而出现的变动幅度较小。

于层理方向 1 米范围内取出厚度在 20 厘米以内的样品。一般在此 1 米范围之内按中央和两端三点取样, 并将此三个样品混合成为一个试样, 试样的重量必须在 200 克以上。

取样时应注意将层理或矿体上方的试样除去。已重结晶的部份岩块也应去掉。这是因为特殊的微生物群落会在局部地区呈斑点状分布的缘故。

取样时一般应注意以下各点：① 要特别注意防止试样间的混杂；② 使用新的标本袋(聚乙烯制)，登记各袋的产地、标本号、采样年月日，绑上运输标签；③ 试样保存箱一定要贴上标签；④ 取样时手要尽可能清洁。

(二) 自沉积环境取样^[2]

通过分析沉积物(底质及其沉积岩)的微生物群落，可以掌握探索和阐明沉积环境和矿物矿床的手段。未凝固沉积层和固结岩层试样的取样方法有很大的不同。

未凝结底质试样可用采泥器采取之。采泥器有凿入式和抓斗式之别。凿入式采泥器是获取一部份沉积物，其缺点是采泥地点不明，同时由于试样被搅动而无法在进行生态调查时进行定量分析。这种器具可用于采集大量试样、砂砾沉积物和岩盘试样。抓斗式采泥器可以限定一处取样地点，不管多少层次，取样部位的层序都很分明。Ekman 平底型采泥器多用于采集湖沼、内海湾泥质的堆积物(参见第IV节第二部份)。从采泥器取出底质试样时，要是特别注意，就可以不致弄乱一定面积(15×15 厘米)、层厚 10—15 厘米范围的沉积状况，并进行观察。

此外，用投下式柱状采泥器可采集完整无损的柱状试样。已有大小多种的重力柱状采泥器，还有轻便的手提式采泥器，它可以采集重量为 20 公斤、长可达 150 厘米的试样。用投下式活塞型柱状采泥器可采集 5—15 厘米的柱状试样。

(三) 自深层地壳取样

通常用于挖掘油井、温泉的旋转式试锥机可用来采集固结岩层的试样。由取样内管取出岩芯试样时，应削去表面以除掉泥水造成的污染。经初步破碎后，密封于样品袋或培养瓶内，再送往实验室。应同时采集岩芯试样、碎屑试样和泥水试样。一般钻头挖掘深度为 3,000—3,500 米，应每隔 100—200 米取岩芯。

一般供观察微生物群落的沉积物，在岩质方面有软泥、泥浆、凝灰质泥岩、页岩、泥炭、草泥炭等。而特殊的岩相有温泉沉积物、褐铁矿床、硼砂矿床、煤、石油、硫磺等各种矿床。

自深层地壳挖掘的试样，在地表面常压下其体积会膨胀，所以在试样表面会产生细微的裂缝和孔隙。这样生成的裂缝、孔隙会吸收空气、泥水，从而会使试样受到次生性污染。为了判断是取样中固有的微生物抑或是污染的微生物，要进行对照检查。

观察岩相变化时，有时必须每隔数毫米进行取样。观察试锥试样时，技术上的缺陷和记载上的遗漏要慎重检查。

三、观察时的处理方法

(一) 试样的前处理

在处理沉积物试样时，为避免来自非试样中的微生物混入，所采取的措施与处理一般

微生物时的相同。

岩芯试样可用 15% 双氧水洗其表面 2 分钟,然后在 60°C 加热灭菌,或是用煤气灯火焰进行一分钟杀菌处理,即可供作观察。也可用灭菌乳钵捣碎岩芯试样,使成粉粒状来进行观察^[3]。

(二) 标本制作

可用表面复印法制作沉积岩试样。即把采集的岩块切断成 1 立方厘米的小块,将它放到酚醛塑料上,用金刚砂磨石打磨,再用直径为 0.05 微米的 γ -氧化铝尼龙砂布打磨。

取一小块试样浸于 4.91% 的氟氢酸中进行腐蚀。在常温下处理 60、90 或 180 秒,如 60°C 加温,则以 30 秒为宜。在真空蒸发装置中以 2:1 角度在试样表面上喷涂铂,然后用碳膜复印。将其表面切成 0.5 平方厘米大小,使铂碳复印薄膜悬浮在稀氟氢酸溶液中,然后捞在电子显微镜用的铜网上^[4]。

在表面复印的同时,比较超薄切片法和氟氢酸浸渍法制成的试样的电子显微镜照片。也可和扫描电子显微镜照片进行比较^[5]。

这种试样制备方法对于研究多数试样时,或试样中含有有机物时有效。为了不破坏有机物残骸的细微结构,最好用稀氟氢酸溶液进行长时间处理。含有未凝固底质或有机物残骸等的试样,可包埋于聚乙烯树脂中,用超薄切片机金刚刀制成超薄切片(0.05—0.15 微米)。

在采集微生物试样时,必须随时注意污染问题。首先,要用几种不同的方法制作同一试样标本,进而对表面处理的试样各个部份进行观察。除用光学显微镜或电子显微镜观察外,对于铁、硫磺矿床等试样,也可考虑用 X 射线微量分析等方法。

微生物试样可用磨光的断面和薄膜切片进行研究。而分析磨光断面宜采用钙化的硬组织。即预先将试样包埋在合成树脂中以后,在分析之前用金属显微镜或立体显微镜进行拍照,这样可起到鉴定分析位置和阐明其结构的作用。

薄膜切片(3—5 微米)可按一般的组织学方法制作。这一方法可用于软组织或钙化程度较低的硬组织。在进行脱水、包埋、切片处理过程中,要注意使混入污物和移动物质部位的情况减少到最低限度。制备之前最好预先用 70% 乙醇或 10% 福尔马林固定试样。上述试样制作方法仍有许多改良的余地,特别是有必要考虑微生物试样的多样性和复杂性。

II. 表层土壤及植物体

一、取样地点的选择

(一) 表层土壤

在微生物的栖息环境方面,应根据不同的研究目的着眼于特征性的、被认为有质的差异的部位,即① 土壤类型(土壤分类法因研究者而异^[6],在日本一般分为酸性土、褐色土、

红色土、黑色土、灰壤土、未熟土等,它们往往又各被分为几种类型。有时还注意到特殊土壤,如火山灰土和泥炭土等);② 地形(方位和在斜面上的位置等);③ 层位(氧化层和还原层,耕作层和犁底层,冲刷层和沉积层,岩层及有机物层,矿质层等);④ 同一层次内的微小部位(根际和非根际、有机物或无机物的斑点、团粒或柱状等形式的结构)。

采集地点必须选择容易到达,可能在较短时间内将试样运回的地方,而且即使由于采集样品搞乱了现场,应仍可继续采样。为此,应有一定大小的面积(其中在土质和层位深度等方面不会因部位不同而出现差异)。已确定的采集地点应着意管理,使其不致因施工等所破坏。

(二) 植 物 体

植物体上微生物栖息部位不同,其特征有很大的不同。因此,采集时对该植物体的结构要充分了解清楚。采集之前要注意以下几个方面:

1. 叶面

叶面是微生物栖息的特殊场所,要考虑叶位、叶龄、叶片正反面,在一片叶上的取样部位(例如和叶脉的关系)。

2. 根

在根的表面栖息着各种微生物,有的寄生在根部,对植物有病原性;有的形成根瘤或菌根,和植物成共生关系。除这些特殊的结构之外,还要注意到吸收过程进行得旺盛的近顶端白色部份(包括根毛),已木栓质化的着色部位,根表面和内部的差异等。

3. 枝干

树木的躯干是木材腐朽菌的栖息场所。一般选取经砍伐的树木或树桩,特别以正在腐朽的或长有蘑菇的为宜。要注意腐朽部位的颜色(由于木质素分解菌的作用而呈白腐;由纤维素分解菌作用而呈褐腐)。也常常可以从生长着的树木的根周围长出有蘑菇的地方分离出腐朽菌。从边材、心材、形成层可以分离出各不相同的微生物。在分离形成层的菌时,要注意树干凹部或从外部所见颜色发生了变化的部份。

二、取 样 方 法

(一) 表 层 土 壤

因为所取得的样品,要根据实验目的表示一个单位内某种微生物的性质,所以,要尽力避免可能带来不正确结果的因子混入。为此,应注意以下几点:

1. 采集点的数目

随实验目的不同,预定的单位大小不同。若所取单位越大,所含不均一因素就越多。因