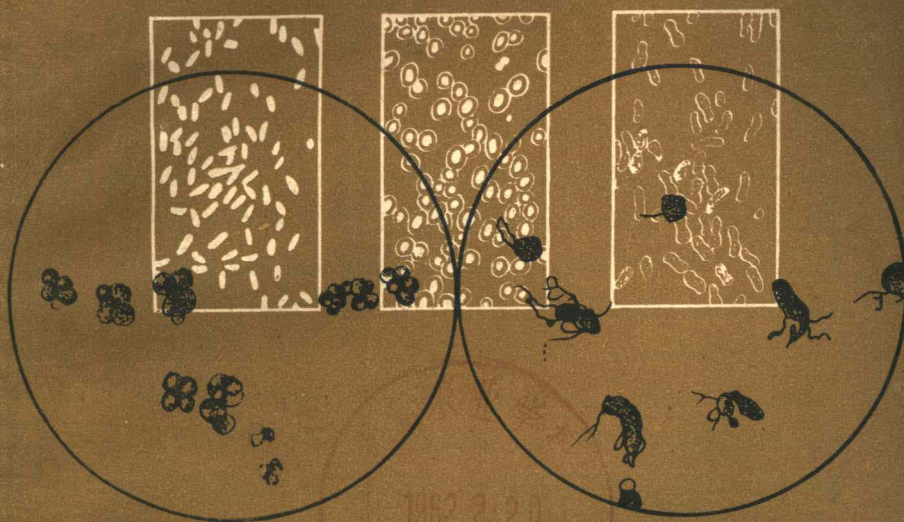




中国农业科学院土壤肥料研究所

陈子英 陈廷伟 编

土壤微生物分析法

上海科学技术出版社

內 容 提 要

土壤微生物分析是指土壤中微生物区系的測定和計數等而言,是土壤普查、搞清土壤底細以至提高农业产量的一項重要工作

本书主要介紹土壤微生物分析方面的几种具体方法。內容分三部分:第一部分介紹一般土壤微生物——包括細菌、真菌和放綫菌的分析方法;第二部分介紹作物根际微生物——特別是根系微生物的分析方法;第三部分介紹土壤微生物的一种簡易观察法——埋片法。最后,附录“关于全国主要农作物区土壤微生物定期定位观测规划綱要草案”全文。

本书可供各地县級和公社內土壤普查、細菌肥料制用方面以及有关农业微生物的工作人员和教学研究人員参考。

土 壤 微 生 物 分 析 法

中国农业科学院土壤肥料研究所

陈子英 陈廷偉 編

*

上海科学技术出版社出版

(上海瑞金二路450号)

上海市书刊出版业营业許可証出 093 号

新华书店上海发行所发行 各地新华书店經售

上海市印刷四厂印刷

*

开本 787×1092 1/32 印張 1 字數 21,000

1959年7月第1版 1961年11月第2次印刷

印數 3,001—4,000

統一書号: 16119·178

定 价: (十) 0.12 元

前 言

1958年农业大跃进中的深耕改土运动給农业微生物工作者提出了許多問題：深耕足肥对土壤微生物有什么影响？土壤微生物能否用来提高农业生产？怎样利用它們？要解决这些問題，不仅理論上沒有多少資料，而且，首先碰到的困难是采用什么方法进行研究，應該观测哪些項目？党向我們指出了一个明确的方針：應該結合生产来研究土壤微生物；應該把土壤微生物与土壤肥力、植物营养联系起来，不能为研究而研究；采用的方法必須既科学又簡便。这种正确的思想指导給我們很大的信心与力量。經過多次的試驗摸索，初步地找到了一些切实可行的观测方法；在观测的項目上我們采用了与土壤肥力、植物营养有关的許多項目，其目的是为了对进一步研究利用土壤微生物来提高农业生产准备一些資料。

本书所介紹的方法是一个初稿，而且只是观测土壤微生物方法中的一小部分。內中“土壤微生物分析法”部分，在1959年全国农业微生物科学技术座談会上曾經进行討論，作了修改；但缺点一定还有存在，希望讀者批評指正。

目 录

前言

I 土壤微生物分析法.....	1
一、采样.....	1
二、土壤微生物分析.....	3
(一)准备工作.....	3
(二)稀释土样.....	4
(三)分析方法.....	5

II 根	18
一	19
二	19
三	19
四	20
五	20
六	21
III 土	23
一	23
二	24

三、观察方法..... 25

四、记载方法..... 25

附录

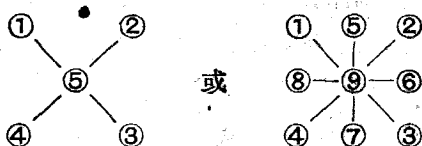
关于全国主要农作物区土壤微生物定期定位观测计
划纲要草案..... 28

I. 土壤微生物分析法

一、采 样

采集土壤作微生物分析，必須取到某块試驗地的中間型土壤，严格要求土样不能混入样品以外的土粒和杂物，一切采土和装土用具均須进行灭菌。

从耕地中采集土壤一般要求采 5~9 个点，用交叉的方法定点，即：



定点必須避免在低陷、小土丘、路旁及其他特殊的地方采土。

分层采土时，可以将几个点的土壤分层用布袋或其他容器装好(布袋或其他容器須事先用高压灭菌)土样最好随时放入密闭的容器中，以免阳光曝晒或干燥。

为了能够在有作物的試驗地少损伤或不损伤作物，不必挖坑取土，可以利用土钻分层取土。取土时必须非常仔細，避免上层土壤下落，同时每取一层土样之后，必須将土钻上殘土除尽，用棉花沾酒精将钻头灭菌。

每个装土布袋或其他容器必須编号記載，最好用硬紙卡片登記。如：

①編號 No_____

②取土日期 _____年____月____日_{上午}

③取土地点

④土壤层次

⑤作物

⑥采集人

土样采取后，应立即携至实验室进行处理。将同层土壤混合放入已灭菌的瓷盘中，用已灭菌的小刀拌匀，除掉杂物，随即依照所要分析的项目分别称取土样，除全氮全磷可以在风干后称土之外，其他有关土壤微生物与土壤养分的分析，都要求拌匀后立刻称土，分别进行分析。

应立刻进行分析的项目有：水分、酸硷度、氧化还原势等。

(1)水分：事先准备好必要数目的小铝盒或称量瓶，将它们在 105°C 的温度下烤 4 小时，然后放入干燥器中冷却，称量，分别记载它们的重量(a)；放入 5~10 克的土样，与铝盒一同称量记载它们重量(b)；把称好的土样(两个重复)，放入 105°C 的温度下烤 4 小时，取出放入干燥器中，冷却后称一次，接着放入烤箱中烤 2~3 小时再称，如此重复，直到最后两次的重量相小于 3 毫克时为止，把最后两次的平均重量 (c) 作为干土与铝盒的重量，然后再计算它的含水量(%), 即：

$$\text{水分}\% = \frac{b-c}{b-a} \times 100$$

a——铝盒的重量

b——铝盒与湿土的重量

c——铝盒与干土的重量

为了求得每 1 克干土中的微生物数量或某种土壤养分的含量, 必须求出水分的系数, 即:

$$\text{水分系数} = \frac{100}{100 - \text{水分}\%}$$

将所得的每克湿土中的微生物数量或养分含量乘以水分系数, 即得每克干土中的微生物数量或养分含量 (参看分析方法 1. 平面计数法)。

同样可以用上法求得作物植株中的水分百分数与水分系数。

(2) 土壤的酸硷度: 称 10 克土壤放入 50 毫升 (c.c.) 的蒸馏水中 (5:1), 在摇篮机上摇 5 分钟, 用 pH 计或比色法测定土壤中的酸硷度。

(3) 土壤中的氧化还原势: 用测 pH 的方法提取土壤浸出液, 在电位计上测定。如果用苏式 $\pi-4$ 电位计可同时测定 pH 与 Eh 值, 但在测 Eh 值时不必加氢醌。

另外, 可以用甘汞和铂金电极直接测定土壤中的氧化还原势。

至于测水稻土中的氧化还原势, 还有一个简便的办法: 用直径 5~6 厘米、长约 20~30 厘米的大玻璃管, 垂直插入稻田中, 然后用手从底下将玻璃管连土一齐取出, 随即将玻璃管携回室内, 可以分层测定水稻土中的氧化还原势。但在密植的条件下, 往往受根系的影响, 而使 Eh 值升高。

二、土壤微生物分析

(一) 准备工作

进行分析前必须将所需要的用品和培养基灭菌备用。假如

要分析一个土样,所需要用品如下:

(1) 300 毫升三角瓶 1 个,内盛 100 毫升冷开水;瓶中应放入 20 克左右小玻璃球或小卵石,以便粉碎土粒。

100 毫升三角瓶 7 个,内盛 45 毫升冷开水。以上三角瓶均用高压蒸汽灭菌。

(2) 10 毫升吸管 7 支,顶端须用棉花塞好(长约 3 厘米)将露出的棉絮在酒精灯上烧去,然后用干净报纸包好,再用高温干热灭菌($160\sim 170^{\circ}\text{C}$) 2 小时。切勿超过 180°C ,以免将棉塞及包纸焦化。

(3) 1 毫升吸管的用量根据分析项目多少决定,每一项目需要 1 支。高温干热灭菌、包紮方法同上。

(4) 培养皿每 1 项目需要 6 个(取 3 个稀释度,2 个重复)。用旧报纸包好后高温干热灭菌。

(5) 各种培养基,经高压灭菌后备用。液体稀释计数法用的培养基管,事先在试管架上排列好并在架上贴上标签。每一项目用 10 支试管(取 5 个稀释度,2 个重复)。最好用 5×10 或 10×10 孔的试管架。

所有用品及培养基经灭菌后置于干净橱中保藏备用。除预定需要数量外,还须准备一定的备用品,以备意外需要。

(二) 稀释土样

称取 10 克拌匀的土壤放入盛有 100 毫升无菌水和小玻璃球的三角瓶中,放在摇篮机上摇 5~10 分钟,或用手摇搅也可。将摇搅后的悬浮液静置 30 秒钟,然后用无菌吸管按 10 倍顺序稀释。如分析项目不多时,更大的稀释度可用试管顺序稀释(9 毫升无菌水中接入 1 毫升悬浮液);否则最好用三角瓶(45 毫升无菌水接入 5 毫升悬浮液)稀释,以免接种材料不够。

土壤稀釋液制备后,再根据需,选择一定的稀釋度接种。接种量为每次 1 毫升,与培养基混合均匀。接种稀釋度的选择可根据各地不同土壤中微生物区系数量确定。一般的如牛肉汁培养基,无机合成培养基,氨化、反硝化培养基及其他有机培养基等可以选择第 4、5、6 次稀釋度接种;而无氮培养基、硝化培养基、分解有机磷与分解纖維培养基可以取第 3~5 次稀釋度,甚至可从第 2 次起,因为在这些培养基中細菌的数目往往很少。同时,在作物生长旺盛时,必須把稀釋度加大,可以稀釋到第 8 次,因为这个时期的菌数比較多。

稀釋时每一稀釋度必須用一新取的无菌吸管;接种时如吸管不多,可由高稀釋度向低稀釋度順序用 1 支吸管接种。

(三)分析方法

I. 平面計数法

細菌、真菌、放綫菌及固氮菌一般采用平面計数法,即根据培养皿中生长出的菌落数計数。計数标准为:放綫菌与細菌以 20~300 个菌落为准,真菌及固氮菌以 10~100 个菌落为准。从两个重复的培养皿中得出平均数字,再乘以稀釋倍数即得出每克湿土中的微生物数量,然后将所得的数字乘以水分系数即得出每克干土中的微生物数量。

有时高倍稀釋度中的菌数反而多于低倍的,其原因很多:一方面受細菌相互間生理特性的影响,一方面可能由于操作上的关系,例如前后两次培养基的 pH 值或培养时溫度有某些差別,而使得菌数悬殊很大。因此;对于每次分离或每个操作过程,要用最大的可能求其一致。

(1)好气細菌

培养基(牛肉膏培养基)

市售牛肉膏	3 克		
蛋白胨	10 克	琼脂(即洋菜)	15 克
葡萄糖	10 克	自来水(或开水)	1000 毫升
食盐	5 克		

用 10 % Na_2CO_3 将酸硷度调节到 $\text{pH} = 7.2 \sim 7.4$, 高压灭菌。接种后将培养皿反轉置保温箱中 ($28 \sim 30^\circ\text{C}$) 培养 48 小时后計数, 并挑出优势菌株以便純化。

(2) 嫌气細菌

培养基与好气細菌的相同。接种后放入嫌气罐中置保温箱內培养 48 小时后計数。嫌气培养罐可用有开口的干燥器联結抽气装置。以美藍指示剂^① 1 小管指示罐中嫌气状态, 如美藍液面以下保持无色状态則为滿意条件。其余詳細方法可参考微生物实验等书。

(3) 真菌

培养基 用鏈霉素孟加拉紅培养基, 目的是为了抑制細菌的生长以免影响真菌計数。培养基不调节酸硷度。

葡萄糖	10 克
蛋白胨	5 克
KH_2PO_4	1 克
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 克
孟加拉紅 ^② (1/300 溶液)	10 毫升

① 美藍指示剂: (1) 6 毫升的 1/10N NaOH 用蒸餾水稀釋到 100 毫升, (2) 3 毫升的 0.5% 美藍稀釋到 100 毫升, (3) 6% 的葡萄糖溶液; 等量混合以上 3 种溶液, 加热至美藍褪色后迅速置于嫌气罐中。

② 孟加拉紅(Rose Bengale): 先配成 1/300 的溶液, 每 1000 毫升培养基加入 10 毫升即成 1/30,000 的溶液。

鏈霉素 ^{① ②}	20微克 ^③ /毫升
琼脂	20克
水	1000毫升

(4)放綫菌

培养基

可溶性淀粉	10克
KNO ₃ (或 NaNO ₃)	2 克
K ₂ HPO ₄	1 克
KCl	0.5克
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5克
FeSO ₄	0.01克
琼脂	15克
水	1000毫升

pH=7.2

为了抑制細菌生长便于放綫菌的計数可用千分之五的石碳酸处理土样。每 100 毫升土壤悬液加入10%的石碳酸 5 毫升处理 10 分鐘(搖晃 5 分鐘,再靜置 5 分鐘),可得到滿意的效果(注意:处理后的土壤悬液不能另作細菌数量分析之用)。或者用加入鏈霉素(30 微克/毫升)的方法也可抑制細菌的生长。

- ① 鏈霉素要在使用培养基时加入,不能經高压灭菌。因此,必須用无菌操作法稀釋和使用时加入。
- ② 鏈霉素稀釋法: 用消毒注射器吸取 4 毫升无菌水注入 1 克装的鏈霉素小瓶中,即稀釋成每毫升含 0.25 克鏈霉素。再用注射器抽取此溶液 1 毫升加入到 49 毫升无菌水中即稀釋成 0.005 克/毫升(= 5 毫克/毫升=5000 微克/毫升)。此溶液在每 1000 毫升真菌培养基內加入 6 毫升即成含鏈霉素 30 微克/毫升。
- ③ 1 微克= $\frac{1}{1000}$ 毫克。

此外，也有用淀粉铵培养基和克氏合成 1 号培养基测定放线菌数量。二种培养基的配方如下：

淀粉铵培养基

可溶性淀粉	10克
K_2HPO_4	1.0克
$(NH_4)_2SO_4$	2.0克
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5克
$FeSO_4$	0.01克
KCl	0.5克
琼脂	15克
水	1000毫升
pH=7.6~7.8	

克氏合成 1 号培养基

葡萄糖	20.0 克
K_2HPO_4	1.0 克
KNO_3	1.0 克
$MgSO_4$	0.3 克
NaCl	0.2 克
$FeSO_4$	0.001克
$CaCO_3$	0.5 克
琼脂	15 克
水	1000毫升
pH=7.0	

(5)固氮菌

培养基 用安息香酸钠(苯甲酸钠)培养基。这种培养基对其他微量嗜氮细菌有抑制作用，而对好气性自生固氮菌有促使产生黑色素作用，便于计数。

安息香酸钠	1~2克
K_2HPO_4	0.2克
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2克
NaCl	0.2克
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	0.1克
琼脂	15克
水	1000毫升
pH=7.4~7.6	

此外，也有用瓦氏 77 号培养基及阿息比培养基计数的，二

种培养基的配方如下:

瓦氏 77 号培养基

甘露醇	10克
K_2HPO_4	0.5 克
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 克
NaCl	0.2 克
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	微量
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	微量
1% 剛果紅	5 毫升
琼脂	15克
水	1000毫升

pH=7.0

阿息比培养基

甘露醇	10.0克
K_2HPO_4	0.2克
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2克
NaCl	0.2克
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	0.1克
$CaCO_3$	5.0克
琼脂	15克
水	1000毫升

真菌、放綫菌与固氮菌在恒溫箱(28~30°C)培养 7 天后,計数并挑选优势菌株以便純化。

(6)无机磷細菌

A. 培养基

葡萄糖	10.0克	} 无磷培养基	$Ca_3(PO_4)_2$	2克
$(NH_4)_2SO_4$	1.0克			
NaCl	0.3克			
KCl	0.3克			
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.3克			
$FeSO_4$	微量			
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	微量			
琼脂	20克			
蒸餾水	1000毫升			

B. 測定方法 可用稀釋土样計算有溶磷作用的細菌菌落

方法；也可用点土粒法，即在加有上述培养基的培养皿内，点以土粒 20~50 粒，然后根据土粒四周 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 溶解区的有无，决定含菌百分率，如 50 粒土中 30 粒有溶解区，则为 60%。

(7) 鉀細菌

A. 培养基

蔗糖	10克	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1克
Na_2HPO_4	0.2克	CaCO_3	5.0克
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2克	琼脂	20克
NaCl	0.2克	水	1000毫升
土壤矿物	1克(注解見第 17 頁)		

B: 測定方法 培养 3 天后，选取无色、透明、凸起的鉀細菌菌落計数，培养時間不要过长，否則固氮菌长出影响鉀細菌測数。

II. 液体稀釋計数法

氨化、硝化、反硝化、分解纖維、分解有机磷和固氮菌的細菌数均可以用試管液体稀釋法进行計数。这些数目同样可以反应土壤中各种細菌生理作用的强度，分析方法比較簡便。

將 5 个不同稀釋度的菌液分別接到 10 支試管中(每个稀釋度 2 个重复)，放入定溫箱中培养 14 天(氨化細菌 7 天即可計数)，然后观察試管中是否有細菌生长(长有細菌的表现是：培养基渾浊起泡，表面有菌膜)，或用試剂鉴别其中产生了的某种物質如氨、硝酸根等，然后分別記載它們的稀釋度和生长情况。如：

稀釋度	$\frac{1}{1,000}$	$\frac{1}{10,000}$	$\frac{1}{100,000}$	$\frac{1}{1,000,000}$	$\frac{1}{10,000,000}$
生长情况	++	++	++	+	0
数量指标	2	2	2	1	0

也就是說：在前三个稀釋度的試管都长有細菌，在

$\frac{1}{1,000,000}$ 的試管中只有一支長有細菌，而在 $\frac{1}{10,000,000}$ 的稀釋度中沒有細菌存在，這樣我們可以在上列數量指標的數字中選擇三個數字。將 $\frac{1}{1,000}$ 與 $\frac{1}{10,000}$ 稀釋度項下的指標數字舍棄，結果便得“210”的數量指標，然後根據數量指標，從下列表中求出細菌的近似值。例如“210”的近似值是 6，然後將細菌近似值乘以試管的最低稀釋倍數（即數量指標第 1 個數字的稀釋倍數）。假如在我們舉例當中的最低稀釋度是 $\frac{1}{100,000}$ ，於是 $6 \times 100,000 = 600,000$ ，即 1 克濕土中含有 60 萬個細菌；如果再乘以水分系數即得 1 克干土中的細菌數。

液體稀釋計數法每管裝培養基 5 毫升（反硝化細菌為 10 毫升），接種 1 毫升土壤懸浮液。

根據數量指標測定細菌數量的統計表

數量指標	細菌近似數	數量指標	細菌近似數
001	0.5	121	3.0
010	0.5	200	2.5
011	0.9	201	5.0
020	0.9	210	6.0
100	0.6	211	13.0
101	1.2	212	20.0
110	1.3	220	25.0
111	2.0	221	70.0
120	2.0	222	110.0

(1) 氮化細菌

A. 培養基 蛋白胨 10 克
 $MgSO_4$ 0.5 克
 K_2HPO_4 1 克

NaCl	0.5克
FeSO ₄	0.001克
*微量元素溶液	1毫升
无氮蒸餾水	1000毫升

用 10% Na₂CO₃ 調节 pH=7.2~7.4

B. 檢查方法 培养 7 天后，檢查試管中培养基是否渾浊，并用納氏試剂（或石蕊試紙）檢查是否有氨态氮存在（与空白对照比較）。

(2) 硝化細菌

A. 硝化作用第一阶段培养基

(NH ₄) ₂ SO ₄	2 克
K ₂ HPO ₄	1 克
MgSO ₄	0.5 克
NaCl	2 克
FeSO ₄	0.4 克
CaCO ₃ 或 MgCO ₃	5 克
蒸餾水	1000 毫升

pH=7.2

B. 檢查方法 培养 14 天后观察是否有細菌生长，并用銻-碘-淀粉作指示剂观察是否产生亚硝酸根（銻-碘-淀粉試剂的配法是用 1 克淀粉溶于少量水中，另外用 5 克氯化銻溶于 25 毫升水中，把两个溶液混合煮沸到淀粉溶解为止，然后加入 0.5 克干的碘化銻加水到 250 毫升即成。制成的試剂应当是无色的，保存在棕色瓶中待用），如果有亚硝酸根存在便出現深藍色。檢查

* 微量元素：将 H₃BO₃ 5 克、Na₂MoO₄ 5 克和蒸餾水 1000 毫升，配成溶液，每 1 公升培养基加入此溶液 1 毫升。