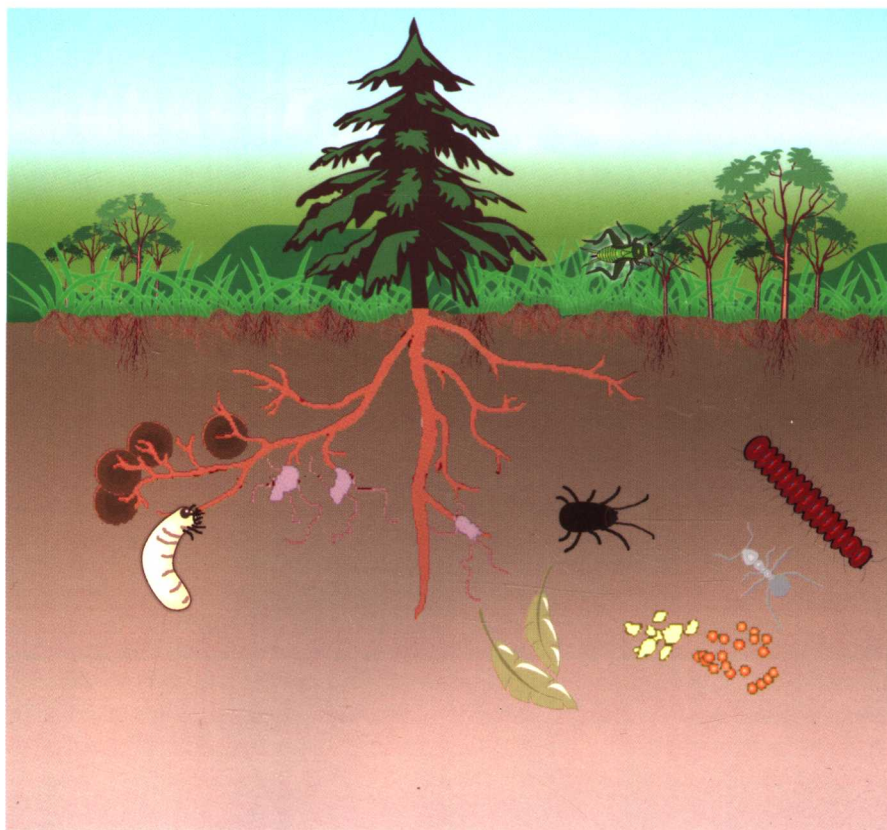


土壤微生物生物量 测定方法及其应用

吴金水 林启美 黄巧云 肖和艾 编著



气象出版社

土壤微生物生物量测定方法及其应用

吴金水 林启美 黄巧云 肖和艾 编著

气象出版社

内容简介

土壤是人类社会赖以生存和发展的重要物质基础。在全世界范围内,土壤退化仍在加剧,土壤污染也日益严峻,严重威胁到农业生产、人类健康和全球生态安全。我国土壤资源极其匮乏,遏止土壤退化,提高土壤质量是保障我国粮食安全与生态安全的百年大计。土壤微生物生物量是土壤最活跃的成分,与土壤资源可持续利用密切相关。本书对土壤微生物生物量的有关研究方法进行了较系统的介绍,同时对各种方法的应用范围及局限性加以了讨论,为读者在研究过程中选择合适的方法提供借鉴。本书的第2章介绍土壤微生物生物量计数测定方法,第3、4章和5章分别介绍土壤微生物细胞膜、细胞壁和细胞质成分分析法,第6、7、8、9章分别介绍土壤微生物生物量碳、氮、磷、硫测定方法,第10章介绍底物诱导法,第11章介绍土壤酶活性分析法,第12章介绍其他有关分析方法。

本书可作为农业、林业、相关大专院校和科研机构从事土壤学、植物营养学、环境科学、生态学等研究和教学人员的工具书和参考书。

图书在版编目(CIP)数据

土壤微生物生物量测定方法及其应用/吴金水等编著.
北京:气象出版社,2006.6

ISBN 7-5029-4158-4

I. 土… II. 吴… III. 土壤微生物-微生物量-生物测定 IV. S154.3

中国版本图书馆CIP数据核字(2006)第064582号

出版者:气象出版社

网 址: <http://cmp.cma.gov.cn>

E-mail: qxcbs@263.net

责任编辑:李太宇 张锐锐

封面设计:张建永

责任校对:程铁柱

印刷者:北京中新伟业印刷有限公司

发行者:气象出版社

开 本: 787×1092 1/16 印 张: 9.75 字 数: 250 千字

版 次: 2006年7月第一版 2006年7月第一次印刷

书 号: 7-5029-4158-4/Q·0019

印 数: 1~2000

定 价: 25.00元

地 址: 北京市海淀区中关村南大街46号

邮 编: 100081

电 话: 总编室: 010-68407112 发行部: 010-62175925

终 审: 汪勤模

Foreword

It is a great pleasure to be asked to write a foreword for this book («Soil Microbial Biomass—Methods and Application») by Professors Jinshui Wu and Qimei Lin. Both did the research for their PhDs in my laboratory at Rothamsted. They were outstanding students and now both are highly respected scientists with richly deserved international reputations. We have published a number of joint papers on the soil microbial biomass and its activity, based upon work directly from their PhD research and then from later collaborations.

In a book such as this, it is essential that we first consider the soil microbial biomass concept. Here we are considering the soil micro-organisms as a single unit, the microbial biomass, just as we might choose to study an entire forest, rather than the individual trees.

It is also interesting to briefly review the history of the development of the methods used to measure the soil microbial biomass. They go back a long way! In 1966, Professor David Jenkinson FRS showed that the extra carbon dioxide evolved (the “flush”) when a soil was fumigated with chloroform, the fumigant removed and the soil then incubated under standard conditions of temperature and moisture, came from the cells of the killed micro-organisms as they were mineralised by the small recolonising population which subsequently developed. Calibration of this “flush” gave an estimate of the carbon immobilised in the cells of the original soil organisms (the soil microbial biomass). This new method (Fumigation Incubation - FI) was published by Professors David Jenkinson and David Powlson in 1976. It was a breakthrough as previously the only way to measure the microbial biomass was by microscopic techniques. Anyone who has attempted this will know what a tedious method it is. The FI method did have some disadvantages. For example it did not work in acid soils or those containing actively decomposing substrates. However, it was, and still is, widely used.

However, in 1982, things changed when we published the first (a method to measure biomass phosphorus (P) of a series of papers describing the Fumigation-Extraction (FE)) method. This was followed by biomass nitrogen (N) and, finally, biomass carbon (C). Then, the new, FE method is basically a chemical procedure and has none of the disadvantages of the FI method. Jinshui Wu made a big contribution in changing the biomass carbon analysis from a tedious wet digestion method to an automated procedure. Later, Qimei Lin made a similar contribution in his investigations of the Substrate Induced Respiration Method and, controversially, in his work which questioned the value of soil ergosterol as an indicator of fungal biomass.

Our FE methods are amongst the most widely quoted papers in *Soil Biology and*

Biochemistry, the leading journal in this field. The methodology has been used in a wide number of situations. Research includes studies of nutrient fluxes (C, N, P and S) through the biomass, effects of heavy metals and pesticides, the biomass as an early warning of changing soil conditions, biomass dynamics in paddy soils and many more.

It is exciting to think that this book on methods in soil microbial ecology is now available in the Chinese language and I hope it will inspire and help many others to explore the fascinating topic of the soil microbial biomass.

Phil Brookes

Rothamsted Research, Harpenden, Herts, UK AL5 2JQ

目 录

第1章	概述	(1)
第2章	土壤微生物计数法	(3)
2.1	培养计数法	(3)
2.2	直接镜检计数法	(6)
2.3	多步离心分离法	(13)
第3章	细胞膜成分分析法	(18)
3.1	麦角甾醇分析法	(18)
3.2	磷脂分析法	(22)
第4章	细胞壁成分分析法	(34)
4.1	几丁质分析方法	(34)
4.2	胞壁酸和 2,6-二氨基庚二酸分析方法	(36)
4.3	脂多糖分析方法	(37)
第5章	细胞质成分分析法	(42)
5.1	三磷酸腺苷(ATP)分析法	(42)
5.2	DNA 和 RNA 分析法	(47)
第6章	土壤微生物生物量碳	(54)
6.1	熏蒸培养法	(54)
6.2	熏蒸提取法	(57)
6.3	应用	(60)
第7章	土壤微生物生物量氮	(65)
7.1	熏蒸培养法	(65)
7.2	熏蒸提取-全氮测定法	(68)
7.3	熏蒸提取-茚三酮比色法	(71)
7.4	应用	(74)
第8章	土壤微生物生物量磷	(79)
8.1	熏蒸提取——全磷测定法	(79)
8.2	熏蒸提取——无机磷测定法	(82)
8.3	应用	(84)
第9章	土壤微生物生物量硫	(89)
9.1	熏蒸提取法	(89)
9.2	应用	(91)

第10章 底物诱导法	(96)
10.1 底物诱导呼吸法(SIR)	(96)
10.2 精氨酸氨化方法	(102)
第11章 土壤微生物生物量的其他分析方法	(109)
11.1 热释放法	(109)
11.2 二甲基亚砷还原法	(110)
11.3 BIOLOG 方法	(111)
11.4 免疫探针方法	(112)
11.5 絮凝分离法	(115)
11.6 细胞伸长法测定活细菌数	(115)
第12章 土壤酶活性分析法	(117)
12.1 土壤酶活性的测定条件	(117)
12.2 水解酶	(121)
12.3 氧化还原酶活性	(135)
12.4 转移酶和裂解酶	(138)
附录一	(142)
附录二 常用染色液	(146)
附录三 最大或然数统计表	(148)
鸣谢	(150)

第 1 章 概 述

微生物是地球三大生物门类之一,在地球生态系统中起着最终分解者的作用。在土壤中,微生物不仅种类繁多,而且生物化学过程十分复杂,对土壤演化过程和性质变化有深刻的影响,特别是在有机物质和氮、磷、硫等植物养分元素的转化与循环过程中发挥关键作用。研究土壤微生物及其功能,是当前土壤学和生态学的重要内容。

土壤学将生活在土壤中体积小于 $5 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ 的生物统称为土壤微生物,主要包括真菌、细菌、放线菌及原生动物等。迄今为止,土壤微生物的研究大致可分为三个阶段。第一个阶段是在 20 世纪 70 年代前,主要是采用传统的显微镜或者培养等方法研究土壤微生物的数量和种类。经过这一阶段的大量研究,使我们认识到土壤微生物的复杂性,尤其是其数量巨大、种类繁多且功能各异。第二个阶段是从 20 世纪 70 年代末期开始的土壤微生物生物量研究阶段。鉴于土壤微生物的复杂性,部分研究者提出以土壤微生物的生物总质量(土壤微生物生物量)作为表征其种群大小的整体概念,从而避免由于测定土壤微生物的个体和种类数量的技术难度所造成的确定其种群大小的不确定性。历经 30 多年的研究,目前已经形成了一套较为完善的研究方法体系。第三个阶段就是 20 世纪 80 年代末期应用分子生物学技术开展的土壤微生物种群结构和多样性研究,特别是在近十年来,越来越多的分子生物学新方法被引入到土壤微生物研究领域,如 BIOLOG、土壤微生物原位分子标记、RNA 和 DNA 测序相关技术、基因芯片等。但这方面的研究还处于探索之中,仍未形成较为完备的研究方法体系。

以当前的技术,真正直接地测定土壤微生物生物量仍是难以实现的。最早提出的是以土壤呼吸商、耗氧量或酶活性作为反映土壤微生物生物量的指标。由于土壤中大部分微生物处于休眠状态,不能在短时间内完全被底物激活,不同种类微生物分泌的酶有其特异性,这些指标都不能客观地反映土壤微生物生物量大小。英国洛桑试验站 Jenkinson 和 Powelson 从 1973 年起开始,研究采用快速杀灭土壤微生物,再经过培养测定其矿化释放的 CO_2 量作为土壤微生物生物量指标,并于 1976 年发表了系列研究结果,确立了测定土壤微生物生物量碳的熏蒸-培养法,达到快速定量的目的。熏蒸技术在土壤微生物生物量测定上的应用,标志着土壤微生物研究方法进入一个新的时代,具有里程碑意义。不久,德国的 Anderson 和 Domsch(1978)建立了测定土壤微生物生物量的底物诱导呼吸法(SIR 法)。但是,这两种方法仍较费时,对操作过程和实验条件(培养温度)的要求比较严格,部分土壤不适用。此后,许多学者对这些方法进行了探讨。英国洛桑试验站 Brookes 与众多合作者和学生采用熏蒸和提取技术,建立了更为简便快速、精确和适用范围广泛的土壤微生物生物量碳、氮、磷的测定方法,使土壤微生物生物量的测定在世界上许多实验室得以普及。

特别强调的是:采用现行的土壤微生物生物量测定方法,所获得的结果尽管可以从某一侧面反映土壤微生物质量状况,但仍不能作为土壤微生物的真实质量,也不能作为反映土壤微生物个体和种类多少的具体数量指标。

在 20 世纪 80 年代,对于土壤微生物生物量的测定侧重于反映其在土壤中的存在状况,主

要是反映其与土壤有关性状和肥力以及有关环境因素(如重金属污染等)的关系。从 20 世纪 90 年代起,吴金水等人开始将测定土壤微生物生物量的熏蒸和提取方法应用到土壤微生物生物量碳、氮、磷的周转,以及土壤碳、氮、磷、硫等养分的转化过程研究。这些研究对于深入认识土壤有机质周转和养分循环机理,尤其是土壤微生物在其中发挥的作用提供了重要借鉴,同时扩大土壤微生物生物量测定方法的应用范围。

土壤是人类社会赖以生存和发展的重要物质基础。在全世界范围内,土壤退化仍在加剧,同时土壤污染问题日益严峻,严重威胁到农业生产、人类健康和全球生态安全。我国土壤资源极其匮乏,解决土壤退化问题,并提高土壤质量是保障我国粮食安全与生态安全的百年大计。土壤微生物生物量是土壤最活跃的成分,与土壤资源可持续利用密切关联。因此,加强土壤微生物生态学研究,对于保持和提高土壤肥力,显得格外重要。

为了满足我国越来越多的研究人员的需要,本书对土壤微生物生物量的有关研究方法进行了较系统的介绍,同时对各方法的应用范围与局限性加以讨论,为读者在研究过程中选择合适的方法提供借鉴。本书的第 2 章介绍土壤微生物生物量计数测定方法,第 3、4、5 章分别介绍土壤微生物细胞膜、细胞壁和细胞质成分分析法,第 6、7、8、9 章分别介绍土壤微生物生物量碳、氮、磷、硫测定方法,第 10 章介绍底物诱导法,第 11 章介绍其他有关分析方法,第 12 章介绍土壤酶活性分析法。

第2章 土壤微生物计数法

土壤是最复杂、最丰富的微生物基因库,所含微生物不仅数量巨大,而且种类繁多,主要包括细菌、真菌和放线菌三大类,是土壤最活跃的成分。土壤微生物数量测定方法可分为三大类:一类是根据在培养基上生长的菌落数来计算土壤微生物的数量,统称为培养计数法,主要有稀释平板法(Dilute plate counting)和最大或然计数法(MPN, most probable numbers);二类是将土壤微生物染色后,在显微镜下观察计数,称为直接镜检法(Direct microscope counting),包括涂片法、琼脂薄片法和膜过滤法等;三类是直接将微生物从土壤中分离和提取出来后再进行测定,主要有离心分离法(Centrifuge separation)。

2.1 培养计数法

2.1.1 概要

在自然条件下,土壤中的大多数微生物处于休眠状态,一旦供给可利用的碳源(如培养基),一些微生物将快速生长繁殖。因此,根据在培养基上所生长的微生物数量,可以估算土壤中微生物的数量。这种土壤微生物数量测定方法称为培养计数法,主要包括稀释平板计数法(简称稀释平板法)和最大或然计数法。

稀释平板计数法的基本原理:土壤微生物经分散处理成为单个细胞后,在特殊的培养基上生长并形成一个菌落,根据形成的菌落数来计算微生物的数量。

最大或然计数法的基本原理:假设被测定的微生物在稀释液中均匀分布,并在试管或平板上全部存活,随着稀释倍数的加大,稀释液中微生物的数量将越来越少,直到将某一稀释度的土壤稀释液接种到培养基上培养后,没有或很少出现微生物菌落。根据没有出现菌落的最低稀释度和出现菌落的最高稀释度,再用最大或然计数法计算出样品中微生物的数量。

2.1.2 稀释平板法

一、试剂配制

常用的培养基种类很多(见附录一),可根据需要测定的微生物种类选择培养基。按配方配制培养基后,先在121℃下灭菌15 min,冷却至45~50℃使用。凝固后的培养基可加热溶解后使用。

二、仪器设备

广口瓶或三角瓶及配套的橡皮塞,移液管(1 ml、10 ml,吸口用棉花塞住后用牛皮纸包好灭菌),培养皿(9 cm,用牛皮纸包好后灭菌)和显微镜等。

三、操作步骤

(1)土壤系列稀释液制备

取新鲜土壤(<2 mm)10.00 g,放入经灭菌的装有 70 ml 水的广口瓶中,塞上经灭菌的橡皮塞,在振荡机上振荡 10 min,此为 10^{-1} 土壤稀释液。迅速用灭菌的移液管吸取 10^{-1} 土壤稀释液 10 ml,放入灭菌的装有 90 ml 水的广口瓶中,塞上橡皮塞,混合均匀,此为 10^{-2} 土壤稀释液。再如此依次配制 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 系列土壤稀释液。上述操作均在无菌条件下进行,以避免污染。

(2) 平板制备和培养

从两个稀释倍数的土壤稀释液中(细菌和放线菌通常用 10^{-5} 和 10^{-6} 土壤稀释液,真菌用 10^{-2} 和 10^{-3} 稀释液)吸取 1.00 ml(吸前摇匀),分别放入五套培养皿中(注意每变换一次浓度,须更换一支移液管);再向培养皿内注入 $45\sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的培养基 10 ml,立即混合均匀,静置凝固后,倒置放于培养箱中培养。细菌和放线菌在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养 $7\sim 10\text{ d}$,真菌在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养 $3\sim 5\text{ d}$ 。

(3) 镜检计数

尽管使用不同的培养基,但细菌、放线菌和真菌都可能在同一个培养基上生长,所以必须用显微镜做进一步的观察。明显有菌丝的一般是真菌,真菌的菌丝为丝状分枝,比较粗大;而放线菌菌丝呈放射状,比较细。细菌有球状和杆状,有些细菌也形成细小的菌丝。酵母菌的菌落与细菌的菌落很相似,但在显微镜下容易分辨。酵母菌个体比较大,一般有圆形、椭圆形、卵形、柠檬形或黄瓜形,有些还有瘤状的芽。

在两级稀释度中,选细菌和放线菌的菌落数为 $30\sim 200$ 个、真菌菌落数为 $20\sim 40$ 个的培养皿各 5 个,取其平均值计算出每组的菌落数。如果菌落很多,可将其分成 $2\sim 4$ 等份进行计数。微生物生物量可以通过微生物细胞个体大小和密度计算得到。

(4) 计算

$$\text{土壤微生物数量}(\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}) = MD/W$$

式中 M 为菌落平均数; D 为稀释倍数; W 为土壤烘干质量(g)。

2.1.3 最大或然计数法(MPN)

一、试剂配制

培养基配制与稀释平板法基本相同(见附录一),采用试管培养时,培养基中不需加琼脂。

二、仪器设备

试管($2\text{ cm} \times 18\text{ cm}$),其他同稀释平板法。

三、操作步骤

(1) 土壤系列稀释液中制备

按稀释平板法制备土壤系列稀释液,一般配制 $10^{-1}\sim 10^{-6}$ 的稀释液。

(2) 接种和培养

从上述土壤系列稀释液中各取 1 ml 接种到平板培养基或试管液体培养基中,每个稀释度重复 $3\sim 5$ 次,同时设置空白对照,以检验是否被污染。因微生物类型和生长速度不同,所要求的稀释倍数、培养基和培养时间都有差别(表 2-1)。根据微生物类型分别在 $28\sim 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $7\sim 30\text{ d}$ 。培养结束时,记录出现菌落的平板数量或出现特征反应的试管数。

表 2-1 几种主要土壤微生物生理群 MPN 计数方法

微生物生理群	培养基*	稀释度	培养时间(d)	主要检查方法
氨化细菌	蛋白胨氨化培养基	$10^{-6} \sim 10^{-9}$	7	加奈氏试剂后出现棕黄色或褐色
亚硝酸细菌	3.1	$10^{-2} \sim 10^{-7}$	14	加格利斯试剂 I 及 II 出现绛红色或加锌碘淀粉试剂及 20% 的硫酸出现蓝色
硝酸细菌	3.4	$10^{-2} \sim 10^{-6}$	14	加浓硫酸及二苯胺试剂出现蓝色
反硝化细菌	3.5	$10^{-4} \sim 10^{-8}$	14	有气体, 加格利斯试剂 I 及 II 出现绛红色, 加浓硫酸及二苯胺试剂出现蓝色
自生固氮菌	3.25	$10^{-2} \sim 10^{-6}$	7~14	表面有褐色或黏液状菌膜
好气性纤维素分解菌	3.14, 3.15	$10^{-1} \sim 10^{-5}$	14	滤纸上有黄色或桔黄色菌斑, 滤纸破裂
嫌气性纤维素分解菌	3.16	$10^{-1} \sim 10^{-5}$	14~21	滤纸上有黄色或桔黄色菌斑, 滤纸破裂
硫化细菌	3.7	$10^{-2} \sim 10^{-8}$	21~30	加 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BaCl_2 出现沉淀
反硫化细菌	3.8	$10^{-2} \sim 10^{-7}$	21~30	管壁出现黑色沉淀

注: * 以代号表示的培养基列于附录一。

(3) 计算

通常将有微生物生长的最后 3 个稀释度中出现微生物菌落的平板数作为微生物生长指标, 从最大或然数表(附录三)中查出最大或然数近似值, 按下列公式计算样品中的微生物数量:

$$\text{土壤微生物数量}(\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}) = MD/W$$

式中 M 为最大或然数近似值; D 为全部出现菌落的最高稀释倍数; W 为土壤烘干质量(g)。

例如, 某土壤系列稀释液 1 ml 接种到 5 个平板, 经培养后, $10^{-3} \sim 10^{-5}$ 的稀释液全部出现菌落; 接种 10^{-6} 稀释液的 5 个平板只有 4 个出现菌落; 接种 10^{-7} 稀释液的只有 1 个出现菌落; 接种 10^{-8} 稀释液的全部没有菌落。由此得到土壤的微生物生长指标为 541, 查最大或然数表(附录三, 表 3)得到其最大或然数近似值为 17, 乘以第一位数的稀释倍数 10^5 , 再除以土壤烘干质量即可得到土壤微生物数量。

微生物生长的数量指标都应当是三位数。但是不管重复数多少, 第一位数字如重复数相等, 即代表全部重复都出现菌落的最高稀释倍数的数值。后两位数字依次是以下两个稀释度出现菌落的平板数量。如果以下稀释液还出现了微生物菌落, 则将其出现微生物菌落的重复数加到第三位上。例如, $10^{-3} \sim 10^{-8}$ 系列稀释液(4 个重复)出现菌落的平板数分别为 4, 4, 3, 2, 1 和 0。这里 10^{-7} 稀释液出现菌落的平板数为 1, 将其加到前一稀释液(10^{-6})的平板数上, 即得该土壤的微生物生长指标为 433, 查表得最大或然数近似值为 30, 计算得到每克土壤(新鲜重)的微生物数量为 3.0×10^5 。

应注意: 如果出现微生物生长的稀释度比没有出现微生物生长的稀释倍数低, 则说明微生物在稀释液中不是均匀分布的, 在这种情况下就需要对实验方案进行核查。

2.1.4 方法评价

最初研究土壤微生物的方法是培养计数法, 该方法的优点在于可测定土壤中可培养的、不同类型的微生物数量, 包括细菌、真菌和放线菌, 特别是可用于测定可培养的、具有特殊功能的

微生物种群,如氨化细菌、硝化细菌、反硝化细菌、解磷菌和固氮菌等。该方法存在的问题是,仅能测定在培养基上快速生长繁殖,并能够形成菌落或有某种特征的土壤微生物种群,而大部分土壤微生物种群不能在培养基上生长。另外,在培养基上所形成的菌落可能来自多个细胞,也有可能由菌丝(或多个细胞)发育成菌落。因此,培养计数法所测定的微生物数量,通常不到土壤中微生物实际数量的1%,故不能作为土壤微生物的真实数量。此外,该方法即使用于测定土壤中可培养的微生物数量,测定结果的精确度和重复性也较差。

2.2 直接镜检计数法

2.2.1 概要

由于土壤微生物的特性和培养基的局限性,通过在培养基上生长的菌落数量来间接地计算土壤微生物数量,一般只能测量出土壤中很少的一部分微生物。因此,一些研究者提出了直接镜检计数法,主要包括涂片法、琼脂薄片法和膜过滤法。使用一般的染色剂进行涂片染色,镜检时很难区别死的微生物细胞和土壤颗粒,这里仅介绍 FDA 染色涂片测定活菌丝数和 FITC 染色测定活细菌数的方法。

涂片法的基本原理:将一定量的土壤悬浮液涂抹在载玻片上,风干染色后进行镜检计数,从而计算出单位质量土壤的微生物数量。由于使用特别的染色剂可着色活细胞,从而可测定土壤活体微生物数量。

琼脂薄片法的基本原理:在制备土壤悬浮液时加入一定量琼脂,在进行土壤分散的同时进行加热,取一定量的土壤-琼脂悬浮液制成琼脂薄片,染色后进行镜检计数,再计算出单位质量土壤的微生物数量。

膜过滤法的基本原理:将土壤悬浮液用无菌水稀释,取一定量的稀释液染色后,用微孔膜过滤,对微孔膜上的微生物进行镜检计数,再计算出单位质量土壤的微生物数量。

2.2.2 FDA 染色涂片法测定活菌丝数

一、试剂配制

磷酸盐缓冲液($0.06 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$): $8.28 \text{ g NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 溶于 1 L 去离子水, $10.68 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于 1 L 去离子水;将两种溶液按 $28:72$ 的比例混合,调节 pH 值使其与土壤 pH 值大致相同。

FDA 染色液:见附录二。

琼脂溶液(1.5%): 1.5 g 琼脂溶于 100 ml 磷酸盐缓冲液中(pH 7.6)。

二、仪器设备

三角瓶(200 ml),试管(15 ml),振荡机,载玻片(图 2-1),盖玻片,荧光显微镜等。

三、操作步骤

(1) 土壤分散

取 10.00 g 新鲜土壤($<2 \text{ mm}$)于 200 ml

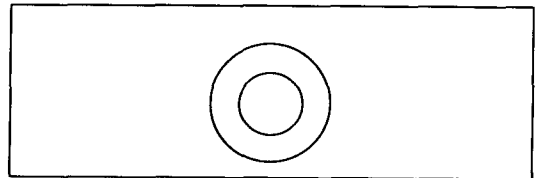


图 2-1 染色-镜检法涂片

外圆面积 1 cm^2 ,半径 5.64 mm ,内圆半径 3.64 mm ,镜检必须在外圆边缘约 1.7 mm 以内的区域进行(Trolldenier, 1995)

三角瓶中,加入 95 ml $0.06 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液,充分振荡 15 min。

(2) 染色

取 1 ml 土壤悬浮液于 15 ml 的试管中,加入 4 ml 磷酸盐缓冲溶液,再加入 1 ml FDA 染色液。室温下培养 3 min 后,加入 1 ml 琼脂溶液,混匀。

(3) 涂片和镜检

取 0.1 ml 上述土壤-染色液-琼脂混合液均匀地涂于如图 2-1 所示的载玻片上,盖上盖玻片,迅速用荧光显微镜进行镜检计数。镜检计数方法见下文的琼脂薄片法。

(4) 计算

土壤活菌丝的生物体积及生物量碳计算方法同琼脂薄片法。

2.2.3 FITC 染色涂片法测定活细菌数

一、试剂配制

Tris-盐酸溶液 I [$c(\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3) = 0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$]: 6.35 g 三羟基氨基甲烷溶于 800 ml 去离子水,用浓盐酸调节 pH 值至 7.5,定容至 1 L。

Tris-盐酸溶液 II [$c(\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3) = 0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$]: 25.4 g 三羟基氨基甲烷溶于 800 ml 去离子水,用浓盐酸调节 pH 值至 7.5,定容至 1 L。

INT 溶液: 2 g 氯化 2-(*p*-碘苯基-3-*p*-硝基苯)-5-苯四氮唑溶于 1 L Tris-盐酸溶液 II 中。

NADH-NADPH 混合溶液: 0.4 g NADH 和 0.4 g NADPH 溶于 100 ml Tris-盐酸溶液 II 中。

FITC 染色液: 见附录二。

碳酸盐-重碳酸盐缓冲液($0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$): 42 g NaHCO_3 溶于 1 L 去离子水; 53 g Na_2CO_3 溶于 1 L 去离子水。吸取 80 ml NaHCO_3 和 100 ml Na_2CO_3 溶液混合,加去离子水 500 ml 并调节 pH 值至 9.6,定容至 1 L。

焦磷酸钠溶液(5%, *w*:*v*): 8.39 g 焦磷酸钠($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)溶于 100 ml 去离子水。

碳酸钠溶液 [$c(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$]: 10.6 g 碳酸钠溶于 100 ml 去离子水。

甘油溶液: 量取 45 ml 甘油于 5 ml $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸钠溶液中,摇匀。

磷酸盐缓冲液($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.2): 1.38 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 溶于 1 L 去离子水中, 1.78 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于 1 L 去离子水,将两种溶液按 28:72 的比例混合。

氯化钠溶液 [$c(\text{NaCl}) = 0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$]: 8.77 g 氯化钠溶于 1 L 去离子水。

甲醛溶液: 20 ml 甲醛溶于 80 ml 去离子水。

二、仪器设备

烧杯(100 ml),搅拌机,闪烁计数瓶,超声波水浴器,载玻片(图 2-1),盖玻片,荧光显微镜等。

三、操作步骤

(1) 土壤分散

取 1.00 g 新鲜土壤($<2 \text{ mm}$)于 100 ml 烧杯中,加入 20 ml Tris-盐酸溶液 I,用搅拌机低速搅拌 1 min。

(2) 培养

取 2.0 ml 上述土壤悬浮液于闪烁计数瓶中,加入 1 ml INT 溶液,再加入 1 ml NADH-NADPH 混合溶液,在 25°C 的黑暗条件下培养 4 h。再加入 1 ml 20% 甲醛水溶液,

4 °C下过夜。

(3) 涂片和染色

将上述装有经培养的土壤悬浮液的闪烁计数瓶置于超声波水浴器中,低能量(输出功率 50 W)超声波处理 2 min,加入琼脂使其浓度达到 0.01%(v:v)。取 0.01 ml 混合液均匀地涂抹于如图 2-1 所示的载玻片上(使用前用稀酸洗涤),于酒精灯上加热干燥后用 FITC 染色液染色 3 min。染色后置于 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸盐-重碳酸盐缓冲液中浸泡 10 min,再转入 5% 焦磷酸钠溶液中浸泡 2 min,取出用去离子水轻轻冲洗。

(4) 镜检

洗涤后的染色片干燥后,加一滴甘油溶液,盖上盖玻片固定,用荧光显微镜进行镜检计数,具体方法参见琼脂薄片法。

(5) 计算

土壤活细菌的生物体积和生物量碳的计算方法参见琼脂薄片法。

2.2.4 琼脂薄片法

一、试剂配制

琼脂-Decon 90 溶液:1 g 琼脂溶于 100 ml 无菌水(过 $0.20 \mu\text{m}$ 滤膜),加热溶解,再与 20 ml Decon 90 稀释液(12 ml Decon 90 于 100 ml 无菌水)混合均匀。

台酚蓝溶液:5 g 苯酚溶于 100 ml 无菌水,1 g 台酚蓝溶于 100 ml 无菌水;按照 15:1 的比例混合;再按 4:1 与冰醋酸混合,用 $0.2 \mu\text{m}$ 膜过滤。

二、仪器设备

可控温超声波水浴清洗机(300 Ultrasonik NEY),可调慢速搅拌机(1.5 V , $0 \sim 2000 \text{ rev} \cdot \text{min}^{-1}$, Kanke and Kunkel EKA-labortechnik),显微镜,显相器(Camera lucida),血球计数板(图 2-2),盖玻片(厚 0.47 mm),加拿大香脂(Canada Balsam)。

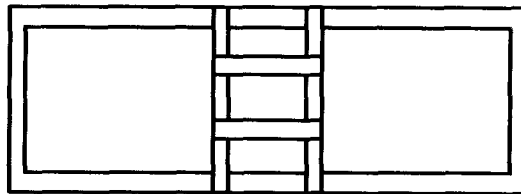


图 2-2 血球计数板(改进型)

三、操作步骤

(1) 土壤分散

取 $1.00 \sim 2.00 \text{ g}$ (根据土壤微生物含量而定) $< 2 \text{ mm}$ 的新鲜土壤于 100 ml 塑料杯中,加入 60 ml $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 的琼脂-Decon 90 混合溶液。将塑料杯置于超声波清洗机水槽中(土壤琼脂混合溶液的液面要低于水面),最大功率处理 15 min。在超声波处理过程中,保持水浴 $60 \text{ }^\circ\text{C}$,并不断慢速搅拌土壤琼脂悬浮液。处理结束后仍继续搅拌土壤悬浮液,直到取样前 30 s 停止。取样必须在 10 min 内完成。

(2) 琼脂薄片制备

将吸管(内径 1 mm)插入土壤-琼脂悬浮液液面下 1 cm 处,吸取约 0.02 ml 悬浮液,迅速

放入血球计数板上,立即盖上盖玻片(厚 0.47 mm),冷却凝固后一起放入去离子水(用前经 0.2 μm 滤膜过滤)中,使琼脂薄片分离。每个样品至少做 4 个琼脂薄片,即 4 次重复。

(3)染色

将琼脂薄片放到普通载玻片上,干燥后浸泡在台酚蓝溶液中。1 h 后先用无菌水冲洗,再用 95%酒精脱水。在琼脂薄片上加一滴加拿大香脂,盖上普通的盖玻片,即得琼脂薄片,可永久保存。

(4)镜检

将琼脂薄片置于显微镜下,在目镜上放入 New Porton G12 分格计数板,根据表 2-2 进行镜检。仅对被染为深蓝色的球形和圆柱形微生物计数,形状不规则(如破裂开)和其他颜色(如黄色、紫红色)的物体均不计数。

球形微生物分为 11 级(表 2-2),直径在 0.34~0.97 μm 的为第 1 组,计数面积为 $2.0 \times 10^2 \mu\text{m}^2$ (相应于 New Porton G12 分格玻璃片左上角的两个方格)。直径在 0.97~3.13 μm 的为第 2 组,计数面积为 $2.1 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ (相应于 New Porton G12 分格玻璃片的全部方格),第 1 组和第 2 组在油镜下镜检。直径在 3.13~16.00 μm 的为第 3 组,在 500 倍下镜检,计数面积为 $3.7 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ (相应于目镜分格玻璃片的 A 方格面积)。圆柱形微生物可分为 8 级,均在 500 倍下进行镜检,计数面积同球形微生物的第 3 组。圆柱形微生物的直径用 New Porton G12 分格玻璃片直接测量,而长度则通过显相器直接描绘在 A4 纸上,再用测绘轮测定其长度,也可用其他的方法如网格交叉的方法来测定。每一组必须在不同部位镜检 20 次。如果 20 次所测定的微生物个数低于 40,则必须加测 20 次。

表 2-2 直接显微镜检的视野和放大倍数

细胞直径 (μm)	细胞直径范围 (μm)	细胞体积 (μm^3)	细胞体积范围 (μm^3)	分組级别	放大倍数
球形微生物					
0.40	0.34~0.49	0.034	0.02~0.06	2	1250(油镜)
0.57	0.49~0.69	0.10	0.06~0.17	3	1250(油镜)
0.80	0.69~0.97	0.27	0.17~0.48	4	1250(油镜)
1.13	0.97~1.37	0.76	0.48~1.35	5	1250(油镜)
1.60	1.37~1.93	2.15	1.35~3.76	6	1250(油镜)
2.26	1.93~3.13	6.04	3.76~16.06	7	1250(油镜)
4.00	3.13~4.83	33.51	16.06~59.00	6	500
5.66	4.83~6.83	94.94	59.00~166.83	7	500
8.00	6.83~9.66	268.08	166.83~471.99	8	500
11.32	9.66~13.66	759.52	471.99~1334.6	9	500
16.00	13.66~16.00	2144.66	1334.6~2144.66	10	500
圆柱形微生物					
1.00	< 1.21	0.79×长度		2	500
1.42	1.21~1.71	1.58×长度		3	500
2.00	1.71~2.42	3.14×长度		4	500
2.83	2.42~3.42	6.29×长度		5	500
4.00	3.42~4.83	12.57×长度		6	500
5.66	4.83~6.83	25.16×长度		7	500
8.00	6.83~9.66	50.27×长度		8	500
11.32	9.66~13.66	100.64×长度		9	500

(5) 计算

根据镜检所测定的微生物数量及所计数的面积计算微生物生物体积,再按其密度($1.1 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$)、干物质含量(25%)和含碳量(47%)估计微生物生物量碳(Jenkinson, Ladd, 1981)。

例如 $0.49 \sim 0.69 \mu\text{m}$ 球形微生物在 20 次镜检中的结果为 20, 镜检总面积为 $4.0 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ($20 \times 2.0 \times 10^2$), 则可计算得到被镜检(琼脂薄片厚度为 0.1 mm)的土壤质量(M_s)为 $6.7 \times 10^{-6} \text{ g}$ ($1/60 \times$ 镜检总面积 $\times 10^{-6} \times 0.1 \text{ mm}$); 单位土壤(g)该球形微生物数量($N = 20/M_s$)为 $2.98 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$; 其生物总体积 V ($0.1 \times N \times 10^{-9}$)为 $2.98 \times 10^{-4} (\text{mm}^3 \cdot \text{g}^{-1})$ 。故可按下式计算该球形微生物的生物量碳(B_c ; $0.424 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$):

$$B_c = V \times 1.1 \times 0.25 \times 0.47 \times 10^3 (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$$

2.2.5 膜过滤法

一、试剂配制

Decon 90 溶液: 取 12 ml 浓溶液于 100 ml 经 $0.2 \mu\text{m}$ 滤膜过滤的水中。

吕氏美蓝溶液(Loeffler methylene blue): 见附录二。

吖啶橙(Acridine orange, AO)溶液: 见附录二。

NaCl 溶液 [$c(\text{NaCl}) = 0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$]: 8.77 g NaCl 溶于 1 L 去离子水, $0.2 \mu\text{m}$ 滤膜过滤。

柠檬酸钠系列缓冲溶液 ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$): 21.01 g $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 溶于 1 L 去离子水, 53.61 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶于 1 L 去离子水; 吸取 13.6 ml、21.6 ml 和 30.7 ml 柠檬酸溶液分别与 36.4 ml、28.4 ml 和 19.3 ml 磷酸钠溶液混合, 即配制成 pH 值为 6.6、5.5 和 4.0 的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸盐系列缓冲溶液, 制备的溶液均经 $0.2 \mu\text{m}$ 滤膜过滤。

甲醛, Cargille 油。

二、仪器设备

微孔滤膜(Millipore isotope filter, 孔径分别为 $8 \mu\text{m}$ 、 $3 \mu\text{m}$ 、 $0.8 \mu\text{m}$ 、 $0.45 \mu\text{m}$, 膜直径 25 mm) 和过滤装置(图 2-3), 其他仪器设备同 2.3.3。

三、操作步骤

(1) 土壤分散

取 $1.00 \sim 2.00 \text{ g}$ (根据土壤微生物数量而定) $< 2 \text{ mm}$ 的新鲜土壤于 100 ml 塑料杯中, 加入 50 ml 无菌水和 10 ml Decon 90 溶液, 在 5°C 下用超声波清洗机处理 15 min, 同时慢速搅拌, 将土壤悬浮液用无菌水稀释到 200~500 倍。

(2) 细菌的过滤、染色及镜检

土壤稀释液摇匀后静置 5 min, 吸取一定量(根据土壤微生物数量而定, 一般 50 ml), 用孔径为 $8 \mu\text{m}$ 的微孔膜过滤, 以除去土壤颗粒、有机物质和菌丝等。再吸取一定量的过滤液, 用孔径为 $3 \mu\text{m}$ 的微孔膜过滤。取 1.9 ml 滤液, 加入 0.1 ml 甲醛, 甲醛的最终浓度为 2%, 再加入 0.2 ml AO 溶液, 黑暗中室温培养 10 min。吸取 0.25 ml 于过滤器上, 加入 8.0 ml NaCl 溶液, 用 $0.45 \mu\text{m}$ 的微孔膜(黑底)抽滤。再依次用 pH 值 6.6、5.5 和 4.0 的柠檬酸钠缓冲溶液及去离子水洗涤, 将滤膜转移到载玻片上, 在膜的底部和

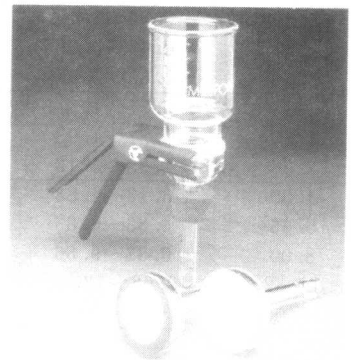


图 2-3 微生物过滤器