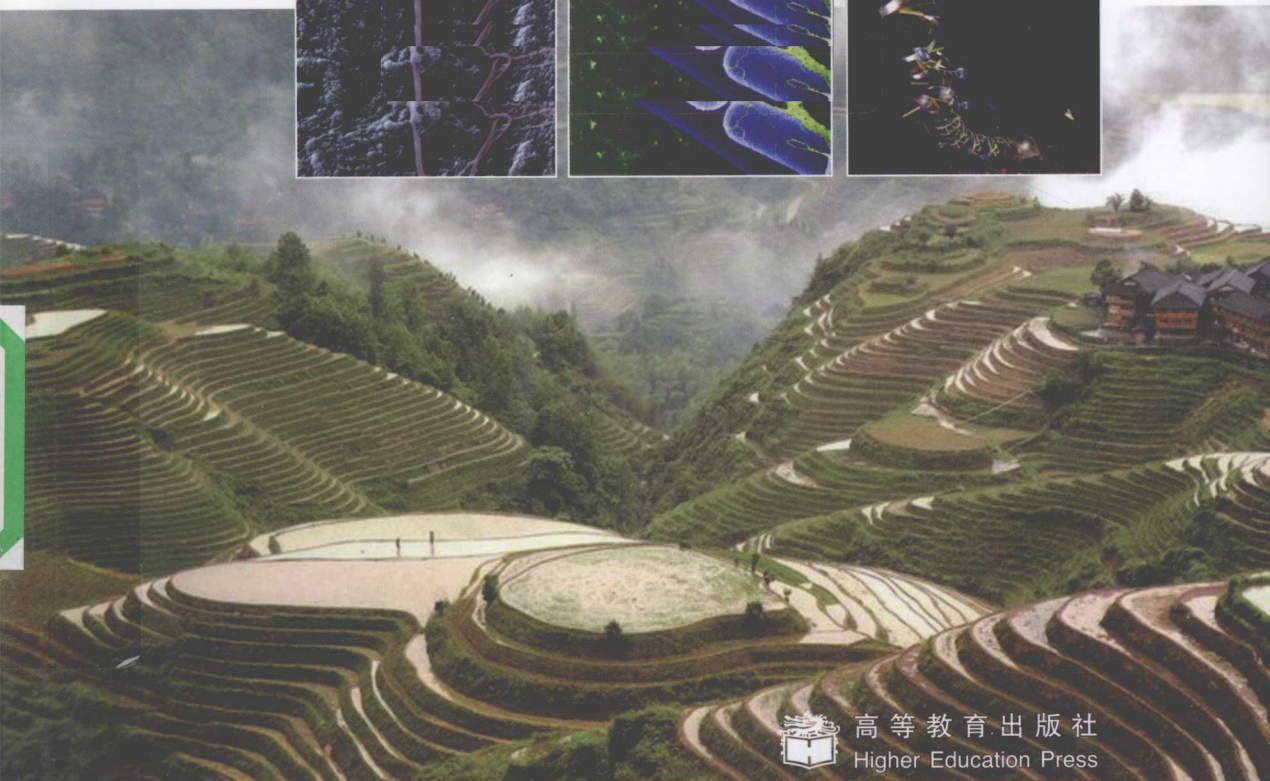
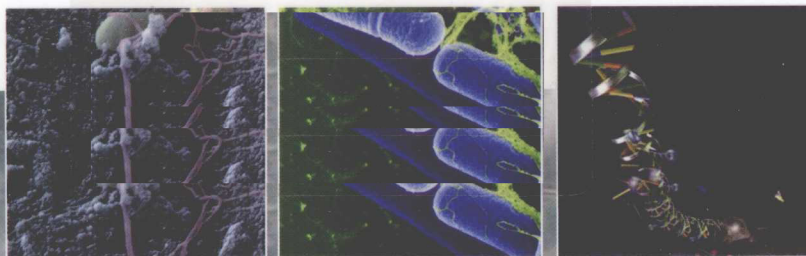


土壤科学丛书
SOIL SCIENCE SERIES

土壤微生物 研究原理与方法

Principles and Methods of Soil Microbiology Research

主编 林先贵

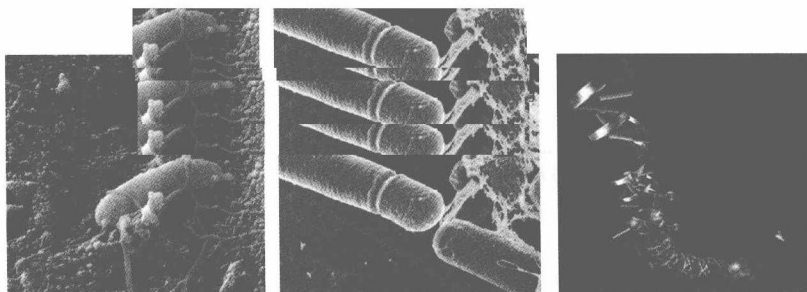


高等教育出版社
Higher Education Press

土壤科学丛书
SOIL SCIENCE SERIES

土壤微生物 研究原理与方法

Turang Weishengwu Yanjiu Yuanli Yu Fangfa



高等教育出版社·北京
HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING

内容简介

本书对土壤微生物的研究原理与方法作了比较全面、系统的介绍,涵盖了土壤微生物学的常规研究方法与新型实验技术。主要内容包括:土壤微生物学实验室的常规设置与常用仪器、实验设计与数据处理,土壤微生物的分离计数与鉴定保藏、生物量测定与多样性分析,土壤微生物过程强度与酶活性测定、原位研究与同位素技术,以及土壤微生物的应用技术等。

本书既是一本工具书,也可作为实验教学参考书,可供从事土壤学、微生物学、生态学、环境科学和农学等领域的科技工作者、研究生和本科生等参考。

图书在版编目(CIP)数据

土壤微生物研究原理与方法/林先贵主编. —北京:
高等教育出版社, 2010. 3

ISBN 978 - 7 - 04 - 028407 - 2

I. 土… II. 林… III. 土壤微生物 - 研究
IV. S154. 3

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 220822 号

| | | | | | |
|------|-----|------|-----|------|----|
| 策划编辑 | 李冰祥 | 责任编辑 | 张晓晶 | 封面设计 | 张楠 |
| 责任绘图 | 尹莉 | 版式设计 | 史新薇 | 责任校对 | 刘莉 |
| 责任印制 | 尤静 | | | | |

| | | | |
|------|-----------------|------|---|
| 出版发行 | 高等教育出版社 | 购书热线 | 010 - 58581118 |
| 社址 | 北京市西城区德外大街 4 号 | 咨询电话 | 400 - 810 - 0598 |
| 邮政编码 | 100120 | 网 址 | http://www.hep.edu.cn |
| 总 机 | 010 - 58581000 | | http://www.hep.com.cn |
| | | 网上订购 | http://www.landraco.com |
| 经 销 | 蓝色畅想图书发行有限公司 | | http://www.landraco.com.cn |
| 印 刷 | 北京铭成印刷有限公司 | 畅想教育 | http://www.widedu.com |
| 开 本 | 787 × 1092 1/16 | 版 次 | 2010 年 3 月第 1 版 |
| 印 张 | 27.75 | 印 次 | 2010 年 3 月第 1 次印刷 |
| 字 数 | 510 000 | 定 价 | 58.00 元 |

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 28407 - 00

序

中国科学院南京土壤研究所微生物室编著，由郝文英、李良谟主持，李振高、尹瑞玲、游长芬、顾希贤等参加编写的《土壤微生物研究法》从1985年初版以来，为土壤微生物工作者及高等院校从事相关学科教学和学习的师生所欢迎，起到了统一分析方法、提高分析结果互比性的作用，对推进我国土壤微生物学的发展发挥了阶段性的积极作用。该书中介绍的许多传统方法，在20多年以后的今天，仍然为国内外土壤微生物工作者所广泛采用。但随着微生物学科的发展，特别是微生物多样性研究方法的突破与应用，以及相关研究领域的扩大与研究内容的深入，微生物的研究已由细胞水平发展到分子水平，对土壤微生物的分析方法提出了更高的要求。为了能够适应学科发展和满足广大读者的需求，我等一直期望该书能扩容再版，以便更好地适应土壤微生物学研究和发展的需要。

我所微生物室林先贵等同志在原《土壤微生物研究法》基础上编著的这本《土壤微生物研究原理与方法》一书了却了我们的这个再版夙愿。该书不仅对原版内容作了系统的归纳和整理，而且在微生物实验室的设置上作了调整和扩充，在研究方法上作了更新和完善，同时也加强了对研究方法原理的阐述，并对土壤微生物的应用研究和数理统计方法做了更加深入的介绍。该书结构完整、内容系统、图文并茂、指导性强，具有较高的实用价值。相信该书的出版将对科研院所和高等院校广大从事土壤学、微生物学、生态学、环境科学和农学等领域的科学工作者、工程技术人员、研究生有所裨益，对土壤微生物学及相关领域的研究和探讨起到规范和指导性的作用，同时对各级政府部门从事生态建设、环境保护、农业与农村可持续发展的领导干部也具有参考价值。

郝文英

2008年1月20日

前 言

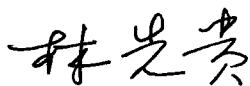
土壤微生物种类繁多、功能多样，不仅在土壤的形成发育、物质转化、肥力培育以及环境净化等方面起着重要作用，同时还是宇宙间最大的微生物资源库。由于土壤微生物的多样性及其功能的复杂性，深入研究难度较大，故土壤微生物学的发展始终依赖于研究方法的突破和改进。1985年，我所微生物室郝文英、李良谟、李振高、尹瑞玲、游长芬和顾希贤等同志编著出版的《土壤微生物研究法》一书，受到了广大同行和读者的欢迎，是一本指导性强的工具书，起到了规范研究的作用，对推动我国土壤微生物学的发展具有积极意义。在此，我们向为此付出辛勤劳动并取得卓越成就的老一辈致以崇高的敬意和衷心的感谢！

近20多年来，随着生物学科的蓬勃发展，微生物研究手段取得了长足进步，土壤微生物研究方法也产生了质的飞跃。生物多样性的理论与方法，特别是分子生物学技术的应用，已经开拓了土壤微生物学发展的新方向，它们与传统分析方法相互弥补、共同促进。为了全面反映土壤微生物研究方法的最新进展，我们对原书结构作了调整，对内容进行了更新、扩充和完善，并补充阐述了部分方法的原理，便于读者对研究方法有更深刻的理解。因此，我们将再版书名定为《土壤微生物研究原理与方法》，以便更好地服务于土壤微生物学的发展。

在本书的编著过程中，作者们参阅了大量文献，力求做到全面系统、简洁实用。全书共分九章：土壤微生物研究概述、实验室的设置与设备、土壤微生物的计数与分析、土壤微生物的鉴定与保藏、土壤微生物多样性的分析、土壤微生物过程的分析、土壤微生物的原位研究、土壤微生物的应用技术、实验设计与数据分析处理，另附土壤微生物研究相关资源信息。在任务分工上，林先贵主持编著，并具体负责编撰第一、二章，胡君利、尹睿、张晶、褚海燕、贾仲君、王一鸣、张华勇、陈瑞蕊依次负责编撰第三、四、五、六、七、八、九章和附录，张华勇还承担了插图的摹制与绘制工作。最后，全书由林先贵、胡君利负责统稿、定稿。

因受篇幅所限，本书仅列出了主要文献资料，并引用了一些原著作者的插图与照片，特此声明，并向所有著作者表示最深切的谢意。本书经中国科学院南京土壤研究所郝文英先生审阅并作序，既是为本书质量把关，也是对我们的支持与鼓励，在此表示衷心的感谢。高等教育出版社李冰祥女士对本书的策划与出版给予了支持与帮助，在此一并表示感谢。

由于编者水平有限，内容难免有疏漏之处，祈盼同行们提出宝贵意见。需要说明的是，本书中介绍的某些方法我们没有实地用过，有的用得不多，有的只在多种方法中择一二种，内容可能有不妥或错误之处，敬请读者不吝指教，共同磋商，以便再版时修正补充。



2008年1月1日写于南京

2009年1月1日改于北京

目 录

| | |
|------------------------------|----|
| 第 1 章 土壤微生物研究概述 | 1 |
| 1.1 土壤微生物学的研究对象 | 1 |
| 1.1.1 土壤微生物多样性 | 1 |
| 1.1.2 土壤微生物过程 | 3 |
| 1.1.3 土壤微生物与环境的关系 | 3 |
| 1.2 土壤微生物学的发展简史 | 4 |
| 1.2.1 微生物研究方法进程 | 5 |
| 1.2.2 土壤微生物学的创立 | 5 |
| 1.2.3 土壤微生物分子生态学的发展 | 6 |
| 1.3 土壤微生物学的研究展望 | 7 |
| 1.3.1 土壤微生物的分离与纯培养 | 8 |
| 1.3.2 土壤宏基因组学技术及应用 | 9 |
| 1.3.3 土壤微生物多样性与功能耦合 | 10 |
| 1.3.4 土壤微生物的应用技术 | 11 |
| 第 2 章 实验室的设置与设备 | 12 |
| 2.1 实验室的设置与功能 | 12 |
| 2.1.1 通用实验室 | 12 |
| 2.1.2 专用实验室 | 13 |
| 2.1.3 现代实验室 | 15 |
| 2.2 实验室的仪器与器皿 | 18 |
| 2.2.1 主要仪器 | 18 |
| 2.2.2 玻璃器皿 | 18 |
| 2.2.3 其他器具 | 19 |
| 2.2.4 生物安全柜 | 19 |
| 2.3 常规操作与注意事项 | 20 |
| 2.3.1 灭菌 | 20 |

| | |
|------------------------------|------------|
| 2.3.2 洗涤····· | 26 |
| 第3章 土壤微生物的计数与分析 ····· | 29 |
| 3.1 土样的采集与预处理····· | 29 |
| 3.1.1 准备工作····· | 30 |
| 3.1.2 土样采集与记录····· | 30 |
| 3.1.3 土样运输与储存····· | 31 |
| 3.1.4 预处理与预培养····· | 32 |
| 3.2 土壤微生物的分离与计数····· | 32 |
| 3.2.1 培养基····· | 32 |
| 3.2.2 一般微生物的分离与计数····· | 37 |
| 3.2.3 厌氧微生物的分离与计数····· | 42 |
| 3.2.4 土壤微生物的纯化与培养····· | 45 |
| 3.3 土壤微生物区系的分析····· | 52 |
| 3.3.1 主要类群微生物的分离与计数····· | 53 |
| 3.3.2 主要功能微生物的测定····· | 54 |
| 3.4 根际微生物的分析····· | 62 |
| 3.4.1 根际微生物的分离····· | 63 |
| 3.4.2 根际优势菌的分群····· | 64 |
| 3.4.3 根瘤菌与病原菌的检测····· | 65 |
| 3.4.4 丛枝菌根真菌的分析····· | 68 |
| 3.5 土壤微生物生物量的测定····· | 73 |
| 3.5.1 氯仿熏蒸法····· | 73 |
| 3.5.2 底物诱导呼吸法····· | 81 |
| 3.5.3 腺苷三磷酸测定法····· | 82 |
| 3.5.4 土壤麦角甾醇分析法····· | 84 |
| 3.5.5 土壤几丁质分析法····· | 85 |
| 第4章 土壤微生物的鉴定与保藏 ····· | 87 |
| 4.1 土壤微生物的分类与鉴定····· | 87 |
| 4.1.1 土壤微生物的分类····· | 87 |
| 4.1.2 微生物的传统鉴定方法····· | 93 |
| 4.1.3 微生物自动化鉴定系统····· | 135 |
| 4.2 菌种的选育与保藏····· | 143 |
| 4.2.1 菌种的选育与改造····· | 143 |
| 4.2.2 菌种的保藏与复壮····· | 157 |
| 第5章 土壤微生物多样性的分析 ····· | 166 |

| | |
|-------------------------------|------------|
| 5.1 微生物的物种多样性分析 | 166 |
| 5.1.1 改进培养措施 | 166 |
| 5.1.2 新型培养技术 | 168 |
| 5.2 微生物的功能多样性分析 | 170 |
| 5.2.1 BIOLOG 碳素利用法 | 170 |
| 5.2.2 功能基因组学研究 | 171 |
| 5.3 微生物的结构多样性分析 | 173 |
| 5.3.1 醌指纹法 | 173 |
| 5.3.2 脂肪酸谱图法 | 174 |
| 5.4 微生物的遗传多样性分析 | 178 |
| 5.4.1 基于杂交的分析方法 | 184 |
| 5.4.2 基于 PCR 的分析方法 | 192 |
| 第 6 章 土壤微生物过程的分析 | 218 |
| 6.1 土壤碳转化作用 | 218 |
| 6.1.1 土壤呼吸作用 | 218 |
| 6.1.2 纤维素分解作用 | 221 |
| 6.1.3 土壤产甲烷作用 | 222 |
| 6.2 土壤氮转化作用 | 223 |
| 6.2.1 土壤氮素矿化作用 | 223 |
| 6.2.2 土壤硝化作用 | 226 |
| 6.2.3 土壤反硝化作用 | 230 |
| 6.2.4 土壤固氮作用 | 233 |
| 6.3 土壤磷、铁、硫转化作用 | 236 |
| 6.3.1 土壤磷转化作用 | 236 |
| 6.3.2 土壤铁转化作用 | 238 |
| 6.3.3 土壤硫转化作用 | 240 |
| 6.4 土壤酶活性的测定 | 243 |
| 6.4.1 氧化还原酶活性 | 245 |
| 6.4.2 水解酶活性 | 249 |
| 6.4.3 转移酶和裂解酶活性 | 262 |
| 第 7 章 土壤微生物的原位研究 | 266 |
| 7.1 土壤微生物的观察 | 266 |
| 7.1.1 土壤微生物细胞的观察 | 266 |
| 7.1.2 土壤微生物区系的原位观测 | 269 |
| 7.1.3 根际微生物的观测 | 278 |

| | |
|------------------------------|------------|
| 7.2 模型生态系统的应用 | 279 |
| 7.2.1 环流装置 | 281 |
| 7.2.2 根际装置 | 283 |
| 7.2.3 温室气体升高模拟装置 | 289 |
| 7.2.4 土壤呼吸的田间原位测定装置 | 290 |
| 7.3 稳定性同位素技术的应用 | 294 |
| 7.3.1 稳定同位素示踪技术 | 295 |
| 7.3.2 稳定同位素核酸探针技术 | 300 |
| 第8章 土壤微生物的应用技术 | 322 |
| 8.1 微生物肥料 | 322 |
| 8.1.1 固氮菌、解磷菌及解钾菌 | 323 |
| 8.1.2 菌根真菌 | 326 |
| 8.1.3 根际促生菌 | 331 |
| 8.1.4 微生物有机肥 | 333 |
| 8.2 微生物农药 | 334 |
| 8.2.1 苏云金杆菌 | 335 |
| 8.2.2 微生物除草剂与农用抗生素 | 336 |
| 8.3 微生物修复 | 336 |
| 8.3.1 微生物对有机污染物的降解 | 337 |
| 8.3.2 微生物对重(类)金属的转化 | 338 |
| 8.3.3 微生物对生物污染的防治 | 340 |
| 8.3.4 微生物对复合污染的修复 | 341 |
| 第9章 实验设计与数据分析处理 | 343 |
| 9.1 实验设计 | 343 |
| 9.1.1 实验设计的要素和原则 | 343 |
| 9.1.2 正交实验设计 | 344 |
| 9.1.3 均匀实验设计 | 347 |
| 9.1.4 其他实验设计方法 | 349 |
| 9.2 数据分析处理 | 351 |
| 9.2.1 显著性检验 | 352 |
| 9.2.2 方差分析 | 353 |
| 9.2.3 线性相关与一元线性回归分析 | 354 |
| 9.2.4 多元分析处理中的主成分分析 | 357 |
| 9.2.5 聚类分析 | 359 |
| 9.2.6 典范对应分析 | 359 |

| | |
|----------------------------|-----|
| 附录 | 362 |
| 一、培养基配方 | 362 |
| 二、常用酸碱溶液的配制 | 376 |
| 三、常用固态化合物溶液的配制 | 377 |
| 四、常用消毒剂的配制 | 378 |
| 五、常用酸碱指示剂的配制 | 379 |
| 六、常用分子生物学试剂的配制 | 379 |
| 七、常用引物列表 | 384 |
| 八、最大或然数法测数统计表 | 389 |
| 九、标准筛孔对照表 | 391 |
| 十、土壤中常见细菌、放线菌、真菌的检索表 | 392 |
| 十一、国内外微生物菌种保藏机构网络信息 | 402 |
| 十二、土壤系统分类检索表 | 405 |
| 参考文献 | 407 |

第1章 土壤微生物研究概述

土壤微生物是使土壤具有生命力的主要成分，与土壤肥力及土壤健康有着密切关系，在土壤形成与发育、物质转化与能量传递等过程中发挥着重要作用，是评价土壤质量的重要指标之一，也是工业、农业、医药和环境用菌的重要来源。土壤微生物学是研究土壤中微生物的种类、数量、分布、生命活动规律及其与环境关系的基础学科，包括土壤微生物的生命活动及其对土壤肥力、植物营养和生态环境的影响，涉及微生物的形态结构、分类鉴定、生理生化和生长繁殖等微生物学基本内容，同时也包括生物化学和分子生物学等方面的一些内容。研究方法可大致分为以纯培养技术为代表的传统研究方法和以分子生物学为特色的现代研究方法。以下依次介绍土壤微生物学的研究对象和发展简史，并提出研究展望。

1.1 土壤微生物学的研究对象

土壤微生物是土壤中一切肉眼看不见或看不清楚的微小生物的总称，严格意义上应包括细菌、古菌、真菌、病毒、原生动物和显微藻类。土壤微生物学的研究对象包括森林、草原、农田、湿地和苔原等所有陆地和浅水域底部的土壤，主要研究自然、干扰或胁迫条件下土壤微生物的群落结构、种群消长、生理代谢、遗传变异、演替规律及其与土壤生态功能的关联，尤其是环境变更或管理分异条件下土壤质量的微生物学监测、评价与调控，以及土壤微生物种质资源的开发与应用。土壤是微生物生长和繁殖的天然培养基，被誉为微生物的大本营。土壤微生物资源在自然界中最为丰富多样，研究技术难度大、方法要求高，主要研究角度分为土壤微生物多样性、土壤微生物过程以及土壤微生物与环境的关系。

1.1.1 土壤微生物多样性

土壤生态系统是土壤生物与其周围环境所构成的自然综合体，生物与环境

之间既相互依赖、彼此制约，同时又相互作用、往复调控。土壤微生物多样性是土壤生态系统的一个基本生命特征，指土壤生态系统中所有的微生物种类、它们拥有的基因以及这些微生物与环境之间相互作用的多样化程度。土壤微生物多样性存在于基因、物种、种群以及群落四个层面，当前研究也主要集中在物种多样性、功能多样性、结构多样性及遗传多样性四个方面。

土壤微生物的物种多样性是指土壤生态系统中微生物的物种丰富度和均一度，主要是从分类学、系统学和生物地理学角度对一定地域内物种的现状进行研究，这是微生物多样性的最直接表现形式。自然界中绝大多数的微生物种群尚未被分离培养或描述过，目前主要通过培养基最大限度地培养各种菌落，由此了解土壤中可培养的微生物种群。

土壤微生物的功能多样性是指土壤微生物群落所能执行的功能范围以及这些功能的执行过程，对自然界元素循环具有重要意义，如分解功能、营养传递功能以及促进或抑制植物生长的功能等，目前一般采用底物诱导下的代谢响应模式测算土壤微生物群落的代谢功能多样性。正是由于微生物具有多种多样的代谢方式和生理功能，因而可以适应各种不同的生态环境，并以不同的生活方式与其他生物相互作用，从而构成了地球表面丰富多彩的生态体系。

土壤微生物的结构多样性是指土壤微生物群落在细胞结构组分上的多样化程度，这是导致微生物代谢方式和生理功能多样化的直接原因。生物标记物分析法通过提取和分析用作不同类群标记性指纹的生化组分或胞外产物来获取微生物群落组成和结构多样性信息。因为不同菌群的特征谱图不同，在高度专一性基础上又具有多样性，所以标记物的组成变化能够说明微生物群落结构的变化，从而可以对土壤微生物群落进行识别和定量描述。

土壤微生物的遗传多样性是土壤微生物在基因水平上所携带的各类遗传物质和遗传信息的总和，这是微生物多样性的本质和最终反映。与高等生物相比，微生物在基因水平上的多样性更为突出，不同种群间遗传物质和基因表达具有很大差异。根据研究手段不同，微生物遗传多样性一般表现在基因组大小和基因数目的多样性、遗传物质化学组成和 DNA 序列的差异、rRNA 的基因序列差异以及由基因序列所揭示的遗传背景多样性等方面。

土壤是挖掘微生物资源的重要基地，对于人类在粮食、能源、资源和环境等方面危机的缓解具有全球性的重大意义。土壤微生物的应用研究具有巨大潜力：首先，微生物在生物圈的维持中发挥着中枢作用，是地球生物化学循环的主要推动者，可用于环境变化监控和污染治理；其次，极端环境微生物的研究可为人类了解和探索生命的策略和极限以及超常物质的开发提供资源，在生物技术领域(如开发抗菌、抗肿瘤的产品)亦极具价值；再次，微生物在高等生物的保护和生态恢复中起着重要作用，如菌根真菌可以帮助植物成功地定植在土

壤中，实现目标地区的森林再造或土壤修复；最后，微生物在地球上起源早，具有独特的交叉反应且容易操作，可作为阐明生态演化和生物进化原理的模式种群。

1.1.2 土壤微生物过程

土壤是自然界物质循环的重要基地，土壤微生物是土壤中物质转化的动力，如固氮作用、硝化作用、反硝化作用、纤维素分解作用、腐殖质分解和合成作用，磷、硫、铁以及其他元素的转化等。相同的微生物种群可以行使不同的土壤功能，相同的土壤过程也可以由不同微生物种群完成。此外，土壤酶是土壤新陈代谢的重要因素，它与生活着的微生物细胞一起推动着物质转化。土壤生物化学反应几乎都是由酶驱动的，在碳、氮、硫、磷等元素的生物循环中都有土壤酶的作用。因此，了解土壤微生物的活动状况以及酶活性等，具有一定的生产实践意义。

土壤微生物过程即研究微生物的作用。目前有关土壤微生物过程强度和土壤酶的研究，日益受到广泛重视。随着分析仪器的的发展，土壤微生物过程研究在分析手段上亦有所进步，虽然仍不尽完善，但仍然可以反映出土壤中所进行的生物化学过程的相对强度。当然，土壤微生物学的基本内容是研究土壤中微生物的生命活动规律，如果只研究微生物纯培养，即使能够把土壤中的微生物种类全部分离出来，也只能获得一套不能说明它们在土壤中活动规律的菌种。因此，原位研究方法是了解土壤微生物作用的生物化学过程及其强度的重要手段。

目前除进行土壤微生物的显微观察以及微生物区系特别是根际土壤的原位观测外，经常采用一些模拟装置，以便在尽可能符合自然条件的情况下进行研究。从某种意义上说，模拟体系是研究微生物转化某一特定基质或研究影响微生物活性的环境条件所必不可少的研究手段。但模拟绝不是拼凑，更不是多种微生物的混合培养，它具有自然真实性，是大自然生态系统的一个缩影，并尽可能接近自然状况下生态系统的正常结构和功能。当然，缩影方法也不是简单地把自然小样本搬到实验室研究，有时需要对某些次要环境因素做些简化或舍弃，但在主要方面仍保持高度的真实性。近年来，稳定同位素示踪技术和稳定同位素核酸探针技术在土壤微生物原位研究中有了较大的发展，这是今后一段时间的重要发展方向。

1.1.3 土壤微生物与环境的关系

土壤微生物受土壤营养状况、pH、质地、温度、水分和通气性等的影响，环境变更或管理分异会导致土壤微生物多样性及其生态功能的变化。例如，人

类正面临着严峻的全球气候变化,如全球变暖、森林锐减、土地退化等等。土壤微生物在陆地生态系统元素循环中起基础作用,环境变更势必会对此造成影响。如大气 CO_2 浓度升高可能通过影响植物生长而间接影响土壤微生物,如增加根系生物量和根际沉积物、改变根系分泌物的化学组成等,进而影响土壤微生物群落,以致影响由微生物所调控的多个土壤过程;当 CO_2 浓度升高时,土壤微生物也会反过来作用于陆地生态系统的结构和功能,包括温室气体(如 CH_4 、 N_2O)排放等。

当然,土壤微生物也会因人类对土壤的管理利用而发生变化。例如,耕作可造成土壤团聚体的分裂和表层土壤中有机质的损耗,免耕土壤的微生物生物量和功能多样性往往高于传统耕作土壤,而轮作可能比采用单一性栽培的保护性耕作更有利于维持土壤微生物多样性及活性,并可抑制在单一栽培系统中易繁衍的有害微生物并提高农作物产量。另外,施用有机肥也可能有利于维持土壤微生物多样性及活性,施用无机肥的影响则因肥料种类、施用方式、土壤类型及利用方式等复杂因素的干扰而不同。综合而言,耕作可能会对土壤微生物造成不利影响,进而影响农业生态系统的可持续性,而施肥可能对此有调节作用。

当前,土壤污染是人类面临的重要环境问题,当各种各样的污染物进入土壤环境后,可间接地危及微生物,或进入微生物体直接产生危害。该危害既可以在物种和群落的生态水平上发生,也可以在基因和遗传的分子水平上发生,还可以在生理和代谢的细胞水平上发生。这不仅取决于土壤污染发生的类型、污染的方式以及污染物的种类、特性、浓度、时间等,也取决于土壤中微生物的群落结构、抗逆特性及其基因稳定性和易变性等。土壤是微生物的大本营,土壤污染必然会对土壤微生物及与之紧密联系的土壤生态功能造成极为严重的损害。

1.2 土壤微生物学的发展简史

土壤微生物学是19世纪中叶开始发展起来的一门生命科学分支学科,在19世纪后半叶取得了一系列令人振奋的研究成果,从多方面揭示了土壤中的部分微生物及其生态功能,并在20世纪初叶成为一门独立学科,这是土壤微生物经典生物学发展的黄金时代,纯培养技术是该阶段研究方法的集中代表。20世纪后半叶,土壤微生物研究方法取得突破性进展,BIOLOG、PLFA(phospholipid fatty acid,磷脂脂肪酸)、基因指纹图谱、克隆文库、基因芯片、稳定同位素核酸探针(stable-isotope probing, SIP)和环境基因组学等新兴技术开创了土壤微生物分子生态学发展的黄金时代,分子生物学技术是该阶段研究方法的

鲜明特色。

1.2.1 微生物研究方法进程

微生物学是指在细胞、分子或群体水平上研究微生物的形态构造、生理代谢、遗传变异、生态分布和分类进化等生命活动基本规律，并将其应用于工业发酵、医学卫生和生物工程等领域的科学，其基本任务是发掘、利用和改善有益微生物，控制、消灭或改造有害微生物。但在人类历史上的很长一段时间里，人们对微生物世界处于无知状态，对眼前的微生物往往表现出“视而不见、嗅而不闻、触而不觉、食而不察、得其益而不感其好、受其害而不知其恶”的愚昧状态。尽管当时的人类虽未见到微生物个体，却长期自发地与微生物打交道，并凭着经验在实践中开展利用有益微生物和防治有害微生物的活动。

回顾来看，微生物学的发展始终依赖于研究方法的突破和改进。1676年，微生物学先驱列文虎克(A. Leeuwenhoek)用自制的单式显微镜首次观察到细菌的个体，他被认定是第一个精确描述微生物世界的人。之后，微生物学奠基人巴斯德(L. Pasteur)和细菌学奠基人科赫(R. Koch)等先后创立了一系列研究微生物的独特方法和技术，并在理论上取得了大的突破，微生物学以独立的学科形式开始形成。1897年，毕希纳(E. Büchner)用无细胞酵母菌压榨汁中的“酒化酶”(zymase)对葡萄糖进行乙醇发酵成功，从而开创了微生物生化研究的新时代。此后，关于微生物生理和代谢的研究蓬勃开展开来，其中还掀起了寻找和研究抗生素的热潮。1953年4月25日，沃森(J. D. Watson)和克里克(H. F. C. Crick)在英国《自然》杂志上发表关于DNA结构的双螺旋模型，整个生命科学领域进入了分子生物学研究的新阶段，同样也是微生物学发展史上成熟期到来的标志。

1.2.2 土壤微生物学的创立

现代土壤学奠基人之一柯斯特切夫(П. А. Костычев)在1882—1885年详细研究了土壤中的菌类植物，指出微生物不仅作用于有机质的分解过程，还参与了腐殖质的形成过程。1891年，伊万诺夫斯基(D. I. Ivanovski)发表了关于土壤微生物作用的论文，系统研究了土壤微生物的数量、不含氮物质的分解、含氮物质的转化、蛋白质的再生成以及外界条件对土壤微生物活动的影响等。从19世纪末一直贯穿20世纪上半叶，土壤微生物学的发展与其主要奠基人维诺格拉德斯基(L. H. Winogradsky)关于土壤微生物学的研究是分不开的：他从1887年起陆续发现了硫细菌、铁细菌、硝化细菌及其化能营养特性，并首次创立了选择性无机盐培养基；1893年，他又第一次纯化培养了厌氧性的固氮

梭菌，并确定了它的固氮性能。

荷兰学者贝叶林克(M. Beijerinck)对土壤微生物学有很多贡献，他最先分离出根瘤菌和好气性的固氮菌，并且对于自生性的固氮作用进行了较深入的研究。前苏联学者奥梅梁斯基(В. Л. Омелянский)首先发现了分解纤维素的细菌，研究了纤维素分解和果胶质分解的微生物学过程，并对硝化细菌和固氮菌也进行了很多研究，他的研究工作和著作对前苏联土壤微生物学的发展起了重大的作用。美国微生物学家瓦克斯曼(S. A. Waksman)对土壤中有机质分解的微生物学原理进行了详细的研究，他于1928年出版的《土壤微生物学原理》(Principles of Soil Microbiology)总结了这门学科的主要成就，对土壤微生物学有很大帮助。此后，前苏联学者威廉斯(B. P. Williams)关于农学原理和土壤肥力的学说提出了土壤微生物学的研究任务，针对微生物生态学(土壤微生物群落、根际微生物及其活动等)提出了非常重要的科学理论，并创造了不少有实践意义的科学技术。

我国土壤微生物学研究起步较晚，1935年张宪武开始对根瘤菌进行过研究，在抗日战争时期，也只有两三个单位各自做了些分离菌种和接菌的试验。从20世纪40年代到新中国成立，从事土壤微生物研究和教学活动的集中代表和奠基人为张宪武、樊庆笙、陈华癸等，他们的研究内容主要集中在根瘤菌和抗生素。新中国成立后，农业微生物学科和应用工作有了长足的发展，研究工作主要分为以下几个方面：①土壤微生物生态学研究，研究不同土壤类型、气候条件和植被状态下的微生物生态学，研究土壤生成与发育过程中微生物的作用，并应用合理的农业技术措施来调节土壤微生物群落的活动，提高土壤肥力。②根际微生物研究，研究植物根际范围内的微生物群落，研究它们的生命活动对植物根部营养的作用，建立了合理施肥的微生物学基础。③土壤微生物种间关系研究，研究土壤微生物间的互助与对抗关系，以期能够调控它们，发挥有益微生物的作用，抑制有害微生物的作用。④微生物肥料研究，选育有效菌种，研究微生物肥料的制造和使用方法，如根瘤菌、固氮菌、磷细菌等不同功能型肥料，推广微生物肥料，提高农业产量。总体来说，我国当时的发展水平除了个别研究达到国际先进水平外，绝大多数研究与国外先进水平相比存在很大差距。

1.2.3 土壤微生物分子生态学的发展

20世纪后半叶，土壤微生物研究方法取得突破性进展，包括以PLFA技术为代表的生物化学方法、以BIOLOG技术为代表的生理学方法(community-level physiological profiling, CLPP)和以PCR(polymerase chain reaction, 聚合酶链反应)技术为代表的分子生物学方法等。PLFA技术通过分析微生物细胞结构稳定组