

〔日〕土壤微生物研究会 编

土壤微生物实验法

科学出版社

土壤微生物实验法

〔日〕土壤微生物研究会 编

叶维青 张维谦 张玉龙 译
周鹏里 薛景珍

叶维青 张维谦 校

科学出版社

1983

内 容 简 介

本书是一部内容全面而详尽的土壤微生物学实验手册，包括土壤细菌、放线菌、真菌、藻类、原生动物、线虫、根际微生物、菌根菌以及许多生理群微生物的分离和计数以及土壤中微生物活性和土壤酶的测定法。这些实验法都力求模拟土壤条件以得到符合土壤中真实情况的结果。本书还简述了土壤藻类和土壤线虫的鉴定法以及分解农药微生物的实验法。每章都列举了大量文献。

本书可供微生物、土壤、农业科技工作者和农业院校有关专业师生参考。

土壤微生物研究会编

土壤微生物实验法

養賢堂，東京，1977

土壤微生物实验法

〔日〕土壤微生物研究会 编

叶维青 张维谦 张玉龙 译
周鹏里 薛景珍

叶维青 张维谦 校
责任编辑 洪庆文

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1983年12月第一版 开本：787×1092^{1/32}

1983年12月第一次印刷 印张：22 3/8

印数：0001—4,500 字数：496,000

统一书号：13031·2442

本社书号：3347·13—12

定价：3.40元

中译本前言

日本土壤微生物研究会编的《土壤微生物实验法》(1977年订正第二版)是四十多位土壤微生物学工作者分别写成的。内容广泛、详尽,是一部很有参考价值的土壤微生物学实验手册,这部书有如下特点:

一、取材广泛,包括了土壤细菌、放线菌、真菌、藻类、原生动物和线虫、根际微生物、菌根以及许多生理群的分离和测定方法、土壤中微生物活性的测定方法、土壤酶的研究和测定方法、土壤中各生理群主要种类的特征,简述了土壤藻类和线虫的鉴定法和检索表。对于同一项目大都列举了多种实验方法,并对不同方法做了评介,以便根据不同条件选择应用。

二、书中内容绝大多数是原文作者根据自己的第一手经验编写的,有些是编写者创造的,有些是原本由别人提出,但经过作者实践考查过,并有所改进。因此,在许多项目中都指出了实验工作的关键问题和需要特殊注意的事项。

三、在仪器装配、试剂配制、取样、操作步骤等方面都写得十分细致、具体,便于参考应用。

本书由沈阳农学院微生物学教研室和外语教研室的同志们译出,译文严谨,力求确切表达科学内容和原著者的见解。“信且达”,体现了译者们的丰富的专业知识、语文水平和严谨的学术作风。

这本书的中译本的出版对于我国土壤微生物学的研究和教学工作将是很有裨益的。

陈华葵识

前 言

日本的土壤微生物研究工作,最早开始于明治后期,大正年间继承下来。但进入昭和年代之后,则被土壤化学的研究所淹没,并未培养土壤微生物的研究人员,并且在第二次世界大战时还一度中断了研究。至于说土壤化学的研究,也只是集中在土壤中的物质变化,特别是集中在氮的形态变化上,说明了土壤中氮的消长变化情况。然而,左右土壤物质变化的却是土壤中的微生物,因此微生物方面的研究就应与物质变化的研究并重。从这种观点出发,战后开始了土壤微生物的研究工作,昭和 31 年(1956 年)成立了土壤微生物座谈会。1966 年作为研究会成立 10 周年纪念,发行了《土壤与微生物》杂志等等,开展了独立活动直至现在。

在土壤微生物的方面研究,目前最为欠缺的是,还没有一本用日语书写的土壤微生物实验法。这种情况一方面使测定方法不能统一,同时也使得对土壤微生物有兴趣的研究人员难以进入土壤微生物领域。

鉴于这些实际情况,土壤微生物研究会从 1968 年起就着手计划编写土壤微生物实验法一书,编委会定出了选题,确定了执笔人员,一直在为出版工作而努力。这项实验法的宗旨,是使不甚具备土壤微生物知识的人,根据本书也可以正确地进行实验,能够解释所获得的实验结果;书中尽量收集微生物生态上目前认为重要的微生物;将微生物作用与微生物有机地联系起来加以介绍;各题目分别委托对该题目有经验的第一线的人员执笔。综观全书,从目前来说尚不失为一部

用日语刊行的收罗无遗的好书。当然，实验法并不是固定不变而是日新月异的，因此，我们准备在适当的时机进一步修订。

希望这部实验法能广泛地为对土壤微生物有兴趣的研究人员所应用，使得土壤微生物学更加有所发展。

最后，在纸张不足发行其他书刊比较困难的情况下，对欣然赞同出版发行的养贤堂以及川锐雄社长，对在编辑中做出贡献的各位编委以及各位执笔者深表谢意。

土壤微生物研究会

代表 铃木达彦

1975年2月

目 录

中译本前言

前言..... xxix

第一章 土壤和微生物的处理方法..... 1

1.1 土样的采集和制备 (香川尚德)..... 1

1.1.1 土样的采集和制备过程..... 1

1.1.2 土壤剖面的调查..... 2

1.1.3 土样的采集..... 4

1.1.4 土样的制备和保存..... 8

1.1.4.1 毛样的制备..... 9

1.1.4.2 分析样品的制备..... 9

1.1.4.3 土样的保存..... 10

1.2 微生物的处理方法 (仁王以智夫)..... 10

1.2.1 微生物实验的特点..... 10

1.2.2 实验室..... 11

1.2.2.1 一般实验室..... 11

1.2.2.2 无菌室..... 12

1.2.3 常用的器皿..... 13

1.2.4 灭菌..... 14

1.2.4.1 高压灭菌..... 15

1.2.4.2 间歇灭菌..... 16

1.2.4.3 干热灭菌..... 17

1.2.4.4 火焰灭菌..... 18

1.2.4.5 化学灭菌..... 18

1.2.4.6 射线灭菌..... 19

1.2.4.7 过滤除菌..... 19

1.2.5	培养基的制备	21
1.2.5.1	市售培养基	21
1.2.5.2	实验室制备的培养基	21
1.2.5.3	棉塞	22
1.2.5.4	斜面培养基和柱状培养基	23
1.2.6	微生物的培养	24
1.2.6.1	微生物的移植	24
1.2.6.2	静置培养	25
1.2.6.3	振荡培养	25
1.2.6.4	通气培养	26
1.2.7	镜检	26
1.2.8	微生物实验的清理及器皿的洗涤	27
1.2.8.1	微生物实验中的废弃物	27
1.2.8.2	器皿的洗涤和保管	28
	引用文献	28
第二章	土壤微生物的计数法	30
2.1	序言 (近藤熙、加藤邦彦)	30
2.2	活菌数的测定 (近藤熙、加藤邦彦)	30
2.2.1	稀释平板法	30
2.2.1.1	器皿和试剂	31
2.2.1.2	操作	32
2.2.1.3	活菌数的计算	33
2.2.2	最或然数法	35
2.2.2.1	器皿和试剂	35
2.2.2.2	操作	35
2.2.2.3	活菌数的计算	36
2.2.3	注意事项	37
2.3	微生物总数的测定 (松口龙彦)	40
2.3.1	Rossi-Cholodny 埋片法	40
2.3.1.1	操作	40

2.3.1.2	微生物相对密度的计算	41
2.3.2	Thornton-Gray 的比率法 (ratio 法)	41
2.3.2.1	操作	42
2.3.2.2	微生物总数的计算	43
2.3.3	Jones-Mollison 法	43
2.3.3.1	操作	43
2.3.3.2	微生物总数的计算	44
2.4	荧光抗体法 (菊本敏夫)	46
2.4.1	荧光抗体制备的程序	46
2.4.1.1	免疫原与免疫	46
2.4.1.2	γ -球蛋白的制备	47
2.4.1.3	荧光色素的标记	49
2.4.1.4	未结合色素的清除	49
2.4.1.5	荧光抗体的精制	50
2.4.1.6	荧光抗体的保存	51
2.4.2	荧光抗体染色的程序	51
2.4.2.1	标本的制作	51
2.4.2.2	标本的固定(预处理)	52
2.4.2.3	荧光抗体染色	52
2.4.3	荧光显微镜的观察	53
2.5	土壤切片法	54
2.5.1	土样的采集	55
2.5.2	染色、洗涤和干燥	55
2.5.3	树脂固定	56
2.5.4	土壤薄片和镜检载玻片的制备	57
2.5.5	土壤薄片的镜检	58
	引用文献	60
第三章 土壤细菌实验法		62
3.1	序言 (佐藤 匡)	62

3.2	好气性细菌的计数和分离 (牛越淳夫)	63
3.2.1	好气性细菌的测数	63
3.2.1.1	好气性细菌的计数	64
3.2.1.2	耐结晶紫细菌的测数	64
3.2.1.3	土壤中芽孢数的测定	65
3.2.2	细菌的分离和保存	65
3.2.2.1	细菌的纯化分离法	65
3.2.2.2	菌株的保存	66
3.2.3	细菌的分类	69
3.2.3.1	Bergey 细菌鉴定手册概要	79
3.2.3.2	土壤中常见细菌属的主要分类学特性及其 检定方法	79
3.3	厌气性细菌的计数和分离 (武田 洁)	92
3.3.1	培养基的制备	92
3.3.2	厌气培养法和活菌的计数	93
3.3.2.1	滚管法 (roll tube)	94
3.3.2.2	Rosenthal 法	96
3.3.2.3	改良 Rosenthal 法	98
3.3.2.4	碱性焦性没食子酸法	99
3.3.2.5	Weinberg 管法	100
3.3.2.6	钢丝棉法	101
3.3.2.7	厌气罐法	102
3.3.3	梭状芽孢杆菌 (<i>Clostridium</i>) 的计数	104
3.3.4	厌气性细菌的分离和保存	105
3.3.4.1	厌气性细菌的分离和纯化	105
3.3.4.2	厌气性细菌的保存	106
3.3.5	厌气细菌的鉴定	107
3.3.5.1	厌气性细菌的性状检查法	112
	引用文献	117

第四章 土壤放线菌实验法(兰 道生)	120
4.1 序言	120
4.2 活菌数的测定	121
4.2.1 器皿和试剂.....	121
4.2.2 培养基的选择和培养方法.....	121
4.2.3 平板上放线菌的鉴别法.....	122
4.3 放线菌的分离与保藏.....	123
4.4 放线菌的鉴定	123
4.4.1 链霉菌的分类法.....	125
4.4.1.1 形态观察.....	127
4.4.1.2 放线菌颜色的观察.....	129
4.4.1.3 放线菌的生理试验.....	129
4.4.2 链霉菌以外的放线菌的鉴定.....	132
4.5 抗生素生产性能	132
4.5.1 抗生素生产性能的测定法.....	132
4.5.2 抗生素效价的测定.....	133
引用文献.....	133
第五章 土壤真菌实验法(生越 明)	135
5.1 序言	135
5.2 真菌的研究方法	136
5.2.1 移植.....	136
5.2.2 单孢分离法.....	136
5.2.3 单菌丝分离法.....	137
5.2.4 细菌汰除法.....	138
5.2.5 真菌的培养.....	139
5.2.6 真菌培养基.....	139
5.3 土壤真菌分离法	140
5.3.1 稀释平板法.....	141

5.3.1.1	器具	141
5.3.1.2	培养基	142
5.3.1.3	操作	142
5.3.2	土壤淋洗法	142
5.3.2.1	器具(装置)	142
5.3.2.2	培养基	143
5.3.2.3	操作(淋洗)	143
5.3.3	孢子悬浮法	144
5.3.3.1	器具与试剂	144
5.3.3.2	操作	144
5.3.4	土壤平板法	145
5.3.4.1	培养基	145
5.3.4.2	操作	145
5.3.5	钟形撒粉器法	145
5.3.5.1	器皿	145
5.3.5.2	培养基	145
5.3.5.3	操作	145
5.3.6	平板插入筛选法	147
5.3.6.1	器皿	147
5.3.6.2	培养基	147
5.3.6.3	操作	147
5.3.7	插入管法	148
5.3.7'	变法	148
5.3.7'.1	器皿	148
5.3.7'.2	培养基	148
5.3.7'.3	操作	148
5.3.8	菌丝分离法	149
5.3.8.1	培养基	149
5.3.8.2	操作	149

5.3.9	植物残渣法	150
5.3.9.1	器皿和试剂	150
5.3.9.2	培养基	151
5.3.9.3	操作	151
5.3.10	捕捉法	151
5.3.10.1	材料	151
5.3.10.2	培养基	152
5.3.10.3	操作	152
5.4	土壤中真菌的观察法	152
5.4.1	直接镜检法	152
5.4.1.1	器皿和试剂	152
5.4.1.2	操作	153
5.4.2	埋片法	153
5.4.2'	变法	154
5.4.2'.1	器皿与试剂	154
5.4.2'.2	操作	154
5.4.3	土壤悬浮液涂抹法	154
5.4.3.1	器皿与试剂	154
5.4.3.2	培养基	154
5.4.3.3	操作	155
5.4.4	繁殖体测定法	155
5.4.4.1	器皿与试剂	155
5.4.4.2	培养基	155
5.4.4.3	操作	155
5.4.5	土壤切片制法	156
5.4.5.1	器皿与试剂	156
5.4.5.2	操作	156
5.5	真菌保藏法	157
5.5.1	菌种保藏的注意事项	157

5.5.2	菌种保藏用培养基	158
5.5.3	传代培养保藏法	158
5.5.4	液体石蜡覆盖法	159
5.5.5	双重橡皮栓法	159
5.5.6	砂管保藏法	160
5.5.7	土壤保藏法	160
5.5.8	冷冻干燥保藏法	161
5.6	真菌的鉴定	162
5.6.1	土壤真菌的分类	162
5.6.2	土壤真菌的鉴定	164
5.6.3	土壤真菌目的检索表	164
	引用文献	167
第六章	土壤藻类实验法(秋山 优)	170
6.1	序言	170
6.2	土壤藻类的采集和培养	171
6.2.1	采集法	171
6.2.2	分离和培养方法	172
6.2.2.1	混合培养(粗培养)	172
6.2.2.2	单藻培养和纯培养	174
6.2.3	培养条件	176
6.2.4	分离藻类的保藏	176
6.3	土壤藻类数量的测定	177
6.4	土壤藻类的鉴定	179
6.4.1	土壤藻类的观察法	179
6.4.2	土壤藻类的检索	185
	引用文献	193
第七章	土壤原生动物实验法(栗原 康)	196
7.1	序言	196

7.2	分离和培养	199
7.2.1	细菌捕食性原生动物的检定和培养	199
7.2.1.1	Singh 法	199
7.2.1.2	利用细菌悬液的培养法	199
7.2.2	腐生性原生动物的检定和培养	200
7.2.3	分离培养	200
7.3	计数法	200
7.3.1	用玻璃环计数	201
7.3.2	活动体和孢囊的计数	201
7.3.3	直接镜检法计数	202
7.3.3.1	普通染色法计数	202
7.3.3.2	改良革兰氏染色计数法	203
7.4	原生动物的分类	204
7.4.1	土壤原动物在分类学上的地位	205
7.4.2	主要土壤原动动物的形态特征	206
	引用文献	210
第八章	线虫实验法(一户 稔、三井 康)	212
8.1	序言	212
8.2	样品的采集和线虫的分离	213
8.2.1	植物、土壤样品采集方法	213
8.2.2	土壤线虫(不包括孢囊)分离法	215
8.2.2.1	筛分法	215
8.2.2.2	Baermann 法	216
8.2.2.3	Christie-Perry 法	217
8.2.2.4	离心浮选法	218
8.2.2.5	特制洗选器分离法	219
8.2.3	土壤中孢囊的分离法	221
8.2.4	植物组织中的线虫分离法	222
8.2.4.1	组织解剖分离法	222

8.2.4.2	Baermann 分离法	222
8.2.4.3	组织捣碎器筛分法	223
8.2.4.4	加热逸出法	223
8.2.4.5	组织染色分离法	224
8.2.5	孵化幼虫大量采集法	225
8.3	线虫的处理和保藏	226
8.3.1	线虫个体的处理方法	226
8.3.2	加热杀死线虫	227
8.3.3	线虫的固定	228
8.3.4	线虫的保藏法	229
8.3.4.1	管瓶保藏和植物标本保藏法	229
8.3.4.2	显微镜标本的制法	230
8.3.5	线虫群体的增殖法	232
8.4	线虫的鉴定	233
8.4.1	线虫目或总科之前的分类	233
8.4.2	植物寄生线虫的分类和鉴定	237
8.4.3	重要寄生线虫的简易鉴别法	241
8.4.4	日本主要的植物寄生线虫	243
8.4.5	委托鉴定时的注意事项	246
8.5	线虫密度的调查	247
8.5.1	线虫个体的计数	247
8.5.2	土壤线虫密度的调查	248
8.5.2.1	抽样测定法	248
8.5.2.2	指示植物测定法	249
8.5.2.3	孢囊线虫密度的调查	249
8.5.3	植物线虫寄生量的调查	250
8.5.3.1	根瘤线虫寄生量的调查	250
8.5.3.2	根腐线虫寄生量的调查	252
8.5.3.3	孢囊线虫寄生量的调查	253

8.5.3.4	柑桔根线虫寄生量的调查	254
8.6	线虫的培养	254
8.6.1	用细菌培养线虫	255
8.6.2	用真菌培养线虫	255
8.6.3	用愈伤组织培养线虫	256
8.6.3.1	种子消毒	257
8.6.3.2	愈伤组织培养基	257
8.6.3.3	虫体灭菌	257
8.6.3.4	虫体的洗涤	259
8.6.3.5	线虫的接种	260
8.7	食线虫菌的分离与保藏	260
8.7.1	食线虫菌的捕食行动	260
8.7.2	菌的分离法	260
8.7.3	食线虫菌的分离操作	263
8.7.4	分离培养基	264
8.7.5	食线虫菌的培养和保藏	264
	引用文献	264
第九章	富集培养(佐藤 匡)	267
9.1	序言	267
9.2	瓶培养法-液体富集培养法	268
9.2.1	好气培养法	268
9.2.1.1	器皿和试剂	268
9.2.1.2	操作	269
9.2.2	厌气培养法	269
9.2.2.1	器皿和试剂	269
9.2.2.2	操作	272
9.2.3	注意点和补充	273
9.3	土壤环流法	274
9.3.1	装置的组装和作用原理	276