

278291

土壤微生物 分析方法手册

中国科学院 微生物室 主編
林业土壤研究所



科学出版社

10 |
5
277

6145

56277

278291

土壤微生物分析方法手冊

中国科学院 微生物室 主編
林业土壤研究所

科学出版社

1960

内 容 简 介

本书内容包括分析土壤微生物的基本设备和一般技术、如何测定土壤微生物数量及组成、各种微生物生理羣及藻类的测定、根际微生物区系的研究方法、土壤生物化学过程的强度测定、土壤酶活性的测定等部分。本书系根据国内各单位积累的經驗，参照国外的方法，进行整理編成。考虑到土壤酶在形成腐殖质中的作用，这方面理論近年有很大发展，因而书中作了較多的介绍。

本书为对研究土壤微生物提供了研究方法的一本工具书，可供农林业方面的微生物工作者及高等学校生物系师生参考。

土壤微生物分析方法手册

中国科学院
林业土壤研究所 微生物室主編

科学出版社出版 (北京朝阳门大街 117 号)
北京市书刊出版业营业許可証出字第 061 号

中国科学院印刷厂印刷 新华书店总經售

1960 年 10 月第 一 版 书号：2295 字数：63,000
1960 年 10 月第一次印刷 开本：850×1168 1/32
(京) 0001—7,500 印张：3

定价：0.46 元

前 言

微生物具有強烈的生物化学活性。它們是土壤中进行的各种物质轉化过程的积极参与者，是土壤中各种生物化学和生理学过程动态平衡的主要調节者，在土壤形成和創造土壤肥力中起着重大的作用。有关土壤微生物在創造土壤肥力和植物营养中的重大作用，已引起生物土壤科学工作者和农业生产实践工作者的注意。認識到应用土壤微生物学的分析資料，来研究土壤的发生、熟化和肥力不仅能获得土壤特征的完整概念，而且能对生产提出可靠的依据。現在生产实践上已向这門科学提出解决控制土壤微生物的活动，来提高土壤肥力，保証作物产量不断增长的办法。土壤微生物学工作者已經在这方面进行了很多的工作，积累了不少有意义的資料，但不可諱言，所积累的知識还远远不能符合客观的要求。这一方面是由于土壤微生物的生长和活动，是在条件异常复杂的土壤中发展着，研究土壤微生物間的相互关系有較大困难；另一方面是目前在研究土壤微生物所应用的分析方法，还存在着很大的缺点，还缺乏在微生物生存的自然条件下，研究它們的生活的方法。这样就大大地妨碍了这門学科的发展和更好的解决生产实践上的問題。

解放以来，土壤微生物学的研究工作已在我国广泛地开展起来，几年来积累了不少有意义的資料，同时部分的研究結果，已經在生产实践上發揮了一定的作用。在研究方法方面，各有关单位也在工作中摸索出不少好的經驗。大家正满怀信心地要在短时期内通过总结农林业丰产經驗，建立一套完整的、先进的土壤微生物学的研究体系和分析方法，为創造中国的土壤微生物学而奋斗！但是目前在总结农林业丰产經驗的工作中，由于所采用的分析方法不同，所得到的結果常常难于比較，这給較全面地分析和总结

这方面的資料带来不少的困难。因此在当前阶段采用可以比較通用的分析方法，已成为土壤微生物学工作者十分注意的問題。目前使用的分析方法很多，但各有其优缺点，提出一套符合多方面要求的統一方法，是有一定困难的。在去年十一月由中国科学院生物学部主持在中国科学院林业土壤研究所召开的土壤微生物区系工作座談会上，参加會議的同志們再一次提出了統一分析方法的問題、认为有早日編写出一本适应当前中国土壤微生物工作情况的分析方法手册的必要。对这个問題在会上作了专题討論，提出了分析方法的大致輪廓。最后推定由中国农业科学院土壤肥料研究所陈子英，沈阳农学院馬麟祥，中国科学院土壤研究所郝文英，中国科学院微生物研究所关妙姬和中国科学院林业土壤研究所周煦卿，郑洪元等同志执笔，并由中国科学院林业土壤研究所微生物室主編，这样就促使这本分析方法誕生了。

文献里的分析方法很多，这本小册子里所选用的方法，多数是国内有关单位在工作中应用較广，并且认为能获得良好結果的方法。同时也采用了一部分苏联科学院微生物研究所普希金斯卡娅教授所介紹的方法。这本书主要是介紹一些分析的操作方法，因此尽量減少純理論性的东西。同时为了供开始进行这方面工作的同志参考，除較詳細地介紹了操作方法外，还介紹了一些有关微生物的基本操作技术。此外，由于考虑到酶在土壤的生物活性和土壤腐殖质的形成等方面具有很重要的意义，因此作了較多的介紹，供深入进行研究的参考。

这本小册子只是中国土壤微生物分析方法手册的开端，益趨完善的分析方法，有待从事这方面工作同志共同努力来制訂。更由于这本书編写的時間較为仓促，内容不完备和錯誤的地方在所难免，希望同志們指正和补充。

張克武 1960年4月1日

目 录

前 言	(i)
第一章 微生物实验室的基本设备和一般技术	(1)
一、实验室的设备	(1)
二、实验室一般操作	(1)
(一)玻璃器皿的清洁法	(1)
(二)灭菌(器皿及培养基的灭菌)法	(2)
(三)天平的使用方法	(4)
三、土壤样品的采取	(4)
(一)采样前准备	(4)
(二)采样	(4)
四、土壤样品的保存	(6)
五、试样的分析方法——微生物计数法	(6)
(一)土壤颗粒接种法	(6)
(二)土壤悬液接种法	(7)
(三)直接计数法	(8)
(四)埋片法	(9)
第二章 土壤微生物数量及组成的测定	(11)
一、各类微生物的计数	(11)
(一)细菌的计数	(11)
(二)真菌的计数	(15)
(三)放线菌的计数	(17)
二、各类微生物数量与组成的统计	(18)
(一)细菌	(18)
(二)真菌	(19)
(三)放线菌	(19)
三、各类微生物的纯化和鉴定	(19)

(一) 稀释法	(19)
(二) 划线法	(20)
第三章 各种微生物生理羣及藻类的测定	(21)
一、 氨化細菌	(21)
(一) 平板培养法	(21)
(二) 稀释法(滴定法)	(22)
二、 硝化細菌	(23)
(一) 亚硝酸細菌数量的测定——应用稀释法	(23)
(二) 硝酸細菌数量的测定——应用稀释法	(24)
三、 反硝化細菌(硝酸还原細菌)	(25)
四、 好气性自生固氮菌	(26)
(一) 土粒法	(27)
(二) 平板法	(27)
(三) 稀释法	(28)
五、 嫌气性自生固氮菌	(29)
六、 微嗜氮微生物	(30)
七、 土壤藻类	(30)
(一) 稀释法	(30)
(二) 平板法	(31)
八、 纖維素分解菌	(31)
(一) 好气性纖維素分解菌的测定	(32)
(二) 嫌气性纖維素分解菌的测定	(33)
九、 硫細菌	(34)
(一) 硫化細菌的数量及其活动强度的测定	(34)
(二) 反硫化細菌的数量及其活动强度的测定	(35)
十、 磷細菌	(36)
十一、 鉄細菌	(37)
(一) 鉄細菌的测定	(38)
(二) 高铁还原菌的测定	(38)
十二、 硅酸盐細菌	(39)
第四章 根际微生物区系研究方法	(40)

一、根系微生物分析法	(40)
(一) 采集分析样株	(41)
(二) 称取样品	(41)
(三) 冲洗	(42)
(四) 观测项目	(43)
二、根际微生物区系的研究法	(44)
第五章 土壤生物化学过程强度的测定	(49)
一、土壤呼吸强度的测定	(49)
(一) CO ₂ 的比色测定法	(50)
(二) CO ₂ 容量测定法	(50)
(三) CO ₂ 气量法	(51)
(四) CO ₂ 田间测定法	(53)
二、纤维素分解作用强度的测定	(53)
三、氨化作用强度的测定	(54)
(一) 土壤培养法	(54)
(二) 溶液培养法	(56)
(三) 酪氨酸法	(56)
四、固氮作用强度的测定	(57)
(一) 土壤培养法	(57)
(二) 溶液培养法	(57)
五、硝化作用强度的测定	(58)
六、磷的转化强度的测定	(60)
七、腐殖质分解作用强度的测定	(62)
八、土壤中优势微生物合成腐殖质能力的测定	(63)
(一) FeCl ₃ 反应试验	(63)
(二) 酚氧化酶强度的测定	(63)
第六章 土壤酶活性的测定	(65)
一、蛋白分解酶的测定	(65)
(一) 酪素分解法	(65)
(二) 精胶分解法	(66)
二、脲酶的测定	(67)

三、纖維素分解酶的測定	(68)
四、轉化酶的測定	(69)
五、接觸酶的測定	(70)
(一) 滴定法	(71)
(二) 氣量法	(71)
六、過氧化酶(或過氧化物酶)的測定	(71)
七、多酚氧化酶的測定	(72)
八、脫氫酶的測定	(72)
九、磷酸酶的測定	(73)
(一) 酚酞磷酸鈉法	(73)
(二) 磷酸苯二鈉法	(74)
参考文献	(75)
附 录	(81)
土样登記卡片	(81)
数量指标計算細菌数量統計表	(81)
各类微生物分析結果登記表	(84)

第一章 微生物實驗室的基本設備和一般技術

一、實驗室的設備

經常使用的微生物學的技术方法之一，是从微生物的混合体中分离出一种或一系列的微生物，用人工方法培养它們，以便进一步全面的研究它們的形态，培养和生理特征。在微生物学发展的现阶段中，除在显微镜下研究微生物的形态以外，也广泛的采用生物化学和生理学的研究方法，以及研究微生物所引起的某些过程的特殊方法。所以微生物實驗室應該有能进行微生物培养工作，显微镜工作，以及基本化学工作的設備。

微生物試驗室，有一部分和化学分析室完全一样，但也有它特殊的要求。實驗室要求清洁无尘，空气流通。所謂清洁的含义中尚有空气中微生物含量的要求。工作时防止气流的过分振動，如果条件允許最好在室內設无菌室或接种箱，以使操作减少污染。

对于在微生物工作中使用过的器皿和工具在洗滌前，应經過特殊的处理(灭菌或消毒)，来杀死所有的微生物。器皿的洗滌、杀菌及許多輔助工作最好是在单独的房間内进行。

在實驗室內經常要接触和应用的許多仪器中，最常用的有：带有油鏡頭的显微镜，高压灭菌鍋，烤箱，保温箱，1/10的天秤，分析天秤，烧杯，量筒，滴管，三角瓶，試管，糖发酵管，白金耳，白金針，刮刀，酒精灯，載玻片，刻度吸管，平底的二重培养皿，染色用品，以及制备培养基所用的藥品等等。

二、實驗室一般操作

(一) 玻璃器皿的清潔法

1. 新的玻璃器皿 在制造过程中常粘附一些可溶物质，而这

些物質可能对微生物有害。故新的器皿要先用水洗，再用肥皂充分擦洗；必要时用 20% 的盐酸溶液浸漬，然后用清水洗去全部残余的盐酸（无氯离子存在）。

2. 已培养过微生物的玻璃器皿 特别是能引起人畜或植物传染病的病原微生物的玻璃器皿，必须经过高压灭菌后，使其内容物融化，然后倾于污物容器内，再用毛刷沾用肥皂和去污粉洗涤，最后用淨水冲洗，凉干。

3. 試管 可浸在热的肥皂水中煮沸 10 分钟，取出浸于冷水中，用毛刷擦去内壁污物，并用清水冲淨，倒放凉干。

4. 吸管 先用鈎針拔除棉花塞，用水将粘附管壁的污物冲走，然后浸泡在洗液中 24 小时，再用水小心冲洗干淨，吸管口向上傾斜放置凉干。

5. 載玻片和盖片 一般不宜用毛刷洗涤，最好放在肥皂水或洗液内煮沸十分钟，取出用水冲淨。如用于細菌鞭毛染色，則載玻片上必須无油漬，可用 10% 的重碳酸鈉煮沸，再以热肥皂水洗涤。洗淨的玻片用軟布擦干或放在 70% 的酒精中，使用时取出以軟布擦干或經火焰烤干。

(二) 滅菌(器皿及培养基的滅菌)法

用于培养微生物的器皿和培养基在使用前，必須經過灭菌。根据要灭菌物品的性質，选择适当的方法进行。

灭菌的方法可分物理灭菌，化学灭菌，热力灭菌，过滤灭菌等四类。

1. 物理灭菌 紫外綫灭菌，可用于接种室内。

2. 化学灭菌 应用化学药品杀死各种器皿及工具等的表面微生物。常用的葯剂有以下几种：(1) 3—5% 的石碳酸溶液，用于被微生物污染的实验桌，衣服等的消毒。(2) 2% 的来苏尔溶液，可以用来洗手消毒。(3) 用 70% 的酒精溶液，可以用来消毒器具。其他如碘酒、福尔馬林等都有灭菌作用。

3. 热力灭菌 利用热力来杀菌，这是最常用的方法，根据加热

的方式不同,可分为以下几种方法。

(1) 火焰灭菌法 将所需要灭菌的东西,放在火焰上烧灼以达到灭菌的目的,如白金耳、剪刀、镊子和载玻片等耐烧的器具。

(2) 干热灭菌法 利用干热箱中的干燥热空气进行灭菌,一般空的玻璃试管、培养皿、烧瓶、吸管等可用此法灭菌。干燥箱的温度保持在 $150-170^{\circ}\text{C}$,灭菌时间是1—2小时。为避免器皿破裂,当烤箱内物品灭菌好以后,不可立即将门打开,必须待箱内温度降到 $50-70^{\circ}\text{C}$ 时方可开门。

(3) 湿热灭菌法 利用灭菌器中湿热空气或蒸汽以进行灭菌,方法有以下几种:

1) 常压湿热灭菌,亦称巴斯德灭菌法 常用于杀死非芽孢微生物。于 $70-80^{\circ}\text{C}$ 加热5—10分钟。这方法主要是用来处理注射器和其他金属器具。

2) 柯赫间歇灭菌 利用煮沸水所产生的循环蒸气来灭菌。蒸气温度为 100°C ,一般來說,在这样温度下繁殖体經30—45分钟后即可死亡,但芽孢菌則不能消灭。故要每天进行一次灭菌,連續进行3天才行。这种灭菌法应用于在較高温度下易破坏的物品和培养基——象含糖培养基、牛奶、明胶等。

3) 高压灭菌 用高压蒸气(2个气压, 121°C)20—30分钟处理,便可达到完全灭菌。使用高压蒸气杀菌时,首先要将杀菌器内的空气排除,然后关密排气孔。如果排气不完全,会影响温度的升高,則杀菌不完全。当加热停止后,須待气压計指針降到零时,再徐徐打开气孔;如果早打开气孔会使培养基猛烈沸騰,沾湿棉塞,有时甚至会内容物頂出棉塞,操作要特别注意。因培养基的体积与热的传导有密切的关系,所以在使用上述方法灭菌时,应根据要灭菌的培养基的数量来决定灭菌的时间。同时为了避免凝結水沾湿棉塞,可用硫酸紙包好再进行灭菌。

4) 过滤灭菌 对热不稳定物质,如含維生素、血清、糖类及一些药物等的液体的灭菌,可应用过滤灭菌法。即将液体通过一种已經灭菌过的瓷器、硅藻土、石棉或玻璃制成的过滤器灭菌。

(三) 天秤的使用方法

使用天秤应注意以下几点：

1. 天秤应放平 安置的地方要避免有振动，使用时绝对避免风。
2. 天秤的休止点应接近于休止点指牌中央 每次使用前要先校准，用毕后也要检查休止点有无变动。
3. 添加物品或除去物品以及不用天秤时，应将梁架上。使用时动作要慢，不能过于剧烈的转动，以维持天秤灵敏度。
4. 被称物应放在天秤左边的载物盘上，物品不能直接与盘接触，必须放在洁淨纸、表面皿或称量瓶中称量。
5. 被称物品的温度应与天秤的温度一致。
6. 切勿用手触摸砝码，特别是分析天秤的砝码。砝码与天秤要专一使用。

三、土壤样品的采取

土壤样品的采取，是土壤微生物分析的第一步。样品采取的代表性，以及均匀性均影响以后分析的准确度，采样时必须加以严密的注意。

(一) 采样前准备

采样前必须准备下列一组用具：

1. 刮子(挖土坑及采样用)，或开口土钻。
2. 灭菌硫酸纸(50 × 50 厘米)，混合土样用。
3. 干淨的塑料袋，盛土壤样品用。
4. 灭菌标签纸，记录用。

(二) 采 样

1. 选点 采样时最好能多听取土壤学家(或植物学家，森林学家，这决定于采何种土壤)的意见，选择具有代表性地区进行采

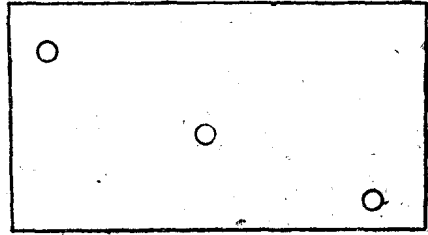
样。

2. 记录

- (1) 土壤植被的描述。
- (2) 土壤地理, 气候的描述。
- (3) 如为熟地, 尚须描述该土壤耕作年代, 农业措施, 耕种情况, 作物产量。

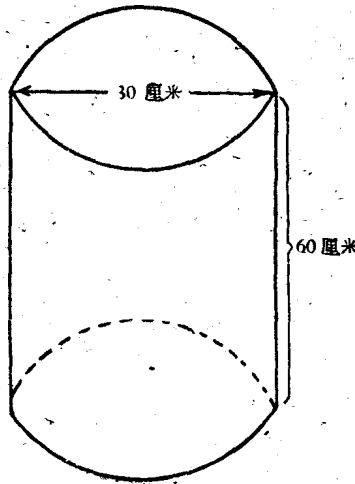
(4) 采土层次。

3. 采样 根据上述选好的标准地段, 如面积不超过100平方米时; 如右图选三个点, 每个点采一公斤土。天然混合后, 取一公斤装于塑料袋中, 留待分析用。



采土壤剖面时, 可挖坑进行。采土时, 由下往上采取, 层次可根据研究目的决定, 如根据土壤发生层次, 深翻层次等。

采水稻土时, 首先利用下图的铁圈, 圈住欲采的土壤; 然后排



出其中的水,根据需要,用开口土钻采取所需要的层次。

采森林土壤时,标准地段选择好后,在两棵树的中間选采土壤,然后按上述方法进行采样。枯枝落叶层作为单独一层采取。

四、土壤样品的保存

样品采好后,最好在 24 小时内进行分析。如不可能,采回的土壤样品,装于无菌的广口瓶中(为了能够通气,只装瓶体积的 2/3),然后用无菌棉塞塞上,保存在零上 4°C 的冰箱中。

关于保存的温度,大部分学者认为保存在低温下,可停止微生物的发育和活动,能保持土样原来的菌数。另一部分学者主张土样最好在普通室温下保存,只要保存土壤的自然湿度,不消失 2—3% 水分便可。法国学者 Pochon 认为試料在室温下保存最长可达 2—3 周;过了这个期限,微生物区系的平衡就要改变;某些种消失,另一些种发展。他们认为放在冰箱中会改变土壤微生物的生活条件。但低温对微生物产生那些影响,尚未获得确切資料,故一般仍采用低温保存方法。

五、試样的分析方法——微生物計数法

(一) 土壤顆粒接种法

原則 把供試的土壤顆粒,排列在适于某一生理微生物羣生长的选择性固体培养基上,这一类羣微生物的菌落圍繞着顆粒发育起来。由这些顆粒的百分数,可以得到这类菌在土壤中的含量及其近似值的概念。

操作方法 在二重皿內倒好所选用的培养基,作成平板,以备接种。

把用篩眼大 2 毫米的篩子篩过的少許土壤放在一无菌的研鉢內,加入少量的无菌水,研磨成泥团。用无菌的玻璃棒粘上少量泥团,按一定数目的顆粒排列,点在二重皿中的培养基上。其数目最好固定,以便于进行比较。

結果的觀察·在 28—30°C 保溫箱內培育后,即計算含有菌落的顆粒數目(隨着研究的菌羣,菌落形態不同),和接種的顆粒的總數比較,算出長有菌落的顆粒的百分數。

百分數越高,則這類土壤所含有這類羣的微生物數目越多。這種方法只能得出土壤之間同類羣微生物數量的比較數據。

(二) 土壤懸液接種法

測定原則 製備均勻的土壤懸液並作成一系列的稀釋液。以一定量的每種稀釋土壤懸液接種,使其均勻分布于二重皿中的培養基內。由長出的菌落數目,計算土壤中該類微生物的相對值。

操作方法 稱取新鮮土樣 10 克,放在已滅菌的研鉢內,加入少量無菌水,然後仔細的研磨約 1—2 分鐘;隨後將此土壤懸液倒至已滅菌的 250 毫升的空三角瓶內,加無菌水使此土壤懸液為 1:10 的稀釋液。另一種方法是將稱出的土壤直接放在盛有 100 毫升無菌水的 250 毫升三角瓶內。這兩種方法製成的土壤懸液皆置于每分鐘振蕩 70 次左右的振蕩機上(或手搖振蕩)振蕩 10 分鐘。

從這個 1/10 的懸液吸取 1 毫升移入有 9 毫升無菌水的試管中,作成 1/100 的稀釋液。由 1/100 的稀釋液中吸取 1 毫升再移入裝 9 毫升無菌水的試管中,作成 1/1000 的稀釋液。以此類推,一直稀釋到所需要的稀釋度。每次吸取懸液時要注意把懸液搖勻,每次操作務求一致。計數的方法有如下幾種。

1. 平板計數法

(1) 混菌法 用無菌的 1 毫升的吸管,吸取上述製備好的土壤懸浮液 1 毫升,分別注入各個滅菌的培養皿中。培養皿上用玻璃筆注上稀釋倍數,分析菌類以及日期。同一稀釋度作 3—5 個重複,分別注入融化並冷卻到 45°C 的培養基中,小心振蕩使培養基與土壤懸浮液均勻的混合。待培養基凝固后,將培養皿倒置于 28—30°C 的定溫箱中,待菌落長出后進行計數。

計算公式:

$$1 \text{ 克干土中的菌数} = \frac{\text{菌落平均数} \times \text{稀释度}}{\text{干土的百分数}} \times 100$$

(2) 涂抹法 将已灭菌的二重皿注入琼脂培养基待其凝固后, 放到 60—70°C 的烤箱内, 烤 15—20 分钟左右, 至培养基的表面无凝结水时, 便可取出备用。

用 1 毫升的吸管, 滴加 0.05 毫升土壤悬液到每个平板的中央, 用一无菌的玻璃刮刀, 把接种物均匀地分布在平板的表面上。

这些操作都要在无菌的条件下进行。最好从高稀释度开始接种, 则每换稀释液时不必都换吸管。在每次取稀释液时都要把悬液摇匀。每个稀释度要重复 3—5 个二重皿。接种后放到 28—30°C 保温箱中培养。

2. 稀释法

用 1 毫升无菌吸管, 吸取上述的土壤悬液 1 毫升于盛 5—10 毫升灭菌的液体培养基的试管中, 每个稀释度接种 2 支或 3 支, 置 28—30°C 的保温箱中培养。

一般是将 5 个不同稀释度的菌液分别接种, 培养到一定的时间后取出观察试管中是否长有细菌; 或用试剂鉴别其中产生的物质, 如氨、亚硝酸根等, 然后分别记载它们的稀释度和生长情况, 如:

稀释度	1/100	1/1,000	1/10,000	1/100,000	1/1,000,000
生长情况	+++	+++	++	+	0
数量指标	3	3	2	1	0

在上面的例子中前 2 个稀释度的试管中, 都长有细菌; 在 1/10,000 稀释度的试管中, 只有 2 支长有细菌, 而在 1/1,000,000 试管中没有细菌生长。这样我们在上列数字中取三个数(其中最后一个必须为零), 而将 1/100、1/1,000 之数字去掉, 则结果便得 210 的数量指标。然后根据数量指标查 McCrady 表得出近似值, 再以近似值乘稀释度再乘水分百分数, 便可得出干土中的细菌数。

(三) 直接计数法

将稀释的菌液放到细菌计数板上, 用显微镜直接检查视野中