

土壤微生物 分析方法手册

许光辉 郑洪元 主编

农业出版社

41

土壤微生物分析方法手册

许光辉 郑洪元 主编

李凤珍 卢耀波 编
张德生 刘增柱

农业出版社

土壤微生物分析方法手册

许光辉 郑洪元 主编

* * *

责任编辑 徐蒲生

农业出版社出版 (北京朝内大街130号)

新华书店北京发行所发行 农业出版社印刷厂印刷

850×1168毫米32开本 10.25印张 245千字
1986年2月第1版 1986年2月北京第1次印刷
印数 1—4,000册

统一书号 13144·294 定价 2.15元

内 容 提 要

本书是为研究土壤微生物的生态分布和生命活动提供测定方法的一本工具书。内容包括分析土壤微生物的基本设备和一般操作技术；土壤中细菌、放线菌、真菌、藻类、根际微生物以及许多微生物生理群的数量和组成的测定方法；土壤生物化学过程强度的测定方法；土壤酶活性的测定方法以及各类微生物的分离、鉴定方法等。这些方法是根据国内有关单位多年使用积累的经验，参考了近年来国外应用和改进的方法，在力求接近土壤条件的基础上，整理编写而成。

本书可供微生物、土壤、农业、林业、环保科技工作者和高等院校有关专业师生参考。

序

《土壤微生物分析方法手册》从1960年初版以来，为农林土壤微生物工作者及高等院校生物系师生所欢迎，起到了统一分析方法的作用。其中许多方法，在过了二十年后的今天，仍为国内和国际土壤微生物工作者广泛采用。但随着微生物学科的发展，特别是微生物生态学的发展，应用土壤微生物学的分析资料，来研究森林、农田、沙漠、海涂以及湖泊等生态系统中物质循环和能量转化，以达到保持生态平衡，提高生物生产力，已成为国内外生态学研究工作者所重视和关注的课题。因此，对土壤微生物生态的分析方法提出了更高的要求。

在自然界中，绿色植物通过叶绿素的光合作用摄取太阳能，使它转化为化学能，将无机物转化为有机物。因此，植物是最主要的生产者。动物，包括人类，消耗有机物，使能量和物质重新分配，是消费者。而微生物分解有机物，将其还原为无机物，使之重新被植物所利用，是分解者。但是，微生物又可由无机物合成为有机物，并转化有机物，因而它同时又是生产者。这样就构成了自然界生态系统的物质循环。

土壤微生物学的基本内容是研究微生物与它们所居住和生活环境之间的相互关系，即生态学。它研究土壤中微生物的种类、数量和分布；微生物的生命活动与植物营养的关系；土壤形成和发育过程中微生物的作用；微生物对植物养料的活化和固定等。这些都是微生物参与的物质生物循环所制约的。微生物与高等植

物之间，以及微生物相互之间的直接和间接关系；微生物对土壤和其它环境的净化作用等等。都是土壤微生物学中所要研究的重点课题。

但是，土壤微生物学近三十年来的发展还是比较缓慢的。其原因在某种意义上来说主要是受研究方法的限制。在自然条件下，土壤中微生物的组成和活动，及其引起的许多生物化学过程，往往是互相交替、互相影响、错综复杂的。这就给研究它们的生态分布和生命活动，造成了许多困难。近年来，土壤微生物学科研工作者虽然提出过许多改进的方法，这些方法都各有特点，但也都有它本身的局限性。建立在特定生态条件下了解和识别微生物特征与性质的方法，比较纯培养条件与自然条件下微生物生活和活动的差异，从而创造近似于自然生境的微生物纯培养条件，尤其是混合培养的条件，进而建立模拟生态系统来进行综合的、比较完整的研究，这是摆在土壤微生物学研究工作者面前的一项艰巨而光荣的任务。

1981年初，中国土壤学会在苏州召开全国土壤微生物专业学术讨论会。会上，同志们在肯定已出版的《土壤微生物分析方法手册》所起的历史作用的基础上，提出将这本书上所介绍的方法进行修改、补充和扩大方法内容，并尽可能收入近二十年来国内外学者提出的一些新的研究方法，包括分子生物学的方法，争取早日再版，以进一步推动土壤微生物学，特别是土壤微生物生态学的发展，使它更好地为解决生产实践问题和提高理论研究水平服务。并推举中国科学院林业土壤研究所微生物研究室组织力量重新编写，由农业出版社负责出版。这就是这本再版的《手册》问世的由来。

这本再版《手册》，内容与原版有了较大的修改和补充。不但介绍了一些现在国际上广为采用的比较先进的方法，而且在土壤

生物化学研究方法和微生物分类鉴定方法等方面，也作了适当的扩充和完善。希望它对有经验的土壤微生物学科研和教学工作者，以及对从事土壤微生物学研究资历不长的年轻科技工作者，都有一定的参考价值。

当然，在这本再版的《手册》里，不可能纳入在文献里见到的所有方法。限于篇幅，也不可能作详尽的介绍。由于编写者的水平和编写时间的仓促，遗漏和错误的地方，在所难免，希望读者们批评指正，以利于再版时修改补充。

许光辉

1983年7月1日于杭州

目 录

序

第一章 实验室的基本设备和一般操作技术	1
第一节 实验室和实验室的基本设备	1
一、实验室	1
二、实验器具和仪器设备	2
第二节 微生物实验室的一般操作技术	3
一、灭菌设备和一般灭菌操作技术	3
二、无菌室的设计和无菌箱、超净工作台的使用	6
三、恒温室和培养箱	9
四、光学显微镜的一般使用方法	10
(一) 普通光学显微镜	10
(二) 相差显微镜	23
(三) 荧光显微镜	31
(四) 显微摄影	33
(五) 彩色照相	39
(六) 电子显微镜	40
(七) 扫描电子显微镜	42
第三节 天平的使用	43
一、常用的天平种类	43
二、普通粗天平的使用和注意事项	44
三、较精密分析天平的使用和注意事项 (以半自动光电天平为例)	44
四、使用精密分析天平的注意事项	45
第四节 玻璃器皿的清洁法	46
一、常用的清洁剂	47
二、洗液的配制及使用的注意事项	47

三、洗涤玻璃器皿的方法与要求	47
第二章 土壤样品的采集	49
第一节 采样前的准备工作	49
第二节 采样地点的记载	50
第三节 采样方法	50
第四节 土壤样品的携带和保存	52
第三章 微生物的分离	53
第一节 分离微生物必备的器具	54
第二节 无菌操作的一般规则	55
第三节 接种操作法	56
第四节 微生物的分离	57
一、好气性微生物的分离	57
二、厌氧性微生物的分离	60
第五节 富集培养	63
一、富集培养的一般操作方法	64
二、厌氧性微生物的富集培养	64
三、土壤环流法	65
四、选择培养基法	66
第六节 显微操作法	67
一、解剖针的制作方法	67
二、单细胞分离的方法	68
第四章 培养基	70
第一节 培养基的种类	70
第二节 培养基的基本材料	72
第三节 营养成分	75
第四节 其它因子	77
第五节 配制培养基的注意事项	78
第五章 菌种保藏	80
第一节 低温冷冻保藏法	81
第二节 干燥保藏法	83
一、土壤保藏法	83
二、细砂保藏法	84

三、明胶圈块法	84
四、硅胶干燥法	85
五、L-干燥法	85
第三节 隔绝空气保藏法	86
第四节 冷冻干燥法	87
第六章 土壤微生物数量和组成的测定	91
第一节 土壤微生物的计数法	92
一、间接计数法	92
二、直接计数法	94
第二节 土壤中各类微生物的计数	102
一、细菌的计数	103
二、真菌的计数	107
三、放线菌的计数	109
第三节 各类微生物生理群及藻类的测定	110
一、氨化细菌的测定	110
二、硝化细菌的测定	113
三、反硝化细菌(硝酸还原细菌)的测定	116
四、好气性自生固氮菌的测定	119
五、嫌气性自生固氮菌的测定	122
六、微嗜氮微生物的测定	123
七、纤维素分解菌的测定	123
八、甲烷生成菌的测定	128
九、芳香族化合物分解菌的测定	128
十、硫化细菌的测定	129
十一、反硫化细菌的测定	130
十二、磷细菌的测定	131
十三、铁细菌的测定	133
十四、硅酸盐细菌的测定	135
十五、土壤藻类的测定	136
第七章 微生物的鉴定	138
第一节 微生物鉴定常用方法	139
第二节 各类微生物的检索表	141

第三节	鉴定的化学方法	160
一、	免疫学方法	160
二、	定量免疫电泳方法	162
三、	DNA G+C含量的测定方法	167
四、	脂类的测定	170
五、	细胞壁成分的测定	170
六、	酯酶的测定	171
第八章	根际微生物研究方法	176
第一节	根际采样方法	176
一、	根际土壤采集方法	177
二、	根面微生物采集方法	178
三、	根系微生物采样方法	178
第二节	根际微生物分析方法	179
一、	根际区(即根区)微生物的分析	179
二、	根面(即近根区)微生物的分析	179
三、	根区(即根系)微生物的分析	179
第三节	研究根系微生物注意事项	182
第九章	土壤有机成分分析	183
第一节	土壤全氮量的测定	183
第二节	土壤全碳的测定	186
第三节	土壤全磷量的测定(钼蓝比色法)	187
第四节	土壤氨基酸的测定	189
一、	氨基酸总量测定(茚三酮比色法)	189
二、	氨基酸组成的测定	191
第五节	土壤糖类的测定	192
一、	总糖量测定(蒽酮法)	192
二、	土壤五碳糖的测定	194
三、	中性糖含量的测定(酚-硫酸法)	195
四、	中性糖组分测定(气相色谱法)	197
五、	糖醛酸含量的测定(吡唑比色法)	198
六、	糖醛酸组分的测定(气相色谱法)	199
七、	氨基糖含量的测定	201

八、氨基糖组分的测定 (气相色谱法)	203
第六节 土壤酚类化合物的测定	204
一、总酚量的测定	204
二、酚类化合物的组成成分测定 (气相色谱法)	206
第七节 土壤有机酸的测定	208
一、有机酸组分测定 (气相色谱法)	208
二、丙酮酸的测定	209
第八节 土壤中核酸的碱基 (嘌呤 + 嘧啶) 的测定	211
第九节 土壤中细菌DNA的测定	213
第十节 土壤中微生物产生的生理活性物质的测定	215
一、土壤抗生物质的测定	216
二、土壤毒素的测定	217
第十章 原位土壤中微生物活性测定	220
第一节 微生物量 (Microbial biomass) 的测定	220
一、氯仿熏蒸法	220
二、三磷酸腺苷 (ATP) 测定法	223
第二节 土壤呼吸作用的测定	226
一、碱吸收滴定法	227
二、田间测定法	227
三、华勃检压法	228
四、原位土壤中细菌、真菌呼吸作用强度的测定	233
第三节 纤维素分解作用强度的测定 (埋片法)	234
第四节 氨化作用强度的测定	234
第五节 硝化作用强度的测定	237
一、根据硝酸盐的累积量测定硝化作用强度 (土壤培养法)	237
二、根据亚硝酸的残余量测定硝化作用强度 (溶液培养法)	239
第六节 反硝化作用强度的测定	240
第七节 固氮作用强度的测定	242
一、土壤培养法	242
二、乙炔还原法	243
第八节 酚分解作用强度的测定	244
第九节 磷转化强度的测定	246

第十一章	土壤酶活性测定	249
第一节	脱氢酶活性的测定	251
第二节	过氧化氢酶活性的测定	255
第三节	多酚氧化酶活性的测定	258
第四节	蔗糖酶活性的测定	261
第五节	β -葡糖苷酶活性的测定	266
第六节	纤维素酶活性的测定	269
第七节	磷酸酶活性的测定	274
第八节	芳基硫酸酯酶活性的测定	280
第九节	蛋白酶活性的测定	282
第十节	脲酶活性的测定	287
第十一节	土壤酶的提取及其基本性质的测定	291
附 录		296
主要参考书		305
主要参考文献		307

第一章 实验室的基本设备和一般操作技术

微生物生态学作为微生物学的一个分支，其任务是研究自然界各种生物和非生物因子对微生物生命活动的影响，以及微生物对外界环境的反作用。其实验研究工作要涉及微生物的形态结构、分类鉴定、生理生化、生长繁殖等微生物学的基本内容，以及生物化学和生理学的一些实验研究方法。所以，微生物生态学实验室的设置应能满足微生物常规实验和一般化学工作的要求。对实验房间的结构、内部设置、空间环境以及日常管理工作等方面，都需要有较严格的要求。

第一节 实验室和实验室的基本设备

一、实验室

实验室宜设在楼上的向阳面，墙壁和地面最好刷上油漆，在适当的墙角上方设有通风口，门窗要严实，窗户挂有浅色窗帘。房间中央和靠着墙边分别设有木制和水磨石制的实验台，前者供一般操作用，后者供显微镜观察用和安放较精密的仪器。室内要有足够的照明和布局合理的上下水道、煤气和电源。水池最好镶上瓷砖，并装有高压水龙头。室内不应存放与工作无关的东西，各种仪器、器具都应有固定的位置，并力求整齐，便于使用，便于清扫。为了减少灰尘，实验室应尽量避免过多的人员流动。

二、实验器具和仪器设备

实验室的基本设备，大致可分为玻璃器皿、仪器、普通工具和常用药品几大类。

(一) 玻璃器皿类

试管：试管的规格有多种，按管口形状分卷口和不卷口两种。按大小可分为大、中、小三种。一般试验多用 15×150 毫米的中型试管。对于菌种保藏，为了延长保藏时间，常用 18×180 毫米的大试管。而 10×100 毫米的小试管，对进行某些生理生化试验较适用，既可节省药品，又可少占地方。微生物的砂土保藏，通常也使用这种小试管。此外，尚有带刻度的试管，但不常用。

培养皿：直径 50 毫米到 200 毫米，一般多用 90 毫米的。近来也有用塑料制品来代替现用的玻璃培养皿。

应具备的其它玻璃器皿还有：各种规格的烧瓶，25—5000 毫升的三角瓶，10—1000 毫升的量筒，25—1000 毫升的容量瓶，50—1000 毫升的烧杯，1—10 毫升的刻度吸管，不同大小的滴管、漏斗、分液漏斗、冷凝管、试剂瓶、洗瓶、干燥器，玻璃管、玻璃棒、玻片等。

(二) 仪器类

必备的常用仪器：普通天平，分析天平，光学显微镜（附有相差附件、荧光附件和显微摄影装置的万用显微镜更为理想），pH 计，分光光度计，离心机，干热灭菌箱，蒸汽灭菌器，蒸汽高压灭菌锅，恒温箱，冰箱，真空泵，磁力搅拌器，瓦氏呼吸器，振荡机，细胞破碎器，水浴锅，电泳仪等。

除了上列常用仪器之外，随着微生物学的发展，从建立较完善的微生物实验室考虑，逐步增添一些大型贵重仪器是必要的。例如：气相色谱仪，高压液相色谱仪，紫外分光光度计，真空冷冻干燥器，氨基酸分析仪，冷冻超速离心机，台式发酵罐，显微

操作器，超薄切片机，电子显微镜等。

(三) 工具类 如试管筐、架，三角架，滴定台，酒精灯，煤气喷灯，石棉网，橡皮塞，胶管，软木塞，纱布，脱脂棉，棉花，硫酸纸，滤纸，注射器，剪刀，镊子，打孔器，铝盒，铝锅，瓷盆，研钵，喷雾器，解剖刀，接种针，接种环，小铁铲，土壤刀，土壤筛，粉碎机等。

第二节 微生物实验室的一般操作技术

近年来，随着分子生物学、遗传学的发展和渗透，以及各种新的测试仪器的不断涌现，微生物学的实验方法技术和使用的仪器越来越趋于复杂。关于目前已在微生物实验室中广泛使用的一些新方法和新技术将在后面分别介绍，这里只谈实验室的一般操作技术。

一、灭菌设备和一般灭菌操作技术

微生物实验最主要的特点，是在纯培养的状态下进行的，自始至终不允许杂菌污染。所以，实验用的一切材料、器具，事先都必须经过严格的灭菌处理。灭过菌的材料和器具，一旦触及未经灭菌的东西，或暴露在带菌的空气之中，即不能再视为无菌，这一点是必须首先强调的。

灭菌的方法有几种，可根据不同情况采用不同的方法。

火焰灭菌是最简单又最可靠的灭菌方法。灭完菌马上就使用的小件金属器具，如镊子、解剖刀、接种针、载玻片等，常用此法灭菌。采用火焰灭菌法要注意防止灼死供试微生物。

干热灭菌法。适用于各种玻璃器皿。将器皿放入干热灭菌箱，在 150—160℃下保持 2 小时即可彻底灭菌。试管、三角瓶等带口的器皿，事先塞好棉栓（不用橡皮塞）；培养皿、吸管、玻片等

要用纸包好，或装入特制的金属盒或筒里，临用时才打开。干热灭菌应注意以下几点：待灭菌的器皿，事先要烤干或风干；要灭菌的器皿，特别是带棉栓的试管，不得与干热灭菌箱的内壁接触，尤其不得直接放在底板上；灭菌时，勿使温度超过 160°C ，如果温度过高出现烤焦味，应立即切断电源，但不要急于打开箱门或通风孔；灭菌完毕，待温度下降到 $50-60^{\circ}\text{C}$ 时方可打开箱门，以免冷空气骤然进入而引起器皿破裂。

蒸汽间歇灭菌法。一些在高温下易破坏的物品（如糖类培养基、牛奶、明胶等）多采用此法灭菌。在 100°C 蒸煮20—30分钟，将物品中细菌的营养体杀死，然后在室温下放置1天，使残留下来的（ 100°C 没致死的）大部分孢子形成营养体，此时再行灭菌，将这部分营养体杀死。如此操作反复三次，即可达到完全灭菌的目的。

高压蒸汽灭菌法。这是在高压下的蒸汽灭菌，是在高压灭菌器中进行的。高压灭菌器有立式、卧式、手提式。加热方法有电热、汽热、明火加热。手提式的体积小、轻便，对少量物品灭菌和野外工作很方便。

高压灭菌器的样式规格虽然较多，但结构大同小异。其主体一般都是带有厚而重、并耐高温高压的盖子的金属锅，有一金属外壳，里层是铝制的内腔，即工作室。锅身与盖用粗的螺丝杆连接，可任意松紧。上盖安有排汽口和安全阀，一旦压力过高，安全阀即自动放汽排险。顶部或侧边安有指示工作室内压力的气压表。中部有加水口和水位标记线，锅底部有放水口。

高压灭菌锅是微生物实验室必不可少的，使用效率最高的一种灭菌器械，但如果使用不当，有发生爆炸或蒸汽烫伤的危险。因此，使用时必须严格遵守操作规程。操作要点如下：使用前先沿加水口加水，直到锅内水面达到水位标记线为止，然后将加水