

258344

土壤微生物学 分析技术手册

J. 波 爽 著

科学出版社



土壤微生物学分析技术手册

J. 波 爽 著

閻 遜 初 譯

科 学 出 版 社

1959

J. POCHON
MANUEL TECHNIQUE D'ANALYSE
MICROBIOLOGIQUE DU SOL

Masson et Cie éditeurs 1954

內 容 簡 介

这是一本测定土壤微生物各种活性的技术手册。对于好气性和嫌气性固氮菌、蛋白分解菌、氨化菌、亚硝化菌、硝化菌、反硝化菌、纤维素分解菌、淀粉分解菌、硫酸盐还原菌和硫黄氧化菌等主要生理羣活性测定的方法都有确切的说明，也介绍了细菌、放线菌、真菌、藻类和原生动物计数的方法，书末还附有各种不同土型微生物学分析报告实例和土壤生物活性图解等。本书应是土壤微生物学工作者经常用的工具书，也可供其他微生物学研究人员和高等院校有关专业的师生参考。

土壤微生物学分析技术手册

J. 波 爽 著

閻 遜 初 譯

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许可証出字第 061 号

中国科学院印刷厂印刷 新华书店总经销

1959 年 10 月 第 一 版

书号：1898 字数：99,000

1959 年 10 月 第一次印刷

开本：787×1092 1/32

(京) 0001—5,000

印张：5

定价：0.55 元

序

这主要是一本技术手册，因此我們把所有純理論的东西、微生物的生理和鑑定特征都去掉了。这不是一本土壤微生物学手册，而是“微生物学分析”或更确切地說来，是“农业生物学分析”手册。它只包含分析技术而不談菌株的分离*。

虽然在文献里分析技术的数目很多，在这里我們对于每种分析只介紹一两个方法。我們之所以选取这些方法是因为它們已在我們的試驗室里受到长期考驗（大部分是在我們試驗室里安排好的）并認為能够得出良好的結果；換言之，即如对于一种生物科学所可期待的那樣，这些方法是灵敏而忠实可靠的。

我們強調主要的一点：这些技术應該仔細施行，一个細節的改变就可能使結果发生錯誤。

我們在每章之末例举一个分析的結果，时常用綫图表示，以便于理解。

最后，由于一个土样的檢查結果主要是比較性的，在这本手册之末列有 18 个土样的全部分析。特意选择类型很不同的土壤，代表普通在法国所遇到的各型土壤的一部分。

* 如要对于土壤的分析做得更深入一些，應該參閱原始著作。也可以参考 1948 年发表的簡明土壤微生物学 [Précis de Microbiologie du sol de Pochon et Tchan (Masson et Cie édit.)]

做这方面工作的新手可能参考这些分析结果，用以和他所得到的结果做比较，并加以解释。

我们仅向医学科学院院士巴斯德学院院长 Tréfouël 教授表达谢忱，承他美意接受这本手册在巴斯德学院专论汇集内发表。

七 学

目 录

序.....	i
緒論.....	1
土壤微生物学分析的基本原則.....	1
第 一 章 一般技术.....	6
器材.....	6
采土.....	6
培养基.....	9
塑泥.....	10
土壤浸出液.....	10
土壤浸出液琼胶.....	11
硅酸凝胶.....	12
标准盐溶液.....	16
以土壤接种.....	18
以土壤顆粒接种.....	18
以土壤悬液和稀释液接种.....	19
染色.....	21
第 二 章 微生物总数.....	24
定性研究.....	24
显微镜直接观察.....	24
贴片和埋片.....	25
定量研究.....	25
平板計数.....	25

普通方法.....	26
对照的方法.....	30
微生物直接計数.....	32
两个方法的结果和比較价值.....	34
第三章 固定大气氮菌类羣.....	35
好气性固氮菌.....	35
显微镜直接观察.....	35
塑泥.....	35
硅酸凝胶上測驗.....	37
固氮菌計数.....	38
嫌气性固氮菌.....	40
显微镜直接观察.....	40
塑泥.....	40
硅酸凝胶上測驗.....	40
一个土壤的固氮能力.....	42
共生固氮菌.....	43
从根瘤內分离根瘤菌及其培养.....	43
血清学鑑定.....	45
效能的估計.....	48
优势的估計.....	50
抗噬菌体的能力.....	51
第四章 氨化菌类羣.....	54
土壤平板法.....	54
沙平板法.....	55
酪氨酸法.....	56
結果的解释.....	58
附录——蛋白分解菌类羣.....	60
第五章 硝化菌类羣.....	62

顯微鏡直接觀察.....	62
硅酸凝膠平板培養.....	62
液體培養基內硝化能力的估計.....	63
第六章 反硝化菌類羣.....	67
土壤反硝化活性的測定.....	67
第七章 纖維素分解菌類羣.....	70
好氣性纖維素分解菌.....	70
顯微鏡直接觀察.....	70
紙硅酸凝膠.....	71
纖維素琼膠.....	72
嫌氣性纖維素分解菌.....	75
中溫菌.....	75
顯微鏡直接觀察.....	75
液體培養基內培養.....	75
高溫菌.....	76
第八章 分解淀粉-半纖維素和其他醣類的微生物類羣.....	77
淀粉分解菌類羣.....	77
淀粉琼膠法.....	77
液體培養法.....	79
半纖維素分解菌類羣.....	80
半纖維素的制備.....	80
硅酸凝膠法.....	81
液體培養法.....	82
非聚化糖的水解.....	83
塑泥.....	83
硅酸凝膠.....	83
第九章 硫黃的生物循環.....	84

硫酸盐还原菌.....	84
还原硫的氧化菌.....	85
硅酸凝胶平板法.....	85
液体培养法.....	86
第十章 放线菌计数.....	88
放线菌总数的计算.....	88
孢子和菌丝体类型相对比例的测定.....	89
第十一章 真菌计数.....	90
第十二章 藻类计数.....	93
第十三章 原生动物计数.....	94
第十四章 一个土壤微生物学分析的实施方案.....	97
完全分析项目一览表.....	97
简略分析项目一览表.....	99
附录	
酸性土壤分析.....	100
全氮、有机碳和腐殖质的定量分析.....	101
土壤 pH 的测定.....	105
十八个土壤的分析报告.....	106
土壤生物活性图解.....	143
内容查对表.....	148

緒 論

土壤微生物学分析的基本原則

一般經典地把土壤比做活的有机体。这个形象最能表現它的性質:結構复杂,在它的內部所發生的生物化学現象很是多种多样,土壤象一个“整体”,象一个“有机体”对于外界的刺激(气候、耕作措施等……)起反应;这个有机体的各种生物化学和生理的机能处于动态平衡。

主要是微生物調节这个平衡。它們决定有机合成的过程 and 无机元素的矿化(因而腐殖質化)、变为可溶和不可溶的过程;这就是說它們对于土壤肥力和,归根結蒂,对农业所起的作用是最为重要的。

但是,在这样复杂的机体內如果要确定微生物、土壤的物理化学构造、气候和耕种措施在土壤肥力中所起的作用的清楚的界限,那将是过于簡略而虛妄的。

因此,要想在这些各种不同肥力因素的研究之間确定清楚的界限也是虛妄的。所有这些学科都應該合作,以便認識一定的土壤。

所以,在一个土壤的分析里,微生物学有它的位置,而且是重要的位置。为了随着土壤的演变,微生物学甚至是不可缺少的,因为它所供給的結果,时常比其他学科的結果更有层次。然而,應該很好地确定它的目的,这个目的决定分析技术本身而又为以下的考虑所决定。

土壤微生物区系的一般性質

在土壤微生物区系的本质和它和肥力的关系問題上还有着許多未知的东西,然而有几点已經确定,以便准确地指导土壤的微生物学分析和技術。

1. 土壤中微生物的数目与土壤生物学活性共增。而一般說来这种活性是肥力的一个因素,或者至少显得是和它相联系的¹⁾。

因此,估計微生物区系的总量是有意义的。

2. 土壤是几乎所有地球上的微生物、特别是許多致病菌的淵源。这些微生物的一大部分在土壤中处于潛伏生活状态,大概不起任何作用。唯有在土壤中起生物化学作用的活跃的微生物才和土壤的生命和农业生物学家发生关系。

然而在我們的知識的現狀下,只認識极小的一部分微生物的这种作用。主要是針對着这部分微生物来做微生物学分析。

具有共同生物化学作用的微生物形成,由土壤中这一作用本身、由这一机能所規定的类羣;因此,生理上这些类羣是同質的,但是在形成这些类羣的种的分类位置上則时常是异質的。

因此,微生物学分析要針對着这些細菌的机能类羣而非从土壤里分离出来的某某种。可能以后再做这后一研究,但是在大部情况下,这一研究和农学家沒有直接的关系。

1) 相关地消耗的氧气和放出的二氧化碳也增加;二氧化碳是土壤生物学活性的良好測驗物,遺憾的是难于測定。

3. 每个机能类羣虽独立工作，然而也和其他类羣有联系。这种联系可能是“相继的”，降解和合成、氧化和还原等的連鎖反应。这种联系也可能是“同时的”，协力的或对抗的，或者仅是竞争的。

因此，如果农业生物学家想要了解在土壤中实际经过的情形，他就应该尽可能地在试验室里实现这些相互反应可能发生作用的条件；这就叫做在“生态”条件下工作。土壤在其整体上随着季节而变化，为了很好地认识一个土壤，在一年的不同时期来分析它是有好处的。

技术的一般原则

所有这些事实就意味着应用适于土壤微生物学的很特殊的技术，譬如说，和通常医学细菌学的技术就大不相同。一般原则可能简述如下：

1. 禁用純培养，只是在很特殊的情况下才能用，那么从所得结果推論在土壤里实际经过的情形时要极为谨慎。在土壤里所研究的菌株是和微生物区系的所有微生物竞争或合作的。

2. 用尽可能和土壤相近的培养基：土壤本身、土壤水浸液或含有在土壤里确实可以找到的营养物质的无化学作用的固体或液体培养基（因此禁用蛋白胨、肉膏等）。

3. 选择培养的（特别是营养的）条件以证明生理类羣的存在，这些培养条件要使某某类羣有选择性的繁殖（所谓“选择性”培养基）。

4. 与其说是由組成类羣的微生物的形态，不如说是由它们的生物化学代謝来得出这些羣的描述特征。

5. 用含有全部微生物区系的土壤本身来接种。
6. 培养的物理条件(湿度、温度、酸硷度)要尽可能和土壤者相同。

結果的解释和意义

遺憾的是在許多情況下，不是遵守这样严格“生态学”的技术。那么解释結果时就應該謹慎。

例如，用土壤本身来做試驗，为了使各种現象加快并且可以比較，就要采取相当高的固定的湿度和比土壤平均温度更高的固定的温度。在这些条件下，全部微生物区系的平衡可能被扰乱，而在土壤正常生态条件下不很活跃的微生物在这种新的实验生态条件下变得活跃起来。因此所研究和测定的是菌羣的“潜在”活性，而非其“实际”活性；换言之，这是如果把它放在土壤中很少实现的最适条件下它可能有的活性。所以，所得結果并不是絕對的数值，而是在不同土壤之間可以比較的相对的数值。这是一个首要的概念。

不能总用严格生态学的方法的另一个原因是，由于有許多因素起作用，这些方法不能得出易于解释的定量的結果。那么就要以显然是人为的方法(就如以土壤稀释液所接种的液体培养基)来代替。这些方法如果正确地拟定而仔細地应用也是忠实可靠，并且易于解释的。但是所提供的結果，沒有任何絕對价值；然而，重要的是可以以它們的比較数值，按照一定生理羣的活性对于土壤进行分类。这就是农学家所需要的。这可以說明在土壤的微生物学分析中技术是基本的。只有用严格相同的技术所得到的結果才

能互相比較。為了保證試驗的規則性（因而也是結果的價值），每一系列的分析的試樣要附有一個對照土樣，這個土樣總是了解得很清楚的那一個，用做比較。由於實際條件受到偶然的擾亂，在對照土壤上記錄出反常的結果，就要把這一系列樣品的分析拋棄。

最後，如上面已經談到的，如果土壤的微生物學分析在技術上是獨立的，但只有和完整的化學和土壤學分析結合起來才有全部的意義。如果沒有做後一分析，為了正確而有效地解釋細菌學的結果，就必須至少知道土壤的酸鹼度、其全氮和有機碳的含量。最低限度，總應該進行這三種測定。

第一章 一般技术

器 材

做土壤微生物学分析所必需的器材是有限的。

試驗室通用器材——高压灭菌鍋、烤箱、馬福炉、水风筒、制玻璃器皿的风火管，过滤用的装置和瓷滤柱，天秤和小称，带有油镜头的显微镜，28° 和 60℃ 的保温箱。

玻璃器皿——直径 17 和 22 毫米的試管。如应为无菌时，試管将加上棉塞并經過高压蒸鍋或烤箱灭菌。Kahn 氏管；溶血管。直径 15 厘米、10 厘米(大量)和 5 厘米的佩氏二重皿(如应为无菌时，二重皿用 SO_2 薰过的紙包起，然后經過高压蒸鍋灭菌)。Erlenmeyer 氏瓶或 Fournau 氏瓶。直径 12 厘米高 30 厘米的玻璃筒。1/10 刻度的 10 毫升和 1 毫升的吸管；每毫升滴 20 滴的滴管。

测量体积的刻度杯。

用以制备一定含量的溶液的定量球形瓶和刻有两道綫的吸管。

采 土

應該用确切的技术采取土样，归根結蒂采土技术可以决定微生物学分析的价值。

由于土壤本質上是不均匀的，必須多采局部土样，然后混合，以便得到可以代表要分析的土壤的平均土样；至少做

通常的检查时需要如此。

1. 普通技术

工具——经过高压蒸锅或火烧灭菌的带把的金属小杯碟。

容量 500 毫升的大口（直径 4 厘米）玻璃瓶，加棉塞并灭菌；或是用绳捆好的容量相同的塑料小袋。

采土深度——用手或抹刀除去 5 厘米的表层土。用无菌小杯碟取深度在 5 和 10 厘米之间的土壤。

局部采土的距离——距离决定于要检查的土地的面积。在这个面积上采取距离相等的 10 个土样。

均匀化——用无菌容器所采集的 10 个土样，在试验室里用筛眼大 5 毫米的筛子筛过，以便除去石块和大的有机残余，然后再用 2 毫米的筛子筛过。

保存——这样得到的平均土样放在无菌瓶内，用棉花或软木塞塞好，或装在塑料袋内，在试验室温度下保存。分析前最大的保存期限为 3 週；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。

湿度的测定——过筛之后，最好测定采土时土样的湿度。这对于认识土壤的状态是一个重要的指示而且也可使我们把分析的结果折合为土壤的干重来计算。

在一个减去重量的杯碟内准确地称 5 克土样。放在 80℃ 恒温箱内直到重量不变为止。

2. 特殊技术

A) 同一土壤不同层次的采样——挖一沟到所要求的

深度。在同一垂直線上每个有代表性的层次采一土样。每采一土样之前須除去这一深度的切面表面土 2—3 厘米。

这些土样将分別过篩均匀化、保存并各別分析。

也可用鉗探器进行工作，然后把所得到的土柱随意切分为小段。

B) 根际土样的采取——为了研究根际的微生物区系，用鉄鉞取出含有植物鬚根的一块土壤。在一张无菌紙上把土块仔細弄碎。要取两份土样。

a) 这样弄碎所落下来的土壤，这是“远”根际区。过篩均匀化，保存。

b) 这样脫出来的鬚根浸在含无菌水的玻璃缸里。輕輕搖动。附着在根上的小土屑落下来。然后用离心或过滤法收集；这是“近”根际区。

土样 a 和 b 将分別保存并分析；b 的重量总是很小的。

3. 說明卡片

所采土样总附有相当于下列卡片的說明。这个卡片可做为榜样。这些說明将使結果的解释更为容易。

土 样 号 数

采土日期

采土地点

地理位置：

簡略描述：

向阳程度：

雨量：