



# 土壤微生物 研究法

中国科学院南京土壤研究所微生物室 编著  
科 学 出 版 社

# 土壤微生物研究法

中国科学院南京土壤研究所微生物室 编著

科 学 出 版 社

1985

## 内 容 简 介

本书是一本工具书，书中对土壤微生物的研究方法作了比较全面的介绍。主要内容有：实验室的设置和一般操作，土壤微生物的分析与计数，土壤微生物的鉴定，土壤生境中微生物的观察和鉴别，土壤生物化学过程强度的测定，土壤微生物研究的模拟体系，菌种保藏，数据处理等。除了常规方法外，还介绍了一些新技术。

本书可供土壤微生物工作者和农林院校有关专业的师生参考。

## 土 壤 微 生 物 研 究 法

中国科学院南京土壤研究所微生物室 编著

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

\*

1985年4月第一版	开本：787×1092 1/32
1985年4月第一次印刷	印张：11 5/8
印数：精 1—3,600	插页：精 3 平 1
平 1—3,000	字数：257,000

统一书号：13031·2847

本社书号：3951·13—12

定价：布脊精装 3.50元  
平 装 2.85元

## 序

土壤微生物种类繁多，在土壤物质转化中具有多种重要作用，与土壤肥力和植物营养有密切关系，同时又是工业和医药用菌的丰富资源。土壤微生物学研究领域宽广，涉及的研究方法和手段亦多。鉴于微生物的变异性及其生活的土壤条件的复杂性，如何使所得结果尽可能地反映自然情况，在方法上应多所考究。

本书是一本土壤微生物学研究工作的工具书。内容除包括土壤微生物的分离、测数、菌种鉴定和保藏以及某些生化活性测定等常用方法，并根据国内同行的经验和我们应用的体会加以系统整理和归纳外，还选编了内生菌根真菌检测、土壤微生物生物量测定，微生物菌株标记鉴别法和以测定细胞体内 DNA 的 G 加 C 比例鉴别微生物的技术等当前国际上常用的方法；介绍了土壤生境中微生物的直接观察和鉴别，土壤微生物研究中的模拟体系，如环流装置和人工根际模拟体系等方法和技术；土壤微生物实验室常用仪器的使用、保养及分析数据的处理等。还将常用溶液、试剂、培养基的配制、稀释测数统计表、比重、糖度换算表、标准筛孔对照表以及土壤微生物分析记录表格和卡片格式等列于附录或索引，便于读者查找。

书中采取的某些方法中有的我们还没有实地用过，有的做得不多，有的则只在多种方法中择一、二种，错漏之处在所难免，望读者不吝指教，共同磋商，以便再版时修正补充。

本书由我所微生物室郝文英、李良谟、李振高、尹瑞龄、游长芬、顾希贤等同志编写，朱增炎同志对个别章节提供了部分

资料。全书最后由郝文英、李良谟、李振高、尹瑞龄统稿汇编。插图由我所绘图室和摄影室同志绘制、拍摄。在编写过程中还得到其他同志的支持和帮助，在此表示感谢。

郝文英

1983年3月

# 目 录

序.....	xiii
第一章 实验室的设置和一般操作.....	1
1.1 实验室的设置和主要设备 .....	1
1.1.1 预备室 .....	1
1.1.2 专用实验室 .....	1
1.1.3 普通实验室 .....	2
1.2 实验室的主要仪器和常用器皿 .....	3
1.2.1 主要仪器 .....	3
1.2.2 常用玻璃器皿 .....	4
1.2.3 其他器具 .....	4
1.3 实验室的一般操作 .....	5
1.3.1 洗涤 .....	6
1.3.1.1 洗涤剂 .....	6
1.3.1.2 常用玻璃器皿的洗涤法 .....	7
1.3.2 灭菌 .....	8
1.3.2.1 灭菌前的准备 .....	8
1.3.2.1.1 制作棉塞 .....	8
1.3.2.1.2 包扎器皿 .....	9
1.3.2.2 灭菌方法 .....	10
1.3.2.2.1 加热灭菌法 .....	11
1.3.2.2.2 过滤除菌法 .....	14
1.3.2.2.3 化学灭菌法 .....	17
1.3.2.2.4 辐射灭菌法 .....	18
1.3.3 接种 .....	19
1.3.3.1 划线法 .....	19

1.3.3.2	穿刺法 .....	20
1.3.3.3	点接法 .....	20
1.3.4	显微镜 .....	20
1.3.4.1	显微镜的构造 .....	21
1.3.4.1.1	机械装置 .....	21
1.3.4.1.2	光学系统 .....	22
1.3.4.2	显微镜的使用 .....	25
1.3.4.2.1	普通光学显微镜 .....	25
1.3.4.2.2	相差显微镜 .....	25
1.3.4.2.3	荧光显微镜 .....	28
1.3.4.3	显微镜的保养 .....	30
1.3.5	血球计数板 .....	31
1.3.5.1	血球计数板的构造 .....	31
1.3.5.2	血球计数板的使用方法 .....	31
1.3.6	测微尺 .....	33
1.3.6.1	目镜测微尺 .....	34
1.3.6.2	镜台测微尺 .....	34
1.3.6.3	测微尺的使用 .....	34
1.3.6.3.1	目镜测微尺的标定 .....	34
1.3.6.3.2	菌体大小的测量 .....	35
1.3.7	分析天平 .....	36
1.3.7.1	天平的使用方法 .....	36
1.3.7.1.1	调整天平零点 .....	36
1.3.7.1.2	称量 .....	36
1.3.7.2	分析天平的使用规则 .....	38
第二章	土壤微生物的分析与计数 .....	40
2.1	土壤样品的采集 .....	40
2.1.1	采样 .....	40
2.1.2	土壤样品的包装与保存 .....	41
2.2	培养基的类别、制备和贮存 .....	41

2.2.1	培养基的成分 .....	41
2.2.2	培养基的种类 .....	42
2.2.2.1	按成分划分 .....	42
2.2.2.2	按状态划分 .....	42
2.2.2.3	按用途划分 .....	43
2.2.3	培养基的选择和应用 .....	43
2.2.3.1	腐生好氧性细菌培养基 .....	44
2.2.3.2	腐生厌氧性细菌培养基 .....	45
2.2.3.3	放线菌培养基 .....	45
2.2.3.4	真菌培养基 .....	46
2.2.3.5	好氧性自生固氮菌培养基 .....	47
2.2.3.6	根瘤菌培养基 .....	47
2.2.3.7	好氧性纤维素分解菌培养基 .....	47
2.2.3.8	厌氧性纤维素分解菌培养基 .....	48
2.2.3.9	亚硝酸细菌培养基 .....	49
2.2.3.10	硝酸细菌培养基 .....	49
2.2.3.11	反硝化细菌培养基 .....	49
2.2.3.12	硫化细菌培养基 .....	50
2.2.3.13	反硫化细菌培养基 .....	50
2.2.3.14	解磷细菌培养基 .....	50
2.2.3.15	硅酸盐细菌培养基 .....	51
2.2.4	培养基的制备和贮存 .....	51
2.2.4.1	培养基的制备 .....	51
2.2.4.2	培养基的贮存 .....	54
2.3	土壤微生物的分离与计数 .....	54
2.3.1	一般土壤微生物的分离与计数 .....	54
2.3.1.1	稀释平板法 .....	54
2.3.1.2	稀释法 .....	57
2.3.1.3	土粒法 .....	59
2.3.2	厌氧微生物的分离与计数 .....	59



2.3.2.1	充氮厌氧培养法 .....	59
2.3.2.2	焦性没食子酸吸收氧气法 .....	61
2.3.2.3	专性厌氧细菌的分离法 .....	62
2.3.3	微生物的移植与纯化 .....	64
2.3.3.1	移植 .....	64
2.3.3.2	纯化 .....	64
2.4	根际微生物的分析 .....	67
2.4.1	根际的分区 .....	68
2.4.2	根际微生物的分离 .....	68
2.4.2.1	样品采集 .....	68
2.4.2.2	分离方法 .....	69
2.4.3	根际优势菌株的分群 .....	71
2.4.3.1	营养型的区分 .....	71
2.4.3.2	细菌形态及营养型区分标准 .....	72
2.5	植物组织内微生物的分离 .....	73
2.5.1	植物材料的选择 .....	73
2.5.2	组织表面灭菌 .....	73
2.5.3	分离方法 .....	75
2.5.3.1	组织分离法 .....	75
2.5.3.2	稀释平板分离法 .....	75
2.5.3.3	蔗糖浓度梯度分离法 .....	75
2.6	内生菌根真菌的检测 .....	76
2.6.1	土壤中繁殖体的回收 .....	77
2.6.2	土壤中繁殖体的定量测定 .....	78
2.6.2.1	土中内囊霉孢子的计数法 .....	78
2.6.2.2	生物测定法 .....	78
2.6.3	纯化和保存 .....	79
2.6.3.1	以孢子保存 .....	79
2.6.3.2	以植物培育保存 .....	79
2.6.4	植物根部受侵染程度的检测 .....	79

2.6.4.1	根样的收集 .....	79
2.6.4.2	根样的清洗和染色 .....	79
2.6.4.3	镜检和定殖程度的检测 .....	80
2.6.4.4	受侵染根部菌根真菌生物量的测定 .....	81
2.7	微生物生物量的测定 .....	81
2.7.1	熏蒸法 (Jenkinson, 1976) .....	81
2.7.2	ATP 含量换算法 .....	83
2.7.3	真菌体内几丁质含量换算法 .....	83
第三章	土壤微生物的鉴定 .....	85
3.1	引言 .....	85
3.1.1	微生物在生物分类学中的位置 .....	85
3.1.2	微生物的分类单位及命名 .....	86
3.1.3	细菌、放线菌和真菌的主要异同及其分类原则 .....	88
3.2	土壤细菌的鉴定 .....	90
3.2.1	细菌的特征及其分类依据 .....	90
3.2.2	细菌鉴定的一般程序和方法 .....	90
3.2.2.1	一般程序 .....	90
3.2.2.2	基本方法 .....	91
3.2.2.2.1	细菌的形态、大小及运动 .....	91
3.2.2.2.2	细菌的培养性状 .....	105
3.2.2.2.3	细菌的生理生化反应 .....	110
3.2.2.2.4	细菌的生态条件 .....	133
3.2.2.2.5	DNA 中 GC 含量的测定 .....	138
3.2.3	细菌常用分类系统简介与检索 .....	144
3.2.3.1	伯杰氏分类法 .....	145
3.2.3.2	克氏分类法 .....	152
3.3	土壤放线菌的鉴定 .....	153
3.3.1	放线菌的特征及分类原则 .....	153
3.3.2	放线菌鉴定的基本方法 .....	154

3.3.2.1	形态特征 .....	154
3.3.2.2	培养特征 .....	157
3.3.2.3	生理试验 .....	159
3.3.2.3.1	明胶液化 .....	159
3.3.2.3.2	牛奶凝固与胨化 .....	159
3.3.2.3.3	淀粉水解 .....	160
3.3.2.3.4	纤维素水解 .....	160
3.3.2.3.5	硫化氢的产生 .....	161
3.3.2.3.6	不同碳源的利用 .....	161
3.3.2.3.7	抗菌谱测定 .....	162
3.3.3	土壤链霉菌属的种群归并法 .....	164
3.3.4	放线菌分类系统简介 .....	165
3.3.4.1	放线菌目中科和属的检索表 .....	
	(Waksman, 1961) .....	165
3.3.4.2	克拉西里尼科夫分类表 (1965) .....	166
3.3.4.3	放线菌目分科分属检索表 (中国科学院 微生物研究所分类组, 1975年) .....	166
3.4	土壤真菌的鉴定 .....	168
3.4.1	真菌的特征及其分类依据 .....	168
3.4.2	真菌形态显微观察法 .....	169
3.4.2.1	制片方法 .....	169
3.4.2.2	真菌玻片标本的封片与染色 .....	171
3.4.2.3	镜检 .....	174
3.4.3	真菌培养特征观察方法 .....	175
3.4.3.1	点植培养法 .....	175
3.4.3.2	菌落特征的观察和记载 .....	175
3.4.4	土壤中常见真菌的特征与检索 .....	176
第四章	土壤生境中微生物的观察和鉴别 .....	180
4.1	生境中土壤微生物检测 .....	180
4.1.1	土壤细菌的显微镜直接计数法 .....	180

4.1.2	琼脂膜法 .....	182
4.1.3	土壤微生物区系的埋片观察法 .....	184
4.1.4	光学显微镜直接检测土壤颗粒法 .....	186
4.1.5	毛细管法 .....	189
4.1.6	尼龙网法 .....	191
4.1.7	植物根系与微生物相互作用检查法 .....	191
4.1.8	根系观察箱法 .....	193
4.1.9	电子显微镜法 .....	193
4.1.10	土壤切片观察法 .....	194
4.2	显微放射自显影法 .....	197
4.3	微生物菌株标记鉴别法 .....	201
4.3.1	免疫血清鉴别法 .....	201
4.3.1.1	抗血清的制备 .....	201
4.3.1.2	应用抗血清鉴别微生物 .....	204
4.3.1.2.1	凝集反应 .....	204
4.3.1.2.2	沉淀试验 .....	206
4.3.1.2.3	交叉凝集试验 .....	207
4.3.2	荧光抗体法 .....	208
4.3.2.1	从抗血清中提取免疫球蛋白 .....	208
4.3.2.2	抗体标记荧光素 .....	209
4.3.2.3	荧光染色 .....	212
4.3.2.4	荧光显微镜观察 .....	213
4.3.3	菌株的抗药性标记鉴别法 .....	214
4.3.3.1	抗药性突变体的获得 .....	214
4.3.3.2	抗药性菌株的追踪及其回收 .....	215
第五章	土壤生物化学过程强度的测定 .....	216
5.1	土壤呼吸作用 .....	216
5.1.1	密闭静置培养测 CO <sub>2</sub> 法 .....	217
5.1.2	通气培养测 CO <sub>2</sub> 法 .....	219
5.1.3	田间收集 CO <sub>2</sub> 法 .....	220

5.2	土壤氨化作用 .....	222
5.2.1	土壤培养法 .....	222
5.2.2	氨化菌培养液培养法 .....	224
5.3	土壤硝化作用 .....	225
5.3.1	土壤培养法 .....	226
5.3.2	培养基接种土壤悬液法 .....	228
5.3.3	纯菌培养法 .....	230
5.3.4	环流法 .....	231
5.4	土壤反硝化作用 .....	231
5.4.1	硝酸盐消失法 .....	231
5.4.2	气相色谱法 .....	234
5.5	土壤固氮作用 .....	237
5.5.1	土壤培养测全氮法 .....	238
5.5.2	无氮培养液培养法 .....	240
5.5.3	乙炔还原法 .....	241
5.6	土壤磷素的转化作用 .....	247
5.7	纤维素分解作用 .....	250
5.7.1	埋布片法 .....	250
5.7.2	尼龙袋法 .....	251
5.8	土壤铁素的转化作用 .....	252
5.8.1	淹水土壤中 Fe 还原活性的测定法 .....	253
5.8.2	环流土壤中 Fe 氧化活性的测定法 .....	255
5.9	淹水条件下的硫酸盐还原作用 .....	256
5.9.1	SO <sub>4</sub> -S 的定量 .....	256
5.9.2	游离 H <sub>2</sub> S 和硫化物态 S 的定量 .....	258
5.10	土壤酶活性的测定 .....	260
5.10.1	脱氢酶 .....	261
5.10.2	过氧化氢酶 .....	263
5.10.3	多酚氧化酶 .....	264
5.10.4	转化酶 .....	265

5.10.5	脲酶 .....	268
5.10.6	蛋白酶 .....	269
5.10.7	纤维素分解酶 .....	271
5.10.8	磷酸酶 .....	273
第六章 土壤微生物研究的模拟体系 .....		276
6.1	环流装置 .....	276
6.1.1	Audus 环流装置 (1946) .....	277
6.1.2	Collin 和 Sims 环流装置 (1956) .....	277
6.1.3	Cripps 和 Norris 环流装置 (1969) .....	279
6.2	连续流动法 .....	279
6.3	微生物连续培养法 .....	281
6.4	人工根际的模拟体系 .....	283
6.4.1	植物根系代谢液的制取 .....	284
6.4.2	火棉胶袋的制作 .....	285
6.4.3	膜的渗透性的测定 .....	285
6.4.4	根系代谢液对土壤微生物活性的影响 .....	286
6.5	种稻土壤中固氮酶活性的测定装置 .....	286
6.6	水稻根际中气体代谢的测定装置 .....	290
第七章 菌种保藏 .....		294
7.1	菌种保藏的基本原理 .....	294
7.2	菌种保藏的常用方法 .....	294
7.2.1	斜面传代保藏法 .....	294
7.2.2	矿物油封藏法 .....	295
7.2.3	固体曲保藏法 .....	296
7.2.4	沙土保藏法 .....	296
7.2.5	土壤培养保藏法 .....	298
7.2.6	蒸馏水保藏法 .....	298
7.2.7	冷冻干燥保藏法 .....	299
7.2.8	液氮保藏法 .....	301

7.2.9 素瓷珠保藏法 .....	301
7.2.10 琼脂穿刺保藏法 .....	302
7.3 菌种保藏的注意事项 .....	302
第八章 数据处理 .....	306
8.1 统计分析的意义 .....	306
8.2 几个常用的统计值 .....	306
8.2.1 平均数 .....	306
8.2.2 标准差 .....	307
8.2.3 标准误 .....	308
8.2.4 变异系数 ( <i>C.V.</i> ) .....	309
8.3 两个平均值的比较——显著性测试 .....	309
8.4 多个样本平均值的比较——方差分析法 .....	310
8.5 回归分析 .....	313
8.5.1 回归分析计算 .....	313
8.5.2 相关系数 $r$ 的计算及其显著性检验 .....	314
8.5.3 计算回归线的精确度和置信限 .....	314
8.5.4 回归直线作图 .....	315
附录 .....	325
一、常用酸碱溶液的配制 .....	325
二、常用固态化合物当量(或克分子)浓度的配制 .....	326
三、常用酸碱指示剂的配制 .....	327
四、常用消毒剂的配制 .....	327
五、标准 pH 比色管的制备 .....	328
六、比重、糖度换算表 .....	329
七、稀释法测数统计表 .....	330
八、标准筛孔对照表 .....	333
九、土壤样品登记表 .....	334
十、土壤含水量测定记录表 .....	334

十一、土壤微生物分析记录表·····	335
十二、微生物生理群稀释分析记录表·····	336
十三、细菌鉴定卡片·····	337
十四、放线菌鉴定卡片·····	340
十五、真菌鉴定卡片·····	342
十六、菌种保藏登记卡片·····	343
培养基索引·····	344
试剂及溶液索引·····	346
主要参考文献·····	348



# 第一章 实验室的设置和一般操作

## 1.1 实验室的设置和主要设备

土壤微生物学研究的常规工作有培养基的配制和灭菌、微生物的分离和培养、显微镜检查、生理生化反应的测定及器具的洗涤和灭菌等。进行这些工作时最好有专门的房间。一般应设预备室、灭菌室、接种室、恒温室、洗涤室及实验室。实验室又可因工作性质的不同而有归并菌种的实验室和测定生理生化反应的实验室。这些房间的共同特点是墙壁和地板便于清洁卫生,不积灰尘,室内陈设不宜过多,应不妨碍清扫。

### 1.1.1 预备室

预备室用于配制培养基和处理土样等。室内有试剂柜和存放器具或材料的柜子及宽桌面的实验台、电炉和水、电源。

### 1.1.2 专用实验室

1. 灭菌室 主要用于培养基的灭菌以及分离培养微生物所用各种器具的灭菌。室内应备有加压蒸汽灭菌器和蒸锅、干热灭菌器(烘箱)等。

2. 接种室 系分离、接种及纯化菌种等无菌操作的专用实验室,要求室内空气里无杂菌。为此,房子不宜太高,天花板和四壁均要涂油漆或在四壁铺瓷砖,不留缝隙和积灰尘的棱角;地板要光滑,能用水冲洗,要双重窗;在室顶部和近地面处有空气过滤的气孔。室外是二重过道,其一起缓冲作用,