

土壤微生物学研究中的直接法

丁 鎰

(中国科学院林业土壤研究所, 沈阳)

土壤是一个有机-无机复合体,生活在其中的微生物不仅受着土壤环境的制约,而且也能动地影响着土壤,在土壤肥力、植物营养和土壤净化方面均起着重要的作用。了解微生物在土壤中的分布、活动、变化规律和在物质及能量上的转化作用,是土壤微生物学研究的重要内容。

然而,土壤是一个具有气相、液相、固相的非均一系统,又是一个不透明体。微生物在其中的分布和活动甚为复杂。了解它们间的关系,在技术上还存在不少障碍。因此加强这方面的研究也就很必要。土壤微生物工作者为此进行了大量工作,建立了不少方法,归纳起来可分为直接法和间接法两类。前者采用直接显微观察的办法,便于在自然条件下考察土壤中的微生物;后者需要经过培养阶段再进行研究,便于进行生理、生化和机理方面的研究。近年来在研究中随着各种新技术的应用,使土壤微生物学不论在分类、生态和生理、生化方面均取得显著的进展,大大地推动了土壤微生物学的发展。本文仅就土壤微生物学中直接法方面的研究作一论述。

一、显微镜直接观察

作为微生物居住环境的土壤,其显微观察

具有特别意义。但技术上存在很大障碍,过去用碱性染料染色,土壤胶体颗粒与菌体均同样着色,因而无法区辨它们。H. J. Corn 利用曙红(eosine)、四溴二氯萤光黄(phloxine)、孟加拉玫瑰红等酸性染料,以酚为媒染剂,克服了这一障碍,菌体着色,土壤颗粒不着色,因而能把菌体和土粒区别开来。С. Н. Виноградский^[1]利用此法研究了土壤中的微生物区系。将土壤试料制成悬液,经离心、沉淀处理后分别将沉淀和悬液涂抹在盖玻片上,用0.1~1%琼胶为胶结剂,比较了土壤的显微图景。认为土壤中的微生物区系由土壤微生物和发酵性微生物组成。土著微生物不依赖任何外来添加的养料,全靠土壤中原先含的物质而发育。它们处于活跃状态,属于不形成孢子的种,多属球形细菌,集结为结构不同的菌群,一些紧密包着荚膜,另一些比较疏松,也较分散,均居住在胶体物质的团块上,很难脱落下来。而发酵性微生物则在土壤中常处于潜伏状态,它需要外界添加的能源而繁殖,活动是间歇性的,属于生孢子的杆菌,不固着在土壤屑块上,而在土壤溶液中繁殖,С. Н. Виноградский的研究初步揭示了土壤中的微生物图景。但是,此法的缺点是:在制备土壤悬液时已破坏了土体的自然状态。因此,所得到的显

微图景不能说是土壤中微生物的真实景观。另外显微图景不能区分活菌与死菌,并且在制备土壤悬液时可能将真菌和放线菌的菌丝断裂成小体,在计数时均一并计算进去,因此计数可能偏高。

鉴于此,Н. Г. Холодный 创造了埋片法,将载片埋入土壤内,不改变土壤的自然结构,微生物靠粘附在载片上的土壤溶液而生长,因而获得了比较真实的微生物景观。但此法应用时也有其局限之处,即在湿度很小的土壤中就限制了微生物在载片上的生长。甚至当埋片时间长达 2~3 周还看不见菌的生长。А. В. Рыбалкина^[2] 改进了 Н. Г. Холодный 的方法,即在载玻片上涂上 2% 的琼脂或其他培养基作诱饵。缩短了埋片的时间,一般数日即可。所复制出来的微生物图景在类型上也较丰富多采。显然这是把埋片法和培养基法结合起来了。它的缺点也和其他直接法一样得不到纯培养物。

二、毛细管法

在土壤中存在的微生物大部吸附在土壤颗粒表面,而土壤颗粒之间是纵横交错的毛细管空隙。空气、养分随毛细管作用不断流动。微生物借以吸收养分而生存。Б. В. Перфильева 和 Д. Р. Габе^[3] 把水下土、淤泥、土壤均看作是流动着的毛细管系统。创造了毛细管法。用这种方法能在更接近自然状态下,研究上述自然生境下的微生物区系。并可用于地质微生物方面的研究。Т. В. Аристовская^[4] 利用此法已找到许多不能为平板法所揭示出的微生物种,还分离出两个新属:塞里伯氏菌属(*Seliberia*)和足微菌属(*Pedomicrobium*),还阐明了微生物在土壤中存在和活动的方式,生长在土壤溶液中的菌均表现为单细胞的生活模式,而在土粒上的菌则聚居形成微菌落。当土壤湿度下降,溶液中的微生物就会跑到土壤颗粒上去,变成不活跃的状态,甚至会从微生物图景中消失。

此法的要点是:用一组特制的毛细管板,宽 5~6 毫米,长 9~11 毫米,每板具有 5 个毛细管,毛细管非圆柱形,为便于镜检观察制成长方

形,孔的大小为 0.65 毫米×0.20 毫米。上顶薄,下底稍厚。毛细管经灭菌后,插入熔融的 0.2% 琼脂中。琼脂由于毛细管作用而吸入管内,紧贴于毛细管内壁上。然后装入支架套上,插入土壤内,埋放数天或数月(根据实验要求而定),取出后用 5% 石碳酸赤癣红染色,再在显微镜下观察。

这种方法能显示出许多在天然生境下的微生物区系和微动物区系。在沉积物和污水的微生物区系研究上非常有效。对于土壤微生物的研究还应结合其他方法的应用才更为有利。

三、荧光显微和荧光抗体技术

直接计数法已对土壤中存在的微生物得到一个量上的概念。但是它不能区分活菌和死菌。为消除此缺点,微生物工作者曾作了多方面的努力。Strugger^[5] 利用吖啶橙荧光显微技术得到了良好的结果,他在研究不同荧光染料染色时,发现吖啶橙与其他染料不同,荧光显色与染料的浓度密切相关。当样品吸收少量染料时呈亮绿色荧光,当样品吸收大量染料时则呈现暗红色荧光。因而利用此现象来作活体染色。因为在一般情况下活细菌均比死细菌吸收染料少。故用它来区别死、活细胞。虽然如此,仍然经过了 10 年才得到比较广泛的应用。Я. Сеиферт^[6] 用此法研究土壤微生物也获得很好结果。方法是将土壤试料 1 克加入到 10 毫升浓度为 1:1000~1:5000 的吖啶橙溶液内;将液面出现淡黄-绿荧光的试管取出制片。在载玻片上滴加此液一滴,立即用盖玻片(20×20 毫米)盖上,用凡士林封边,防止蒸发。然后在荧光显微镜下观察,用碳弧灯或汞灯为光源,用蓝色滤光片,在暗室中进行观察。细菌呈亮绿色荧光,背底暗色,土壤颗粒呈红褐色,用此法可进行土壤微生物的定量测定。

显然,Strugger 的荧光观察法,如能改用投射光,可能就会得到更广泛的应用。Н. А. Красильников 和 Д. Г. Звягинцев^[7] 用投射光发光显微镜和吖啶橙染色的方法研究了微生物在土壤中的空间分布。此法不破坏土壤结构,在采

取的土壤标本表面,滴加吖啶橙溶液 1 滴。然后在发光显微镜下观察。结果发现在土壤中微生物在自然状态下大量分布在土粒表面,而仅少部分游动在土壤颗粒之间的溶液内。细菌在不同大小的土壤颗粒上均有发现。放线菌及真菌通过它的菌丝体固定在大的土壤颗粒上。据计算每 100 平方微米的颗粒表面吸附的微生物细胞数可从几个到几十个。在土壤中虽然微生物的细胞数量很多,但所占的面积很小,仅 0.4%。因而造成微生物的生长各自有其活动中心。每个菌落均可独立生长,各有其活动空间。在空间上不易发生竞争。微生物在土壤中的分布也是不均匀的,不仅在不同颗粒间是这样,就是在同一颗粒的不同部位间也是如此。在土壤中细菌也经常呈纯培养状态,但有时则形成复杂的微生物群落。总之通过发光显微镜的研究丰富了我们对微生物在土壤空间分布的认识。

G. Trolldenier^[8] 还将此荧光显微技术用在土壤微生物的计量研究方面。此法不仅可研究土块上的微生物,还可研究根际微生物。用吖啶橙染色时,细菌、根细胞、土壤颗粒均清晰可辨。细菌呈亮绿色荧光,根细胞虽亦呈绿色发光,但色调很淡,土壤则呈暗褐色。

观察时为了得到更理想的结果,还可采用添加熄灭剂(quenchers)的办法以减弱土体的自体发光。常用的熄灭剂有 0.5—1% (W/V) 过磷酸钠,齐氏石炭酸复红和二嗪绿(diazine, 0.05% W/V)。在应用熄灭剂情况下细菌和放线菌菌丝均能明显地看出来。

也应当指出,藻类,某些真菌,放线菌和细菌由于它们本身能发荧光,因而勿需用吖啶橙染色亦能观察出来。

埋片法的优点在于提供了土壤中微生物在自然状态下的概貌。它的缺点在于对微生物不能进行种的鉴定。如果在埋片上能直接鉴定种,那么它的用途就会扩大,利用免疫荧光染色法,即利用抗原-抗体的特殊荧光反应,则有可能鉴定土壤中存在的某些微生物。

Schmidt E. L.^[9] 研究免疫荧光染色,发现荧光素对黄曲霉具有很强的专一性,能鉴别出

在灭菌土壤中混合培养的黄曲霉,凡属于此群的菌均产生强烈荧光,而不属于此群的菌荧光均较微弱,而非曲霉属的菌则完全不起反应。且产生的荧光强度与凝聚试验效价均有一定的相关性,但也有例外,譬如萨氏曲霉也同样产生荧光,因而也就难于和黄曲霉相区别开来了。虽然如此,此法仍是研究微生物生态的一个有力工具。

近年来这方面的技术已发展到荧光抗体的直接应用^[10],即将抗体和荧光素相结合制成荧光抗体试剂。染色使此试剂作用于抗原而产生特定的荧光。因此,利用起来很方便,勿需经常制备抗血清。

该方法的步骤是:

1. 荧光抗体的制备

先分离、选择特殊对象的某些抗原机体,经培养后,收集起来,经洗涤处理,稀释到一定浓度注入兔体,然后采取其活性血清。免疫血清产生 γ 球蛋白,用透析法精制,并稀释到 1% 蛋白浓度。将荧光色素(常用荧光素异硫氰酸盐, FITC) 与免疫球蛋白结合,形成荧光抗体,此荧光抗体(FA)在葡聚糖凝胶柱上精制,除去未起反应的 FITC,得到的荧光抗体临时稀释成适宜的浓度即可应用。此制备的 FA 装入密闭瓶中,在 -20°C 可保持数年之久,随用随取。

2. 生态-试料(eco-sample)染色

将自然材料放在显微镜载玻片上,为抑制非专一性抗体吸附作用可先用明胶-碱性蕊香红异硫氰酸盐作复染色处理,最后再将荧光抗体作用于已经干燥的明胶-RHITC 层上,染色 1 小时,用缓冲液洗涤,风干后用荧光显微镜观察。

荧光抗体技术不仅具有高度的专一性,而且具有极高的灵敏性。菌体细胞的染色浓度低到 10^{-18} 克如此微量还能探查出来,单细胞含氮量低到 5×10^{-11} 微克亦能检测出来。因而近年来它的应用日在扩大,过去仅用在医学微生物的研究方面,现在在微生物生态研究方面已广为应用。仅举例如表 1。

但此法在应用中也受到一些限制:

表1 荧光抗体技术在微生物生态研究上的应用

研究对象	研究内容	文献
厌氧细菌	检查、鉴定瘤胃中的微生物	11
黄曲霉	检测黄曲霉在土壤中的生长	12
芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	检测土壤上的芽孢杆菌	13
大豆根瘤菌 <i>Rhizobium japonicum</i>	检测大豆根瘤菌的专一性, 鉴定在土壤和根瘤中的大豆根瘤菌	14
大豆根瘤菌	研究大豆根瘤菌的作用、颜色和在土壤中的拮抗作用	15
三叶草根瘤菌 <i>Rhizobium trifolii</i>	鉴定三叶草的根瘤菌	16
腐败梭状芽孢杆菌 <i>Clostridium septicum</i>	检测腐败梭状芽孢杆菌在土壤中的存在和生长	17
固氮菌属 <i>Azotobacter</i>	鉴定在埋片上的固氮菌	18
拜氏固氮菌 <i>Azotobacter beijerinckii</i>	研究在土壤中的拜氏固氮菌	19

1. 限于抗原-抗体的专一性, 因而只能用于一些特定的微生物。
2. 在观察中还存在非专一性吸附的干扰。
3. 由于死细胞和活细胞两者均属专一性染色, 因而不能分辨死、活细胞。

四、电子显微镜及扫描电子显微技术

利用电子显微镜直接观察土壤中存在的微生物, 因它具有很高的放大倍率和分辨能力, 能揭示出光学显微镜不能揭示的形态和图景。

Д. И. Никитин^[20] 利用电子显微镜观察土壤悬液, 用热吸附法制片。将土壤悬液 1 滴滴加在铝片上, 再在悬液滴上覆盖铜网膜。然后将此铝片移到水浴上, 于 50~60℃ 保持 3~5 分钟, 最后去掉铝片, 过多的悬液亦从铜网膜架上除去。此制片勿需任何预处理, 即可放电镜下观察。Никитин 用此法观察到一系列迄今从未有人知道的奇异微生物类型。根据其形态特征可将其归纳为: 星状形; 圆形多孔状; 伞状形; 类藻状和亚显微结构等。目前电子显微的技术已广泛用在微生物的分类上。

电子显微镜不仅用作形态观察, 还可用作

定量研究。Никитин^[21] 用电子显微镜对土壤中的微生物进行直接计数。先将土壤试料制成 10^{-1} 或 10^{-2} 的稀释液。用微量吸管滴加一滴 (0.003~0.008 毫升) 到金属架网膜上。待干后将制片用磷钨酸或金属处理, 观察视野中的细胞数。计算金属架面积上的细胞数。每毫升悬液中微生物的总数按下式计算:

$$M = \frac{n \cdot \pi r^2}{a^2 \cdot V \cdot P}$$

M ——1 毫升悬液中细胞量

n ——视野中的细胞数

r ——金属架半径(微米)

a ——金属架的方边

V ——滴液体积(毫升)

P ——悬液稀释度

从电子显微镜下的计量结果成百倍于实验室平板法的计量结果。为便于比较, 仅将 Никитин 用实验室平板法、毛细管法和电子显微镜法对不同腐殖质含量, 不同水分含量的土壤中的微生物计量结果列于表 2:

表2 平板法、毛细管法、电泳法对土壤中微生物计量的比较^[22]
(微生物总量/1 克绝干土)

土 壤	水分含量 %	腐殖质含量 %	平板法	毛细管法	电泳法
含腐殖质丰富土壤					
湿	16.9	5.97	24.1×10^6	96.3×10^7	15.6×10^9
干	2.01	5.33	12.7×10^4	61.2×10^7	11.2×10^9
腐殖质贫瘠土壤					
湿	11.7	1.62	3.4×10^6	63.5×10^7	13.0×10^9
干	0.5	1.68	2.4×10^4	28.5×10^7	4.3×10^9

因此电子显微镜确是揭露土壤中微生物的一种有力工具。然而此法的缺点是它把土壤先制成悬液, 已改变了土壤的自然原始状态。看不到微生物在土壤中的原始空间分布。除此外, 也和其他直接法一样, 不能直接作种的鉴定。

Gray^[23] 曾利用扫描电子显微镜观察土壤微生物。将土壤粘附在样品架上, 放在真空喷镀仪中, 经喷镀一层金-铂合金后, 放入电子显微

镜下观察,看到了微生物在土壤中的空间分布。因不用破坏土壤的自然状态就看到了微生物在土壤颗粒结构上存在的状态,确实比透射电子显微镜的直接观察具有独到之处。在扫描图谱中微生物、粘土矿物颗粒、有机物的枯枝落叶层和腐殖质残体均清晰可辨。因而揭示了微生物在土壤中的真实状态,便于深入开展生态学方面的研究。故电子扫描显示了土壤中微生物的真实图景。也应当指出电子扫描技术也还有不足之处。目前最好的扫描电子显微镜的分辨率比起透射电子显微镜来相差达 20—50 倍。因此要探查一些超微结构就嫌不够了。因此在微生物学上常将透射电子显微镜和扫描电子显微技术结合起来应用。

总之,这是一个很有发展前途的研究方法,再配合其他新技术的应用就可能揭露出微生物在土壤中活动的奥妙。

五、红外照像技术的利用

在考察自然生境下的微生物时,对一些在形状和大小上与微生物相似的腐殖质颗粒,用普通光学显微办法很难将它们和微生物区别开来。采用染色处理的办法,也因在生境表面覆盖上一层染料,因而妨碍了被包埋微生物的观察。利用红外照像的技术不仅可观察到自然生境下非染色的微生物,还可探查包埋在生境材料成份中的微生物细胞。对土壤、活性污泥、植物根毛组织内部的微生物以及微生物的纯培养均能照录,对微生物生态学的研究特别方便。

该方法是先将观察材料制成悬浮液,滴加在载玻片上,再盖上盖玻片,在显微镜下观察。用消多色差接物镜,12 伏透射光源,用黄色 Tiffon No. 12 或中等红色 25A Ednalite 滤光片,照像时射出光线强度增到 5 安培,曝光时间 0.01 秒,用柯达红外 8443 型胶片。

此种照片能使所有的细菌均呈“假”红色,而诺卡氏菌属、链霉菌属和真菌的种则不呈此色。因此在区辨微生物上也甚有用。植物-根组织亦不呈红色,因而可用此技术将豆科植物根

毛表面的细菌和侵入根毛内部在侵入线中的根瘤菌照录出来。L. E. Casida^[24]观察了三叶草根瘤菌侵入三叶草根毛内部所显示出的图景。根瘤菌在侵入线中成“串”排列,呈红色,背底和根毛的原生质呈淡蓝色,根毛壁呈黄色,因而使图景显得非常清晰美丽。

虽然此技术能区别开细菌细胞和其他材料的机理还不清楚,但可以假定与细胞表面的物理化学性质有关。此技术不仅可观察非染色的活细胞,还可观察死细胞。用热处理土壤或用氯仿、四氯化碳在冰冻温度处理土壤并过夜,均不影响在生境条件下细菌的红外可见性。但用甲苯处理时,则因溶解了细胞,破坏了土壤中的细菌,因而就不能应用此技术了。

六、放射自显影技术的应用

近年来放射自显影技术已用到土壤微生物的研究上,用以区辨在植物残体上和土壤中的死、活菌体。Waid 等^[25]利用此技术观察山毛榉腐败叶片上的死、活菌丝。操作程序是:

1. 样品处理

将采集的叶片样品切成圆盘形,以 10 微居里/毫升浓度的 ^{14}C -葡萄糖溶液标记 2 小时,再用 4% 甲醛处理,无菌水洗涤。

2. 自显影的制备

用聚乙烯氯仿溶液剥取叶面上的菌丝。即先将聚乙烯氯仿溶液涂抹在叶片上,待涂料硬化后,再从叶片上剥下此薄皮,贴在载玻片上,置氯仿气容器中。采用液体照像乳胶显影 2 天。利用液体乳胶的优点在于叶面上的菌丝能与此乳胶紧密粘在一起。活的菌丝显出明晰影像,对照样品表明并无菌丝的非代谢自吸收,本底放射活性亦可略而不计。

Waid 等利用此技术还作了自显影样品的定量考查。用 400 倍镜观察载玻片上的自显标本,在接目镜上装上方格测微尺。根据视野的面积,计算出自显影的面积,并据此换算出单位叶片上菌丝的总长度和具代谢活性的菌丝长度。

然而此法的可靠性亦有争论。因为一些死的菌丝也可能因受某些溶真菌的细菌或其他微

生物的作用而变成能吸收放射性标记元素的基点,从而被当成活的菌丝而被显影出来。因此,采用高分辨率的电镜自显影技术就很必要了。

Ramsey 利用高分辨率的电镜自显影技术研究了淤泥中具有代谢活性的细菌。Waid 等亦利用此技术研究了加拿大伊罗藤水草叶片上的细菌,用浓度 20 微居里/毫升的 ^3H -胸腺嘧啶核苷处理样品 2 小时,用 3% 磷钨酸对细胞作负染色,然后滴加在铜网的火棉胶-碳膜上,多余的悬液用滤纸吸干,用 3% 戊二醛磷酸缓冲液 (pH7) 固定,用液体乳胶液滴加在铜网上,置氮气上曝光 8 周,曝光后的铜网经显影、定影、水洗等处理后,用电镜观察,结果约 70% 的细菌细胞被标记了。

Brasier 亦用此技术研究了土壤中具有代谢活性的细菌。先用 1% (w/v) 醋酸钠溶液将干燥的土壤团块湿润 24 小时,然后用 ^3H -葡萄糖溶液 (20 微居里/升) 注满,处理 3 小时,再将漂浮起的表面膜取下贴到铜网上,如上述处理制片,曝光 7 周,最后用电镜观察,结果仅 5% 的细胞被标记。

近年来土壤微生物的研究技术已有很大进展,各种新技术的利用已逐渐克服土壤这一不透明体的障碍,揭示出许多前所未有的微生物和微生物在自然生境下的分布和活动状态。把自然生境下的直接研究和实验室纯培养的研究结合起来就能更真实地揭露微生物在土壤中的活动规律。从而为人类有效地利用这些规律,充分发挥土壤微生物在提高土壤肥力,改善植物培养以及在土壤净化等方面的巨大作用。

参 考 文 献

- [1] Виноградский, С. Н.: *Микробиология Почвы*. Изд-во АН СССР, Москва 1952.
- [2] Рыбалкина, А. В. и Кононенко, Е. В.: *Микробиология*, 22 (4): 439—444, 1958.
- [3] Перфильева, Б. В. и Габеев, Д. Р.: *Почвоведение*, 1961, No. 1: 81—86.
- [4] Аристовская, Т. В. и Паринкина, О. И.: *Почвоведение*, 1961, No. 1: 20—28.
- [5] Strugger, S.: *Can. J. Res.*, 26:188—193, 1948.
- [6] Сенферг, Я.: *Почвоведение*, 1958, No. 2: 50—54.
- [7] Красильников, Н. А. и Звягинцев, Д. Г.: *Докл. АН СССР*, 128 (2): 366—367, 1958.
- [8] Trolldenier, G.: *The Use of Fluorescence Microscope for Counting Soil Microorganisms, Modern Methods in the Study of Microbial Ecology*, (ed. by Rosswall, T.), NFR, Stockholm, 1972, pp. 53—59.
- [9] Schmidt, E. L.: *Appl. Microbiol.*, 13(5):673—679, 1965.
- [10] Schmidt, E. L.: *Fluorescent Antibody Techniques in the Study of Microbial Ecology, Modern Methods in the Study of Microbial Ecology* (ed. by Rosswall, T.), NFR, Stockholm, 1972, pp. 67—76.
- [11] Hobson, P. N. and S. O. Mann: *J. Gen. Microbiol.*, 16(2):463—571, 1957.
- [12] Schmidt, E. L. and R. O. Bankole: *Science*, 136(3518):776—777, 1962.
- [13] Hill, T. R. and T. R. C. Gray: *J. Bacteriol.*, 93:1888—1896, 1967.
- [14] Schmidt, E. L. et al.: *J. Bacteriol.*, 95(6): 1987—1993, 1968.
- [15] Bohlool, B. B. and E. L. Schmidt: *Soil Sci.*, 110:229—237, 1970.
- [16] Trinick, M. G.: *J. Appl. Bacteriol.*, 32:181—186, 1969.
- [17] Garcia, M. M. and K. A. McKay: *J. Appl. Bacteriol.*, 32:362—370, 1969.
- [18] Tchan, Y. T. and Derille: *Ann. Inst. Pasteur*, 118(5):665—673, 1970.
- [19] Schmidt, E. L. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 23(2): 161—165, 1977.
- [20] Никитин, Д. И.: *Почвоведение*, 1964, No. 6:86—91.
- [21] Никитин, Д. И. и Макарьева, Г. Д.: *Почвоведение*, 1970, No. 10: 51—55.
- [22] Nikitin, D. I.: *Direct Electron Microscopic Techniques for the Observation of Microorganisms in Soil, Modern Methods in the Study of Microbial Ecology* (ed. by Rosswall, T.), NFR, Stockholm, 1972, pp. 85—92.
- [23] Gray, T. R. G.: *Science*, 155(3770):1668—1670, 1967.
- [24] Caside, L. E.: *Science*, 159(3811):199—200, 1968.
- [25] Waid, J. S., K. J. Preston and P. J. Harris: *Autoradiographic Technique to Detect Active Microbial Cell in Natural Habitats, Modern Methods in the Study of Microbial Ecology* (ed. by Rosswall, T.), NFR, Stockholm, 1972, pp. 317—322.