

第三次全国土壤普查土壤 生物调查技术规范

(修订版)

执笔人：孙波 王辉 蒋瑞霖 陈晏 王晓玥
梁玉婷 郑洁 栾璐 马志远 王宁
祝玲月 卞清 魏海雷 林英华 梁文举
邱江平 杨云锋 张瑞福 秦华 阮志勇
李永涛 胡锋 徐明岗 李荣 沈其荣

国务院第三次全国土壤普查领导小组办公室

2023年2月

目 次

1	适用范围	144
2	总则	144
2.1	调查目标	144
2.2	调查工作流程	144
2.3	调查原则	145
3	规范性引用文件	146
4	术语和定义	146
4.1	土壤生物 soil organisms	146
4.2	土壤生物群落 soil biome	146
4.3	土属 soil genus	147
4.4	土种 soil species	147
4.5	样点 sampling site	147
4.6	样地 sampling plot	147
4.7	样方 sampling quadrat	147
4.8	分区随机采样法 block random sampling method	147
4.9	土壤质量和土壤健康的生物学评价 biological assessment of soil quality and soil health	147
4.10	土壤生物样品中转站 soil organism sample transferring station	147
4.11	土壤微生物生物量 soil microbial biomass	147
4.12	土壤呼吸强度 soil respiration intensity	147
4.13	土壤多酚氧化酶 soil polyphenol oxidase	147
4.14	土壤 β -D-葡萄糖苷酶 soil β -D-glucosidase	148
4.15	土壤脲酶 soil urease	148
4.16	土壤硝酸还原酶 soil nitrate reductase	148
4.17	土壤氨单加氧酶 soil ammonia monooxygenase	148
4.18	土壤磷酸酶 soil phosphatase	148
4.19	青枯菌 <i>Ralstonia solanacearum</i>	148
4.20	尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	148
4.21	土壤线虫 soil nematode	148
4.22	蚯蚓 earthworm	148
4.23	基因拷贝数 gene copies	148
4.24	土壤微生物高通量测序 soil microbial high-throughput sequencing	149
4.25	土壤功能基因组测序 soil functional genomic sequencing	149
4.26	土壤动物线粒体基因组测序 soil animal mitochondrial genome sequencing	149
4.27	土壤生物数据库 soil biological database	149
4.28	植物生长旺盛期 plant exuberant growth period	149
5	土壤生物调查方法	149
5.1	土壤生物调查样点布设方法	149
5.2	土壤生物调查样点布设数量与区域	149
5.3	土壤生物调查样地设置与信息采集	150
5.4	土壤生物样品采集	151
5.5	土壤生物调查人员组成和调查时间选择	153

5.6	土壤生物样品中转站建设管理	153
5.7	土壤生物调查样品分析测试单位选择	154
6	土壤生物调查和评价指标体系与分析方法	154
6.1	土壤生物评价指标体系	154
6.2	土壤微生物生物量	155
6.3	土壤细菌、真菌、古菌和重要碳氮磷功能基因丰度	155
6.4	土壤呼吸强度	155
6.5	土壤酶活性	155
6.6	土壤微生物群落组成	156
6.7	土壤优势功能微生物分离培养及鉴定	156
6.8	土壤功能基因组	156
6.9	土壤线虫群落分析	156
6.10	蚯蚓群落分析	156
7	土壤生物调查质量控制	156
7.1	建立土壤生物调查质量控制体系	156
7.2	土壤生物采样过程质量控制	156
7.3	分析测试单位质量控制	156
7.4	土壤生物样品分析过程中系统误差、随机误差和差错控制	157
7.5	土壤生物数据质量控制	157
8	土壤质量和土壤健康的生物学综合评价	157
9	土壤生物调查成果管理	157
9.1	建立土壤生物调查数据库	157
9.2	开展土壤生物调查数据分析与评价，提交土壤生物调查报告	157
附录 1	土壤微生物生物量的测定——熏蒸提取法	158
附录 2	土壤细菌、真菌、古菌和重要碳氮磷功能基因实时荧光定量 PCR 方法	163
附录 3	土壤呼吸强度测定方法	170
附录 4	土壤酶活性测定方法	171
附录 5	土壤微生物群落组成高通量测序方法	179
附录 6	土壤优势功能微生物分离培养及鉴定方法	187
附录 7	土壤功能基因组测序方法	193
附录 8	土壤线虫分离鉴定方法	204
附录 9	蚯蚓物种调查鉴定及线粒体基因测序方法	210
附录 10	土壤生物样品分析质量控制方法	215
附录 11	土壤生物数据质量控制方法	217
附录 12	土壤质量和土壤健康的评价方法	221
附录 13	土壤生物调查数据管理方法	226

1 适用范围

本规范规定了第三次全国土壤普查（以下简称“土壤三普”）土壤生物调查技术规范，包括土壤生物调查评价指标体系、调查样点布设方法、样品采集与保存运输方法、样品分析方法、调查全程质量控制方法、调查数据综合分析方法、调查数据管理方法等。

本规范适用于全国尺度或区域尺度基于土种样点采样的土壤生物调查，包括对土壤生物群落的生物量、活性、物种多样性、功能多样性、重要功能种群组成的调查；适用于全国尺度或区域尺度基于土壤生物学性状的农用地土壤质量和土壤健康评价。

2 总则

2.1 调查目标

基于土壤三普设定的总体目标，针对我国所有土属中的重要土种，覆盖主要气候类型、地形条件和土地利用方式，调查植物生长旺盛期土壤微生物、线虫、蚯蚓的生物量、活性、多样性和功能，评价我国重要土种的土壤质量与土壤健康状况，提出我国土壤生物功能提升的管理对策。

2.2 调查工作流程

土壤生物调查工作流程见图 1。

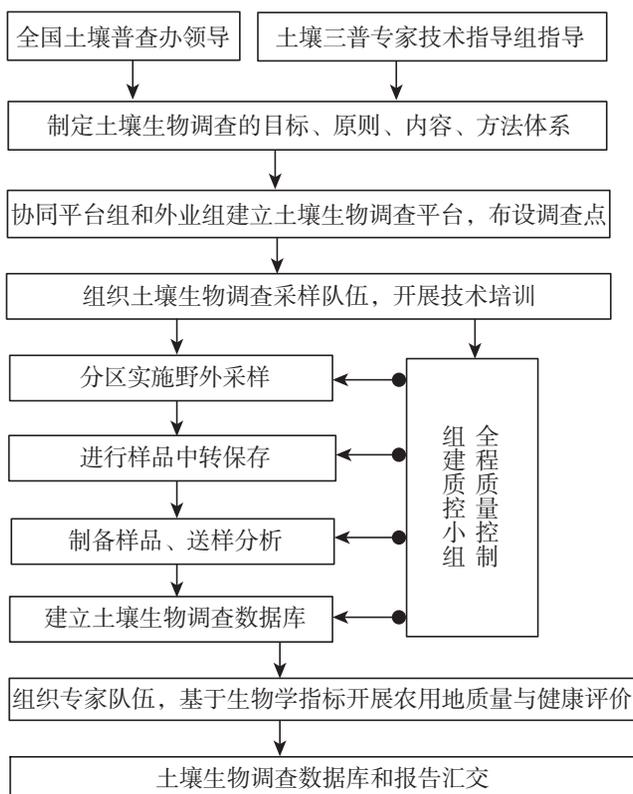


图 1 土壤生物调查工作流程

2.3 调查原则

2.3.1 土壤生物评价指标选取原则

土壤生物驱动了土壤中养分和污染物的转化和循环，影响了土壤结构的形成，从而影响了土壤质量和土壤健康水平。由于土壤生物复杂多样，在土壤中形成复杂的生物群落，生物群落中存在随机性和确定性的演变过程，影响了土壤生物群落的功能。土壤生物的生物量、群落组成、功能和活性等是评价土壤质量变化的敏感指标，需要综合考虑选择土壤生物指标。

2.3.1.1 多功能性兼顾原则

集成土壤生物培育土壤质量和提升植物生产力的功能，包括促进养分转化、促进植物生长、抑制病害发生等功能。

2.3.1.2 重要性和代表性指标相结合原则

针对碳、氮、磷养分蓄积和转化功能、促进植物生长、抑制病害发生功能，考虑土壤生物对主要功能的贡献度和制约作用，同时考虑在同类生物指标中的代表性。

2.3.1.3 稳定性和敏感性指标相结合原则

在考虑土壤生物群落演替过程与生物群落功能之间协同变化的敏感性指标基础上，考虑土壤生物群落在长期演替中的稳定性指标。

2.3.1.4 分子生物学与经典生态学指标相结合原则

考虑调查和分析方法的先进性、可靠性和低成本性，兼顾分子生物学分析以及细胞与群落尺度上生物多样性和功能分析。

2.3.2 土壤生物调查样点布设原则

紧密结合土壤三普总体布点思路，土壤生物调查遵循“气候带主导”原则、“农用地主导”原则、“以土种作为基本分区单元”原则布设样点。在全国尺度上，根据土种面积占比顺序选择土壤生物调查的土种类型，基于土壤三普布设的土壤剖面调查样点，根据土种分布图斑的面积抽取土壤剖面土壤生物调查样点，作为全国的土壤生物调查样点。在省（区、市）尺度上，根据加密调查的目标和任务，以所在省（区、市）的土壤剖面样点为基础，可以抽取部分土壤剖面样点，也可以覆盖所有土种的土壤剖面样点，直至加密部分表层样点（如针对特色农产品产区），最终确定省（区、市）土壤生物调查样点。原则上，土壤生物调查与土壤剖面调查协同开展“共点”调查。

2.3.2.1 气候带主导、兼顾自然经济条件

土壤生物调查样点分布采取东、中部并重，兼顾西部的思路。土壤生物受干湿度等气候因素以及地形地貌、经济发展水平等条件影响。我国地势西高东低，年降水量从东往西逐渐减少，经济发展水平从东往西逐次递减。土壤生物调查样点布设将全国分为东部湿润区（东部，下同）、中部半湿润半干旱区（中部，下同）、西部干旱区（西部，下同）3个大区。

2.3.2.2 农用地主导、兼顾其他用地类型

覆盖土壤三普中土地利用方式范围，土壤生物调查中的土地利用方式以耕地和园地为主，兼顾林地、草地和其他土地中的后备耕地，根据不同区域、不同土地利用方式组成的变化，调节土壤样点的布设比例。针对耕地，兼顾不同区域土壤质量等级的比例，调节土种样点的比例。

2.3.2.3 覆盖土壤三普调查土属、以土种作为基本分区单元

土壤生物调查覆盖土壤三普的所有调查土属，包含各土属中的主要土种。土属是土壤分类系统的中层分类单元，形成土属的气候、地形、成土母质、人为耕作条件也驱动了土壤生物多样性的形成以及土壤生物功能的演变。土种是土壤分类系统的基层分类单元，受区域气候、地形、母质、改良利用等影响，土种反映了土层厚度、黏粒、盐分等微域土壤质量特征，代表了土壤改良利用的方向。针对耕地和园地，土壤生物调查以土种作为样点选择的基本分区单元，根据土种面积占比顺序选择土壤生物调查的土种类型，根据土种分布图斑的面积抽取土壤剖面样点，确定土壤生物调查样点。针对林地和草地，以土属为基本分区单元，在每个土属下选择1~2个优势土种作为调查对象。土壤生物调查

与土壤剖面调查协同开展“共点”调查。

2.3.3 土壤生物样品采集原则

土壤生物调查坚持样品采集的景观性原则、随机性原则和等量性原则。为了保证土壤生物样品的典型性，必须坚持景观性原则，在一定区域选择土种形成的典型景观类型采集土壤生物样品。为了保证采集的混合土壤生物样品的代表性，必须坚持随机性原则，使组成总体的个体有同样的机会被选入样品，即组成样品的个体应当是随机地取自总体，避免人为因素的影响。为了保证采集的混合土壤生物样品具有可比性，土壤生物样品采集数量必须坚持等量性原则，采集相同数量的个体样品组成混合样品。

2.3.4 土壤生物调查样品和分析样品的编码原则

以土壤三普土壤剖面调查点编号作为土壤生物调查的样地编号。样品编码在样地编号基础上扩展4个字段共7位数字，样品编码格式为：N A B C D，其中N为剖面点编号，A为样点级别字段（0~2，0为国家级土壤生物样点，1为省级土壤生物样点，2为市级及以下土壤生物样点），B为生物调查样点编号字段（0001~9999），C为样品类型编号（1~3，1为微生物，2为线虫，3为蚯蚓），D为土壤生物样品重复编号字段（1~9，其中1~6为调查样品重复编号，7~9为质控样重复编号）。

根据土壤三普土壤样品制样转码原则，建立对应于野外样品唯一编号的送检样品编号，然后在送检样品编号基础上添加2位数字，分别代表不同的分析项目，并对应相应的数字序号（1，2，3，4，…）作为分析样品编号。同时对平行双样、质控样按同样规则进行编号。

2.3.5 土壤生物调查质量控制和数据管理原则

土壤生物调查质量控制涉及调查和评价的全部过程。质量保证和质量控制目的是保证所产生的土壤生物调查分析资料具有代表性、准确性、精密性、可比性和完整性。

土壤生物调查数据管理按照土壤三普数据管理制度执行，目标是保证土壤生物调查的正确性和安全性，遵守土壤三普数据的产权保护政策与共享制度。

3 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本规范必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本规范；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于规范。

- GB/T 36197—2018 《土壤质量 土壤采样技术指南》
- GB/T 32740—2016 《自然生态系统土壤长期定位监测指南》
- GB/T 33469—2016 《耕地质量等级》
- GB/T 17296—2009 《中国土壤分类与代码》
- GB/T 10111—2008 《随机数的产生及其在产品质量抽样检验中的应用程序》
- NY/T 1634—2008 《耕地地力调查与质量评价技术规程》

4 术语和定义

下列术语和定义适用于本规范。

4.1 土壤生物 soil organisms

在土壤中生活的微生物和动物的总体，包括细菌、放线菌、真菌、病毒、古菌、藻类、原生动物、后生动物等。

4.2 土壤生物群落 soil biome

在一定的土壤区域环境和一定的时间聚集的各种生物种群的集合。土壤生物群落的基本特征包括

群落的空间结构、时间组配和种类结构、群落物种多样性、相对丰度、优势种、营养类群等。

4.3 土属 soil genus

土壤分类系统中的中级分类单元。是在相同的气候、地形等自然环境条件以及共同的人为生产活动条件下，由于区域性的成土母质及风化壳、水文状况差异形成的具有一定土壤属性的一群土壤。具有一定的成土过程、土壤理化属性和土壤改良利用方向。

4.4 土种 soil species

土壤分类系统中的基层单元。是处于相同或相似景观部位，具有相似土体构型和土壤剖面性状特征的一群土壤。在土属范围内反映了土层厚度、黏粒、盐分含量等性状的差异。

4.5 样点 sampling site

按照一定调查原则确定的具有代表性、典型性的土壤调查区域。

4.6 样地 sampling plot

在土壤调查样点，为进行科学性调查采样确定的具有一定边界的地段。

4.7 样方 sampling quadrat

在土壤调查样地中，开展土壤或者地段依附性强的且调查确定的采样地块。

4.8 分区随机采样法 block random sampling method

将样地划分为地形条件、生物群落类型、土壤属性较为一致的不同采样区块，利用随机布点和随机选择样方的方式进行土壤采样的方法。

4.9 土壤质量和土壤健康的生物学评价 biological assessment of soil quality and soil health

土壤质量是土壤在生态系统范围内维持生物的生产力、保护环境质量以及促进动植物健康的能力。土壤健康是土壤持续支撑农产品安全生产、维持生态环境质量和保障动植物及人类健康的能力。土壤质量和土壤健康相互关联，土壤质量是形成土壤健康的物质基础，而土壤健康是发挥土壤质量的功能保障。土壤中的生物群落形成多级生物网络，驱动了土壤中碳、氮、磷等生源要素和有害物质的转化与循环过程，从而影响了土壤质量和土壤健康水平。利用土壤生物的生物量、活性、多样性和功能性指标可以从生物学角度评价土壤质量和土壤健康，为土壤可持续管理提供依据。

4.10 土壤生物样品中转站 soil organism sample transferring station

具备一定的土壤生物样品保存、处理和相关数据管理条件的站点。负责收集、处理和保存野外采集的土壤生物样品、开展样品编号和存放、分发样品至检测单位、收集整理数据。

4.11 土壤微生物生物量 soil microbial biomass

单位土壤中体积小于 $5 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ 微生物的总重量。

4.12 土壤呼吸强度 soil respiration intensity

单位时间内从单位质量土壤中释放出来的二氧化碳量。

4.13 土壤多酚氧化酶 soil polyphenol oxidase

含铜氧化还原酶类。在土壤碳循环中参与木质素及多酚类物质的降解，能够通过分子氧化酚或多

酚生成对应的醌。

4.14 土壤 β -D-葡萄糖苷酶 soil β -D-glucosidase

纤维素酶类。在土壤碳循环中参与纤维素的降解，能够水解结合于末端非还原性的 β -D-葡萄糖键生成葡萄糖。

4.15 土壤脲酶 soil urease

酰胺水解酶类。在土壤氮循环中参与有机尿素的分解，催化尿素水解成氨和二氧化碳。

4.16 土壤硝酸还原酶 soil nitrate reductase

氧化还原酶类。在土壤氮循环中参与硝酸盐转化，催化硝酸离子还原成亚硝酸离子。

4.17 土壤氨单加氧酶 soil ammonia monooxygenase

氧化还原酶类，是硝化作用的限速酶。在土壤氮循环中参与氨氧化过程，催化铵根离子(NH_4^+)氧化转化为羟胺(NH_2OH)。

4.18 土壤磷酸酶 soil phosphatase

将土壤中正磷酸单酯水解成磷酸盐的一类非特异性磷酸单酯酶。在酸性和碱性条件下测定其水解活性，分别称为酸性磷酸酶活性和碱性磷酸酶活性。

4.19 青枯菌 *Ralstonia solanacearum*

革兰氏阴性菌，属于 β 变形菌纲，薄壁菌目，假单胞菌科，劳尔氏菌属。青枯菌是一种广泛分布的病原细菌，可引起马铃薯、番茄等多种植物发生青枯病。

4.20 尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum*

尖孢镰刀菌属半知菌类(Imperfect fungi)丛梗孢目(Moniliales)瘤座孢科(Tuberculariaceae)镰刀菌属(*Fusarium*)。尖孢镰刀菌是一种广泛分布的土传病原真菌，可产生小型分生孢子、大型分生孢子和厚垣孢子3种类型，可引起茄科、豆科等多种植物发生枯萎病。

4.21 土壤线虫 soil nematode

一类虫体透明、结构简单且两侧对称的假体腔无脊椎动物，隶属线虫动物门(Nematoda)，是土壤动物中数量和功能类群最丰富的类群之一。根据食性分为食细菌线虫、食真菌线虫、植食性线虫、杂食性-捕食性线虫。

4.22 蚯蚓 earthworm

属于环节动物门寡毛纲的陆栖无脊椎动物，通过取食、消化、排泄蚯蚓粪、分泌黏液和掘穴等活动影响土壤物质循环和能量传递。根据生活习性分为生活在土壤腐殖质层、喜食凋落物、不形成洞穴的表层种蚯蚓；生活在土壤表层、形成水平洞穴、喜食富含有机质土壤的内层种蚯蚓；形成垂直洞穴、上食下居的深层种蚯蚓。

4.23 基因拷贝数 gene copies

利用荧光化学物质测定聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)循环后产物总量的方法，简称实时荧光定量PCR法，分析得到某一生物的基因在基因组中的个数。

4.24 土壤微生物高通量测序 soil microbial high-throughput sequencing

通过对微生物 16S rDNA、18S rDNA、ITS（内源转录间隔区）进行扩增测序的技术，用于分析土壤微生物群落结构和多样性。

4.25 土壤功能基因组测序 soil functional genomic sequencing

针对土壤中细菌、真菌、古菌、原生动物、显微藻类等生物群落，通过从土壤样品中提取全部微生物的 DNA，进行功能基因组学的测序分析技术。用于构建宏基因组文库，分析土壤生物功能多样性。

4.26 土壤动物线粒体基因组测序 soil animal mitochondrial genome sequencing

基于不同土壤动物线粒体 DNA 中可变区碱基排列顺序的差异，利用土壤动物线粒体基因组中一段公认的、相对较短的 DNA 序列片段来进行物种鉴定的一种分子生物学技术。

4.27 土壤生物数据库 soil biological database

通过建立数据中心屏蔽室，形成单独部署的数据库，避免入侵或信息泄露风险，达到 B 级防护标准，用于存放土壤生物调查数据。

4.28 植物生长旺盛期 plant exuberant growth period

指一年中植物生长最旺盛的时期。植物生长与温度条件密切相关，同时还受纬度、海拔、植物种类、水分等条件的影响。农业上一般以日平均气温大于 15℃ 的持续时期称为喜温作物的生长旺盛期。

5 土壤生物调查方法

5.1 土壤生物调查样点布设方法

根据土壤三普布点原则，按气候区类型、土地利用类型、土种类型、地形条件的代表性和典型性，确定土壤生物调查样点的分布和数量。在第二次全国土壤普查 1:5 万土壤图（细分至土种，部分地区土属）的基础上，叠加第三次全国国土调查 1:1 万土地利用现状图、2020 年 1:1 万全国行政区划图，评价不同土地利用方式的代表性；基于 12.5 m 分辨率的数字高程模型，评价调查土种在海拔、坡度等地形条件方面的代表性。最后，根据土壤生物调查土种面积占比，基于全国土壤剖面调查点分布图，抽取调查土种剖面点的分布点和数量。在没有土种分布图的地区，综合利用土地利用、地形等信息确定土壤生物调查样点分布，通过专家组评估制定全国土壤生物调查样点位置和分布图。

5.2 土壤生物调查样点布设数量与区域

(1) 根据气候带主导、兼顾自然经济条件原则，土壤生物调查样点分布以东中部地区为主，兼顾西部地区。在我国南北温度梯度带上，通过土壤生物调查样点的空间合理布点实现对不同气候带的全覆盖。

(2) 根据农用地主导、兼顾其他用地类型原则，根据各地耕地、园地、林地、草地、其他土地利用方式面积占比确定土壤生物调查样点比例。其中耕地样点，结合全国各地耕地质量等级面积占比，确定不同等级耕地土壤生物调查样点比例，覆盖全国高、中、低 3 个等级的耕地。

(3) 根据覆盖土壤三普所有调查土属、以土种作为基本分区单元原则，在土壤剖面调查点的基础上，依据土属中土种分布面积所占比例，确定同一土属下土壤生物调查的土种类型，每个土属最少调查一个土种类型；合理调整不同区域和土地利用方式下不同土种样点的数量，面积较大的土种，可

根据土壤空间分布状况、行政单元、土地利用类型、气候、地形和植被条件等布设多个样点。

5.3 土壤生物调查样地设置与信息采集

土壤生物调查样地布设应以土壤三普土壤剖面调查点为核心，土壤生物调查与土壤剖面调查“共点”设置调查点，具有与土壤剖面调查点相同的土壤理化性状、立地条件与生产利用情况。土壤生物调查队伍通过手持终端 App 等导航设备寻找土壤生物采样点位置，根据土壤剖面挖掘点或者以 GPS 定位点为核心设置采样地。土壤生物调查样点电子围栏为土壤剖面调查点所在的二普县级土壤图图斑边界（大部分是土种图斑，部分为土属图斑）。样地范围可在包含土壤剖面点的土种图斑边界内调整。

每个土壤生物调查样地面积原则上应大于 1 hm²。在平原区地形地貌简单、土种分布面积较大的地区，可按 100 m×100 m 正方形确定；在山区、湿地、梯田等地形地貌复杂、土种面积分布较小的地区，可根据具体土种、地块形状与面积适当调整样地面积与形状，例如丘陵山区狭长地带，可以采用 50 m×200 m 等长方形在相同地形部位确定样地，保证样地中土种类型的一致性。土壤生物调查样地原则上选择面积较大、作物类型相同的完整地块，避免破碎田块以及水产养殖塘、道路等非调查的土地利用方式。

填报土壤样地信息。在土壤生物调查信息平台中核实或输入调查样点的样点编码，地理坐标、海拔、行政区划、采样日期、天气情况、调查人及其所属单位等信息。以上均为必填项。除天气状况、农药肥料翻耕信息、调查人、调查机构需现场选择填报外，其他项均已统一赋值，野外进行核定。

(1) 样点编码。

统一编码，已经赋值，以下所有工作流程均使用同一编码。

(2) 行政区划。

依据“省（区、市）—市—区（县）—乡（镇）—建制村”顺序，记录采样点所在地。代码按照 ISO 3166-2: 2007（最新版）规定执行。每个样点已经赋值，野外核查无误。

(3) 地理坐标、全景照片。

顺时针依次输入正方形或长方形样地的 4 个直角点经纬度坐标。坐标参照国家网格参考系统（CGCS 2000 国家大地坐标系），经纬度格式采用“十进制”，单位：度（°）。样地每个直角点确定位置后，由手持设备自动采集坐标信息和赋值。

在第一直角点面向样地方向用手持 App 或者数码相机等拍摄包含地块、农作物、天空的样地全景照片，种植玉米等高秆作物时可借助拍摄杆等装置拍摄，并上传土壤生物调查信息系统平台。

(4) 海拔。

每个样点确定位置后，由手持设备自动采集和赋值。单位：m。

(5) 日期。

采用“20××年××月××日”格式，如“2022 年 08 月 05 日”，自动赋值。

(6) 天气状况。

从“雨、雨夹雪或冰雹、雪、雨雪冰雹后 24 h 内晴或多云、雨雪冰雹后 24 h 内阴、雨雪冰雹后 48 h 内晴或多云、雨雪冰雹后 48 h 内阴、雨雪冰雹后 72 h 内晴或多云、雨雪冰雹后 72 h 内阴、连续阴 72 h 以上、连续晴 72 h 以上”选项中选择。

(7) 农药肥料翻耕信息。

现场询问农户，从“近 3 天内是否施用农药”选择“是”或者“否”，选“是”进一步填写农药名称；从“近 3 天内是否施用肥料”选择“是”或者“否”，选“是”进一步选择从“固体化肥、水溶性化肥、固体有机无机复混肥、水溶性有机无机复混肥、商品有机肥、土杂肥、厩肥、水溶性有机肥”中选择，并注明施用方式 [沟施、穴施、撒施、喷施、管道滴施、其他（需注明）]；从“近 3 天内是否翻耕”选择“是”或者“否”。

(8) 调查人。

填写现场技术领队姓名及所属单位，调查人由系统提供现场选择。

(9) 调查机构。

填写调查任务承担机构全称，调查机构由系统提供现场选择。

5.4 土壤生物样品采集

选定土壤生物调查样地后，根据样地的地形、土壤条件划分为3个条件相对一致的采样区块（图2），采用分区随机采样法采集土壤生物样品。

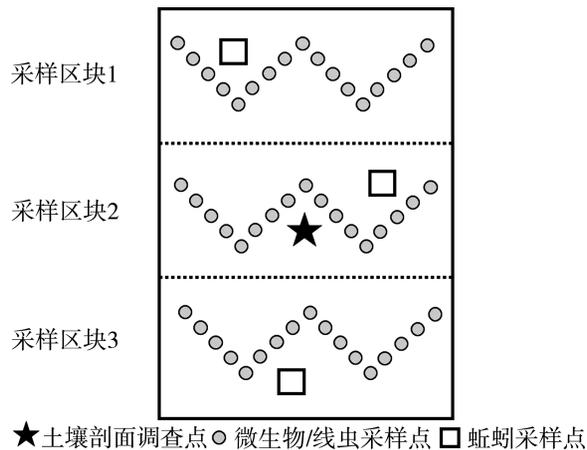


图2 土壤生物调查样地采样分区与采样点布设

5.4.1 土壤微生物和线虫的土钻法采样

果园和林地去除地面植被和枯枝落叶，具体采样位置设在树冠边缘垂直下方；农田去除表面杂物，垄作农田土壤，采集垄上（种植作物条带上）非根际土。在每个采样区块内，利用直径50 mm的不锈钢土钻随机采集15个0~20 cm土层的土壤样品，按四分法混合成1个土壤微生物样品和1个线虫样品，样品重量不够可适当增加采样点数。每个样地分别采集3个微生物混合样和3个线虫混合样作为重复。针对包含多块地块、种植不同作物类型的样地，每个重复样的多点混合采样点应选择在同一地块、具有相同的作物类型，3个重复样也应尽可能选择相同或相似的作物类型。

5.4.1.1 好气状态下土壤样品的采集

(1) 先去除土壤上面的任何覆盖物，包括植物、苔藓、可见根系、凋落物，以及可见的土壤动物等。

(2) 每个采样点的取土深度及重量应均匀一致，土样上层和下层的比例也要相同。采样铲或筒形取样器应垂直于地面，入土至规定的深度；斜插或入土角度不同，有可能使各样点的取土深度不够一致。

(3) 用于土壤微生物分析和土壤线虫分离鉴定的每个混合样品分别以1 000 g左右为宜。

(4) 采集的样品量过多时，可用四分法将多余的土壤弃去。四分法是将采集的土样放在盘子里或塑料布上，掰碎、混匀，铺成四方形，划对角线将土样分成四等份；把对角的两份分别合并成一份，保留一份，弃去一份。如果所得的土样仍然很多，可多次重复使用四分法缩分，直至所需重量。

(5) 样品采集后立即装4℃冷藏箱或者冰袋中保存，尽快以低温鲜样运输方式邮寄回实验室分析。

5.4.1.2 淹水或潮湿的稻田和湿地土壤样品采集

(1) 若土壤已被排干或自然水位在地表以下，则上部土层的样品按好气状态下土壤样品相同的方式采取。

(2) 把淹水状态下采集的表层土样排在塑料布上，经核对后立即装入塑料袋，以手揉搓样袋排

出空气，扎紧袋口，系上标签；再套上另一个塑料袋，扎紧袋口，系上另一份相同的标签。

(3) 采集水稻土或湿地等烂泥土样时，四分法难以应用，可改为在塑料盆（桶）中用塑料棒将样品搅匀，取出所需数量的土样。

采样点位应选在被采土壤类型特征明显的地方，地形相对平坦、稳定、植被良好；坡脚、洼地等具有从属景观特征的地点不设采样点；城镇、住宅、围墙、道路、沟渠、田埂、粪坑、堆肥点、坟墓附近等处人为干扰大，可能导致土壤性状变化，使土壤失去代表性，不宜设采样点；采样点离铁路、公路至少 300 m；不在水土流失严重或表土被破坏处设采样点。

5.4.2 土壤中蚯蚓的手拣法采样

在每个采样区块随机选择 1 个 1.0 m×1.0 m 的样方，利用手拣法采集 0~30 cm 土层中的所有蚯蚓，以深层种为主要生态型的地块可根据需要适当增加调查深度，并记录调查深度。每个样地采集 3 个蚯蚓混合样作为 3 个重复。蚯蚓的 3 个重复样方应尽可能选择相同或相似的自然条件与作物类型。野外采集的蚯蚓当天必须进行脱水固定，并妥善保存与寄回中转站。

5.4.2.1 蚯蚓样品采集

(1) 在每个采样区域内利用样方框随机设置 1 个蚯蚓样方，用固定钉固定，样方面积为 100 cm×100 cm、深度为 30 cm。

(2) 去除样方内土壤表面的覆盖物，如植物、凋落物、秸秆，发现的蚯蚓放入样品袋。

(3) 用铁锹挖出样方内的所有土壤，将土壤置于平铺的塑料布上，手工就地分拣蚯蚓，拣过的土壤应单独放置，不要与未拣过的土壤混合。将拣到的蚯蚓放入样品袋中，样品袋内放入 1/5~1/4 容积的土壤以保持蚯蚓活性，土量以肉眼看不到蚯蚓活体为准，采样时截断的蚯蚓保留蚯蚓头部分，尾部弃去。

(4) 样方应严格遵循样方容积，边缘部分保持垂直，边缘可用小型锄/铲/锹修整，修整时小心不要截断蚯蚓，样方边缘的蚯蚓需装入样品袋内。

(5) 每个样方内采集到的所有蚯蚓装入一个样品袋，每个挖掘完成的样方必须拍照上传，照片范围内要有完整的样方框和固定钉、拣完蚯蚓的浮土，以及采样工具。一个样点 3 个采样分区共采集 3 个蚯蚓样品袋。

(6) 每一个样点或样地的 3 个野外样品袋在采样结束后，应安排专人逐项检查 App 采样记录、样品袋标签和蚯蚓样品，如有缺项和错误，及时补齐更正，检查完的 3 个样品袋与同点采集的 3 个土壤微生物、3 个土壤线虫样品整齐摆放在样地边的空地，拍摄照片并上传，照片中样本袋编号应清晰可见，标签要能够区分同一样点的不同处理。

(7) 所采蚯蚓样品带回室内，当天完成对蚯蚓样品的脱水固定工作。

(8) 其他注意事项。①为了尽可能采得性发育成熟标本，采样应选择春、夏季进行，同时考虑温度和降雨等气象条件，最好在雨后采集。避开高温、大雨、干旱等时期采样，减少深耕、施肥、喷药、灌水等人为措施的影响。②对于水稻田，以避开水稻灌水期为原则。如样地落在淹水稻田等土壤水分饱和的田块时，可选择在样地内田埂、沟渠等地段布置样方。③对于林地，由于根系影响采样，可以适当扩大采样样方的面积和采样深度，记录实地采样的方式。

5.4.2.2 蚯蚓样品的脱水固定

野外采集的蚯蚓当天必须进行脱水固定，可在晚上进行。每个样品袋中的蚯蚓固定步骤如下。

(1) 蚯蚓清洗与计量。从样品袋中取出当天所有蚯蚓，用纯净水或自来水清洗干净，吸水纸吸干后计数、称总鲜重，每个样方内的蚯蚓数与总鲜重需在 App 中填报上传，然后将蚯蚓放入麻醉盒。

(2) 蚯蚓麻醉。麻醉盒中装载 1/3 容积 10%酒精溶液，放入蚯蚓浸泡，直至 5~10 min 蚯蚓不再扭动，移入脱水盒。

(3) 蚯蚓脱水。脱水盒中装载 1/3 容积 95%以上的纯酒精，放入麻醉充分的蚯蚓进行脱水，脱水过程中随时捋直蚓体，直至 10~15 min 蚯蚓变硬变直固定。

(4) 拍照上传。所有的蚯蚓排放在 1 张 A4 纸上并拍照上传，样品标签应清晰可见。

(5) 每个样品袋的蚯蚓同上述步骤分别处理。

5.4.2.3 蚯蚓样品的保存、标记与运输

每个样品袋中脱水固定完的蚯蚓采用如下步骤保存、标记与邮寄。

(1) 蚯蚓保存与标记。脱水固定后的蚯蚓放入注满浓度 95% 以上酒精的容器，如可密闭离心管中保存，每个样品袋中的蚯蚓放入一个容器，容器外面贴上打印的样本标签。容器中的酒精应每天更换，直至清澈为止。

(2) 蚯蚓样品邮寄。保存在容器中的蚯蚓，7~10 天后倒去酒精溶液，可以放在容器中直接邮寄。邮寄时再一次核对样品数量，一次邮寄的所有容器摆放整齐并拍照上传，照片中要有包装盒和邮寄地址，邮寄地址应为样品中转站，App 填写外业调查队伍中寄样人的基本信息、寄送样品清单或表、寄样日期等。

5.4.3 根据微地形调整采样区块形状与深度

土壤生物样品采集过程中如遇到垄作等微地形情形，应选择地表相对一致、生物活跃的采样区块，条件不能满足时可适当调整采样区块形状与深度，尽可能满足土壤生物样品采集面积与深度的要求。

5.4.4 土壤生物调查外业质控

土壤生物调查队伍在采样过程中，每个采样区块分别拍摄一张包含采样人、采样工具的土壤微生物和线虫采样工作照片，一张挖掘完成的蚯蚓样方（含采样工具和捡完蚯蚓的土壤）照片，并在 App 上传。完成所有采样工作后，将土壤微生物样品袋、线虫样品袋、蚯蚓样品袋整齐摆放在样地边空地，拍摄照片并上传，照片中样本袋标签应清晰可见，标签要能够区分同一样地不同重复的样品。

5.5 土壤生物调查人员组成和调查时间选择

土壤生物调查在全国 8 个区域分区开展采样。每个区域根据调查样点数量，组织 3~5 支外业调查队伍。每队由 3~5 名具备丰富野外采样工作经验的人员组成，包括土壤微生物调查专业人员 1~2 名、土壤动物调查专业人员 1~3 名，至少 1 人具有高级职称，其中 1 人担任队长。

土壤生物调查的野外采样时期原则上选择在植物生长旺盛期以及土壤动物性发育成熟期，代表土壤生物多样性和功能最高的时期。在耕地利用方式下，可以选择在作物生长旺盛期采样，在多季作物轮作下可以选择在夏粮收获期采样（表 1）。

表 1 全国不同区域土壤生物调查采样时期

区域	采样时期
东北区	6—8 月
华北区、西北区	6—9 月
青藏区	7—8 月
华中区、华东区、华南区、西南区	4—7 月

土壤生物调查应避免导致土壤生物群落显著变化的环境和管理条件。在实施野外采样时，根据区域天气和农业管理条件的变化，避开降雨等天气以及施肥和灌溉等管理时期。

土壤生物调查与土壤剖面调查共点进行。土壤剖面调查获得的立地条件与生产利用状况等背景数据，以及土壤剖面表层样品理化分析数据与土壤生物调查数据共同建立土壤数据库，共同开展土壤质量、土壤多样性和土壤生物健康评价。

5.6 土壤生物样品中转站建设管理

5.6.1 中转站建设

中转站应具备收集、处理、储存土壤微生物和线虫、蚯蚓样品的设施，包括水电齐全的土壤生物

样品储备间和土壤生物样品处理工作间，配备相关设备，包括 4℃ 低温冷藏箱、-80℃ 超低温冰箱等储存设备，土壤生物 DNA 提取设备、土壤线虫和动物形态学观察与鉴定设备等样品处理设备，以及进行样品编码的计算机和打印设备等。

5.6.2 土壤生物调查样品制备

样品中转站集成了标准化收集、处理、储存和分配土壤微生物、线虫和蚯蚓样本等功能。中转站样品库分别配有专人负责，具体分工如下。①样品接收组：样品中转站指定专人负责样品接受确认，重点检查样品标签、样品状况、样品类型、样品数量、样品包装等，发现样品遗缺、破损、信息不全等应及时上报并处理，样品无误后在 App 中确认收样。②加工处理组：负责接收入库生物样品，核对样品类别和数量，并根据样品种类与研究需求进行分装和处理、分析样品分发等。③冻存管理组：负责样品的出入库管理、追踪核实样本库存情况与质量检测控制等工作。具体的处理人、分派人、保管人均应在 App 中签收确认，App 中应能反映出分析样、留存样、标本样的具体分派人。

样品加工处理组应在收到土壤微生物、线虫和蚯蚓样本 1 周内，进行样本入库、编码和保存，开展土壤微生物样品的分析与 DNA 的提取，线虫样品的分离、制片与 DNA 的提取，以及蚯蚓样品的形态学鉴定、线粒体组 DNA 的提取与标本的制作，完成样品分析的派送工作。土壤生物样品短期保存于 4℃ 冰箱。提取的微生物和线虫基因组 DNA、蚯蚓线粒体 DNA 加入甘油保存在冻存管中，储存于 -80℃ 超低温冰箱，避免反复冻融，提高样本中 DNA 的稳定性。冻存管上标记二维码信息，方便信息提取和快速查询。

5.7 土壤生物调查样品分析测试单位选择

土壤生物调查样品分析单位应具有符合国家与行业相关分析要求，并且在相关行业内具有较好的口碑；具有独立承担民事责任的能力；具有良好的商业信誉和健全的财务会计制度；具有履行合同所必需的设备和专业技术能力；生物测序公司需获得如下高通量测序行业认证资质证书并从事相关业务 3 年以上。

5.7.1 认证资质

(1) 行业资质认证：ISO 9001 质量管理体系认证证书、PacBio 官方认证测序服务商证书，Illumina 官方认证测序服务商证书等。

(2) 国家资质认证：中国计量认证（CMA）证书和中国合格评定国家认可委员会认证（CNAS）证书。

5.7.2 分析技术与设备要求

(1) 分析技术：具有进行土壤微生物和动物样本保存和种群鉴定，或者基因高通量测序和分析的技术能力。

(2) 设备要求：应配备有支撑土壤生物调查所需的专业设备，包括样本保藏室、生物培养室、第二代高通量基因测序平台（如 Illumina HiSeq、MiSeq）、体视显微镜等。

(3) 数据分析软件与处理要求：土壤微生物、线虫、蚯蚓基因测序数据分析软件、比对数据库、处理软件应具备行业内公认的权威性。如测序分析软件 QIIME、Uclust、Mothur、Chromas 等，比对数据库 Silva、NCBI、NGDC 等，处理软件 OriginLab 等。

6 土壤生物调查和评价指标体系与分析方法

6.1 土壤生物评价指标体系

依据土壤生物评价多功能性指标的重要性和代表性，将评价指标分为 3 个层次。第一层包括土壤微生物生物量、土壤微生物活性、土壤微生物组成和多样性、土壤生物功能多样性、土壤动物群落组成和多样性。第二层基于其功能分为相互独立的指标群。第三层包括在一定功能类群下的核心指标和

补充指标（表2）。在省域尺度及以下开展土壤普查时，需要基于土壤生物调查目标选择生物学指标，如开展基于土种样点采样的土壤生物详查指标可选择核心生物学指标进行调查，而开展基于网格布点的表层土壤生物多样性普查可以选择土壤微生物生物量碳、土壤呼吸强度、细菌和真菌 Alpha 多样性进行调查。

表2 土壤质量和土壤健康生物学调查和评价指标体系

第一层	第二层	第三层核心指标	第三层补充指标
土壤微生物生物量	土壤微生物生物量	土壤微生物生物量碳	
	土壤微生物绝对丰度 (荧光定量 PCR)	<ul style="list-style-type: none"> • 细菌绝对丰度 • 真菌绝对丰度 • 古菌绝对丰度 	<ul style="list-style-type: none"> • 固碳菌绝对丰度 • 固氮菌 DNA • 丛枝菌根菌 DNA
土壤微生物活性	土壤呼吸强度	葡萄糖底物诱导呼吸强度	呼吸熵
	土壤典型碳、氮、磷 转化酶活性	<ul style="list-style-type: none"> • 碳：β-D-葡萄糖苷酶活性 • 氮：脲酶活性 • 磷：磷酸酶活性 	<ul style="list-style-type: none"> • 碳：多酚氧化酶活性 • 氮：硝酸还原酶活性、氨单加氧酶活性
土壤微生物组成和多样性	第二代高通量测序土壤微生物群落组成物种组成和多样性	<ul style="list-style-type: none"> • 细菌、真菌、古菌群落组成 • 细菌、真菌、古菌 Alpha 多样性 (Shannon 指数、Chao1 指数、Eveness 指数) 	<ul style="list-style-type: none"> • 细菌、真菌、古菌群落 Beta 多样性 (基于 Bray-Curtis 的非度量多维尺度分析 NMDS 以及 PCA 分析) • 优势功能微生物 (纤维素分解菌、固氮细菌、青枯菌、尖孢镰刀菌) 组成
土壤生物功能多样性	功能基因组学测序土壤微生物功能多样性	土壤养分循环功能基因 Alpha 多样性 (Shannon 指数、Chao1 指数、Eveness 指数)	<ul style="list-style-type: none"> • 土壤养分循环功能基因 Beta 多样性 (基于 Bray-Curtis 的 NMDS, PCA) • 土壤耐逆 (盐碱、酸、旱等逆境) 功能基因相对丰度 • 土壤益生菌 (乳杆菌 <i>Lactobacillus</i>) 和病毒基因相对丰度
土壤动物群落组成和多样性	线虫密度、群落组成和多样性	<ul style="list-style-type: none"> • 线虫密度 • 形态学鉴定线虫群落组成 (植食性线虫、食细菌线虫、食真菌线虫、捕食类线虫、杂食性线虫) 	分子生物学鉴定线虫群落组成
	蚯蚓生物量、群落组成和多样性	<ul style="list-style-type: none"> • 蚯蚓生物量 • 蚯蚓形态学鉴定群落组成 (表生型蚯蚓、内生型蚯蚓、深栖型蚯蚓) 	分子生物学鉴定蚯蚓群落组成

6.2 土壤微生物生物量

氯仿熏蒸提取—重铬酸钾法/碳光谱分析法。见附录 1。

6.3 土壤细菌、真菌、古菌和重要碳氮磷功能基因丰度

实时荧光定量 PCR 法。见附录 2。

6.4 土壤呼吸强度

葡萄糖底物诱导呼吸法。见附录 3。

6.5 土壤酶活性

(1) 4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖苷荧光底物法测定土壤 β-D-葡萄糖苷酶活性。

- (2) 左旋多巴比色法测定土壤多酚氧化酶活性。
 - (3) 尿素底物比色法测定土壤脲酶活性。
 - (4) 对氨基苯磺酸化比色法测定土壤硝酸还原酶活性。
 - (5) 夹心酶联免疫吸附法测定土壤氨单加氧酶活性。
 - (6) 4-甲基伞形酮-磷酸酯荧光底物法测定土壤磷酸酶活性。
- 以上酶活性测定详见附录 4。

6.6 土壤微生物群落组成

高通量测序方法详见附录 5。

6.7 土壤优势功能微生物分离培养及鉴定

纤维素培养基培养纤维素分解菌，YEM 培养基培养固氮细菌，SAMA 培养基培养青枯菌，Komada 培养基培养尖孢镰刀菌及第二代测序鉴定法详见附录 6。

6.8 土壤功能基因组

基因组第二代测序法详见附录 7。

6.9 土壤线虫群落分析

贝尔曼漏斗分离法、光学显微镜下的线虫鉴定法和线虫测序鉴定法详见附录 8。

6.10 蚯蚓群落分析

- (1) 蚯蚓形态学鉴定法。见附录 9。
- (2) 蚯蚓线粒体基因测序鉴定法。见附录 9。

7 土壤生物调查质量控制

7.1 建立土壤生物调查质量控制体系

建立专家组对土壤生物样品采集、指标分析、数据产生、上报和入库过程进行数据检验和数据质量控制。为了保证土壤生物调查数据的整体质量，需要在数据生产的各个环节开展数据质量控制。包括土壤生物采样、土壤样品分析、数据处理和上报。在国务院第三次全国土壤普查领导小组办公室统一领导下，协同土壤三普专家技术指导组，包括顶层设计组、平台技术组、外业技术组、内业技术组，成立土壤生物调查质量控制专家小组，从样品采集、样品制备、分析测试、数据检验、数据上报、数据入库等全过程进行质量控制。保证土壤生物调查数据和分析资料具有代表性、准确性、精密性、可比性和完整性。

7.2 土壤生物采样过程质量控制

在采集过程中检查调查样点的代表性和准确性、调查数据的完整性和可靠性。为保证土壤生物调查的准确性，在布设样点时按区域样点数的 5% 增设质量控制样点。

7.3 分析测试单位质量控制

加强分析检测人员技术和责任心培训，控制分析差错。在分析数据上报过程中检查实验室内精密性、准确度和实验室间精密性、准确度，以及数据的完整性和区域可比性，以保证生物分析数据的准确可靠性。

7.4 土壤生物样品分析过程中系统误差、随机误差和差错控制

校正仪器和量具，控制试剂质量，选用合适的分析方法以及对照试验，控制系统误差。进行10%~15%平行双样分析，控制精密度。设置土壤生物调查质控样品，督查分析单位的分析质量，控制准确度。见附录10。

7.5 土壤生物数据质量控制

分析过程中数据质量控制包括平行样数据录入、缺失和低于检测限数据录入、有效数字计算修约。分析数据上报前的检验包括范围和逻辑检查、完整性检查、一致性和有效性检查。分析数据上报后对可疑数据开展系统误差、过失错误分析，对离群数据（可疑数据）采用统计学方法判别。见附录11。

8 土壤质量和土壤健康的生物学综合评价

- (1) 建立土壤质量和土壤健康评价数据库。
- (2) 建立土壤生物学最小评价指标集和方程，开展土壤生物学评价。
- (3) 集成土壤生物学、土壤物理和土壤化学综合指数，综合评价土壤质量和土壤健康。
- (4) 提出土壤质量和土壤健康管理的对策报告。基于土壤生物和土壤剖面的共点调查数据库，土壤健康的单因子、复合因子和综合因子评价，采用地理信息系统软件绘制土壤质量和土壤健康评价图，提出土壤质量和土壤健康的生物学调控对策，撰写评价报告。评价方法见附录12。

9 土壤生物调查成果管理

9.1 建立土壤生物调查数据库

基于土壤三普技术规范，在全国农业技术推广服务中心《耕地地力调查与质量评价技术规程》（NY/T 1634—2008）、《县域耕地资源管理信息系统数据字典》基础上，完善土壤生物调查数据标准。按土壤三普数据库规范建立物理隔离的全国土壤生物调查数据库，包括空间数据、属性数据、相关参数、模型等。调查数据管理方法见附录13。

9.2 开展土壤生物调查数据分析与评价，提交土壤生物调查报告

组织土壤生物调查数据分析和评价专家组，撰写土壤生物调查总结报告、土壤质量和土壤健康评价报告及管理对策报告，提交国务院第三次全国土壤普查领导小组办公室。

附录 1 土壤微生物生物量的测定——熏蒸提取法

1.1 意义范围和质控

熏蒸法测定的土壤微生物生物量指土壤中活体微生物细胞的含量，这一指标可以测定细胞中的碳、氮、磷含量，计算微生物细胞内元素的化学计量比，并估算土壤微生物对土壤或添加外源有机物料的矿化能力。熏蒸提取法（FE）适用土壤 pH 范围较广的好氧和厌氧（淹水、稻田）土壤。本方法也适用于包含易分解有机底物和硫酸钾溶液过饱和土壤生物量的测定。氯仿熏蒸也影响土壤动物，但其对土壤有机碳贡献一般小于 5%，通常可以忽略不计。调动土壤普查管理平台系统，对数据进行审查备案。随机抽取同一批样品的 1%~5% 进行检查。采用技术规程规定的方法，对指标进行复核。

1.2 规范性引用文件

GB/T 32725—2016《实验室测定微生物过程、生物量与多样性用土壤的好氧采集、处理及贮存指南》

ISO 10694: 1995 土壤质量 干烧后对有机碳和总碳的测定（元素分析法）[ISO 10694: 1995, Soil quality—Determination of organic and total carbon after dry combustion (elementary analysis)]

ISO 11465: 1993 土壤质量 土壤的干重和水含量的测定 重量法（ISO 11465: 1993, Soil quality—Determination of dry matter and water content on a mass basis—Gravimetric method）

1.3 术语和定义

土壤微生物生物量（soil microbial biomass）：土壤中活体微生物细胞的质量。这一指标可通过测定这些细胞中碳或氮的含量，或者测定对添加碳源矿化能力来估算。如采用碳或氮含量分析，则可能包括死细胞或者细胞碎片；如测定土壤呼吸，则仅能测到活体细胞。

1.4 原理

新鲜土壤经氯仿熏蒸后，活体微生物细胞被裂解，释放出微生物有机质。熏蒸对非活体的土壤有机质无显著影响。土样经氯仿熏蒸 24 h，土壤有机碳能够被 0.5 mol/L K_2SO_4 溶液定量提取并被测定出来，根据熏蒸土样与不熏蒸土样测定的有机碳的差值，可以估计土壤微生物生物量碳。本方法通常被定义为熏蒸提取法。

1.5 试剂和材料

1.5.1 土壤

土样应遵守《实验室测定微生物过程、生物量与多样性用土壤的好氧采集、处理及贮存指南》（GB/T 32725—2016）。土样过筛（孔径 <2 mm）并混匀，在室内适当风干至土样含水量约为田间持水量的 40%（根据不同土壤质地，为含水量的 8%~15%，砂土含水量相对较低）。

土壤田间持水量测定：用滤纸覆盖底部带孔的圆筒，圆筒长 50~150 mm，直径 50~100 mm，并称重。将土壤填到圆筒中，并加盖。室温下，在水浴中浸泡圆筒 2h 后，从水中取出圆筒放置在有砂子的托盘中，根据土壤类型的差异沥干 2~24 h。称带土的圆筒重，取出土，并将其在 105 °C 烘干至恒重，称烘干土重。

田间持水量（WHC）的计算，用%表达，计算如下：

$$\text{WHC} = \frac{S - T - D}{D} \times 100 \quad (1-1)$$

式中， S ——水饱和土壤+圆筒+滤纸的重，单位 g；

T ——毛重，即圆筒+滤纸的重量，单位 g；

D ——土壤烘干重，单位 g。

土壤样本的含水量宜高于 30% 田间持水量，为确保氯仿均匀分布和有效熏蒸。本方法特别注意潮湿土壤的板结。淹水的土壤样品在分析之前不必进行干燥处理。

1.5.2 试剂

应使用公认的分析纯试剂，具体如下。

(1) 硅脂（中等黏度）。

(2) 去乙醇氯仿。在光照下，去乙醇氯仿迅速降解，形成碳酰氯（ COCl_2 ）气体，具有无色无味和高毒性。

(3) 硫酸钾溶液， $c(\text{K}_2\text{SO}_4) = 0.5 \text{ mol/L}$ （ $\rho = 87.135 \text{ g/L}$ ）。

(4) 碱石灰。

1.6 仪器

(1) 室温， $(25 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ 培养（恒温培养箱）。

(2) 防爆干燥机。

(3) 滤纸。

(4) 玻璃烧杯。

(5) 有盖培养皿。

(6) 塑料瓶（250 mL）。

(7) 抽真空装置（水泵或电泵）。

(8) 水平或架空摇床。

(9) 冰箱 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 到 $15 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

(10) 防爆沸颗粒。

1.7 熏蒸和提取

1.7.1 熏蒸

将干燥器底部平铺湿润滤纸后再进行土样的熏蒸。

称取经前处理（1.5.1）相当于 $25 \sim 50.0 \text{ g}$ 烘干基的新鲜土样 3 份，置于玻璃烧杯 [1.6 节 (4)] 或有盖培养皿 [1.6 节 (5)] 中。将烧杯或培养皿放入真空干燥器中，并放置盛有 25 mL 去乙醇氯仿 [1.5.2 节 (2)] 的烧杯 1 只，烧杯内放入少量防爆沸的颗粒 [1.6 节 (10)]，同时放入一小烧杯碱石灰溶液。抽真空使氯仿剧烈沸腾约 2 min。关闭干燥器抽真空阀门，将其在 $(25 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ 暗室培养 22~24 h。

如果没有足够的土壤，使用较小的样品规模提供土壤与提取剂的比例保持不变（土水比为 1:4，质量体积比）。为获得最大的提取物质，土壤有机质含量超过 20% 时（有机质含量的测定见 ISO 10694）增加土壤与提取液的比例（当土壤有机质含量超过 95% 时，最大比例是 1:30，例如土壤的枯枝落叶层）。记录使用土壤的质量。

熏蒸结束后，从干燥器中取出含氯仿的烧杯和滤纸。干燥器反复抽真空（6 次，每次 2 min）直到土壤无氯仿味为止。熏蒸好的土壤以备提取用。

另称取不熏蒸土样（ 50.0 g 烘干基的新鲜）3 份，置于塑料瓶作为对照土样。立即用 200 mL 的 K_2SO_4 [1.5.2 节 (3)] 进行提取。

1.7.2 提取

为提取有机碳，将熏蒸土样无损地转移到聚乙烯塑料瓶（6.6）中，加入 200 mL K_2SO_4 [1.5.2 节（3）]，用水平振荡器 [1.6 节（8）] 振荡 30 min（200 r/min），或用立式振荡器振荡 45 min（60 r/min），提取液用滤纸 [1.6 节（3）] 过滤到塑料瓶中。未熏蒸的对照土壤用同样的方法提取和过滤。

若未即时分析，将熏蒸和未熏蒸的土样在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 到 $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中保存。取样分析前在室温下解冻并充分摇匀。

土壤提取液特别是低温下保存的土壤提取液，解冻后会出现一些白色沉淀（ $CaSO_4$ 结晶），对有机碳测定没有影响，不必除去，但取样前应充分摇匀。

幼嫩活根的细胞膜也会影响氯仿熏蒸的效果。若土壤中含有大量活根，取湿土（相当于 25~50 g 干土）到 250 mL 玻璃瓶中，用 100 mL 硫酸钾溶液 [$c(K_2SO_4) = 0.05\text{ mol/L}$]，以 200 r/min 振荡预提取 20 min 后过筛（耕作土过 2 mm 的孔，草地土过 3 mm 的孔）。另外添加 75 mL 的硫酸钾溶液仔细筛洗根和小石头，当土壤中完全无根和石头时烘干和称重。离心土壤悬浮液 15 min，转速大约为 1 500 r/min。倒掉上清液，在土壤中加入 3 滴氯仿进行熏蒸。

1.8 提取物中碳的测定

土样中微生物有机碳含量可被分析测定，也可以进行土壤样本之间的比较。微生物生物量的确定需要乘以转换系数，此系数是通过添加已知碳含量的微生物细胞后进行熏蒸提取分析，然后换算而得。所有的转换系数都与这个初始数值相关。碳含量的测定使用重铬酸钾氧化—容量法（1.8.1）或仪器分析法（1.8.2）。

1.8.1 微生物生物量碳——重铬酸钾氧化法

1.8.1.1 原理

强酸条件下，有机质被氧化同时 Cr^{5+} 被还原为 Cr^{3+} ，剩余的重铬酸钾用来滴定，利用所消耗的重铬酸钾量，计算碳的含量。

1.8.1.2 附加试剂

（1）重铬酸钾， $c(K_2Cr_2O_7) = 0.0667\text{ mol/L}$ （1L 水中溶解 19.6125 g 烘干的重铬酸钾）。重铬酸钾是一种有毒物质，使用和最终处置时应当十分谨慎。

（2）磷酸（ H_3PO_4 ）， $\rho = 1.71\text{ g/L}$ 。

（3）硫酸（ H_2SO_4 ）， $\rho = 1.84\text{ g/L}$ 。

（4）硫酸亚铁铵滴定液， $c[(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O] = 0.040\text{ mol/L}$ 。15.69 g 硫酸亚铁铵溶于去离子水，缓缓加入 20 mL 浓硫酸（3），用去离子水定容至 1 000 mL。

（5）1,10-邻菲咯啉硫酸混合液，0.025 mol/L。

（6）酸混合液：2 倍体积的浓硫酸（3）与 1 倍体积的磷酸（2）混合。

1.8.1.3 附加仪器

（1）李比希式冷凝器（冷凝水）。

（2）250 mL 圆底烧瓶。

（3）酸式滴定管，10 mL，以 0.05 mL 刻度标记。

（4）吸管，2 mL。

1.8.1.4 程序

吸收 8 mL 的过滤提取液（1.7.1）（ P_s ）于圆底烧瓶 [1.8.1.3 节（2）] 中，用吸管 [1.8.1.3 节（4）] 加入 2 mL 的重铬酸钾 [1.8.1.2 节（1）]（ P_D ）和 15 mL 的酸混合液 [1.8.1.2 节（6）]。通过冷凝器 [1.8.1.3 节（1）] 轻轻地回流混合液 30 min，用 20 到 25 mL 水冲洗来使其冷却和稀释。

用同样的方法消化含 8 mL 的硫酸钾溶液 [1.5.2 节 (3)] 的重复空白样。消化的空白样也被称为“回流空白”。

加入几滴邻菲咯啉硫酸混合液 [1.8.1.2 节 (5)] 作为指示剂，用硫酸亚铁铵溶液 [1.8.1.2 节 (4)] 回滴 [1.8.1.3 节 (3)] 过剩的重铬酸钾来测定。

1.8.1.5 结果计算

有机碳含量的计算按照公式 (1-2) 和 (1-3)。

$$C(\mu\text{g/mL}) = [(V_H - V_S)/V_C] \times M \times P_D \times E \times 1000/P_S \quad (1-2)$$

式中， V_S ——样品消耗的滴定体积，单位 mL；

V_H ——回流空白消耗的滴定体积，单位 mL；

V_C ——未回流空白消耗的滴定体积，单位 mL；

M ——重铬酸钾的浓度，单位 mol/L；

P_D ——添加的重铬酸钾溶液的体积，单位 mL；

P_S ——添加的样本的体积，单位 mL；

E ——有机碳转换为 CO_2 的转换系数，取值 3。

$$C(\mu\text{g/g 干土}) = C(\mu\text{g/mL}) \times (P_K/D_W + S_W) \quad (1-3)$$

式中， P_K ——提取物的质量，单位 g；

D_W ——样本烘干重（按照 ISO 11465 的标准测定），单位 g；

S_W ——土壤水 [水重 (g) / 烘干土重 (g)]（按照 ISO 11465 的标准测定）。

微生物生物量碳 B_C 的计算按照公式 (1-4)。

$$B_C = E_C/k_{EC} \quad (1-4)$$

式中， E_C ——熏蒸土样提取有机碳的质量-不熏蒸土样提取有机质的质量；

k_{EC} ——0.38，由熏蒸培养法和熏蒸提取法分别测定 12 个土壤的关系计算而得。

1.8.2 微生物生物量碳——碳光谱分析法

1.8.2.1 原理

提取的土壤有机碳在过硫酸钾 ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) 溶液中能够氧化为 CO_2 ， CO_2 可以通过红外 (IR) 或紫外 (UV) 光谱分析测定。

1.8.2.2 附加试剂

(1) 过硫酸钾溶液 ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$)。

(2) 磷酸 (H_3PO_4) [见 1.8.1.2 节 (2)]。

(3) 聚合偏磷酸钠 [$(\text{NaPO}_3)_n$]，超级纯。

(4) 过硫酸钾试剂。将 20.0 g 过硫酸钾 [1.8.2.2 节 (1)] 溶于 900 mL 的去离子水，用磷酸 [1.8.2.2 节 (2)] 调节至 pH 2.0，最后用去离子水定容至 1 L。

(5) 聚合偏磷酸钠试剂。将 50.0 g 聚合偏磷酸钠 [1.8.2.2 节 (3)] 溶于 900 mL 去离子水，用磷酸 [1.8.2.2 节 (2)] 调节至 pH 2.0，最后用去离子水定容至 1 L。

1.8.2.3 附加仪器

碳自动分析仪（红外检测法）或连续流动分析仪（比色法检测）。目的是基于紫外活化过硫酸氧化有机碳测定微生物生物量碳。

1.8.2.4 程序

对于自动化的紫外过硫酸氧化方法，需取 5 mL 硫酸钾土壤提取液 (1.7.2 节) 与 5 mL 聚合偏磷酸钠溶液 [1.8.2.2 节 (5)] 混合。这个过程可以将土壤提取液中 CaSO_4 沉淀溶解。过硫酸钾试剂 [1.8.2.2 节 (4)] 被自动送入紫外氧化室，在这里由紫外光激活使有机碳氧化为 CO_2 ，通过红外线吸收光谱或紫外光谱测定 CO_2 的含量。

1.8.2.5 结果计算

计算提取土壤有机碳含量使用公式 (1-5)。

$$C(\mu\text{g/g 干土}) = [(V \times D_V) - (B \times D_B)] \times (P_K/D_W + S_W) \quad (1-5)$$

式中, V ——样本 C 浓度, 单位 $\mu\text{g/mL}$;

D_V ——磷酸钠稀释样本的体积, 单位 mL ;

B ——空白 C 浓度, 单位 $\mu\text{g/mL}$;

D_B ——磷酸钠稀释空白的体积, 单位 mL ;

P_K ——见公式 (1-3);

D_W ——见公式 (1-3);

S_W ——见公式 (1-3)。

计算生物量 B_C 使用公式 (1-6)。

$$B_C = E_C/k_{EC} \quad (1-6)$$

式中, E_C ——熏蒸土样提取的有机碳的质量-不熏蒸土样提取的有机质的质量;

k_{EC} ——0.45。

转换系数 k_{EC} 值, 是根据熏蒸培养与熏蒸提取法测定 23 种土壤微生物生物量碳的统计学回归关系间接获得的。它使熏蒸提取法结合使用的 ^{14}C 标记进行有机质的分解的研究成为可能。

1.9 不同实验室重复测试土壤微生物生物量的精度

以德国实验室为例, 其重复测试土壤微生物生物量的结果见表附录 1-1。

表附录 1-1 德国实验室重复测试土壤微生物生物量的结果——熏蒸提取法

参数	平均值/ ($\mu\text{g/g}$)	CV ^① /%	SE ^②
黄土			
未熏蒸样品提取的碳	71	21	6.7
熏蒸样品提取的碳	207	15	7.4
E_C ^③	136	23	9.2
黑土			
未熏蒸样品提取的碳	85	18	5.4
熏蒸样品提取的碳	265	11	7.1
E_C	180	15	8.6

注: ①CV 为变异系数; ②SE 为 4 个重复平均值的标准误; ③ E_C 为熏蒸土壤与未熏蒸土壤有机碳含量的差值。土壤微生物生物量的计算是 E_C 除以转换系数 k_{EC} 。

参考文献

GB/T 39228—2020. 土壤微生物生物量的测定熏蒸提取法 [S].

BROOKES P C, LANDMAN A, PRUDEN G, et al., 1985. D. S. Chloroform fumigation on the release and extractability of soil nitrogen; a rapid direct extraction method for measuring microbial biomass nitrogen in soil [J]. Soil Biol. Biochem., 17: 837-842.

HARDEN T, JOERGENSEN R G, MEYER B, et al., 1993. Mineralization of straw and formation of soil microbial biomass in a soil treated with simazine and dinoterb [J]. Soil Biol. Biochem., 25: 1273-1276.

HARDEN T, JOERGENSEN R G, MEYER B, et al., 1993. Soil microbial biomass estimated by fumigation-extraction and substrate-induced respiration in two pesticide-treated soils [J]. Soil

- Biol. Biochem., 25: 679-683.
- INUBUSHI K, BROOKES P C, JENKINSON D S, 1991. Soil microbial biomass C, N and ninhydrin-N in aerobic and anaerobic soils measured by the fumigation-extraction method [J]. Soil Biol. Biochem., 23: 737-741.
- ISO 10390: 1994. Soil quality-Determination of pH [S].
- ISO 11274: 2019. Soil quality-Determination of water-retention characteristics-Laboratory methods [S].
- MUELLER T, JOERGENSEN R G, MEYER B, 1992. Estimation of soil microbial biomass C in the presence of living roots by fumigation-extraction [J]. Soil Biol. Biochem., 24: 179-181.
- OCIO J A, BROOKES P C, 1990. An evaluation of methods for measuring the microbial biomass in soils following recent additions of wheat straw and the characterization of the biomass that develops [J]. Soil Biol. Biochem., 22: 685-694.
- SPARLING G P, FELTHAM C W, REYNOLDS J, et al., 1990. Estimation of soil microbial C by a fumigation-extraction method: use on soils of high organic matter content, and a reassessment of the K_{EC} -factor [J]. Soil Biol. Biochem., 22: 301-307.
- VANCE E D, BROOKES P C, JENKINSON D S, 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C [J]. Soil Biol. Biochem., 19: 703-707.
- WU J, BROOKES P C, JENKINSON D S, 1993. Formation and destruction of microbial biomass during the decomposition of glucose and ryegrass in soil [J]. Soil Biol. Biochem., 25: 1435-1441.
- WU J, JOERGENSEN R G, POMMERENING B R, et al., 1990. Measurement of soil microbial biomass C by fumigation-extraction: an automated procedure [J]. Soil Biol. Biochem., 22 (8): 1167-1169.

附录 2 土壤细菌、真菌、古菌和重要碳氮磷功能基因实时荧光定量 PCR 方法

2.1 意义、范围与质控

为调查全国不同土种中微生物不同种群 DNA 水平生物量, 比较养分转化微生物丰度水平, 需要对土壤细菌、真菌、古菌和碳氮磷功能基因实时荧光定量检测。此方法适用于土壤鲜样或存放于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的土壤样本。质控过程采取定量 Actin 报告基因作为标准内参及阴性对照进行质控, 保证上机测试结果准确性。

2.2 实验材料与仪器

2.2.1 实验材料

(1) *pEASY-T1* 克隆载体、DH5 α 感受态细胞、DNA 提取试剂盒、PCR 纯化试剂盒、质粒提取试剂盒、PCR 试剂盒、qPCR 试剂盒。

(2) LB 液体及平板培养基: 10 g/L 胰蛋白胨、10 g/L NaCl、5 g/L 酵母提取物、15 g/L 琼脂; 氨苄青霉素 (制备母液 100 mg/mL), 添加 100 μL 到 100 mL LB 培养基中。

(3) 96 孔板及膜、移液枪、枪头、2.5 mL 离心管、 ddH_2O 、2 \times Taq Master Mix、2 \times T5 Fast qPCR

Mix (SYBR Green I)。

2.2.2 实验仪器

荧光实时定量 PCR 仪、高速冷冻离心机、微量紫外分光光度计、旋涡仪、水浴锅、电泳仪、恒温培养箱。

2.3 方法原理

荧光实时定量 PCR (real-time quantitative PCR) 是一种在 DNA 扩增反应中, 以荧光化学物质测每次聚合酶链式反应 (PCR) 循环后产物总量的方法。在荧光定量 PCR 过程中最常用的方法是 DNA 结合染料 SYBR Green I 的非特异性方法和 Taqman 水解探针的特异性方法。前者 (SYBR Green I) 是一种结合于所有 dsDNA 双螺旋小沟区域的具有绿色激发波长的染料, 在游离状态下会发出微弱的荧光, 但一旦与双链 DNA 结合后, 荧光将大大增强。后者 (Taqman) 是利用 Taq 切核酸酶活性, 切断探针, 产生荧光信号。由于探针与模板是特异性结合, 所以荧光信号的强弱就代表了模板的数量。

绝对定量 RT-qPCR 利用荧光信号的变化实时检测 PCR 扩增反应中每一个循环扩增产物量的变化, 通过 CT 值和标准曲线实现对起始模板的定量分析。CT 值: 指的是实时定量扩增过程的荧光信号达到指数扩增时的循环次数。CT 值与起始模板的关系研究表明, 每个模板的 CT 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系, 起始拷贝数越多, CT 值越小 (Heid et al., 1996)。

2.4 土壤 DNA 提取与检测

2.4.1 土壤 DNA 提取

- (1) 向 Lysing Matrix E 中加入 400~450 mg 土壤样本。
- (2) 向土壤样本中加入 980 μ L Lysis Buffer S1、120 μ L Lysis Buffer S2 和 10 μ L RNase A Solution, 高速涡旋 15 s。
- (3) 使用 FastPrep 样品制备仪, 6.0 m/s, 研磨 20 s。
- (4) 14 000 g 离心 10 min, 保留上清液, 弃去沉淀。
- (5) 小心地将上清液转移至新的 2.0 mL 离心管。
- (6) 向离心管中加入 250 μ L Inhibitor Removal S, 颠倒混合 15 次。
- (7) 14 000 g 离心 10 min, 保留上清液, 弃去沉淀。
- (8) 小心地将 900 μ L 上清液转移至新的 2.0 mL 离心管。
- (9) 向离心管中加入 900 μ L Binding Buffer S, 高速涡旋 5s。
- (10) 将结合柱 Column S1 装入配套的 2.0 mL 收集管, 向 Column S1 中加入 800 μ L 上述混合液。14 000 g 离心 1 min, 倒掉收集管中液体, 再次安装好收集管。
- (11) 重复 2 次步骤 (10) (第三次不足 800 μ L, 有多少加多少)。
- (12) 向 Column S1 中加入 500 μ L Wash Buffer S, 14 000 g 离心 1 min, 倒掉收集管中的液体, 再次安装好收集管。
- (13) 重复一次步骤 (12)。
- (14) 不加任何试剂, 14 000 g, 离心 2 min。
- (15) 丢弃 2.0 mL 收集管, 将 Column S1 装入配套的 1.5 mL 收集管。
- (16) 将 Column S1 在室温条件干燥 15 min。
- (17) DES Buffer 提前置于 55 $^{\circ}$ C 预热。
- (18) 向 Column S1 柱膜中央加入 100 μ L 预热的 DES Buffer。
- (19) 14 000 g 离心 1 min。
- (20) 吸取管底的 DES, 重新加至 Column S1 柱膜中央, 14 000 g 离心 1 min。
- (21) 1.5 mL 收集管中液体即为洗脱 DNA。对核酸进行质量检测, 对于符合质量标准 ($1.8 < A_{260}/280 < 2.0$, $A_{260}/230 > 1.8$) 的 DNA 于 -20° C 冷冻保存。

2.4.2 土壤 DNA 质量检测

2.4.2.1 琼脂糖凝胶电泳

对提取的基因组 DNA 进行琼脂糖电泳检测。凝胶成像结果表明有完整的基因组条带，且无其他杂质的情况下判定为合格。

琼脂糖凝胶配置方法如下。

(1) 常用琼脂糖凝胶分别为 0.5%、1% 和 2% 的琼脂糖凝胶，凝胶浓度选择主要取决于目的片段的大小和电泳时间。

(2) 以制备 1% 琼脂糖凝胶（大胶用 100 mL，小胶用 70 mL）为例：称取 1 g（0.7 g）琼脂糖置于锥形瓶中，加入 100 mL（70 mL）1×TAE，瓶口倒扣小烧杯，微波炉加热（1 min）煮沸 2~3 次至琼脂糖全部融化，摇匀，即成 1.0% 琼脂糖凝胶液。

注意：2% 琼脂糖凝胶，以上述体系为例，即加入 2 g（1.4 g）琼脂糖及 100 mL（70 mL）1×TAE。

(3) 胶板制备：取电泳槽内的有机玻璃内槽（制胶槽）洗干净，晾干，放入制胶玻璃板。取透明胶带将玻璃板与内槽两端边缘封好，形成模子。将内槽置于水平位置，并在固定位置放好梳子。将冷却至 65℃ 左右（戴手套触摸瓶外侧时温热不烫手）的琼脂糖凝胶液混匀小心地倒入内槽玻璃板上，使胶液缓慢展开，直到整个玻璃板表面形成均匀胶层。

(4) 室温下，静置直至凝胶完全凝固，垂直轻拔梳子，取下胶带，将凝胶及内槽放入电泳槽中。添加 1×TAE 电泳缓冲液至没过胶板为止。

(5) 胶块摆放应保证每个泳道平行于电泳场，保证 DNA 条带在凝胶中垂直移动，加样后应调整好凝胶及托槽的位置。

(6) 凝胶成像时，摆正胶块，拍照。

2.4.2.2 浓度和纯度定量

使用 NanoDrop ND-2000 完成核酸浓度以及 A260/280 比例的测定，用于鉴定核酸的浓度和纯度。浓度大于 5 ng/μL，A260/280 纯度值为 1.8~2.0，A260/230 值大于 1.8 判定为合格样本。

(1) 测量前必须将样本混匀（涡旋 5 s）。

(2) 检测后立即使用拭镜纸擦拭机器接头，先取一张将上下机器接头部的液体吸走，再将此拭镜纸吸附过样品的面反折到内部，折叠 4 次后以单方向多次擦拭台面（至少 5 次）。

(3) 同一滴液体只能做 1 次检测，欲重复定量同一样品，应擦拭掉前一滴液体后，添加新液体。

(4) 核酸样品可使用 1~2 μL 做测量，推荐使用 2 μL 移液器，以避免体积不足无法准确测定核酸含量。

(5) 不可使用任何含有腐蚀性溶液的样品用于测量，仅可用无腐蚀性的液体溶解 DNA 并进行测定。

(6) 大批量样本测定时，每 50 个样本需进行 1 次纯水重置归零。

2.5 细菌、真菌、古菌和功能基因的质粒构建

2.5.1 细菌、真菌、古菌和碳氮磷功能基因的基因片段 PCR 扩增

细菌、真菌、古菌和碳氮磷功能基因的 PCR 反应体系一致，所不同的只是使用的引物序列以及对应的 PCR 循环过程（表附录 2-1）。

表附录 2-1 细菌、真菌、古菌和碳氮磷等功能基因常用的引物序列及 PCR 反应条件

类型	引物名称	引物序列 (5' -3')	扩增程序	参考文献
细菌	341F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	95 °C 预变性 2 min, 35 个循环: 94 °C 变性 20 s, 55 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 1 min。72 °C 延伸 10 min后 4 °C 保温	Takahashi et al., 2014
	806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT		
真菌	nu-SSU-1196F	GGAAACTCACCAGGTCCAGA	95 °C 预变性 3 min, 35 个循环: 95 °C 变性 30 s, 59 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 40 s。72 °C 延伸 10 min后 4 °C 保温	Borneman and Hartin, 2000
	nu-SSU-1536R	ATTGCAATGCYCTATCCCCA		
古菌	ARC344F	ACGGGGYGCAGCAGGCGCGA	94 °C 预变性 4 min, 35 个循环: 94 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 45 s。72 °C 延伸 10 min后 4 °C 保温	Takahashi et al., 2014
	ARC806R	GGACTACVSGGGTATCTAAT		
碳固定 (<i>cbbL</i> 基因)	K2f	ACCA [C/T] CAAGCC [G/C] AAGCT [C/G] GG	95 °C 预变性 5 min, 35 个循环: 95 °C 变性 45 s, 62 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 90 s。72 °C 延伸 10 min后 4 °C 保温	Tolli and King, 2005
	V2f	GCCTTC [G/C] AGCTTGCC [G/C] ACC [G/A]		
固氮菌 (<i>nifH</i> 基因)	PolF	TGCGAYCCSAARGCBGACTC	95 °C 预变性 5 min, 35 个循环: 95 °C 变性 60 s, 55 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 60 s。72 °C 延伸 10 min后 4 °C 保温	Poly et al., 2001
	AQER	GACGATGTAGATYTCCTG		
丛枝菌 根真菌	AMV4.5NF-F	AAGCTCGTAGTTGAATTTCCG	95 °C 预变性 5 min, 35 个循环: 95 °C 变性 60 s, 55 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 60 s。72 °C 延伸 10 min后 4 °C 保温	Lumini et al., 2010
	AMDGR-R	CCCAACTATCCCTATTAATCAT		

注：*cbbL* 基因编码核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶 (RubisCO) 是卡尔文循环中的关键酶，该酶催化卡尔文循环中的第一步 CO₂ 固定。*nifH* 基因编码二氮酶还原酶是氮固定过程中重要的酶。

2.5.1.1 PCR 扩增目的基因步骤

(1) PCR 反应体系总体积为 20 μL，包括：2×Taq Master Mix 10 μL，上下游引物各 1 μL，DNA 模板 1 μL，RNase-Free 水 7 μL。

(2) PCR 反应条件。

细菌真菌古菌：94 °C 3 min；35 个循环的 94 °C 30 s，55 °C 30 s，72 °C 1 min；72 °C 保温 5 min。

cbbL 基因：95 °C 30 s；35 个循环的 95 °C 10 s，62 °C 40 s，72 °C 30 s；72 °C 保温 5 min。

nifH 基因和丛枝菌根菌基因：94 °C 5 min；35 个循环的 94 °C 45 s，55 °C 20 s，55 °C 20 s，72 °C 20 s；72 °C 保温 5 min。

(3) 电泳检测目的条带：取 PCR 扩增的产物，点样于 1% 琼脂糖凝胶板上，电压 100 V，电泳 30 min。紫外凝胶成像系统下进行观察和拍照。

2.5.1.2 对目的基因扩增条带进行回收纯化

采用 Qiagen IAGEN 胶回收试剂盒，对 PCR 产物进行回收纯化，操作步骤如下。

(1) 将单一目的条带从琼脂糖凝胶中切下，放入干净离心管中，称重。

(2) 向离心管中加入 3 倍体积 (300 μL) 的 QG buffer 溶液 (溶胶液)，50 °C 水浴放置 10 min，期间不断温和翻转离心管，确保胶块充分溶解。加 100 μL 的异丙醇到样品中；

(3) 将所得溶液加入吸附柱中 (吸附柱放置在干净收集管中)，室温静置 2 min，12 000 r/min 离心 1 min，倒掉收集管废液，将吸附柱放入原收集管中。

(4) 向吸附柱中加入 750 μL 漂洗液 PE buffer，12 000 r/min 离心 1 min，倒掉收集管中废液，将吸附柱放入收集管。

(5) 重复操作步骤 (4)。

(6) 将吸附柱放入空的收集管中，12 000 r/min 离心 2 min，尽量除尽漂洗液。将吸附柱盖打开

室温放置 3 min，彻底晾干。

(7) 将吸附柱放入到一个干净的离心管中，向吸附膜中间滴加适量 50 μL 缓冲液 EB，室温放置 2 min，12 000 r/min 离心 2 min，收集 DNA 溶液。重复 1 次，提高 DNA 回收量。得到的 DNA 溶液 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置待用。

2.5.2 细菌、真菌和古菌的 PCR 产物与 T 载体连接

将上述经纯化后的 PCR 产物与 T 载体连接以构建已知浓度的标准样品。具体步骤如下。

2.5.2.1 体系

4 μL 纯化后的 PCR 产物与 1 μL pEASY[®] -T5 Zero 载体轻轻混合。混合后，在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 5 min，反应结束后，将离心管置于冰上。

2.5.2.2 转化

(1) 取 DH5 α 感受态细胞置于冰浴中，将连接溶液全部（5 μL ）加入 100 μL DH5 α 感受态细胞中进行转化，轻弹混匀，冰浴 10 min。

(2) 将 105 μL 转化菌液加入到含有氨苄青霉素的 LB 固体培养基上，均匀涂开，37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养过夜。

2.5.3 阳性克隆检测及质粒提取

2.5.3.1 阳性克隆检测

(1) PCR 方法鉴定阳性克隆。

步骤 1：每个平板用无菌枪头挑取单克隆菌落于 10 μL 高压灭菌双蒸水，振荡混匀，并进行编号。

步骤 2：取 3 μL 混合液与 13 μL PCR 反应体系中，用 M13 引物进行菌落 PCR 鉴定阳性克隆，PCR 体系 13 μL ，包括：8 μL 的 2 \times Bicolor PCR SuperMix，0.5 μL 的 M13F 引物，0.5 μL M13R 的引物序列，4 μL 无酶水。

步骤 3：将上述反应体系按照 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min，25 循环的 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min，最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min 的反应程序进行 PCR 扩增。

步骤 4：进行产物测序鉴定。原有条带长度+199 bp，若假阳性，199 bp 处有条带。

步骤 5：菌落 PCR 产物电泳中目的条带单一的，进行单克隆富集培养。

(2) 大肠杆菌菌株保存。

挑取电泳检测合格的菌落至 1 mL 的 LB 培养液中（不含氨苄青霉素）培养 12~24 h，再与甘油（体积比）1:1 保存。

2.5.3.2 质粒提取

(1) 摇菌培养。

将 (1) PCR 方法鉴定阳性克隆步骤 1 的鉴定结果为阳性的剩余的 7 μL 溶菌水混入含有 2 mL LB 培养基和 2 μL 氨苄青霉素的离心管中，封口，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床振荡培养 16 h（150 r/min）。

(2) 收集质粒。

使用倍沃质粒抽提试剂盒提取克隆好的质粒。

步骤 1：5 000 r/min 离心 10 min，弃上清液，将管子倒置于纸巾上，去除残留培养基（尽量除干净）。

注意：残留培养基会导致细胞裂解不良，从而降低 DNA 产量。

步骤 2：加入 170 μL Buffer A1（确保其中已加入 RNase A），用移液器或涡旋振荡仪充分悬浮细菌细胞。

注意：充分重悬对于获得最佳产量是至关重要的。

步骤 3：加入 170 μL Buffer B1，必须轻轻地反转 5~10 次以混匀（不要涡旋），室温静置 5 min 以内，裂解液整体表现为澄清。

注意：孵育时间不能超过 5 min。Buffer B1 若产生沉淀，须在 37 $^{\circ}\text{C}$ 加热，使沉淀溶解后再使用。

步骤 4: 加入 240 μL Buffer N1, 立即手动振荡 5~10 次混匀, 产生白色沉淀。

注意: 一定要混合均匀, 若混合物仍然呈团块、褐色、黏稠状, 需要更充分混匀来完全中和。

步骤 5: 将裂解液移入高速离心管, 室温 12 000 r/min 离心 10 min。

注意: 若沉淀离心不完全, 可以再离心 5 min; 若没有高速离心机, 可低速离心 (5 000 r/min 左右) 后取相对澄清的上清液。

步骤 6: 取 530 μL 步骤 6 中的上清液转移至一个干净的 1.5 mL 离心管中 (避免吸到沉淀), 加入 25 μL Plasmid-L Beads, 涡旋混匀 1 min 左右。

注意: Plasmid-L Beads 使用前需充分涡旋混匀。

步骤 7: 混匀后室温静置 5~10 min, 其间需手动或涡旋混匀 3~5 次, 之后上磁力架静置 1 min 左右 (确保所有磁珠被吸附即可), 弃去上清液, 保留磁珠。

注意: 孵育期间一直混匀有助于提高得率。

步骤 8: 从磁力架上取下离心管, 加入 750 μL Buffer MKB, 涡旋混匀 1 min, 之后上磁力架静置 1 min (确保所有磁珠被吸附即可), 弃去上清液, 保留磁珠。

步骤 9: 从磁力架上取下离心管, 加入 750 μL DNA Wash Buffer (确保加入 96%~100%乙醇), 涡旋混匀 1 min, 之后上磁力架静置 1 min (确保所有磁珠被吸附即可), 弃去上清液, 保留磁珠。重复此步骤。

注意: DNA Wash Buffer 使用前请加入与瓶身相应的 96%~100%乙醇。

步骤 10: 在磁力架上晾干 5~10 min。除残留乙醇, 以便获得最佳洗脱。

注意: 要注意观察磁珠是否过于干燥, 过于干燥会影响洗脱效果。

步骤 11: 从磁力架上取下离心管, 加入 50~100 μL Elution Buffer (65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅预热) 或者细胞培养水, 涡旋混匀 1 min, 孵育 5 min (可于室温或 65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育), 期间混匀 1~2 次再上磁力架, 静置 2 min 左右 (确保所有磁珠被吸附即可), 吸取澄清的液体 (产物) 至无菌离心管中, 检测后于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 或 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

注意: 小体积 (50 μL) 洗脱可能会洗脱不完全, 得率有所降低。如有必要可进行二次洗脱, 提高 DNA 产量, 或者直接 100 μL 洗脱。

(3) 质粒检测。

将提好的质粒进行测序, 测序引物为 M13, 测序序列符合预期的载体的作为质粒标准品使用。使用 Qubit 核酸蛋白分析仪测定上述质粒标准品的浓度。

2.6 荧光定量检测

2.6.1 梯度质粒标准样品制备

将取 10 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 的质粒标准品加入 990 μL 水中, 涡旋混匀稀释 100 倍, 作为第一个样品 A。

(1) 从 A 中取 10 μL 样品加入 90 μL 水中, 混匀稀释 10 倍, 作为第二个样品 B。

(2) 从 B 中取 10 μL 样品加入 90 μL 水中, 混匀稀释 10 倍, 作为第三个样品 C。

以此类推。制备 7 个梯度样品。

2.6.2 反应体系构建、qPCR 上机检测和结果计算

2.6.2.1 qPCR 上机检测

将上述配置完成的梯度质粒标准品及提取的 DNA 待测样品 (调整浓度为 3~5 $\text{ng}/\mu\text{L}$) 作为 qPCR 模板上机执行 qPCR, 同时以加 ddH₂O 为空白对照。在 96 孔板中, 一个样品做 3 重复 (即 3 孔), 以 Tsingke TSE501 ArtiCanATM SYBR qPCR Mix 染色扩增为例, 扩增体系各组分如表附录 2-2 所示。

表附录 2-2 qPCR 扩增体系组分

组分	体积/ μL
Tsingke TSE501 ArtiCanATM SYBR qPCR Mix	10
10 $\mu\text{mol/L}$ Primer F	0.4
10 $\mu\text{mol/L}$ Primer R	0.4
Template (gDNA)	2
ddH ₂ O	7.2
总计	20

以上扩增体系按 2.5.1 中不同微生物的引物对应的扩增程序进行扩增。

2.6.2.2 qPCR 下机后进行数据分析

(1) 根据已知的质粒浓度 ($\text{ng}/\mu\text{L}$), 计算对应的标准品的拷贝数:

$$\text{标准品的拷贝数 (copies}/\mu\text{L}) = \frac{6.02 \times 10^{23} \times \text{质粒浓度} \times 10^{-9}}{DNA\text{length} \times 660} \quad (2-1)$$

式中, 6.02×10^{23} 为摩尔分数; $DNA\text{length}$ 为对应引物的碱基长度。

(2) 根据已知的质粒拷贝数绘制标准曲线:

$$CT = k \times \lg(x) + b \quad (2-2)$$

式中, x 为样品拷贝数, k 为斜率, b 为截距。

注意: R^2 需要至少 0.99 以上, 扩增效率在 90%~110%, 兼并引物可放宽到 80%~120%。如果剔除一些数据后仍然不行, 重新稀释, 重做标曲。

(3) 基于质粒浓度算得的 k 值和 b 值, 代入待测样品对应的 CT 值即可获得待测样品的拷贝数。

$$\text{待测样品的拷贝数 (copies}/\mu\text{L}) = 10^{\frac{CT-b}{k}} \quad (2-3)$$

参考文献

- BORNEMAN J, HARTIN R J, 2000. PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (10): 4356-4360.
- EDWARDS I P, UPCHURCH R A, ZAK D R, 2008. Isolation of fungal cellobiohydrolase I genes from sporocarps and forest soils by PCR [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 3481-3489.
- FRASER T D, LYNCH D H, GAIERO J R, et al., 2017. Quantification of bacterial non-specific acid (*phoC*) and alkaline (*phoD*) phosphatase genes in bulk and rhizosphere soil from organically managed soybean fields [J]. *Applied Soil Ecology*, 111: 48-56.
- HEID C A, STEVENS J K, LIVAK K J, et al., 1996. Real time quantitative PCR [J]. *Genome Research*, 6 (10): 986-994.
- LIVAK K J, SCHMITTGEN T, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. *Methods*, 25 (4): 402-408.
- POLY F, MONROZIER L J, BALLY R, 2001. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil [J]. *Research in Microbiology*, 152 (1): 95-103.
- TAKAHASHI S, TOMITA J, NISHIOKA K, et al., 2014. Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of bacteria and archaea using next-generation sequencing [J]. *PLoS ONE*, 9 (8): e105592.
- TOLLI J, KING G M, 2005. Diversity and structure of bacterial chemolithotrophic communities in pine forest and agroecosystem soils [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (12): 8411-8418.

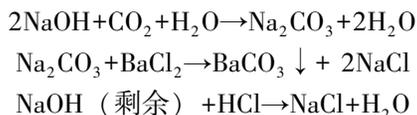
附录3 土壤呼吸强度测定方法

3.1 意义、范围与质控

测定添加以葡萄糖为底物的土壤呼吸强度可以用于确定土壤微生物活性潜力。本方法基于单位时间内，底物添加条件下二氧化碳释放量来表征土壤在没有碳源限制下的最大可能呼吸强度。适用于好氧、不饱和土壤中土壤微生物呼吸强度的测定。土壤微生物呼吸强度需按照技术规程规定的方法进行测定，根据土壤呼吸强度的变异系数适当增加重复实验。调用土壤三普管理平台系统，对数据进行审查备案。随机抽取同一批样品的1%~5%进行检查。采用技术规程规定的方法，对指标进行复核。

3.2 原理

新鲜土壤样品混合葡萄糖置于室内恒温培养。样品要置于空气或去除CO₂的合成空气中。利用微生物分解有机物质，释放的CO₂用碱液吸收法（NaOH吸收）来求得土壤矿化碳含量。培养阶段土壤样品释放的CO₂由NaOH吸收，根据反滴定未中和的NaOH，计算消耗的NaOH，然后计算出CO₂的释放量。



3.3 试剂

(1) 氢氧化钠（NaOH）溶液（浓度0.1 mol/L）：称取4 g NaOH（分析纯）溶于无CO₂的蒸馏水中，定容至1 000 mL。

(2) 盐酸（HCl）溶液（浓度0.05 mol/L）：吸取4.2 mL浓盐酸（分析纯）溶于800 mL蒸馏水中，定容至1 000 mL，用硼砂标定其浓度。

(3) 氯化钡（BaCl₂）溶液（浓度1 mol/L）：称取244 g BaCl₂·2H₂O（化学纯）溶于无CO₂蒸馏水中，定容至1 L。

(4) 酚酞乙醇溶液指示剂：称取1 g酚酞溶于100 mL乙醇（95%）中。

(5) 葡萄糖试剂（浓度40 g/L）：称取20 g葡萄糖，溶于300 mL无CO₂蒸馏水中，定容至500 mL。

3.4 仪器

- (1) 恒温培养箱或培养室。
- (2) 培养瓶：配有内外盖的密闭性能良好的500 mL瓶子。
- (3) 小烧杯：50 mL，用于装土壤。
- (4) 玻璃瓶：25 mL，用于装氢氧化钠溶液。
- (5) 滴定管及其支架。

3.5 步骤

- (1) 新鲜土壤过4 mm筛后，称取相当于20.0 g干土的新鲜土壤样品（水稻土等含水量过高的

土壤需要在室内阴干 2~3 天至含水量为 10% 左右) 3 份, 分别放入 3 个 50 mL 烧杯中, 在烧杯中加入约 3 mL 40 g/L 葡萄糖溶液 (相当于每克土壤中加入 6 mg 葡萄糖), 使待测土壤的含水量达到田间持水量的 40%~60%。并将 3 个烧杯分别放入 500 mL 培养瓶中。然后将盛有 20 mL 0.1 mol/L NaOH 溶液的玻璃瓶小心地置于培养瓶内, 培养瓶于通风处放置 30 min 后, 将培养瓶加盖密封, 放置在 25 °C 的恒温培养箱内培养 2 h。同时每批样品测定时应设置不加土壤的空白对照。

(2) 在培养开始时和 2 h 后, 取出吸收瓶, 将其中溶液完全洗入三角瓶中, 加入 1 mol/L BaCl₂ 溶液 20 mL 及酚酞指示剂两滴, 用 0.05 mol/L HCl 滴定中和未耗尽的 NaOH, 滴定至红色消失, 用通过 HCl 消耗量来计算 CO₂ 的数量。

3.6 结果计算

底物诱导呼吸量 SIR 的计算:

$$\text{SIR} [\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{h})] = \{ [(V_0 - V) \times c \times 0.022] \times 2 \times 1000 \} / (m \times 2) \quad (3-1)$$

式中, V_0 ——空白滴定时消耗标准盐酸的体积, 单位 mL;

V ——样品滴定时消耗标准盐酸的体积, 单位 mL;

c ——标准盐酸的浓度, 单位 mol/L;

0.022——二氧化碳 (1/2CO₂) 的摩尔质量, $M(1/2\text{CO}_2) = 0.022 \text{ g/mmol}$;

m ——土壤烘干质量, 单位 kg。

参考文献

GB/T 32720—2016. 土壤微生物呼吸的实验室测定方法 [S].

李振高, 骆永明, 滕应, 2008. 土壤与环境微生物研究法 [M]. 北京: 科学出版社.

中国土壤学会, 2000. 土壤农业化学分析方法 [M]. 北京: 中国农业科技出版社.

ANDERSON J P E, DOMSCH K H, 1978. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 10 (3): 215-221.

ISO 14240-1: 1997. Soil quality—Determination of soil microbial biomass—Part 1: Substrate-induced respiration method [S].

ISO 16072: 2002. 土壤微生物呼吸的实验室测定方法 (Soil quality—Laboratory methods for determination of microbial soil respiration, IDT) [S].

ISO 17155: 2012. Soil quality—Determination of abundance and activity of soil microflora using respiration curves [S].

附录 4 土壤酶活性测定方法

4.1 意义、范围与质控

为调查全国土壤微生物的碳、氮、磷元素转化功能, 需要对 6 个碳、氮、磷转化典型酶的功能活性进行测定。酶活测定所用样品为鲜土, 采样后需放在保温箱里用冰袋邮寄, 寄到实验室后短期内 (2 周内) 可以在 4 °C 冰箱内保存, 如果超过 2 周需要存放在 -20 °C 冰箱中, 取用时需要先复苏, 即在 4 °C 下复苏 3 天, 然后在 25 °C 下复苏 3 天, 再进行酶活性测定。6 种酶类分别是 β-D-葡萄糖苷

酶，在土壤碳循环中负责纤维素的降解并生成葡萄糖；多酚氧化酶，在土壤碳循环中参与木质素及多酚类物质的降解；脲酶，在土壤氮循环中负责将有机氮转化为无机氮；硝酸还原酶，在土壤反硝化过程的中负责将硝酸离子还原成亚硝酸离子；氨单加氧酶，在土壤硝化反应中负责将铵根离子转化为羟胺；土壤磷酸酶，在土壤中负责将有机磷转化为无机磷。其中土壤磷酸酶，当土壤 pH<7 时，适用酸性磷酸酶测定方法；当土壤 pH≥7 时，使用碱性磷酸酶测定方法。测定的质控过程是采取同一批次样品，1%~5% 随机抽样后重复测试结合留样复测，以提高检测结果的准确性。

4.2 β-D-葡萄糖苷酶

4.2.1 方法原理

β-D-葡萄糖苷酶，在土壤碳循环中负责纤维素的降解，以水解纤维素二糖和纤维素寡糖生成葡萄糖。其活性用荧光底物（4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖苷）法测定。

4.2.2 材料试剂

4.2.2.1 供试土壤

本方法所使用土壤为从田间采样得到的鲜土。

4.2.2.2 实验仪器

- (1) 250 mL 广口锥形瓶。
- (2) 八通道移液器和枪头。
- (3) 黑色 96 微孔板。
- (4) 摇床。
- (5) 恒温培养箱。
- (6) 多功能酶标仪。

4.2.3 实验方法

4.2.3.1 试剂配制

(1) 50 mmol/L 醋酸钠缓冲液（土壤 pH≤7）：配制 50 mmol/L 的醋酸钠缓冲液，取 6.804 g 三水合乙酸钠溶解在 800 mL 去离子水中，用 12 mol/L 盐酸调至 pH=6.5（或加 1.25 mL 冰醋酸）后定容到 1 L，缓冲液保存在 4℃ 冰箱，8 天内使用。

(2) 50 mmol/L 碳酸钠缓冲液（土壤 pH>7）：配制 50 mmol/L 的碳酸钠缓冲液，取 5.3 g 碳酸钠溶解在 800 mL 去离子水中，用 HCl 溶液调至 pH=8，然后定容到 1 L，缓冲液保存在 4℃ 冰箱，8 天内使用。为减少土壤异质性的影响，建议取 5 g 鲜土，分别于 5 个广口瓶中振荡，振荡后将悬浮液混合待测。

(3) 10 μmol/L 4-甲基伞形酮（MUB，标准品，4-methylumbelliferyl）：取 17.6 mg MUB 溶解在 10 mL 的甲醇中，配制成 10 mmol/L 标液，然后稀释 1 000 倍成 10 μmol/L MUB；于 4℃ 冰箱保存，3 天内使用。

(4) 200 μmol/L 荧光底物：200 μmol/L 4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖苷（4-MUB-β-D-glucoside），即 1.691 mg 4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖苷，用去离子水定容至 25 mL。提前一天配制，放置在 4℃ 冰箱保存，3 天内使用。

(5) 1 mol/L 的 NaOH 溶液：取 4 g 分析纯氢氧化钠溶于去离子水中，稀释至 100 mL。

4.2.3.2 操作步骤

(1) 称取 1 g 鲜土于 250 mL 广口锥形瓶中，加入 125 mL 50 mmol/L 醋酸钠缓冲液（酸性，土壤 pH≤7）或碳酸盐缓冲液（碱性，土壤 pH>7），塞上瓶塞或用封口膜封住，在摇床上于 180 r/min 振荡 30 min 制备悬浮液。为减少土壤异质性的影响，建议取 5 g 鲜土，分别于 5 个广口瓶中振荡，振荡后将悬浮液混合待测。

注意：β-D-葡萄糖苷酶、多酚氧化酶、脲酶、磷酸酶的悬浮液制备方法一致，制备一次悬浮液可以同时测定 4 种酶。

(2) 使用八通道移液器吸 200 μL 土壤悬浮液于黑色 96 微孔板内，每个样品孔加 50 μL 200 $\mu\text{mol/L}$ 的荧光底物。

(3) 同时做样品和基质控制，样品控制孔加 200 μL 土壤悬浮液和 50 μL 醋酸钠缓冲液，基质控制孔中加入 200 μL 醋酸钠缓冲液和 50 μL 荧光底物。

(4) 所有样品和空白加完后，酶标板放在 20 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下用恒温培养箱培养 4 h，之后加入 10 μL 1 mol/L 的 NaOH 溶液，终止反应。

(5) 使用多功能酶标仪进行荧光测定，在 365 nm 波长处激发，在 450 nm 处检测荧光。

4.2.3.3 结果计算

酶活性 [$\text{nmol}/(\text{g} \cdot \text{h})$] = 净荧光值 \times 缓冲液体积 (mL) / [激发系数 \times 吸入悬浮液体积 (mL) \times 反应时间 (h) \times 土壤重量 (g)] (4-1)

净荧光值 = [(样品孔测出的荧光值 - 样品控制荧光值) / 淬灭系数] - 基质控制荧光值 (4-2)

激发系数 (fluor/nmol) = 参考标准 / 加入样品池当中的标准品的量 (4-3)

淬灭系数 = (淬灭标准孔测出的荧光值 - 样品控制荧光值) / 参考标准品测出的荧光值 (4-4)

4.3 多酚氧化酶

4.3.1 方法原理

多酚氧化酶，在土壤碳循环中参与木质素及多酚类物质的降解，可以通过参与木质素降解和聚合可溶性酚从而促进腐殖质形成，能够通过分子氧化酚或多酚形成对应的醌。其活性用底物 [左旋多巴 (*L*-DOPA)] 分光光度法测定。

4.3.2 材料试剂

4.3.2.1 土壤

本方法所使用土壤为从田间采样得到的鲜土。

4.3.2.2 实验仪器

- (1) 250 mL 广口锥形瓶。
- (2) 八通道移液器和枪头。
- (3) 白色 96 微孔板。
- (4) 摇床。
- (5) 恒温培养箱。
- (6) 多功能酶标仪。

4.3.3 实验方法

4.3.3.1 试剂配制

(1) 50 mmol/L 醋酸钠缓冲液 (土壤 $\text{pH} \leq 7$): 配制 50 mmol/L 的醋酸钠缓冲液，取 6.804 g 三水合乙酸钠溶解在 800 mL 去离子水中，用 12 mol/L 盐酸调至 $\text{pH} = 6.5$ (或加 1.25 mL 冰醋酸) 后定容到 1L，缓冲液保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱，8 天内使用。

(2) 50 mmol/L 碳酸钠缓冲液 (土壤 $\text{pH} > 7$): 配制 50 mmol/L 的碳酸钠缓冲液，取 5.3 g 碳酸钠溶解在 800 mL 去离子水中，用 HCl 溶液调至 $\text{pH} = 8$ ，然后定容到 1 L，缓冲液保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱，8 天内使用。为减少土壤异质性的影响，建议取 5 g 鲜土，分别于 5 个广口瓶中振荡，振荡后将悬浮液混合待测。

(3) 底物：左旋多巴 (*L*-DOPA, *L*-3,4-dihydroxyphenylalanine) (25 mmol/L)，取 0.492 9 g *L*-DOPA 溶于稀盐酸后用去离子水稀释至 100 mL (90 $^{\circ}\text{C}$ 热水)。

4.3.3.2 操作步骤

(1) 称取 1 g 鲜土于 250 mL 广口锥形瓶中，加入 125 mL 50 mmol/L 醋酸钠缓冲液 (酸性，土壤 $\text{pH} \leq 7$) 或碳酸盐缓冲液 (碱性，土壤 $\text{pH} > 7$)，塞上瓶塞或用封口膜封住，在摇床上于 180 r/min 振荡 30 min 制备悬浮液。为减少土壤异质性的影响，建议取 5 g 鲜土，分别于 5 个广口瓶中振荡，振荡

后将悬浮液混合待测。

注意： β -D-葡萄糖苷酶、多酚氧化酶、脲酶、磷酸酶的悬浮液制备方法一致，制备一次悬浮液可以同时测定4种酶。

(2) 使用八通道移液器吸 200 μ L 土壤悬浮液于白色 96 微孔板内，每个样品孔加 50 μ L 200 μ mol/L 的底物。

(3) 同时做样品和基质控制，样品控制孔加 200 μ L 土壤悬浮液和 50 μ L 醋酸钠缓冲液，基质控制孔中加入 200 μ L 醋酸钠缓冲液和 50 μ L 底物。

(4) 所有样品和空白加完后，酶标板放在 20 $^{\circ}$ C 黑暗条件下用恒温培养箱培养 18 h。使用多功能酶标仪，采用分光光度法，在 450 nm 处测定吸光值。

4.3.3.3 结果计算

$$\text{酶活性 [nmol/ (g} \cdot \text{h)]} = \frac{\text{最终吸光度} \times \text{缓冲液体积 (mL)}}{[7.9 \mu\text{mol} \times \text{吸入悬浮液体积 (mL)} \times \text{反应时间 (h)} \times \text{土壤重量 (g)}]} \quad (4-5)$$

$$\text{最终吸光值} = \text{样品孔吸光值} - \text{基质控制吸光值} - \text{样品控制吸光值} \quad (4-6)$$

4.4 脲酶

4.4.1 方法原理

脲酶将尿素分解成二氧化碳和铵。其活性通常通过测量 NH_4^+ 的生成速率来测定。

4.4.2 材料试剂

4.4.2.1 供试土壤

本方法所使用土壤为从田间采样获得的鲜土。

4.4.2.2 实验仪器

- (1) 250 mL 广口锥形瓶。
- (2) 八通道移液器和枪头。
- (3) 白色 96 微孔板。
- (4) 摇床。
- (5) 恒温培养箱。
- (6) 多功能酶标仪。

4.4.3 实验方法

4.4.3.1 试剂配制

(1) 50 mmol/L 醋酸钠缓冲液 (土壤 $\text{pH} \leq 7$)：配制 50 mmol/L 的醋酸钠缓冲液，取 6.804 g 三水合乙酸钠溶解在 800 mL 去离子水中，用 12 mol/L 盐酸调至 $\text{pH} = 6.5$ (或加 1.25 mL 冰醋酸) 后定容到 1 L，缓冲液保存在 4 $^{\circ}$ C 冰箱，8 天内使用。

(2) 50 mmol/L 碳酸钠缓冲液 (土壤 $\text{pH} > 7$)：配制 50 mmol/L 的碳酸钠缓冲液，取 5.3 g 碳酸钠溶解在 800 mL 去离子水中，用 HCl 溶液调至 $\text{pH} = 8$ ，然后定容到 1 L，缓冲液保存在 4 $^{\circ}$ C 冰箱，8 天内使用。为减少土壤异质性的影响，建议取 5 g 鲜土，分别于 5 个广口瓶中振荡，振荡后将悬浮液混合待测。

(3) 底物：尿素 (urea) 400 mmol/L，取 24 g 尿素定容到 1 L。

4.4.3.2 操作步骤

(1) 称取 1 g 鲜土于 250 mL 广口锥形瓶中，加入 125 mL 50 mmol/L 醋酸钠缓冲液 (酸性，土壤 $\text{pH} \leq 7$) 或碳酸钠缓冲液 (碱性，土壤 $\text{pH} > 7$)，塞上瓶塞或用封口膜封住，在摇床上于 180 r/min 振荡 30 min 制备悬浮液。为减少土壤异质性的影响，建议取 5 g 鲜土，分别于 5 个广口瓶中振荡，振荡后将悬浮液混合待测。

注意： β -D-葡萄糖苷酶、多酚氧化酶、脲酶、磷酸酶的悬浮液制备方法一致，制备一次悬浮液可以同时测定4种酶。

(2) 使用八通道移液器吸 200 μL 土壤悬浮液于白色 96 微孔板内，每个样品孔加 50 μL 200 $\mu\text{mol/L}$ 的底物。

(3) 同时做样品和基质控制，样品控制孔加 200 μL 土壤悬浮液和 50 μL 醋酸钠缓冲液，基质控制孔中加入 200 μL 醋酸钠缓冲液和 50 μL 底物。

(4) 所有样品和空白加完后，酶标板放在 20 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下用恒温培养箱培养 18 h。

(5) 使用氨氮用水杨酸试剂包（Cat. 2395266-CN）和氨氮用氰尿酸试剂包（Cat. 2395466-CN）对孔中的铵浓度进行测量。

(6) 水杨酸试剂溶解在去离子水中（每毫升 1 包），每孔加入 40 μL 水杨酸试剂，包括对照品和标准品。

(7) 反应 3 min 后，将氰尿酸试剂溶解在去离子水中（每毫升 1 包），并将 40 μL 氰尿酸试剂分配到每个孔中。显色在 20 min 内完成。

(8) 使用多功能酶标仪，采用分光光度法，在 610 nm 处测定吸光值。

4.4.3.3 结果计算

$$\text{净 ABS} = \text{测定孔平均 ABS} - \text{样品控制孔的平均 ABS} - \text{底物控制孔的平均 ABS} \quad (4-7)$$

$$\text{酶活性} [\text{nmol}/(\text{g} \cdot \text{h})] = \text{净 ABS} \times \text{缓冲液体积 (mL)} /$$

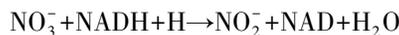
$$[\text{消光系数} \times \text{吸入悬浮液体积 (mL)} \times \text{反应时间 (h)} \times \text{土壤重量 (g)}] \quad (4-8)$$

式中，ABS 为 NH_4^+ 在 610 nm 处的吸光值，消光系数为每增加一个单位浓度的 NH_4^+ 对应的 ABS 的变化量。

4.5 硝酸还原酶

4.5.1 方法原理

硝酸还原酶作用于 NO_3^- 使还原为 NO_2^- ，即



产生的 NO_2^- 可以从土壤内渗到外界溶液中，并积累在溶液中。因此测定反应溶液中 NO_2^- 含量的增加，即表明酶活性的大小。

NO_2^- 含量的测定用对氨基苯磺酸化比色法，亚硝酸与对氨基苯磺酸和 α -萘胺在酸性条件下生成红色偶氮化合物，未反应的 NADH 会抑制后续的显色反应，用 PMS 将其中和后再进行后续反应，生成的红色偶氮化合物颜色在 2~3 h 稳定，可用比色法定量，该法非常灵敏，能测定每毫升 0.5 μg 的 NaNO_2 。

4.5.2 材料试剂

4.5.2.1 供试土壤

本方法所使用土壤为从田间采样得到的鲜土。

4.5.2.2 实验仪器

- (1) 酶标仪（520 nm）。
- (2) 96 孔板。
- (3) 振荡涡旋仪。
- (4) 台式离心机（8 000 r/min）。
- (5) 恒温箱。
- (6) 单道移液器（20 μL 、100 μL 、200 μL 、1000 μL ）。

4.5.3 实验方法

4.5.3.1 试剂配制

NaNO_2 标准液的配制：用蒸馏水将 10 $\mu\text{mol/mL}$ NaNO_2 标准液稀释至 1.0 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.8 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.6 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.4 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.2 $\mu\text{mol/mL}$ 。

4.5.3.2 操作步骤

(1) 称取相当于 0.05 g 风干土重的新鲜土样于 2 mL 离心管中，每个样品称取两份，一份样品标记为测定管，另一份样品标记为对照管。

(2) 设置标准品管和空白管：标准品管各加不同浓度的标准品 50 μL ，绘制标准曲线；空白管加 50 μL 蒸馏水。

(3) 样品测定管和对照管分别加 50 μL 蒸馏水。

(4) 空白管、标准品管、样品测定管和对照管均加 180 μL 硝酸盐溶液（试剂盒内备有试剂）。

(5) 空白管、标准品管和样品测定管先加 18 μL NaOH 溶液（试剂盒内备有试剂），样品对照管先不加。

(6) 用振荡涡旋仪将各管充分混匀，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱反应 24 h。

(7) 培养结束后，空白管、标准品管、样品测定管和对照管均加 25 μL NADH 溶液（试剂盒内备有试剂）。

(8) 样品对照管加 18 μL NaOH 溶液（试剂盒内备有试剂），其他各管不加。

(9) 加样结束后，立刻用振荡涡旋仪将各管充分混匀，于台式离心机中在 8 000 r/min 室温条件下离心 5 min。

(10) 准备好 96 孔板，于上述各管内分别吸取 80 μL 上清液于 96 孔板对应孔内，各孔均加 20 μL PMS 溶液（试剂盒内备有试剂）；充分混匀，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱保温 20 min。

(11) 保温结束后，各孔分别加 50 μL 对氨基苯磺酸和 50 μL α -萘胺溶液（试剂盒内备有试剂）充分混匀，显色 20 min 后于酶标仪上在 520 nm 处测定各孔的 OD 值；样品测定孔、对照孔、标准品孔、空白孔的 OD 值分别记为 $A_{\text{测定}}$ 、 $A_{\text{对照}}$ 、 $A_{\text{标准}}$ 、 $A_{\text{空白}}$ ，计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。

4.5.3.3 结果计算

以标准品浓度作横坐标， $\Delta A_{\text{标准}}$ 为纵坐标（ y 轴）绘制出标准品线性回归曲线，按曲线方程计算各样本浓度值。

单位的定义：每克土样每天中产生 1 $\mu\text{mol NO}_2^-$ 的量为一个 S-NR 活力单位。

$$\text{S-NR (U/g)} = x \times V_{\text{标准}} / (W \cdot T) = 0.05x / W \quad (4-9)$$

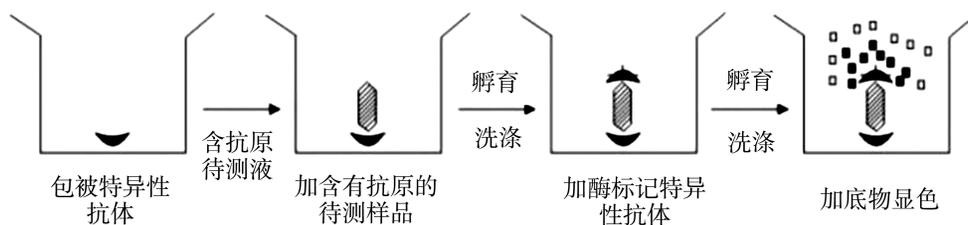
式中， $V_{\text{标准}}$ 为反应体系中加入的标准液体积，0.05 mL； W 为风干土样，g； T 为反应时间，1 天。

4.6 氨单加氧酶

4.6.1 方法原理

氨单加氧酶的测定使用夹心法酶联免疫吸附法（ELISA）：特异性抗体结合到固相载体上形成固相抗体且仍保持其免疫学活性（图附录 4-1）。

往预先包被氨单加氧酶（AMO）捕获抗体的包被微孔中依次加入抗原待测物和标准品、辣根过氧化物酶（HRP）标记的抗体，经过孵育并彻底洗涤。用底物 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺（TMB）显色，TMB 在过氧化物酶的催化下形成联苯醌，使用硫酸终止反应。



图附录 4-1 夹心法酶联免疫吸附原理

4.6.2 材料试剂

4.6.2.1 供试土壤

本方法所使用土壤为从田间采样得到的鲜土。

4.6.2.2 实验仪器

- (1) 酶标仪（450 nm）。
- (2) 96 孔板。
- (3) 10 000 *g* 离心机。
- (4) 单道移液器（10 μL 、20 μL 、200 μL 、1000 μL ）。
- (5) 恒温箱或水浴锅。
- (6) 组织匀浆机。

4.6.3 实验方法

4.6.3.1 试剂配制

- (1) 预先包被 AMO 抗体（重组蛋白捕获抗体）的微孔板。
- (2) AMO 标准液（大肠杆菌 *E. coli* 重组蛋白），浓度依次为 0 U/L、15 U/L、30 U/L、60 U/L、120 U/L、240 U/L。
- (3) 0.1 mol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 磷酸盐缓冲液（PBS）。
- (4) 标记抗体液：0.05% 辣根过氧化物酶（HRP）标记的抗体溶液。
- (5) 洗涤液：8.0 g NaCl, 0.2 g KCl, 2.9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g KH_2PO_4 , 0.5 mL 吐温-20, 加无菌去离子水至 1 000 mL。
- (6) 底物显色液：先将 TMB 以 0.1 mol/L 的浓度溶于二甲基亚砜，再将 1 mmol/L TMB 和 3.0 mmol/L H_2O_2 溶于 0.2 mol/L 醋酸钠/枸橼酸缓冲液（pH 4.0）。
- (7) 终止液：2 mol/L H_2SO_4 。

4.6.3.2 操作步骤

- (1) 称取 1 g 过筛的风干土壤，加入 9 mL 的 PBS（pH=7.2~7.4，浓度为 0.01 mol/L），将土壤充分混合，混合过程选用组织匀浆器，冰浴上匀浆（或者进行液氮碾磨）。2~8 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心取上清液，离心转速选用 5 000 r/min，时间是 15 min。取上清液待检，仔细收集上清液。
- (2) 设置标准品孔和样本孔，标准品孔各加不同浓度的标准品 50 μL ，绘制标准曲线。
- (3) 样本孔先加待测样本 10 μL ，再加去离子水 40 μL ，空白孔不加。
- (4) 除空白孔外，标准品孔和样本孔中每孔加入 HRP 标记的检测抗体 100 μL ，用封板膜封住反应孔，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅或恒温箱温育 60 min。
- (5) 弃去液体，在吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液，静置 1 min，甩去洗涤液，在吸水纸上拍干，如此重复洗板 5 次（也可用洗板机洗板）。
- (6) 每孔加入底物显色液 100 μL ，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min。
- (7) 每孔加入终止液 50 μL ，15 min 内在 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值。

4.6.3.3 结果计算

以标准品浓度作为横坐标，对应 OD 值作为纵坐标，绘制出标准品线性回归曲线，按曲线方程计算各样本浓度值。

4.7 土壤磷酸酶（酸性和碱性磷酸酶）

4.7.1 方法原理

磷酸酶是一种能够将对应底物去磷酸化的酶，即通过水解磷酸单酯将底物分子上的磷酸基团除去，并生成磷酸根离子和自由的羟基。其活性用荧光底物 [4-甲基伞形酮（MUB）-磷酸盐] 法测定。

4.7.2 材料试剂

4.7.2.1 供试土壤

本方法所使用土壤为从田间采样得到的鲜土。

4.7.2.2 实验仪器

- (1) 250 mL 广口锥形瓶。
- (2) 八通道移液器和枪头。
- (3) 黑色 96 微孔板。
- (4) 摇床。
- (5) 恒温培养箱。
- (6) 多功能酶标仪。

4.7.3 实验方法

4.7.3.1 试剂配制

(1) 50 mmol/L 醋酸钠缓冲液 (土壤 pH≤7): 配制 50 mmol/L 的醋酸钠缓冲液, 取 6.804 g 三水合乙酸钠溶解在 800 mL 去离子水中, 用 12 mol/L 盐酸调至 pH=6.5 (或加 1.25 mL 冰醋酸) 后定容到 1 L, 缓冲液保存在 4 °C 冰箱, 8 天内使用。

(2) 50 mmol/L 碳酸钠缓冲液 (土壤 pH>7): 配制 50 mmol/L 的碳酸钠缓冲液, 取 5.3 g 碳酸钠溶解在 800 mL 去离子水中, 用 HCl 溶液调至 pH=8, 然后定容到 1 L, 缓冲液保存在 4 °C 冰箱, 8 天内使用。为减少土壤异质性的影响, 建议取 5 g 鲜土, 分别于 5 个广口瓶中振荡, 振荡后将悬浮液混合待测。

注意: β-D-葡萄糖苷酶、多酚氧化酶、脲酶、磷酸酶的悬浮液制备方法一致, 制备一次悬浮液可以同时测定 4 种酶。

(3) 10 μmol/L MUB (标准品, 4-methylumbelliferyl): 取 17.6 mg MUB 溶解在 10 mL 的甲醇中, 配制成 10 mmol/L 标液, 然后稀释 1 000 倍成 10 μmol/L MUB, 于 4 °C 冰箱保存, 3 天内使用。

(4) 200 μmol/L 荧光底物: 取 200 μmol/L 4-甲基伞形酮 (MUB) - 磷酸盐 (4-MUB-phosphate), 即 1.28 mg 4-甲基伞形酮 (MUB) - 磷酸盐, 用去离子水定容至 25 mL。提前一天配制, 放置在 4 °C 冰箱保存, 3 天内使用。

(5) 1 mol/L 的 NaOH 溶液: 取 4 g 分析纯氢氧化钠溶于去离子水中, 稀释至 100 mL。

4.7.3.2 操作步骤

(1) 称取 1 g 鲜土于 250 mL 广口锥形瓶中, 加入 125 mL 50 mmol/L 醋酸钠缓冲液 (酸性, 土壤 pH≤7) 或碳酸盐缓冲液 (碱性, 土壤 pH>7), 塞上瓶塞或用封口膜封住, 在摇床上于 180 r/min 振荡 30 min 制备悬浮液。为减少土壤异质性的影响, 建议取 5 g 鲜土, 分别于 5 个广口瓶中振荡, 振荡后将悬浮液混合待测。

(2) 使用八通道移液器吸 200 μL 土壤悬浮液于黑色 96 微孔板内, 每个样品孔加 50 μL 200 μmol/L 的荧光底物。

(3) 同时做样品和基质控制, 样品控制孔加 200 μL 土壤悬浮液和 50 μL 醋酸钠缓冲液, 基质控制孔中加入 200 μL 醋酸钠缓冲液和 50 μL 荧光底物。

(4) 所有样品和空白加完后, 酶标板放在 20 °C 黑暗条件下培养 4 h, 之后加入 10 μL 1 mol/L 的 NaOH 溶液, 终止反应。

(5) 使用多功能酶标仪进行荧光测定, 在 365 nm 波长处激发, 在 450 nm 处检测荧光。

4.7.3.3 结果计算

酶活性 [nmol / (g · h)] = 净荧光值 × 缓冲液体积 (mL) / [激发系数 × 吸入悬浮液体积 (mL) × 反应时间 (h) × 土壤重量 (g)]

净荧光值 = [(样品孔测出的荧光值 - 样品控制荧光值) / 淬灭系数] - 基质控制荧光值

激发系数 (fluor/nmol) = 参考标准/加入样品池当中的标准品的量 (4-12)

淬灭系数 = (淬灭标准孔测出的荧光值-样品控制荧光值) / 参考标准品测出的荧光值 (4-13)

参考文献

- 李振高, 骆永明, 滕应, 2008. 土壤与环境微生物研究法 [M]. 北京: 科学出版社.
- FREEMAN C, OSTLE N, KANG H, 2001. An enzymic 'latch' on a global carbon store: a shortage of oxygen locks up carbon in peatlands by restraining a single enzyme [J]. *Nature*, 409 (6817): 149.
- LI M, ZHANG J, YANG X, et al., 2021. Responses of ammonia-oxidizing microorganisms to biochar and compost amendments of heavy metals-polluted soil [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 102: 263-272.
- SAIYA-CORK K R, SINSABAUGH R L, ZAK D R, 2002. Effects of long term nitrogen deposition on extracellular enzyme activity in an *Acer saccharum* forest soil [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 34: 1309-1315.
- SINSABAUGH R L, 2010. Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 42: 391-404.
- SINSABAUGH R L, HILL B H, SHAH J J F, 2009. Ecoenzymatic stoichiometry of microbial organic nutrient acquisition in soil and sediment [J]. *Nature*, 462 (7274): 795-U117.
- SINSABAUGH R L, LAUBER C L, WEINTRAUB M N, et al., 2008. Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale [J]. *Ecology Letters*, 11: 1252-1264.
- ZIBILSKIE L M, BRADFORD J M, 2007. Oxygen effects on carbon, polyphenols, and nitrogen mineralization potential in soil [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 71 (1): 133-139.

附录 5 土壤微生物群落组成高通量测序方法

5.1 意义、范围与质控

为调查全国土壤总体微生物及其典型功能物种的物种多样性特征, 需开展土壤细菌、真菌、古菌、固碳菌、固氮菌、丛枝菌根菌高通量测序。高通量质控过程包括元数据和测序数据的一致性检查、测序数据的质量检测、低质量测序序列的过滤及切除、接头序列及无关序列的剔除、宿主及污染序列的过滤、混合样本的数据分割等。

5.2 扩增子测序实验基本流程

土壤样品→DNA 抽提→核酸质检→PCR 扩增→PCR 产物质检→上机获取 FASTQ 数据→文库构建→数据质检。

5.3 主要实验设备

扩增子测序主要实验设备见表附录 5-1。

表附录 5-1 扩增子测序主要实验设备

仪器名称	用途
台式高速离心机	用于分离液体与固体颗粒或液体与液体的混合物中各组分
PCR 仪器	利用 PCR (polymerase chain reaction, 聚合酶链反应) 技术对特定 DNA 扩增
全自动核酸提取仪	DNA 自动提取
电泳仪	用于将获得的 DNA 样品进行组分分析或单个组分提取
凝胶成像仪	PCR 产物检测
移液器	用于定量转移液体
Bioanalyzer	样品质量控制仪
NanoDrop	DNA 纯度及浓度检测
tip 离心管	分装样品

5.4 实验流程

5.4.1 土壤 DNA 提取

参照附录 7 土壤功能基因组测序方法 7.4.1~7.4.2 步骤, 提取土壤 DNA, 并质检。

5.4.2 DNA 样品质控标准

浓度不低于 5 ng/ μL , A260/280 数值范围在 1.8~2.0, 凝胶电泳结果能看到完整条带。

5.4.2.1 琼脂糖凝胶电泳

对提取的基因组 DNA 进行琼脂糖电泳检测。凝胶成像结果表明有完整的基因组条带, 且无其他杂质的情况下判定为合格。

琼脂糖凝胶配置方法如下。

(1) 常用琼脂糖凝胶分别为 0.5%、1% 和 2% 的琼脂糖凝胶, 凝胶浓度选择主要取决于目的片段的大小和电泳时间。

(2) 以制备 1% 琼脂糖凝胶 (大胶用 100 mL, 小胶用 70 mL) 为例: 称取 1 g (0.7 g) 琼脂糖置于锥形瓶中, 加入 100 mL (70 mL) 1×TAE, 瓶口倒扣小烧杯。微波炉加热 (1 min) 煮沸 2~3 次至琼脂糖全部融化, 摇匀, 即成 1.0% 琼脂糖凝胶液。

注意: 2% 琼脂糖凝胶, 以上述体系为例, 即加入 2 g (1.4 g) 琼脂糖及 100 mL (70 mL) 1×TAE。

(3) 胶板制备: 取电泳槽内的有机玻璃内槽 (制胶槽) 洗干净, 晾干, 放入制胶玻璃板。取透明胶带将玻璃板与内槽两端边缘封好, 形成模子。将内槽置于水平位置, 并在固定位置放好梳子。将冷却至 65 °C 左右 (戴手套触摸瓶外侧时温热不烫手) 的琼脂糖凝胶液混匀, 小心地倒入内槽玻璃板上, 使胶液缓慢展开, 直到整个玻璃板表面形成均匀胶层。

(4) 室温下, 静置直至凝胶完全凝固, 垂直轻拔梳子, 取下胶带, 将凝胶及内槽放入电泳槽中。添加 1×TAE 电泳缓冲液至高于胶板为止。

(5) 胶块摆放应保证每个泳道平行于电泳场, 保证 DNA 条带在凝胶中垂直移动, 加样后应调整好凝胶及托槽的位置。

(6) 凝胶成像时, 摆正胶块, 拍照。

5.4.2.2 浓度和纯度定量

使用 NanoDrop ND-2000 完成核酸浓度以及 A260/280 比例的测定, 用于鉴定核酸的浓度和纯度。浓度大于 10 ng/ μL , A260/280 纯度值为 1.8~2.0 判定为合格样本。

(1) 测量前必须将样本混匀 (涡旋 5 s)。

(2) 检测后立即使用拭镜纸擦拭机器接头，先取一张将上下机器接头部的液体吸走，再将此拭镜纸吸附过样品的面反折到内部，折叠4次后以单方向多次擦拭台面（至少5次）。

(3) 同一滴液体只能做1次检测，欲重复定量同一样品，应擦拭掉前一滴液体后，添加新液体。

(4) 核酸样品可使用1~2 μL做测量，推荐使用2 μL移液器，以避免体积不足无法准确测定核酸含量。

(5) 不可将任何含有腐蚀性溶液的样品用于测量，仅可用无腐蚀性的液体溶解DNA并进行测定。

(6) 大批量样本测定时，每50个样本需进行1次纯水重置归零。

5.4.3 细菌、真菌、古菌和碳、氮、磷功能基因的基因片段PCR扩增

细菌、真菌、古菌和碳、氮、磷功能基因的PCR反应体系一致，所不同的只是使用的引物序列以及对应的PCR循环过程，具体见表附录5-2。

表附录5-2 土壤细菌、真菌、古菌引物序列及PCR反应条件

类型	引物名称	引物序列 (5' -3')	扩增程序	参考文献
细菌	515F	GTGCCAGCMGCCGCGG	95℃ 预变性 2 min, 35 个循环: 94℃ 变性 20 s, 55℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 1 min。72℃ 延 伸 10 min后 4℃ 保温	Tamaki et al., 2011
	907R	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT		
真菌	ITS1-1737F	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	95℃ 预变性 3 min, 35 个循环: 95℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s。72℃ 延 伸 10 min后 4℃ 保温	Degnan et al., 2012
	ITS2-2043R	GCTGCGTTCATCGATGC		
古菌	519F	CAGCCGCCGCGGTAA	95℃ 预变性 4 min, 35 个循环: 94℃ 变性 30 s, 57℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 45 s。72℃ 延 伸 10 min后 4℃ 保温	Coolen et al., 2004
	915R	GTGCTCCCCGCAATTCCT		

5.4.3.1 构建文库

(1) 一轮PCR扩增。

首先，在PCR管中加入以下体系（表附录5-3）。

表附录5-3 第一轮PCR反应体系

添加组分	添加量
2×Taq Master Mix	7.5 μL
5 pmol/μL primer F	1 μL
5 pmol/μL primer R	1 μL
DNA 模板	≥1 μL (30 ng)
H ₂ O	15 μL
总计	15 μL

其次，按以下程序设置PCR仪程序（表附录5-4）。

表附录5-4 第一轮PCR反应条件

温度/℃	时间	循环数
94	5 min	

(续表)

温度/°C	时间	循环数
94	30 s	26
56	30 s	
72	30 s	
72	5 min	
4	保持	

(2) 二轮 PCR 扩增。

首先，在 PCR 管中加入以下体系（表附录 5-5）。

表附录 5-5 第二轮 PCR 反应体系

添加组分	添加量/ μL
2×Taq Master Mix	15
I5	1
I7	1
一轮产物	3
H ₂ O	10
总计	30

其次，按以下程序设置 PCR 仪程序（表附录 5-6）。

表附录 5-6 第二轮 PCR 反应条件

温度/°C	时间	循环数
94	5 min	10
94	30 s	
56	30 s	
72	30 s	
72	5 min	
4	保持	

5.4.3.2 文库磁珠纯化

(1) 在 U 形板中加入 20 μL 平衡至室温且充分混匀的 AMPure XP beads（Beads：产物 = 0.8：1），再加入 25 μL PCR 产物（不足 25 μL 时需用水补齐），用移液器缓慢吹打 10 次，混匀，室温放置 5 min。

(2) 磁力架上放置 5 min 至上清液透明，弃上清液。

(3) 加入 200 μL 新鲜配制的 80% 的乙醇，室温 30 s，弃上清液。

(4) 重复上一个步骤，共洗涤两次。

(5) 室温晾干放置，晾干至无液滴残留（用 10 μL 移液器检查管底是否有液滴残留），且 Beads 表面无反光现象，从磁力架上取下平板。

(6) 加入 25 μL H₂O 洗脱，吹打 10 次，充分混匀，室温放置 2 min。

(7) 置于磁力架上 5 min 至上清液透明，转移 20 μL 上清液至一块新的 96 孔 PCR 板中或新的 PCR 管中。

5.4.3.3 文库质检

(1) 取 3 μL 纯化过的二轮产物进行琼脂糖凝胶电泳检测，检测是否有条带、条带大小是否符合预期和条带是否单一。琼脂糖凝胶电泳实验流程参照 5.4.2.1 节。

(2) 取 1 μL 纯化过的二轮产物用超微量分光光度计 N120 进行浓度检测。

5.4.4 测序及序列生物信息分析

使用 Illumina Novaseq 6000 PE250 平台进行测序，每个样本不低于 10 万条 Raw reads。原始数据为 FASTQ 格式。使用 Trimmomatic 软件 (Bolger et al., 2014) 对原始双端序列进行去杂。去杂参数为：检测并截去模糊碱基 N；并采用滑窗法检查平均碱基质量，当质量低于 20 时，截取前面高质序列。去杂后的双端序列利用 FLASH 软件 (Reyon et al., 2012) 进行。拼接参数：最小的 overlap 为 10 bp、最大的 overlap 为 200 bp、最大错配率为 20%。

为保证结果的准确性，可进行精准去杂，去除含有模糊碱基 (ambiguous base)、单碱基高重复区 (homologous) 的序列以及长度过短的序列。精准去杂的参数：去掉含有氮碱基的序列，保留碱基质量分数 Q20 达到至少 75% 的序列。同时，利用 UCHIME 检测并去除序列中的嵌合体序列。

Raw data → 去杂后 data → 序列拼接为 tags → 继续质控获得 clean tags → 去除嵌合体后获得 valid tags。

测序数据进行预处理生成优质序列之后，采用 VSEARCH 软件 (Rognes et al., 2016)，根据序列的相似性，将序列归为多个 OTU。参数为序列相似度大于或等于 97% 被归为一个 OTU 单元。

使用 QIIME 软件包 (Wang et al., 2007) 挑选出各个 OTU 的代表序列，并将所有代表序列与数据库进行比对注释。16S 使用 Silva (version 138) 数据库比对，物种比对注释使用 RDP classifier 软件，保留置信区间大于 0.7 的注释结果。ITS 使用 Unite 数据库比对，古菌使用 Silva (version 138) 数据库比对。物种比对注释使用 BLAST 软件。

5.4.5 OTU 分类

使用 VSEARCH (version 2.4.2) 软件，对质控得到的优质序列 valid tags 按照 97% 的相似度进行 OTU 分类，并选取每个 OTU 中丰度最大的序列作为该 OTU 的代表序列。采用 RDP classifier Naive Bayesian 分类算法对代表序列与数据库进行比对注释，得到 OTU 的注释信息。根据每个 OTU 在各个样本中包含的序列数，构建 OTU 在各个样本中的丰度矩阵文件。根据序列比对采用 PyNAST (v0.1) 软件对 OTU 代表序列进行系统进化关系的构建，获得系统发育树文件，按照最小深度对所有样本随机抽取，得到抽齐后的 OTU 文本表格。

5.4.6 OTU 序列挑选及注释

OTU 分类后，对 OTU 种类、OTU 注释信息及代表序列情况记性统计。分别对各个样本中分类到该 OTU 的 tags 数进行统计，可以获得各个 OTU 在每个样本中的丰度情况。

5.4.7 群落结构分布

对样本在分类学水平门 (L2)、纲 (L3)、目 (L4)、科 (L5)、属 (L6)、种 (L7) 等各个不同的分类层级，进行注释以及汇总，并以表格的形式展现丰度结果。

5.4.8 Alpha 多样性指数计算统计

为了进行样本多样性之间的比较，在分析前需要统一抽样深度，以校正测序深度不同引起的多样性差异。在统一测序深度下计算不同样本的多样性指数，并汇总成表格。统计的指数包括如下 4 个。

(1) Observed_OTUs: 直接检测到的微生物种类数。

(2) Chao1: 用于估计样本中物种 Richness 总数，数值越大，代表物种越多。

$$S_{\text{Chao1}} = S_{\text{obs}} + \frac{n_1(n_1 - 1)}{2(n_2 + 1)} \quad (5-1)$$

式中， S_{Chao1} —— 估计的 OTU 数目；

S_{obs} —— 实际观测到的 OTU 数目；

- n_1 ——只含有一条序列的 OTU 数目（如“singletons”）；
 n_2 ——只含有两条序列的 OTU 数目（如“doubletons”）。

(3) Shannon: 用来估算样本中微生物的多样性指数之一。它与 Simpson 多样性指数均为常用的反映 Alpha 多样性的指数。Shannon 指数越大, 说明群落多样性越高。

$$H_{\text{Shannon}} = - \sum_{i=1}^{S_{\text{obs}}} \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N} \quad (5-2)$$

式中, S_{obs} ——实际观测到的 OTU 数目;
 n_i ——第 i 个 OTU 所含的序列数;
 N ——所有的序列数。

(4) Evenness: 物种均匀度是指某一群落或生境中全部微生物物种数目的分配状况, 其反映了各物种个体数目分配的均匀程度。可以基于 Shannon-Wiener 指数计算物种多样性, 物种均匀度的计算公式为

$$J = \frac{H'}{\ln S} \quad (5-3)$$

式中, S ——群落内的物种数;
 H' ——Shannon-Wiener 多样性指数。

5.4.9 Alpha 多样性指数差异分析

基于各样本的多样性指数, 可以检验组间样本的 Alpha 多样性是否存在显著差异。基于 Wilcoxon 秩和检验 (两组样本) 或 Kruskal-Wallis 秩和检验 (3 组或 3 组以上样本) 对组间多样性指数进行差异分析, 以 $P < 0.05$ 作为差异显著性筛选阈值, 并使用 Bonferroni 方法对 p 进行多重假设检验校正, 用以评估组间物种多样性是否存在显著差异。

5.4.10 Beta 多样性分析

PCA、PCoA、NMDS 分析和 RDA/CCA 属于排序分析, PCA、PCoA 和 NMDS 分析是非约束排序分析, RDA/CCA 是约束性排序分析。排序分析是一种可视化分析, 用于展示样本/分组间的相似性和差异性, 非约束性排序只基于样本的物种组成数据, 而约束性排序可以同时使用物种组成和环境因子数据进行排序分析, 从而解释环境因子对于样本中物种组成的影响。

5.4.10.1 NMDS 分析

非度量多维尺度 (NMDS, nonmetric multidimensional scaling) 分析是基于 Bray-Curtis 矩阵对样本进行排序, 其区别在于 NMDS 不再是特征根排序技术, 也不再以排序轴承载更多的方差为目的, 因此 NMDS 排序图可以任意旋转、中心化和倒置。NMDS 分析在多维空间内构建对象的初始结构, 并用迭代程序不断地调整对象位置, 目标是尽可能地最小化应力函数 (stress function, 取值 0~1), 应力函数是排序空间内对象结果与原始距离矩阵之间相异程度的度量。

5.4.10.2 PCA

PCA (principal component analysis), 即主成分分析, 该分析基于 Bray-Curtis 距离, 常用于数据降维, 同时保持数据集中对方差贡献最大的特征, 从而有效地找出数据中最“主要”的元素和结构, 去除噪声和冗余, 揭示隐藏在复杂数据背后的简单结构, 即在低维空间尽可能多地展示数据的主要趋势特征。PCA 基于 OTU 丰度表, 运用方差分解, 将样本间的差异反映在二维坐标图上, 坐标轴为能够最大程度解释方差的两个特征根, 样本组成越相似在 PCA 图中越聚集, 而不同组的样本可能表现出分散分布。

5.4.10.3 PCoA

PCoA (principal co-ordinates analysis) 是一种研究数据相似性或差异性的可视化方法, 通过一系列的特征值和特征向量进行排序后, 选择主要排在前几位的特征值。PCoA 可以找到距离矩阵中最主要的坐标, 通过 PCoA 可以观察个体或群体间的差异。PCoA 和 PCA 的排序都是以展示对象之间的距离为目标, 其区别在于 PCA 基于欧氏距离, 而在 PCoA 排序过程中, 可以选择其他的距离/非相似性

矩阵，进而在二维坐标中将对象之间的相互关系表现出来。

PCoA 分析结合微生物多元变量统计分析中的 Adonis 分析判断差异是否具有显著性。

NMDS 分析结合微生物多元变量统计分析中的 Anosim 分析判断差异是否具有显著性。

UPGMA 分析 (unweighted pair group method with arithmetic mean)：通过距离矩阵算法，揭示样本间或组间相似情况。

针对 PCoA、UPGMA 和 NMDS 分析，提供基于以下距离算法。

(1) 加权的 (weighted) Unifrac 距离 (基于进化关系，且考虑到物种丰度)。

(2) 非加权的 (unweighted) Unifrac 距离 (基于进化关系，但不考虑物种丰度，仅仅考虑物种的有无)。

(3) Bray-Curtis 距离算法 (考虑物种的丰度)。

(4) Binary-Jaccard 距离算法 (仅仅考虑物种的有无，不考虑物种的丰度)：Jaccard 系数，又叫 Jaccard 相似性系数，用来比较样本集中的相似性和分散性的一个概率。

(5) Euclidean (欧氏) 距离算法 (考虑物种的丰度)：欧氏距离 (Euclidean distance) 是一个通常采用的距离定义，它是在 m 维空间中两个点之间的真实距离。

5.4.11 菌群差异统计分析

微生物多元变量统计分析主要包括两大类。

(1) 常规：ANOVA、Kruskal-Wallis 算法，对于两个样本间的差异显著性分析，使用 Metastat 分析方法。

(2) LEfSe 分析 (分组数小于等于 6 时提供)，结合差异检测方法 (Kruskal-Wallis 检验或 Wilcoxon 检验) 和线性判别分析进行特征选择。

LEfSe (linear discriminant analysis effect size) 分析，是一种用于发现和解释高维度数据生物标志物的分析工具，可以进行两个或多个分组的比较，它强调统计意义和生物相关性，能够在组与组之间寻找具有统计学差异的生物标志物 (biomarker)。①首先在多组样本中采用非参数因子 Kruskal-Wallis 秩和检验检测不同分组间丰度差异显著的物种；②再利用上一步中获得的显著差异物种，用成组的 Wilcoxon 秩和检验来进行组间差异分析；③最后用线性判别分析 (LDA) 对数据进行降维和评估差异显著的物种的影响力 (即 LDA score)。

5.4.12 菌群功能预测分析

PICRUSt2 是一款基于标记基因序列来预测功能丰度的软件。本研究默认预测测序样品中的 COG 和 KO 丰度。使用 PICRUSt2 软件，预测已知微生物基因功能的构成，从而统计不同样本和分组之间在功能上的差异。

5.4.12.1 基于 16S 的 KEGG 功能预测

KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, 京都基因及基因组百科全书)，是一个有关生物系统较完善的数据库，关联基因组信息和功能信息的知识库。其由基因蛋白序列 (KEGG genes)、具有内源性和外源性的化学物质 (KEGG ligand)、分子相互作用和代谢通路图 (KEGG pathway) 和各种生物之间的层次关系 (KEGG brite) 构成。根据功能分级，通常将 KEGG 分为 3 个层级，即 level1、level2 和 level3。其中 level1 包含 6 个分类：Metabolism、Genetic information processing、Environmental information processing、Cellular processes、Organismal systems 和 Human diseases (具体物种注释可能有删减)；level2 包含 Cell growth and death、Transcription 和 Development 等 44 个分类 (具体物种注释可能有删减)；level3 即为常规富集使用的数百个 Pathway，从 level1 到 level3 功能更具体，反之，更概括。将预测 KEGG 结果在 3 个 level 上 (两组根据 Wilcoxon 算法、多组根据 Kruskal-Wallis 算法) 统计差异，对差异结果绘制热图和条形图。

5.4.12.2 基于 16S 的 COG 功能预测

COG 即 Clusters of orthologous groups of proteins。构成每个 COG 的蛋白都被假定为来自一个祖先蛋白。Orthologs 是指来自不同物种的由垂直家系 (物种形成) 进化而来的蛋白，并且典型地保留与

原始蛋白有相同的功能。Paralogs 是那些在一定物种中的来源于基因复制的蛋白,可能会进化出新的与原来有关的功能。通过观看其主页和说明文档,可以理解为 COG 是 NCBI 的数据库。COG 的中文释义即“同源蛋白簇”。COG 分为两类,一类是原核生物的,另一类是真核生物的。原核生物的一般称为 COG 数据库。将预测 COG 结果进行(两组根据 Wilcoxon 算法、多组根据 Kruskal-Wallis 算法)统计差异,对差异绘制热图和条形图。

真菌和古菌无此分析。

参考文献

- BLAXTER M, MANN J, CHAPMAN T, et al., 2005. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 360 (1462): 1935-1943.
- BOLGER A M, LOHSE M, USADEL B, 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data [J]. *Bioinformatics*, 30 (15): 2114-2120.
- CAPORASO J G, BITTINGER K, BUSHMAN F D, et al., 2009. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment [J]. *Bioinformatics*, 26 (2): 266-267.
- CAPORASO J GREGORY, KUCZYNSKI JUSTIN, STOMBAUGH JESSE et al., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. *Nat. Methods*, 7: 335-6.
- CHAO A, 1984. Non-parametric estimation of the classes in a population [J]. *Scandinavian Journal of Statistics*, 11 (4): 265-270.
- COOLEN M J L, HOPMANS E C, RIJPSTRA W I C, et al., 2004. Evolution of the methane cycle in Ace Lake (Antarctica) during the Holocene: response of methanogens and methanotrophs to environmental change [J]. *Organic Geochemistry*, 35 (10): 1151-1167.
- DEGNAN P H, OCHMAN H, 2012. Illumina-based analysis of microbial community diversity [J]. *ISME J.*, 6: 183-198.
- DESANTIS T Z, HUGENHOLTZ P, LARSEN N, et al., 2006. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 72 (7): 5069-5072.
- DOUGLAS G M, MAFFEI V J, ZANEVELD J, et al., 2019. PICRUST2: an improved and extensible approach for metagenome inference [J]. *bioRxiv*: 672295.
- EDGAR R C, HAAS B J, CLEMENTE J C, et al., 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection [J]. *Bioinformatics*, 27 (16): 2194-2200.
- ESTY W W, 1986. The Efficiency of good's nonparametric coverage estimator [J]. *Annals of Statistics*, 14 (3): 1257-1260.
- FAITH D P, BAKER A M, 2005. Phylogenetic diversity (PD) and biodiversity conservation: some bioinformatics challenges [J]. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2 (2): 121-128.
- LOBO, 2008. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [J]. *J. Mol. Biol.*, 215 (3): 403-410.
- LUMINI E, ORGIAZZI A, BORRIELLO R, et al., 2010. Disclosing arbuscular mycorrhizal fungal biodiversity in soil through a land-use gradient using a pyrosequencing approach [J]. *Environmental Microbiology*, 12 (8): 2165-2179.
- MAGOČ T, SALZBERG S L, 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. *Bioinformatics*, 27 (21): 2957-2963.
- POLY F, MONROZIER L J, BALLY R, 2001. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil [J]. *Research in Microbiology*, 152

- (1): 95–103.
- QUAST C, PRUESSE E, YILMAZ P, et al., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 41: D590–D596.
- REYON D, TSAI S Q, KHAYTER C, et al., 2012. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing [J]. *Nat. Biotechnol.*, 30: 460–465.
- ROGNES T, FLOURI T, NICHOLS B, et al., 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics [J]. *Peer J.*, 4: e2584.
- SIMPSON E H, 1949. Measurement of diversity [J]. *Nature*, 163: 688.
- TAMAKI H, WRIGHT C L, LI X Z, et al., 2011. Analysis of 16S rRNA amplicon sequencing options on the Roche/454 next-generation titanium sequencing platform [J]. *PLoS One*, 6: e25263.
- TOLLI J, KING G M, 2005. Diversity and structure of bacterial chemolithotrophic communities in pine forest and agroecosystem soils [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (12): 8411–8418.
- WANG Q, GARRITY G M, TIEDJE J M, et al., 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 5261–5267.

附录 6 土壤优势功能微生物分离培养及鉴定方法

6.1 意义、范围与质控

为调查不同类型土壤典型微生物菌种功能潜力，需分离培养典型的具有不同功能微生物菌种。根据微生物的功能特质，进行选择性的筛选、分离和保存。本方法适用于分离培养土壤中普适性功能菌株纤维素分解菌、固氮细菌以及土壤典型致病菌青枯菌、尖孢镰刀菌。质控过程包括元数据和第二代测序数据的一致性检查、读取数据质量评估，接头序列及末端序列过滤和筛选等参照 FastQC 指导要求执行。

6.2 材料试剂

6.2.1 土壤

本方法所使用土壤为刚从样地中采集或采集后于 4 °C 储存的土壤。

6.2.2 试剂

- (1) 硫酸铵 [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, SIGMA, catalog number: A4418-100G]。
- (2) 氯化钠 (NaCl, SIGMA, catalog number: S7653-250G)。
- (3) 硫酸钾 (K_2SO_4 , SIGMA, catalog number: 223492-500G)。
- (4) 磷酸氢二钾 (K_2HPO_4 , SIGMA, catalog number: 1051041000-250G)。
- (5) 硫酸镁 (MgSO_4 , SIGMA, catalog number: M7506-500G)。
- (6) 氯化钙 (CaCl_2 , SIGMA, catalog number: C4901-100G)。
- (7) α -萘胺 ($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NH}_2$, SIGMA, catalog number: 34390-250MG)。
- (8) 葡萄糖 ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, SIGMA, catalog number: D9434-250G)。
- (9) 羧甲基纤维素钠盐 [$\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_2(\text{OH})_2\text{OCH}_2\text{COONa}$, SIGMA, catalog number: C5013-500G]。
- (10) 明胶 (SIGMA, catalog number: 70151-500G)。
- (11) 乙醇 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, SIGMA, catalog number: E7023-500ML)。
- (12) 亚硝酸钠 (NaNO_2 , SIGMA, catalog number: S2252-500G)。

- (13) 碳酸钠 (Na_2CO_3 , SIGMA, catalog number: 222321-500G)。
- (14) 磺胺酸 [$4-(\text{H}_2\text{N})\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H}$, SIGMA, catalog number: 121573-250G]。
- (15) 乙酸 ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$, SIGMA, catalog number: 695092-100ML)。
- (16) 甘露醇 ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$, SIGMA, catalog number: PHR1007-1G)。
- (17) 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4 , SIGMA, catalog number: PHR1330-5G)。
- (18) 磷酸钙 ($\text{Ca}_3\text{O}_8\text{P}_2$, SIGMA, catalog number: 21218-1KG)。
- (19) 氯化镁 (MgCl_2 , SIGMA, catalog number: M8266-100G)。
- (20) 氯化钾 (KCl, SIGMA, catalog number: P9541-500G)。
- (21) 二苯胺 [$(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{NH}$, SIGMA, catalog number: 242586-500G]。
- (22) 浓硫酸 (H_2SO_4 , SIGMA, catalog number: 339741-500ML)。
- (23) 亚硫酸氢钠 (NaHSO_3 , SIGMA, catalog number: 243973-500G)。
- (24) 亚硫酸钠 (Na_2SO_3 , SIGMA, catalog number: 239321-500G)。
- (25) 1,2,4-氨基萘酚磺酸 [$\text{H}_2\text{NC}_{10}\text{H}_5(\text{OH})\text{SO}_3\text{H}$, SIGMA, catalog number: 398969-25G]。
- (26) 氯化铁 (FeCl_3 , SIGMA, catalog number: 157740-100G)。
- (27) 碳酸钙 (CaCO_3 , SIGMA, catalog number: 239216-500G)。
- (28) 钾长石粉 (SIGMA, catalog number: NIST70B-40G)。
- (29) 多黏菌素硫酸盐 (SIGMA, catalog number: C4461-100MG)。
- (30) 放线菌酮 ($\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{NO}_4$, 上海吉至生化科技有限公司, catalog number: A49960-1G)。
- (31) 2,3,5-氯化三苯基四氮唑 ($\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{ClN}_4$, SIGMA, catalog number: T8877-5G)。
- (32) 牛肉膏 (MACKLIN, catalog number: B885959-500G)。
- (33) 蛋白胨 (SIGMA, catalog number: 70175-500G)。
- (34) 青霉素 ($\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4$, SIGMA, catalog number: 61305-25MG)。
- (35) 氯霉素 ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$, SIGMA, catalog number: R4408-10ML)。
- (36) 结晶紫 ($\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{Cl}$, SIGMA, catalog number: C0775-25G)。
- (37) 杆菌肽 ($\text{C}_{66}\text{H}_{103}\text{N}_{17}\text{O}_{16}\text{S}$, SIGMA, catalog number: 08382-50DISCS-F)。
- (38) *L*-天门冬酰胺 ($\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$, MACKLIN, catalog number: L800638-10G)。
- (39) 乙二胺四乙酸铁钠 ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{NaFeO}_8$, SIGMA, catalog number: E6760-100G)。
- (40) *D*-半乳糖 ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, SIGMA, catalog number: G0750-10G)。
- (41) 五氯硝基苯 ($\text{C}_6\text{Cl}_5\text{NO}_2$, SIGMA, catalog number: 45653-250MG)。
- (42) 牛胆汁 (SIGMA, catalog number: T6260-100MG)。
- (43) 四硼酸钠 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, SIGMA, catalog number: 221732-500G)。
- (44) 硫酸链霉素 (MACKLIN, catalog number: S6153-10g)。
- (45) 磷酸 (H_3PO_4 , SIGMA, catalog number: 345245-500ML)。
- (46) 甘油 (SIGMA, catalog number: G7893)。
- (47) 琼脂粉 (SIGMA, catalog number: A7921-100G)。
- (48) 细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (Solarbio, catalog number: D2100)。
- (49) 琼脂糖 (Biowest, catalog number: G-10)。
- (50) PCR 引物 (Life Technologies)。
- (51) PCR 反应体系试剂 (TAKARA, catalog number: B110006)。
- (52) 胶回收试剂盒 (Wizard 83[®] SV Gel and PCR Clean-up System, Promega, catalog number: A9282)。
- (53) 三羟甲基氨基甲烷 (Tris, Vetec, catalog number: V900483-500G)。
- (54) 上样缓冲液 (TAKARA, catalog number: 9156)。

6.2.3 耗材

- (1) 镊子 (Jinzhong, catalog number: JD5020)。
- (2) 剪刀 (Jinzhong, catalog number: J21130)。
- (3) 切胶刀片 (Jinzhong, catalog number: J11010)。
- (4) 滤纸 (SEP, catalog number: DXLZ11F)。
- (5) 50 mL 离心管 (BD Falcon, catalog number: 352070)。
- (6) 微量离心管 (2 mL, 5 mL; Eppendorf, catalog number: 022363352, 30119401)。
- (7) 塑料研磨棒 (Huuaobio, catalog number: SLXMB-1.5)。
- (8) 13 cm 方型培养皿 (Axygen, catalog number: ASJ-17-9142)。
- (9) 60 mm 培养皿 (Corning, catalog number: 430166)。
- (10) 96 孔 PCR 板 (Jet Keen Biotechnology, catalog number: PC-0200-9B)。
- (11) 12 通道移液器 (10 μ L, 100 μ L, 300 μ L; Eppendorf, catalog numbers: 3122000027, 3122000043, 3122000060)。
- (12) 单道移液器 (10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1 000 μ L; Eppendorf, catalog numbers: 3120000020, 3120000038, 3120000046, 3120000054, 3120000062)。
- (13) 移液器吸头 (nuclease-free, 10 μ L, 200 μ L, 1 000 μ L; Axygen, catalog numbers: T-300, T-200-Y, T-1000-B)。
- (14) Parafilm 封口膜 (Bemis, catalog number: PM-996)。
- (15) 96 孔 PCR 板封板膜 (Axygen, catalog number: PCR-TS)。
- (16) 称量纸 (Dingguo, catalog number: PP-P-002)。
- (17) 一次性乳胶手套 (Dingguo, catalog number: GV-RST-M)。
- (18) 试管 (Greiner, catalog number: 16910)。

6.2.4 仪器

- (1) 生物安全柜 (Thermo Fisher Scientific, catalog number: BSC-1000IIA2)。
- (2) 旋涡混合器 (TIAGEN BIOTECH, catalog number: OSE-VS-01)。
- (3) 电子天平 (Mettler Toledo, catalog number: AL104)。
- (4) 平板摇床 (Kylin-Bell Lab Instruments, catalog number: TS-2)。
- (5) 微孔板离心机 (TIAGEN BIOTECH, catalog number: OSE-MP26)。
- (6) PCR 仪 (T100TM 99; BIO-RAD, model: 1861096)。
- (7) 电泳仪 (JUNYI-DONGFANG, catalog number: JY300HC)。
- (8) 凝胶成像仪 (BIO-RAD, model: Universal Hood II)。
- (9) 酶标仪 (Molecular Devices[®] 102, model: PARADIGM)。
- (10) 紫外分光光度计 (Thermo Fisher Scientific, model: NanoDrop ND-2000)。
- (11) 磁力架 (Thermo Fisher Scientific, catalog number: 12321D)。
- (12) 高速微型离心机 (Thermo Fisher Scientific, model: Heraeus Pico 17)。
- (13) 遗传分析仪 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, model: 3730XL)。
- (14) -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱 (Thermo Fisher Scientific, model: 907)。
- (15) -20 $^{\circ}$ C 冰箱 (Haier, catalog number: DW-40L92)。

6.3 功能细菌分离培养实验步骤

6.3.1 土悬液制备

(1) 从样地里采集土壤样品, 装在全无菌 50 mL 离心管或全无菌自封袋中 (4 $^{\circ}$ C 储存) 尽快转移至实验室进行后续操作。

(2) 利用灭菌镊子、药匙等去除石子、植物根系、无法粉碎的大块土壤等杂质, 在电子天平上

称取 5 g 土壤，放置在灭菌的 250 mL 三角烧瓶中，加入 100 mL 灭菌 10 mmol/L $MgCl_2$ ，用封口膜封口，在平板摇床上于常温在 180 r/min 下摇 30 min。

(3) 放置在常温静置 15 min。

(4) 将上层悬液转移至无菌 50 mL 离心管，注意不能带有下层土壤。

(5) 利用分光光度计测量土壤悬液 OD_{600} 值，加入灭菌 10 mmol/L $MgCl_2$ ，调整至 $OD_{600} = 0.5$ ，静置 30 min。

6.3.2 功能细菌的分离培养及纯化

6.3.2.1 纤维分解菌

(1) 制备纤维素培养基：称取 2.0 g 纤维素、2.0 g 明胶、0.25 g $MgSO_4$ 、0.5 g KH_2PO_4 加入 1 000 mL 蒸馏水中，将 pH 调节至 6.8~7.2。自然固体培养基加 1.5% 琼脂。将 5 mL 培养基分装于试管中，管中贴于内壁放一滤纸条，一半浸入培养液内，一半露于空气中，于 121 °C 下灭菌 30 min。

(2) 滤纸条是以普通的滤纸剪成 5 cm×0.7 cm 的纸条。如呈酸性反应，先以碱性溶液（在自来水中加入 1 或 2 滴浓碱液即可），浸泡 4~5 h，取出用自来水冲洗，烘干使用。

(3) 选取 5 个稀释度（ 10^{-5} ~ 10^{-1} ）的土壤悬液接种，每管接土壤悬液 1 mL，每个稀释度的悬液重复 4 管。另取 4 支培养基不接种悬液而接种无菌水作对照。在接入土壤稀释液时，需经过露于液面的滤纸条流入培养基中。于 28 °C 条件下培养 14 天，检查各试管中滤纸条上细菌菌落的出现及滤纸变薄、断裂、色素产生情况。记录测试结果。

(4) 对纤维素分解细菌进一步分离与纯化，吸取上述不同稀释度的培养物 1 mL 加入新鲜的液体纤维素培养基中进行富集培养，必要时可反复两次进行富集培养。从各富集培养物中取 80 μ L 的液体涂布到固体纤维素培养基中。最后在 28 °C 培养箱中培养以长出菌落，根据形态学差异，挑选不同的单克隆子，随后将不同的单克隆子分别接种在纤维素固体培养基再进行划线纯化（可进行多次的划线纯化工作），最后进行下一步的菌种保存和 DNA 提取工作。

6.3.2.2 固氮细菌

(1) 制备酵母浸出物-甘露醇（YEM）培养基：称取 10.00 g 甘露醇、0.20 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.10 g NaCl、0.50 g K_2HPO_4 、0.20 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、0.01 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 、1.00 g 酵母提取物加入 1 000 mL 蒸馏水中（pH=6.7~7），自然固体培养基加 1.5% 琼脂。将 5 mL 培养基分装于试管中，管中紧贴内壁放一滤纸条，一半浸入培养基内，一半露于空气中，于 121 °C 下灭菌 30 min。

(2) 选取 4 个稀释度（如 10^{-4} ~ 10^{-1} ）的土壤悬液，每一稀释度的悬液接种 4 支试管（即 4 次重复），每管接种 1 mL。另取 4 支培养基不接种悬液而接种无菌水作对照。于 28 °C 条件下培养 7 天后，如滤纸上出现褐色菌落，则表示有自生固氮菌的生长。记录测试结果。

(3) 对固氮菌进一步分离与纯化，吸取上述不同稀释度的培养物 1 mL 加入新鲜的液体酵母浸出物-甘露醇培养基中进行富集培养，必要时可反复两次进行富集培养。从各富集培养物中 80 μ L 的液体涂布到酵母浸出物-甘露醇固体培养基中，置于 28 °C 温箱中培养 7 天后根据形态学差异，挑选不同的单克隆子，随后将不同的单克隆子分别接种在酵母浸出物-甘露醇固体培养基再进行划线纯化（可进行多次的划线纯化工作），最后进行下一步的菌种保存和 DNA 提取工作。

6.3.2.3 青枯菌

(1) 制备青枯菌选择性培养基：①牛肉膏蛋白胨（NA）培养基：牛肉膏 3 g，蛋白胨 10 g，NaCl 5 g，琼脂 20 g，水 1 000 mL，pH 7.0~7.2。②青枯菌选择性培养基（SMSA 培养基）：待 NA 培养基冷却至 60 °C 以下时，迅速加入无菌青霉素 1.5 mg（每 1 000 mL 培养基加入量，下同）、氯霉素 1.5 mg、结晶紫 1.5 mg、杆菌肽 7.5 mg、多黏菌素硫酸盐 15 mg、放线菌酮 15 mg、2,3,5-氯化三苯基四氮唑（TTC）15 mg。自然固体培养基加 1.5% 琼脂，于 121 °C 下灭菌 30 min。

(2) 选取 6 个稀释度（如 10^{-7} ~ 10^{-2} ）的土壤悬液，吸取不同稀释度的土壤溶液各 80 μ L，分别涂布于青枯菌 SMSA 固体培养基置于 28 °C 培养箱中培养 3~7 天。待菌落长出后根据形态学差异，挑选不同的单克隆子，随后将不同的单克隆子分别接种在牛肉膏蛋白胨（NA）固体培养基再进行划线

纯化（可进行多次的划线纯化工作），最后进行下一步的菌种保存和 DNA 提取工作。

6.3.2.4 尖孢镰刀菌

(1) 制备尖孢镰刀菌的选择性培养基（Komada 培养基）：称取 1.0 g K_2HPO_4 、0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.5 g KCl、0.01 g Fe-Na-EDTA、2.0 g L-天门冬酰胺、20 g D-半乳糖溶于约 300 mL 水中，定容至 1 000 mL。自然固体培养基加 1.5% 琼脂，于 121 °C 下灭菌 30 min。待培养基冷却至 60 °C 以下时，迅速加入无菌 1.0 g 五氯硝基苯（每 1 000 mL 培养基加入量，下同）、0.5 g 牛胆汁、1 g $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 、0.3 g 硫酸链霉素，再用 10% 磷酸将 pH 调至 3.8~4.0，然后倒平板备用。

(2) 选取 6 个稀释度（如 10^{-7} ~ 10^{-2} ）的土壤悬液，吸取不同稀释度的土壤溶液各 80 μ L，分别涂布于尖孢镰刀菌选择性固体培养基置于 28 °C 培养箱中培养 3~7 天。待菌落长出后，通过形态观察，找出不同的单菌落，随后将不同的单菌落分别接种在尖孢镰刀菌选择性固体培养基上再进行划线纯化（可进行多次的划线纯化工作），最后进行下一步的菌种保存和 DNA 提取工作。

6.3.3 微生物保存——甘油保存法

(1) 将 6.3.2 分离得到的纯菌株接种于其对应的液体培养基，于 28 °C、180 r/min 摇床振荡培养至对数生长期（ $OD_{600} = 0.6 \sim 0.8$ ）。

(2) 将 50% 甘油（等体积蒸馏水加等体积甘油）、2 mL 离心管/保藏管、枪头等试验用品于 121 °C 灭菌 20 min。

(3) 无菌条件下将菌液与 50% 浓度的甘油 1 : 1 等体积混合到保藏管中，最终甘油终浓度为 25%。

(4) 将上述保藏管于 -80 °C 冰箱保存。

6.4 功能菌株的鉴定

6.4.1 DNA 提取

(1) 待提取 DNA 菌株的准备：将保藏的菌种接种到对应的液体培养基中（各菌株对应的液体培养基见 6.3.2 功能细菌的分离培养及纯化），于 28 °C、180 r/min 摇床振荡培养活化至细胞进入对数生长期（ $OD_{600} = 0.8$ ）。

(2) 细菌基因组 DNA 提取试剂盒使用前先在漂洗液中加入无水乙醇，根据不同规格的试剂盒加入相应体积。

(3) 取活化的菌悬液 1 mL，12 000 r/min 离心 1 min，尽量吸尽上清液。

(4) 向细菌沉淀中加入 500 μ L 试剂盒裂解液（溶液 A），振荡至菌体充分悬浮。

(5) 向悬浮液中加入 20 μ L 的 RNase A（10 mg/mL），于 55 °C 放置 10 min。

(6) 加入 20 μ L 的蛋白酶 K（10 mg/mL），充分混匀，于 55 °C 水浴消化 30 min。消化期间可颠倒离心管混匀数次，12 000 r/min 离心 10 min。将上清液转移到一个新的离心管中。如有沉淀，可再次离心。

(7) 加入 500 μ L 溶液 B，充分混匀。如出现白色沉淀，于 55 °C 放置 5 min，沉淀即会消失，不影响后续实验。如溶液未变清亮，说明样品消化不彻底，可能导致提取的 DNA 量少及不纯，还有可能导致上柱后堵柱子，应增加消化时间。

(8) 加入 500 μ L 无水乙醇，充分混匀，此时可能会出现絮状沉淀，不影响 DNA 的提取，可将溶液和絮状沉淀都加入吸附柱中，放置 2 min（分两次加入，每次 700 μ L）。

(9) 12 000 r/min 离心 2 min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。

(10) 向吸附柱中加入 600 μ L 漂洗液（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），于 12 000 r/min 离心 1 min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。

(11) 向吸附柱中加入 600 μ L 漂洗液，于 12 000 r/min 离心 1 min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。

(12) 12 000 r/min 离心 2 min，将吸附柱置于室温或 50 °C 温箱放置数分钟，目的是将吸附柱中

残余的漂洗液去除，否则漂洗液中的乙醇会影响后续的实验，如酶切、PCR 等。

(13) 将吸附柱放入一个干净的离心管中，向吸附膜中央悬空滴加 50~200 μL 经 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴预热的洗脱液，室温放置 5 min，于 12 000 r/min 离心 2 min。

(14) 离心所得洗脱液再加入吸附柱中，室温放置 2 min，于 12 000 r/min 离心 2 min，即可得到高质量的基因组 DNA。

6.4.2 PCR 扩增

(1) 准备好用于 PCR 扩增的 DNA 模板，做好各个模板的标记。

(2) 功能细菌鉴定使用通用引物（上游引物）27F：5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'；（下游引物）1492R：5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' 进行扩增；真菌鉴定使用通用引物（上游引物）ITS1：5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'；（下游引物）ITS4：5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' 进行扩增。

(3) 在生物安全柜中，将以下 PCR 反应体系进行混合（表附录 6-1）。

表附录 6-1 PCR 反应体系

反应成分	体积/ μL
2 \times Taq PCR Mix	25
引物 27F	1
引物 1492R	1
DNA 模板	2
ddH ₂ O	21
总计	50

(4) 利用 PCR 仪根据以下反应条件进行 PCR 扩增（表附录 6-2）。

表附录 6-2 PCR 反应条件

步骤	温度/ $^{\circ}\text{C}$	时间	循环数
预变性	95	2.5 min	
变性	95	15 s	35
退火	55	30 s	
延伸	72	1 min	
最终延伸	72	10 min	
保持	4		

(5) 获得扩增产物后，将 3.0 μL 的 PCR 产物、3.0 μL Marker 和阴性对照通过 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，利用微量紫外分光光度计（NanoDrop ND-2000）测定扩增产物的浓度。

(6) 根据 PCR 产物浓度进行等浓度混样，充分混匀后使用 1 \times TAE 浓度 2% 的琼脂糖胶电泳纯化 PCR 产物，选择目标条带割胶，使用胶回收试剂盒回收目标条带，将回收的 PCR 产物进行测序鉴定。

6.4.3 序列分析及鉴定

(1) 使用遗传分析仪（Applied Biosystems, Foster City, CA, USA）进行测序。

(2) 得到某菌株的测序结果（碱基序列）。

(3) 在美国国家生物技术信息中心（National Center for Biotechnology Information, NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）的 BLAST 的 GeneBank 中进行同源序列搜索。

(4) 从结果中选择同源性较高的菌株进行多序列比对，构建系统发育树，确定功能纯菌的生物

分类学信息。

参考文献

- 李振高, 骆永明, 滕应, 2008. 土壤与环境微生物研究法 [M]. 北京: 科学出版社.
- GU Y, WANG X, YANG T, et al., 2020. Chemical structure predicts the effect of plant-derived low-molecular weight compounds on soil microbiome structure and pathogen suppression [J]. *Funct. Ecol.*, 34: 2158–2169.
- KIM M, OH H S, PARK S C, et al., 2014. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes [J]. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64: 346–351.
- KOMADA H, 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil [J]. *Rev. Plant Prot. Res.*, 8: 114–125.
- LÓPEZ A C, ALIPPI A M, 2019. Feasibility of using RFLP of PCR-amplified 16S rRNA gene(s) for rapid differentiation of isolates of aerobic spore-forming bacteria from honey [J]. *J. Microbiol. Methods*, 165: 105690.

附录 7 土壤功能基因组测序方法

7.1 意义、范围与质控

为探明全国不同土壤中细菌、真菌、古菌、原生动物、显微藻类生物群体所有基因组功能潜力, 需开展土壤生物功能基因组高通量测序。功能基因组质控过程包括元数据和测序数据的一致性检查、测序数据的质量检测、低质量测序序列的过滤及切除、接头序列及无关序列的剔除、宿主及污染序列的过滤、混合样本的数据分割等, 参照扩增子测序指导附录 5 要求执行。

7.2 基因组第二代测序实验基本流程

土壤样品→DNA 抽提→核酸质检→DNA 片段化→文库构建→上机测序→数据质检。

7.3 实验主要设备

基因组第二代测序主要设备见表附录 7-1。

表附录 7-1 主要设备清单

编号	设备名称	描述
1	PCR 仪	利用 PCR 技术对特定 DNA 扩增
2	离心机	用于分离液体与固体颗粒或液体与液体的混合物中各组分
3	电泳仪	用于将获得的 DNA 样品进行组分分析或单个组分提取
4	电泳槽	凝胶电泳系统的核心部分, 用于盛放缓冲液和凝胶
5	磁力架	用于蛋白质和核酸等小体积样品的高效磁性分离

(续表)

编号	设备名称	描述
6	涡旋混合仪	用于多种样品混匀和涡旋振荡操作
7	移液器	用于定量转移液体
8	分光光度计	分析样品特定波长处或一定波长范围内光的吸收度
9	片段分析仪	用于判定文库片段大小
10	核酸定量仪	用于测定核酸浓度
11	测序仪	用于对文库进行测序
12	超声打断仪	用于对初始 DNA 进行片段化处理

7.4 实验操作流程模块

7.4.1 核酸提取

不同土壤 DNA 提取试剂盒方法略有差异，以具体试剂盒标准方法为主，本方法列举常规试剂盒提取及高盐碱土壤试剂盒提取。

7.4.1.1 常规土壤 DNA 提取操作步骤

(1) 直接添加 250 mg 以内的待测土壤样品到裂解管中，然后添加 750 μL 的裂解液到裂解管中，在涡旋仪上在最大速下振荡 5 min 以上混匀（如果使用高频振荡器时间可以适当缩短）。

(2) 将裂解管放到离心机里，在 $\geq 10\,000\text{ g}$ 下离心 1 min。

(3) 将步骤 (2) 所得上清液 400 μL 加到 1 号过滤柱（试剂盒内备有耗材）中，并套在一个收集管里，在 8 000 g 的离心力条件下离心 1 min。丢弃过滤柱。

(4) 添加 1 200 μL 的基因组 DNA 裂解液（试剂盒内备有试剂）到上一步的收集管中充分混匀。

(5) 从步骤 (4) 获得的混合液中吸取 800 μL 加到 2 号过滤柱（试剂盒内备有耗材）中，在 10 000 g 下离心 1 min，倒掉收集管中废液。

(6) 重复进行步骤 (5) 的操作，尽量保证所有裂解液都进行过柱处理。

(7) 将 2 号柱套在一个新的收集管内，添加 200 μL 的基因组 DNA 洗涤液 1（试剂盒内备有试剂）到 2 号柱中，在 $\geq 10\,000\text{ g}$ 条件下离心 1 min。

(8) 添加 500 μL 的基因组 DNA 洗涤液 2（试剂盒内备有试剂）到 2 号柱中，在 $\geq 10\,000\text{ g}$ 下离心 1 min。

(9) 将 2 号柱移至干净的 1.5 mL 离心管中，添加 $\geq 50\text{ }\mu\text{L}$ 的基因组 DNA 洗脱液到柱基质上（洗脱液事先在 65~70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热效果更好），室温下放置 2~5 min，在 $\geq 10\,000\text{ g}$ 下离心 1 min 来洗脱基因组 DNA。

(10) 将抑制物去除柱套在一个收集管内，添加 600 μL 的抑制物去除液，在 $\geq 8\,000\text{ g}$ 条件下离心 3 min。

(11) 将洗脱的基因组 DNA 放入制备好的抑制物去除柱内，抑制物去除柱套在一个干净的 1.5 mL 离心管内，并在 16 000 g 条件下离心 3 min，得到的 DNA 样品进行后续 PCR 等试验。

7.4.1.2 高盐碱土壤 DNA 提取操作步骤

(1) 称出 1 g 样品到无菌研钵中（使用 6~10 cm 直径的研钵。每次只取出一个样品，以尽量减少 DNA 在室温下的降解），再加入 0.5 g 无菌石英砂到研钵中。石英砂可酌情增加用量。在研钵中加入足够的液氮快速冷却石英砂和研钵。

注意：如果 1 g 土壤样品不够用，可在以下步骤中增加土壤样品用量和按比例增加试剂量（如 DNA 提取缓冲液、蛋白酶 K、SDS 和异丙醇等）。本方案也适用于其他类型的环境样品（污泥、水、

木材等），但样品量要视情况而定。

(2) 开始研磨样品，如果加入的液氮太少已经消耗完，立即加入新的液氮。研磨样品时尽量控制在研钵里的一个小区域内。一直研磨直到样品开始融化。研磨时尽可能保持样品处于冷冻状态。

注意：如果样品冷冻后结块难以研磨，可以放置稍微解冻，但一定要加入 0.2~0.4 mL 的 DNA 提取缓冲液，记录准确的使用量 V_1 。当温度升高时，缓冲液可以抑制 DNA 降解。

(3) 重复步骤 (2)，冷冻研磨 2 次（共 3 次）。

(4) 当样品仍处于冷冻状态时，用刮刀把样品集中到研钵的中心（如有必要，加入更多的液氮保持样品冷冻）。转移样品到新的 15 mL 离心管中。

注意：此时如果不能立即进行 DNA 提取，样品要保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下，直到准备好进行下一步的 DNA 提取。

(5) 在上述准备好的样品中加入 3.3 mL DNA 提取缓冲液（含有 CTAB）。缓冲液的总容量应该是 3.3 mL，如果在冷冻研磨过程中添加过该缓冲液，并且使用量为 V_1 (mL)，则这一步添加的缓冲液体积为 $3.3 - V_1$ 。

注意：如果土壤杂质太多，但含有足够的 DNA，可以增加缓冲液总体积至 5 mL。

(6) 加入 12.2 mL 蛋白酶 K (10 mg/mL)，轻轻地混合。

注意：如果在步骤 (5) 中加入 5 mL 缓冲液，则加入 18.5 μL 蛋白酶 K。

(7) $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min，其间 5~10 min 倒转混合 1 次。

(8) 加入 0.37 mL 20% 的 SDS，轻轻地混合。

注意：如果在步骤 (5) 中加入 5 mL 缓冲液，则加入 0.56 mL 20% 的 SDS。

(9) $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 h，每 15~30 min 轻柔地倒转混合 1 次。

(10) $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 6 000 g 离心 20 min。

(11) 转移上清液到 Oak Ridge tubes 中（使用半透明的 Oak Ridge tubes），尽量不要碰到白色的表层。

注意：如果样品中有太多的有机杂质（如蛋白质），可以转移上清液到 15 mL 锥形离心管中用于氯仿提取。

(12) 加入 1.2 mL DNA 提取缓冲液（含有 CTAB）到剩余的沉淀中涡旋混匀。

注意：如果在步骤 (5) 中加入 5 mL 缓冲液，则加入 1.8 mL 含有 CTAB 的 DNA 提取缓冲液。

(13) 加入 0.13 mL 20% 的 SDS，轻柔地混合。

注意：如果在步骤 (5) 中加入 5 mL 缓冲液，则加入 0.2 mL 20% 的 SDS。

(14) $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴静置 15 min。

(15) $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 6 000 g 离心 20 min。

(16) 转移上清液与步骤 (11) 所得的上清液混合，转移过程中避免碰到白色表层。

注意：如果样品中有太多的有机杂质（如蛋白质），在下一步之前，加入与上清液等体积的氯仿：异戊醇（1：24）混合液，在通风橱中用圆盘旋转混匀仪连续倒转混合 5~10 min。3 700 g 离心 20 min。转移上清液到一个新的锥形离心管中。加入新的等体积氯仿：异戊醇再萃取 1 次。然后转移上清液到 Oak Ridge tubes 中。

(17) 加入 0.6 μL 的 2-异丙醇（使用量要精准控制在 0.6 μL ）。

(18) 在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中静置过夜。低温有助于 DNA 沉淀。

(19) 从冰箱取出样品， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴加热。在进行下一步之前，确保样品是完全加热的并且所有的沉淀都溶解了。在离心前加热样本可以溶解静置一整夜产生的所有矿物沉淀。

注意：尽可能彻底地溶解所有矿物沉淀，需要 30~45 min。

(20) $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 室温下 15 000 g (RCF) 离心 20 min（确保离心机处于室温状态，如果太冷，样品中的矿物沉淀就会析出）。离心后立即将上清液转移到新的离心管中（保留上清液直到通过后续步骤确认得到 DNA，否则需要重复这一步）。

(21) 在 Oak Ridge tubes 的 DNA 沉淀中加入 1 mL 冰的 70% 乙醇清洗 DNA 沉淀。15 000 g 离心

5 min, 去掉乙醇。

注意: 如果 DNA 沉淀杂质太多, 可以清洗两次。可以使用移液枪尽可能彻底地去除乙醇。一些纯净的 DNA 可能是不可见的。如果去除乙醇之前不离心或者下一步中不充分溶解 DNA 就转移, 就有可能损失一部分 DNA。

7.4.1.3 DNA 样品保存及处理

得到的 DNA, 长期保存时, 应冻存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。在后续实验中, 应先将 DNA 于冰上解冻 (提前 1h 开始解冻), 解冻后将 DNA 轻轻涡旋混匀后离心, 再进行后续实验。

7.4.1.4 DNA 样品质控标准

浓度不低于 $10\text{ ng}/\mu\text{L}$, A260/280 数值范围在 1.8~2.0, 凝胶电泳结果能看到完整条带。

7.4.2 核酸质量检测

7.4.2.1 琼脂糖凝胶电泳

对提取的基因组 DNA 进行琼脂糖电泳检测。凝胶成像结果表明有完整的基因组条带, 且无其他杂质的情况下判定为合格。

琼脂糖凝胶配置方法如下。

(1) 常用琼脂糖凝胶分别为 0.5%、1% 和 2% 的琼脂糖凝胶, 凝胶浓度选择主要取决于目的片段的大小和电泳时间。

(2) 以制备 1% 琼脂糖凝胶 (常用 400 mL/4 块) 为例: 称取 4 g 琼脂糖置于锥形瓶中, 加入 400 mL $1\times\text{TAE}$, 瓶口倒扣小烧杯。微波炉加热 (8 min) 琼脂糖全部融化 (底部无小气泡升起), 摇匀, 放置温度降到 $55\sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 加入 $40\text{ }\mu\text{L}$ 溴化乙锭 ($10\text{ }\mu\text{L}/\text{块}$), 摇匀, 即成 1.0% 琼脂糖凝胶液。

注意: 2% 琼脂糖凝胶, 以上述体系为例, 即加入 2 g 琼脂糖及 100 mL $1\times\text{TAE}$ 。

(3) 胶板制备: 取制胶板洗干净晾干, 在固定位置放入 28 孔梳子 (24 孔样品, 2 孔 Marker, 两边各留 1 孔不用, 以防止边孔电泳时跑歪)。将冷却已加入溴化乙锭的琼脂糖凝胶液混匀小心地倒入制胶板中, 使胶液缓慢展开到固定刻度线高度, 轻轻晃动制胶板, 使整个制胶板表面形成均匀胶层。

(4) 室温下, 静置直至凝胶完全凝固, 添加 $1\times\text{TAE}$ 电泳缓冲液覆盖电泳胶, 再垂直轻拔梳子, 使胶孔充满缓冲液; 连内槽一起取出胶块, 加入样品及 Marker, 之后将凝胶及内槽放入电泳槽中。添加 $1\times\text{TAE}$ 电泳缓冲液至没过胶板为止。

(5) 胶块摆放应保证每个泳道平行于电泳场, 保证 DNA 条带在凝胶中垂直移动, $5\text{ V}/\text{cm}$, 电泳 20 min。

(6) 凝胶成像时, 摆正胶块, 拍照。

7.4.2.2 纯度定量

使用 NanoDrop ND-2000 完成核酸纯度的测定, 用于鉴定核酸纯度。A260/280 纯度值为 1.5~2.2 时判定为合格样本。

(1) 测量前必须将样本混匀 (涡旋 5 s)。

(2) 检测后立即使用拭镜纸擦拭机器接头, 先取一张将上下机器接头部的液体吸走, 再将此拭镜纸吸附过样品的面反折到内部, 折叠 4 次后以单方向多次擦拭台面 (至少 5 次)。

(3) 同一滴液体只能做一次检测, 欲重复定量同一样品, 应擦拭掉前一滴液体后, 添加新液体。

(4) 核酸样品可使用 $1\sim 2\text{ }\mu\text{L}$ 做测量, 推荐使用 $2\text{ }\mu\text{L}$ 移液器, 以避免体积不足无法准确测定核酸含量。

(5) 不可将任何含有腐蚀性溶液的样品用于测量, 仅可用无腐蚀性的液体溶解 DNA 并进行测定。

(6) 大批量样本测定时, 每 50 个样本需进行一次纯水重置归零。

7.4.2.3 浓度定量

使用 Quantus Fluorometer (Promega) 完成核酸浓度的测定, 将荧光染料与特异的靶分子结合来鉴定核酸浓度。浓度 $\geq 2\text{ ng}/\mu\text{L}$ 判断为合格。

- (1) 每天使用 QuantiFluor® dsDNA System 配置荧光染料及制定标曲。
- (2) 在 0.5 mL 定量管中加入 99 μL 1 \times TE、1 μL 样品、100 μL 染料，振荡混匀，避光静置 5 min。
- (3) 将定量管放入仪器中进行浓度读取。

7.4.3 DNA 片段化

此处为超声法片段化，如选择其他方法，请参照对应的标准方法执行。

7.4.3.1 超声法 DNA 打断实验操作

- (1) 打开超声打断仪，加入去离子水，进行设备预冷。
- (2) 将适量的样品（一般在 100~1 000 ng）转移至打断管中，用 ddH₂O 补足体积至固定的刻度线（总体积 130 μL ）。
- (3) 选择预置的大小为 400 bp 程序，点击启动打断程序（可根据 DNA 完整性调整打断时间）。

7.4.3.2 DNA 片段化后质量控制

琼脂糖凝胶电泳，参考 7.4.2.1 进行琼脂糖凝胶电泳，检验片段化后的产物目的条带是否集中在期望区间内。

7.4.4 DNA 片段化产物定量

使用荧光定量仪对切胶回收后的 PCR 产物进行浓度定量。

- (1) 根据试剂说明构建标准曲线。
- (2) 在 0.5 mL 定量管中分别加入 99 μL 1 \times TE Buffer、1 μL 样品、100 μL 稀释好的染料工作液。
- (3) 将混合物涡旋 5 s，短暂离心，并在室温下避光温育 5 min，然后读取读数。
- (4) 根据定量后得到的片段化 DNA 浓度，计算文库构建时需要加入的 DNA 体积，尽量确保 DNA 文库起始量是一致的。

7.4.5 文库构建

使用文库试剂盒完成文库构建，通过末端修复、添加接头、PCR 扩增以及磁珠纯化完成文库构建。

7.4.5.1 末端修复以及 A-tailing 组装

- (1) 在离心管或者 PCR 板中完成单独的末端修复和 A-tailing 组装反应。反应体系见表附录 7-2。

表附录 7-2 末端修复和 A-tailing 组装反应体系

组分	体积/ μL
Fragmented DNA (1ng~1 μg)	32
NEXTflex End-Repair & Adenylation Buffer Mix	15
NEXTflex End-Repair & Adenylation Enzyme Mix	3
体系总体积	50

- (2) 轻微涡旋上述混合物并短暂离心后放置到冰中，保证管中或板中的组分混匀。立即进行下一步操作。

- (3) 热循环仪孵育 40 min（表附录 7-3）。

表附录 7-3 热循环仪孵育温度梯度程序

步骤	温度/ $^{\circ}\text{C}$	时间/min
末端修复和 A-tailing 组装	22	20
	72	20
保持	4	

7.4.5.2 接头连接

- (1) 根据建库起始量对接头用量进行控制，必要时稀释接头至合适的浓度。
- (2) 在已经完成的末端修复和 A-tailing 的管中连接接头（表附录 7-4）。

表附录 7-4 接头连接操作体系

组分	体积/ μL
末端修复的 DNA 混合物	50
NEXTflex Barcode Adater（根据投入 DNA 总量进行稀释）	2.5
NEXTflex Ligase Enzyme Mix	47.5
体系总体积	100

- (3) 用移液枪上下吹吸混匀 15~20 次（关键步骤），短暂离心。
- (4) 在 22 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min（实验完成后立即纯化）。

7.4.5.3 连接接头后纯化

- (1) 在同一个板/管中，使用磁珠纯化（表附录 7-5）。

表附录 7-5 磁珠纯化体系

组分	体积/ μL
上步链接接头后的混合物	100
Agencourt [®] AMPure [®] XP beads	80
体系总体积	180

- (2) 通过移液器反复抽吸，将磁珠与 DNA 彻底混合。
- (3) 在室温下将混合物孵育 5~15 min，使 DNA 结合到磁珠子上。
- (4) 将管放在磁力架上通过磁力吸附磁珠。静置孵育直至液体澄清。
- (5) 使用移液器小心吸出并丢弃上清液，注意不要吸到磁珠。
- (6) 添加 200 μL 的 80% 乙醇洗涤磁珠。
- (7) 在磁力架上，于室温条件静置孵育 ≥ 30 s。
- (8) 使用移液器小心吸出并丢弃乙醇，注意不要吸到磁珠。
- (9) 添加 200 μL 的 80% 乙醇。
- (10) 在磁力架上，于室温条件静置孵育 ≥ 30 s。
- (11) 使用移液器小心吸出并丢弃乙醇，注意不要吸到磁珠。此步在不影响磁珠的情况下，尽可能去除掉液体组分。
- (12) 在室温下将磁珠干燥 1~3 min，或直到所有乙醇都蒸发掉为止。
- (13) 从磁体架上将管取下。
- (14) 彻底重悬磁珠：加入 32 μL 的洗脱缓冲液（10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0~8.5），反复抽吸，以保证所有磁珠均已重悬于缓冲液中。
- (15) 在室温下孵育 3 min，从磁珠上将 DNA 洗脱。
- (16) 将管放置在磁力架上，室温静置 3~5 min 直至液体变为澄清状态。
- (17) 转移 30 μL 上清液到新的离心管或 PCR 管中，该步骤后可暂停，将纯化后的产物放置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存留用。

7.4.5.4 文库扩增

- (1) 将每个文库扩增反应组装，见表附录 7-6。

表附录 7-6 文库扩增反应体系

组分	体积/ μL
NEXTflex PCR Master Mix	12
NEXTflex Primer Mix	2
加接头后 DNA 文库	20
PCR-grade water	16
体系总体积	50

(2) 充分混匀并短暂离心。

(3) 使用以下循环参数进行扩增（表附录 7-7）。

表附录 7-7 PCR 扩增程序方法

流程	温度/ $^{\circ}\text{C}$	反应时间	循环数
预变性	98	2 min	循环数参考说明书，根据相对应的文库总质量判断
变性	98	30 s	
退火	65	30 s	
延伸	72	1 min	
终延伸	72	4 min	
保持	4		

根据表附录 7-8 选择文库扩增循环数 [根据输入的 DNA 文库总质量 ($1\text{ ng}\sim 1\text{ }\mu\text{g}$) 使用循环数]。

表附录 7-8 输入的 DNA 文库总质量与扩增循环数关系

Adapter 连接文库 DNA/ ng	生成 $1\text{ }\mu\text{g}$ 文库 DNA 所需的循环数
500	2~4
100	5~6
50	7~8
10	9~10
5	11~12
1	11~15

7.4.5.5 文库扩增后纯化

(1) 在同一管中，执行磁珠纯化（表附录 7-9）。

表附录 7-9 磁珠纯化体系

组分	体积/ μL
Library Amplification reaction product	50
Agencourt [®] AMPure [®] XP beads	50
体系总体积	100

- (2) 通过移液器反复抽吸，将磁珠与 DNA 彻底混合。
- (3) 在室温下将混合物孵育 5~15 min，使 DNA 结合到磁珠子上。
- (4) 将管子放在磁力架上通过磁力吸附磁珠。静置孵育直至液体澄清。
- (5) 使用移液器小心吸出并丢弃上清液，注意不要吸到磁珠。
- (6) 添加 200 μL 的 80% 乙醇洗涤磁珠。
- (7) 在磁力架上，于室温条件静置孵育 ≥ 30 s。
- (8) 使用移液器小心吸出并丢弃乙醇，注意不要吸到磁珠。
- (9) 添加 200 μL 的 80% 乙醇。
- (10) 在磁力架上，于室温条件静置孵育 ≥ 30 s。
- (11) 使用移液器小心吸出并丢弃乙醇，注意不要吸到磁珠。此步在不影响磁珠的情况下，尽可能去除掉液体组分。
- (12) 在室温下将磁珠干燥 1~3 min，或直到所有乙醇都蒸发掉为止。
- (13) 从磁体架上将管取下。
- (14) 彻底重悬磁珠：加入 55 μL 的洗脱缓冲液（10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0~8.5），反复抽吸，以保证所有磁珠均已重悬于缓冲液中。
- (15) 在室温下孵育 3 min，从磁珠上将 DNA 洗脱。
- (16) 将管放置在磁力架上以捕获磁珠。室温静置孵育直至液体变为澄清状态。
- (17) 将澄清的上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中，此时管中即为制备好的 DNA 文库。
- (18) 将构建好的文库 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。保留部分文库以便补测使用。如于冻存状态下取出分装，应先置于冰中溶解，待完全溶解后轻轻涡旋混匀再进行分装。

7.4.5.6 文库质检

将构建好的文库进行片段大小的检测，目标条带长度应为目的片段加双端接头长度，即构建宏基因组文库时，目的片段大小应为 400 bp 左右，加双端接头后，文库大小为 520 bp 左右。接头单端大小为 60 bp 左右。将构建好的文库用 Quantus Fluorometer (Promega) 定量检测，文库浓度高于 5 ng/ μL 的视为合格。

7.5 上机测序

使用 Illumina Novaseq 6000 PE150 平台进行基因组测序，每个样品测序 Raw data 不低于 10 GB。根据文库质检的片段大小和定量结果，结合每个文库要测定的数据量进行计算和 pooling，pooling 后的样本根据测序仪的标准流程进行稀释变性和上机的操作（此步骤根据仪器给的标准操作规程进行）。

7.6 数据分析

7.6.1 测序序列统计与质控

采用 Fastp 软件及 R 对原始测序数据进行质量评估。

为了得到高质量的测序数据以提高后续生物信息分析准确性，首先需要对原始下机数据进行质控和过滤，主要参考如下条件。

- (1) 剪切序列 3' 端和 5' 端的 adapter 序列。
- (2) 剔除平均质量值低于 20 以及含氮碱基的 reads。
- (3) 剔除序列长度小于 50 bp 的序列。

7.6.2 序列组装

采用 MEGAHIT 软件将各个样本的 Clean Reads 组装为 Contigs。

7.6.3 基因预测

采用 Prodigal 软件对拼接结果中大于等于 300 bp 的 Contig 进行 ORF 预测。选择核酸长度大于等

于 100 bp 的基因，并将其翻译为氨基酸序列。

7.6.4 非冗余 Genes 集构建

采用 CD-HIT 软件对大于筛选后基因进行去冗余。

7.6.5 基因丰度计算

采用 SOAPaligner 将各个样本的 clean reads 比对到非冗余 genes，使用默认参数为：95% identity。最终得到各个样本中各个基因的表达量（RPKM）。

7.6.6 物种与功能注释

采用 DIAMOND 软件将非冗余 genes 比对到各个物种与功能数据库（NR、COG、KEGG、card 等），使用参数“blastp; --max-target-seqs 1”。筛选出“ $evaluate \leq 1e-5$ ”的比对结果，将基因表达量（RPKM）值累加到 gene 的物种和功能分类上作为 gene 的物种丰度和功能丰度。

7.6.7 Alpha 多样性指数计算统计

为了进行样本多样性之间的比较，在分析前需要统一抽样深度，以校正测序深度不同引起的基因多样性差异。在该统一深度下计算不同样本的多样性指数，并汇总成表格。统计的指数包括：

- (1) Observed_OTUs：直接检测到的基因种类数。
- (2) Chao1：用于估计样本中功能基因 Richness 总数，数值越大，代表功能基因越多。

$$S_{\text{Chao1}} = S_{\text{obs}} + \frac{n_1(n_1 - 1)}{2(n_2 + 1)} \quad (7-1)$$

式中， S_{Chao1} ——估计的功能基因数；

S_{obs} ——实际观测到的功能基因数；

n_1 ——只含有一条序列的功能基因数目（如“singletons”）；

n_2 ——只含有两条序列的功能基因数目（如“doubletons”）。

(3) Shannon：用来估算样本中功能基因的多样性指数之一。它与 Simpson 多样性指数均为常用的反映 Alpha 多样性的指数。Shannon 值越大，说明群落功能基因多样性越高。

$$H_{\text{Shannon}} = - \sum_{i=1}^{S_{\text{obs}}} \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N} \quad (7-2)$$

式中， S_{obs} ——实际观测到的功能基因数目；

n_i ——第 i 个功能基因所含的序列数；

N ——所有的序列数。

(4) Evenness：功能基因均匀度是指某一群落或生境中全部功能基因数目的分配状况，其反映了各物种个体数目分配的均匀程度。可以用基于 Shannon-Wiener 指数计算功能基因多样性，功能基因均匀度的计算公式为

$$J = \frac{H'}{\ln S} \quad (7-3)$$

式中， S ——群落内的功能基因数；

H' ——Shannon-Wiener 多样性指数。

7.6.7.1 Alpha 多样性指数差异分析

基于各样本的多样性指数，可以检验组间样本的 Alpha 多样性是否存在显著差异。基于 Wilcoxon 秩和检验（两组样本）或 Kruskal-Wallis 秩和检验（3 组或 3 组以上样本）对组间多样性指数进行差异分析，以 $P < 0.05$ 作为差异显著性筛选阈值，并使用 Bonferroni 方法对 p 进行多重假设检验校正，用以评估组间功能基因多样性是否存在显著差异。

7.6.7.2 群落柱形图

根据分类学分析结果，可知不同分组（或样本）中物种、功能或基因的结构组成情况。群落柱形图可以直观呈现两方面信息：①各样本在某一分类学水平上含有何种物种、基因和功能；②样本中各物种、基因和功能的相对丰度（所占比重）。

软件：基于相应的分类学数据表，利用 R 语言工具作图。

7.6.8 功能基因 Beta 多样性分析

7.6.8.1 样本层级聚类

利用树枝结构描述和比较多个样本物种、基因或功能的相似性和差异关系。首先使用统计算法 Bray-Curtis 计算两两样本间距离，获得 Beta 多样性距离矩阵，之后根据距离矩阵进行层级聚类 (hierarchical clustering) 分析，使用非加权组平均法 UPGMA 算法构建树状结构，得到树状关系形式用于可视化分析。

软件：QIIME 计算 Beta 多样性距离矩阵，然后用 R 语言作图画树。

7.6.8.2 PCoA

PCoA 是一种研究数据相似性或差异性的可视化方法，与 PCA 类似，主要区别在于 PCA 基于欧氏距离，PCoA 可基于欧氏距离以外的其他距离（默认 Bray-Curtis 距离），通过降维找出影响样本群落组成或功能差异的潜在主成分。

PCoA 通过一系列的特征值和特征向量进行排序后，选择主要排在前几位的特征值，PCoA 可以将多特征的高维数据投影到较低维空间，从多元事物中解析出主要影响因素，获取反映数据最大变化解释度的信息，直观展示样本点间的差异，同时可根据样本分布推断分组类别与样本实际分布的可能性关系，通过 PCoA 可以在物种、基因、COG 和 KEGG 代谢功能等层次上进行分析观察个体或群体间的差异。

软件：R 语言 PCoA 分析和作 PCoA 图。

7.6.8.3 NMDS

非度量多维尺度 (NMDS) 分析 (Shi et al., 2018) 是一种将多维空间的研究对象 (样本或变量) 简化到低维空间进行定位、分析和归类，同时又保留对象间原始关系的数据分析方法。适用于无法获得研究对象间精确的相似性或相异性数据，仅能得到它们之间等级关系数据的情形。其基本特征是将对象间的相似性或相异性数据看成点间距离的单调函数，在保持原始数据次序关系的基础上，用新的相同次序的数据列替换原始数据进行度量型多维尺度分析。换句话说，当资料不适合直接进行变量型多维尺度分析时，对其进行变量变换，再采用变量型多维尺度分析，对原始资料而言，就称之为非度量型多维尺度分析。其特点是根据样本中包含的物种或功能信息，以点的形式反映在多维空间上，而对不同样本间的差异程度，则通过点与点之间的距离体现，最终获得样本的空间定位点图。NMDS 可以对不同样品在物种、基因、COG 和 KEGG 代谢功能等层次上进行分析 (默认选择 Bray-Curtis 距离)。

软件：QIIME 计算 Beta 多样性距离矩阵，R 语言 vegan 软件包进行 NMDS 分析及作图。

7.6.8.4 PERMANOVA 分析

又称 Adonis 分析，可利用半度量 (如 Bray-Curtis) 或度量距离矩阵 (如 Euclidean) 对总方差进行分解，通过线性模型分析不同分组因素或环境因子 (如临床表型数据、土壤理化指标等) 对样品差异的解释度，并使用置换检验进行显著性分析。

软件：R 语言 vegan 包或 QIIME 软件。

7.6.9 物种与功能贡献度分析

基于样本的物种和功能相对丰度，进行物种丰度与功能丰度之间的关联分析，找出特定物种的功能贡献度以及特定功能的物种贡献度。该分析既可以研究 TOP/特定功能或代谢途径主要存在于哪些物种，也可以分析 TOP/特定物种所具有的主要功能或代谢途径。

7.6.10 生物地球化学循环功能分析

生物地球化学循环 (biogeochemical cycle)，即在地球表层生物圈中，生物有机体经由生命活动，从其生存环境的介质中吸取元素及其化合物 (常称矿物质)，通过生物化学作用转化为生命物质，同时排泄部分物质返回环境，并在其死亡之后又被分解成为元素或化合物 (亦称矿物质) 返回环境介质中。这一个循环往复的过程，称为生物地球化学循环。生物地球化学循环还包括从一种生物体 (初级生产者) 到另一种生物体 (消费者) 的转移或食物链的传递及效应。

7.6.10.1 碳固定功能注释分析

基于碳固定标记基因集，从宏基因组 KEGG 注释结果中筛选功能基因信息，获得各功能基因在不同样本中的丰度信息。

7.6.10.2 氮循环功能注释分析

基于氮循环标记基因集，从宏基因组 KEGG 注释结果中筛选功能基因信息，获得各功能基因在不同样本中的丰度信息。

7.6.10.3 磷循环功能注释分析

基于磷循环标记基因集，从宏基因组 KEGG 注释结果中筛选功能基因信息，获得各功能基因在不同样本中的丰度信息。

7.6.10.4 硫循环功能注释分析

基于硫循环标记基因集，从宏基因组 KEGG 注释结果中筛选功能基因信息，获得各功能基因在不同样本中的丰度信息。

7.6.11 耐性基因功能注释分析

7.6.11.1 耐盐性功能注释分析

基于耐盐标记基因集，从宏基因组 KEGG 注释结果中筛选功能基因信息，获得各功能基因在不同样本中的丰度信息。

7.6.11.2 耐酸性功能注释分析

基于耐酸标记基因集，从宏基因组 KEGG 注释结果中筛选功能基因信息，获得各功能基因在不同样本中的丰度信息。

7.6.11.3 耐旱性功能注释分析

基于耐旱标记基因集，从宏基因组 KEGG 注释结果中筛选功能基因信息，获得各功能基因在不同样本中的丰度信息。

7.6.12 病毒及有益菌功能注释分析

基于有益菌乳酸菌 (*Lactobacillus*) 及土壤病毒标记基因集，从宏基因组 KEGG 注释结果中筛选功能基因信息，获得各功能基因在不同样本中的丰度信息。

参考文献

- BESEMER J, BORODOVSKY M, 1999. Heuristic approach to deriving models for gene finding [J]. *Nucleic Acids Res.*, 27 (19): 3911–3920.
- BUCHFINK B, XIE C, HUSON D H, 2015. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND [J]. *Nat. Methods*, 12 (1): 59–60.
- CHEN L, ZHENG D, LIU B, et al., 2016. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis 10 years on [J]. *Nucleic Acids Res.*, 44 (D1): D694–D697.
- CHEN S, ZHOU Y, CHEN Y, et al., 2018. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor [J]. *Bioinformatics*, 34 (17): i884–i890.
- HUERTA-CEPAS J, SZKLARCZYK D, FORSLUND K, et al., 2016. eggNOG 4.5: a hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences [J]. *Nucleic Acids Res.*, 44 (D1): D286–D293.
- KENT W J, SUGNET C W, FUREY T S, et al., 2002. The human genome browser at UCSC [J]. *Genome Res.*, 12 (6): 996–1006.
- LANGMEAD B, SALZBERG S L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 [J]. *Nat. Methods.*, 9 (4): 357–359.
- LI D, LIU C M, LUO R, et al., 2015. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and

- complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph [J]. *Bioinformatics*, 31 (10): 1674–1676.
- LIU B, POP M, 2009. ARDB: Antibiotic Resistance Genes Database [J]. *Nucleic Acids Res.*, 37 (Database issue): D443–D447.
- LIU C M, WONG T, WU E, et al., 2012. SOAP3: ultra-fast GPU-based parallel alignment tool for short reads [J]. *Bioinformatics*, 28 (6): 878–879.
- LI W, GODZIK A., 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences [J]. *Bioinformatics*, 22 (13): 1658–1659.
- LOMBARD V, GOLACONDA R H, DRULA E, et al., 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013 [J]. *Nucleic Acids Res.*, 42 (Database issue): D490–D495.
- PARKS D H, TYSON G W, HUGENHOLTZ P, et al., 2014. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles [J]. *Bioinformatics*, 30 (21): 3123–3124.
- QIN N, YANG F, LI A, et al., 2014. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis [J]. *Nature*, 513 (7516): 59–64.
- SCHLOSS P D, WESTCOTT S L, RYABIN T, et al., 2009. Introducing Mothur: open – source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75 (23): 7537–7541.
- SEGATA N, WALDRON L, BALLARINI A, et al., 2012. Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes [J]. *Nat Methods.*, 9 (8): 811–814.
- SHI Y C, GUO H, CHEN J, et al., 2018. Initial meconium microbiome in Chinese neonates delivered naturally or by cesarean section [J]. *Sci. Rep.*, 8 (1): 3255.
- XIE C, MAO X, HUANG J, et al., 2011. KOBAS 2.0: a web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases [J]. *Nucleic Acids Res.*, 39 (Web Server issue): W316–W322.
- ZHENG Z, ZHONG W, LIU L, et al., 2016. Bioinformatics approaches for human gut microbiome research [J]. *Infectious Diseases and Translational Medicine*, 2 (2): 69.
- ZHU W, LOMSADZE A, BORODOVSKY M, 2010. Ab initio gene identification in metagenomic sequences [J]. *Nucleic Acids Res.*, 38 (12): e132.

附录 8 土壤线虫分离鉴定方法

土壤线虫是数量和功能类群最为丰富的一类土壤动物，根据已发表的线虫种类估算，地球上的线虫至少有 10 万种。线虫在土壤食物网中占有重要的地位，在维持土壤生态系统稳定、促进物质循环和能量流动方面发挥着重要的生态功能。由于土壤线虫占据多个营养级，且能够对环境变化或干扰做出迅速响应，具有作为指示生物的独特优势。

8.1 材料与试剂

8.1.1 材料

- (1) 8~10 cm 0.25 mm 孔径的筛网。
- (2) 无色、无味面巾纸。
- (3) 载玻片 (25 mm × 75 mm, 厚 1.0~1.2 mm)。

- (4) 盖玻片（20 mm × 20 mm，厚 0.13~0.16 mm）。
- (5) 塑料小皿（直径为 60 mm）。
- (6) 直径 120 mm 的漏斗。
- (7) 橡胶管。
- (8) 弹簧铗。
- (9) 浮载剂：线虫的固定液。
- (10) 封片剂：石蜡。
- (11) 挑针：通常用现成的金属丝。

8.1.2 试剂

- (1) 甲醛（分析纯 AR，37%~40%）。
- (2) 无水乙醇。
- (3) 福尔马林固定液（40%甲醛 8 mL、甘油 2 mL、蒸馏水 90 mL 配制成 100 mL 混合液 I）。
- (4) 甘油-酒精混合液（甘油-酒精混合液：30%酒精 95 mL、甘油 5 mL 配制成混合液 II）。
- (5) 蒸馏水（每瓶 500 mL）。
- (6) 丙三醇（甘油）（分析纯 AR，500 mL）。
- (7) 甘油。
- (8) 石蜡。

8.1.3 设备

- (1) 大容量低速离心机。
- (2) 体式显微镜。
- (3) 光学显微镜。
- (4) 水浴锅。
- (5) 干燥器。

8.2 实验步骤

8.2.1 土壤线虫分离方法

采用贝尔曼漏斗法分离土壤线虫。操作步骤如下。

- (1) 在直径 120 mm 的漏斗末端接一段橡胶管，在橡胶管后端用弹簧铗夹紧。
- (2) 在漏斗内放置 0.25 mm 的筛网。
- (3) 取 50~100 g 土样均匀铺在筛网上，加水浸没土壤。
- (4) 放置于室温条件下静置分离。
- (5) 静止 24 h 后，打开弹簧铗，放出橡胶管内的水 5~10 mL 于小瓶中。
- (6) 将水浴锅温度设定为 60 ℃，再将小瓶置于水浴锅中，加热 3 min 杀死线虫，取出，稍静置冷却。
- (7) 再在小瓶中加入 2~3 mL 福尔马林固定液进行固定，摇匀，写好标签和序号。

8.2.2 土壤线虫计数

在体式显微镜下对土壤样品中所有线虫进行计数，对获得的线虫总数统一换算成条/100 g 干土（注意：需要测定每个鲜土样品的含水量）。

8.2.3 土壤线虫的保存

将线虫水溶液放置到 50 mL 的离心管中，静置约 12 h 后吸出上层液体，保留 9 mL 线虫水溶液至 15 mL 的玻璃小瓶中，在 60 ℃ 水浴锅中水浴 5 min，等其冷却后，在每个样品的玻璃小瓶中加入 1 mL 福尔马林和甘油的混合液（40%福尔马林溶液：甘油=4：1）。

8.2.4 土壤线虫的制片

在福尔马林固定液中杀死线虫，让线虫样品在溶液中停留至少 24 h。24 h 后，转移要固定的剩余

部分于小皿中，并向小皿中加入甘油-酒精混合液。将样品放入干燥器中停留 15 天，使其慢慢脱水。15 天后观察样品不同部分的清晰度，确定是否可以做永久玻片。用挑针挑出需要的线虫，放入滴过一小滴甘油的玻片上，取一小片石蜡放在液体周围，用盖玻片盖在液体上。把玻片放在加热的铜板上，让石蜡完全熔化，密封住盖玻片下的液体，永久玻片制作完成。

8.2.5 土壤线虫的鉴定

在统计土壤线虫数量的基础上，随机抽取至少 150 条线虫在光学显微镜下进行科属鉴定，不足 150 条的需全部鉴定。将临时玻片置于光学显微镜（Olympus BX50）下，土壤线虫分类参照 Bongers（1988）、张晓珂等（2013）、Li 等（2017）的分类图鉴进行。

8.3 土壤线虫分子生物学鉴定方法

8.3.1 材料与试剂

- (1) 一次性口罩、无菌手套。
- (2) 面巾纸。
- (3) 0.5 mL 和 2 mL 离心管。
- (4) 无水乙醇。
- (5) DNeasy Blood & Tissue Kit 线虫 DNA 提取试剂盒。
- (6) 3NDf/C_1132rmod 引物。

8.3.2 仪器设备

- (1) 线虫提取富集相关材料（1 mm、0.25 mm、30 μm 不锈钢网筛、表面皿、天平、烧杯、2 L 的量杯等）。
- (2) 10 μL 、20~200 μL 、1 000 μL 的移液器。
- (3) 4 $^{\circ}\text{C}$ 、-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。
- (4) 真空泵。
- (5) 高压灭菌锅。
- (6) 恒温水浴锅。
- (7) 无菌工作台。
- (8) 离心机。
- (9) PCR 仪。

8.3.3 实验步骤

8.3.3.1 土壤线虫 DNA 提取

在提取线虫 DNA 之前，将每个样品的线虫悬液以 2 000 g 离心 10 min（或线虫悬液静置 2 h 以上）。弃去上清液后，保留约 2 mL 线虫悬液并转移到 2 mL 离心管中。然后将 2 mL 离心管以 6 000 g 离心 2 min，弃去上清液后，最终保留 0.5 mL 线虫悬液使用 DNeasy Blood & Tissue Kit 试剂盒（QIAGEN）进行线虫 DNA 提取。根据 DNeasy Blood & Tissue Kit 试剂盒的说明书，为了得到更多的线虫 DNA，使用双倍的裂解缓冲液（360 μL Buffer ATL，40 μL 蛋白酶 K）来充分浓缩和裂解线虫，消化时间延长至 1.5 h。具体的操作步骤如下（Du et al., 2020; 杜晓芳等, 2021）。

(1) 在保留 0.5 mL 线虫悬液的离心管中加入 360 μL Buffer ATL、40 μL 蛋白酶 K，涡旋 15 s 后水浴消化 1.5 h，水浴消化期间间断振荡（每隔 15 min 上下颠倒几次）。

(2) 涡旋 15 s，加入 400 μL Buffer ATL，涡旋混匀后加入 400 μL （96%~100%）的酒精，涡旋混匀。

(3) 用移液器将 2 mL 离心管中的所有液体转移至带有滤柱的 2 mL 收集管中（分几次转移视情况而定），6 000 g 离心 1 min，弃去离心液及收集管。

(4) 将滤柱转移到一个新的收集管中，加入 500 μL Buffer AW1，6 000 g 离心 1 min，弃去滤出液和收集管。

(5) 将滤柱转移到一个新的收集管中，加入 500 μL Buffer AW2, 18 000 g 离心 3 min 干燥滤柱，弃去滤出液和收集管。

(6) 将滤柱置于一个 1.5 mL 的离心管中，加入 100 μL （一般为 50~200 μL ）Buffer AE，室温孵化 1 min 后于 6 000 g 离心 1 min，最终得到线虫 DNA。

(7) 提取的线虫 DNA 储存在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱用于后续的 PCR 扩增和测序。

8.3.3.2 线虫群落的扩增测序

使用引物 3NDF/C_1132rmod 对线虫 18S rDNA V4 区进行扩增。PCR 采用 TransGen AP221-02: TransStart Fastpfu DNA Polymerase, 20 μL 反应体系: 5 \times FastPfu Buffer 4 μL , 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL , Forward Primer (5 $\mu\text{mol/L}$) 0.8 μL , Reverse Primer (5 $\mu\text{mol/L}$) 0.8 μL , FastPfu Polymerase 0.4 μL , BSA 0.2 μL , Template DNA 10 ng, 最后使用灭菌 PCR 水补足至 20 μL 。

线虫 PCR 反应参数: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 35 次循环后最终在 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。扩增之后, PCR 产物使用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行可视化, 使用 AxyPrep DNA 凝胶提取试剂盒 (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA) 进行纯化, 并使用 QuantiFluorTM-ST (Promega, USA) 对回收产物进行检测定量。根据 Illumina MiSeq 平台 (Illumina, San Diego, USA) 标准操作规程用纯化后的扩增片段构建 PE 300 文库。PCR 文库构建是在引物上合成 barcode, 采用混合样品建库的模式。具体构建文库的步骤为: ①连接“Y”字形接头; ②使用磁珠筛选去除接头自连片段; ③利用 PCR 扩增进行文库模板的富集; ④氢氧化钠变性, 产生单链 DNA 片段。利用 Illumina 公司的 MiSeq PE300 平台进行双端测序, 原始数据上传至 NCBI 数据库 (杜晓芳等, 2021)。

8.3.4 数据质控与生物信息分析

8.3.4.1 生物信息分析

使用 Trimmomatic 软件对原始测序序列进行质控, 使用 FLASH (<http://www.cbcb.umd.edu/software/flash>, version 1.2.7) 软件进行拼接。

(1) 过滤 reads 尾部质量值 20 以下的碱基及质控后 200 bp 以下的 reads, 去除含氮碱基的 reads。

(2) 根据 PE reads 之间的 overlap 关系, 将成对 reads 拼接成一条序列, 最小 overlap 长度为 10 bp。

(3) 拼接序列的 overlap 区允许的最大错配比率为 0.2, 去除无法拼接的序列。

(4) 根据序列首尾两端的 barcode 和引物区分样品, 并调整序列方向, barcode 需精确匹配, 引物允许 2 个碱基的错配。

8.3.4.2 OTU 聚类

使用 UPARSE 软件 (<http://drive5.com/uparse/>, version 7.1), 根据 97% 的相似度对序列进行 OTU 聚类, 具体流程如下。

(1) 提取优化序列中的非重复序列, 去除没有重复的单序列。

(2) 按照 97% 相似性对非重复序列 (不含单序列) 进行 OTU 聚类, 在聚类过程中去除嵌合体, 得到 OTU 代表序列。

(3) 将所有优化序列 map 至 OTU 代表序列, 选出与 OTU 代表序列相似性在 97% 以上的序列, 生成 OTU 表格。

8.3.4.3 分类学分析

通过 BLAST 搜索, 比对 NCBI NT 数据库对物种进行分类注释。

8.3.4.4 线虫多样性分析

为了进行样本多样性之间的比较, 分析前需要统一测序深度, 以校正测序深度不同引起的基因多样性差异。在该统一深度下计算不同样本的线虫多样性指数。

(1) Observed_species (OTUs): 直接观测到的线虫种类数。

(2) Chao1: 用于估计样本中物种总数, 数值越大, 代表物种越多。

$$S_{\text{Chao1}} = S_{\text{obs}} + \frac{n_1(n_1 - 1)}{2(n_2 + 1)} \quad (8-1)$$

式中, S_{Chao1} ——估计的 OTU 数目;

S_{obs} ——实际观测到的 OTU 数目;

n_1 ——只含有一条线虫的 OTU 数目;

n_2 ——只含有两条线虫的 OTU 数目。

(3) Shannon: 用来估算样本中线虫多样性指数之一。它与 Simpson 多样性指数均为常用的反映 Alpha 多样性的指数。Shannon 值越大, 说明群落多样性越高。

$$H_{\text{Shannon}} = - \sum_{i=1}^{S_{\text{obs}}} \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N} \quad (8-2)$$

式中, S_{obs} ——实际观测到的 OTU 数目;

n_i ——第 i 个 OTU 所含的序列数;

N ——所有的序列数。

(4) Evenness: 物种均匀度是指某一群落或生境中全部线虫物种个体数目的分配状况, 其反映了各物种个体数目分配的均匀程度。可以基于 Shannon-Wiener 指数计算物种多样性, 物种均匀度的计算公式为

$$J = \frac{H'}{\ln S} \quad (8-3)$$

式中, S ——群落内的物种数;

H' ——Shannon-Wiener 多样性指数。

8.3.4.5 线虫群落特征分析

线虫分类鉴定后, 对其种类及不同物种的数量情况进行统计, 可以获得各个线虫种类在每个样本中的丰度情况, 物种相对丰度分析方法如下。

$$\text{Relative abundance (\%)} = I_{\text{si}} / \sum N_{\text{si}} \times 100 \quad (8-4)$$

式中, I_{si} ——样本中单个线虫物种检测数量;

$\sum N_{\text{si}}$ ——样本中所有线虫物种检测总数量。

参考文献

- 陈小云, 刘满强, 胡锋, 等, 2006. 根际微型土壤动物—原生动物和线虫的生态功能 [J]. 生态学学报, 27 (8): 3132-3143.
- 杜晓芳, 梁文举, 李琪, 2021. 土壤线虫群落 DNA 提取、扩增及高通量测序 [J]. 微生物组实验手册: e2104085. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2104085>.
- 李玉娟, 吴纪华, 陈慧丽, 等, 2005. 线虫作为土壤健康指示生物的方法及应用 [J]. 应用生态学学报, 16 (8): 1541-1546.
- 骆静梅, 张晓珂, 梁文举, 2021. 土壤线虫采集、标本制作与数据分析 [J]. Bio - 101: e1010621. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1010621>.
- 毛小芳, 李辉信, 陈小云, 等, 2004. 土壤线虫三种分离方法效率比较 [J]. 生态学杂志 (3): 149-151.
- 尹文英, 1998. 中国土壤动物检索图鉴 [M]. 北京: 科学出版社.
- 张晓珂, 梁文举, 李琪, 等, 2013. 长白山森林土壤线虫——形态分类与分布格局 [M]. 北京: 中国农业出版社.
- BARKER K R, NUSBAUM C J, NELSON L A, 1969. Seasonal population dynamics of selected plant-parasitic nematodes as measured by three extraction procedures [J]. J. Nematol., 1 (3): 232-239.

- BONGERS T, BONGERS M, 1998. Functional diversity of nematodes [J]. *Applied Soil Ecology*, 10 (3): 239–251.
- BONGERS T, VAN DER HANS M, KORTHALS G, 1997. Inverse relationship between the nematode maturity index and plant parasite index under enriched nutrient conditions [J]. *Applied Soil Ecology*, 6 (2): 195–199.
- BONGERS T, 1988. De nematoden van Nederland; een identificatietabel voor de in Nederland aange- troffen zoetwater – en bodembewonende nematoden [M]. Voorschoten, The Netherlands: Stichting Uitgeverij Koninklijke Nederlandse Natuurhistorische Vereniging: 408.
- BONGERS T, 1990. The maturity index: An ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition [J]. *Oecologia*, 83 (1): 14–19.
- DU X F, LI Y B, HAN X, et al., 2020. Using high – throughput sequencing quantitatively to investigate soil nematode community composition in a steppe – forest ecotone [J]. *Applied Soil Ecology*, 152: 103562.
- FERRIS H, BONGERS T, 2009. Indices developed specifically for analysis of nematode assemblages [M] // *Nematodes as Environmental Indicators*. Wallingford UK: CABI: 124–145.
- FERRIS H, GRIFFITHS B S, PORAZINSKA D L, et al., 2012. Reflections on plant and soil nematode ecology: past, present and future [J]. *Journal of Nematology*, 44 (2): 115–126.
- FERRIS H, SANCHEZ–MORENO S, BRENNAN E B, 2012. Structure, functions and interguild rela- tionships of the soil nematode assemblage in organic vegetable production [J]. *Applied Soil Ecology*, 61: 16–25.
- FERRIS H, 2010. Form and function: metabolic footprints of nematodes in the soil food web [J]. *Euro- pean Journal of Soil Biology*, 46 (2): 97–104.
- JIANG Y J, LIU M Q, ZHANG J B, et al., 2017. Nematode grazing promotes bacterial community dy- namics in soil at the aggregate level [J]. *The ISME Journal*, 11: 2705–2717.
- JIANG Y J, LUAN L, HU K, et al., 2020. Trophic interactions as determinants of the arbuscular my- corrhizal fungal community with cascading plant – promoting consequences [J]. *Microbiome*, 8 (1): 142.
- LI Q, LIANG W, ZHANG X, et al., 2017. Soil nematodes of grasslands in Northern China [M]. Hangzhou: Zhejiang University Press; London: Academic Press.
- LIU M Q, CHEN X Y, QIN J T, et al., 2008. A sequential extraction procedure reveals that water management affects soil nematode communities in paddy fields [J]. *Applied Soil Ecology*, 40 (2): 250–259.
- YEATES G W, BONGERS T, DE GOEDE R D, et al., 1993. Feeding habits in nematode families and genera: an outline for soil ecologists [J]. *Journal of Nematology*, 25 (3): 315–331.
- YEATES G W, COLEMAN D C, 2021. Role of Nematodes in Decomposition [M] // *Nematodes in Soil Ecosystems*. Austin: University of Texas Press: 55–80.

附录 9 蚯蚓物种调查鉴定及线粒体基因测序方法

蚯蚓是土壤中生物量最大的一类大型土壤动物，其生命活动能够改善土壤结构，提高土壤肥力，指示土壤环境质量，在自然界物质循环和生态平衡中起着重要的作用，其组成和数量可作为评价土壤健康的一个重要生物指标。蚯蚓形态学鉴定质控可通过多家单位的土壤生物专家同时进行鉴定，将鉴定结果进行比对统一；蚯蚓线粒体基因测序结果质控，一方面在 DNA 提取扩增时严格按照技术规程进行，另一方面线粒体基因测序时包括元数据和测序数据的一致性检查、测序数据的质量检测、低质量测序序列的过滤及切除、接头序列及无关序列的剔除、污染序列的过滤、混合样本的数据分割等参照测序指导要求执行。

9.1 材料与试剂

9.1.1 试剂

- (1) 乙酸 (Rhawn, catalog number: R049946-500mL)。
- (2) 乙醇 (SIGMA, catalog number: E7023-500mL)。
- (3) 无脊椎动物 DNA 提取试剂盒 (OMEGA E. Z. N. A. TM, catalog number: D3373-01)。
- (4) PCR 引物 (Life Technologies)。
- (5) PCR 反应体系试剂 [Tran Taq Polymerase High Fidelity catalog (HiFi), catalog number: AP131-11]。
- (6) 2 000-bp Plus DNA 标准物 (DiNing, catalog number: DM1003)。
- (7) 甘油 (SIGMA, catalog number: G7893)。
- (8) 氯仿-异戊醇混合液 (Lianmai, catalog number: LM-100804)。

9.1.2 耗材

- (1) 铅笔 (Deli, catalog number: S907)。
- (2) 笔记本 (Deli, catalog number: 7952-A5-30)。
- (3) 镊子 (Jinzhong, catalog number: JD5020)。
- (4) 丁腈手套 (INTCO, catalog number: STDJY)。
- (5) 网筛 (PAMPAS, catalog number: 601011499100_GWc7T)。
- (6) 竹夹 (Muchun, catalog number: 1556299202_TZYNk)。
- (7) 大头针 (Deli, catalog number: 0039-3)。
- (8) 解剖套装 (TZZT, catalog number: 27001)。
- (9) 50 mL 离心管 (50 mL; BD Falcon, catalog number: 352070)。
- (10) 微量离心管 (1.5 mL, 5 mL; Eppendorf, catalog numbers: 0030125.150, 30119401)。
- (11) 单道移液器 (10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1 000 μ L; Eppendorf, catalog numbers: 3120000020, 3120000038, 3120000046, 3120000054, 3120000062)。
- (12) 移液器吸头 (nuclease-free, 10 μ L, 200 μ L, 1 000 μ L; Axygen, catalog numbers: T-300, T-200-Y, T-1000-B)。
- (13) 封口膜 (Bemis, catalog number: PM-996)。
- (14) 15 cm 圆形培养皿 (Axygen, catalog number: ASJ-17-9142)。
- (15) 切胶刀片 (Jinzhong, catalog number: J11010)。

(16) 核酸纯化柱 (Doyobio, catalog number: T316109)。

9.1.3 仪器

- (1) 相机 (Canon, model: EOS 90D)。
- (2) 解剖镜 (Nikon, model: SMZ800N)。
- (3) -80 ℃超低温冰箱 (Thermo Fisher Scientific, model: 907)。
- (4) -20 ℃冰箱 (Haier, catalog number: DW-40L92)。
- (5) 2~8 ℃医用冷藏箱 (Meiling, model: YC-330L)。
- (6) 高速离心机 (Eppendorf, model: 5810R)。
- (7) 旋涡混合器 (TIAGEN BIOTECH, catalog number: OSE-VS-01)。
- (8) 电泳仪 (JUNYI-DONGFANG, catalog number: JY300HC)。
- (9) 凝胶成像仪 (BIO-RAD, model: Universal Hood II)。
- (10) 紫外分光光度计 (Thermo Fisher Scientific, model: NanoDrop ND-2000)。
- (11) 电热恒温水浴锅 (Kanglu, model: HHS-4S)。
- (12) 电子天平 (Mettler Toledo, catalog number: AL104)。
- (13) PCR 仪 (T100TM 99 ; BIO-RAD, model: 1861096)。

9.2 实验步骤

野外采集的蚯蚓经脱水固定后中转至分析实验室, 分析实验室应在收到蚯蚓样本的 1~2 周内完成样本的形态学鉴定、蚯蚓线粒体 DNA 的提取, 以及标本制作。蚯蚓提取的线粒体 DNA 用甘油冻存在 -80 ℃超低温冰箱中, 避免反复冻融, 以提高样本中 DNA 的稳定性, 并尽快送基因测序公司测序。蚯蚓标本一般制作为液浸标本, 可常温保存, 蚯蚓标本管和 DNA 冻存管上标记二维码信息, 方便信息提取和快速查询。

9.2.1 蚯蚓物种形态学鉴定

蚯蚓物种形态学鉴定主要依据其外部形态特征和内部解剖特征。形态特征包括蚯蚓的大小和颜色, 口前叶、背孔起始位置, 刚毛特征, 生殖环带位置及形状, 性乳突、雄孔和雌孔位置、受精囊孔数目及位置等; 内部解剖特征包括隔膜、砂囊、盲肠、心脏、精巢囊、储精囊、前列腺、受精囊、副性腺等器官系统等。

(1) 取出固定处理好的蚯蚓样本于盛满无水乙醇的石蜡盘上, 使用解剖镜观察并记录背腹面体色、体长、体宽、体节、体环、背中line、口前叶、背孔、环带、刚毛、雄生殖孔、雌生殖孔、受精囊孔的外部形态特征或数量, 并于电脑上使用相机软件控制相机拍照。

(2) 将蚯蚓标本背面朝上于解剖盘上, 沿背中line向前, 用解剖剪小心剖开, 并用大头针固定。

(3) 镜检观察蚯蚓内部器官形态特征并记录。统一从蚯蚓头部环节起, 依次观察蚯蚓样本内部隔膜、砂囊、受精囊、精巢囊、储精囊、心脏、小肠、雌生殖孔、受精囊孔、雄生殖孔、前列腺与盲肠等的位置、数量与形状, 描述并记录特征, 并用电脑控制相机拍照。

(4) 物种分类时首先参考我国已有的蚯蚓物种形态特征。参考 Chen (1931, 1933, 1936, 1938, 1946)、Gates (1939, 1972)、陈义 (1956)、蒋际宝 (2016)、尹文英 (1998) 等已报道的蚯蚓特征表述进行详细比对鉴定。同时请专门的分类学家帮助完成。

9.2.2 蚯蚓样本 DNA 提取

(1) 采用无脊椎动物 DNA 提取试剂盒 (如 OMEGA 公司的 OMEGA E. Z. N. A.™ Mollusc DNA Kit), 提取富含糖类的环节动物组织细胞中的 DNA。

(2) 备用试剂配置: 在 DNA Wash Buffer 中加入 80 mL 无水乙醇, 混匀; 氯仿和异戊醇 (24:1) 振荡混匀; Elution Buffer 缓冲液 60~70 ℃水浴。

(3) 剪取小于 30 mg 的蚯蚓标本尾部肌肉, 细致清除干净附着其上的肠道部分及土壤杂质等, 用去离子水洗净, 剪碎后放置于 1.5 mL 微量离心管中。

(4) 依次加入 350 μL Buffer MBL 和 25 μL 蛋白酶 K, 涡旋混匀, 放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中 12~14 h, 直到微量离心管中大多数组织完全溶解。

(5) 在 1.5 mL 微量离心管中加入 350 μL 氯仿-异戊醇混合液, 涡旋混匀, 然后 $\text{RCF} = 10\,000\text{ g}$ 室温离心 2 min。小心提取 250 μL 上清液置于新的 1.5 mL 微量离心管中。加入 5 μL RNase A 酶到微量离心管内, 室温静置 10~30 min。

(6) 加入 250 μL Buffer MBL 到微量离心管内, 涡旋混匀 10~15 s, 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min。加入 250 μL 乙醇 (室温, 96%~100%) 到微量离心管内, 涡旋混匀 10~15 s。

(7) 将 750 μL 混合液转移到试剂盒提供的 2 mL 收集管上的收集柱中, 然后 $\text{RCF} = 10\,000\text{ g}$ 室温离心 1 min, 保留收集管, 丢弃下清液。再同样转速室温离心 1 min, 丢弃收集管与下清液。将收集柱放置在一个新的 2 mL 收集管中, 加入 500 μL HB Buffer 缓冲液, 然后 $\text{RCF} = 10\,000\text{ g}$ 室温离心 30 s, 丢弃下清液。

(8) 加入 700 μL DNA Wash Buffer 缓冲液, 然后 $\text{RCF} = 10\,000\text{ g}$ 室温离心 1 min, 丢弃下清液。重复 1 次, 再次丢弃下清液, 然后将收集柱与收集管 $\text{RCF} = 15\,000\text{ g}$ 室温离心 2 min。

(9) 将收集柱插入新的 1.5 mL 微量离心管中, 室温下开盖放置 2 min。加入 50 μL Elution Buffer 缓冲液, 温浴 2 min, 然后 10 000 g 室温离心 1 min。按照上述步骤重复 1 次, 以收获 100 μL 的 DNA。

(10) 判断 DNA 产量和质量: 将提取的 DNA 用 NanoDrop ND-200 测定其浓度, 并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。若总 DNA 完整且纯度为 85%~90%, 说明所得 DNA 的质量和浓度符合扩增要求。之后将 DNA 产物在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

9.2.3 线粒体基因扩增测序

(1) 设计以下引物进行线粒基因的扩增。

正向引物: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'。

反向引物: 5'-TATACTTCTGGGTGTCCGAAGAATCA-3'。

引物经由生物公司合成, 并配成 100 $\mu\text{mol/L}$ 储存液, 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。

(2) PCR 反应体系设置为 50 μL , 具体组成见表附录 9-1。

表附录 9-1 PCR 反应体系

成分	反应体系 (50 μL) / μL
DNA 模板	1
正向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)	2
反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)	2
2.5 mmol/L dNTPS	0.6
10 \times Trans Taq TM HiFi Buffer I	4
Trans Taq DNA polymerase High Fidelity (HiFi)	9.6
ddH ₂ O	加至 50

每轮实验均需要设置阴性对照组 (不加 DNA, 只加入相同体积的去离子水) 和阳性对照 (在同样的体系和条件下保证能扩增出的样品 DNA)。

(3) PCR 扩增条件设置见表附录 9-2。

表附录 9-2 PCR 扩增条件

步骤	温度/ $^{\circ}\text{C}$	时间/min	循环数
预变性	94	5	

（续表）

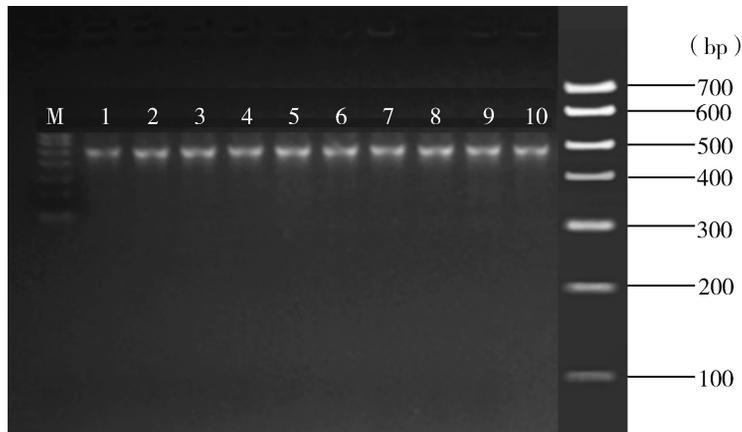
步骤	温度/℃	时间/min	循环数
变性	94	0.5	32
退火	50	0.5	
延伸	72	1	
最终延伸	72	10	
保持	4		

（4）获得扩增产物后，将 PCR 产物、3.0 μL Marker 和阴性对照通过 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，利用微量紫外分光光度计（NanoDrop ND-2000）测定扩增产物的浓度。

9.2.4 核酸质量检测

（1）琼脂糖凝胶电泳。

对提取的基因组 DNA 进行琼脂糖电泳检测。凝胶成像结果表明有完整的基因组条带，且无其他杂质的情况下判定为合格，如图附录 9-1。



图附录 9-1 琼脂糖凝胶电泳图示例

（2）根据 PCR 产物浓度进行等浓度混样，充分混匀后使用 1×TAE 浓度 2% 的琼脂糖胶电泳纯化 PCR 产物，选择目标条带割胶，使用胶回收试剂盒回收目标条带，将回收的 PCR 产物送至生物公司利用 Sanger 法进行双端测序鉴定。

（3）将测序获得原始数据导入 Chromas 软件生成序列峰图，判断结果序列质量。

（4）将测序峰图利用 DNASTar 校对准确后得到的 COI 基因序列在 NCBI GenBank 中进行 BLAST 相似性搜索，寻找匹配的同源蚯蚓物种序列，构建系统发育树，确定蚯蚓物种分类学信息。

9.3 蚯蚓群落特征分析

根据蚯蚓形态鉴定和分子鉴定的结果，结合采样信息记录统计各样点蚯蚓种类、数量和生物量。蚯蚓多样性指数主要包括如下 4 个指标。

（1）Observed species：直接观测到的蚯蚓种类数。

（2）Chao1：用于估计样本中物种总数，数值越大，代表物种越多。

$$S_{\text{Chao1}} = S_{\text{obs}} + \frac{n_1(n_1 - 1)}{2(n_2 + 1)} \quad (9-1)$$

式中， S_{Chao1} —— 估计的蚯蚓种类数；

S_{obs} —— 实际观测到的蚯蚓种类数；

n_1 ——只含有 1 条序列的蚯蚓种类数;

n_2 ——只含有 2 条序列的蚯蚓种类数。

(3) Shannon: 用来估算样本中蚯蚓多样性指数之一。它与 Simpson 多样性指数均为常用的反映 Alpha 多样性的指数。Shannon 值越大, 说明群落多样性越高。

$$H_{\text{Shannon}} = - \sum_{i=1}^{S_{\text{obs}}} \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N} \quad (9-2)$$

式中, S_{obs} ——实际观测到的蚯蚓种类数;

n_i ——第 i 种蚯蚓所含的序列数;

N ——所有的序列数。

(4) Evenness: 物种均匀度是指某一群落或生境中全部蚯蚓物种个体数目的分配状况, 其反映了各物种个体数目分配的均匀程度。可以基于 Shannon 指数计算物种多样性, 物种均匀度的计算公式为:

$$J = \frac{H'}{\ln S} \quad (9-3)$$

式中, S ——群落内的物种数;

H' ——Shannon 多样性指数。

汇总统计结果, 邀请制图专家协助进行蚯蚓种群分布图的绘制。

参考文献

- 陈义, 1956. 中国蚯蚓 [M]. 北京: 科学出版社.
- 高杏, 2018. 无量山地区巨蚓科分类及分子系统发育研究 [M]. 上海: 上海交通大学.
- 蒋际宝, 2016. 中国巨蚓科蚯蚓分类与分子系统发育研究 [M]. 上海: 上海交通大学.
- 马梅, 2014. 中药广地龙高特异性 PCR 鉴别的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学.
- 尹文英, 1998. 中国土壤动物检索图鉴 [M]. 北京: 科学出版社.
- BELY A E, WRAY G A, 2004. Molecular phylogeny of naidid worms (Annelida: Clitellata) based on cytochrome oxidase I [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30 (1): 50-63.
- CHEN Y, 1931. On the terrestrial Oligochaeta from Szechuan [J]. *Contributions from the Biological Laboratory of the Science Society of China (Zoological Series)*, 7: 117-171.
- CHEN Y, 1933. A preliminary survey of the earthworms of the lower Yangtze valley [J]. *Contributions from the Biological Laboratory of the Science Society of China (Zoological Series)*, 9: 177-296.
- CHEN Y, 1936. On the Terrestrial Oligochaeta from Szechuan, II: With the Notes on Gates' Types [J]. *Contributions from the Biological Laboratory of the Science Society of China (Zoological Series)*, XI: 269-306.
- CHEN Y, 1938. Oligochaeta from Hainan, Kwangtung [J]. *Contributions from the Biological Laboratory of the Science Society of China (Zoological Series)*, XII: 375-427.
- CHEN Y, 1946. On the terrestrial Oligochaeta from Szechuan III [J]. *Journal of West China Border Research Society*, 16: 83-141.
- GATES G E, 1935. New earthworms from China, with notes on the synonym of Chinese species of *Drawida* and *Pheretima* [J]. *Smithson. Misc. Coll.*, 93 (3): 1-19.
- GATES G E, 1939. On some species of Chinese earthworms, with special reference to specimens collected in Szechwan by Dr. D. C. Graham [J]. *Proceedings of the United States National Museum*, 85: 405-507.
- GATES G E, 1972. Burmese earthworms: an introduction to the systematics and biology of Megadrile Oligochaetes with special reference to southeast Asia [J]. *Transactions of the American Philosophical Society*, 62 (7): 1-326.

附录 10 土壤生物样品分析质量控制方法

10.1 分析误差来源

在分析过程中产生的误差包括系统误差、随机误差和差错。

系统误差是由分析过程中某些固定原因造成的。例如方法本身的缺陷、计量仪器不准确、试剂不纯、环境因素的影响以及分析人员恒定的个人误差等。它的变异是同一方向的，只要分析条件不变，在重复测定时会重复出现，易于找出产生误差的原因、测定其大小并予以校正。

随机误差又称偶然误差，是指某些偶然因素，例如气温、气压、湿度的改变，仪器的偶然缺陷或偏离，操作的偶然失误或仪器污染等外因引起的误差。随机误差是服从正态分布的，即 95% 的测定值应落在均值 $\bar{X} + 1.96S_x$ (标准误) 范围内，称为 95% 置信限。

差错亦称粗差，是由于分析过程中的粗心大意，或未遵守操作规程，或读数、记录、计算错误，或加错试剂等造成测定值偏离真值的异常值，应将它舍弃。差错无规律可循，小的错误，会增大试验误差，降低分析的可靠性，大的错误会导致分析失败。因此，在分析过程中必须严格要求，细心操作，避免发生错误。

控制随机误差 (偶然误差) 的方法一般采用重复测定法，即多次平行测定，取其平均值。因为平均值的偶然误差比单次测定值的偶然误差小，误差的大小与测量次数的平方根成反比 ($S_x = S / \sqrt{n}$)。土壤生物性质变异较大，一般需要进行 3~5 次重复；在评价某一测定方法时，则需要采用 10 次左右的重复。

10.2 分析误差表示方法

偏差是测定值偏离算术平均值 (\bar{X}) 的程度，用于表示分析结果的精密度。

10.2.1 绝对偏差 (absolute deviation)

$$\text{绝对偏差} = \text{测定值} (X_i) - \text{平均值} (X) \quad (10-1)$$

10.2.2 相对偏差 (relative deviation)

$$\text{相对偏差} = \frac{\text{测定值}(X_i) - \text{平均值}(X)}{\text{平均值}(X)} \times 100 \quad (10-2)$$

10.2.3 标准偏差 (标准差, standard deviation)

表示群体的离散程度，用以说明分析结果的精密度大小。单次测定标准差为

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} = \sqrt{\frac{\sum X_i^2 - (\sum X_i)^2/n}{n-1}} \quad (10-3)$$

S 值小，说明单次测定结果之间的偏差小，精密度高，平均值的代表性高。一般用 $X \pm S_x$ 表示。

10.2.4 平均值标准差 (标准误, standard error of mean)

一组多次平行测定结果用平均值表示时，一般用平均值标准差 S_x 表示平均值精密度的大小。 S_x 大小与测定次数 n 有关。

$$S_x = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (10-4)$$

平均值标准差是重要的偏差指标，用 $\bar{X} \pm S_x$ 表示。

10.2.5 变异系数 (coefficient of variation)

标准差占测定值的平均值的百分率称为变异系数 (CV)：

$$CV(\%) = \frac{S}{\bar{X}} \times 100 \quad (10-5)$$

CV 小，说明平均值的波动小，亦即精密度高，代表性好。

分析结果的准确度主要由系统误差决定，精密度则由偶然误差决定。准确度高，表示测定结果很好；精密度高，说明测定方法稳定，重现性好。提高分析质量要求既要有很高的准确度，也要有很高的精密度。

10.3 分析误差控制方法

10.3.1 粗差及系统误差的控制

控制分析差错 (粗差) 需要分析测试单位建立健全规章制度，加强分析检测人员的技术和责任心培训。

系统误差应从仪器、量具的校正，试剂质量的选择，分析方法的选用，以及对照试验、空白试验等方面加以考虑。

(1) 仪器、量具的校正：必要时可对仪器、量器进行校正，如天平、比色计、容量瓶、移液管、滴定管等，以减免仪器误差。

(2) 试剂质量控制：应按分析要求选择适合的试剂质量，包括水及化学试剂。同时还应注意试剂的配制、使用和贮存方法，必要时提纯试剂。

(3) 空白试验：除了不加样品以外，完全按着样品测定的相同操作步骤和条件进行测定，所得结果称为空白试验值，用以校正样品的测定值，减少试剂、仪器误差和滴定终点等所造成的误差。

(4) 对照试验：用参比样品、标准方法逆行对照，或由分析单位不同人员或不同单位逆行分析对比，检验和校正分析结果的误差。

10.3.2 精密度控制

(1) 测定率：针对可以进行平行双样分析的项目，每批样品每个项目分析时均须做 10%~15% 平行样品，5 个样品以下，应增加到 50% 以上。

(2) 测定方式：由分析者自行编入的明码平行样，或由质控员在采样现场、样品流转中心或实验室编入的密码平行样。二者等效，不必重复。

(3) 合格要求：平行双样测定结果的误差在允许误差范围之内。

10.3.3 准确度控制

采集 3 个典型土种的土壤生物样品 (每个样品采集 100 kg, -80 °C 长期保存)，选择已获得国家计量认证的分析单位 (每类指标选择 3 个单位)，分析土壤生物指标，获得具有可靠精密度的测定平均值，作为土壤生物调查中的质控样品，用于选择分析单位和控制土壤生物分析质量。

在控制精密度 (每批带测质控平行双样) 的基础上，参考《利用实验室间比对进行能力验证的统计方法》(GB/T 28043—2019)，选择分析单位的分析值落在质控样保证值 $X \pm S$ (在 95% 的置信水平) 范围之内，保证每批次质控样测定值落在质控样保证值 $X \pm 2S$ (在 95% 的置信水平) 范围之内。

绘制土壤生物分析准确度质控图，用质控样的保证值 X 与标准偏差 S ，在 95% 的置信水平，以 X 作为中心线、 $X \pm 2S$ 作为上下警告线、 $X \pm 3S$ 作为上下控制线的基本数据。每批所带质控样的测定值落在中心附近、上下警告线之内，则表示分析正常，此批样品测定结果可靠；如果测定值落在上下控制线之外，表示分析失控，测定结果不可信，检查原因，纠正后重新测定；如果测定值落在上下警告

线和上下控制线之间，分析结果虽可接受，但有失控倾向，应予以注意。

10.3.4 监测过程中受到干扰时的处理

检测过程中受到干扰时，按有关处理制度执行。一般要求如下：①停水、停电、停气等，凡影响到检测质量时，全部样品重新测定；②仪器发生故障时，可用相同等级并能满足检测要求的备用仪器重新测定。无备用仪器时，应将仪器修复、重新检定合格后重测。

附录 11 土壤生物数据质量控制方法

11.1 土壤生物数据的全过程质量控制

为了保证土壤生物调查数据的整体质量，需要在数据生产的各个环节开展数据质量控制。包括土壤生物采样、土壤样品分析、数据处理和上报。针对全国尺度的土壤生物调查，在国务院第三次全国土壤普查领导小组办公室统一领导下，协同土壤三普专家技术指导组，包括顶层设计组、平台技术组、外业技术组、内业技术组，成立土壤生物调查质量控制专家小组，从样品采集、样品制备、分析测试、数据检验、数据入库等全过程进行质量控制。各省（区、市）开展土壤生物调查时，由国家级和省级专家技术指导组成员建立省级土壤生物调查质量控制专家小组。

在采集过程中检查调查样点的代表性和准确性、调查数据的完整性和可靠性。在分析数据上报过程中检查实验室内精密度、准确度和实验室间精密度、准确度，以及数据的完整性和区域可比性，以保证生物分析数据的准确性和可靠性。在数据上报和入库过程中检查数据的归并错误和数据的完整性，保证综合分析和评价数据的准确可靠。

11.2 分析过程中数据质量控制

11.2.1 分析数据结果的表示

11.2.1.1 平行样测定结果的表示

平行样的测定结果用平均值表示，低于分析方法最低检出限的测定值按“未检出”报出，参加统计时按 1/2 最低检出限计算，但在计算检出率时，按“未检出”统计。

11.2.1.2 检测数据录入的位数

记录测量数据，要采用法定计量单位，只保留 1 位可疑数字，有效数字的位数应根据计量器具的精度及分析仪器的示值确定，不得随意增添或删除。

土壤生物样品测定值一般保留 3 位有效数字。表示分析结果精密度的数据，只取 1 位有效数字；当测定次数很多时，最多只取 2 位有效数字。表示分析结果的有效数字的位数，不能超过方法检出限的有效数字位数。

11.2.2 缺失和低于检测限数据的表示

11.2.2.1 数据缺失的原因

数据的缺失一般由以下情况引起：①没有要求采样；②不满足质量控制要求，数据被质量控制程序拒绝进入数据库；③由于样品保存或采样分析超过规定时间；④在样品储存或运输过程中丢失。

11.2.2.2 数据缺失处理方法

对缺失数据的统计处理一般采用 3 种方法解决。

(1) 删除：低版本 SAS 和一般电子表格进行描述性统计时，自动删除缺失数据，这是大部分统计软件和数据管理程序所采用的缺省方法。此时，数据报表上填空。

(2) 替代：选用该土属不同土种生物调查的平均值替代。缺失数据应控制在 5% 以内，按照第一种方法处理，数据报表上填空。缺失数据应在备注中说明是何种原因引起的缺失（没有要求采样的数据，用 none 表示；不满足质控要求的数据或有问题的数据，用 noqc 表示；其他原因而缺失的数据用 nodata 表示）。

(3) 痕量数据的表示：未到检测限的数据，选择低于检测限数据的平均值填写，并应在备注中说明。

11.2.3 有效数字的计算修约规则

11.2.3.1 有效数字计算规则

(1) 几个数字相加、相减的和或差的小数后保留位数与各数中小数后位数最少者相同。

(2) 几个数字相乘、相除的积或商的有效数字位数与各数中有效数字位数最少者相同。

(3) 进行对数运算时，对数的有效数字位数与真数相同。

(4) 进行平方、开方、立方运算时，计算结果的有效数字位数与原数相同。

(5) 某些常数 π 、 e 等的有效数字的位数是无限的，根据需要取位。

(6) 计算测定结果的平均值，当测定次数为 4 或 4 以上并呈正态分布时，其有效数字的位数可比原数多 1 位。

(7) 在计算的记录过程中，当有效数字位数确定后，其余数字应按修约规则一律舍去。

11.2.3.2 数字的修约

数字修约的原则：先运算后修约。数字修约按国家标准《数字修约规则与极限数值的表示和判定》(GB/T 8170—2008) 进行。实例见表附录 11-1。

表附录 11-1 数字修约实例

修约前	修约要求	修约规则	修约后
14.243 2	保留 1 位小数	在拟舍弃的数字中，若左边第一个数字小于 5（不包括 5）时，则舍弃，即所拟保留的末位数不变	14.2
26.484 3	保留 1 位小数	在拟舍弃的数字中，若左边第一个数字大于 5（不包括 5）时，则进 1，即所拟保留的末位数加 1	26.5
1.050 1	保留 1 位小数	在拟舍弃的数字中，若左边第一个数字等于 5 时，其右边的数字并非全部为零时，则进 1，即所拟保留的末位数加 1	1.1
0.350 0	保留 1 位小数	在拟舍弃的数字中，若左边第一个数字等于 5 时，其右边的数字皆为零时，所拟保留的末位数若为奇数则进 1，若为偶数（包括 0）则不进	0.4
0.450 0	保留 1 位小数		0.4
1.505 0	保留 2 位小数		1.50
15.454 6	修约成整数	在拟舍弃的数字中，若为两位以上数字时，不得连续进行多次修约（例如：将 15.454 6 修约成整数，就不能 1 次修约为 15.455、2 次修约为 15.46、3 次修约 15.5、4 次修约为 16），应根据所拟舍弃的数字中左边第一个数字的大小，1 次修约出结果	15

11.3 分析数据上报前的检验

11.3.1 范围和逻辑检查

范围和逻辑检查即在数据获取后检查、询问和适时更正数据（包括表格和电子）文件中无效数据的过程。

在已经完成的表格中首先目视检查无效数据、缺失数据和错误数据；其次对一项或一系列项目进行范围和逻辑检查，检查出可能产生错误的过程。根据对表格的检查，提出关于可疑数据的准确性和

完整性的问题表，要求提供数据的一方（如分析测试单位）进行核对并答复。负责土壤生物调查的单位根据答复对表格和电子文件进行修改。

11.3.2 数据的完整性检查

土壤生物调查与土壤剖面调查结合，采用土壤剖面调查的定位和详细背景信息表。土壤生物调查采集的样品编码和上报数据编码中，以土壤三普土壤剖面调查点编号作为土壤生物调查的样地编号。样品编码在样地编号基础上扩展 4 个字段共 7 位数字，样品编码格式为：N A B C D，其中 N 为剖面点编号，A 为样点级别字段（0~2，0 为国家级土壤生物样点，1 为省级土壤生物样点，2 为市级及以下生物样点），B 为生物调查样点编号字段（0001~9999），C 为样品类型编号（1~3，1 为微生物，2 为线虫，3 为蚯蚓），D 为土壤生物样品重复编号字段（1~9，其中 1~6 为调查样品重复编号，7~9 为质控样重复编号）。土壤生物调查采用相同点位的土壤剖面调查元数据文档，通过审核土壤剖面调查的元数据文档记录，可以溯源数据的误差来源，保证数据的完整性。具体如下。

- (1) 场地记录文档：对长期采样地自然地理背景、土壤类型、母质、利用方式的详细记录。
- (2) 方法记录文档：对采样时间、地点、试验设计、采样/观测方法的详细地记录。
- (3) 分析记录文档：分析测试条件、测试方法、QC 报告（空白、重复、标样、校正）。
- (4) 数据处理文档：审核如何从原始数据到最终结果报告的过程以及数据转换步骤。
- (5) 仪器和标样（质控样）检定文档：审核分析测试的置信度。

11.3.3 数据的一致性和有效性检查

土壤生物调查在不同区域和不同时间完成，需要审核土壤生物采样中的空间一致性和时间一致性。检查重复样品的样地位置、采样年度的一致性，审查测定项目的分析方法、重复测定的数量，保证数据的代表性和有效性。数据的缺失率不大于 10%。每个数据集应有数据生产和质控后更新时间的说明。

11.4 可疑数据的取舍

11.4.1 可疑数据的取舍原则

正常数据总是有一定的分散性，如果人为删去未经检验断定其离群数据（outliers）的测定值（即可疑数据），由此得到精密度很高的测定结果并不符合客观实际。为了保障土壤生物调查数据符合客观实际，应随时剔除具有明显系统误差和过失错误的的数据，对离群数据（可疑数据）的取舍应采用统计学方法判别：①复查产生可疑值的试验过程，如果是过失误差，则应舍弃；②如果未发现过失，则应按统计程序，决定取舍。

11.4.2 异常值判别

- (1) 计算的统计值不大于显著性水平 $\alpha=0.05$ 的临界值，则可疑数据为正常数据，保留。
- (2) 计算的统计值大于显著性水平 $\alpha=0.05$ 的临界值，但小于 $\alpha=0.01$ 的临界值，此可疑数据为偏离数据，可以保留，取中位数代替平均值。
- (3) 算的统计量大于显著性水平 $\alpha=0.01$ 的临界值，此可疑值为异常值，应与剔除，并对剩余数据继续检验，直到无异常值为止。

11.4.3 异常值的检验方法

11.4.3.1 大样本离群数据的取舍（3 倍标准差法）

根据正态分布密度函数，设测定值为 X_i ，可表示为 $X_i+3S \geq \mu \geq X_i-3S$ 。若 X_i 在 $X_i \pm 3S$ 范围内，此数据可用；若在 $X_i \pm 3S$ 范围外，此数据不可用，须舍弃（亦称莱特准则）。该判断的置信度在 99.7% 以上，但测定次数增多时，出现可疑值机会就随之增加，应将取舍标准改变如下。

先计算多次测定结果的平均值 \bar{X} 和标准差 S ，再计算 Z 值。

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 + \dots + X_n}{n} \quad (n \text{ 为包括可疑值在内的测定次数}) \quad (11-1)$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}{n-1}} \quad (11-2)$$

$$Z = \frac{X - \bar{X}}{S} \quad (X \text{ 为可疑值}) \quad (11-3)$$

然后查正态分布表，得对应于 Z 值的 α 值。如 $n\alpha = n \times \alpha < 0.1$ ，则舍弃， $n\alpha > 0.1$ ，则不舍弃。

例如：土壤全氮的 5 次平行测定结束 (g/kg) 为 1.52、1.48、1.65、1.85、1.45。其中 1.85 为可疑值，需判断取舍。计算平均值 $\bar{X} = 1.59$ ； $S = \pm 0.164$ ； $Z = (1.85 - 1.59) / 0.164 = 1.585$ 。查正态分布表 $\alpha = 0.0565$ ， $n\alpha = 5 \times 0.0565 = 0.2825$ ，因 $n\alpha > 0.1$ ，可疑值 1.85 不予舍弃。

11.4.3.2 小样本离群数据取舍

在有限数的小样本估测可疑数据的统计检验方法包括：Dixon、Grubbs、Cochran 和 Youden 检验法。可以对一个样品、一批样品、一台仪器或一组数据中可疑数据的检验。现介绍最常用的两种方法。

(1) 狄克松 (Dixon) 检验法。

此法适用于一组测量值的一致性检验和剔除离群值，本法中对最小可疑值和最大可疑值进行检验的公式因样本的容量 n 的不同而异，检验方法如下。

将一组测量数据从小到大顺序排列为 $X_1, X_2, X_3, \dots, X_n$ ， X_1 和 X_n 分别为最小可疑值和最大可疑值，按表附录 11-2 计算公式求 Q 值。

表附录 11-2 Dixon 检验统计量 Q 计算公式

n 值范围	可疑值为最小值 X_1 时	可疑值为最大值 X_n 时
3~7	$Q = (X_2 - X_1) / (X_n - X_1)$	$Q = (X_n - X_{n-1}) / (X_n - X_1)$
8~10	$Q = (X_2 - X_1) / (X_{n-1} - X_1)$	$Q = (X_n - X_{n-1}) / (X_n - X_2)$
11~13	$Q = (X_5 - X_1) / (X_{n-1} - X_1)$	$Q = (X_n - X_{n-2}) / (X_n - X_2)$
14~25	$Q = (X_3 - X_1) / (X_{n-2} - X_1)$	$Q = (X_n - X_{n-2}) / (X_n - X_3)$

根据表附录 11-3 中给定的显著性水平 α 和样本容量 n 查得临界值 Q_α 。若 $Q \leq Q_{0.05}$ ，则检验的可疑值为正常值；若 $Q_{0.05} < Q \leq Q_{0.01}$ ，则可疑值为偏离值；若 $Q > Q_{0.01}$ ，则可疑值为离群值，应舍去。

表附录 11-3 Dixon 检验临界值

显著性水平	n									
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
$Q_{0.05}$	0.941	0.765	0.642	0.560	0.507	0.554	0.512	0.477	0.576	
$Q_{0.01}$	0.988	0.889	0.780	0.698	0.637	0.683	0.635	0.597	0.679	
显著性水平	n									
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
$Q_{0.05}$	0.546	0.521	0.546	0.525	0.507	0.490	0.475	0.462	0.450	
$Q_{0.01}$	0.642	0.615	0.641	0.616	0.595	0.577	0.561	0.547	0.535	

注：引自 GB 17378.2—2007。

例：一组测定值按从小到大的顺序排列为 14.56、14.90、14.90、14.92、14.95、14.96、15.00、15.00、15.01、15.02。检验 14.56 是否为异常值，可疑值为最小值 X_1 时，按下式计算统计量：

$$Q = \frac{X_2 - X_1}{X_n - 1 - X_i} = \frac{14.90 - 14.56}{15.01 - 14.56} = 0.755$$

当 $n=10$, $\alpha=0.01$ 时, 查表附录 11-3, $Q=0.579$ 。由于 $0.755 > 0.579$, $Q > Q_{0.01}$, 判定 X_1 为异常值, 应舍去。

(2) 格拉布斯 (Grubbs) 检验法。

此法适用于检验多组测量值的均值的一致性和剔除多组测量值中的离群均值, 也可以用于检验一组测量值一致性和剔除一组测量值中离群值。方法如下。

在一组测量值中, 依从小到大顺序排列为 $X_1, X_2, X_3, \dots, X_n$, 若对最小值 X_1 或最大值 X_n 可疑时, 进行下列计算:

$$\begin{cases} T = (\bar{X} - X_1)/S \\ T = (X_n - \bar{X})/S \end{cases} \quad (11-4)$$

式中, X_1 为最小值; X_n 为最大值; \bar{X} 为平均值; S 为标准差。

若根据测定次数 (n) 和给定的显著性水平 α , 从表附录 11-4 得 T_α 临界值。若 $T \leq T_{0.05}$, 则可疑值为正常值; 若 $T_{0.05} < T \leq T_{0.01}$, 则可疑值为偏离值; 若 $T > T_{0.01}$, 则可疑值为离群值, 应舍去。舍去离群值后, 再计算 \bar{X} 和 S , 再对第二个极值进行检验。

表附录 11-4 Grubbs 检验临界值

显著性水平	n									
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
$T_{0.05}$	1.153	1.463	1.672	1.822	1.938	2.032	2.110	2.176	2.234	
$T_{0.01}$	1.155	1.492	1.749	1.944	2.097	2.221	2.323	2.410	2.485	
显著性水平	n									
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
$T_{0.05}$	2.285	2.331	2.371	2.409	2.443	2.475	2.504	2.532	2.557	
$T_{0.01}$	2.550	2.607	2.659	2.705	2.747	2.785	2.821	2.854	2.884	

注: 引自 GB 17378.2—1998。

附录 12 土壤质量和土壤健康的评价方法

12.1 评价原理

基于土壤生物和土壤剖面的共点调查, 在我国第三次全国土壤调查数据库基础上, 建立我国第三次全国土壤生物和土壤剖面调查数据库, 综合利用我国重要土种的土壤物理学、化学和生物学性状, 基于数理统计分析等模型方法, 建立土壤质量和土壤健康的综合评价方法。

(1) 在第三次全国土壤生物和土壤剖面调查数据库中, 选取土壤生物学评价指标体系, 分析其生物功能效应 (如促进/抑制养分积累、植物生长等), 根据生物功能建立评价的隶属度函数, 开展土壤质量和土壤健康的生物学单因子评价。

(2) 利用统计分析软件 (如 SPSS、Stata、Statistic、SAS、R 语言等) 进行因子分析, 确定因子

权重；建立评价土壤生物多样性和生物健康质量的最小指标集；建立土壤质量和土壤健康的生物学综合指数（soil biological index, SBI）评价方程，计算 SBI 指数评分值。

(3) 在我国第三次全国土壤生物和土壤剖面调查数据库中，选取土壤物理和化学评价指标体系，分析其作物产量效应，建立评价的隶属度函数，开展土壤质量和土壤健康的物理学和化学单因子评价。

(4) 利用统计分析软件进行因子分析，建立评价土壤物理学生物多样性和生物健康质量的最小指标集；建立土壤质量和土壤健康的物理学综合指数（soil physical index, SPI）和化学综合指数（soil chemical index, SCI）评价方程，计算 SPI 和 SCI 指数评分值。

(5) 综合利用土壤质量和土壤健康的物理学、化学和生物学单因子评价结果，建立土壤质量和土壤健康综合指数（soil health index, SHI）评价方程，计算 SHI 指数评分值。

(6) 根据评价结果，采用地理信息系统软件（如 ArcGIS、MapGIS、MapInfo）绘制土壤质量和土壤健康的生物学评价图和综合评价图。

(7) 开展耕地土壤健康和耕地特色农产品适应性评价，撰写评价报告，提出土壤健康的区域调控对策。

12.2 评价步骤

12.2.1 土壤生物调查评价数据库建设

按数据库规范建立标准数据库，以土种为单元建立土壤生物数据库管理系统，包括空间数据、属性数据、相关参数、模型等，为全国耕地质量评价、土壤适宜性评价等提供生物数据支撑。

基于土壤三普技术规范，以全国农业技术推广服务中心《耕地地力调查与质量评价技术规程》（NY/T 1634—2008）、《县域耕地资源管理信息系统数据字典》（张炳宁等，2004）为数据标准基础，补充完善土壤生物数据字典。系统的数据标准、数据流程、分析方法、成果表达等符合土壤三普调查统一要求（全国农业技术推广服务中心，2005，2006）。在建立数据库管理系统中，以 VB 编程语言（如 Microsoft Visual Basic 6.0）为开发语言，以 GIS 软件（如 ESRI 研究所 MapObjects）为空间数据显示、编辑、分析工具，以 Access MDB 数据库和 Dbase DBF 数据库保存属性数据，可以通过网络与 GeoDatabase 交换数据，以 Microsoft Windows 11、Microsoft Office 2020 为单机系统运行环境。

12.2.2 土壤质量和土壤健康的生物学指数评分法

12.2.2.1 建立评价土壤质量和土壤健康的生物学最小指标集（minimum index set）

针对特定的问题、过程、管理措施或政策，确定土壤质量和土壤健康的生物学评价的关键功能，建立定量评价的指标体系和评价标准。对农业系统而言，应根据培育土壤养分库容、提升作物产量的功能确定评价标准。

基于主成分分析法（PCA），通过正交变换将一组可能存在相关性的变量转换为一组线性不相关的变量（主成分，principal component）。主成分因子分析要求主成分的累计贡献率占总方差的 75% 以上（表附录 12-1）。不同土壤生物主成分代表了不同的功能群，但主成分中的生物因子指标间存在重叠现象，需要利用评分函数法对数据进行标准化处理，通过聚类分析，从中提取出核心评价指标，建立评价土壤质量和土壤健康的生物学最小指标集。

表附录 12-1 因子主成分的特征值和贡献率（示例）

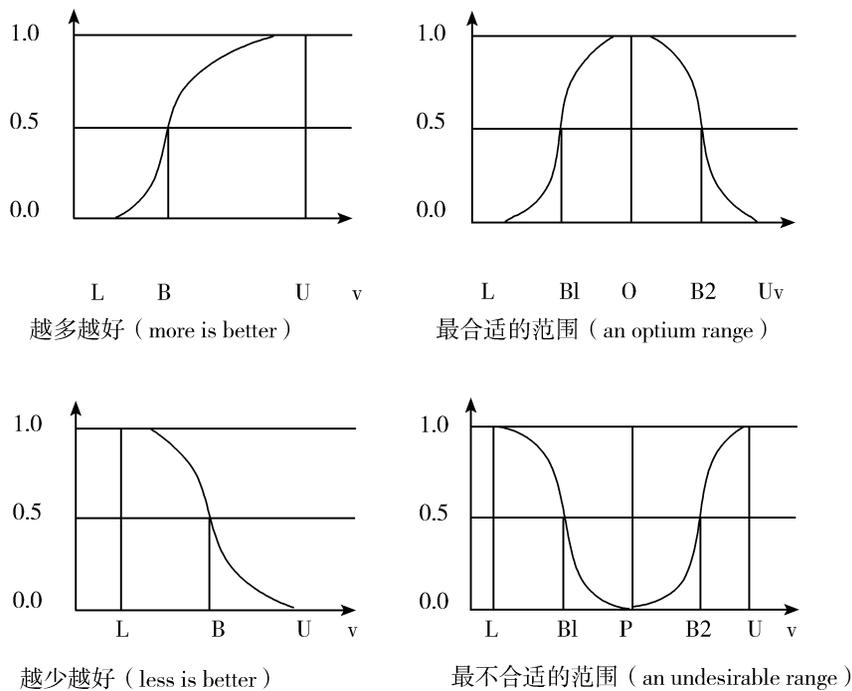
主成分	特征值	贡献率/%	累计贡献率/%
1	2.495	22.7	22.7
2	1.600	14.5	37.2
3	1.299	11.8	49.0
4	1.146	10.4	59.4
5	1.029	9.4	68.8
6	0.862	7.8	76.6
7	0.828	7.5	84.2

(续表)

主成分	特征值	贡献率/%	累计贡献率/%
8	0.645	5.9	90.1
9	0.564	5.1	95.2
10	0.419	3.8	99.0
11	0.113	1.0	100

12.2.2.2 标准化土壤生物学评价指标，确定转换阈值

测定土壤生物评价指标，建立各个土壤生物指标与土壤生物功能间的关系模型。这一过程大多针对各项指标，建立相应的评分函数（将评价数值转变为变幅为0~1的无量纲数值）（图附录12-1），确定其转换的阈值，对各项指标进行评分。



L、B、U 和 S 分别表示阈值下限、基准线、阈值上限和斜率。

图附录 12-1 土壤质量和土壤健康生物学评价的 4 种评分函数

12.2.2.3 建立土壤质量和土壤健康生物学综合指数（SBI）评分方程，确定评价权重系数

利用经验模型（层次分析、多元回归分析、主成分分析、逐步回归分析、灰色关联度分析等）或根据专家意见确定各项评价指标和土壤功能的权重，在各级指标体系中所有指标的权重之和应为 1 或 100%；如通过计算相应的载荷矩阵，并求出各项指标的公因子方差，方差的大小表示了该项指标对土壤质量和土壤健康总体变异的贡献，由此可以得出各项指标的权重（表附录 12-2）。

表附录 12-2 不同评价指标的公因子方差和权重示例

综合指标	单因子指标	公因子方差	权重值
微生物多样性	指标 1	0.889	0.189
	指标 2	0.912	0.194
	指标 3	0.776	0.165
	指标 4	0.610	0.130
	指标 5	0.752	0.160
	指标 6	0.760	0.162

在确定各个生物学指标权重系数的基础上，利用加乘方法，建立土壤质量和土壤健康的生物学综合指数（SBI）评分方程。在相互交叉的同类指标间采用加法进行合成，分别计算土壤微生物生物量（MB）、土壤微生物活性（RE）、土壤微生物物种多样性（MD）、土壤生物功能多样性（FD）、土壤动物多样性（AD）隶属度的综合指数。然后在相互独立的5类指标间采用乘法进行合成，计算土壤生物学指数（SBI）：

$$SBI = MB \times RE \times MD \times FD \times AD = \left(\sum_{i=1} k1_i \times MB_i \right) \times \left(\sum_{i=1} k2_i \times RE_i \right) \times \left(\sum_{i=1} k3_i \times MD_i \right) \times \left(\sum_{i=1} k4_i \times FD_i \right) \times \left(\sum_{i=1} k5_i \times AD_i \right) \quad (12-1)$$

式中， $k1_i$ 、 $k2_i$ 、 $k3_i$ 、 $k4_i$ 、 $k5_i$ 分别是微生物生物量、微生物活性、微生物物种多样性、生物功能多样性和动物多样性的各个生物学指标的权重系数， MB_i 、 RE_i 、 MD_i 、 AD_i 分别是微生物生物量、微生物活性、微生物多样性、生物功能多样性和动物多样性指标的隶属度值。SBI是评价土壤质量和土壤健康的生物指数。

12.2.2.4 土壤质量和土壤健康的生物指数评价等级

将各指标的评分值与权重系数相乘，得到土壤生物指数评分的矩阵，其总和即为土壤生物指数的等级值。这些值在0.1~1.0范围内。最高值1.0表示土壤生物指数表征的土壤质量和土壤健康水平完全适宜植物生长，最低值（如取0.1）表示土壤生物指数完全不适宜植物生长。参考《耕地质量评定与分等定级技术规范》（DB33/T 895—2013），将土壤生物指数划分为高、中、低3类10个等级。

12.2.2.5 土壤质量和土壤健康管理的生物学评价与调控对策分析

全国1:100万土壤图的基本制图单元为土属，1:400万土壤图的基本制图单元为亚类。在土属尺度上，根据土种生物单因子指标评价和多因子指标综合评价结果，基于土属中土种面积进行面积加权平均，获得土属单位的生物指标值和指数评价值。在亚类尺度上，根据土属生物单因子指标评价和多因子指标综合评价结果，基于亚类中土属面积比例进行面积加权平均，获得土壤亚类单位的生物单因子指标值和多因子指数评价值。

在此基础上，采用地理信息系统软件（如ArcGIS、MapGIS、MapInfo）绘制土壤生物健康单因子评价图和复合因子综合评价图。如针对单项指标，绘制土壤细菌、真菌、线虫和蚯蚓图谱（ATLAS），绘制微生物生物量碳、土壤呼吸量、土壤可培养功能微生物、土壤蚯蚓生物量等指标分布图。针对复合指标，绘制土壤微生物生物量等级分布图、土壤微生物活性等级分布图、土壤微生物多样性指数等级图、土壤生物功能多样性指数等级图、土壤动物多样性指数等级图。针对土壤生物学综合指标，绘制耕地土壤质量和土壤健康的生物学评价等级分布图。

组织国内土壤微生物、土壤动物、土壤生物物种和功能多样性、土壤健康领域的专家组建土壤生物评价团队，分析研究土壤生物调查数据和评价结果，撰写中国土壤生物多样性、土壤质量和土壤健康的生物学评价报告，提出我国不同区域土壤质量和土壤健康管理的生物学调控对策。

12.2.3 土壤质量和土壤健康的综合指数评分法

按照土壤生物指数评价方法，针对土壤物理学指标（容重、团聚体、黏粒含量等）和土壤化学指标（有机质、养分含量、重金属含量、pH等）分别建立评价土壤质量和土壤健康的土壤物理学和化学最小指标集。

在确定各个物理和化学指标权重系数的基础上，利用加乘方法，建立土壤质量和土壤健康综合指数（SBI）评分方程。在相互交叉的同类指标间采用加法进行合成，在相互独立的指标间采用乘法进行合成，计算土壤物理学指数（soil physical index, SPI）和土壤化学指数（soil chemical index, SCI）。

$$SPI = BD \times SA \times CC = \left(\sum_{i=1} k1_i \times BD_i \right) \times \left(\sum_{i=1} k2_i \times SA_i \right) \times \left(\sum_{i=1} k3_i \times CC_i \right) \quad (12-2)$$

式中， $k1_i$ 、 $k2_i$ 、 $k3_i$ 分别是容重类、团聚体类、黏粒类物理学指标的权重系数， BD_i 、 SA_i 、 CC_i 分别是容重类、团聚体类、黏粒类物理学指标的隶属度值。

$$SCI = OM \times NC \times HM \times PH = \left(\sum_{i=1} k1_i \times OM_i \right) \times \left(\sum_{i=1} k2_i \times NC_i \right) \times \left(\sum_{i=1} k3_i \times HM_i \right) \times \left(\sum_{i=1} k4_i \times PH_i \right) \quad (12-3)$$

式中, $k1_i$ 、 $k2_i$ 、 $k3_i$ 、 $k4_i$ 分别是有机质类、养分类、重金属类、pH类化学指标的权重系数, OM_i 、 NC_i 、 HM_i 、 PH_i 分别是有机质类、养分类、重金属类、pH类化学指标的隶属度值。

最后, 集成土壤生物学指数 (SBI)、土壤物理学指数 (SPI) 和土壤化学指数 (SCI), 建立土壤质量和土壤健康的综合指数 (SHI)。

$$SHI = SBI \times SPI \times SCI \quad (12-4)$$

在此基础上, 采用地理信息系统软件绘制 1:400 万土壤健康的单因子、复合因子和综合因子评价图。撰写土壤质量和土壤健康的综合评价报告, 提出我国不同区域土壤质量和土壤健康管理的综合调控对策。

参考文献

- 全国农业技术推广服务中心, 2005. 耕地地力调查与质量评价 [M]. 北京: 中国农业出版社: 145-226.
- 全国农业技术推广服务中心, 2006. 耕地地力评价指南 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社: 25-150.
- 孙波, 赵其国, 张桃林, 1997. 土壤质量与持续环境, I. 土壤质量的定义及评价方法 [J]. 土壤, 29 (3): 113-120, 243.
- 孙波, 赵其国, 张桃林, 等, 1997. 土壤质量与持续环境, III. 土壤质量评价的生物学指标 [J]. 土壤, 29 (5): 225-234.
- 孙波, 赵其国, 1999. 红壤退化中土壤质量的评价指标和评价方法 [J]. 地理科学进展, 18 (2): 118-128, 246.
- 张炳宁, 彭世琪, 张月平, 2004. 县域耕地资源管理信息系统数据字典 [M]. 北京: 中国农业出版社: 214
- 张炳宁, 张月平, 张秀美, 等, 1999. 基本农田信息系统的建立及其应用 [J]. 土壤学报, 36 (4): 510-521.
- KARLEN D L, DIANE E S, 1994. A Framework for Evaluating Physical and Chemical Indicators of Soil Quality [M]. Madison, Wisconsin, USA: Soil Science Society of America, Inc.: 53-72.
- ZHANG Z, QU Y, LI S, et al., 2017. Soil bacterial quantification approaches coupling with relative abundances reflecting the changes of taxa [J]. Scientific Reports, 7 (1): 1-11.

附录 13 土壤生物调查数据管理方法

13.1 土壤生物调查数据范围

土壤生物调查数据包括土壤生物样品、土壤生物分析数据、土壤生物评价图、土壤生物评价报告。

13.2 土壤生物调查数据管理原则

严格遵守土壤三普数据的产权保护政策与共享制度，按照土壤三普数据管理制度执行土壤生物调查数据的管理。

13.3 土壤生物调查数据管理执行人

(1) 在土壤三普期间，由土壤生物调查数据管理团队负责数据质量管理和数据共享服务，保证进入数据库的数据的正确性、安全性，保障对调查报告的数据支撑。

(2) 在土壤三普工作结束后，由国务院第三次全国土壤普查办公室负责系统的安全运行，保障数据库的长期管理，为全国数据共享提供服务。

13.4 土壤生物调查数据库管理

(1) 在土壤三普信息平台中建立物理隔绝的土壤生物调查数据库，所有数据及备份保存在物理隔离信息平台中，保障数据安全。

(2) 所有调查数据和文档需进行备份（光盘、硬盘），每年检查并更新备份数据一次，防止由于储存介质问题导致数据丢失；保证数据长期可用和安全性。

13.5 土壤生物调查数据共享制度

(1) 遵守国家保密法规和知识产权保护法律，严格保护数据生产单位的权益；遵循“权利与义务对等、平等互利”原则，实现土壤三普数据调查单位之间的数据共享，以此支撑土壤三普报告的编写工作。

(2) 土壤三普所有数据均属于国家的数据资源，由国务院第三次全国土壤普查办公室行使对数据所有权的管理，土壤生物调查参与单位为数据生产单位，不具有对数据的独立产权，但享有调查数据的优先利用权和调查报告的署名权。

(3) 土壤三普中所有数据对国家有关部门不设保护期限，根据数据用户类型和数据用途制定合理的数据保护期限，在保护期内其他用户必须通过协议等方式获取和利用数据，但需要获得相关主管部门的书面许可，不得向第三者转手提供。

(4) 在土壤三普设置的数据保护期限后，数据生产者可以使用各自所生产的数据开展科学研究、技术研发、示范应用等工作；其他数据应用单位（研究者）在发表相关成果时，应注明其所利用数据的生产单位（或研究者）、数据提供单位，并向数据所有权部门（数据提供单位）提供数据利用情况，提交发表的成果。

(5) 违反（3）、（4）规定即为侵犯知识产权行为。国务院第三次全国土壤普查办公室和相关主管部门可依法追究侵权单位和责任人的法律责任。