

附件 8

第三次全国土壤普查 土壤生物调查技术规范 (征求意见稿)

国务院第三次全国土壤普查领导小组办公室
2022 年 3 月

目 次

1 适用范围	1
2 总则	1
3 规范性引用文件	6
4 术语和定义	6
5 土壤生物调查方法	12
6 土壤生物调查和评价指标体系与分析方法	17
7 土壤生物调查质量控制	22
8 土壤质量和土壤健康的生物学综合评价.....	23
9 土壤生物调查成果管理	23

1 适用范围

本文件规定了全国第三次土壤普查（以下简称“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、调查样点布设原则与方法、野外样品采集与保存运输方法、室内检测方法、调查全程质量控制、调查数据综合分析方法、调查数据和成果的管理等。

本文件适用于全国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、物种和功能多样性、重要功能种群组成的调查；适用于全国尺度耕地基于土壤生物学性质的土壤质量和土壤健康评价。

2 总则

2.1 调查目标

土壤生物调查在土壤普查中具有基础性、重要性和复杂性特征。基于第三次土壤普查设定的总体目标和任务预算，针对“三普”涉及土属的重要土种，以调查植物生长旺盛期微生物群落以及线虫和蚯蚓等土壤动物群落的多样性及其生物功能为目标，开展土壤生物多样性与生物功能的概要性调查与评价，为全国第三次土壤普查提供土壤质量与土壤健康管理及评价的生物学性状数据。

2.2 调查工作流程

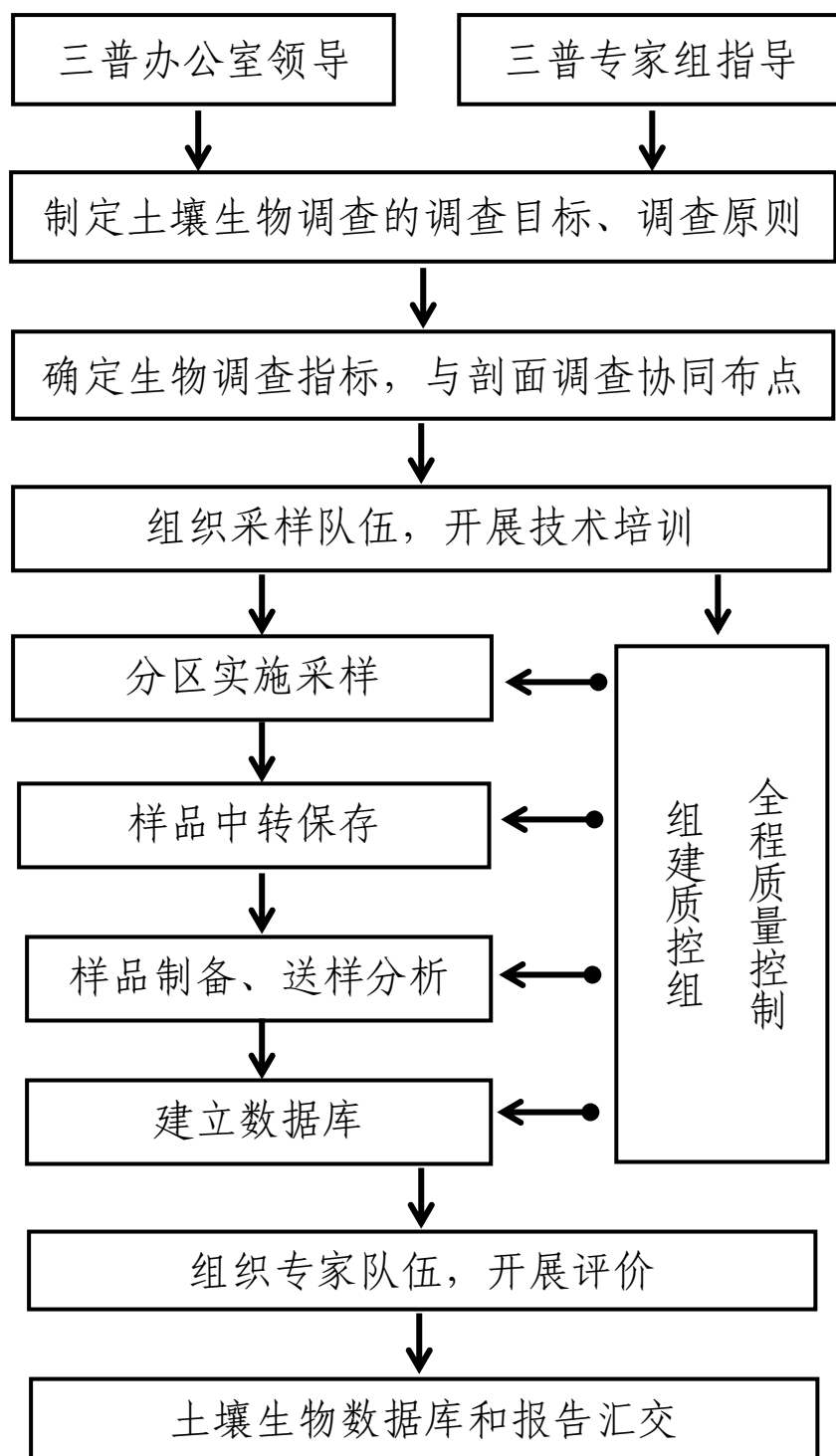


图 1 土壤生物调查工作流程

2.3 调查原则

2.3.1 土壤生物评价指标选取原则

土壤生物参与土壤中的元素循环，对土壤结构特别是团

聚体的形成具有重要作用，影响了土壤质量和土壤健康水平。由于土壤生物的复杂多样，在土壤中形成复杂的生物网络，不同生物之间存在随机性和确定性的相互关联和相互作用，共同影响土壤生物的多功能性。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，重点考虑土壤生物对碳、氮、磷养分蓄积和转化的功能，兼顾土壤生物影响植物生长和病害发生的功能；

2.3.1.2 重要性和代表性指标相结合原则：考虑土壤生物指标对主要功能的贡献度、对主要生产力提升过程的制约作用、以及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：在考虑土壤生物的演替过程与生物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；

2.3.1.3 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和经典细胞与群落尺度的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

紧密结合全国第三次土壤普查总体布点思路，土壤生物调查遵循先“气候带主导”、后“农用地主导”再“以土种作为基本分区单元”的原则布设样点。

2.3.2.1 气候带主导、兼顾自然地理分区

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。土壤生物调查样点分布采取东、中部并重，兼顾西部的思路。土壤生物调查样点布设将全国分为东部湿润区、中部半湿润半干旱区、西部干旱区三个大区，东部湿润区包括黑（东部）、吉（东部）、辽（东部）、鲁（胶东）、苏、沪、浙、皖、赣、鄂、湘、渝、川、贵、桂、滇、粤、琼（大部）、闽、藏（东南）等 20 个省市地区（不含港澳台）；中部半湿润半干旱区包括黑（西部）、吉（西部）、辽（西部）、内蒙古（东部）、京、津、冀、鲁（大部）、豫、晋、陕（大部）、甘（东部）、宁（南部）、藏（大部）、青（东部）、新（山地）、琼（西部）等 16 个省（区）；西部干旱区包括新（大部）、甘（西部）、宁（北部）、藏（西北）、青（西部）等 5 个省（区）。

2.3.2.2 农用地主导、兼顾其他用地类型

覆盖“三普”定义的土壤利用方式范围，以耕地和园地为主，兼顾林地、草地和其他后备耕地资源，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“三普”全部土属、以土种作为基本分区单元

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形成以及土壤生物功能的演变。土种反映了土层厚度、黏粒、盐分等微域土壤质量特征，受区域气候、地形、母质、土地利用等影响，代表了土壤改良利用的方向。土壤生物调查覆盖“三普”在我国大陆调查的所有土属，包含各土属中的主要土种；以土种作为样点选择的基本分区单元，根据土种面积占比及大小，确定选择调查土种类型及样点数量。

2.3.3 土壤生物样品采集原则

土壤生物调查以样品采集的景观性原则、随机性原则和等量性原则进行样品采集。针对一定区域条件下形成的土种，样品采集时必需坚持景观性原则，保证所采土壤生物样品能够代表所在的景观类型下形成的土种。为了保证土壤样品的代表性，必须坚持土壤生物样品采集的随机性原则，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 土壤生物调查样地和调查样品的编码原则

以“三普”土壤剖面表层样品编号为样地编号，添加 2 位数表示土壤生物调查样品的编码。其中第 1 数字表示土壤生物类型（0-微生物，1-线虫，2-蚯蚓），第 2 位数字表示

土壤生物调查样品的重复数序。

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“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“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文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

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文件。

4.1 土壤生物 soil organism

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、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、营养结构等。

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

在土壤调查区域中，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功能。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，驱动了土壤中养分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 5×10^3 立方微米微生物的总重量。

4.12 土壤呼吸强度 soil respiration quotient

单位时间内从单位面积土壤中扩散出来的二氧化碳量。

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 -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

将土壤中正磷酸单脂水解成磷酸盐的一类非特异性磷

酸单脂酶。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、烟草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（*Imperfecti fungi*）、从梗孢目（*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三种类型，可引起瓜类、茄科、香蕉、棉、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原体腔无脊椎动物，是土壤动物中数量和功能类群最丰富的类群。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 土壤蚯蚓 *soil 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、分泌粘液和掘穴等活动影响土壤物质循环和能量传递作。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

基于实时荧光定量 PCR 法,即利用荧光化学物质测定聚合酶链式反应循环后产物总量的方法,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 16Ss rDNA、18S rDNA、ITS 区域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 土壤宏基因组测序 soil metagenomic 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,分析功能宏基因的测序分析技术。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 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。

5 土壤生物调查方法

5.1 土壤生物调查样点布设方法

基于全国县级 1: 50000 的土壤类型图、土地利用类型图、县级行政区划图、地形地貌图的叠加分析, 参考全国 1:100 万的土属图、耕地质量等级图和生态区类型分布图, 根据上述全国土壤生物调查样点布设原则, 按气候区类型、土地利用类型分布比例、耕地质量等级、土种面积比例等确定土壤生物调查样点的分布比例, 基于土种的典型分布区, 在全国典型土壤剖面调查点分布图的基础上, 确定土壤生物调查样点分布。在没有土种分布图的地区, 综合利用土地利用、地形地貌等信息确定土壤生物调查样点分布。最终通过专家组评估修定得出全国土壤生物调查样点分布图及采样位置。

5.2 土壤生物调查样点布设数量与区域

5.2.1 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比例大约为东部: 中部: 西部为 65%: 30%: 5%。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。

5.2.2 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、后备耕地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、低三个等级的耕地。

5.2.3 根据覆盖“三普”所有调查土属、以土种作为基

本分区单元原则，依据土属之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，每个土属至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的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，例如不同土属可按土种面积占比和面积大小选择前10-20%的土种布置两个样点。

5.3 土壤生物调查样地设置

5.3.1 土壤生物调查样地布设应以“三普”土壤剖面调查点为中心，设置在剖面调查点周边，具有与土壤剖面调查点相一致的土壤立地条件与生产利用情况。

5.3.2 每个土壤生物调查样地面积应大于 1 公顷。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，可根据具体土种形状与面积适当调整样地面积与形状，如丘陵山区狭长地带，可以采用 50m×200m 长方形确定样地，保证样地中土种类型的一致性。

5.4 土壤生物样品采集

每个样点的样地根据样地的地形、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。

5.4.1 土壤微生物和线虫的土钻法采样：在每个采样区块，清除表层杂物或凋落物层，利用直径 50mm 的不锈钢土

钻随机采集 20 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，上述步骤再重复一次，每个采样区块采集 2 个混合样，每个样点共采集 6 个混合样，作为 6 个重复。详细过程见操作手册第 3 章。

5.4.2 土壤蚯蚓的手拣法采样：在每个采样区块随机选择 2 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。每个采样区块采集 2 个混合样，每个样点共采集 6 个混合样，作为 6 个重复。详细过程见操作手册第 4 章。

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、生物活动活跃的采样区块，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。

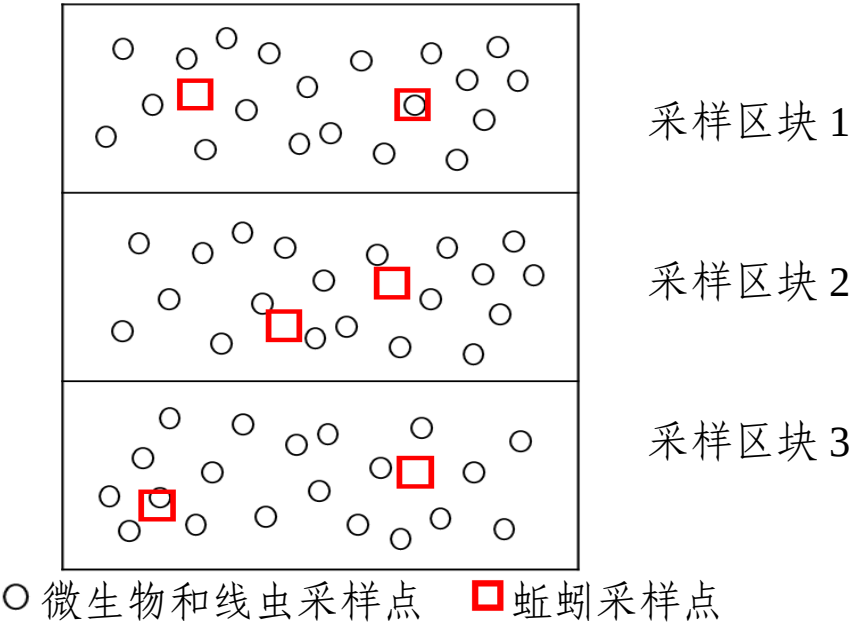


图 2 土壤生物调查样地采样分区与随机采样点及样方布设

5.5 土壤生物调查人员组成和调查时间选择

5.5.1 土壤生物调查在全国 9 个农业区域分区开展采样。根据每个区域根据调查样点数量，组织 3-5 支采样队伍。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。

5.5.2 土壤生物调查原则上在植物生长旺盛期、即土壤生物多样性和功能最高的时期采样。在耕地类型下，选择在作物生长旺盛期或多季作物的夏粮收获期进行（表 1）。

表 1 全国耕地划分区内土壤生物调查采样时间选择

耕地划分区	采样时间
东北区	6 月-7 月
内蒙古及长城沿线区、 黄土高原区、黄淮海区、甘新区	6 月-8 月
青藏区	7 月-8 月
长江中下游区、西南区、华南区	6 月-7 月或 9 月-10 月

5.5.3 土壤生物调查应避开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。

5.5.4 土壤生物调查可与土壤剖面调查同时进行。由土壤剖面调查人员负责立地条件与生产利用状况等调查，土壤剖面表层样品的理化分析数据可以用于土壤生物多样性和土壤生物健康评价。土壤生物调查选择的土种样点在没有土

壤剖面调查点时，需要同时进行土地利用等调查和土壤表层样品的基础物理化学分析。

5.6 土壤生物样品中转站建设管理

5.6.1 中转站条件

应具备收集、处理、储存土壤微生物和线虫、蚯蚓样品功能的设备和设施，包括 4°C 低温冷藏箱、-80°C 超低温冰箱、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。详细过程见操作手册第 3 章、第 4 章。

5.6.2 土壤生物调查样品制备

土壤生物样品中转站应承担制备土壤生物分析样品，管理土壤生物样品二维码信息等功能。详细过程见操作手册第 3 章、第 4 章。

5.7 土壤生物调查样品分析测试单位选择

土壤生物样品分析单位应具有符合国家与行业相关分析要求的认证资质，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；生物测序公司还需获得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

5.7.1.1 行业资质认证：ISO9001 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。

5.7.1.2 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

5.7.2.1 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，基因高通量测序和分析的技术能力。

5.7.2.2 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。

5.7.3 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，将评价指标分为三个层次，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）。详细过程见附件操作手册第 1 章。

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
1. 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 定量)	细菌绝对丰度 真菌绝对丰度 古菌绝对丰度	1.固碳菌绝对丰度 2.固氮菌 DNA 丛枝菌根菌 DNA
2. 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	1.碳:多酚氧化酶活性 2.氮:氨单加氧酶活性 3.磷:磷酸酶活性	1.碳: β -葡萄糖苷酶活性 2.氮:脲酶活性、硝酸还原酶活性
3. 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	1.细菌、真菌、古菌群落组成 2.细菌、真菌、古菌 Alpha-多样性 (Shannon-Wiener, Chao1 richness, Evenness)	1.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)

			2.优势功能微生物(纤维素分解菌, 硝酸菌, 亚硝酸菌, 固氮细菌, 解磷菌, 解钾菌, 青枯菌, 尖孢镰刀菌) 组成
4. 土壤生物功能多样性	宏基因组测序 土壤微生物功能多样性	土壤养分循环功能基因 alpha-多样性 (Shaanon 指数, Chao1 Richness 指数, Eveness 指数)	1.土壤养分循环功能基因 Beta-多样性 (基于 Bray-Curtis 的 NMDS, PCA) 2. 盐渍化、酸化、干旱逆境下土壤耐逆功能基因相对丰度
5. 土壤动物组成和多样性	线虫密度、组成和多样性	1. 线虫密度 2. 形态学鉴定线虫组成 (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组成

	蚯蚓生物量、组成和多样性	1. 蚯蚓生物量 2. 蚯蚓形态学鉴定组成（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。见操作手册第 5 章。

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。见操作手册第 6 章。

6.4 土壤呼吸强度

葡萄糖底物诱导呼吸法。见操作手册第 7 章。

6.5 土壤酶活性

6.5.1 苯酚-次氯酸钠比色法测定土壤脲酶活性。见操作手册第 8 章第 2 节

6.5.2 酚二磺酸比色法测定土壤硝酸还原酶活性。见操作手册第 8 章第 3 节

6.5.3 夹心酶联免疫吸附法测定土壤氨单加氧酶活性。见操作手册第 8 章第 4 节

6.5.4 磷酸苯二钠比色法测定土壤磷酸酶活性。见操作手册第 8 章第 5 节

6.5.5 甲基伞形酮- β -D-葡萄糖苷荧光底物法测定土壤 β -葡萄糖苷酶活性。见操作手册第 8 章第 6 节

6.5.6 左旋多巴比色法测定土壤多酚氧化酶活性。见操作手册第 8 章第 7 节

6.6 土壤宏基因组

第二代高通量测序法。见操作手册第 9 章。

6.7 土壤微生物群落组成

高通量测序方法。见操作手册 10 章。

6.8 土壤优势功能微生物分离培养及鉴定

6.8.1 纤维素培养基培养纤维素分解菌及二代测序鉴定法。见操作手册第 11 章

6.8.2 亚硝酸盐培养基培养硝化细菌及二代测序鉴定法。见操作手册第 11 章

6.8.3 铵盐培养基培养亚硝化细菌及二代测序鉴定法。见操作手册第 11 章

6.8.4 YEM 培养基培养固氮细菌及二代测序鉴定法。见操作手册第 11 章

6.8.5 NBRIP 培养基培养解磷细菌及二代测序鉴定法。见操作手册第 11 章

6.8.6 Aleksandrov 培养基培养解钾菌及二代测序鉴定法。见操作手册第 11 章

6.8.7 SAMA 培养基培养青枯菌及二代测序鉴定法。见操作手册第 11 章

6.8.8 Komada 培养基培养尖孢镰刀菌及二代测序法。鉴定见操作手册第 11 章

6.9 土壤线虫群落分析

6.9.1 贝尔曼漏斗法分离法。见操作手册第 12 章

6.9.2 光学显微镜下的线虫鉴定法。见操作手册第 12 章

6.9.3 线虫测序鉴定法。见操作手册第 12 章

6.10 土壤蚯蚓群落分析

6.10.1 乙醇麻醉与固定法。见操作手册第 13 章

6.10.2 蚯蚓形态学鉴定法。见操作手册第 13 章

6.10.3 蚯蚓线粒体基因测序鉴定法。见操作手册第 13

章

7 土壤生物调查质量控制

土壤生物调查质量控制目标是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。质量控制涉及土壤生物调查和评价的全部过程。

7.1 建立土壤生物调查质量控制体系

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。

7.2 建立健全测试单位规章制度

加强分析检测人员技术和责任心培训，控制分析差错。

7.3 土壤生物采样过程质量控制

保证样品采集的随机性和等量性。

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，见操作手册第 14 章

7.4.1 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。

7.4.2 进行 10% ~ 15 % 平行双样分析，控制精密度。

7.4.3 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。

7.5 土壤生物数据质量控制。见操作手册第 15 章。

7.5.1 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。

7.5.2 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。

7.5.3 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。

8 土壤质量和土壤健康的生物学综合评价

8.1 建立评价土壤质量和土壤健康生物学评价的最小指标集

8.2 标准化生物学评价指标值，确定转换阈值

8.3 建立生物学评价指标评分方程。

8.4 从生物学角度评价土壤质量和土壤健康等级，撰写评价报告

根据评价结果，采用地理信息系统软件绘制土壤质量和土壤健康的生物学评价图，撰写评价报告，提出土壤质量和土壤健康的生物学调控对策。评价方法见操作手册第 16 章。

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“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 NYT1634-2008》、《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，为“三普”提供土壤生物学性状数据支撑。

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的生物学评价报告，与土壤生物调查数据库一起提交第三次全国土壤普查办公室。

第三次全国土壤普查
土壤生物调查技术规范
(征求意见稿)
附件 1 操作手册

国务院第三次全国土壤普查领导小组办公室
2022 年 3 月

目 录

第 1 章 土壤生物调查总体目标、工作流程和指标体系...	7
1. 土壤生物调查总体目标	7
2. 土壤生物调查工作流程	7
3. 土壤生物调查评价指标选择原则	8
4. 土壤生物调查评价指标体系	8
第 2 章 土壤生物调查样点布设与采样管理方法.....	13
1. 土壤生物调查样点布设原则	13
2. 土壤生物调查样点布设	23
3. 土壤生物调查样地设置	24
4. 土壤生物样品采集原则	24
5. 土壤生物调查样品采集	25
6. 土壤生物调查人员组成和调查时间选择.....	26
7. 土壤生物调查样品和数据管理	27
第 3 章 土壤微生物和线虫样品采集与保存运输方法....	28
1. 采样前期准备	28
2. 采样设计	28
3. 采样步骤	29
第 4 章 土壤蚯蚓野外采集与保存、运输方法.....	32
1. 范畴与术语	32
2. 工具与器材	32
3. 样地分区	32

4. 采样点选取	32
5. 采样步骤	32
6. 蚯蚓样品保存与运输	33
7. 样品中转站	33
第 5 章 土壤微生物生物量的测定 - 熏蒸提取法.....	34
1. 意义范围和质控	34
2. 规范性引用文件	34
3. 术语和定义	34
4. 原理	34
5. 试剂和材料	35
6. 仪器	35
7. 熏蒸和提取	36
8. 提取物中碳的测定	36
9. 精度	40
第 6 章 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	44
1. 意义、范围与质控	44
2. 实验材料与仪器	44
3. 方法原理	44
4. 土壤 DNA 提取	45
5. 细菌、真菌、古菌和功能基因的质粒构建.....	46
6. 荧光定量检测	49
第 7 章 土壤呼吸强度测定方法	52

1. 意义、范围与质控	52
2. 原理	52
3. 试剂	52
4. 仪器	52
5. 步骤	53
6. 检测	53
7. 结果计算	53
第 8 章 土壤酶活性测定方法	55
1. 意义、范围与质控	55
2. 脲酶	55
3. 硝酸还原酶	57
4. 氨单加氧酶	58
5. 土壤磷酸酶（酸性和碱性磷酸酶）	60
6. β -葡萄糖苷酶	62
7. 土壤多酚氧化酶	63
第 9 章 土壤宏基因组测序方法	66
1. 意义、范围与质控	66
2. 基因组第二代测序实验基本流程	66
3. 实验主要设备	66
4. 实验操作流程模块	66
5. 数据分析	78
第 10 章 土壤微生物群落组成高通量测序方法.....	90
1. 意义、范围与质控	90

2. 基因组二代测序实验基本流程	90
3. 主要设备	90
4. 实验流程	90
第 11 章 土壤优势功能微生物分离培养及鉴定方法.....	98
1. 意义、范围与质控	98
2. 材料试剂	98
3. 功能细菌分离培养实验步骤	102
4. 功能菌株的鉴定	107
第 12 章 土壤线虫分离鉴定方法	111
1. 材料与试剂	111
2. 实验步骤	112
3. 土壤线虫分子生物学鉴定方法	113
第 13 章 土壤蚯蚓种群调查鉴定及线粒体基因组测序方法	118
1. 材料与试剂	118
2. 实验步骤	119
3. 蚯蚓群落特征分析	123
第 14 章 土壤生物样品分析质量控制方法.....	125
1. 分析误差来源	125
2. 分析误差表示方法	125
3. 分析误差控制方法	126
第 15 章 土壤生物数据质量控制方法	128
1. 分析质量控制范围	128

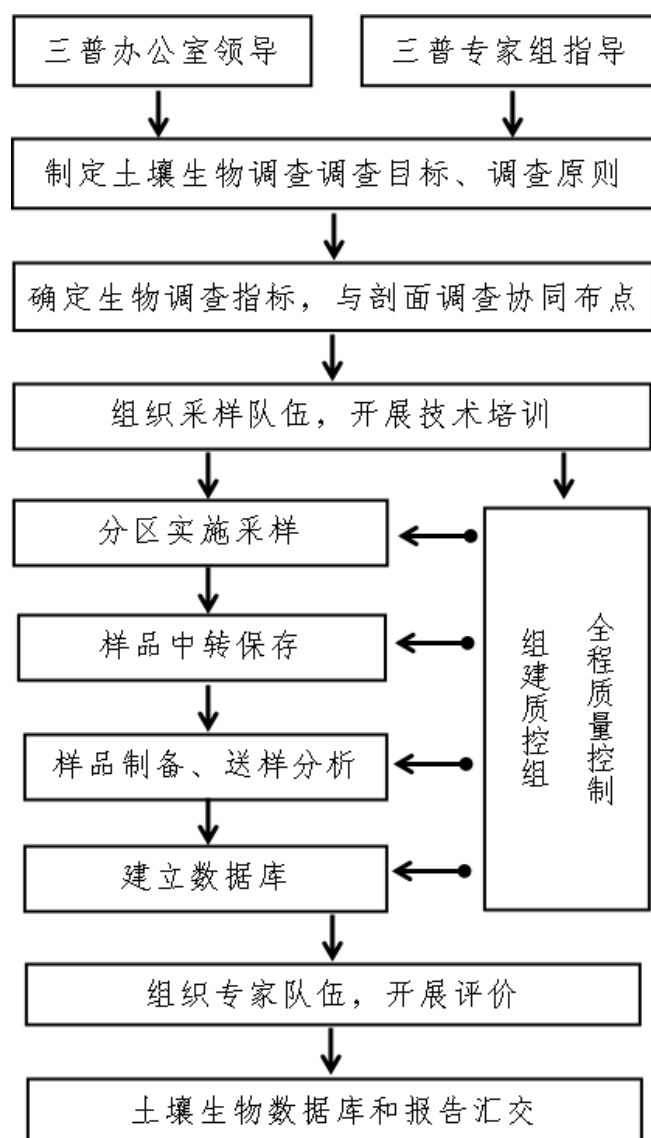
2. 分析过程中数据质量控制	128
3. 分析数据上报前的检验	130
4. 可疑数据的取舍	131
第 16 章 土壤质量和土壤健康的生物学评价方法.....	135
1. 评价原理	135
2. 评价步骤	135
第 17 章 土壤生物调查数据管理方法	141
1. 土壤生物调查数据范围	141
2. 土壤生物调查数据管理原则	141
3. 土壤生物调查数据管理执行人	141
4. 土壤生物调查数据库管理	141
5. 土壤生物调查数据共享制度	141

第 1 章 土壤生物调查总体目标、工作流程和指标体系

1. 土壤生物调查总体目标

土壤生物调查在土壤普查中具有基础性、重要性和复杂性特征。基于全国第三次土壤普查设定的总体目标和任务预算,针对全国第三次土壤普查中我国大陆的所有土属,以调查植物生长旺盛期的土壤生物群落多样性及其生物功能潜能为目标,开展主要土种的土壤生物多样性与生物功能的概要性调查与评价,为国家耕地质量评价、土壤适宜性评价等提供土壤质量和土壤健康的生物学性状数据。

2. 土壤生物调查工作流程



3. 土壤生物调查评价指标选择原则

土壤生物 (soil organism) 是指在土壤中生活的微生物、动物和植物的总体。由于土壤生物复杂多样, 在土壤中形成复杂的生物网络, 不同生物之间存在随机性和确定性的相互关联和相互作用, 共同影响了土壤生物的多功能性。土壤生物参与土壤中的元素循环, 对土壤结构特别是团聚体的形成具有重要作用, 其生物量、群落组成、功能和活性等是评价土壤质量变化的敏感指标。

在选择土壤生物指标时需要考虑多重原则:

2.1 多功能性兼顾原则

2.1.1 集成培育土壤质量和提升植物生产力功能

2.1.2 重点考虑生物的 C、N、P 的蓄积和转化功能

2.1.3 兼顾促进生长和控制病害功能

2.2 重要性和代表性原则

2.2.1 考虑生物指标对主要功能的贡献度

2.2.2 考虑生物指标对主要生产力提升过程的制约作用

2.2.3 考虑在同类生物指标中的代表性

2.3 稳定性和敏感性原则

2.3.1 考虑土壤生物的演替过程与生物功能之间协同变化的敏感性, 基于不同生物间的相互作用方式, 如中性作用、同种和异种间竞争、捕食、互利共生、片利共生、寄生等, 考虑土壤生物群落的生物量、活性、物种组成和多样性、功能多样性等单项和综合指标在长期演替中的稳定性;

2.3.2 考虑土壤生物指标在长期演替过程中的稳定性

2.4 分子生物学指标与经典生态学指标相结合原则

2.4.1 考虑调查和分析方法的先进性、可靠性和低成本性

2.4.2 兼顾分子生物学分析和经典细胞与群落尺度功能分析。

4. 土壤生物调查评价指标体系

总体上, 土壤生物的生物量、活性、多样性组成及其功能是评价土壤生物多样性和生物健康质量的 4 类基础指标。

土壤微生物包括细菌、放线菌、真菌、藻类和原生动物 5 大类群。土壤微生物生物量指土壤中体积小于 5×10^3 立方微米的微生物总量, 其表征方法包括微生

物生物量碳（或氮、磷）、磷酸酯脂肪酸（PLFA）、DNA 总量（荧光定量 PCR 法）、三磷酸腺苷（ATP）、流式细胞计数（FCM）等（Zhang et al., 2017）。从稳定性、可操作性和成本考虑，微生物生物量碳和 DNA 总量是较好的表征指标。

土壤呼吸可用来评价土壤的生物活性。土壤呼吸商指单位的微生物生物量碳的基础呼吸量（ qCO_2 ，计量单位是 CO_2 -碳，克/小时），是表征土壤微生物单位生物量活性的敏感性指标，利用底物诱导方测定的土壤呼吸可以表征土壤微生物活性的最高潜力。

土壤酶活性也是评价土壤生物活性的重要敏感指标。土壤酶主要来自微生物和植物，其中参与 C、N、P 循环转化的土壤酶包括：参与碳循环的淀粉酶、纤维分解酶、脂肪酶、硫代葡萄糖苷酶和蔗糖酶；参与氮循环的脲酶、蛋白酶、酰胺酶、硝酸还原酶、亚硝酸还原酶等；参与磷循环的磷酸酶。其中代表性的酶包括： β -葡萄糖苷酶，在土壤碳循环中负责纤维素的降解，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）法在多功能酶标仪上进行测定；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，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））分光光度法在多功能标仪上测定；脲酶，在土壤氮循环中负责将有机氮转化为无机氮，用苯酚-次氯酸钠比色法在分光光度计上测定；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，用酚二磺酸比色法在分光光度计上测定；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，用酶联免疫吸附试验（ELISA）在分光光度计上测定。

评价土壤生物多样性需要全面分析土壤中细菌、真菌、古菌、原生动物、显微藻类生物群体（包括活体和死体）基因组遗传组成及其群落功能潜力。宏基因组分析不依赖于微生物的分离培养，克服了纯培养方法的技术限制，以功能基因筛选和测序分析为手段，揭示了土壤微生物的种群结构和功能基因多样性，包括土壤肥力形成、养分转化、耐逆促生等功能。土壤微生物宏基因组组成和多样性是全面评价土壤生物多样性的综合性指标。

土壤微生物包括参与土壤中 C、N、P 转化的不同类群，为调查不同土壤中微生物存在资源利用异质性特征，评价土壤中可培养微生物的组成及其潜在的功能，需要培养分离微生物。根据不同微生物对特异性营养的生长反馈能力差异，利用选择性微生物培养基培养、筛选、分离特定微生物菌群，用于高通量测序，检测

特异性营养菌群资源。如纤维分解菌、固氮细菌、硝化细菌、反硝化细菌、氨化细菌、磷细菌、钾细菌（硅酸盐细菌）等，其数量和优势种群影响了土壤微生物的功能。此外，土壤中广泛分布的病原细菌—青枯菌（劳尔氏菌属）可引起包括马铃薯、番茄、烟草等作物在内的 50 多个科 200 多种植物发生青枯菌；广泛分布的病原真菌—尖孢镰刀菌（镰刀菌属）。可引起瓜类、茄科、香蕉、棉、豆科等 100 多种植物发生枯萎病，因此青枯菌和尖孢镰刀菌组成是评价土壤典型细菌和真菌病害微生物的重要指标。

土壤动物从生物量和数量上以无脊椎动物为主。从大小上分为以下 3 类：1）微动物（<100 微米）如原生动物门、线虫纲和轮虫纲中的动物，存在于土壤团粒表面水膜中；2）中型动物（100-2000 微米）如螨虫、弹尾目、小昆虫、蜘蛛以及与线蚓科的一些动物；3）土壤大型和巨大型动物（>2000 微米）如蚂蚁、白蚁、蜈蚣、昆虫、蚯蚓、蜗牛等。土壤动物之间及其与微生物间存在营养关系，如线虫以细菌和真菌为食，通过食物网影响了土壤有机物质矿化和养分的转化，因此土壤线虫组成是评价土壤生物功能的重要指标。土壤动物一方面促进有机质和养分做好，另一方面，通过形成大孔隙和团粒显著地改善土壤结构。但由于动物迁移性强，其中一些全期土壤动物的数量和多样性可以作为评价土壤生物功能的稳定性指标。

依据土壤质量和土壤健康生物学评价指标的重要性和代表性，评价指标可分为三个层次，第一层包括：土壤微生物生物量、土壤微生物活性、土壤微生物多样性和组成、土壤生物功能多样性、土壤动物多样性和组成。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相互交叉的单项生物学指标，可分为核心指标和补充指标（表 1）。这些指标以土壤生物培育土壤质量和提升植物生产力功能为核心，在有机质和养分蓄积和转化功能方面形成相互关联的系统性指标体系。

表 1 土壤生物健康评价指标体系

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 定量)	细菌绝对丰度 真菌绝对丰度 古菌绝对丰度	固碳菌绝对丰度 固氮菌 DNA 丛枝菌根菌 DNA

2. 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	碳：多酚氧化酶活性 氮：氨单加氧酶活性 磷：磷酸酶活性	碳： β -葡萄糖苷酶活性 氮：脲酶活性、硝酸还原酶活性
3. 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	1. 细菌、真菌、古菌群落组成 2. 细菌、真菌、古菌 Alpha-多样性 (Shannon-Wiener, Chao1 richness, Evenness)	1. 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) 2. 优势功能微生物 (纤维素分解菌, 硝酸菌, 亚硝酸菌, 固氮细菌, 解磷菌, 解钾菌, 青枯菌, 尖孢镰刀菌) 组成
4. 土壤生物功能多样性	宏基因组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 Richness 指数, Evenness 指数)	1. 土壤养分循环功能基因 Beta-多样性 (基于 Bray-Curtis 的 NMDS, PCA) 2. 盐渍化、酸化、干旱逆境下土壤耐逆功能基因相对丰度
5. 土壤动物组成和多样性	线虫密度、组成和多样性	1. 线虫密度 2. 形态学鉴定线虫组成 (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组成
	蚯蚓生物量、组成和多样性	1. 蚯蚓生物量 2. 蚯蚓形态学鉴定组成 (表生型蚯蚓, 内生型蚯蚓, 深栖型蚯蚓)	分子生物学鉴定蚯蚓组成

第2章 土壤生物调查样点布设与采样管理方法

1. 土壤生物调查样点布设原则

紧密结合全国第三次土壤普查总体布点思路，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。

1.1 自然地理主导、兼顾经济地理分区

1.1.1 气候带主导、兼顾自然经济地理分区

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、中部半湿润半干旱区、西部干旱区三个大区，东部湿润区包括黑（东部）、吉（东部）、辽（东部）、鲁（胶东）、苏、沪、浙、皖、赣、鄂、湘、渝、川、贵、桂、滇、粤、琼（大部）、闽、藏（东南）等20个省市地区（不含港澳台）；中部半湿润半干旱区包括黑（西部）、吉（西部）、辽（西部）、内蒙古（东部）、京、津、冀、鲁（大部）、豫、晋、陕（大部）、甘（东部）、宁（南部）、藏（大部）、青（东部）、新（山地）、琼（西部）等16个省（区）；西部干旱区包括新（大部）、甘（西部）、宁（北部）、藏（西北）、青（西部）等5个省（区）。

1.1.2 农用地主导、兼顾其他用地类型

覆盖三普中土壤利用方式范围，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。

1.1.3 覆盖三普全部土属、以土种作为基本分区单元

土壤生物调查覆盖三普中我国大陆的所有土属，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。土

壤生物调查以土种作为样点选择的基本分区单元，根据土种面积占比及大小，确定选择调查土种类型及样点的数量。

表 1 土壤分类及代码

土纲	土类	土属	土属代码	所在省份
铁铝土	砖红壤	红泥质砖红壤	A11111	云南
铁铝土	砖红壤	涂砂质砖红壤	A11112	广东
铁铝土	砖红壤	暗泥质砖红壤	A11113	海南
铁铝土	砖红壤	麻砂质砖红壤	A11114	海南广西云南
铁铝土	砖红壤	砂泥质砖红壤	A11115	广东海南
铁铝土	砖红壤	泥质砖红壤	A11116	云南
铁铝土	砖红壤	涂砂质黄色砖红壤	A11211	
铁铝土	砖红壤	暗泥质黄色砖红壤	A11212	广东海南
铁铝土	砖红壤	麻砂质黄色砖红壤	A11213	海南云南
铁铝土	砖红壤	砂泥质黄色砖红壤	A11214	海南
铁铝土	砖红壤	泥质黄色砖红壤	A11215	云南
铁铝土	砖红壤	暗泥质砖红壤性土	A11311	海南
铁铝土	砖红壤	麻砂质砖红壤性土	A11312	海南
铁铝土	砖红壤	砂泥质砖红壤性土	A11313	海南
铁铝土	赤红壤	红泥质赤红壤	A12111	广西广东云南
铁铝土	赤红壤	暗泥质赤红壤	A12112	云南
铁铝土	赤红壤	麻砂质赤红壤	A12113	福建广东广西云南
铁铝土	赤红壤	硅质赤红壤	A12114	云南
铁铝土	赤红壤	砂泥质赤红壤	A12115	福建广东广西
铁铝土	赤红壤	泥质赤红壤	A12116	广东广西云南
铁铝土	赤红壤	紫土质赤红壤	A12117	云南
铁铝土	赤红壤	灰泥质赤红壤	A12118	云南
铁铝土	赤红壤	麻砂质黄色赤红壤	A12211	海南云南
铁铝土	赤红壤	砂泥质黄色赤红壤	A12212	海南
铁铝土	赤红壤	泥质黄色赤红壤	A12213	云南
铁铝土	赤红壤	硅质黄色赤红壤	A12214	云南
铁铝土	赤红壤	麻砂质赤红壤性土	A12311	广东
铁铝土	赤红壤	砂泥质赤红壤性土	A12312	广东
铁铝土	赤红壤	泥砂质赤红壤性土	A12313	广东
铁铝土	红壤	红泥质红壤	A13111	浙江安徽福建江西湖北湖南广西贵州云南
铁铝土	红壤	暗泥质红壤	A13112	浙江附件云南
铁铝土	红壤	麻砂质红壤	A13113	浙江福建江西湖北湖南广东广西四川云南
铁铝土	红壤	硅质红壤	A13114	江西湖南云南
铁铝土	红壤	砂泥质红壤	A13115	福建广东广西贵州
铁铝土	红壤	泥质红壤	A13116	江西湖南广东贵州
铁铝土	红壤	灰泥质红壤	A13117	湖南广东江西云南
铁铝土	红壤	红砂质红壤	A13118	江西湖南广东
铁铝土	红壤	紫土质红壤	A13119	云南
铁铝土	红壤	红泥质黄红壤	A13211	浙江
铁铝土	红壤	泥砂质黄红壤	A13212	西藏
铁铝土	红壤	暗泥质黄红壤	A13213	浙江四川
铁铝土	红壤	麻砂质黄红壤	A13214	浙江安徽福建江西湖北湖南广西云南
铁铝土	红壤	硅质黄红壤	A13215	江西湖南贵州云南
铁铝土	红壤	砂泥质黄红壤	A13216	浙江福建广西
铁铝土	红壤	泥质黄红壤	A13217	浙江安徽江西湖南云南
铁铝土	红壤	红泥质棕红壤	A13311	浙江安徽江西湖南
铁铝土	红壤	麻砂质棕红壤	A13312	江西
铁铝土	红壤	硅质棕红壤	A13313	湖北
铁铝土	红壤	红泥质山原红壤	A13411	云南
铁铝土	红壤	暗泥质山原红壤	A13412	云南
铁铝土	红壤	砂泥质山原红壤	A13413	四川
铁铝土	红壤	泥质山原红壤	A13414	云南
铁铝土	红壤	磷灰质山原红壤	A13415	云南
铁铝土	红壤	红泥质红壤性土	A13511	江西湖南
铁铝土	红壤	暗泥质红壤性土	A13512	云南
铁铝土	红壤	麻砂质红壤性土	A13513	安徽湖北

铁铝土	红壤	砂泥质红壤性土	A13514	安徽湖南湖北贵州
铁铝土	黄壤	红泥质黄壤	A21111	四川贵州云南
铁铝土	黄壤	暗泥质黄壤	A21112	浙江贵州云南
铁铝土	黄壤	麻砂质黄壤	A21113	安徽福建江西湖南广东海南
铁铝土	黄壤	硅质黄壤	A21114	福建江西湖南贵州
铁铝土	黄壤	砂泥质黄壤	A21115	浙江广西海南四川重庆贵州
铁铝土	黄壤	泥质黄壤	A21116	浙江安徽福建江西湖南贵州云南
铁铝土	黄壤	灰泥质黄壤	A21117	湖北四川重庆贵州云南
铁铝土	黄壤	紫土质黄壤	A21118	贵州
铁铝土	黄壤	硅质漂洗黄壤	A21211	贵州
铁铝土	黄壤	泥质漂洗黄壤	A21212	四川重庆云南
铁铝土	黄壤	灰泥质漂洗黄壤	A21213	贵州
铁铝土	黄壤	砂泥质表潜黄壤	A21311	广西安徽西藏四川
铁铝土	黄壤	硅质黄壤性土	A21412	湖北贵州
铁铝土	黄壤	砂泥质黄壤性土	A21413	湖北广东四川重庆贵州
铁铝土	黄壤	泥质黄壤性土	A21414	安徽湖南四川重庆贵州
铁铝土	黄壤	红砂质黄壤性土	A21415	湖北
淋溶土	黄棕壤	黄土质黄棕壤	B11111	甘肃
淋溶土	黄棕壤	麻砂质黄棕壤	B11112	安徽河南西藏
淋溶土	黄棕壤	砂泥质黄棕壤	B11113	安徽湖北四川重庆
淋溶土	黄棕壤	泥质黄棕壤	B11114	安徽湖北陕西甘肃
淋溶土	黄棕壤	泥砂质黄棕壤	B11115	重庆四川西藏
淋溶土	黄棕壤	暗泥质暗黄棕壤	B11211	云南
淋溶土	黄棕壤	麻砂质暗黄棕壤	B11212	广西贵州云南
淋溶土	黄棕壤	砂泥质暗黄棕壤	B11213	广西云南
淋溶土	黄棕壤	泥质暗黄棕壤	B11214	湖北湖南贵州
淋溶土	黄棕壤	灰泥质暗黄棕壤	B11215	贵州云南
淋溶土	黄棕壤	紫土质暗黄棕壤	B11216	云南
淋溶土	黄棕壤	硅质黄棕壤性土	B11311	安徽湖北
淋溶土	黄棕壤	泥质黄棕壤性土	B11312	安徽
淋溶土	黄褐土	黄土质黄褐土	B12111	河南湖北陕西甘肃
淋溶土	黄褐土	泥砂质黄褐土	B12112	河南
淋溶土	黄褐土	黄土质粘盘黄褐土	B12211	安徽江西河南湖北
淋溶土	黄褐土	黄土质白浆化黄褐土	B12311	江苏安徽河南湖北
淋溶土	黄褐土	黄土质黄褐土性土	B12411	四川
淋溶土	棕壤	黄土质棕壤	B21111	山西内蒙古辽宁吉林甘肃
淋溶土	棕壤	泥砂质棕壤	B21112	河北辽宁山东云南
淋溶土	棕壤	麻砂质棕壤	B21114	河北山西内蒙古辽宁吉林山东安徽河南陕西甘肃西藏
淋溶土	棕壤	硅质棕壤	B21115	辽宁甘肃云南
淋溶土	棕壤	砂泥质棕壤	B21116	山西山东
淋溶土	棕壤	泥质棕壤	B21117	辽宁
淋溶土	棕壤	灰泥质棕壤	B21118	北京山西陕西云南
淋溶土	棕壤	紫土质棕壤	B21119	云南
淋溶土	棕壤	红泥质棕壤	B21121	云南
淋溶土	棕壤	黄土质白浆化棕壤	B21211	辽宁
淋溶土	棕壤	麻砂质白浆化棕壤	B21212	山东
淋溶土	棕壤	泥质白浆化棕壤	B21213	陕西
淋溶土	棕壤	黄土质潮棕壤	B21311	辽宁
淋溶土	棕壤	泥砂质潮棕壤	B21312	内蒙古辽宁山东
淋溶土	棕壤	泥砂质棕壤性土	B21411	西藏
淋溶土	棕壤	麻砂质棕壤性土	B21412	辽宁河南
淋溶土	棕壤	硅质棕壤性土	B21413	辽宁甘肃
淋溶土	棕壤	泥质棕壤性土	B21414	辽宁河南
淋溶土	棕壤	砂泥质棕壤性土	B21415	山东
淋溶土	棕壤	暗泥质棕壤性土	B21416	山东
淋溶土	棕壤	灰泥质棕壤性土	B21417	河北
淋溶土	暗棕壤	黄土质暗棕壤	B31111	内蒙古
淋溶土	暗棕壤	暗泥质暗棕壤	B31112	吉林黑龙江云南
淋溶土	暗棕壤	麻砂质暗棕壤	B31113	内蒙古辽宁吉林黑龙江甘肃西藏
淋溶土	暗棕壤	硅质暗棕壤	B31114	黑龙江湖北
淋溶土	暗棕壤	砂泥质暗棕壤	B31115	湖北西藏
淋溶土	暗棕壤	泥质暗棕壤	B31116	内蒙古黑龙江湖北云南
淋溶土	暗棕壤	灰泥质暗棕壤	B31117	湖北云南
淋溶土	暗棕壤	紫土质暗棕壤	B31118	云南
淋溶土	暗棕壤	暗泥质白浆化暗棕壤	B31211	吉林黑龙江
淋溶土	暗棕壤	麻砂质白浆化暗棕壤	B31212	吉林黑龙江

淋溶土	暗棕壤	硅质白浆化暗棕壤	B31213	吉林黑龙江
淋溶土	暗棕壤	黄土质草甸暗棕壤	B31311	甘肃
淋溶土	暗棕壤	泥砂质草甸暗棕壤	B31312	内蒙古黑龙江
淋溶土	暗棕壤	暗泥质草甸暗棕壤	B31313	吉林黑龙江
淋溶土	暗棕壤	麻砂质草甸暗棕壤	B31314	内蒙古黑龙江
淋溶土	暗棕壤	砂泥质草甸暗棕壤	B31315	湖北
淋溶土	暗棕壤	暗泥质潜育暗棕壤	B31411	黑龙江
淋溶土	暗棕壤	泥砂质灰化暗棕壤	B31511	吉林
淋溶土	暗棕壤	暗泥质灰化暗棕壤	B31512	吉林
淋溶土	暗棕壤	麻砂质灰化暗棕壤	B31513	吉林黑龙江西藏
淋溶土	暗棕壤	泥质灰化暗棕壤	B31514	吉林
淋溶土	暗棕壤	灰泥质灰化暗棕壤	B31515	吉林
淋溶土	暗棕壤	暗泥质暗棕壤性土	B31611	吉林
淋溶土	暗棕壤	麻砂质暗棕壤性土	B31612	吉林黑龙江云南
淋溶土	白浆土	黄土质白浆土	B32111	吉林黑龙江
淋溶土	白浆土	黄土质草甸白浆土	B32211	吉林
淋溶土	白浆土	泥砂质草甸白浆土	B32212	黑龙江
淋溶土	白浆土	黄土质潜育白浆土	B32311	吉林黑龙江
淋溶土	白浆土	泥砂质潜育白浆土	B32312	黑龙江
淋溶土	棕色针叶林土	麻砂质棕色针叶林土	B41111	黑龙江新疆云南
淋溶土	棕色针叶林土	砂泥质棕色针叶林土	B41112	四川
淋溶土	棕色针叶林土	泥质棕色针叶林土	B41113	云南
淋溶土	棕色针叶林土	麻砂质灰化棕色针叶林土	B41211	黑龙江四川
淋溶土	棕色针叶林土	紫土质灰化棕色针叶林土	B41212	云南
淋溶土	棕色针叶林土	麻砂质表潜棕色针叶林土	B41311	黑龙江新疆
淋溶土	灰化土	麻砂质灰化土	B42011	西藏
半淋溶土	燥红土	涂砂质燥红土	C11111	海南
半淋溶土	燥红土	暗泥质燥红土	C11112	海南
半淋溶土	燥红土	麻砂质燥红土	C11113	海南
半淋溶土	燥红土	砂泥质燥红土	C11114	海南
半淋溶土	燥红土	泥砂质褐红土	C11211	四川云南
半淋溶土	燥红土	暗泥质褐红土	C11212	云南
半淋溶土	燥红土	麻砂质褐红土	C11213	云南
半淋溶土	燥红土	硅质褐红土	C11214	云南
半淋溶土	褐土	黄土质褐土	C21111	河北山西内蒙古辽宁山东河南陕西甘肃
半淋溶土	褐土	泥砂质褐土	C21112	北京河南西藏
半淋溶土	褐土	灰泥质褐土	C21113	辽宁山东陕西
半淋溶土	褐土	红土质褐土	C21114	甘肃
半淋溶土	褐土	复钙褐土	C21115	河北
半淋溶土	褐土	黄土质石灰性褐土	C21211	北京山西内蒙古辽宁山东河南陕西甘肃四川
半淋溶土	褐土	泥砂质石灰性褐土	C21212	河北河南西藏
半淋溶土	褐土	硅质石灰性褐土	C21213	内蒙古陕西
半淋溶土	褐土	砂泥质石灰性褐土	C21214	四川
半淋溶土	褐土	泥质石灰性褐土	C21215	西藏
半淋溶土	褐土	灰泥质石灰性褐土	C21216	北京
半淋溶土	褐土	红土质石灰性褐土	C21217	甘肃
半淋溶土	褐土	黄土质淋溶褐土	C21311	山西内蒙古辽宁江苏陕西甘肃
半淋溶土	褐土	泥砂质淋溶褐土	C21312	河南西藏
半淋溶土	褐土	暗泥质淋溶褐土	C21313	山东江苏
半淋溶土	褐土	硅质淋溶褐土	C21314	河北甘肃
半淋溶土	褐土	灰泥质淋溶褐土	C21315	北京山东河南
半淋溶土	褐土	砂泥质淋溶褐土	C21316	山东
半淋溶土	褐土	黄土质潮褐土	C21411	辽宁
半淋溶土	褐土	泥砂质潮褐土	C21412	北京河北辽宁山东河南
半淋溶土	褐土	油壤土	C21511	陕西
半淋溶土	褐土	垆壤土	C21512	陕西
半淋溶土	褐土	立茬壤土	C21513	陕西
半淋溶土	褐土	斑斑土	C21514	陕西
半淋溶土	褐土	壤塔土	C21515	陕西
半淋溶土	褐土	硅质燥褐土	C21611	四川
半淋溶土	褐土	泥砂质燥褐土	C21612	四川
半淋溶土	褐土	黄土质褐土性土	C21711	山西辽宁河南陕西
半淋溶土	褐土	泥砂质褐土性土	C21712	河南西藏
半淋溶土	褐土	暗泥质褐土性土	C21713	辽宁
半淋溶土	褐土	硅质褐土性土	C21714	陕西甘肃
半淋溶土	褐土	灰泥质褐土性土	C21715	辽宁
半淋溶土	褐土	砂泥质褐土性土	C21716	山东

半淋溶土	褐土	堆垫褐土性土	C21717	河南
半淋溶土	灰褐土	黄土质灰褐土	C31111	新疆
半淋溶土	灰褐土	泥砂质灰褐土	C31112	西藏
半淋溶土	灰褐土	硅质灰褐土	C31113	新疆
半淋溶土	灰褐土	泥质灰褐土	C31114	西藏
半淋溶土	灰褐土	泥质暗灰褐土	C31211	宁夏
半淋溶土	灰褐土	黄土质淋溶灰褐土	C31311	青海新疆
半淋溶土	灰褐土	砂泥质淋溶灰褐土	C31312	西藏
半淋溶土	灰褐土	黄土质石灰性灰褐土	C31411	甘肃青海
半淋溶土	灰褐土	泥质石灰性灰褐土	C31412	甘肃
半淋溶土	灰褐土	灰泥质石灰性灰褐土	C31413	甘肃
半淋溶土	灰褐土	泥砂质灰褐土性土	C31511	西藏
半淋溶土	灰褐土	砂泥质灰褐土性土	C31512	西藏
半淋溶土	黑土	黄土质黑土	C32111	内蒙古辽宁吉林吉林黑龙江甘肃
半淋溶土	黑土	泥砂质黑土	C32112	吉林黑龙江
半淋溶土	黑土	暗泥质黑土	C32113	河北
半淋溶土	黑土	黄土质草甸黑土	C32211	内蒙古吉林黑龙江甘肃
半淋溶土	黑土	泥砂质草甸黑土	C32212	内蒙古黑龙江
半淋溶土	黑土	黄土质白浆化黑土	C32311	吉林黑龙江
半淋溶土	黑土	黄土质表潜黑土	C32411	黑龙江
半淋溶土	灰色森林土	暗泥质灰色森林土	C33111	河北
半淋溶土	灰色森林土	麻砂质灰色森林土	C33112	内蒙古新疆
半淋溶土	灰色森林土	硅质灰色森林土	C33113	内蒙古
半淋溶土	灰色森林土	风砂质灰色森林土	C33114	河北
半淋溶土	灰色森林土	麻砂质暗灰色森林土	C33211	新疆
钙层土	黑钙土	黄土质黑钙土	D11111	内蒙古吉林黑龙江甘肃新疆
钙层土	黑钙土	泥砂质黑钙土	D11112	黑龙江吉林
钙层土	黑钙土	泥质黑钙土	D11113	内蒙古
钙层土	黑钙土	灰泥质黑钙土	D11114	内蒙古
钙层土	黑钙土	黄土质淋溶黑钙土	D11211	黑龙江新疆
钙层土	黑钙土	麻砂质淋溶黑钙土	D11212	内蒙古
钙层土	黑钙土	黄土质石灰性黑钙土	D11311	内蒙古吉林黑龙江甘肃青海新疆
钙层土	黑钙土	红土质石灰性黑钙土	D11312	青海
钙层土	黑钙土	泥砂质石灰性黑钙土	D11313	吉林黑龙江青海
钙层土	黑钙土	麻砂质石灰性黑钙土	D11314	内蒙古
钙层土	黑钙土	硅质石灰性黑钙土	D11315	青海
钙层土	黑钙土	黄土质淡黑钙土	D11411	吉林
钙层土	黑钙土	暗泥质淡黑钙土	D11412	内蒙古
钙层土	黑钙土	黄土质草甸黑钙土	D11511	内蒙古吉林黑龙江
钙层土	黑钙土	泥砂质草甸黑钙土	D11512	内蒙古
钙层土	黑钙土	苏打盐化黑钙土	D11611	吉林
钙层土	黑钙土	碱化黑钙土	D11700	吉林
钙层土	栗钙土	黄土质栗钙土	D21111	河北内蒙古甘肃青海
钙层土	栗钙土	泥砂质栗钙土	D21112	河北青海
钙层土	栗钙土	麻砂质栗钙土	D21113	内蒙古
钙层土	栗钙土	硅质栗钙土	D21114	内蒙古青海
钙层土	栗钙土	泥质栗钙土	D21115	内蒙古青海
钙层土	栗钙土	白干栗钙土	D21116	内蒙古
钙层土	栗钙土	砂田栗钙土	D21117	甘肃
钙层土	栗钙土	暗泥质栗钙土	D21118	河北
钙层土	栗钙土	灰泥质栗钙土	D21119	河北
钙层土	栗钙土	黄土质暗栗钙土	D21211	内蒙古甘肃青海新疆
钙层土	栗钙土	泥砂质暗栗钙土	D21212	内蒙古河北青海
钙层土	栗钙土	麻砂质暗栗钙土	D21213	内蒙古
钙层土	栗钙土	泥质暗栗钙土	D21214	内蒙古青海
钙层土	栗钙土	白干暗栗钙土	D21215	吉林
钙层土	栗钙土	砂田暗栗钙土	D21216	
钙层土	栗钙土	暗泥质暗栗钙土	D21217	河北
钙层土	栗钙土	黄土质淡栗钙土	D21311	山西陕西甘肃青海
钙层土	栗钙土	泥砂质淡栗钙土	D21312	新疆
钙层土	栗钙土	麻砂质淡栗钙土	D21313	内蒙古
钙层土	栗钙土	硅质淡栗钙土	D21314	内蒙古
钙层土	栗钙土	泥质淡栗钙土	D21315	内蒙古
钙层土	栗钙土	白干淡栗钙土	D21316	山西
钙层土	栗钙土	黄土质草甸栗钙土	D21411	甘肃
钙层土	栗钙土	泥砂质草甸栗钙土	D21412	河北内蒙古
钙层土	栗钙土	白干草甸栗钙土	D21413	吉林

钙层土	栗钙土	氯化物栗钙土	D21511	河北
钙层土	栗钙土	硫酸盐栗钙土	D21512	河北
钙层土	栗钙土	苏打栗钙土	D21513	河北
钙层土	栗钙土	碱化栗钙土	D21600	河北
钙层土	栗钙土	麻砂质栗钙土性土	D21711	河北
钙层土	栗钙土	暗泥质栗钙土性土	D21712	河北
钙层土	栗钙土	泥质栗钙土性土	D21713	河北
钙层土	栗钙土	硅质栗钙土性土	D21714	河北
钙层土	栗钙土	灰泥质栗钙土性土	D21715	河北
钙层土	栗褐土	黄土质栗褐土	D31111	河北山西
钙层土	栗褐土	泥砂质栗褐土	D31112	河北
钙层土	栗褐土	麻砂质栗褐土	D31113	河北
钙层土	栗褐土	暗泥质栗褐土	D31114	河北
钙层土	栗褐土	泥质栗褐土	D31115	河北
钙层土	栗褐土	硅质栗褐土	D31116	河北
钙层土	栗褐土	灰泥质栗褐土	D31117	河北
钙层土	栗褐土	黄土质淡栗褐土	D31211	山西内蒙古
钙层土	栗褐土	泥砂质潮栗褐土	D31311	内蒙古
钙层土	黑垆土	黑垆土	D32100	陕西甘肃宁夏
钙层土	黑垆土	粘化黑垆土	D32200	陕西甘肃
钙层土	黑垆土	潮黑垆土	D32300	宁夏
钙层土	黑垆土	黑麻土	D32400	甘肃
干旱土	棕钙土	黄土质棕钙土	E11111	青海新疆
干旱土	棕钙土	泥砂质棕钙土	E11112	青海
干旱土	棕钙土	暗泥质棕钙土	E11113	内蒙古
干旱土	棕钙土	硅质棕钙土	E11114	内蒙古
干旱土	棕钙土	泥砂质淡棕钙土	E11211	新疆
干旱土	棕钙土	泥砂质草甸棕钙土	E11311	内蒙古新疆
干旱土	棕钙土	氯化物棕钙土	E11411	青海
干旱土	棕钙土	硫酸盐棕钙土	E11412	青海新疆
干旱土	棕钙土	碱化棕钙土	E11500	新疆
干旱土	棕钙土	黄土质棕钙土性土	E11611	青海
干旱土	灰钙土	黄土质灰钙土	E21111	甘肃宁夏青海新疆
干旱土	灰钙土	泥砂质灰钙土	E21112	宁夏青海
干旱土	灰钙土	砂田灰钙土	E21113	甘肃
干旱土	灰钙土	黄土质淡灰钙土	E21211	内蒙古宁夏青海
干旱土	灰钙土	泥砂质淡灰钙土	E21212	甘肃宁夏青海
干旱土	灰钙土	砂田淡灰钙土	E21213	甘肃
干旱土	灰钙土	泥砂质草甸灰钙土	E21311	宁夏
干旱土	灰钙土	氯化物灰钙土	E21411	宁夏
干旱土	灰钙土	硫酸盐灰钙土	E21412	甘肃宁夏新疆
干旱土	灰钙土	砂田苏打灰钙土	E21413	甘肃
漠土	灰漠土	黄土质灰漠土	F11111	甘肃新疆
漠土	灰漠土	泥砂质钙质灰漠土	F11211	宁夏
漠土	灰漠土	草甸灰漠土	F11300	新疆内蒙古
漠土	灰漠土	盐化物灰漠土	F11411	新疆
漠土	灰漠土	硫酸盐灰漠土	F11412	甘肃新疆
漠土	灰漠土	碱化灰漠土	F11500	新疆
漠土	灰漠土	泥质灌耕灰漠土	F11611	新疆
漠土	灰漠土	泥砂质灌耕灰漠土	F11612	甘肃
漠土	灰棕漠土	泥砂质灰棕漠土	F12111	甘肃青海新疆
漠土	灰棕漠土	泥砂质石膏灰棕漠土	F12211	甘肃青海新疆
漠土	灰棕漠土	泥砂质石膏盐盘灰棕漠土	F12311	青海
漠土	灰棕漠土	泥砂质灌耕灰棕漠土	F12411	甘肃青海
漠土	棕漠土	泥砂质棕漠土	F21111	甘肃
漠土	棕漠土	硫酸盐棕漠土	F21211	新疆
漠土	棕漠土	泥砂质石膏棕漠土	F21311	甘肃新疆
漠土	棕漠土	泥砂质石膏盐盘棕漠土	F21411	甘肃新疆
漠土	棕漠土	泥砂质灌耕棕漠土	F21511	甘肃新疆
初育土	黄绵土	绵土	G11111	山西陕西甘肃宁夏
初育土	黄绵土	绵砂土	G11012	陕西甘肃宁夏
初育土	红粘土	典型红粘土	G12100	河北山西辽宁山东河南
初育土	红粘土	积钙红粘土	G12200	辽宁陕西甘肃宁夏青海
初育土	红粘土	麻砂质复盐基红粘土	G12311	浙江
初育土	红粘土	红泥质复盐基红粘土	G12312	浙江
初育土	新积土	山洪土	G13111	贵州云南
初育土	新积土	石灰性山洪土	G13112	内蒙古陕西甘肃宁夏青海西藏

初育土	新积土	堆垫土	G13113	青海广东
初育土	新积土	坝淤土	G13114	
初育土	新积土	漫淤土	G13115	陕西
初育土	新积土	冲积砾砂土	G13211	西藏
初育土	新积土	冲积砾泥土	G13212	云南
初育土	新积土	冲积砂土	G13213	辽宁黑龙江江西四川西藏
初育土	新积土	冲积壤土	G13214	四川云南
初育土	新积土	石灰性冲积砂土	G13215	河北山西内蒙古辽宁黑龙江山东陕西四川重庆西藏
初育土	新积土	石灰性冲积壤土	G13216	陕西甘肃西藏
初育土	新积土	石灰性冲积粘土	G13217	内蒙古西藏
初育土	新积土	珊瑚砂土	G13300	海南
初育土	龟裂土	盐龟裂土	G14011	新疆
初育土	龟裂土	碱龟裂土	G14012	新疆
初育土	风沙土	荒漠固定风沙土	G15111	甘肃新疆
初育土	风沙土	荒漠半固定风沙土	G15112	青海新疆
初育土	风沙土	荒漠流动风沙土	G15113	甘肃青海新疆
初育土	风沙土	草原固定风沙土	G15211	山西辽宁陕西宁夏西藏
初育土	风沙土	草原半固定风沙土	G15212	河北辽宁陕西宁夏西藏
初育土	风沙土	草原流动风沙土	G15213	陕西青海西藏
初育土	风沙土	草甸固定风沙土	G15311	河北辽宁黑龙江河南西藏
初育土	风沙土	草甸半固定风沙土	G15312	河北辽宁黑龙江四川
初育土	风沙土	草甸流动风沙土	G15313	河北
初育土	风沙土	滨海固定风沙土	G15411	广东
初育土	风沙土	滨海半固定风沙土	G15412	广东
初育土	风沙土	滨海流动风沙土	G15413	海南
初育土	石灰(岩)土	红色石灰土	G21100	湖北广东海南广西四川重庆贵州云南
初育土	石灰(岩)土	黑色石灰土	G21200	浙江湖南广东贵州云南
初育土	石灰(岩)土	棕色石灰土	G21300	江苏浙江安徽江西湖北湖南广西陕西四川贵州
初育土	火山灰土	典型火山灰土	G22100	云南黑龙江广东
初育土	火山灰土	暗火山灰土	G22200	辽宁
初育土	火山灰土	基性岩火山砾泥土	G22311	安徽江西海南
初育土	火山灰土	基性岩火山泥土	G22312	黑龙江江苏安徽福建海南
初育土	紫色土	酸紫砾泥土	G23111	浙江贵州
初育土	紫色土	酸紫砂土	G23112	安徽湖南广东广西四川重庆贵州
初育土	紫色土	酸紫壤土	G23113	浙江湖北湖南广东海南四川贵州云南
初育土	紫色土	酸紫粘土	G23114	浙江福建湖南广西四川重庆贵州云南
初育土	紫色土	紫砾泥土	G23211	河南四川重庆云南
初育土	紫色土	紫砂土	G23212	江苏江西
初育土	紫色土	紫壤土	G23213	安徽湖南四川重庆贵州云南
初育土	紫色土	紫泥土	G23214	安徽河南湖北广西四川重庆贵州
初育土	紫色土	灰紫砾泥土	G23311	河南四川重庆贵州
初育土	紫色土	灰紫砂土	G23312	安徽广东四川重庆
初育土	紫色土	灰紫壤土	G23313	江西四川重庆贵州湖南广东
初育土	紫色土	灰紫泥土	G23314	浙江安徽江西湖北广西四川重庆贵州云南
初育土	磷质石灰土	磷质珊瑚砂土	G24111	海南
初育土	磷质石灰土	盐渍磷质珊瑚砂土	G24311	
初育土	粗骨土	麻砂质酸性粗骨土	G25111	山东浙江安徽江西湖北
初育土	粗骨土	硅质酸性粗骨土	G25112	江苏浙江安徽湖南
初育土	粗骨土	泥质酸性粗骨土	G25113	浙江安徽江西湖南贵州
初育土	粗骨土	红砂质酸性粗骨土	G25114	浙江江西湖北
初育土	粗骨土	暗泥质中性粗骨土	G25211	山东浙江安徽
初育土	粗骨土	麻砂质中性粗骨土	G25212	辽宁河南
初育土	粗骨土	硅质中性粗骨土	G25213	河南
初育土	粗骨土	泥质中性粗骨土	G25214	辽宁河南陕西四川
初育土	粗骨土	砂泥质中性粗骨土	G25215	山东
初育土	粗骨土	灰泥质钙质粗骨土	G25311	辽宁河南青海贵州
初育土	粗骨土	暗泥质钙质粗骨土	G25312	河北
初育土	粗骨土	硅质钙质粗骨土	G25313	陕西
初育土	粗骨土	砂泥质钙质粗骨土	G25314	山东
初育土	粗骨土	白粉土	G25411	广西
初育土	石质土	麻砂质酸性石质土	G26111	河北黑龙江山东河南
初育土	石质土	灰泥质酸性石质土	G26112	贵州
初育土	石质土	红砂质酸性石质土	G26113	江西
初育土	石质土	麻砂质中性石质土	G26211	辽宁
初育土	石质土	硅质中性石质土	G26212	辽宁河南
初育土	石质土	泥质中性石质土	G26213	河南

初育土	石质土	砂泥质中性石质土	G26214	山东
初育土	石质土	灰泥质钙质石质土	G26311	河北山西辽宁山东河南
初育土	石质土	砂泥质钙质石质土	G26312	山东
初育土	石质土	含盐石质土	G26400	
半水成土	草甸土	草甸砂土	H11111	内蒙古辽宁黑龙江西藏
半水成土	草甸土	草甸壤土	H11112	内蒙古辽宁黑龙江西藏湖南青海四川
半水成土	草甸土	草甸粘土	H11113	内蒙古辽宁黑龙江
半水成土	草甸土	石灰性草甸砂土	H11211	河北内蒙古青海西藏
半水成土	草甸土	石灰性草甸壤土	H11212	内蒙古辽宁黑龙江西藏新疆
半水成土	草甸土	石灰性草甸粘土	H11213	辽宁黑龙江西藏新疆
半水成土	草甸土	白浆化草甸壤土	H11311	黑龙江
半水成土	草甸土	潜育草甸砂土	H11411	黑龙江西藏
半水成土	草甸土	潜育草甸壤土	H11412	黑龙江
半水成土	草甸土	潜育草甸粘土	H11413	黑龙江
半水成土	草甸土	石灰性潜育草甸砂土	H11414	西藏
半水成土	草甸土	石灰性潜育草甸壤土	H11415	黑龙江
半水成土	草甸土	石灰性潜育草甸粘土	H11416	黑龙江
半水成土	草甸土	白浆化潜育草甸粘土	H11417	黑龙江
半水成土	草甸土	氯化物草甸土	H11511	辽宁青海西藏
半水成土	草甸土	硫酸盐草甸土	H11512	辽宁
半水成土	草甸土	苏打草甸土	H11513	内蒙古黑龙江新疆
半水成土	草甸土	碱化草甸土	H11600	内蒙古黑龙江西藏
半水成土	潮土	潮砂土	H21111	江苏山东陕西
半水成土	潮土	潮壤土	H21112	河北陕西山东
半水成土	潮土	潮粘土	H21113	河北江苏
半水成土	潮土	石灰性潮砂土	H21114	河北辽宁江苏安徽山东河南陕西青海新疆
半水成土	潮土	石灰性潮壤土	H21115	北京河北山西内蒙古辽宁山东江苏安徽河南陕西青海新疆
半水成土	潮土	石灰性潮粘土	H21116	北京辽宁江苏安徽河南陕西
半水成土	潮土	石灰性灰潮砂土	H21211	上海江苏安徽河南湖北湖南
半水成土	潮土	石灰性灰潮壤土	H21212	上海江苏浙江江西湖北湖南广西四川重庆贵州
半水成土	潮土	石灰性灰潮粘土	H21213	上海江苏浙江安徽四川重庆
半水成土	潮土	灰潮砂土	H21214	浙江安徽江西河南湖北广东广西
半水成土	潮土	灰潮壤土	H21215	安徽江西河南湖北湖南广西
半水成土	潮土	灰潮粘土	H21216	河南
半水成土	潮土	脱潮砂土	H21311	河北内蒙古山东河南甘肃
半水成土	潮土	脱潮壤土	H21312	河北山西山东河南陕西
半水成土	潮土	脱潮粘土	H21313	北京河南
半水成土	潮土	湿潮砂土	H21411	河北河南陕西
半水成土	潮土	湿潮壤土	H21412	河北陕西
半水成土	潮土	湿潮粘土	H21413	河北河南湖北
半水成土	潮土	氯化物潮土	H21511	河北内蒙古辽宁山东浙江安徽河南陕西宁夏
半水成土	潮土	硫酸盐潮土	H21512	河北山西内蒙古辽宁山东陕西宁夏青海新疆
半水成土	潮土	苏打潮土	H21513	山西内蒙古
半水成土	潮土	镁盐潮土	H21514	新疆
半水成土	潮土	碱化砂土	H21611	安徽山东
半水成土	潮土	碱潮壤土	H21612	河北辽宁河南
半水成土	潮土	碱潮粘土	H21613	安徽
半水成土	潮土	淤潮砂土	H21711	内蒙古
半水成土	潮土	淤潮壤土	H21712	河南
半水成土	潮土	淤潮粘土	H21713	内蒙古河南
半水成土	潮土	表锈淤潮砂土	H21714	宁夏
半水成土	砂姜黑土	黑姜土	H22111	河北安徽河南湖北
半水成土	砂姜黑土	黄姜土	H22112	山东安徽
半水成土	砂姜黑土	覆泥黑姜土	H22113	山东安徽
半水成土	砂姜黑土	灰黑姜土	H22211	河北山东河南
半水成土	砂姜黑土	覆淤黑姜土	H22212	山东
半水成土	砂姜黑土	氯化物盐化砂姜黑土	H22311	江苏
半水成土	砂姜黑土	碱黑姜土	H22411	安徽
半水成土	砂姜黑土	黑泥土	H22511	广西
半水成土	林灌草甸土	林甸土	H23111	新疆
半水成土	林灌草甸土	耕灌林甸土	H23112	新疆
半水成土	林灌草甸土	硫酸盐盐化林灌草甸土	H23211	新疆
半水成土	林灌草甸土	氯化物盐化林灌草甸土	H23212	新疆
半水成土	林灌草甸土	苏打盐化林灌草甸土	H23213	新疆
半水成土	林灌草甸土	碱化林灌草甸土	H23300	
半水成土	山地草甸土	山地草甸壤土	H24111	北京山西河北

半水成土	山地草甸土	山地草原草甸土	H24200	
半水成土	山地草甸土	山地灌丛草甸砂土	H24311	湖南贵州
半水成土	山地草甸土	山地灌丛草甸壤土	H24312	辽宁黑龙江浙江安徽湖北四川贵州
半水成土	山地草甸土	山地灌丛草甸粘土	H24313	福建陕西贵州
水成土	沼泽土	典型沼泽土	J11100	河北辽宁湖北青海
水成土	沼泽土	腐泥沼泽土	J11200	辽宁陕西青海新疆四川
水成土	沼泽土	泥炭沼泽土	J11300	辽宁黑龙江湖北青海四川贵州云南西藏
水成土	沼泽土	草甸沼泽土	J11400	河北内蒙古辽宁黑龙江陕西青海新疆西藏四川
水成土	沼泽土	盐化沼泽土	J11500	辽宁青海
水成土	沼泽土	碱化沼泽土	J11600	
水成土	泥炭土	埋藏草炭土	J21111	辽宁黑龙江
水成土	泥炭土	草炭土	J21112	辽宁黑龙江青海四川
水成土	泥炭土	中位泥炭土	J21200	黑龙江
水成土	泥炭土	高位泥炭土	J21300	
盐碱土	草甸盐土	氯化物草甸盐土	K11111	内蒙古辽宁山东陕西宁夏新疆
盐碱土	草甸盐土	硫酸盐草甸盐土	K11112	山西内蒙古吉林山东陕西宁夏青海
盐碱土	草甸盐土	苏打草甸盐土	K11113	内蒙古宁夏
盐碱土	草甸盐土	镁质草甸盐土	K11114	宁夏
盐碱土	草甸盐土	氯化物结壳盐土	K11211	新疆
盐碱土	草甸盐土	氯化物沼泽盐土	K11311	青海
盐碱土	草甸盐土	硫酸盐沼泽盐土	K11312	宁夏
盐碱土	草甸盐土	氯化物碱化盐土	K11411	河南青海
盐碱土	草甸盐土	苏打碱化盐土	K11412	内蒙古山东
盐碱土	草甸盐土	镁质碱化盐土	K11413	甘肃
盐碱土	滨海盐土	滨海砂盐土	K12111	河北山东海南
盐碱土	滨海盐土	滨海泥盐土	K12112	辽宁上海山东
盐碱土	滨海盐土	滨海沼泽盐土	K12200	辽宁广东海南
盐碱土	滨海盐土	涂砂盐土	K12311	河北山东广西
盐碱土	滨海盐土	涂泥盐土	K12312	河北辽宁上海浙江广西
盐碱土	酸性硫酸盐土	典型酸性硫酸盐土	K13100	福建海南
盐碱土	酸性硫酸盐土	含盐酸性硫酸盐土	K13200	广东广西
盐碱土	漠境盐土	氯化物漠境盐土	K14111	新疆
盐碱土	漠境盐土	氯化物干旱盐土	K14211	内蒙古
盐碱土	漠境盐土	硫酸盐干旱盐土	K14212	内蒙古
盐碱土	漠境盐土	氯化物残余盐土	K14311	陕西宁夏青海新疆
盐碱土	漠境盐土	硫酸盐残余盐土	K14312	新疆
盐碱土	漠境盐土	苏打残余盐土	K14313	新疆
盐碱土	寒原盐土	氯化物寒原盐土	K15111	西藏
盐碱土	寒原盐土	硫酸盐寒原草甸盐土	K15211	西藏
盐碱土	寒原盐土	寒原硼酸盐土	K15300	
盐碱土	寒原盐土	碳酸盐寒碱盐土	K15411	西藏
盐碱土	碱土	草甸碱土	K20100	内蒙古辽宁吉林黑龙江山东河南
盐碱土	碱土	草原碱土	K20200	内蒙古
盐碱土	碱土	龟裂碱土	K20300	宁夏
盐碱土	碱土	氯化物盐化碱土	K20411	河南
盐碱土	碱土	硫酸盐盐化碱土	K20412	新疆
盐碱土	碱土	苏打盐化碱土	K20413	辽宁吉林黑龙江
盐碱土	碱土	荒漠碱土	K20500	新疆
人为土	水稻土	潮泥田	L11111	江苏浙江安徽福建江西湖南广东广西陕西四川贵州云南
人为土	水稻土	潮泥砂田	L11112	浙江广东广西
人为土	水稻土	湖泥田	L11113	上海江苏安徽云南
人为土	水稻土	涂泥田	L11114	浙江福建
人为土	水稻土	淡涂泥田	L11115	上海广东
人为土	水稻土	潮白土田	L11116	浙江
人为土	水稻土	麻砂泥田	L11117	江西湖北安徽江西湖南
人为土	水稻土	砂泥田	L11118	江西湖南广西
人为土	水稻土	鳍泥田	L11119	江西安徽湖南
人为土	水稻土	灰泥田	L11121	湖北湖南贵州
人为土	水稻土	紫泥田	L11122	浙江安徽江西湖北湖南广西四川重庆贵州云南
人为土	水稻土	红砂泥田	L11123	浙江江西湖北
人为土	水稻土	红泥田	L11124	浙江安徽江西福建湖北湖南云南
人为土	水稻土	黄泥田	L11125	浙江四川贵州
人为土	水稻土	马肝泥田	L11126	江苏安徽江西河南湖北四川重庆
人为土	水稻土	浅潮泥田	L11211	河北山东浙江江西河南广西陕西四川云南辽宁黑龙江
人为土	水稻土	浅潮泥砂田	L11212	广东广西黑龙江

人为土	水稻土	浅湖泥田	L11213	山东陕西云南
人为土	水稻土	浅涂泥田	L11214	浙江广东海南
人为土	水稻土	浅淡涂泥田	L11215	浙江
人为土	水稻土	浅潮白土田	L11216	浙江
人为土	水稻土	浅暗泥田	L11217	浙江江西广东海南
人为土	水稻土	浅麻砂泥田	L11218	浙江江西湖北湖南广东广西
人为土	水稻土	浅砂泥田	L11219	江西湖北湖南广东海南四川贵州
人为土	水稻土	浅鳊泥田	L11221	浙江安徽江西湖南贵州
人为土	水稻土	浅灰泥田	L11222	浙江安徽江西湖北湖南广东广西贵州
人为土	水稻土	浅紫泥田	L11223	浙江江西湖南广西海南四川重庆贵州云南
人为土	水稻土	浅红砂泥田	L11224	浙江江西湖北湖南
人为土	水稻土	浅白粉泥田	L11225	广西
人为土	水稻土	浅红泥田	L11226	浙江安徽江西福建湖南广东广西贵州云南
人为土	水稻土	浅黄泥田	L11227	四川重庆
人为土	水稻土	浅马肝泥田	L11228	安徽河南四川
人为土	水稻土	浅黄土田	L11229	黑龙江辽宁
人为土	水稻土	渗潮泥田	L11311	河北江苏浙江安徽海南广西陕西新疆四川重庆贵州云南湖南上海
人为土	水稻土	渗潮泥砂田	L11312	广东西藏
人为土	水稻土	渗湖泥田	L11313	江苏安徽
人为土	水稻土	渗涂泥田	L11314	浙江广东海南
人为土	水稻土	渗淡涂泥田	L11315	上海浙江广东
人为土	水稻土	渗潮白土田	L11316	浙江
人为土	水稻土	渗暗泥田	L11317	海南
人为土	水稻土	渗麻砂泥田	L11318	安徽福建湖南广东海南
人为土	水稻土	渗砂泥田	L11319	海南广西贵州
人为土	水稻土	渗鳊泥田	L11321	安徽广东四川贵州
人为土	水稻土	渗灰泥田	L11322	湖南广东贵州
人为土	水稻土	渗紫泥田	L11323	湖南广东海南广西四川重庆贵州
人为土	水稻土	渗红砂泥田	L11324	湖南
人为土	水稻土	渗红泥田	L11325	浙江安徽湖南
人为土	水稻土	渗马肝泥田	L11326	江苏安徽陕西
人为土	水稻土	渗黄土田	L11328	陕西
人为土	水稻土	渗煤锈田	L11329	广东贵州
人为土	水稻土	青潮泥田	L11411	河北辽宁黑龙江上海江苏浙江安徽江西福建山东河南湖北广东海南广西陕西新疆四川贵州云南
人为土	水稻土	青暗泥田	L11412	海南
人为土	水稻土	青麻砂泥田	L11413	江西安徽湖南
人为土	水稻土	青砂泥田	L11414	江西四川重庆
人为土	水稻土	青鳊泥田	L11415	江西安徽湖南
人为土	水稻土	青灰泥田	L11416	安徽江西湖北湖南贵州
人为土	水稻土	青紫泥田	L11417	安徽江西湖南四川重庆贵州云南
人为土	水稻土	青红砂泥田	L11418	江西
人为土	水稻土	青红泥田	L11419	安徽江西湖北广西云南
人为土	水稻土	青马肝泥田	L11421	江苏安徽四川重庆
人为土	水稻土	烂泥田	L11422	浙江安徽湖南广东海南广西陕西贵州云南
人为土	水稻土	锈水田	L11423	湖北湖南广东贵州
人为土	水稻土	表潜黄泥田	L11424	陕西
人为土	水稻土	泥炭土田	L11425	广东
人为土	水稻土	黄斑粘田	L11511	上海江苏浙江安徽海南贵州
人为土	水稻土	漂黄泥田	L11611	四川重庆贵州
人为土	水稻土	漂红泥田	L11612	安徽福建湖北湖南
人为土	水稻土	漂鳊泥田	L11613	安徽湖南广东
人为土	水稻土	漂马肝田	L11614	江苏安徽湖北陕西
人为土	水稻土	漂涂泥田	L11615	广东
人为土	水稻土	氯化物涂砂田	L11711	海南
人为土	水稻土	氯化物涂泥田	L11712	河北辽宁广东
人为土	水稻土	硫酸盐泥砂田	L11713	辽宁
人为土	水稻土	咸酸田	L11811	广东
人为土	灌淤土	灌淤砂土	L21111	新疆西藏
人为土	灌淤土	灌淤壤土	L21112	河北甘肃青海新疆
人为土	灌淤土	灌淤粘土	L21113	河北甘肃青海
人为土	灌淤土	潮灌淤壤土	L21211	内蒙古甘肃宁夏青海
人为土	灌淤土	表锈灌淤壤土	L21311	宁夏
人为土	灌淤土	盐化灌淤土	L21400	
人为土	灌漠土	灌漠壤土	L22111	甘肃新疆
人为土	灌漠土	灰灌漠砂土	L22211	新疆

人为土	灌漠土	灰灌漠壤土	L22212	甘肃新疆
人为土	灌漠土	灰灌漠粘土	L22213	新疆
人为土	灌漠土	潮灌漠壤土	L22311	甘肃
人为土	灌漠土	硫酸盐灌漠土	L22411	甘肃新疆
高山土	草毡土	草毡砾砂土	M11111	西藏
高山土	草毡土	草毡砂土	M11112	四川西藏
高山土	草毡土	草毡壤土	M11113	青海新疆西藏
高山土	草毡土	薄草毡砂土	M11211	青海新疆西藏
高山土	草毡土	棕草毡砾砂土	M11311	西藏
高山土	草毡土	棕草毡壤土	M11312	青海西藏
高山土	草毡土	湿草毡砂土	M11411	青海西藏
高山土	草毡土	湿草毡壤土	M11412	西藏
高山土	黑毡土	黑毡砾砂土	M12111	西藏
高山土	黑毡土	黑毡砾泥土	M12112	西藏
高山土	黑毡土	黑毡砂土	M12113	山西西藏
高山土	黑毡土	黑毡壤土	M12114	青海新疆四川西藏
高山土	黑毡土	薄黑毡砂土	M12211	青海西藏
高山土	黑毡土	薄黑毡粘土	M12212	宁夏青海
高山土	黑毡土	棕黑毡砾泥土	M12311	四川西藏
高山土	黑毡土	棕黑毡砂土	M12312	西藏青海
高山土	黑毡土	棕黑毡壤土	M12313	西藏
高山土	黑毡土	湿黑毡砂土	M12411	西藏
高山土	寒钙土	寒钙砂土	M21111	西藏
高山土	寒钙土	寒钙壤土	M21112	西藏
高山土	寒钙土	暗寒钙壤土	M21211	青海西藏
高山土	寒钙土	淡寒钙砾砂土	M21311	西藏
高山土	寒钙土	淡寒钙砂土	M21312	青海
高山土	寒钙土	盐化寒钙土	M21400	
高山土	冷钙土	冷钙砾砂土	M22111	西藏
高山土	冷钙土	冷钙砂土	M22112	西藏
高山土	冷钙土	冷钙壤土	M22113	西藏
高山土	冷钙土	暗冷钙壤土	M22211	新疆
高山土	冷钙土	淡冷钙砾砂土	M22311	西藏
高山土	冷钙土	盐化冷钙土	M22411	西藏
高山土	冷棕钙土	冷棕钙砾砂土	M23111	西藏
高山土	冷棕钙土	冷棕钙砂土	M23112	西藏
高山土	冷棕钙土	冷棕钙壤土	M23113	西藏
高山土	冷棕钙土	冷棕钙粘土	M23114	西藏
高山土	冷棕钙土	淋淀冷棕钙砾砂土	M23211	西藏
高山土	冷棕钙土	淋淀冷棕钙砂土	M23212	西藏
高山土	冷棕钙土	淋淀冷棕钙壤土	M23213	西藏
高山土	寒漠土	寒漠砾砂土	M31011	西藏
高山土	寒漠土	寒漠砂土	M31012	青海
高山土	寒漠土	寒漠粘土	M31013	西藏
高山土	冷漠土	冷漠砾砂土	M32011	西藏
高山土	冷漠土	冷漠砂土	M32012	西藏
高山土	寒冻土	寒冻土	M41000	四川云南西藏

2. 土壤生物调查样点布设

2.1 土壤生物调查样点布设方法

在全国 1:50000 土壤类型（土种）图的基础上，叠加 1:50000 土地利用类型图、1:50000 全国县级行政区划图、1:50000 地形地貌图，参考 1:100 万全国耕地质量等级图、1:100 万生态区类型分布图等，根据上述全国土壤生物调查样点布设原则，按气候区类型、土地利用类型分布比例、耕地质量等级、土种面积比例等确定土壤生物调查样点的分布比例，基于土种的典型分布区，在全国典型土壤剖面调查点分布图的基础上，确定土壤生物调查样点分布。在没有土种分布图

的地区，综合利用土地利用、地形地貌等信息确定土壤生物调查样点分布。最终通过专家组评估修定得出全国土壤生物调查样点分布图及采样位置。

2.2 土壤生物调查样点布设数量与区域

2.2.1 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比例为东部：中部：西部=65%：30%：5%。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。

2.2.2 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、低三个等级的耕地。

2.2.3 根据覆盖三普所有调查土属、以土种作为基本分区单元原则，依据土属之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，每个土属至少一个土种类型；合理调整不同区域和土地利用方式下的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，例如不同土属可按土种面积占比和面积大小选择前 10-20%的土种布置两个样点。。

3. 土壤生物调查样地设置

3.1 土壤生物调查样地布设应以三普土壤剖面调查点为中心，设置在剖面调查点周边，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。

3.2 每个土壤生物调查样地面积应大于 1 公顷。在平原区地形地貌简单、土种分布面积较大的地区，可按 100m×100m 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，可根据具体土种形状与面积适当调整样地面积与形状，如丘陵山区狭长地带，可以采用 50m×200m 长方形确定样地，保证样地中土种类型的一致性。

4. 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。针对一定区域条件下形成的土种，样品采集时必须坚持景观性原则，保证所采土壤生物样品能够代表所在的景观类型下形成的土种。为了保证土壤样品的代表性，必需坚持土壤生物样品采集的随机性原则，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。

5. 土壤生物调查样品采集

每个样点的样地根据样地的地形、土壤条件划分为 3 个条件相对一致的采样分区（图 1），采用分区随机采样法采集土壤生物样品。

5.1 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；农田铲除表面表土，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，利用直径 50mm 的不锈钢土钻随机采集 20 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，上述步骤再重复一次，每个采样区块采集 2 个混合样，每个样点共采集 6 个混合样，作为 6 个重复。

5.2 土壤蚯蚓的手拣法采样：在每个采样区块随机选择 2 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。每个采样区块采集 2 个混合样，每个样点共采集 6 个混合样，作为 6 个重复。

5.3 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、生物活动活跃的采样区块，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 均匀分区和简单随机网格采样点确定

适用于地形起伏小、土壤理化特征均匀的区域。将研究区域均匀划分成为 3 个采样分区。每个分区按既定尺寸划分成网格，将全部网格点编上号码，决定样品数后，随机抽取规定的样品数目的多个号码，其号码对应的网格点即为将进行土壤采样点。随机数可以利用掷骰子、抽签、查随机数表的方法获得，具体方法可见《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》。

5.5 按变化条件分区和随机采样点确定

适用于地形或土壤理化特征有显著变异的区域。如果根据前期收集的资料发现采样区域内的土壤有明显的几种类型或者所研究的属性有明显变化时，先将区域分成相应的几块，分块内地形条件、群落类型、土壤类型和属性较为一致，不同分块间差异明显。森林系统可根据地形，按坡上、坡中、坡下不同的地形部位

进行分块；草地系统可根据丘顶、丘间地、迎风坡、背风坡分块。在每个分块内采用 5.4 方法划分网格和选择采样点。或者采用 S 形随机确定土壤采样点。

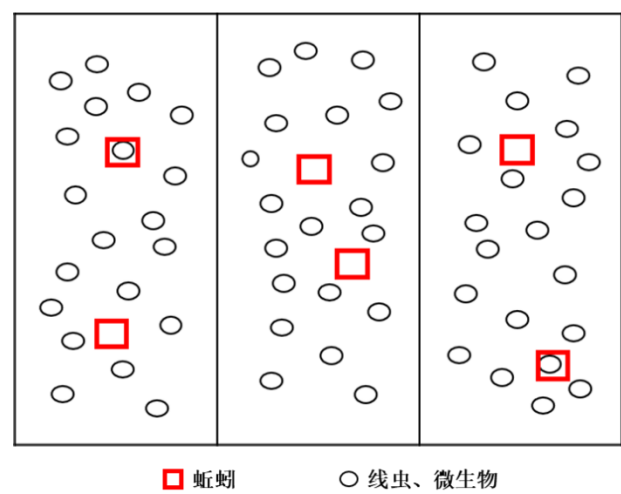


图 1 土壤生物调查样地的采样分以及随机采样点和样方布设

6. 土壤生物调查人员组成和调查时间选择

6.1 土壤生物调查在全国 9 个农业区域分区开展采样。根据每个区域根据调查样点数量，组织 3~5 支采样队伍。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。

6.2 土壤生物调查原则上在植物生长旺盛期、即土壤生物多样性和功能最高的时期采样。在耕地类型下，选择在作物生长旺盛期或多季作物的夏粮收获期进行(表 1)。

6.3 土壤生物调查应避开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。

6.4 土壤生物调查可与土壤剖面调查同时进行。由土壤剖面调查人员负责立地条件与生产利用状况等调查，土壤剖面表层样品的理化分析数据可以用于土壤生物多样性和土壤生物健康评价。土壤生物调查选择的土种样点在没有土壤剖面调查点时，需要同时进行土地利用等调查和土壤表层样品的基础物理化学分析。

表 1 土壤生物调查分区采样时间选择

耕地划分区	采样时间
东北区	6 月-7 月
内蒙古及长城沿线区、黄土高原区、黄淮海区、甘新区	6 月-8 月
青藏区	7 月-8 月
长江中下游区、西南区、华南区	6 月-7 月或 9 月-10 月

7. 土壤生物调查样品和数据管理

7.1 土壤生物样品和数据管理组

由具有土壤分类、生物、分析、统计、制图方向的专业技术人员组成，负责本次土壤生物调查样品收集、保存、分发等管理工作，负责土壤生物调查数据的收集、上报和入库工作。

7.2 土壤生物样品中转站

样品中转站应具备收集、处理、储存土壤微生物和线虫、蚯蚓样品等功能，如 4℃低温冷藏箱、土壤动物形态观察与鉴定、DNA 提取、-80℃超低温冰箱等。

7.3 土壤生物调查样品分析编号原则

土壤生物样品中转站应承担分析样品编号功能。在野外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。

7.4 土壤生物调查质量控制

成立土壤生物调查质量控制专家组，由第三次土壤普查质量管理人员、土壤生物调查和分析质量管理人员组成，在土壤生物样品采集、土壤生物样品分析、土壤生物数据上报和入库过程进行全流程质量控制，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。

第 3 章 土壤微生物和线虫样品采集与保存运输方法

1. 采样前期准备

1.1 制定采样计划

采样前需根据采样目的制定采样报告表格, 包含: 场地位置、采样确切点、场地历史、采样日期、临近取样前天气状况(气温、降雨)。实地采样前根据所收集的资料进行现场勘察, 主要考察采样区域的土壤类型、地形、植物群落等分布情况。

1.2 器具准备

根据采样目的准备相应需要的器具, 可能涉及到的器具如下:

工具类: 原状取土钻(总长 1 米, 钻头长为 20 cm, 直径 50 mm)。

器材类: 全球定位系统(GPS)、数码相机、卷尺、比色卡、铁盒、样品袋、干冰、冰袋、冷藏箱等。

试剂类: 纯水、酒精(95%)等

文具类: 样品标签、采样记录表、铅笔、记号笔、资料夹等。

野外防护用品: 工作服、工作鞋、安全帽、药品箱等。

注意事项: (1) 采样工具和盛放土壤样品的容器必须事先灭菌, 或先用采样区内的土壤擦拭; (2) 采样下一个样品前采样工具先用 95%酒精擦拭干净并晾干。

2. 采样设计

2.1 划分采样分区

以三普剖面点为中心设置具有相同土壤理化性状、立地条件与生产利用情况的 1 公顷样地, 根据地形设置为 100m × 100m 正方形或者 50m × 200m 的长方形。每个样点的样地根据样地的地形、土壤条件划分为 3 个条件相对一致的采样区域(第 2 章图 1)。

2.2 确定采样点数

土壤微生物和线虫采样使用混合采样, 采集扰动型样品。在采集多点组成的混合样品时, 采样应沿着一定的路线, 按照均匀、随机、等量 and 多点混合的原则进行。采样点均匀分布可以起到控制整个采样范围的作用; 随机定点可以避免主

观误差，提高样品的代表性；等量是要求每一点采集土样深度要一致，采样量要一致；多点混合是指把一个采样分区内各点所采集的土样均匀混合构成一个混合样品，以提高样品的代表性，一个混合样品由 20 个样点组成。每个采样区域采集 6 个混合样品。

2.3 采样深度

采样深度在各个地形中均设置为 0-20 cm。

3. 采样步骤

3.1 位置选择

根据研究目的，选择土壤样本的代表性采集位点。采样点选在被采土壤类型特征明显的地方，地形相对平坦、稳定、植被良好的地点；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，可能造成土壤特性错乱，使土壤失去代表性，不宜设采样点；采样点离铁路、公路至少 300m 以上；采样点以剖面发育完整、层次较清楚、无侵入体为准，不在水土流失严重或表土被破坏处设采样点。确定采样位置并进行记录，例如在地图上参照易于辨认的静止物进行标注、使用非常精确的地图或使用 GIS 定位。

3.2 采样现场和土壤信息记录

应系统地记录采样现场的植被、地形、天气和土地利用等情况，以及对土壤进行简单的田间描述。

3.3 采样方法

3.3.1 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) 对于多点混合样，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) 用于土壤微生物性质分析和土壤线虫分离鉴定的每个混合样品以 1000g 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。

3.3.2 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与好气状态下土壤样品相同的方式采取；在水位下面的土样用泥炭钻或掘洞器采取。

(2) 把淹水状态下采取的各层土样排在塑料布上，经验对后立即装入塑料袋，以手揉搓样袋驱出空气，扎紧袋口，结上标签；再套上另一个塑料袋，扎紧袋口，结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。

3.4 样品标记

盛放样品的容器要进行清楚地标记，而且标记信息应该是唯一的，使每份样品都和取样点对应。好气土壤在样品袋或容器内外各放置一张标签，用铅笔注明采样地点、日期、采样深度、土壤名称、编号及采样人等。淹水土壤使用不透水的双层样品袋或容器盛放，外层容器的内外各放置一张标签。避免使用从土壤中吸收水分或向土壤中释放溶剂或增塑剂之类物品作为标签。标记样品的同时在采样报告上做好采样记录。采样结束后，由专人逐项检查采样记录、样袋标签和土壤样品，如有缺项和错误，及时补齐更正。

3.5 样品保存与运输

在样地里采集土壤线虫和微生物样品后，装在无菌自封袋中立即转移至样品中转站保存。具体操作如下：选取保温性能好的塑料收纳箱，用保温铝箔将收纳箱内测包裹紧实，按照采样点将土壤线虫和微生物样品分开存放于两个收纳箱中。为保证采集线虫和微生物的生物活性，土壤样品与干冰冰袋分层放置进行低温储存，使土壤样品处于低温状态且受冷均匀，降低温度对线虫和微生物样品的影响。土壤线虫根据运输时间长短，保持土壤 40-60% 的水分。选用顺丰等特快专递寄送样品，样品运输途中避免雨淋和暴晒。在邮寄样品时还需再一次核对样

品类别和数量。

3.6 样品中转站

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和线虫样本等功能。中转站线虫和微生物样品库分别配有专人负责，(1) 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等；(2) 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。

中转站配备低温保存土壤微生物和线虫样品的冰箱(4℃冰箱和-80℃超低温冰箱)。土壤微生物和线虫样品短期保存于4℃冰箱，样品采集的一周内需完成线虫分离和制片，以及微生物和线虫基因组DNA提取。提取的微生物和线虫基因组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。

第4章 土壤蚯蚓野外采集与保存、运输方法

1. 范畴与术语

本部分适用于全国第三次土壤普查蚯蚓调查采样。

2. 工具与器材

采样记录表, 全球定位系统 (GPS)、数码相机、地形图、地图、绘图笔、铁锹, 卷尺、手套, 塑料布、100%酒精, 蚯蚓保存盒 (透气), 冰袋, 蛇皮袋, 个人野外防护用品、小台称、文具等。

3. 样地分区

以三普剖面点为中心设置具有相同土壤理化性状、立地条件与生产利用情况的1公顷样地, 根据地形设置为100m×100m正方形或者50m×200m的长方形。每个样点的样地根据样地的地形、土壤条件划分为3个条件相对一致的采样区域。在每个区域随机选择2个1m×1m、深度为30cm的样方 (第2章图1)。

4. 采样点选取

根据研究目的, 选择土壤蚯蚓样本的代表性采集位点。采样点选在被采土壤类型特征明显的地方, 地形相对平坦、稳定良好且土壤湿润的地点; 坡脚、洼地等具有从属景观特征的地点不设采样点; 沟渠、田埂、粪坑、堆肥点、坟墓附近等处人为干扰大, 可能造成土壤生物特性错乱, 使样本失去代表性, 不宜设采样点; 采样点离铁路、公路至少300m以上; 不在水土流失严重或表土被破坏处设采样点; 不在多种土类、多种母质母岩交错分布、面积较小的边缘地区布设采样点。确定采样位置并进行记录。

5. 采样步骤

5.1 采样信息记录

确定好采样点样品编码, 写好样品标签, 样品标签需用铅笔注明采样地点、日期、采样深度、土壤名称、编号及采样人等。并在采样记录表中系统记录采样现场的植被、地形、天气和土地利用等情况, 以及对土壤进行简单的田间描述。

5.2 采样方法

根据采样点设置原则, 在样地作物进行收获时, 在每个分区中土壤还没被翻动的区域内随机设置两个蚯蚓采样样方, 样方面积为100cm×100cm、深度为30cm,

利用手工分拣法采集蚯蚓样本。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，手工就地分拣采集蚯蚓并计数，在计数时以蚯蚓头部数量为准。每个样方内采集到的所有蚯蚓作为一个蚯蚓样本，一个样地三个区域共采集六个土壤蚯蚓样本。

6. 蚯蚓样品保存与运输

将不同蚯蚓样本分别保存于有适量原位土壤的顶部透气蚯蚓盒中，在底部和侧边贴上样本标签，并在采样记录本上记录样本详细信息。采样结束后，由专人逐项检查采样记录、核对蚯蚓样本类别和数量，保证样本无遗漏错误。

将蚯蚓样品与干冰冰袋分层放置进行低温储存，使土壤样品处于低温状态且受冷均匀，降低温度对蚯蚓样品的影响。根据运输时间长短，保温盒底部铺满湿润滤纸（适时适量添水），保持土壤 40%~60% 的水分。选用顺丰特快专递寄送样品，运送途中避免雨淋、暴晒和剧烈震动。在邮寄样品时还需再一次核对样品类别和数量。

7. 样品中转站

蚯蚓样品中转站集成了标准化收集、处理、储存和分配蚯蚓样本等功能。中转站蚯蚓样品库分别配有专人负责，（1）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等；（2）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。

中转站配备恒温温室或大型人工气候箱、低温冰箱（4℃冰箱和-80℃超低温冰箱）。蚯蚓活体和透气蚯蚓盒一起入库，短期保存于 20℃恒温和 60%空气恒湿环境下。样品采集后的一周内完成蚯蚓样本个体的称重、标本制作，以及蚯蚓线粒体组 DNA 的提取，两周内完成蚯蚓样本形态学鉴定。蚯蚓标本可保存在常温或 4℃冰箱中，蚯蚓线粒体 DNA 用甘油冻存在-80℃超低温冰箱中，避免反复冻融，提高样本中 DNA 的稳定性。以上处理具体操作步骤见本手册第 13 章。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。

第5章 土壤微生物生物量的测定—熏蒸提取法

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，并估算其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 值范围广泛的好氧和厌氧（淹水，稻田）土壤。本标准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%，通常可以被忽略不计。调用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。

2. 规范性引用文件

ISO 10381-6: 1993 土壤质量-采样-第 6 分：实验室中测定好氧微生物过程的土壤的采集、处理及贮存指南（ISO 10381-6: 1993, Soil quality-Sample-Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory）。

ISO 10694: 1995 土壤质量-土壤有机质和总碳的测定—干烧法（元素分析）（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）。

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。

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 24h, 土壤有机碳能够被 0.5mol/L K_2SO_4 溶液定量提取并被地测定出来, 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。

5. 试剂和材料

5.1 土壤

土样应遵守土壤采集、处理及贮存指南 (ISO 10381-6)。土样过筛 (孔径 < 2mm) 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%。

土壤田间持水量测定见附录 A。

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。本方法特别要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。

5.2 试剂

应使用公认的分析纯试剂, 包括:

5.2.1 硅脂 (中等粘度)。

5.2.2 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。

5.2.3 硫酸钾溶液, $c(K_2SO_4)=0.5\text{ mol/L}$ ($\rho = 87.135\text{ g/l}$)。

5.2.4 碱石灰。

6. 仪器

6.1 室温, $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 培养。

6.2 防爆干燥机。

6.3 滤纸。

6.4 玻璃烧杯。

6.5 有盖培养皿。

6.6 塑料瓶 (250 mL)。

6.7 抽真空装置 (水泵或电泵)。

6.8 水平或架空摇床。

6.9 冰箱 15°C 到 -20°C 。

6.10 防爆沸颗粒。

7. 熏蒸和提取

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(5.1)相当于25~50.0g烘干基的新鲜土样3份,置于玻璃烧杯(6.4)或有盖培养皿(6.5)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(5.2.2)的烧杯1只,烧杯内放入少量防爆沸的颗粒(6.10),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 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 暗室孕育22~24h。

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; w:v)。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ISO10694)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L-layer)。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2min)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(50.0g烘干基的新鲜)3份,置于塑料瓶作为对照土样。见2方法,立即用200 mL的 K_2SO_4 (5.2.3)进行提取。

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200mL K_2SO_4 (5.2.3),用水平振荡器(6.8)振荡30min(200r min^{-1}),或用立式振荡器振荡45min(60r min^{-1}),提取液用滤纸(6.3)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 -15°C 到 -20°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,参照附录B进行提取预处理。

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使数值相关。碳含量的测定使用重铬酸钾氧化容量法(8.1)或仪器分析法(8.2)。

8.1 微生物生物量碳-重铬酸钾法

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,从所消耗的重铬酸钾量,计算碳的含量。

8.1.2 附加试剂

8.1.2.1 重铬酸钾, $c(\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7)=0.0667 \text{ mol/L}$ (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。

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

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

8.1.2.4 硫酸亚铁铵滴定液, $c[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]=0.040 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。15.69g 硫酸亚铁铵溶于去离子水,缓缓加入 20mL 浓硫酸(8.1.2.3),用去离子水定容至 1000 mL。

8.1.2.5 1,10-邻菲罗啉硫酸混合液, 0.025 mol/L 。

8.1.2.6 酸混合液:2 倍体积的浓硫酸(8.1.2.3)与 1 倍体积的磷酸混合(8.1.2.2)。

8.1.3 附加仪器

8.1.3.1 李比希式冷凝器(冷凝水)。

8.1.3.2 250 mL 圆底烧瓶。

8.1.3.3 酸式滴定管, 10mL, 以 0.05mL 刻度标记。

8.1.3.4 吸管, 2mL。

8.1.4 程序

吸收 8mL 的过虑提取液(7.1)(P_s)于圆底烧瓶(8.1.3.2)中,用吸管(8.1.3.4)加入 2mL 的重铬酸钾(8.1.2.1)(P_d)和 15mL 的酸混合液(8.1.2.6)。通过冷凝器(8.1.3.1)轻轻地回流混合液 30 分钟,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 8mL 的硫酸钾溶液(5.2.3)的重复空白样。消化的空白样也被称之为“回流空白”。

加入几滴邻菲罗啉硫酸混合液(8.1.2.5)作为指示剂,用硫酸亚铁铵溶液

(8.1.2.4) 回滴 (8.1.3.3) 过剩的重铬酸钾来测定。

8.1.5 结果计算

有机碳含量的计算按照公式 (1) 和 (2)

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

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;

$$C(\mu\text{g/g dry soil}) = C(\mu\text{g/ml}) \times (P_K/D_W + S_W) \quad (2)$$

式中:

P_K ——提取物的质量, 单位 g;

D_W ——样本烘干重 (按照 ISO11465 的标准测定), 单位 g;

S_W ——土壤水 (水重 (g) / 烘干土重 (g)) (按照 ISO11465 的标准测定);

微生物生物量碳 B_C 的计算按照公式 (3):

$$B_C = E_C / k_{EC} \quad (3)$$

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;

$k_{EC} = 0.38$ 。

系数 k_{EC} 是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。

8.2 微生物生物量碳 - 碳光谱分析法

8.2.1 原理

提取的土壤有机碳在过硫酸钾 ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) 溶液中能够氧化为二氧化碳, 二氧化碳可以通过红外 (IR) 或紫外 (UV) 光谱分析测定。

8.2.2 附加试剂

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

8.2.2.2 磷酸 (H_3PO_4) (见 8.1.2.2)。

8.2.2.3 聚合偏磷酸钠 [$(\text{NaPO}_3)_n$]，超级纯。

8.2.2.4 过硫酸钾试剂。20.0g 的过硫酸钾 (8.2.2.1) 溶于 900mL 的去离子水，用磷酸 (8.2.2.2) 调节至 pH2.0，最后用去离子水定容至 1L。

8.2.2.5 聚合偏磷酸钠试剂。50.0g 聚合偏磷酸钠 (8.2.2.3) 溶于 900mL 去离子水，用磷酸 (8.2.2.2) 调节至 pH2.0，最后用去离子水定容至 1L。

8.2.3 附加仪器

8.2.3.1 碳-自动分析仪 (红外检测法) 或连续流动分析仪 (比色法检测)。本标准这部分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。

8.2.4 程序

对于自动化的紫外过硫酸氧化方法，需取 5mL 硫酸钾土壤提取液 (7.1) 与 5mL 聚合偏磷酸钠溶液 (8.2.2.5) 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 (8.2.2.4) 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。

8.2.5 结果计算

计算提取土壤有机碳含量使用公式 (4)

$$C(\mu\text{g/g dry soil}) = [(V \times D_V) - (B \times D_B)] \times (P_K / D_w + S_w) \quad (4)$$

式中：

V——样本 C 浓度，单位 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ；

D_V ——磷酸钠稀释样本的体积，单位 mL；

B ——空白 C 浓度，单位 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ；

D_B ——磷酸钠稀释空白的体积，单位 mL；

P_K ——见公式 2；

D_w ——见公式 2；

S_w ——见公式 2。

计算生物量 B_c 使用公式 (5)

$$B_c = E_c / k_{EC} \quad (5)$$

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；

$$k_{EC}=0.45$$

注1: 注 1: 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。

注2: 注 2: 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。

9. 精度

附录中总结了实验室检测该方法的精度的详细信息。该实验室试验所得的值仅适用于附录 C 提供的土壤所示的浓度范围。

附录 A 土壤田间持水量的测定

A. 1 范围

本方法是适合获得土壤田间持水量的值, 但这个值在应用中不是关键的。

A. 2 原理

底部带孔圆筒充满泥土, 加盖浸泡在水中, 沥干。通过称重测定土壤持水量, 105°C 烘干至恒重再称重。

A. 3 仪器

A. 3. 1 圆筒, 体积一定, 长大约 50-150mm, 直径 50-100mm, 底部带孔。

A. 3. 2 水浴 (室温)。

A. 3. 3 托盘, 带有一个排水孔, 装有厚度 20-50mm 湿的精石英砂。

A. 3. 4 烘箱, 能够保持 $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 的温度。

A. 3. 5 天平, 称重的精度为 $\pm 0.01\text{g}$ 。

A. 4 程序

用滤纸覆盖底部带孔的圆筒 (A. 3. 1), 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含砂子的托盘 (A. 3. 3) 中, 根据土壤类型的差异沥干 2h-24h。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。

A. 5 计算

田间持水量 (WHC) 的计算, 用 % 表达, 如下:

$$WHC = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

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。

A. 6 结果的表达

土壤田间持水量（*WHC*）以占土壤烘干重的百分比表达。

附录 B 含有大量活性根的土壤微生物生物量的估算 - 预提取过程

B. 1 附加试剂

B. 1. 1 硫酸钾溶液， $c(K_2SO_4) = 0.05 \text{ mol/l}$ (8.714 g/l 超级纯的硫酸钾)。

B. 1. 2 附加仪器。

B. 1. 3 离心机。

B. 2 程序

取湿土（相当于 25-50g 干土）到 250mL 玻璃瓶中，用 100mL 硫酸钾溶液的以 200 r/min 振荡预提取 20 min 后过筛（耕作土过 2mm 的孔，草地土过 3mm 的孔）。另外添加 75mL 的硫酸钾溶液 (B. 1. 1) 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 (B. 2. 1) 土壤悬浮液，15min，转速大约 500g。倒掉上清液，在土壤中加入 3 滴氯仿 (5. 2. 2)，按照 7. 1 的程序进行熏蒸。

B. 3 评价

采用上述方法处理含有活性根的土壤对于土壤微生物生物量碳的测定非常关键。另外，此处理可降低土壤中无机氮的背景值，对于土壤微生物生物量氮的测定更容易。它也降低了测量干燥土壤中微生物生物量的问题，因此非常适合测量年内土壤微生物生物量碳和氮的波动。微生物生物量在此预提取过程中不会被提取出来。

附录 C 实验室的试验结果

本方法在德国的 11 个试验室进行了重复测试。选用黄土和黑土 2 种耕作土

壤进行试验。表 C.1 所示的结果是未熏蒸和熏蒸土壤的有机碳含量及 E_c 。 E_c 指熏蒸土壤与未熏蒸土壤提取的有机碳含量的差值。土壤微生物生物量的计算是 E_c 除以转换系数 k_{EC} 。

表 C.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
$E_c^{3)}$	180	15	8.6
1) CV=变异系数 2) SE=4 个重复平均值的标准误 3) 熏蒸土壤与未熏蒸土壤有机碳含量的差值			

参考文献

- [1] GB/T 39228-2020 39228-2020 土壤微生物生物量的测定熏蒸提取法
- [2] ISO 10390: 1994, Soil quality-Determination of pH.
- [3] ISO 11274: -¹⁾, Soil quality-Determination of water-retention characteristics - Laboratory methods.
- [4] Brookes P.C., *et al.* Chloroform fumigation on the release and extractability of soil nitrogen: A rapid direct extraction method for measuring microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biol. Biochem.*, **17**, 1985, pp. 837-842.
- [5] Harden T., *et al.* Soil microbial biomass estimated by fumigation-extraction and substrate-induced respiration in two pesticide-treated soils. *Soil Biol. Biochem.*, **25**, 1993, pp. 679-683.
- [6] Harden T., *et al.* Mineralization of straw and formation of soil microbial biomass

- in a soil treated with simazine and dinoterb. *Soil Biol. Biochem.*, **25**, 1993, pp. 1273–1276.
- [7] Inubushi, K., Brookes, P.C. and Jenkinson, D.S. Soil microbial biomass C, N and ninhydrin-N in aerobic and anaerobic soils measured by the fumigation-extraction method. *Soil Biol. Biochem.*, **23**, 1991, pp. 737–741.
- [8] Mueller T., Joergensen R. G. and Meyer B. Estimation of soil microbial biomass C in the presence of living roots by fumigation-extraction. *Soil Biol. Biochem.*, **24**, 1992, pp. 179–181.
- [9] Ocio J.A. and Brookes, P.C. 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. *Soil Biol. Biochem.*, **22**, 1990, pp. 685–694.
- [10] Sparling G.P., *et al.* Estimation of soil microbial c by a fumigation-extraction method: use on soils of high organic matter content, and a reassessment of the kec-factor. *Soil Biol. Biochem.*, **22**, 1990, pp. 301–307.
- [11] Wu J., *et al.* Measurement of soil microbial biomass C by fumigation-extraction – an automated procedure. *Soil Biol. Biochem.*, **22**, 1990, pp. 1167–1169.
- [12] Vance E.D., Brookes P.C. and Jenkinson D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.*, **19**, 1987, pp. 703–707.
- [13] Wu J., Brookes P.C. and Jenkinson D.S. Formation and destruction of microbial biomass during the decomposition of glucose and ryegrass in soil. *Soil Biol. Biochem.*, **25**, 1993, pp. 1435–1441.

第6章 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

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-70° C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. 实验材料与仪器

2.1 实验材料

(1) PEASY-T1 载体、Trans1-T1 感受态细胞、DNA 提取试剂盒、PCR 纯化试剂盒、质粒提取试剂盒；

(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、10 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、ddH₂O、2 × Taq Master Mix、2 × T5 Fast qPCR Mix (SYBR Green I)。

2.2 实验仪器

实时荧光定量 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。

3. 方法原理

实时荧光定量 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 (threshold cycle): 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)。

4. 土壤 DNA 提取

- (1) 加入 0.25 g 土壤样品到一个 Power Bead Tubes 中, 轻轻涡旋混匀。
- (2) 检测 Solution C1。若出现沉淀, 60° C 水浴至全溶解。
- (3) 加入 60 μ L Solution C1, 上下颠倒数次混匀。
- (4) 把 Power Bead Tubes 固定在涡旋仪适配器上, 最大转速 (3200 rpm, 若涡旋仪达不到此速度, 可适当延长 5~10 min) 涡旋连续振荡 10 min。
- (5) 室温 10000 g 离心 30 s, 转移上清至一个干净的 2 mL Collection Tube (试剂盒提供) 中。
- (6) 加入 250 μ L Solution C2 到上清中, 涡旋混匀 5 s, 4° C 孵育 5min。
- (7) 室温 10000 g 离心 1 min, 避开沉淀小珠, 转移上清 $\leq$ 600 μ L 到一个新的收集管 (2 mL Collection Tube) 中。
- (8) 加入 200 μ L Solution C3 到上清中, 涡旋混匀。4° C 孵育 5min。
- (9) 室温 10000 g 离心 1 min, 避开沉淀小珠, 转移上清 $\leq$ 600 μ L 到一个新的收集管 (2 mL Collection Tube) 中。
- (10) Solution C4 使用前先摇匀。加入 1200 μ L solution C4 到上清中, 涡旋混匀 5s。
- (11) 加载约 675 μ L 上清到 spin filter 中, 室温 10000g 离心 1 min。弃去滤液, 继续加载 675 μ L 上清, 室温 10000g 离心 1 min。重复直至过滤完所有上清。(每个样品共需要加载 3 次。)
- (12) 加 500 μ L solution C5 到 spin filter 中, 室温 10000 g 离心 30s, 弃上清。
- (13) 室温 10000 g 离心 1min, 小心转移 spin filter 到 2 mL collection tube 中, 尽量避免 solution C5 污染。
- (14) 加入 100 μ L solution C6 到白色滤膜中心。室温 10000 g 离心 30 s。弃去 spin filter, 此时收集管中的 DNA 可以直接用于下游实验, 无需进一步纯

化。

(15) 将提取好的 DNA 使用微量紫外分光光度计 (Nano Drop ND-1000, 美国) 测定 DNA 浓度和纯度, 对符合质量标准的 DNA ($260/230 > 1.8$, $260/280 > 1.8$) 冷冻保存 (-20°C ~ -80°C)。

5. 细菌、真菌、古菌和功能基因的质粒构建

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。

细菌、真菌、古菌和碳氮磷等功能基因常用的引物序列及 PCR 反应条件具体如下表 1:

	引物名称	引物序列 (5' - 3')	扩增程序	参考文献
细菌	515F	GTGCCAGCMGCCGCGG	95 ° C for 2 min, 35 cycles of 20 s at 94 ° C, 40 s at 55 ° C and 1 min at 72 ° C, and a final 10-min extension at 72 ° C	Tamaki et al., 2011
	907R	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT		
真菌	ITS1-1737F	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	95 ° C for 3 min, 35 cycles of 30 s at 95 ° C, 30 s at 59.3 ° C, and 45 s at 72 ° C and a final 10-min extension at 72 ° C	Degnan et al., 2012
	ITS2-2043R	GCTGCGTTCTTCATCGATGC		
古菌	519 F	CAGCCGCCGCGGTAA	96 ° C for 4 min, 35 cycles of 30 s at 94 ° C, 40 s at 57 ° C, and 45 s at 72 ° C and a final 10-min extension at 72 ° C	Coolen et al., 2004
	915 R	GTGCTCCCCGCAATTCCT		
碳固定 (CbbL)	K2f	ACCA[C/T]CAAGCC[G/C]AAGCT[C/G]GG	95 ° C for 5 min, 35 cycles of 45 s at 95 ° C, 45 s at 62 ° C and 90 s at 72 ° C, and a final 20-min extension at 72 ° C.	Tolli et al., 2005
	V2f	GCCTTC[G/C]AGCTTGCC[G/C]ACC[G/A]		
固氮菌 (<i>nifH</i> 基因)	Po1F	TGCGAYCCSAARGCBGACTC	94 ° C for 15 min, 32 cycles of 60 s at 94 ° C, 60 s at 55 ° C and 60 s at 72 ° C, and a final 10-min extension at 72 ° C.	Poly et al., 2001
	AQER	GACGATGTAGATYTCCTG		
丛植菌根菌	AMV4	AAGCTCGTAGTTGAATTTTCG	94 ° C for 15 min, 32 cycles of 60 s at 94 ° C, 60 s at 55 ° C and 60 s at 72 ° C, and a final 10-min extension at 72 ° C.	Lumini et al., 2010
	5NF-F			
	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。

具体过程以细菌为例：

(1) PCR 反应体系：25 μ L 的 2 $\times$ Taq Master Mix、2 μ L 的 515F 引物序列、2 μ L 的 907R 引物序列、2 μ L DNA 和 19 μ L 的 ddH₂O，体系共计 50 μ L。

(2) PCR 扩增：将上述反应体系按照 95 ° C for 2 min, 35 cycles of 20 s at 94 ° C, 40 s at 55 ° C and 1 min at 72 ° C, and a final 10-min extension at 72 ° C 的反应程序进行 PCR 扩增。

(3) PCR 产物电泳检测和纯化。取 2 μ L 上述 PCR 产物进行核酸电泳检测。若核酸电泳检测合格（目的条带是否在预期位置，如果是则合格）则进行纯化，若不合格则重复以上 PCR 扩增步骤直至电泳检测合格后进行 PCR 纯化。纯化过程为“吸附-洗杂-洗脱”的过程。具体地，将电泳合格的 PCR 产物置于 DNA 纯化柱中，产物中 DNA 片段会吸附于 DNA 纯化柱上，利用 wash buffer 通过一系列快速漂洗-离心的步骤，将引物、核苷酸、蛋白、酶等杂质去除（洗杂需重复多次以尽可能的洗去杂质，提高产物纯度），最后用洗脱液将 DNA 片段洗脱。更详细的纯化步骤可以根据购买的 PCR 纯化试剂盒上的标准步骤进行。

5.2. 细菌、真菌和古菌的 PCR 产物与 T 载体连接

将上述经纯化后的细菌、真菌和古菌的 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：

体系：4 μ L 纯化后的 PCR 产物与 1 μ L pEASY[®]-T3 Cloning Vector 轻轻混合。混合后，在 25° C 下反应 5 min，反应结束后，将离心管置于冰上。

转化：

(1) 在大肠杆菌感受态细胞刚刚解冻时加入以上混合体系。即将以上体系加入到 50 μ L 的感受态细胞中，轻弹混匀后冰浴 25 min；

(2) 42 ° C 水预热激 30 S 后立即置于冰上 2 min；

(3) 将以上体系加入 250 μ L LB 培养液中（不含氨苄青霉素），200 rpm 在 37° C 培养 1h；

(4) 将 300 μ L 菌液在 5000 g 离心 3 min，去除上层 200 μ L LB 培养基，将剩余的 100 μ L 菌液均匀的涂在 LB 培养基上（加氨苄青霉素）在 37 ° C 下过夜培养 12 h（注：培养时间不能过长）。

5.3. 阳性克隆检测及质粒提取

5.3.1 阳性克隆检测

5.3.1.1 PCR 方法鉴定阳性克隆

(1) 用无菌接种针点接 8-10 个白色单克隆菌落分别至 8 μL 无菌水中, 涡旋混匀, 并进行编号;

(2) 取 1 μL 混合液与 20 μL PCR 反应体系中, 用 M13 引物鉴定阳性克隆, PCR 反应体系 20 μL , 包括: 10 μL 的 Taq Master Mix、1 μL 的 M13F 引物序列、1 μL 的 M13R 引物序列、共计 8 μL DNA 模板和 ddH₂O;

(3) 将上述反应体系按照 94 ° C for 10 min, 30 cycles of 30 s at 94 ° C, 30 s at 55 ° C and 30 s at 72 ° C, and a final 10-min extension at 72 ° C 的反应程序进行 PCR 扩增;

(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。

5.3.1.2 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 小时, 再与甘油 (体积比) 1:1 保存。

5.3.1.3 质粒提取

摇菌培养

(1) 将上述鉴定测序正确的克隆菌(带质粒的大肠杆菌)液涂在 LB 固体平板。

(2) 置于 37 °C 恒温培养箱, 培养 12-17 h, 待长出菌落。

(3) 灭菌 15 mL 离心管内加入 5 mL 含抗生素的 LB 液体培养基, 编号标记。

(4) 挑取单克隆菌团放置液体培养基, 每个培养基放置 1 个菌落。

(5) 37 °C, 180 rpm, 振荡培养过夜。

收获细菌并裂解

(1) 离心扩增好的菌液, 按说明书将菌液重悬, 转入 1.5 mL 离心管中。用质粒小量抽提试剂盒, 按说明书要求提取质粒。

(2) 细菌高速离心 1 min, 彻底去除上清。

(3) 加入 250 μL RB 溶液, 振荡器充分悬浮细菌。

(4) 加入 250 μL LB 溶液。立即上下颠倒 10 次, 使细菌裂解, 室温, 放置 2 min。

(5) 加入 250 μL NB 溶液。立即上下颠倒 10 次, 使之充分中和, 室温, 放

置 2 min。

(6) 室温, 1500 rpm, 高速离心 15 min。

(7) 将吸附柱放入收集管内, 离心得到的上清转移至吸附柱, 室温, 15000 rpm, 高速离心 30 s。

(8) 弃废液, 将吸附柱放入收集管, 加入 700 μL WB 溶液到吸附柱中, 15000 rpm, 高速离心 30 s。

(9) 重复上一操作, 之后, 将吸附柱放入干净的 1.5 mL 离心管中, 加 30–50 μL 预热的 Elution Buffer, 室温, 放置 2 min, 高速离心 1 min。

(10) 样品进行电泳检测: 1% 琼脂糖凝胶电泳, 上样量为 2 μL , 紫外灯下观察, 最明亮的带为超螺旋形式, 可以在一定程度上表明提取质粒的纯度。

质粒的纯化

(1) 将之前提取好的质粒放入 1.5 mL 离心管中, 加入 1/10 体积的 3 mol/L 无菌乙酸钠溶液。

(2) 加入 2 倍体积的无水乙醇, 放置于 -20°C 沉淀 4–6h 或过夜。

(3) 4°C , 高速离心机 14000 rpm, 离心 20 min。

(4) 弃去上清, 70%乙醇洗 2 次。

(5) 空气干燥, 可置超净工作台干燥。

(6) 加 200 μL 无菌水溶液干燥后所得沉淀, 即为质粒溶液。

(7) 紫外分光光度计测量质粒浓度和产量。

测量 OD₂₆₀ 的值。

质粒 DNA 浓度 = $\text{OD}_{260} \times 50 \times \text{稀释倍数}$ ($\text{ng}/\mu\text{L}$)。

6. 荧光定量检测

6.1. 梯度质粒标准样品制备

将取 10 μL 质粒标准品加入到 990 μL 水, 涡旋混匀稀释 100 倍, 作为第一个样品 A。

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

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

以此类推。制备 6^{-8} 个梯度样品。

6.2. 反应体系构建、qPCR 上机检测和结果计算

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 2 × T5 Fast qPCR Mix (SYBR Green I) 染色扩增，扩增体系各组分如下：

组分	体积
2 × T5 Fast qPCR Mix (SYBR Green I)	10 μL
10 μM Primer F	0.5 μL
10 μM Primer R	0.5 μL
Template (gDNA)	1 μL
ddH ₂ O	8 μL
Total	20 μL

以上扩增体系按本章 4.1 中不同微生物（细菌、真菌或古菌）的引物对应的扩增程序进行扩增。

6.2.2 qPCR 下机后进行数据分析

（1） 根据已知的质粒浓度（ng/μL），计算对应的标准品的拷贝数：

$$\text{拷贝数 (copies/μL)} = \frac{6.02 \times 10^{23} \times \text{质粒浓度} \times 10^{-9}}{\text{DNA length} \times 660}$$

其中 6.02×10^{23} 为摩尔分数；DNA length 为对应引物的碱基长度；1 dsDNA 碱基 = 660 道尔顿。

（2） 根据已知的质粒拷贝数绘制标准曲线

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

其中 x 为样品拷贝数， k 为斜率， b 为截距。注： 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。

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

参考文献

- [1] Heid C A, Stevens J K, Livak K J , et al. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 1996, 6 (10):986-994.
- [2] Livak K J, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 2001, 25 (4):402-408.
- [3] Tamaki, H. et al. Analysis of 16S rRNA amplicon sequencing options on the Roche/454 next-generation titanium sequencing platform. *PLoS One*. 6, e25263 (2011).
- [4] Degnan, P. H. & Ochman, H. Illumina-based analysis of microbial community diversity. *ISME. J.* 6, 183-198 (2012).
- [5] Coolen, M.J.L., Hopmans, E.C., Rijpstra, W.I.C., Muyzer, G., Schouten, S., Volkman, J.K., 2004. Evolution of the methane cycle in Ace Lake (Antarctica) during the Holocene: response of methanogens and methanotrophs to environmental change. *Organic Geochemistry* 35 (10), 1151- 1167.
- [6] Tolli J, King G M. Diversity and structure of bacterial chemolithotrophic communities in pine forest and agroecosystem soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12):8411-8418.
- [7] Poly F, Monrozier L J, Bally R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology*, 2001, 152(1): 95-103.
- [8] Fraser TD, Lynch DH, Gaiero JR, et al. Quantification of bacterial non-specific acid (phoC) and alkaline (phoD) phosphatase genes in bulk and rhizosphere soil from organically managed soybean fields. *Applied Soil ecology*, 2017, 111: 48-56.
- [9] Edwards IP, Upchurch RA, Zak DR . (2008). Isolation of fungal cellobiohydrolase I genes from sporocarps and forest soils by PCR. *Appl Environ Microbiol* 74: 3481- 3489.

第 7 章 土壤呼吸强度测定方法

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。适用于好氧、不饱和土壤中土壤微生物呼吸强度。土壤微生物呼吸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。调用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。

2. 原理

新鲜土壤样品混合葡萄糖置于恒温（如 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ）培养箱或培养室黑暗培养。样品要置于空气或去除 CO_2 的合成空气中。培养阶段土壤样品释放的 CO_2 通过配备流量计的气相色谱仪（火焰离子化检测器或热导检测器）测定（GB/T32720-2016）。

3. 试剂

3.1 如果是环境气体， CO_2 校准气体浓度为 $300-500 \mu\text{L L}^{-1}$ 。

3.2 如果是合成气体， CO_2 校准气体浓度为 $20-200 \mu\text{L L}^{-1}$ 。

3.3 葡萄糖试剂：葡萄糖与滑石粉按 1: 4 比例（质量比）混合，研磨，保存于广口瓶中备用。

4. 仪器

4.1 恒温培养箱或培养室。

4.2 广口瓶/血清瓶。

4.3 橡胶塞或硅胶塞。

4.4 注射器。

4.5 检测器为火焰离子化检测器或热导检测器的气相色谱仪。

注：热导检测器经常用于检测除 CO_2 外的其他气体。火焰离子化检测器不能做到这一点。然而，如果没有热导检测器，旧的气相色谱仪也可以升级。就检测 CO_2 而言，火焰离子化检测器与热导检测器功效完全一样。

4.6 用于数据计算和系统控制的计算机。

5. 步骤

(1)称取小于 2mm 的新鲜土壤样品(相当于干土 20. 0g)3 份分别放入 3 个 250ml 三角瓶或血清瓶中，加入葡萄糖粉剂（葡萄糖添加量见表 3. 1. 1）充分混匀，于通风处放置 30min 后，用胶塞和密封胶密封三角瓶，至于 25℃下培养 2h。

(2) 在培养开始时和 2h 后，用注射器从三角瓶中抽取 5mL 气体样品，采用气相色谱仪测定样品 CO₂ 量。

6. 检测

6.1 采用火焰离子检测器的气相色谱仪检测

检测 CO₂，当加入 H₂ 和 CO₂ 反应后，将 CO₂ 转化为 CH₄，火焰离子检测器(FID) 可以检测到 CH₄，检测温度至少为 350℃。同时 H₂ 也是火焰离子检测器的燃气。毛细管柱或填充柱可以用于分离。直径小于 0. 53mm 的毛细管柱由于流量有限，不适用该系统。测定温度为恒温 80℃。若手动测样，可用密闭注射器直接注射气体样品。如在线检测，则可以用自动进样仪。

6.2 采用热导检测器（TCD）的气相色谱仪

需要配备热导检测器的气相色谱仪，检测温度为 150℃。用填充柱进行分离。40℃恒温进行测定。在线监测或单样品监测都可以。

7. 结果计算

底物诱导呼吸量 SIR 的计算：

$$SIR\ (mL/(kg \cdot h)) = C \times V/M/2$$

式中：C——广口瓶中 CO₂ 的浓度（mL/mL）

V——广口瓶中空气的体积（mL）

M——土壤烘干质量（kg）

表 3. 1. 1 不同土壤有机质含量的葡萄糖添加量

有机质含量 (%)	推荐葡萄糖添加量 (mg/g soil)
<2	0. 5-2
2-4	3-4
>4	6

参考文献

- [1] GB/ T 32720-2016 土壤微生物呼吸的实验室测定方法
- [2] 17155 Soil quality-Determination of abundance and activity of soil microflora using respiration curvers
- [3] ISO 14240-1:1997 Soil quality-Determination of soil microbial biomass-Part 1: Substrate-induced respiration method
- [4] 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)

第 8 章 土壤酶活性测定方法

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 7 个碳氮磷转化典型酶的功能活性进行测定。7 种酶类是 β -葡萄糖苷酶,在土壤碳循环中负责纤维素的降解生成葡萄糖;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。此方法适用于土壤鲜样或风干后的土壤样品。针对土壤磷酸酶,当土壤 $\text{pH}<7$ 时,适用酸性磷酸酶测定方法;当土壤 $\text{pH}\geq 7$ 时,使用碱性磷酸酶测定方法。测定的质控过程采取同一批次样品 1-5%随机抽样后重复测试结合留样复测提高检测结果的准确性。

2. 脲酶

2.1 方法原理: 采用苯酚-次氯酸钠比色法。在碱性溶液中及在亚硝基铁氰化钠催化剂存在下生成蓝色的靛酚。该生成物数量与氨浓度成正比。

反应式如下: $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 \uparrow + 2\text{NH}_3$

2.2 材料试剂

2.2.1 供试土壤

本方法所使用土壤为从田间采样并自然风干后测定。

2.2.2 实验仪器

- (1) 分光光度计
- (2) 恒温箱
- (3) 分析天平

2.3 实验方法

2.3.1 试剂配制

(1) 柠檬酸盐缓冲液: 取 368g 柠檬酸溶于 600mL 蒸馏水中,另取 295g 氢氧化钾溶于水,再将二种溶液合并,用 1M 氢氧化钠将 pH 调至 6.7,并用蒸馏水稀释至 2L。

(2) 苯酚钠溶液: 称 62.5g 苯酚溶于少量乙醇中,加 2mL 甲醇和 18.5mL 丙

酮，然后用乙醇稀释至 100mL (A 液)，保存在冰箱中。

(3) 氢氧化钠溶液: 称 27g 氢氧化钠溶于 100mL 水中 (B 液), 保存在冰箱中。
使用前, 取 A、B 两液各 20mL 混合, 并用蒸馏水稀释至 100mL 备用。

(4) 次氯酸钠溶液: 用水稀释制剂, 至活性氯的浓度为 0.9%, 溶液稳定。

(5) 10% 尿素。

(6) 甲苯。

(7) 氮的标准溶液: 精确称取 0.4717g 硫酸铵溶于水并稀释至 1000mL, 则得 1mL 含 0.1mg 氮的标准液。绘制标准曲线时, 可再将此液稀释 10 倍供用。

2.3.2 操作步骤

(1) 标准溶液: 吸取稀释的标准液 10、25、40、60、75、90mL, 移于 500mL 容量瓶中, 然后加蒸馏水至刻度。在 10mL 每一溶液中, 分别含有 20 μ g、50 μ g、80 μ g、120 μ g、150 μ g 及 180 μ g 的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 。这些溶液用于绘制标准曲线。

(2) 取 10g 过 1mm 筛的风干土壤样本, 置于 100mL 三角瓶中, 加 2mL 甲苯。

(3) 甲苯处理 15min 后加 10mL 10% 尿素溶液和 20mL pH6.7 柠檬酸盐缓冲液摇匀。

(4) 在 37℃ 恒温箱中培养 3h 后, 用热至 38℃ 的蒸馏水稀释至刻度, 摇荡, 将悬液过滤, 滤液备用。

(5) 与此同时, 对每一土样设置用水代替基质的对照; 对整个试验, 设置无土壤的对照, 以检验试剂的纯度。

(6) 取 1mL 滤液注入 50mL 容量瓶中, 用蒸馏水稀释至 10mL 然后加入 4mL 苯酚钠溶液, 并立即加入 3mL 次氯酸钠溶液。加入每一试剂后, 立即将混合物仔细混合。

(7) 用 1cm 的比色槽, 在比色计上于波长 578nm 处测定颜色的深度 (靛酚的青色能在 60 min 内保持稳定)。用供试样品所得的消光值减去对照样品消光值的差, 根据标准曲线求出氨态氮量。

2.3.3 计算

脲酶活性以, 每百克土壤中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 毫克数表示:

$$\text{土壤脲酶活性} [\text{mg } \text{NH}_4^+\text{-N} / (100\text{g 干土} \cdot 24\text{h})] = (C \times V \times 10) \times 10 / \text{dwt}$$

式中 C—土壤滤液中酶活性值 ($\text{mg } \text{NH}_4^+\text{-N} / \text{mL}$)

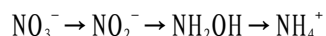
V—土壤溶液体积 mL

dwt—烘干土重量 g

3. 硝酸还原酶

3.1 方法原理

采用酚二磺酸比色法。在厌氧环境下，通过与酚二磺酸的蓝色反应，求出反应前后硝态氮量差值，用于表示硝酸还原酶活性。其反应式如下：



3.2 材料试剂

3.2.1 供试土壤

本方法所使用土壤为从田间采样并自然风干后测定。

3.2.2 实验仪器

- (1) 分光光度计
- (2) 恒温箱
- (3) 分析天平
- (4) 水浴锅
- (5) 真空泵

3.3 实验方法

3.3.1 试剂配制

- (1) 1% KNO_3 溶液。
- (2) 1% 葡萄糖。
- (3) CaCO_3 。
- (4) 铝钾矾饱和溶液。
- (5) 酚二磺酸：取 3g 重蒸酚与 37 g (20.1mL) 浓 H_2SO_4 混合，在沸水浴上回流加热 6h 即成。
- (6) 10%NaOH。
- (7) KNO_3 标准溶液：精确称取 16.3052g 重结晶 KNO_3 溶于蒸馏水中并稀释至 1L (1mL 含 10mg NO_3^- N)。使用前，将标准液再进行稀释 (1mL 含 0.1mg NO_3^- N)。

3.3.2 操作步骤：

标准曲线绘制：吸取 50mL KNO_3 标准溶液，置于瓷皿中，在沸水浴上蒸干，残渣用 2mL 酚二磺酸处理 10min。再加 15mL 蒸馏水，定容 500mL (1mL 含 0.01mg

$\text{NO}_3^- \text{N}$)。吸取此溶液 5-40mL 于 50mL 容量瓶中，用 10%NaOH 调至微黄色，定容后在分光光度计上于 400-500nm 处进行比色。以光密度值为纵坐标，浓度为横坐标，绘制标准曲线。

取 1g 过 1mm 筛的风干土壤，置于 100mL 减压三角瓶中，加 20mg CaCO_3 和 1mL 1% KNO_3 。仔细混合后，加 1mL 葡萄糖(作为氢的供体)。将此混合液连接于真空泵抽气 3min，稍摇荡三角瓶，置于 30℃ 恒温箱中培养 24h。

培养结束后，加 50mL 水、1mL 铝钾矾液，摇匀。取 20mL 液移于瓷皿上蒸干。加 1mL 酚二磺酸处理 10min，加 15mL 水，再加 10%NaOH 调至碱性。将着色液转至 50mL 容量瓶中，定容、比色(波长为 450nm)

用灭菌土壤(180℃ 加热 3h)作对照。

3.3.3 计算

硝酸盐还原酶活性以 24h 后 10g 土壤中被还原的 $\text{NO}_3^- \text{N}$ 表示：

硝酸盐还原酶活性 $[\text{mg } \text{NH}_3^- \text{N} / (10\text{g 干土} \cdot 24\text{h})] = (m_0 - m) \times 10 / \text{dwt}$

式中 m_0 —土壤反应前硝态氮含量的毫克数 mg

m —土壤反应后硝态氮含量的毫克数 mg

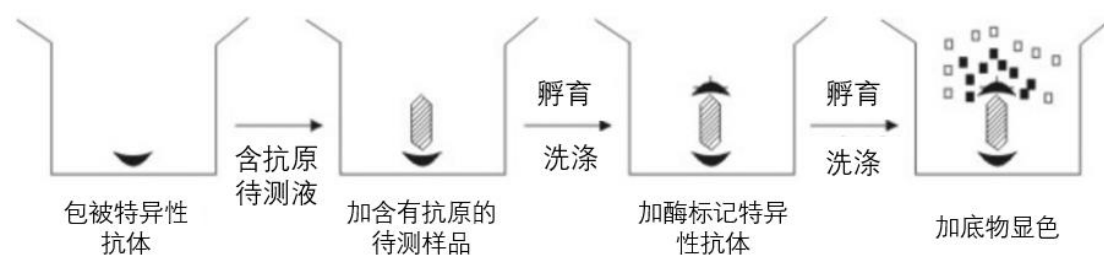
dwt—烘干土重量 g

4. 氨单加氧酶

4.1 方法原理

使用夹心法酶联免疫吸附试验(ELISA)。ELISA 的基础是抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记。结合在固相载体表面的抗原或抗体仍保持其免疫学活性，酶标记的抗原或抗体既保留其免疫学活性，又保留酶的活性。

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准品、辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗体，经过温育并彻底洗涤。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。



4.2 材料试剂

4.2.1 供试土壤

本方法所使用土壤为从田间采样并自然风干后测定。

4.2.2 实验仪器

- (1) 酶标仪 (450nm)
- (2) 96 孔板
- (3) $10000 \times g$ 离心机
- (4) 单道移液器 ($10 \mu\text{L}$, $20 \mu\text{L}$, $200 \mu\text{L}$, $1000 \mu\text{L}$)
- (5) 恒温箱

4.3 实验方法:

4.3.1 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、15、30、60、120、240 U/L。
- (3) $0.1\text{M NaH}_2\text{PO}_4\text{-NaH}(\text{PO}_4)_2$ 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: 8.0g NaCl , 0.2g KCl , $2.9\text{g Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $0.2\text{g KH}_2\text{PO}_4$, 0.5mL 吐温-20, 加无菌去离子水至 1000mL 。
- (6) 底物显色液: 先将 TMB 以 0.1M 的浓度溶于二甲亚砜, 然后, 再将 1mM TMB 和 $3.0\text{mM H}_2\text{O}_2$ 溶于 0.2M 醋酸钠/枸橼酸缓冲液 ($\text{pH}4.0$)。
- (7) 终止液: $2\text{M H}_2\text{SO}_4$ 。

4.3.2 操作步骤

- (1) 称取 1g 过筛的风干土壤, 加入 9g 的 $\text{pH}7.2\text{-}7.4$ 的 PBS, 用手工将标本充分混匀。 $2\text{-}8^\circ\text{C}$ 条件离心 20 分钟左右 ($2000\text{-}3000$ 转/分), 仔细收集上清。
- (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 $50 \mu\text{L}$, 绘制标准曲线;
- (3) 样本孔先加待测样本 $10 \mu\text{L}$, 再加去离子水 $40 \mu\text{L}$, 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 $100 \mu\text{L}$, 用封板膜封住反应孔, 37°C 水浴锅或恒温箱温育 60min 。
- (5) 弃去液体, 吸水纸上拍干, 每孔加满洗涤液, 静置 1min , 甩去洗涤液,

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 ，37℃避光孵育 15min。

(7) 每孔加入终止液 50 μL ，15min 内在 450nm 波长处测定各孔的 OD 值。

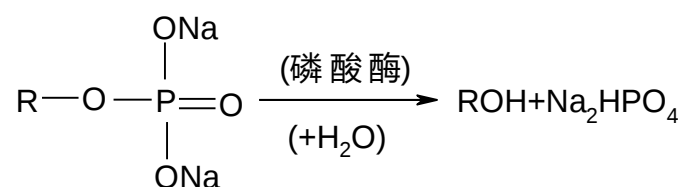
4.3.3 计算

以标准品浓度作横坐标，对应 OD 值作纵坐标，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。

5. 土壤磷酸酶（酸性和碱性磷酸酶）

5.1 方法原理：

采用磷酸苯二钠比色法。测定磷酸酶主要根据酶促作用生成的有机基团量或无机磷量计算磷酸酶活性。它们的总反应式如下：



式中，R 指酚酞、苯酚、感应、 α -或 β -萘酚、*p*-硝基苯酚

5.2 材料试剂

5.2.1 供试土壤

本方法所使用土壤为从田间采样并自然风干后测定。

5.2.2 实验仪器

- (1) 分光光度计
- (2) 96 孔板
- (3) 10000 $\times$ g 离心机
- (4) 恒温箱

5.3 实验方法：

5.3.1 试剂配制

(1) 磷酸苯二钠溶液：将 6.75g 磷酸苯二钠溶于蒸馏水，并稀释至 1000mL（1 mL 含 25mg 酚）。

(2) 醋酸盐缓冲液（pH5.0，用于酸性磷酸酶测定）；

硼酸盐缓冲液（pH9.0，用于碱性磷酸酶测定）。

(3) 氯代二溴对苯醌亚胺试剂 (Gibbs 试剂): 取 200mg 2,6-二溴苯醌氯酰亚胺, 溶于乙醇, 并稀释至 100mL。

(4) 标准溶液:

母液, 取 1g 酚溶于蒸馏水中, 稀释至 1L, 贮于棕色瓶中;

工作液, 取 10mL 酚原液稀释至 1L (每毫升含 0.01 毫克酚)。

(5) 甲苯。

5.3.2 操作步骤

(1) 绘制标准曲线: 取 1、3、5、7、9、11 和 13mL 酚工作液, 置于 100mL 容量瓶中, 每瓶加入 5mL 缓冲液, 用水稀释至 25mL, 加 1mL Gibbs 试剂, 显静置 20min 后于 578nm 处比色测定, 绘制标准曲线。

(2) 取 10g 过 1mm 筛的风干土壤置于 100mL 三角瓶中, 加 1.5mL 甲苯, 轻摇 15min。

(3) 加入 10mL 磷酸苯二钠溶液和 10mL 相应的缓冲液 (酸性磷酸酶用醋酸盐缓冲液; 碱性磷酸酶用硼酸盐缓冲液), 仔细摇匀。

(4) 放入恒温箱, 在 37℃ 下培养 3h 后, 用 38℃ 的热水将瓶中内容物稀释至刻度 (甲苯应浮在刻度以上), 再用致密滤纸过滤。

(5) 对每一土样, 设置用 10mL 代替基质的对照。

(6) 比色程序:

a. 取滤液 1mL 置于 100mL 容量瓶中, 加 5mL 相应的缓冲液, 用水稀释至 25mL, 加 1mL Gibbs 试剂。

b. 将反应物仔细混合, 静置 20min, 这时溶液呈现青色。

c. 用水将瓶中混合物稀释至刻度, 并在 24h 内, 用 1cm 液槽, 在分光光度计上于波长 578nm 处测定颜色的深度, 读取消光值。

d. 以供试样品所得消光值减去对照样品消光值的差, 根据标准曲线, 求出酚量。

5.3.3 计算

土壤磷酸酶活性, 以每百克土的酚毫克数表示, 其计算式为:

土壤磷酸酶活性 $[\mu\text{g 苯酚}/(\text{g 干土} \cdot \text{h})] = (C \times V) \times /dwt$

式中 C—土壤滤液中苯酚含量 $\mu\text{g/mL}$

V—土壤溶液体积 mL

dwt—烘干土重量 g

6. β -葡萄糖苷酶

6.1 方法原理

β -葡萄糖苷酶，在土壤碳循环中负责纤维素的降解， β -葡萄糖苷酶负责进一步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。

6.2 材料试剂

6.2.1 供试土壤

本方法所使用土壤为从田间采样并自然风干后测定。

6.2.2 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

6.3 实验方法

6.3.1 试剂配制

- (1) 50mM 醋酸盐缓冲液：配制 50 mM 的醋酸盐 6.804 g 三水合乙酸钠溶解在 800 mL 去离子水中用 12 M 盐酸调 pH，缓冲液保存在 4 冰箱，8 天内使用。
- (2) 荧光底物：200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 4-甲基伞形酮- β -D-葡萄糖苷（4-MMB- β -D-glucoside），即 1.691mg 4-甲基伞形酮- β -D-葡萄糖苷，去离子水定容 25mL。
- (3) 1M 的 NaOH 溶液：4g 分析纯氢氧化钠溶于去离子水中，稀释至 100mL。

6.3.2 操作步骤

(1) 称取 1g 鲜土于 250mL 广口锥形瓶中，加入 125mL，50mM，pH=5 的醋酸钠缓冲液（pH 约 6.5），塞上瓶塞或用封口膜封住，在摇床上于 180rpm min^{-1} 震荡 20min 制备悬浮液。

(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 μM 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 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下培养 4h，之后加入 10 μL 1M 的 NaOH 溶液，终止反应。

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

6.3.3 结果计算

酶活性 ($\text{nmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$) = (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 (nmol^{-1}) = (标准曲线斜率 [荧光值 / (nmol/mL)]) / 反应液体积

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

7. 土壤多酚氧化酶

7.1 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。

7.2 材料试剂

7.2.1 土壤

本方法所使用土壤为从田间采样并自然风干后测定。

7.2.2 实验仪器

- (1) 250mL 广口锥形瓶
- (2) 八通道移液器和枪头
- (3) 白色 96 微孔板
- (4) 多功能酶标仪

7.3 实验方法

7.3.1 试剂配制

(1) 50mM 醋酸盐缓冲液: 配制 50 mM 的醋酸盐 6.804 g 三水合乙酸钠溶解在 800 mL 去离子水中用 12M 盐酸调 pH, 缓冲液保存在 4 冰箱, 8 天内使用。

(2) 底物: 左旋多巴 (L-DOPA) ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$) 即, 0.4929g L-DOPA 溶于稀盐酸后用去离子水稀释至 100mL。

7.3.2 操作步骤

(1) 称取 1g 鲜土于 250mL 广口锥形瓶中, 加入到 125mL, 50mM, pH=5 的醋酸钠缓冲液 (pH 约 6.5), 震荡 1h 制备悬浮液。

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

(3) 同时做样品和基质控制, 样品控制孔加 $200 \mu\text{L}$ 土壤悬浮液和 $50 \mu\text{L}$ 醋酸钠缓冲液, 基质控制孔中加入 $200 \mu\text{L}$ 醋酸钠缓冲液和 $50 \mu\text{L}$ 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 20h。使用多功能酶标仪, 采用分光光度法, 在 450nm 处测定吸光值。

7.3.3 结果计算

酶活性 ($\text{nmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$) = (最终吸光度*缓冲液体积 (mL)) / ($7.9 \mu\text{mol}$ *吸入悬浮液体积 (mL)*反应时间 (h)*土壤重量 (g))

最终吸光值=样品孔吸光值-基质控制吸光值-样品控制吸光值

参考文献

- [1] 李振高, 骆永明, 滕应. 土壤与环境微生物研究法 [M]. 第 1 版. 北京: 科学出版社, 2008
- [2] Li, M., Zhang, J., Yang, X., *et al.* Responses of ammonia-oxidizing microorganisms to biochar and compost amendments of heavy metals-polluted soil. *Journal of Environmental Sciences*, 2021, 102: 263-272.
- [3] Freeman, C., Ostle, N., & Kang, H. An enzymic 'latch' on a global carbon store - A shortage of oxygen locks up carbon in peatlands by restraining a single enzyme. *Nature*, 2001, 409(6817), 149-149.
- [4] Saiya-Cork, K. R., Sinsabaugh, R. L., Zak, D. R. Effects of long term nitrogen deposition on extracellular enzyme activity in an *Acer saccharum* forest soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 2002, 34, 1309-1315.
- [5] Sinsabaugh, R. L. Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil.

Soil Biology & Biochemistry, 2010, 42: 391–404

[6] Sinsabaugh, R. L., Lauber, C. L., Weintraub, M. N., *et al.* Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecology Letters*, 2008, 11, 1252–1264.

[7] Sinsabaugh, R. L., Hill, B. H., & Shah, J. J. F. Ecoenzymatic stoichiometry of microbial organic nutrient acquisition in soil and sediment. *Nature*, 2009, 462 (7274), 795–U117.

[8] Zibilske, L. M., & Bradford, J. M. Oxygen effects on carbon, polyphenols, and nitrogen mineralization potential in soil. *Soil Science Society of America Journal*, 2007, 71 (1), 133–139.

第9章 土壤宏基因组测序方法

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，需开展土壤生物宏基因组高通量测序。宏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（见下文）要求执行。

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→样本质检→切胶回收→文库构建→数据质检。

3. 实验主要设备

表 1 主要设备清单（推荐型号请见附录表一）

编号	设备名称	描述
1	PCR 仪	利用 PCR (Polymerase chain reaction, 聚合酶链反应) 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
6	漩涡混合仪	用于多种样品混匀和漩涡振荡操作
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

4. 实验操作流程模块

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，试剂盒信息详见附录表二）

4.1.1 常规土壤 DNA 提取操作步骤

(1) 直接添加 250mg 以内的待测土壤样品到裂解管中, 然后添加 750 μ L 的裂解液到裂解管中, 在涡旋仪上最大速下振荡 5 分钟以上混匀。(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 ≥ 10000 g 下离心 1 分钟。

(3) 将上一步所得上清液 400 μ L 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 8000 g 的离心力条件下离心 1 分钟。丢弃过滤柱。

(4) 添加 1200 μ L 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) 将步骤 4 获得的混合液吸取 800 μ L 混合液加到 2 号过滤柱(试剂盒内备有耗材)中, 在 10000 g 下离心 1 分钟, 倒掉收集管中废液。

(6) 重复进行上一步骤(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 μ L 的基因组 DNA 洗涤液 1(试剂盒内备有试剂)到 2 号柱中, 在 ≥ 10000 g 条件下离心 1 分钟。

(8) 添加 500 μ L 的基因组 DNA 洗涤液 2(试剂盒内备有试剂)到 2 号柱中, 在 ≥ 10000 g 下离心 1 分钟。

(9) 将 2 号柱移至干净的 1.5mL 离心管中, 添加 ≥ 50 μ L 的基因组 DNA 洗脱液到柱基质上(洗脱液事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中预热效果更好), 室温下放置 2-5 分钟, 在 ≥ 10000 g 下离心 1 分钟来洗脱基因组 DNA。

(10) 将抑制物去除柱套在一个收集管内, 添加 600 μ L 的抑制物去除液, 在 ≥ 8000 g 条件下离心 3 分钟。

(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 1.5mL 离心管内, 并在 16000g 条件下离心 3 分钟, 得到的 DNA 样品进行后续 PCR 等试验。

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。在研钵中加入足够液氮快速冷却石英砂和研钵。

注: 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）开始研磨样本，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。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：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 V1。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（共三次）。

（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，加入更多的液氮让保持样品冷冻）。转移样本到新的 15 mL 离心管中。

注：此时如果不能立即进行 DNA 提取，样品要保存在 -80 °C，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 V1 mL，这一步添加的缓冲液体积为 3.3–V1。

注：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：如果在第（5）步中加入 5 mL 缓冲液，则加入 18.5 μL 蛋白酶 K。

（7）37°C 水浴 30 min，期间 5–10 min 倒转混合一次。

（8）加入 0.37 mL 20% 的 SDS，轻轻地混合。

注：如果在第（5）步中加入 5 mL 缓冲液，则加入 0.56 mL 20% 的 SDS。

（9）65°C 水浴 2 h，每 15–30 min 轻柔地倒转混合一次。

（10）25°C 离心 20 min，6,000 x g。

（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：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：如果在第（5）步中加入 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：如果在第 (5) 步中加入 5 mL 缓冲液，则加入 0.2 mL 20% 的 SDS。

(14) 65 ° C 水浴静置 15 min.

(15) 25 ° C 离心 20 min, 6,000 x g 。

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

注：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 1:24 氯仿：异戊醇混合液，在通风橱中用圆盘旋转混匀仪连续倒转混合 5-10 min。3,700 x 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：异戊醇再萃取一次。然后转移上清液到 Oak Ridge tubes 中。

(17) 加入 0.6 个体积的 2-异丙醇（使用量要精准控制在 0.6 个体积）。

(18) 在-20 或-80 ° 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 ° 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：尽可能彻底地溶解所有矿物沉淀，大概需要 30-45 min。

(20) 25 ° C 室温 15,000 x 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 x g 离心 5 min，去掉乙醇。

注：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。

4.1.3 DNA 样品保存及处理

得到的 DNA，长期保存时，冻存于-20℃。在后续实验中，应先将 DNA 于冰上解冻（提前一小时开始解冻），解冻后将 DNA 轻轻涡旋混匀后离心。再进行后续实验。

4.1.4 DNA 样品质控标准

浓度不低于 10ng/μL，A260/280 数值范围在 1.7-2.1，凝胶电泳结果能看到

完整条带。

4.2 核酸质量检测

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：

(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 100mL,小胶用 70mL)为例：称取 1g(0.7g)琼脂糖置于锥形瓶中，加入 100 mL (70mL) 1×TAE，瓶口倒扣小烧杯。微波炉加热(1分钟)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：2%琼脂糖凝胶，以上述体系为例，即加入 2g(1.4g)琼脂糖及 100mL(70mL) 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。

4.2.2 浓度和纯度定量

使用 NanoDrop™ 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 20 ngμL⁻¹，A260/280 纯度值介于 1.8 - 2.0 之间判定为合格样本。

(1) 测量前必须将样本混匀(涡旋 5 秒钟)。

(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，折迭四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 1~2 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 个样本需进行一次纯水重置归零。

4.3 DNA 片段化（此处为标准酶法片段化，如选择其他方法，请参照对应的标准方法执行）

4.3.1 DNA 酶法打断实验操作

（1） 实验前请先进行 80%乙醇配制。实验前 30 分钟将试剂拿出置于冰上解冻，解冻后进行简单的上下颠倒混匀。

（2） 设置 PCR 仪程序如下：

表 2 PCR 仪升温梯度程序设置表

步骤	温度（°C）	时间（分钟）
1	4	1
2	32	3-20
3	65	30
4	4	Hold

（3） 进行片段化酶添加前的 DNA 准备工作：

表 3 片段化混合体系配制表（Catalog No. ab198414）

组分	体积（ μL ）
FX Buffer, 10X	1.25
DNA	根据实际状况调整
FX Enhancer	当输入 DNA 总质量低于 10ng 时，可在组分中添加本试剂， 体积为 2.5
PCR 级别水	根据实际状况调整

总体积	40
-----	----

(4) 进行步骤3后所获得的DNA混合物,每个反应添加 2.5 μ L 的 FX Enzyme Mix。上下颠倒混匀 6-8 次后立即放置于冰上。

(5) 将反应管从冰上拿出,快速进行简单离心后放置于已经预冷至 4° C 的 PCR 仪中,进行步骤2 设置好的程序处理。

(6) 程序结束后,将样本管拿出后立即转移至冰上,应立即进行后续建库环节处理。

4.3.2 DNA 片段化后质量控制

琼脂糖凝胶电泳,参考步骤 3.2.1 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。片段化后凝胶电泳图详细说明见于附录图三。

4.4 DNA 片段化产物切胶回收

(1) 根据步骤 3.3.2 质控后的片段化后 DNA 进行评估,针对胶图上无法清晰成像的低浓度样品,应在跑胶时添加一个出 DNA Marker 外的标记物,如 16s V3-V4 区的 PCR 扩增产物 (428bp)。方便切胶时进行位置辨认。

(2) 每个片段化产物分别加入到 2-3 胶孔中上样,目的片段大小 300-500bp,单个胶孔加样体系为 8-10 μ L,电泳时间适当延长至 40 分钟。

(3) DNA 电泳结束后,在紫外灯下快速切下含目的 DNA 片段的凝胶(建议用纸巾吸尽凝胶表面液体并切碎,并尽量去除不含 DNA 的多余的凝胶)。称取凝胶重量(去除空管重量),100 mg 凝胶等同于 100 μ L 体积。

(4) 加入等倍体积 Buffer GDP。55°C 水浴 7-10 分钟,根据凝胶大小适当调整时间,确保凝胶块完全溶解。水浴期间颠倒混匀 2 次加速溶胶。

(5) 短暂离心收集管壁上的液滴。将 FastPure DNA Mini Columns-G 吸附柱(试剂盒内备有耗材)置于 Collection Tubes 2 mL 收集管中,把 ≤ 700 μ L 溶胶液转移至吸附柱中,12000g 离心 30-60 秒。若溶胶体积大于 700 μ L,把吸附柱置回收集管中,剩余的溶胶液转移至吸附柱中,12000g 离心 30-60 秒。

(6) 弃滤液,把吸附柱置于收集管中。加入 300 μ L Buffer GDP 至吸附柱中。静置 1 分钟。12000g 离心 30-60 秒。

(7) 弃滤液,把吸附柱置于收集管中。加入 700 μ L Buffer GW (已加入无水乙醇)至吸附柱中。12,000 g 离心 30-60 秒。

(8) 重复步骤 5。两次使用 Buffer GW 冲洗能确保盐份被完全清除,消除对

后续实验的影响。

(9) 弃滤液，把吸附柱置回收集管中。12000g 离心 2 分钟。

(10) 将吸附柱置于在 1.5 mL 灭菌的离心管中，加入 20–30 μL Elution Buffer 至吸附柱中央，放置 2 分钟。12000g 离心 1 分钟。弃去吸附柱，把 DNA 保存于 -20°C 。

4.5 胶回收的 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) 在标准管和样品管中分别分配 95 μL 和 99.5 μL Qubit 工作溶液。

(2) 在单独的 Qubit 分析管中添加 5 μL 标准液（1 和 2）和 0.5 μL 样品。

(3) 将混合物涡旋 5 秒，短暂离心，并在室温下避光温育 5 分钟，然后读取读数。

(4) 根据定量后得到的 PCR 产物浓度，计算混匀样品时需要加入的体积，保证混合物中所加入的每个 PCR 产物的 DNA 总质量是一致的。

4.6 文库构建（具体实验方案可根据不同试剂盒进行调整）

使用建库试剂盒完成文库构建，通过末端修复、添加接头以及磁珠纯化完成文库构建。

4.6.1 末端修复以及添加 A-tailing

(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。混合体系如下：

表 4 末端修复和 A-tailing 组装反应体系

组分	体积
PCR 产物混合物（20–25 样本）	50 μL
End Repair & A-Tailing Buffer*	1.75 μL
HyperPrep/HyperPlus ERAT Enzyme Mix**	0.75 μL
PCR-grade water*	7.5 μL
总混合物体积	60 μL

(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 30 分钟。

表 5 热循环仪孵育温度梯度程序

步骤	温度	时间
End repair and A-tailing	20° C	30 分钟
末端修复和 A-tailing 组装	65° C	30 分钟
HOLD	4° C	∞

4.6.2 接头连接

- (1) 稀释接头至合适的浓度（常规接头浓度为 15 nmol/μL）。
- (2) 在已经完成的末端修复和 A-tailing 的管中连接接头。

表 6 接头连接操作体系

组分	体积
步骤 3.6.1.3 最终得到的，已末端修复的 DNA 混合物	60 μL
接头（根据 DNA 总质量计算体积）	5 μL
PCR-grade water*	35 μL
Ligation Buffer*	7.5 μL
DNA Ligase*	2.5 μL
体系总体积	110 μL

表 7 输入 DNA 与稀释接头摩尔比关系

输入 DNA 总质量	接头:输入 DNA 摩尔比	输入 DNA 总质量	接头:输入 DNA 摩尔比
1ug	10: 1	50ng	200: 1
500ng	20: 1	25ng	400: 1
250ng	40: 1	10ng	1000: 1
100ng	100: 1	5ng	2000: 1

- (3) 彻底混匀（涡旋 10 秒）并短暂离心。
- (4) 在 20° C 孵育 15 分钟。（此步骤为实验中止点，如时间不合适，可进行 4° C 过夜孵育，第二天进行后续实验）。

4.6.3 连接接头后纯化

- (1) 在同一个板/管中，使用 0.8X 的磁珠进行磁珠纯化。

表 8 磁珠纯化体系

组分	体积
上步链接接头后的混合物	110 μL
KAPA 纯化磁珠	88 μL
体系总体积	198 μL

- (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 分钟，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 秒。
- (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 秒。
- (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 分钟，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 mM 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 分钟，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离心管或 PCR 管中，此时管中即为制备好的 DNA 文库。

4.6.4 文库定量

使用荧光定量仪对文库进行初步浓度定量。对于文库总质量大于 1 μg 的样本不进行文库扩增。

4.6.5 文库扩增

(1) 将每个文库扩增反应组装如下:

表 9 文库扩增反应体系

组分	体积
2X KAPA HiFi HotStart ReadyMix	6.25 μ L
10X Library Amplification Primer Mix	1.25 μ L
加接头后 DNA 文库	20 μ L
PCR-grade water*	22.5 μ L
Total volume	50 μ L

(2) 充分混匀并短暂离心。

(3) 使用以下循环参数进行扩增

表 10 PCR 扩增程序方法

Step	Temp	Duration	Cycles
Initial denaturation	98 ° C	45 sec	1
Denaturation	98 ° C	15 sec	循环数参考说明书, 根据相对应的文库总质量判断
Annealing†	60 ° C	30 sec	
Extension	72 ° C	30 sec	
Final extension	72 ° C	1 min	1
HOLD	4 ° C	∞	1

根据下表选择文库扩增循环数(根据输入的 DNA 文库总质量(1ng– 1 μ g)使用循环数):

表 11 输入的 DNA 文库总质量与扩增循环数关系表

Adapter-ligated library DNA	Number of cycles require to generate 1 μ g of library DNA
500 ng	2 – 4
100 ng	5 – 6
50 ng	7 – 8
10 ng	9 – 10

5 ng	11 – 12
1 ng	13 – 14
500 pg	15 – 16

4.6.6 文库扩增后纯化

(1) 在同一管中，执行基于 1X 比例的磁珠纯化

表 12 纯化体系表

组分	体积
Library Amplification reaction product	50 μ L
Agencourt® AMPure® XP reagent	50 μ L
总体积	100 μ L

- (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 分钟，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 μ L 的 80% 乙醇洗涤磁珠。
- (7) 在磁力架上，于室温条件静置孵育 ≥ 30 秒。
- (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 μ L 的 80% 乙醇。
- (10) 在磁力架上，于室温条件静置孵育 ≥ 30 秒。
- (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 分钟，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 μ L 的洗脱缓冲液（10 mM 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 分钟，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 1.5mL 离心管中，此时管中即为制备好的 DNA

文库。

(18) 将构建好的文库保存在-20℃。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。

4.6.7 文库质检

(1) 将构建好的文库进行琼脂糖凝胶电泳，目标条带长度应为，目的片段加双端接头长度。即，构建 16s V3-V4 区常规文库时，目的片段大小应为 428bp，加双端接头后，文库大小为 548bp。接头单端大小为 60bp。

(2) 将构建好的文库进行 Qubit 4.0 定量检测，文库浓度高于 10ng/μL 的视为合格。

5. 数据分析

5.1 数据质量评估（相关分析软件详见附录表三）

采用 FastQC 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) 剔除包含超过 3 个 N 碱基的序列；
- (2) 剔除高质量碱基 (Phred score ≥ 20) 占比小于 60% 的序列；
- (3) 剔除 3' 端低质量碱基；
- (4) 剔除序列长度小于 75bp 的序列。

5.2 样本组装

采用 metaSPAdes 软件将各个样本的 Clean Reads 组装为 Contigs，使用参数 “--only-assembler -k 31, 51, 71, 91”。

5.3 非冗余 Contigs

筛选出大于等于 500bp 的 Contig，采用 CD-HIT 软件将各个样本的组装结果去冗余，使用参数 “-c 0.95 -aS 0.9 -G 0”。

5.4 非冗余 Genes

采用 MetaGeneMark 软件预测基因结构，筛选出大于等于 100bp 的 Gene，采用 CD-HIT 软件去冗余，使用参数 “-c 0.95 -aS 0.9 -G 0”。

5.5 基因定量

将各个样本的 Clean Reads 比对到非冗余 Genes，使用参数 “--meta -l IU”。

最终得到各个样本、各个基因的表达量 (TPM)。

5.6 功能注释

采用 DIAMOND 软件将非冗余 Genes 比对到各个功能数据库，使用参数 “--sensitive -k 1”。筛选出 “bitscore ≥ 60 and evalue $\leq 1e-5$ ” 的比对结果，将基因表达量 (TPM) 值累加到功能分类上作为功能丰度。

5.7 物种鉴定

采用 Kraken2 软件将定量后的非冗余基因比对到数据库，目前支持物种分类 Bacteria (GTDB)、Archaea (GTDB) 和 Fungi (NCBI RefSeq)。

5.8 物种丰度抽平

由于每个样本对应的 reads 数量差距较大，为避免因样本数据大小不同而造成分析时的偏差，在样本达到足够测序深度的情况下，需对每个样本进行随机抽平处理，一般选择测序样本中最少 reads 数做为基数，即将所有样本的 reads 数统一抽平到该值。

5.9 分类学系统组成树

同样基于物种进化树状结构，分类学系统组成树可以结合树中每个物种在所有样本中的分布情况，直观地显示出每个分类学水平的高丰度物种，以及对于特定的物种，其在每个样本中的分布差异。分析默认选择每个分类水平中相对丰度大于 1% 的物种在图中展示，且要求物种注释信息不能有断层（虽然某个属的相对丰度超过 1%，但是其科水平无注释，则不能在图中进行展示），为了结果展示的直观性和有效性，应尽量控制样本量。

5.10 物种总丰度柱状图

物种总丰度柱状图可以用于展示在某一分类水平下，所有样本中整体丰度较高的物种及其相对丰度。推荐分析默认选择相对丰度大于 1% 的物种绘制柱状图（个数低于 30 个全画）。

5.11 多样本物种组成柱状图

最常用于展示每个样本物种组成的可视化分析方法之一，在某一分类水平上将每个样本的物种组成绘制成柱状图展示在一张图上，可以更直观地同时观测到每个样本的物种组成、同组样本物种组成的一致性、以及样本/分组间物种组成差异，推荐分析默认选择相对丰度大于 1% 的物种绘制柱状图（个数低于 30 个全画）。

5.12 Wilcoxon 差异分析

Wilcoxon 秩和检验(rank-sum test), 有时也叫 Mann-Whitney U 检验, 是一种常用于分析两两分组间的样本总体分布是否存在差异的非参数检验方法, 不对数据分布作特殊假设, 适用于复杂的数据分布情况。利用 Wilcoxon 秩和检验对两两分组间样本进行比较, 在各分类水平上找出两组中具有显著差异的物种, 以 $p \text{ value} < 0.05$ 作为差异显著性筛选阈值。

5.13 Alpha 多样性指数统计

计算菌群丰富度 (Community richness) 的指数:

- (1) Observed-species: 直接观测到的 OTU/ASV 个数。
- (2) Chao1: 用于估计样本中物种总数, 数值越大代表物种越多。

$$S_{chao1} = S_{obs} + \frac{n_1(n_1 - 1)}{2(n_2 + 1)}$$

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) ACE: 用于估计样本中物种总数, 数值越大代表物种越多, 与 Chao1 的算法不同。

$$S_{ACE} = \begin{cases} S_{abund} + \frac{S_{rare}}{C_{ACE}} + \frac{n_1}{C_{ACE}}, & \text{for } \hat{\gamma}_{ACE}^2 < 0.80 \\ S_{abund} + \frac{S_{rare}}{C_{ACE}} + \frac{n_1}{C_{ACE}}, & \text{for } \hat{\gamma}_{ACE}^2 \geq 0.80 \end{cases}$$

计算菌群多样性 (Community diversity) 的指数:

- (1) 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 值越大, 说明群落多样性越高。

$$H_{shannon} = - \sum_{i=1}^{S_{obs}} \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N}$$

S_{obs} = 实际测量出的 OTU 数目;
 n_i = 第 i 个 OTU 含有的序列数目;
 N = 所有的序列数。

- (2) Simpson: 用来估算样本中微生物的多样性指数之一, Simpson 指数值越大, 说明群落多样性越低。

$$D_{simpson} = \frac{\sum_{i=1}^{S_{obs}} n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

- (3) InvSimpson: 1-Simpson 指数值, InvSimpson 指数值越大, 说明群落多样性越高。

(4) Coverage: 指各样本文库的覆盖率, 其数值越高, 则样本中序列被测出的概率越高, 而没有被测出的概率越低。

5.14 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 (三组或三组以上样本) 对组间多样性指数进行差异分析, 以 $p\text{-value} < 0.05$ 作为差异显著性筛选阈值, 并使用 Bonferroni 方法对 $p\text{-value}$ 进行多重假设检验校正 (fdr), 用以评估组间物种多样性是否存在显著差异。

5.15 Beta 多样性分析

5.15.1 样本聚类树图

样本聚类树可以从整体上描述和比较样本/分组间的相似性和差异性。基于 OTU/ASV 丰度表, 首先计算样本间的 Bray-Cruits 非相似性矩阵, 然后对样本进行平均连锁层次聚类, 平均连锁又称为 UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean), 越相似的两个样本会优先聚类。

5.15.2 PCA 分析

PCA 分析 (Principal Component Analysis), 即主成分分析, 分析基于 Euclidean 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, 去除噪音和冗余, 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/ASV 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。

5.15.3 PCoA 分析

主坐标分析 (PCoA, Principal Coordinate Analysis) 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 基于欧式距离, 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。

分析默认使用四种常用的距离/非相似性矩阵: unweighted unifrac、weighted unifrac、Bray-Crutiis 和 Jaccard。其中 Bray-Crutiis 和 Jaccard 只考虑物种组成, 而 unifrac 距离则会综合物种进化关系。

以基于 unifrac 距离的 PCoA 分析为例, 首先, 基于 OTU/ASV 代表序列构建系统进化树, 结合代表序列进化关系及 OTU/ASV 表, 计算两两样本间的距离。unweighted unifrac 和 weighted unifrac 的区别在于 unweighted unifrac 距离只考虑序列/物种是否在群落中出现, 而不考虑序列的丰度, 即如果两个群落包含的物种完全相同, 那么不管物种的丰度是否有差异, unweighted unifrac 值都为 0。

5.15.4 NMDS 分析

非度量多维尺度分析 (NMDS, nonmetric multidimensional scaling) 可以基于任何类型的距离/非相似性矩阵对对象 (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, 目标是尽可能的最小化应力函数 (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。

如果预先设定的排序轴数量比较少 (如二维、三维), 则在相同轴数的情况下, NMDS 往往能够获得比 PCoA 更少失真的对象之间的关系。

分析默认使用四种常用的距离/非相似性矩阵: unweighted unifrac、weighted unifrac、Bray-Curtis 和 Jaccard。其中 Bray-Curtis 和 Jaccard 只考虑物种组成, 而 unifrac 距离则会综合物种进化关系。

附录表一：宏基因组实验参考设备清单

表 1 宏基因组实验参考设备清单

编号	设备名称	仪器公司	货号
1	PCR 仪	Applied Biosystems MiniAmp Thermal Cyclers	A37834
2	离心机	大龙台式高速微量离心机	D3024
3	电泳仪	伯乐 PowerPac Basic	1645050
4	电泳槽	Wide Mini-Sub® Cell GT 水平电泳槽	170-4469
5	磁力架	赛默飞 DynaMag™-2 Magnet	12322D
6	漩涡混合仪	美国 SI Vortex genie2	SI-0246
7	Eppendorf 艾本德 移液器	0.1 – 2.5 µL	3120000216
		0.5 – 10 µL	3120000224
		2 – 20 µL	3120000232
		10 – 100 µL	3120000240
		20 – 200 µL	3120000054
		100 – 1,000 µL	3120000062
8	分光光度计	赛默飞 NanoDrop™ ONE 分光光度计	A30221

注：具体仪器根据所在实验平台进行调整

附录表二：宏基因组实验参考试剂盒清单

表 2 宏基因组实验参考试剂盒清单

编号	试剂盒类型	描述	货号
1	FastDNA SPIN Kit for Soil	MP Biomedicals	116560-200
2	DNeasy PowerSoil Kit	QIAGEN 针对高盐碱土壤 DNA 提取	12888-100
2	土壤/粪便 DNA 提取试剂盒	北京天漠科技开发有限公司	TD611-50
3	片段化酶 OnePot Pro	Hieff® Smearase	12907ES24/96
4	片段化/末修/加 A 模块	Hieff NGS® OnePot Pro	12619ES24/96

	OnePot Pro	DNA Fragmentation Reagent	
5	建库试剂盒 OnePot Pro	Hieff NGS® OnePot Pro DNA Library Prep Kit for Illumina®	12205ES24/96

注：具体试剂盒根据所在实验平台进行调整

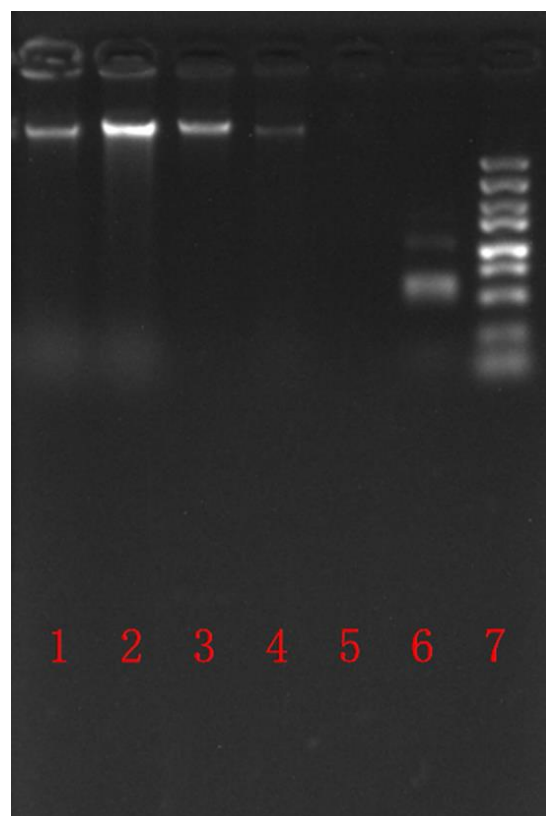
附录表三：宏基因组下机数据分析参考软件清单

表 2 宏基因组下机数据分析参考软件清单

编号	软件名称	版本	参考网站
1	FastQC	0.11.9	http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/
2	R	4.1.2	https://mirrors.tuna.tsinghua.edu.cn/CRA/
3	metaSPAdes	3.15.3	http://cab.spbu.ru/software/spades/
4	CD-HIT	4.6.2	http://cd-hit.org
5	MetaGeneMark	3.25	http://exon.gatech.edu/meta_gmhmp.cgi
6	DIAMOND		http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/diamond/
7	Kraken2	2.1.1	https://ccb.jhu.edu/software/kraken2/

注：具体数据分析所使用的软件类型和版本请根据所在实验平台进行调整

附录图一：DNA 琼脂糖凝胶电泳图示例



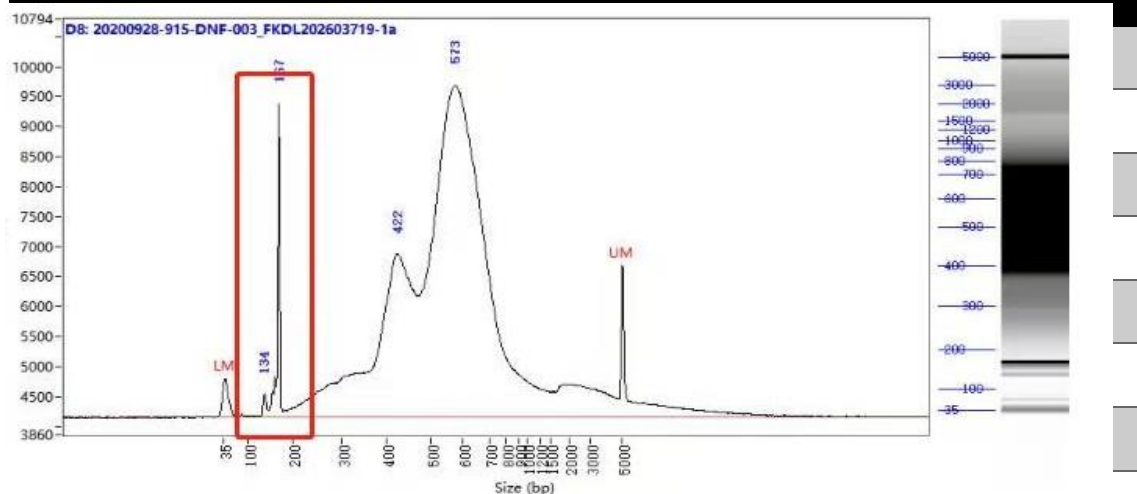
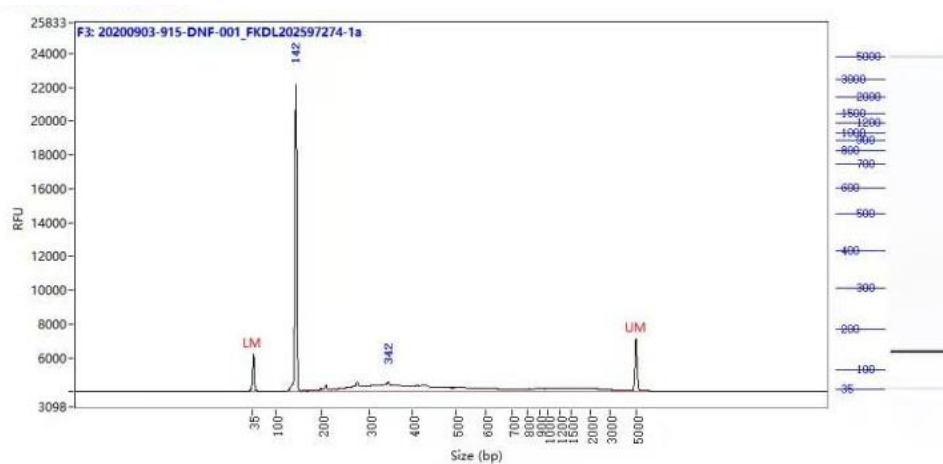


图 1. DNA 琼脂糖凝胶电泳图示例



附录图二：文库 Agilent 生物分析仪峰图示例

图 1. 存在接头污染文库，框内即为接头信号的情况

图 2. 仅包含接头信号示例

附录图三：片段化产物琼脂糖凝胶电泳图示例

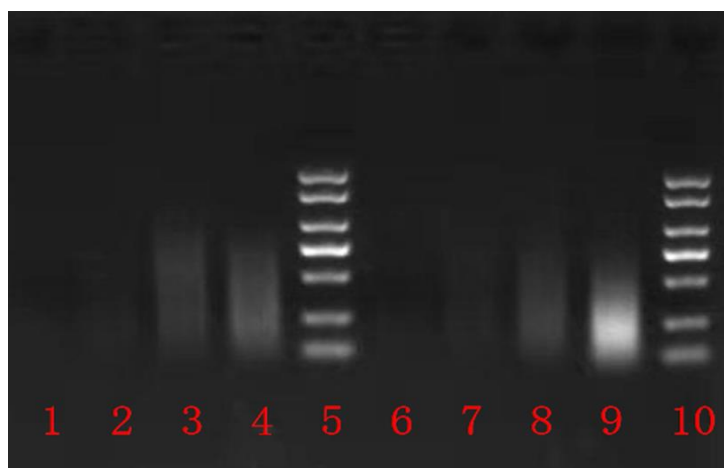


图 1. 片段化产物琼脂糖凝胶电泳图示例

样品编号	样品名	备注
1	土壤 DNA 10ng	DNA 总输入量过低导致无法判断片段化效果
2	土壤 DNA 100ng	有模糊结果，可进行先建库后切胶回收
3	土壤 DNA 500ng	片段化结果略微偏大，可切胶回收进行后续实验
4	土壤 DNA 1000ng	片段化结果合格
5	DL2000 Marker	
6	细菌 DNA 10ng	DNA 总输入量过低导致无法判断片段化效果
7	细菌 DNA 100ng	有模糊结果，可进行先建库后切胶回收
8	细菌 DNA 500ng	片段化结果略微偏大，可切胶回收进行后续实验
9	细菌 DNA 1000ng	片段化结果合格
10	DL2000 Marker	

参考文献

[1] Shi Y C, Guo H, Chen J, et al. Initial meconium microbiome in Chinese neonates delivered naturally or by cesarean section [J]. Sci Rep. 2018. 8(1): 3255.

- [2] Chen S, Zhou Y, Chen Y, et al. fastp: an μ Ltra-fast all-in-one FASTQ preprocessor [J]. *Bioinformatics*. 2018. 34(17): i884–i890.
- [3] Kent W J, Sugnet C W, Furey T S, et al. The human genome browser at UCSC [J]. *Genome Res*. 2002. 12(6): 996–1006.
- [4] Langmead B, Salzberg S L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 [J]. *Nat Methods*. 2012. 9(4): 357–359.
- [5] Segata N, Waldron L, Ballarini A, et al. Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes [J]. *Nat Methods*. 2012. 9(8): 811–814.
- [6] Parks D H, Tyson G W, Hugenholtz P, et al. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles [J]. *Bioinformatics*. 2014. 30(21): 3123–3124.
- [7] Li D, Liu C M, Luo R, et al. MEGAHIT: an μ Ltra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph [J]. *Bioinformatics*. 2015. 31(10): 1674–1676.
- [8] Li W, Godzik A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences [J]. *Bioinformatics*. 2006. 22(13): 1658–1659.
- [9] Besemer J, Borodovsky M. Heuristic approach to deriving models for gene finding [J]. *Nucleic Acids Res*. 1999. 27(19): 3911–3920.
- [10] Zhu W, Lomsadze A, Borodovsky M. Ab initio gene identification in metagenomic sequences [J]. *Nucleic Acids Res*. 2010. 38(12): e132.
- [11] Liu C M, Wong T, Wu E, et al. SOAP3: μ Ltra-fast GPU-based parallel alignment tool for short reads [J]. *Bioinformatics*. 2012. 28(6): 878–879.
- [12] Qin N, Yang F, Li A, et al. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis [J]. *Nature*. 2014. 513(7516): 59–64.
- [13] Zheng Z, Zhong W, Liu L, et al. *Bioinformatics Approaches for Human Gut Microbiome Research* [J]. *Infectious Diseases and Translational Medicine*. 2016. 2(2): 69.
- [14] Xie C, Mao X, Huang J, et al. KOBAS 2.0: a web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases [J]. *Nucleic Acids Res*. 2011. 39(Web Server issue): W316–W322.
- [15] Buchfink B, Xie C, Huson D H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND [J]. *Nat Methods*. 2015. 12(1): 59–60.
- [16] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities [J]. *Appl Environ Microbiol*. 2009. 75(23): 7537–7541.
- [17] Huerta-Cepas J, Szklarczyk D, Forslund K, et al. eggNOG 4.5: a hierarchical

orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences

[J]. *Nucleic Acids Res.* 2016. 44(D1): D286–D293.

[18] Lombard V, Golaconda R H, DrμLa E, et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013 [J]. *Nucleic Acids Res.* 2014. 42(Database issue): D490–D495.

[19] Liu B, Pop M. ARDB—Antibiotic Resistance Genes Database [J]. *Nucleic Acids Res.* 2009. 37(Database issue): D443–D447.

[20] Chen L, Zheng D, Liu B, et al. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis—10 years on [J]. *Nucleic Acids Res.* 2016. 44(D1): D694–D697.

第 10 章 土壤微生物群落组成高通量测序方法

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参照扩增子测序指导（见下文）要求执行。

2. 基因组二代测序实验基本流程

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

3. 主要设备

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
QIAextractor	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

4. 实验流程

4.1 土壤 DNA 提取

参照第 9 章土壤宏基因组测序 4.1-4.2 步骤，提取土壤 DNA，并质检。

4.2 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，件具体如下表 1:

	引物名称	引物序列 (5' - 3')	扩增程序	参考文献
细菌	515F	GTGCCAGCMGCCGCGG	95 ° C for 2 min, 35 cycles of 20 s at 94 ° C, 40 s at 55 ° C and 1 min at 72 ° C, and a final 10-min extension at 72 ° C	Tamaki et al., 2011
	907R	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT		
真菌	ITS1-1	GGAAGTAAAAGTCGTAA	95 ° C for 3 min, 35 cycles of 30 s at 95 ° C, 30 s at 59.3 ° C, and 45 s at 72 ° C and a final 10-min extension at 72 ° C	Degnan et al., 2012
	737F	CAAGG		
	ITS2-2	GCTGCGTTCTTCATCGA	45 s at 72 ° C and a final 10-min extension at 72 ° C	
	043R	TGC		
古菌	519 F	CAGCCGCCGCGGTAA	96 ° C for 4 min, 35 cycles of 30 s at 94 ° C, 40 s at 57 ° C, and 45 s at 72 ° C and a final 10-min extension at 72 ° C	Coolen et al., 2004
	915 R	GTGCTCCCCGCCAATTCTT		
碳 固 定 (CbbL)	K2f	ACCA [C/T] CAAGCC [G /C] AAGCT [C/G] GG	95 ° C for 5 min, 35 cycles of 45 s at 95 ° C, 45 s at 62 ° C and 90 s at 72 ° C, and a final 20-min extension at 72 ° C.	Tolli et al., 2005
	V2f	GCCTTC [G/C] AGCTTG CC [G/C] ACC [G/A]		
固 氮 菌 (<i>nifH</i> 基因)	PolF	TGCGAYCCSAARGCBGACTC	94 ° C for 15 min, 32 cycles of 60 s at 94 ° C, 60 s at 55 ° C and 60 s at 72 ° C, and a final 10-min extension at 72 ° C.	Poly et al., 2001
	AQER	GACGATGTAGATYTCCTG		
丛 植 菌 根 菌	AMV4	AAGCTCGTAGTTGAATT	94 ° C for 15 min, 32 cycles of 60 s at 94 ° C, 60 s at 55 ° C and 60 s at 72 ° C, and a final 10-min extension at 72 ° C.	Lumini et al, 2010
	5NF-F	TCG		
	AMDGR-R	CCCAACTATCCCTATTAATCAT		

在生物安全柜中，在无菌 50μL 管中按照以下体积混合 PCR 体系：

试剂	体积 (μL)
----	---------

10 × PCR Buffer	1.5
dNTPs (2.5mM each)	1.2
上游引物 (10nM)	0.15
下游引物 (10nM)	0.15
HS Taq (5U/ 1)	0.075
无菌水	10.425
总计	13.5

每个样本 PCR 进行 3 个重复，将同一样本的 PCR 产物混合后用 2%琼脂糖凝胶电泳检测，使用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒 (AXYGEN 公司)切胶回收目的片段，Tris-HCl 洗脱；而后 2%琼脂糖电泳检测回收片段大小，并检测 PCR 产物在 230、260 和 280nm 处的吸光值，保证 260/280 值 1.8–2.0，260/230 值 2.0–2.2。

4.3 文库建库及高通量测序

使用 Illumina® DNA Prep, (M) Tagmentation 建库试剂盒按照 Amplify Tagmented DNA 的建库流程对 PCR 产物进行建库，使用 Advanced Analytical Fragment Analyzer with the HS-NGS High Sensitivity 474 kit 或者 Agilent 2100 Bioanalyzer with a High Sensitivity DNA kit 对建好的库进行质量检测，保证最大吸收峰在目标片段大小。检测合格后使用 Illumina NovaSeq 6000 System 平台对构建的扩增子文库进行 PE250 测序。

4.4 序列生物信息分析

原始数据为 FASTQ 格式。使用 Trimmomatic [7] 软件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 [8] 软件进行。拼接参数为：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)、单碱基高重复区(homologous)的序列以及长度过短的序列。精准去杂的参数为：去掉含有 N 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。

测序数据进行预处理生成优质序列之后，采用 Vsearch [9] 软件，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 [10] 软件包的挑选出各个 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 Greengenes 或者 Silva(version123) 数据库比对, 18S 使用 Silva(version123) 数据库比对, 物种比对注释使用 RDP classifier [11] 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。物种比对注释使用 blast [12] 软件。

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 OTUs 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 表格。

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。

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, 并以表格的形式进行展现丰度结果。

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, 以矫正测序深度不同引起的多样性差异。在该统一深度下计算不同样本的多样性指数, 并汇总表格。统计的指数包括

(1) Observed-species: 直接观测到的 OTU 个数。

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

$$S_{chao1} = S_{obs} + \frac{n_1(n_1 - 1)}{2(n_2 + 1)}$$

其中，

S_{chao1} = 估计的 OTU 数；

S_{obs} = 实际观测到的 OTU 数；

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"）

（1） ACE: 用于估计样本中物种总数，数值越大代表物种越多，与 Chao1 的算法不同。

$$S_{ACE} = \begin{cases} S_{abund} + \frac{S_{rare}}{C_{ACE}} + \frac{n_1}{C_{ACE}}, & \text{for } \hat{\gamma}_{ACE}^2 < 0.80 \\ S_{abund} + \frac{S_{rare}}{C_{ACE}} + \frac{n_1}{C_{ACE}}, & \text{for } \hat{\gamma}_{ACE}^2 \geq 0.80 \end{cases}$$

其中，

$$N_{rare} = \sum_{i=1}^{abund} i n_i, C_{ACE} = 1 - \frac{n_1}{N_{rare}}$$

$$\hat{\gamma}_{ACE}^2 = \max \left[\frac{S_{rare} \sum_{i=1}^{abund} i(i-1)n_i}{C_{ACE} N_{rare} (N_{rare} - 1)} - 1, 0 \right]$$

$$\tilde{\gamma}_{ACE}^2 = \max \left[\hat{\gamma}_{ACE}^2 \left\{ 1 + \frac{N_{rare}(1 - C_{ACE}) \sum_{i=1}^{abund} i(i-1)n_i}{N_{rare}(N_{rare} - C_{ACE})} \right\}, 0 \right]$$

n_i = 含有 i 条序列的 OTU 数目；

S_{rare} = 含有“abund”条序列或者少于“abund”的 OTU 数目；

S_{abund} = 多于“abund”条序列的 OTU 数目； $abund$ = “优势” OTU 的阈值，默认为 10。

（2） 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 值越大，说明群落多样性越高。

$$H_{shannon} = - \sum_{i=1}^{S_{obs}} \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N}$$

其中，

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。

(3) Coverage: 指各样本文库的覆盖率, 其数值越高, 则样本中序列被测出的概率越高, 而没有被测出的概率越低。

$$C = 1 - \frac{n_1}{N}$$

其中,

n_1 = 只含有一条序列的 OTU 数目;

N = 抽样中出现的总序列数目。

(4) Evenness: 物种均匀度是指某一群落或生境中全部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。可以用基于 Shannon-Wiener 指数计算物种多样性, 物种均匀度的计算公式为:

$$J = \frac{H'}{\ln S}$$

其中,

S = 群落内的物种数,

H' = Shannon-Wiener 多样性指数。

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 (三组或三组以上样本) 对组间多样性指数进行差异分析, 以 $p\text{-value} < 0.05$ 作为差异显著性筛选阈值, 并使用 Bonferroni 方法对 $p\text{-value}$ 进行多重假设检验校正 (fdr), 用以评估组间物种多样性是否存在显著差异。

4.10 Beta 多样性分析

4.10.1 NMDS 分析

非度量多维尺度分析 (NMDS, nonmetric multidimensional scaling) 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, 目标是尽可能的最小化应力函数 (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。

4.10.2 PCA 分析

PCA 分析 (Principal Component Analysis), 即主成分分析, 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, 去除噪音和冗余, 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。

参考文献:

- [1] Tamaki, H. et al. Analysis of 16S rRNA amplicon sequencing options on the Roche/454 next-generation titanium sequencing platform. PLoS One. 6, e25263 (2011).
- [2] Degnan, P. H. & Ochman, H. Illumina-based analysis of microbial community diversity. ISME. J. 6, 183-198 (2012).
- [3] Coolen, M.J.L., Hopmans, E.C., Rijpstra, W.I.C., Muyzer, G., Schouten, S., Volkman, J.K., 2004. Evolution of the methane cycle in Ace Lake (Antarctica) during the Holocene: response of methanogens and methanotrophs to environmental change. Organic Geochemistry 35 (10), 1151- 1167.
- [4] Tolli J, King G M. Diversity and structure of bacterial chemolithotrophic communities in pine forest and agroecosystem soils. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 8411-8418.
- [5] Poly F, Monrozier L J, Bally R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil. Research in Microbiology, 2001, 152(1): 95-103.
- [6] Lumini E, Orgiazzi A, Borriello R, et al. Disclosing arbuscular mycorrhizal fungal biodiversity in soil through a land-use gradient using a pyrosequencing approach. Environmental Microbiology, 2010, 12(8): 2165-2179.
- [7] Bolger Anthony M, Lohse Marc, Usadel Bjoern. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics, 2014, 30: 2114-20.
- [8] Reyon Deepak, Tsai Shengdar Q, Khayter Cyd et al. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. Nat. Biotechnol., 2012, 30: 460-5.

- [9] Caporaso J Gregory, Kuczynski Justin, Stombaugh Jesse et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods*, 2010, 7: 335–6.
- [4] Rognes Torbjørn, Flouris Tomáš, Nichols Ben et al. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *Peer J*, 2016, 4: e2584.
- [10] Wang Qiong, Garrity George M, Tiedje James M et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, 73: 5261–7.
- [11] Lobo. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). *J Mol. Biol.*, 2008, 215 (3): 403–410.

第 11 章 土壤优势功能微生物分离培养及鉴定方法

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,需分离培养典型的不同的功能微生物菌种。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、硝化细菌、亚硝化细菌、固氮细菌、解磷菌、解钾菌固氮菌,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。

2. 材料试剂

2.1 土壤

本方法所使用土壤为刚从样地中采集或采集后 4℃ 储存的土壤。

2.2 试剂

- 2.2.1. 硫酸铵 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, SIGMA, catalog number: A4418-100G)
- 2.2.2. 氯化钠 (NaCl) , SIGMA, catalog number: S7653-250G)
- 2.2.3. 硫酸钾 (K_2SO_4) , SIGMA, catalog number: 223492-500G)
- 2.2.4. 磷酸氢二钾 (K_2HPO_4) , SIGMA, catalog number: 1051041000-250G)
- 2.2.5. 硫酸镁 (MgSO_4) , SIGMA, catalog number: M7506-500G)
- 2.2.6. 氯化钙 (CaCl_2) , SIGMA, catalog number: C4901-100G)
- 2.2.7. α -萘胺 $(\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NH}_2)$, SIGMA, catalog number: 34390-250MG)
- 2.2.8. 葡萄糖 $(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6)$, SIGMA, catalog number: D9434-250G)
- 2.2.9. 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)
- 2.2.10. 明胶 (SIGMA, catalog number: 70151-500G)
- 2.2.11. 乙醇 $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH})$, SIGMA, catalog number: E7023-500ML)
- 2.2.12. 亚硝酸钠 (NaNO_2) , SIGMA, catalog number: S2252-500G)
- 2.2.13. 碳酸钠 (Na_2CO_3) , SIGMA, catalog number: 222321-500G)
- 2.2.14. 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)
- 2.2.15. 乙酸 $(\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H})$, SIGMA, catalog number: 695092-100ML)

- 2.2.16. 甘露醇 ($C_6H_{14}O_6$, SIGMA, catalog number: PHR1007-1G)
- 2.2.17. 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4 , SIGMA, catalog number: PHR1330-5G)
- 2.2.18. 磷酸钙 ($Ca_3O_8P_2$, SIGMA, catalog number: 21218-1KG)
- 2.2.19. 氯化镁 ($MgCl_2$, SIGMA, catalog number: M8266-100G)
- 2.2.20. 氯化钾 (KCl, SIGMA, catalog number: P9541-500G)
- 2.2.21. 二苯胺 ($(C_6H_5)_2NH$, SIGMA, catalog number: 242586-500G)
- 2.2.22. 浓硫酸 (H_2SO_4 , SIGMA, catalog number: 339741-500ML)
- 2.2.23. 亚硫酸氢钠 ($NaHSO_3$, SIGMA, catalog number: 243973-500G)
- 2.2.24. 亚硫酸钠 (Na_2SO_3 , SIGMA, catalog number: 239321-500G)
- 2.2.25. 1,2,4-氨基萘酚磺酸 ($H_2NC_{10}H_5(OH)SO_3H$, SIGMA, catalog number: 398969-25G)
- 2.2.26. 氯化铁 ($FeCl_3$, SIGMA, catalog number: 157740-100G)
- 2.2.27. 碳酸钙 ($CaCO_3$, SIGMA, catalog number: 239216-500G)
- 2.2.28. 钾长石粉 (SIGMA, catalog number: NIST70B-40G)
- 2.2.29. 粘菌素硫酸盐 (SIGMA, catalog number: C4461-100MG)
- 2.2.30. 放线菌酮 ($C_{15}H_{23}NO_4$, 上海吉至生化科技有限公司, catalog number: A49960-1G)
- 2.2.31. 2,3,5-氯化三苯基四氮唑 ($C_{19}H_{15}ClN_4$, SIGMA, catalog number: T8877-5G)
- 2.2.32. 牛肉膏 (MACKLIN, catalog number: B885959-500G)
- 2.2.33. 蛋白胨 (SIGMA, catalog number: 70175-500G)
- 2.2.34. 青霉素 ($C_{16}H_{13}N_3O_4$, SIGMA, catalog number: 61305-25MG)
- 2.2.35. 氯霉素 ($C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$, SIGMA, catalog number: R4408-10ML)
- 2.2.36. 结晶紫 ($C_{25}H_{30}N_3Cl$, SIGMA, catalog number: C0775-25G)
- 2.2.37. 杆菌肽 ($C_{66}H_{103}N_{17}O_{16}S$, SIGMA, catalog number: 08382-50DISCS-F)
- 2.2.38. L-天门冬酰胺 ($C_4H_8N_2O_3$, MACKLIN, catalog number: L800638-10g)
- 2.2.39. 乙二胺四乙酸铁钠 ($C_{10}H_{12}N_2NaFeO_8$, SIGMA, catalog number: E6760-100G)
- 2.2.40. D-半乳糖 ($C_6H_{12}O_6$, SIGMA, catalog number: G0750-10G)
- 2.2.41. 五氯硝基苯 ($C_6Cl_5NO_2$, SIGMA, catalog number: 45653-250MG)

- 2.2.42. 牛胆汁 (SIGMA, catalog number: T6260-100MG)
- 2.2.43. 四硼酸钠 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, SIGMA, catalog number: 221732-500G)
- 2.2.44. 硫酸链霉素 (MACKLIN, catalog number: S6153-10g)
- 2.2.45. 磷酸 (H_3PO_4 , SIGMA, catalog number: 345245-500ML)
- 2.2.46. 甘油 (SIGMA, catalog number: G7893)
- 2.2.47. 琼脂粉 (SIGMA, catalog number: A7921-100G)
- 2.2.48. 细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (Solarbio, catalog number: D2100)
- 2.2.49. 琼脂糖 (Biowest, catalog number: G-10)
- 2.2.50. PCR 引物 (Life Technologies)
- 2.2.51. PCR 反应体系试剂 (TAKARA, catalog number: B110006)
- 2.2.52. 胶回收试剂盒 (Wizard 83® SV Gel and PCR Clean-up System, Promega, catalog number: A9282)
- 2.2.53. 三羟甲基氨基甲烷 (Tris, Vetec, catalog number: V900483-500G)
- 2.2.54. 上样缓冲液 (TAKARA, catalog number: 9156)

2.3 耗材

- 2.3.1. 镊子 (Jinzhong, catalog number: JD5020)
- 2.3.2. 剪刀 (Jinzhong, catalog number: J21130)
- 2.3.3. 切胶刀片 (Jinzhong, catalog number: J11010)
- 2.3.4. 滤纸 (SEP, catalog number: DXLZ11F)
- 2.3.5. 50-mL 离心管 (BD Falcon, catalog number: 352070)
- 2.3.6. 微量离心管 (2-, 5-mL; Eppendorf, catalog number: 022363352, 30119401)
- 2.3.7. 塑料研磨棒 (Huaoobio, catalog number: SLXMB-1.5)
- 2.3.8. 13-cm 方型培养皿 (Axygen, catalog number: ASJ-17-9142)
- 2.3.9. 60-mm 培养皿 (Corning, catalog number: 430166)
- 2.3.10. 96 孔 PCR 板 (Jet Keen Biotechnology, catalog number: PC-0200-9B)
- 2.3.11. 12 通道移液器 (10, 100, 300 μL ; Eppendorf, catalog numbers: 3122000027, 3122000043, 3122000060)
- 2.3.12. 单道移液器 (10, 20, 100, 200, 1000 μL ; Eppendorf, catalog numbers:

3120000020, 3120000038, 3120000046, 3120000054, 3120000062)

2.3.13. 移液器吸头 (nuclease-free, 10, 200, 1000 μ L; Axygen, catalog numbers: T-300, T-200-Y, T-1000-B)

2.3.14. Parafilm 封口膜 (Bemis, catalog number: PM-996)

2.3.15. 96 孔 PCR 板封板膜 (Axygen, catalog number: PCR-TS)

2.3.16. 称量纸(Dingguo, catalog number: PP-P-002)

2.3.17. 一次性乳胶手套(Dingguo, catalog number: GV-RST-M)

2.3.28. 试管(Greiner, catalog number: 16910)

2.4 仪器

2.4.1. 生物安全柜 (Thermo Fisher Scientific, catalog number: BSC-1000IIA2)

2.4.2. 旋涡混合器 (TIAGEN BIOTECH, catalog number: OSE-VS-01)

2.4.3. 电子天平 (Mettler Toledo, catalog number: AL104)

2.4.4. 平板摇床 (Kylin-Bell Lab Instruments, catalog number: TS-2)

2.4.5. 微孔板离心机 (TIANGEN BIOTECH, catalog number: OSE-MP26)

2.4.6. PCR 仪 (T100TM 99 ; BIO-RAD, model: 1861096)

2.4.7. 电泳仪 (JUNYI-DONGFANG, catalog number: JY300HC)

2.4.8. 凝胶成像仪 (BIO-RAD, model: Universal Hood II)

2.4.9. 酶标仪 (Molecular Devices® 102 , model: PARADIGM)

2.4.10. 紫外分光光度计 (Thermo Fisher Scientific, model: NanoDrop ND-2000)

2.4.11. 磁力架 (Thermo Fisher Scientific, catalog number: 12321D)

2.4.12. 高速微型离心机 (Thermo Fisher Scientific, model: Heraeus Pico 17)

2.4.13. 遗传分析仪 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, model: 3730XL)

2.4.14. -80 ° C 超低温冰箱 (Thermo Fisher Scientific, model: 907)

2.4.15. -20 ° C 冰箱 (Haier, catalog number: DW-40L92)

3. 功能细菌分离培养实验步骤

3.1 土悬液制备

- 3.1.1 样地里采集土壤样品，装在无菌 50mL 离心管或无菌自封袋中 (4℃ 储存) 尽快转移至实验室进行后续操作；
- 3.1.2 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 5g 土壤，放置在灭菌的 250mL 三角烧瓶中，加入 100mL 灭菌 10mM MgCl_2 ，封口膜封口，在平板摇床上常温 180 rpm 摇 30 分钟；
- 3.1.3 放置在常温静置 15 分钟；
- 3.1.4 将上层悬浊液转移至无菌 50mL 离心管，注意不能带有下层土壤；
- 3.1.5 利用分光光度计测量土壤悬液 OD600 值，加入灭菌 10mM MgCl_2 ，调整至 OD600=0.5，静置 30 分钟。

3.2 各功能细菌的分离培养及纯化

3.2.1 纤维分解菌

- (1) 制备纤维素培养基：称取纤维素 2.0 g，明胶 2.0 g， MgSO_4 0.25 g， KH_2PO_4 0.5 g 加入到 1000mL 蒸馏水，将 pH 调节至 6.8-7.2。自然固体培养基加 1.5% 琼脂。将 5mL 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，121℃ 下灭菌 30min。
- (2) 滤纸条是以普通的滤纸剪成 5cm × 0.7cm 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 4~5h，取出用自来水冲洗，烘干使用。
- (3) 选取 5 个稀释度 ($10^{-5} \sim 10^{-1}$) 的土壤悬液接种，每管接土壤悬液 1mL，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℃ 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 1mL 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 μL 的液体涂布到固体纤维素培养基中。最后在 28℃ 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。

3.2.2 硝化细菌:

(1) 制备硝化菌培养基:称取 NaNO_2 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, K_2HPO_4 0.75g, Na_2CO_3 1g, NaH_2PO_4 0.25g 加入到 1000mL 蒸馏水,自然固体培养基加 1.5% 琼脂。将培养基在普通滤纸上过滤,装入试管,每管装 5mL, 121°C 下灭菌 30min。

(2) 配制格利斯试剂:格利斯试剂溶液 I:称取磺胺酸 0.5g,溶于 150mL 醋酸溶液(30%)中,保存于棕色瓶中。溶液 II:称取 α -萘胺 0.5g,加入 50mL 蒸馏水中,煮沸后,缓缓加入 30% 的醋酸溶液 150mL 中,保存于棕色瓶中。二苯胺试剂:将 0.5g 无色二苯胺(Diphenylamine)溶于 20mL 蒸馏水及 100mL 浓硫酸中。

(3) 选取 5 个稀释度(如 $10^{-6} \sim 10^{-2}$)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 1mL。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 14 天后,测定硝酸根的产生。吸取培养液 5 滴于白瓷板孔中,先加入 1-2 滴格利斯试剂,如不呈红色,则表示亚硝酸已经完全消失。此时,另吸取培养液 5 滴于白瓷板孔中,加入 1 或 2 滴二苯胺试剂,如呈蓝色,则表示亚硝酸已被氧化为硝酸(NO_3^-),说明有硝酸细菌的存在。记录测试结果。

(4) 对硝化菌进一步分离与纯化,吸取上述不同稀释度的培养物 1mL 加入新鲜的液体硝化菌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 μL 的液体涂布到硝化菌固体培养基中。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硝化菌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。

3.2.3 亚硝化细菌培养基:

(1) 制备亚硝化菌培养基:称取 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5g, NaCl 0.3g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03g, K_2HPO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03g 和 CaCl_2 7.5g 加入到 1000mL 蒸馏水,自然固体培养基加 1.5% 琼脂。将培养基在普通滤纸上过滤,装入试管,每管装 5mL, 121°C 下灭菌 30min。

(2) 配制格利斯试剂:格利斯试剂由两种溶液组成:A 液:将 0.5g 对氨基苯磺酸

加到150mL的20%稀乙酸溶液中。B液:将1g α -萘胺加到20mL蒸馏水和150mL20%的稀乙酸溶液中。

(3) 选取6个稀释度(如 $10^{-7} \sim 10^{-2}$)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1mL。另取4支培养基不接种悬液而接种无菌水作对照。于28℃条件下培养14天后,吸取培养液5滴于白瓷板孔中,加入1或2滴格利斯试剂,如有亚硝酸(NO_2^-)存在,则呈红色,表示有亚硝酸细菌存在。记录测试结果。

(4) 对亚硝化菌进一步分离与纯化,吸取上述不同稀释度的培养物1mL加入新鲜的液体亚硝化菌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 μL 的液体涂布到亚硝化菌固体培养基中。最后在28℃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亚硝化菌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。

3.2.4 固氮细菌:

(1) 制备酵母浸出物-甘露醇(YEM)培养基:称取甘露醇10.00 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.20 g, NaCl 0.10 g, K_2HPO_4 0.50 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.20 g, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, 酵母提取物1.00 g加入到1000mL蒸馏水($\text{pH}=6.7-7$),自然固体培养基加1.5%琼脂。将5mL培养基分装于试管中,管中贴于内壁放一滤纸条,一半浸入培养基内,一半露于空气中,121℃下灭菌30min。

(2) 选取4个稀释度(如 $10^{-4} \sim 10^{-1}$)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1mL。另取4支培养基不接种悬液而接种无菌水作对照。于28℃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1mL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 μL 的液体涂布到酵母浸出物-甘露醇固体培养基中,置于28℃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。

3.2.5 解磷菌

- (1) 制备磷酸盐培养基(NBRIP), 称取葡萄糖 10 g, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25g, KCl 0.2g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1g。在高压灭菌前将培养基的 pH 调至 7.0 将 5mL 培养基分装于试管中, 121℃ 下灭菌 30min。
- (2) 配制 4%钼酸铵试剂。称取化学纯钼酸铵结晶 18g, 溶解在 420mL 蒸馏水中, 然后再渐渐向钼酸铵水中加入 30mL 浓硫酸, 充分振荡, 使结晶完全溶解后, 保存在棕色玻璃瓶中待用。
- (3) 配制还原剂。称取化学纯亚硫酸氢钠(NaHSO_3) 15g, 溶于 250mL 蒸馏水中, 加入亚硫酸钠(Na_2SO_3) 1.5g 和 1, 2, 4-氨基苯酚磺酸 [$\text{C}_6\text{H}_5(\text{OH})(\text{NH}_2)(\text{SO}_3\text{H})$] 使之完全溶解后, 用蒸馏水稀释成 500mL。如溶液浑浊, 可用滤纸过滤, 保存于棕色瓶中使用。
- (4) 用 4 个稀释度 ($10^{-7} \sim 10^{-4}$) 的土壤悬液接种, 每个稀释度的悬液重复 4 管, 每管接土壤悬液 1.0mL, 另取 4 支培养基不接种悬液而接种无菌水作对照。于 28℃ 条件下培养 5 天后。取 50% 试管中液体加 4% 钼酸铵试剂 1mL, 在沸水浴中加热 2min。取出后加入还原剂 0.5mL, 有磷酸时呈蓝色反应。记录测试结果。
- (5) 对解磷菌进一步分离与纯化, 可吸取上述 1mL 培养物加入新鲜的液体 NBRIP 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 μL 的液体涂布到 NBRIP 固体培养基中, 置于 28℃ 温箱中培养 5 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 NBRIP 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。

3.2.6 解钾菌

- (1) 制备改良型固体 Aleksandrov 培养基: 称取 5g 葡萄糖, 0.05g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05g FeCl_3 , 0.01g CaCO_3 , 0.2g CaPO_4 , 0.2g KAlSi_3O_8 , 15g 琼脂粉加入到 1000mL 蒸馏水。
- (2) 将 2 个稀释度 (10^{-4} 、 10^{-3}) 的土壤悬液 1mL 接种于灭菌的培养皿中, 然后倾入上述冷至 45℃ 左右的培养基约 12mL, 充分摇匀, 待冷却凝固后, 倒放于 28℃ 恒温箱中。培养 4 天后, 选择大型, 透明凸起如玻璃珠状, 十分黏着而有弹性的菌落即为硅酸盐细菌。
- (3) 对解钾细菌进一步分离与纯化, 对上述菌落进行富集培养。从富集培养物中取 80 μL 的液体涂布到改良型固体 Aleksandrov 培养基中, 置于 28℃ 温箱中培

养 4 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改良型固体 Aleksandrov 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。

3.2.7 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 1000 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 1000 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、多粘菌素硫酸盐 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, 121°C 下灭菌 30min。

(2) 选取 6 个稀释度 (如 $10^{-7} \sim 10^{-2}$) 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。

3.2.8 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 1000 mL。自然固体培养基加 1.5 % 琼脂, 121°C 下灭菌 30min。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 1000 mL 培养基加入量, 下同)、0.5g 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 $10^{-7} \sim 10^{-2}$) 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。

3.3 细菌保存-甘油保存法

3.3.1 将 2.2 中分离得到的纯菌株接种于其对应的液体培养基, 28°C, 180 rpm

摇床振荡培养至对数生长期（OD₆₀₀=0.6-0.8）。

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

3.3.3 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%。做好所以分离出的纯菌株的标记。

3.3.4 将上述保藏管于-80℃冰箱保存。

4. 功能菌株的鉴定

4.1 DNA 提取

4.1.1 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 2.2 各功能细菌的分离培养及纯化），28℃，180 rpm 摇床振荡培养活化至细胞进入对数生长期（OD₆₀₀=0.8）。

4.1.2 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。

4.1.3 取活化的菌悬液 1mL，12000rpm 离心 1min，尽量吸尽上清。

4.1.4 向细菌沉淀中加入 500μL 溶液 A，振荡至菌体充分悬浮。

4.1.5 向悬浮液中加入 20μL 的 RNase A（10mg/mL），55℃放置 10min。

4.1.6 加入 20μL 的蛋白酶 K（10mg/mL），充分混匀，55℃水浴消化，30min。消化期间可颠倒离心管混匀数次，12000 转离心 10min。将上清转移到一个新的离心管中。如有沉淀，可再次离心。

组分	规格
RNase A	1mL × 2
蛋白酶 K	1mL × 2
溶液 A	50mL
溶液 B	50mL
漂洗液	15mL × 2
洗脱液	30mL
吸附柱	100 个
收集管	100 个

4.1.7 加入 500μL 溶液 B，充分混匀。如出现白色沉淀，于 55℃放置 5min，

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，请增加消化时间。

4.1.8 加入 500μL 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 2min（分两次加入，每次 700μL）。

4.1.9 12000rpm 离心 2min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。

4.1.10 向吸附柱中加入 600μL 漂洗液（使用前请先检查是否已加入无水乙醇）12000rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。

4.1.11 向吸附柱中加入 600μL 漂洗液，12000rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。

4.1.12 12000rpm 离心 2min，将吸附柱置于室温或 50℃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。

4.1.13 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 50-200μL 经 65℃水浴预热的洗脱液，室温放置 5min，12000rpm 离心 2min。

4.1.14 离心所得洗脱液再加入吸附柱中，室温放置 2min，12000rpm 离心 2min，即可得到高质量的基因组 DNA。

4.2 PCR 扩增

4.2.1 准备好用于 PCR 扩增的 DNA 模板，做好各个模板的标记。

4.2.2 使用细菌鉴定通用引物 27F: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG; 1492R: GGTTACCTTGTTACGACTT 进行扩增。

4.2.3 在生物安全柜中，将以下 PCR 反应体系进行混合。

反应成分	体积 (μL)
Taq PCR Mix (2X)	25
引物 27F	1
引物 1492R	1
DNA 模板	2
ddH ₂ O	21

4.2.4 利用 PCR 仪根据以下反应条件进行 PCR 扩增。

步骤	温度 (° C)	时间	
预变性	95	2.5 min	1
变性	95	15 s	
退火	(T _m -5)°	30 s	35 个循环
延伸	72	1 min	
最终延伸	72	10min	1
保存	4° C	forever	1

4.2.5 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。

4.2.6 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 产物进行测序鉴定。

4.3 序列分析及鉴定

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

4.3.2 得到某菌株的测序结果 (碱基序列)。

4.3.3 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。

4.3.4 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

- [1] 李振高, 骆永明, 滕应. 土壤与环境微生物研究法 [M]. 第一版. 北京.: 科学出版社, 2008.
- [2] Gu Y, Wang X, Yang T, Friman VP, Geisen S, Wei Z, et al. Chemical structure predicts the effect of plant-derived low-molecular weight compounds on soil

- microbiome structure and pathogen suppression. *Funct Ecol* 2020; 34: 2158– 2169.
- [3] Komada, H. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Rev. PlantProt. Res.* 1975, 8, 114– 125
- [4] López AC, Alippi AM. Feasibility of using RFLP of PCR-amplified 16S rRNA gene(s) for rapid differentiation of isolates of aerobic spore-forming bacteria from honey. *J Microbiol Methods* 2019; 165: 105690.
- [5] Kim, M., Oh, H.S., Park, S.C., Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* 64: 346–351

第 12 章 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,地球上至少有线虫 10 万种。线虫群落在土壤碎屑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。此外,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,因此具有作为指示生物的独特优势。

1. 材料与试剂

1.1 材料

- 1.1.1 8cm-10cm 60 目的筛网
- 1.1.2 无色、无味面巾纸
- 1.1.3 载玻片 (25 mm × 75 mm, 厚 1.0-1.2mm)
- 1.1.4 盖玻片 (24 mm × 50 mm, 厚 0.13-0.16 mm)
- 1.1.5 塑料小皿 (直径为 60 mm)
- 1.1.6 直径 120mm 的漏斗
- 1.1.7 橡胶管
- 1.1.8 弹簧铗
- 1.1.9 浮载剂: 线虫的固定液
- 1.1.10 封片剂: 石蜡
- 1.1.11 挑针: 通常用现成的金属丝

1.2 试剂

- 1.2.2 甲醛 (分析纯 AR, 37~40%)
- 1.2.3 无水乙醇
- 1.2.4 FG 溶液 (40%甲醛, 8mL; 甘油, 2mL; 蒸馏水, 90mL 配制成 100mL 混合液 I)
- 1.2.5 甘油-酒精混合液 (甘油-酒精混合液: 30%酒精, 95mL; 甘油, 5mL 配制成混合液 II)
- 1.2.4 蒸馏水 (每瓶 500 mL)

1.2.5 丙三醇（甘油）（分析纯 AR，500 mL）

1.3 设备：

1.3.1 大容量低速离心机（LC-LX-L50C）

1.3.2 体式显微镜（Motic SMZ-168）

1.3.3 光学显微镜（Olympus BX50）

1.3.4 水浴锅

2. 实验步骤

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：

2.1.1 在直径 120mm 的漏斗末端接一段橡胶管，在橡胶管后端用弹簧铗夹紧；

2.1.2 在漏斗内放置 60 目的筛网；

2.1.3 取 50g-100g 土样均匀铺在筛网上，加水浸没土壤；

2.1.4 放置于室温条件下静置分离；

2.1.5 静止 24h 后，打开弹簧铗，放出橡胶管内的水 20-25mL 左右于小瓶中；

2.1.6 将水浴锅温度设定为 60℃，再将小瓶置于水浴锅中，加热 3 分钟杀死线虫，取出，稍静置冷却；

2.1.7 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。

2.1.8 获得的数据最后换算成线虫条数 $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ 干土（注：一定要测定每个样品鲜土的含水量）。

2.2 土壤线虫计数与鉴定

在统计土壤线虫数量的基础上，随机抽取至少 100 条线虫在光学显微镜下进行科属鉴定，不足 100 条的全部鉴定，并测量其体长与体宽。土壤线虫分类参照 Bongers (1994)、张晓珂等 (2013)、Li et al. (2017) 等的分类图鉴进行。

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，在 60℃ 水浴锅中水浴 5 min，等其冷却后，在每个样品中加入 1 mL 福尔马林和甘油的混合液（40%福尔马林溶液：甘油= 4:1）。

2.4 土壤线虫的固定

在 FG 溶液（40%甲醛，8mL；甘油，2mL；蒸馏水，90mL 配制成 100mL 混合液 I）中热杀死线虫，让线虫样品在溶液中停留至少 24 小时以上。24 小时后，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（甘油-酒精混合液：30%酒精，95mL；甘油，5mL 配制成混合液 II）。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，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，让石蜡完全溶化，密封住盖玻片下的液体，永久玻片制作完成(骆静梅等，2021)。

2.5 土壤线虫的鉴定

将临时玻片置于光学显微镜(Olympus BX50)下，土壤线虫分类参照 Bongers (1994)、张晓珂等(2013)、Li et al. (2017) 的分类图鉴进行。

3. 土壤线虫分子生物学鉴定方法

3.1 材料与试剂

3.1.1 一次性口罩、无菌手套

3.1.2 面巾纸

3.1.3 0.5 mL 和 2 mL 的离心管

3.1.4 无水乙醇

3.1.5 DNeasy Blood & Tissue 线虫 DNA 提取试剂盒

3.1.6 NF1/18Sr2b 引物

3.2 仪器设备

3.2.1 线虫提取富集相关材料（18 目、60 目、500 目不锈钢网筛（浙江上虞银河测试仪器厂）、表面皿、天平、烧杯、2 L 的量杯等）

3.2.2 10 μ l, 20-200 μ l, 1000 μ l 的移液器 (Eppendorf)

3.2.3 4/-80 °C 冰箱（海尔）

3.2.4 真空泵（郑州长城科工贸有限公司 SHB-111）

3.2.5 高压灭菌锅（上海申安医疗器械厂 DSX-18L-1）

3.2.6 恒温水浴锅（上海精宏实验设备有限公司 DK-S24）

3.2.7 无菌工作台

3.2.8 离心机 (Eppendorf Centrifuge 5425)

3.2.9 PCR 仪 (ABI GeneAmp® 9700 型)

3.3 实验步骤

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 $1902 \times g$ 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 $6010 \times g$ 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 μ l Buffer ATL, 40 μ l 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):

3.3.1.1 在保留 0.5 mL 线虫悬液的离心管中加入 360 μ l Buffer ATL, 40 μ l 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)。

3.3.1.2 涡旋 15 s, 加入 400 μ l Buffer AL, 涡旋混匀后加入 400 μ l (96–100%) 的酒精, 涡旋混匀。

3.3.1.3 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), $6010 \times g$ 离心 1 min, 弃去离心液及收集管。

3.3.1.4 将滤柱转移到一个新的收集管中, 加入 500 μ l Buffer AW1, $6010 \times g$ 离心 1 min, 弃去滤出液和收集管。

3.3.1.5 将滤柱转移到一个新的收集管中, 加入 500 μ l Buffer AW2, $18,407 \times g$ 离心 3 min 干燥滤柱, 弃去滤出液和收集管。

3.3.1.6 将滤柱置于一个 1.5 mL 的离心管中, 加入 100 μ l (一般为 50–200 μ l) Buffer AE, 室温孵化 1 min 后 $6010 \times g$ 离心 1 min 最终得到线虫 DNA。

3.3.1.7 提取的线虫 DNA 储存在 -80°C 冰箱用于后续的 PCR 扩增和测序。

3.3.2 线虫群落的扩增测序

使用引物 NF1-F/18Sr2b-R (Porazinska et al., 2009) 对线虫 18S rDNA V4 区进行扩增。PCR 采用 TransGen AP221-02: TransStart Fastpfu DNA Polymerase,

20 μ l 反应体系: 5x FastPfu Buffer 4 μ l, 2.5 mM dNTPs 2 μ l, Forward Primer (5 μ M) 0.8 μ l, Reverse Primer (5 μ M) 0.8 μ l, FastPfu Polymerase 0.4 μ l, BSA 0.2 μ l, Template DNA 10 ng, 最后使用灭菌 PCR 水补足至 20 μ l。

线虫 (NF1-F/18Sr2b-R) PCR 反应参数为: 95 ° C 预变性 3 min, 95 ° C 变性 30 s, 55 ° C 退火 30 s, 72 ° C 延伸 45 s, 35 次循环后最终在 72 ° 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 (图 2), 使用 AxyPrep DNA 凝胶提取试剂盒 (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA) 进行纯化, 并使用 QuantiFluor™-ST (Promega, USA) 对回收产物进行检测定量。根据 Illumina MiSeq 平台 (Illumina, San Diego, USA) 标准操作规程将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)。

3.4 数据质控与生信分析

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:

3.4.1.1 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 N 碱基的 reads。

3.4.1.2 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。

3.4.1.3 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。

3.4.1.4 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。

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：

3.4.2.1 提取优化序列中的非重复序列，去除没有重复的单序列。

3.4.2.2 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

3.4.2.3 去除嵌合体，得到 OTU 代表序列。

3.4.2.4 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%

3.4.2.5 以上的序列，生成 OTU 表格。

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。

参考文献

- [1] 陈小云, 刘满强, 胡锋, 等. 根际微型土壤动物——原生动物和线虫的生态功能. 生态学报, 2006, 27(8): 3132-3143.
- [2] 杜晓芳, 梁文举, 李琪. 土壤线虫群落 DNA 提取、扩增及高通量测序. 2021, Bio-101: e2104085. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2104085>
- [3] Li Q, **Liang WJ**, Zhang XK, Md Mahamood. Soil Nematodes of Grasslands in Northern China. Hangzhou: Zhejiang University Press and London: Academic Press (ISBN: 978-0-12-813274-6) , 2017.
- [4] 骆静梅, 张晓珂, 梁文举. 土壤线虫采集、标本制作与数据分析. 2021, Bio-101: e1010621. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1010621>
- [5] 张晓珂、梁文举、李琪等著. 长白山森林土壤线虫—形态分类与分布格局. 北京: 中国农业出版社, 2013.
- [6] Du, X. F., Li, Y. B., Han, X., Ahmad, W. and Li, Q. Using high-throughput sequencing quantitatively to investigate soil nematode community composition in a steppe-forest ecotone. Appl Soil Ecol, 2020, 152: 103562.
- [7] 李玉娟, 吴纪华, 陈慧丽, 等. 线虫作为土壤健康指示生物的方法及应用. 应用生态学报, 2005, 16(8): 1541-1546.
- [8] 毛小芳, 李辉信, 陈小云, 胡锋. 土壤线虫三种分离方法效率比较. 生态学杂志, 2004(03): 149-151.
- [9] 尹文英. 中国土壤动物检索图鉴[M]. 科学出版社, 1998.
- [10] Barker K R, et al. Seasonal population dynamics of selected plant-parasitic

- nematodes as measured by three extraction procedures. *J Nematol*, 1969, 1(3): 232–239.
- [11] Bongers, T. 1988. *De nematoden van Nederland*. KNNV Pirola, Schoorl NL. 408 p.
- [12] Bongers T. The Maturity Index: An ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition. *Oecologia*, 1990, 83(1): 14–19.
- [13] Bongers T, Bongers M. Functional diversity of nematodes. *Appl Soil Ecol*, 1998, 10(3): 239–251.
- [14] Bongers T, et al. Inverse relationship between the nematode maturity index and plant parasite index under enriched nutrient conditions[J]. *Appl Soil Ecol*, 1997, 6(2): 195–199.
- [15] Ferris H. Form and function: metabolic footprints of nematodes in the soil food web. *European J Soil Biol*, 2010, 46(2): 97–104.
- [16] Ferris H, Bongers T. Indices developed specifically for analysis of nematode assemblages. *Nematodes as Environmental Indicators*, 2009: 124–145.
- [17] Ferris H, et al. Structure, functions and interguild relationships of the soil nematode assemblage in organic vegetable production. *Appl Soil Ecol*, 2012, 61: 16–25.
- [18] Ferris H, et al. Reflections on plant and soil nematode ecology: past, present and future. *J Nematol*, 2012, 44(2): 115.
- [19] Liu MQ, et al. A sequential extraction procedure reveals that water management affects soil nematode communities in paddy fields. *Appl Soil Ecol*, 2008, 40, 250– 259.
- [20] Yeates GW, Coleman D C. Role of nematodes in decomposition. *Nematodes in soil ecosystems*, 1982, 55–80.
- [21] Yeates G W, et al. Feeding habits in nematode families and genera—An outline for soil ecologists. *J Nematol*, 1993, 25(3): 315–31.

第 13 章 土壤蚯蚓种群调查鉴定及线粒体基因组测序方法

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,其种群数量可作为评价土壤健康的一个重要生物指标。拟委托“南京土壤研究所、南京农业大学、上海交通大学和凌恩生物、美吉生物、华大基因测序平台协作完成土壤蚯蚓种群形态学鉴定和高通量测序鉴定。蚯蚓形态学鉴定质控通过多家单位土壤生物专家进行同时鉴定,将鉴定结果进行比对统一;蚯蚓线粒体基因组测序结果质控,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组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。

1. 材料与试剂

1.1 试剂

- 1.1.1. 乙酸 (Rhawn, catalog number: R049946-500ML)
- 1.1.2. 乙醇 (SIGMA, catalog number: E7023-500ML)
- 1.1.3. Mollusc DNA Kit (OMEGA E. Z. N. A.™, catalog number: D3373-01)
- 1.1.4. PCR 引物 (Life Technologies)
- 1.1.5. PCR 反应体系试剂 (Tran Taq Polymerase High Fidelity catalog (HiFi), catalog number: AP131-11)
- 1.1.6. 2000-bp Plus DNA 标准物 (DiNing, catalog number: DM1003)

1.2 耗材

- 1.2.1 铅笔 (Deli, catalog number: S907)
- 1.2.2 笔记本 (Deli, catalog number: 7952-A5-30)
- 1.2.3 镊子 (Jinzhong, catalog number: JD5020)
- 1.2.4 丁腈手套 (INTCO, catalog number: STDJY)
- 1.2.5 网筛 (PAMPAS, catalog number: 601011499100-GWc7T)
- 1.2.6 竹夹 (Muchun, catalog number: 1556299202-TZYNk)
- 1.2.7 大头针 (Deli, catalog number: 0039-3)

- 1.2.8 解剖套装 (TZZT, catalog number: 27001)
- 1.2.9 50-mL离心管 (50-, 100-mL; BD Falcon, catalog number: 352070)
- 1.2.10 (1.5-, 5-mL; Eppendorf, catalog number: 0030125.150, 30119401)
- 1.2.11 单道移液器 (10, 20, 100, 200, 1000 μ L; Eppendorf, catalog numbers: 3120000020, 3120000038, 3120000046, 3120000054, 3120000062)
- 1.2.12 移液器吸头 (nuclease-free, 10, 200, 1000 μ L; Axygen, catalog numbers: T-300, T-200-Y, T-1000-B)
- 1.2.13 Parafilm 封口膜 (Bemis, catalog number: PM-996)
- 1.2.14 15-cm 圆型培养皿 (Axygen, catalog number: ASJ-17-9142)
- 1.2.15 切胶刀片 (Jinzhong, catalog number: J11010)
- 1.2.16 核酸纯化柱 (Doyobio, catalog number: T316109)

1.3 仪器

- 1.3.1. 相机 (Canon, model: EOS 90D)
- 1.3.2. 解剖镜 (Nikon, model: SMZ800N)
- 1.3.3. -80℃ 超低温冰箱 (Thermo Fisher Scientific, model: 907)
- 1.3.4. -20℃ 冰箱 (Haier, catalog number: DW-40L92)
- 1.3.5. 2-8℃ 医用冷藏箱 (Meiling, model: YC-330L)
- 1.3.6. 高速离心机 (Eppendorf, model: 5810R)
- 1.3.7. 旋涡混合器 (TIAGEN BIOTECH, catalog number: OSE-VS-01)
- 1.3.8. 电泳仪 (JUNYI-DONGFANG, catalog number: JY300HC)
- 1.3.9. 凝胶成像仪 (BIO-RAD, model: Universal Hood II)
- 1.3.10. 紫外分光光度计 (Thermo Fisher Scientific, model: NanoDrop ND-2000)
- 1.3.11. 电热恒温水浴锅 (Kanglu, model: HHS-4S)
- 1.3.12. 电子天平 (Mettler Toledo, catalog number: AL104)
- 1.3.13. PCR 仪 (T100TM 99 ; BIO-RAD, model: 1861096)

2. 实验步骤

2.1 蚯蚓麻醉与固定

将每样地采集的动物样本用清水洗净, 置于 10⁻15%乙醇溶液中麻醉 10⁻15

分钟。将麻醉后的样本移至 90%乙醇溶液或无水乙醇中固定 15 分钟，期间蚯蚓等动物需用竹镊子等调整至笔直状态。转移固定后的样本到密闭保存管或保存盒中，管内加满 90%乙醇溶液或无水乙醇，同时在管内外贴上牢固的塑料标签。随后 2~3 天内定期更换溶液 2~5 次，至溶液内基本无色素。样品可常温保存。处理好的标本可倒掉酒精邮寄，或带上公共交通工具，并于 1~2 天内加入酒精。

2.2 蚯蚓物种形态学鉴定

主要依据体型和生物学特征，即蚯蚓的大小和颜色、环节数、生殖带位置，性突起的特点、口器特点以及雄孔和雌孔位置，刚毛特征，并通过解剖观察砂囊的位置进一步的确定。

2.2.1. 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、背中线、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。

2.2.2. 将蚯蚓标本背面朝上于解剖盘上，沿背中线向前，用解剖剪小心剖开，并用大头针固定。

2.2.3. 镜检观察蚯蚓内部器官形态特征并记录。统一从第V处起，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。

2.2.4. 物种分类时首先参考我国已有的蚯蚓物种形态特征。参考陈义(1956)、尹文英(1998)与 Sims & Easton(1972)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。

2.3 蚯蚓样本DNA提取

2.3.1. 采用软体动物DNA小量提取试剂盒（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。

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

2.3.3. 剪取小于30mg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1.5mL微量离心管中。

2.3.4 依次加入 350 μ l Buffer MBL 和 25 μ l 蛋白酶K, 漩涡混匀, 放置于37℃水浴中12-14小时, 直到微量离心管中大多数组织完全溶解。

2.3.5 在 1.5mL 微量离心管中加入350 μ l 氯仿-异戊醇混合液, 漩涡混匀, 然后RCF=10000转速室温离心2分钟。小心提取 250 μ l 上清液置于新的 1.5mL 微量离心管中。加入 5 μ l RNase A酶到微量离心管内, 室温静置10-30分钟。

2.3.6 加入 250 μ l Buffer MBL到微量离心管内, 漩涡混匀10-15秒, 水浴70℃ 10分钟。加入 250 μ l 乙醇 (室温, 96-100%) 到微量离心管内, 漩涡混匀10-15秒。

2.3.7 将 750 μ l 混合液转移到试剂盒提供的 2mL 收集管上的收集柱中, 然后RCF=10000转速室温离心1分钟, 保留收集管, 丢弃下清液。再同样转速室温离心1分钟, 丢弃收集管与下清液。将收集柱放置在一个新的 2mL 收集管中, 加入500 μ l HB Buffer缓冲液, 然后RCF=10000转速室温离心30秒, 丢弃下清液。

2.3.8 加入700 μ l DNA Wash Buffer缓冲液, 然后转速10000室温离心1分钟, 丢弃下清液。重复一次, 丢弃下清液, 然后将收集柱与收集管在转速15000室温离心2分钟。

2.3.9 将收集柱插入新的 1.5mL 微量离心管中, 室温下开盖放置2分钟。加入 50 μ l Elution Buffer缓冲液, 温浴2分钟, 然后转速10000室温离心1分钟。按照上述步骤重复一次, 以收获 100 μ l 的DNA。

2.3.10 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, 如图1凝胶电泳结果能看到完整条带。若总DNA完整且纯度在85%-90%之间, 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℃冰箱保存。

2.4 线粒体基因扩增测序

2.4.1 设计以下引物进行线粒基因的扩增

COI (Bely and Wray, 2004):

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 μ M 储存液, 置于-20℃下保存备用。

2.4.2 PCR反应体系设置为 50 μ l, 具体组成如下:

成分	反应体系 (50 μ l)
模板 DNA	1 μ l
正向引物 (10 μ M)	2 μ l
反向引物 (10 μ M)	2 μ l
2.5 mM d NTP	0.6 μ l
10*trans TaqTM HiFi Buffer I	4 μ l
Trans Taq DNA polymerase High Fidelity (HiFi)	9.6 μ l
dd H ₂ O	加至 50 μ l

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)

2.4.3 PCR扩增条件设置如下:

步骤	温度 (° C)	时间	
预变性	94	5 min	1
变性	94	30 s	
退火	50	30 s	32 个循环
延伸	72	1 min	
最终延伸	72	10min	1
保存	4° C	forever	1

2.4.4 获得扩增产物后, 将 PCR 产物, 3.0 μ L 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。

2.5 核酸质量检测

2.5.1 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 1。

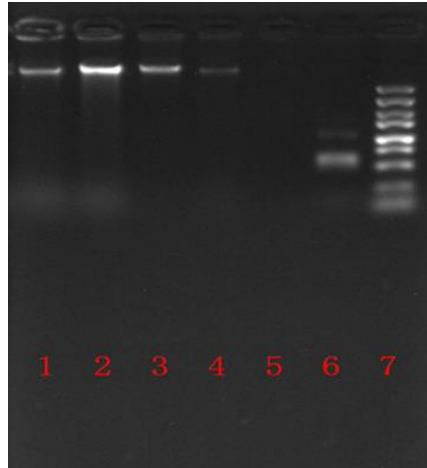


图 1，琼脂糖凝胶电泳图示例

2.5.2 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。

2.5.3 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。

2.5.4 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。

3. 蚯蚓群落特征分析

3.1 比对统一蚯蚓形态学鉴定和分子学鉴定的结果，结合采样信息记录统计各样点蚯蚓种类、数量和生物量。

3.2 运用Shannon-Weiner多样性指数、Margalef丰富度指数、Pielou均匀度指数和密度-类群DG指数等指数来表征蚯蚓的群落特征。

1) Margalef 丰富度 $d = (S-1) / \ln N$ 式中，S为总类群数，N为总个体数；

2) Shannon-Weiner 多样性指数 $H' = -\sum P_i \ln P_i$ 其中， $P_i = N_i / N$ ，N 为总个体数， N_i 为第i 个类群的个体数；

3) Pielou均匀度 $J = H' / H_{\max}$ 式中， H' 为Shannon-Wiener指数， $H_{\max}$ 为最大多样性；

4) 密度-类群指数D G: $D G = (g / G) \sum (D_i C_i / D_{\max} C)$ ， D_i 为第i个类群个体数， $D_{\max}$ 为C个类群中第i个类群的最大值， C_i 为第i个类群在C个群落中出现的次数，G为C个群落中出现的类群数，g为要测度的某群落实有类群数。

3.3 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:

- [1] 蒋际宝. 中国巨蚓科蚯蚓分类与分子系统发育研究. 上海交通大学, 2016.
- [2] 陈义. 中国蚯蚓 [M]. 科学出版社, 1956.
- [3] 尹文英. 中国土壤动物检索图鉴. 科学出版社, 1998.
- [4] Sims R W, Easton E G. 1972. A numerical revision of the earthworm genus *Pheretima* auct. (Megascolecidae: Oligochaeta) with the recognition of new genera and an appendix on the earthworms collected by the Royal Society North Borneo Expedition. *Biological Journal of the Linnean Society*, 4 (3): 169– 268.
- [5] Bely A E, Wray G A. 2004. Molecular phylogeny of nauidid worms (Annelida: Clitellata) based on cytochrome oxidase I . *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30 (1): 50– 63.
- [6] 高杏. 无量山地区巨蚓科分类及分子系统发育研究. 上海交通大学, 2018.
- [7] 马梅. 中药广地龙高特异性PCR鉴别的研究. 广州中医药大学, 2014..

第 14 章 土壤生物样品分析质量控制方法

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引起的。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，操作的偶然丢失或沾污等外因引起的误差。随机误差是服从正态分布的，即 95 % 的测定值应落在均值 $\bar{X} + 1.96S_x$ (标推误) 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，可增大试验误差，降低分析的可靠性，大的错误可导致分析失败。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，需要采用 10 次左右的重复。

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。

2.1 绝对偏差 (Absolute Deviation)

绝对偏差 = 测定值 (X_i) — 平均值 ($\bar{X}$)

2.2 相对偏差 (Relative Deviation)

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

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：

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

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 $\bar{X} \pm S_x$ 表示。

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。

$$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

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

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%）：

$$CV\% = \frac{S}{\bar{X}} \times 100\%$$

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有很高的准确度，也要有很高的精密度。

3. 分析误差控制方法

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，试剂质量选择，分析方法选用以及对照试验，空白试验等方面加以考虑。

3.1.1 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；

3.1.2 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，必要时应提纯试剂；

3.1.3 空白试验：除了不加样品以外，完全按着样品测定的同样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；

3.1.4 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。

3.2 精密度控制

3.2.1 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。

3.2.2 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；

3.2.3 合格要求：平行双样测定结果的误差在允许误差范围之内。

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 100kg, -80℃ 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/T28043-2011)，选择分析单位的分析值落在质控样保证值 $\bar{x} \pm s$ （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 $\bar{x} \pm 2s$ （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 $\bar{x}$ 与标准偏差 s ，在 95% 的置信水平，以 $\bar{x}$ 作为中心线、 $\bar{x} \pm 2s$ 作为上下警告线、 $\bar{x} \pm 3s$ 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，虽分析结果可接受，但有失控倾向，应予以注意。

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，将仪器修复、重新检定合格后重测。

第 15 章 土壤生物数据质量控制方法

1. 分析质量控制范围

数据质量控制包括在数据产生、上报和入库过程中的质量控制。

2. 分析过程中数据质量控制

2.1 分析数据结果的表示

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。

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，只保留一位可疑数字，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，只取一位有效数字；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。

2.2 缺失和低于检测限数据的表示

2.2.1 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在样品储存或运输中丢失样品。

2.2.2 对缺失数据的统计处理一般采用三种方法解决

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数据，用 noqc 表示；其它原因而缺失的数据用 no data 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。

2.3 有效数字的计算修约规则

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。

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》(GB8170-1987) 进行。实例见表 1。

表 1 数字修约实例

修约前	修约要求	修约规则	修约后
14.2432	保留一位小数	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
26.4843	保留一位小数	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
1.0501	保留一位小数	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
0.3500	保留一位小数	在拟舍弃的数字中, 若左边第一个数字等于 5 时,	0.4
0.4500	保留一位小数	其右边的数字皆为零时, 所拟保留的末位数若为奇	0.4
1.5050	保留二位小数	数则进 1, 若为偶数 (包括 0) 则不进。	1.50
15.4546	修约成整数	在拟舍弃的数字, 若为两位以上数字时, 不得连续	15

进行多次修约（例如：将 15.454 6 修约成整数，就不能一次修约为 15.455、二次修约为 15.46、三次修约 15.5、四次修约为 16），应根据所拟舍弃的数字中左边第一个数字的大小，一次修约出结果。

3. 分析数据上报前的检验

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，要求产生数据的一方（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。

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，采用三普土壤剖面编号原则，在土壤剖面编号基础上，添加 2 位数表示生物类型（0-微生物，1-线虫，2-蚯蚓）和重复数序（1-6）。

土壤生物调查采用相同电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。包括：

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。

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。

3.4 数据的三级检验

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。由农业农村部第三次土壤普查信息中心-土壤生物调查质量控制中心-土壤生物样品采集和分析小组在各个层次进行数据检验和数据质量控制。

土壤生物样品采集和分析小组负责检查数据的精密度、准确度和可靠性,以保证分析数据准确可靠;土壤生物调查质量控制中心检查各个采集和分析小组上报数据的实验室内精密度、准确度和试验室间精密度、准确度,以及数据的完整性和区域可比性,以保证专业数据的准确可靠;农业农村部第三次土壤普查信息中心负责检查土壤生物调查质控中心数据归并错误、数据完整性,以保证综合分析数据的准确可靠。

4. 可疑数据的取舍

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。

4.2 异常值判别

4.2.1 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;

4.2.2 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；

4.2.3 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，直到无异常值为至。

4.3 异常值的检验方法

4.3.1 大样本离群数据的取舍（三倍标准差法）

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：

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

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

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

然后查正态分布表，得对应于 Z 值的 a 值。如 $na < 0.1$ ，则舍弃， > 0.1 ，则不舍弃。

例如：土壤全氮的 5 次平行测定结束 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 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 $a=0.0565$ ， $na=5 \times 0.0565=0.2825$ ，因 $na > 0.1$ ，可疑值 $1.85 \text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 不予舍弃。

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 狄克逊 (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 $X_1, X_2, X_3, \dots, X_i$ 和 X_n 分别为最小可疑值和最大可疑值，按表 2 计算公式求 Q 值。

根据表 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。

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 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。

表 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	$Q = (X_3 - X_1) / (X_{n-2} - X_1)$	$Q = (X_n - X_{n-2}) / (X_n - X_3)$

表 3 Dixon 检验临界值表 (GB17378.2-1998)

显著性	n								
水平	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	n									
水平	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	

② 格鲁勃斯 (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：

$$T = (\bar{X} - X_1) / S$$

$$T = (X_n - \bar{X}) / S$$

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 15-6 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 4 Grubbs 检验临界值表 (GB17378.2-1998)

显著性	n								
水平	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	n								
水平	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

第 16 章 土壤质量和土壤健康的生物学评价方法

1. 评价原理

基于数理统计分析等模型方法（表 1），建立土壤质量和土壤健康的生物学综合评价方法。

- （1）建立我国第三次全国土壤生物调查评价数据库。
- （2）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，开展土壤生物的单因子评价。
- （3）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；建立土壤质量和土壤健康的生物学综合指数（Soil Biological Health, SBH）评价方程，计算 SBH 指数评分值。
- （4）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生物学评价图，撰写评价报告，专家评审，提出土壤健康调控对策。

表 1 土壤生物评价过程中的经验模型

评价过程	应用的模型和方法
选择评价因素	主成分分析、逐步回归分析、层次分析法、多元回归分析、相关系数检验、灰色关联度分析
确定因素权重	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
综合评价	分级赋值法、模糊综合判别、聚类分析

2. 评价步骤

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，以土种为基本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。

基于第三次全国土壤普查技术规范,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 NY1634-2008》、《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、成果表达等符合全国农技中心统一要求(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 公司 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。

2.2 土壤质量和土壤健康的生物学指数评价法

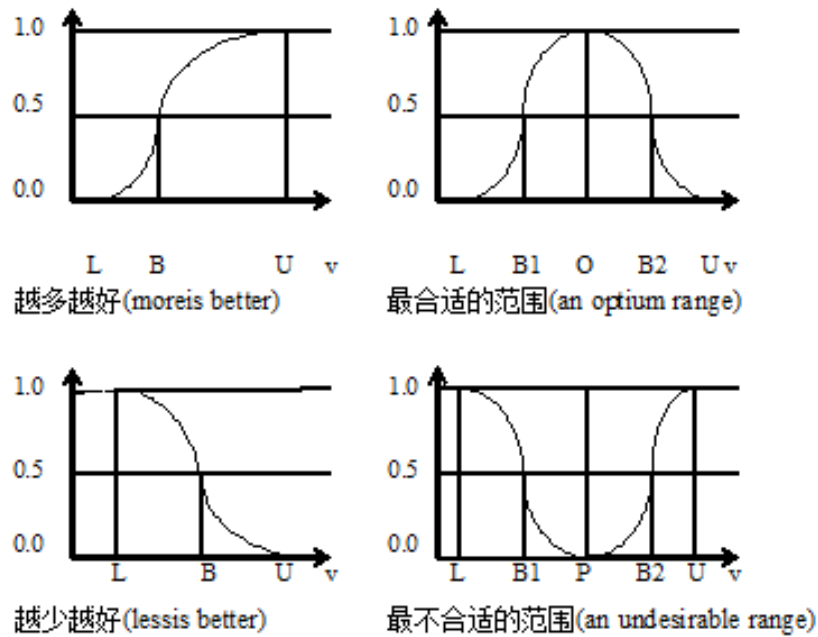
2.2.1 建立评价土壤质量和土壤健康的生物学最小指标集(Minimum Index Set)

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(Principal Component Analysis, 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 3)。不同土壤生物主因子代表了不同的功能群,但其中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,通过数理统计进行聚类分析,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”。

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(将数字的或主观的评级转变为变幅为 0-1 的无量纲数值)(图 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 1 土壤质量和土壤健康生物学评价的 4 种评分函数

2.2.3 建立土壤质量和土壤健康生物学综合指数（SBH）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 4）。

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综合指数（SBH）评分方程。在第二层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。然后在第一层相互独立的 5 类指标间采用乘法进行合成，计算土壤生物健康质量指数（Soil Biological Health）综合指数：

$$\begin{aligned}
 \text{SBH} &= \text{MB} \times \text{RE} \times \text{MD} \times \text{FD} \times \text{AD} \\
 &= \left(\sum_{i=1} k_{1i} \times \text{MB}_i \right) \times \left(\sum_{i=1} k_{2i} \times \text{REB}_i \right) \times \left(\sum_{i=1} k_{3i} \times \text{MD}_i \right) \times \left(\sum_{i=1} k_{4i} \times \text{FD}_i \right) \times \left(\sum_{i=1} k_{5i} \times \text{AD}_i \right)
 \end{aligned}$$

式中， k_{1i} 、 k_{2i} 、 k_{3i} 、 k_{4i} 、 k_{5i} 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、微生物多样性和动物多样性指标的隶属度值。SBH 是土壤质量和土壤健康的综合性指数。

表 2 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
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

表 3 不同层次评价指标的公因子方差和权重

第 2 层指标	第 3 层指标	公因子方差	权重值
多样性 1 (如宏基因组多样性)	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
多样性 2 (如可培养微生物多样性)	指标 1	0.731	0.196
	指标 1	0.634	0.170
	指标 1	0.735	0.197
	指标 1	0.776	0.208
	指标 1	0.856	0.229

2.2.4 土壤质量和土壤健康的生物学评价等级

将各指标的评分值与权重系数相乘,得到土壤健康评分的矩阵,其总和即为土壤健康的等级值。这些值在 0.1~1.0 范围之内。最高值 1.0 表示土壤健康水平完全适宜植物生长,最低值(如取 0.1)表示土壤健康水平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 DB33T 895》,将土壤生物健康质量划分为高、中、低 3 类 10 个等级。

2.2.5 土壤生物多样性和生物健康质量评价与对策分析

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,获得土属单元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,获得土壤亚类单元的生物指标值和指数评价值。

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多因子综合评价图。如针对第三层次指标,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。针对第一层次指标,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。针对土壤健康综合指标,绘制耕地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健康管理的生物学调控对策。

参考文献:

- [1] 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. 北京: 中国农业出版社. 214pp.

- [2] 张炳宁, 张月平, 张秀美. 1999. 基本农田信息系统的建立及其应用. 土壤学报, 36(4): 510-521.
- [3] 全国农业技术推广服务中心. 2005. 耕地地力调查与质量评价. 北京: 中国农业出版社. pp. 145-226.
- [4] 全国农业技术推广服务中心. 2006. 耕地地力评价指南. 北京: 中国农业科学技术出版社. pp. 25-150.
- [5] 孙波, 赵其国, 红壤退化中土壤质量的评价指标和评价方法. 地理科学进展, 1999, 18(2): 118-128. 246.
- [6] 赵其国, 孙波, 张桃林, 土壤质量与持续环境, I. 土壤质量的定义及评价方法. 土壤, 1997, 29(3): 113-120. 243.
- [7] 孙波, 赵其国, 张桃林, 余慎, 土壤质量与持续环境, III. 土壤质量评价的生物学指标. 土壤, 1997, 29(5): 225-234.
- [8] Zhang, Z., Qu, Y., Li, S. et al. 2017. Soil bacterial quantification approaches coupling with relative abundances reflecting the changes of taxa. Scientific Reports, 7: 4837. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05260-w>.
- [9] Karlen, D. L. and Diane, E. S., A framework for evaluating physical and chemical indicators of soil quality, p.53-72, Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, USA, 1994.

第 17 章 土壤生物调查数据管理方法

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。

2. 土壤生物调查数据管理原则

严格遵守第三次全国土壤普查数据的产权保护政策与共享制度，按照第三次全国土壤普查数据管理制度执行土壤生物调查数据的管理。

3. 土壤生物调查数据管理执行人

3.1 在第三次全国土壤普查期间，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；

3.2 在第三次全国土壤普查工作结束后，由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；

4. 土壤生物调查数据库管理

4.1 在第三次全国土壤普查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。

4.2 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引起数据丢失；保证数据长期可用和安全性。

5. 土壤生物调查数据共享制度

5.1 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，实现第三次全国土壤普查数据调查单位之间的数据共享，支撑第三次全国土壤普查报告的编写工作。

5.2 第三次全国土壤普查所有数据均属于国家的数据资源，由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。

5.3 第三次全国土壤普查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可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。

5.4 在第三次全国土壤普查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。

5.5 违反 5.3、5.4 规定即为侵犯知识产权行为。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。