

土壤线虫采集、标本制作与数据分析

Soil Nematode Collection, Specimen Preparation and Data Analysis

骆静梅^{1,2}, 张晓珂^{1,*}, 梁文举^{1,*}

¹中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳, 辽宁 110016; ²中国科学院大学, 北京 100049

*通讯作者邮箱: zxk@iae.ac.cn; liangwj@iae.ac.cn

引用格式: 骆静梅, 张晓珂, 梁文举. (2021). 土壤线虫采集、标本制作与数据分析. Bio-101 e1010621.

Doi: 10.21769/BioProtoc.1010621.

How to cite: Luo, J. M., Zhang, X. K. and Liang, W. J. (2021). Soil Nematode Collection, Specimen Preparation and Data Analysis. Bio-101 e1010621. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010621. (in Chinese)

摘要: 土壤线虫是数量和功能类群最为丰富的一类土壤动物, 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。本文论述了在土壤线虫群落研究过程中涉及的四个主要步骤 (不包含分类鉴定), 即 (1) 土壤线虫的野外采集; (2) 土壤线虫的分离提取; (3) 土壤线虫标本制作; (4) 土壤线虫数据处理和统计分析。首先, 合理的取样对于土壤线虫群落研究至关重要, 它决定了结果的真实性和准确性; 在实际工作中研究者需要根据不同的研究目的设计相应的取样方案。待取样全部完成后, 研究者要尽快进行线虫的分离提取工作。目前国内外应用最广泛的三种分离提取方法为浅盘法、蔗糖漂浮离心法以及贝尔曼漏斗分离法; 每种方法都有其优势、弊端及适用范围, 应根据所提取线虫的具体用途来确定采用何种分离方法。分离得到的线虫需要制作成临时标本或者永久标本以便进行土壤线虫的科属分类鉴定。最终获得的土壤线虫科属的原始数据一般先要进行转换和标准化处理, 然后再做进一步的统计分析。如果数据不符合正态分布, 可以进行对数转换、立方根转换和倒数转换; 数据标准化是为了达到小区间的方差齐性, 或者使得同一小区内的不同属性间或同一属性在不同小区内的方差减小。通过上述样品制备过程, 能够探明土壤线虫科属分布特征, 可为土壤线虫群落研究奠定基础; 通过线虫数据的统计分析, 可以获得指示、反映土壤食物网结构和功能变化的重要结果。

关键词: 土壤线虫, 样品采集, 提取方法, 标本制作, 数据分析

研究背景

土壤线虫是丰富度与多样性最大的一类土壤动物。根据已发表的线虫种类估算，地球上至少有线虫 10 万种 (van den Hoogen *et al.*, 2019)。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 (傅声雷等, 2019)。在土壤线虫群落研究过程中，除了专业性极强的分类鉴定工作外，还涉及以下四个主要步骤，即 (1) 土壤线虫的野外采集；(2) 土壤线虫的分离提取；(3) 土壤线虫标本制作；(4) 土壤线虫数据处理和统计分析。合理的取样及提取方法、可靠的标本制作方法以及准确的数据分析，对于获得线虫种属数据具有重要的作用。对于这些过程的操作规范性要求极高，只有遵循统一规范的操作步骤，才能最终获得准确翔实完整的土壤线虫数据。例如，如果取样方法不当，土壤样品不具有代表性，就可能对试验结果产生很大的影响，就无法得出正确的结论。常规土壤线虫的取样目的主要包括线虫群落调查、线虫病害诊断、线虫分类研究等 (张晓珂等, 2013)。在取样过程中，研究者还要根据不同的取样目的去考虑取样深度、取样时间及取样数量等诸多因素。规范的土壤取样工作是线虫群落研究的基础，之后要进入重要的线虫分离提取阶段。线虫的分离提取方法有多种，且具有不同的优势、弊端及适用范围，可根据提取线虫的种类和数量、采集时间、土壤类型及所提取线虫的具体用途等选择最适合的方法 (刘维志, 2004)。目前国内外通用的三种土壤线虫分离提取方法，即浅盘法 (Oostenbrink, 1960; Townshend, 1963; Verschoor and De Goede, 2000)、蔗糖漂浮离心法 (刘维志, 1995; Coleman *et al.*, 1999; 谢辉, 2005) 以及贝尔曼漏斗分离法 (Viglierchio and Schmitt, 1983; Gray, 1984; Tomar *et al.*, 2006)，具体操作步骤规范将在本文做详细的介绍。提取到土壤线虫样品后，为了在土壤线虫科属分类鉴定过程中便于观察线虫细微的形态结构，通常都需要将分离到的线虫制作成玻片标本，用于线虫的形态观察和分类鉴定。用于鉴定的玻片标本通常有两种：一种为临时标本 (俗称水片)，另一种为永久标本。临时标本的制作方法简单快速，不需要特殊的仪器设备及药剂，有利于快速鉴定线虫的种类；但该方法的弊端是制成的临时玻片保存时间较短，应该防止放置时间过长以致于线虫虫体变形，因此永久玻片更易于长时期保存，便于物种标本的积累、分类鉴定的学习以及学生教学的观察。

获得了土壤线虫群落或者种属信息后，为了利用这些有限的信息来直观地揭示出生

态系统的变化, 确定土壤虫多样性, 必须借助于有效的多样性指数和分析方法 (李玉娟等, 2005; 张晓珂等, 2018)。目前国内外研究者通常用香农-威纳指数 (Shannon-Weiner index, H') 和辛普森指数 (Simpson index, λ) 等来评价土壤线虫的物种多样性 (Yeates, 1984; Yeates and Bongers, 1999); 利用土壤线虫群落数据计算富集指数 (enrichment index, EI)、结构指数 (structure index, SI)、基础指数 (basal index, BI) 以及通路指数 (channel index, CI) 可以有效反映出土壤食物网对食物资源的预期响应及对食物网结构复杂性进行衡量 (Ferris *et al.*, 2001; Yeates *et al.*, 2003; 张晓珂等, 2012 和 2013)。此外, 线虫代谢足迹也是一个可以用来评估进入食物网碳量的非常重要的指标 (Guan *et al.*, 2018; Kou *et al.*, 2020)。Ferris (2010) 也提出了线虫代谢足迹是由生产碳 (线虫的一个生活周期中碳分配到生长和繁殖中的量) 和呼吸碳 (通过呼吸作用释放的二氧化碳) 两部分组成。基于生长和呼吸中利用的碳来度量代谢活性和生态系统功能, 研究者可以利用量化的土壤线虫形态度量数据来反映和指示碳的代谢过程 (Ferris, 2010; Luo *et al.*, 2021)。但迄今为止, 还没有一种单一的线虫生态指数可以全面有效地揭示土壤线虫群落结构或者土壤食物网的变化, 只有综合各种生态指数才能更好地发挥土壤线虫群落对土壤食物网的生物指示功能。综上, 本文从土壤线虫的采集、分离提取、标本制作和数据分析这四个方面对土壤线虫的主要研究过程进行详细地阐述, 以期对于土壤线虫群落研究提供一种标准化方法, 利于土壤线虫研究的规范化。

一、土壤线虫采集

1. 土壤收集方法

1.1 材料与试剂

自封袋、标签纸或用于标注的记号笔。

1.2 仪器设备

通常 2.5 cm 直径的土钻较为常用; 此外, 在取样过程中也经常使用铁锹、小铲子和螺旋钻 (图 1)。

1.3 实验步骤

首先根据试验目的和样地面积选取合适的取样样点数量以及确定样点的分布。常规取样按五点法, "S"或"W"型等方法进行随机取样; 由于大多数线虫分布在 0–30 cm 土层, 因此大多数取样的土层深度应该在这个范围之内, 根据不同采

集目的，也有采集 0–100 cm 土层探讨土壤线虫的垂直分布。此外，根据试验目的需要设置合适的取样时间，如果研究目的是要获得不同的线虫物种或用于分类研究，则需要不同的时间取样，选择在线虫群体最大、成虫最多时进行 (刘维志, 1995); 如果是为了预测虫害，则要提前，时间要选在作物种植之前; 如果是为了研究群落动态，取样最好至少在 2 周的间隔，这对于监测可能出现快速的群落变化通常是十分必要的。充足的样品量对于获得准确的线虫标本是十分重要的，要根据采样面积的大小，设置不同数量的采样点。一般在小于 1 英亩 (0.405 公顷) 的土地面积上可取 10 钻，1–5 英亩可取 20–30 钻，6–10 英亩可取 50–100 钻 (Blair *et al.*, 1996)。由于线虫的分布具有异质性，不建议在大于 5 英亩的面积上取一个单一土样来代表。一般建议至少要 5 钻土的混合样作为一个土壤样品; 在直径为 18 m 的林地采集土样，如果一个样本为至少 16 钻土的混合样品就能发现 96% 的线虫物种。取得测试所需土壤样品的重量一般要为 100–200 g，装入自封袋密封，并写好标签或用签字笔在袋上直接标注。

1.4 注意事项

- 1) 取得的多钻土样混合过程中要避免由于机械性破坏造成土壤线虫的死亡问题。
- 2) 未提取的土壤样品要放在冰箱内 4 °C 低温保存。在土样保存过程中，温度和湿度对线虫影响较大，许多线虫在长时间保存后将会死亡。因此，土样线虫提取必须在短时间 (一周) 内完成。
- 3) 所有样品在提取前要用手轻轻充分混合，这样才能达到好的提取效果。
- 4) 采集好的土样放入自封袋以后注意不要在阳光下暴晒，以防自封袋内温度过高导致线虫死亡或活性急剧下降。

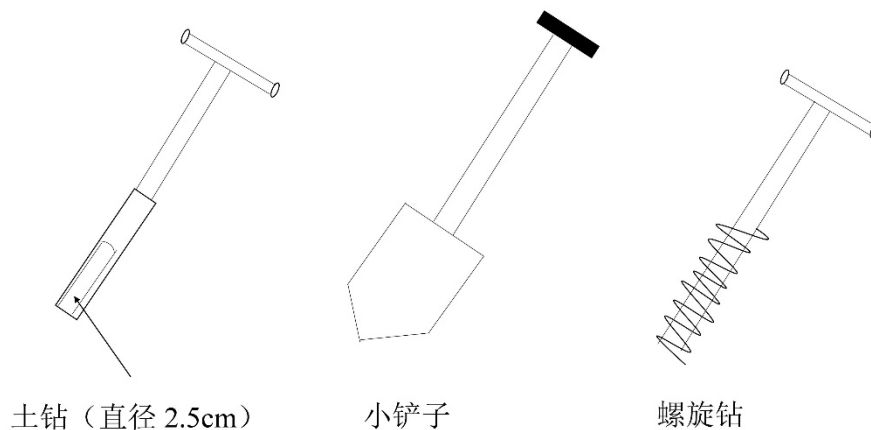


图 1. 取样工具示意图

2. 土壤线虫的分离提取方法

2.1 浅盘法

1) 材料与试剂

4%甲醛溶液 [福尔马林 (40%甲醛): 蒸馏水 = 1: 9]、标本瓶 (类似医用注射小瓶)。

2) 仪器设备

烧杯 (250 ml) 多个 (根据样品数量)、18 目 (多个)、60 目和 400 目的不锈钢网筛、(固定用) 竹签、面巾纸、表面皿、50 ml 试管 (多个)、水管喷头、天平、真空泵、水浴锅、记号笔。

3) 线虫提取步骤

a. 线虫的淘洗过筛

- a) 称取 100 g 鲜土倒入烧杯中, 加水至刻线搅匀, 静置 1 min, 倒入一组网筛, 上层为 60 目, 下层为 400 目, 边倒边振荡分样筛, 防止水分充满下层的 400 目筛而从筛中溢出。
- b) 然后再在烧杯中加入水后将土壤继续混匀, 静置 1 min, 倒入网筛中。按照上述步骤重复 3 次。
- c) 将 400 目分样筛取下, 用喷头把 400 目网筛中的线虫悬液中的泥浆冲洗干净, 倒入烧杯中。

b. 浅盘静置

- a) 浅盘装置的制备：取 18 目的网筛 (材质为不锈钢)，对筛子按照试验处理进行编号，在筛子中铺入一张面巾纸，周围用竹签固定，并将该网筛放入浅盘中 (装置结构见图 2)。
- b) 将烧杯中的水与泥通过表面皿轻轻倒到筛面上 (表面皿的作用是防止倒水和泥时将面巾纸冲破)，水、线虫和泥浆的混合物全部倒入，未倒净的剩余泥浆可用清水冲洗，再次全部倒入筛面。
- c) 静置 24 h 以便线虫沉淀，并进行饥饿处理，以得到虫体各器官清楚的线虫标本。
- d) 24 h 之后轻轻取走网筛，慢慢摇动浅盘 (不要让浅盘中的水洒出)，再将浅盘中的水全部转移到 250 ml 的烧杯中，静置 2 h 以上后，用真空泵抽走烧杯上层的水，剩余约 1 cm 高 (约 50 ml) 的水。将剩余的水摇匀后全部倒入大试管中，再静置 2 h 以上。

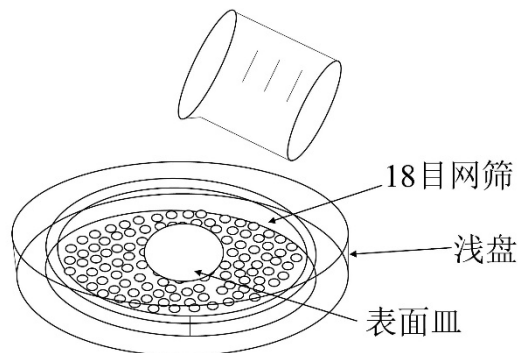


图 2. 浅盘装置示意图

c. 线虫温和热杀死法 (gentle heating)

- a) 先将水浴锅温度设定为 60 °C，把静置 2 h 以上的试管中的上层水小心抽出，只保留大约 2–3 ml，线虫集中于试管底部的水中。
- b) 注意：操作时要避免使试管出现大的晃动，以免线虫被重新搅起。
- c) 将抽完水后的试管放入水浴锅中，加热 3 min 杀死线虫。
- d) 之后取出试管，静置冷却，加入 4% 甲醛溶液，摇匀。
- e) 将加入 4% 甲醛溶液后的试管中的水倒入标本瓶中，盖紧盖子，写好

标签和序号，放入标本盒中待鉴定。

2.2 蔗糖漂浮离心法

1) 材料与试剂

1.18 g/ml 的蔗糖溶液或 1.15 g/cm³ 的硫酸镁溶液、TAF 固定液 (三乙醇胺福尔马林液: 福尔马林, 即 40% 甲醛, 7 ml; 三乙醇胺, 2 ml; 蒸馏水, 91 ml) 或 4% 甲醛溶液 [福尔马林 (40% 甲醛): 蒸馏水 = 1: 9]、标本瓶。

2) 仪器设备

水盆或大烧杯 (2000 ml)、250 ml 烧杯 (多个)(根据样品数量)、60 目、400 目和 500 目的不锈钢网筛、50 ml 试管 (多个)、100 ml 离心管 (多个)、水管喷头、天平、离心机、真空泵、水浴锅、记号笔。

3) 线虫提取步骤

a. 线虫的淘洗过筛

- a) 称取鲜土 100 g, 将称好的土倒入水盆或大烧杯中, 加水搅匀, 静置 1 min。将水倒入一组网筛, 即上层为 60 目, 下层为 400 目, 边倒边震荡分样筛, 防止水充满下层的 400 目筛而从筛中溢出。
- b) 然后, 再在水盆或大烧杯中加入水后继续混匀土壤, 静置 1 min, 倒入网筛中, 如此重复 3 次。
- c) 将 400 目的分样筛取下, 用喷头把 400 目网筛中的线虫悬液中的泥浆冲洗干净, 倒入烧杯中, 静置 24 h。

b. 蔗糖梯度离心

- a) 将静置烧杯中的上层水轻轻倒掉, 只保留下层大约 30 ml 水、线虫和泥浆的混合物。
- b) 将混合物轻轻摇匀, 倒入离心管中, 在天平上调平衡, 把平衡后的离心管放入离心机中, 第一次离心 (离心机的转速 710 × g, 离心时间为 4 min)。倒掉第一次离心后的离心管内的上层液, 保留泥土层。由于线虫的比重约为 1.08 g·cm⁻³, 比水的比重略大, 故线虫与泥土层混在一起。
- c) 在离心管中分别注入比重为 1.18 g/ml 的蔗糖溶液或 1.15 g/cm³ 的硫酸镁溶液约 10 ml, 在天平上调平衡后, 摇匀, 放入离心机中进行

第二次离心。由于线虫比重比蔗糖溶液或硫酸镁溶液的比重小，故与泥土分离，悬浮于蔗糖溶液或硫酸镁溶液中，而泥土由于比重较大而沉入离心管底层。

- d) 离心后，迅速取出离心管，把离心管内的上层液倒入 500 目筛中，用水把蔗糖液或硫酸镁溶液冲掉，以防线虫在蔗糖液或硫酸镁溶液中脱水变形。
- e) 然后把线虫液冲入烧杯中，随后再转入试管中。将其静置 24 h 以上，以使线虫沉淀，并进行饥饿处理，以得到虫体各器官清楚的线虫标本。

c. 线虫的杀死和固定

- a) 线虫的杀死采用温和热杀死法。先将水浴锅温度设定为 60 °C；把静置 6 h 以上的试管中的上层水小心抽出，只保留大约 2–3 ml，线虫集中于试管底部的水中。注意：操作时要避免使试管出现大的晃动，以免线虫被重新搅起。
- b) 将抽完水后的试管放入水浴锅中，加热 3 min 杀死线虫，取出，稍静置冷却，加入等量的 2 倍 TAF 固定液或同上直接用 4% 甲醛溶液，摇匀，倒入小瓶中，写好标签和序号，放入标本盒中待鉴定。

2.3 贝尔曼漏斗分离法

1) 材料与试剂

4% 甲醛溶液 [福尔马林 (40% 甲醛): 蒸馏水 = 1: 9]、标本瓶。

2) 仪器设备

20 目的不锈钢网筛、培养皿、胶管、弹簧夹、漏斗、50 ml 试管 (多个)、天平、真空泵、水浴锅、记号笔。

3) 线虫提取步骤

漏斗装置 (见图 3) 是将漏斗 (直径 10–15 cm) 固定在架子上，下端接 10 cm 长的胶管一段，胶管口上装一个止水弹簧夹。

- a. 取鲜土样 100 g，用适当的纸巾包裹。在漏斗上放一个 20 目的网筛，将包裹的土样置于漏斗的网筛中，加清水浸没纸包处，应注意清水尽量从漏斗壁慢慢加入，不要直接加在纸巾上以避免纸巾破裂导致样品中有土

壤颗粒或其它杂质进入。另外，加水的量不宜完全淹没纸包，最好是加水至纸包接近被淹没，由于纸巾易吸水，这样就足以使整张纸巾浸湿，从而保证土壤的湿润以及土壤没有在一个完全的淹水状态下（厌氧状态），这样线虫的活动能力更好，有利于从土壤中分离出来。上盖玻璃培养皿，可以依据情况静止 24 h 或 48 h，48 h 的提取效率一般高于 24 h，但由于少数线虫生活周期很短，不宜更长时间。由于趋水性和本身的重量，线虫离开土壤，在水中游动，最后沉降到漏斗末端的橡皮管中。

- b. 打开胶管下部的弹簧夹，用试管接取液体样约 5 ml，静置 1 h，吸取上部多余水分；将试管放到水浴锅中 60 °C 热水中 3 min，杀死线虫；与 4% 甲醛 1:1 的比例，混合倒入小瓶中，做好记号，密封保存备用。

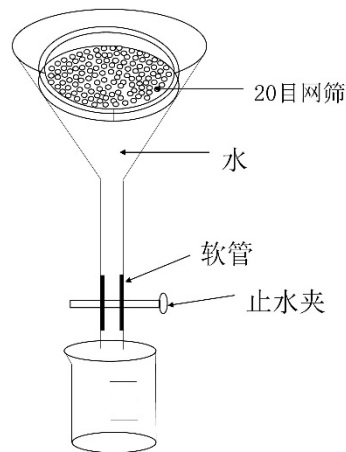


图 3. 漏斗装置示意图

2.4 三种线虫分离提取方法的优缺点

1) 浅盘法

该种提取方法主要由 Oostenbrink (1960)、Townshend (1963) 和 Verschoor and De Goede (2000) 等学者最初建立的，其优点为工作强度相对较低，分离效率较高，适于大量样品的提取；缺点为受到线虫活性的限制，需要线虫自身进行游动，因此只能提取活的线虫，而且有时线虫悬浮液所含的杂质较多。

2) 蔗糖漂浮离心法

该种提取方法主要参考刘维志 (1995)、Coleman *et al.* (1999) 和谢辉 (2005) 等文献, 其优点为分离效率高, 能分离出土壤中活的和死的线虫; 同时可获得相当澄清的线虫悬浮液, 有利于镜检鉴定; 其缺点为工作量较大, 此外如果线虫和蔗糖溶液接触时间较长将对一些线虫产生有害的影响。值得注意的是离心设备在该提取方法中是必不可少的, 活的和死的线虫都被分离出来, 在实际操作和研究分析中必需考虑到这些注意事项。

3) 贝尔曼漏斗分离法

该种提取方法主要参考 Viglierchio and Schmitt (1983)、Gray (1984) 和 Tomar *et al.* (2006) 等文献。其优点为简单省力, 分离较快, 不需要一些特殊的设备, 更加经济更省力; 其缺点为相对变异性较大, 一些较大的线虫不易提取到。该方法更适用于砂性较强、粘性较差的土壤; 易于分离土壤中活跃性较大的线虫。值得注意的是, 总的提取时间大约是 2–3 d, 时间不要过长或过短 (Viglierchio and Schmitt, 1983)。

二、土壤线虫标本制作

1. 临时标本

1.1 仪器设备与试剂

- 1) 体视显微镜: 带光源的双目镜。
- 2) 洁净的载玻片与盖玻片: 选用的载玻片, 大小为 25 mm × 75 mm (厚 1.0–1.2 mm)。盖玻片方形, 大小为 24 mm × 50 mm, 厚度为 0.13–0.16 mm。
- 3) 浮载剂: 线虫的固定液
- 4) 封片剂: 石蜡
- 5) 挑针: 通常用现成的金属丝

1.2 具体操作步骤

- 1) 用吸管适量吸取一滴浮载剂于洁净载玻片中央, 液滴一定要小, 使加盖玻片之后, 浮载剂恰好铺满盖玻片所占的空间。
- 2) 用挑针将固定好的线虫转移数条于浮载剂中, 或者直接用吸管适量吸取含有线虫的浮载剂滴于洁净载玻片中央。
- 3) 将石蜡切成小的块状, 分别置于浮载剂的四周 (四个角), 盖上盖玻片, 放于

铁板上加热，封片 (图 4)。

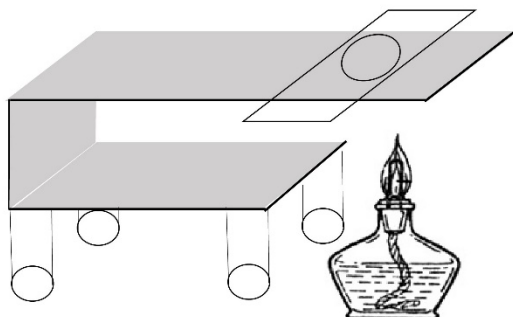


图 4. 封片过程示意图

2. 永久标本 (视频 1)

2.1 仪器设备与试剂

- 1) 体视显微镜：带光源的双目镜。
- 2) 洁净的载玻片与盖玻片：选用的载玻片，大小为 25 mm × 75 mm (厚 1.0–1.2 mm)。盖玻片方形，大小为 24 mm × 50 mm，厚度为 0.13–0.16 mm。
- 3) 封片剂：石蜡
- 4) 挑针：通常用现成的金属丝
- 5) 铜板：大小为 21 cm × 7 cm
- 6) FG 溶液：福尔马林，40% 甲醛，8 ml；甘油，2 ml；蒸馏水，90 ml 配制成 100 ml 混合液 I
- 7) 甘油-酒精混合液：30% 酒精，95 ml；甘油，5 ml 配制成混合液 II

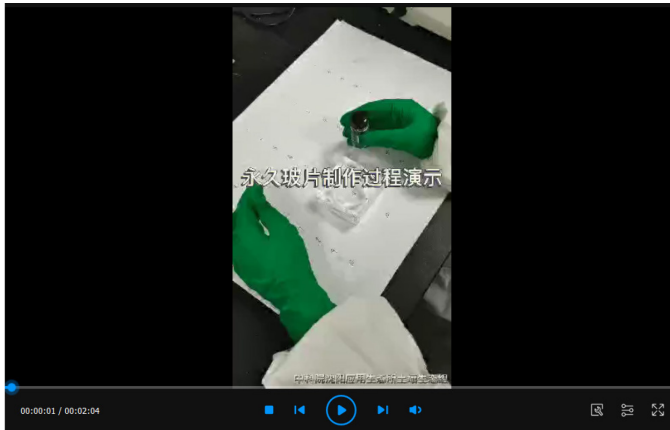
2.2 具体操作步骤

1) 杀死并固定线虫

在 FG 溶液中热杀死线虫，让线虫样品在溶液中停留至少 24 h 以上。

- 2) 24 h 后，抽出多余液体，转移要固定的剩余部分于小碗中，并向碗中加入甘油-酒精混合液。将样品放入干燥器 (底部放入氯化钙) 中停留 30 d，使其慢慢脱水。
- 3) 拿一个干净的玻璃载玻片，在载玻片的中心做一个蜡环，在环的中心滴一小滴甘油。

- 4) 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。
- 5) 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，永久玻片就完成了。



视频 1. 永久玻片制作过程

三、土壤线虫相关指数计算及数据分析

如果数据不符合正态分布，可以进行适当转换，转换的方法主要有对数转换、立方根转换和倒数转换。土壤线虫数据常用的转换方法为：当线虫数量数据若不满足正态分布，在作统计分析前要进行 $\ln(x+1)$ 转换；对线虫的相对多度采用反正弦函数转换，以保证数据呈正态分布，然后再利用 SPSS 等软件进行统计学上的显著性检验。数据标准化是为了达到小区间的方差齐性，或者使得同一小区内的不同属性间或同一属性在不同小区内的方差减小。此外有些数量分析方法要求特殊的标准化处理，并将标准化作为其分析方法的一部分 (刘任涛, 2016)。

1. 土壤线虫物种多样性及群落分析指数

1.1 土壤线虫物种多样性指数

香农-威纳多样性指数 (Shannon-Weiner diversity index): $H' = -\sum P_i(\ln P_i)$

优势度指数/辛普森指数 (Simpson index): $\lambda = \sum P_i^2$

某一给定的分类单元可以看作是第 i 个分类单元 (例如属); P_i 为第 i 个分类单元中个体所占的比例。

1.2 土壤线虫群落分析指数

富集指数 $EI = 100 \times e / (b + e)$

结构指数 $SI = 100 \times s / (b + s)$

基础指数 $BI = 100 \times b / (b + e + s)$

通路指数 $CI = 100 \times ef / (eb + ef)$

b 、 e 和 s 对应的值分别为 $\sum kb_n b$ ， $\sum ke_n e$ 和 $\sum ks_n s$ ，其中 kb ， ke 和 ks 为各类群所对应的加权数 (其值在 0.8-5.0 之间)，而 nb 、 ne 和 ns 则为各类群的相对多度。 ef 是食真菌线虫 e 组分值，而 eb 是食细菌线虫 e 组分值。

2. 线虫代谢足迹

线虫代谢足迹： $\Sigma(N_t (0.1 W_t / m_t + 0.273 (W_t^{0.75})))$

某个属可以看作 t ； N_t 是 t 属的多度； W_t 是 t 属生物量， m_t 是 t 属的 cp 值。

线虫代谢足迹的纵坐标轴 (Y-轴) 代表富集足迹，横坐标轴 (X-轴) 代表结构足迹。X-轴坐标为 $SI - 0.5F_s$ 和 $SI + 0.5F_s$ ，Y-轴坐标为 $EI - 0.5F_e$ 和 $EI + 0.5F_e$ (F_s 和 F_e 分别为结构代谢足迹和富集代谢足迹) (Ferris, 2010)。功能代谢足迹为这些点 $[(SI - 0.5F_s, EI); (SI, EI + 0.5F_e); (SI + 0.5F_s, EI); (SI, EI - 0.5F_e); (SI, EI)]$ 连接的区域。富集代谢指数 (enrichment footprint, $efoot$) 是指通常 $c-p$ 值较低 (1-2) 且对资源富集反映迅速的一类线虫的代谢足迹；结构代谢指数 (structure footprint, $sfoot$) 反映的是 $c-p$ 值较高 (3-5) 的一类线虫的碳代谢过程，这类线虫对食物网具有调节功能 (Neher *et al.*, 2004; Ferris, 2010; Ferris *et al.*, 2012)。功能代谢足迹是富集代谢和结构代谢圈定区域的总合。

3. 线虫生产碳和呼吸碳

生产碳： $P_t = (N_t \times 20\% \times 52\% \times W_t \times 1000) / m_t$

呼吸碳： $CO_2 - C_t = N_t \times 0.273 \times (W_t \times 1000)^{0.75}$

某个属可以看作 t ； N_t 是 t 属的多度； W_t 是 t 属生物量， m_t 是 t 属的 cp 值；20% 是鲜土到干土的转换系数 (Persson *et al.*, 1980)；52% 是干土 C 含量 (Persson, 1983)；1000 是从 μg 到 g 的转换系数；0.273 是 C 和 CO_2 分子质量的比值。

致谢

本研究由国家自然科学基金项目 (41977054 和 41771280) 和国家科技基础资源调查专项项目 (2018FY100304) 资助，同时感谢中国科学院森林生态与管理重点实验室与

辽宁省现代保护性耕作和生态农业重点实验室的大力支持。

参考文献

1. 傅声雷, 张卫信, 邵元虎, 时雷雷, 刘占锋. (2019). [土壤生态学-土壤食物网及其生态功能](#). 科学出版社. 北京.
2. 李玉娟, 吴纪华, 陈慧丽, 陈家宽. (2005). [线虫作为土壤健康指示生物的方法及应用](#). *应用生态学报* 16(8): 1541-1546.
3. 刘任涛. (2016). [土壤动物生态学研究方法-实验设计、数据处理与论文写作](#). 科学出版社. 北京.
4. 刘维志. (1995). 植物线虫学研究技术. 辽宁科学技术出版社. 沈阳.
5. 刘维志. (2004). [植物线虫志](#). 中国农业出版社. 北京.
6. 谢辉. (2005). [植物线虫分类学](#). 高等教育出版社. 北京.
7. 张晓珂, 梁文举, 李琪. (2013). [长白山森林土壤线虫-形态分类与分布格局](#). 中国农业出版社. 北京.
8. 张晓珂, 梁文举, 李琪. (2018). [我国土壤线虫生态学研究进展和展望](#). *生物多样性* 26 (10): 1060-1073.
9. Blair, J. M., Bohlen, P. J. and Freckman, D. W. (1996). [Soil invertebrate as indicators of soil quality](#). In: Doran, J. W. and Jones, A. J. (Eds.). *Methods for assessing soil quality*. Soil Science Society of America, Inc. 273-291.
10. Coleman, D. C., Blair, J. M., Elliott, E. T. and Wall, D. H. (1999). [Soil invertebrates](#). In: Robertson, G. P., Coleman, D. C., Bledsoe, C. S. and Sollins, P. (Eds.). *Standard soil methods for long-term ecological research*. Oxford University Press. 349-337.
11. Ferris, H. (2010). [Form and function: metabolic footprints of nematodes in the soil food web](#). *Eur J Soil Biol* 46(2): 97-104.
12. Ferris, H., Bongers, T. and de Goede, R. G. (2001). [A framework for soil food web diagnostics: extension of the nematode faunal analysis concept](#). *Appl Soil Ecol* 18(1): 13-29.
13. Ferris, H., Sánchez-Moreno, S. and Brennan, E. (2012). [Structure, functions and interguild relationships of the soil nematode assemblage in organic vegetable production](#). *Appl Soil Ecol* 61: 16-25.

14. Gray, N. (1984). [Ecology of nematophagous fungi: comparison of the soil sprinkling method with the Baermann funnel technique in the isolation of endoparasites](#). *Soil Biol Biochem* 16(1): 81-83.
15. Guan, P., Zhang, X., Yu, J., Cheng, Y., Li, Q., Andriuzzi, W. S. and Liang, W. (2018). [Soil microbial food web channels associated with biological soil crusts in desertification restoration: the carbon flow from microbes to nematodes](#). *Soil Biol Biochem* 116: 82-90.
16. Kou, X., Zhang, X., Bai, W., Cai, Q., Wu, Z., Li, Q. and Liang, W. (2020). [Exploring N fertilizer reduction and organic material addition practices: an examination of their alleviating effect on the nematode food web in cropland](#). *Land Degrad Dev* 31(18): 2952-2961.
17. Luo, J., Zhang, X., Kou, X., Xie, H., Bao, X., Mahamood, M. and Liang, W. (2021). [Effects of residue mulching amounts on metabolic footprints based on production and respiration of soil nematodes in a long-term no-tillage system](#). *Land Degrad Dev* 32(7): 2383-2392.
18. Neher, D., Weicht, T., Moorhead, D. and Sinsabaugh, R. (2004). [Elevated CO₂ alters functional attributes of nematode communities in forest soils](#). *Funct Ecol* 18(4): 584-591.
19. Oostenbrink, M. (1960). Estimating nematode populations by some selected methods. In: Sasser, J. N. and Jenkins, W. R. (Eds.). *Nematology*. The University of North Carolina Press, Chapel Hill. 85-102.
20. Persson, T. (1983). [Influence of soil animals on nitrogen mineralisation in a northern Scots pine forest](#). Proceedings of the VIII Int Colloquium Soil Zool. 117-126.
21. Persson, T., Bååth, E., Clarholm, M., Lundkvist, H., Söderström, B. and Sohlenius, B. (1980). [Trophic structure, biomass dynamics and carbon metabolism of soil organisms in a Scots pine forest](#). *Ecol Bull (Stockholm)* 32: 419-459.
22. Tomar, V., Baniyamuddin, M. and Ahmad, W. (2006). Community structure of soil inhabiting nematodes in a mango orchard at Aligarh, India. *Int J Nematol* 16(1): 89.
23. Townshend, J. (1963). [A modification and evaluation of the apparatus for the Oostenbrink direct cottonwool filter extraction method¹](#). *Nematologica* 9(1): 106-

110.

24. van den Hoogen, J., Geisen, S., Routh, D., Ferris, H., Traunspurger, W., Wardle, D. A., de Goede, R. G. M., Adams, B. J., Ahmad, W., Andriuzzi, W. S., Bardgett, R. D., Bonkowski, M., Campos-Herrera, R., Cares, J. E., Caruso, T., de Brito Caixeta, L., Chen, X. Y., Costa, S. R., Creamer, R., da Cunha Castro, J., Dam, M., Djigal, D., Escuer, M., Griffiths, B. S., Gutiérrez, C., Hohberg, K., Kalinkina, D., Kardol, P., Kergunteuil, A., Korthals, G., Krashevskaya, V., Kudrin, A. A., Li, Q., Liang, W. J., Magilton, M., Marais, M., Martín, J. A. R., Matveeva, E., Mayad, E. H., Mulder, C., Mullin, P., Neilson, R., Nguyen, T. A. D., Nielsen, U. N., Okada, H., Rius, J. E. P., Pan, K. W., Peneva, E., Pellissier, L., da Silva, J. C. P., Pitteloud, C., Powers, T. O., Powers, K., Quist, C. W., Rasmann, S., Sánchez Moreno, S., Scheu, S., Setälä, H., Sushchuk, A., Tiunov, A. V., Trap, J., van der Putten, W., Vestergård, M., Villenave, C., Waeyenbergh, L., Wall, D. H., Wilschut, R., Wright, D. G., Yang, J. and Crowther, T. W. (2019). [Soil nematode abundance and functional group composition at a global scale](#). *Nature* 572: 194-198.
25. Verschoor, B. C. and De Goede, R. G. (2000). [The nematode extraction efficiency of the Oostenbrink elutriator-cottonwool filter method with special reference to nematode body size and life strategy](#). *Nematology* 2(3): 325-342.
26. Viglierchio, D. and Schmitt, R. V. (1983). [On the methodology of nematode extraction from field samples: Baermann funnel modifications](#). *J Nematol* 15(3): 438.
27. Yeates, G. W. (1984). [Variation in soil nematode diversity under pasture with soil and year](#). *Soil Biol Biochem* 16(2): 95-102.
28. Yeates, G. W. (2003). [Nematodes as soil indicators: functional and biodiversity aspects](#). *Biol Fert Soils* 37(4): 199-210.
29. Yeates, G. W. and Bongers, T. (1999). [Nematode diversity in agroecosystems](#). *Agric Ecosyst Environ* 74(1-3): 113-135.
30. Zhang, X., Li, Q., Zhu, A., Liang, W., Zhang, J. and Steinberger, Y. (2012). [Effects of tillage and residue management on soil nematode communities in North China](#). *Ecol Indic* 13(1): 75-81.