

黑 龙 江 省 地 方 标 准

DB23/T XXXX—XXXX

土壤原生动物监测技术规范

起草单位:黑龙江省生态环境监测中心
联系人: 蒋本超
电话: 15846388292
邮箱: jiangbenaokg@163.com

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

黑龙江省市场监督管理局 发 布

目 次

前 言 II

引 言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 样品采集 1

5 样品保存 2

6 原生动物种鉴定 2

7 质量保证和质量控制 3

附 录 A （资料性） 采样地基本情况记录表 5

附 录 B （资料性） 土壤样品采样环境调查数据表 6

附 录 C （资料性） 原生动物种信息统计表 8

附 录 D （资料性） 原生动物种鉴定书目 9

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由黑龙江省生态环境厅提出并归口。

本文件起草单位：黑龙江省生态环境监测中心、哈尔滨师范大学。

本文件主要起草人：

引 言

为贯彻《中华人民共和国环境保护法》《中华人民共和国土壤污染防治法》和《国务院关于印发2030年前碳达峰行动方案的通知》等法律法规、部门规章，实施国家黑土地保护工程，稳定土壤功能，保护土壤生物多样性，制定本文件。

土壤原生动物监测技术规范

1 范围

本文件规定了土壤原生动物监测技术术语定义、样品采集、样品保存、原生动物物种鉴定、质量保证和质量控制要求的内容。

本文件适用于土壤原生动物监测。

2 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 土壤质量 土壤采样技术指南
- HJ/T 166 土壤环境监测技术规范
- HJ 710.10 生物多样性观测技术导则 大中型土壤动物
- NY/T 395 农田土壤环境质量监测技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 原生动物

是最原始、最简单、最低等的单细胞动物。

4 样品采集

4.1 野外采样器具

- 4.1.1 器材类工具：应符合 HJ/T 166 的要求，包括但不限于样品袋、GPS 定位仪、数码相机。
- 4.1.2 工具类：应符合 HJ/T 166、HJ 710.10 的要求，包括但不限于铁铲、圆状取土钻。
- 4.1.3 文具类：应符合 HJ/T 166、HJ 710.10 的要求，包括但不限于基本情况记录表与采样环境调查数据表。
- 4.1.4 安全防护用品与采样车辆：应符合 HJ/T 166 的要求。

4.2 采样点位布设与观测

- 4.2.1 监测点位的布设和确定应符合 HJ/T 166 的规定。实际监测中，布点数量还要根据采样目的、样地环境状况等因素确定，一般每个样方至少布设 5 个点。
- 4.2.2 采集样本前，应先对现场环境情况进行观测、记录和拍照；尽可能全面地记录天气情况、土壤基本植被等其他信息（参见附录 A 和附录 B）。

4.3 采样时间

监测时间的确定包括但不限于：

- a) 若进行逐季或逐月监测，各季或各月监测的时间间隔应基本相同；
- b) 同一监测点位的采样深度、采样范围、采样时间应同步；
- c) 监测时间选择在一天内的同一时段。

4.4 采集样品

- 4.4.1 样品采集过程应符合 GB/T 36197 和 NY/T 395 的要求。
- 4.4.2 利用铁铲或圆状取土钻按照采样点分布采集表层土壤，采样深度 0 cm - 20 cm。每个采样点采集 2 kg 土壤混合样品，样品重量不够可适当增加采样点数。样品采集过程中，应去除砾石、植物根系等，每个采样点采集的土壤深度、重量应一致。样品应充分混匀后装入样品袋，做好标注。

4.5 样品标识和记录

- 4.5.1 样品袋外侧应标识采样点信息、采样时间以及采样人姓名。
- 4.5.2 采样表应记录采样时间、采样地名称等（参见附录 A）。

5 样品保存

采集的样品应室温保存，风干，用于土壤理化指标分析、制备土壤浸出液、原生动物活体观察、原生动物活体计数和原生动物专家鉴定。

6 原生动物物种鉴定

6.1 非淹没培养皿法活体培养

取30 g风干的土壤样品，置于烧杯中，加入100mL蒸馏水，煮沸 10 - 15 min，静置沉淀，取悬浮液过滤得到土壤浸出液。另取5 g风干土样，用纱布包好放入培养皿中，加入土壤浸出液约 60 mL，浸出液淹没样品2/3处为宜，对土壤中的原生动物进行培养，在25 ℃ 培养箱内培养1 天-7 天（视原生动物生长情况可延长培养天数），得到活体培养液。

6.2 活体观察、鉴定单击或点击此处输入文字。

6.2.1 原生动物活体观察流程

土壤原生动物活体观察流程可按照以下步骤开展：

- a) 用玻璃毛细管吸取一滴 6.1 得到的活体培养液滴到载玻片上，以原生动物活体 3 - 4 只为宜，液体的含量尽量少，避免液体从载玻片四边溢出；在显微镜下观察时，若原生动物运动速度过快可逐渐轻压盖玻片，使原生动物的运动减慢，注意不要破坏原生动物活体；
- b) 在盖玻片四角均匀地涂抹少量凡士林，防止盖玻片直接压在原生动物上使原生动物活体裂解死亡，盖上盖玻片，制作原生动物活体装片；
- c) 在低倍显微镜下查找原生动物活体；
- d) 在中倍显微镜下观察原生动物活体；
- e) 在高倍显微镜下观察原生动物活体；
- f) 于显微镜下进行原生动物活体拍照记录。

6.2.2 形态学观察

观察原生动物活体运动方式、大小、形状、纤毛及纤毛器（长度、分布和排列特征等），伸缩泡（部位/数量以及形成过程、排空间歇时间、是否有收集管等）、内质情况（是否存在特殊的油球、空泡、结晶体、食物泡数目/分布特征等）、色素体的存在及体色等特征。将原生动物物种信息填写至附录C中。每个样品应观察不少于2 - 3 个制作的原生动物活体装片。

6.3 活体计数

每隔24h对6.1中制备的活体培养液进行原生动物计数，步骤如下：

- a) 每次计数前，将培养皿中的活体培养液摇匀；
 - b) 将活体培养液划分为上、中、下三层，每层按照五点取样法（也可适当增加点数），每点取液体 1mL 于载玻片上；
 - c) 在显微镜下观察并计数，将获得的原生动物活体数量最大值填写至附录 C 中。
- 单个风干土壤样品中原生动物数量按以下公式计算：

$$N_0 = \left[\sum_{i=1}^m (n_1^{\uparrow} + n_1^{\text{中}} + n_1^{\downarrow} + \dots + n_m^{\uparrow} + n_m^{\text{中}} + n_m^{\downarrow}) \right] / V_0 \dots\dots\dots (1)$$

$$N = (N_0 \times V_l) / M_s \dots\dots\dots (2)$$

式中：

$n_m^{\uparrow}$ 、 $n_m^{\text{中}}$ 、 $n_m^{\downarrow}$ ——上、中、下每层中第m个取样点所观察的原生动物活体的数值，单位为个；

V_0 ——上、中、下每层所取的活体培养液总体积的数值，单位为毫升（mL）；

N_0 ——每毫升活体培养液中原生动物活体的数值，单位为个；

V_l ——6.1中加入的土壤浸出液体积的数值，单位为毫升（mL）；

M_s ——用于制备活体培养液的风干土壤样品重量的数值，单位为克（g）；

N ——每克风干土壤样品中原生动物活体的数值，单位为个。

6.4 物种鉴定依据

对原生动物物种信息进行统计并填写物种相关信息（参见附录C）。

原生动物物种鉴定书目见附录D。

无法通过鉴定书目鉴定的物种，应从活体培养液中吸出单个原生动物，置于无菌孔板中，经25 ℃ 恒温单克隆培养后由资深原生动物物种鉴定专家进行重复鉴定。

7 质量保证和质量控制

7.1 样品采集

- 7.1.1 及时在现场做好样品保存，正确标识样品。
- 7.1.2 及时清洗所有接触过样品的采样器具，防止污染。

7.2 样品运输

- 7.2.1 根据采样记录核对清点样品。
- 7.2.2 运输中应仔细保管样品，避免强光照射。

7.3 样品的交接与记录

- 7.3.1 样品交接时，应办理正式交接手续，接收人员应检查样品状态并进行记录。
- 7.3.2 样品应有唯一性标识及检测过程中的状态标识，确保样品不会混淆。

7.4 物种鉴定

物种鉴定的质量控制如下：

- a) 活体培养液的制备过程及原生动物活体计数过程应设置平行样，平行样的测定结果用平均数表示；
- b) 原生动物活体拍照资料应附上详细文字描述，包括物种形态学特征等信息；
- c) 原生动物新种经单克隆培养后由资深原生动物物种鉴定专家进行重复鉴定；
- d) 应当保存并更新相关的分类学文献。

7.5 数据记录

数据记录表应有鉴定人、复核人、审核人签字。

附 录 A
(资料性)
采样地基本情况记录表

采样地基本情况记录表样式如下：

采样地名称：				地点：	
样地#	样方#	样地长度：	样地宽度：	样地面积：	取样深度：
经纬度：E _____ N _____				样地序号：	
采集日期：				时间：	
采样人：				样品编号：	
制表人：				样品采集目的：	
土壤类型		☐ 卵石_____% ☐ 树木残干_____% ☐ 砂砾_____% ☐ 其他（ ）_____%			
样品采集		采样器具 _____ 如何采样 _____ 采样方法 _____			
备注					

附录 B
(资料性)
土壤样品采样环境调查数据表

土壤样品采样环境调查数据表样式如下：

日期：			时间：		
地点：省 市 县 村					
样地所属区域：		样地名称：			
经纬度：E _____N _____		海拔高度 _____ m			
样地#		样方#	土壤类型：		
起始时间：			终止时间：		
调查人：					
天气 情况	当前		过去 24 小时		过去 7 天有无大雨
	暴雨（大雨）	☐	☐		☐ 是 ☐ 否 气温 _____ °C 其他 _____
	小雨（中雨）	☐	☐		
	阵雨	☐	☐		
	多云	☐ _____%	☐ _____%		
	晴	☐	☐		
环境 特征	周围土地利用优势类型 ☐ 森林 ☐ 牧场/草原 ☐ 农业 ☐ 居民区 ☐ 商业 ☐ 工业 ☐ 其他_____		样地非点源（NPS）污染情况 ☐ 无 ☐ 某些可能污染源 ☐ 明显污染源 当地农田侵蚀情况 ☐ 无 ☐ 中等 ☐ 严重		
	采样地周边植被		优势类型 ☐ 乔木 ☐ 灌木 ☐ 草 ☐ 藤蔓 优势物种 _____		
稻田、湿地等类型的样地特征	进水流速 _____m/s			上方覆盖度 ☐ 半开阔 ☐ 半荫 ☐ 全荫	

土质	温度 ℃ 总氮 (g/kg) 活性磷 (g/kg) pH 土壤含水量 %	采样地周边 地表水特征	气味 ☐正常/无 ☐污物 ☐石油 ☐化学药品 ☐腥臭 ☐其他_____ 水表油污 ☐平滑 ☐闪光 ☐油珠 ☐斑块 ☐无 ☐其他_____ 浊度（如未测量） ☐清澈 ☐轻微浑浊 ☐浑浊 ☐不透明 ☐着色 ☐其他_____
----	---	-----------------------------------	---

附 录 C
(资料性)
原生动物种信息统计表

原生动物物种信息统计表样式如下:

土壤名称	样地编号	采集时间
土壤类型	定容体积	鉴定人员

[illegible]

鉴定人：

复核人：

审核人：

附 录 D
(资料性)

原生动物物种鉴定书目

- D.1 尹文英. 中国土壤动物[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- D.2 沈韞芬. 原生动物学[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- D.3 宋微波. 原生动物学专论[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1999.
- D.4 尹文英. 中国土壤动物检索图鉴[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- D.5 尹文英. 中国亚热带土壤动物[M]. 北京: 科学出版社, 1992.