

# 附藓蛭态轮虫分离法的比较 与分离条件的探索

尹志伟 徐润林\*

中山大学生命科学学院 广州 510275

**摘要:** 蛭态轮虫是附藓无脊椎动物中常见的类群, 由于个体较小, 观察难度大, 尤其是对其分离困难, 故对此类群的研究一直落后于其他轮虫类群。本文以文献报道附藓蛭态轮虫的分离方法为基础, 设定了不同的实验组, 比较了不同分离方法的分离效率, 并探讨了不同分离条件对附藓蛭态轮虫分离效率的影响。结果显示: 与简单的震荡复苏法相比, 蔗糖震荡复苏法可分离出更多的蛭态轮虫, 且在分离条件为 pH 7.8、温度 20℃和湿度 60%时可达到最高的分离效率。文中还就各分离条件对分离效率的影响进行了讨论。

**关键词:** 附藓动物; 蛭态轮虫; 分离技术

**中图分类号:** Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2017) 04-708-09

## Comparative Studies on the Extraction Methods and Conditions of Moss-dwelling Bdelloidea Rotifers

YIN Zhi-Wei XU Run-Lin\*

*School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China*

**Abstracts:** Bdelloidea rotifers are the common invertebrates in moss fauna. However, Bdelloidea rotifers is difficult to observe due to the smaller size of each individual and also it is difficult to separate them. Therefore the research on this group invertebrate was behind compared to other rotifer taxa. This article is aimed at comparing the extraction efficiency on Bdelloidea rotifers by different extraction methods and exploring the affect on extraction efficiency under different experiment condition. The multi-shock resuscitation methods and the sucrose shock resuscitation methods were selected according to the literature reports on extraction methods of moss-dwelling Bdelloidea rotifer. Impact factors, such as pH, temperature and humidity were chosen as different experimental conditions, and the experiment was done by setting up the different experimental groups with Orthogonal table of  $L_9$  (Table 1). All the data obtained from the experiment were deal with Excel 2010 and the statistic analysis was processed with SPSS 19.0 for analysis of

**基金项目** 国家自然科学基金项目 (No. 31030015);

\* 通讯作者, E-mail: xurunlin\_1960@yahoo.com;

**第一作者介绍** 尹志伟, 男, 硕士研究生; 研究方向: 动物生态学; E-mail: sumbit@foxmail.com。

收稿日期: 2016-11-01, 修回日期: 2017-02-26 DOI: 10.13859/j.cjz.201704022

variance to determine the difference among the experiment results. The study results showed that the average number of Bdelloidea rotifers were 94.68 ind/g and 165.33 ind/g by multi-shock and sucrose shock resuscitation methods, respectively (Fig. 1). The sucrose shock resuscitation methods could extract more Bdelloidea rotifers compared with the multi-shock resuscitation methods significantly ( $F = 24.017, P < 0.05$ ). The influence of the extraction conditions on the extraction efficiency was in the order: pH > humidity > temperature. Both range analysis and variance analysis displayed that while the maximum extraction efficiency can be expected under the following extraction conditions: pH at 7.8, temperature at 20°C and humidity at 60% respectively (Table 2 - 4).

**Key words:** Moss-dwelling-animals; Bdelloidea rotifer; Extraction technology

苔藓植物结构虽然相对简单,但因具独特的生理适应机制,故分布广泛。从植物群落生态演替层面上讲,苔藓植物也参与了植物群落生长发育的早期阶段,并与土壤形成一种独特的生态环境,即苔藓土壤生态系统。在此系统中也包含了包括原生动动物、线虫、轮虫、腹毛动物、缓步动物、环节动物、小型节肢动物和软体动物等种类繁多、数量巨大的无脊椎动物类群(查广才 1998, 杨潼 2008, Mieczan 2009, 杨再超等 2009, 潘林等 2010, Glime 2013),又由于不同动物的多种摄食方式,它们在苔藓植物群落营养物质循环中起着非常重要的作用(Davis 1981, Merrifield et al. 1998, Thorp et al. 2010)。苔藓植物成为一些小型无脊椎动物栖息场所的主要原因是其能为这些动物提供一个相对稳定的水环境和有机颗粒丰富的食物源,而这些均是制约无脊椎动物生存的最重要的限制因子(Gerson 1982)。无脊椎动物对苔藓土壤生境的适应机制以及苔藓土壤系统无脊椎动物的物种多样性和种群季节动态等方面的研究逐渐成为热点(尹文英 1992, 陈灵芝 1993, 何强等 2004)。

蛭态轮虫为轮虫动物门的一个类群,属双巢纲下的蛭轮目(徐润林 2013)。它们的体型基本都较小,体长约 0.1 ~ 1.0 mm。生活方式上,蛭态轮虫多营自由生活,少有寄生及固着的种类;分布十分广泛,适应性极强。已有的研究表明,生存于陆地生境中的轮虫绝大部分属于蛭态轮虫,占土壤轮虫总数的 95%(Donner

1975)。苔藓植物生境是蛭态轮虫扩散至新环境的首选栖息地(Hirschfelder et al. 1993)。蛭态轮虫主要以细菌、酵母、单细胞藻类以及一些特殊的有机颗粒为食,但不同种类的蛭态轮虫偏爱的食物各不相同,有的种类偏爱细菌,有的则偏爱酵母(Ricci 1984)。

尽管早在 20 世纪 40 年代,人们就开始关注附藓蛭态轮虫(Burger 1948),但由于分离技术上的原因,很长一段时间内,附藓蛭态轮虫的研究进展较为缓慢。起初人们多是将干漏斗法和湿漏斗法等经典的土壤小型动物分离技术直接用于蛭态轮虫的分离(尹文英 1992, 潘林等 2010),但其分离结果并不令人满意。国际上对这一问题也尚未有通用的解决办法。根据文献报道,到目前为止国外学者先后构建了 3 种用于分离蛭态轮虫的方法,即光照冰浴法(Ricci et al. 1989)、震荡复苏法(Peters et al. 1993)以及蔗糖震荡复苏法(Örstan 1998)。其中,第一种方法主要用于新鲜土壤或苔藓植物样品中的蛭态轮虫分离;后两种方法适用于从干燥后的土壤或苔藓植物样品中分离蛭态轮虫。考虑工作的现实性和实际应用性,从干燥样品中高效分离蛭态轮虫对后续研究工作的保证具有重要的意义。因此,本文重点比较了两种从干燥的苔藓植物样品中分离蛭态轮虫的方法和各自的分离效率,并探讨了人工培养条件下影响蛭态轮虫分离效率的各种可控条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 苔藓植物样品的采集

本研究所用的苔藓样品均采集于中山大学校园内。用小铲将苔藓植物及其着生处的土壤铲起或者将树皮连同其上的苔藓植物刮下，将苔藓样品装入牛皮信封内保存，带回实验室自然风干备用。

### 1.2 蛭态轮虫的分离方法

按照文献介绍的震荡复苏法 (Peters et al. 1993) 和蔗糖震荡复苏法 (Örstan 1998) 操作步骤，分别对 0.25 g 同一干燥苔藓植物样品中的蛭态轮虫进行分离。分离过程中的培养温度 20℃、湿度 60%、培养时间 24 h。每种分离方法均设 3 个重复样。在蔗糖震荡法中，每个处理样均震荡 2 次，每次约 10 s。分离步骤完成后，在体视镜 (尼康 SMZ-1000/800) 下观察并计数获得的轮虫数量，并将结果换算成单位重量样品中的虫体数量 (ind/g)。

本研究对于轮虫分离条件的探索采用了蔗糖震荡复苏法。由于在同等条件下，蔗糖震荡法较震荡法分离出了更多的动物个体，故选择此法做进一步的研究。

### 1.3 蛭态轮虫分离条件的设定

分离用水分别选用自来水 (未除氯)、超纯水和一种商品饮用纯净水 (commodity drinking purified water)。培养时的光照条件分别设置了强光照 (4 000 lx)、弱光照 (1 000 lx) 和无光照 (0 lx)。培养时间分别设置了 6 h、12 h、18 h 和 24 h。由于时间过长，可能出现复苏的个体进行生殖而导致数据偏差，因此培养时间上限设定在 24 h。培养液 pH 分别设置为 3.8、4.8、5.8、6.8、7.8、8.8 和 9.8。培养温度分别设置为 10℃、15℃、20℃、25℃ 和 30℃；培养相对湿度 (the humidity in incubator) 分别设置为 30%、45%、60%、75% 和 90%。在各个实验中除针对变量组设置梯度变化外，对其他条件的实验均是在 20℃、pH 7.8、湿度 60% 下培养 24 h。

实验过程中利用超纯水，1 mol/L 的 HCl 溶液以及 1 mol/L 的 NaOH 溶液配置不同 pH 溶

液。采用上海今迈 Phs-3c 型数显酸度计测定 pH，实验过程中每隔 6 h 测定培养介质 pH，并通过添加酸碱溶液保持 pH 恒定。

实验采用宁波江南仪器厂生产的 GXZ-280B 光照培养箱进行温度、湿度、光照的恒定控制。轮虫培养实验中所用容器为上海晶安生物生产的玻璃培养皿 (150 mm)、介质的用量如无特殊说明，均为 10 ml。各实验组的分离结果均利用体视镜进行观察并计数。

### 1.4 培养三因素三水平正交试验

为评价各分离条件的综合作用，在分别对各单因子实验分析后，选定各因子对分离效率最高的 3 个水平，设计了一个 3 因子 3 水平的正交试验分析 (表 1)，以找出对蛭态轮虫分离实验结果影响最大的分离因子和三因素间的交互作用对分离结果的影响 (金良超 1988)。

### 1.5 数据分析

本文实验数据利用 SPSS 19.0 统计分析软件中的方差分析评判实验结果间的差异显著性。

## 2 结果

### 2.1 两种分离方法的效率比较

震荡复苏分离法分离得到的蛭态轮虫平均为 94.68 ind/g，蔗糖震荡复苏分离法得到的蛭态轮虫平均为 165.33 ind/g，蔗糖震荡复苏分离法的分离效率显著高于震荡复苏法 ( $F = 24.017$ ,  $P < 0.05$ , 图 1)。

### 2.2 不同分离条件对蔗糖震荡复苏法分离效率的影响

不同分离条件下采用蔗糖震荡复苏法分离得到的蛭态轮虫数见图 2。

在 3 种实验用水中，自来水作为培养液分离的轮虫数量最高 (平均 186.67 ind/g)，而其他两种水作为培养液时，得到的轮虫数量都稍低。单因子方差分析显示，选用不同培养用水分离轮虫的效果没有显著差异 ( $F = 2.463$ ,  $P < 0.05$ )，多重比较 (multiple comparisons, LSD) 也可得到同样的结论。

在强光照条件下观察到的蛭态目轮虫数量

表 1 正交表  $L_9(3^4)$ Table 1 Orthogonal table of  $L_9(3^4)^*$ 

试验组 Experiment groups	pH	温度 (°C) Temperature	湿度 (%) Humidity	空列 Blank	结果 Results
	A	B	C	D	
1	1 (6.8)	1 (20)	1 (90)	1	
2	1 (6.8)	2 (25)	2 (60)	2	
3	1 (6.8)	3 (30)	3 (30)	3	
4	2 (7.8)	1 (20)	2 (60)	3	
5	2 (7.8)	2 (25)	3 (30)	1	
6	2 (7.8)	3 (30)	1 (90)	2	
7	3 (8.8)	1 (20)	3 (30)	2	
8	3 (8.8)	2 (25)	1 (90)	3	
9	3 (8.8)	3 (30)	2 (60)	1	

\* 正交表是一整套规则的设计表格，以  $L_n(t^c)$  表示， $L$  为正交表的代号， $n$  为试验的次数， $t$  为水平数， $c$  为列数，也就是可能安排最多的因素个数。例如  $L_9(3^4)$  表示需作 9 次实验，最多可观察 4 个因素，每个因素均为 3 水平。空白列是用来判断试验的结果是否由误差引起的，有空白列设计的试验结果会更可靠。

\* Orthogonal table is a set of rules for the design a table by using  $L$  as the orthogonal table code,  $n$  for the number of trials,  $t$  for the level of the number,  $c$  for the number of columns, which is probably organized the largest number of factors. For example,  $L_9(3^4)$  indicated that it need 9 tests up for a maximum of 4 factors, each factor was with 3 levels. The blank column is used to determine whether the result of the test is caused by the error the results of test with the blank column design will be more reliable.

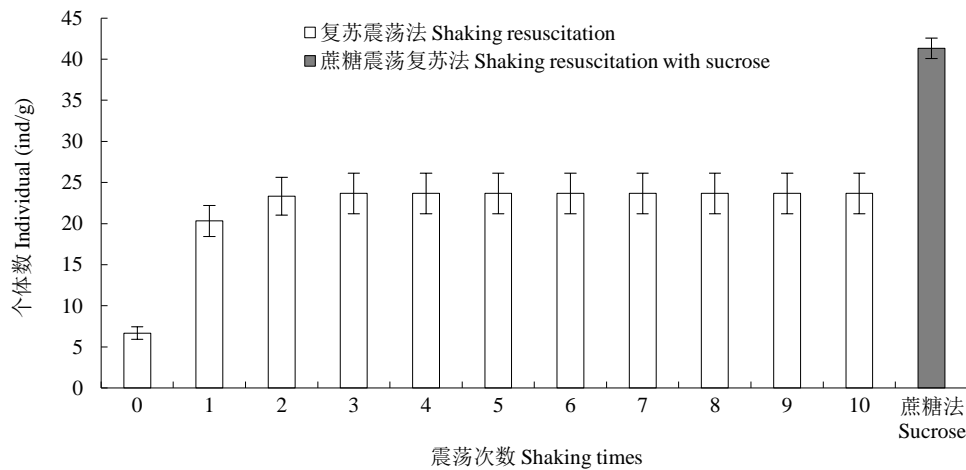


图 1 不同方法分离出的蛭态轮虫数 (ind/g)

Fig. 1 The number of bdelloid rotifers with different extraction methods

最高，为 186.67 ind/g，而在黑暗条件下，观察到的轮虫数次之，为 177.32 ind/g，在弱光条件下，所观测到的轮虫数最低，为 146.67 ind/g。不同光照条件下观测结果差异不显著 ( $F =$

0.205,  $P > 0.05$ )。

培养时间为 6 h 时，分离的蛭态轮虫数最低 (64 ind/g)，培养时间为 24 h 时，得到的轮虫数最高 (186.67 ind/g)。培养时间对分离蛭态

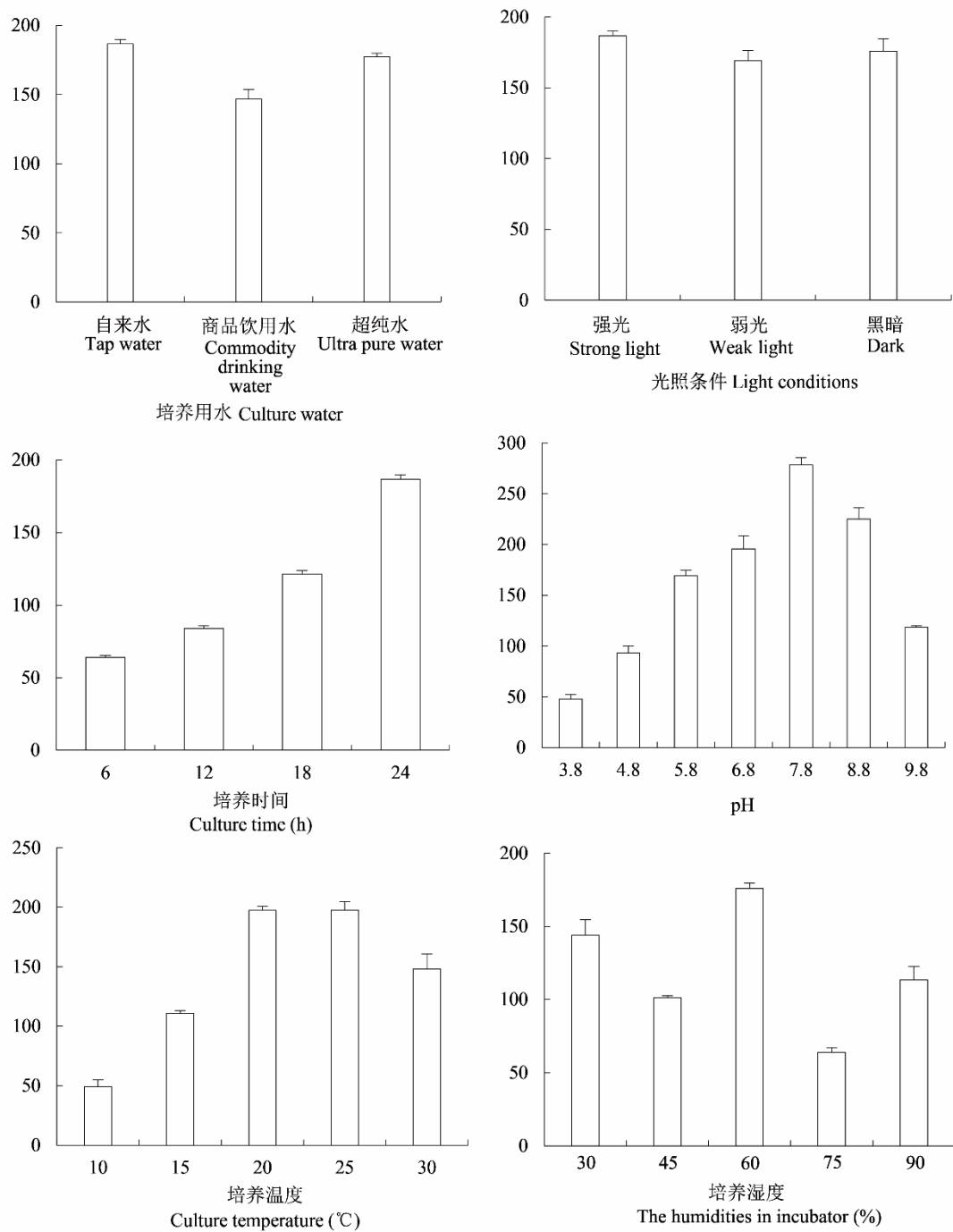


图 2 不同条件下分离出的蛭态轮虫数量 (ind/g)

Fig. 2 The number of Bdelloid Rotifers in different extraction conditions

轮虫数的影响极显著 ( $F = 71.203, P < 0.01$ )。多重比较 (LSD) 表明, 培养时间在 12 h 以内, 各实验组间无显著差异, 培养时间超过 12 h 的

各实验组间均呈显著差异。

在不同 pH 实验组间, 随着 pH 的增大, 分离得到的轮虫数量呈现先增加后再减少的趋

势。当 pH 为 7.8 时, 分离得到的轮虫数量最多 (279.88 ind/g)。pH 对分离蛭态轮虫的影响极显著 ( $F = 12.003$ ,  $P < 0.01$ )。pH 7.8 可以被认为是分离蛭态轮虫的最佳值。

培养温度对蛭态轮虫分离的影响与 pH 类似, 随温度的上升, 分离的轮虫先增加再减少。在 10℃ 时, 分离的轮虫数目最低 (49.33 ind/g), 20℃ 时, 分离得到的轮虫数量最多 (197.33 ind/g), 30℃ 时, 分离的轮虫数量 (148 ind/g) 虽低于峰值, 但远高于低温条件下的结果。培养温度对蛭态轮虫分离的影响是显著的 ( $F = 9.051$ ,  $P < 0.05$ )。

虽然培养湿度对蛭态轮虫分离的影响不像培养温度和 pH 那样有规律, 但不同湿度下, 分离得到的轮虫数量还是存在一定差异, 最高值是在湿度为 60% 时得到的 (176 ind/g), 其他湿度条件下得到的轮虫数量都较低。不同湿度条件下分离的轮虫数量无显著差异 ( $F = 5.071$ ,  $P > 0.05$ )。

## 2.3 因子正交试验

**2.3.1 极差分析** 为了解各因子对指标影响的主次关系, 从而确定最优水平的组合, 对经正交实验获得的数据进行了极差分析 (range analysis)。pH、温度和湿度 3 因子间的极差大小为  $A > C > B$ ; 对轮虫分离结果产生影响的因子组合主次顺序为  $A > C > B$ , 优化水平组合为 A2B1C2, 即 pH 值 7.8、温度 20℃ 和湿度 60% (表 2)。

**2.3.2 方差分析** 虽然极差分析法简单明了、通俗易懂且计算工作量少, 但该方法不能将试验中由于试验条件改变引起的数据波动同试验误差引起的数据波动区分开来。也就是说, 不能区分因子不同水平间对应的试验结果的差异究竟是由于因子水平不同引起的, 还是由于试验误差引起的, 无法估计试验误差的大小。同时不能判断各因子对相应指标影响是否显著, 所以对各数据做进一步方差分析, 结果见表 3 和表 4。

表 2 正交试验的极差分析

Table 2 The results of the range analysis

试验组 Experiment group	pH	温度 (°C) Temperature	湿度 (%) Humidity	空列 Blank	实验结果 Result
	A	B	C	D	
1	6.80	20.00	90.00	1.00	181.33
2	6.80	25.00	60.00	2.00	192.00
3	6.80	30.00	30.00	3.00	106.67
4	7.80	20.00	60.00	3.00	278.67
5	7.80	25.00	30.00	1.00	186.67
6	7.80	30.00	90.00	2.00	218.67
7	8.80	20.00	30.00	2.00	197.33
8	8.80	25.00	90.00	3.00	234.67
9	8.80	30.00	60.00	1.00	222.67
K <sub>1</sub>	480.00	657.33	634.67	590.67	
K <sub>2</sub>	684.00	613.33	693.33	620.00	
K <sub>3</sub>	654.67	548.00	490.67	608.00	
$\bar{K}_1$	160.00	219.11	211.56		
$\bar{K}_2$	228.00	204.44	231.11		
$\bar{K}_3$	218.22	182.67	163.56		
R	68.00	36.44	67.56		

K. 单因子单水平指标之和;  $\bar{K}$ . K 的平均值; R. 极差。

K. Sum of single factor and single level index;  $\bar{K}$ . Mean value of K; R. Range.

表 3 方差分析结果

Table 3 The result of analysis of variance

方差来源 Source	第三类平方和 Type III sum of squares	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	<i>F</i>	显著性检验 的 <i>P</i> 值 <i>P</i> value in significance test
校正模型 Corrected Model	17 377.535 <sup>a</sup>	6	2 896.256	39.936	0.025
截距 Intercept	367 510.771	1	367 510.771	5 067.543	0.000
pH	8 110.058	2	4 055.029	55.914	0.018
温度 Temperature	2 017.11	2	1 008.555	13.907	0.067
湿度 Humidity	7 250.366	2	3 625.183	49.987	0.020
误差 Error	145.045	2	72.522		
合计 Total	385 033.351	9			
校正后合计 Corrected total	17 522.58	8			

a.  $R^2 = 0.992$  (校正后的  $R^2 = 0.967$ ; Corrected  $R^2 = 0.967$ )。

表 4 三种因子对轮虫分离结果平均值的方差分析

Table 4 The variance analysis of three factors on average number of bdelloid rotifers

因子与水平 Factors and levels	均值 Mean (ind/g)	95%置信区间 95% Confidence interval	
		下限 Lower bound	上限 Upper bound
pH			
6.8	160.236	138.845	181.155
7.8	228.003*	206.848	249.158
8.8	218.223	197.068	239.378
温度 Temperature (°C)			
20	219.110*	197.955	240.265
25	204.447	183.292	225.602
30	182.670	161.515	203.825
湿度 Humidity (%)			
90	211.557	190.402	232.712
60	231.113*	209.958	252.268
30	163.557	142.402	184.712

\* 差异显著。\* Significant difference.

比较表 3 中第三类平方和可知, 对蛭态轮虫分离结果产生影响的各因子中, pH > 湿度 > 温度。每个因子的最佳水平为: pH 7.8、湿度 60% 以及温度 20°C。这一结果与极差分析一致。

### 3 讨论

蛭态轮虫常常栖息在特殊的生境类型中, 如苔藓植物丛中。由于其个体较小以及形态学的特殊性, 因此, 从苔藓植物丛中分离蛭态轮

虫是对其进行研究的前提条件之一。至今, 震荡复苏法 (Peters et al. 1993) 和蔗糖震荡复苏法 (Örstan 1998) 是两种被学者广为采用的蛭态轮虫分离方法。

通过分析两种方法分离苔藓样品中蛭态轮虫效果, 可以发现这两种方法有其各自的适用性与不足。

在震荡复苏法中, 由于将苔藓植物样品浸入水中 24 h, 为处于低湿休眠状态的蛭态轮虫提供了充分的复苏时间, 所以对干燥苔藓样品

和新鲜苔藓样品都有良好的分离效果。此外，因其在分离过程中重复操作了 10 次，所以基本上能将已复苏的蛭态轮虫全部分离出来。但该方法的局限性同样十分明显，巨大的工作量几乎是蔗糖震荡复苏法的 10 倍。

由于在干燥的苔藓样品中，蛭态轮虫处于低湿休眠状态。有研究表明，对处于休眠状态的线虫 (Crowe et al. 1975)、细菌 (Kosanke et al. 1992) 以及植物种子 (Crowe et al. 1992)，如果在复苏之前先进行高渗透压处理，可以显著提升其复苏效率。此外，在复苏的过程中，直接将休眠体暴露在水中时，休眠体会快速吸水从而使其体内的盐分不自主丢失，造成损伤，甚至导致其死亡 (Crowe et al. 1992)。因此，一个逐渐减小的渗透压环境可以防止快速吸水的出现，给机体一个调整的空间。蔗糖震荡复苏法分离过程中，通过给苔藓植物样品中的休眠动物提供了高渗的蔗糖环境，使其能够平稳地克服短时间内快速吸水导致的失盐问题。从这个角度讲，蔗糖震荡复苏法应是震荡复苏法的一种改进。通过比较实验，可以明确的是蔗糖震荡复苏法的确提高了对干燥苔藓样品中蛭态轮虫的分离效率，并大大缩减了工作量。

利用蔗糖震荡复苏法分离蛭态轮虫时，需要将样品放入培养箱中培养。在此过程中有多个因子 (温度、湿度、光照、培养时间、pH 以及水质) 可能影响分离的效率。通过实验，可以发现不同水质对蛭态轮虫的分离效率影响不大。该结果与 Ricci (1984) 对不同水质下蛭态轮虫休眠体的复苏研究结果一致，说明了尽管在休眠体复苏过程中水起着重要作用，但是不同水质对轮虫分离效率的影响较小。光照条件对轮虫的分离效率亦无显著影响，此结果与席贻龙等 (2001) 的研究报道相吻合，但 Devetter (2010) 认为光照对土壤轮虫的分离效率很重要，主要是由于光照产生的热量，促使蛭态轮虫向背离光源的水中运动。

通过比较不同培养时间下轮虫的分离效率，可发现随着时间的增加，分离效率不断提高，当培养时间为 24 h 时，分离效率最高。这个结果与前人的文献报道相似 (Örstan 1998)。Womersley (1987) 在对线虫低湿休眠现象的研

究中提出，依据进入休眠状态的快慢，可将线虫划分为快速失水型 (fast-dehydration strategists) 和慢速失水型 (slow-dehydration strategist)。虽然对于其他具有低湿休眠特征的动物 (如缓步动物和蛭态轮虫) 的同类研究仍较缺乏，但有些学者认为蛭态轮虫所有种类均为慢速失水型 (Jacob 1909, Wright et al. 1992)。但是对于蛭态轮虫在吸水复苏阶段的持续时间还没有专门的文献研究，因此对于复苏时间的探究很有必要。在实验中，我们发现，在复苏培养前几个小时内没有或偶见蛭态轮虫，随着培养时间的延续，复苏的轮虫也逐渐增加。这些现象也支持了上述的推测。如不考虑其他因子，则培养时间越长，确保所有的轮虫都能复苏，分离的效果越好。然而，Ricci (1983) 对 9 种蛭态轮虫的培养研究发现，蛭态轮虫存在两种不同的生活史，一种为复苏以后快速繁殖后代，另一种为持续到濒死阶段才开始产卵。由此可知，由于不同种类的蛭态轮虫产生后代的速率不一，所以培养时间越长，则观察到的结果与实际情况相差可能越大。综合考虑这些因子以及实际操作上的必要和可行性，我们认为从干燥的苔藓植物样品中分离蛭态轮虫的培养时间定为 24 h 最合适。

温度和湿度是另外两个影响轮虫分离结果的重要生态因子。在我们的研究中，这两个因子对分离效率均有显著影响。就温度而言，实验中在温度约 20℃ 左右时分离效率最高，该值与 Ricci (1984) 的报道 (22 ~ 24℃) 接近，两者分离效率差别可考虑做进一步的探究。湿度并非单独对蛭态轮虫产生影响，往往是与其他生态因子共同作用于蛭态轮虫 (Örstan 1998)。本研究中也发现湿度对蛭态轮虫的影响会随不同温度而有所差异。

虽然 pH 对蛭态轮虫的影响研究鲜有报道，但有学者曾发现在 pH 7.5 时，轮虫休眠卵的萌发率最高 (席贻龙等 2001)。本研究中，在分离条件 pH 3.8 ~ 9.8 范围内，均有蛭态轮虫被观察到，说明蛭态轮虫对 pH 生存适应范围较广。比较后显示在 pH 为 7.8 的培养条件下，分离得到的蛭态轮虫数量最多。

考虑到各生态因子不可能单独作用于蛭态



轮虫,我们在研究中对分别存在明显差异的 3 个因子进行了 3 水平正交试验,根据作用的大小,在各因子中,对轮虫复苏影响起作用的大小次序为 pH > 湿度 > 温度;各因子不同水平的组合中,pH 为 7.8、湿度为 60%、温度为 20℃ 的组合能够获取到最大的轮虫分离效率。非常巧合的是,在最佳因子组合中各因子的值正是各单因子梯度试验中的最佳值。

## 参 考 文 献

- Burger A. 1948. Studies on the moss dwelling bdelloids (Rotifera) of Eastern Massachusetts. *Transactions of the American Microscopical Society*, 67(2): 111–142.
- Crowe J H, Hoekstra F A, Crowe L M. 1992. Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, 54: 579–599.
- Crowe J H, Madin K A. 1975. Anhydrobiosis in nematodes: evaporative water loss and survival. *Journal of Experimental Zoology*, 193(3): 323–334.
- Davis R C. 1981. Structure and function of two Antarctic terrestrial moss communities. *Ecological Monographs*, 51(2): 125–143.
- Devetter M. 2010. A method for efficient extraction of rotifers (Rotifera) from soils. *Pedobiologia*, 53(1): 115–118.
- Donner J. 1975. Randbiotope von Fließgewässern als Orte der Anpassung von Wasserorganismen an Bodenbedingungen. Gezeigt an Rotatorien der Donau und Nebenflüsse. *Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie Wien*, Berlin: Springer.
- Gerson U. 1982. Bryophytes and invertebrates // Smith A J E. *Bryophyte Ecology*. New York: Chapman & Hall.
- Glime J M. 2013. Invertebrates: Introduction. Chapt. 4-1 // Glime J M. *Bryophyte Ecology*. Vol. 2. *Bryological Interaction*. Michigan Technological University and the International Association of Bryologists.
- Hirschfelder A, Koste W, Zucchi H. 1993. Bdelloid rotifers in aerophytic mosses: Influence of habitat structure and habitat age on species composition. *Hydrobiologia*, 255(1): 343–344.
- Jacobs M H. 1909. The effects of desiccation on the rotifer *Philodina roseola*. *Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen*, 6(2): 207–263.
- Kosanek J W, Osburn R M, Shuppe G I, et al. 1992. Slow rehydration improves the recovery of dried bacterial populations. *Canadian Journal Microbiology*, 38(6): 520–525.
- Merrifield K, Ingham R E. 1998. Nematodes and other aquatic invertebrates in *Eurhynchium oregonum* (Sull.) Jaeg., from Mary's Peak, Oregon Coast Range. *Bryologist*, 101(4): 505–511.
- Mieczan T. 2009. Ciliates in *Sphagnum* peatlands: vertical micro-distribution, and relationships of species assemblages with environmental parameters. *Zoological Studies*, 48(1): 33–48.
- Örstan A. 1998. Factors affecting long-term survival of dry bdelloid rotifers: a preliminary study. *Hydrobiologia*, 387/388: 327–331.
- Peters U, Koste W, Westheide W. 1993. A quantitative method to extract moss-dwelling rotifers. *Hydrobiologia*, 255/256: 339–341.
- Ricci C. 1983. Life histories of some species of Rotifera Bdelloidea. *Hydrobiologia*, 104(1): 175–180.
- Ricci C. 1984. Culturing of some bdelloid rotifers. *Hydrobiologia*, 112(1): 45–51.
- Ricci C, Pagani M, Bolzern A M. 1989. Temporal analysis of clonal structure in a moss bdelloid population. *Hydrobiologia*, 186/187: 145–152.
- Thorpe J H, Covich A P. 2010. *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*. Boston: Academic Press.
- Womersley C Z. 1987. A reevaluation of strategies employed by nematode anhydrobiotes in relation to their natural environment. *Zeitschrift für Kristallographie*, 226(5): 467–475.
- Wright J C, West P, Ramlov H. 1992. Cryptobiosis in Tardigrada. *Biology Review*, 67(1): 1–29.
- 查广才. 1998. 苔藓土壤动物种群动态的初步研究. *信阳师范学院学报: 自然科学版*, 1(1): 61–66.
- 陈灵芝. 1993. 中国的生物多样性: 现状及其保护对策. 北京: 科学出版社.
- 何强, 杜桂森. 2004. 苔藓植物多样性保护现状. *首都师范大学学报: 自然科学版*, 9(3): 52–57.
- 金良超. 1988. 正交设计与多指标分析. 北京: 中国铁道出版社.
- 潘林, 焦德志, 王文峰, 等. 2010. 扎龙湿地苔藓群落土壤动物的分布及多样性. *土壤*, 42(4): 536–540.
- 席贻龙, 黄祥飞. 2001. 不同培养条件下萼花臂尾轮虫休眠卵的萌发. *动物学报*, 47(3): 292–297.
- 徐润林. 2013. *动物学*. 北京: 高等教育出版社.
- 杨潼. 2008. 中国东部武夷山风景区苔藓中的缓步动物. *动物分类学报*, 33(2): 348–353.
- 杨再超, 王智慧, 张朝晖. 2009. 金矿区苔藓结皮表土原生动物种落与环境因子的关系. *生态学杂志*, 28(8): 1525–1530.
- 尹文英. 1992. 中国亚热带土壤动物. 北京: 科学出版社.