

生态林业研究所

**主编：谭波 李娇 曹瑞 吴福忠**

**参加编写人员（按姓氏拼音排序）： 陈亚梅 付长坤 贺若阳 胡筠怡 梁子逸 谭羽 杨帆 杨开军 游成铭 赵海蓉 张钰**

实验方法汇编

**2017 版**

**目 录**

**[第一章 实验室安全准则 1](#_Toc487709270)**

[第一节 实验室管理制度 1](#_Toc487709271)

[第二节 实验室安全管理制度 2](#_Toc487709272)

[第三节 实验室卫生制度 3](#_Toc487709273)

[第四节 仪器使用管理制度 4](#_Toc487709274)

[第五节 药品使用管理制度 5](#_Toc487709275)

[第六节 学生实验守则 6](#_Toc487709276)

**[第二章 实验室主要仪器使用指南 7](#_Toc487709277)**

[第一节 定量分析实验室 7](#_Toc487709278)

[1.1 自动凯氏定氮仪 7](#_Toc487709279)

[1.2 红外智能消化炉 8](#_Toc487709280)

[1.3 电热鼓风干燥箱 9](#_Toc487709281)

[第二节 称量室 11](#_Toc487709282)

[第三节 精密仪器实验室 12](#_Toc487709283)

[3.1 LI-6400便携式光合仪 12](#_Toc487709284)

[3.2 LI-8100A土壤碳通量自动测量系统 18](#_Toc487709285)

[3.3 原子吸收分光光度计 20](#_Toc487709286)

[3.4 微波消解仪 25](#_Toc487709287)

[3.5 双光束紫外可见分光光度计 28](#_Toc487709288)

[3.6 总有机碳分析仪（multi N/C 2100） 31](#_Toc487709289)

[3.7 TOC/TNb 分析仪（Vario 系列） 33](#_Toc487709290)

[3.8 GC-MS气相色谱质谱联用仪 35](#_Toc487709291)

[3.9 荧光原子吸收分光光度计 38](#_Toc487709292)

[3.10 酶标仪 41](#_Toc487709293)

[第四节 土壤生物实验室 43](#_Toc487709294)

[4.1 高速冷冻台式离心机 43](#_Toc487709295)

[4.2 Leica体式显微镜 44](#_Toc487709296)

[第五节 分子生物学实验室 46](#_Toc487709297)

[5.1 普通PCR仪 46](#_Toc487709298)

[5.2 实时定量PCR仪 47](#_Toc487709299)

[5.3 凝胶成像系统 48](#_Toc487709300)

[5.4 光密度扫描仪 49](#_Toc487709301)

**[第三章 土壤样品相关指标测定 51](#_Toc487709302)**

[第一节 土壤样品采集与处理 51](#_Toc487709303)

[1.1 土样采集 51](#_Toc487709304)

[1.2 土样制备与保存 51](#_Toc487709305)

[第二节 土壤物理性质分析 54](#_Toc487709306)

[2.1 土壤温度测定 54](#_Toc487709307)

[2.2 土壤水分测定 54](#_Toc487709308)

[2.3 土壤容重测定 55](#_Toc487709309)

[2.4 土壤比重测定 56](#_Toc487709310)

[2.5 土壤孔隙度测定 57](#_Toc487709311)

[2.6 土壤酸碱度测定 57](#_Toc487709312)

[第三节 土壤碳的测定 59](#_Toc487709313)

[3.1 土壤有机碳测定 59](#_Toc487709314)

[3.2 溶解性有机碳测定 60](#_Toc487709315)

[3.3 易氧化有机碳测定 60](#_Toc487709316)

[3.4 活性有机碳测定 61](#_Toc487709317)

[3.5 惰性有机碳测定 62](#_Toc487709318)

[3.6 轻组有机碳、重组有机碳测定 62](#_Toc487709319)

[3.7 土壤有机碳粒径测定 63](#_Toc487709320)

[3.8 土壤颗粒有机碳测定 64](#_Toc487709321)

[第四节 土壤氮的测定 65](#_Toc487709322)

[4.1 土壤全氮测定 65](#_Toc487709323)

[4.2 土壤可溶性氮测定 66](#_Toc487709324)

[4.3 土壤铵态氮测定 69](#_Toc487709325)

[4.4 土壤硝态氮测定 70](#_Toc487709326)

[4.5 土壤亚硝态氮测定 71](#_Toc487709327)

[4.6 土壤矿化氮测定 72](#_Toc487709328)

[第五节 土壤磷的测定 77](#_Toc487709329)

[5.1 土壤全磷测定 77](#_Toc487709330)

[5.2 土壤速效磷测定 78](#_Toc487709331)

[5.3 土壤有机磷测定 81](#_Toc487709332)

[5.4 土壤无机磷测定 83](#_Toc487709333)

[第六节 土壤钾的测定 85](#_Toc487709334)

[6.1 土壤全钾测定 85](#_Toc487709335)

[6.2 土壤速效钾测定 86](#_Toc487709336)

[第七节 土壤金属元素测定 88](#_Toc487709337)

[7.1 金属元素总量的消解—微波消解法 88](#_Toc487709338)

[7.2 金属元素总量的消解—全分解方法 89](#_Toc487709339)

[7.3 金属元素总量的测定 90](#_Toc487709340)

[第八节 土壤微生物测定 93](#_Toc487709341)

[8.1 土壤微生物生物量测定 93](#_Toc487709342)

[8.2 土壤微生物群落结构测定（PLFA） 98](#_Toc487709343)

[8.3 功能微生物的分离与记数 100](#_Toc487709344)

[第九节 土壤动物测定 105](#_Toc487709345)

[第十节 土壤酶活性测定 108](#_Toc487709346)

[10.1 土壤蔗糖酶测定 108](#_Toc487709347)

[10.2 土壤脲酶测定 109](#_Toc487709348)

[10.3 土壤过氧化氢酶测定 110](#_Toc487709349)

[10.4 土壤磷酸酶测定 111](#_Toc487709350)

[10.5 土壤纤维素酶测定 112](#_Toc487709351)

[第十一节 土壤呼吸测定 115](#_Toc487709352)

**[第四章 凋落物相关指标测定 117](#_Toc487709353)**

[第一节 凋落物样品采集与处理 117](#_Toc487709354)

[1.1 新鲜凋落物采集与处理 117](#_Toc487709355)

[1.2 分解袋中凋落物的采集与处理 117](#_Toc487709356)

[第二节 凋落物物理性质分析 118](#_Toc487709357)

[2.1 凋落物分解温度检测 118](#_Toc487709358)

[2.2 凋落物含水量测定 118](#_Toc487709359)

[2.3 凋落物酸碱度测定 118](#_Toc487709360)

[2.4 凋落物质量损失 119](#_Toc487709361)

[第三节 凋落物碳、氮、磷测定 120](#_Toc487709362)

[3.1 凋落物有机碳测定 120](#_Toc487709363)

[3.2 凋落物水溶性有机碳、氮、磷测定 121](#_Toc487709364)

[3.3 凋落物全氮测定 122](#_Toc487709365)

[3.4 凋落物全磷测定 123](#_Toc487709366)

[第四节 凋落物腐殖化测定 126](#_Toc487709367)

[4.1 凋落物腐殖物质光学特性测定 126](#_Toc487709368)

[4.2 凋落物质组成成分测定 127](#_Toc487709369)

[第五节 凋落物组分测定 129](#_Toc487709370)

[5.1 总水溶性组分 129](#_Toc487709371)

[5.2 总有机溶性组分 129](#_Toc487709372)

[5.3 总酸溶性和酸不溶性组分 130](#_Toc487709373)

[第六节 凋落物金属元素测定 132](#_Toc487709374)

[第七节 凋落物微生物测定 136](#_Toc487709375)

[7.1 凋落物微生物生物量测定 136](#_Toc487709376)

[7.2 凋落物微生物群落结构测定（PLFA） 141](#_Toc487709377)

[第八节 凋落物酶活性测定 143](#_Toc487709378)

**[第五章 水样相关指标测定 147](#_Toc487709379)**

[第一节 水样采集与处理 147](#_Toc487709380)

[第二节 水样理化性质分析 149](#_Toc487709381)

[2.1 水温 149](#_Toc487709382)

[2.2 电导率 149](#_Toc487709383)

[2.3 流速 149](#_Toc487709384)

[2.4 pH值 149](#_Toc487709385)

[2.5 DO 149](#_Toc487709386)

[第三节 水样碳、氮、磷的测定 150](#_Toc487709387)

[3.1 水样总有机碳测定 150](#_Toc487709388)

[3.2 水样全氮测定 154](#_Toc487709389)

[3.3 水样全磷测定 160](#_Toc487709390)

[第四节 水样金属元素测定 164](#_Toc487709391)

[4.1 可溶性元素的测定 164](#_Toc487709392)

[4.2 金属元素总量的测定 165](#_Toc487709393)

[第五节 水样微生物测定 169](#_Toc487709394)

[5.1 水体初级生产力测定 169](#_Toc487709395)

[5.2 水样采集与挂瓶 169](#_Toc487709396)

[5.3 水体浮游植物测定 171](#_Toc487709397)

**[第六章 植物样品相关指标测定 176](#_Toc487709398)**

[第一节 植物样品采集与处理 176](#_Toc487709399)

1.1 [植物样品的采集 176](#_Toc487709400)

1.2 [植物样品的制备与保存 176](#_Toc487709401)

[第二节 植物水分的测定 178](#_Toc487709402)

[2.1 风干植物样品水分的测定 178](#_Toc487709403)

[2.2 新鲜植物样品水分的测定 178](#_Toc487709404)

[第三节 植物灰分中的常量元素分析 180](#_Toc487709405)

[第四节 植物激素提取 182](#_Toc487709406)

[第五节 植物生理生化指标测定 185](#_Toc487709407)

[第六节 木质素、纤维素测定 191](#_Toc487709408)

[第七节 叶绿素测定 192](#_Toc487709409)

[第八节 总酚测定 194](#_Toc487709410)

#  实验室安全准则

## 第一节 实验室管理制度

* 实验室是科学研究和人才培养的重要基地，实验人员应认真执行实验室安全管理、仪器管理、药品管理制度等相关要求，不得在实验室内进行与实验工作无关的活动；
* 进入实验室必须穿工作服，进入无菌室换无菌衣、帽、鞋、戴好口罩，非研究所人员不得进入实验室，严格执行安全操作规程。工作服应经常清洗，保持整洁，必要时高温消毒；
* 实验人员应在其分配的实验台面上活动，不得占用他人台面，特殊情况下应提前与所涉及的人员商量，严禁在实验台面上随意涂画；
* 实验室的设施布局不得随意变动，仪器设备未经管理员同意不得擅自使用，严格遵守公用仪器操作规程和使用预约登记制度，登记时要记录仪器设备使用情况，设备租借按相关程序向实验室管理员提出申请；
* 严格实验室门禁卡、钥匙的管理，门禁卡、钥匙的借出由实验室管理员统一管理，任何人不得私自借给他们使用或擅自配置钥匙，特殊情况下应提前向管理员提出申请；
* 实验室内要保持清洁卫生，不得乱扔纸屑等杂物。进入实验室工作的实验人员对实验室卫生负责，实验结束后，应及时进行清扫整理，桌柜等表面应用消毒液擦拭，保持无尘，杜绝污染；
* 实验室应井然有序，物品摆放整齐、合理，不能随意移动。不得存放实验室外个人用品、仪器等，严禁在冰箱、温箱、烘箱内存放私人物品；
* 化学试剂应定期检查并有明晰标签，仪器定期检查、保养、检修；
* 实验结束后，实验人员及时清理实验用具，对有毒、有害、易燃的物品和废弃物应按有关要求执行。关好门窗、水电，在管理员处归还钥匙并签字确认。

## 第二节 实验室安全管理制度

实验室是进行实践教学和科研工作的重要基地，为做好实验室安全工作，确保实验工作的顺利开展，制定本管理制度。

* 安全工作，人人有责。实验人员必须牢固树立“安全第一”的思想，严格遵守实验室管理制度和实验室操作流程，防止任何安全事故的发生；
* 实验室内严禁烟火，存放的一切易燃、易爆物品都要单独隔离，与火源、电源保持一定距离，严禁闲杂人员入内；
* 充分熟悉安全用具，如灭火器、急救箱的存放位置和使用方法，并妥加爱护，安全用具及急救药品不准移作它用；
* 盛药品的容器上应贴上标签，注明名称、溶液浓度；
* 危险药品要专人、专类、专柜保管，实行双人双锁管理制度。各种危险药品要根据其性能、特点分门别类贮存，并定期进行检查，以防意外事故发生；
* 不得私自将药品带出实验室，实验室内严禁存放个人物品；
* 有危险的实验在操作时应使用防护眼镜、面罩、手套等防护设备；
* 能产生有刺激性或有毒气体的实验必须在通风橱内进行；
* 浓酸、浓碱具有强烈的腐蚀性，用时要特别小心切勿使其溅在衣服或皮肤上，废酸应倒入酸缸，但不要往酸缸里倾倒碱液，以免酸碱中和放出大量的热而发生危险；
* 实验中所用药品不得随意散失、遗弃，对反应中产生有害气体的实验应按规定处理，以免污染环境，影响健康；
* 实验完毕后，实验人员应关闭所使用的仪器设备，切断电源、气源和水源，对实验室作一次系统的检查，随时关好门窗，防火、防盗、防破坏。

## 第三节 实验室卫生制度

* 实验室是进行人才培养、科学研究的重要场所，必须加强管理，为实验人员创造一个良好的实验环境；
* 凡进入实验室参加实验的人员，必须穿工作服，并保证整洁、干净。非研究所人员未经许可不得进入实验室；
* 进入实验室工作的实验人员对实验室卫生负责，要注意保持室内卫生及良好的实验秩序。每次做完实验后，应将所有仪器设备复位，清理好现场；
* 实验室内各种设备器材摆放要合理、整齐，实验室内严禁放置私人物品；
* 实验室要做到定期清扫、经常通风，保持良好的实验环境；
* 实验中如使用或产生有异味或影响实验室安全的物品，必须在通风橱内进行，并做好尾气收集及排放措施；
* 实验室产生的废液不要随意倒入水槽中，特别是有毒、有害液体，必须装入废液缸中并贴好标签，不要随意放置；
* 通风橱若非实验需要，应将个人实验用品收拾到个人储物柜中，保持通风橱内整洁；
* 公共区域实验台面应保持整洁，使用完的仪器配件、药品等应放入对应储物柜中，堆放在实验台面上的物品若无明晰标签，一律按垃圾处理；
* 实验室中有害气体、粉尘含量必须符合国家标准规定，对污染环境的有害物质要定期进行分析和监测，确保实验人员的健康和安全。

## 第四节 仪器使用管理制度

为确保实验室高效运转和管理，保证科研工作的顺利开展，特制定仪器使用管理制度。

* 实验室仪器使用应坚持“先预约、后使用”的原则，未经实验室管理员的同意，其他人员不准使用、移动、调换及借出仪器；
* 使用仪器前应先检查仪器是否正常。仪器设备运行期间，不得擅自离岗，发现异常及故障及时关机，作好有关记录并立即报告实验室管理员，不得隐瞒不报，擅自修理。仪器故障排除后方可使用，杜绝仪器带病运转；
* 仪器的使用应严格按照仪器说明书中的要求进行，使用人员必须掌握仪器的工作原理、性能、操作程序方可使用。所有仪器使用者均应爱护仪器设备，轻拿轻放，切忌野蛮操作。如违反操作规程导致仪器设备损坏，要追究当事人责任，并按有关规定给予必要的处罚；
* 实验室仪器原则上不外借，凡需借用仪器者，一律填写外来人员实验室使用登记表，经管理员同意及指导老师签字后方可借出，并按研究所实验室仪器使用收费标准收取相关费用。出借仪器归还时，如发现损坏、遗失，要按价赔偿；
* 仪器使用结束后，应将各部件恢复到所要求的位置，及时做好清理工作，到管理员处签字确认；
* 仪器室应有安全设施，并定期检查，切实做好防火、防盗等安全工作。如有遗失或其它事故，应及时查清原因并报告相关负责人。

## 第五节 药品使用管理制度

实验室所需的化学药品、试剂溶液不仅品种繁多，而且大多数具有一定的危险性，对其加强管理是保证分析数据质量的关键，更是确保安全的需要。

* 要遵循既有利于科研，又要保障安全的原则，加强危险药品管理和使用的安全教育；
* 化学药品存放应保证阴凉、通风、干燥、避光，有防火、防盗设施，周围禁止吸烟和使用明火；
* 根据药品的不同种类、性质分类存放，并采用科学的保管办法。如受光易变质的药品应装在避光容器内；易挥发、潮解的药品要密封；长期不用的药品应蜡封；装碱的玻璃瓶不能用玻璃塞等；
* 化学药品应在容器外贴上标签，并涂蜡保护，短时间装药品的容器可不涂蜡。对分装的药品在容器标签上应注明名称、规格及浓度，无标签的药品不能擅自乱扔、乱倒；
* 对危险药品要严加管理：危险药品必须存入专柜，加锁防范；互相发生化学反应的药品应隔开存放；危险药品都要严加密封，并定期检查密封情况，高温、潮湿季节尤应注意；要加强对火源的管理，危险药品专柜周围和内部严禁火源；变质、失效的化学药品要及时销毁，销毁时要注意安全，不得污染环境；
* 药品不得与配置的溶液放在一起，固体药品应与液体药品分开保存，使用完后试剂药品应及时收拾清理，保证实验台面整洁干净；
* 定期对药品进行检查，确保药品的用量并在保质期内使用，严禁使用过期、失效的药品。

## 第六节 学生实验守则

* 实验人员进入实验室工作，应严格遵守实验室的管理条例，必须服从实验室管理员的安排，不得大声喧哗，要保持实验室的安静和室内卫生；
* 爱护仪器设备。实验人员必须掌握仪器设备工作原理、性能、操作规程方可使用，未经同意不得擅自动用实验室仪器设备，凡违反操作规程或擅自动用仪器设备造成损失者，按照相关规定给予一定处罚。仪器发生故障时，应立即停止使用，并报告实验室管理员予以排除故障，严禁擅自拆卸、搬弄仪器；
* 爱惜药品和实验材料。实验中要注意节约使用实验材料，未经实验室管理员同意，不得将实验用品带出实验室；
* 实验中应注意安全，使用仪器设备和易燃、易爆、有毒药品，必须严格遵守操作规程，防止意外事故发生。在实验过程中出现事故，应立即切断电源、水源，停止实验并向实验室管理员报告；
* 用过的废渣、废纸、火柴梗等杂物不得随意丢弃，须置于指定地方。特别是有毒有害物品，必须在实验室管理员指导下进行处理，不准乱扔、乱放；
* 实验结束后，要及时清理实验台面，保证实验台面整洁干净。将使用的仪器和工具器皿清洗后立即放回原处，规定在原地使用的仪器，不得任意移动；
* 离开实验室时，应关好门窗、水电，以确保实验室的安全。经实验室管理员审查仪器设备还原情况并同意后，签字确认。

#  实验室主要仪器使用指南

## 第一节 定量分析实验室

生态林业研究所公用实验室，为森林培育、生态学、林学等学科领域开展测试分析。目前实验室拥有定氮仪、纯水机、烘箱、真空干燥箱、通风橱等仪器，可为实验样品前处理及实验具体操作提供设备支持和测试方法。

### 1.1 自动凯氏定氮仪

**(1) 主要用途**

目前普遍采用凯氏定氮法来对土壤、食品、农产品以及一些物质进行氮—蛋白质含量的测定。用此方法测定试样时，需经过消解、蒸馏、滴定三个过程，本仪器完成蒸馏工作。

**(2) 操作流程**

1. 检查仪器工作台是否稳定；
2. 检查仪器碱桶、蒸馏水桶的管路，按颜色标示是否接正确，各个桶盖另一根无颜色标示的接空气借口。有无漏气漏水现象，集液瓶放稳定；
3. 冷却水进出口是否接好，冷却水是否打开，仪器后面残余液管子是否夹子夹紧；
4. 插上电源线，设置好碱液量（一秒5-7 ml，一般设置8秒）和蒸馏时间（1分钟大约25 ml，一般设置4-6分钟），设置好每一个参数后，要按“确定”键进行保存（碱液、酸液时间均根据样品要求进行设置）；
5. 按“启动”按钮开始进行测试（仪器记忆最后一次的操作程序，若下次操作同一个样品时，只需要按“启动”按钮测试即可）。

**补充：**

1. **设置“碱”时间：**按“设置”键，直到光标自动停留在加碱上，此时加碱指示灯亮，时间以秒为单位，按“+”、“-”调节需要设置的时间，设置好后按“确认”键保存；
2. **设置“蒸馏”时间：**按“设置”键，直到光标自动停留在蒸馏上，此时蒸馏指示灯亮，时间以分为单位，按“+”、“-”调节需要设置的时间，设置好后按“确认”键保存。

**(3) 注意事项**

1. 开机需预热三分钟，第一个样品测试用蒸馏水代替样品，使仪器预热，并带走残余物质；
2. 仪器测试使用的必须是蒸馏水，冷却用自来水，仪器使用前必须把残留液的管子插上，并夹紧夹子，冷却水打开；
3. 工作结束后，将碱桶取下换上装上蒸馏水的清洗桶（只需将碱桶上戴的盖嘴拧下插到清洗桶中即可），设置加碱时间20秒，蒸馏时间为0，按“启动”键，洗后倒掉消化管的水，重复三次（每天要做）；
4. 每天工作完时，将蒸馏瓶内的残水排掉，每星期清洗碱桶、蒸馏水桶和清洗桶；
5. 如需要拔冷却水进管和冷却水出管时，先拔下与水龙头相连接的进水管，再拔下仪器上的出水管，不要搞错次序。

### 1.2 红外智能消化炉

**(1) 主要用途**

红外智能消化炉可用于农业、林业、环保、地质等部门以及高等院校、科研部门对植株、种子、土壤等消化。

**(2) 操作流程**

**执行分段式程序升温**（例如：分三段设定温度到420度）：

1. 打开电源开关（红色开关）；
2. 按“SET”键+“A/M”键3秒，跳出第二设置区程序参数修改界面，连续按“SET”键数次出现：检查“RUN”设置为“3”，pro=“1”，再设置r1=200，T1=5分钟，c1=200度，r2=180，T2=5，c2=350度，r3=200，T3=90，c3=420度，r4=0，T4=0，。。。r32=0，T32=0，c32=0，设置好后等几秒钟，程序会自动保存；
3. 打开启动开关（绿色开关），程序自动运行，自动结束。如果出现不运行，再检查“RUN”设置为“3”，pro=“1”（程序自动保存最后一次的设定操作）。

**(3) 注意事项**

1. 温控表里的参数不得随意更改；
2. 先把准备消化的样品放在消化架上，再端到消化炉上；
3. 消化炉的消化孔不能空着，如没有足够样品可直接将空消化管放到消化炉上，以免热量散发影响样品消化，严重时会导致机器内部配件受损；
4. 消化架密封挂板在415度或420度以后挂上；
5. 仪器使用过程中避免将酸液流入到加热区导致仪器短路，每次使用完擦洗仪器。

### 1.3 电热鼓风干燥箱

**(1) 主要用途**

电热鼓风干燥箱由箱体、控温系统、电加热鼓风系统组成，供工矿企业、化验室、科研单位等作干燥、烘焙熔蜡、灭菌用。

**(2) 操作流程**

1. 打开箱门，将待处理样品放入箱内搁板上，关上箱门，关闭放气阀，打开真空阀，接通真空泵抽气，使箱内达到所需的真空度，关闭真空阀门和真空泵电源；
2. 接通电源，将电源插头插入电源插座，将面板上的电源开关置于“开”的位置，此时仪表出现数字显示，表示设备进入工作状态。通过操作温度控制器，设定所需要的箱内温度；
3. 仪器开始工作，箱内温度逐渐达到设定值，经过所需的干燥处理时间后，处理工作完成；
4. 关闭电源，待箱内温度接近环境温度后，打开充气阀，解除箱内真空、打开箱门，取出样品。

**(3) 注意事项**

1. 使用时应当观察真空泵的油位，以免由于缺油而损坏电机；
2. 水及腐蚀性太强的物品不宜放入其内；
3. 开门取样品时注意箱内温度，以免烫伤。

**表1 定量分析实验室其它仪器概述**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **仪器名称** | **主要用途** | **注意事项** |
| 恒温水浴锅 | 恒温加热样品 | 加水之前切勿接通电源，使用过程中，水位必须高于不锈钢隔板。 |
| 烘箱 | 土壤、植物等样品烘干 | 烘箱周围不能放置易燃易爆的物品，样品排列不能太密，禁止烘焙易燃、易爆、易挥发及有腐蚀性的物品。 |
| 控温式远红外消煮炉 | 土壤、植物样品的消煮 | 硫酸回流高度应控制在管高的三分之二以下，使用完毕后，请拔下电源插头。 |
| 优普超纯水仪 | 用于超纯水制备 | 不要在水箱没水时取水，进入设置后，机器停止制水，退出设置即自动恢复制水，晚上最后离开实验室的实验人员，必须确认纯水仪处于非取水状态。 |
| 振荡器 | 液态、固态化合物的振荡培养 | 工作时，应放置在平整坚固的台面上，以防振动，每次使用完毕，如果有水滴在仪器上，请擦拭干净。 |

## 第二节 称量室

**(1) 主要用途**

称量室是一个环境相对无振动、无气流的专用工作室，主要用于土壤、植物、药品等的称重，室内温度恒定，相对湿度（% RH）为45%~60%。

**(2) 天平操作流程**

1. 调水平：天平开机前，应观察天平后部水平仪内的水泡是否位于圆环的中央，否则通过天平的地脚螺栓调节，左旋升高，右旋下降；
2. 预热：天平在初次接通电源或长时间断电后开机时，至少需要30分钟的预热时间。因此，实验室电子天平在通常情况下，不要经常切断电源；
3. 称量：
4. 按下ON/OFF键, 接通显示器；
5. 等待仪器自检。当显示器显示零时，自检过程结束，天平可进行称量；
6. 放置称量纸，按显示屏两侧的Tare键去皮，待显示器显示零时，在称量纸上加所要称量的试剂、药品等；
7. 称量完毕，按ON/OFF键, 关闭显示器。

**(3) 注意事项**

1. 天平在安装时已经过严格校准，故不可轻易移动天平，否则校准工作需重新进行；
2. 严禁不使用称量纸直接称量！挥发性、腐蚀性、吸潮性的物品必须放在加盖的容器中称重；
3. 每次称量后，请清洁天平，避免对天平造成污染而影响称量精度，影响他人的工作。

## 第三节 精密仪器实验室

生态林业研究所公用实验室，主要管理大型精密仪器和通用度较高的仪器设备，为森林培育、生态学、林学等学科研究提供仪器设备和实验方法。目前实验室拥有总有机碳分析仪、MARSX微波快速溶剂萃取系统、GC-MS、原子吸收分光光度计、双道原子荧光光度计、双光束紫外可见分光光度计、LI-6400便携式光合仪以及LI-8100A土壤碳通量自动测量系统，可以进行测定TC、TOC、NPOC、TIC、POC 及TNb各项参数、分析化学的样品消解、萃取、蛋白水解等。

### 3.1 LI-6400便携式光合仪

**(1) 主要用途**

LI-6400便携式光合仪主要应用于测定植物叶片光合作用，在实验过程中可以控制叶片周围的CO2浓度、H2O浓度、温度、相对湿度、光照强度和叶室温度等所有相关的环境条件。配置6400-40荧光叶室，可以同时测量植物叶片的气体交换、荧光参数和呼吸参数等指标。

**(2) 操作流程**

1. **日常检查**

**仪器预热期间的检查：**

1. 检查温度：仪器主界面h行温度值Tblock、Tair、Tleaf三者数值相差在1℃以内，要求叶温热电偶的位置高于黑色垫圈约1 mm；
2. 检查光源：用手罩住光源，检查g行ParIn-um和ParOut-um 是否读数为0；
3. 检查叶室混合扇：在测量菜单中，按“2”，第“f1”项，按“0”关闭叶室混合扇，听分析器头部声音有无变化；
4. 检查气路堵塞：在测量菜单中，按“2”，第“f2”项，设定流速为1000，将化学管拧到完全bypass位置，检查b行flow能否达到650以上，能达到说明气路没有堵塞。

**仪器预热后的检查：**

1. 检查CO2和H2O IRGAS 零点：将两个化学管拧到完全scrub位置，同时完全闭合叶室，保证叶室内无叶片，等待5分钟，参比室和样品室CO2和H2O的数值会降到0附近，如果CO2读数在±5 ppm以内，H2O读数在±0.5 mmol/mol以内，表示仪器零点正常，如果不在数值范围内，可再等10分钟进行观察；
2. 检查叶室漏气：将两个化学管调到完全scrub位置，在叶室周围吹气，a行样品室CO2读数变化大于2 ppm，说明叶室漏气；
3. 匹配的重要性：每天开始测量之前，仪器进行一次匹配，在相同的CO2浓度下做实验，每20-30分钟匹配一次，每次测量都会改变CO2浓度，每改变一次CO2浓度，进行一次匹配。

具体操作：按“Match”键，当CO2R和CO2S数值接近时，自动出现“MATCHZRGAS”，点击之后按“exit”。匹配最好等夹上叶片一段时间后进行，如果出现“CO2 has changed”，表示匹配不好。

1. **非控制环境条件的测量**
2. 装好化学药品，连接硬件，最好使用CF卡，将测量数据存入卡中，从主机里直接导数据耗时长，CF卡插入主机后面的小槽内；
3. 将两个化学管拧到完全Bypass位置，打开仪器电源，配置界面选择“Factory default”，连接状态按“Y”键，进入主菜单，仪器预热约20分钟；
4. 预热期间进行日常检查；
5. 关闭光源“lamp”，打开叶室，夹好待测的植物叶片，叶片尽量充满整个叶室。按“1”，点击“F1（Open LogFile）”，选择将数据存入的位置（主机或CF卡），建立一个文件夹，点击“enter”，输入一个“remark”，点击“enter”；
6. 等待a行参数稳定，b行参数△CO2数值波动＜0.2 μmol/mol，Photo数值稳定在小数点之后一位，c行参数在正常范围内（0＜Cond＜1；Ci＞0；Tr＞0），按“F1（log）”键记录数据，也可观察e行“stable”数值为1时进行记录；
7. 更换叶片，按“F4”，添加“remark”，进行另一个叶片的测量，至少半小时进行一次匹配“Match”。测量结束后，按“F3（Close file）”，保存数据文件，必须关闭文件，防止数据丢失；
8. 导出数据：数据存入CF卡，取出CF卡，直接用读卡器导出数据；数据存入仪器主机，用RS-232数据线连接电脑和LI-6400XT，按“esc”键退回仪器主界面，按“F5（Utility Menu）”，通过上下箭头选择“File Exchange Mode”，在电脑上预先安装SimFX软件，双击打开“LI6400 FileEX”，点击“File”，选择“Prefs”，选择“Com”端口，按“Connect”键，连接成功后，选择文件传输到指定位置；
9. 导出数据之后，按“esc”键，退回到仪器主界面，关机。关机之后两个化学管拧到中间松弛状态，旋转叶室固定螺丝，使叶室处于打开状态。
10. **控制环境条件的测量**
11. 装好化学药品，硬件连接，使用CF卡时，将CF卡插入主机后面的小槽内，安装LED光源和CO2注入系统；
12. 打开仪器电源，配置界面选择LED光源，按“Y”键，进入主菜单, 仪器预热约20分钟；
13. 按“F4”键进入测量菜单，进行日常检查；
14. 将CO2化学管拧到完全Scrub位置，将Dessicant化学管拧到完全Bypass位置，按“2”，再按“F3（Mixer）”，点击“reference CO2”，按“edit”设为400，点击“keep”进行确定。打开光源“Lamp”，输入需要的光强“PAR”为1000，点击“enter”；
15. 控制叶片温度，按“2”，再按“F4”，选择“Block”温度，点击“enter”，输入测定温度为环境温度26℃，点击“enter”，回到测量菜单，按“3”，再按“F1（area）”输入实际测量的叶片面积，仪器默认为6 cm2；
16. 打开叶室，夹好待测植物叶片，按“1”，再按“F1（Open LogFile）”，选择将数据存入的位置（主机或CF卡），建立一个文件夹，点击“enter”，输入一个“remark”，点击“enter”；
17. 等待a行参数稳定，b行参数△CO2数值波动＜0.2 μmol/mol，Photo数值稳定在小数点之后一位，c行参数在正常范围内（0＜Cond＜1；Ci＞0；Tr＞0），按“F1（log）”键记录数据，也可观察e行“stable”数值为1时进行记录；
18. 更换叶片，按“F4”，添加“remark”，进行另一个叶片的测量，至少半小时进行一次匹配“Match”。测量结束后，按“F3（Close file）”，保存数据文件，必须关闭文件，防止数据丢失；
19. 导出数据之后，按“esc”键，退回到仪器主界面，关机。关机之后两个化学管拧到中间松弛状态，旋转叶室固定螺丝，使叶室处于打开状态。
20. **光响应曲线的测量**
21. 装好化学药品，硬件连接，使用CF卡时，将CF卡插入主机后面的小槽内，安装LED光源；
22. 打开仪器电源，配置界面选择LED光源，按“Y”进入主菜单，仪器预热约20分钟；
23. 按“F4”进入测量菜单，进行日常检查；
24. 将两个化学管拧到完全Bypass位置，在测量菜单下，按“2”，再按“F3（CO2 Mixer）”，通过上下箭头选择“S) Sample CO2 ×××μmol/mol”，按“enter”，设定CO2浓度为环境CO2浓度（约400 μmol/mol），按“keep”确定，打开光源“Lamp”；
25. 控制叶片温度，按“2”，再按“F4”，选择“Block”温度，点击“enter”，输入测定温度为环境温度±6℃，点击“enter”，回到测量菜单，按“3”，再按“F1（area）”输入实际测量的叶片面积，仪器默认为6 cm2；
26. 打开叶室，夹好待测植物叶片，在测量菜单下按“1”，再按“F1（Open LogFile）”，选择将数据存入的位置（主机或CF卡），最好建立一个独立文件夹，即同一植物叶片在不同光强下的光合速率，点击“enter”，输入一个“remark”，点击“enter”；
27. 按“5”，再按“F1（Auto prog）”，进入自动测量界面，通过上下箭头键选择“Lightcurve2”，点击“enter”，数据添加到之前建立好的文件夹，点击“Summary”，按“setpts”，点击“enter”，出现“Desired Lamp Settings”，自高到低设定光强梯度（1500 1200 1000 800 600 400 200 150 100 50 20 0），数值间一定空格，点击“enter”，“Minimum Wait time（secs）”设为120，点击“enter”，“Maximum Wait time（secs）”设为200，点击“enter”，“Match if △CO2 less than （ppm）设为100，点击“enter”，按“Y”进入自动测量，点击“A-abort program”中途停止测量；

**设定光强梯度时一定要清零，按“home”键，回车，梯度点一般为10-13个，在200以下多设梯度点，阳生植物在20—150之间至少设5个梯度点。**

1. 按“1”，再按“F3（close file）”保存文件，更换叶片再次进行测量；
2. 导出数据之后，按“esc”键，退回到仪器主界面，关机。关机之后两个化学管拧到中间松弛状态，旋转叶室固定螺丝，使叶室处于打开状态。
3. **CO2响应曲线的测量**
4. 装好化学药品，硬件连接，使用CF卡时，将CF卡插入主机后面的小槽内，安装LED光源；
5. 打开仪器电源，配置界面选择LED光源，按“Y”进入主菜单，仪器预热约20分钟；
6. 按“F4”进入测量菜单，进行日常检查；
7. 安装CO2钢瓶，更换O形圈，小苏打化学管拧到完全Scrub，干燥剂化学管拧到完全Bypass；
8. CO2混合器校准：按“2”，再按“F3”，通过上下箭头键选择“S） Sample CO2 ×××μmol/mol”，按“enter”，设定CO2浓度为环境CO2浓度（约400 μmol/mol），按“enter”，将CO2注入系统预热1分钟左右，按“escape”退回到测量菜单，按“F3（calib menu）”，选择“CO2 Mixer calibrate”，点击“enter”，按“Yes”，如果CO2浓度高于2000 μmol/mol，且达到稳定后仪器自动提示，点击“Y”，仪器开始自动进行8点校准，完成后提示“implement this calibrate?”按“Y”，然后按“esc”退出；
9. 按“2”，再按“F5（PAR）”，通过上下箭头键选择“Q) Quantum Flux ×××mol/m2/s”，点击“enter”，设定为饱和光强1000（根据光响应曲线确定），按“keep”；
10. 打开叶室，夹好待测植物叶片，按“1”，再按“F1（Open LogFile）”，选择将数据存入的位置（主机或CF卡），建立一个文件夹，点击“enter”，输入一个“remark”，点击“enter”；
11. 按“5”，再按“F1（Auto prog）”，进入自动测量界面，通过上下箭头键选择“A-Ci Curve2”，点击“enter”，数据添加到之前建立好的文件夹，点击“Summary CO2”，点击“enter”，出现“Desired CO2 Settings”，自高到低设定CO2梯度（400 300 200 100 50 0 400 600 800 1000 1200 1500），数值间一定空格，点击“enter”，“Minimum Wait time（secs）”设为60，点击“enter”，“Maximum Wait time（secs）”设为300，点击“enter”，“Match if △CO2 less than （ppm）设为100，点击“enter”，按“Y”进入自动测量，点击“A-abort program”中途停止测量；
12. 按“1”，再按“F3（close file）”保存文件，更换叶片再次进行测量；
13. 导出数据之后，按“esc”键，退回到仪器主界面，关机。关机之后两个化学管拧到中间松弛状态，旋转叶室固定螺丝，使叶室处于打开状态。

**(3) 注意事项**

1. 叶片选择：生长环境一致、叶龄一致、无相互遮阴、生长状况良好的叶片，测量时尽量保持叶片原来的状态；
2. 测定时间：上午9:00—11:00；
3. 测定光响应曲线和CO2响应曲线之前，进行光诱导；
4. 同一天测定光响应曲线和CO2响应曲线时，尽量使用不同的叶片，叶片内外条件尽量一致；
5. 测定叶片取样进行分子生物学分析时，取样后放在液氮罐中保存，拿回实验室在-70℃冰箱保存；
6. 更换CO2钢瓶时，将小苏打化学管拧到完全Scrub，干燥剂化学管拧到完全Bypass（更换之前先调零），每更换一次CO2钢瓶更换一个O形圈，CO2钢瓶自装上后，8小时内耗尽，不管在用与否；
7. 当干燥剂达到2/3红色时，应更换干燥剂（循环利用）。

### 3.2 LI-8100A土壤碳通量自动测量系统

**(1) 主要用途**

LI-8100A能够对土壤CO2流量进行长期测量和短期测量，对土壤环境的影响很小。在同一位置自动监测土壤CO2通量的日变化，时间可达数月。通过连接其它环境传感器，如太阳辐射、土壤温度和土壤水分传感器等，可研究环境条件变化与土壤CO2通量的相关性。土壤CO2通量自动测量的完整系统，支持无线操作，实现陆地多种生态系统净碳交换NCE多点、实地、长期连续监测，同时周围环境改变对测量室内部的扰动最小。

**(2) 操作流程**

1. **连接硬件**
2. AIR IN：连接有黑色套管的接口，接口形状为针形，直接插入，取出时往下按；
3. AIR OUT：接口形状为非针形，直接插入，取出时直接拔出；
4. AIR IN和AIR OUT下面的接口为BELLOWS，形状为针形，直接插入，取出时往下按；
5. CHAWBER：连接有黄色套管的接口，接口有一个卡口，对准插入，作用是控制测量底座，打开仪器电源后，底座往下移动表示接口连接好；
6. 水分测量接口下面有一个分支接口，连接温度探测器，一般把探测器针头插至地下5cm进行土壤温度测量，而水分探测器则需将针头全部插入地下；
7. **装存储卡**

拧松主机四周的螺丝，取下后右边有两个卡槽，分别为数据存储卡（上面）和无线网卡（下面）的卡槽，取出时按卡槽旁边的按钮即可；

1. **正式测量**
2. 打开仪器主机，装上一节电池，把测量底座放到土壤环上；
3. 打开主机电源，等待主机显示“IRGA READY”时，可以进行正式测量；
4. IPad装入电池，回到IPad主界面，右下角有一个“IX”网络标志，点击后再按“WiFi”连接。连上后，点击左上角“IPad Wireless”，选择“LI8100A-Winmoble-4.0”，点击“Connect by TCPIP”，按“Use”，点击“OK”；
5. 进入测量界面之后，点击左下角“Menu”，选择“setup”，点击“Start measurement”，设置参数：“File name”：文件名；“Comments”：处理名称；“Chamber offset”：距离呼吸底座的高度；“Treatment label”：重复次数，设置完成后，点击“Start”开始测量，此时呼吸底座往下移动，测量下一个土壤环，点击“Append data to file”，按“Send”；
6. 测量完成后，关闭主机电源，取出电池，松开所有接口，关闭IPad。

**(3) 注意事项**

1. LI-8100A各硬件需正确连接，针脚无损坏、扭曲；
2. PDA应提前充电，日期设置要准确，便于日后数据分析；
3. 土壤水分传感器应垂直插入土中，与土壤表面接触良好（冬季土壤结冰）；
4. 土壤环需提前安置，以尽可能减小土壤扰动；
5. 打开仪器主机，右下角盒子内装有温度探测器（红色）和底座接口（黑色）的保护套，确保实验过程中不丢失。

### 3.3 原子吸收分光光度计

**(1) 主要用途**

AA-7000系列原子吸收分光光度计可进行高灵敏度分析，也是世界首款标准配备振动传感器的AAS。配备了全面的安全机构，包括气体泄漏探测器，同时配置新研发的3D双光束光学系统，该系统通过对光束和光束数字调节器的优化实现了火焰和石墨炉法最佳的性能，并通过光学元件的优化来减少光能量损失。双光束光学系统及稳定的硬件可达到极高的稳定性，光学系统和新石墨炉的设计显著改善了石墨炉的检出限，安全性高。

**(2) 操作流程**

1. **火焰连续法**
2. 每次测定之前，先确定仪器主机右侧灯室内有无当次测定所需的元素灯，如果没有，需要安装元素灯。具体操作：灯室内总共可以放6盏元素灯，换灯时把元素灯移至外侧，先旋松螺钮，取下后垂直向上拔下元素灯，此时不能使元素灯上方碰撞灯室顶部导致破裂，把需要测定的元素灯装上，安装时把元素灯对准卡槽，垂直向下放入卡槽，再拧紧螺钮；
3. 打开电脑，双击桌面图标“WiZAArd”，点击“测量”，输入登录名“admin”，无密码直接进入，点去“向导选择”，此项对元素的设定可在仪器自检过程中的漏气检查时进行（漏气检查耗时长，大概8分钟）；
4. 进行灯位设定，安放元素灯的位置前面都有编号，换灯之后需更新编号值，具体操作：点击“仪器”，选择“灯位设定”，点击“元素”，进行“编号”设置，最后点击“确定”，“灯寿命”和“使用情况”接近时，需更换新的元素灯；
5. 打开仪器主机灯室下面的电源按钮，同时打开乙炔和空气增压机：

  **乙炔：**总阀向逆时针方向转动1/4圈，分压阀调至0.09—0.1；

 **空气增压机：**向上提红色按钮为打开，向下则关闭；

1. 点击“仪器”，选择“连接”，仪器自检开始：

 **原子化器（前/后）：**如果没有通过，向右后向前挪动白色绑带绑住的电线；

 **调节气体：**点击“关闭”，按“是”；

 **废液传感器检测：**当检测界面出现时，把接线置于白色废液容器液面之上，打开容器盖子，把接线往上提高，点击“确定”，之后出现对话框后，把接线置于容器液面之下，盖上容器盖子，放下接线，点击“确定”；

 **N2O-C2H2检测：**点击“否”，按“确定”，最后点击“确定”；

 **漏气检查：**选上所有的检查项目，点击“确定”，开始进行漏气检查，此时，测量界面右下角显示剩余时间，“GLC：执行（不可点火：剩余2）”；

**自检过程中，检查项目为绿色表示通过，白色为忽略的检查项目，红色为没有通过的检查项目！**

1. 漏气检查时进行元素设定：点击“参数”，选择“元素选择向导”，点击“选择参数（此次测量所需元素）”，选择方法为“火焰法”，选上“普通灯”，点击“下一步”，进行“校准曲线”和“样品组”的设定：

 **“校准曲线”：**“浓度单位”为μg/ml，行数设为5（5个梯度浓度的标样），点击“更新”，实际值此时为1、2、3、4、5，点击“确定”，标准曲线每次测定都需重建；

 **“样品组”：**“浓度单位”为μg/ml，“样品数＜300”，点击“更新”，设定数值一般高于测定的样品数量；

设定完成后，点击“确定”，选择“下一步”，点击“下一步”，点击“确定”，选择“谱线搜索/光束平衡”，大概2分钟之后完成，点击“关闭”，点击“完成”，元素设定完成之后，元素灯自动移至需测定的位置；

1. **点火：**点火之前，把卡片放在火焰槽，左右移动，使点火之后的火焰蓝光下方平整，不出现凹凸不平，同时检查乙炔分压阀数值是否在0.09—0.1之间，完成后同时按住仪器主机右上方“PURGE”和“IGMTE”两键，进行点火，如果没点上，点击“不显示记录（否）”，继续进行点火；
2. 测量之前，进行仪器清洗，用容量瓶装去离子水，放在进样口前面，插入进样管，等待5分钟，此时火焰颜色明显发生变化；
3. **标准曲线测量：**先测定去离子水进行调零“AUTO Zero”，当测定元素值为0时，可以进行标准曲线的测量，然后依次放上标曲溶液，点击“start”，观察测量界面第2个图红线越平稳越好，待测量界面最上方元素由蓝变灰，表示测量完成。标准曲线自动生成，斜率一般达到0.99就可以用，标准曲线对应的编号为“STD”；
4. **样品测量：**测定方法和标准曲线一样，样品有空白的情况，先用空白进行调零，没有空白直接测定样品。测定之后的浓度一项为所需数据，删除数据，点击“X”，导出数据直接复制浓度一栏的数值，粘贴在excel表格里；

**删除数据之后，粘贴在excel表里的数据还会出现删除的数据，需认真做好笔记！测定K、Ca、Mg时，需加掩蔽剂，掩蔽剂因测定元素而不同！**

1. 关机之前需清洗仪器，再关闭主机“EXTZNGUISH”，关闭乙炔，顺时针旋转关闭总阀，分压阀旋至松弛状态，最后关上空气增压机，排出废液。
2. **石墨炉法**
3. 打开电脑，打开氩气主阀，分压阀拧至0.35左右，打开水泵，水泵需加入去离子水，注水口在水泵上方，水量不能少于最小水位（min）；
4. 打开原子吸收主机电源之前，进行元素灯的更换，安装此次测量所需的元素灯，在测量过程中，切勿挪动元素灯；
5. 打开原子吸收主机右下方的电源和左下方的加热开关，打开仪器左边的自动进样器开关；
6. 双击电脑上的图标“WiZAArd”，点击“测量”，输入登录名“admin”，无密码直接进入，点击“确定”，进入“向导选择”对话框，选择“元素选择”，点击“确定”，选择“参数”，点击“装载参数”，选择需测量的元素，方法为“石墨炉法”，点击“普通灯”，使用“ASC”，点击“确定”和“下一步”进行标准曲线和样品组的设定：

**“标准曲线”：**设定次数为1，浓度单位为μg/ml，行数为5，点击“更新”，有两种方法：

第一种，事先配好不同浓度的标准溶液，无空白，把标准溶液依次放在进样器的外围，从2号位置起开始放置（1号位置放置去离子水，用做之后的试测量），进样器上面有编号，依次排列，此种方法需设置“位置”、“样品体积”、“实际值（1、2、3、4、5）”；

第二种，放置母液在2号位置，稀释剂在R1位置，设置不同的样品体积和稀释剂体积（总量尽可能保持一致），得到不同浓度的标准溶液，稀释剂可以使用去离子水或稀硝酸，此种方法需设置“位置”、“样品体积”、“实际值（1、2、3、4、5）”、“稀释剂体积”，设置完成后点击“更新”，最后点击“确定”；

 **“样品组”：**浓度单位为μg/ml，设置参数：

**未知样品/掺入测量次序：**“位置”从测量样品开始的位置进行编号，可编到10-12，在测量界面下方表格内可进行更多位置编号；

**样品数：**“样品数”最好大于待测样品数量；

设定完成后，点击“更新”，按“确定”，点击“下一步”，选择“连接/发送参数”，仪器自检开始，一般只有左边列项需要检测，直至“原子化器（前/后）”，当检查到右边列项第三个时（Air），出现“调节气体”，点击“否”，按“关闭”，点击“确定”，点击“否”，自检结束后，点击 “发送升温程序和ASC参数”，完成后点击“下一步”，仪器进行“光学参数”中的“谱线搜索”，当“谱线搜索/光束平衡”中显示谱线、光束均“OK”时，点击“关闭”，按“下一步”，选择“升温程序”，最后点击“完成”；

1. **喷嘴位置设定：**喷嘴一定竖直向下，点击“仪器”，选择“石墨炉喷嘴位置”，待进样器转盘调至最右边时，点击“确定”，然后按“确定”：

**转盘位置（进样器）：**按下进样器右下方的卡槽，进样器往右拉至燃烧头正面，进样器左侧锁定键往外拉垂直向下进行固定，喷嘴自动移至石墨炉上方之后，把进样臂导轨放在石墨管上方，保持松弛状态，通过进样器左侧、前面的螺钮调整喷嘴位置，出现位置调节对话框，通过细、粗脉冲或自己设定的脉冲调节喷嘴进入石墨管中间洞口的移动速度，向下移动直至喷嘴进入石墨管洞口正中间，最后达到洞口离底部2/3、3/4的位置即可，可以用镜子反照石墨管右侧，左侧照灯观察具体位置，最后点击“确定”，拧紧进样臂导轨；

1. **测量：**1号位置的测量，测量元素数值＜0.009即可，没达到要求重复1号位置的测量，点击“TEST MEAS”，按“测量”，点击“确定”，检查完后进行清洗，点击“关闭”，测量时注意进样臂细线的松弛状态。达到要求之后，关闭测量菜单，对图下方的表格进行编辑，“位置”为标样STD、未知样品依次编号，完成后点击“start”，仪器开始自动测量，一般重复测定2次。测量过程中，点击“参数”，选择“参照参数”，对“重复测量条件”中的“重复次数”、“最大重复次数”进行更改，一般两次测量之后，达到要求就不再进行第三次测量；
2. 测量完成后，点击“仪器”，选择“连接”，选择“与仪器的通讯断开”，点击“确定”，关闭氩气总阀，松开分压阀，关闭冷却水水泵，关闭测量软件，关闭主机电源、加热开关、自动进样器开关。

**(3) 注意事项**

1. 使用仪器前先检查助燃气体是否充足，乙炔瓶内气压低于0.5 Mpa时就要进行更换，否则会造成气路堵塞不能点火；
2. 仪器使用前后均需清洗仪器，保证测量数据的准确性；
3. 处理样品后要进行过滤，否则很容易使雾化器进样毛细管堵塞（专用的钢丝疏通）；
4. 要注意检查点火口电极上的积碳（造成短路），注意检查雾化器火焰燃烧是否均匀（关闭火焰后用硬纸卡片清洁燃烧口）；
5. 元素灯要在关机状态下更换，确认插入灯座；
6. 提示废液罐液面较低时，向废液罐内加入少许蒸馏水；
7. 进样器中的样品杯用稀硝酸浸泡一夜，烘干待用；
8. 更换石墨管：仪器主机正面有个卡锁，向下按，再拧松石墨管右边的螺钮，向右移动，挪至最右边，取出石墨管。细管洞口正面朝上，装入石墨管，正方形的金属块向左移动，合上之后按下石墨管右边的螺钮。用枪头（200 μl）把石墨管中间的细管洞口调到正面朝上；
9. 关闭空压机气泵时需将红色按钮按下，并将绿色阀门拧至垂直90°；
10. 乙炔总阀关闭后，松开分压阀，释放管道余气，使压力表上的数值归零；
11. 仪器使用完毕，清空空气增压机中的废水（每次做完实验），注意观察空压机润滑油的液面高度在两红线之间，太低要更换空压机油。

### 3.4 微波消解仪

**(1) 主要用途**

MARSX微波快速溶剂萃取系统是美国CEM公司开发用于分析化学的样品消解、萃取、蛋白水解、浓缩、干燥、实验化学的有机/无机合成以及化学工艺模拟数据条件中试等各种微波化学应用。微波功率控制是专利的全范围非脉冲输出，冷却方式安全的快速自动风冷/水冷。仪器标准方法权威，批处理量大，且所有样品独立密闭, 确保无交叉污染和样品损失。

**(2) 操作流程**

1. 开机后及每次运行方法前，按“P/T”检查温度是否正常，温度T＜50℃表示正常，在运行方法前按“1”键，检查方法在℃标识下必须显示“CONTROL”；
2. **称样：**称取样品放至反应罐底部，消解有机样品每个反应罐称取样品≤0.5克，无机样品≤1.0克，注意事项：
3. 不熟悉的样品称样时应严格控制在0.5克以内；
4. 称样重量应尽量保持一致；
5. 在同一批消解反应中，不可同时混用不同型号的反应罐或将不同性质的样品混合消解；
6. 称取样品时，尽量不要使样品粘在反应罐内壁上；
7. **加酸：**容量为55 ml的反应罐消解时加酸量为5 ml，从而使反应罐内溶液总体积在5 ml-20 ml之间，注意事项：
8. 同一批消解反应中必须使用相同的酸或溶剂；
9. 溶剂的选择：HNO3、HCL为常用酸，H2SO4、H3PO4会产生高温，使用时应该有严格的温控，H3CLO3禁止使用；
10. **消解罐的摆放：**每一批消解反应必须保证反应罐数量在6个以上，使用6-16个反应罐时，将反应罐放在底座内部均匀摆放；使用17-24个反应罐时，将反应罐放在底座外围均匀摆放；使用25-32个反应罐时，可将一半反应罐均匀摆放在底座内部，另一半均匀摆放在外围；使用33-40个反应罐时，首先将反应罐填满底座内部，其余的均匀摆放在外围；
11. **安装反应底座：**确保每个反应罐有压力弹片，拧紧反应罐盖子，确保内衬罐装好外壳保护套，同时保证保护套为干燥状态；
12. **载入方法“Load method”或编辑/创建方法“edit/creative method”：**用户目录选择“USER Directory”，选择方法或创建新方法，选择样品种类“organic”，选择控制模式“RAMP TO TEMPERATURE”，设定反应方法，按“next”，方法命名，填写实验备忘（可省略），按“next”回到初始界面，此时显示“CURRENT METHOD”为新创建的方法，注意事项：
13. 在运行方法前按“1”键检查方法在℃标识下必须显示“CONTROL”；
14. 仪器可自动调节功率输出，设定时应注意功率平台与反应罐数量的匹配关系：6-25个反应罐（600W），25罐以上（1200W），尽量采用功率最小化原则；
15. 按“Start/Pause”键开始消解程序，消解过程中，按“Start/Pause”键可暂停、继续消解程序，按“Stop”键停止消解，消解程序完成后，仪器自动进入冷却过程；
16. 当仪器显示温度低于80℃时（As、Hg等元素温度需降至60℃），取出反应罐，在通风橱内缓慢拧松盖子，释放剩余压力（不能将盖子上的气孔对着自己），再全部打开盖子；
17. 后续操作：赶酸、转移、定容等，待仪器反应结束5分钟后再关机，开关机间隔时间至少1分钟。

**补充：**

1. **控制模式选择（载入方法）**
2. “Standard Control”标准温/压控制：根据设定的目标温度和压力值；
3. “Ramp to Temperature”比例温度/时间控制：适合不熟悉样品的消解，能找到反应临界点和最佳反应条件，一般低糖/淀粉/碳水化合物为140℃，蛋白质类为145℃-150℃，多糖类为150℃，类脂/脂肪类大于160℃-165℃；
4. “Ramp to pressure”比例压力/时间控制：适合熟悉的样品，同时必须有压力传感器；
5. “Power/Time”比例功率/时间控制：不能改变功率值和时间，不适合密闭反应，适用于使用烧杯等非密闭容器；
6. **方法内容编辑的一般原则**

消解一般推荐使用两步消化，植物类样品取样量控制在0.5 g（ml）以内，溶剂为硝酸，一般两步消解；土壤及沉积物类样品取样量控制在1.0 g以内，溶剂为硝酸或盐酸，一般三步消解。

**(3) 注意事项**

1. 所有的反应罐各部件必须为干燥且无污染物的状态，以防罐体局部吸收微波后温度过高，损坏罐体；
2. 严格确认压力弹片已经安装且安装正确，严格确认反应罐完全嵌入转盘；
3. 转盘上摆放消解罐时，应尽量均匀对称；
4. 微波启动后15秒内不能关掉，微波停止后5分钟之内不得关机，反应完成后，在温度低于80度并低于溶液沸点时，在通风橱内通过排气螺帽释放压力后，才打开反应罐；
5. 酸和其他化学烟雾会损坏电路和安全互锁门，高氯酸严禁用于微波消解；
6. 每次消解完成后必须进行清洗程序；
7. 定期清理反应腔，确保反应腔内传感器清洁；
8. 不能将消解罐放置在烘箱中烘干，应倒扣使其自然晾干（反应罐外套不得浸泡清洗）；
9. 不能随意更改设置好的仪器参数，特别是保持温度！

### 3.5 双光束紫外可见分光光度计

**(1) 主要用途**

双光束紫外可见分光光度计是北京普析通用仪器有限责任公司研发的应用于有机化学、生物化学、药品分析、食品检验、环境保护及生命科学等领域的仪器，波长范围190-900 nm，光度范围-4.0-4.0 Abs，基线平直度±0.001 Abs，保证了0.010% T的超低杂散光，优质全息光栅，降低仪器的杂散光，仪器分子更加准确，双光束动态反馈比例记录测光系统从而保证基线稳定性。

**(2) 操作流程**

1. **光度测量（特定波长下的吸光度）**
2. **试剂配制：**样品配制和去离子水备用；
3. **仪器开机：**打开电脑，进入Windows操作环境，确认仪器样品室中无挡光物后，打开仪器电源，双击桌面图标，打开UVWin测量软件，仪器进入初始化进程，自检完成后进入测量界面，仪器需预热半个小时；
4. **参数设置：**选择“光度测量”，进入参数设置界面：

**扫描参数：**“光度方式”为Abs，“测量波长”根据实验条件确定，一般设为400 nm；

**仪器参数：**“光谱带宽”设为2.0 nm；

1. **暗电流校正：**将随机附带的黑挡块放入样品池架上，在测量菜单中点击“暗电流校正”，校正完毕后取出黑挡块。暗电流校正能确保测量数据的准确性，一般在环境温度变化较大或仪器安装位置发生改变时进行校正；
2. **校零：**将两个石英比色皿装上去离子水，放入样品池架上，关上样品室门盖，点击“校零”，此时测量界面上方显示的实时吸光度值应该大约为0.000 Abs；
3. **样品测量：**取出放置于样品光路上的比色皿，倒掉去离子水后用样品溶液清洗至少3遍后盛入样品溶液，放入样品池架上，关上样品室门盖，点击“开始”进行测量；
4. **结果输出：**测量完成后，将数据保存为UVWin软件专用的文件格式，方便日后查看和分析。
5. **光谱扫描（吸收峰）**
6. **试剂配制：**样品配制和去离子水备用；
7. **仪器开机：**打开电脑，进入Windows操作环境，确认仪器样品室中无挡光物后，打开仪器电源，双击桌面图标，打开UVWin测量软件，仪器进入初始化进程，自检完成后进入测量界面，仪器需预热半个小时；
8. **参数设置：**选择“光谱扫描”，进入参数设置界面：

**扫描参数：**“光度方式”为Abs，“扫描速度”为中速，“采样间隔”为1 nm，“波长范围”为220 nm-660 nm，“纵坐标范围”为0.000~2.000；

**仪器参数：**“光谱带宽”设为2.0 nm；

1. **暗电流校正：**将随机附带的黑挡块放入样品池架上，在测量菜单中点击“暗电流校正”，校正完毕后取出黑挡块。暗电流校正能确保测量数据的准确性，一般在环境温度变化较大或仪器安装位置发生改变时进行校正；
2. **基线校正：**将两个石英比色皿装上去离子水，放入样品池架上，关上样品室门盖，点击“基线校正”，此时测量界面出现基线校正提示，波长也会变化显示目前的进度，“基线校正”自动完成；
3. **样品测量：**取出放置于样品光路上的比色皿，倒掉去离子水后用样品溶液清洗至少3遍后盛入样品溶液，放入样品池架上，关上样品室门盖，点击“开始”进行光谱扫描；
4. **结果分析：**测量完成后，可以使用UVWin软件的峰值检出功能，点击快捷工具按钮或选择“图形”菜单下的“峰值检出”，对扫描得到的曲线进行分析，用峰值检出进行峰值搜寻，如果无法搜寻出峰值，可以对阈值进行设置，检出峰值后测量软件会列出检出峰值对应的吸光值；
5. **结果输出：**测量完成后，将数据保存为UVWin软件专用的文件格式，方便日后查看和分析。
6. **定量测量（含量大小测定）**
7. **试剂配制：**为样品处理做准备；
8. **样品处理：**类似于TTC含量测定，需做试剂空白实验；
9. **仪器开机：**打开电脑，进入Windows操作环境，确认仪器样品室中无挡光物后，打开仪器电源，双击桌面图标，打开UVWin测量软件，仪器进入初始化进程，自检完成后进入测量界面，仪器需预热半个小时；
10. **参数设置：**选择“定量测量”，进入参数设置界面：

**扫描参数：**“测量方法”为单波长法，“主波长”为540 nm，“曲线方程”为Abs=f(c)，“方程次数”为一次，“浓度单位”为mg/l，“校正方法”为浓度法；

**仪器参数：**“光谱带宽”设为2.0 nm；

1. **显色反应：**标准溶液和浸出液的显色反应要同时进行；
2. **建立校正曲线：**点击“标准样品”，依次输入标准溶液的编号1-7，浓度为0.0 mg/l、0.1 mg/l、0.2 mg/l…，将两个石英比色皿装上试剂空白溶液，放入样品池架上，关上样品室门盖，点击“校零”，将样品一侧的溶液按编号顺序依次换为标准溶液，点击“开始”进行吸光度值的测量，测量软件会实时以吸光度值对应浓度值绘制曲线，曲线的参数为Abs=K1\*(c)+K0，K0=0.0014，K1=0.68847，R2=0.9999；
3. **样品测量：**同样条件下，在“未知样品”中输入样品的编号，测定样品溶液、空白溶液的吸光度，测量软件会根据校正曲线实时计算出六价铬浓度，分别为A和B；
4. **结果分析：**以质量分数W计，数值以mg/kg表示，计算公式为W=（A-B）\*V\*N/m。

**(3) 注意事项**

1. 样品液以充满比色皿的三分之二体积为宜；
2. 氘灯能量低不能通过检测：一般是仪器清理不干净，镜片有遮挡物，要做好实验前后的仪器清理工作，最好用纱布和棉签清理；
3. 测出数据有误：数值一直为0，多半是实验室温度太低，提前一小时开空调，精密仪器使用温度以22-24℃为宜，一般空调温度设置为26℃，因为实验室一般要开窗扩散有毒气体；数值波动大，一般是开机预热时间不够，仪器需要提前半小时开机预热后再使用；
4. 仪器使用完成后取出比色皿，注意一定要关机，仪器寿命有限。

### 3.6 总有机碳分析仪（multi N/C 2100）

**(1) 主要用途**

总有机碳分析仪是德国耶拿公司开发用于测定TC、TOC、NPOC、TIC、POC 及TNb各项参数的仪器，测量范围0-30000 ppm，检测原理为非色散红外吸收法（NDIR），氧化方法为高温催化燃烧氧化。仪器具有宽范围全量程分析，无需稀释，精确测量，自动保护功能和SCS安全自检系统能保证多参数快速测定。

**(2) 操作流程**

1. **前期准备：**打开高纯氧总阀，调整分压阀至0.2-0.4 Mpa，打开电脑，打开仪器主机电源， 待主机指示灯变绿后，双击桌面图标，打开multiwin软件，用户名和密码均为admin，点击“OK”，仪器初始化开始，测量界面左上角显示系统状态，待红色指示灯变黑后，所有指标显示“OK”表示仪器初始化完成；
2. **设定：**调节主机内的针形阀（Main），使气体流量（MFM1）在160±3之间，设定催化剂所需测量温度，点击“配置”，下拉菜单中选择“编辑器设置”，选择分析仪器配件“仪器组件”，设定进样针体积为200 μl，点击“OK”确定；
3. **新建方法：**点击“方法”，选择“新建”，输入文件名，选择测量参数（TOC、TC或NPOC）、测量次数（3-4次）、测试精度要求（如2%），完成后点击“方法参数”，选择“进样体积”为200 μl，根据待测试样特性编辑其所需的“最大吹扫时间（如120 s）”，选择“最长积分时间（如200 s）”，点击“保存”，点击方法为当前测量方法；
4. **载入已存方法：**点击“载入方法”，选择已建好的方法后点击“OK”，建好的方法中包含校准曲线，可用一点标准样品检验校准曲线是否满足测试要求（标准曲线是否漂移），如满足测试要求，可直接进行样品测试，如不满足，则需重新制作标准曲线：

**制作标准曲线：**测试界面下，点击“校正”或选择“测量”菜单下的“校正”，点击“是”，按“确定”，编辑校准曲线的“标准样品份数（4个以上）”，输入“标准液浓度（mg/l）”，点击右下角“测量”，按“开始（F2）”，测量完成后，仪器自动绘制校准曲线，通过去除标准样品数值修改校准曲线，最后点击“是”，点击“应用”，按“关闭”；

1. **样品测定：**选择“测量”，下拉菜单中点击“开始测量”或直接点击“F2”快捷键进行测量，输入文件名，点击“开始”之后，测量对话框出现，用待测溶液清洗注射器数次后再吸入样品液，保证注射器取好的样品中没气泡，点击 “F2”，再次出现测量对话框后，点击“OK”，将注射器针头完全垂直插入到进样垫注射口中匀速注射样品，注射完立即抽出注射器，测试完成后点击“退出”，进行下一个样品的测试，期间用去离子水清洗注射器；
2. **数据输出：**点击“数据报告/分析数据报告”弹出分析数据表，点击“保存”；
3. **关机：**点击“退出”关闭测量软件，关闭主机和电脑，关闭高纯氧总阀，松开分压阀。

 **(3) 注意事项**

1. 打开仪器之前检查：废液管接到废液罐中，且流出畅通，废液罐的剩余体积充足；试剂瓶中有足够的磷酸；检查气瓶压力；
2. 仪器使用前后均需用蒸馏水清洗；
3. 每次测量溶液最多为500 μl（目前仪器设置为200 μl），每次测量需用待测溶液清洗注射器数次，保证注射器取好的样品中没气泡；
4. 进样时将注射器针头完全垂直插入到进样垫注射口中匀速注射样品，注射完立即抽出注射器；
5. 采用TOC（diff）方法时，使用40%的磷酸，实验之前加入5 ml，采用NPOC方法时，使用2 mol HCL，根据样品体积加入量一般为50 ml，保证样品的PH值在2左右。

### 3.7 TOC/TNb 分析仪（Vario 系列）

**(1) 主要用途**

样品中的C和N在高温催化作用下被高纯氧氧化生成对应的氧化物，经过干燥和净化后，由各自的检测器（C——IR N——EC）检测。检测器的信号通过计算机积分处理，得到的峰面积与标准对照品的峰面积对比，通过外标法得到样品含量。Vario TOC 采用多点标准曲线校正，生成标准曲线的校准系数。

**(2) 操作流程**

**液体模式操作**

1. 打开氧气瓶总阀，将低压（分压表）调节到接近 0.1 MPa；
2. 打开仪器主机电源开关，仪器将进行自检，包括多通阀复位、注射泵复位、机械臂升降和样品盘复位，等仪器自检完成（约2分钟）后，双击桌面快捷图标，打开“Vario TOC select”软件，点击 “ok”按钮即可进入软件主界面；
3. 软件搜索连接端口并自动连接仪器，连接成功后，软件界面左下角过程状态会显示“standby”；
4. **设置燃烧管温度**：点击“选项”，选择“设置”，点击“参数”，拉动下部的滚动条，将“反应器、工作温度”设置为 850℃，按“ok”按钮确认退出，关闭软件该燃烧管温度设置会保存，不需要每次开机设置该参数，等待温度到设定值（约20分钟左右），然后才可设定工作表开展分析测试工作；
5. **准备样品：**样品需要经过0.45 μm的膜过滤后才可上机，如果使用 NPOC方法，样品还需要充分酸化，浓度较高的样品可以通过定量稀释后再上机；
6. **方法：**Vario TOC预置了常用的方法，差减法不测试总氮选择“TIC/TC”、 差减法要测试总氮选择“TIC/TC/TNb”、 直接法不测试总氮选择“NPOC-precise”、直接法要测试总氮选择“NPOC/TNb-precise”；
7. **选择使用校准系数：**Vario TOC将不同组分的校准系数归总在一个名称里面，在系数中选择这个名称即可选择对应的系数。Vario TOC出厂时预设了名为“Default”的系数名称，其各个组分的浓度范围均为 0-10 ppm（mg/L）。“Default”为缺省的系数名称，如果不选择系数名称则被认为是选用“Default”；
8. **运行工作表：**运行分为单次运行和自动运行。单次运行只运行工作表中的一行，而自动运行则运行整个工作表直到结束或者中途终止，如果配有自动进样器，通常会选择自动运行。自动运行结束仪器会进入休眠模式，下次运行之前需要唤醒仪器，中途停止方式可以选择手动和自动方式，手动中途停止可以通过操作菜单“系统”→“停止”，自动中途停止是通过设置停止标记位来实现：“编辑”→“停止标记”，设置停止位，按“OK”确认退出；
9. **数据管理：**得到的数据可以通过文件的形式进行存储，点击“文件”→“保存”或者“文件”→ “保存为”，文件的导出点击“文件”→“导出/导入”→“导出”；
10. **关机：**工作表中的样品序列运行结束后，仪器通常会自动进入睡眠模式，此时仪器会关断氧气，燃烧炉温度会慢慢降低。关机步骤：

第一步，单击闹钟图标唤醒仪器；

第二步，将系统压力调节到 400 mbar；

第三步，将燃烧炉温度设置为50℃，点击“选项”→“设置”→“参数”，单击“ok”按钮，仪器开始降温；

第四步，当燃烧炉温度降到100℃以下时，关闭钢瓶总阀；

第五步，但系统压力降低为20以下时，关闭软件，仪器电源。

**(3) 注意事项**

1. 由于多数盐的熔融温度为 700-800℃（如氯化钠为800℃，氯化钙为 774℃），分析高盐分水样如果仍采用 850℃，可能会导致催化剂效率降低和燃烧管的脆裂；
2. 取样管路插入下一个样品。取样管路共两根，一根是取样管，样品由该管道进入仪器，另外一根为曝气鼓氧管。取样时鼓氧管末端一定要高于或者远离取样管末端，以免氧气被吸入而导致取样体积不准确得到不正确的分析结果。

### 3.8 GC-MS气相色谱质谱联用仪

**(1) 主要用途**

GC-MS（QP2010Ultra）是岛津目前性能最先进的气相色谱质谱联用仪，可在较短时间内对多组分混合物进行定性分析，广泛应用于医药、环境、生物等领域，在不损失灵敏度、质谱图不失真情况下扫描速度可高达20000 u/sec， Scan/SIM同时扫描，高灵敏度离子源提供高传输效率的离子光学系统，并实现离子源盒中温度的均一化，可以在待机模式时节约电量并减少载气消耗，效率高、样品通量大。

**(2) 操作流程**

1. **定性分析**
2. 打开氦气，调节分压阀0.6-0.8 MPa（瓶内气压低于1 MPa需换气），打开仪器主机右下角和左边后面的电源开关，仪器预热完成后双击桌面图标“GC-MS”，进入测量界面；
3. 点击助手栏中“真空控制”，点击“自动启动”，完成后点击“关闭”；
4. 真空完成后约12小时后，点击“调谐”，选择“峰监测窗”，执行检查泄漏（参考说明书参数要求），完成后点击“开始自动调谐”，点击“文件”，选择“另存调谐文件”；
5. 观察测量界面右上角GC、MS均准备就绪后，单击“实时”助手栏中的“批处理”，“批处理表”窗口打开，单击“文件”，下拉菜单中选择“新建批处理文件”；
6. 单击“批处理”助手栏中的“向导”，“批处理表向导”窗口打开，进行设置，创建批处理表：
* 单击“新建”，选择“仅未知样品”，指定要使用的方法文件（TEST-STD-SIM），取消选中两个“数据处理”项目，单击“下一步”；
* 在“批处理表向导—流路/未知样品(1)”中进行设置，输入“瓶号”和“样品计数”，输入“进样体积（如1 μl）”，单击“下一步”；
* 在“批处理表向导—流路/标准样品(2)”中进行设置，输入“数据文件名”，如果文件名的结尾是一个数字，则文件按顺序命名，取消选中“报告输出”，单击“完成”，对批处理表中样品名称、数据文件等进行更改；
1. 单击“文件”下拉菜单中的“另存批处理文件”，在保存方法文件的位置打开文件夹，输入文件名并保存文件，把待测样品置于自动进样器，单击“批处理”助手栏中的“开始”，仪器执行批处理，期间要停止批处理，单击“批处理”助手栏中的“停止”。
2. **定量分析**

定量分析除创立方法文件之外，需要创建组分表、SIM表。

1. 打开氦气，打开仪器主机右下角和左边后面的电源开关，仪器预热完成后双击桌面图标“GC-MS”，进入测量界面；
2. 点击助手栏中“真空控制”，点击“自动启动”，完成后点击“关闭”；
3. 点击“调谐”，选择“峰监测窗”，执行检查泄漏，完成后点击“开始自动调谐”，点击“文件”，选择“另存调谐文件”；
4. 观察测量界面右上角GC、MS均准备就绪后，启动“GC-MS实时分析”程序，单击“实时”助手栏中的“批处理”，“批处理表”窗口打开，单击“文件”，下拉菜单中选择“新建批处理文件”；
5. 单击“批处理”助手栏中的“向导”，“批处理表向导”窗口打开，进行设置，创建批处理表：
* 选择“新建”，点击“标准和未知样品”，指定要使用的方法文件（C:\GCMSsolution\Sample\alkane-24m），选择“定量”，单击“下一步”；
* 在“批处理表向导—流路/标准样品(1)”中进行设置，输入“瓶号（校正点的个数自动从方法中加载）”和“平均计数（重复次数）”，输入“进样体积（如1ul）”，单击“下一步”；
* 在“批处理表向导—流路/标准样品(2)”中进行设置，输入“数据文件名”，如果文件名的结尾是一个数字，则文件按顺序命名，单击“下一步”；
* 在“批处理表向导—流路/未知样品(1)”中进行设置，输入“瓶号”和“样品计数”，输入“进样体积（如1 μl）”，单击“下一步”；
* 在“批处理表向导—流路/未知样品(2)”中进行设置，输入“数据文件名”，如果文件名的结尾是一个数字，则文件按顺序命名，取消选中“报告输出”，单击“完成”，对批处理表中样品名称、数据文件等进行更改；
1. 单击“文件”下拉菜单中的“另存批处理文件”，在保存方法文件的位置打开文件夹，输入文件名并保存文件，把待测样品置于自动进样器，单击“批处理”助手栏中的“开始”，仪器执行批处理，期间要停止批处理，单击“批处理”助手栏中的“停止”。

**(3) 注意事项**

1. 开关机严格按照正确的顺序进行；
2. 弄清废液收集瓶和清洗液瓶的位置；
3. 仪器运行时，使用人应时常去观察仪器运行情况，若出现问题及时报与管理人员；
4. 不要在仪器顶端放置任何东西，否则可能会阻塞排气口，造成仪器过热；
5. 安全使用氦气，设备不用时，应该关闭氦气瓶主阀门，防止意外发生。

### 3.9 荧光原子吸收分光光度计

#### 3.9.1 仪器操作说明

**(1) 主要用途**

双道原子荧光光度计首创采用最新设计的进口注射泵与蠕动泵联用的内置式断续流动进样装置，并采用夹管阀应用技术，试剂不接触阀体，无腐蚀、无记忆且可靠性高，适用于样品中砷、汞、硒、铅、锗、锡、锑、铋、镉、碲、锌、金等十二种元素的痕量分析。仪器能实现双道两元素同时测量，全自动智能化运行，三维自动进样器，单个样品盘多达130位，并支持半自动测定方式。

**(2) 操作流程**

1. 试剂配制：载流液为2%盐酸，还原剂为2%硼氢化钾+0.5%氢氧化钠，必须先将氢氧化钠溶解然后再加入硼氢化钾，现用现配；
2. 打开氩气阀，调节好载气压力0.3 MPa；
3. 打开原子化器室前门，检查去水装置中水封，如水封不足，用滴管加入蒸馏水；
4. 打开计算机电源开关，打开仪器主机电源，双击桌面图标，打开“AFS-8X”软件，进入自检窗口，单击“检测”，全部通过之后，点击“返回”；
5. 点击“点火”，点击工具栏“元素表”，A道自动识别，B道手工设置，点击“确定”，根据方法需要对仪器条件进行设定；
6. 点击工具栏“标准系列”，依次输入所配制的标准浓度，点击“确定”；
7. 点击“样品参数”、“添加样品”，设置样品名称、样品形态等信息，点击“确定”；
8. 点击“测量窗口”，出现测量界面，点击“预热”，至少预热30分钟，确定载流、还原剂、标准品、样品都已放好，压紧泵块；
9. 点击“重做空白”，出现另存为界面，输入新文件名（样品-日期），点击“保存”；
10. 仪器开始运行，默认从当前位置开始测量，屏幕出现“载流”时，将样品管放入载流瓶中，屏幕出现“溶液”时，将样品管放入要测定的比色管中，如检测出现失误可点击“重做”，进行再次测定；
11. 点击“报告”、“工作曲线”，根据需要进行打印或保存；
12. 检测完毕，点击“清洗程序”，按清洗说明放好各管，点击“清洗”，至少洗5次；
13. 点击“熄火”，然后关闭软件、主机电源、关气、松泵压块、关电脑。

 **(3) 注意事项**

1. 更换元素灯时，一定要在主机电源关闭的情况下进行，按住卡槽，光点调正中；
2. 所有试剂均应为优级纯，且需现用现配，不能过夜使用；
3. 所有用到的玻璃仪器均要用20%硝酸浸泡过夜，清洗后60℃烘1小时待用；
4. 原子化器高度Hg为10 cm，As等其他元素为8 cm；
5. 若样品中被测物含量很高，污染了仪器，则停止测试，立即清洗反应系统的管道、原子化器等；
6. 蠕动泵管定期滴加硅油，不测量时应打开压块，不能长时间挤压泵管；
7. 测试结束后，一定要运行仪器清洗程序，将所有管子接入空气。

#### 3.9.2 As、Hg相关指标测试

**(1) 砷（As）标准溶液的配制**

1. 吸取1 ml浓度为1 mg/ml的砷（As）单元素标准溶液（国家标准物质研究中心）置于100 ml容量瓶中，用5%的盐酸稀释至刻度，此溶液为砷（As）的标准储备液,浓度为10 μg/ml（10 ppm）。再吸取10 ml此储备液置于100 ml容量瓶中,用5%盐酸定容至刻度,此溶液为砷标准使用液,含量为1 μg/ml(1 ppm),以上两种溶液冰箱中保存；
2. 分别称取10 g硫脲和10 g抗坏血酸都置于同一200 ml容量瓶中，用去离子水稀释至刻度，配制成含5%硫脲和5%抗坏血酸的混合溶液，备用；
3. 取4支100 ml和1支200 ml的洁净容量瓶，分别加入0.1 ml、0.2 ml、0.4 ml、0.8 ml、2 ml的浓度为1 μg/ml（1 ppm）的砷（As）标准使用溶液；
4. 再向4支100 ml的容量瓶中各加入5 ml浓盐酸，向200 ml的容量瓶中加入10 ml浓盐酸；
5. 再向4支100 ml的容量瓶中各加入20 ml 5%硫脲和5%抗坏血酸的混合液，向200 ml的容量瓶中加入40 ml 5%硫脲和5%抗坏血酸的混合液；
6. 最后，分别用去离子水定容至刻度，标准系列溶液中砷（As）的含量分别1 ng/ml、2 ng/ml、4 ng/ml、8 ng/ml、10 ng/ml，酸度5% HCL。

**(2) 汞（Hg）标准溶液的配制**

1. 吸取1 ml浓度为1000 μg/ml的汞（Hg）单元素标准溶液（国家标准物质研究中心）至于100 ml洁净容量瓶中加入0.05 g重铬酸钾（K2Cr2O7）,用5%硝酸定容至刻度，此溶液为汞标准储备液，浓度10 μg/ml（10 ppm）置于冰箱中保存。再吸取1 ml汞的标准储备液至于100 ml容量瓶中，用5%硝酸定容成汞标准使用液，浓度为0.1 μg/ml（0.1 ppm）；
2. 取5支200 ml洁净容量瓶，分别加入0.8 ml、1.6 ml、2.4 ml、3.2 ml和4.0 ml的浓度为0.1 μg/ml（0.1 ppm）的汞标准使用液；
3. 再向5支200 ml的容量瓶中各加入10 ml浓盐酸；
4. 最后，分别用去离子水定容至刻度，标准系列溶液中汞（Hg）的含量分别0.4 ng/ml、0.8 ng/ml、1.2 ng/ml、1.6 ng/ml、2 ng/ml，酸度5% HCL，标准系列溶液应随配随用。

**(3) 砷（As）、汞（Hg）载流溶液的配制**

先向一个500 ml洁净的烧杯中加入200 ml左右的去离子水，再向烧杯中慢慢加入20 ml浓盐酸，最后加入去离子水至400 ml刻度，此溶液含5% HCL。

**(4) 砷（As）、汞（Hg）还原剂的配制**

KBH4 2%（w/v）在0.5% NaOH溶液中。

称取2.5 g NaOH溶于去离子水，溶解后加入10 g KBH4，加去离子水稀释至500 ml。

**注意：配制溶液使用的所有玻璃器具都要用硝酸溶液浸泡24小时以上。**

### 3.10 酶标仪

**(1) 主要用途**

酶标仪是[酶联免疫吸附试验](https://baike.so.com/doc/5629331-5841952.html%22%20%5Ct%20%22_blank)的专用仪器又称微孔板检测器，其核心是一个[比色计](https://baike.so.com/doc/6933230-7155562.html%22%20%5Ct%20%22_blank)，即用比色法来进行分析，测定一般要求样品液的最终体积在250 μL以下，用一般光电比色计无法完成测试。 北京普朗酶标仪测量准确、重复性好，具有质控功能， 能做定性、定量、基因检测，同时开机后具有自检功能，可保证仪器每次均工作在正常状态下。

**(2) 操作流程**

1. **加入样品：**酶标板一共有96个孔，每个孔的体积为400 μL，加入样品液体积一般在250 μL以下，确保酶标板第一个孔是空着的。注意事项：一个样品对应一个空白，依次放入，测量结果为样品值—空白值—第一个孔的数值；
2. 打开电脑和酶标仪主机背后的电源；
3. **测量：**双击桌面图标，点击“酶标仪”，选择“检测”，仪器开始自检，自检完成后，输入“板号（文件名）”、“固定板型输入（酶活性）”，选择“酶标板出仓”，放入酶标板，注意酶标板上字母朝里放入，放好后往回拉一下，点击“自动检测”，大约1分钟之后酶标板出仓表示测定完成，点击“数据导出”，数据直接自动保存到桌面上；
4. 实验完成后，取出酶标板，点击“酶标板进仓”，选择“退出”，关闭测量软件，关闭酶标仪电源和电脑。

**(3) 注意事项**

1. 使用移液枪加液，枪头不能混用，酶标板保持干净；
2. 在测量过程中，不能碰触酶标板，以防酶标板传送时挤伤操作人员的手；
3. 不能将样品或试剂洒到仪器表面或内部，操作完成后洗手；
4. 不要在测量过程中关闭电源，使用完成后盖好防尘罩。

## 第四节 土壤生物实验室

生态林业研究所公用实验室，为森林培育、生态、林学等学科研究提供仪器设备和实验方法。目前实验室拥有高速冷冻台式离心机、Leica体式显微镜、烘虫箱、智能生化培养箱、人工气候培养箱、制冰机、超低温冰箱等仪器，可以进行土壤动物分离和鉴定等。

### 4.1 高速冷冻台式离心机

**(1) 主要用途**

高速冷冻台式离心机离心力高达64400 xg，制冷系统为冷冻剂（R134A），驱动系统为 无碳刷感应电机，可用于亚细胞器、蛋白质、病毒等样品的分离。

**(2) 操作流程**

1. 电源开关按至ON，按“OPEN DOOR”键打开仪器腔门；
2. 安装转头前，确认锥形轴套位于驱动轴上，若脱落，不能操作转头；

**目前实验室有F2402H（1.5 ml）、F1010（10 ml）和F0650（50 ml）三种型号的转头，安装好转头后，确认安装的转头和仪器显示的转头型号是否一致，任何情况下，转头均需平衡运行；**

1. 样品对称放置，放入之前请再次配平，确保样品溶液不外漏；
2. 关闭离心机门并向下轻按，直至听见两个门锁的锁紧声，“OPEN DOOR”、“START”两灯均亮表示离心机门锁好；
3. 输入运行参数：
4. 选择转头号——ROTOR， 或 ，ENTER；
5. 设定运转速度——RPM， 或 /RCF， 或 ；
6. 设定运行时间——TIME， 或 ；
7. 设定运行温度——TEMP， 或 ，根据实验要求设定，低温一般设为4℃；
8. 加速模式和减速模式一般为0—9，仪器默认为9，一般无需变动；
9. 核对所有参数无误，并锁紧机门，按“ENTER”键确定参数，按“START”键开始离心，离心过程中“IMBALANCE”灯亮表示转头没安装好或样品放置不对称；
10. 设定时间计算至0，或按“STOP”键或按“FAST STOP”键结束运行；
11. 仪器停止后，“OPEN DOOR”亮，按“OPEN DOOR”键，门锁释放打开门；
12. 取出转头，关闭仪器电源。

**(3) 注意事项**

1. 离心管一定要配套，不能用底部为尖的离心管，离心管大小不合适会影响仪器门盖盖严；
2. 离心中途需观察仪器运转是否正常；
3. 离心结束，转头停止运转后，方可打开门盖；
4. 关闭仪器电源，取出转头，用柔软干净的布擦拭转头和机腔内壁；
5. 保持仪器门盖处于打开状态，待机腔内温度与室温平衡后方可盖上！

### 4.2 Leica体式显微镜

**(1) 主要用途**

Leica体式显微镜是德国徕卡显微系统公司生产，10倍、20毫米视野高眼点目镜，4.4: 1连续变倍比，内置25000小时冷光源，6500K白光色温，同时具备投射/反射照明，主要用于观察生物细胞、生物切片。

**(2) 操作流程**

1. 插上显微镜电源线，打开显微镜左右两边靠里的灯；
2. **调节亮度：**打开显微镜左右两边靠外的螺钮，双手同时操作，旋扭调节亮度大小；
3. **放置样品：**样品放入培养皿，培养皿中加入少量水，这样不会使样品漂浮，观察时就不会出现两层，观察过程中可用解剖针翻动样品；
4. 通过调节显微镜高度、焦距、放大缩小的方式清楚观察样品：

**调节高度**：松开仪器背后黑色螺钮（手握主机，以免坠落），向上向下进行调节；双手同时操作调节焦距（大的蓝色螺钮）和放大缩小（小的蓝色螺钮）；

1. 如需电脑拍照，打开电脑，无密码直接进入，点击软件10Moons SDK-2000，点击“保存当前图像”，保存后点击“退出”。

 **(3) 注意事项**

1. 擦镜头时，镜头纸对折，从中间向周围擦，每次实验完毕，镜身要用纱布擦干净；
2. 载物台上的载玻片和盖玻片要清洁，切勿污染物镜或其它部件；
3. 实验结束后，将载物台降到最低点，并移开镜头。

## 第五节 分子生物学实验室

生态林业研究所公用实验室，为森林培育、生态学、林学等学科研究提供仪器设备和实验方法。目前实验室拥有C.B.S SCIENTIFIC dggek-4001-220 DGGE电泳仪、EPPENDORF、B10-RAD C1000 THERMAL CYCLER 普通PCR仪、BIO-RAD GS-800 光密度仪、CFX96 实时定量PCR仪、B10-RAD MOLECULAR IMAGER GEL DOC XR凝胶成相系统，可以进行检测DNA片段的单碱基突变、分析蛋白电泳胶片、动植物压缩标本以及凝胶电泳和转印膜的数字成像和分析等。

### 5.1 普通PCR仪

**(1) 主要用途**

THERMAL CYCLER普通PCR仪是BIO-RAD 公司成产，应用于PCR扩增、克隆、循环测序、基因表达及诱变的研究。

**(2) 操作流程**

1. 打开仪器背后的开关，仪器自检自动进行，时间一般为2-3分钟；
2. 放置样品：将绿色的固定架放入仪器内部，固定架两边有长短之分，短的一边朝下放置。用离心管装25-50 μl的样品溶液，盖好后放入固定架的小针孔内，盖上仪器门盖，朝Tighten方向旋紧，听见响一声即可；
3. 按“RUN”键，选择“PREVIOUS RUS”，选择方法（WCZZ0142为创建好的方法），按“RUN”键，设置参数：“Cycler”一般不设置，“Block”为样品槽，有A和B两个样品槽，选择即可，若A、B样品槽均选，点击左下“Select all”，设置完后，按“ENTER”键，此时出现“V”，按“RUN”键；
4. 设置样品体积“Sample volume”，设置完后按“OK”键，点击“RUN”，“Lid Temperature”保持105℃不变，当样品槽灯亮时，测定开始，此时仪器进行加热，界面显示“Cycler Block Status , Lid Preheating”；
5. 仪器测定过程中，点击“Status”可查看剩余时间“Remaining”，点击“Main Menu”，回到仪器主界面，显示“Running”表示测定正在进行，点击“Status”,回到正在测定的界面，测定期间需要取消，按“Cancle run”键，测定结束后关机。

**(3) 注意事项**

1. PCR仪使用的环境要恒定，工作环境的温度不能过高或过低，最好在有空调的房间中使用；
2. 实验结束后关闭仪器电源，不能开启过夜。

### 5.2 实时定量PCR仪

**(1) 主要用途**

CFX96实时定量PCR仪是BIO-RAD 公司成产，激发光/发射光波长范围为450-730 nm，样品容量为960.2 ml反应管，温度梯度范围30-100℃，不低于室温30℃。可同时检测5个目标基因，节约试剂和样品，使用温度梯度功能，可以使用多个参照基因进行基因表达分析。

**(2) 操作流程**

1. 打开电脑和PCR仪主机背后的电源开关，电脑密码为dell，同时打开UPS稳压器；
2. **放置样品：**待仪器自检完成后，双击桌面上图标，点击“Bio-Rad CFX Manager”软件，点击“update”，选择“cancle”，点击“Startup Wizard”，点击“Cancle”，确认仪器主界面上方显示“CFX cco15814”后，点击“Open Lid”，主界面显示“startup successful”时，直接放入样品，此时不需要放入固定架；
3. **样品测定：**点击“File”，选择“Open”，点击“protocol”，点击“桌面”，选择“Fungi5”，点击“OK”，此时出现“Run setup”界面，选择“Plate”，点击“express load（1…12）”，选择“edit selected”，用鼠标全部选上，点击“Scan Mode”，此时出现“SYBR/FAM only”，选择“Select Fluorophore”，当“Select Fluorophore”界面变为绿色后，选上“√”，点击“OK”，选择“Sample type”，点击“unknown”，选中待测的样品后点击“SYBR”；
4. 如果配有标曲，选中标曲，点击“Sample Type”，选择“standard”，进行标曲梯度序号的设定，选择“Replicate Series”，点击“vertical（纵向）”，选择“Apply”，设定浓度梯度，点击“Dilution series”，设置“Concentration（浓度）”，“from”设为1，“to”设为7，“Dilution Factor”设为10.000，设定好后点击“Apply”，点击“OK”，保存后点击“Run Setup”，选择“Start Run”，点击“Close Lid”，待“Start Run”灯点亮后，选中，保存之后，仪器开始测量；
5. 实验结束后，先关闭测量软件，再关闭仪器主机，最后关闭电脑。

**(3) 注意事项**

1. 按照正确的开关机顺序操作。开机顺序：电脑 PCR仪主机 PCR仪收集软件（主机面板上的绿灯亮后），关机顺序恰好相反；
2. 实验结束后关闭电源，不能开启过夜。

### 5.3 凝胶成像系统

**(1) 主要用途**

GEL DOC XR凝胶成像系统可应用于凝胶电泳和转印膜的数字成像和分析，系统包括密封暗箱、摄像头、白光和UV 光源、带琥珀型滤片的滤片环、UV 保护档板。

**(2) 操作流程**

1. 打开凝胶成像系统背后电源开关，开启电脑，电脑密码为1234；
2. 拉开仪器主机下面的样品槽，把样品胶放到样品槽的中间位置，不能用手直接接触样品槽，放上之后直接推入样品槽；
3. 双击桌面上图标，打开“zmagelab”软件，点击“新建”，选择“应用程序”，点击“选择”，点击“核酸凝胶”，选择“Ethidium Bromide”，点击“放置凝胶”，选择“Filter Position”，选择“滤光片1”，点击“确定”，此时仪器主机上面的黑杆移到滤光片1的位置；
4. 通过“照相机缩放”观察样品胶，样品胶位置不合适可以重新放入进行调整，点击“运行实验协议”，选择“保存”，实验结束后关闭软件，关闭仪器主机和电脑。

**(3) 注意事项**

1. 在将样品胶放入样品槽之前，应先在样品槽内铺一层保鲜膜，防止样品胶污染样品槽；
2. 实验结束后，将样品胶放到指定的回收地点，以防污染。

### 5.4 光密度扫描仪

**(1) 主要用途**

GS-800是BIO-RAD 公司成产，其分辨率为36.3 μm，波长范围为400-750 nm，动力学线性范围为0～3OD，采用12位（4096色）数据采集模式，彩色CCD摄相头可对任何具颜色的样品进行实时、高灵敏、高精度的扫描。具有较高的精确度、分辨率和图象质量，可分析蛋白电泳胶片、X光胶片、动植物压缩标本等各种透明、半透明和不透明的物质。

**(2) 操作流程**

1. 把加密狗插入电脑，打开扫描仪电源进行预热，仪器开关上面的两个灯均点亮时，表示仪器预热完成，打开电脑，密码为dell；
2. 双击桌面上图标，打开“Quantity one”软件，点击“Basic”，显示屏右上角“Quantity one Basic”界面，点击“select scanner”，选择“GS-800”，点击“step I”，按“Select”键，选择“Application”下拉菜单中的“Select”，选择“Gel”，点击“Silver stain”；
3. 点击“Step II”，选择“preview scan”，扫描完后点击“Stop”；
4. 用鼠标选中所需观察的样品胶位置，点击“Step III”，选择“Select”，点击“不同的分辨率”进行设定，选择好后点击“Done”，点击“Acquire”；
5. 如果扫描完成的图片出现黑白相间的现象，说明仪器预热没到时间。如果图片正常，关闭“Quantity one”，此时出现“Save: ?”，点击“Save”进行图片保存。

**(3) 注意事项**

分析扫描完成的图片，电脑上必须安装“Imagelab”软件，扫描的图片才能打开。

**表2 分子生物学实验室其它仪器概述**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **仪器名称** | **主要用途** | **注意事项** |
| Milli-Q超纯水机 | 超纯水制造 | 保持中端过滤器里没有空气，以免滋生细菌，不能放空水箱！电阻率达到18.2说明水质没问题，可以正常取水，水箱需用0.1 mol NaOH清洗，一年一次。 |
| 灭菌锅 | 土壤、植物等样品灭菌 | 使用前检查灭菌锅高水位灯是否亮着，不亮则需往灭菌锅内加入蒸馏水，灭菌完成后，待压力降到0后，拉开排气阀，开盖取出样品即可，如果样品是液体，灭菌完成后静置的时间应该更长一点。 |

# 第三章 土壤样品相关指标测定

## 第一节 土壤样品采集与处理

### 1.1 土样采集

**(1) 采集前的准备工作**

根据研究目的水选择具有代表性的土壤，确定采样地点，了解采样地区的生物气候等情况，决定采样时间。动手采样前应对采样地区的土壤、生物、气候等环境因子进行调查并记录，如地形、植被、土壤剖面形态、土壤水热状况、pH值、有机质含量、质地等。采样所用的工具、包装用塑料袋和其他器皿均应事先灭菌或用要采的土壤擦拭。

**(2) 采样程序**

1. 除去地表面的植被和枯枝落叶；
2. 铲除地表1厘米左右的表土，以避免地面微生物与土样中微生物混杂；
3. 多点采取重量大体相当的土样于塑料布上，剔除石砾、植被残根等杂物，混匀后取一定量装袋。取样点可以采用对角采样的办法或根据地形情况决定，也可以用随即取样或系统取样的方法；
4. 取样深度依研究设计来定，在同一剖面中分层取样时，应在挖好剖面后，先取下层土样，再取上层土样，以避免上下层混杂。

### 1.2 土样制备与保存

从野外取回的土样，经登记编号后，都需经过一个制备过程——风干、磨细、过混匀、装瓶，以备各项测定之用。

样品制备目的是：剔除土壤以外的侵入体（如植物残茬、昆虫、石块等）和新生体（如铁锰结核和石灰结核等），以除去非土壤的组成部分；适当磨细，充分混匀，使分析时所称取的少量样品具有较高的代表性，以减少称样误差；全量分析项目，样品需要磨细，以使分解样品的反应能够完全和彻底；使样品可以长期保存，不致因微生物活动而霉坏。

**(1) 新鲜样品和风干样品**

为了样品的保存和工作的方便，从野外采回的土样都先进行风干。但是，由于在风干过程中，有些成分如低价铁、铵态氮、硝态氮等会起很大的变化，这些成分的分析一般均用新鲜样品。在实验室测定土壤速效磷、钾时，仍以风干土为宜。采集到的土壤样品应尽快进行分析，存放的时间越短越好，鲜土需要在-4℃以下保存，风干土样则需要避光保存。

**(2) 样品的风干、制备和保存**

1. **风干：**将采回的土样，放在木盘中或塑料布上，摊成薄薄的一层，置于室内通风阴干。在土样半干时，须将大土块捏碎（尤其是黏性土壤），以免完全干后结成硬块，难以磨细。风干场所力求干燥通风，并要防止酸蒸气、氨气和灰尘的污染。样品风干后，应拣去动植物残体如根、茎、叶、虫体等和石块、结核（石灰、铁、锰），如果石子过多，应当将拣出的石子称重，记下所占的百分比；
2. **粉碎过筛：**风干后的土样，倒入钢玻璃底的木盘上，用木棍研细，使之全部通过2 mm孔径的筛子。充分混匀后用四分法分成两份，一份作为物理分析用，另一份作为化学分析用。作为化学分析用的土样还必须进一步研细，使之全部通过1 mm或0.5 mm孔径的筛子。1927年国际土壤学会规定通过2 mm孔径的土壤作为物理分析之用，能过1 mm孔径作为化学分析之用，人们一直沿用这个规定。

但近年来很多分析项目趋向用于半微量的分析方法，称样量减少，要求样品的细度增加，以降低称样的误差。因此现在有人使样品通过0.5 mm孔径的筛子。但必须指出，土壤pH、交换性能、速效养分等测定，样品不能研的太细，因为研得过细，容易破坏土壤矿物晶粒，使分析结果偏高。同时要注意，土壤研细主要使团粒或结粒破碎，这些结粒是由土壤黏土矿物或腐殖质胶结起来的，而不能破坏单个的矿物晶粒。因此，研碎土样时，只能用木棍滚压，不能用榔头锤打。因为晶粒破坏后，暴露出新的表面，增加有效养分的溶解；

1. **保存：**一般样品用磨口塞的广口瓶或塑料瓶保存半年至一年，以备必要时查核之用，样品瓶上标签须注明样号、采样地点、土类名称、试验区号、深度、采样日期、筛孔等项目。

## 第二节 土壤物理性质分析

### 2.1 土壤温度测定

土壤温度采用纽扣式温度计测定，通常土壤有机层应埋入距地表5 cm深处，矿质土壤层埋入地表20 cm深处，可根据实际土层厚度做调整。

### 2.2 土壤水分测定

**(1) 方法原理**

　土壤样品在105±2℃烘至恒重时的失重，即为土壤样品所含水分的质量。 根据土壤含水量可计算出以水层厚度(mm)表示的不同土层内的水贮量。

**(2) 仪器设备**

土钻；土壤筛：孔径1 mm；铝盒：小型的直径约40 mm，高约20 mm；大型的直径约55 mm，高约28 mm；分析天平：感量为0.001 g和0.01 g；小型电热恒温烘箱；干燥器：内盛变色硅胶或无水氯化钙。

**(3) 试样的选取和制备**

1. 风干土样：选取有代表性的风干土壤样品，压碎，通过1 mm筛，混合均匀后备用；
2. 新鲜土样：在田间用土钻取有代表性的新鲜土样，刮去土钻中的上部浮土，将土钻中部所需深度处的土壤约20 g，捏碎后迅速装入已知准确质量的大型铝盒内，盖紧，装入木箱或其他容器，带回室内，将铝盒外表擦拭干净，立即称重，尽早测定水分。

**(4) 测定步骤**

1. 风干土样水分的测定：取小型铝盒在105℃恒温箱中烘烤约2 h，移入干燥器内冷却至室温，称重，准确至0.001 g。用角勺将风干土样拌匀，舀取约5g，均匀地平铺在铝盒中，盖好，称重，准确至0.001 g。将铝盒盖揭开，放在盒底下，置于已预热至105±2℃的烘箱中烘烤6 h。取出，盖好，移入干燥器内冷却至室温（约需20 min），立即称重。风干土样水分的测定应做两份平行测定；
2. 新鲜土样水分的测定：将盛有新鲜土样的大型铝盒在分析天平上称重，准确至0.01 g。揭开盒盖，放在盒底下，置于已预热至105±2℃的烘烤箱中烘烤12 h。取出，盖好，在干燥器中冷却至室温（约需30 min），立即称重。新鲜土样水分的测定应做三份平行测定。

注：烘烤规定时间后一次称重，即达“恒重”。

**(5) 结果计算**

水分（分析基），%=[(m1-m2)/(m1-m0)]×100

水分（干基），%=[(m1-m2)/(m2-m0)]×100

式中：

m0—烘干空铝盒质量，g；

m1—烘干前铝盒及土样质量，g；

m2—烘干后铝盒及土样质量，g。

平行测定的结果用算术平均值表示，保留小数后一位。

平行测定结果的相差，水分小于5%的风干土样不得超过0.2%，水分为5～25%的潮湿土样不得超过0.3%，水分大于15%的大粒（粒径约10 mm）粘重潮湿土样不得超过0.7%（相当于相对相差不大于5%）。

### 2.3 土壤容重测定

**(1) 测定步骤**

1. 在田间选择挖掘土壤剖面的位置，按使用要求挖掘土壤坡面，如只测量耕层土壤容重，则无需挖剖面；
2. 用修土刀修平土壤剖面，并记录土壤剖面的形态特征，按剖面层次，分层采样，耕层重复4次，下面层每层重复3次；
3. 将环刀托放在已知重量的环刀上，在环刀内壁擦上些许凡士林，将环刀刀口向下压入土中，直至环刀充满土为止；
4. 用修土刀切开周围的土样，取出已经充满土的环刀，削去环刀两端多余的土壤，并擦干净环刀外壁的土壤，同时，在同层取样处，用铝盒采样，用于测定土壤含水量；
5. 把装有土样的环刀两端立即加盖，以避免水分蒸发，随即称重；
6. 将装有土样的铝盒烘干称重，测定土壤含水量，或者直接从环刀内取出土样测定土壤含水量。

**(2) 结果计算**

Pb=m/ [V\*(1+θm)]

式中：

Pb—土壤容重，g·cm-3；

m—环刀内湿土的质量，g；

V—环刀容积，cm3；

θm—样品含水量，%。

### 2.4 土壤比重测定

**(1) 测定步骤**

1. 称通过1 mm筛孔的土壤风干样品10 g(精确到0.001)、装入容积为50 mL的比重瓶内；
2. 向瓶内加注蒸馏水、约至容积的一半，徐徐摇动，使土样充分湿润，与水混合均匀；
3. 将比重瓶置沙浴上加热煮沸，并保持1小时、其间需经常摇动比重瓶，以驱逐土壤中的空气；
4. 冷却比重瓶，再加入蒸馏水，至略低于瓶颈处静置澄清；
5. 冷却澄清后，稍加蒸馏水至瓶颈，塞好瓶塞，使多余水分溢出；
6. 用滤纸檫干水分，称重（精确至0.001 g）(g2)；
7. 另作一次不加土壤、只有蒸馏水注满时的称重(g1)。

**(2) 结果计算**

d=g/g+g1-g2 (g/cm3)

式中：

g—烘了土重（由吸湿系数换算）；

g1—比重瓶+水重；

g2—比重瓶+水重+土样重。

### 2.5 土壤孔隙度测定

土壤的比重是土壤同相物质的重量与纯粹固相体积的比值，而士壤的容重是土壤固相物质的重量与原状土壤体积（固相体积+ 孔隙体积）的比值，因此有了土壤的容重和比重，就可直接计算土壤的孔隙度，公式如下：

P%=(1- Pb /d)×100%

式中：

Pb—土壤容重，g·cm-3；

d—土壤比重。

### 2.6 土壤酸碱度测定

**(1) 试剂制备**

1. pH标准缓冲液：将pH 4.00、pH 6.84、pH 9.18对应的pH缓冲剂溶于水，定容至250 ml；
2. 氯化钾溶液[1 mo1·L-1]：74.6 g氯化钾(KCI，化学纯)溶于400 ml水中，该溶液pH要在5.5 ~ 6.0之间，然后稀释至1 L；
3. 氯化钙溶液[0.01 mo1·L-1]：147.02 g氯化钙(CaC12·2H2O，化学纯)溶于200 ml水中，定容至1 L，即为1.0 mol·L-1氯化钙溶液。吸取10 ml 1.0 mol·L-1氯化钙溶液于500 mL烧杯中加400 mL水，用少量氢氧化钙或盐酸调节pH为6左右，然后定容至1 L即为0.01 mo1·L-1的氯化钙溶液。

**(2) 测定步骤**

1. **待测液的制备：**称取过2 mm筛的风干土样10 g于50 mL高型烧杯中，加入25 mL无二氧化碳的水或1.0 mo1·L-1氯化钾溶液(酸性土测定用)或0.01 mo1·L-1氯化钙溶液(中性、石灰性或碱性土测定用)。枯枝落叶层或泥炭层样品称5 g，加水或盐溶液50 mL，用玻璃棒剧烈搅动1~2 min，静置30 min，此时应避免空气中氨或挥发性酸等的影响；
2. **仪器校正：**用与土壤浸提液pH值接近的缓冲液校正仪器，使标准缓冲液的pH值与仪器标度上的pH值相一致；
3. **测定：**在与上述相同的条件下，把玻璃电极与甘汞电极插人土壤悬液中，测pH值。每份样品测完后，即用水冲洗电极，并用干滤纸将水吸千。

## 第三节 土壤碳的测定

### 3.1 土壤有机碳测定

**(1) 试剂制备**

1. 重铬酸钾溶液[0.8 mo1·L-1]：39.2245 g 重铬酸钾（K2Cr2O7，分析纯）加400 mL水，加热溶解，冷却后定容至1 L；
2. 硫酸亚铁溶液[0.2 mo1·L-1]：55.60 g 硫酸亚铁（FeSO4·7H2O，化学纯）溶于1 L蒸馏水(加浓硫酸15 mL防氧化)，用0.1000 mo1·L-1的 K2Cr2O7标准溶液标定；
3. 邻菲罗啉指示剂：邻菲罗啉(C12H8N2·H2O) 1.4850 g邻菲罗啉（C12H8N2·H2O）与0.6950 g硫酸亚铁（ FeSO4·7H2O）溶于100 mL蒸馏水，贮于棕色瓶；
4. 浓硫酸[H2SO4密度1.84 g·ml，分析纯]。

**(2) 测定步骤**

1. 称样：称取自然风干的过100目（0.149 mm）筛孔的风干土壤0.0100 g左右，置于消煮管底部；
2. 加粉末状硫酸银0.1 g，然后准确加入5.00 mL 重铬酸钾溶液和5 mL硫酸摇匀，放在预热到220~230℃的消煮炉上消煮15 min，冷却后洗涤转移消煮管内所有液体（洗后液体体积为50 mL左右），加4滴邻菲罗啉指示剂；
3. 用标定的硫酸亚铁滴定残余重铬酸钾，溶液颜色变化为橙黄→灰绿→棕红。

注：当样品滴定所用硫酸亚铁的体积达不到空白标定所用硫酸亚铁的体积的1/3时，则需要减少土样的重量，每批样品做2~3个二氧化硅（0.5 g）空白。

**(3) 结果计算**

$$OM=\frac{\frac{c×V\_{1}}{V\_{0}}×(V\_{0}-V)×M×1.724×1.08}{m×10^{3}}×100$$

式中：

OM—(organic matter)土壤中有机质的质量分数，%；

c—重铬酸钾标准溶液的浓度，mo1·L-1；

V1—加入重铬酸钾标准溶液的体积，mL；

V0—空白标定用去硫酸亚铁溶液的体积，mL；

V—滴定图样用去硫酸亚铁溶液的体积，mL；

M—1/4C的摩尔质量，M（1/4C）=3 g·mol-1；

10-3—将mL转换为L的换算系数；

1.08—氧化校正系数（按平均回收率92.6 %计算）；

1.724—将有机碳换算成有机质的系数（按土壤有机质的平均含碳量为58 %计）；

m—风干土样的质量。

### 3.2 溶解性有机碳测定

称取过2 mm筛新鲜土样10 g于小白瓶中，加入去离子水50 ml（水土比例5:1），密封上振荡器持续震荡4 h，用定性滤纸过滤收集滤液，滤液用0.45微米滤膜再次过滤，液体上机即可(TOC)。溶解性有机碳占土壤总有机碳的比例很小，一般不作为衡量有机碳质量的重要指标。但是它作为微生物生长的主要能源，在提供土壤养分方面具有重要作用。

### 3.3 易氧化有机碳测定—高锰酸钾氧化法

**(1) 试剂制备**

1. 配置333 mmol/L的高锰酸钾溶液500 ml：称取26.307 g KMnO4溶于500 ml水中，盖上表面皿，加热至沸并保持微沸状态1 h，冷却后于室温放置2-3天后，用砂芯漏斗过滤，滤液贮存于清洁带塞的棕色瓶中；
2. 标准33.3 mmol/L KMnO4溶液：2.6307 g KMnO4定容到500 ml；
3. 标准3.33 mmol/L KMnO4溶液：吸取33.3 KMnO4溶液100 ml定容到1L；
4. 标准曲液浓度：移液枪吸取33、34、35、36、37、38、39、40 ml的3.33 mmol/L的KMnO4溶液转入100 ml容量瓶，定容。则该系列的浓度为：1.099、1.132、1.166、1.199、1.232、1.265、1.299、1.332 mmol/L，以高锰酸钾浓度为横坐标，吸光值为纵坐标计算。

**(2) 测定步骤**

1. 称取过0.5 mm筛含15 mg碳左右的风干土，装入50 ml离心管内，加入333 mmol/L的高锰酸钾溶液25 ml，然后用移液枪取上清液0.4 ml用去离子水按1:250稀释，装入100 ml的容量瓶中。将液体在565 nm的分光光度计上比色，其标准液的浓度范围一定要包含1 mg碳，根据高锰酸钾溶液的消耗量，可求出易氧化有机碳土壤样品的碳含量。每消耗1 mmol高锰酸钾溶液相当于消耗氧化碳0.75 mmol碳(或9 mg碳)；
2. 25℃条件下，取三份含有15 mg碳的土壤样品，装入50 ml离心管内，加333 mmol/L的高锰酸钾溶液25 ml，密封瓶口，以25 r/min振荡1 h；
3. 振荡后的样品以2000 r/min离心5 min，然后用移液枪取上清液0.4 ml用去离子水按1: 250稀释，装入100 ml的容量瓶中；
4. 上述稀释液在565 nm的分光光度计上比色，其标准液的浓度范围一定要包括1 mg碳，根据高锰酸钾的消耗量，可求出易氧化土壤样品的含碳量。计算结果得出：每消耗1 mmol高锰酸钾溶液相当于氧化碳0.75 mmolC（或9 mgC）；
5. 最后，设置空白样品并用同样的方法配置标准曲线。

### 3.4 活性有机碳测定—H2SO4水解法

 **(1) 试剂制备**

1. 2.5 mol/L 硫酸：吸取133.15 ml浓硫酸定容到1 L；
2. 13 mol/L 硫酸：吸取173.10 ml浓硫酸定容到250 ml。

**(2) 测定步骤**

1. 称取过0.3 mm（48目）筛风干土0.5 g于50 ml离心管中，加入20 ml 2.5 mol/L硫酸，放入水浴锅中水解（105℃, 30 min），水解后离心5分钟（5000/min），上清液转移至100 ml三角瓶内，再用20 ml去离子水冲洗离心管中的样品，再离心5分钟（5000/5 min），清洗液同样倒入三角瓶内，这部分液体包含的碳即为土壤活性碳库I(Labile pool carbon I (LPI-C))；
2. 剩余土壤残渣用2 ml 13 mol/L硫酸在室温下浸提一夜，然后提取液用去离子水稀释到1 mol/L（24 ml去离子水稀释），再在水浴锅中水解（3 h，105℃），水解后离心5分钟（5000/min），提取液转移至100 ml三角瓶内，这部分液体被称为活性碳库II (Labile pool carbon II (LPII-C))。最后所得提取液上机（TOC）即可测得活性碳含量。

通过差减法我们可以计算出样品中惰性有机碳含量：

惰性有机碳=TOC-(LPI-C+LPII-C)

### 3.5 惰性有机碳测定—HCl水解法

称取过2 mm筛的风干土2 g放于消煮管中，然后加入6 mol/L盐酸20 ml，用可调温度的消煮板在115℃下消煮16 h，消煮过程中不断摇晃试管洗掉试管壁上积聚物质，样品冷却后用蒸馏水洗至中性，然后在 55℃下烘干，研磨过165 µm筛，用重铬酸钾容量法-外加热法测得的有机碳即为惰性碳。

### 3.6 轻组有机碳、重组有机碳测定

密度分组是采用一定相对密度的溶液将土壤中相对密度较低的游离态有机物质和相对密度较高的有机无机复合体分离开来的过程，其中悬浮液为轻组有机碳( LF) ，沉淀部分为重组有机碳( HF) 。

**(1) 试剂制备**

1.7 g/ml 碘化钠(NaI)溶液：称取199 g NaI溶于150 ml蒸馏水即得此密度溶液。

**(2) 测定步骤**

1. 称取过2 mm筛风干土10 g放入50 ml的离心管中，加入1.7 g/ml NaI重夜25 ml，密封震荡1 h，在离心机上离心10分钟(3000 r/min)，将上清液全部倒入到0.45 m滤膜上真空抽滤，滤纸上的轻组有机碳用不少于100 ml 的0.01 mol/L CaCl2溶液清洗，再用不少于100 ml的蒸馏水清洗，将滤纸上的轻组有机碳转移到已称重的铝盒中；
2. 向离心管中加入20 ml NaI重夜，重复上述过程2次，以保证样品中轻组部分分离干净，3次得到的轻组有机碳合在一起，在60℃下烘干，称得的重量与空烧杯重量之差，即是轻组有机质的质量，然后用重铬酸钾——氧化法滴定其有机碳含量即可；
3. 离心管底部残渣用0.01 mol/L CaCl2溶液清洗干净，导入已称重的铝盒中完全烘干（60℃，2d），通过重铬酸钾滴定法可以测得重组有机碳含量。

### 3.7 土壤有机碳粒径测定

粒径分组的基础是土壤有机碳与不同土粒结合，导致有机碳的结构和功能不同。根据粒级大小不同将其分为5 个组分: 砂粒( 53～2 000 μm) 、粗粉粒( 5～53 μm) 、细粉粒( 2～5 μm) 、粗黏粒( 0. 2～2 μm) 和细黏粒(＜0. 2 μm) 。

测定方法：称取10 g过2 mm筛的风干土样于250 mL的烧杯中，加100 mL水，于超声波发生器上超声30 min，过53 μm筛，在筛上得到的是53～2 000 μm的砂粒组分，然后根据Stockes定律计算每个粒级颗粒分离的时间进行分离，通过不同的离心时间和离心速度分离得到5～53 μm的粗粉粒、2～5 μm的细粉粒、0. 2～2 μm 的粗黏粒和＜0. 2 μm的细黏粒。其中细粉粒和细黏粒悬液采用0.2 mol /L CaCl2絮凝，再离心收集，各组分转移至铝盒在60℃烘箱中烘干至恒重，测碳含量即可。

### 3.8 土壤颗粒有机碳测定

**(1) 试剂制备**

六偏磷酸钠（5 g/L）：5 g六偏磷酸钠溶于600 ml蒸馏水中，定容至1 L。

**(2) 测定步骤**

称取过2 mm筛风干土样10 g（M0），倒入250 ml三角瓶内，加入100 ml六偏磷酸钠（5 g/L）溶液，手摇1分钟后，震荡18 h（常温，90转）。将土壤悬浮液全部过53 m（270目）筛，反复用去蒸馏水冲洗至过滤水为无色，收集筛上的土样（>53m）到已称重的铝盒(M1)中，60℃烘干2 d后称重（M2）。将铝盒内土样研磨后过100目（150m）筛，分析全碳含量（M）。测定POC碳含量后根据团聚体质量含量/土壤容重和土壤深度计算土壤颗粒有机碳储存。

**(3) 结果计算**

土壤POC含量（g/kg）计算公式：

$$POC=M×\frac{M2-M1}{M0×K}$$

M0为风干土质量；M1为铝盒质量；M2为烘干后土样和铝盒的总质量；K为风干土和烘干土的换算系数。

## 第四节 土壤氮的测定

### 4.1 土壤全氮测定

**(1) 试剂制备**

1. 氢氧化钠溶液[400 g/L]：称取氢氧化钠（NaOH，分析纯）400 g溶于蒸馏水，定溶至1 L；
2. 浓硫酸[H2SO4密度1.84 g· ml-1，分析纯]；
3. 硼酸溶液[20 g/L]：硼酸（H3BO3，分析纯）20 g溶于蒸馏水，定溶至1 L；
4. 混合指示剂：溶解0.099 g的溴甲酚绿和0.066 g的甲基红于100 mL的乙醇中；
5. 硼砂标准溶液[0.0100 mol/L]：称1.9068 g硼砂（Na2B4O7·10H2O ）溶于蒸馏水，定溶至1 L；
6. 盐酸标准溶液[0.0100 mol/L]：量取8.4 mL浓盐酸溶于蒸馏水，定溶至1 L中，即为0.1 mol/L HCl，再稀释10倍，用0.0100 mol/L硼砂(Na2B4O7)标准溶液标定；
7. 吸取20 mL 0.0100 mol/L硼砂标准溶液于100 mL锥形瓶中，加1滴甲基红-溴甲酚绿混合指示剂，用待标定的盐酸滴定，溶液由蓝变紫红为终点，重复做三次，盐酸标准溶液的浓度：

CHCl= (0.0100×V1)/(V2-V0)

式中：

0.0100—硼砂标准溶液的浓度(mol/L)；

V1—硼砂标准溶液的体积(mL)；

V2—滴定硼砂用去盐酸标准溶液的体积(mL)；

V0—滴定水用去盐酸标准溶液的体积(mL)。

**(2) 测定步骤**

1. 准确称取干土0.2000 -0.2050 g置于消煮管底部，加定氮片一颗，加10 mL浓H2SO4过夜；
2. 消煮；
3. 直接上机蒸馏：锥形瓶中用移液枪加5 mL硼酸溶液（ 20 g/L）和2-3滴混合指示剂（甲基红-溴甲酚绿指示剂），蒸馏前需加水稀释消煮管中液体，安装于凯氏定氮仪，加碱时间最好为十秒，蒸馏4 min左右；
4. 滴定：用盐酸标准溶液（0.0100 mol/L HCl）滴定，溶液由蓝绿色经透明突变到紫红色为终点，记下用去盐酸标准溶液的毫升数。与此同时，进行试剂空白试验的蒸馏与滴定，以校正试剂的误差。（滴定之前应用硼砂滴定，确保盐酸浓度无误）

**(3) 结果计算**

WN =[(V-V0)×C×0.014×103]/m

式中：

WN——全氮含量(g/kg)；

V —滴定样品用去盐酸标准溶液体积(mL)；

V0——滴定试剂空白试验用去盐酸标准溶液体积(mL)；

C—盐酸标准 溶液的浓度(mol/L)；

0.014—氮原子的摩尔质量(g/mmol)；

m—样品干质量(g)。

### 4.2 土壤可溶性氮测定—碱解扩散法

**(1) 方法原理**

在密封的扩散皿中，用1.8 mol/L氢氧化钠(NaOH)溶液水解土壤样品，在恒温条件下使有效氮碱解转化为氨气状态，并不断地扩散逸出，由硼酸(H3BO3)吸收，再用标准盐酸滴定，计算出土壤可溶性氮的含量。

**(2) 仪器设备**

扩散皿、微量滴定管、1/1000分析天平、恒温箱、玻璃棒  毛玻璃、皮筋、吸管(2 ml和10 ml)、腊光纸、角匙、瓷盘。

**(3) 试剂配制**

1. 1.8 mol/L氢氧化钠溶液：称取化学纯氢氧化钠72 g，用蒸馏水溶解后冷却定容到1000 ml；
2. 1.2 mol/L氢氧化钠溶液：称取化学纯氢氧化钠48 g，用蒸馏水溶解定容到1000 ml；
3. 2%硼酸溶液：称取20 g硼酸，用热蒸馏水(约60℃)溶解，冷却后稀释至1000 ml，用稀盐酸或稀氢氧化钠调节pH至4.5(定氮混合指示剂显葡萄酒红色)；
4. 0.01 mol/L盐酸标准溶液：先配制1.0 mol/L盐酸溶液，然后稀释100倍，用标准碱标定；
5. 定氮混合指示剂：称取0.1 g甲基红和0.5 g溴甲酚绿指示剂放入玛瑙研钵中，加入100 ml 95%酒精研磨溶解，此液应用稀盐酸(HCl)或氢氧化钠(NaOH)调节pH至4.5；
6. 特制胶水：阿拉伯胶(称取10 g粉状阿拉伯胶，溶于15 ml蒸馏水中)10份、甘油10份，饱和碳酸钾5份混合即成(最好放置在盛有浓硫酸的干燥器中以除去氨)；
7. 硫酸亚铁(粉状)：将分析纯硫酸亚铁磨细保存于阴凉干燥处。

**(4) 测定步骤**

1. 称取通过18号筛(孔径1 mm)风干样品2 g(精确到0.001g)和1 g硫酸亚铁粉剂，均匀铺在扩散皿外室内，水平地轻轻旋转扩散皿，使样品铺平；
2. 用吸管吸取2%硼酸溶液2 ml，加入扩散皿内室，并滴加1滴定氮混合指示剂，然后在皿的外室边缘涂上特制胶水，盖上毛玻璃，并旋转数次，以便毛玻璃与皿边完全粘合，再慢慢转开毛玻璃的一边，使扩散皿露出一条狭缝，迅速用移液管加入10 ml 1.8 mol/L氢氧化钠于皿的外室，立即用毛玻璃盖严；
3. 水平轻轻旋转扩散皿，使碱溶液与土壤充分混合均匀，用橡皮筋固定，贴上标签，随后放入40℃恒温箱中，24小时后取出，再以0.01 mol/L HCl标准溶液用微量滴定管滴定内室所吸收的氮量，溶液由蓝色滴至微红色为终点，记下盐酸用量毫升数V。同时要做空白试验，滴定所用盐酸量为V0。

**(5) 结果计算**

可溶性氮(mg/100 g土)= N×(V-V0)×14／样品重×100

式中：

N—标准盐酸的摩尔浓度；

V—滴定样品时所用去的盐酸的毫升数；

V0—空白试验所消耗的标准盐酸的毫升数；

14—一个氮原子的摩尔质量mg/mol；

100—换算成每百克样品中氮的毫克数。

**(6) 注意事项**

1. 滴定前首先要检查滴定管的下端是否充有气泡，若有，首先要把气泡排出；
2. 滴定时，标准酸要逐滴加入，在接近终点时，用玻璃棒从滴定管尖端沾取少量标准酸滴入扩散皿内；
3. 特制胶水一定不能沾污到内室，否则测定结果将会偏高；
4. 扩散皿在抹有特制胶水后必须盖严，以防漏气。

### 4.3 土壤铵态氮测定

**(1) 试剂制备**

1. 氯化钾溶液[2 mol·L-1 ]：称取149.1 g 氯化钾（KCl，化学纯）溶于蒸馏水中，定容至1 L；
2. 苯酚溶液：称取10 g 苯酚（C6H5OH，化学纯）和0.100 g 硝普钠（Na2Fe(CN)5NO·2H2O，化学纯），用蒸馏水定容至1 L，用棕色瓶贮存于4℃的冰箱中；
3. 次氯酸钠碱性溶液：称取10 g 氢氧化钠（NaOH，化学纯）、7.06 g 七水合磷酸氢二钠（Na2HPO4·7H2O化学纯）、31.8 g 十二水合磷酸三钠（Na3PO4·12H2O，化学纯）和量取10 mL 次氯酸钠（NaOCl，化学纯），稀释至1 L，用棕色瓶贮存于4℃的冰箱中；
4. 掩蔽剂：将400 g·L-1 酒石酸钾钠（KNaC4H4O6·4H2O，化学纯）溶液与100 g·L-1 的EDTA二钠盐（C10H14O8N2Na2·2H2O，化学纯）溶液等体积混合，每100 mL 混合液中加入0.5 mL 氢氧化钠（10 mol·L-1）溶液；
5. NH4+-N标准液[5 μg·mL-1]：称取0.4717 g干燥的硫酸铵（(NH4)2SO4，分析纯）溶于蒸馏水，定容至1 L，即配成100 μg·mL-1的标准液，使用前加水稀释20倍，即配成5 μg·mL-1的NH4+-N标准液。

**(2) 测定步骤**

1. 称取10.00 g新鲜土样于100 mL三角瓶中，加入50 mL氯化钾溶液，震荡30 min，用中速定性滤纸过滤；
2. **比色：**吸取2~10 mL（一般为5 mL）到50 mL容量瓶中，用2 mol·L-1的氯化钾溶液补充至10 mL，加水稀释至30 mL，然后依次加入5 mL苯酚溶液和5 mL次氯酸钠碱性溶液，摇匀，室温（20℃）放置1 h后加掩蔽剂1 mL，然后定容，2 h后在分光光度计上625 nm波长处比色，读取吸光度；
3. **绘制标准曲线：**分别吸取0、0.5、1、2、3、4、5 mL 5 μg·mL-1的NH4+-N标准液于50 mL的容量瓶中，各加氯化钾溶液10 mL，同步骤②。

**(3) 结果计算**

$W\left(NH\_{4}^{+}\right)=\frac{c×V×ts}{m}$×1000

式中：

W(NH4+)—土壤NH4+-N含量，mg·kg-1；

c—从标准曲线查得显色液中NH4+-N的浓度，μg·mL-1；

V—显色液的体积，mL；

ts—分取倍数，ts= 待测液体积(ml)/测定时吸取待测液体积(ml)=50/2~10；

m—烘干土样质量，g。

### 4.4 土壤硝态氮测定

**(1) 试剂制备**

1. 盐酸溶液：量取84 mL HCl（分析纯）溶液定容到1 L的容量瓶中；
2. 氯化钾溶液[2 mol·L-1]：称取149.1 g氯化钾溶于蒸馏水，定容至1 L；
3. 硝态氮标准溶液[10 ppm]：0.772 g干燥的硝酸钾（KNO3，分析纯）溶于水，定容至1 L，此为100 ppm硝态氮溶液，将此溶液准确稀释10倍，即为10 ppm硝态氮标准溶液（取5 mL定容至50 mL容量瓶中）。

**(2) 测定步骤**

1. 称取10.00 g新鲜土样于100 mL三角瓶中，加入50 mL 氯化钾溶液，震荡30 min，用中速定性滤纸过滤；
2. **比色：**吸取2~10 mL（一般为10 mL）到50 mL容量瓶中，加入1 mL 盐酸（HCl，1 mol·L-1）溶液，然后用蒸馏水定容，显色1 h后在分光光度计上220 nm、 275 nm波长处比色，读取吸光度（该液体无色）；
3. **绘制标准曲线：**分别吸取0、1、2、5、10、15、20 mL 10 ppm的NO3--N标准液于50 mL的容量瓶中，同步骤②。

**(3) 结果计算**

$$ω\left(NO\_{3}^{-}\right)=\frac{c×V×ts}{m}$$

式中：

ω(NO3-)——土壤NO3--N含量，mg·kg-1；

c——从标准曲线查得显色液中NH4+-N的浓度，μg·mL-1；

V——显色液的体积，mL；

ts—分取倍数，ts= 待测液体积(ml)/测定时吸取待测液体积(ml)=50/2~10；

m——烘干土样质量，g。

### 4.5 土壤亚硝态氮测定

**(1) 试剂制备**

1. 氯化钾溶液[2 mol·L-1]：称取149.1 g氯化钾溶于水，稀释定容至1 L；
2. 浓氯化铵溶液：称取100 g氯化铵溶于水，稀释至500 mL；
3. 稀氯化铵溶液：吸取50 mL浓氯化铵溶液，用去离子水稀释至2 L；
4. 重氮化试剂：称取0.5 g磺胺（C6H8N2O2S）溶于100 mL盐酸[2.4 mol·L-1]，储存于4℃的冰箱中；
5. 偶合试剂：称取0.3 g的N-1萘基-乙二胺二盐酸盐（C12H14N2·2HCl，化学纯）溶于100 mL盐酸溶液[0.12 mol·L-1]，储存于棕色瓶，放于冰箱中；
6. 亚硝态氮标准液[ρ(NO2--N)=1000 mg·L-1]：称取1.500 g亚硝酸钠（NaNO2，分析纯）于烧杯中，加蒸馏水溶解后定容至1 L，使用时吸取10 mL于1 L容量瓶中，定容得到[ρ(NO2-=10 mg·L-1]，此液应现配现用。

**(2) 测定步骤**

1. 称取10 g过2 mm筛孔的鲜土于100 mL广口瓶内，加入氯化钾溶液50 mL，置于振荡器上振荡30 min，用中速定性滤纸过滤；
2. 吸取15 ml滤液于50 ml容量瓶中，依次加入1 ml浓氯化铵，25 ml稀氯化铵，2 ml重氮化试剂和2 ml耦合试剂于上述容量瓶中，摇匀定溶；20 min后在540 nm波长处比色，以空白试剂为对照，测定吸光度；
3. 工作曲线：分别吸取硝态氮标准溶液[ρ(NO2--N)=1000 mg·L-1]0、0.5、1、2、3、3.5、4、5、7、10 mL，分别加入还原柱中，按样品测试顺序进行还原和比色。

**(3) 结果计算**

$$ω\left(NO\_{3}^{-}/NO\_{2}^{-}\right)=\frac{c×V×ts}{m}$$

式中：

ω(NO2-)——土壤中亚硝态氮的含量，mg·kg-1；

c——显色液硝态氮或亚硝态氮的质量浓度，mg·mL-1；

V——比色时定容的体积，mL；

ts—分取倍数，ts= 待测液体积(ml)/测定时吸取待测液体积(ml)=50/2~10；

m——烘干土样质量，g。

### 4.6 土壤矿化氮测定

#### 4.6.1 厌气培养法

**(1) 方法原理**

用浸水保温法（Water-logged incubation）处理土壤，利用嫌气微生物在一定温度下矿化土壤有机氮成为NH4＋—N，再用2 mol·L-1 KCl溶液浸提，浸出液中的NH4＋—N，用蒸馏法测定，从中减去土壤初始矿质氮（即原存在于土壤中的NH4＋—N和NO3－—N），得土壤矿化氮含量。

**(2) 仪器设备**

恒温生物培养箱、振荡器、半微量定氮蒸馏器、半微量滴定管（5 mL）。

**(3) 试剂配制**

1. 0.02 mol·L-1 (1/2 H2SO4)标准溶液：先配制0.10 mol·L-1 (1/2 H2SO4)溶液，然后标定，再准确稀释而成；
2. 2.5 mol·L-1 KCl：称取KCl（化学纯）186.4 g，溶于水定容1 L；
3. FeSO4—Zn粉还原剂：将FeSO4·7 H2O（化学纯）50.0 g 和Zn粉10.0 g共同磨细（或分别磨细，分别保存，可数年不变，用时按比例混合）通过60号筛，盛于棕色瓶中备用（易氧化，只能保存一星期）；
4. 20 g·L -1硼酸—指示剂：20 g H3BO3（化学纯）溶于1 L水中，每升H3BO3溶液中加入甲基红—溴甲酚绿混合指示剂5 mL，并用稀酸或稀碱调节至微紫红色，此时该溶液的pH为4.8。指示剂用前与硼酸混合，此试剂宜现配，不宜久放；
5. 120 g·L–1 MgO悬浊液：MgO 12 g经500～600℃灼烧2 h，冷却，放入100 mL水中摇匀。

**(4) 测定步骤**

1. 土壤矿化氮和初始氮之和的测定：称取20目风干土样20.0 g，置于150 mL三角瓶中，加蒸馏水20.0 mL，摇匀。要求土样被水全部覆盖，加盖橡皮塞，置于40±2℃恒温生物培养箱中培养一星期（七昼夜）取出，加80 mL 2.5 mol·L-1 KCl溶液，再用橡皮塞塞紧，在振荡机上振荡30 min，取下立即过滤于150 mL三角瓶中，吸取滤液10.0～20.0 mL注入半微量定氮蒸馏器中，用少量水冲洗，先将盛有20 g·L-1硼酸—指示剂溶液10.0 mL的三角瓶放在冷凝管下，然后再加120 g·L-1 MgO悬浊液10 mL于蒸馏器中，用少量水冲洗，随后封闭。再通蒸汽，待馏出液约达40 mL时（约10 min），停止蒸馏，取下三角瓶用0.02 mol·L-1 (1/2 H2SO4)标准液滴定，同时做空白试验；
2. 土壤初始氮的测定：称取20目筛的风干土样20.0 g，置于250 mL三角瓶中，加2 mol·L-1 KCl溶液100 mL，加塞振荡30 min，过滤于150 mL三角瓶中。取滤液30～40 mL于半微量定氮蒸馏器中，并加入FeSO4—Zn粉还原剂1.2 g，再加400 g·L-1 NaOH溶液5 mL，立即封闭进样口。预先将盛有20 g·L-1硼酸—指示剂10 mL的三角瓶置于冷凝管下，再通蒸汽蒸馏，当吸收液达到40 mL时（约10 min）停止蒸馏，取下三角瓶，用0.02 mol·L-1 (1/2 H2SO4)标准液滴定，同时做空白试验。

**(5) 结果计算**

土壤矿化氮与初始氮之和（N）（mg·kg-1）=

土壤初始氮（N）（mg·kg-1）=

式中：

*c*—— 0.02 mol·L-1 (1/2 H2SO4)标准溶液的浓度(mol·L-1)；

*V*——样品滴定时用去1/2 H2SO4标准溶液体积(mL)；

*V*0——空白试验滴定时用去1/2 H2SO4标准溶液体积(mL)；

*ts*——分取倍数；

14.0——氮原子的摩尔质量(g·mol-1)；

103——换算系数。

#### 4.6.2 好气培养法

**(1) 方法原理**

土壤样品与3倍质量的石英砂相混合，用水湿润，将样品在通气良好又不损失水分的条件下恒温30℃，培养2周。然后用2 mol·L-1 KCl溶液提取铵态氮、硝态氮和亚硝态氮。取部分提取液再用MgO和戴氏（Devarda）合金同时进行还原和蒸馏，测定馏出液的铵态氮量，以此计算培养后样品中（NH4＋—N+NO3－—N+ NO2－—N）氮含量。用同样方法测定培养前土壤—石英砂混合物中的（NH4＋—N+NO3－—N+ NO2－—N）氮含量，根据两次测定结果之差，计算土壤样品中可矿化氮含量。

**(2) 仪器设备**

科龙A型半微量定氮蒸馏器、0.01 mL刻度的5 mL 微量滴定管、RC-16型Res罩、恒温生物培养箱。

**(3) 试剂制备**

1. 2 mol·L-1的KCl溶液：溶解KCl（化学纯、无氮）1500 g于水中，然后稀释10 L，充分搅匀；
2. 氧化镁（MgO）：MgO（化学纯），放在马福炉中以600～700℃灼烧2 h，取出置于内盛粒状KOH的干燥器中冷却后，贮于密闭瓶中；
3. 第威德合金（Alloy Devardaˊs），又称戴氏合金（含Cu50%，含Al45%，含Zn5%）：将优质的合金球磨至通过100目筛，其中至少有76%应能通过300目筛，将磨细的合金置于密封瓶中贮存；
4. 硼酸—指示剂溶液；
5. 0.005 mol·L-1 (1/2 H2SO4)标准溶液：量取H2SO4（化学纯）2.83 mL，加蒸馏水稀释至5000 mL，然后用标准碱或硼酸标定之，此为0.0200 mol·L-1 (1/2 H2SO4)标准溶液，再将此溶液准确稀释4倍，即得0.005 mol·L-1 (1/2 H2SO4)标准溶液。

**(4) 测定步骤**

称取10.00 g（过2 mm筛）风干土样于100 mL烧杯中，再加30.00 g经酸洗的30～60目的石英砂充分混匀。然后将混合物移到内盛6 mL水的250 mL广口瓶中，在转移时，应将混合物均匀铺在瓶底上。当混合物全部移入广口瓶后轻轻震动瓶子，弄平混合物的表面。在瓶颈上塞上具有中心孔并边接有Res罩的橡皮塞，将瓶子放在30℃的恒温生物培养箱内培养2周。培养结束后，除去带Res罩的橡皮塞，加入2 mol·L-1的KCl溶液100 mL，用另一只实心橡皮塞塞紧，放在振荡机上振荡1 h。

静置悬浊液直到土壤—砂子混合物沉下，上层溶液清沏（一般需30 min）。此时可将盛有20 g·L-1硼酸—指示剂溶液5 mL的三角瓶置于半微量蒸馏器的冷凝管下，冷凝管的末端不必插入硼酸—指示剂溶液中，用20 mL移液管吸取上层清液置于科龙A型半微量定氮蒸馏器的进样杯中，并使其很快流入蒸馏瓶中，用洗瓶以少量水冲洗进样杯，然后加入戴氏合金0.2 g和MgO 0.2 g于蒸馏瓶中再用少量水冲洗进样杯，最后加水封闭进样杯。立即通蒸汽蒸馏。当馏出液达到30 mL时，可停止蒸馏，冲洗冷凝管的末端，移出盛蒸馏液的三角瓶，用微量滴定管以0.05 mol·L-1 (1/2 H2SO4)标准溶液，同时做空白试验。

用同法测定另一份未经培养的土壤—石英砂混合物的含氮量，求两者之差，即为该土壤可矿化氮的含量。

**(5) 结果计算**

同厌气培养法

## 第五节 土壤磷的测定

### 5.1 土壤全磷测定

**(1) 试剂制备**

1. 氢氧化钠溶液[2 mol/L ]：氢氧化钠（NaOH，分析纯）80 g溶于1 L蒸馏水；
2. 钼锑贮存液：钼酸铵[(NH4)6Mo7O24·4H2O] 10 g溶于约60℃的300 mL蒸馏水中，搅拌，冷却；浓硫酸（H2SO4，分析纯）153 mL缓缓加入到400 mL蒸馏水，冷却，缓缓倒入钼酸铵溶液中，再加酒石酸锑钾(KSbOC4H4O6·1/2 H2O) 0.5 g（100 mL 5 g/L酒石酸锑钾），混匀，定容至1 L，避光贮存，此贮存液含10 g/L钼酸铵、2.75 mol/L硫酸；
3. 钼锑抗显色剂：抗坏血酸(C6H8O6，分析纯) 1.50 g溶于100 mL钼锑贮存液，现配现用；
4. 磷标准液[5 μg/mL]：50℃烘干的KH2PO4 0.4394 g溶于100 mL蒸馏水，加5 mL浓H2SO4防腐，用水定容到1 L，即浓度为100 μg/mL（可长期保存），取5 mL于100 mL容量瓶中定容即为5 μg/mL 磷标准液；
5. 2,4-二硝基酚指示剂[2 g/L ]：2,4-二硝基酚0.20 g溶于100 mL蒸馏水；
6. 硫酸溶液[0.5 mol/L]：吸取28.0 mL浓硫酸于1 L水中。

**(2) 测定步骤**

1. 准确称取干土0.2000-0.2050 g置于消煮管底部，加10 mL浓硫酸，10滴高氯酸（约0.7 mL）；
2. **消煮**；
3. **显色：**用移液枪取待测液5 mL于50 mL容量瓶，加蒸馏水20 mL左右（容量瓶1/3至1/2处），加2,4-二硝基酚指示剂2滴，再用氢氧化钠（2 mol/L）调节pH至微黄（颜色太黄用0.5 mol/L硫酸调回），加钼锑抗显色剂5 mL，摇匀定容，显色30 min；
4. **比色：**以空白溶液调吸收值为零，在700 nm处测定吸收值，由回归方程求得磷浓度（μg/mL）；
5. **标准曲线：**取5 μg/mL P标准液0、1、2、3、4、5、6 mL于50 mL容量瓶，定容，得0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 μg/mL磷标准系列，加蒸馏水20 mL左右，加2,4-二硝基酚指示剂2滴，氢氧化钠（2 mol/L）调节pH至微黄，加钼锑抗显色剂5 mL，定容，显色30 min。以0 μg/mL P标准系列显色液调零，700 nm测定吸收值，以标准磷浓度(μg/mL)为横坐标，吸收值为纵坐标，绘制标准曲线，建立回归方程。

**(3) 结果计算**

Wp =(C×V×t×103)/m×106

式中：

Wp—全磷含量(g/kg)；

C—从工作曲线上查得显色液的P浓度(μg/mL)；

V—显色液体积(50 mL)；

t—分取倍数(100 mL/5 mL=20)；

m—样品干质量(g)。

### 5.2 土壤速效磷测定—碳酸氢钠法

**(1) 方法原理**

石灰性土壤由于大量游离碳酸钙存在，不能用酸溶液来提取速效磷，可用碳酸盐的碱溶液。由于碳酸根的同离子效应，碳酸盐的碱溶液降低碳酸钙的溶解度，也就降低了溶液中钙的浓度，这样就有利于磷酸钙盐的提取。同时由于碳酸盐的碱溶液也降低了铝和铁离子的活性，有利于磷酸铝和磷酸铁的提取。此外，碳酸氢钠碱溶液中存在着OH-、HCO-3、CO2-3等阴离子有利于吸附态磷的交换，因此，碳酸氢钠不仅适用于石灰性土壤，也适用于中性和酸性土壤中速效磷的提取。

待测液用钼锑抗混合显色剂在常温下进行还原，使黄色的锑磷钼杂多酸还原成为磷钼蓝进行比色。

**(2) 仪器设备**

往复振荡机、电子天平(1/100)、分光光度计、三角瓶(250 ml和100 ml)、烧杯(100 ml)、移液管(10 ml、50 ml)、容量瓶(50 ml)、吸耳球、漏斗(60 ml)、滤纸、坐标纸、擦镜纸、小滴管。

**(3) 试剂配制**

1. 0.5 mol/L碳酸氢钠浸提液：称取化学纯碳酸氢钠42.0 g溶于800 ml水中，以0.5 mol/L氢氧化钠调节pH至8.5，洗入1000 ml容量瓶中，定容至刻度，贮存于试剂瓶中。此溶液贮存于塑料瓶中比在玻璃瓶中容易保存，若贮存超过1个月，应检查pH值是否改变；
2. 无磷活性炭：活性碳常常含有磷，应做空白试验，检查有无磷存在。如含磷较多，须先用2 mol/L盐酸浸泡过夜，用蒸馏水冲洗多次后，再用0.5 mol/L碳酸氢钠浸泡过夜，在平瓷漏斗上抽气过滤，每次用少量蒸馏水淋洗多次，并检查到无磷为止。如含磷较少，则直接用碳酸氢钠处理即可；
3. 磷(P)标准溶液：准确称取45℃烘干4-8小时的分析纯磷酸二氢钾0.2197 g于小烧杯中，以少量水溶解，将溶液全部洗入1000 ml容量瓶中，用水定容至刻度，充分摇匀，此溶液即为含50 mg/L的磷基准溶液。吸取50 ml此溶液稀释至500 ml，即为5 mg/L的磷标准溶液(此溶液不能长期保存)。比色时按标准曲线系列配制；
4. 硫酸钼锑贮存液：取蒸馏水约400 ml，放入1000 ml烧杯中，将烧杯浸在冷水中，然后缓缓注入分析纯浓硫酸208.3 ml,并不断搅拌，冷却至室温。另称取分析纯钼酸铵20 g溶于约60℃的200 ml蒸馏水中，冷却。然后将硫酸溶液徐徐倒入钼酸铵溶液中，不断搅拌，再加入100 ml 0.5%酒石酸锑钾溶液，用蒸馏水稀释至1000 ml，摇匀贮于试剂瓶中；
5. 二硝基酚：称取0.25 g二硝基酚溶于100 ml蒸馏水中；
6. 钼锑抗混合色剂：在100 ml钼锑贮存液中，加入1.5 g左旋（旋光度+21—+22°）抗坏血酸，此试剂有效期24小时，宜用前配制。

**(4) 测定步骤**

1. 称取通过18号筛(孔径为1 mm)的风干土样5 g(精确到0.01 g)于200 ml三角瓶中，准确加入0.5 mol/L碳酸氢钠溶液100 ml，再加一小角勺无磷活性碳，塞紧瓶塞，在振荡机上振荡30分钟(振荡机速率为每分钟150—180次)，立即用无磷滤纸干过滤，滤液承接于100 ml三角瓶中，最初7～8 ml滤液弃去；
2. 吸取滤液10 ml(含磷量高时吸取2.5—5 ml；同时应补加0.5 mol/L碳酸氢钠溶液至10 ml)于50 ml量瓶中，加硫酸钼锑抗混合显色剂5 ml充分摇匀，排出二氧化碳后加水定容至刻度，再充分摇匀；
3. 30分钟后，在分光光度计上比色(波长660 nm)，比色时须同时做空白测定；
4. 磷标准曲线绘制：分别吸取5 mg/L磷标准溶液0、1、2、3、4、5 ml于50 ml容量瓶中，每一容量瓶即为0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/L磷，再逐个加入0.5 mol/L碳酸氢钠10 ml和硫酸一钼锑抗混合显色剂5 ml，然后同待测液一样进行比色。绘制标准曲线。

**(5) 结果计算**

土壤速效Pmg/kg=比色液mg/L×定容体积/W×分取倍数

式中：

比色液mg/L—从工作曲线上查得的比色液磷的mg/L数；

W—称取土样重量(g)；

分取倍数—100/10；

土壤速效磷(P)mg/kg。

等级：

＜5                                            低

5—10                     中

＞10                      高

**(6) 注意事项**

1. 活性碳一定要洗至无磷无氯反应；
2. 钼锑抗混合剂的加入量要十分准确，特别是钼酸量的大小，直接影响着显色的深浅和稳定性。标准溶液和待测液的比色酸度应保持基本一致，它的加入量应随比色时定容体积的大小按比例增减；
3. 温度的大小影响着测定结果。提取时要求温度在25℃左右。室温太低时，可将容量瓶放入40—50℃的烘箱或热水中保温20分钟，稍冷后方可比色。

### 5.3 土壤有机磷测定

**(1) 试剂制备**

1. 硫酸溶液[0.2 mol/L ]：浓硫酸（NaOH，分析纯）6 ml定溶于1 L蒸馏水；
2. 钼锑贮存液：钼酸铵[(NH4)6Mo7O24·4H2O] 10 g溶于约60℃的300 mL蒸馏水中，搅拌，冷却；浓硫酸（H2SO4，分析纯）153 mL缓缓加入到400 mL蒸馏水，冷却，缓缓倒入钼酸铵溶液中，再加酒石酸锑钾(KSbOC4H4O6·1/2H2O) 0.5 g（100 mL 5 g/L酒石酸锑钾），混匀，定容至1 L，避光贮存。此贮存液含10 g/L钼酸铵、2.75 mol/L硫酸；
3. 钼锑抗显色剂：抗坏血酸(C6H8O6，分析纯) 1.50 g溶于100 mL钼锑贮存液，现配现用；
4. 磷标准液[5 μg/mL]：50℃烘干的KH2PO4 0.4394 g溶于100 mL蒸馏水，加5 mL浓H2SO4防腐，用水定容到1 L，即浓度为100 μg/mL（可长期保存），取5 mL于100 mL容量瓶中定容即为5 μg/mL 磷标准液；
5. 2,4-二硝基酚指示剂[2 g/L ]：2,4-二硝基酚0.20 g溶于100 mL蒸馏水；
6. 硫酸溶液[0.5 mol/L]：吸取28.0 mL浓硫酸于1 L水中。

 **(2) 测定步骤**

1. 准确称取干土0.5-1 g置于15 ml瓷坩埚中，在550℃高温电炉内灼烧1 h，取出冷却，用0.2 mol/L硫酸溶液100 ml将土样洗入200 ml容量瓶中。另外称取0.5-1 g同一样品于另一个200 ml 容量瓶中，加入0.2 mol/L硫酸溶液100 ml；
2. 两瓶的溶液摇匀后，分别将瓶塞松放在瓶口上，一起放入40℃烘箱内保温1 h，取出，冷却至室温，加水定容，过滤；
3. **显色：**用移液枪取待测液10 mL于50 mL容量瓶，加蒸馏水20 mL左右（容量瓶1/3至1/2处），加2,4-二硝基酚指示剂2滴，再用氢氧化钠（2 mol/L）调节pH至微黄（颜色太黄用0.5 mol/L硫酸调回），加钼锑抗显色剂5 mL，摇匀定容，显色30 min；
4. **比色：**以空白溶液调吸收值为零，在700 nm处测定吸收值，由回归方程求得磷浓度（μg/mL）；
5. **标准曲线：**取5 μg/mL P标准液0、1、2、3、4、5、6 mL于50 mL容量瓶，定容，得0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 μg/mL 磷标准系列，加蒸馏水20 mL左右，加2,4-二硝基酚指示剂2滴，氢氧化钠（2 mol/L）调节pH至微黄，加钼锑抗显色剂5 mL，定容，显色30 min。以0 μg/mL P标准系列显色液调零，700 nm测定吸收值，以标准磷浓度(μg/mL)为横坐标，吸收值为纵坐标，绘制标准曲线，建立回归方程。

**(3) 结果计算**

Wp =(C×V×t×103)/m×106

式中：

Wp—磷含量(g/kg)；

C—从工作曲线上查得显色液的P浓度(μg/mL)；

V—显色液体积(50 mL)；

t—分取倍数(200 mL/10 mL=20)；

m—样品干质量(g)。

分别计算出灼烧与未灼烧土壤的含磷量，然后经灼烧的结果减去未灼烧的结果，其差值即为有机磷含量。

### 5.4 土壤无机磷测定

**(1) 试剂制备**

1. 硫酸溶液[0.2 mol/L ]：浓硫酸（NaOH，分析纯）6 ml定溶于1 L蒸馏水；
2. 钼锑贮存液：钼酸铵[(NH4)6Mo7O24·4H2O] 10 g溶于约60℃的300 mL蒸馏水中，搅拌，冷却；浓硫酸（H2SO4，分析纯）153 mL缓缓加入到400 mL蒸馏水，冷却，缓缓倒入钼酸铵溶液中，再加酒石酸锑钾(KSbOC4H4O6·1/2H2O) 0.5 g（100 mL 5 g/L酒石酸锑钾），混匀，定容至1 L，避光贮存。此贮存液含10 g/L钼酸铵、2.75 mol/L硫酸；
3. 钼锑抗显色剂：抗坏血酸(C6H8O6，分析纯) 1.50 g溶于100 mL钼锑贮存液，现配现用；
4. 磷标准液[5 μg/mL]：50℃烘干的KH2PO4 0.4394 g溶于100 mL蒸馏水，加5 mL浓H2SO4防腐，用水定容到1 L，即浓度为100 μg/mL（可长期保存）。取5 mL于100 mL容量瓶中定容即为5 μg/mL 磷标准液；
5. 2,4-二硝基酚指示剂[2 g/L ]：2,4-二硝基酚0.20 g溶于100 mL蒸馏水；
6. 硫酸溶液[0.5 mol/L]：吸取28.0 mL浓硫酸于1 L水中。

**(2) 测定步骤**

1. 称取0.5-1 g样品于200 ml 容量瓶中，加入0.2 mol/L硫酸溶液100 ml；
2. 溶液摇匀后，分别将瓶塞松放在瓶口上，一起放入40℃烘箱内保温1 h，取出，冷却至室温，加水定容，过滤；
3. **显色：**用移液枪取待测液10 mL于50 mL容量瓶，加蒸馏水20 mL左右（容量瓶1/3至1/2处），加2,4-二硝基酚指示剂2滴，再用氢氧化钠（2 mol/L）调节pH至微黄（颜色太黄用0.5 mol/L硫酸调回），加钼锑抗显色剂5 mL，摇匀定容，显色30 min；
4. **比色：**以空白溶液调吸收值为零，在700 nm处测定吸收值。由回归方程求得磷浓度（μg/mL）；
5. **标准曲线：**取5 μg/mL P标准液0、1、2、3、4、5、6 mL于50 mL容量瓶，定容，得0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 μg/mL 磷标准系列。加蒸馏水20 mL左右，加2,4-二硝基酚指示剂2滴，氢氧化钠（2 mol/L）调节pH至微黄，加钼锑抗显色剂5 mL，定容，显色30 min。以0 μg/mL P标准系列显色液调零，700 nm测定吸收值。以标准磷浓度(μg/mL)为横坐标，吸收值为纵坐标，绘制标准曲线，建立回归方程。

**(3) 结果计算**

Wp =(C×V×t×103)/m×106

式中：

Wp—磷含量(g/kg)；

C—从工作曲线上查得显色液的P浓度(μg/mL)；

V—显色液体积(50 mL)；

t—分取倍数(200 mL/10 mL=20)；

m—样品干质量(g)。

## 第六节 土壤钾的测定

### 6.1 土壤全钾测定

**(1) 试剂制备**

K标准溶液：准确称取在105℃烘干4~6小时的分析纯KCL 0.9535 g溶于纯水中，定容至1000 ml即为500 ug/ml的K标准液，吸取100 ml稀释至500 ml即为100 ug/ml，分别吸取100 ug/ml标准液0、1、5、10、15、20、30 ml于100 ml量瓶中，用纯水稀释至刻度，摇匀，即为0、1、5、10、15、20、30 ug/ml的系列标准液。

**(2) 待测液制备**

1. 称取过0.25 mm筛孔的风干土0.1500 g于镍坩埚底部，加几滴无水酒精固定土样，加2 g固体NaOH于坩埚内，用玻棒拨平（注意勿使玻棒接触土壤），盖上坩埚盖（如不及时加热熔融，应存放于干燥器中以防吸水潮解），同时做一空白；
2. 将坩埚盖移开置于1000~2000瓦电炉上，使NaOH熔融排除水分，冷却后立即移入马福炉中，打开电源，逐步升温至700~720℃，保持15分钟，切断电源，待炉内温度降到100℃以下，打开炉门，取出冷却；
3. 用滴管加少量热水，用酒精灯加热溶解溶块，洗涤用漏斗转入100 ml量瓶中，用热水少量多次洗涤坩埚，直到确认洗净为止，注意洗涤液总量不超过80 ml；
4. 向量瓶中加4.5 mol/l H2SO4 10 ml，摇动使冷至室温，纯水定容摇匀，静置沉清，即为待测液。

**(3) 测定步骤**

准确吸取待测液5 ml于25 ml量瓶中，纯水定容，于火焰光度计上测定。

**(4) 结果计算**

全钾（K）g/kg = ug/ml（测得值-空白值）×（显色体积/显色吸取量）×（待测液总体积/烘干土样重）×10-3

 = ug/ml ×（25/5）×（100/烘干土样重）×10-3

### 6.2 土壤速效钾测定—醋酸铵—火焰光度计法

**(1) 方法原理**

以中性1 mol/L NH4OAc溶液为浸提剂，NH+4与土壤胶体表面的K+进行交换，连同水溶性的K+一起进入溶液，浸出液中的钾可用火焰光度计法直接测定。

**(2) 仪器设备**

1/1000天平、振荡机、火焰光度计、三角瓶(250 ml，100 ml)、漏斗(60 ml)、滤纸、坐标纸、角匙、吸耳球、移液管(50 ml)。

**(3) 试剂配制**

1. 中性1.0 mol/L NH4OAc溶液：称77.08 g NH4OAc溶于近1升水中，用稀HOAc或NH4OH调节至pH 7.0，用水定容至1升；
2. K标准溶液：称取0.1907克KCl溶于1 mol/L NH4OAc溶液中，完全溶解后用1 mol/L NH4OAc溶液定容至1升，即为含100 mg/L K的NH4OAc溶液。用时分别吸取此100 mg/L K标准液0、2、5、10、20、40 ml放入100 ml容量瓶中，用1 mol/L NH4OAc定容，即得0、2、5、10、20、40 mg/L K标准系列溶液。

**(4) 测定步骤**

称取风干土样(1 mm孔径)5.××g于150 ml三角瓶中，加1 mol/L NH4OAc溶液50.0 ml(土液比为1:10)，用橡皮塞塞紧，在20—25℃下振荡30分钟用干滤纸过滤，滤液与钾标准系列溶液一起在火焰光度计上进行测定，在方格纸上绘制成曲线，根据待测液的读数值查出相对应的mg/L数，并计算出土壤中速效钾的含量。

**(5) 结果计算**

土壤速效钾(K)mg/kg=待测液mg/L×加入浸提剂毫升数/风干土重。

## 第七节 土壤金属元素测定

### 7.1 金属元素总量的消解—微波消解法

**(1) 方法原理**

微波消解是结合高压消解和微波快速加热的一项预处理技术。水样和酸的混合物吸收微波能量后，酸的氧化反应活性增加，将样品中的金属元素释放到溶液中。

**(2) 试剂制备**

1. 硝酸(HNO3)：优级纯；
2. 盐酸(HCl)：优级纯；
3. 氢氟酸(HF)；
4. (1+1)硝酸：用优级纯硝酸配制。

**(3) 测定步骤**

1. 将所有实验器皿包括微波消解罐、漏斗、容量瓶等放置在(1+1)硝酸中浸泡过夜，使用前再依次用自来水、去离子水洗净，自然风干；
2. 准确称取0.2 g粉碎过后的试样(过100目筛)于微波消解罐中，加入5 ml硝酸、1 ml氢氟酸、1 ml盐酸置于通风橱中静置过夜，上机消解前加盖旋紧，放入微波消解仪中，按照仪器推荐升温程序进行消解；

**由于土壤种类较多，所含有机质差异较大，在消解时，应注意观察，各种酸的用量视消解情况酌情增减！**

1. (COOL DOWN)程序运行完毕后取出消解罐置于通风橱内冷却(大约30 min)，待罐内温度与室温平衡后，放气开盖，将罐内消解液移入50 ml容量瓶中，用去离子水冲洗消解罐内壁多次，定容；
2. 将定容后的待测液过滤至事先清洗干净的聚乙烯瓶中备用；
3. 空白实验：用去离子水代替试样按上述步骤与样品同步进行消解。

**(4) 注意事项**

1. 每次消解完成后微波消解罐用大量自来水冲洗，再用去离子水润洗，自然风干，加入9 ml硝酸，进行清洗程序。清洗程序结束后再按上述步骤冲洗润洗风干后才能进行下一次消解；
2. 所有的反应罐各部件必须为干燥且无污染物的状态，以防罐体局部吸收微波后温度过高，损坏罐体；
3. 严格确认压力弹片已经安装且安装正确，严格确认反应罐完全嵌入转盘；
4. 微波消解罐不能用刷子清洗，不能用超声波清洗。

### 7.2 金属元素总量的消解—全分解方法

**(1) 方法原理**

采用盐酸-硝酸-氢氟酸-高氯酸全分解的方法，破坏土壤的矿物晶格，使试样中的待测元素全部进入试液。

**(2) 试剂制备**

1. 硝酸(HNO3)：优级纯；
2. 盐酸(HCl)：优级纯；
3. 氢氟酸(HF)；
4. 高氯酸：优级纯；
5. (1+1)硝酸：用优级纯硝酸配制。

**(3) 测定步骤**

1. 将所有实验器皿包括微波消解罐、漏斗、容量瓶等放置在(1+1)硝酸中浸泡过夜，使用前再依次用自来水、去离子水洗净，自然风干；
2. 准确称取0.2 g粉碎过后的试样(过100目筛)于放置消煮釜，加入5 ml混合酸[浓硝酸与高氯酸以5:1（体积比）混合]，拧紧罐子于通风橱中静置过夜。将装有样品的消煮釜放入烘箱中，温度分别设置为80℃（20 min），120℃ （1 h），160℃（1 h），180℃（2 h）；
3. 待消解完成后将罐内消解液移入50 ml容量瓶中，用去离子水冲洗消解罐内壁多次，定容；
4. 将定容后的待测液过滤至事先清洗干净的聚乙烯瓶中备用；
5. 空白实验：用去离子水代替试样按上述步骤与样品同步进行消解。

### 7.3 金属元素总量的测定

**(1) 仪器设备**

火焰原子吸收分光光度计，相应元素的空心阴极灯(K、Na、Ca、Mg、Mn、Zn、Cr、Ni、Pb、Cd)。

**(2) 试剂制备**

相应元素的标准溶液(1000 μg/ml)：K、Na、Ca、Mg、Mn、Zn、Cr、Ni、Pb、Cd。

**(3) 校准曲线的绘制**

1. 取1 ml相应元素标准溶液移至1000 ml容量瓶，用去离子水定容，得到1 mg/L该元素标准溶液使用液；
2. 于10个100 ml容量瓶中分别移取0、0.5、1.0、2.0、3.0、5.0、10.0、20.0、30.0、50.0 ml相应元素标准溶液使用液，加去离子水定容，其浓度分别为0、0.005、0.010、0.020、0.030、0.050、0.100、0.200、0.300、0.500 mg/L；
3. 在火焰原子吸收分光光度计上进行测量，建立目标元素的校准曲线。

**(4) 样品测定**

与校准曲线的测定方法一致，在校准曲线上查得目标元素含量，空白样品的测定与试样相同。

**(5) 结果计算**

样品中元素含量：$ρ=\frac{(ρ\_{1}-ρ\_{2})×V}{m×(1-f)}$

式中：

*ρ*——样品中目标元素的质量含量，mg/kg；

*ρ1*——试样中目标元素的质量浓度，mg/L；

*ρ2*——空白试样中目标元素的质量浓度，mg/L；

*V*——试液定容的体积，ml；

*m*——称取试样的质量，g；

*f*——试样中水分的含量，%。

**(6) 注意事项**

1. 使用仪器前先检查助燃气体是否充足，乙炔瓶内气压低于0.5 Mpa时就要进行更换，否则会造成气路堵塞不能点火。一般仪器提示燃气压力时，应检查出气阀和主阀压力表上的数值是否正常。关闭仪器时应拧紧乙炔瓶主阀，拧松出气阀，使压力表上的数值归零；
2. 每次使用后要注意空压机的排水。注意观察空压机润滑油的液面高度在两红线之间，太低要更换空压机油；
3. 处理样品后要进行过滤，否则很容易使雾化器进样毛细管堵塞。毛细管堵塞后样品灵敏度会大幅下降，此时要用专用的钢丝疏通。若无大的改善，需在关掉乙炔的情况下，保证空气压力，将雾化器卸出清理；
4. 要注意检查点火口电极上的积碳，如有积碳要刮除，如果积碳太多，有可能造成短路。注意检查雾化器火焰燃烧是否均匀，如火焰燃烧不均匀，关闭火焰后用硬纸卡片清洁燃烧口；
5. 元素灯要在关机状态下更换，确认插入灯座；
6. 提示废液罐液面较低时，向废液罐内加入少许蒸馏水即可；
7. 关闭空压机气泵时需将红色按钮按下，并将绿色阀门拧至垂直90°。

## 第八节 土壤微生物测定

### 8.1 土壤微生物生物量测定

#### 8.1.1 微生物生物量碳

**(1) 试剂制备**

1. 去乙醇氯仿：普通氯仿试剂一般含有少量乙醇作为稳定剂，使用前需除去。将氯仿试剂按1: 2（体积分数）的比例与去离子水或蒸馏水一起加入分液漏斗中，充分摇动1 min，慢慢放出底层氯仿于烧杯中，如此洗涤三次。得到的无乙醇氯仿加入无水氯化钙，以除去氯仿中的水分。纯化后的氯仿置于暗色试剂瓶中，在低温（4℃）、黑暗状态下保存。注意氯仿具有致癌作用，必须在通风橱中进行操作；
2. K2SO4提取液[0.5 mol/L]：称取174.26 g K2SO4分析纯定容至2 L（难溶，需用磁力搅拌器水浴锅加热，待冷却后方可定容）；
3. 重铬酸钾-浓硫酸溶液[0.018 mol/L K2CrO7-12 mol/L H2SO4]：称取5.3000 g分析纯的重铬酸钾于400 ml 蒸馏水中，缓缓加入435 ml 分析纯浓硫酸（H2SO4, ρ=1.84 g/ml），边加边搅拌，冷却至室温后定容至1 L；
4. 邻菲罗啉指示剂：称取1.49 g 邻菲罗啉溶于100 ml 0.7%分析纯硫酸亚铁溶液，此溶液易变质，应密封保存与棕色试剂瓶中；
5. 硫酸亚铁溶液[0.05 mol/L]：称取13.9 g 分析纯硫酸亚铁溶于800 ml 蒸馏水中，加入5 ml 分析纯浓硫酸，用蒸馏水定容至1 L，保存于棕色试剂瓶中，注意：此溶液易被空气氧化，每次使用是应该标定其实际浓度；
6. 重铬酸钾标液[0.05 mol/L]：称取经130℃烘2 h的分析纯重铬酸钾2.4515 g，定容至1 L。

**(2) 测定步骤**

1. 称取过2 mm筛的鲜土5.000 g于白瓶中，然后放进真空干燥箱中，并放置盛有去除乙醇的氯仿的烧杯（200 ml左右），烧杯内加入适量的石英砂，同时还应放入一小杯稀NaOH溶液（100 ml，吸收熏蒸期间释放的CO2），以及一小杯水（100 ml，保持湿度）；熏蒸时间为24 h。另外称取同等数量鲜土，置于另一干燥箱以作未熏蒸对照；
2. 熏蒸结束，放气，取出装有氯仿的烧杯后，反复抽真空4-5次（抽气-放气），每次3 min，待完成以上步骤后，方可取出土样进行下一步实验；
3. 向熏蒸和未熏蒸的土样中加入25 ml硫酸钾溶液，振荡30 min（熏蒸与未熏蒸的操作步骤相同），震荡结束后用中速定性滤纸过滤至小口瓶中；
4. 吸取5 ml浸提液于小消煮管中，再加入5-10 ml 0.018 mol/L的重铬酸钾溶液，再加入适量石英砂；
5. 混匀后置于远红外消煮炉中消煮10 min，消化管放入前，炉中的温度应升至179℃；
6. 待冷却后，无损的转移到150 ml 三角瓶中，用蒸馏水洗涤消化管3~5次，使溶液体积大约为80 ml；
7. 各加入5滴邻菲罗啉指示剂，用0.05 mol/L 的硫酸亚铁标准溶液滴定，溶液颜色由橙黄色变成蓝绿色，再变成棕红色即为滴定终点；
8. 取20.00 ml 0.05 mol/L的重铬酸钾标液于150 ml 的三角瓶中，加入3 ml 分析纯浓硫酸和5滴邻菲罗啉指示剂，用硫酸亚铁溶液滴定至终点，根据消耗的硫酸亚铁溶液的体积计算准确浓度，计算公式C2=C1V1/V2。

**(3) 结果计算**

W=(V0-V1)\*c\*3\*Ts\*K\*1000/m

式中：

W—土壤中的含量，mg·kg-1；

c—FeSO4溶液的浓度，mol·L-1；

V0—滴定空白样时所消耗的FeSO4体积，mL；

V1—滴定样品时所消耗的FeSO4体积，mL；

Ts—分取倍数，25/5；

3—碳的毫摩尔质量；

K—转化系数（通常为0.45）；

m—烘干土样质量，g。

计算熏蒸与未熏蒸的差值即为土壤微生物生物量碳含量。

#### 8.1.2 微生物生物量氮

**(1) 试剂制备**

1. 去乙醇氯仿：普通氯仿试剂一般含有少量乙醇作为稳定剂，使用前需除去。将氯仿试剂按1: 2（体积分数）的比例与去离子水或蒸馏水一起加入分液漏斗中，充分摇动1 min，慢慢放出底层氯仿于烧杯中，如此洗涤三次。得到的无乙醇氯仿加入无水氯化钙，以除去氯仿中的水分。纯化后的氯仿置于暗色试剂瓶中，在低温（4℃）、黑暗状态下保存。注意氯仿具有致癌作用，必须在通风橱中进行操作；
2. K2SO4提取液[0.5 mol/L]：称取174.26 g K2SO4分析纯定容至2 L（难溶，需用磁力搅拌器水浴锅加热，待冷却后方可定容）；
3. 苯酚溶液：称取10 g 苯酚（C6H5OH，化学纯）和0.1000 g 硝普钠（Na2Fe(CN)5NO·2H2O，化学纯），用蒸馏水定容至1 L，用棕色瓶贮存于4℃的冰箱中，用时温热至室温；

注：由于苯酚呈固体状，配制前需水浴加热（60℃），然后将苯酚液体倒在一个小烧杯A中（大约25 g），然后再将A中苯酚倒入烧杯B中，称量A中剩余质量约为15 g，说明B中的质量为10 g，此过程不必精准，B中质量为10~15之间均可。

1. 次氯酸钠碱性溶液：称取10 g NaOH（化学纯）、7.06 g Na2HPO4·7H2O（化学纯）、31.8 g Na3PO4·12H2O（化学纯）和量取10 mL NaOCl（化学纯），定容至1 L，用棕色瓶贮存于4℃的冰箱中；
2. 掩蔽剂：将400 g/L KNaC4H4O6·4H2O（酒石酸钾钠，化学纯）溶液与100 g/L 的C10H14O8N2Na2·2H2O（ EDTA二钠盐，化学纯）溶液等体积混合，每100 mL 混合液中加入0.5 mL 10 mol/L的NaOH溶液；
3. NH4+-N标准液[5 μg/mL]：称取0.4717 g干燥的(NH4)2SO4（硫酸铵，分析纯）溶于蒸馏水，定容至1 L，即配成100 μg/mL的标准液，使用前加水稀释20倍，即配成5 μg/mL的NH4+-N标准液。

**(2) 测定步骤**

1. 称取过2 mm筛的鲜土5.000 g 于白瓶中，然后放进真空干燥箱中，并放置盛有去除乙醇的氯仿的烧杯（200 ml左右），烧杯内加入适量的石英砂，同时还应放入一小杯稀NaOH溶液（100 ml，吸收熏蒸期间释放的CO2），以及一小杯水（100 ml，保持湿度）；熏蒸时间为24 h。另外称取同等数量鲜土，置于另一干燥箱以作未熏蒸对照；
2. 熏蒸结束，放气，取出装有氯仿的烧杯后，反复抽真空4-5次（抽气-放气），每次3 min，待完成以上步骤后，方可取出土样进行下一步实验；
3. 向熏蒸和未熏蒸的土样中加入25 ml 硫酸钾溶液，振荡30 min（熏蒸与未熏蒸的操作步骤相同），震荡结束后用中速定性滤纸过滤至小口瓶中；
4. 吸取5 ml 浸提液于50 ml容量瓶中，再加入约20 ml 蒸馏水；
5. 依次加入5 mL苯酚溶液和5 mL次氯酸钠碱性溶液，摇匀，若有沉淀加掩蔽剂1 mL，然后定容。显色30 min 后在分光光度计上625 nm波长处比色，读取吸光度；
6. 标准曲线：分别吸取0、0.5、1、2、3、4、5 mL 5 μg/mL的NH4+-N标准液于50 mL的容量瓶中，后续步骤同⑤。

**(3) 结果计算**

W=C\*V\*Ts\*K/m×1000

式中：

W—土壤中的含量，mg·kg-1；

C—从标准曲线查得显色液中的浓度，μg·mL-1；

V—显色液的体积，50 mL；

Ts—分取倍数，50/5；

K—转化系数（通常为0.54）；

m—烘干土样质量，g。

计算熏蒸与未熏蒸的差值即为土壤微生物生物量氮含量。

#### 8.1.3 微生物生物量磷

**(1) 试剂制备**

1. 去乙醇氯仿：普通氯仿试剂一般含有少量乙醇作为稳定剂，使用前需除去。将氯仿试剂按1: 2（体积分数）的比例与去离子水或蒸馏水一起加入分液漏斗中，充分摇动1 min，慢慢放出底层氯仿于烧杯中，如此洗涤三次。得到的无乙醇氯仿加入无水氯化钙，以除去氯仿中的水分。纯化后的氯仿置于暗色试剂瓶中，在低温（4℃）、黑暗状态下保存。注意氯仿具有致癌作用，必须在通风橱中进行操作；
2. NaHCO3 溶液[0.5 mol/L]：42.00 g分析纯NaHCO3 溶于1 L蒸馏水中，需调节pH至8.5；
3. 磷酸二氢钾溶液：1.0984 g分析纯的磷酸二氢钾（称前105℃烘2~3 h），定容至1 L；
4. HCl溶液：84 ml分析纯HCl定容至1 L；
5. 磷酸二氢钾标准溶液：0.1757 g 分析纯磷酸二氢钾（称前105℃烘2~3 h）溶于少量去离子水中，再加入1~2 ml浓硫酸，用去离子水定容至1 L，即得到40 μg·p/ml 磷酸二氢钾贮存液，置于4℃下保存，取50 ml 贮存液用去离子水稀释至500 ml，即得到4 μg·p/ml 磷酸二氢钾标准溶液，此溶液不宜久存；
6. 钼锑贮存液：153 ml浓硫酸（分析纯，=1.84 g/ml）缓慢倒入约400 ml水中，搅拌冷却，另取10 g钼酸铵[(NH4)6Mo7O24·4H2O, 分析纯]，溶解于约60℃的300 ml水中，冷却，然后将硫酸溶液缓缓倒入钼酸铵溶液中，再加入100 ml 0.5%酒石酸锑钾（KSbC4H4O6·1/2H2O，分析纯）溶液，最后用蒸馏水稀释至1 L，避光贮存，次贮存液含有1%钼酸铵和2.75 mol/L 硫酸；
7. 钼提抗显色剂：1.50 g 抗坏血酸（C6H8O6，分析纯）溶于100 ml 钼锑贮存液中，此液需随配随用。

**(2) 测定步骤**

1. 称取过2 mm筛的鲜土5.000 g 于白瓶中，然后放进真空干燥箱中，并放置盛有去除乙醇的氯仿的烧杯（200 ml左右），烧杯内加入适量的石英砂，同时还应放入一小杯稀NaOH溶液（100 ml，吸收熏蒸期间释放的CO2），以及一小杯水（100 ml，保持湿度）；熏蒸时间为24 h。另外称取同等数量鲜土，置于另一干燥箱以作未熏蒸对照；
2. 熏蒸结束，放气，取出装有氯仿的烧杯后，反复抽真空4-5次（抽气-放气），每次3 min，待完成以上步骤后，方可取出土样进行下一步实验；
3. 熏蒸完毕后，取出试验样品，将熏蒸和未熏蒸的土壤样品中各加25 ml 0.5 mol/L 的NaHCO3溶液，另称取土壤三份于白瓶中，加入0.5 ml 250 μg·p/ml磷酸二氢钾溶液，再加入25 ml 0.5 mol/L 的NaHCO3溶液。全部样品震荡30 min，然后用中速定量滤纸过滤至细口瓶，取5 ml 滤液与50 ml的容量瓶中；加入5 ml HCl，摇晃待泡沫去除完后加入5 ml显色剂，显色定容，882 nm下比色；
4. 标准曲线：分别取0.00、0.25、0.50、1.00、1.50、2.00 ml 4 μg·p/ml磷酸二氢钾标准溶液于50 ml容量瓶中，再加入与样液等体积的NaHCO3溶液，同上进行中和比色测定，即得0、0.04、0.08、0.16、0.24、0.32系列标准磷工作曲线。

**(3) 结果计算**

同土壤磷

### 8.2 土壤微生物群落结构测定（PLFA）

**(1) 试剂制备**

1. 磷酸钾缓冲液PBS：将PBS缓冲剂溶于水后，调节pH到7.4即可，需冷藏保存；
2. 氢氧化钾甲醇溶液[0.56%]：0.56 g氢氧化钾溶于甲醇；定溶至100 mL；
3. 乙酸溶液[1 mol/L]：5.7 mL乙酸溶于水，定溶至100 mL；
4. 甲苯：甲醇溶液[1:1]：等体积甲苯（分析纯）与甲醇（色谱纯）相溶；
5. 氯仿：正己烷溶液[1:4]：氯仿（色谱纯）与正己烷（色谱纯）混合液，其体积比为1:4。

**(2) 测定步骤**

1. 称取过2 mm筛的鲜土1.000 g于棕色瓶，依次加入4.8 ml磷酸钾缓冲液PBS，12 ml甲醇和6 ml氯仿（色谱纯）；
2. 涡旋30 s，100 Hz超声10 min（水温应低于30℃），37℃水浴加热30 min；
3. 将液体转移至50 ml三角瓶，依次加入6 ml氯仿（色谱纯）和6 ml磷酸钾缓冲液PBS，轻轻摇动后静置过夜（避光）；
4. 过夜后，吸取三角瓶中下层液体过0.45孔径的有机相针头过滤器，加入经5 ml氯仿活化的硅胶柱；
5. 依次加入2 ml\*3次氯仿（色谱纯），2 ml\*3次丙酮（色谱纯）洗涤硅胶柱；
6. 将洗涤后的硅胶柱转移到10 ml离心管上，加入2 ml\*3次甲醇（色谱纯），将甲醇收集到离心管中，氮气吹干；
7. 依次加入1 ml 氢氧化钾甲醇溶液和1 ml甲苯：甲醇溶液，涡旋30 s后37℃水浴30 min；
8. 待冷却后，依次加入0.1 ml乙酸溶液和2 ml\*2次氯仿：正己烷溶液，吸取上层液体到另一离心管中氮气吹干，上机前于-20℃保存；
9. 加入200微升氯仿：正己烷溶液，上机测定。

### 8.3 功能微生物的分离与记数

我们在这里所说的功能微生物是专指森林土壤中，起到凋落物分解和养分循环的各种微生物，如纤维素分解微生物，木质素分解微生物，氨化、硝化、反硝化微生物等等。这里面有细菌，真菌，放线菌等各种类型。

#### 8.3.1 土壤微生物分离计数的基本方法

**(1) 稀释到平板法**

1. 土壤悬液的制备：无菌操作用1/100天平称取10克过2毫米筛的土样于盛90 ml无菌水的三角烧瓶中（或20克于180克的无菌水中，依用量定），震荡10-15分钟，得均匀土壤悬液；
2. 取上述土壤悬液1毫升倒入9毫升无菌水的试管中（或2毫升倒入18毫升试管中），依次按10倍法稀释到10-6（或更高）。用吸管吸取时，在稀释液中反复的吹吸3~4次，以减少因管壁吸附造成的误差，也使悬液充分分散；
3. 根据各类微生物在上述土壤中存在数量相对大小，分别选取稀释度接种相应种类平板培养基（一般真菌采用10-1、10-2、10-3稀度；放线菌10-3、10-4、10-5稀释度；细菌10-4、10-5、10-6稀释度，每个稀释度3~4个重复）。接种方法可以用混菌法或涂抹法，接种后置28~30℃恒温培养箱中培养（细菌3~5天；真菌5~7天；放线菌10~14天），然后在细菌和放线菌中选取出现菌落数在20~200之间的培养皿；真菌中选取菌落数在10~100之间的培养皿进行计数；

注：被扩散的细菌或真菌菌落占据琼脂表面15%以上的培养皿应该剔除，因为它们抑制了其他菌落的正常发育造成误差。

**(2) 最或然数法**

对具特殊生理功能的细菌，常用最或然数（MPN）法计数，如硝化、厌氧固N菌、硫化、反硝化、纤维分解菌等。

1. 将制备好的稀释液按10倍连续稀释后，根据各类群在土壤中的大概数量选择5个相连稀释度分别接种至各自的培养基，每一稀释度重复5管，即一个样本计数每种微生物需25管，接种后28℃培养7~14天，观察各生理群落生长或反应；
2. 根据各稀释管中有无待测微生物生长或其生理反应的正负得出数量指标，并依数量指标查数量统计表，计算得出微生物数量。

注：

1. 确定数量指标时应选取稀释系列中所有重复都有生长（或呈正反应、阳性反应）的最符稀释度为数量指标的第一位数字；
2. 用此法计数时，在稀释系列中必须最后一个稀释度所有重复间均没有微生物生长；
3. 如果在所有重复试管内都有微生物生长的稀释度之后仍有三个数字，则将最后一个数字加到前一个数字上。

结果计算：每克土壤中的菌数=（数量指标对应近似数×数量指标第一位数稀释倍数）/干土%（干土百分比即为1-含水量）。

**(3) 显微镜直接记数（略）**

#### 8.3.2 分离各类微生物用培养基配方及用法

**(1) 腐生好氧性细菌培养基**

牛肉膏蛋白胨培养基：牛肉膏3 g，蛋白胨5 g，琼脂18 g，水1000 ml，pH 7.0-7.2。

**(2) 腐生厌氧性细菌培养基**

1. 高泽有机氮琼脂培养基：葡萄糖10 g，蛋白胨15 g，牛肉膏3 g，NaCl 5 g，水1000 ml，pH 7.2；
2. 蛋白胨无机盐琼脂培养基：葡萄糖2 g，蛋白胨15 g，牛肉膏3 g，MgSO4·7H2O 0.5 g，FeSO4·7H2O 0.05 g，1%(NH4)2SO4溶液10 ml水1000 ml，pH 7.2。

**(3) 放线菌培养基**

1. 改良高氏一号：KNO3 1.0 g，FeSO4·7H2O 0.01 g，K2HPO4 0.5 g淀粉20 g，MgSO4·7H2O 0.5 g，琼脂15 g，NaCl 0.5 g，水1000 ml，临用时在已经融化的培养基中加入重铬酸钾溶液，每300 ml培养基加3%重铬酸钾1 ml(100 ppm)，以抑制细菌和霉菌生长，淀粉先加入少量冷水调成糊状在加入；
2. 马铃薯-蔗糖琼脂(PDA)培养基：20%马铃薯浸出液1000 ml，蔗糖20 g，琼脂18 g (200 g马铃薯去皮，加水1000 ml煮到能被玻棒戳破为止，过滤，补足1000 ml即可)。

**(4) 真菌培养基**

1. 马丁氏(Martin)培养基：KH2PO4 1.0 g，葡萄糖10.0 g，MgSO4·7H2O 0.5 g，琼脂18 g，蛋白胨5.0 g，水1000 ml(100 ml培养液加1%孟加拉红(Rose Bengal))，水溶液3.3 ml，临用时每100 ml培养基加1%链霉素0.3 ml(30 ppm)；
2. 查彼克氏(Czapek)培养基：NaNO3 2.0 g，蔗糖30.0 g， K2HPO4 1.0 g，KCl 0.5 g，MgSO4·7H2O 0.5 g，琼脂18 g，FeSO4·7H2O 0.01 g，水100 ml，pH 7.0；
3. PDA培养基(同上放线菌培养基)。

**(5) 好氧性自生固氮菌培养基**

* 1. 瓦克斯曼氏(Waksman)77号培养基：K2HPO4 0.5 g，1%刚果红5 ml， MgSO4·7H2O 0.2 g，琼脂18 g，NaCl 0.2 g，水1000 ml，MnSO4·4H2O微量(1%溶液2滴)，FeCl3·6H2O微量(1%溶液2滴)，pH 7.0(先测pH再加刚果红)；
	2. 阿须贝(Ashby)无氮培养基：KH2PO4 0.2 g，CaCO3 5.0 g，MgSO4·7H2 0.2 g，甘露醇10.0 g，NaCl 0.2 g，琼脂18 g，CaSO4·2H2O 0.1 g，水1000 ml。

**(6) 好氧性纤维素分解菌培养基[赫奇荪氏培养基(Hutchinson)]**

KH2PO4 1.0 g，NaCl 0.1 g，MgSO4·7H2O 0.3 g，NaNO3 2.5 g，FeCl3 0.01 g，琼脂18 g，CaCl2 0.1 g，水1000 ml，pH 7.2左右。

用法1：培养基到平板凝固后在琼脂平板表面放一张无淀粉滤纸(滤纸用1%醋酸浸泡一昼夜，用碘液检查确无淀粉后，再用2%苏打水冲洗至中性，凉干即可)，用三角形涂抹器使滤纸紧贴琼脂表面,然后接种土粒或土壤悬液，保湿培养；

用法2：将上述成分出琼脂外配制好后，分装试管，每管约5 ml，然后加处理过的滤纸条1条贴于试管内壁，一半浸入培养液，一半露出液面，用MPN法接种记数。

**(7) 厌氧性纤维分解菌培养基**

1. 磷酸铵钠培养基：

Na(NH4)HPO4 2.0 g CaCO3  5.0 g

KH2PO4  1.0 g MgSO4·7H2O 0.5 g

CaCl2·6H2O 0.5 g 蛋白胨 1.0 g

蒸馏水 1000 ml 加滤纸条或2×2 mm纸片0.05 g

1. 依姆歇涅茨基氏培养基：

CaCO3 2.0 g 蛋白胨 2.5 g

牛肉膏 1.5 g 水 100 ml

加滤纸条或2×2 mm纸片0.05 g

**(8) 亚硝化细菌培养基**

(NH4)2SO4  2.0 g MgSO4·7H2O 0.03 g

NaH2PO4 0.25 g CaCO3 5.0 g

K2HPO4 0.75 g MnSO4·4H2O 0.01 g

水 1000 mm PH 7.2

培养二周后，取培养液入白瓷板上，加格利斯试剂（祥见土壤消化作用强度测定）甲液和乙液各一滴，若显红色，证明有亚硝化作用。

**(9) 硝酸细菌培养基**

NaNO2 1.0 g MgSO4·7H2O 0.03 g

K2HPO4 0.75 g MnSO4·4H2O 0.01 g

NaH2PO4 0.25 g Na2CO3 1.0 g

水 1000 ml

如上先用格利斯试剂测定，若不呈红色，再用二苯胺试剂测定，若呈蓝色，则有消化作用。

**(10) 反硝化细菌培养基**

柠檬酸钠 5.0 g KNO3 2.0 g

KH2PO4 1.0 g K2HPO4  1.0 g

MgSO4·7H2O 0.2 g 水 1000 ml

PH 7.2~7.5

用奈氏试剂（生理生化反应中常用）及格利斯试剂测定有无氨和NO2—存在。若其中之一或二者均呈正反应，均表示有反硝化作用。若格利斯试剂加入后为负反应，再用二笨胺试剂，亦为负反应，表示有较强的反硝化作用。

#### 8.3.3 微生物分离记数所需器械及药品总结

**(1) 采土样用器械：(略)**

**(2) 制土壤悬液及分离微生物用**

三角烧瓶、试管、培养皿、天平、酒精灯、灭菌锅（湿热）、烘箱、电炉、培养箱、振荡培养箱、蒸馏水发生器、显微镜等等实验室常用器械。

**(3) 试剂药品**

琼脂、牛肉膏、蛋白胨、葡萄糖、酵母膏、淀粉、蔗糖、MgSO4·7H2O、Na(NH4)HPO4 KH2PO4 、CaCl2·6H2O、CaCO3、、NaH2PO4、NaNO2、、MnSO44H2O、FeCl3·6H2O、CaCl2、CaSO4·2H2O、1%醋酸、2%苏打水、NaOH、HCl、柠檬酸钠、1%链霉素溶液、格利斯试剂、奈氏试剂、二苯胺等等（待补充）。

## 第九节 土壤动物测定

**(1) 研究意义**

土壤动物群落不仅是森林土壤肥力的重要生物学指标，而且与土壤的形成、发育和演替以及森林生态系统中的生物元素循环密切相关。作为生态系统的工程师，包括蚯蚓、蚂蚁、白蚁等在内的大型土壤动物群落对土壤团粒结构的形成、土壤孔隙性、通气性以及土壤生物化学特性等具有显著的影响。而以原生动物、线虫、螨类、跳虫等为主的中小型土壤动物群落在土壤营养元素的吸收与释放、凋落物的分解与周转、微生物群落结构以及养分有效性等的过程中起着不可替代的作用。因而可见，研究土壤动物群落对进一步深入影响到土壤生态系统的结构和功能及其系统机理具有重要意义。

**(2) 方法原理**

主要利用土壤动物避光性，避热性，避干燥性特点将动物从土壤中分离。

**(3) 实验材料**

1. 大型土壤动物：卷尺，铁铲，镊子，正方形铁框(50 cm×50 cm (0.25 m2)，放大镜，存储瓶，酒精，体式解剖镜，生物显微镜，解剖针；
2. 中小型土壤动物：卷尺，铁铲，环形取样器(100 cm2, 25 cm2)，Tullgren 干漏斗装置，Baermann 湿漏斗装置，蒸馏水，酒精体式解剖镜，生物显微镜，解剖针；
3. 专门研究某一类土壤动物时，则采用专门的采集方法，如吸虫瓶采集法、陷阱采集法、引诱法、羽化捕捉法和手摇网筛法等。

**(4) 研究方法**

1. **手捡法大型土壤动物收集**

随机选取5个土壤环境条件(植被、地被，凋落物等)基本一致样点，将正方形铁框50 cm×50 cm (0.25 m2)嵌入土壤(防止土壤动物逃逸)，逐层取出土壤，采用放大镜，镊子手拣土壤动物，手拣完成后将土壤逐层回填，同时将所得样本分大类登记后放入盛有酒精的容器中带回室内，采用体式解剖镜和生物显微镜参照《中国土壤动物检索图鉴》和《昆虫分类检索》鉴定分类。

1. **干漏斗法(Tullgren)分离中小型土壤动物**

干生土壤动物采用100 cm2环形取样器沿土壤层自上而下逐层取样，所采样品装入密封、透气、避光的土壤动物收集袋低温保存，迅速带回室内分离，采用改进的Tullgren干漏斗进行中小型干生土壤动物分离，干生动物每12 h观测1次，48 h完成分离。采用体式解剖镜和生物显微镜参照《中国土壤动物检索图鉴》和《昆虫分类检索》鉴定分类。



干漏斗(Tullgren)简图

干漏斗由三个部分组成：上部的热源，中部金属筛网，下部收集漏斗和装有75%酒精的收集盘，分离结束将收集盘所得土壤动物置于体式解剖镜下计数，采用体式解剖镜和生物显微镜分类。

1. **湿漏斗法(Baermann)分离中小型土壤动物**

湿生土壤动物采用25 cm2环形取样器沿土壤层自上而下逐层取样，所采样品装入密封、透气、避光的土壤动物收集袋低温保存，迅速带回室内分离，采用Baermann湿漏斗法进行中小型湿生土壤动物，为防止线蚓自溶，湿生动物初始每4 h观测1次，以后时间间隔逐渐加长，48 h完成分离。采用体式解剖镜和生物显微镜参照《中国土壤动物检索图鉴》和《昆虫分类检索》鉴定分类。



湿漏斗(Baermann)简图

湿漏斗同样由三部分组成，上部热源，中部金属筛网，下部装水的收集漏斗和收集盘，分离结束将收集盘所得土壤动物置于体式解剖镜下计数，采用体式解剖镜和生物显微镜分类。

## 第十节 土壤酶活性测定

### 10.1 土壤蔗糖酶测定—比色法

**(1) 试剂制备**

1. 3,5-二硝基水杨酸溶液：称0.5 g二硝基水杨酸，溶于20 ml 2 N(2 mol/L)氢氧化钠和50 ml水中，再加30 g酒石酸钾钠，用水稀释至100 ml(不超过7天)；
2. 磷酸氢二钠溶液[1/15M]：11.867 g Na2HPO4·2H2O溶于1 L蒸馏水或23.858 g Na2HPO4·12H2O溶于蒸馏水，定容至1 L；
3. 磷酸二氢钾[1/15M]：9.078 g KH2PO4溶于蒸馏水，定容至1 L；
4. 磷酸缓冲液[pH 5.5]：50 ml磷酸氢二钠溶液（1/15M）加入950 ml 磷酸二氢钾（1/15M），混合均匀即可；
5. 蔗糖溶液[8%]：称取80 g蔗糖溶于蒸馏水，定容至1 L；
6. 标准容液：葡萄糖在50-58℃烘8小时，称0.5 g溶于磷酸缓冲液（pH 5.5），定容至100 ml。

**(2) 测定步骤**

1. 称取1 g新鲜土样（共4份，其中有基质土样3份，无机质对照1份）于三角瓶中，向有基质中加入0.25 ml甲苯，15 ml 蔗糖溶液和5 ml 磷酸缓冲液；向无基质中加入0.25 ml甲苯，15 ml蒸馏水和5 ml 磷酸缓冲液；整个实验需做一个无土对照，向无土的三角瓶中加入0.25 ml甲苯，15 ml 蔗糖溶液和5 ml 磷酸缓冲液；
2. 摇匀混合后，放入恒温箱中，在37℃下培养24 h；
3. 培养结束后，迅速用中速的定性滤纸过滤到三角瓶中；吸取滤液1 ml，加入到玻璃试管中，再加3 ml二硝基水杨酸溶液，并在沸水的水浴锅中加热5 min，随即将试管移至自来水冷却后，洗入50 ml容量瓶定容，在分光光度计上于508 nm处进行比色；
4. 标准曲线：分别取0、0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1.1、1.3标准容液到玻璃试管，同③进行显色反应、定容和测定。

### 10.2 土壤脲酶测定—比色法

**(1) 试剂制备**

1. 柠檬酸盐缓冲液[pH 6.7]：取368 g柠檬酸溶于600 ml蒸馏水中，另取295 g氢氧化钾溶于少量水，再将二种溶液合并，用1 N（1 mol/L NaOH）氢氧化钠将pH调至6.7，并用蒸馏水定容至2 L；
2. 苯酚钠溶液：称62.5 g苯酚溶于少量乙醇中，加2 ml甲醇和18.5 ml丙酮，然后用乙醇定容至100 ml（A液），保存在冰箱中。称27 g氢氧化钠溶于水，定容至100 ml（B液），保存在冰箱中。使用前，将A、B两液混合，并用蒸馏水定容至500 ml备用；
3. 次氯酸钠溶液：量取16.4 ml安福替民（有效氯5.5%）定容到100 ml容量瓶中；
4. 尿素溶液[10%]：称取100 g尿素，用水溶至1 L；
5. 标准溶液：精确称取0.4717 g硫酸铵溶于水并定容至1 L，得到1 ml含有0.1 mg氮的标准液 （0.1 mg/ml）。

**(2) 测定步骤**

1. 称取1 g新鲜土样（共4份，其中有基质土样3份，无机质对照1份）于三角瓶中，向有基质中加入2 ml甲苯，10 ml 尿素溶液和20 ml柠檬酸盐缓冲液；向无基质中加入2 ml甲苯，10 ml蒸馏水和20 ml柠檬酸盐缓冲液；整个实验需做一个无土对照，向无土的三角瓶中加入2 ml甲苯，10 ml 尿素溶液和20 ml柠檬酸盐缓冲液；
2. 摇匀混合后，放入恒温箱中，在37℃下培养24 h；
3. 培养结束后，迅速用中速的定性滤纸过滤到三角瓶中，吸取1 ml滤液于50 ml容量瓶中，加入20 ml蒸馏水，充分摇荡；
4. 依次加入4 ml苯酚钠，仔细混合，再加入3 ml次氯酸钠，充分摇荡，放置20 min，用水稀释至刻度，溶液呈现青蓝色，1 h内在（青蓝色在1 h内保持稳定）在分光光度计上于578 nm处进行比色测定；
5. 标准曲线：吸取配置好的标准溶液10 ml，定容至100 ml，即稀释了10倍，吸取0、1、3、5、7、9、11、13 ml移至50 ml容量瓶，加水至20 ml，再按步骤④ 进行显色，显色定容后在紫外分光光度计上于578 nm处进行比色测定。

### 10.3 土壤过氧化氢酶测定—容量法

**(1) 试剂制备**

1. 3%过氧化氢溶液（用36% H2O2溶液配制）；
2. 3 N硫酸；
3. 0.1 N(0.02 ml.L-1)高锰酸钾溶液的配制与标定：
4. 0.02 M KMnO4溶液的配制：称取3.4 g KMnO4，倒入1000 ml烧杯中，加入适当蒸馏水使其溶解后，用水稀释至约1000 ml。摇匀，加热煮沸并保持1 hr，冷却后过滤，静置过夜、过滤后标定其浓度；
5. 0.05 mol. L-1 Na2C2O3 标准溶液的配制：称取6.7000 g基准Na2C2O3（120℃烘干2 hr后冷却称量），溶解，定容至1000 ml；
6. KMnO4溶液的标定：取25 ml 0.05 mol. L-1 Na2C2O3标准溶液，加水25 ml，10 ml 9 mol. L-1 H2SO4溶液，加热至60～70℃，用KMnO4溶液滴定，接近终点时逐滴加入至微红，30 s不褪色为止。计算KMnO4溶液的浓度（CKMnO4）。

CKMnO4＝CNa2C2O3.V Na2C2O3/V KMnO4

**(2) 测定步骤**

取2 g风干土，置于100 ml三角瓶中，并注入40 ml蒸馏水和5 ml 3%过氧化氢溶液。将三角瓶放在复式振荡机上，振荡20 min(120 r/min, 30℃)，而后加入5 ml 3 N硫酸，以稳定未分解的过氧化氢，再将瓶中悬液用慢速型滤纸过滤，然后，吸取25 ml滤液，用0.1 N高锰酸钾滴定至淡粉红色终点。

**(3) 结果计算**

用于滴定土壤滤液所消耗的高锰酸钾量(毫升数)为B，用于滴定25 ml原始的过氧化氢混合液所消耗的高锰酸钾量(毫升数)为A。

(A-B)\*T即为过氧化氢酶活性。以20 min后1 g土壤的0.1 N高锰酸钾的毫升数表示，式中T为高锰酸钾滴定量的校正值。

### 10.4 土壤磷酸酶测定—磷酸苯二钠比色法(只作酸性和中性磷酸酶)

**(1) 试剂制备**

1. 5%磷酸苯二钠：5 g磷酸苯二钠溶于100 ml pH 5.5醋酸盐缓冲液、5 g磷酸苯二钠溶于100 ml pH 7.0柠檬酸盐缓冲液中；
2. 0.2 M pH 5醋酸盐缓冲液：称取27.22 g醋酸钠（NaAc.3H2O）溶解于蒸馏水中，定容至1000 ml，即为0.2 M醋酸钠液（x）；吸取700 ml 0.2 M醋酸钠液（x）和300 ml 0.2 M醋酸溶液混合，即得0.2 M pH 5醋酸盐缓冲液；
3. 0.1 M pH 7.0磷酸盐－柠檬酸缓冲液：35.61 g磷酸氢二钠.2H2O（Na2HPO4.2H2O）溶解于水中，定容至1000 ml，得X溶液；21.01 g柠檬酸.2H2O溶解于水中，定容至1000 ml，得Y溶液；363 ml X溶液＋1637 ml Y溶液混匀，即得0.1 M pH 7.0磷酸盐－柠檬酸缓冲液；
4. 0.05 M PH 9.4硼砂-NaOH缓冲液，19.07 g/L硼砂液与55 ml 0.2 M NaOH液混合稀释至1000 ml；
5. PH 9.8 NH4Cl-NH4OH缓冲液，20 g NH4Cl，溶于100 ml浓NH4OH中；
6. 8%铁氰化钾：8 g溶于100 ml水中；
7. 2%氨基安替比林：2 g 4-氨基安替比林溶于100 ml水；
8. 酚的标准溶液：

酚原液---取1 g重蒸酚溶于蒸馏水中，稀释至1 L；储于棕色瓶中；

酚工作液---取10 m酚原液稀释至1 L(每毫升含0.01 mg酚)；

1. 甲苯。

**(2) 标准曲线绘制**

取1、3、5、7、9、11和13 ml酚工作液，置于50 ml容量瓶中，加入20 ml蒸馏水，再加入0.25 ml缓冲液，0.5 ml氨基安替比林，0.5 ml铁氰化钾液。定容，15 min在510 nm比色，以光密度为纵坐标，浓度为横坐标绘制成标准曲线。

**(3) 测定步骤**

1. 称5 g风干土置于200 ml三角瓶中，加1 ml甲苯，轻摇15 min后，加入20 ml 0.5%磷酸苯二钠(酸性磷酸酶用醋酸盐缓冲液，中性磷酸盐用柠檬酸盐缓冲液，碱性磷酸盐用硼酸盐缓冲液)，仔细摇匀后放入恒温箱，在37℃下培养2 h；
2. 吸取5 ml滤液于50 ml容量瓶中，然后按绘制标准曲线所述方法显色，用硼酸缓冲液时，呈现蓝色，在分光光度计上于660 nm处比色。

**(4) 结果计算**

磷酸酶活性，以24 h后1 g土壤中释出的酚毫克数表示：

酚(mg)=a\*8

式中：

a—从标准曲线上查得的酚毫克数；

8—换算成1 g土的系数。

### 10.5 土壤纤维素酶测定—硝基水杨酸比色法

**(1) 研究意义**

纤维素是植物残体进入土壤的碳水化合物的重要组分之一。在纤维素酶作用下，它的最初水解产物是纤维二糖。在纤维二糖酶作用下，纤维二糖分解成葡萄糖。所以，纤维素酶是碳素循环中的一个重要酶。

**(2) 研究方法**

在纤维素酶参与下，纤维素最终水解生成葡萄糖。

测定土壤纤维素酶主要有以下几种方法：测定加到土壤中的纤维素物质的重量变化（剩余量）；根据纤维素水解产物——葡萄糖与某些物质(蒽酮、二硝基水杨酸)生成着色化合物进行比色测定；测定加入土壤的纤维素物质的质的变化，如粘合度（纤维素分解时，溶液粘合度降低，用粘度计测定）。

Reese曾把纤维素酶分为C1酶（用不溶纤维素作基质）和Cx酶（用可溶性羧甲基纤维素作基质），测定纤维素酶选用的缓冲体系包括磷酸盐缓冲液（pH 5.5或6.8）、醋酸盐缓冲液（pH 5.5）和柠檬酸盐磷酸盐缓冲液（pH 5.5）。

**(3) 试剂制备**

1. 1%羧甲基纤维素；
2. pH 5.5磷酸盐缓冲液：由0.06 M KH2PO4和Na2HPO4溶液混合制成；
3. 甲苯；
4. 3,5-二硝基水杨酸溶液：称0.5 g二硝基水杨酸，溶于20 ml 2 N氢氧化钠和50 ml水中，再加30 g酒石酸钾钠，用水稀释至100 ml（不超过7天）；
5. 葡萄糖标准溶液（1 ml标准液含0.2-0.8 mg葡萄糖）；
6. 标准曲线绘制：分别取不同浓度标准葡萄糖溶液1 ml移于25 ml容量瓶中，加3 ml 3,5-二硝基水杨酸溶液。将容量瓶放在沸腾水浴5 min，然后迅速冷却3 min，定容，15 min后在分光光度计上于波长540 nm处比色测定，以光密度值为纵坐标，以葡萄糖浓度为横坐标，绘制标准曲线。

**(4) 测定步骤**

称10 g土壤置于三角瓶中，加2 ml 1%羧甲基纤维素、5 ml pH 5.5磷酸盐缓冲液及1.5 ml甲苯，将其放在37℃下培养72 h，取出后过滤并定容25 ml。取1 ml滤液，加入3 ml 3，5-二硝基水杨酸溶液，沸水浴5 min，迅速冷却3 min，定容，15 min后在波长540 nm处比色，纤维素酶活性，以72 h 10 g土壤生成葡萄糖毫克数表示。

## 第十一节 土壤呼吸测定

**(1) 影响土壤呼吸的因素**

温度和湿度主要是通过对土壤微生物代谢和植物根系生长的影响来改变土壤呼吸作用的。许多研究表明，土壤呼吸和温度之间存在明显的相关关系。Q10值常用来描述温度和土壤呼吸之间的关系，它是指温度升高10℃时，土壤呼吸速率增大的倍数，平均值为2.4。水分一般和温度共同作用于土壤呼吸，产生协同效应。在一定温度范围内，土壤呼吸随着温度和湿度的升高而增高。在水分饱和或渍水或过干的条件下，土壤呼吸速率将被抑制。植被类型、养分状况、有机质含量、土壤的理化性质等在不同的区域有很大的差异，这导致土壤呼吸速率的时间、空间异质性较大。

**(2) 土壤呼吸的测定方法**

土壤呼吸采用碱液吸收法测定(Anderson, 1982)，其原理是：将一定浓度的碱液装入开敞的玻璃罐瓶中，放置在测定的土壤表面上，用一个上端密闭的金属圆桶罩住(下端嵌入土壤中至少2 cm )。当CO2从土壤表面释放出来时，被保持在圆桶内直到扩散被碱液吸收，达到测定时间后，取走碱液，未反应的部分通过滴定确定，减去这一部分，即得到被碱液吸收的CO2量。

具体操作是：选择测定地点后，将20 ml NaOH 溶液(1.0 N ) 装入玻璃瓶中放在距地表2 cm处的三角支架上，迅速用金属桶罩住，桶要避免阳光直接照晒，可用布、木板遮住，或外表镀上反光的铝箔。当碱液吸收24 h 后，取走盛碱液的容器, 用盖子盖紧带到实验室进行分析，这一测定需要的对照处理是：用碱液将金属桶中原有空气中的CO2吸收，为此，在测定地点将盛碱液的玻璃罐放入金属桶中，然后将桶的开敞一端也要密封住，如用盖盖住，用胶带纸将缝隙粘住。在实验室，将对照和暴露在土壤空气中的碱液进行滴定，确定未与CO2反应的NaOH 量。为此，要将过量的BaCl2（2 mol/l，5 ml）滴入碱液中，沉淀溶液中由CO2被NaOH 吸收所产生的NaCO3，形成BaCO3，再以酚酞作指示剂，用稀酸(1.0 N HCl) 中和未与CO2反应而剩余的NaOH。滴入酸时要慢，以避免与已沉淀的BaCO3接触而使之重新溶解，记录下滴定碱液所消耗的酸的体积。

以下公式可用来计算24 h内由土壤呼吸产生的CO2量：

C或CO2 (mg) = (*V* 1- *V* 2) N E

式中，*V* 1——中和对照处理中碱液所消耗的酸的体积；*V* 2——中和土壤呼吸处理中碱液所消耗的酸的体积；N —— 盐酸的当量浓度；E——重量转换系数，用C表示时E= 6，用CO2表示时E= 22。

**(3) 测定步骤**

1. 选取好样点，将收集装置安装好；
2. 试剂配置：0.5 mol/L NaOH，0.5 mol/L的HCl，0.5 mol/L的BaCl2，酚酞指示剂；
3. 吸取20 mL NaOH (过量) 置于敞口容器中（烧杯），迅速密封，然后将其放入收集容器中，并密封；
4. 放置2小时后将其密封后取回，加入5 ml BaCl2（过量）以沉淀生成的Na2CO3，用0.5 mol/L的HCl滴定。

**(4) 结果计算**

计算CO2排放通量，公式如下：

VCO2=[(V标定-V滴定)\*CHCl\*V桶\*0.0022]/t

式中，t：为碱液吸收CO2的时间；CO2排放通量单位为mg/h\*m2；V桶为桶的体积；CHCl为HCl的浓度；0.0022为换算系数。

# 第四章 凋落物相关指标测定

## 第一节 凋落物样品采集与处理

### 1.1 新鲜凋落物采集与处理

新鲜凋落物的采集通过在野外样地中布设凋落物收集器进行。根据实验安排，定期在样地内预先布设的收集器中进行收集，本所布设与野外的凋落物收集器主要分为两类：

 **(1) 方框形凋落物收集器**

采集时，收集框中所有的凋落物，装入塑料密封袋进行保存，做好标记，遮光冷藏保存带回实验室进行分析。

 **(2) 倒圆锥形凋落物收集器**

采集时，如圆锥体内壁中挂有凋落物，将凋落物人为移入系在圆锥体下方开口处的黑布袋中，解下黑布袋装入塑料密封袋，做好标记，换上新的空黑布袋以便下一次采集。

### 1.2 分解袋中凋落物的采集与处理

分解袋凋落物的采集通过收集预先布设在样地内装有凋落物的分解袋进行。根据实验安排，定期采集样地内预先布设的凋落物分解袋。

采集过程中，在尽量不损失目标样品的情况下，尽可能的清除分解袋外附着的其他凋落物，植物根系以及土壤，装入塑料密封袋，做好标记，避光冷冻保存带回实验室进行分析。

## 第二节 凋落物物理性质分析

### 2.1 凋落物分解温度检测

凋落物分解温度通过埋设纽扣式温度计的小号塑料密封袋埋入后覆盖，并将密封袋上所系的尼龙绳系在周边明显且固定的物体上（如树干或大型岩石等），温度计的记录时间有限，需定期进行更换，并将所记录数据录取保存。

### 2.2 凋落物含水量测定

1. 凋落物含水量通过差量法进行，需预先准备足量牛皮纸信封在50-60℃烘箱烘干至恒重，经天平称重后，将信封质量记在信封上备用；
2. 将凋落物从尼龙分解网袋中倒入临时容器后，仔细分选出其中的杂物，再将凋落物装入备好的信封中，用粗天平称重，并将此时的质量（凋落物鲜重+信封重）记在信封上；
3. 把装有凋落物的信封放入50-60℃的烘箱进行烘干，每8小时取出用粗天平称重并记录数据于信封，当质量不再下降则表示凋落物已烘至恒重。

含水率=$\frac{m\_{2}-m\_{3}}{m\_{2}-m\_{1}}×100\%$

式中：

*m1*=信封重；

*m2*=信封重+凋落物鲜重；

*m3*=信封重+凋落物干重。

### 2.3 凋落物酸碱度测定

将采回的凋落物自然风干后剪碎，加入蒸馏水（凋落物与水的比例为1:20)后充分搅匀，静置30 min，过滤取上清液，用pH计测其酸碱度。

### 2.4 凋落物质量损失

凋落物质量损失通过差量法进行。在布设分解戴时，需带回一定量的分解袋，取出凋落物装入预先备好的记录信封自重的烘干信封，烘至恒重后，计算出凋落物的初试质量*m0*。后期，每次采样后，用相同的方法得到该次采样的凋落物干重*mi*。

$$w=m\_{0}-m\_{i}$$

式中：

w=凋落物质量损失；

$m\_{0}$=凋落物初始质量；

$ m\_{i}$=凋落物第i次采样的质量。

仔细清理分解袋附着的土壤和侵入的根系，称鲜重，测定水分换算系数，换算出凋落物质量损失率。

D=(Wt/W0)×100%

式中：D为凋落物的质量损失率(%)；Wt为换算出的凋落物样品分解t时间后损失的重量(g)；W0为投放时分解袋样品初始重量。

## 第三节 凋落物碳、氮、磷测定

### 3.1 凋落物有机碳测定

**(1) 原理**

根据中华人民共和国国家标准(GB 7857-87)、中华人民共和国林业行业标准(LY/T 1237-1999)，采用重铬酸钾氧化法。加热消煮使有机碳氧化为CO2，Cr2O72-被还原为Cr3+，剩余的K2Cr2O7用Fe2+滴定，总K2Cr2O7减Fe2+滴定K2Cr2O7之差，计算即为有机碳含量。

**(2) 仪器设备**

210℃消化炉；消煮管；锥形瓶；酸式滴定管。

**(3) 试剂制备**

1. 0.8000 mol/L 1/6K2Cr2O7溶液：K2Cr2O7 39.2245 g溶于1 L蒸馏水；
2. 0.2000 mol/L FeSO4溶液：FeSO4·7H2O 55.6000 g溶于1 L蒸馏水(加浓硫酸15 mL防氧化)，用0.1000 mol/L K2Cr2O7标准溶液标定；
3. 临菲啰啉指示剂：临菲啰啉(C12H8N2·H2O) 1.4850 g与FeSO4·7H2O 0.6950 g溶于100 mL蒸馏水，贮于棕色瓶。

 **(4) 测定步骤**

1. 称样：取凋落物0.0100 g左右称重，置于消煮管底部；
2. 消煮：加0.8000 mol/L 1/6K2Cr2O7 10 mL，再加浓硫酸5 mL，摇匀，于210℃消煮10 min，用50 mL左右蒸馏水将消煮管内容物洗入锥形瓶；
3. 滴定：加临菲啰啉指示剂4滴，用0.2000 mol/L FeSO4(标定)滴定，溶液由橙黄经墨绿迅速变为棕红色为终点。

**(5) 结果计算**

OC[g/kg]={[(CK2Cr2O7×VK2Cr2O7)/V0]×(V0-V)×0.003×1.1×103}/DM

=[CFeSO4标×(V0-V)×0.003×1.1×103]/DM

OM[g/kg]=OC×1.724 C/N[%]=[OC/TN]×100

式中，OC(organic carbon)为有机碳含量(g/kg)，OM(organic matter)为有机质含量(g/kg)，C/N为碳氮比(%)，TN(total nitrogen)为全氮含量(g/kg)，CK2Cr2O7为1/6K2Cr2O7浓度(0.8000 mol/L)，VK2Cr2O7为1/6K2Cr2O7体积(10 mL)，V0为空白组滴定消耗FeSO4(标定)体积(mL)，V为样品组滴定消耗FeSO4(标定)体积(mL)，DM为样品干质量(g)，CFeSO4标为经标定的FeSO4浓度(mol/L), 0.003为1/4碳原子的摩尔质量(g/mmol)，1.1为氧化校正系数，10-3为mg与g之间的进制，1.724为有机碳与有机质之间的换算系数。

### 3.2 凋落物水溶性有机碳、氮、磷测定

**(1) 备置提取液**

 备置方法：精确称取0.5 g (称准至0.0001 g)，加入150 ml锥形瓶中，加入50 ml蒸馏水，常温下震荡30 min，过0.45 μm滤膜，即为待测液，将待测滤液置于生化培养箱中(4℃)保存用以分析（一周内完成）。

**(2) 水溶性有机碳的测定**

 水溶性有机碳采用TOC分析仪(multi N/C 2100，analytikjena)测定。每次抽取200 μm待测滤液进行测定。低浓度可以用直接法（NPOC）测定，高浓度是可以差减法（TC-IC）测定，但注意不能超过仪器的范围。

**(3) 水溶性氮的测定**

抽取25 ml待测滤液于消煮管中，然后根据凋落物全氮的测定方法（凯氏定氮法）测定，即为水溶性氮。

**(4) 水溶性磷的测定**

抽取5 ml待测滤液于50 ml容量瓶中，然后根据凋落物全磷的测定方法（钼锑抗比色法）测定，即为水溶性磷。

### 3.3 凋落物全氮测定

**(1) 方法原理**

根据中华人民共和国国家标准(GB 7173-87)、中华人民共和国林业行业标准(LY/T 1228-1999)，采用凯氏定氮法。浓H2SO4加热消煮使全氮转化为铵态氮，NaOH碱化，蒸馏出氨，H3BO3吸收，标准HCl滴定。

**(2) 仪器设备**

220℃、360℃消化炉；凯氏定氮仪；消煮管；锥形瓶；100 mL容量瓶；酸式滴定管。

**(3) 试剂制备**

1. 400 g/L NaOH溶液：NaOH 400 g溶于1 L蒸馏水；
2. 20 g/L H3BO3溶液：H3BO3 20 g溶于1 L蒸馏水；
3. 0.0100 mol/L HCl溶液：浓HCl 8.4 mL溶于1000 mL蒸馏水，即为0.1 mol/L HCl，再稀释10倍（最好20倍），用0.0100 mol/L硼砂(Na2B4O7)标准溶液标定；

公式为：CHCl=2(CNa2B4O7×VNa2B4O7)/(VHCl-Na2B4O7-VHCl-H2O)

1. 0.0100 mol/L Na2B4O7标准溶液：Na2B4O7·10H2O 1.9068 g溶于500 mL蒸馏水；
2. 甲基红-溴甲酚绿指示剂：甲基红0.066 g与溴甲酚绿0.099 g溶于100 mL乙醇。

**(4) 测定步骤**

1. **称样：**取凋落物0.2000 g左右称重，置于消煮管底部，加浓H2SO4 7.5 mL过夜；
2. **消煮：**催化剂：CuSO4: K2SO4(1: 9) 3-4 g，摇匀，加热至澄清，冷却。用50 mL左右蒸馏水将消煮管内容物洗入100 mL容量瓶，冷却，定容，转移至100 mL小口瓶备用；

**加热设置：程序设置：10, 3, 2;**

**0-200**℃；时间：5 min 温度：120℃.

 **0-180**℃；时间：5 min(温度分别为200, 250, 300, 350℃).

 **0-200**℃；时间：60min 温度：400℃.

1. **蒸馏：**锥形瓶中加20 g/L H3BO3 5 mL和甲基红-溴甲酚绿指示剂2滴；消煮管中加待测液25 mL，安装于凯氏定氮仪，加碱，蒸馏2 min左右；
2. **滴定：**用0.0100 mol/L HCl(标定)滴定，溶液由绿色经透明迅速变为红色为终点。

**(5) 结果计算**

TN [g/kg]=[(V-V0)×C×0.014×10-3]/DM

式中，TN(total nitrogen)为全氮含量(g/kg)，V为样品组滴定消耗HCl体积(mL)，V0为空白组滴定消耗HCl体积(mL)，C为HCl(标定)浓度(mol/L)，0.014为氮原子的摩尔质量(g/mmol)，10-3为mg与g之间的进制，DM为样品干质量(g)。

### 3.4 凋落物全磷测定

**(1) 方法原理**

根据中国人民共和国国家标准( GB 7852-87)、中华人民共和国林业行业标准(LY/T 1232-1999)，采用钼锑抗比色法。浓H2SO4加热消煮使全磷转化为可溶性磷酸盐，在一定pH和Sb3+下，H3PO4与钼酸铵[(NH4)6Mo7O24]反应形成锑磷钼混合杂多酸，被抗坏血酸(C6H8O6)还原为磷钼蓝，比色，根据回归方程计算全磷含量。

**(2) 仪器设备**

220℃、360℃消化炉；分光光度计；消煮管；50 mL容量瓶。

**(3) 试剂制备**

1. 5 μg/mL P标准液：50℃烘干的KH2PO4 0.4394 g溶于1 L蒸馏水(加浓H2SO4 5 mL防腐)，浓度为100 μg/mL，稀释20倍即为5 μg/mL P标准液；
2. 2 mol/L NaOH溶液：NaOH 80 g溶于1 L蒸馏水；
3. 钼锑贮存液：钼酸铵[(NH4)6Mo7O24·4H2O] 10 g溶于300 mL蒸馏水；浓H2SO4 153 mL缓缓加入到400 mL蒸馏水，冷却，倒入钼酸铵溶液，再加酒石酸锑钾(KSbOC4H4O6·1/2H2O) 0.5 g，混匀，定容至1 L，避光贮存；
4. 钼锑抗显色剂：抗坏血酸(C6H8O6) 1.5 g溶于100 mL钼锑贮存液，现配现用；
5. 2 g/L 2,4-二硝基酚指示剂：2,4-二硝基酚0.2 g溶于100 mL蒸馏水。

**(4) 测定步骤**

1. **称样：**取凋落物0.2000 g左右称重，置于消煮管底部，加浓H2SO4 7.5 mL过夜；
2. **消煮：**同N；
3. **显色：**取待测液5 mL于50 mL容量瓶，加蒸馏水20 mL左右，加2,4-二硝基酚指示剂2滴，2 mol/L NaOH调节pH至微黄，加钼锑抗显色剂5 mL，定容，显色30 min；
4. **比色：**700 nm测定OD值，由回归方程求得P浓度；
5. **标准曲线：**取5 μg/mL P标准液0、1、2、3、4、5、6 mL于50 mL容量瓶，定容，得0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 μg/mL P标准系列。加蒸馏水20 mL左右，加2,4-二硝基酚指示剂2滴，2 mol/L NaOH调节pH至微黄，加钼锑抗显色剂5 mL，定容，显色30 min。以0 μg/mL P调零，700 nm测定OD值。以标准P浓度(μg/mL)为横坐标，OD值为纵坐标，绘制标准曲线，建立回归方程。

**(5) 结果计算**

TP [g/kg]=(C×V×D×10-3)/DM

式中，TP(total phosphorus)为全磷含量(g/kg)，C为P浓度(由回归方程求得，μg/mL)，V为反应体积(50 mL)，D为分取倍数(100 mL/5 mL=20)，103为g与mg之间的进制，DM为样品干质量(g)。

## 第四节 凋落物腐殖化测定

### 4.1 凋落物腐殖物质光学特性测定

**(1) 试剂制备**

1. NaOH和Na4P2O7·10H2O混合提取液(0.1 mol L-1)：称取氢氧化钠20 g和十水合焦磷酸钠223 g，将称取的药品放入烧杯，用量筒量取1.5 L-2 L蒸馏水于烧杯将药品溶解(为加速药品溶解，可以放入水浴锅中进行加热)，待其冷却后，再定容至5 L；
2. NaHCO3(0.05 mol L-1)：称取碳酸氢钠4.2 g溶于少量蒸馏水，再定容至1 L。

**(2) 测定步骤**

1. 光学特性待测液提取：ΔlogK、E4/E6和A600/C的测定参考Chenet al.的方法。称取风干样品1.00 g于150 mL锥形瓶，加100 mL 0.1 mol L-1 NaOH和Na4P2O7·10H2O混合提取液，加塞振荡10 min，沸水浴1 h，待冷却后过滤，于3 000 r min-1离心10 min，再过0.45 μm滤膜，滤液为待测液；
2. 取待测液10 mL，加0.05 mol L-1 NaHCO3调节pH至7-8，用分光光度计(TU- 1901, Puxi, Beijing, China)测定400 nm、465 nm、600 nm和665 nm处的吸光值，用碱提取液作为对照进行测定。

**(3) 结果计算**

ΔlogK=log(A400/A600)

E4/E6=A465/A665

式中，A400、A600、A465、A665分别为400、600、465、665 nm处吸光值。

### 4.2 凋落物质组成成分测定

**(1) 试剂制备**

1. NaOH和Na4P2O7·10H2O混合提取液(0.1 mol L-1)：称取氢氧化钠20 g和十水合焦磷酸钠223 g，将称取的药品放入烧杯，用量筒量取1.5 L-2 L蒸馏水于烧杯将药品溶解(为加速药品溶解，可以放入水浴锅中进行加热)，待其冷却后，再定容至5 L；
2. 0.5 mol L-1 H2SO4：用移液管量取27 ml浓硫酸于400 ml蒸馏水中，待其冷却后，再定容至1 L；
3. 0.05 mol L-1 H2SO4：将配置的0.5 mol L-1 H2SO4溶液稀释10倍，取200 ml的0.5 mol L-1 H2SO4溶液将其稀释10倍，定容至2 L；
4. 0.05 mol L-1 NaOH：先配置0.5 mol L-1 NaOH溶液，称取氢氧化钠8 g溶于少量蒸馏水中，再定容至1 L；将配置好的0.5 mol L-1 NaOH溶液稀释10倍为0.05 mol L-1 NaOH溶液。

**(2) 测定步骤**

1. 待测液的提取：称取风干样品1.00 g于150 mL锥形瓶，加100 mL 0.1 mol L-1 NaOH和Na4P2O7·10 H2O混合提取液，加塞振荡10 min，沸水浴1 h，待冷却后过滤，于3 000 r min-1离心10 min，再过0.45 μm滤膜，滤液为待测液；
2. 取待测液1 mL于PE管，稀释10倍，测定总腐殖质碳(humus substances, HS)；
3. 取待测液20 mL于试管，加热近沸，逐滴加0.5 mol L-1 H2SO4至pH 2 (絮状沉淀)，于80°C水浴30 min，过夜。用0.05 mol L-1 H2SO4洗涤，过滤，沉淀为胡敏酸，滤液为富里酸。用热的0.05 mol L-1 NaOH少量多次洗涤沉淀，过滤至100 mL容量瓶，定容，取溶解的胡敏酸溶液过0.45 μm滤膜，测定胡敏酸碳(humic acid, HA)和富里酸碳(fulvic acid, FA)。并由此计算胡敏素碳(humin, Hm)、腐殖化度(humification degree, HD)和腐殖化率(humification ratio, HR)；
4. 碳含量的测定使用TOC进行。

**(3) 结果计算**

Hm=HS-HA-FA

HD=HS/OC

HR=HD/Dt

式中，Hm为胡敏素碳(humin, mg g-1)，HS为腐殖质碳(humic substances, mg g-1)，HA为胡敏酸碳(humic acid, mg g-1)，FA为富里酸(fulvic acid, mg g-1)，HD为腐殖化度(humification degree, %)，OC为有机碳(organic carbon, mg g-1)，HR为腐殖化率(humification ratio, % d-1)，Dt为各关键时期的天数(d)。

Ps: OC, 有机碳的测定参考凋落物碳测定方法。

## 第五节 凋落物组分测定

### 5.1 总水溶性组分

**(1) 测定步骤**

总水溶性组分以热水浸提，精确称取1 g干样(*m1*) (称准至0.0001 g)，加入250 ml锥形瓶中，加入100 ml 80°C的热蒸馏水，置于沸水浴中加热0.5 h，并经常摇荡。将样品转移到已称重(G)的干燥砂芯漏斗中，用热蒸馏水洗涤残渣及锥形瓶并将瓶内残渣全部洗入砂芯漏斗，继续洗涤至洗液无色后，再多洗涤2—3次。用真空泵抽干滤液，将砂芯漏斗于105±2°C烘干至质量恒定(*m2*)。

**(2) 结果计算**

热水抽出物含量*x*(%)，按公式计算：

=

式中：

——抽提前试样的绝干质量，g；

——抽提后试样的绝干质量，g。

### 5.2 总有机溶性组分

**(1) 测定步骤**

采用索式提取法以三氯甲烷抽提，精确称取样品1 g (*m1*)(称准至0.0001 g)，放入已经干燥的滤纸套中，将滤纸套及样品于60℃的烘箱中烘干称重(*m2*)，用150 ml三氯甲烷于80°C下索式提取，提取至溶剂颜色为无色，然后滤纸套及样品在60°C下被烘干至恒重(*m3*)，通过重量损失测定有机溶性物质含量。

**(2) 结果计算**

有机溶剂抽出物含量，按下式计算：

 =

式中：

*m1*——抽提前试样的绝干质量，g；

*m2*——抽提前样品和滤纸套的绝干质量，g；

*m3*——抽提后样品和滤纸套的绝干质量，g。

### 5.3 总酸溶性和酸不溶性组分

**(1) 测定步骤**

1. 采用索式提取法以三氯甲烷抽提有机溶性组分，精确称取样品1 g(*m1*)(称准至0.0001 g)，放入已经干燥的滤纸套中，将滤纸套及样品于60℃的烘箱中烘干称重(*m2*)，然后用150 ml三氯甲烷于80°C下索式提取，提取至溶剂颜色为无色，然后滤纸套及样品在60°C下被烘干至恒重(*m3*)，去除掉有机溶性物质；
2. 将滤纸套中的样品转移至250 ml锥形瓶中，加入100 ml 80°C的热蒸馏水，置于沸水浴中加热0.5 h，并经常摇荡。将样品转移到已称重(G)的干燥砂芯漏斗中，用热蒸馏水洗涤残渣及锥形瓶并将瓶内残渣全部洗入砂芯漏斗，继续洗涤至洗液无色后，再多洗涤2—3次。用真空泵抽干滤液，将砂芯漏斗于105±2°C烘干至质量恒定(*m4*)，去除水溶性物质；
3. 用72%硫酸注满砂芯漏斗，用玻璃棒搅拌至样品完全浸软后，浸泡样品过夜，第二天用热蒸馏水多次洗涤残渣，用真空泵抽干滤液，提取酸溶性物质，将砂芯漏斗于105±2°C烘干至质量恒定(*m5*)，剩余残渣为酸不溶性物质。

**(2) 结果计算**

通过重量损失测定酸溶性和酸不溶性物质含量，结果计算如下：

1. 酸溶性物质含量，按下式计算：

=

式中：

——抽提前试样的绝干质量，g；

——抽提了有机溶性物质与水溶性物质后试样的绝干质量，g；

——抽提了有机溶性物质、水溶性物质与酸溶性物质后试样的绝干质量，g。

1. 酸不溶性物质含量，按下式计算：

=

式中：

——抽提前试样的绝干质量，g；

——抽提了有机溶性物质、水溶性物质与酸溶性物质后试样的绝干质量，g。

## 第六节 凋落物金属元素测定

**(1) 方法原理**

植物样品用硝酸消煮，分离二氧化硅定容后的同一待测液，可使用电感耦合等离子体发射光谱法(ICP-AES)同时测定全铁、铝、钙、镁、钾、钠、磷、硫、锰、铜、锌等元素。硝酸是强酸同时又是强氧化剂，沸点80℃，当混合酸加入样品后，硝酸与有机质作用，产生无色二氧化碳及棕色二氧化氮气体，使样品膨胀，起泡，加热时作用更强。

**(2) 仪器设备**

1. 微波消解仪、分析天平、元素测定相关仪器；
2. 50 ml容量瓶、中速定性滤纸、锥形瓶或塑料瓶（小白瓶，60 ml）；
3. 移液管、移液枪等。

**(3) 试剂制备**

1. 用于消煮样品的试剂：浓HNO3(优级纯)，高氯酸；
2. 用于清洗容器的试剂：化学纯的HNO3或HCl；
3. 金属元素标准液、去离子水。

**(4) 测定步骤**

1. 制备待测液
2. **微波消解法制备待测液：**准确称取0.2000 g凋落物粉末干样，置于微波消解仪消煮管内底部，加入7 ml 浓HNO3，摇匀，通风橱消解过夜。将消煮管依次置于消煮炉转盘，放入微波消解仪中。按照设定的消解程序进行消解，消解结束后冷却至室温。轻轻拧开管盖放出内部气体，用去离子水将消解液洗入50 ml容量瓶中，定容，摇匀，过滤至塑料瓶中待测；
3. **浓硝酸与高氯酸消解制备待测液：**准确称取0.2000 g凋落物粉末干样于聚四氟乙烯坩埚中，加入5 ml混合酸[浓硝酸与高氯酸以5:1（体积比）混合]，放置于通风橱中静置过夜。将装有样品的坩埚放入高压消解罐中拧紧，放入烘箱中。温度分别设置为80℃（20 min），120℃ （1 h），160℃ （1 h），180℃（2 h）。待消化完成后冷却至室温，用去离子水将消解液全部转移至50 ml容量瓶中，定容，摇匀，并迅速移至塑料瓶中保存；
4. 制备空白试样：不加样品，其余同“制备待测液”步骤，制备空白待测液2—3份；
5. 标准曲线绘制：用金属元素标准液自行配制待测标准溶液，标准溶液酸的浓度与消煮液中酸的浓度接近，标准溶液平时应放置在冰箱中（保鲜温度），放置时间不宜过长；
6. 样品测定
7. 打开空气泵（包括电源开关、红色按钮提上去为开、绿色开关按钮），乙炔罐拧开90°，红色旋钮向ON方向拧紧，压力表在0.09-0.1之间。打开电脑及AA-7000，取下挡板，打开WizAArd软件，输入用户名及密码，进入后选择仪器--连接，检测Air--确定，废液传感器检测--拧开废液罐瓶盖提起--确定--盖上瓶盖--确定，检测N2O--否，检测C2H2--确定，漏气检查过程中选择元素向导，选择元素，编辑参数--谱线搜索--下一步，校准曲线设定--行数更新--输入标尺浓度，样品组设定--样品数更新，下一步--直至完成（使用前检查灯位设置）；
8. 待测液亦可直接按照设定程序，使用电感耦合等离子体发射光谱法同时测定多种金属元素。

**(5) 结果计算**

X（mg/kg）=（D-B）×50 (ml) / M

式中：

X：样品中元素含量(mg/kg)；

D：样品测定值(mg/L)；

B：空白值(mg/L)；

M：样品质量(g)。

**(6) 注释**

1. 微波消解仪消解前称样品注意事项：称样时混匀样品；称样时一定要避免交叉污染；样品应放到消煮管底部，避免沾在壁上；每次（40个样）都要称取1个标样和2个空白；
2. 微波消解程序设置应在工程师指导下进行，参考程序如下：

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **stage** | **power** | **RAMP** | **control** | **HOLD** |
| 1 | 1200w | 06:00 | 120℃ | 02:00 |
| 2 | 1200w | 04:00 | 150℃ | 05:00 |
| 3 | 1200w | 04:00 | 185℃ | 20:00 |

整个过程包括4个阶段，除上述3个stage以外，之后还有一个冷却过程，大约需要25 min。因此，一次消煮共需时间大约70 min，消煮管内不能有金属物质等，以免爆炸；

1. 微波消解消煮管清洁：消煮管每次消煮使用过后应用大量自来水冲洗，再用去离子水润洗，晾干或擦干外壁后加入7-8 ml硝酸（优级纯），拧紧管盖（保持所有消解罐盖松紧程度一致），放入消煮炉转盘中，打开仪器，按HOME键进入主界面，选择Load method--select—user directory--select—CLEAN—select，点击开始。待冷却阶段结束后，取出消煮管，将溶液倒掉废液桶，再用去离子清洗管子3-4次，倒扣晾干备用（消解时保持消煮罐外壁干燥）；
2. 容量瓶、小漏斗、移液管等需洗涤的仪器在使用前需用1:10硝酸（化学纯即可）或1:8盐酸（化学纯即可）浸泡3小时以上，然后用自来水冲洗2－3次后再用去离子水清洗干净，放在干净的密闭容器中，用于清洗的稀酸用一个固定的容器，最多洗两次后更换；
3. 样品消煮完后尽快进行测定，不宜放置时间太长；测定时首先要先空白和标样，确定没有问题后再开始样品的测定；每测定20个样品后需要校准一次标准曲线；如果空白和标样结果不可靠，则与此相关的所有样品的测定结果无效。

## 第七节 凋落物微生物测定

### 7.1 凋落物微生物生物量测定

#### 7.1.1 微生物生物量碳测定

**(1) 试剂制备**

1. 去乙醇氯仿：普通氯仿试剂一般含有少量乙醇作为稳定剂，使用前需除去。将氯仿试剂按1:2（体积分数）的比例与去离子水或蒸馏水一起加入分液漏斗中，充分摇动1 min，慢慢放出底层氯仿于烧杯中，如此洗涤三次。得到的无乙醇氯仿加入无水氯化钙，以除去氯仿中的水分。纯化后的氯仿置于暗色试剂瓶中，在低温（4℃）、黑暗状态下保存。注意氯仿具有致癌作用，必须在通风橱中进行操作；
2. K2SO4提取液[0.5 mol/L]：称取174.26 g K2SO4分析纯定容至2 L（难溶，需用磁力搅拌器水浴锅加热，待冷却后方可定容）；
3. 重铬酸钾-浓硫酸溶液[0.018 mol/L K2CrO7-12 mol/L H2SO4]：称取5.3000 g 分析纯的重铬酸钾于400 ml 蒸馏水中，缓缓加入435 ml 分析纯浓硫酸（H2SO4, ρ=1.84 g/ml），边加边搅拌，冷却至室温后定容至1 L；
4. 邻菲罗啉指示剂：称取1.49 g 邻菲罗啉溶于100 ml 0.7%分析纯硫酸亚铁溶液，此溶液易变质，应密封保存与棕色试剂瓶中；
5. 硫酸亚铁溶液[0.05 mol/L]：称取13.9 g 分析纯硫酸亚铁溶于800 ml 蒸馏水中，加入5 ml 分析纯浓硫酸，用蒸馏水定容至1 L，保存于棕色试剂瓶中，注意：此溶液易被空气氧化，每次使用是应该标定其实际浓度；
6. 重铬酸钾标液[0.05 mol/L]：称取经130℃烘2 h的分析纯重铬酸钾2.4515 g，定容至1 L。

**(2) 测定步骤**

1. 称取2.000 g 新鲜凋落物于白瓶中，然后放进真空干燥箱内，并放置盛有去除乙醇的氯仿的烧杯（200 ml左右），烧杯内加入适量的石英砂，同时还应放入一小杯稀NaOH溶液（100 ml，吸收熏蒸期间释放的CO2），以及一小杯水（100 ml，保持湿度）。熏蒸时间为24 h。另外称取同等数量鲜土，置于另一干燥箱以作未熏蒸对照；
2. 熏蒸结束，放气，取出装有氯仿的烧杯后，反复抽真空4-5次（抽气-放气），每次3 min，待完成以上步骤后，方可取出土样进行下一步实验；
3. 向熏蒸和未熏蒸的土样中加入25 ml 硫酸钾溶液，振荡30 min（熏蒸与未熏蒸的操作步骤相同），震荡结束后用中速定性滤纸过滤至小口瓶中；
4. 吸取5 ml 浸提液于小消煮管中，再加入5-10 ml 0.018 mol/L的重铬酸钾溶液，再加入适量石英砂；
5. 混匀后置于远红外消煮炉中消煮10 min，消化管放入前，炉中的温度应升至179℃；
6. 待冷却后，无损的转移到150 ml 三角瓶中，用蒸馏水洗涤消化管3~5次，使溶液体积大约为80 ml；
7. 各加入5滴邻菲罗啉指示剂，用0.05 mol/L 的硫酸亚铁标准溶液滴定，溶液颜色由橙黄色变成蓝绿色，再变成棕红色即为滴定终点；
8. 取20.00 ml 0.05 mol/L的重铬酸钾标液于150 ml 的三角瓶中，加入3 ml 分析纯浓硫酸和5滴邻菲罗啉指示剂，用硫酸亚铁溶液滴定至终点，根据消耗的硫酸亚铁溶液的体积计算准确浓度，计算公式C2=C1V1/V2。

#### 7.1.2 微生物生物量氮

**(1) 试剂制备**

1. 去乙醇氯仿：普通氯仿试剂一般含有少量乙醇作为稳定剂，使用前需除去。将氯仿试剂按1: 2（体积分数）的比例与去离子水或蒸馏水一起加入分液漏斗中，充分摇动1 min，慢慢放出底层氯仿于烧杯中，如此洗涤三次。得到的无乙醇氯仿加入无水氯化钙，以除去氯仿中的水分。纯化后的氯仿置于暗色试剂瓶中，在低温（4℃）、黑暗状态下保存。注意氯仿具有致癌作用，必须在通风橱中进行操作；
2. K2SO4提取液[0.5 mol/L]：称取174.26 g K2SO4分析纯定容至2 L（难溶，需用磁力搅拌器水浴锅加热，待冷却后方可定容）；
3. 苯酚溶液：称取10 g 苯酚（C6H5OH，化学纯）和0.1000 g 硝普钠（Na2Fe(CN)5NO·2H2O，化学纯），用蒸馏水定容至1 L，用棕色瓶贮存于4℃的冰箱中，用时温热至室温；

注：由于苯酚呈固体状，配制前需水浴加热（60℃），然后将苯酚液体倒在一个小烧杯A中（大约25 g），然后再将A中苯酚倒入烧杯B中，称量A中剩余质量约为15 g，说明B中的质量为10 g，此过程不必精准，B中质量为10~15 g之间均可。

1. 次氯酸钠碱性溶液：称取10 g NaOH（化学纯）、7.06 g Na2HPO4·7H2O（化学纯）、31.8 g Na3PO4·12H2O（化学纯）和量取10 mL NaOCl（化学纯），定容至1 L，用棕色瓶贮存于4℃的冰箱中；
2. 掩蔽剂：将400 g/L KNaC4H4O6·4H2O（酒石酸钾钠，化学纯）溶液与100 g/L 的C10H14O8N2Na2·2H2O（ EDTA二钠盐，化学纯）溶液等体积混合，每100 mL 混合液中加入0.5 mL 10 mol/L的NaOH溶液；
3. NH4+-N标准液[5 μg/mL]：称取0.4717 g干燥的(NH4)2SO4（硫酸铵，分析纯）溶于蒸馏水，定容至1 L，即配成100 μg/mL的标准液，使用前加水稀释20倍，即配成5 μg/mL的NH4+-N标准液。

**(2) 测定步骤**

1. 称取2.000 g 新鲜凋落物于白瓶中，然后放进真空干燥箱中，并放置盛有去除乙醇的氯仿的烧杯（200 ml左右），烧杯内加入适量的石英砂，同时还应放入一小杯稀NaOH溶液（100 ml，吸收熏蒸期间释放的CO2），以及一小杯水（100 ml，保持湿度）；熏蒸时间为24 h。另外称取同等数量鲜土，置于另一干燥箱以作未熏蒸对照；
2. 熏蒸结束，放气，取出装有氯仿的烧杯后，反复抽真空4-5次（抽气-放气），每次3 min，待完成以上步骤后，方可取出土样进行下一步实验；
3. 向熏蒸和未熏蒸的土样中加入25 ml 硫酸钾溶液，振荡30 min（熏蒸与未熏蒸的操作步骤相同），震荡结束后用中速定性滤纸过滤至小口瓶中；
4. 吸取5 ml 浸提液于50 ml容量瓶中，再加入约20 ml 蒸馏水；
5. 依次加入5 mL苯酚溶液和5 mL次氯酸钠碱性溶液，摇匀，若有沉淀加掩蔽剂1 mL，然后定容。显色30 min 后在分光光度计上625 nm波长处比色，读取吸光度；
6. 标准曲线：分别吸取0、0.5、1、2、3、4、5 mL 5 μg/mL的NH4+-N标准液于50 mL的容量瓶中，后续步骤同⑤。

#### 7.1.3 微生物生物量磷

**(1) 试剂制备**

1. 去乙醇氯仿：普通氯仿试剂一般含有少量乙醇作为稳定剂，使用前需除去。将氯仿试剂按1:2（体积分数）的比例与去离子水或蒸馏水一起加入分液漏斗中，充分摇动1 min，慢慢放出底层氯仿于烧杯中，如此洗涤三次。得到的无乙醇氯仿加入无水氯化钙，以除去氯仿中的水分。纯化后的氯仿置于暗色试剂瓶中，在低温（4℃）、黑暗状态下保存。注意氯仿具有致癌作用，必须在通风橱中进行操作；
2. NaHCO3 溶液[0.5 mol/L]：42.00 g分析纯NaHCO3 溶于1 L蒸馏水中；需调节pH至8.5；
3. 磷酸二氢钾溶液：1.0984 g分析纯的磷酸二氢钾（称前105℃烘2~3 h），定容至1 L；
4. HCl溶液：84 ml分析纯HCl定容至1 L；
5. 磷酸二氢钾标准溶液：0.1757 g 分析纯磷酸二氢钾（称前105℃烘2~3 h）溶于少量去离子水中，再加入1~2 ml浓硫酸，用去离子水定容至1 L，即得到40 μg·p/ml 磷酸二氢钾贮存液，置于4℃下保存，取50 ml 贮存液用去离子水稀释至500 ml，即得到4 μg·p/ml 磷酸二氢钾标准溶液，此溶液不宜久存；
6. 钼锑贮存液：153 ml浓硫酸（分析纯，=1.84 g/ml）缓慢倒入约400 ml水中，搅拌冷却，另取10 g钼酸铵[(NH4)6Mo7O24·4H2O, 分析纯]，溶解于约60℃的300 ml水中，冷却，然后将硫酸溶液缓缓倒入钼酸铵溶液中，再加入100 ml 0.5%酒石酸锑钾（KSbC4H4O6·1/2H2O，分析纯）溶液，最后用蒸馏水稀释至1 L，避光贮存，次贮存液含有1%钼酸铵和2.75 mol/L 硫酸；
7. 钼提抗显色剂：1.50 g 抗坏血酸（C6H8O6，分析纯）溶于100 ml 钼锑贮存液中，此液需随配随用。

**(2) 测定步骤**

1. 称取2.000 g 新鲜凋落物于白瓶中，然后放进真空干燥箱中，并放置盛有去除乙醇的氯仿的烧杯（200 ml左右），烧杯内加入适量的石英砂，同时还应放入一小杯稀NaOH溶液（100 ml，吸收熏蒸期间释放的CO2），以及一小杯水（100 ml，保持湿度），熏蒸时间为24 h。另外称取同等数量鲜土，置于另一干燥箱以作未熏蒸对照；
2. 熏蒸结束，放气，取出装有氯仿的烧杯后，反复抽真空4-5次（抽气-放气），每次3 min，待完成以上步骤后，方可取出土样进行下一步实验；
3. 熏蒸完毕后，取出试验样品，将熏蒸和未熏蒸的土壤样品中各加25 ml 0.5 mol/L 的NaHCO3溶液，另称取土壤三份于白瓶中，加入0.5 ml 250 μg·p/ml磷酸二氢钾溶液，再加入25 ml 0.5 mol/L 的NaHCO3溶液，全部样品震荡30 min，然后用中速定量滤纸过滤至细口瓶，取5 ml 滤液与50 ml的容量瓶中；加入5 ml HCl，摇晃待泡沫去除完后加入5 ml显色剂，显色定容，882 nm下比色；
4. 标准曲线：分别取0.00、0.25、0.50、1.00、1.50、2.00 ml 4 μg·p/ml磷酸二氢钾标准溶液于50 ml容量瓶中，再加入与样液等体积的NaHCO3溶液，同上进行中和比色测定，即得0、0.04、0.08、0.16、0.24、0.32系列标准磷工作曲线。

**(3) 结果计算**

同土壤磷

### 7.2 凋落物微生物群落结构测定（PLFA）

**(1) 试剂制备**

1. 磷酸钾缓冲液PBS：将PBS缓冲剂溶于水后，调节pH到7.4即可，需冷藏保存；
2. 氢氧化钾甲醇溶液[0.56%]：0.56 g氢氧化钾溶于甲醇，定容至100 mL；
3. 乙酸溶液[1 mol/L]：5.7 mL乙酸溶于水，定容至100 mL；
4. 甲苯：甲醇溶液[1:1]：等体积甲苯（分析纯）与甲醇（色谱纯）相溶；
5. 氯仿：正己烷溶液[1:4]：氯仿（色谱纯）与正己烷（色谱纯）混合液，其体积比为1: 4。

**(2) 测定步骤**

1. 称取1.000 g 新鲜凋落物于棕色瓶，依次加入4.8 ml磷酸钾缓冲液PBS，12 ml甲醇和6 ml氯仿（色谱纯）；
2. 涡旋30 s，100 Hz超声10 min（水温应低于30℃），37℃水浴加热30 min；
3. 将液体转移至50 ml三角瓶，依次加入6 ml氯仿（色谱纯）和6 ml磷酸钾缓冲液PBS，轻轻摇动后静置过夜（避光）；
4. 过夜后，吸取三角瓶中下层液体过0.45孔径的有机相针头过滤器，加入经5 ml氯仿活化的硅胶柱；
5. 依次加入2 ml\*3次氯仿（色谱纯），2 ml\*3次丙酮（色谱纯）洗涤硅胶柱；
6. 将洗涤后的硅胶柱转移到10 ml离心管上，加入2 ml\*3次甲醇（色谱纯），将甲醇收集到离心管中，氮气吹干；
7. 依次加入1 ml 氢氧化钾甲醇溶液和1 ml甲苯：甲醇溶液，涡旋30 s后37℃水浴30 min；
8. 待冷却后，依次加入0.1 ml乙酸溶液和2 ml\*2次氯仿：正己烷溶液，吸取上层液体到另一离心管中氮气吹干，上机前于-20℃保存；
9. 加入200微升氯仿：正己烷溶液，上机测定。

## 第八节 凋落物酶活性测定

**(1) 试剂制备**

1. 氢氧化钠溶液[1.0 mol/L]：4 g NaOH 溶于100 mL去离子水；
2. 醋酸缓冲液[50 mmol/L]：4.374 g 三水乙酸钠+1.1 mL 冰醋酸溶于1 L去离子水（用冰醋酸调节pH =5）；
3. 酸性磷酸酶底物缓冲液[5 mmol/L]：185.6 mg对硝基苯磷酸二钠（p-Nitrophenyl phosphate）溶于100 ml醋酸缓冲液中；
4. 纤维二糖水解酶底物缓冲液[2 mmol/L]：92.7 mg对硝基苯纤维二糖糖苷（p-Nitrophenyl-cellobioside）溶于100 ml醋酸缓冲液中；
5. β-葡萄糖苷酶底物缓冲液[5 mmol/L]：150.7 mg对硝基苯-β-葡糖苷（p-Nitrophenyl-β-glucopyranoside）溶于100 ml醋酸缓冲液中；
6. β-N-乙酰葡糖胺糖苷酶底物缓冲液[2 mmol/L]：68.5 mg对硝基苯-β–N-乙酰葡糖胺糖苷（p-Nitrophenyl-β-N-acetylglucosaminide）溶于100 ml醋酸缓冲液中；
7. 亮氨酸氨基肽酶底物缓冲液[5 mmol/L]：125.7 mg L-亮氨酸-4-硝基苯胺（leucine p-nitroanilide）溶于100 ml醋酸缓冲液中；
8. 多酚氧化酶/过氧化物酶底物缓冲液[5 mmol/L]：98.6 mg左旋多巴（L-DOPA）溶于100 ml醋酸缓冲液中，可配好100-200 ml的底物缓冲溶液保存于冰箱中，如果不污染能保存几周，注意溶液混合之后需要调节pH至5.0；
9. 过氧化氢溶液[0.3%]：10 ml 30%过氧化氢稀释至1 L。

**(2) 测定步骤**

1. 取出新鲜凋落物，把样品分成2份；
2. 1份用于称重，记录质量，然后放入牛皮纸袋中，65℃烘干至恒重（2天），称干重；
3. 另1份称取约2 g（湿重），记录准确地质量，放入小的广口瓶，加入60 ml醋酸缓冲液，用磁力搅拌器搅拌2 min；
4. 选择一个酶标板，所有的样品和对照都要设置6-8个重复。每个酶标板要设置空白（孔里空着或者加200 µl的缓冲液），同时设置底物对照组(底物+缓冲液)。此外，每个样品还要设置粗酶液对照组（粗酶液+缓冲液），以及样品测量组（粗酶液+底物）；
5. 将粗酶液倒入培养皿或浅的容器用（磁力搅拌器）剧烈搅拌，以确保粗酶液注入酶标板的孔中之前混合均匀。为了避免草碎片堵住枪头的口，可将枪头端部剪掉一些，使口直径1-2 mm；
6. 使用移液枪分别吸取50 µl粗酶液到粗酶液对照组和样品测量组，加50 µl缓冲液到底物对照组，加150 µl缓冲液到粗酶液对照组，加150 µl底物溶液到底物对照组和样品测量组。对于过氧化物酶，还需加10 µl 0.3%过氧化氢溶液到底物对照组和样品测量组；
7. 将酶标板放到摇床上，氧化酶样品的酶标板要尽可能的高速的摇（但不能洒出来）。磷酸酶培养45 min；多酚氧化酶和过氧化物培养1-2 h；β-N-乙酰葡糖胺糖苷酶培养3 h；纤维素酶培养4 h；β-葡萄糖苷酶培养1 h；肽酶培养4-6 h。培养时间可根据样品的酶活性大小调整。培养温度控制在30℃；
8. 用移液枪，从孔取出100 µl，注意不要吸入底部的凋落物，并注入新的酶标板（提示：调整好移液枪的容量，不用一直改变）；
9. 每个孔中加入5 µl 1.0 mol/L 氢氧化钠溶液终止反应并显色（注：多酚氧化酶、过氧化物酶和亮氨酸氨基肽酶不需要终止反应，因此培养完毕后应尽快比色）；
10. 多酚氧化酶和过氧化物酶在450 nm处测定吸光值，其余种类的酶在405 nm处测定吸光值，如果样品的吸光值超过了2.000，需要把培养的时间缩短一些重新测定或者少加一点粗酶液。

**(3) 结果计算**

1. 酸性磷酸酶、纤维二糖水解酶、β-葡萄糖苷酶和β-N-乙酰葡糖胺糖苷酶活性的计算

酶活性用单位时间(h)单位质量(g)干凋落物水解底物的量µmol数表示。

 Activity (µmol h-1 gDOM-1) = OD/ [(EC)/ (0.200) × (h) × (gDOM/V) × (0.050)]

式中：

OD = 样品测量组 Abs – (底物对照组 Abs + 样品对照组Abs)；

EC为消光系数；

h为培养时间；

gDOM =（样品重）×（干重/湿重）；

V=粗酶液体积。

**注意：**这个条件下对硝基苯酚的EC（extinction coefficient，消光系数）为4.2。通过把1.00 μmol/mL的对硝基苯酚标准溶液稀释成不同的浓度来制作一个标准曲线，100 µl标准液+ 5 µl 1.0 mol/L 氢氧化钠溶液。在405 nm处测定吸光值。根据吸光值和浓度来做回归分析，求回归方程，斜率a就是EC，吸光率和浓度呈线性关系，OD最高达到2.000。

1. 亮氨酸氨基肽酶活性的计算

酶活性用单位时间(h)单位质量(g)干凋落物转化底物的量µmol数表示。

 Activity (µmol h-1 gDOM-1) = OD/ [(EC)/(0.200) ×(h) ×(gDOM/V)× (0.050)]

式中：

OD = 样品测量组 Abs – (底物对照组 Abs + 样品对照组Abs)；

EC为消光系数；

h为培养时间；

gDOM =（样品重）×（干重/湿重）；

V=粗酶液体积。

**注意：**这个条件下对硝基苯胺的EC（extinction coefficient，消光系数）为3.6。通过把1.00 μmol/mL的对硝基苯胺标准溶液稀释成不同的浓度来制作一个标准曲线，将各浓度的100 μl加入孔中并读取405 nm处吸光度。根据吸光值和浓度来做线性回归，求回归方程，斜率a就是EC，吸光率和浓度呈线性关系，OD最高达到2.000。

1. 多酚氧化酶和过氧化物酶活性的计算

酶活性用单位时间(h)单位质量(g)干土转化底物的量µmol数表示。

 Activity (µmol h-1 gDOM-1) = OD/ [(EC)/(0.200) ×(h) ×(gDOM/V)× (0.050)]

式中：

OD = 样品测量组 Abs – (底物对照组 Abs + 样品对照组Abs)；

EC为消光系数；

h为培养时间；

gDOM =（样品重）×（干重/湿重）；

V=粗酶液体积。

**注意：**用100 μl mushroom 酪氨酸酶（1 mg/ml，溶于50 mmol/L 醋酸缓冲液中，pH 5.0），3 ml 醋酸缓冲液(50 mmol/L)和1 ml 1 mmol/L 左旋多巴（L-DOPA）醋酸缓冲液(50 mmol/L)制成反应混合液。室温放置6小时，在450 nm处测定100 μl反应混合液的吸光值，然后除以0.25 μmol/ml，得到吸光度/(μmol/ml)，得到的EC大概为0.403。

# 第五章 水样相关指标测定

## 第一节 水样采集与处理

为了能够真实反映水体的质量，除采用精密仪器和准确的分析技术外，特别要注意水样的采集和保存。采集的样品要能代表水体的质量。采样后易发生变化的成分，需在现场测定。带回实验室的样品，在测定前要妥善保存，以确保样品在保存期间无变化。

由于溪流水体的组成相对稳定，采瞬时样品具有很好的代表性。当水体的组成随时间发生变化，则要在适当时间间隔内进行瞬时采样，分别进行分析，测出水质的变化程度、频率和周期。当水体的组成发生空间变化时，就要在各个相应的部位采样。

* 进行背景值调查时，设置在不受人类活动影响或影响很小的上游河段；
* 采集水样前，应先用水样洗涤采样容器、盛样瓶及盖子或塞子2~3次，采样容器应由惰性物质制成，能抗破裂，清洗方便，且密封性和开启性均较好，必须保护样品免受吸附、蒸发和外来物质的污染，所以需使用能塞紧的容器，但不得使用橡皮塞或软木塞，一般采用无色具塞硬质玻璃瓶或具塞聚乙烯瓶；
* 采样时应保证采样点的位置准确。采样时不可搅动水底部的沉积物，也不能混入水面上漂浮的物质，如果水样中含沉降性固体(如泥沙等)，则应分离除去；
* 各种水质的水样，在采集至分析这段时间里，由于物理的、化学的和生物的作用会发生各种变化，为了使这些变化降低到最小，必须采取必要的保护措施，并尽可能快的进行分析：
1. 保存水样的基本要求
2. 减缓生物作用；
3. 减缓化合物或者络合物的水解及氧化还原作用；
4. 减少组分的挥发和吸附损失。
5. 保存措施
6. 选择适当材料的容器；
7. 控制溶液的pH；
8. 加入化学试剂抑制氧化还原反应和生化作用；
9. 冷藏或冷冻以降低细菌活性和化学反应速度。

## 第二节 水样理化性质分析

### 2.1 水温

当需要长期监测温度时可使用纽扣式温度计，瞬时测量采用YSI Professional Plus便携式水质仪。

### 2.2 电导率

用YSI Professional Plus便携式水质仪测定。

### 2.3 流速

用流速仪测定。当流速仪测速困难或超出流速仪测速范围的高流速、低流速、小水深等情况时，用浮标法测定。

### 2.4 pH值

pH值可间接地表示水的酸碱程度，pH值低于7.0为偏酸性，pH值高于7.0为偏碱性。天然水的pH值多在6~9范围内。由于天然水的pH值受水温影响而变化，测定时应在规定的温度下进行，或者校正温度。一般采用YSI Professional Plus便携式水质仪测定。

### 2.5 DO

用YSI Professional Plus便携式水质仪测定。

## 第三节 水样碳、氮、磷的测定

### 3.1 水样总有机碳测定

总有机碳（TOC），是以碳的含量表示水体中有机物质总量的综合指标。由于TOC的测定采用燃烧法，因此能将有机物全部氧化，它比BOD5或COD更能直接表示有机物的总量，因此常常被用来评价水体中有机物污染的程度。

**(1) 方法原理**

1. 差减法

TOC=TC-TIC

试样进入燃烧管后所有的碳会被催化燃烧生成二氧化碳，通过检测器测得TC，试样进入燃烧管后，样品中的无机碳和磷酸反应生成二氧化碳，检测器测得TIC，通过差减得到TOC值。

1. 直接法

TOC=NPOC+POC

样品加入过量的酸进行酸化，酸化的过程是TIC和酸进行反应生成二氧化碳，然后样品经曝气吹扫除去二氧化碳和POC，最后将样品注入燃烧管中进行催化燃烧，再通过检测器测得NPOC值。

NPOC的酸化是通过加入过量的浓盐酸或者浓磷酸，等充分反应后测试样品的pH值，只有pH值<2时，才认为TIC反应完全。

**(2) 测定步骤**

1. 样品的前期处理

水样必须用0.45 μm的滤膜过滤，待测液需在4℃冷藏备用。

1. 仪器选择
2. TOC分析仪：multi N/C 2100 (Analytik jena)；
3. 自动进样TOC分析仪： vario TOC select (Elementar)。
4. Multi N/C 2100 (Analytik jena)使用方法
5. 差减法测定：用500 μl微量注射器分别准确吸取待测液200 μl，依次在TOC分析仪上选择TC和IC测定方法，注入燃烧管，分别测量TC和IC的吸收峰峰面积，得到相应的TC和IC值，运用公式TOC=TC-IC得到TOC值；
6. 直接法测定：用盐酸对待测液进行酸化，等充分反应后用pH试纸测定样品的pH值，保证其pH在2左右，在TOC分析仪上选择NPOC测定方法，先对酸化后的待测液进行吹扫，去除无机碳，再吸取200 μl吹扫后的样品注入燃烧管，测量吸收峰面积，得到NPOC值。
7. Vario TOC select (Elementar)使用方法
8. 差减法测定：将待测样品吸取10 ml装入自动进样TOC分析仪的样品罐中，依次放入样品盘2-49的样品位，样品盘1号位放置装有去离子水的样品罐，在自动进样TOC分析仪上选择TC/IC测定方法，仪器自动测量TC及TIC值，软件通过差减得到TOC值；
9. 直接法测定：将待测样品加入过量的浓盐酸或者浓磷酸酸化，等充分反应后测试样品的pH值，要求pH<2。吸取10 ml酸化后的样品装入自动进样TOC分析仪的样品罐中，依次放入样品盘2-49的样品位，样品盘1号位放置装有去离子水的样品罐，在自动进样TOC分析仪上选择NPOC测定方法，仪器自动测得NPOC结果(在使用NPOC测定方法时，软件默认样品盘32号位为酸瓶，手动酸化后，自动进样分析时在软件提醒是否进行酸化时点否)。
10. 精密度和准确度

使用Vario TOC select (Elementar)测量时，软件默认每个样品测定次数为2+1次(相对偏差小于3%)，取平行测定结果的算术平均值为测定结果。

Multi N/C 2100 (Analytik jena)测量时，推荐每个样品测定2+1次，取平行测定结果的算术平均值为测定结果。

1. 注意事项

样品必须经过0.45 μm的滤膜过滤，务必保证没有固体颗粒残渣进入燃烧管。若样品内盐分过高须要充分稀释，否则会凝结在燃烧管壁上，致使燃烧管断裂。

**(3) 仪器操作**

1. Multi N/C 2100 (Analytik jena)操作规程及其使用注意事项

**操作规程：**

1. 打开氧气瓶总阀，调节分压阀至0.2-0.5 Mpa；
2. 打开主机电源；
3. 待主机指示灯变绿后打开软件multiWin；
4. 调节针型阀（Main）使气流量在160±3；
5. 待仪器初始化完毕，软件左上角所有状态显示OK后，载入已存方法；
6. 选择好相应的测定方法后点击开始测量，点击启动，用进样针吸取待测样品200 μl；
7. 待软件弹窗提示可以注射样品时，将进样针垂直插入进样孔，点击ok并将样品注射入燃烧管；
8. 待样品测量积分完成后，手动记录样品数据；
9. 关机：首先退出软件，再关闭仪器主机，然后将氧气瓶主阀关闭拧紧。

**注意事项：**

1. 只有待主机指示灯变绿后，才能双击multiWin图标，打开软件；
2. 每次注射时尽量将注射针对准TC隔膜中心位置；
3. 每次测试开始时，应进几针去离子水清洗，待仪器指示稳定后，再开始样品测定；
4. 每次测试完毕后，应进几针空白液，待仪器指示稳定后，再退出软件，关闭仪器；
5. 若出现气流量显示不正常，TIC冷凝器模块没有气泡冒出，需关闭仪器检查仪器各处是否有堵塞(联系仪器管理员)。
6. Vario TOC select (Elementar)操作规程及其使用注意事项

**操作规程：**

1. 打开氧气瓶总阀，将分压阀调节到接近0.1 Mpa；
2. 打开仪器主机电源开关，仪器将进行自检，这些自检动作包括：多通阀复位，注射泵复位，机械臂升降和样品盘复位(大约2分钟)；
3. 仪器自检完成后打开软件，软件搜索连接端口并自动连接仪器，成功后会在界面左下角过程状态显示“standby”；
4. 点击选项-设置-参数，将反应器工作温度设置为850℃，点击确认；
5. 等待温度到设定值(约20分钟左右)，然后才可设定工作表开展分析测试工作；
6. 准备样品：样品需要经过0.45 μm的膜过滤后才可上机。如果使用 NPOC方法，样品还需要充分酸化。浓度较高的样品可以通过定量稀释后再上机；
7. 关机：将系统压力调节到400 mbar；将燃烧炉温度设置为50℃，当燃烧炉温度降到100℃以下时，关闭钢瓶总阀；当系统压力降低为20以下时，关闭软件，仪器电源。

**注意事项：**

1. 注意软件状态栏左下角维护提醒指示进度条，双击进度条进入维护间隔页面，以进度条的方式指示各个事件已经使用的进度。单击选中这些事件，则在右侧窗口显示选中的事件的详细信息。进度条指示有三种颜色，当进度小于80%时指示为绿色，当进度为80-99%时指示为黄色，当进度大于100%时指示为红色(联系仪器管理员)；
2. Combustion tube liquid（液体燃烧管）：维护时更换里面的填充材料，参见液体燃烧管的填装和安装；
3. Ash finger liquid（液体灰分管）：维护时清洗灰分管和重新填装石英棉；
4. Halogene adsorption tube（脱卤素管）：维护时更换桐棉；
5. Water adsorption tube（干燥管）：维护时更换高氯酸镁；
6. Acid reservoir（储酸管）：维护时更换磷酸；
7. Ash-finger Solid（固体灰分管）：维护时清理灰分管并重新填装铝棉；
8. Combution tube solid（固体燃烧管）：维护时更换里面的填充材料，参见固体燃烧管的填装和安装；
9. 对于盐分含量比较高的水样，燃烧管温度设为680℃，低盐分水样燃烧管温度设置为850℃，海水、严重污染的废水及采用盐（硫酸钾等）浸提的水样为高盐分水样，地表水及自来水可认为是低盐分水样。由于多数盐的熔融温度为 700-800℃，（如氯化钠为分 800℃，氯化钙为 774℃），分析高盐分水样如果仍采用 850℃，可能会导致催化剂效率降低和燃烧管的脆裂；
10. 储酸管内的磷酸需要人工添加，每次测量之前先检查储酸管内的酸是否充足，储酸管内为5%磷酸。

### 3.2 水样全氮测定

#### 3.2.1 总氮—过硫酸钾氧化—紫外分光光度法

**(1) 方法原理**

在60℃以上的水溶液中，过硫酸钾分解生成氢离子和氧，加入氢氧化钠用以中和氢离子，使过硫酸钾分解完全。在120~124℃的碱性介质条件下，用过硫酸钾作氧化剂，不仅可将水样中的氨氮和亚硝酸盐氮氧化为硝酸盐，同时将水样中大部分有机氮化合物氧化为硝酸盐。而后，用紫外分光光度法分别于波长220 nm与275 nm处测定其吸光度，按A=A220-2A275计算硝酸盐氮的吸光度值，从而计算总氮的含量，其摩尔吸光系数为1.47×103 L/(mol·cm)。

**(2) 仪器设备**

紫外分光光度计及10 mm石英比色皿；蒸汽压力锅，锅内温度相当于120~124℃；25 ml具塞玻璃磨口比色管。所用玻璃器皿可以用盐酸(1+9)或硫酸(1+35)浸泡，清洗后再用去离子水冲洗数次。

**(3) 试剂制备**

1. 去离子水；
2. 碱性过硫酸钾溶液：称取40 g过硫酸钾(K2S2O8)，15 g氢氧化钠，溶于去离子水中，稀释至1000 ml。溶液存放于聚乙烯瓶内，最长可贮存一周；
3. (1+9)盐酸溶液；
4. (1+35)硫酸溶液；
5. 氢氧化钠溶液，200 g/L：称取20 g氢氧化钠(NaOH)，溶于去离子水中，稀释至100 ml；
6. 氢氧化钠溶液，20 g/L：将(200 g/L)氢氧化钠稀释10倍而得；
7. 硝酸钾标准溶液

标准贮备液：称取0.7218 g经105~110℃烘干4 h的优级纯硝酸钾(KNO3)溶于去离子水中，移至1000 ml容量瓶中，定容。此溶液每毫升含100 μg硝酸盐氮，加入2 ml三氯甲烷为保护剂，至少可稳定6个月。

硝酸钾标准使用液：将贮备液用去离子水稀释10倍而得，使用时配制。此溶液每毫升含10 μg硝酸盐氮。

**(4) 测定步骤**

1. 校准曲线的绘制
2. 分别吸取0、0.50、1.00、2.00、3.00、5.00、7.00、8.00 ml硝酸钾标准使用溶液于25 ml比色管中，用去离子水稀释至10 ml标线；
3. 加入5 ml碱性过硫酸钾溶液，用纱布裹紧磨口塞，塞紧磨口塞，以防迸溅出；
4. 将比色管置于蒸汽压力锅中，调节温度至120℃，使比色管在过热水蒸气中加热0.5 h；
5. 自然冷却，开阀放气，移去外盖，取出比色管并冷却至室温；
6. 加入(1+9)盐酸1 ml，用去离子水稀释至25 ml标线，混匀；
7. 在紫外分光光度计上，用10 mm石英比色皿分别在220 nm及275 nm波长处测定吸光度，用校正的吸光度绘制校准曲线。
8. 样品的测定

取10 ml水样于25 ml比色管中。按校准曲线绘制步骤[b]至[f]操作。然后按校正吸光度，在校准曲线上查出相应的总氮量，再用下列公式计算总氮含量。

总氮(mg/L)=$\frac{m}{V}$

式中：

*m*——从校准曲线上查得的含氮量(μg)；

*V*——所取水样体积(ml)。

**(5) 注意事项**

1. 玻璃具塞比色管的管塞须用纱布裹紧后塞紧比色管，保证其密合性良好。经高温高压作用后，管塞会黏合在比色管上，不易拿出，在管塞上裹一圈纱布可以有效的防止这种情况发生；
2. 使用蒸汽压力锅消煮后，要等压力指示表归零后方可开阀放气，揭开锅盖；
3. 使用蒸汽压力锅时，要检查其水位情况，仪器开启后在高水位或低水位时会自动报警，此时需关闭电源取出样品重新检查核对。

#### 3.2.2 硝态氮—紫外分光光度法

**(1) 方法原理**

利用硝酸根离子220 nm波长处的吸收而定量测定硝酸盐氮。溶解的有机物在220 nm处也会有吸收，而硝酸根离子在275 nm处没有吸收。因此，在275 nm处作一次测量，以校正硝酸盐氮值。

**(2) 仪器设备**

紫外分光光度计

**(3) 试剂制备**

1. 1 mol/L盐酸(优级纯)：取3.1 ml优级纯的盐酸溶于去离子水中，移至100 ml容量瓶中，定容；
2. 硝酸盐氮标准贮备液：称取0.7218 g经105~110℃烘干4 h的优级纯硝酸钾(KNO3)溶于去离子水中，移至1000 ml容量瓶中，定容。此溶液每毫升含100 μg硝酸盐氮，加入2 ml三氯甲烷为保护剂，至少可稳定6个月。

**(4) 测定步骤**

1. 标准曲线的绘制
2. 于8个100 ml容量瓶中分别吸取0、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、3.00、4.00 ml硝酸盐氮标准贮备液，用新鲜去离子水稀释至标线，其浓度分别为0、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、3.00、4.00 mg/L硝酸盐氮；
3. 在紫外分光光度计上，用10 mm石英比色皿分别在220 nm及275 nm波长处，以新鲜去离子水50 ml加1 ml盐酸溶液为参比，测定吸光度。用校正的吸光度绘制校准曲线。
4. 样品测定
5. 取50 ml水样于50 ml比色管中，加入1.0 ml盐酸溶液；
6. 在紫外分光光度计上，用10 mm石英比色皿分别在220 nm及275 nm波长处，以新鲜去离子水50 ml加1 ml盐酸溶液为参比，测定吸光度。

**(5) 结果计算**

A校=A220-2A275

式中：

A220——220 nm波长测得吸光度；

A275——275 nm波长测得吸光度。

求得吸光度的校正值以后，从校准曲线中查得相应的硝酸盐氮量，即为水样测定结果(mg/L)。水样若经稀释后测定，则结果应乘以稀释倍数。

#### 3.2.3 氨氮—纳氏试剂光度法

**(1) 方法原理**

碘化汞和碘化钾的碱性溶液与氨反应生成淡红棕色胶态化合物，此颜色在较宽的波长内强烈吸收，通常测量用波长在410~425 nm范围。

**(2) 仪器设备**

紫外分光光度计

**(3) 试剂制备**

1. 纳氏试剂
2. 称取16 g氢氧化钠，溶于50 ml去离子水中，充分冷却至室温；
3. 称取7 g碘化钾和10 g碘化汞(HgI2)溶于去离子水中，然后将此溶液在搅拌下徐徐注入氢氧化钠溶液中，用去离子水稀释至100 ml，贮于聚乙烯瓶中，密封保存；
4. 酒石酸钾钠溶液：称取50 g酒石酸钾钠(KNaC4H4O6·4H2O)溶于100 ml去离子水中，加热煮沸以除去氨，放冷，定容至100 ml；
5. 铵标准贮备溶液：称取3.819 g经100℃干燥过的优级纯氯化铵(NH4Cl)溶于去离子水中，移入1000 ml容量瓶中，稀释至标线。此溶液每毫升含1.00 mg氨氮；
6. 铵标准使用溶液：移取5.00 ml铵标准贮备液于500 ml容量瓶中，用去离子水稀释至标线。此溶液每毫升含0.010 mg氨氮。

**(4) 测定步骤**

1. 校准曲线的绘制
2. 吸取0、0.50、1.00、3.00、5.00、7.00和10.00 ml铵标准使用溶液于50 ml比色管中，加水至标线，加1.0 ml酒石酸钾钠溶液，混匀。加1.5 ml纳氏试剂，混匀。放置10 min后，在波长420 nm处，用光程20 mm比色皿，以去离子水为参比，测量吸光度；
3. 由测得的吸光度，减去零浓度空白的吸光度后，得到校正吸光度，绘制校准曲线。
4. 水样的测定

取50 ml水样加入50 ml比色管中(使氨氮含量不超过0.1 mg)，加1.0 ml酒石酸钾钠溶液，混匀，加1.5 ml纳氏试剂，混匀。放置10 min后，在波长420 nm处，用光程20 mm比色皿，以水为参比，测量吸光度，以去离子代替水样做空白测定。

**(5) 结果计算**

由水样测得的吸光度减去空白试验的吸光度后，从校准曲线上查得氨氮含量(mg)。

氨氮(N, mg/L)=$ \frac{m}{V}$×1000

式中：

*m*——由校准曲线查得的氨氮量(mg)；

*V*——水样体积(ml)。

###  水样全磷测定

#### 3.3.1 总磷—过硫酸钾消解—钼锑抗分光光度法

**(1) 水样的预处理—过硫酸钾消解法**

1. 仪器：蒸汽压力锅；50 ml具塞比色管；
2. 试剂：5%过硫酸钾溶液：溶解5 g过硫酸钾于去离子水中，并稀释至100 ml。
3. 测定步骤：取25 ml水样于50 ml具塞比色管中，加过硫酸钾溶液4 ml，管塞用纱布裹紧后塞紧，置于蒸汽压力锅中消煮。在120℃下加热30 min。待压力表指针降至零后开阀放气，取出放冷，备用。试剂空白和标准溶液也做同样的消解处理。

**(2) 钼锑抗分光光度法**

1. 方法原理

在酸性条件下，正磷酸盐与钼酸铵、酒石酸锑氧钾反应，生成磷钼杂多酸，被还原剂抗坏血酸还原，则变成蓝色络合物，通常即称磷钼蓝。

1. 仪器

紫外分光光度计

1. 试剂
2. (1+1)硫酸；
3. 10%抗坏血酸溶液：溶解10 g抗坏血酸(C6H8O6)于去离子水中，并稀释至100 ml。该溶液贮存在棕色玻璃瓶中，在约4℃可稳定几周。如颜色变黄，必须重配；
4. 钼酸盐溶液：溶解13 g钼酸铵((NH4)6Mo7O24·4H2O)于100 ml去离子水中，溶解0.35 g酒石酸锑钾(KSbC4H4O6·1/2H2O)于100 ml去离子水中；

在不断搅拌下，将钼酸铵溶液徐徐加到300 ml (1+1)硫酸中，加酒石酸锑氧钾溶液并且混合均匀，贮存在棕色的玻璃瓶中于4℃保存，至少稳定两个月；

1. 磷酸盐贮备溶液：将优级纯磷酸二氢钾(KH2PO4)于110℃干燥2 h，放冷后取出称取0.2197 g溶于去离子水，移入1000 ml容量瓶中。加(1+1)硫酸5 ml，用去离子水稀释至标线，此溶液每毫升含50.0 μg磷，本溶液在玻璃瓶中可贮存至少六个月；
2. 磷酸盐标准溶液：吸取10.00 ml磷酸盐贮备液于250 ml容量瓶中，用去离子水稀释至标线。此溶液每毫升含2.00 μg磷，现配现用。
3. 测定步骤
4. 校准曲线的绘制
* 取7支50 ml具塞比色管，分别加入磷酸盐标准使用液0、0.50、1.00、3.00、5.00、10.00、15.00 ml，加去离子水至50 ml；
* 显色：向比色管中加入1 ml 10%抗坏血酸溶液，混匀。30 s后加2 ml钼酸盐溶液充分混匀，放置15 min；
* 测量：用10 mm比色皿于700 nm波长处，以零浓度溶液为参比，测量吸光度。
1. 样品测定

将消解后的样品加去离子水稀释至标线。以下按绘制标准曲线的步骤进行显色和测量。减去空白试验的吸光度，并从校准曲线上查出含磷量。

1. 结果计算

磷酸盐(P, mg/L)=$\frac{m}{V}$

式中：

*m*——由校准曲线查得的磷量(μg)；

*V*——水样体积(ml)。

#### 3.3.2 磷酸根——钼锑抗比色法

**(1) 方法原理**

在酸性条件下，正磷酸盐与钼酸铵、酒石酸锑氧钾反应，生成磷钼杂多酸，被还原剂抗坏血酸还原，则变成蓝色络合物，通常即称磷钼蓝。

**(2) 仪器设备**

紫外分光光度计

**(3) 试剂制备**

1. (1+1)硫酸；
2. 10%抗坏血酸溶液：溶解10 g抗坏血酸于去离子水中，并稀释至100 ml。该溶液贮存在棕色玻璃瓶中，在约4℃可稳定几周。如颜色变黄，必须重配；
3. 钼酸盐溶液：溶解13 g钼酸铵((NH4)6Mo7O24·4H2O)于100 ml去离子水中。溶解0.35 g酒石酸锑氧钾(K(SbO)C4H4O6·1/2H2O)于100 ml去离子水中。

在不断搅拌下，将钼酸铵溶液徐徐加到300 ml (1+1)硫酸中，加酒石酸锑氧钾溶液并且混合均匀，贮存在棕色的玻璃瓶中于4℃保存，至少稳定两个月；

1. 磷酸盐贮备溶液：将优级纯磷酸二氢钾(KH2PO4)于110℃干燥2 h，放冷后取出称取0.2197 g溶于去离子水，移入1000 ml容量瓶中。加(1+1)硫酸5 ml，用去离子水稀释至标线。此溶液每毫升含50.0 μg磷；
2. 磷酸盐标准溶液：吸取10.00 ml磷酸盐贮备液于250 ml容量瓶中，用去离子水稀释至标线。此溶液每毫升含2.00 μg磷，现配现用。

**(4) 测定步骤**

1. 校准曲线的绘制
2. 取7支50 ml具塞比色管，分别加入磷酸盐标准使用液0、0.50、1.00、3.00、5.00、10.00、15.00 ml，加去离子水至50 ml；
3. 显色：向比色管中加入1 ml 10%抗坏血酸溶液，混匀。30s后加2ml钼酸盐溶液充分混匀，放置15 min；
4. 测量：用10 mm比色皿于700 nm波长处，以零浓度溶液为参比，测量吸光度。
5. 样品测定

将消解后的样品加去离子水稀释至标线。以下按绘制标准曲线的步骤进行显色和测量。减去空白试验的吸光度，并从校准曲线上查出含磷量。

**(5) 结果计算**

磷酸盐(P, mg/L)=$\frac{m}{V}$

式中：

*m*——由校准曲线查得的磷量(μg)；

*V*——水样体积(ml)。

## 第四节 水样金属元素测定

###  可溶性元素的测定—电感耦合等离子体发射光谱法

**(1) 方法原理**

经过0.45 μm滤膜过滤后的水样注入电感耦合等离子体发射光谱仪后，目标元素在等离子体火炬中被气化、电离、激发并辐射出特征谱线，在一定浓度范围内，其特征谱线的强度与元素的浓度成正比。

**(2) 仪器设备**

电感耦合等离子体发射光谱仪。

**(3) 试剂配制**

硝酸(优级纯)；多元素标准溶液(Al、Ca、Cd、Cr、Cu、Fe、K、Mg、Mn、Na、Pb、Zn)：1000 μg/ml。

**(4) 样品预处理**

采集样品后，通过0.45 μm滤膜过滤，收集所需体积的滤液，加入适量优级纯的硝酸，使硝酸含量达到1%。

**(5) 测定步骤**

1. 校准曲线的绘制
2. 取1 ml多元素标准溶液溶于去离子水中，移至1000 ml容量瓶，定容，得到1 mg/L多元素标准溶液使用液；
3. 于10个100 ml容量瓶中分别移取0、0.5、1.0、2.0、3.0、5.0、10.0、20.0、30.0、50.0 ml多元素标准溶液使用液，加去离子水定容，其浓度分别为0、0.005、0.010、0.020、0.030、0.050、0.100、0.200、0.300、0.500 mg/L；
4. 在电感耦合等离子体发射光谱仪上进行测量，建立目标元素的校准曲线。
5. 样品测定
6. 在与建立校准曲线相同的条件下，测定处理后的试样的发射强度，在校准曲线上查得目标元素含量；
7. 空白样品的测定与试样相同。

**(6) 结果计算**

样品中元素含量：*ρ=(ρ1-ρ2)×f*

式中：

*ρ*——样品中目标元素的质量浓度，mg/L；

*ρ1*——试样中目标元素的质量浓度，mg/L；

*ρ2*——空白试样中目标元素的质量浓度，mg/L；

*f*——稀释倍数。

###  金属元素总量的测定

#### 4.2.1 金属元素总量的消解—微波消解法

**(1) 方法原理**

微波消解是结合高压消解和微波快速加热的一项预处理技术。水样和酸的混合物吸收微波能量后，酸的氧化反应活性增加，将样品中的金属元素释放到溶液中。

**(2) 试剂制备**

硝酸：优级纯；(1+1)硝酸：优级纯。

**(3) 测定步骤**

1. 将所有实验器皿包括微波消解罐、漏斗、容量瓶等放置在(1+1)硝酸中浸泡过夜，使用前再依次用自来水、去离子水洗净，自然风干；
2. 量取5 ml水样于微波消解罐中，加入5 ml硝酸，置于通风橱中静置过夜，上机消解前加盖旋紧，放入微波消解仪中，按照仪器推荐升温程序进行消解；
3. (COOL DOWN)程序运行完毕后取出消解罐置于通风橱内冷却(大约30 min)，待罐内温度与室温平衡后，放气开盖，将罐内消解液移入50 ml容量瓶中，用去离子水冲洗消解罐内壁多次，定容；
4. 将定容后的待测液过滤至事先清洗干净的聚乙烯瓶中备用；
5. 空白实验：用去离子水代替试样按上述步骤与样品同步进行消解。

**(4) 注意事项**

1. 每次消解完成后微波消解罐用大量自来水冲洗，再用去离子水润洗，自然风干，加入9 ml硝酸，进行清洗程序。清洗程序结束后再按上述步骤冲洗润洗风干后才能进行下一次消解；
2. 所有的反应罐各部件必须为干燥且无污染物的状态，以防罐体局部吸收微波后温度过高，损坏罐体；
3. 严格确认压力弹片已经安装且安装正确。严格确认反应罐完全嵌入转盘；
4. 微波消解罐不能用刷子清洗，不能用超声波清洗。

#### 4.2.2 金属元素总量的测定

**(1) 方法选择**

需要同时测定多元素总量时推荐选择电感耦合等离子体发射光谱法；

测定单一元素总量时推荐选择火焰原子吸收分光光度法。

**(2) 测定多元素总量**

样品经过前处理后测定方法同4.1。

**(3) 测定单一元素总量**

1. 仪器

火焰原子吸收分光光度计；相应元素的空心阴极灯(K、Na、Ca、Mg、Mn、Zn、Cr、Ni、Pb、Cd)。

1. 试剂

相应元素的标准溶液(1000 μg/ml)。

1. 校准曲线的绘制
2. 取1 ml相应元素标准溶液移至1000 ml容量瓶，用去离子水定容，得到1 mg/L多元素标准溶液使用液；
3. 于10个100 ml容量瓶中分别移取0、0.5、1.0、2.0、3.0、5.0、10.0、20.0、30.0、50.0 ml相应元素标准溶液使用液，加去离子水定容，其浓度分别为0、0.005、0.010、0.020、0.030、0.050、0.100、0.200、0.300、0.500 mg/L；
4. 在火焰原子吸收分光光度计上进行测量，建立目标元素的校准曲线。
5. 样品测定

与校准曲线的测定方法一致，在校准曲线上查得目标元素含量，空白样品的测定与试样相同。

1. 结果计算

样品中元素含量：*ρ=(ρ1-ρ2)×f*

式中：

*ρ*——样品中目标元素的质量浓度，mg/L；

*ρ1*——试样中目标元素的质量浓度，mg/L；

*ρ2*——空白试样中目标元素的质量浓度，mg/L；

*f*——稀释倍数。

1. 注意事项
2. 使用仪器前先检查助燃气体是否充足，乙炔瓶内气压低于0.5 Mpa时就要进行更换，否则会造成气路堵塞不能点火。一般仪器提示燃气压力时，应检查出气阀和主阀压力表上的数值是否正常。关闭仪器时应拧紧乙炔瓶主阀，拧松出气阀，使压力表上的数值归零；
3. 每次使用后要注意空压机的排水。注意观察空压机润滑油的液面高度在两红线之间，太低要更换空压机油；
4. 处理样品后要进行过滤，否则很容易使雾化器进样毛细管堵塞。毛细管堵塞后样品灵敏度会大幅下降，此时要用专用的钢丝疏通。若无大的改善，需在关掉乙炔的情况下，保证空气压力，将雾化器卸出清理；
5. 要注意检查点火口电极上的积碳，如有积碳要刮除，如果积碳太多，有可能造成短路。注意检查雾化器火焰燃烧是否均匀，如火焰燃烧不均匀，关闭火焰后用硬纸卡片清洁燃烧口；
6. 元素灯要在关机状态下更换，确认插入灯座；
7. 提示废液罐液面较低时，向废液罐内加入少许蒸馏水即可；
8. 关闭空压机气泵时需将红色按钮按下，并将绿色阀门拧至垂直90°。

## 第五节 水样微生物测定

###  水体初级生产力测定

 “黑白瓶”（black and white bottle）：容量在250～300 ml之间，校准至1 ml，可使用具塞、完全透明的温克勒瓶或其他适合的细口玻璃瓶,瓶肩最好是直的。每个瓶和瓶塞要有相同的编号。用称量法来测定每个细口瓶的体积。玻璃瓶用酸洗液浸泡6 h后，用蒸馏水清洗干净，黑瓶可用黑布或用黑漆涂在瓶外进行遮光，使之完全不透光。

###  水样采集与挂瓶

 **(1) 采水与挂瓶深度确定**

采集水样之前先用照度计测定水体透光深度，如果没有照度计可用透明度盘测定水体透光深度。采水与挂瓶深度确定在表面照度100%～1%之间，可按照表面照度的100%、50%、25%、10%、1%选择采水与挂瓶的深度和分层。浅水湖泊（水深≦3 m）可按0.0 m、0.5 m、1.0 m、2.0 m、3.0 m 的深度分层。

1. **水样采集：**根据确定的采水分层和深度，采集不同深度的水样。每次采水至少同时用虹吸管（或采水器下部出水管）注满三个试验瓶，即一个白瓶、一个黑瓶、一个初始瓶。每个试验瓶注满后先溢出三倍体积的水，以保证所有试验瓶中的溶解氧与采样器中的溶解氧完全一致。灌瓶完毕，将瓶盖盖好，立即对其中一个试验瓶（初始瓶）进行氧的固定，测定其溶解氧，该瓶溶解氧为“初始溶解氧”；
2. **挂瓶与嚗光：**将灌满水的白瓶和黑瓶悬挂在原采水处，曝光培养24 h。挂瓶深度和分层应与采水深度和分层完全相同。各水层所挂的黑、白瓶以及测定初始溶解氧的玻瓶应统一编号，做好记录。

**(2) 溶解氧的固定与分析**

曝光结束后，取出黑、白瓶，立即加入 1 ml 硫酸锰溶液和2 ml 碱性碘化钾溶液，使用细尖的移液管将试剂加入到液面之下，小心盖上塞子，避免空气带入。将实验瓶颠倒转动数次，使瓶内成分充分混合，然后将实验瓶送至实验室测定溶解氧。初始瓶的溶解氧固定和室内测定方法与此相同，均依照“GB7489-87”方法执行。有条件时，也可依据GB11913-89《电化学探头法》进行现场测定（利用YSI Pro-plus多功能水质仪测定瓶中氧含量）。

1. 计算方法

各水层日生产力[mg（o2）/m2.d]]；

总生产力=白瓶溶解氧-黑瓶溶解氧；

净生产力=白瓶溶解氧-初始瓶溶解氧；

呼吸作用量=初始瓶溶解氧-黑瓶溶解氧；

每平方米水柱日生产力[g（O2）/m2·d]计算方法，可用算术平均均值累计法计算。

1. 注意事项
2. 在有机质含量较高的湖泊、水库，可采用2～4 h 挂瓶一次，连续测定的方法，以免由于溶解氧过低而使净生产力可能出现负值；
3. 在光合作用很强的情况下，会形成氧的过饱和，在瓶中产生大量的气泡，应将瓶略微倾斜，小心打开瓶塞加入固定剂，再盖上瓶盖充分摇均，使氧气固定下来；
4. 测定时间应同时记录当天的水温、水深、透明度，并描述水草的分布情况；
5. 尽可能同时测定水中主要营养盐，特别是总磷和总氮；
6. 对于较大的湖泊和水库，因船只、风浪、气候等因素的影响，使用24 h 曝光试验，耗资耗力较大，可采用模拟现场法。模拟现场法的采样、布设曝光方法同现场法。仅布设曝光地点可选择在离水岸较近的水域进行。选择模拟现场法，主要为了保证交通、安全、实施方便，但要尽可能考虑模拟地点和现场法在水深、光照、温度等因素一致

###  水体浮游植物测定

**(1) 水体浮游植物样品采集**

定量样品在定性采样之前用采水器采集，每个采样点取水样1 L，贫营养型水体应酌情增加采水量。泥沙多时需先在容器内沉淀后再取样。分层采样时，取各层水样等量混匀后取水样1 L。大型浮游植物定性样品用25号浮游生物网在表层缓慢拖曳采集，注意网口与水面垂直，网口上端不要露出水面。

 **(2) 样品的固定**

浮游植物样品立即用鲁哥氏液固定，用量为水样体积的1%～1.5%。如样品需较长时间保存，则需加入37%～40%甲醛溶液，用量为水样体积的4%。

**(3) 水样的沉淀和浓缩**

固定后的浮游植物水样摇匀倒入固定在架子上的1 L沉淀器中，2 h后将沉淀器轻轻旋转，使沉淀器壁上尽量少附着浮游植物，再静置24 h。充分沉淀后，用虹吸管慢慢吸去上清液。虹吸时管口要始终低于水面，流速、流量不能太大，沉淀和虹吸过程不可摇动，如搅动了底部应重新沉淀。吸至澄清液的1/3时，应逐渐减缓流速，至留下含沉淀物的水样20 mL～25（或30～40）mL，放入30（或50）mL的定量样品瓶中。用吸出的少量上清液冲洗沉淀器2次～3次，一并放入样品瓶中，定容到30（或50）mL。如样品的水量超过30（或50）mL，可静置24 h后，或到计数前再吸去超过定容刻度的余水量。浓缩后的水量多少要视浮游植物浓度大小而定，正常情况下可用透明度作参考,依透明度确定水样浓缩体积见表，浓缩标准以每个视野里有十几个藻类为宜。

**表3　依透明度确定水样浓缩体积**

|  |  |
| --- | --- |
| **透明度（cm）** | **1 L 水样浓缩后的水量（mL）** |
| ＞100 | 30～50 |
| 50～100 | 100～50 |
| 30～50 | 500～100 |
| 20～30 | 1000（不浓缩） |
| ＜20 | ＞1000（稀释） |

**(4) 种类鉴定**

优势种类应鉴定到种，其它种类至少鉴定到属。种类鉴定除用定性样品进行观察外，微型浮游植物需吸取定量样品进行观察，但要在定量观察后进行。

参考书目：《中国常见淡水浮游藻类图谱》、《淡水微型生物与底栖生物》、《淡水习见藻类》。

**(5) 计数**

可显微镜照相后统一进行计数与鉴定。

1. 计数框行格法

 计数前需先核准浓缩沉淀后定量瓶中水样的实际体积，可加纯水使其成30 mL、50 mL、100 mL等整量。然后将定量样品充分摇匀，迅速吸出0.1 mL置于0.1 mL计数框内（面积20 mm×20 mm）。盖上盖玻片后，在高倍镜下选择3行～5行逐行计数，数量少时可全片计数。

1 L水样中的浮游植物个数（密度）可用下列公式计算：



式中：

N——1 L水样中浮游生物的数量，个/L；

N0——计数框总格数；

N1——计数过的方格数；

V1——1 L水样经浓缩后的体积，mL；

V0——计数框容积，mL；

Pn——计数的浮游植物个数。

1. 目镜视野法

首先应用台微尺测量所用显微镜在一定放大倍数下的视野直径，计算出面积。计数的视野应均匀分布在计数框内，每片计数视野数可按浮游植物的多少而酌情增减，一般为50个～300个，依浮游植物数确定计算视野数见表。

**表4 依浮游植物数确定计算视野数**

|  |  |
| --- | --- |
| **浮游植物平均数（个/视野）** | **视野数（个）** |
| 1～2 | 300 |
| 2～5 | 200 |
| 5～10 | 100 |
| ＞10 | 50 |

1 L水样中浮游植物的个数（密度）可用下列公式计算：

**

式中：

N——1 L水样中浮游生物的数量，个/L；

Cs——计算框面积，mm2；

Fs——视野面积，mm2；

Fn——每片计数过的视野数；

V——1 L水样经浓缩后的体积，mL；

V0——计数框容积，mL；

Pn——计数的浮游植物个数。

 **(6) 生物量的测定**

浮游植物的比重接近1，可直接采用体积换算成重量（湿重）。体积的测定应根据浮游植物的体型，按最近似的几何形状测量必要的长度、高度、直径等，每一种类至少随机测定50个，求出平均值，代入相应的求积公式计算出体积。此平均值乘上1 L水中该种藻类的数量，即得到1 L水中这种藻类的生物量，所有藻类生物量的和即为1 L水中浮游植物的生物量，单位为mg/L或g/m3。

种类形状不规则的可分割为几个部分，分别按相似图形公式计算后相加。量大或体积大的种类，应尽量实测体积并计算平均重量。其他种类可参照表D1。微型种类只鉴别到门，按大、中、小三级的平均质量计算。极小的（＜5 μm）为0.0001 mg/104个；中等的（5 μm～10 μm）为0.002 mg/104个；较大的（10 μm～20 μm）为0.005 mg/104个。

**浮游植物调查器具：**

1. 鲁哥氏液：称取6 g碘化钾溶于20 mL蒸馏水中，待完全溶解后，加入4 g碘，摇动，至碘完全溶解，加蒸馏水定容到100 mL，贮存于磨口棕色试剂瓶中；
2. 采水器：水深小于10 m的水体可用玻璃瓶采水器，深水必须用颠倒式采水器或有机玻璃采水器，规格为1000 mL；
3. 浮游生物网：圆锥形，用25号（孔径0.064 mm）筛绢缝制成；
4. 水样瓶：1000 mL；
5. 样品瓶：定量样品瓶采用带刻度的30 mL或50 mL玻璃试剂瓶；定性样品瓶采用30 mL～50 mL玻璃或聚乙烯瓶；
6. 沉淀器：1000 mL圆筒形玻璃沉淀器或1000 mL分液漏斗；
7. 乳胶管或U形玻璃管：内径2 mm；
8. 洗耳球；
9. 刻度吸管：0.1 mL、1.0 mL；
10. 计数框：0.1 mL（10行×10行，共100格）；
11. 盖玻片。

# 第六章 植物样品相关指标测定

## 第一节 植物样品采集与处理

### 1.1 植物样品的采集

采集植物样品首先要选定植株，样株必须有充分的代表性，通常也像采集土样一样按照一定路线多点采集，组成平均样品，组成每一平均样品的样株数目视作物种类、种植密度、株型大小、株龄或生育期以及要求的准确度而定。从试验区选择样株要注意群体密度，植株长相、植株长势、生育期的一致，过大或过小，遭受病虫害或机械损伤以及由于边际效应长势过强的植株都不应采用。

植株选定后还要决定取样的部位和组织器官，重要的原则是所选部位的组织器官要具有最大的指示意义，也就是说，植株在该生育期对该养分的丰欠最敏感的组织器官，果树和林木多年生植物的营养诊断通常采用“叶分析”或不带叶柄的“叶片分析”。

植物体内各种物质，特别是活动性成分如硝态氮、氨基态氮，还原糖等都处于不断的代谢变化之中，不仅在不同生育期的含量有很大的差别，并且在一日之间也有显著的周期性变化。因此在分期采样时，取样时间应规定一致，通常以上午8—10时为宜，因为这时植物的生理活动已趋活跃，地下部分的根系吸收速率与地上部正趋于上升的光合作用强度接近动态平衡。此时植物组织中的养料贮量最能反映根系养料吸收与植物同化需要的相对关系，因此最具有营养诊断的意义。

采得的植株样品如需要分不同器官（例如叶片，叶鞘或叶柄、茎、果实等部分）测定，须立即将其剪开，以免养分运转。

### 1.2 植物样品的制备与保存

采得的样品一般说是需要洗涤的，否则可能引起泥土、施肥喷药等显著的污染，洗涤方法一般可用湿布仔细擦净表面沾污物。

**(1) 植物样品的保存**

测定易起变化的成分(例如硝态氮、氨基态氮、氰、无机磷、水溶性糖、维生素等)须用新鲜样品，鲜样品如需短期保存，必须在冰箱中冷藏，以抑制其变化。分析时将洗净的鲜样剪碎混匀后立即称样，放入瓷研钵中与适当溶剂(或再加石英砂)共研磨，进行浸提测定。

测定不易变化的成分则常用干燥样品。洗净的鲜样必须尽快干燥，以减少化学和生物的变化。如果延迟过久，细胞的呼吸和霉菌的分解都会消耗组织的干物质而改变各成分的百分含量、蛋白质也会裂解成较简单的含氮化合物。杀酶要有足够的高温，但烘干的温度不能太高，以防止组织外部结成干壳而阻碍内部水分的蒸发，而且高温还可能引起组织的热分解或焦化。因此，分析用的植物鲜样要分两步干燥，通常先将鲜样在80—90℃烘箱（最好用鼓风烘箱）中烘15—30分钟，（松软组织烘15分钟，致密坚实的组织烘30分钟），然后，降温至60—70℃，逐尽水分，时间须视鲜样水分含量而定，大约12—24小时。

**(2) 植物样品的制备**

干燥的样品可用研钵或带刀片的(用于茎叶样品)或带齿状的（用于种子样品）磨样机粉碎，并全部过筛。分析样品的细度须视称样的大小而定，通常可用圆孔直径为1 mm的筛；如称样仅1—2 g者，宜用0.5 mm的筛；称样小于1 g者，须用0.25或0.1 mm筛。磨样和过筛都必须考虑到样品沾污的可能性。样品过筛后须充分混匀，保存于磨口广口瓶中，内外各贴放一样品标签。

样品在粉碎和贮存过程中又将吸收一些空气中的水分，所以在精密分析工作中，称样前还须将粉状样品在65℃（12—24小时）或90℃（2小时）再次烘干，一般常规分析则不必。干燥的磨细样品必须保存在密封的玻璃瓶中，称样时应充分混匀后多点勺取。

## 第二节 植物水分的测定

### 2.1 风干植物样品水分的测定

**(1) 方法原理**

风干的植物组织样品或种子样品的水分常用100—105℃烘干法测定。烘干时样品的失重被认为是水分重，所以这是一种间接测定水分的方法。样品在高温烘烤时可能有部分易焦化、分解或挥发的成分损失致产生水分测定的正误差，也可能因水分未完全逐尽(或在冷却、称量时吸湿)或有部分油脂等被氧化增重而造成误差。

**(2) 测定步骤**

取洁净铝盒，放入100—105℃烘箱中烘半小时。取出，盖好，移入干燥器中冷至室温（约20分钟），称重。再烘半小时，称重，两次称重差不超过1 mg就算已达恒重。将粉碎、混匀的风干植物样品约3.000 g平铺在铝盒中，称量后将盖子放在盒底下，放在已预热至约115℃的烘箱中，关门，调整温度在100—105℃之间，烘烤4—5小时，取出，盖好，移入干燥器中冷却至室温后称量，再同法烘烤约2小时，再称重，此时可先将砝码放好，因为重量之差一般只有几毫克。如此继续烘称，直到前后两次重量之差不超过2 mg为止，如果后一次重量大于前次，则以前一次重量为准。

**(3) 结果计算**

水分%(风干基)=样品烘烤前后重量之差/风干样品重量×100

干物质%(风干基)=样品烘烤后的重量/风干样品重量×100

### 2.2 新鲜植物样品水分的测定

**(1) 方法原理**

新鲜植物样品不宜直接在100℃烘烤，因为高温时外部组织可能形成干壳，反而阻碍内部组织中水分的逸出，因此须在较低温度下初步烘干升温至100—105℃烘干。此法只适于热稳定性高的不含易热解和易挥发成分的样品，如果是幼嫩植物组织和含糖、干性油或挥发性油的样品，都不宜用此法。

**(2) 测定步骤**

取一小烧杯，放入约5.000 g干净的纯砂和一支玻棒，放入100—105℃烘箱中至恒重。向杯中加入剪碎、混匀的多汁新鲜样品约5 g，与砂搅匀后称重，将杯和内容物先在50—60℃(不鼓风)烘约3—4小时，冷却，称重，再同法烘约2小时，再称重量，至恒重为止。

**(3) 结果计算**

水分%(鲜湿基)=称样前后重量之差/新鲜样品重量×100

干物质%(鲜湿基)=称样烘烤后的重量/新鲜样品重量×100

**(4) 注意事项**

1. 水分不很多的松散的新鲜样品可以不加砂和玻棒，或改用铝盒称样；
2. 粗粒的鲜样应多称些，以提高称样的代表性。

## 第三节 植物灰分中的常量元素分析

**(1) 方法原理**

灰分元素是植物体的组成元素，用特殊的试剂与灰分进行专一性反应，根据颜色变化及其产生的结晶形状可定性分析植物灰分中的常量元素。

**(2) 仪器设备**

高温电炉，坩埚，烘箱，台秤，显微镜，载玻片，盖玻片，白瓷板，表面皿。

**(3) 试剂配制**

1. 5%磷酸二氢钾；5%磷酸氢二钾；5%硫酸镁；5%硫酸钾；5%硫氰化钾；5%氧化钙；15%过氯酸；10% HCl；10%氯化钡；50%硫酸；
2. 镁试剂（现配现用）：5 g Na3PO4及30 g NH4Cl溶于50 ml蒸馏水中，加入20 ml浓NH4OH，然后定容至100 ml；
3. 钼酸铵试剂：7 g钼酸铵溶于50 ml蒸馏水，加入50 ml浓HNO3 ，放置过夜，取上清液备用（溶液有腐蚀性）；
4. 二苯胺试剂（现配现用）：1 g二苯胺溶于100 ml浓H2SO4中（有腐蚀性）。

**(4) 测定步骤**

1. 材料灰化：50 g鲜样，洗净后放入坩埚内，先置于105℃烘箱中烘干，然后于高温（550℃）电炉上灰化2小时（需要时称干重和灰重，求出干重百分含量和灰重百分含量）；
2. 检定：将1 g灰分溶解于4 ml 10% HCl溶液中作如下的检定；
3. 氮：加5滴灰分溶液于白瓷比色板上，加1滴1%二苯胺-硫酸试剂，观察是否有蓝颜色的生成，呈蓝色表明有硝酸盐存在；
4. 磷：放1滴5% KH2PO4于干洁的载玻片上，并加1滴钼酸铵试剂，几分钟后在显微镜下观察结晶（磷钼酸铵）的颜色和形状。用1滴灰分溶液作同样试验，观察其结果；
5. 钾：将1滴5%的K2HPO4溶液于载玻片上，并在其旁边滴1滴过氯酸液， 小心将它们逐渐混合，置显微镜下观察结晶（KClO4）的颜色与形状；用1滴灰分溶液作同样试验，并观察其结果；
6. 镁：按上述方法，将1滴5% MgSO4和1滴镁试剂混合，镜检结晶（磷酸铵镁）的颜色与形状；再用灰分溶液作同样试验，并观察结果；
7. 硫：将1滴5% K2SO4和1滴10% BaCl2在载玻片上混合，镜检结晶（BaSO4）的颜色与形状，用灰分溶液作同样试验并观察结果；
8. 钙：将1滴50% H2SO4和1滴5% CaCl2在载玻片上混合，镜检结晶（CaSO4）的颜色与形状，用灰分溶液作同样试验，并观察结果；
9. 铁：在白瓷比色板上加5滴灰分溶液和3滴5% KSCN，混合有红色形成则表示有铁的存在。 把观察结果填入下表，并写出反应方程式。

## 第四节 植物激素提取

**(1) 仪器设备**

减压旋转浓缩器、真空泵、离心机、pH计。

**(2) 实验材料**

碾钵3个、分液漏斗8个（萃取）、用于滤纸过滤的玻璃器皿（过滤可以用离心机来代替）、圆底烧瓶（接旋转蒸发仪接口）、40个10 ml容量瓶 、滤纸。

**(3) 试剂制备**

液氮、甲醇（色谱纯）、石油醚、0.1 mol/L NaOH溶液、不溶性PVP、0.5 mol/LHCL溶液、乙酸乙酯、醋酸、激动素 Kinetin 250 mg 11.40；1 g 32；5 g 120.15；赤霉素GA 31 g 61.40；5 g 210.70；ABA 脱落酸：250 ug：222.00；1 mg 613.00；IAA 5 g 100.5。

**(4) 提取步骤**

1. **研磨：**取0.5 g实验材料，放入预先冷却的研钵中，液氮研磨（尽量要将其研磨完全，保证提取过程的高回收率），加入预冷的体积分数为80%甲醇15 mL，甲醇与样品的比例一般是（10:1）；
2. **浸提：**随后放入4℃冰箱中浸提13小时（浸提时为了防止甲醇挥发，可以在器皿上加盖一层保鲜膜），并不断搅拌，在4℃下6500 r/min离心10 min，倒出上清液，重复2次，合并上清液（发现2 次离心回收率只有89% , 经3 次离心才达97% , 为了充分提取IAA等激素，离心3 次是必要的）；

注：此过程时间要求不是太严格，但是尽量要长，过夜也无所谓，主要目的在于保证实验材料提取完全，并且提取的滤液尽量减少在滤纸上的损耗。

1. **浓缩：**滤液在旋转蒸发仪上，40～45℃，抽滤至原体积的1/3（38℃下减压浓缩至水相）；
2. **石油醚萃取：**石油醚等体积萃取2次，丢弃石油醚相，保留水相，此过程是为了去除提取液中的叶绿素、脂类物质及残留的甲醇，保留水相（一般萃取3次，每次静止半小时，实际操作过程中，要根据不同情况来定，只要得到澄清溶液即可）；
3. **调节PH：**用0.1 mol/L NaOH调PH 8.0，加不溶性PVP（大约0.4克，用量为初始样品用量的0.2倍，搅拌20分钟后抽滤）振摇15～30分钟后，抽滤弃去PVP，重复三次；
4. **乙酸乙酯萃取：**用1 N 醋酸调PH 3.0后，等体积乙酸乙酯萃取2-3次，取酯相（这两步实验操作中，PH的调节很重要）；
5. 于40～45℃旋转蒸发仪上将酯相蒸干（合并乙酸乙酯相在38℃下减压浓缩），用流动相溶解残留物，得到样液；
6. 经0.45 µm微孔滤膜过滤后，进样检测。

**(5) 时间安排**

1. 第一天：下午4点半左右称取样品，研磨，在4℃下浸提，过夜；
2. 第二天：早上9点在4℃下6500 r/min离心10 min，倒出上清液，重复2次，合并上清液。

**(6) 注意事项**

1. C18色谱预处理柱使用前用5 ml甲醇疏松, 再用15 ml PH 3.5的0.02 mol/L的醋酸缓冲液平衡，然后样品过柱，再用15 ml上缓冲液洗涤柱子，最后用40%乙腈洗脱收集，过柱的流速均为0.5 ml/min；
2. 提取后得到四种激素，分别是脱落酸、吲哚乙酸、赤霉素、激动素。一般当天下午将样品浸提上，晚上过滤一次，第二天早上再过滤，操作熟练以后，滤液当天一般就可以纯化完，尽量不要把时间拖的太久，因为有部分物质是容易分解的；
3. 流动相的选择：前人的研究多采用甲醇－水－醋酸、乙腈－水－醋酸或乙腈－甲醇－水－醋酸体系作为流动相，考虑到乙腈本身的毒性较大且价格较昂贵，为此本试验采用甲醇－水－醋酸体系作流动相，体积分数为50%且pH 3的甲醇溶液；
4. 实验用水均为二次蒸馏水，石油醚 (30～60℃) 为优级纯，其它试剂均为分析纯，乙腈为色谱纯。因此, 宜采取先酸化、后碱化的溶剂萃取程序。

## 第五节 植物生理生化指标测定

**(1) 仪器设备**

冰箱、高速冷冻离心机、分光光度计、试管、研钵、小烧杯、容量瓶、量筒、电子天平、水浴锅、漏斗、滤纸、剪刀、液氮罐、铝箔、移液器。

**(2) 试剂制备**

1. Tris–HCl缓冲液 pH 8.0：将121 g的Tris碱溶解于约0.9 L水中，（25℃下）加46 mL的浓盐酸（11.6 N），用水调整终体积至1 L，pH 8.0；
2. 0.1%(v/v)Triton X–100：1 mL Triton X–100加入1000 mL蒸馏水（非离子性去垢剂，对人体有害请穿实验服并戴一次性手套操作）；
3. 10%(w/w)PVP；
4. Na2HPO4-NaH2PO4缓冲液pH 7.0：混合390 mL 1 mol/L的磷酸二氢钠（单碱）和610 mL 1 mol/L磷酸氢二钠（双碱）贮液，获得所需pH 7.0的磷酸缓冲液；
5. 配制1 mol/L的磷酸二氢钠（NaH2PO4·H2O）贮液：溶解138 g于足量水中，使终体积为1 L；
6. 配制1 mol/L磷酸氢二钠（Na2HPO4）贮液：溶解142 g于足量水中使终体积为1 L；
7. 0.05 mol/L愈创木酚；
8. 0.6%硫代巴妥酸（TBA，用10%三氯乙酸配制）：称取硫代巴比妥酸0.6 g溶于10% TCA溶解并用其定容至l00 mL；
9. 10%三氯乙酸: 先配100%三氯乙酸（TCA），在装有500 g TCA的试剂瓶中加入100 ml水，用磁力搅拌器搅拌直至完全溶解，临用前再稀释（稀释液应在临用前配制）；
10. 牛血清白蛋白：配成100 μg/ml；称取10 g牛血清白蛋白加水溶解最后用蒸馏水定溶至100 ml；
11. 考马斯亮蓝G-250：称取100 mg考马斯亮蓝G-250溶于50 ml 90%乙醇中，加入85%（W/V）磷酸100 ml，最后用蒸馏水定容至1000 ml，此溶液在常温下可放置一个月；
12. 3%的磺基水杨酸溶液：称取3 g磺基水杨酸加水溶解后，定容至100 mL；
13. 酸性茚三酮试剂：称取1.25 g茚三酮溶于30 mL冰醋酸和 20 mL 6 M磷酸溶液中，搅拌加热70℃溶解后冷却，置棕色试剂瓶中，于4℃下其稳定性可保2-3天；
14. 90%乙醇：在90 mL无水乙醇中加入10 mL蒸馏水；
15. 磷酸（85%，W/V）、甲苯、抗坏血酸、脯氨酸、EDTA、KCl、MgCl2、PMSF、DTT、KCN 、Na2EDTA 、H2O2；
16. 核黄素、甲硫氨酸、NBT、冰醋酸；
17. 浓盐酸、KCN、甲硫氨酸、牛血清白蛋白、甲苯。

**(3) 测定步骤**

1. **采样**：中午11：00至14：00从各个处理新生枝条中部开始取样，叶片先用蒸馏水冲洗并用滤纸擦干水分，选新生枝条中部完全展开叶取三片。立即储存于液氮或-80℃保存，用于生理生化分析；
2. **提取：**取样品用液氮研磨成粉末后，称取3 g叶片立即加9 ml提取液提取，（100 mg FW，用300 µL提取）提取液包括：4℃ 100 mM Tris–HCl缓冲液，pH 8.0（内含10 mM EDTA，50 mM KCl，20 mM MgCl2，0.5 mM PMSF，1 mM DTT，0.1%(v/v)Triton X–100,10%(w/w)PVP），混匀后4℃，14000×g离心30分钟，上清液于4℃保存用于蛋白质含量和酶活性测定，每个处理三个重复，所有的步骤均应在0℃冰浴里进行；
3. **抗氧化酶活性测定**
4. **APX（抗坏血酸过氧化物酶活性）：**利用APX在H2O2存在的条件下使抗坏血酸量减少的原理测定酶活性。在2 ml酶液中加入1 ml酶反应液（50 mmol L-1 Na2HPO4-NaH2PO4缓冲液，pH 7.0，含1 mmol L-1抗坏血酸和2.5 mmol L-1 H2O2）中，充分混匀，紫外可见光光度计上读取290 nm处吸光光度值在3 min内每15 s中的变化，计算每分钟内每克鲜重转化的抗坏血酸量（摩尔消光系数为2.8 L mmol-1 cm-1），用以表示酶活性大小，单位为µmol AsA min-1gFW-1；
5. **SOD（超氧化物歧化酶活性）：**氮蓝四唑法，利用SOD抑制NBT在光下被O2-还原的反应测定活性。分别取六只玻璃管加入5、10、20、40 µl提取酶液和适量反应液，反应混合液总量3 ml，反应液包含2 µM核黄素，10 µM甲硫氨酸，50 µM NBT，20 µM KCN，6.6 mM Na2EDTA。试管于25℃下避光恒温保存10分钟，反应以照光开始，以未照光试管为对照，在560nm处检测吸光光度值，SOD活性以吸光度降低50%所需要的酶量作为一个酶活性单位；
6. **POD（过氧化物酶活性）：**酶活性测定用愈创木酚法。反应体系包括：2.9 ml 0.05 mol/L磷酸缓冲液，pH 7.0，1.0 ml 2% H2O2，1.0 ml 0.05 mol/L愈创木酚和0.1 ml酶液，用加热煮沸5 min的酶液作为对照，反应体系加入酶液后立即于34℃水浴中保温3min，然后迅速稀释1倍，470 nm波长下比色，每隔1 min记录1次吸光度，共记录5次，然后以每分钟内A470变化0.01为一个酶活性单位(u)。按以下公式计算POD活性：

过氧化物酶活性= (ΔA470× VT)/(W × VS×0.01× t)式中过氧化物酶活性单位为µ·g-1·min-1；ΔA470为反应时间内吸光度的变化；W 为材料鲜重，单位为g；t为反应时间，单位为min；VT为提取酶液总体积，单位为ml；Vs为测定时取用酶液体积，单位为ml；

1. **CAT（过氧化氢酶活性）：**酶液在20℃恒温保存5分钟，然后取100 µl酶液加入反应液，总的混合液为3 ml，混合反应液中含有30% H2O2，50 mM磷酸钠缓冲液，pH 7.0，以没有H2O2的反应液作对照，测定在240 nm处吸光度值在3分钟内每15秒中的变化。CAT酶活性以每分钟分解1 µmol H2O2所需的酶量为一个活性单位，单位µmol H2O2 min-1gFW-1。
2. **丙二醛含量测定（膜脂氧化程度指标）**

取2 ml提取液（对照加2 ml蒸馏水）并加入2 ml 0.6%硫代巴妥酸（TBA，用10%三氯乙酸配制）溶液，混匀后在沸水浴上反应15分钟，迅速冷却后再离心。取上清液用分光光度计测定其在532，600和450 nm波长下的消光度，用公式C（µmol L-1）=6.45（OD532-OD600）-0.56OD450计算MDA含量。

1. **可溶性蛋白含量测定**

参照Bradford等(1976)的可溶性蛋白含量测定的方法：考马斯亮蓝G-250(Coomassie brilliantblue G-250)染色法。

1. 样品测定：样品提取液中蛋白质浓度的测定，吸取样品提取液1 ml（样品提取与SOD酶活测定时相同），放入具塞刻度试管中（设两个重复管），加入5 ml考马斯亮蓝G-250试剂，充分混合，放置2 min后在595 nm下比色，记录吸光度值，通过标准曲线查得蛋白质含量；
2. 标准曲线：取6支试管，按下表数据配制0～100 μg/ml血清白蛋白液各1 ml，准确吸取所配各管溶液0.1 ml，分别放入10 ml具塞试管中，加入5 ml考马斯亮蓝G-250试剂，盖塞，反转混合数次，放置2 min后，在595 nm下比色，绘制标准曲线。

**表5 配制0～100 μg/ml血清白蛋白液**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **管 号** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** |
| 100 μg/ml牛血清蛋白量(ml)蒸馏水量(ml)蛋白质含量(mg) | 01.00 | 0.20.80.02 | 0.40.60.04 | 0.60.40.06 | 0.80.20.08 | 1.000.10 |

1. 结果计算

样品蛋白质含量（mg/g鲜重）=(C×V/a)/W

式中：

C－查标准曲线所得每管蛋白质含量（mg）；

V－提取液总体积（ml）；

a－测定所取提取液体积（ml）；

W－取样量（g）。

1. **脯氨酸含量测定**
2. **脯氨酸的提取**
* 准确称取不同处理的待测植物叶片各0.5 g，分别置大管中，然后向各管分别加入5 ml 3%的磺基水杨酸溶液，在沸水浴中提取10 min（提取过程中要经常摇动），冷却后过滤于干净的试管中，滤液即为脯氨酸的提取液；
* 吸取2 ml提取液于另一干净的带玻塞试管中，加入2 ml冰醋酸及2 ml酸性茚三酮试剂，在沸水浴中加热30 min，溶液即呈红色；
* 冷却后加入4 ml甲苯，摇荡30 S，静置片刻，取上层液体至10 ml离心管中，在3000 rpm下离心5 min；
* 用吸管轻轻吸取上层脯氨酸红色甲苯溶液于比色杯中，以甲苯为空白对照，在分光光度计上520 nm波长处比色，求得吸光度值。
1. **标准曲线的绘制**
* 在分析天平上精确称取25 mg脯氨酸，倒入小烧杯内，用少量蒸馏水溶解，然后倒入250 ml容量瓶中，加蒸馏水定容至刻度，此标准液中每ml含脯氨酸100 μg；
* 系列脯氨酸浓度的配制取6个50 ml容量瓶，分别盛入脯氨酸原液0.5，1.0，1.5，2.0，2.5及3.0 ml，用蒸馏水定容至刻度，摇匀，各瓶的脯氨酸浓度分别为1，2，3，4，5及6 μg/ml；
* 取6支试管，分别吸取2 ml系列标准浓度的脯氨酸溶液及2 ml冰醋酸和2 ml酸性茚三酮溶液，每管在沸水浴中加热30 min；
* 冷却后各试管准确加入4 ml甲苯，振荡30 S，静置片刻，使色素全部转至甲苯溶液；
* 用注射器轻轻吸取各管上层脯氨酸甲苯溶液至比色杯中，以甲苯溶液为空白对照，于520 nm波长处进行比色；
* 标准曲线的绘制：先求出吸光度值（Y）依脯氨酸浓度（X）而变的回归方程式，再按回归方程式绘制标准曲线，计算2 ml测定液中脯氨酸的含量（μg/2 ml）。

## 第六节 木质素、纤维素测定

**(1) 方法原理**

测定木质素、纤维素含量的方法很多，如纤维素含量的测定方法有浓酸水解定糖法、硝酸乙醇法、氯化法等；木质素含量的测定方法有浓酸水解法、紫外分光光度法、红外光谱定量分析法和同位素标记法。由于红外光谱法和同位素标记法对实验室要求较高，所以应用并不普遍。

**(2) 测定步骤**

1. **消煮：**称1 g左右（w0）植物样于消煮管中，加入100 ml酸性洗涤剂158℃恒温消煮1小时以上，利用丙酮将全部溶液转移至烧杯中准备抽虑；
2. **抽虑：**利用抽虑瓶将烧杯内溶液及残渣通过砂芯坩锅过滤。抽虑后170℃烘干至恒重称w1，加72%浓硫酸与坩埚中（3小时以上）使其与纤维素反应，再抽虑，于170℃烘干后称w2，再放入马弗炉中550℃去木质素后称w3；
3. **酸性洗涤剂：**20 g CTAB加入1 L 1 mol/L H2SO4，之后加数滴正辛醇于消煮管（消泡）。

**(3) 结果计算**

w1 - w2 = 纤维素量

（w1-w2）/w0 \* 100% = 纤维素含量

w3 - w2 =木质素量

(w3-w2)/w0 \* 100% = 木质素含量

## 第七节 叶绿素测定

**(1) 操作步骤**

叶绿素是叶绿体中具有光学活性的主要色素，包括叶绿素a和b，它能吸收400 mm~700 mm波长的光能，实现碳和水分的化学转化，形成有机物质，积累能量。因此，叶绿素含量的测定，对于了解光合生产，特别是潜在的光合能力有重要意义。本方法适用于新鲜植物组织（如叶片、果实等）的叶绿素a、b含量及总量的测定。

取植物叶片（切碎）0.500克放入试管，加入5 ml叶绿素提取液（乙醇：丙酮：水＝4.5: 4.5: 1），盖上棉塞，避光提取72 h（隔20小时至少摇匀一次），72小时后，于663 nm和645 nm处比色，类胡萝卜素在470 nm比色。

**(2) 结果计算**

Ca＝（12.7 A 663-2.69 A 645）v/m

Cb＝(22.9 A 645-4.68 A 663)v/m

Ccaro=[（1000 A 470 nm-2.05 Ca-114.8 Cb）/245]v/m

Ct=Ca+Cb=(8.02 A 663+20.21 A 645)v/m

式中：

Ca-------叶绿素a浓度（mg/l）；

Cb-------叶绿素b浓度（mg/l）；

Ct-------总叶绿素浓度（mg/l）；

V：提取液体积；

M：样品质量，换算成mg.kg-1；

chl a=Ca\*10/叶片含水量；

chl b=Cb\*10/叶片含水量；

chl t=Ct\*10/叶片含水量。

## 第八节 总酚测定

**(1) 总酚的提取**

称取0.05xx g磨碎干样于25 ml干燥玻璃刻度试管中，加入提取剂70%丙酮10 ml（丙酮：水=7:3），放在超声波水浴锅中水浴40 min（水浴锅设置：温度30度，时间40 min，功率设为最大100）。

水浴后的提取液转移到10 ml离心管中，于低温离心机内离心10 min（离心机设置：温度4度，转速3000，时间10 min），离心后的上清液即为待测液。

**(2) 总酚的比色**

1. 取上述待测液500 ul（0.5 ml）于25 ml刻度试管中（空白用0.5 ml蒸馏水代替），加入蒸馏水9.5 ml，然后再加0.5 ml福林试剂（放在4度冰箱保存，低温保存，变绿就不能用了，福林试剂用蒸馏水1:1稀释），摇匀后再加入2.5 ml Na2CO3(100 g/L)溶液，摇匀后放置在黑暗环境下40 min显色完全，测其725 nm处的吸光度；
2. **儿茶酚标准液**：配置100 mg/L的儿茶酚溶液，称取0.100 g的儿茶酚，溶解，定容到1 L；
3. **绘制标准曲线**：量取0、1、2、3、4、5、6 ml的100 mg/L儿茶酚标准液于100 ml容量瓶，加入福林试剂5 ml，100 g/L碳酸钠溶液5 ml (100 g Na2CO3定容到1 L)，定容后儿茶酚溶液浓度分别为0、1、2、3、4、5、6 mg/L。R2=0.9983，绘制标曲。

**(3) 结果计算**





式中：

W——总酚含量，g/Kg；

C——从工作曲线上查得显色液的总酚浓度，mg/L；

Ts——分取倍数；

V——总待测液体积，10 mL；

V1——吸取待测液体积，0.5 mL；

V2——定容后的体积，13 mL；

m——烘干样质量，mg。