

ICS 点击此处添加 ICS 号

CCS 点击此处添加 CCS 号



团 体 标 准

T/ XXXX—XXXX

茶园土壤质量评价技术规范

Technical Specifications for Soil Quality Evaluation in Tea Gardens

（征求意见稿）

2025 - XX - XX 发布

2025 - XX - XX 实施

福建省农村专业技术协会 发 布

目次

- 前 言 3
- 1 范围 4
- 2 规范性引用文件 4
- 3 术语和定义 5
- 4 评价对象 5
- 5 样品采集、制备与分析 5
- 6 评价方法 7
- 附录 A（资料性附录）土壤微生物量碳的测定 10
- 附录 B（规范性附录）福建茶园土壤评价指标限值 13

前 言

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

请注意本文件的某些内容可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由福建省农业科学院资源环境与土壤肥料研究所提出。

本文件由福建省农村专业技术协会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

茶园土壤质量评价技术规范

1 范围

本文件规定了茶园土壤质量评价的术语和定义、评价对象、样品采集、制备与分析 and 评价方法。
本文件适用于福建茶园土壤质量的安全评估、等级划分及茶园种植管理相关的土壤质量管控。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 15618 土壤环境质量 农用地土壤污染风险管控标准

GB 20287-2006 农用微生物菌剂

GB/T 33469 耕地质量等级

GB/T 22105.1 土壤质量 总汞、总砷、总铅的测定 原子荧光法 第1部分：土壤中总汞的测定

GB/T 22105.2 土壤质量 总汞、总砷、总铅的测定 原子荧光法 第2部分：土壤中总砷的测定

GB/T 17141 土壤质量 铅、镉的测定 石墨炉原子吸收分光光度法

GB/T 14550 土壤质量 六六六和滴滴涕的测定 气相色谱法

GB/T 14552 水、土中有机磷农药测定的气相色谱法

HJ 491 土壤和沉积物 铜、锌、铅、镍、铬的测定 火焰原子吸收分光光度法

LY/T 1228 森林土壤水解性氮的测定

NY/T 853 茶叶产地环境技术条件

NY/T 87 土壤全钾测定法

NY/T 88 土壤全磷测定法

NY/T 889 土壤速效钾和缓效钾含量的测定

NY/T 1121.1 土壤检测 第1部分：土壤样品的采集、处理和贮存

NY/T 1121.2 土壤检测 第2部分：土壤 pH 的测定

NY/T 1121.4 土壤检测 第4部分：土壤容重的测定

NY/T 1121.6 土壤检测 第6部分：土壤有机质的测定

NY/T 1121.7 土壤检测 第7部分：土壤有效磷的测定

NY/T 1121.24 土壤检测 第24部分：土壤全氮的测定 自动定氮仪法

NY/T 295 中性土壤阳离子交换量和交换性盐基的测定

NY/T 1616 土壤中9种磺酰脲类除草剂残留量的测定液相色谱-质谱法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 茶园土壤

指用于茶树种植的耕作层土壤（0~40cm 土层），包括现有茶园土壤、规划新建茶园待开发土壤及周边关联土壤区域。

3.2 茶园土壤质量

在茶园生态系统边界内保持茶树生产力、维持环境质量、促进动植物健康的能力。

3.3 茶园土壤污染物

指存在于茶园土壤中，对茶树生长、茶叶品质及人体健康可能产生不利影响的元素，包括砷（As）、镉（Cd）、铬（Cr）、汞（Hg）、铅（Pb）、镍（Ni）、铜（Cu）、锌（Zn）以及氟（F），六六六、滴滴涕、有机磷农药、磺酰脲类除草剂。

3.4 茶园土壤肥力指标

表征茶园土壤提供养分能力的参数，包括有机质、全氮、全磷、全钾、有效氮、有效磷、速效钾、碱解氮、铜、锌、锰等微量元素含量及阳离子交换量。

3.5 茶园特征微生物

指与茶园土壤肥力水平、酸化程度及污染状况密切相关的特征微生物类群，包括功能细菌和真菌群落，其丰度及多样性可反映土壤生态功能状态。

4 评价对象

4.1 基本要求：茶园环境符合NY/T 853要求。

4.2 土壤无机污染物指标

汞（Hg）、砷（As）、镉（Cd）、铬（Cr）、铅（Pb）、镍（Ni）、铜（Cu）、锌（Zn）、氟（F）。

4.3 土壤有机污染物指标

六六六、滴滴涕、有机磷农药、磺酰脲类除草剂。

4.4 土壤化学肥力指标

有机质、全氮、碱解氮、全磷、有效磷、全钾、速效钾、pH 值、阳离子交换量。

4.5 土壤肥力微生物学指标 soil fertility microbial index

土壤微生物数量、土壤微生物量碳、土壤微生物量氮、土壤酶活性等土壤微生物学指标。

5 样品采集、制备与分析

5.5 样品采集

茶园土壤样品采集时间为秋茶采摘后基肥施用前的 10 月-12 月，应避开降雨天气、以及施肥和灌溉等管理时期。采样应符合 NY/T 1121.1 的规定。

5.6 样品制备

茶园土壤样品去除石砾和植物残根等杂物，分装 3 份，2 份置于 4 ℃ 冰箱保存，分别用于测定土壤有机污染物含量及土壤微生物学肥力指标；另 1 份风干后用于测定土壤化学肥力指标和土壤无机污染物含量。

5.7 样品分析

5.7.1 土壤无机污染物的分析方法按表 1 的规定进行。

表 1 土壤污染物分析方法

污染物	单位	检测方法标准号
砷	mg/kg	GB/T 22105.2
镉	mg/kg	GB/T 17141
铅	mg/kg	GB/T 17141
汞	mg/kg	GB/T 22105.1
铬	mg/kg	HJ 491
镍	mg/kg	HJ 491
铜	mg/kg	HJ 491
锌	mg/kg	HJ 491
氟	mg/kg	NY/T 395

5.7.2 土壤有机污染物的分析方法按表 2 的规定进行。

表 2 土壤有机污染物分析方法

污染物	单位	检测方法标准号
六六六总量	mg/kg	GB/T 14550
滴滴涕总量	mg/kg	GB/T 14550
有机磷农药	mg/kg	GB/T14552
磺酰脲类除草剂	mg/kg	NY/T1616

5.7.3 化学肥力指标测定

检测方法按表 3 执行。

表 3 土壤化学肥力指标检测方法

指标名称	单位	检测方法标准号
pH 值	-	NY/T 395
土壤全氮	g/kg	NY/T 1121.24
土壤全磷	g/kg	LY/T 1232
土壤全钾	g/kg	LY/T 1234

土壤有机质	g/kg	NY/T 1121.6
土壤水解性氮	mg/kg	LY/T 1229
土壤有效磷	mg/kg	NY/T 1121.7
土壤速效钾	mg/kg	NY/T 889
阳离子交换量	cmol/kg	NY/T 295

5.7.4 微生物学肥力指标测定

微生物数量：土壤可培养细菌、真菌和放线菌数量采用平板计数法，按照 GB 20287 中 6.3.2 的规定进行，换算成每克干土所含的菌落数。

微生物量碳：测定方法见附录 A。

微生物量氮：测定方法见附录 B。

土壤酶活性：测定脲酶、过氧化氢酶、磷酸酶、蔗糖酶活性，方法见附录 C。

6 评价方法

6.1 单一指标评价

6.1.1 土壤污染物指标

评价方法按表 3 执行。

表 4 不同质量茶园土壤污染物含量分级评价

等级	高	中	低
砷（mg/kg）	<10	10～40	>40
镉（mg/kg）	<0.2	0.2～0.3	>0.3
铬（mg/kg）	<90	90～150	>150
汞（mg/kg）	<0.15	0.15～0.3	>0.3
铅（mg/kg）	<50	50～100	>100
镍（mg/kg）	<40	40～80	>80
铜（mg/kg）	<30	30～50	>50
锌（mg/kg）	<100	100～200	>200
氟（mg/kg）	<400	400～1200	>1200
六六六总量（mg/kg）	<0.01	0.01～0.1	>0.1
滴滴涕总量（mg/kg）	<0.01	0.01～0.1	>0.1
有机磷农药（mg/kg）	<0.1	0.1～0.5	>0.5
磺酰脲类除草剂（mg/kg）	<0.1	0.1～0.5	>0.5

6.1.2 化学肥力指标

评价方法按表 4 执行。

表 5 茶园土壤化学肥力指标分级评价

等级	高	中	低
pH	4.5~5.5	4.0~4.5 或 5.5~6.5	<4.0 或 >6.5
有机质 (g/kg)	>15	10~15	<10
总氮 (g/kg)	>1.0	0.8~1.0	<0.8
水解氮 (mg/kg)	>100	50~100	<50
全磷 (g/kg)	>0.6	0.4~0.6	<0.4
有效磷 (mg/kg)	>10	5~10	<5
全钾 (g/kg)	>10	5~10	<5
速效钾 (mg/kg)	>120	80~120	<80
阳离子交换量 (cmol/kg)	>15	10~15	<10

6.1.3 微生物学肥力指标

微生物数量参考值见表 5。

表 5 不同质量茶园土壤微生物数量参考值

微生物数量/ Log (CFU/g 干土)	质量水平		
	低	中	高
细菌	< 6.0	6.0~9.0	>9.0
真菌	< 3.0	3.0~5.0	>5.0

微生物量碳、氮参考值见表 6。

表 6 不同质量茶园土壤微生物量碳、氮参考值

微生物量	质量水平		
	低	中	高
微生物量碳 / (mg/kg)	< 150	150~300	>300
微生物量氮 / (mg/kg)	< 20	20~40	> 40

土壤酶活性参考值见表 7。

表 7 不同质量茶园土壤酶活性参考值

酶活性	质量水平		
	低	中	高
脲酶 / (mg/g/24h)	< 30.0	30.0~60.0	>60.0
过氧化氢酶 / (mL/g 干土)	< 5.0	5.0~6.0	>6.0
磷酸酶 / [mg 酚 / (g 干土 · 24h)]	< 0.5	0.5~1.5	>1.5
蔗糖酶 / (mL/g 干土)	< 6.0	6.0~10.0	>10.0

6.2 综合质量判定

6.2.2 若茶园土壤中任一污染物含量分级质量为“低”，直接判定为“低”；

6.2.3 茶园土壤污染物含量质量为“中”或“高”时，按以下规则判定：

高级：污染物含量分级为高，化学肥力指标分级中，80%以上指标是属“高”，微生物学肥力指标均为“高”；

中级：污染物含量分级为中，化学肥力指标分级中，60%以上指标是属“高”，微生物学肥力指标均为“中”；

低级：不符合上述条件。

附录 A（资料性附录）土壤微生物量碳的测定

A.1 原理

新鲜土壤经氯仿熏蒸后（24 h），土壤微生物死亡细胞发生裂解，释放出的微生物量碳通过 0.5 mol/L K_2SO_4 溶液提取后，用重铬酸钾—硫酸溶液进行氧化。反应结束后，用硫酸亚铁来滴定剩余的重铬酸钾，根据所消耗的重铬酸钾量，计算得到有机碳量。根据熏蒸土壤和未熏蒸土壤测定有机碳量的差值及转换系数 (kEC)，从而计算土壤微生物量碳含量。

A.2 设备和材料

A.2.1 天平：感量为 0.01 g 和 0.1 mg。

A.2.2 真空干燥器：直径 22 cm。

A.2.3 聚乙烯离心管：200 mL。

A.2.4 消化管：150 mL，24 mm × 295 mm。

A.2.5 冰箱：-20°C 和 4°C。

A.2.6 水泵抽真空装置。

A.2.7 油浴消化装置：包括油浴锅和铁丝网。

A.2.8 可调温电炉：2000°C ± 1°C。

A.2.9 烧杯：15 mL、25 mL

A.2.10 聚乙烯离心管：80 mL

A.3 试剂

A.3.1 无乙醇氯仿（ $CHCl_3$ ）

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。将氯仿试剂与蒸馏水按 1:2（体积比）一起放入分液漏斗中，充分摇动 1 min，慢慢放出底层氯仿于烧杯中，重复洗涤 3 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，避光保存于 4°C 冰箱中。注意氯仿具有致癌作用，必须在通风橱中进行操作。

A.3.2 硫酸钾（0.5 mol/L）溶液

称取硫酸钾（ K_2SO_4 ）87.10 g 溶于蒸馏水中，稀释至 1000 mL。

A.3.3 重铬酸钾（0.2000 mol/L）标准溶液

称取经 130°C 烘干的重铬酸钾（ $K_2Cr_2O_7$ ，分析纯）9.8110 g 溶于蒸馏水中，稀释至 1000 mL。

A.3.4 重铬酸钾（0.1000 mol/L）标准溶液

称取经 130℃烘干的重铬酸钾（K₂Cr₂O₇，分析纯）4.9055 g 溶于蒸馏水中，稀释至 1000 mL。

A.3.5 硫酸亚铁（0.05 mol/L）溶液

称取 13.9005 g 硫酸亚铁（FeSO₄·7H₂O，化学纯）溶于 800 mL 蒸馏水中，慢慢加入浓硫酸 5 mL，在用蒸馏水稀释至 1000 mL，保存于棕色试剂瓶中。

此溶液易被空气氧化，需在每次使用前进行标定。标定方法：吸取 0.1000 mol/L 标准溶液 5.0 mL 于 150 mL 三角瓶中，加 5 mL 浓硫酸和 2 滴邻啡罗啉指示剂，用硫酸亚铁溶液滴定至终点，根据所消耗的硫酸亚铁溶液量计算其准确浓度，按式（A.1）计算：

$$M = \frac{C \times V_1}{V_2} \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

M—— 硫酸亚铁标准溶液浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

C—— 重铬酸钾标准溶液浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

*V*₁—— 吸取的重铬酸钾标准溶液体积，单位为毫升（mL）；

*V*₂—— 滴到终点时消耗硫酸亚铁溶液体积，单位为毫升（mL）。

A.3.6 邻啡罗啉指示剂

称取 1.49 g 邻啡罗啉溶于 100 mL 0.7%分析纯硫酸亚铁溶液。密封保存于棕色试剂瓶中。

A.4 操作步骤

A.4.1 熏蒸

A.4.1.1 称取过 2 mm 筛的新鲜土壤 20.0 g 于 25 mL 烧杯中，置于真空干燥器中，同时一并放置盛有 50 mL 无乙醇氯仿的烧杯（烧杯内放入少量防爆沸玻璃珠）和盛有 50 mL NaOH 溶液的烧杯（NaOH 用以吸收熏蒸过程中释放出来的 CO₂），干燥器底部加入少量水以保持容器湿度。盖上真空干燥器盖子，用真空泵抽真空，使氯仿沸腾 5 min。关闭真空干燥器的阀门，于 25℃黑暗条件下培养 24 h。

A.4.1.2 熏蒸结束后，打开真空干燥器阀门（应听到空气进入的声音，否则熏蒸不完全），取出盛有氯仿（可重复利用）和 NaOH 溶液的小烧杯，清洁干燥器，反复抽真空（5 次或 6 次，每次 3 min，每次抽真空后最好完全打开干燥器盖子），直至土壤无氯仿气味为止。同时，另称等量的 3 份土壤置于另一个干燥器中，作为不熏蒸对照处理。

A.4.1.3 从干燥器中取出熏蒸和未熏蒸土壤，将土壤完全转移到 200 mL 聚乙烯离心管中，加入 80 mL 0.5 mol/L 硫酸钾溶液，300 r/min 振荡 30 min，用中速定量滤纸过滤。同时做 3 个无土壤基质空白。土壤提取液最好立即分析，或-20℃冷冻保存。

A.4.2 测定

吸取上述 10 mL 土壤提取液于 150 mL 消化管中，加入 5 mL 重铬酸钾溶液（0.2000 mol/L）、浓硫

酸 5 mL，再加入 3 片或 4 片经浓盐酸浸泡过夜后洗涤烘干的瓷片（以防瀑），混匀后置于油浴消化装置中煮沸 10 min。冷却后转移到 150 mL 三角瓶中，用去离子水洗涤消化管 3 次~5 次使溶液体积约为 70 mL，加入 2 滴邻啡罗啉指示剂，用 0.05 mol/L 硫酸亚铁标准溶液滴定，溶液颜色由橙黄色变化为蓝绿色，再变为棕红色即滴定终点。

A.5 结果计算

A.5.1 有机碳量

有机碳量按式（A.2）计算：

$$A = \frac{12 \times 10^3 \times (V_0 - V) \times M \times f}{W} \dots\dots\dots (B. 2)$$

式中：

- A——有机碳量，单位为毫克每千克（mg/kg）；
- V_0 ——空白消耗的 FeSO₄ 溶液体积，单位为毫升（mL）；
- V ——样品消耗的 FeSO₄ 溶液体积，单位为毫升（mL）；
- M ——FeSO₄ 标准溶液浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；
- f —— 稀释倍数；
- W —— 烘干土壤质量，单位为克（g）；
- 12—— 碳原子的毫摩尔质量；
- 10^3 —— 为换算系数。

A.5.2 土壤微生物量碳

土壤微生物量碳按式（A.3）计算：

$$B_C = \frac{E_C}{k_{EC}} \dots\dots\dots (A.3)$$

式中：

- B_C ——土壤微生物量碳，单位为毫克每千克（mg/kg）；
- E_C ——熏蒸和未熏蒸土壤有机碳量的差值，单位为毫克每千克（mg/kg）；
- k_{EC} ——转换系数，取值 0.38。

附录 B（规范性附录）福建茶园土壤评价指标限值

（含重金属、肥力、微生物指标详细限值，同 6.1 节表格内容）

附录 B

（资料性附录）

土壤微生物量氮的测定

B.1 原理

新鲜土壤经氯仿熏蒸后（24 h），土壤微生物死亡细胞发生裂解，释放出的 α -氨基酸态氮和铵态氮通过 0.5 mol/L K_2SO_4 溶液提取，提取液中 α -氨基酸态氮和铵态氮与茚三酮发生反应，形成紫蓝色化合物，其形成量与 NH_3 浓度成正相关，故用茚三酮比色法测定提取液中 NH_3 的含量。根据熏蒸土壤和未熏蒸土壤测定有机氮量（ NH_4^+-N ）的差值及转换系数（ m ），计算土壤微生物生物量氮。

B.2 设备和材料

B.2.1 天平：感量为 0.01 g 和 0.1 mg。

B.2.2 聚乙烯离心管：10 mL。

B.2.3 真空干燥器：直径 22 cm。

B.2.4 紫外分光光度计：200 nm~1000 nm。

B.2.5 水浴锅：20℃ ~ 100℃ 。

B.3 试剂

B.3.1 无乙醇氯仿（ BHB_{I3} ）

同 B.3.1。

B.3.2 0.05 mol/L 硫酸钾（ K_2SO_4 ）溶液

同 B.3.2。

B.3.3 pH 5.2 的乙酸锂（ $LiOH \cdot H_2O$ ）溶液

称取氢氧化锂（ $LiOH \cdot H_2O$ ）168 g，加入冰乙酸 279 mL，加蒸馏水稀释至 1000 mL，用浓盐酸或 50%的氢氧化钠溶液调节 pH 至 5.2。

B.3.4 茚三酮溶液

取 150mL 二甲基亚砷（ B_2H_6OS ）和乙酸锂溶液 50mL，加入 4g 水合茚三酮（ $B_9H_4O_3 \cdot H_2O$ ）和 0.12 g 还原茚三酮（ $B_{18}H_{10}O_6 \cdot 2H_2O$ ）搅拌至完全溶解。

B.3.5 50%乙醇水溶液

吸取 50 mL 99%乙醇于 100 mL 容量瓶中，用蒸馏水稀释。

B.3.6 1 mol/L 的硫酸铵 $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ 标准储存液

称取 4.7167 g 分析纯硫酸铵（称前 105℃烘 2h）溶于 0.5 mol/L 硫酸钾溶液中，并用硫酸钾溶液稀释至 1000 mL，摇匀，于 4℃ 冰箱中保存。

B.3.7 0.1 mol/L 的硫酸铵 [(NH₄)₂SO₄] 标准液

吸取 10 mL 1 mol/L 的硫酸铵标准储存液于 100 mL 容量瓶中，用 0.5 mol/L 硫酸钾溶液稀释至 100 mL，摇匀。此溶液现用现配。

B.3.8 工作曲线的制备

分别吸取 0.1 mol/L 的硫酸铵标准液 0.00 mL、0.50 mL、1.00 mL、2.00 mL、3.00 mL、4.00 mL、5.00 mL 于 100 mL 容量瓶中，用 0.5 mol/L 硫酸钾溶液稀释至 100 mL，摇匀，其浓度分别为 0 mol/L、0.25 mol/L、0.5 mol/L、1.0 mol/L、1.5 mol/L、2.0 mol/L、2.5 mol/L 硫酸铵标准氮的系列溶液。

B.4 分析步骤

B.4.1 熏蒸

同 B.4.1。

B.4.2 测定

吸取 0.5 mL 样品提取液和标准工作液，分别置于 10 mL 的塑料离心管中，加入 2 mL 茚三酮显色剂，涡旋搅拌充分混匀，置于试管架上，在沸水中水浴 15 min，迅速冷却，加入 5 mL 稀释液（50%乙醇水溶液），摇匀于 570 nm 下比色。

B.5 结果计算

土壤微生物生物量氮按式（B.1）计算：

$$B_N = m \times E_N \quad \dots\dots\dots (B.1)$$

式中：

B_N ——土壤微生物生物量氮，单位为毫克每千克（mg/kg）；

E_N ——熏蒸和未熏蒸土壤有机氮量的差值，单位为毫克每千克（mg/kg）；

m ——转换系数，取值 5.0。

附录 C（资料性附录）土壤酶活性测定

C.1 土壤过氧化氢酶

C.1.1 原理

过氧化氢酶能酶促过氧化氢分解生成分子氧和水，从而降低过土壤中氧化氢的毒害作用。土壤中过氧化氢酶的测定是根据单位时间析出的氧量或剩余的过氧化氢量来表示过氧化氢酶的活性。

C.1.2 设备和材料

C.1.2.1 天平：感量为 0.01 g 和 0.1 mg。

C.1.2.2 往复式振荡机：30 r/min~300 r/min。

C.1.2.3 滴定管：10 mL。

C.1.2.4 三角瓶：150 mL。

C.1.3 试剂

C.1.3.1 高锰酸钾溶液[$c(\text{KMnO}_4)=0.002 \text{ mol/L}$]

称取化学纯高锰酸钾 0.3161 g，溶于 1000 mL 无 CO_2 蒸馏水中，储于棕色瓶中，备用。

C.1.3.2 0.3% H_2O_2

按 1:100 将 30% H_2O_2 用水稀释。

C.1.4 测定步骤

称取 5 g 过 1 mm 筛的风干土样，置于 150 mL 三角瓶中。注入 40 mL 蒸馏水和 5 mL 0.3% 过氧化氢。同时设置对照，即三角瓶中注入 40 mL 蒸馏水和 5 mL 0.3% 过氧化氢，而不加土样。塞紧瓶塞，置于 120 r/min 往返式摇床上，振荡 30 min。随即注入 5 mL 1.5 mol/L 硫酸以终止反应，用致密滤纸过滤。取滤液 25 mL，用 0.002 mol/L 高锰酸钾溶液滴定至微红色。

C.1.5 结果计算

以单位土重消耗的 0.002 mol/L 高锰酸钾毫升数（对照与试验测定的差）表示土壤过氧化氢酶活性，按式（C.1）计算：

$$A_1 = \frac{V}{dwt} \dots\dots\dots (C.1)$$

式中：

A_1 ——土壤过氧化氢酶活性，单位为毫升高锰酸钾每克干土（ mLKMnO_4/g 干土）；

V ——0.002 mol/L 高锰酸钾毫升数，单位为毫升（mL）；

Cwt ——烘干土壤重量，单位为克（g）。

C.2 土壤脲酶

C.2.1 原理

土壤中脲酶能促尿素生成氨、二氧化碳和水。其中氨能与酚类化合物起反应生成蓝色的靛酚，颜色深度与氨含量相关，因而用于脲酶活性的测定。

C.2.2 设备和材料

C.2.2.1 天平：感量为 0.01 g 和 0.1 mg。

C.2.2.2 恒温培养箱：20℃~70℃。

C.2.2.3 往复式振荡机：30 r/min~300 r/min。

C.2.2.4 冰箱：4℃。

C.2.2.5 pH 计。

C.2.2.6 紫外分光光度计：200 nm~1000 nm。

C.2.2.7 水浴锅：20℃~100℃。

C.2.2.8 容量瓶：50 mL。

C.2.3 试剂

C.2.4 甲苯

C.2.4.1 10% 尿素

称取 10 g 尿素，用蒸馏水溶至 100 mL。

C.2.4.2 柠檬酸盐缓冲液

分别称取 368 g 柠檬酸溶于 600 mL 蒸馏水；295 g 氢氧化钾溶于 1000 mL 蒸馏水。将两溶液合并，用 1 mol/L NaOH 将 pH 调至 6.7，用蒸馏水稀释至 2000 mL。

C.2.4.3 苯酚钠溶液

C.2.4.3.1 溶液 1：将 62.5 g 苯酚溶于少量乙醇，加 2 mL 甲醇和 18.5 mL 丙酮，用乙醇稀释至 100 mL。

C.2.4.3.2 溶液 2：27 g NaOH 溶于 100 mL 水。将两溶液保存在冰箱中。

C.2.4.3.3 使用前将两溶液各 20 mL 混合，用蒸馏水稀释至 100 mL。

C.2.4.4 次氯酸钠溶液

用蒸馏水稀释试剂，至活性氯的浓度为 0.9%，溶液稳定。

C.2.4.5 氮的标准溶液

C.2.4.5.1 称取 0.4717 g 硫酸铵溶于蒸馏水中并稀释至 1000 mL，得到 1 mL 含有 0.1 mg 氮的标准液；

C.2.4.5.2 往 50 mL 容量瓶中分别注入 1 mL、2.5 mL、4 mL、6 mL、7.5 mL 及 9 mL 的氮标准液，并用蒸馏水稀释至刻度。得到分别含有 0.1 mg、0.25 mg、0.4 mg、0.6 mg、0.75 mg 及 0.9 mg 的 NH_4^+ -N 标

准曲线。

C.2.5 测定步骤

称取 10 g 过 1 mm 筛的风干土样，置于 100 mL 容量瓶中，加 2 mL 甲苯。甲苯处理 15 min 后，往瓶中注入 10 mL 10% 尿素溶液和 20 mL 柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.7)，仔细混合。将瓶在 38℃ 恒温箱中放置 24 h 后，用加热至 38℃ 的蒸馏水稀释至刻度，摇荡，将悬液过滤。滤液备用。与此同时，对每一土样设置用水代替基质的对照；对整个试验，设置无土壤的对照，以检验试剂的纯度。取滤液 1 mL 置于 50 mL 容量瓶中，用蒸馏水稀释至 10 mL，然后加入 4 mL 苯酚钠溶液，并立即加入 3 mL 次氯酸钠溶液。加入每一试剂后，立即将混合物仔细混合。混合后 20 min，将混合物体积稀释至刻度。用 1 cm 的比色槽，在分光光度计上于波长 578 nm 处，测定颜色的深度。用供试样品所得的消光值减去对照样品消光值的差，根据标准曲线求出氨态氮量。

C.2.6 结果计算

土壤的脲酶活性，以每百克土的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的毫克数表示，按式 (C.2) 计算：

$$A_2 = \frac{(C \times V \times 10) \times 10}{C_{wt}} \dots\dots\dots (C.2)$$

式中：

A_2 ——土壤脲酶活性，单位为毫克 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 每克土 [$\text{mgNH}_4^+\text{-N}/(100 \text{ g 干土} \cdot 24 \text{ h})$];

C —— 土壤滤液中酶活性值，单位为毫克 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 每毫升 ($\text{mgNH}_4^+\text{-N/mL}$);

V —— 土壤溶液体积，单位为毫升 (mL);

10 —— 分取倍数;

C_{wt} —— 烘干土壤重量，单位为克 (g)。

C.3 土壤磷酸酶

C.3.1 原理

土壤磷酸酶活能酶解磷酸苯二钠释放出的酚，使其与氯代二溴对苯醌亚胺试剂反应生色。用比色法测定出游离的酚量，用以表示磷酸酶活性。

C.3.2 设备和材料

C.3.2.1 天平：感量为 0.01 g 和 0.1 mg。

C.3.2.2 恒温培养箱：20℃~70℃。

C.3.2.3 紫外分光光度计：200 nm~1000 nm。

C.3.2.4 水浴锅：20℃~100℃。

C.3.2.5 容量瓶：100 mL。

C.3.3 试剂

C.3.3.1 乙酸盐缓冲液 (pH 5.0)

称取 136 g 乙酸钠溶于 700 mL 蒸馏水，用乙酸调节至 pH 5.0，用蒸馏水稀释至 1000 mL。

C.3.3.2 柠檬酸盐缓冲液 (pH 7.0)

称取 300 g 柠檬酸钾溶于 700 mL 蒸馏水，用稀盐酸调节至 pH 7.0，用蒸馏水稀释至 1000 mL。

C.3.3.3 硼酸盐缓冲液 (pH 9.6 与 pH 10.0)

称取 12.404g 硼酸溶于 700mL蒸馏水，用稀 NaOH 溶液调节调节至 pH 10.0，用蒸馏水稀释至 1000 mL。

C.3.3.4 磷酸二钠溶液

将 6.75 g 苯磷酸二钠溶液溶于蒸馏水，并稀释至 1000 mL。

C.3.3.5 甲苯

C.3.3.6 Gibbs 试剂

将 200 mg 2,6-双溴苯醌氯酰亚胺溶于乙醇，并稀释至 100 mL。

C.3.3.7 标准溶液

C.3.3.7.1 母液：1 g 酚溶于蒸馏水中，并稀释至 1000 mL，溶液保存在暗色瓶中。

C.3.3.7.2 测量前吸取 5 mL 母液稀释至 100 mL 制成工作液。分别向 100 mL 容量瓶中注入 1 mL、3 mL、5 mL、7 mL、9 mL、11 mL 工作液，分别得到 0.05、0.15、0.25、0.35、0.45 及 0.55 mg 酚标准溶液。

C.3.4 测定步骤

取 10g 过 1mm 筛的风干土样，置于 100mL容量瓶中，用 1.5 mL甲苯处理。甲苯处理 15min 后，注入 10 mL 苯磷酸二钠溶液和 10 mL 相应的缓冲液。将反应混合物置于 38℃ 恒温箱中，培养 24 h 后，用 38℃ 的热水将瓶中内容物稀释至刻度，再用致密滤纸过滤。对每一土样设置用 10 mL 水代替基质的对照。比色程序如下：

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

b) 将反应物仔细混合，静置 20 min，这时溶液呈现青色。

c) 用水将瓶中混合物稀释至刻度，并在 24 h 内，用 1 cm 液槽，在分光光度计上于波长 578 nm 处测得颜色的深度，读取消光值。以供试样品所得消光值减去对照样品消光值的差，根据标准曲线，求出酚量。

C.3.5 结果计算

土壤磷酸酶活性，以每克土的酚毫克数表示，按式 (C.3) 计算：

$$A_3 = \frac{C \times V}{dwt} \dots\dots\dots (C.3)$$

式中：

A_3 —— 土壤磷酸酶活性，单位为毫克酚每克干土 [mg 酚/ (g 干土 24 h)]

C —— 土壤滤液中苯酚含量，单位为毫克每毫升 (mg/mL)；

V —— 土壤溶液体积，单位为毫升（mL）；

100 —— 分取倍数；

C_{wt} —— 烘干土壤重量，单位为克（g）。

C.4 土壤蔗糖酶

C.4.1 原理

蔗糖酶能水解蔗糖酶生成的葡萄糖和果糖。水解的还原糖能与 3,5-二硝基水杨酸反应而生成橙色的 3-氨基-5-硝基水杨酸。颜色深度与还原糖量相关，因而可用测定还原糖量来表示蔗糖酶的活性。

C.4.2 设备和材料

C.4.2.1 天平：感量为 0.01 g 和 0.1 mg。

C.4.2.2 恒温培养箱：20℃～70℃。

C.4.2.3 往复式振荡机：30 r/min～300 r/min。

C.4.2.4 紫外分光光度计：200 nm～1000 nm。

C.4.2.5 水浴锅：20℃～100℃。

C.4.2.6 容量瓶：100 mL。

C.4.3 试剂

C.4.3.1 甲苯

C.4.3.2 20% 蔗糖溶液

C.4.3.3 磷酸盐缓冲液（pH 5.5）

C.4.3.4 菲林溶液

C.4.3.4.1 溶液 1: 34.64 gCuSO₄·5H₂O 溶于蒸馏水，并稀释至 500 mL。

C.4.3.4.2 溶液 2: 173 g 酒石酸钾钠和 50 gNaOH 溶于蒸馏水中，并稀释至 500 mL。

C.4.3.4.3 测量前，将溶液 1 和 2 按 1:1 混合。

C.4.3.5 33% 碘化钾

C.4.3.6 0.1 mol/L 硫代硫酸钠

分别称取 24.82 gNa₂S₂O₃·5H₂O 和 1 gNa₂CO₃·10H₂O 溶于蒸馏水中，并稀释至 1000 mL。

C.4.3.7 用蒸馏水稀释的 H₂SO₄（1:3）

C.4.3.8 淀粉指示剂

0.5 g 淀粉溶于少量蒸馏水，混以 10 mL 煮沸的 25% NaCl 溶液，并煮沸 1 min。

C.4.4 测定步骤

C.4.4.1 称取 10 g 过 1 mm 筛的风干土样，置于 100 mL 容量瓶中，加 1.5 mL 甲苯，在室温下放置 15 min。注入基质和磷酸盐缓冲液（pH 5.5）各 10 mL。将瓶中内容物仔细混合，置于 37℃ 恒温箱中保温，培养 24 h，用 38℃ 的水将瓶中混合物稀释至刻度，充分混合后重新置于恒温箱中。再培养 1 h 后，取 20 mL 未经过滤的透明液，测定其还原糖。每一组测定时，需设置无蔗糖溶液和蔗糖溶液为对照。

C.4.4.2 往 100 mL 三角瓶中注入 10 mL 菲林溶液和 20 mL 供试液，并混以 20 mL 蒸馏水。

C.4.4.3 将以上三角瓶在沸腾的水浴中放置 10 min。

C.4.4.4 由水浴中取出三角瓶，于自来水流下冷至 25℃，再往瓶中注入 3 mL 33% 碘化钾溶液和 4 mL 稀硫酸。

C.4.4.5 用 0.1 mol/L 硫代硫酸钠滴定以上混合液，应先注入 0.5 mL 淀粉指示剂，再进行滴定至蓝色消失。

C.4.5 结果计算

土壤蔗糖酶活性，以单位土重的 0.1 mol/L 硫代硫酸钠毫升数（对照与试验测定之差）表示，按式（C.4）计算：

$$A_4 = \frac{V}{dwt} \dots\dots\dots (C.4)$$

式中：

A_4 ——土壤蔗糖酶活性，单位为毫升硫代硫酸钠每克干土（mLNa₂S₂O₃/g 干土）；

V ——对照与试验测定所需的 0.1 mol/L 硫代硫酸钠毫升数之差，单位为毫升（mL）；

Cwt ——烘干土壤重量，单位为克（g）。
