

土壤微生物磷测定方法

(氯仿熏蒸法 紫外分光光度计)

一、方法原理

新鲜土壤经氯仿熏蒸后 (24h)，被杀死的土壤微生物生物量磷被 0.5mol/L NaHCO_3 溶液提取，在钼锑混合试剂作用下，溶液中的正磷酸与钼酸络合形成磷钼杂多酸 (在一定酸度条件下)，采用磷钼蓝比色法测定提取液中全磷含量。根据熏蒸土壤与未熏蒸土壤测定有机磷量的差值及转换系数 (k_p) 从而计算土壤微生物生物量磷。

二、主要仪器

分光光度计；硬质试管；水浴锅；真空干燥箱；离心机；烧杯；三角瓶；聚乙烯塑料管；离心管；漏斗等。

三、试剂

(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。将氯仿试剂按 1:2 (体积比) 与蒸馏水一起放入分液漏斗中，充分摇动 1min，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瓶试剂中，避光保存于 4℃ 冰箱中。注意氯仿具有致癌作用，必须在通风橱中进行操作。

(2) 0.5mol/L 碳酸氢钠 (NaHCO_3) 浸提液溶液：溶解 NaHCO_3 42.0g 于 800mL 水中，以 0.5mol/L NaOH 溶液调节浸提液的 pH 至 8.5，再用去离子水稀释至 1L。此溶液曝于空气可能因失去 CO_2 使 pH 增高，可于液面加一层矿物油保存之。此溶液储存于塑料瓶中比在玻璃中容易保存，若储存超过一个月，应检查 pH 是否改变。

(3) 2.5mol/L 硫酸 (H_2SO_4) 溶液: 量 70.0mL 分析纯浓硫酸 (H_2SO_4 , $\rho=1.84\text{g/mL}$), 用去离子水稀释至 500mL。

(4) 高氯酸 [$CO(HClO_4)=70\%\sim 72\%$, 分析纯]。

(5) 钼锑抗试剂: ①5g/L 酒石酸氧锑钾溶液: 取酒石酸氧锑钾 [$K(SbO)C_4H_4O_6$]0.5g 溶解于 100mL 水中。②钼酸铵-硫酸溶液: 称取钼酸铵 [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$]10g, 溶于 450mL 水中, 缓慢加入 153mL 浓 H_2SO_4 , 边加边搅。再将上述 A 溶液加入到 B 溶液中, 最后加水至 1L。充分摇匀, 储于棕色瓶中, 此为钼锑混合储备液。

临用前 (当天), 称取左旋抗坏血酸 ($C_6H_8O_5$, 化学纯) 1.5g, 溶于 100mL 钼锑混合液中, 混匀, 此即钼锑抗试剂。有效期 24h, 如保藏冰箱中则有效期较长。此试剂中 H_2SO_4 为 5.5mol/L (H^+), 钼酸铵为 10g/L, 酒石酸锑钾为 0.5g/L, 抗坏血酸为 15g/L。

(6) 磷标准溶液: 准确称取在 105℃ 烘箱中烘干的 KH_2PO_4 (分析纯) 0.2195g, 溶解在 400mL 水中, 加浓 H_2SO_4 5mL (加 H_2SO_4 防长霉菌, 可使溶液长期保持), 转入 1L 容量瓶中, 加水至刻度。此溶液为 50 $\mu\text{g/mL}$ 磷标准溶液。吸取上述磷标准溶液 25mL, 稀释至 250mL, 即为 5 $\mu\text{g/mL}$ 磷标准溶液。(此溶液不宜久存)

四、操作步骤

(1) 称取新鲜土壤 (相当于干土 5.0g) 3 份分别放入 3 个 25mL 小烧杯中。将烧杯放入真空干燥器中, 并放置盛有无乙醇氯仿 (约 2/3) 的 15mL 烧杯 2 或 3 只, 烧杯内放入少量防爆沸玻璃珠, 同时放入一盛有 NaOH 溶液的小烧杯, 以吸收熏蒸过程中释放出来的 CO_2 , 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 5min。关闭真空干燥器阀门, 于 25℃ 黑暗条件下培养 24h。

(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，重做），取出盛有氯仿（可重复利用）和稀 NaOH 溶液的小烧杯，清洁干燥器，反复抽真空（5 或 6 次，每次 3min，每次抽真空后最好完全打开干燥器盖子），直到土壤无氯仿味道为止。同时，另称等量的 3 份土壤，置于另一干燥器中为不熏蒸处理。

(3) 从干燥器中取出熏蒸和未熏蒸土样，将土样完全转移到 200mL 聚乙烯提取瓶中，加入 100mL 0.5mol/L NaHCO_3 浸提液（土水比为 1:20），300r/min 振荡 30min，用慢速定量滤纸过滤。同时作 3 个无土壤基质空白。土壤提取液最好立即分析，或 -20°C 冷冻保存（但使用前需解冻摇匀）。

(4) 吸取 5mL 消化液[依样品的含磷而定，以含磷 (P) 在 20~30 μg 为最好]，注入 25mL 容量瓶中，用水稀释至 20mL，加入 4mL 混合显色剂，再加水定容，摇匀。显色完全（约 30min）后，在 882nm 波长处进行比色，以空白液的透光率为 100（或吸光度为 0），读出测定液的透光度或吸收值。

(5) 工作曲线：准确吸取 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 磷标准溶液 0、0.5mL、1mL、2mL、3mL、4mL、5mL 分别放入 25mL 容量瓶中，加水至约 20mL，然后加钼锑抗试剂 4mL，最后用水定容至 25mL。30min 后开始进行比色。各瓶比色液磷的浓度分别为 0、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 磷。

五、结果计算

土壤微生物生物磷： $B_P = E_{Pt} / k_P$

式中， E_{Pt} 为熏蒸和未熏蒸土壤的差值； k_P 为转换系数，取值为 0.4 (Hed-ley and Stewart, 1982)