**版本1 訂定日期:2024年4月18日**

**土壤健康指標Protocol**

1. **總體密度 (土環法)**

器材：不鏽鋼製土環、烘箱及電子天平(精度0.01克)

步驟：

1. 以已知體積及重量之不鏽鋼環製土環，採取0-15、15-30公分之土壤。
2. 將取土後的土環以105 ± 5℃烘箱進行烘乾24小時。
3. 待溫度降至室溫後秤乾重。
4. 以烘乾土重 /土環體積計算總體密度。
5. **土壤團粒穩定度 (濕篩法)**

儀器：Wet sieving apparatus (from Eijkelkamp)

器材：電子天平(精度0.01克)

試劑：0.2%偏磷酸鈉、0.2%氫氧化鈉溶液及RO水

步驟：

1. 土壤風乾後過篩，留下1mm-2mm粒徑大小風乾土壤。測定土壤樣本pH值。
2. 樣品杯A秤重(W1)。
3. 秤取4克樣本置於0.25mm篩網上。
4. 利用噴霧器(洗滌瓶)預濕樣本等待5-10分鐘使樣品充分濕潤。
5. 加入85毫升RO水於樣品杯A覆蓋土壤。
6. 調整樣品架高度使樣本泡至水中，打開3分鐘模式，震盪3分鐘後機器停止。
7. 調整高度使篩網離開水面瀝乾，取出樣品杯A後置於110˚C烘乾秤重(W2)。
8. 放置另一組樣品杯B秤重(W3)。
9. 於樣品杯B內加入85毫升分散劑，當土壤pH＞ 7時，使用偏磷酸鈉溶液為分散劑，當土壤pH＜ 7時，使用氫氧化鈉溶液為分散劑。
10. 打開連續模式，震盪5分鐘，使小石粒以外土壤洗入樣品杯，可使用玻璃攪拌棒或橡膠頭棒協助壓散。
11. 調整高度使篩網離開水面，將樣品杯B置於110˚C烘乾秤重(W4)。
12. **土壤質地 (比重計法)**

器材與試劑：電子天平(精度0.01克)、比重計、計時器、1000毫升量筒、去離子水及50g·L-1飽和偏磷酸鈉溶液

步驟：

1. 先將過2mm篩的土壤樣品置於105 ± 5℃烘箱進行烘乾24小時，取50克烘乾土壤樣品於500毫升燒杯之中。
2. 加入去離子水300毫升及飽和偏磷酸鈉溶液100毫升後，放置10分鐘。
3. 於電動攪拌器中攪拌10分鐘，時間到將以上土壤溶液倒入1000毫升量筒中，並以去離子水定量至1000毫升。
4. 用攪拌槳攪拌均勻後，輕輕插入比重計和溫度計，在40秒內，將比重讀出，並測液體溫度，記錄下來(第1次)【攪拌槳離開液面開始計時】。
5. 再次以攪拌槳攪拌均勻後，靜置2小時，輕輕插入比重計和溫度計，將比重讀出，並測液體溫度，記錄下來(第2次)【攪拌槳離開液面開始計時】。
6. 加入分散劑於懸濁液中所應作之校正：於土壤懸濁液中加入100毫升飽和偏磷酸鈉溶液後，會影響懸濁液密度，故應另測定1000毫升水中含有100 毫升偏磷酸鈉溶液之比重計讀數(空白)，然後從各懸液讀數扣除。
7. 每次測定比重時，應同時測定該懸濁液之溫度，如高於19.4°C，每增高1°C比重計之讀數應加0.3，低於19.4°C，每低1°C須減0.3(見溫度校正表)，校正為液溫19.4°C時之比重計讀值。
8. 計算方法如下：
9. **酸鹼值 (電極法)**

器材與試劑：電子天平(精度0.01克)、去離子水及玻璃電極pH計

步驟：

1. 秤取過2mm篩的土壤樣品35克，再加去離子水35毫升，調製成土：水 (w/v) ＝ 1:1作成懸浮夜。
2. 在一小時內以玻棒間歇攪拌懸浮夜數次，以玻璃電極pH計測定樣品pH值。
3. **電導度 (土水比1：5法)**

器材與試劑：電子天平(精度0.01克)、去離子水及電導度計

步驟：

1. 秤取過2mm篩的土壤樣品15克，再加去離子水75毫升，調製成土：水 (w/v) ＝ 1:5作成懸浮夜。
2. 懸浮夜以電導度計測定樣品EC值。
3. **總有機碳**

儀器： soli TOC Cub儀器(Elementar, Langenselbold, Germany)

器材：電子天平(精度0.00001克)

步驟：

秤取過0.5mm篩的土壤樣品0.5克以Soli TOC cube進行有機碳分析。

1. **有效性磷、交換性鉀、鈣、鎂、鈉 (Mehlich No.3法)**

儀器：感應耦合電漿原子發射光譜儀(Thermo iCAP 7000)

器材：電子天平(精度0.01克)、100毫升量筒及1000毫升量筒、5公升定量瓶、Waterman No.5濾紙、震盪儀

試劑：

Mehlich No.3儲備液：取139克氟化銨與73.6克EDTA，溶於600毫升RO水中，再定量至1000毫升。

Mehlich No.3萃取液：取100克硝酸銨溶於4公升RO水中，加入20毫升Mehlich No.3儲備液，再加入57.5毫升冰醋酸及4.1毫升濃硝酸，最後以RO水定量至5公升並混合均勻。Mehlich No.3萃取液之pH值為2.5±0.1。

步驟：

1. 秤取過2mm篩的土壤樣品2克放置於50毫升錐形瓶，加入20毫升Mehlich No.3萃取液。
2. 以200 rpm震盪5分鐘後以Waterman No.5濾紙過濾。
3. 濾液以感應耦合電漿原子發射光譜儀(Thermo iCAP 7000)進行分析。
4. **土壤微生物多樣性 (NGS法)**

試劑：DNeasy PowerSoil Pro Kit

步驟：

1. 利用Kit抽取鮮土DNA(所採集的鮮土若無法馬上抽取DNA，請保存於-20℃冰箱中)。
2. 抽取後之DNA請保存於-20℃冰箱中，以冷凍宅配方式寄至農試所郭聆亦助理研究員處協助後續NGS及分析。
3. **土壤酵素活性 (Fluorescein Diacetate Hydrolysis法)**

儀器：分光光度計(波長490 nm)

器材：Glass McCartney bottles (28毫升) with rubber-lined screw caps

試劑：

磷酸鉀緩衝液 (60 mM, pH 7.6 )：取8.7克K2HPO4及1.3克KH2PO4 以去離子水定量至1公升。緩衝液存於4°C冰箱，並於使用當日確認pH。

FDA stock solution (1mg·mL-1)：取0.1克fluorescein diacetate(Sigma) 溶於 100毫升丙酮(acetone),溶液保存於-20°C。

Termination agent：丙酮

Fluorescein master solution (2000 𝛍g/ mL)：取113.2毫克 fluorescein sodium salt (Merck, BDH Analar)溶於50毫升磷酸鉀緩衝液(60 mM, pH 7.6 )

Fluorescein working standard solution：依序取下列Fluorescein master solution體積並以Potassium phosphate buffer定量至50毫升

步驟：

1. 田間採土後，另秤取約50 g新鮮土壤儲存於4°C備用。
2. 取新鮮土壤1 g加入玻璃瓶中，加入10毫升磷酸鉀緩衝液，搖晃均勻。
3. 樣品加入0.2毫升 FDA stock solution，空白組加入0.2 毫升丙酮，震盪20 分鐘(300 rpm)，溫度30°C。
4. 取出玻璃瓶並加入10 毫升丙酮終止反應，手搖混合約10秒。
5. 將樣品以Waterman No.2濾紙過濾後，取出1毫升濾液放入1.5毫升離心管離心，離心條件RCF：16,500 g，5分鐘。
6. 取上清液0.2毫升於樣品盤中以分光光度計(490 nm)進行分析，記錄讀值。