

# 土壤可溶性无机磷对微生物生物量磷测定的干扰

林启美

(中国农业大学土壤和水科学系, 北京 100094)

**摘要:**对于可溶性无机磷含量高于 50mg/kg 的土壤, 熏蒸处理前必须去除这部分磷, 否则将严重干扰微生物量磷的测定。讨论了去除土壤中可溶性无机磷的方法。

**关键词:**微生物生物量磷; 可溶性无机磷; 干扰

## Interference of soil soluble inorganic P in measurement of soil microbial biomass P

LIN Qi-Mei (1. Department of Soil & Water Sciences, China Agricultural University, Beijing, 100094, China)

**Abstract:** When the content of the soil soluble inorganic P is higher than 50 mg/kg, this part of phosphorus must be removed before fumigation treatment. Otherwise, the measurement of soil microbial biomass P would be severely interfered by the presence of a large amount of inorganic P in soil extract. This paper discusses the methods to remove soil soluble inorganic P.

**Key words:** microbial biomass P; soluble inorganic P; interference

文章编号: 1000-0933(2001)06-0993-04 中图分类号: S154 文献标识码: A

微生物生物量磷是植物磷素营养的重要来源<sup>[1-4]</sup>, 其测试方法格外令人关注。Birch<sup>[5]</sup>发现, 用氯仿熏蒸处理土壤时, 释放出来的磷来自微生物。由此 Hedley & Stewart<sup>[6]</sup>用 NaHCO<sub>3</sub> 浸提被氯仿熏蒸和不熏蒸的土壤, 来估算土壤微生物量磷。Brookes 等<sup>[7]</sup>改进该方法, 将浸提时间从 16h 缩短到 30min, 并免去了用阴离子交换树脂预先除掉土壤中可溶性无机磷的步骤, 并且在浸提时, 加入一定量的无机磷, 来校正土壤粘粒对微生物量磷的吸附固定, 从而提高了工作效率。He 等<sup>[8]</sup>报道: 对酸性土壤用 NH<sub>4</sub>F-HCl 浸提剂, 比用 NaHCO<sub>3</sub> 浸提剂更能有效地提取微生物生物量磷。

微生物生物量磷的测定方法还存在两个问题: ①土壤对微生物生物量磷的固定作用。Brookes 等<sup>[7]</sup>提出向未熏蒸的土壤加入一定量的无机磷酸盐, 来校正土壤对微生物生物量磷的固定, 但也有人对此提出异议<sup>[8]</sup>。②土壤可溶性无机磷对分析的干扰。Hedley & Stewart<sup>[6]</sup>曾警告: 当土壤可溶性无机磷含量高时, 必须在熏蒸处理前除掉这部分磷, 否则将干扰微生物生物量磷的测定。

北京郊区菜园土壤可溶性无机磷含量每公斤高达几百毫克<sup>[8]</sup>, 预备试验显示微生物生物量磷的分析受到严重干扰。目前所用的去除土壤无机磷的方法<sup>[6]</sup>, 不仅时间长(16 h), 而且在 24℃ 下操作, 所测定的结果并不是原始土壤的微生物生物量磷, 为此, 试图寻找一个简单的办法, 除掉土壤中的可溶性无机磷, 以避免对微生物生物量磷测定的干扰。

### 1 材料和方法

**基金项目:**国家重点基础研究发展规划资助项目(No. G1999011803)

本研究在土壤和水农业部重点实验室完成。沈方科、王克武、万敏在毕业实习期间参加了部分工作。

收稿日期: 1999-03-09; 修订日期: 1999-12-29

**作者简介:**林启美(1961~), 男, 湖北人, 博士, 教授。主要从事土壤微生物生态研究。

### 1.1 土壤

供试土壤采自北京郊区菜园地,其理化性质见表1。用土钻采集0~20cm的表层土壤,采取的湿土迅速过2mm筛,去掉植物残体和可见的土壤动物,将土壤湿度调节至50%的田间持水量。称取200g 1号土壤5份于塑料袋中,每份每克土分别均匀地加入无机磷(P)37.5、75、150、375、750 $\mu\text{g}$ ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ),与未加无机磷的土壤及2号土一起放入封闭的铁桶内,桶内盛约500ml水和200ml稀碱(1mol NaOH/L),室温下培养7d。经预培养的土壤应迅速测定,或放在5 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

表1 供试土壤性质

Table 1 Soil properties

土壤	pH	有机质	全氮	粘粒<2 $\mu\text{m}$	Olsen-P	微生物生物量碳
		Organic matter	Total N	Clay		Biomass C
			(g/kg)			(mg/kg)
1	8.6	18.2	1.35	198	8.9	275.7
2	7.5	23.6	1.95	162	460.0	210.7

### 1.2 土壤可溶性无机磷的除去方法

方法1 称取100g湿土于2L的容器中,加入pH8.5的0.5mol/L  $\text{NaHCO}_3$ 水溶液100ml,25 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡30min(180rev/min),离心5min(3000rpm),上清液用纤维质膜(Millipore孔径<0.2 $\mu\text{m}$ )过滤,并用膜过滤的去离子水洗涤3次,弃去滤液。将膜研细,并加入适量水,一起倒入土壤中,制成土壤悬浮液,总体积约200ml,摇匀备用。

方法2 称取100g湿土于2L的容器中,加入10个各装有3g阴离子交换树脂(717号,上海)的尼龙布袋,再加1000ml膜过滤的去离子水,25 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡16h(100rev/min),取出树脂,并用少量水洗涤。离心5min(3000rpm),上清液用纤维质膜(Millipore孔径<0.2 $\mu\text{m}$ )过滤,并用膜过滤的去离子水洗涤3次,弃去滤液。将膜研细,并加入适量水,一起倒入土壤中,制成土壤悬浮液,总体积约200ml,摇匀备用。

### 1.3 土壤微生物生物量磷的测定

称取相当于烘干土重10g湿土(或上述土壤悬浮液)9份,3份放入100ml烧杯中,与盛有无酒精氯仿的烧杯一起放入真空干燥器中(土壤悬浮液需加入1ml无酒精氯仿),真空干燥器底部放有湿润的纸和盛有20ml的1mol/L NaOH溶液的烧杯。用真空泵抽成真空,使氯仿沸腾,并持续2min,关闭真空干燥器的阀门,将真空干燥器放入25 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中,保持24h。取出氯仿(倒回瓶中可重复使用),再用真空泵反复抽气,直到土壤闻不到氯仿气味为止。加入pH8.5 0.5mol/L  $\text{NaHCO}_3$ 溶液(1:20土水比),振荡30min(25 $^{\circ}\text{C}$ ,200rev/min)后迅速用中速无磷滤纸过滤,滤液立即测定或放入-15 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

另3份同上加入等量pH8.5 0.5mol/L  $\text{NaHCO}_3$ 溶液,同上述方法浸提土壤中的磷。其余3份加入1.0ml 250 $\mu\text{g}$  P/ml的 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 溶液(相当于每kg土加入250mg P)和等量pH8.5 0.5mol/L  $\text{NaHCO}_3$ 溶液,用于校正土壤对微生物生物量磷的吸附固定作用。

所有浸提液中的磷都用钼锑抗比色法测定。微生物生物量磷( $B_p$ )按照下面公式计算:

$$B_p = (F - UF) / (K_p \cdot R)$$

$F$ 为熏蒸土壤 $\text{NaHCO}_3$ 所浸提的磷量(mg/kg), $UF$ 为不熏蒸土壤 $\text{NaHCO}_3$ 所浸提的磷量(mg/kg), $K_p$ 为 $\text{NaHCO}_3$ 所浸提的微生物生物量磷占总微生物生物量磷的比例,此处用0.40<sup>[9]</sup>, $R$ 为加入的无机磷的回收率(%):

$$R(\%) = ((\text{测定值} - \text{土壤可溶性无机磷}) / 25) \times 100\%$$

此处测定值是指土壤加入 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 溶液后,再用 $\text{NaHCO}_3$ 浸提所得到的磷量(mg/kg土)。土壤可溶性无机磷是指用 $\text{NaHCO}_3$ 直接浸提的磷量,也就是未熏蒸土壤所测定的磷量(mg/kg土),25为浸提前所加入的磷量(mg/kg土)。

## 2 结果与讨论

1号土壤可溶性无机磷含量较低(表1),仅8.9mg/kg土,可直接用Brookes等<sup>[3]</sup>的方法测定土壤微生物生物量磷(表2)。但在预培养时向该土壤加入无机磷酸盐时,微生物生物量磷的测定受到严重干扰。每克土加入37.5mg P时,熏蒸与不熏蒸土壤NaHCO<sub>3</sub>可浸提磷的差值为4.6,与原土壤的测定值(4.7)几乎相同。但加入的磷量超过75mg/kg土时,熏蒸与不熏蒸土壤NaHCO<sub>3</sub>可浸提磷的差值为负数,且随着磷加入量的增加,负值增大。

2号土壤可溶性无机磷含量高达459.93mg/kg,熏蒸与不熏蒸土壤NaHCO<sub>3</sub>浸提的磷量之间的差值为-34.0mg/kg。

熏蒸前去除土壤中的可溶性无机磷后(表3),1号土壤无论加入磷量高低,熏蒸与不熏蒸土壤NaHCO<sub>3</sub>浸提磷量之间的差值都为正值,用第1个方法处理的差值为4.95~5.63,第2个方法为4.26~5.27,与未经预处理的原土壤的值4.7之间没有显著性的差异( $P < 0.05$ )。

可溶性磷含量很高的2号土壤,如果熏蒸前也去除土壤中的这部分无机磷,也得到相似的结果,两种方法的熏蒸与不熏蒸土壤NaHCO<sub>3</sub>可浸提磷的差值分别为6.30和5.70,二者之间也没有显著性的差异( $P < 0.05$ )。由此可见,对于可溶性无机磷含量高的土壤,熏蒸前必须去除这部分无机磷,否则无法测定微生物生物量磷。Brookes等<sup>[13]</sup>所用的土壤可溶性无机磷最高为84.8mg/kg。没有发现其对微生物生物量磷测定的干扰。此处的结果表明,如果土壤Olsen-P超过50mg/kg,熏蒸前必须去除这部分磷。

表2 加入无机磷对微生物生物量磷测定的影响

Table 2 Interference of added inorganic P to the measurement of microbial biomass P(Bp)

土壤 Soil	磷加入量 Added P	未熏蒸 UF Unfumigated	熏蒸 F Fumigated	熏蒸-未熏蒸 UF-E	微生物生物量磷 Bp	回收率 Recovery
		(mg/kg)				(%)
1	0.0	5.30	10.00	4.70	11.75	223.6
	37.5	28.10	32.70	4.60	11.50	239.7
	75.0	59.50	58.60	-0.90		269.9
	150.0	135.40	131.80	-3.60		256.3
	375.0	334.10	311.70	-22.40		234.3
	750.0	757.70	686.50	-71.20		152.3
2	0.0	437.75	403.75	-34.00		248.2

在测定微生物生物量磷时,一般在熏蒸的同时,另取等量的3份土壤,并加入一定量的无机磷,以校正土壤粘粒对熏蒸处理所释放出来的微生物生物量磷的吸附固定效应。Brookes等<sup>[3,7]</sup>发现,加入的无机磷的回收率为70%左右,He等<sup>[8]</sup>报道,加入的无机磷的回收率随土壤pH值而变化,pH值为4.5~5.5时,回收率稳定在76%±7%,而pH<4.5时,回收率降低到20%,指出加入的磷的回收率与土壤微生物生物量磷之间没有简单的线性关系。因为微生物生物量磷和加入的无机磷被土壤吸附的特征是不一样的,所以可以不用加入的无机磷的回收率来校正微生物生物量磷。McLaughlin等<sup>[10]</sup>也指出,用回收率来校正微生物生物量磷的作用不大。Hedley & Stewart<sup>[6]</sup>也发现:没有土壤时,细菌生物量磷的回收率为46%~68%,真菌为64%~84%;有土壤时,回收率则降到37%。显然,K<sub>p</sub>值包含微生物生物量磷被土壤吸附的因素,没有必要再通过加入无机磷来校正微生物生物量磷。本文所有的测定,磷的回收率都在150%以上(表2和表3),这与Brookes等人<sup>[3,7]</sup>的结果完全不同,与其他人的结果差异也很大。供试的两种土壤为石灰性潮土,粘粒含量都低于200g/kg,有机质和全氮的含量都不高,只有pH较高,并且含有一定量的碳酸钙。粘粒和有机质不可能大幅度地提高磷的回收率,而碳酸钙的溶解导致土壤pH下降,从而引起土壤中不可溶性无机磷释放,即出现稀释效应,也不能解释这一现象。加入的无机磷不可能使土壤中不可溶性无机磷释放。到底是何原因导致磷回收率如此高,还没有合理的解释,有待进一步研究。

鉴于前人和此处的研究结果,在计算微生物生物量磷时,没有考虑磷的回收率。1号和2号土壤微生物生物量磷分别为12.42±1.022和15.00±1.061mg P/kg,微生物生物量碳与微生物生物量磷之间的比值分别为22.20和14.05,与Brookes等人<sup>[3]</sup>的结果极为接近。这说明,在计算微生物生物量磷时,可以不考

虑土壤对其吸附固定作用。

表 3 预先除去土壤可溶性磷对微生物量磷测定的影响

Table 3 Effect of pre-removal of soluble P on the measurement of microbial biomass P

土壤 Soil	磷加入量 Added P	可溶性磷除去方法 Methods for pre-removing soluble soil P									
		方法 1 Method 1					方法 2 Method 2				
		UF	F	UF-F	Bp	回收率 (%)	UF	F	UF-F	Bp	回收率 (%)
		(mg/kg)					(mg/kg)				
1	0.0	2.08	7.03	4.85	12.38	223.8	1.71	5.97	4.26	10.65	213.5
	37.5	13.70	19.09	5.39	13.48	212.8	10.30	15.10	4.80	12.00	208.7
	75.0	24.10	29.22	5.12	12.80	186.5	20.10	25.23	5.13	12.83	202.5
	150.0	41.71	47.34	5.63	14.08	198.2	35.42	40.69	5.27	13.18	224.1
	375.0	71.75	77.20	5.45	13.63	235.4	63.83	68.45	4.62	11.55	215.3
	750.0	1112.35	117.54	5.19	12.98	203.5	95.45	99.90	4.45	11.13	203.7
2	0.0	125.92	132.22	6.30	15.75	215.6	135.10	140.80	5.70	14.25	278.4

UF:未熏蒸处理,F:熏蒸处理。

### 3 结论

如果土壤 Olsen-P 含量高于 50mg/kg 土,熏蒸前必须去除这部分磷,否则微生物生物量磷的测定将受到严重的干扰。用微孔膜过滤法去除磷,比用交换树脂法要简便快速,适合大量样品分析。

### 参考文献

- [1] Cole CV, *et al.* Simulation of phosphorus cycling in semi-arid grasslands. *Ecology*, 1977, **58**:1~15.
- [2] Anderson JPE & Domsch KH. Quantities of plant nutrients in the microbial biomass of selected soils. *Soil Science*, 1980, **130**:211~216.
- [3] Brookes PC, *et al.* Phosphorus in the soil microbial biomass. *Soil Biology & Biochemistry*, 1984, **16**:169~175.
- [4] Smith JL. The significance of soil microbial biomass estimation. In: *Soil Biochemistry*, Marcel Dekker, New York, 1990. 357~396.
- [5] Birch HF. Phosphorus transformations during plant decomposition. *Plant & Soil*, 1960, **15**:247~366.
- [6] Hedley MJ & Stewart JWB. Method to measure microbial phosphate in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 1982, **14**, 377~385.
- [7] Brookes PC, *et al.* Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 1982, **14**:319~329.
- [8] He ZL, *et al.* Measurement of microbial biomass phosphorus in low pH soils. *Biology and Fertility of Soils Biochemistry*, 1997, **24**:358~363.
- [9] 林启美,等. 北京菜园土土壤微生物生物量碳、氮与土壤一些性质的关系. *中国农业大学学报(增刊)*, 1997, **2**:43~48.
- [10] McLaughlin MJ, *et al.* Measurement of phosphorus in the soil microbial biomass: A modified procedure for field soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 1986, **18**:437~443.