

# 土壤微生物生物量抽提检定法的研究

## ——土壤微生物生物-C的烘杀抽提容量法检定

王 昕 黄天素

(广东省土壤研究所, 广州 510650)

### 摘 要

本文是在前人提出的氯仿熏蒸分解法测定土壤微生物生物-C的基础上,经过对比试验研究的实践,作了适应性的修改。这种新方法可直接应用于酸性土壤微生物生物-C的测定。现暂称之为烘杀抽提容量分析法。该法较之前者更为方便,有效,而且能够大大缩短测定周期。

土壤微生物的生物量,是研究土壤生态系统中能源营养物质合成分解、累积迁移的一个重要定量依据。检定土壤微生物生物-C有各种不同的方法,其中 Jenkinson<sup>[3]</sup>首先提出的氯仿熏蒸分解法曾以其简便可靠而被广泛采用,但其检测周期很长(25—30天)且不能直接用于酸性土壤,使应用范围受到一定的限制。我所有关同志曾根据 Anderson<sup>[4]</sup>的有关报道,对前者作了适应性修改<sup>1)</sup>,用于酸性土壤微生物生物量的检测研究取得了较好的效果<sup>2)</sup>。近年国外有关学者报道的抽提检测法<sup>2),3)</sup>,有助于缩短检测周期,改善工作条件,为了使这一方法更好地运用到有关的检测和研究工作中,我们对它曾作了专门的分析研究,并进行了多方面的比较试验<sup>4)</sup>。在此基础上提出了与旁人相似但又各不相同的方法程序,暂名之为烘杀抽提容量法:即先用加热烘烤对土样进行杀菌处理,再与未经杀菌处理的试样作对照,用中性盐( $K_2SO_4$ )溶液抽提,再用重铬酸钾氧化容量法对抽提液中的有机-C进行定量,从中计算出可抽出生物-C的数量,然后根据可抽出生物-C与总生物-C量之间的数量相关关系,计算出土壤微生物生物-C的总量。

本文对其原理依据,方法程序,作出介绍,并对其测定和计算结果的精确度作出评价。

## 一、原理和依据

带菌土样经杀菌处理后,微生物细胞的生理功能消失,胞膜的渗透性显著增大,与未经杀菌土样相比,抽提时释出的有机-C也相应增多,而增加释出的有机-C,就是来自微

- 1) 邓邦权等,1988:华南酸性土壤中微生物生物量的熏杀分解法检定,广东土壤通讯,第1期,27—33页。
- 2) C.A. 帕拉托达斯,1987:土壤微生物生物量的溶提测定。吕禄成译自 Почвоведение 1987, No. 4, 64—74页。
- 3) E.D. 温斯,1987:测定土壤微生物生物-C的抽提法。邓邦权译自 Soil Biol. Biochem., Vol.19, No. 6, 703—707页。
- 4) 王昕等:土壤抽出液中有机-C 检定法及抽提处理条件的比较试验(待刊稿)。

生物体内的,即下文所说的可抽出生物-C,因其数量大小与土壤中微生物生物-C 总量成正比,根据它们间的数学关系,就可由测知的可抽出生物-C 算出其总生物-C 量。

虽然氯仿熏蒸和加热烘烤都能达到杀菌的目的,但选用加热烘杀可避免用氯仿处理时对人体可能带来的危害;也不必用前先作纯化处理的麻烦。还可以提高生物-C 的可抽出率,保证了检测的精度,抽提液中有有机-C 的检定,虽也可以用其它方法,但选用与测定土壤有机质原理操作近同的重铬酸钾氧化容量法<sup>[2]</sup>,不但测定结果较之比色法更为稳定可靠,而且,所用的仪器试剂有现成待用之便。

## 二、方法程序

1. 仪器试剂的配备 除备一台恒温烘箱及一台振荡器外,其它仪器设备均与土壤有机质测定相同,所用试剂除另配一提取液外,其它的均与土壤有机质测定近似,只是试剂浓度有所不同:

(1) 抽提液:  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ K}_2\text{SO}_4$  (c.p.)。

(2) 重铬酸钾氧化液: 用浓硫酸 2 份,浓磷酸 1 份的混合液,配成  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  浓度为  $0.00833 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的氧化液(均用 A.R 级品)。

(3) 酸性亚铁溶液: 用  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (A.R) 配成浓度为  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{FeSO}_4$  (A.R) 溶液。

(4) 重铬酸钾标准液: 用纯水配成  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (GR) 浓度为  $0.00333 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的标准溶液。用于亚铁溶液标定。

(5) 其它: 邻菲罗啉指示剂,  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  催化防护剂与土壤有机质测定中要求相同。

2. 土样及其杀菌抽提处理 供试土壤一般取通过 2 毫米的鲜土样(或过筛后装塑料袋封存暂置冰箱备用)。

先称取待测样 25 克(干重计)置于抽提瓶(150 毫升三角瓶)中记下连瓶重,将其置入  $67^\circ\text{C} \pm 1.5^\circ\text{C}$  的恒温烘箱中 24 小时进行杀菌处理,取出冷却后于天平上加水补至原来总重,然后称同量土样于抽提瓶中,不作加温杀菌处理。两者均加入 4 倍(如生物量太小,可取 2 倍)于土重的  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ K}_2\text{SO}_4$  溶液加塞置入振荡机中,振荡抽提 30 分钟,取出过滤,取清液再按下述方法测定抽提液中的有机-C 浓度(每个试样作 2-3 个重复)。

3. 抽出液中有有机-C 含量的测定 每一抽提液吸取 8 毫升注入消化管中,加 16 毫升重铬酸钾氧化液,再加 5-7 毫克  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  粉末,同时以 8 毫升蒸馏水代替抽提液作试样空白对照。置油锅中沸浴消化 5 分钟( $160^\circ\text{C}$ - $180^\circ\text{C}$ )取出冷却后转入三角瓶中加邻菲罗啉指示剂数滴,以酸性  $\text{FeSO}_4$  溶液滴定至终点。每一滤液要有 2-3 个重复,颜色变化和滴定量要求与有机质测定相同。每批(次)滴定所用  $\text{FeSO}_4$  的准确浓度都应以标准  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  溶液标定之。

4. 土壤可提取有机-C 及抽出生物-C 的计算 按上述操作程序所测得的不同处理的试样中可抽提有机-C (Eo.c) 按下式计算

$$\text{Eo.c}(\text{mg} \cdot 100\text{g} \pm^{-1}) = \frac{(V_0 - V) \times M \times 6 \times 1.10}{W} \times 100$$

式中  $V_0$  及  $V$  分别为试剂空白及待测液滴定消耗的  $\text{FeSO}_4$  溶液毫升数;  $M$  为新标定的  $\text{FeSO}_4$  准确浓度  $\text{mol L}^{-1}$ ;  $6$  是每毫摩尔  $\text{FeSO}_4$  相当于  $C$  的毫克数;  $1.10$  是氧化校正系数;  $W$  是用于测定滤液相当于干土重量(克)。

虽然试样量按干重称取, 并以 4 倍于它的提取液来抽提, 但由于试样量含有一定水分, 实际土液比已不是理论上的 1:4, 而是 1:(4+试样水分), 所以当试样含水为  $x\%$  时,  $y$  毫升抽出液相当的干土重 ( $W$ ) 应按下式计算:

$$W \text{ 克} = \frac{\text{试样干重}}{\text{试样干重} \left( 4 + \frac{x}{100} \right)}$$

土壤可抽出生物-C ( $E_{B.C}$ ) 亦即杀菌处理后试样增加释出的可提取有机-C ( $E_{O.C}$ ) 则下式求得:

$$E_{B.C} (\text{mg} \cdot 100\text{g土}^{-1}) = \text{杀菌样 } E_{O.C} - \text{未杀菌样 } E_{O.C}$$

### 三、可提取有机-C 精确度的检验

为检验上述方法测定有机-C 的精密度, 我们按有关方法<sup>1)</sup>选取含有机-C 高低不同试样作了多次重复测定计算其标准差以确定其精确度。另外用加入不同量标准物 (选用葡萄糖) 的办法进行回收测定, 计算其回收率以确定准确度。

#### (一) 测定的精密度

不同试样重复测定结果及其统计数见表 1, 从中可以看出, 此法测有机-C 含量  $0.06$ — $0.143 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g土}^{-1}$  范围内标准差在  $0.0023$ — $0.0031$  毫克之间, 相对差因含量不同而异。含量  $>0.1$  毫克一般在  $3\%$  以内, 含量过小可达  $5\%$ 。实际应用重复间的差异可以此作为精度要求。

#### (二) 测定的准确度

不同试样回收测定结果见表 2, 它表明测得值与理论值近于一致, 绝对差在  $0.001$ — $0.005$  毫克之间, 相对误差均在  $2\%$  以内。

以上结果表明按我们拟定的检测程序, 可溶性有机-C 测定灵敏度为  $2$ — $3$  微克, 含量达  $0.1 \text{ mg} \cdot 100\text{g土}^{-1}$  以上土样, 测定值与实际值误差均在  $2$ — $3\%$  以内。这完全可满足土壤微生物生物量测定的要求。

表 1 不同土壤可抽出有机质-C 重复测定结果及其统计值

Table 1 The measured values and their statistics of extractable organic C from different soil samples

试样 Sample	可抽出有机-C 的重复测定值 Measured values of extractable organic C (mg/100g soil)						平均值 Average ( $\bar{X}$ )	标准误差 Standard error ( $S$ )	变异系数 Variability (%)
I	0.143	0.146	0.143	0.140	0.140	0.143	0.1425	0.0023	1.58
II	0.105	0.105	0.111	0.111	0.111	0.111	0.1090	0.0031	2.84
III	0.057	0.062	0.057	0.057	0.057	0.062	0.0595	0.0027	4.62

1) 王昕: 1981 误差理论在土壤测试分析中的应用, 广东土壤学会年会论文。

表 2 不同试样有机-C 回收试验结果

Table 2 The results of recovery experiment of organic C from different soil samples

试 样 Sample	原存在有机-C Original organic C (mg/100g soil)	加入葡萄糖-C Added glucose C (mg/100g soil)	计得理论值 Theoretical value (mg/100g soil)	实际测得值 Measured value (mg/100g soil)	回收率 Rate of recovery(%)
1	0.143	0.292	0.435	0.432	99.3
2	0.129	0.292	0.421	0.424	100.7
3	0.090	0.292	0.382	0.387	100.3
4	0.071	0.292	0.363	0.362	99.3

#### 四、土壤微生物总生物-C 量的计算

为了查明规定条件下土壤可抽出生物-C 与总生物-C 之间的数量关系, 提供计算依据, 我们在测定一系列试样可抽出生物-C 的同时, 还用修改过的熏杀分解法测出它们各自相应的总生物-C 量。根据所得结果, 计算了各试样可抽出生物-C 与总生物-C 的比率及它们的平均值, 并进一步对它们作出相关回归分析, 建立相关回归方程<sup>1)</sup>。

在上述的规定条件下检出的可抽出生物-C 平均占总生物-C 的 73.9%  $\approx$  74%。据此, 土壤总生物-C (B.C) 可由测得的可抽出生物-C ( $E_{B.C}$ ) 按下式计算出

$$B.C = E_{B.C} / 0.74 \quad (I)$$

相关分析结果表明, 土壤可抽出生物-C ( $E_{B.C}$ ) 与总生物-C 呈正相关, 相关系数  $r = 0.9913$  达到极显著水平, 所得的相关方程为:

$$B.C = 1.4E_{B.C} - 0.56 \quad (II)$$

虽然应用方程 (I) 和应用方程 (II) 由可抽出生物-C 计得的土壤总生物-C 数值近似, 它们间的差异, 一般都不超过熏杀分解法检定允许的误差范围 (4.0—9.6%)<sup>2)</sup>。但从理论上说用方程 (II) 似乎较为切实合理, 实际上两者均可作为由测得可抽出生物-C 计算土壤微生物总生物-C 的依据。

应当指出, 以上计算方程, 只限于本地区酸性土壤上应用。其它地区中性土壤应用本法时, 还要另外建立相应的数学方程, 作为计算总生物-C 量的依据。

#### 参 考 文 献

- [1] 邓邦权、吕禄成, 1990: 鼎湖山自然保护区不同林被土壤微生物的生物量与生物营养物质的库贮量。热带亚热带森林生态系统研究, 第 7 集, 第 113—118 页。
- [2] 中国科学院南京土壤研究所, 1981: 土壤理化分析。132—136 页, 上海科技出版社。
- [3] Jenkinson D. S. et al., 1976: The effects of biocidal treatment on metabolism in soil V. A method for measuring soil biomass. Soil biol. biochem., Vol.8, 209—213.
- [4] Anderson J. P. E et al., 1978: Mineralization of bacteria and fungi in chloroform-fumigated soil. Soil biol. biochem., Vol.10, 209—213.

1) 王昕等: 土壤微生物总生物-C 与可抽生物-C 的数量关系(待刊稿)。

2) 王昕等: 土壤微生物总生物-C 与可抽生物-C 的数量关系(待刊稿)。

## A STUDY ON EXTRACTION METHOD FOR MEASURING SOIL BIOMASS C

Wang Xin and Huang Tiansu

(Institute of Soil Science, Guangdong Province, Guangzhou 510650)

### Summary

According to the experiment conducted by combining the extraction method reported in recent years for measuring soil microbial biomass C with the practices of chloroform-fumigation method used in our works, a new method by the way of heat-sterilization, salt-extraction and volumetric analysis for measuring Microbial biomass C in acid soil is suggested. This method is more convenient and efficient, and the measuring period can be greatly shortened as compared with the chloroform fumigation method.

### · 新书出版消息 ·

#### 《中国土壤系统分类(首次方案)》一书出版

《中国土壤系统分类(首次方案)》是在总结国内外土壤分类经验基础上提出的,以诊断层和诊断特性为基础的定量土壤分类。本书首先从我国土壤分类实际需要出发,设立了一套具有我国特色的诊断层和诊断特性;其次在继承和发展我国已有土壤分类的前提下,拟定了高级土壤分类级别系统,提出了各级分类和命名原则;最后建立了我国土壤高级分类级别的检索系统,并可借电子计算机,进行检索。全书近 10 万字。

本书可供土壤、农、林、地理、环境和生态工作者参考。

本书由中国科学院南京土壤研究所土壤系统分类课题组、中国土壤系统分类课题研究协作组,经过六年共同努力,由龚子同等执笔写成的。1991 年 4 月已由科学出版社出版,新华书店北京发行所发行,各地新华书店经售,每本 5.1 元。