

# 旱地土壤微生物磷测定方法研究\*

吴金水 肖和艾 陈桂秋 黄敏

(中国科学院亚热带区域农业研究所, 长沙 410125)

**摘要** 介绍了国外关于土壤微生物磷测定方法的研究进展, 讨论了常用的几种方法所存在的问题, 介绍了主要操作过程要求。对我国 5 种主要母质类型的土壤 (pH 3.3~7.4,  $1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ ) 的对比研究表明, 我国土壤采用氯仿熏蒸、 $0.5 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$  在 1:20 土水比提取测定无机磷 ( $P_i$ )、并以同时测得的培养土壤微生物的磷的回收率作为计算常数得到的结果最佳。测定的大多数南方土壤的微生物磷占土壤全磷的比例小于 1.5%, 微生物碳磷比值大于 30, 反映南方土壤磷的生物活性较低, 土壤微生物对磷的作物供应调节能力不强。

**关键词** 土壤微生物磷, 测定方法

**中图分类号** S154.36

土壤微生物不仅控制土壤有机质和主要养分 (如 N、P、S) 的循环过程, 而且其本身就是一个重要的活性养分库, 对维持作物的养分供应起重要作用<sup>[1-3](1)</sup>。土壤微生物对施入土壤肥料养分的转化及其有效性的影响也值得深入研究。土壤微生物生物量及养分含量测定对于了解土壤微生物生物量、土壤养分转化动力学及作物供应能力等方面的功能都有重要意义。

测定土壤微生物磷的基本方法是由 Brookes 等<sup>[4]</sup>及 Hedley 等<sup>[5]</sup>分别建立的。Brookes 等<sup>[4]</sup>采用氯仿蒸汽熏蒸 24 小时, Olsen 提取剂 ( $0.5 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ , pH 8.5) 在 1:20 土水比提取 30 分钟, 测定熏蒸后提取无机磷 ( $P_i$ ) 的增量。他们假定土壤微生物磷的熏蒸释放率为 40%, 熏蒸释放后微生物磷的土壤固定率与无机磷 (外加正磷酸盐态磷) 一致。该方法的主要问题是这些假设是否符合实际 (McLaughlin 等<sup>[6]</sup>, Wu 等<sup>[7]</sup>)。

Hedley 等<sup>[5]</sup>采用液态氯仿直接加入土壤的方法熏蒸 (30 分钟), 用 Olsen 提取剂在 1:60 土水比提取 16 小时, 测定熏蒸后提取全磷 ( $P_t$ ) 增量。他们发现在无土壤的情况下, 培养微生物磷的熏蒸释放率远远高于 40%, 加入土壤的提取率也与外加无机磷没有相关性。尽管 Hedley 等<sup>[5]</sup>建议采用了 0.4 作为熏蒸提取的全磷增量与土壤 (pH 6.2~8.2) 微生物磷的转换系数 ( $K_p$ ), 同时指出需要对微生物磷在不同土壤的回收率进行测定。Hedley 等<sup>[5]</sup>的方法也存在几个实际问题。第一, 采用风干后培养的土样, 势必改变微生物原有状态。第二, 提取时间过长, 对磷固定能力强的土壤可能会因熏蒸释放的微生物磷的转化 (成无机态) 和吸附增加而影响提取效率。第三, 采用 1:60 的土水比限制了测定土壤的样品用量 (0.5 g), 这对于新鲜土壤来说其代表性是不够的 (过 2 mm 筛至少要在 2 g 以上)。第四, 全磷测定不仅消化过程繁琐, 而且稀释比例进一步扩大 (3~5 倍), 从而加大分析误差。这些问题使该方法在磷固定能力强和微生物磷很低的土壤因熏蒸增量太小和测定误差相对较大而不能使用 (Wu 等<sup>[7]</sup>)。

McLaughlin 等<sup>[6]</sup>认为采用 Olsen 提取剂在 1:20 土水比提取和测定提取液全磷较好。他们用土壤悬浮液接种培养的细菌和真菌加入到土壤中测定  $K_p$  值, 发现 3 种土壤 (pH 6.0~8.5,  $\text{H}_2\text{O}$ ) 的  $K_p$  值差异很大 (0.33, 0.4 和 0.57), 因此提出应对每种土壤的  $K_p$  值进行测定。

Oberson 等<sup>[8]</sup>的研究表明 Olsen 提取剂对水溶态磷含量低而磷吸附能力强的热带酸性土壤微生物磷

\* 国家杰出青年科学基金 (49925102)、国家自然科学基金 (49871047) 和国家重点基础研究发展规划项目 (G1999011802) 资助

收稿日期: 2001-10-16; 收到修改稿日期: 2002-02-04

(1) Wu J. The turnover of organic C in soil. Ph. D., University of Reading, 1990

的提取性能极不稳定, 建议采用 Bray-1 提取剂(  $0.03 \text{ mol L}^{-1} \text{ NH}_4\text{F} - 0.025 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$  )。Potter 等<sup>[9]</sup>也得到了类似的结果。Wu 等<sup>[7]</sup>研究表明在酸性(  $\text{pH} 3.6 \sim 5.9$ , KCl) 和有机质含量高的土壤 Olsen 提取剂不能获得可靠的土壤微生物磷测定结果, 应当采用 Bray-1 提取剂在 1:4 水土比提取, 测定无机磷(  $P_i$  )的方法。该研究表明加入土壤的培养土壤细菌和真菌磷的熏蒸-提取回收率与外加无机磷的回收率无显著相关性, 否定用外加无机磷的回收率估计微生物磷的回收率。他们认为尽管  $K_p$  值为 0.4 计算得到的土壤微生物磷量(即 Brookes<sup>[4]</sup> 方法) 可作为一粗略的估计, 但精确地估计土壤微生物磷量要求对土壤  $K_p$  值进行测定。

综上所述, 目前还没有测定土壤微生物磷统一方法。两种主要方法(即 Brookes 等<sup>[4]</sup>, Hedley 等<sup>[5]</sup>) 各存在不同的问题, 特别是对酸性土壤应当采用那种方法必须进行对比研究才能确定。为了开展我国土壤的微生物磷和磷在土壤中的微生物转化、土壤磷活化、提高土壤磷有效性和肥料磷的作物利用率的研究, 必须建立适合我国土壤类型的微生物磷测定方法。

## 1 材料与与方法

### 1.1 土壤

方法研究主要采用选自广西、湖南、湖北、河北和陕西 5 省的 12 种旱作土壤, 其母质类型、利用和管理状况和主要性质列于表 1。外加无机磷和培养微生物磷回收率研究和方法检验还增加了 33 种土壤。这些土壤基本代表了该区域的主要土壤类型及其旱作种植管理方式、肥力水平和理化状况。各土壤样品采于 0~20 cm 表层, 多点(5~6 个) 取样混合均匀, 取约 1 kg 保存新鲜状态。

表 1 土壤来源、类型和利用管理状况与主要性状

Table 1 Sources and characteristics of the soils

土号 Soil No.	地点 Site	土壤类型 Soil type	作物 Crops	施肥 <sup>1)</sup> Fertilizers <sup>1)</sup>	pH (KCl)	pH (H <sub>2</sub> O)	有机碳 O. C. (%)	全磷 Total-P (mg kg <sup>-1</sup> )	微生物碳 Bio-C (mg kg <sup>-1</sup> )
1	广西环江	第四纪红壤	柑橘+ 大豆	不施肥	3.3	3.8	1.4	240	273
2	湖南桃源	第四纪红壤	油菜/ 花生	NPK	3.6	4.5	0.7	400	242
3	湖南湘乡	花岗岩红壤	红薯	NPK+ M	4.0	5.3	0.7	260	247
4	湖南衡市	冲积土	柑橘	农家肥	4.1	5.2	1.0	710	296
5	湖南长沙	紫色土	玉米	NP	4.2	5.6	0.6	400	211
6	广西环江	冲积土	玉米	NPK	4.6	5.6	0.4	260	150
7	湖南衡市	冲积土	棉花	NPK+ M	5.0	5.6	0.9	710	223
8	湖北武昌	冲积土	玉米	NPK	5.5	7.0	1.7	950	249
9	湖北监利	冲积土	芝麻	不施肥	6.8	7.8	1.0	870	290
10	湖南长沙	紫色土	花生/ 蔬菜	NP	7.0	8.1	0.8	840	258
11	陕西杨陵	土	小麦/ 玉米	NPK	7.3	8.0	0.8	770	241
12	河北曲州	潮土	小麦/ 玉米	NPK	7.4	7.8	1.1	960	231

1) 氮磷钾和有机肥的施用量为当地通常水平(N, P, K and farmyard manure are applied at local rates)

### 1.2 样品前处理

新鲜土壤应立即处理或保存在 4℃ 冰箱中, 测定前仔细除去土样中可见植物残体(如茎、叶和根)及土壤动物(蚯蚓等), 过筛(孔径 2 mm), 彻底混匀。处理过程应尽量避免破坏土壤结构, 含水量过高应在室内适当风干, 以手感湿润疏松但不结块为宜(大约为 40% 的饱和持水量)。土壤湿度不够可以用蒸馏水调节至饱和持水量的 40%。此样品即可用于土壤实时测定。开展其他研究(如培养实验) 可将土壤

置于密封的大塑料桶内培养 7~15 天,桶内应有适量水以保持湿度,内放一小杯  $1 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH 溶液吸收土壤呼吸产生的  $\text{CO}_2$ ,培养温度为  $25^\circ\text{C}$ 。经过前培养的土壤应立即分析。如果需要保留,应放置于  $4^\circ\text{C}$  的恒温箱中,下次使用前需要在上述条件下至少培养 24 小时。这些过程为消除土壤水分限制对微生物的影响,及植物残体组织对测定的干扰。

### 1.3 土壤细菌和真菌培养及混合悬浮液制备

土壤细菌和真菌的培养按 McLaughlin 等<sup>[6]</sup>和 Wu 等<sup>[7]</sup>的方法加以改进。细菌培养液( $\text{g L}^{-1}$ ): 牛肉膏 10、蛋白胨 3、NaCl 5,采用自来水配制(保证微量元素的自然供应状态)。每个 1L 三角瓶装入培养液 300 ml,在  $1.1 \text{ kg cm}^{-2}$  压力下灭菌 0.5 小时,冷却后接种  $10^{-4}$  土壤悬浮液 0.5 ml,在  $25^\circ\text{C}$  黑暗条件下,静置培养 5 天。收获细菌采用离心方法( $15 \text{ min}$ ,  $2500 \text{ r min}^{-1}$ );再用 0.85% NaCl (W/V) 溶液重复洗涤 6 次。真菌培养液 ( $\text{mg L}^{-1}$ ):  $\text{NaNO}_3$  660,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  330,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  165,  $\text{FeSO}_4$  6.6、酵母膏 165 和蔗糖 10 000。每个 1L 三角瓶装入培养液 300 ml,灭菌后加入链霉素硫酸盐 30 mg 和四环素氢氯化物 1.5 mg,接种  $10^{-1}$  土壤悬浮液 0.5 ml,置于摇床上( $150 \text{ r min}^{-1}$ ) 在  $25^\circ\text{C}$  下培养 5 天。采用三层慢速滤纸真空过滤收集真菌菌丝,用 0.85% NaCl 溶液洗涤 6 次。洗涤过的细菌和真菌分别加入适量 0.85% NaCl 溶液制成悬浮液,置于  $4^\circ\text{C}$  冰箱中保存( $< 3 \text{ 天}$ )。使用前真菌用打浆机适当打散。将细菌和真菌悬浮液按 4/6 (W/W, 干物重) 比例制成混合悬浮液,使其基本接近土壤中细菌和真菌比例。测定细菌与真菌混合悬浮液全磷含量,使混合液含磷量在  $0.250 \text{ mg ml}^{-1}$  左右。培养的细菌和真菌及其混合液的主要特性如表 2。

表 2 培养细菌、真菌及细菌和真菌混合悬浮液(4/6 W/W)的主成分

Table 2 Main constituent of the cultured bacterial and fungal biomass and their mixture

微生物悬浮液 Microbial suspension	干物重 Dry matter ( $\text{mg ml}^{-1}$ )	C ( $\text{mg ml}^{-1}$ )	P ( $\text{mg ml}^{-1}$ )	C / P
细菌	30.8	9.73	0.289	34:1
真菌	28.8	8.82	0.173	51:1
混合悬浮液	29.6	9.17	0.231	40:1

### 1.4 氯仿纯化

分析纯氯仿通常含有乙醇稳定剂,使用前应除去乙醇。采用 Williams 等<sup>[10]</sup>的方法。在通风橱中将氯仿和蒸馏水按 1/2 (V/V) 加入分液漏斗中,充分摇动 1 分钟,慢慢放出底层氯仿于烧杯中。如此洗涤 3 次。得到的纯氯仿加无水氯化钙除去氯仿中的水分,于试剂瓶中在低温( $4^\circ\text{C}$ ) 黑暗状态保存。

### 1.5 土壤熏蒸和提取

经前处理的土壤称取 4.0 g 或 20.0 g (烘干基重) 土样各 6 份,分别放入 25 ml 烧杯中,然后一起置于底部有少量水(约 200 ml) 和氯仿(25 ml) 的真空干燥器中,并放入盛有 25 ml 去乙醇氯仿和经浓硫酸处理的瓷片(0.5 cm 大小,防爆)的烧杯 1~3 个,在  $-0.07 \text{ MPa}$  真空度下使氯仿剧烈沸腾 3~5 分钟,在  $25^\circ\text{C}$  下熏蒸 24 小时。然后将土样转入干净的真空干燥器内,反复抽真空 3 次,彻底除去土壤中氯仿。取出土样转入 100 ml 聚乙烯瓶中,加入 80 ml  $\text{NaHCO}_3$  提取剂( $0.5 \text{ mol L}^{-1}$ , 用  $1 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH 调至 pH 8.5) 或  $\text{NH}_4\text{F-HCl}$  提取剂(浓度分别为  $0.03 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $0.025 \text{ mol L}^{-1}$ ),震荡提取 30 分钟( $300 \text{ r min}^{-1}$ ),用慢性定量滤纸过滤。如果滤液浑浊,亦可采用双层滤纸过滤或离心( $3500 \text{ r min}^{-1}$ ) 8 分钟。在熏蒸同时,另称取 6 份 4.0 g 或 20.0 g 土样于 100 ml 聚乙烯瓶(不熏蒸)直接提取。提取液无机磷的测定应在当天及时进行,最多不能超过 12 小时,全磷测定应在 1~2 天内进行(提取液在  $4^\circ\text{C}$  保存),否则将影响测定结果。

### 1.6 外加无机磷和微生物磷回收率测定

测定无机磷的回收率参照 Brookes 等<sup>[4]</sup>方法。称取 6 份 4.0 g 或 20.0 g 土样,用上述 2 种提取剂提取,提取时加入  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  态 P  $25 \text{ mg kg}^{-1}$  (1:20 土水比) 或  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  (1:4 土水比)。分析提取液中无机磷含量。

在确定了提取剂及水土比之后, 称取 6 份 4.0 g 土样, 其中 3 份加 0.4 ml 细菌和真菌混合悬浮液(含 P 量为  $25 \text{ mg kg}^{-1}$  左右), 用小玻棒混匀, 另 3 份不加微生物, 同时按上述方法熏蒸和  $\text{NaHCO}_3$  提取剂提取。分析提取液中无机磷含量。

### 1.7 提取液中无机磷( $P_i$ )测定

钼锑抗显色方法测定, 试剂和操作步骤参见 Murphy 等<sup>[11]</sup>。1~5 ml(根据含磷量确定)提取液于 25 ml 容量瓶中。 $\text{NaHCO}_3$  提取液用与其等当量的  $1 \text{ mol L}^{-1} \text{HCl}$  中和, 放置 4 小时并不断摇动以排除  $\text{CO}_2$ 。 $\text{NH}_4\text{F-HCl}$  提取液不经过这一过程。容量瓶中加入蒸馏水至约 20 ml, 再分别加混合显色试剂 4 ml, 定容,  $25^\circ\text{C}$  下显色 30 分钟后比色(UV8500-II 型分光光度计)。

### 1.8 提取液中全磷( $P_t$ )测定

消化过程按 Brookes 等<sup>[4]</sup>方法加以改进。吸取 15 ml 提取液于 75 ml 消化管中。 $\text{NaHCO}_3$  提取液在消化前慢慢加入 1 ml 33% 硫酸后放置 4 小时, 摇动排除  $\text{CO}_2$ 。 $\text{NH}_4\text{F-HCl}$  提取液消化前加入 0.4 ml 33% 硫酸即可。为防止消化过程磷的损失, 样品中均加入 1.0 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$  和 0.5 ml 饱和  $\text{MgCl}_2$  溶液, 并加入少量经浓硫酸处理过的石英砂防爆。然后加入 0.2 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  在  $110\sim 115^\circ\text{C}$  甘油浴中消化 30 分钟。如果消化不完全, 根据颜色深度再加入 1~3 滴  $\text{H}_2\text{O}_2$  继续消化 30 分钟。再加入 0.5 ml  $\text{HClO}_4$ (70%, V/V) 消化 1 小时; 然后加入 6 ml  $1 \text{ mol L}^{-1} \text{HCl}$  消煮 0.5~1 小时, 将消化液浓缩到 2~3 ml, 使  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{HClO}_4$  彻底分解。最后加入 20 ml 蒸馏水煮沸使沉淀彻底溶解, 冷却后用蒸馏水定容到 75 ml。磷的测定按上述方法进行。提取液中有机磷( $P_o$ )量以  $P_t$  和  $P_i$  的差值计算。

### 1.9 土壤性质分析

土壤 pH 采用  $1 \text{ mol L}^{-1} \text{KCl}$  溶液或蒸馏水(水土比 1:2.5, W/V)浸提 15 分钟, 用 Mettler-toledo 320 pH 计测定。土壤有机碳测定采用重铬酸钾氧化法, 全磷采用碳酸钠熔融法, 操作方法按中国科学院南京土壤研究所编<sup>[12]</sup>《土壤理化分析》。土壤微生物碳测定采用熏蒸提取-Phoenix8000 碳自动分析仪法(Wu 等<sup>[13]</sup>)。

### 1.10 计算与统计

外加微生物磷的回收率( $R_{\text{Pmb}}$ )和无机磷的回收率( $R_{\text{Pi}}$ )为加入微生物或无机磷的土样提取  $P_i$  量分别与未加的土样提取  $P_i$  量之差占加入量的百分比。

用  $P_i$  增量和无机磷的回收率估计土壤生物磷:  $B_p = E_{\text{Pi}} / (R_{\text{Pi}} \cdot K_p)$  (Brookes 等<sup>[4]</sup>)。

用  $P_t$  增量估计土壤生物磷:  $B_p = E_{\text{Pt}} / K_p$  (Hedley 等<sup>[5]</sup>)。

用  $P_i$  增量和外加微生物磷的回收率估计土壤生物磷:  $B_p = E_{\text{Pi}} / R_{\text{Pmb}}$ 。

上式中  $B_p$  为土壤微生物磷量,  $E_{\text{Pi}}$  和  $E_{\text{Pt}}$  分别为熏蒸土壤提取的  $P_i$  和  $P_t$  增量;  $K_p$  为转换系数, 取值 0.4。

数据为三次重复平均数, 采用 Excel 和 SAS-Anova 进行统计分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 土壤熏蒸提取的磷增量比较

据表 3, 12 种土壤熏蒸后用 Olsen 提取剂( $0.5 \text{ mol L}^{-1} \text{NaHCO}_3$ , pH8.5)在 1:4 和 1:20 土水比提取都能获得显著全磷( $P_t$ )和无机磷( $P_i$ )增量(熏蒸土壤与不熏蒸提取的  $P_t$  和  $P_i$  之差), 且大部分数值达到统计极显著水平( $p > 99\%$ )。在全部土壤中, 两种土水比提取的  $P_i$  增量分别相当于  $P_t$  增量的 60%~96% (1:4) 和 61%~127% (1:20), 平均为 79.3% 和 87.4%。这些结果与 Brookes 等<sup>[4]</sup>在英国土壤得到的结果十分吻合。此外, 大多数土壤在两种土水比提取的有机磷( $P_o$ )增量不显著。即使有些土壤的  $P_o$  增量达到统计显著水平, 其数量也很小( $< 1.0 \text{ mg kg}^{-1}$ ), 只有 1 和 8 号土壤在 1:20 土水比提取的  $P_o$  增量相对较大( $1.3$  和  $2.7 \text{ mg kg}^{-1}$ )。这说明  $P_i$  增量与  $P_t$  增量在多数土壤没有显著差异。这些结果支持了 Brookes 等<sup>[4]</sup>提出的用  $P_i$  增量作为估计土壤微生物磷量的观点。由于  $P_t$  测定的消化过程繁琐, 且分析误差普遍大于  $P_i$  的分析误差(表 3), 因而建议在采用  $P_i$  增量估计这些土壤的微生物磷量。表 3 中数据还表明在 1:20 土水比提取的  $P_i$  增量普遍大于在 1:4 土水比提取的  $P_i$  增量, 前者更大地反映了土壤之间的差别。

表3 氯仿熏蒸, Olsen 和 Bray-1 提取剂在 I 4 和 I 20(W/V) 土水比提取磷增量(mg kg<sup>-1</sup>)

Table 3 Increases in P following chloroform fumigation and extraction in Olsen and Bray-1 extractants at soil solution ratios of I 4 and I 20(W/V)

土壤号 Soil No.		Olsen 提取剂		Bray-1 提取剂	
		I 4	I 20	I 4	I 20
1	$P_t$	1.2±0.3**	3.3±0.5**	0.6±0.1**	1.9±0.6**
	$P_1$	0.9±0.4**	2.0±0.5**	0.4±0.1**	1.4±0.8*
	$P_o$	0.3±0.2	1.3±0.5**	0.2±0.1**	0.4±0.5
2	$P_t$	1.3±0.7*	2.1±0.8*	0.5±0.03**	2.2±0.7**
	$P_1$	0.8±0.1**	1.4±0.6*	0.5±0.1**	2.2±0.9*
	$P_o$	0.5±0.6	0.6±0.4	0.0±0.1	0.0±0.6
3	$P_t$	1.0±0.4*	2.0±0.2**	1.4±0.5**	2.4±0.7*
	$P_1$	0.8±0.03**	1.6±0.2**	1.5±0.1**	2.5±0.4**
	$P_o$	0.1±0.4	0.5±0.3	-0.1±0.4	0.0±0.6
4	$P_t$	3.3±0.6**	5.8±0.7**	4.3±0.6**	3.7±1.7*
	$P_1$	2.4±0.5**	5.3±0.7**	4.3±0.5**	3.3±0.7**
	$P_o$	0.9±0.4*	0.5±1.0	0.0±0.5	0.5±1.3
5	$P_t$	2.4±0.7**	2.2±0.4**	4.0±0.3**	4.2±1.8*
	$P_1$	2.3±0.2**	2.8±0.8**	4.2±0.2**	5.0±1.6**
	$P_o$	0.1±0.5	-0.6±0.6	-0.3±0.4	-0.7±1.5
6	$P_t$	1.0±0.2**	1.2±0.3**	0.4±0.1**	2.0±0.7**
	$P_1$	0.6±0.6**	1.0±0.2**	0.4±0.04**	2.1±0.8*
	$P_o$	0.5±0.2**	0.2±0.1	0.0±0.03	-0.1±0.2
7	$P_t$	3.0±0.7**	4.8±1.6**	3.9±0.2**	3.2±0.9**
	$P_1$	2.4±0.1**	4.3±1.0**	3.9±0.3**	3.1±1.1**
	$P_o$	0.6±0.7	0.4±0.8	0.0±0.2	0.2±0.5
8	$P_t$	2.7±0.1**	9.1±0.6**	0.4±0.1**	1.7±0.4**
	$P_1$	1.9±0.1**	6.4±0.6**	0.3±0.02**	1.9±0.2**
	$P_o$	0.8±0.2**	2.7±0.8**	0.1±0.1	-0.2±0.2
9	$P_t$	4.2±0.2**	5.3±0.8**	3.3±0.1**	4.6±1.4**
	$P_1$	4.0±0.2**	5.0±0.5**	3.4±0.1**	4.7±0.9**
	$P_o$	0.2±0.1	0.3±0.8	-0.1±0.1	-0.1±0.5
10	$P_t$	2.5±0.4**	2.6±0.7**	0.7±2.8	3.8±2.4
	$P_1$	1.9±0.1**	2.1±0.6**	0.7±3.9	3.3±2.3
	$P_o$	0.6±0.3	0.5±0.2*	0.0±0.4	0.4±1.4
11	$P_t$	3.0±0.3**	4.1±0.9**	0.4±0.2**	-0.3±0.1
	$P_1$	2.8±0.2**	4.5±0.6**	0.5±0.1**	0.0±0.06
	$P_o$	0.2±0.1	-0.4±0.4	-0.1±0.1	-0.3±0.1
12	$P_t$	3.4±0.6**	5.9±1.9**	3.1±0.4**	-4.3±5.4
	$P_1$	3.2±0.7**	5.6±2.1**	2.8±0.3**	-4.3±5.6
	$P_o$	0.3±0.2	0.2±0.9	0.3±0.2	-0.2±0.4

注: 表中\* 表示统计显著 ( $p < 0.05$ ), \*\* 表示统计极显著 ( $p < 0.01$ )。Symbols \* and \*\* in parentheses represent statistical significance at 5% and 1% ( $t$ -tests), respectively

需进一步指出的是,即使是在较高的土水比(1:20)提取,所采用的大部分土壤熏蒸提取的  $P_i$  增量在  $1\sim 5\text{ mg kg}^{-1}$  之间。如果采用 Hedley 等<sup>[5]</sup>的土水比(1:60)提取,反映在提取液中的  $P_i$  增量仅有  $0.017\sim 0.83\text{ mg L}^{-1}$ , 很不利于精确测定,如经消化分析误差的影响会更大。因此, Hedley 等<sup>[5]</sup>的方法不适合这些土壤。这与 Wu 等<sup>[7]</sup>对英国土壤的研究结论一致。

当用 Bray-1 提取剂( $0.03\text{ mol L}^{-1}\text{ NH}_4\text{F}+0.025\text{ mol L}^{-1}\text{ HCl}$ )在 1:4 土水比提取,  $P_i$  和  $P_o$  增量的统计显著性也很好(全为极显著),说明提取重现性好(表 3)。但有一半的土壤(1、2、6、8、10、11)其数量很低( $0.3\sim 0.6\text{ mg kg}^{-1}$ ),不能反映土壤微生物磷的实际状况。在 1:20 土水比提取时,  $P_i$  和  $P_o$  增量在大部分土壤有大幅度增加,但测定误差也随之大幅度提高,并且在 pH(KCl) 7.0~7.4 的土壤  $P_i$  和  $P_o$  增量未达到统计显著水平甚至为负值。此外,用 Bray-1 提取剂在两种土水比提取获得的  $P_i$  和  $P_o$  增量数值普遍小于 Olsen 提取剂的数值(表 3)。由此可见,在现有的测定土壤微生物磷的方法中,以 Brookes 等<sup>[4]</sup>提出的 Olsen 提取剂在 1:20 土水比提取获得的结果对我国土壤最适合。

## 2.2 土壤无机磷和微生物磷的回收率

确定土壤微生物磷的熏蒸释放率和土壤固定率的合理估计方法对于精确地估计土壤微生物磷至关重要。Brookes 等<sup>[4]</sup>假定土壤微生物磷的熏蒸释放率为 40%,熏蒸释放后微生物磷的土壤固定率用外加无机磷的回收率代替。Hedley 等<sup>[5]</sup>方法中实际上是采用同一转换系数(0.4)同时校正土壤微生物磷的熏蒸释放率和土壤固定率。Brookes 等<sup>[4]</sup>和 Hedley 等<sup>[5]</sup>都强调了各自的估计方法应当进一步检验。因此,有必要研究土壤微生物磷的熏蒸释放率和土壤固定率的估计方法。

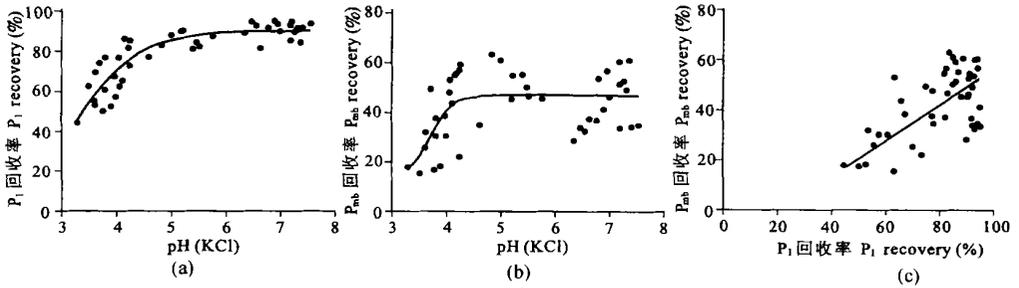


图1 外加无机磷的回收率(a)和微生物磷的回收率(b)与土壤 pH(KCl)值,以及两种外加磷的回收率之间(c)的关系  
Fig. 1 Relations between the recoveries of added inorganic P (a) or that of added microbial biomass P (b) and soil pH(KCl), and relation between the recoveries of the two forms of P (c)

根据对 5 种母质类型的 45 种土壤的测定结果(图 1(a)),加入土壤的无机磷的回收率( $R_{P_i}$ )与土壤 pH(KCl)值存在着显著的相关性。在 pH(KCl) 3.3~4.5 之间,  $R_{P_i}$  由 45% 增加到 86%,但在该 pH 范围内  $R_{P_i}$  的离散度较大。在土壤 pH(KCl) 4.6~7.4 范围内,  $R_{P_i}$  在 80%~95% 之间,平均为 89%;根据对测定数据的回归分析,  $R_{P_i}$  在此 pH 区间的理论值为 88%~92% 之间,与前人在英、美等地得到的结果很接近<sup>[4~6]</sup>。本研究和前人的结果表明  $R_{P_i}$  与土壤 pH(KCl) 关系密切而受其他因素(如母质类型和利用管理等)的影响相对较小,特别是在 pH(KCl) 5 以上的土壤,  $R_{P_i}$  相对比较稳定。

如图 1(b) 所示,尽管加入土壤微生物磷的回收率( $R_{P_{mb}}$ )与土壤 pH(KCl) 值也有一定的相关性,但在所测土壤的 pH(KCl) 范围内(3.3~7.4)其离散度都很大。这与  $R_{P_i}$  的状况有很大的差别。例如 pH(KCl) 4.0 左右(3.8~4.2)土壤的  $R_{P_{mb}}$  高低相差达到了三倍,而对应的  $R_{P_i}$  差异为 0.6 倍。更显然的是  $R_{P_{mb}}$  与  $R_{P_i}$  之间没有显著的相关性(图 1(c))。这进一步证实了 Wu 等<sup>[7]</sup>的见解。可见,外加无机磷的回收率不能作为土壤微生物磷土壤固定的精确估计方法。

尽管不同土壤的  $R_{P_{mb}}$  各不相同,所测定的 45 种土壤的  $R_{P_{mb}}$  平均值为 42%,其中有 16 种(占 1/3 多)土壤达到 50% 以上。显然,影响加入土壤微生物磷回收率的主要因素是土壤固定。因此, Brookes 等<sup>[4]</sup>关于土壤微生物磷的熏蒸释放率为 40% 假设显然低估了土壤微生物磷的实际熏蒸释放率。尽管在

Hedley 等<sup>[5]</sup>的转换系数(0.4)考虑了土壤微生物磷的土壤固定,但以提取的全磷增量来估计土壤微生物磷量。根据表3结果,全磷增量普遍大于无机态磷增量。这就说明 Hedley 等<sup>[5]</sup>的方法同样存在过低地估计土壤微生物磷实际熏蒸释放和提取率的可能性。因此,本文提出用测定的外加培养土壤微生物磷的回收率作为土壤微生物磷的熏蒸释放和土壤固定率的精确估计方法。

### 2.3 土壤微生物磷的估计

上述三种土壤微生物磷的熏蒸释放和土壤固定的估计方法反映出三种土壤微生物磷的计算方法;即 Brookes 等<sup>[4]</sup>的无机磷  $P_i$  增量与外加无机磷回收率和转换系数( $K_p, 0.4$ )校正的方法, Hedley 等<sup>[5]</sup>的全磷( $P_t$ )增量与转换系数( $K_p, 0.4$ )校正的方法,以及本研究提出的无机磷  $P_i$  增量与外加微生物磷回收率校正的方法。

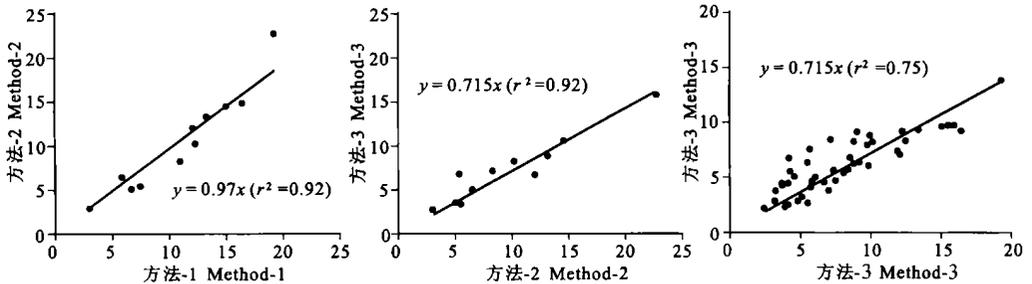


图2 Brookes 方法<sup>[4]</sup>(方法-1)、Hedley 方法<sup>[5]</sup>(方法-2)与以外加微生物磷回收率校正方法(方法-3)得到的土壤微生物磷量( $\text{mg kg}^{-1}$ )比较

Fig. 2 Comparison of the amounts of the soil microbial biomass P ( $\text{mg kg}^{-1}$  soil) estimated by different methods

如图2所示,对于本研究采用的土壤,三种方法得到的土壤微生物磷量的都有显著的相关性。其中采用 Brookes 等和 Hedley 等的两种方法估计土壤微生物磷量十分接近( $y = 0.97x, r^2 = 0.92$ )。但是,这两种方法得到的土壤微生物磷量分别比本研究提出方法得到的估计值大约高30%。根据上述讨论,这种差异可以归结于前两种方法过低地估计了土壤微生物磷的熏蒸释放和提取率。由于本研究提出的采用外加微生物磷回收率校正的方法能够完全克服这一问题,故可认为其对土壤微生物磷量估计较前两种方法更准确。

根据本研究所提出的方法计算结果,采用的45种土壤的微生物磷占土壤全磷的0.45%~4.5%,其中在大多数土壤(70%以上)在1%~2%之间。这一比值基本上在大多数前人在其他国家土壤所提供的土壤微生物磷与全磷的比值范围之内<sup>[3,4,14]</sup>,但小于 Perrott 等<sup>[15]</sup>在新西兰21种草地土壤得到的比值(0.9%~11.7%)。在42种南方土壤(红壤、紫色土、冲积土)的微生物磷占全磷比值一般低于1.5%。

He 等<sup>[3]</sup>研究表明土壤微生物对磷的作物供应起关键作用,土壤微生物碳磷比( $B_c: B_p$ )能反映微生物对磷的作物供应的调节能力。如果  $B_c: B_p$  比值小,土壤微生物磷的释放潜力较大,反之则因其本身的磷养分不足而同化土壤有效磷的能力加强。该研究还表明土壤微生物碳磷比与施磷肥水平密切相关。本研究对45种土壤的测定表明,土壤微生物碳磷比( $B_c: B_p$ )为16:1~75:1。与 Brookes 等<sup>[14]</sup>、Sarathchandra 等<sup>[16]</sup>及 Srivastava 等<sup>[17]</sup>在其它国家得到比值(10:1~35:1)相比,大多数土壤偏高(大于30:1)。

我国南方土壤磷的有效性和施用磷肥的作物利用率都较低。从本研究测定的我国45种土壤可以看出,大部分南方土壤磷的生物活性较低,而且土壤微生物对磷的作物供应的调节能力有限。我们对此还需要作深入的研究,以期探索提高南方土壤磷素有效性的新途径。

### 3 结论

本研究表明采用氯仿熏蒸、 $0.5 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$  在1:20土水比提取测定无机磷( $P_i$ )、并以同时测得的培养土壤微生物磷的回收率校正得到的土壤微生物磷量结果最佳。这一方法适合于我国主要土壤类型(pH 3.3~7.4, KCl)。

## 参考文献

1. Jenkinson D S. The turnover of the organic carbon and nitrogen in soil. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 1990, 329: 361~ 368
2. Wu J, Brookes P C, Jenkinson D S. Formation and destruction of microbial biomass during the decomposition of glucose and ryegrass in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 1993, 25(10): 1 435~ 1 441
3. He Z L, Wu J, O'Donnell A G. Seasonal responses in microbial biomass carbon, phosphorus and sulphur in soils under pasture. *Biol. Fertil. Soils*, 1997, 24: 421~ 428
4. Brookes P C, Powlson D S, Jenkinson D S. Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 1982, 14: 319~ 329
5. Hedley M J, Stewart J W B. Method to measure microbial phosphate in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 1982, 14: 377~ 385
6. McLaughlin M J, Alston A M, Martin J K. Measurement of phosphorus in the soil microbial biomass: a modified procedure for field soils. *Soil Biol. Biochem.*, 1986, 18(4): 437~ 443
7. Wu J, He Z L, Wei W X. Quantifying microbial biomass phosphorus in acid soils. *Biol. Fertil. Soils*, 2000, 32: 500~ 507
8. Oberson A, Friesen D K, Morel C. Determination of phosphorus released by chloroform fumigation from microbial biomass in high P sorbing tropical soils. *Soil Biol. Biochem.*, 1997, 29(9/10): 1 579~ 1 583
9. Potter R L, Jordan C L, Guedes R M. Assessment of a phosphorus fractionation method for soils-Problems for further investigation. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 1991, 34: 453~ 463
10. Williams W M, Blunt J W, Greenfield L G. Method for rapid removal of ethanol from chloroform in soil microbial biomass determination. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 1995, 26(3/4): 407~ 410
11. Murphy J, Riley J P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chem. Acta*, 1962, 27: 31~ 36
12. 中国科学院南京土壤研究所编. 土壤理化分析. 上海: 上海科学技术出版社, 1978. 96~ 101, 132~ 136, 146~ 157
13. Wu J, Joergensen R G, Pommering B. Measurement of soil microbial biomass by fumigation-extraction-an automated procedure. *Soil Biol. Biochem.*, 1990, 22(8): 1 167~ 1 169
14. Brookes P C, Powlson D S, Jenkinson D S. Phosphorus in the soil microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 1984, 16(2): 169~ 175
15. Perrott K W, Sarathchandra S U, FTech M. Phosphorus in the microbial biomass of New Zealand soils under established pasture. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 1989, 32: 409~ 413
16. Sarathchandra S U, Perrott K W, Upsell M P. Microbiological and biochemical characteristics of a range of New Zealand soils under pasture. *Soil Biol. Biochem.*, 1984, 16(2): 177~ 183
17. Srivastava S C. Microbial C, N and P in dry tropical soils: Seasonal changes and influence of soil moisture. *Soil Biol. Biochem.*, 1992, 24(7): 711~ 714

## MEASUREMENT OF MICROBIAL BIOMASS-P IN UPLAND SOILS IN CHINA

Wu Jin-shui Xiao He-ai Chen Gui-qiu Huang Min

(The Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, China)

### Summary

This paper reviews previous methods for measuring the microbial biomass P in soil, with comments on their problems and limitations in the use for different soil types, and described main procedures involved in the measurement. A study was carried out to validate the methods for upland soils in China. Results show that for the 45 soils used, the flush of inorganic P ( $P_i$ ) extracted in  $0.5 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$  (pH8.5) at a soil solution ratio of 1:20 following gaseous chloroform fumigation, as proposed by Brookes *et al.*<sup>[4]</sup>, provided a better indication of the amount of the biomass P than that extracted at a lower soil solution ratio (1:4), or in  $0.03 \text{ mol L}^{-1} \text{ NH}_4\text{F}$ – $0.025 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$  at both the ratios (1:4 and 1:20). In most of the soils, the size of the flush of  $P_i$  was not significantly different from that of the flush of total P extracted ( $P_t$ ), suggesting that the measurement of  $P_i$  was not necessary.

Following fumigation and extraction in the  $\text{NaHCO}_3$  solution at 1:20, the percentage of cultured microbial biomass P added into the soils and recovered as  $P_i$  varied largely (16% ~ 61%), and had no significant correlation with soil pH(KCl) or the percentage recovery of added  $P_i$  (closely correlated with soil pH). This suggests that the percentage of soil biomass P extracted after fumigation was underestimated by previous methods (Brookes *et al.*<sup>[4]</sup>; Hedley *et al.*<sup>[5]</sup>). Therefore, the amount of biomass P in the 45 soils calculated as previous methods was 1.3 folds larger than that calculated using the recovery of cultured microbial biomass P. We believe that the later method provide more reliable estimate for the amount of biomass P in the soils. This study demonstrated that P in soils from south China had generally low availability (< 1.5% of total P) to the microbial biomass.

**Key words** Soil microbial biomass P, Measuring method