

一种测定淹水土壤中微生物生物量碳的方法： 液氯熏蒸浸提—水浴法*

陈 果 刘岳燕 姚槐应 黄昌勇[†]

(浙江大学环境与资源学院, 杭州 310029)

摘 要 针对氯仿熏蒸浸提法测定淹水土壤微生物生物量碳时存在的问题,进行了测定方法的研究,建立了适合淹水土壤微生物生物量碳测定的新方法:液氯熏蒸浸提—水浴法,即在淹水土壤加入一定量的液态氯仿后,直接置于常压下熏蒸,然后用 0.5mol L^{-1} K_2SO_4 溶液浸提,随后将浸提液放置于 100°C 水浴中以排除其中的残余氯仿,最后采用 TOC 分析仪测定浸提液中的有机碳含量。本方法既符合氯仿熏蒸法的原理,在操作上又简便可行,是一种测定淹水土壤微生物生物量碳的理想方法。

关键词 淹水土壤;微生物生物量碳;氯仿熏蒸浸提法;液氯熏蒸浸提—水浴法

中图分类号 F301.24; S154.3

文献标识码 A

自从 Vance 和 Tate 等^[1,2]提出用氯仿熏蒸浸提法(CFE)测定土壤微生物生物量碳以来,该方法已被广泛应用,并被公认为测定土壤微生物生物量碳的标准方法之一。其原理是,对装有土样和氯仿的干燥器,通过真空抽气,使气态氯仿在土壤孔隙中扩散,充分地土壤接触,从而破坏土壤微生物的细胞膜结构,促进微生物细胞活性组分的释放,再用 K_2SO_4 溶液浸提土壤中的有机碳^[3~5]。通常所指的氯仿熏蒸浸提法,实际上包括气态氯仿熏蒸和 K_2SO_4 溶液浸提两个主要步骤。测得的土壤微生物生物量碳是依据熏蒸土样和对照(未熏蒸土样)在 K_2SO_4 提取液中的含量差值确定的^[1,2,5,6]。有不少研究报道,氯仿熏蒸浸提法的应用受到土壤含水量的限制^[7~10],一旦含水量超过田间持水量的 70%~80%,氯仿熏蒸效率则明显下降。由于旱地土壤的含水量一般在田间持水量的 30%~70%,所以该方法在旱地土壤上被广泛应用。但对于淹水生境条件下的土壤、沉积物等,由于淹水层或土壤水处于饱和状态,氯仿气体的扩散会受到土壤水的阻滞,这使得氯仿熏蒸法在淹水土壤上的应用可能引起偏差^[11~13]。为了建立适合淹水土壤的测定方法,有人曾尝试将淹水水稻土先放置在室温条件下晾干,

然后再熏蒸提取,但淹水土样晾干可能需 30~48 h,过长的晾干时间,难免会改变微生物的群落结构。作者曾尝试用快速吹干、离心脱水等方法来缩短土样处理的时间,但均未获得满意的结果。Inubushi 等^[13]曾提出在淹水土样中直接加液态氯仿,再进行真空熏蒸,然后用重铬酸钾氧化法测定 K_2SO_4 提取液中的可溶性碳,并指出获得了较满意的结果。但他们的研究报告中并没有对直接加入氯仿可能产生的问题进行研究。对淹育环境下的水稻土、沉积物等而言,至今仍未建立起一个满意的方法,能准确测定土壤微生物生物量碳。鉴于此,本研究针对淹水水稻土壤的物理化学特征,对传统氯仿熏蒸浸提法进行了改进。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品 土壤样品为浙江嘉兴的黄斑田水稻土和青紫泥田水稻土以及杭州的黄松田水稻土,均为 0~15 cm 耕层土。土样的分类和基本理化性质见表 1。试验前将土风干,去除动、植物残体和石块等,磨细过 2 mm 筛备用。

* 国家自然科学基金项目 (40371063) 资助

[†] 通讯作者, E-mail: chyhuang@zju.edu.cn

作者简介:陈 果(1980~),男,重庆人,博士研究生,主要从事土壤化学和生物化学研究。E-mail: guochen@zju.edu.cn

收稿日期:2006-03-15;收到修改稿日期:2006-06-19

表 1 供试土壤的理化性质

Table 1 Some physical and chemical properties of tested soil samples

| 土样编号 Soil No. | 土壤类型 Soil type | 中国土壤系统分类 CSTC | 采样地点 Site | pH (H ₂ O) | 粘粒 Clay (g kg ⁻¹) | 有机碳 Organic C (g kg ⁻¹) | 总氮 Total N (g kg ⁻¹) |
|------------------|-------------------|------------------|----------------|--------------------------|-------------------------------------|---|--|
| 1 | 黄斑田水稻土 | 普通铁聚水人耕为土 | 浙江嘉兴 ZH JX | 5.36 | 334 | 23.2 | 2.61 |
| 2 | 黄斑田水稻土 | 普通铁聚水人耕为土 | 浙江嘉兴 ZH JX | 7.31 | 236 | 29.0 | 3.32 |
| 3 | 黄斑田水稻土 | 普通铁聚水人耕为土 | 浙江嘉兴 ZH JX | 6.23 | 293 | 27.8 | 3.15 |
| 4 | 青紫泥田水稻土 | 底潜铁渗水耕人为土 | 浙江嘉兴 ZH JX | 6.14 | 314 | 30.7 | 3.48 |
| 5 | 青紫泥田水稻土 | 底潜铁渗水耕人为土 | 浙江嘉兴 ZH JX | 6.67 | 314 | 22.0 | 2.53 |
| 6 | 青紫泥田水稻土 | 底潜铁渗水耕人为土 | 浙江嘉兴 ZH JX | 5.32 | 377 | 26.7 | 3.40 |
| 7 | 黄松田水稻土 | 普通筒育水耕人为土 | 浙江杭州 ZH HZH | 5.76 | 154 | 11.0 | 1.09 |

Silt-clayey yellow mottled paddy soil; Blue clayey paddy soil; Marine-fluvigenic yellow loamy paddy soil; Chinese soil taxonomic classification; Fe—accumulic Stagnic Anthrosols; Fe—leached Stagnic Anthrosols; Hapli—Stagnic Anthrosols; Zhejiang Jiaxing; Zhejiang Hangzhou

1.1.2 土壤样品前处理 设置好气和淹水两个处理。称取表 1 中 7 个风干土样 800 g 各两份,再分别装于两个 1 000 mL 塑料烧杯中,一个杯加去离子水至田间持水量的 50%,不加盖,作为好气培养处理;另一杯土样按水土比 1:1 加入去离子水,此时土面水层约 1 cm,然后用带透气孔的塑料薄膜和橡皮筋将杯口扎紧,作为淹水培养处理。好气和淹水培养处理均放在 25(±1) 的恒温箱中培养,每隔 2~3 d,通过称重补充土样水分。好气培养时间为 15 d,淹水培养时间为 60 d。

1.1.3 测定方法 土壤微生物生物量碳的测定采用经典氯仿熏蒸浸提法^[1]和本研究改进的液氯熏蒸浸提—水浴法,后者测定步骤及结果计算见文章中的讨论和建议部分。K₂SO₄浸提液中有机碳含量的测定采用 TOC—500 自动分析仪(Shimadzu)。土壤基本理化性质的测定均参照文献[14]。

1.1.4 数据分析 数据的统计分析采用 Excel 2000,SPSS 12.0 和 SigmaPlot9.0 软件。

1.2 实验方案

1.2.1 设置实验方案的依据 氯仿熏蒸浸提法已被公认为测定土壤微生物生物量碳的标准方法之一。从理论上讲,无论是气态氯仿熏蒸还是土样中直接加液态氯仿熏蒸,只要氯仿能与土壤样品充分的混合接触,氯仿就能有效地破坏土壤微生物细胞膜结构,促进微生物活性组分(包括微生物碳、氮、磷、硫等)的释放,从而达到熏蒸测定的目的。然而,

正如前言中所述,经典氯仿熏蒸法(气态氯仿熏蒸)不适合在淹水水稻土样中应用。而在淹水水稻土样中直接加液态氯仿,由于液态氯仿能与淹水土样充分混合接触,因此有可能解决淹水土样氯仿熏蒸效率低的问题,但同时又产生了一些必须克服的问题。其中包括:(1)氯仿在水中有一定的溶解性,20 时在水中的溶解度高达 8g L⁻¹,直接将液态氯仿加入淹水土样,无疑会产生残余氯仿对有机碳测定的干扰。(2)根据 Inubushi 和 Witt 等^[13,15]的工作,单位土样液态氯仿的用量差异很大,从 10~57 μl g⁻¹干土不等,那么液态氯仿的最适用量是多少?(3)排除氯仿过程中,是否会对浸提液中的 K₂SO₄可提取碳产生影响?(4)液态氯仿常压熏蒸的效率如何,与气态氯仿真空熏蒸比较,是否能满足熏蒸要求?为了解决上述问题,我们设计了以下实验方案。

1.2.2 实验方案 实验 1,氯仿在水中有一定的溶解性,20 时它在水中的溶解度为 8g L⁻¹。因此,排除残余氯仿是液态氯仿熏蒸的前提条件。基于氯仿的沸点是 61.2,设计了通过水浴法排除残余氯仿的实验,即在含 40 ml 0.5 mol L⁻¹ K₂SO₄溶液的系列消煮管中,分别加入 50、100、200、400、600 μl 去乙醇氯仿,然后置于 100 水浴锅中,分别放置 30、45 及 60 min 后,用 TOC 仪测定其中的有机碳含量。以确定 100 水浴排除残余氯仿的可能性及完全排除所需时间。重复 4 次。

实验 2,分别取烘干土重约 10 g 的 6 个好气培

养的土样,装入 100 mL 系列塑料离心管中,加入约 3~5 ml 去离子水至土壤出现薄薄的表水,然后立即按 10、20、30、40、50、60 $\mu\text{L g}^{-1}$ 干土的比例加入去乙醇氯仿,混合均匀之后,直接置于常压下熏蒸 24 h,然后用 40 ml $0.5 \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_2\text{SO}_4$ 溶液浸提,之后将熏蒸浸提液在 100 $^\circ\text{C}$ 水浴中放置 60 min,最后用 TOC 分析仪测定浸提液中的有机碳含量。以确定适合淹水土壤的液态氯仿用量。重复 4 次。

实验 3,分别取烘干土重约 10g 的 7 个好气培养土样(编号 1~7),装入 100 mL 系列塑料离心管中,首先均按照经典的氯仿熏蒸浸提法^[1]进行熏蒸和浸提。然后将每个土样的 K_2SO_4 浸提液分成两部分,其中一部分 K_2SO_4 浸提液(包括熏蒸和未熏蒸对照)直接用 TOC 分析仪进行测定,另一部分 K_2SO_4 浸提液(包括熏蒸和未熏蒸对照)在 100 $^\circ\text{C}$ 水浴中放置 60 min 后,再用 TOC 分析仪测定。以验证 100 $^\circ\text{C}$ 水浴是否会对浸提液中的 K_2SO_4 可提取碳造成影响。重复 4 次。

实验 4,分别取烘干土重约 10 g 的 7 个好气培养的土样各两份,装入 100 ml 系列塑料离心管。其中一份,每管先加去离子水 3~5 ml 至土壤出现薄薄的表水,然后立即按 60 $\mu\text{L g}^{-1}$ 干土的比例加入无乙醇氯仿,充分混匀后,直接置于常压下熏蒸 24h,然后用 40 ml $0.5 \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_2\text{SO}_4$ 溶液浸提,随后将浸提液放置在 100 $^\circ\text{C}$ 水浴中 60 min;另一份用经典的氯仿熏蒸浸提法^[1]进行熏蒸浸提。最后对两部分均采用 TOC 分析仪测定浸提液中的可溶性碳含量。以确定在常压下直接在淹水土壤中加入液氯熏蒸的效率。重复 4 次。

实验 5,用吸管弃掉淹水培养土样的表层水后,用玻璃棒将土样充分搅匀,然后分别称取烘干土重约 10 g 的土样,装入 100 mL 系列塑料离心管,按 60 $\mu\text{L g}^{-1}$ 干土加入无乙醇氯仿,混合均匀后,在常压下进行液态氯仿熏蒸,熏蒸 24 h 后用 40 ml $0.5 \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_2\text{SO}_4$ 溶液浸提,然后将浸提液放置在 100 $^\circ\text{C}$ 水浴中 60 min,最后用 TOC 分析仪测定浸提液中的可溶性碳含量。以验证液氯熏蒸浸提—水浴法在实际淹水土壤中的适用性,及长期淹水对土壤微生物生物量碳的影响。重复 4 次。

2 结 果

2.1 100 $^\circ\text{C}$ 水浴排除溶解在 K_2SO_4 溶液中氯仿的效果

由于氯仿在水中有一定的溶解性,一旦浸提液中有残余氯仿的存在,这部分氯仿所含的碳无疑会使 TOC 测定结果偏高,因此,排除溶解在 K_2SO_4 浸提

液中的残余氯仿是采用 TOC 测定淹水土壤微生物量碳的前提条件。 K_2SO_4 溶液中加入不同量去乙醇氯仿,放置在 100 $^\circ\text{C}$ 水浴中 30、45、60 min 后测定的有机碳结果表明(表 2),100 $^\circ\text{C}$ 水浴 30 min 后仍能检测到一定量的有机碳。但 45 min 以后,就检测不到有机碳的存在。此结果说明了 100 $^\circ\text{C}$ 水浴 45~60 min 后,能够排除本实验中在 K_2SO_4 溶液中加入的不同量的氯仿。

表 2 100 $^\circ\text{C}$ 水浴排除溶解在 K_2SO_4 溶液中氯仿的效果

Table 2 Effect of 100 $^\circ\text{C}$ water bathing on chloroform removal from K_2SO_4 solution

| 氯仿用量 Amounts of CHCl_3 (μL) | 有机碳 Organic C (mg L^{-1}) | | |
|--|--------------------------------------|--------|--------|
| | 30 min | 45 min | 60 min |
| 50 | 2 | 0 | 0 |
| 100 | 2 | 0 | 0 |
| 200 | 3 | 0 | 0 |
| 400 | 4 | 0 | 0 |
| 600 | 7 | 0 | 0 |

2.2 采用液态氯仿熏蒸法所需的氯仿用量

从图 1 可见,供试的 6 个土样(编号 1~6),除 1 号土样外,其余 5 个土样熏蒸提取碳的含量均随着氯仿用量的增加而提高,随后保持相对稳定,达到最大熏蒸效率时的氯仿用量一般为 20~40 $\mu\text{L g}^{-1}$,低于这个用量时提取量明显减少,表明熏蒸不完全;高于这个用量时提取量仍保持恒定,表明已熏蒸完全。但不同土样达到完全熏蒸时对应的氯仿用量是不同的,如 1 号土样只需 10 $\mu\text{L g}^{-1}$ 即够,而 2 号土样则需 40 $\mu\text{L g}^{-1}$,这说明对采用液态氯仿熏蒸,不同土样达到最大熏蒸效率时所要求的氯仿用量并不完全一致,这可能是因为氯仿熏蒸效率与土壤的理化性质和微生物群落结构等有关^[16~19]。Inubushi 和 Witt 等^[13,15]在各自的实验中,分别采用了 25 g 土,10 $\mu\text{L g}^{-1}$ 干土的氯仿和 35 g 土,2 ml 的氯仿(大约相当于 57 $\mu\text{L g}^{-1}$ 干土的氯仿),都取得了较满意的结果。根据本实验的结果,10 g 土(干重)和 40~60 $\mu\text{L g}^{-1}$ 干土的氯仿用量对所有测试土样均能得到最大熏蒸提取量,并且随着氯仿用量的增加,提取量保持相对稳定。本试验供试土壤的粘粒和有机质含量等差异较悬殊,因此,10 g 土(干重)和 40~60 $\mu\text{L g}^{-1}$ 干土的氯仿用量能适用于大多数土壤。

2.3 100 $^\circ\text{C}$ 水浴对 K_2SO_4 可提取碳的影响

表 2 的实验结果表明,在 K_2SO_4 溶液中加入的不同量氯仿,在 100 $^\circ\text{C}$ 水浴中放置 60 min 后,能被完全排除掉。然而 K_2SO_4 可提取碳(包括非生物可溶

性碳和微生物量碳)在 100 °C 水浴过程中,是否会造成损失。由表 3 结果表明,对同一种土样的浸提液,经过和未经过水浴的熏蒸提取量之间的差异很小,非熏蒸对照之间差异也很小,经 LSD 检验后,在 $p < 0.05$ 水平上差异不显著,这说明 100 °C 水浴 60 min 不会造成浸提液中 K_2SO_4 可提取碳的损失。

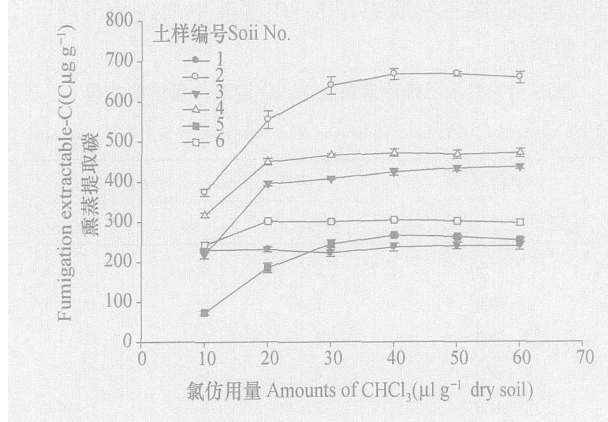


图 1 不同氯仿用量下土壤熏蒸提取碳的变化

Fig. 1 Effect of utilization rate of $CHCl_3$ on extractable-C in fumigated soils

2.4 液态氯仿熏蒸法的熏蒸效率

基于上述方案的研究结果,同时采用液氯熏蒸浸提—水浴法和经典的氯仿熏蒸浸提法测定了 7 个好气培养土壤的微生物量碳。为了使两种方法有可比性,在使用液氯熏蒸浸提—水浴法前,对土壤样品进行瞬时淹水后,立即加液氯仿熏蒸(实验 4),使土样既具备淹水环境又不至于改变好气培养土壤的微生物性质。结果表明(表 4),对供试的 7 个土样,以经典氯仿熏蒸法为参照,采用液氯熏蒸浸提—水浴法的熏蒸浸提效率在 96.4% ~ 104.6% 之间,平均为 99.1%。由液氯熏蒸浸提—水浴法测得的微生物量碳与由经典氯仿熏蒸浸提法测得的微生物量碳的相对误差在 5% 以内,平均为 2.57%,熏蒸提取碳各重复间的重现性也较好 ($SE < 7$),这表明液氯熏蒸浸提—水浴法在淹水土壤中的熏蒸效率与经典氯仿熏蒸浸提法在旱地土壤中的熏蒸效率基本相同,说明液氯熏蒸浸提—水浴法既能适用于淹水土壤中微生物量碳的测定,也可以替代氯仿熏蒸浸提法,测定旱地土壤的微生物量碳。

表 3 100 °C 水浴对熏蒸和非熏蒸提取碳的影响

Table 3 Effect of 100 °C water bathing on extractable-C in fumigated and nonfumigated soils

| 土样编号 Soil No. | 处理 Treatment | 可提取碳 Extractable-C ($C \mu g g^{-1}$) | | |
|------------------|-----------------|---|-----------------|--------------|
| | | 熏蒸 Fum. | 非熏蒸 Non-fum. | 微生物量碳 MBC |
| 1 | 未水浴 No bathing | 273 ±1.9 | 74 ±0.0 | 163 |
| | 水浴 Bathing | 234 ±5.5 | 72 ±2.3 | 162 |
| 2 | 未水浴 No bathing | 658 ±4.6 | 143 ±3.3 | 515 |
| | 水浴 Bathing | 650 ±3.3 | 138 ±2.2 | 512 |
| 3 | 未水浴 No bathing | 426 ±3.7 | 49 ±2.3 | 377 |
| | 水浴 Bathing | 431 ±3.9 | 49 ±2.3 | 382 |
| 4 | 未水浴 No bathing | 476 ±5.6 | 98 ±0.0 | 378 |
| | 水浴 Bathing | 480 ±1.9 | 94 ±0.6 | 386 |
| 5 | 未水浴 No bathing | 265 ±2.0 | 68 ±2.9 | 197 |
| | 水浴 Bathing | 266 ±5.7 | 68 ±1.7 | 198 |
| 6 | 未水浴 No bathing | 303 ±4.0 | 91 ±2.1 | 212 |
| | 水浴 Bathing | 296 ±3.9 | 87 ±2.1 | 209 |
| 7 | 未水浴 No bathing | 84 ±3.3 | 19 ±2.3 | 65 |
| | 水浴 Bathing | 87 ±1.9 | 18 ±3.9 | 69 |

1 Fumigated; Non-fumigated; 微生物量碳 = 熏蒸提取碳 - 非熏蒸提取碳 (转换系数 K_{FC} 未代入计算) Microbial biomass C (MBC) was calculated as the difference in Extractable-C between fumigated and non-fumigated soil samples; Microbial biomass carbon; 平均值 ± 标准误差 Means ± SE

表 4 氯仿熏蒸浸提法和液氯熏蒸浸提—水浴法的熏蒸效率比较

Table 4 Comparison between CFE and CFEB methods in fumigation efficiency

| 土样编号 Soil No. | 可提取碳 Extractable-C ($C \mu g g^{-1}$) | | | | | | 效率比 ER ²⁾ | 相对误差 RE |
|------------------|---|-------------------|---------------|-----------------|-------------------|-----------------------------|-------------------------|------------|
| | 氯仿熏蒸浸提法 CFE | | | 液氯熏蒸浸提—水浴法 CFEB | | | | |
| | 熏蒸 Fum. | 非熏蒸 Non - fum. | 微生物 量碳 MBC | 熏蒸 Fum. | 非熏蒸 Non - fum. | 微生物 量碳 MBC ¹⁾ | | |
| 1 | 237 ±1.9 | 74 ±0.0 | 163 | 233 ±2.5 | 76 ±0.0 | 158 | 96.9 % | 3.07 % |
| 2 | 658 ±4.6 | 143 ±3.3 | 515 | 660 ±2.5 | 147 ±2.5 | 513 | 99.6 % | 0.39 % |
| 3 | 426 ±3.7 | 49 ±2.3 | 377 | 418 ±2.5 | 51 ±2.5 | 367 | 97.3 % | 2.65 % |
| 4 | 476 ±5.6 | 98 ±0.0 | 378 | 479 ±6.2 | 96 ±2.3 | 383 | 101.3 % | 1.32 % |
| 5 | 265 ±2.0 | 68 ±2.9 | 197 | 259 ±2.2 | 69 ±3.9 | 190 | 96.4 % | 3.55 % |
| 6 | 303 ±4.0 | 91 ±2.1 | 212 | 299 ±4.4 | 92 ±2.4 | 207 | 97.6 % | 2.36 % |
| 7 | 84 ±3.3 | 19 ±2.3 | 65 | 86 ±5.7 | 18 ±0.0 | 68 | 104.6 % | 4.62 % |

Fumigated; Nonfumigated; Microbial biomass carbon; Effect ratio; Relative error; 1) 微生物量碳 = 熏蒸提取碳 - 非熏蒸提取碳 (转换系数 K_{EC} 未代入计算) Microbial biomass C (MBC) was calculated as the difference in Extractable-C between fumigated and non-fumigated soil samples; 2) 效率比 = 微生物量碳 (CFEB) / 微生物量碳 (CFE) $\times 100\%$

2.5 液氯熏蒸浸提—水浴法在长期淹水土壤上的应用

应用液氯熏蒸浸提—水浴法测定了长期淹水培养土壤的微生物生物量碳(表 5), 结果表明, 首先, 从熏蒸和非熏蒸对照多次重复的测定结果看, 各处理重复间的重现性都较好 ($SE < 9$), 表明该方法在淹水土壤中测定是合适的。其次, 与好气培养土壤相比(表 4), 长期淹水培养土壤 K_2SO_4 可提取碳总量(非生物可溶性碳 + 微生物生物量碳), 对不同土壤虽有增有减, 但二者的总趋势是一致的, 好气培养高的淹水培养也高, 反之亦然。但长期淹水培养土壤的微生物生物量碳明显下降, 7 个供试土样的土壤微生物量碳降低了 19.1% ~ 59.9%, 平均下降了 34.1% (图 2)。这可能是因为经过长期淹育培养后, 生物可利用碳的耗竭造成了微生物生物量碳的减少^[20]。土壤中的非生物可溶性有机碳的含量却明显增加, 提高幅度为 101.3% ~ 398.0%, 平均增加了 194.1% (图 3)。这可能是由于在淹水培养过程中, 淹水提高了土壤有机碳的溶出和导致团聚体的分散进而增加了可溶性有机碳量^[21], 而对不同土样淹水造成可溶性碳增加幅度的差异如此之大, 除了受供试土壤本身可溶性有机碳量水平影响外, 还可能与土壤其它理化性质如质地、养分等因素有关^[22]。

表 5 液氯熏蒸浸提—水浴法测定长期淹水培养土壤微生物量碳的效果

Table 5 Effectiveness of CFEB measuring microbial biomass C in long-term waterlogged soils

| 土样编号 Soil No. | 可提取碳 Extractable-C ($C \mu g g^{-1}$) | | |
|------------------|---|-----------------|--|
| | 熏蒸 Fum. | 非熏蒸 Non-fum. | 微生物量碳 ¹⁾ MBC ¹⁾ |
| | 1 | 236 ±0.6 | 153 ±2.7 |
| 2 | 782 ±4.5 | 367 ±4.3 | 415 |
| 3 | 538 ±8.0 | 254 ±4.0 | 284 |
| 4 | 450 ±3.4 | 252 ±0.1 | 198 |
| 5 | 416 ±3.2 | 292 ±0.2 | 124 |
| 6 | 359 ±4.2 | 276 ±6.0 | 83 |
| 7 | 76 ±3.1 | 21 ±2.1 | 55 |

Fumigated; Nonfumigated; Microbial biomass carbon; 1) 微生物量碳 = 熏蒸提取碳 - 非熏蒸提取碳 (转换系数 K_{EC} 未代入计算) Microbial biomass C (MBC) was calculated as the difference in Extractable-C between fumigated and non-fumigated soil samples

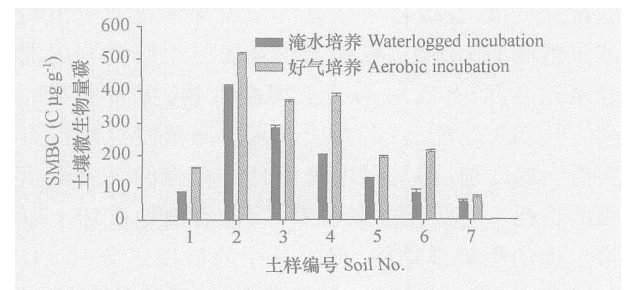


图 2 长期淹水培养下土壤微生物生物量碳与好气培养土壤微生物生物量碳的比较

Fig. 2 Comparison between waterlogged soil and aerobic soil in microbial biomass C

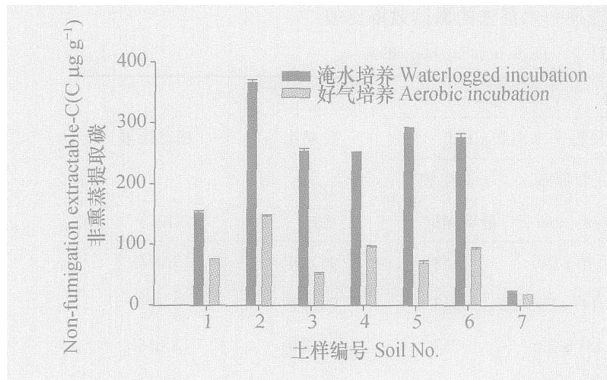


图3 长期淹水培养下土壤非熏蒸提取碳与好气培养土壤非熏蒸提取碳的比较

Fig. 3 Comparison between waterlogged soil and aerobic soil in non-fumigation extractable-C

3 讨论与建议

3.1 讨论

土壤微生物生物量是表征土壤生物与生物化学、土壤生态学特性的重要指标。与土壤理化性质指标不同,土壤生物学性质受环境影响大,对环境变化的灵敏性高,只要土壤条件稍有变化,土壤微生物种群、结构就可能产生明显的改变。因此,对处于淹育生境的水稻土、沉积物等,不能简单照搬旱地土壤的测定土壤微生物量的方法,更不能像其他理化性质那样,采用风干水稻土测定微生物生物量。本研究针对淹水土壤的特殊生境,提出了适合测定淹水土壤微生物生物量的方法:液氯熏蒸浸提—水浴法,弥补了这方面的不足。

与被广泛应用于旱地土壤上的氯仿熏蒸浸提法(真空抽气)相比,本方法的明显区别有二:其一是熏蒸方式的不同。本方法以液态氯仿常压熏蒸代替了氯仿熏蒸浸提法中的真空抽气熏蒸。针对“淹育”这一特殊生境,直接将液态氯仿加入含水量处于饱和或过饱和的土壤中,有利于使氯仿与土壤充分的混合接触,从而有效地杀灭土壤微生物,提高熏蒸效率。从方法原理上,本方法与氯仿熏蒸浸提法没有实质上的区别,都是利用氯仿具有极强的杀灭微生物的特性。土样经过氯仿熏蒸,能有效地破坏土壤微生物的细胞膜结构,促进其中的活性组分(C、N、P、S)等的释放。其二,是排除残余氯仿的方式不同。本方法因直接加液态氯仿到土样,并与土样充分的搅拌混合,因此排除浸提液中的残余氯仿、消除氯仿干扰是本方法能否采用液氯直接熏蒸的前提条

件。依据氯仿的沸点只有 61.2 °C,本方法设计在 100 °C 水浴中放置 45 ~ 60 min,实验结果表明能完全排除残余氯仿,表明本设计是合理可行的。Inubushi 和 Witt 等^[13,15]在各自的实验中,曾对淹水水稻土样直接加液态氯仿又同时采用氯仿熏蒸(真空抽气)相结合来熏蒸土样,然后用重铬酸钾氧化法测定浸提液中的有机碳含量,并指出获得了满意的结果。但他们并没有讨论加入的残余氯仿的去向,本方法的结果解决了这一问题。

本方法是针对淹水土壤设计的土壤微生物生物量碳的测定方法。从瞬时淹水处理(不破坏好气培养土壤的微生物种群结构)结果(表 4)可见,相对误差在 5% 以内,平均为 2.57%,同一土样 4 次重复间的重现性也很理想($SE < 7$),对长期淹水培养土样的测定结果的重现性也很好($SE < 9$),表明本方法能有效测定淹水土壤的微生物生物量碳。值得说明的是该方法不受土壤含水量的限制,还可以替代氯仿熏蒸浸提法测定旱地土壤的微生物生物量,拓展了氯仿熏蒸的适用范围。此外,本方法还具备以下优点:(1)以液态氯仿常压熏蒸替代氯仿真空抽气熏蒸,简化了测定条件,方便操作。(2)采用 100 °C 水浴排除残余氯仿,温度便于控制,操作容易规范,有利于减少偶然误差。(3)采用 TOC 分析仪测定样品浸提液中的碳,简便快速。可见,本方法操作简便、快速、容易规范,并适合批量样品的分析测定。

3.2 测定方法建议

本方法的测定步骤建议如下:

(1)熏蒸——用吸管弃掉淹水土壤的淹水层(保留微薄水层),将去除淹水层的土样充分混匀后用土壤抽样器取约相当于 10 g 烘干土重的新鲜土样 3 份,放入 100 mL 的离心管中,然后按约 60 $\mu\text{L g}^{-1}$ 干土的比例加入氯仿,拧紧盖子,用涡旋振荡器混匀。混匀后将离心管在室内黑暗条件下放置 24 h。在熏蒸处理的同时,另设 3 个非熏蒸对照。

(2)浸提——在上述各离心管中,加入 40 mL (土水比 1:4) 0.5 mol L⁻¹ 的 K₂SO₄ 溶液,在振荡机上振荡 30 min,然后将浸提液过滤(过滤前可低速离心),之后转入消煮管。非熏蒸对照的浸提液直接过滤到带盖的容器中。

(3)水浴——将含熏蒸浸提液的消煮管称重后,放入 100 °C 水浴锅中。待水沸腾时开始计时,45 ~ 60 min 后,取出试管,待冷却后称重,加去离子水补足损失的水分。混匀后转入带盖的容器中。

(4)测定——用 TOC 自动分析仪测定 K₂SO₄ 提

取液中的有机碳含量。

(5) 结果计算:

微生物生物量碳 ($\mu\text{g g}^{-1}$) = $\{(A - B) \times V / M\} / K_{\text{EC}}$

A ——熏蒸提取碳的 TOC 测定值 ($\mu\text{g ml}^{-1}$);

B ——非熏蒸对照的 TOC 测定值 ($\mu\text{g ml}^{-1}$);

V —— K_2SO_4 浸提液体积 (ml) + 土样所含水体积 (ml) ——由于淹水土壤或沉积物的含水量比较高, 因此这部分水分不能忽略不计;

M ——烘干土重 (g);

K_{EC} ——转换系数, 基于本研究结果和其他人员的相关研究^[13, 15, 23, 24], 本计算公式中的 K_{EC} 建议取值为 0.45。

参 考 文 献

- [1] Vance E D, Brookes P C, Jenkinson D S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.*, 1987, 19: 703 ~ 707
- [2] Tate K R, Ross D J, Feltham C W. A direct extraction method to estimate soil microbial biomass C: Effects of experimental variables and some different calibration procedures. *Soil Biol. Biochem.*, 1988, 20: 329 ~ 335
- [3] Jenkinson D S. Studies on the decomposition of plant material in soil. Partial sterilization of soil the soil biomass. *J. Soil. Sci.*, 1966, 17: 280 ~ 302
- [4] Jenkinson D S, Powlson D S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil—V. A method for measuring soil biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 1976, 8: 209 ~ 213
- [5] Brookes P C, Landman A, Pruden G. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: A rapid direct extraction method for measuring microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 1985b, 17: 837 ~ 842
- [6] Brookes P C, Powlson D S, Jenkinson D S. Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 1982, 14: 319 ~ 329
- [7] Sparling G P, West A W. Importance of soil water content when estimating soil microbial C, N and P by the fumigation-extraction methods. *Soil Biol. Biochem.*, 1989, 21: 245 ~ 253
- [8] Ross D J. Estimation of soil microbial C by a fumigation-extraction procedure: Influence of soil moisture content. *Soil Biol. Biochem.*, 1989, 21: 767 ~ 772
- [9] Davidson E A, Eckert R W, Hart S C, *et al.* Direct extraction of microbial biomass nitrogen from forest and grassland soils of California. *Soil Biol. Biochem.*, 1989, 21: 773 ~ 778
- [10] Shen S H, Brookes P C, Jenkinson D S. Soil respiration and the measurement of microbial biomass C by the fumigation technique in fresh and in air-dried soil. *Soil Biol. Biochem.*, 1987, 18: 153 ~ 158
- [11] Inushushi K, Wada H, Takai Y. Determination of microbial biomass nitrogen in submerged soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 1984, 30: 455 ~ 459
- [12] Inubushi K, Brookes P C, Jenkinson D S. Adenosine 5'-triphosphate and adenylate energy charge in waterlogged soil. *Soil Biol. Biochem.*, 1989, 21: 733 ~ 739
- [13] Inubushi K, Brookes P C, Jenkinson D S. Soil microbial biomass C, N and ninhydrin-N in aerobic and anaerobic soils measured by the fumigation-extraction method. *Soil Biol. Biochem.*, 1991, 23: 737 ~ 741
- [14] 鲁如坤主编. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 1999. Lu R K ed. *Analytical Methods for Soil and Agricultural Chemistry (In Chinese)*. Beijing: China Agricultural Science and Technology Publishing House, 1999
- [15] Witt C, Gaunt J L, Galicia C C, *et al.* A rapid chloroform-fumigation extraction method for measuring soil microbial biomass carbon and nitrogen in flooded rice soils. *Biol. Fertil. Soils*, 2000, 30: 510 ~ 519
- [16] Badalucco L, De Cesare F, Grego S. Do physical properties of soil affect chloroform efficiency in lysing microbial biomass? *Soil Biol. Biochem.*, 1997, 29: 1135 ~ 1142
- [17] Anderson J P E, Domsch K H. Mineralization of bacteria and fungi in chloroform-fumigated soils. *Soil Biol. Biochem.*, 1978, 10: 207 ~ 213
- [18] Dector M C, Tessier L, Soulas G. Reassessment of the KEC coefficient of the fumigation-extraction method in a soil profile. *Soil Biol. Biochem.*, 1998, 30: 119 ~ 127
- [19] Toyota K, Ritz K, Young I M. Survival of bacterial and fungal populations following chloroform-fumigation: effects of soil matrix potential and bulk density. *Soil Biol. Biochem.*, 1996, 28: 545 ~ 547
- [20] 周运超, 潘根兴, 李恋卿, 等. 太湖地区 3 种水稻土不同温度培养中有机碳库变化及其对升温的响应. *环境科学*, 2003, 24 (1): 46 ~ 51. Zhou Y C, Pan G X, Li L Q, *et al.* Change of organic carbon pools and the responses to soil warming during laboratory incubations under different temperatures of 3 kinds of paddy soils in Tai Lake region, China (In Chinese). *Environmental Science*, 2003, 24 (1): 46 ~ 51
- [21] Wang F L, Bettany J R. Influence of freeze-thaw and flooding on the loss of soluble organic carbon and carbon dioxide from soil. *J. Environ. Qual.*, 1993, 22: 709 ~ 714
- [22] Sun B, Lin X X. Effects of soil texture and CaCO_3 on turnover of organic materials in Chao soil. *Pedosphere*, 1993, 3 (2): 133 ~ 144
- [23] Wu J, Josergensen R G, Pnamerening B, *et al.* Measurement of soil microbial biomass C by fumigation-extraction: An automated procedure. *Soil Biol. Biochem.*, 1990, 22: 1167 ~ 1170
- [24] Shibahara F, Inubushi K. Measurements of microbial biomass C and N in paddy soils by the fumigation-extraction method. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 1995, 41 (4): 681 ~ 689

A METHOD FOR MEASURING MICROBIAL BIOMASS C IN WATERLOGGED SOIL : CHLOROFORM FUMIGATION EXTRACTION—WATER BATH METHOD

Chen Guo Liu Yueyan Yao Huaiying Huang Changyong[†]

(College of Environment and Resource Science , Zhejiang University , Hangzhou 310029 , China)

Abstract A chloroform-fumigation extraction—water bath method (CFEB) was developed for measuring microbial biomass C in waterlogged soils. Liquid chloroform was directly added to the waterlogged soil to be tested, which was fumigated for 24 h at 25 °C under normal atmospheric pressure and in darkness, and then were extracted with 0.5 ml L⁻¹ K₂SO₄ solution. The extractions were carried out in 100 °C water bath for 45 ~ 60 min to remove chloroform residue before measuring TOC. Non-fumigation controls were extracted directly with 0.5 ml L⁻¹ K₂SO₄ solution. The method was tested on seven paddy soils which were incubated aerobically or anaerobically and compared with the standard chloroform fumigation extraction (CFE). The results of the tests were reliable and reproducible, suggesting that the CFEB is a rapid and effective method for measuring microbial biomass C in waterlogged soils.

Key words Waterlogged soil; Microbial biomass C; Chloroform fumigation extraction method; Chloroform fumigation extraction—water bath method