

# 中华人民共和国国家标准

GB/T 39228—2020/ISO 14240-2:1997

## 土壤微生物生物量的测定 熏蒸提取法

Determination of soil microbial biomass—  
Fumigation-extraction method

(ISO 14240-2:1997, Soil quality—Determination of soil microbial biomass—  
Part 2; Fumigation-extraction method, IDT)

2020-11-19 发布

2021-03-01 实施

国家市场监督管理总局  
国家标准化管理委员会

发布





## 前　　言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准使用翻译法等同采用 ISO 14240-2:1997《土壤质量 土壤微生物生物量的测定 第 2 部分：熏蒸提取法》。

本标准做了下列编辑性修改：

- a) 将标准名称改为《土壤微生物生物量的测定 熏蒸提取法》；
- b) 将公式(1)中有机碳浓度  $C$  改为了  $C_0$ ；
- c) 将公式(1)、公式(2)和公式(4)中的单位删除，在公式说明中添加了其单位的表述；
- d) 参考文献[2]中脚注“即将出版”改为“出版时间：1998 年”。

本标准由中华人民共和国农业农村部提出。

本标准由全国土壤质量标准化技术委员会(SAC/TC 404)归口。

本标准起草单位：中国科学院亚热带农业生态研究所、湖南永清环保研究院有限责任公司、中国科学院南京土壤研究所、江苏省质量和标准化研究院。

本标准主要起草人：吴金水、林先贵、贺前锋、李宝珍、肖和艾、葛体达、刘代欢、陈美军、钱荣富、李鹏祥。



# 土壤微生物生物量的测定

## 熏蒸提取法

### 1 范围

本标准规定了一种通过氯仿熏蒸杀死新鲜土壤微生物后,测定其可提取的有机物质总量,估算土壤微生物生物量的方法。本标准仅描述了可提取有机碳含量的测定,但该方法同时也适用于估算土壤中的微生物氮含量及微生物茚三酮反应氮含量。本标准适用于土壤 pH 值范围较大的好氧和厌氧(渍水、水田)土壤微生物生物量的测定。本标准也适用于含易分解有机底物和硫酸钾溶液过饱和土壤中微生物生物量的测定。

注: 氯仿熏蒸也影响土壤动物,但这类生物的碳贡献一般很少(<5%),通常可以忽略。

### 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

ISO 10381-6:1993<sup>1)</sup> 土壤质量 采样 第 6 部分:实验室测定好氧微生物过程用土壤的采集、处理及贮存指南(Soil quality—Sample—Part 6: Guidance on the collection, handing and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory)

ISO 10694:1995 土壤质量 土壤有机质和总碳的测定 干烧法(元素分析)[Soil quality—Determination of organic and total carbon after dry combustion (elementary analysis)]

ISO 11465:1993 土壤质量 土壤干重和含水量的测定 重量法(Soil quality—Determination of dry matter and water content on a mass basis—Gravimetric method)

### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

#### 3.1

**土壤微生物生物量 soil microbial biomass**

土壤中活体微生物细胞的质量。

注:这一指标可通过测定细胞中碳或氮含量或测定其对添加碳源的矿化能力估算。使用碳或氮分析时,可测死细胞或细胞碎片;当测定土壤呼吸时,只测活体细胞。

### 4 原理

土壤样品经熏蒸后,全部活体微生物细胞破损,释放出微生物有机质。熏蒸对非活体土壤有机质无显著影响。土壤样品经氯仿熏蒸 24 h 后,对于熏蒸和未熏蒸的土壤样品,用 0.5 mol/L K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液定

1) 2009 年,ISO 10381-6:1993 被 ISO 10381-6:2009 代替;2018 年,ISO 10381-6:2009 被 ISO 18400-206:2018 代替。

量提取有机碳并测定,根据有机碳含量的差值,计算土壤微生物生物量碳。

## 5 材料和试剂

### 5.1 土壤样品

应尽量按照 ISO 10381-6 的规定采集、处理及贮存土壤样品。如果要求土壤质量均匀,按照 40% 左右的田间持水量将土壤样品过筛。

按照附录 A 的规定测定土壤田间持水量。

样品含水量应高于 30% 田间持水量,确保氯仿均匀分布和有效熏蒸。同时,要注意避免湿土涂抹和压实。渍水土壤分析前无需干燥处理。

### 5.2 试剂

应使用公认的分析纯试剂,包括:

5.2.1 硅脂(中等黏度)。

5.2.2 去乙醇氯仿。

**警告——在光照射下,去乙醇氯仿迅速降解,形成无色无味、高毒的碳酰氯( $\text{COCl}_2$ )气体。**

5.2.3 硫酸钾溶液, $c(\text{K}_2\text{SO}_4)=0.5 \text{ mol/L}$ ( $\rho=87.135 \text{ g/L}$ )。

5.2.4 碱石灰。

## 6 仪器

6.1 室温或恒温培养室,温度维持在  $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 。

6.2 内置防爆干燥器。

6.3 滤纸<sup>2)</sup>。

6.4 玻璃烧杯。

6.5 皮氏培养皿。

6.6 聚乙烯塑料瓶(250 mL)。

6.7 抽真空装置(水泵或电泵)。

6.8 水平或翻转式振荡器。

6.9 冰箱( $-15^\circ\text{C} \sim -20^\circ\text{C}$ )。

6.10 防爆沸颗粒。

## 7 熏蒸和浸提

### 7.1 熏蒸

将湿润滤纸(6.3)放置于干燥器(6.2)中,以备土壤样品熏蒸。

称取相当于 25 g~50 g 烘干质量的新鲜样品(5.1)至少 3 份,分别放到不同的玻璃烧杯(6.4)或皮式培养皿(6.5)中,再将其置于真空干燥器中。真空干燥器中放置盛有 25 mL 去乙醇氯仿(5.2.2)的烧杯一个,烧杯内放入少量防爆沸颗粒(6.10),同时放入一小烧杯碱石灰(5.2.4)溶液。抽真空待氯仿剧烈沸腾约 2 min,关闭干燥器阀门,置于  $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  的培养室箱(6.1)中黑暗条件下培养 22 h~24 h。

2) Whatman 42 号、Schleicher 和 Schull 595 1/2, Machinery 和 Nagel 261 G 1/4 均为市场可购买到的合适产品。本信息为方便本标准使用者之用,不构成国际标准化组织(ISO)对相关产品的背书。

若土壤样品不够,可称取少量样品,但需保持土壤质量和浸提液比例(1:4)不变。当土壤有机质含量超过20%时(按照ISO 10694规定测量),可扩大土壤与浸提液比例至1:4以上(对于有机质含量超95%的土壤,如枯枝落叶层土壤样品,该比例最大可达1:30)以提高浸提效率。记录所用土壤的质量。

熏蒸结束后,从干燥器中取出盛有氯仿的烧杯及底部滤纸,再反复抽真空(6次,每次2min)去除土壤中残余氯仿。准备好的样品以备浸提用。

另称取未熏蒸的新鲜土壤样品(烘干基重50g)3份,分别置于不同的聚乙烯塑料瓶(6.6)中,作为对照样品,并立即用200mL硫酸钾溶液(5.2.3)进行浸提,方法见7.2。

## 7.2 浸提

将熏蒸土壤样品无损转移到聚乙烯塑料瓶(6.6)中,加入200mL硫酸钾溶液(5.2.3),用水平振荡器(6.8)按200r/min振荡30min,或用翻转式振荡器60r/min振荡45min,再用滤纸(6.3)过滤浸提液。用同样方法浸提和过滤未熏蒸的对照样品。

应迅速测定滤液。若不立即分析,则将熏蒸和未熏蒸的土壤浸提液保存在-15℃~-20℃的冰箱(6.9)中。测定前在室温下解冻,充分摇匀即可。

注1:由于硫酸钙(CaSO<sub>4</sub>)过饱和,硫酸钾的土壤浸提液在保存过程中(特别是低温下保存)会出现一些白色沉淀,但对本方法中有机碳测定没有干扰,不必溶解过量CaSO<sub>4</sub>。

注2:氯仿熏蒸还会影响幼嫩活根的细胞膜。若土壤中含大量活根,则参照附录B进行预处理提取。

## 8 浸提液中碳的测定

通过测定土壤样品中微生物生物量碳,可用于比较不同土壤微生物生物量大小。微生物生物量计算需乘一个转换系数,该系数由已知细胞质量与熏蒸提取碳的相关分析试验而得。所用转换系数皆与该初始系数相关。

可用重铬酸钾氧化法(8.1)或仪器分析法(8.2)测定浸提液中碳含量。

### 8.1 微生物生物量碳——重铬酸钾氧化法

#### 8.1.1 原理

在强酸下,有机质被重铬酸钾氧化,Cr(VI)还原成Cr(III),回滴过剩的重铬酸钾。

#### 8.1.2 其他试剂

8.1.2.1 重铬酸钾,c(K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)=0.0667mol/L(每升水中加入19.6125g烘干重的重铬酸钾)。

警告——重铬酸钾危险,应谨慎使用,妥善处理。

8.1.2.2 磷酸(H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>),ρ=1.71g/L。

8.1.2.3 硫酸(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),ρ=1.84g/L。

8.1.2.4 硫酸亚铁铵滴定液,c[(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O]=0.040mol/L。

将15.69g硫酸亚铁铵溶于蒸馏水,加入20mL硫酸(8.1.2.3)酸化,用蒸馏水定容至1000mL。

8.1.2.5 1,10-邻菲罗啉硫酸混合液,0.025mol/L。

8.1.2.6 酸混合液:2倍体积的硫酸(8.1.2.3)与1倍体积的磷酸(8.1.2.2)混合。

#### 8.1.3 其他仪器

8.1.3.1 李比希式冷凝器(冷凝水)。

8.1.3.2 圆底烧瓶,250mL。

8.1.3.3 酸式滴定管,10mL,按0.05mL刻度标记。



8.2.2.2 磷酸( $H_3PO_4$ ) (见 8.1.2.2)。

8.2.2.3 聚偏磷酸钠[( $NaPO_3$ )<sub>n</sub>],超级纯。

8.2.2.4 过硫酸钾试剂。

将 20 g 过硫酸钾(8.2.2.1)溶于 900 mL 蒸馏水中,再用磷酸(8.2.2.2)调节至 pH 2,最后用蒸馏水定容至 1 000 mL。

8.2.2.5 聚偏磷酸钠试剂。

将 50 g 聚偏磷酸钠(8.2.2.3)溶于 900 mL 蒸馏水中,再用磷酸(8.2.2.2)酸化至 pH 2,最后用蒸馏水定容至 1 000 mL。

### 8.2.3 其他仪器

8.2.3.1 自动碳分析仪(红外检测法)<sup>3)</sup>或连续流动分析仪(比色法检测)<sup>4)</sup>。

本标准此部分目的是基于紫外光活化过硫酸盐光氧化有机碳测定微生物生物量碳。

### 8.2.4 操作步骤

取 5 mL 硫酸钾土壤浸提液(7.2)和 5 mL 聚偏磷酸钠溶液(8.2.2.5)混合均匀,完全溶解土壤浸提液中  $CaSO_4$  沉淀。将过硫酸钾试剂(8.2.2.4)自动送入紫外氧化室,由紫外光活化将有机碳氧化为  $CO_2$ 。用红外线吸收或紫外光谱测定  $CO_2$  浓度。

### 8.2.5 结果计算

按照公式(4)计算土壤有机碳含量( $C$ ):

$$C = [(V \times D_V) - (B \times D_B)] \times (P_K / D_w + S_w) \quad \dots\dots\dots (4)$$

式中:

$C$  —— 样品有机碳含量(以烘干土计),单位为微克每克( $\mu g/g$ );

$V$  —— 样品浓度  $C_0$ ,单位为微克每毫升( $\mu g/mL$ );

$D_V$  —— 磷酸钠稀释样品的体积,单位为毫升(mL);

$B$  —— 空白样品浓度  $C_0$ ,单位为微克每毫升( $\mu g/mL$ );

$D_B$  —— 磷酸钠稀释空白样品的体积,单位为毫升(mL);

$P_K$  —— 见公式(2);

$D_w$  —— 见公式(2);

$S_w$  —— 见公式(2)。

按照公式(5)计算生物量  $B_C$ :

$$B_C = E_C / k_{EC} \quad \dots\dots\dots (5)$$

式中:

$E_C$  —— 黑蒸土壤样品浸提的有机碳含量  $C$ —未熏蒸土壤样品浸提的有机碳含量  $C$ ;

$k_{EC}$  = 0.45。

注 1: 系数  $k_{EC}$  值是由熏蒸培养法和熏蒸提取法获得的土壤微生物生物量碳(23 种土壤)间相关关系计算所得。

注 2: 其可使熏蒸提取法与<sup>14</sup>C 标记有机质分解研究相结合。

3) Dohrman DC 80、Maihak Tocor 4 是市场上可买得到的设备。该信息为方便本标准的使用者,并不为国际标准化组织(ISO)所背书。

4) Skalar、Perstorp Alpkem 是市场上可买得到的设备。该信息为方便本标准的使用者,但并不为国际标准化组织(ISO)所背书。

## 9 精度

附录 C 汇总了本方法中精度的多个实验室试验数据,这些数据对于其他浓度范围和测试对象可能并不适用。

## 附录 A (规范性附录)

## A.1 范围

本方法适用于精度要求不高的土壤持水量测定。

## A.2 原理

底部带孔圆筒用土壤部分填充,加盖并置于水中浸泡后,将吸水后的土壤称重,然后在 105 ℃烘干至恒重后再称重。

### A.3 仪器

- A.3.1 圆筒,体积一定,长约 50 mm~150 mm,直径 50 mm~100 mm,底部带孔。
  - A.3.2 水浴(室温)。
  - A.3.3 托盘,带有一个排水孔,装有高度 20 mm~50 mm 厚湿精石英砂。
  - A.3.4 烘箱,能够保持  $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  的温度。
  - A.3.5 天平,称重精度为  $\pm 0.01\text{ g}$ 。

#### A.4 操作步骤

用滤纸覆盖带孔的圆筒(A.3.1)底部并称重。圆筒用土壤部分填充，并加盖。室温下，在水浴中浸泡圆筒2 h，再保持该水位1 h后，从水中取出圆筒放置在有砂子的托盘(A.3.3)上，根据土壤类型的差异沥干2 h~24 h。称重带土圆筒，取出土，并将其在105 °C烘干至恒重，再称重土壤。

## A.5 计算

持水量(WHC)的计算,用%表达,如式(A.1):

式中：

S——水饱和土壤+圆筒+滤纸质量,单位为克(g);

$T$ ——毛重,即圆筒+滤纸质量,单位为克(g);

$D$ —烘干土壤质量,单位为克(g)。

## A.6 结果表达

土壤持水量(WHC)按占烘干土壤质量的百分比表达。

附录 B  
(资料性附录)

含大量活根土壤微生物生物量估算——预提取过程

B.1 试剂

B.1.1 硫酸钾溶液,  $c(K_2SO_4) = 0.05 \text{ mol/L}$ (8.714 g/L 超级纯的硫酸钾)。

B.2 其他仪器

B.2.1 离心机。

B.3 操作步骤

称取潮湿土壤(相当于 25 g~50 g 烘干土壤)于 250 mL 玻璃瓶中,加入 100 mL 硫酸钾溶液(B.1.1)预提取,以 200 r/min 充分振荡 20 min 后过筛(耕作土过 2 mm 筛,草地土过 3 mm 筛)。然后用 75 mL 的硫酸钾溶液(B.1.1)仔细冲洗筛上根(和小石头),直至筛上无土壤,活根和碎石烘干并称重。土壤悬浮液用离心机(B.2.1)按大约 500g 离心 15 min。倒掉上清液,在土壤中加入 3 滴氯仿(5.2.2),按照 7.1 的操作步骤进行熏蒸。

B.4 评价

采用上述方法处理含活性根土壤很重要。此外,本方法可降低土壤中无机氮背景值,更易测定土壤微生物生物量,减少了干燥土壤中微生物生物量的测定问题。因此,很适合测定土壤微生物生物量碳和氮的一年变化。通过土壤的预提取过程,提取不出微生物生物量。

**附录 C**  
**(资料性附录)**  
**实验室间试验结果**

在德国的 11 个实验室重复测试了本方法。选用黄土和壤土 2 种耕作土壤进行试验。表 C.1 所示结果是未熏蒸和熏蒸土壤所提取有机碳含量及  $E_c$ 。 $E_c$  指熏蒸土壤减未熏蒸土壤所浸提有机碳含量差值。土壤微生物生物量的计算是  $E_c$  除以转换系数  $k_{EC}$  而得。

表 C.1 德国多个实验室间系列测试土壤微生物生物量结果——熏蒸提取法

参数	平均值/( $\mu\text{g/g}$ )	CV <sup>a</sup> /%	SE <sup>b</sup>
黄土	71	21	6.7
	207	15	7.4
	136	23	9.2
壤土	85	18	5.4
	265	11	7.1
	180	15	8.6

<sup>a</sup> CV=变化系数。  
<sup>b</sup> SE=各参与者平均值标准误差( $m=4$ )。  
<sup>c</sup> 熏蒸土壤与未熏蒸土壤结果差异。

### 参 考 文 献

- [1] ISO 10390:1994 Soil quality—Determination of pH
- [2] ISO 11274:1998 Soil quality—Determination of water-retention characteristics—Laboratory methods
- [3] Brookes P.C., Landman A., Pruden G., et al. Chloroform fumigation on the release and extractability of soil nitrogen: A rapid direct extraction method for measuring microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 17, 1985, pp.837-842.
- [4] Harden T., Joergensen R. G., Meyer B., et al. Soil microbial biomass estimated by fumigation-extraction and substrate-induced respiration in two pesticide-treated soils. *Soil Biol. Biochem.*, 25, 1993, pp.679-683.
- [5] Harden T., Joergensen R.G., Meyer B. et al. Mineralization of straw and formation of soil microbial biomass in a soil treated with simazine and dinotero. *Soil Biol. Biochem.*, 25, 1993, pp.1273-1276.
- [6] Inubushi K., Brookes P.C. and 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.*, 23, 1991, pp.737-741.
- [7] Mueller T., Joergensen R.G. and Meyer B. Estimation of soil microbial biomass C in the presence of living roots by fumigation-extraction. *Soil Biol. Biochem.*, 24, 1992, pp.179-181.
- [8] Ocio J.A. and Brookes P.C. An evaluation of methods for measuring the microbial biomass in soils following recent additions of wheat straw and the characterization of the biomass that develops. *Soil Biol. Biochem.*, 22, 1990, pp.685-694.
- [9] Sparling G.P., Feltham C.W., Reynolds J., et al. Estimation of soil microbial c by a fumigation-extraction method: use on soils of high organic matter content, and a reassessment of the  $K_{EC}$ -factor. *Soil Biol. Biochem.*, 22, 1990, pp.301-307.
- [10] Wu J., Joergensen R.G., Pommerening B., et al. Measurement of soil microbial biomass C by fumigation-extraction—an automated procedure. *Soil Biol. Biochem.*, 22, 1990, pp.1167-1169.
- [11] Vance E.D., Brookes P.C. and Jenkinson D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.*, 19, 1987, pp.703-707.
- [12] Wu J., Brookes P.C. and Jenkinson D.S. Formation and destruction of microbial biomass during the decomposition of glucose and ryegrass in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 25, 1993, pp.1435-1441.



中 华 人 民 共 和 国

国 家 标 准

**土壤微生物生物量的测定**

**熏蒸提取法**

GB/T 39228—2020/ISO 14240-2:1997

\*

中国标准出版社出版发行

北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100029)

北京市西城区三里河北街 16 号(100045)

网址 [www.spc.net.cn](http://www.spc.net.cn)

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238

读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

各地新华书店经销

\*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 22 千字

2020 年 11 月第一版 2020 年 11 月第一次印刷

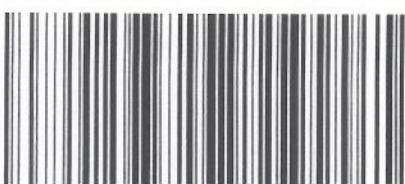
\*

书号: 155066 · 1-65913 定价 18.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68510107



GB/T 39228-2020