

基于图像分析的土壤速效磷的测定

吴沿友^{1,2}, 周秋月¹, 向忠平¹, 钱伟钧¹

(1.现代农业装备与技术省部共建教育部重点实验室/江苏省重点实验室, 江苏大学农业工程研究院, 江苏 镇江 212013; 2.中国科学院地球化学研究所 环境地球化学国家重点实验室, 贵州 贵阳 550002)

摘要:对基于图像分析的土壤速效磷的测定方法进行了研究。在一定的浓度范围内,显色后的溶液磷浓度与图像的平均蓝色度有较好的线性关系。通过设置不同的磷标准溶液浓度范围,研究了图像分析法适用的范围。研究表明,相对于传统比色法,图像分析法在标准溶液浓度小于 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,溶液磷浓度与图像的平均蓝色度不呈线性关系,但在 $0.1 \sim 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的范围内,溶液磷浓度与图像的平均蓝色度有较好的线性关系。土壤待测液的体积与图像平均蓝色度的线性关系好于它与光密度之间的线性关系。当土壤有效磷的浓度在 $0.31 \sim 250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{DW}$ 时,图像分析法可以确保分析精度。基于图像分析的土壤速效磷的测定方法是一种能现场测定,比试纸法精确度高,比传统比色法操作简单,且适应浓度高的土壤速效磷的测定方法。

关键词:速效磷;图像分析;平均蓝色度;比色法;试纸法

中图分类号:X830.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2008)06-2504-05

An Image Analysis-based Determination of Available Phosphorus in Soil

WU Yan-you^{1,2}, ZHOU Qiu-yue¹, XIANG Zhong-ping¹, QIAN Wei-jun¹

(1.Key Laboratory of Modern Agricultural Equipment and Technology, Ministry of Education and Jiangsu Province, Institute of Agricultural Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 210213, China; 2.State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China)

Abstract: The image analysis-based determination of available phosphorus in soil was investigated. In certain range of concentrations, there existed a good linear correlation between the average blueness of image and the concentration of phosphorus in solution after chromogenesis. The various range of phosphorus concentrations in standard solution was set up to study the application of image analysis method. Compared with the conventional colorimetric measurement, the image analysis method did not obtain linear relations between the phosphorus concentration and the average blueness of image when the phosphorus concentration in standard solutions was lower than $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Good linear relations stand between the phosphorus concentration and the average blueness of image when the phosphorus concentration in standard solutions lies in the range of 0.1 to $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The determination based on image analysis could realize the analysis of available phosphorus in soil higher in concentration and greater in the change of concentration, to which the conventional colorimetric measurement was not applicable. The available phosphorus being determined, the linear relationship between volume and the average blueness of image was better than that between volume and optical density of soil solution. The determination based on image analysis could also obtain reliable precision when the concentration of available phosphorus in soil was between $0.31 \sim 250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{DW}$. The measurement, which could be implemented in situ, was more precise than the paper test, more convenient than the conventional colorimetric one, and suitable for the determination of the available phosphorus with higher concentration in the soil.

Keywords: available phosphorus; image analysis; average blueness; colorimetric measurement; paper test

磷是农作物整个生育期中不可缺少的重要营养元素之一。测定土壤速效磷的目的是为了确定作物高产、优质、高经济效益的磷肥施用量^[1]。近年来由于人

们对保护资源和环境的重要性的认识的提高,为遏制因连续大量施用磷肥导致磷矿资源的加速耗竭,以及农田土壤磷素作为非点源污染源造成地表水的富营养化和地下水的污染日益严重的局面,科学、合理的施用磷肥也被赋予了新的内涵,即磷肥的施用不仅要提高产量、改善品质、增加经济效益,而且不应对环境造成污染和破坏^[2-3]。我国是一个人均资源十分贫乏的

收稿日期:2008-01-29

基金项目:国家重点基础研究发展计划项目(2006CB403206)

作者简介:吴沿友(1966—),男,教授,主要从事喀斯特生态研究。

E-mail: yanyouwu@ujs.edu.cn

国家,测定土壤速效磷的意义就更加重要。

目前用来测定溶液中无机磷浓度的方法为试纸法和比色法^[4-5]。其原理是用提取剂提取获取提取液,磷钼酸铵可被还原剂还原为蓝色,且其蓝色深浅在一定范围内与提取液中的磷含量呈线性关系。比色法是用提取液处理成待测液,与显色剂反应进行显色,用分光光度计或光电比色计进行比色,计算。试纸法是将上述显色反应所需化学试剂分别被试纸吸收,试剂与待测液在纸条上反应显色,根据预制的标准色系试纸进行目测比较。

试纸法简便快捷,宜于大田推广应用,但常达不到应有精度。比色法,精确度高,但操作烦琐,且高浓度线性较差。因此,研究一种比试纸法精确度高,比传统比色法操作简单,且适应浓度高的土壤速效磷的测定方法,对科学、合理的施用磷肥和防止水体富营养化具有重要的意义。本文研究出一种基于图像分析的土壤速效磷的分析方法,提供了这种可能。

1 材料方法

本方法的原理为:含磷待测液与显色剂反应进行显色,其蓝色深浅可以用蓝色度来表征。因此蓝色度与磷含量也呈线性关系。

按常规方法进行提取剂、钼锑抗试剂和磷标准溶液的配制。随后进行土壤待测液的制备。

吸取不同体积的含磷(P) $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准溶液,分别加入 50 mL 容量瓶中,再加入钼锑抗显色剂 5 mL,摇匀,定容成磷标准系列溶液。放置 30 min,分别倒入无刻度的试管中,放到白色的试管架上,先以白纸板做拍摄背景,利用 500 万像素数码相机正面水平对放有样品和标样的试管架进行拍摄,获取图像。再用分光光度计上(波长设定为 700 nm)进行对每一试管中的溶液逐一比色,以空白溶液的透光率为 100(即光密度为 0),读出测定液的光密度,绘制成光密度与浓度关系的标准曲线。获取的图片输入电脑,用图像分析软件 SigmaScan Pro 5 对它进行分析。在上述图像上,选取每根试管上正面同一高度的蓝色均匀的区域,利用图像分析软件对这些区域进行分析,获取每个磷标准溶液的图像平均蓝色度。绘制成图像平均蓝色度与溶液浓度关系的标准曲线。

取 5 g 风干土样于 250 mL 干燥三角瓶中,加入 100 mL $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ 浸提液和一小勺无磷活性炭,在振荡机上振荡 30 min,过滤,作为待测液。分别取土壤样品溶液 0、4、8、12、16、20 和 24 mL 于 50

mL 容量瓶中,用钼锑抗试剂 5 mL 显色,并用蒸馏水定容,摇匀,放置 30 min。与磷标准系列溶液的操作一样,获取每一样品的图像平均蓝色度和光密度,分别绘制它们的光密度与浓度、平均蓝色度与浓度关系的标准曲线。

如前步骤获取土壤待测液,吸取一定体积的待测液于 50 mL 容量瓶中,用钼锑抗试剂 5 mL 显色,并用蒸馏水定容,摇匀,放置 30 min,分别倒入无刻度的试管中,连同 3~4 个内参照试管一起放到白色的试管架上。内参照试管是前述的磷标准系列溶液,与磷标准系列溶液的操作一样,获取每一样品的图像平均蓝色度和光密度。

在线实测土壤在现场获取。分两部分,一部分鲜土样现场处理。处理方法为:10 g 鲜土样于 500 mL 干燥三角瓶中,加入 200 mL $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ 浸提液和一小勺无磷活性炭,猛烈手摇振荡 10 min,过滤,作为待测液。现场用前述图像分析法获取待测液的磷浓度。另一部分鲜土样带回实验室,与现场鲜土样同样处理,制备待测液,待测液在实验室内用传统比色法获取待测液的磷浓度。

2 结果与讨论

2.1 磷标准溶液浓度在 $0.1 \sim 0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的图像平均蓝色度与光密度

将磷标准溶液浓度设定为 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 分别绘制光密度与浓度、图像平均蓝色度与浓度关系的标准曲线(图 1)。

从图 1 中可以看出磷浓度在 $0.1 \sim 0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内的浓度与平均蓝色度、光密度的相关性极好,能够满足分析需要。

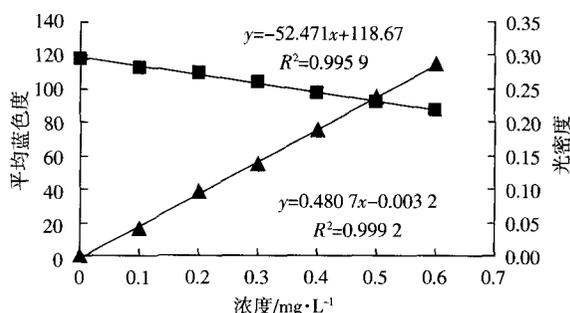


图 1 磷浓度在 $0.1 \sim 0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内的浓度与平均蓝色度(■)、光密度(▲)的关系

Figure 1 The relationship between concentration and the average blueness of image(■)/optical density(▲) in the range from 0.1 to 0.6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

2.2 磷标准溶液在不同浓度区段内的图像平均蓝色度与光密度

将磷标准溶液浓度设定为低浓度段 0、0.01、0.03、0.05、0.10 和 0.20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 中浓度段 0.40、0.60、0.80、1.00 和 1.40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 高浓度段 1.80、2.00、2.50、3.00、3.50 和 4.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 分别绘制它们的光密度与浓度、平均蓝色度与浓度关系的标准曲线(图 2、3 和图 4)。

从图 2 可以看出,在低浓度范围内,比色法有极好的结果,浓度与光密度值线性相关性较好,能够满足分析需要;但平均蓝色度与浓度之间的线性相关性较差,决定系数平方(R^2)仅为 0.871 9,所以不满足分析测定需要,主要原因是浓度太小时,平均蓝色度值偏小。

从图 3 可以看出,在中浓度范围内,两种方法都有极好的结果,浓度与光密度值、平均蓝色度值的线性相关性都好,能够满足分析需要,平均蓝色度与浓度之间的决定系数平方大于比色法中的浓度与光密

度值之间的决定系数平方。

从图 4 可以看出,在高浓度范围内,浓度与光密度值、平均蓝色度值线性相关性较差, R^2 仅为 0.964 1,不能满足分析需要;而平均蓝色度与浓度之间的 R^2 为 0.990 4,能够满足分析需要。

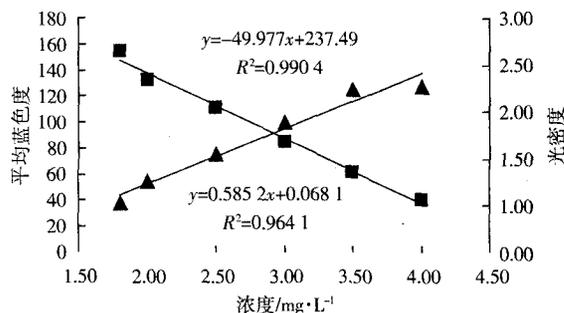


图 4 磷高浓度范围内(1.8~2.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的浓度与平均蓝色度(■)、光密度(▲)的关系

Figure 4 The relationship between concentration and the average blueness of image(■)/optical density(▲) at the higher concentration(1.8~2.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

由此可知,传统的比色法在低、中浓度(0~1.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)下具有较好的测定效果,而图像分析法在中、高浓度(0.4~4.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)具有较好的测定效果。

另外从图 1、图 2 和图 3 可以看出,同样的磷浓度在不同的实验中,平均蓝色度相差很大,这是因为数码相机在摄影时,图像质量受相机品牌、相机设置的感光度(ISO)、周围光线的亮度以及相机的自动补偿功能等因素的影响,因此在实际测定时,应设立已知浓度的内标(参照物 3~4 个)。

2.3 磷标准溶液在大范围浓度区段内的图像平均蓝色度与光密度

将磷标准溶液浓度设定为大范围变化(0、0.01、0.10、1.00、10.00、100.00 和 250.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),分别绘制它们的光密度与浓度、平均蓝色度与浓度关系的标准曲线(图 5 和图 6)。

从图 5 可以看出,在低浓度下,平均蓝色度与浓度关系不是线性关系,而在高浓度范围下(1.00~250.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),平均蓝色度与浓度关系是极好的线性关系, R^2 达到 0.999 0($n=4$)。与平均蓝色度与浓度关系相反,图 6 显示了在低浓度下(0~10.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),光密度与浓度关系成很好的线性关系($R^2=0.994 6, n=5$),而在高浓度范围下(10.00~250.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),光密度与浓度关系不具有线性关系。

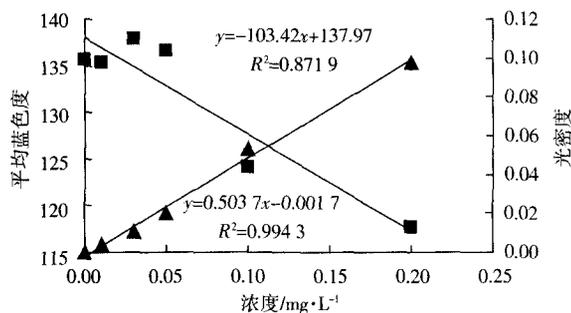


图 2 磷低浓度范围内(0~0.20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的浓度与图像平均蓝色度(■)、光密度(▲)的关系

Figure 2 The relationship between concentration and the average blueness of image(■)/optical density(▲) at the lower concentration(0~0.20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

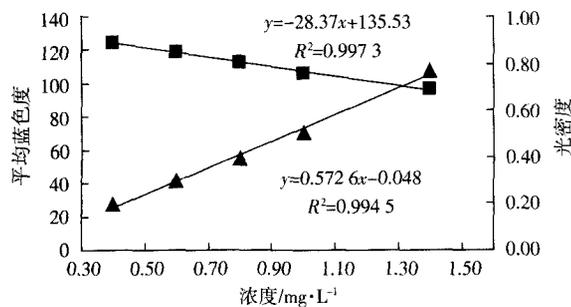


图 3 磷中浓度范围内(0.4~1.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的浓度与图像平均蓝色度(■)、光密度(▲)的关系

Figure 3 The relationship between concentration and the average blueness of image(■)/optical density(▲) at the medium concentration(0.4~1.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

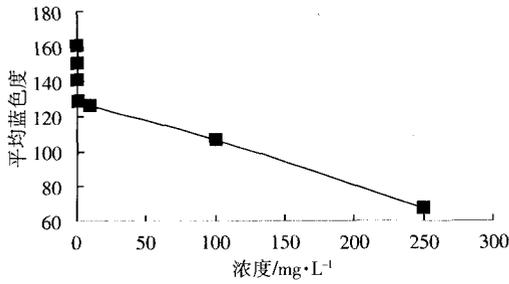


图 5 磷浓度大范围变化时(0~250 mg·L⁻¹)的浓度与图像平均蓝色度的关系

Figure 5 The relationship between concentration and the average blueness of image when the variation in the concentration of phosphorus is great(0~250 mg·L⁻¹)

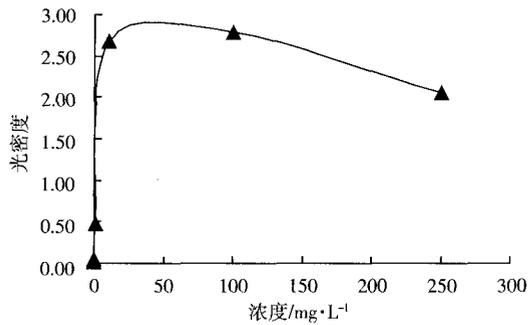


图 6 磷浓度大范围变化时(0~250 mg·L⁻¹)的浓度与光密度的关系

Figure 6 The relationship between concentration and optical density when the variation in the concentration of phosphorus is great(0~250 mg·L⁻¹)

2.4 不同稀释倍数的土壤待测液的图像平均蓝色度与光密度

图 7 是土壤待测液的体积数与光密度、平均蓝色度的关系。从图 7 中可以看出,土壤待测液的体积数

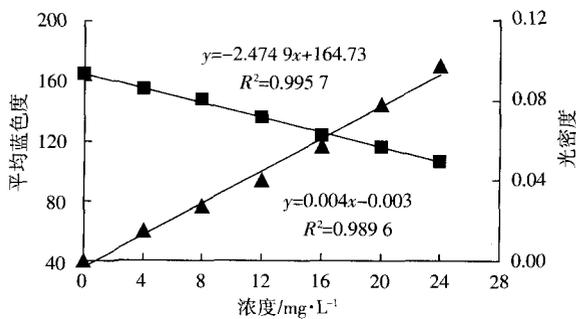


图 7 不同体积土壤待测液与平均蓝色度(■)、光密度(▲)的关系

Figure 7 The relationship between volume and the average blueness of image(■)/optical density(▲) of soil solution for the determination of available phosphorus

与平均蓝色度以及光密度有较好的线性关系, R^2 分别为 0.995 7 和 0.989 6($n=7$)。而平均蓝色度与体积数线性更好。这可能与土壤胶体量的多少影响比色杯的通透性有关,而图像分析法可以选择均匀一致的区域,获取平均蓝色度^[6]。图像分析法所获得的结果精确度更高。

2.5 图像分析法测定土壤速效磷的实例

取合适体积的待测液,通过加 3~4 个内标进行土壤速效磷浓度的测定,得出 6 个土壤样品的速效磷的浓度,如表 1。

表 1 图像分析法与比色法分析的土壤速效磷结果 (mg·kg⁻¹DW)(平均值±标准差, $n=5$)

Table 1 The data of the determination based on image analysis and colorimetric measurement(mg·kg⁻¹DW)(Mean±SD, $n=5$)

样品号 Sample No.	图像分析法 image analysis	比色法 colorimetric measurement
1	5.24±0.38	5.31±0.26
2	16.36±0.94	16.48±0.72
3	25.75±2.31	24.38±2.22
4	35.51±3.47	33.12±4.15
5	52.47±4.91	49.28±6.62
6	110.28±7.45	105.35±11.35

对表 1 的标准差进行分析可以发现,速效磷浓度低时,比色法的精度高于图像分析法,浓度高时,图像分析法的精度高于比色法。两种分析方法对土壤速效磷分析的精度都是可以接受的,图像分析法适合测定土壤的速效磷浓度。

2.6 图像分析法在现场测定土壤速效磷实例

表 2 表示的是图像分析法现场测定结果与实验室内比色法分析的土壤速效磷结果的对比。通过对表 2 的统计分析可以看出,图像分析法在现场测得的结果与实验室内比色法分析的结果无显著差异,表明利用图像分析法现场测定的土壤速效磷的精确度与传统比色法的测定精度无显著差异,可以利用图像分析法现场测定,为精确农业提供了便利条件。

对表 2 的标准差进行分析可以发现,速效磷浓度低时,比色法的精度高于图像分析法,浓度高时,图像分析法的精度高于比色法。两种分析方法对土壤速效磷分析的精度都是可以接受的,图像分析法适合测定土壤的速效磷浓度。

2.7 图像分析法测定土壤速效磷的优缺点

根据前面的结果可以看出,图像分析法测定的浓度范围较大,这是传统比色法难以达到的。在较低浓

表2 图像分析法现场测定与实验室内比色法分析的土壤速效磷测定结果($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{FW}$)

Table 2 The data of the in situ determination based on image analysis and colorimetric measurement at laboratory ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{FW}$)

样品号 Sample No.	图像分析法 image analysis		比色法 colorimetrically measurement	
	测定值 Value of the determination	平均值±标准差 Mean±SD	测定值 Value of the determination	平均值±标准差 Mean±SD
1	24.38	25.98±1.31a	26.35	27.00±1.37a
	27.12		25.87	
	26.98		26.78	
	25.43		28.98	
2	54.12	54.80±1.92a	53.24	55.68±1.86a
	52.76		57.38	
	57.34		55.27	
	54.98		56.85	

度时,不能用图像分析法进行测定,但可以通过增加待测液的体积来获得较好效果,它可以测定速效磷大于 $0.31\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{DW}$ 的土壤,而对于速效磷小于 $250\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{DW}$ 的土壤具有更高的精度,这对于一般土壤的测定是适合的,因为绝大多数土壤的速效磷都在 $0.31\sim 250\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{DW}$ 之间^[7]。

图像分析法,可以用于现场测定。将数码相机拍摄的图像,无线传输到计算机或直接输入笔记本电脑就可获取分析数据,实现了现场快速检测;同时也可以重复多次进行分析,解决了比色法因溶液颜色不稳定影响比色效果的问题^[8]。

3 结论

(1)在一定的浓度范围内,平均蓝色度与溶液中的磷浓度成显著的线性关系。

(2)较低浓度下,传统比色法有着较高的精确度。而在大范围和较高浓度下,图像分析法具有较好的精确度。

(3)对一般田间土壤速效磷的测定,图像分析法具有比传统比色法较好的分析精度,因为传统的比色法可能受到土壤溶液胶体的影响,致使透光率发生改变而影响分析结果。

(4)图像分析法可以对 $0.31\sim 250\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{DW}$ 的土壤速效磷含量进行分析,具有很好的精度,这对大多数土壤是适合的。

参考文献:

- [1] 高祥照, 马文奇, 崔 勇, 等. 我国耕地土壤养分变化与肥料投入状况[J]. 植物营养与肥料学报, 2000, 6(4):363-369.
GAO Xiang-zhao, MA Wen-qi, CUI Yong, et al. Changes of soil nutrient contents and input of nutrients in arable of China[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2000, 6(4):363-369.
- [2] 张乃明, 洪 波, 张玉娟. 农田土壤磷素非点源污染研究进展[J]. 云南农业大学学报, 2004, 19(4):453-456.
ZHANG Nai-ming, HONG Bo, ZHANG Yu-juan. Study progress of phosphorus non-point source pollution in farmland[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2004, 19(4):453-456.
- [3] 高 超, 张桃林. 面向环境的土壤磷素测定与表征方法研究进展[J]. 农业环境保护, 2000, 19(5):282-285.
GAO Chao, ZHANG Tao-lin. Review on environment oriented soil phosphorus testing procedures and interpreting methods[J]. *Agro-Environmental Protection*, 2000, 19(5):282-285.
- [4] Murphy J, J P Riley. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1962, 27:31-36.
- [5] 罗彦超, 胡克倩. 试纸法测定土壤中有有效磷[J]. 河南化工, 1999, 11:35-38.
LUO Yan-chao, HU Ke-qian. Paper testing method for determination of available phosphorus in soils[J]. *Henan Chemical Industry*, 1999, 11:35-38.
- [6] 何 斌, 马天予, 王运坚, 等. 数字图像处理[M]. (第二版)北京: 邮电出版社, 2002.
HE Bin, MA Tian-yu, WANG Yun-jian, et al. Digital image processing (Second edition)[M]. Beijing: Posts and Telecommunications Publishing House, 2002.
- [7] 王蓉芳, 高祥照, 崔 勇. 全国土壤监测资料集(1984—1991)[M]. 北京: 中国劳动出版社, 1993.
WANG Rong-fang, GAO Xiang-zhao, CUI Yong. National soil monitor documents collection(1984—1991)[M]. Beijing: China Labor Publishing House, 1993.
- [8] 卜玉山, Magdoff F R. 十种土壤有效磷测定方法的比较[J]. 土壤学报, 2003, 41(1):140-146.
BU Yu-shan, Magdoff F R. A comparison of ten methods for determination of available phosphorus in soils[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2003, 41(1):140-146.