



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Institutionen för mark och miljö

## **Kalkningens effekter på fosformineralisering – organisk fosfor i det permanenta fältförsöket i Röbäcksdalen (R3-1002)**

*Effects of liming on phosphorus mineralization  
– organic phosphorus in the permanent field trial at  
Röbäcksdalen (R3-1002)*

Christian Sigtryggsson

Kandidatuppsats i biologi  
Agronomprogrammet – inriktning mark/växt

---

Examensarbeten, Institutionen för mark och miljö, SLU  
2015:09

Uppsala 2015



SLU, Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för naturresurser och jordbruksvetenskap  
Institutionen för mark och miljö

Christian Sigtryggsson

Kalkningens effekter på fosformineralisering – organisk fosfor i det permanenta fältförsöket i  
Röbäcksdalen (R3-1002)  
Effects of liming on phosphorus mineralization – organic phosphorus in the permanent field trial at  
Röbäcksdalen (R3-1002)

Huvudhandledare: Magnus Simonsson, institutionen för mark och miljö, SLU  
Biträdande handledare: Thomas Kätterer, institutionen för ekologi, SLU  
Examinator: Anna Mårtensson, institutionen för mark och miljö, SLU

EX0689, Självständigt arbete i biologi – kandidatarbete, 15 hp, Grundnivå, G2E  
Agronomprogrammet – inriktning mark/växt 270 hp

Serienamn: Examensarbeten, Institutionen för mark och miljö, SLU  
2015:09

Uppsala 2015

Nyckelord: organisk fosfor, kalkning, pH, mineralisering, fosfatas

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>



## Abstract

The use of phosphorus within today's intensive farming, represents a future challenge that grows as the world's stores of easily accessible phosphate minerals are being depleted. At the same time, large amounts of organic matter is annually returned to the world's arable land, organic matter whose mineralization contributes to the plant nutrition supply of the subsequent crop. Several studies have evaluated and reported effects of liming on the solubility of inorganic phosphorus in soil. Current pH and liming recommendations are based on the findings in these studies. In what way liming affects the mineralization of organic phosphorus is, by contrast, less well known. The purpose of this study was to determine what effects the three different levels of liming (unlimed, and liming to 70 % and 100 % base saturation, respectively), combined with three PK-levels and two different harvest-residue treatments, had had on the mineralization of organic phosphorus under long-term field conditions. Soil samples from the 'permanent liming' field trial at Röbbäcksdalen close to Umeå in northern Sweden, were analyzed in terms of organic phosphorus content ( $P_{org}$ ), using Saunders and Williams ignition method, and soil organic carbon (C) and nitrogen (N), by dry combustion in a C:N-analyzer. An analysis of variance was performed to test the effects of liming on  $P_{org}$ , organic C and N contents.

Liming affected the  $P_{org}$  content, which was higher in limed than in unlimed plots. Yet, there were no effects of liming on C and N contents. This resulted in lower C: $P_{org}$  ratios in the limed plots. The P flows and pools in the soil of Röbbäcksdalen were estimated based on management information and unpublished results from the field trial. These showed that the limed plots received more PK-fertilizer than the unlimed ones. Mass balance considerations indicates that this was the likely cause why the pool of  $P_{org}$  was larger in the limed treatments. However, soil carbon content was similar cross the lime treatments, even though more harvest residues had been returned in the limed plots because of a higher yield there. Therefore, it cannot be ruled out that the mineralization rate has been higher in limed plots. Furthermore, the analysis of variance showed a strong influence of the block factor, with effects on soil organic carbon, nitrogen and the C: $P_{org}$  ratios. The results do not confirm that liming would increase the P mineralization.

*Keywords:* Organic phosphorus, liming, pH, mineralization, phosphatase.

## Sammanfattning

Fosforanvändningen inom det högtintensiva växtodlingssystemet utgör en framtida utmaning som växer i takt med nyttjandet av de begränsade tillgångarna utav brytbar råfosfat i världen. Samtidigt till- och återförs världens åkermark årligen stora mängder organiskt material, vars mineralisering utgör ett väsentligt tillskott till grödans fosforförsörjning. Kalkning har i flera studier visat sig ha effekt på löslighet och växttillgänglighet av oorganisk fosfor, vilket lagt grunden till rådande pH- och kalkningsrekommendationer. Hur kalkning påverkar mineraliseringen av organisk fosfor är däremot mindre känt. Syftet med denna studie har varit att undersöka vilka effekter olika kalkningsnivåer (okalkat och kalkning till 70 respektive 100 % basmättnad) kombinerat med tre gödslingsnivåer samt olika skörderesthantering, haft på mineraliseringen av organisk fosfor i fält under en längre tidsperiod. Jordprov från det permanenta kalkningsförsöket i Röbbäcksdalen, Umeå i norra Sverige, har analyserats med avseende på halten organisk fosfor ( $P_{org}$ ), enligt Saunders och Williams inaskningsmetod, samt organiskt kol och kväve enligt torrbränning i C:N-analysator. Kalkningens effekter på dessa halter testades genom variansanalys.

Kalkningen påverkade halterna av organisk fosfor, som var högre i kalkade led än i okalkade. Några effekter av kalkning på kol- och kvävehalterna kunde inte ses vilket gav lägre C: $P_{org}$ -kvoter i kalkade led. Med hjälp av opublicerade försöksdata och statistik från försöket beräknades en fosforbalans. Den visade bland annat att kalkade rutor fått högre P-gödsling än okalkade vilket med stor sannolikhet även förklarar uppbyggnaden av de större organiska fosforpoolerna i de förstnämnda. Det kan dock inte uteslutas att nettomineraliseringen varit större i kalkade led då kolhalten förhållit sig lika mellan kalkningsbehandlingarna samtidigt som det förefaller troligt att mer kol återförts kalkade rutor, där skörden varit större, än okalkade. Variansanalysen visade vidare att rutornas fördelning i fält hade stor effekt på främst kolhalt (C %) och indirekt C:N och C: $P_{org}$ -kvoterna. Försöksresultatet styrker inte tesen att kalkning skulle öka fosformineraliseringen.

*Nyckelord:* Organisk fosfor, kalkning, pH, mineralisering, fosfatas.

# Innehållsförteckning

<b>Förkortningar</b>	<b>6</b>
<b>1 Inledning</b>	<b>7</b>
1.1 Fosfor i odlingssystemet	7
1.2 Syfte	9
<b>2 Bakgrund</b>	<b>10</b>
2.1 Fosfor i marken	10
2.2 Fosfor i växten och markens mikrobbiomassa	11
2.3 Organiska fosforformer i marken	13
2.4 Mineralisering av organisk fosfor	14
2.4.1 C:P-kvotens betydelse för mineraliseringen	14
2.4.2 Enzymer och mineralisering	15
2.4.3 Enzymaktivitet och pH	16
2.5 Metodik för mätning av organisk fosfor	19
2.6 Frågeställning och hypotes	20
<b>3 Material och metoder</b>	<b>22</b>
3.1 De permanenta kalkningsförsöken	22
3.2 Bestämning av P <sub>org</sub> i R3-1002	23
3.3 Kol- och kväveanalyser	24
3.4 Resultatbearbetning	24
<b>4 Resultat</b>	<b>25</b>
4.1 Kol, kväve och fosfor i organiskt material	25
4.2 Kvoterna C:N, C:P <sub>org</sub> och N:P <sub>org</sub>	25
<b>5 Diskussion</b>	<b>30</b>
5.1 Fosforbalans	30
5.2 Omsättningen av P <sub>org</sub>	31
<b>6 Slutsatser</b>	<b>35</b>
<b>Referenslista</b>	<b>36</b>

## Förkortningar

$P_{\text{org}}$  – Organisk fosfor  
 $P_{\text{oorg}}$  – Oorganisk fosfor  
 $P_{\text{total}}$  – Total fosfor

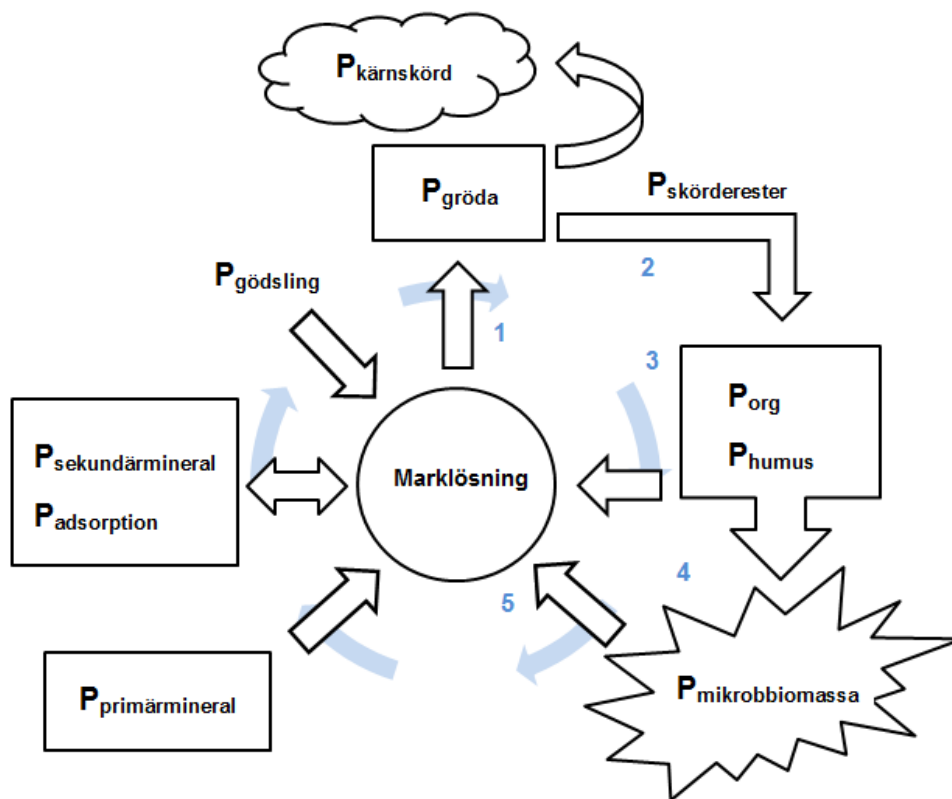


# 1. Inledning

## 1.1 Fosfor i odlingssystemet

Framtidens fosforförsörjning inom den moderna högintensiva växtproduktionen har blivit en allt mer aktualiserad fråga, inte minst med tanke på världsmarknadens kraftiga uppvärdering av fosfatmalm sedan 2007. Brytning av fosfatmalm är idag geografiskt koncentrerad till främst tre länder: USA, Kina och Marocko (Stewart et al., 2005), vilket också gör jordbrukets beroende av råfosfat politiskt intressant. Flera nya system och metoder för en säker återförsel av fosfor i hushållsavfall och avloppsslam till åkermarken är under utveckling och under 2013 kommersialiserades ett av dessa vid reningsverket i Slough, London, där ett nytt processteg installerades för att fälla ut och pellettera näringsämnet (Thames Water, 2013). Insikten om fosforanvändningens miljöpåverkan har också vuxit och förslag på riktlinjer för ett framtida hållbart utnyttjande av tillgången utformats, senast i Naturvårdsverkets (2013) utredning *Hållbar återföring av fosfor*.

Det antropogena odlingssystemet kännetecknas av hög intensitet med återkommande störningar och ett väsentligt flöde av makronäring, däribland fosfor, in i och ut ur systemet. En del av den fosfor som tas upp av grödan (1 i figur 1), återförs marken som skörderester (2). Dessa utgör ett viktigt flöde i recirkulationen av växtnäring i åkermark och skörderesternas inre ämnessammansättning har stor betydelse dess biotillgänglighet (3). I marken nedbryts det organiska materialet av mikroorganismer genom utsöndrandet av enzymer (4). Produkten är lösta fosfater som återförs marklösningen (5).



Figur 1. Fosforflöden och pooler i odlingsystemet.

Som ett steg på vägen mot en mer effektiv och hushållande användning av näringsämnet har mycket arbete lagts ned på att kartlägga fosforflöden i mark och vatten. Mycket forskning har specifikt riktats mot jordbrukssystemet och de kemiska och fysikaliska faktorer som påvisats påverka fosfors omsättning och tillgänglighet i åkermark. Redan på 1940-talet rapporterade Gardner & Kelley (1940) om hur fosfors löslighet var pH-beroende. Vidare presenterade Ghani & Aleem (1942) hypotesen att kalkning kunde påverka nedbrytningen av organisk fosfor. Trots den uppsjö av studier som utförts på området sedan dess, är kunskapen om hur pH-förändringar påverkar mineraliseringen av organisk fosfor begränsad. Störst intresse har istället lagts på mineralfosforgödselmedlens löslighet i markvätskan vid varierande pH, då frågan ur ekonomisk synvinkel i högre grad varit motiverad.

I visionen om framtidens uthålliga jordbruk förutsätts att resursen fosfor nyttjas optimalt i alla odlingsystemets steg. Hur kalkning påverkar

omsättningshastigheten av den stora mängd organiskt material, som årligen till- och återförs jordbruksmarken, är av samma anledning värd att utreda.

## 1.2 Syfte

Syftet med studien är att undersöka eventuella samband mellan å ena sidan kalkning, å andra sidan mineralisering av organisk fosfor i jordbruksmark. Syftet är att studera de långsiktiga effekterna av kalkning på fosformineraliseringen i jordprov från det permanenta kalkningsförsöket i Röbbäcksdalen, *R3-1002 AC-2-1962*.

## 2. Bakgrund

### 2.1 Fosfor i marken

Fosfor utgör det elfte vanligaste elementet i jordskorpan och är ett icke-metalliskt grundämne. Ämnet är essentiellt för allt biologiskt liv och cirkulerar i ett biogeokemiskt kretslopp i vilket ett flertal olika organiska och oorganiska former kan antas. I naturligt tillstånd tillförs ekosystemet fosfor främst genom primärmineralet apatits vittring (Šarapatka, 2003). Vid höga eller låga pH och samtida förekomst av lösligt  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  eller  $\text{Ca}^{2+}$ , kan marklösningens fosfat,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  och  $\text{HPO}_4^{2-}$ , fällas ut som de sekundära mineralen variscit, strengit och oktakalciumfosfat (Pierzynski et al., 2005). De primära och sekundära markmineralen utgör en under normala markkemiska förhållanden stabil lagringsform, och har i regel låg tillgänglighet och omsättbarhet. I en jord kan upp till 80-90 % av markens totala fosfor vara bunden i svårösliga och stabila former (Šarapatka, 2003).

Marklösningens fosfat kan även adsorberas till oxid- och hydroxydytor med  $\text{Al}^{3+}$  och  $\text{Fe}^{3+}$  från vilkas ytor de genom anjonbyte kan frigöras (Reddy & DeLaune, 2008). De lösta fosfaterna i markvätskan förekommer i regel i mycket låga koncentrationer och utgör sällan mer än en procent av ämnets totala förekomst i marken (Pierzynski et al., 2005). Då halten av lösta fosfater i markvätskan är mycket låg, är konkurrensen om  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  och  $\text{HPO}_4^{2-}$  stor mellan växter och mikroorganismer som absorberar fosfaterna ur marklösningen och använder dem i sina biokemiska livsprocesser.

En väsentlig del av markens fosfor kan förekomma i organisk form, upp till 50 % i icke-organogena jordar (Saunders & Williams, 1955) och över 90 % i organogena (Stevenson, 1994). Vid sidan av vittrings- och desorptionsprocesserna utgör mineraliseringen av organisk fosfor en viktig omsättningsfaktor av ämnet i åkerjord (Dick, 1980; Condon et al., 1990; Oehl et al., 2001).

## 2.2 Fosfor i växten och markens mikrobbiomassa

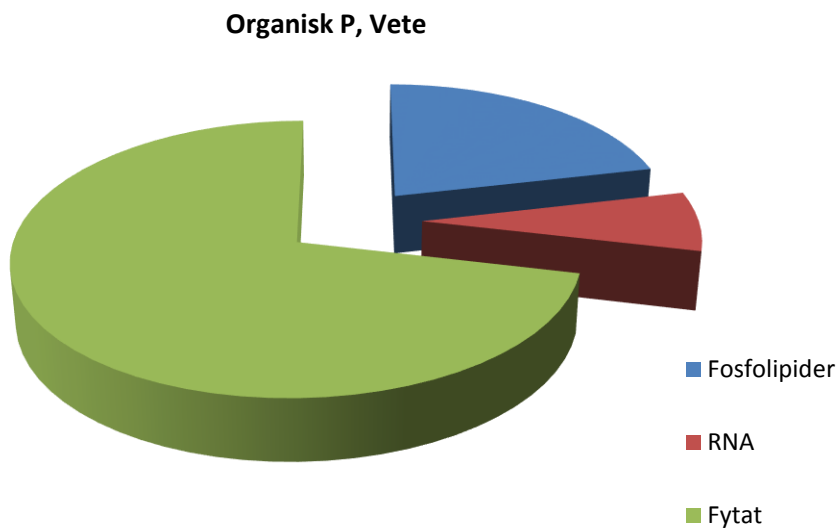
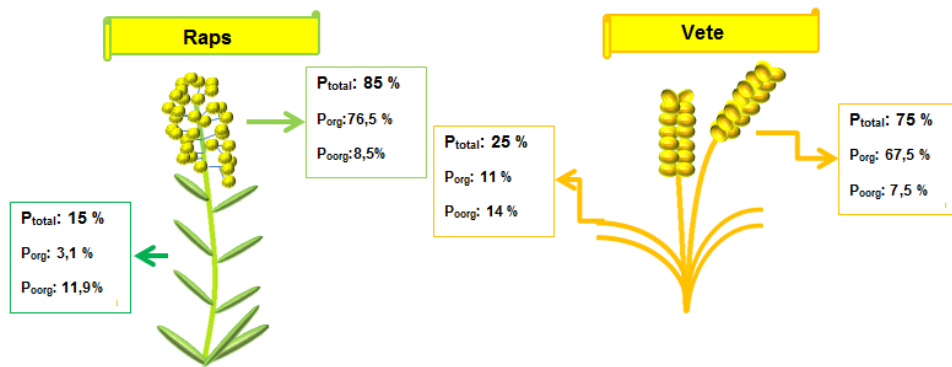
Fosfor räknas som ett av 17 grundämnen som är essentiella för växters tillväxt och utveckling (Campbell and Reece, 2009). Näringsämnet utgör ca 0,2 % av torrsubstansen hos den landlevande vegetationens biomassa (Schachtman et al., 1998) och i regel något större andel hos vattenlevande växter (McJannet et al., 1995). I jordbruksgrödan varierar fosforinnehållet stort mellan olika delar av plantan beroende på gröda, näringstillgång och utvecklingsstadium. Vid fysiologisk mognad av en vetegröda sker en translokering av fosfor inom plantan. Det kan resultera i att upp till 80-90 % av det totala fosforinnehållet i växten allokeras till kärnorna och att endast 10-20 % återstår i de s.k. skörderesterna (Damon et al., 2014; Noack et al., 2014). Även fördelningen mellan  $P_{org}$  och  $P_{oorg}$  förändras med grödans utveckling: vid skörd är 40-60 % av skörderesternas fosforinnehåll oorganiskt jämfört med 60-80 % under grödans vegetativa faser (Damon et al., 2014).

Noack et al. (2014) analyserade fosforinnehållet i vete och raps i ett gödslingsförsök (figur 2) och fann att de kvantitativt viktigaste formerna var ortofosfater, fosfolipider, RNA, pyrofosfat, fosfatestrar och fytat. Fytat eller fytinsyra, som är den primära organiska lagringsformen av fosfor i spannmålskärnan, utgjorde 37 % respektive 60-85 % av  $P_{total}$  i vete- och rapsfrökärnorna. Fytathalten i vetekärnorna påverkades inte av fosforgivans storlek men steg med fosfortillförseln i rapsfröna. Fosfatestern glycerolfosfat utgjorde den näst vanligaste organiska fosfatkomponenten i vete- och rapsfrökärnorna. I rapsfröna varierade halterna av glycerolfosfat med fosforgivan, från 30 % av den totala  $P_{org}$  (låg P-giva) till 11 % (hög P-giva). I övriga delar av plantan dominerade  $P_{oorg}$  som utgjorde 56 % av  $P_{total}$  hos vete respektive 79 % hos raps. I en tidigare studie (Noack et al., 2012) undersöktes motsvarande fördelning hos ytterligare ett antal spannmålsgrödor. Resultaten visade på ett innehåll av  $P_{oorg}$  i skörderesterna på mellan 40 och 70 %.

Fosfat som från markvätskan absorberats av mikroorganismer byggs in i mikrobernas biomassa. Fosforinnehållet i mikroorganismer varierar från 1,5–2,5 % (bakterier) till 5 % (svampar) (Reddy & DeLaune, 2008). Fosfor används främst för att syntetisera nukleinsyror och i mikrobbiomassan kan över 85 % av fosfor vara organisk (Stewart & Tiessen, 1987).

Mikrobbiomassans ämnessammansättning uttrycks ofta i s.k. näringskvoter, däribland C:P. Kvoten visar på vilket massförhållande som råder mellan kol och fosfor i mikrobbiomassan eller i det substrat som nedbryts. Det finns en stor variation i rapporterade C:P-kvoter i mikrobiell biomassa som spänner från 10:1

(Damon et al., 2014) till 333:1 (Kirkby et al., 2011). C:P-kvoten i markens samlade mikrobbiomassa påverkar omsättningen av dött organiskt material och huruvida fosfor mineraliserar eller immobiliserar sker.



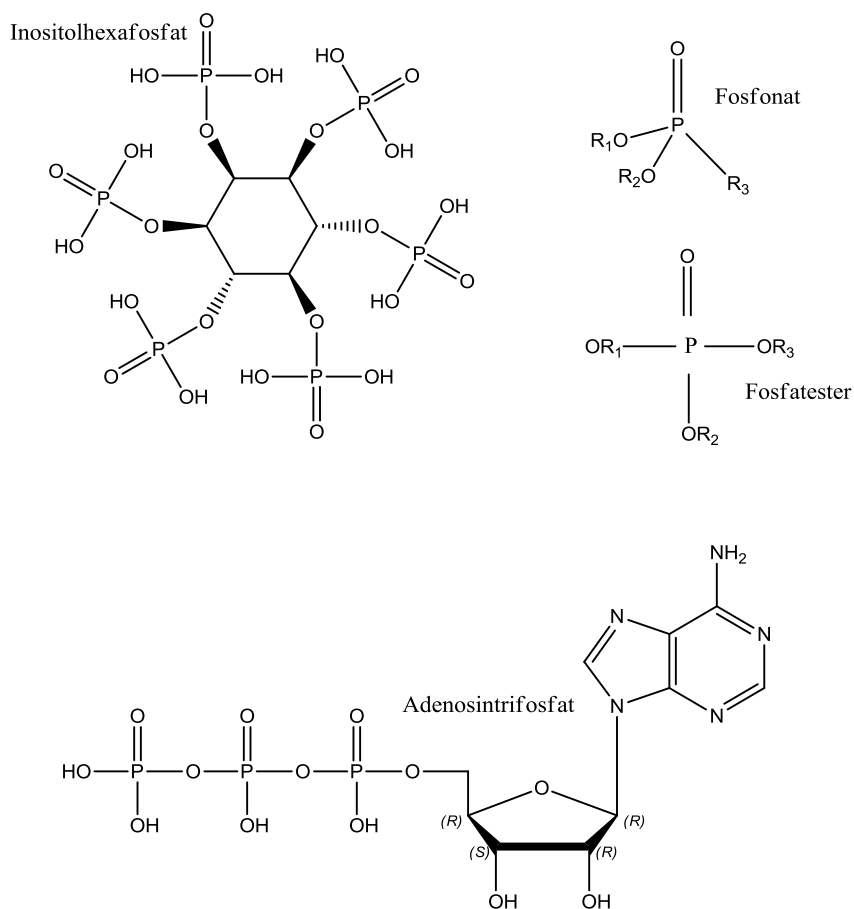
Figur 2. Fördelning mellan organiska och oorganiska fosfatföreningar i fysiologiskt mogna vete- och rapsplanter, samt inbördes fördelning av de tre kvantitativt största organiska fosfaterna i vetets skörderester. Efter Noack et al. (2014)

## 2.3 Organiska fosforformer i marken

Markens organiska fosfater kan indelas i tre huvudgrupper: ortofosfatestrar, fosfonater och anhydrider (figur 3) beroende på hur fosfatmolekylen sitter bunden till de organiska komponenterna (Condrón et al., 2005). Fosfatestern utgörs av en förestrad fosforsyramolekyl med en eller flera esterbindningar. Fosfatmonoester benämns den ester där fosfatmolekylen binds med en esterbindning, medan den i en diester har två och i en triester tre esterbindningar (Condrón et al., 2005). Dessa tre typer utgör undergrupper av fosfatestrar och representeras av en rad mer eller mindre vanligt förekommande organiska fosfater i marken. Inositolfosfater, däribland fytinsyra, är vanligt förekommande monoestrar i marken och kan utgöra en mycket stor andel av den totala mängden  $P_{org}$  (Schachtman et al., 1998; Turner et al., 2003). Fytinsyra, som är en viktig organisk lagringsform i jordbruksgrödan, tillförs marken bland annat då skörderester lämnas kvar i fält. Ortofosfat-diestrar förekommer i regel i väsentligt lägre koncentrationer än monoestrarna och utgör sällan mer än 10 % av  $P_{total}$  (Condrón et al., 2005). Kvantitativt viktiga diestrar är nukleinsyror DNA och RNA samt fosfolipider. De utgör 0,2-2,5 % respektive 1-5 % av  $P_{total}$  i marken. I mikrobiomassa kan hälften av  $P_{total}$  utgöras av nukleinsyror (Reddy & DeLaune, 2008).

Fosfonater är organiska fosfater med en direkt kol-fosforbindning (Kononova & Nesmeyanova, 2002) och har spårats i låga halter i mikroorganismer och i marken (Koukol et al., 2008). 2-aminoetyl-fosfonsyra är den vanligast naturligt förekommande fosfonaten och återfinns i cellmembraners lipider (Hilderbrand et al., 1973). I marken är fosfonaterna p.g.a. sin låga koncentration svåra att uppmäta och bestämma, vilket Newman & Tate (1980) var först ut att lyckas med. Anhydriderna ATP, *adenosintrifosfat*, och ADP, *adenosindifosfat*, används för energiöverföring i cellen. Anhydriden är till strukturen uppbyggd av ortofosfatenheter som binds samman med anhydridbindningar (Condrón et al., 2005).

Biotillgängligheten hos de olika förekommande formerna varierar med de strukturmässiga egenskaperna. Generellt är diestrar mer lättnedbrytbara än monoestrar, vilka kan binda starkt till mineralpartiklar i marken och på så sätt göras otillgängliga för mikroorganismer. Denna adsorptionsbenägenhet hos fosfatmonoestrar ökar med antalet ortofosfatgrupper som sitter bundna i varje molekyl (Celi et al., 2000). Detta innebär att inositolhexafosfat är mer adsorptionsbenägen än monoestrar, som glukosfosfater, med endast en fosfatgrupp. Nukleinsyror och fosfolipider räknas som lättnedbrytbara föreningar och glukosfosfat som relativt lättnedbrytbar, medan den mer stabila fytinsyran räknas som svår (Šarapatka, 2003).



Figur 3. Strukturformler för inositolhexafosfat och adenosintrifosfat samt generell struktur för fosfonat och fosfater.

## 2.4 Mineralisering av organisk fosfor

### 2.4.1 C:P-kvotens betydelse för mineraliseringen.

Mineraliseringen av organisk fosfor styrs i hög grad av den mikrobiella aktiviteten i marken (Šarapatka, 2003). Svampar och bakterier använder kol i de organiska fosforföreningarna för sin respiration och frigör samtidigt fosfatjoner. Då kol utgör en av de mest begränsande faktorerna för mikrobbiomassans tillväxt (Bünemann et al., 2004), har C:P-kvoten stor betydelse för huruvida det mineraliserade fosfatet förblir löst eller byggs in i nya organiska former (Stevenson & Cole, 1999). Är fosforinnehållet i det organiska materialet större än mikroorganismernas behov,



sker en nettomineralisering, och vid det omvända en nettoimmobilisering där lösta fosfater tas från marklösningen (Damon et al., 2014). Enligt Stevenson (1994) sker en nettomineralisering av substratets  $P_{org}$  vid C:P-kvoter  $<200$ , nettoimmobilisering vid kvoter  $>300$ , medan jämviktsläge råder för kvoter i intervallet 200-300 (se tabell 1).

Tabell 1. Hur C:P-kvoter påverkar huruvida mineralisering eller immobilisering sker. Efter Stevenson (1994)

C:P kvot	$<200$	200-300	$>300$
Mineralisering/ immobilisering	Nettomineralisering	Varken nettomineralisering eller immobilisering	Nettoimmobilisering

## 2.4.2 Enzymer och mineralisering

För att bryta bindingarna i de organiska molekylerna och utvinna den bundna näringen utsöndrar svampar, bakterier och växtrötter enzymer som katalyserar nedbrytningsprocesser av  $P_{org}$  (Dick, 1980; Tate, 1995; McLatchey & Reddy, 1998). De extracellulära enzymer som frisätts i cellens omgivning, bryter ester- och anhydridbindningar i  $P_{org}$  (Nannipieri et al., 2011) och spelar en viktig roll i omsättningen av  $P_{org}$  i marken (Dick, 1980). Enzymerna katalyserar reaktionerna enligt följande generella modell (Stevenson & Cole, 1999):



Den gemensamma benämningen på de enzymer som på detta sätt omvandlar  $P_{org}$  till  $P_{org}$  är hydrolaser (Nannipieri et al., 2011). Hydrolaser kan vidare indelas i undergrupper beroende på vilken typ av kemisk struktur de bryter. Två särskilt viktiga sådana grupper är esteraser och anhydridhydrolaser. De olika enzymerna har enligt *The Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* tilldelats ett EC-nummer beroende på vilken typ av reaktion de katalyserar (se tabell 2). Bland esteraterna återfinns fosfater (EC 3.1.3) som delas in i sura fosfater (EC 3.1.3.2) och basiska fosfater (EC 3.1.3.1). En annan typ av esterater är fytas (*myo-inositol-hexakisfosfat-fosfohydrolas*), som är ett samlingsnamn för två enzymer som katalyserar hydrolysen av fytinsyra (EC 3.1.3.8 och EC 3.1.3.26). Bland esteraterna återfinns också fosfodiesteras (EC 3.1.4.X). Anhydrid-hydrolaserna grupperas under EC 3.6.1.X.

### 2.4.3 Enzymaktivitet och pH

De enzymer som närvarar i marken ger upphov till en aktivitet – enzymaktivitet. Enzymaktiviteten definieras som den hastighet med vilken enzymet katalyserar substratets hydrolys, d.v.s. antal reaktioner per tidsenhet. Enzymaktiviteten i en jord har i många studier visat sig vara av stor betydelse för mineraliseringens hastighet. Bland annat rapporterade Tarafdar & Jungk (1987), McLatchey & Reddy (1998) och Chen et al. (2002) signifikant positiva samband mellan enzymaktivitet och mineralisering.

Enzymaktiviteten påverkas av rådande markförhållanden (Nannipieri et al., 2011), bland annat substrat, tillgängligt porvatten, temperatur och pH (Martínez, 1968; Haynes & Swift, 1988; Śarapatka, 2003). Speir & Cowling (1991) pekade på den oorganiska fosfors betydelse för aktiviteten och visade att aktiviteten var högre för sura fosfomonoesteraser vid låg koncentration av oorganisk fosfor i marken och tvärtom vid hög. Hur markens pH påverkar olika enzyms aktivitet har varit föremål för ett stort antal studier. Variationerna enzymtyper emellan har visat sig vara mycket stora, så även bland de hydrolaser som katalyserar nedbrytningen av  $P_{org}$  (tabell 2).

Som namnen antyder, uppvisar sura och basiska fosfataser aktivitetsoptimum vid olika pH. De sura fosfataserna dominerar i aktivitet vid låga till mycket låga pH, då de basiska fosfatasernas aktivitet är närmast obefintlig (Eivazi & Tabatabai, 1977; Margesin & Schinner, 1994; Ekenler, 2002). Även fytaser kan benämnas som sura, neutrala eller alkaliska beroende på vid vilket pH aktiviteten är som störst (Mullaney & Ullah, 2003). pH-optimum för sura och neutrala fytaser (2.5–7.0) har rapporterats av bland annat Wyss et al. (1999). Generellt ger svampar upphov till merparten av fytasaktiviteten vid låga pH (2.5–6.0), bakterier vid neutrala till alkaliska (Vats & Banerjee, 2005). Fosfodiesteraser uppvisar hög aktivitet i ett mycket brett pH-intervall (4.5–9.5), med en stark korrelation mellan aktivitet och pH (Nannipieri et al. 2011).

Då enzymer förekommer i olika hög utsträckning i marken och uppvisar aktivitetsoptimum vid olika pH, förefaller inte mineraliseringsutfallet självklart vid en pH-förändring. Enzymer vars aktivitet gynnas i ett pH-intervall, missgynnas i ett annat. Ekenler (2002) kunde rapportera ett negativt samband mellan pH och sura fosfatasers aktivitet, och ett positivt sådant mellan pH och basiska fosfataser samt fosfodiesteras. Resultaten ligger i linje med de aktivitetsoptimum som i tidigare försök bestämts. Sjöqvist (1995) rapporterade liknande utfall i enzymaktivitet för sura och basiska fosfataser i jordprover från ett permanent kalkningsförsök i norra Sverige (Röbäcksdalen).

Hur förändringar i pH kan påverka mineraliseringen undersöktes av Halstead et al. (1963) i sura jordar från östra Kanada. Resultatet pekade på ett positivt samband mellan kalkning och mineralisering av  $P_{org}$ . Trasar-Cepeda et al. (1991) utförde ett liknande försök där även enzymaktiviteten studerades när en spansk andisol kalkades upp från pH 5.0 till 5.5, 6.0 och 6.5. Några korrelationer mellan fosfatasaktivitet och mineralisering kunde inte rapporteras, inte heller någon nämnvärd ökning i mineralisering i prover kalkade till pH 5.5 och 6.0. Dock kunde en signifikant omsättningsökning av  $P_{org}$  ses i prover kalkade till 6.5, om än inte korrelerade med fosfatasaktiviteten.

Tabell 2. Vanliga hydrolaser: Reaktioner de katalyserar, substrat de hydrolyserar och pH-optimum.

EC-beteckning	Enzym	Exempel på substrat	Reaktion	pH-optimum	Referens
EC 3.1.3.1	Basiska fosfater	Fosfat-monoestrar	${}^1) OP(O^-)_2(OR) + H_2O \rightarrow R-OH + HPO_4^{2-}$	9 – 11	Ekenler, 2002; Stevensson & Cole, 1999
EC 3.1.3.2	Sura fosfater	Fosfat-monoestrar	${}^2) OP(O^-)_2(OR) + H_2O \rightarrow R-OH + HPO_4^{2-}$	4.0 – 6.5	Ekenler, 2002; Margesin & Schinner, 1994
EC 3.1.3.8 och EC 3.1.3.26	Fytas, myo-inositol-hexakisfosfat-fosfohydrolas	Fytinsyra (inositol hexakisfosfat)	Inositol hexakisfosfat + 6H <sub>2</sub> O → Inositol + 6HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	2.5 – 7.0	Stevenson, 1994; Wyss et al. 1999
EC 3.1.4.X	Fosfodiesteras	Nukleinsyror, fosfolipider	$OP(OH)(OR)_2 + H_2O \rightarrow R-OH + OP(OH)_2(OR)$	4.5 – 9.5	Ekenler, 2002; Nannipieri et al., 2011
EC 3.6.1.X	Sura anhydrid hydrolaser	ATP, ADP	$ATP + H_2O \rightarrow AMP + P_2O_7^{4-} \rightarrow P_2O_7^{4-} + H_2O \rightarrow 2 HPO_4^{2-}$	-	Lehninger et al., 1993

<sup>1 & 2)</sup> Protoneringsgrad följer Ekenler, 2002.

## 2.5 Metodik för mätning av organisk fosfor

Under årens gång har behovet av metoder för att bestämma organisk fosfor i jord blivit större. Ett flertal metoder har utvecklats sedan 1950-talet för att på olika sätt lösa ut organiskt bunden fosfor ur jordprover. Följande korta introduktion i ämnet baseras på en metodutvärdering av Condron et al. (1990).

De idag främst vedertagna mätmetoderna kan indelas i två huvudtyper beroende om de i huvudsak bygger på extraktion eller inaskning. Extraktionsmetoderna inkluderar Anderson-Mehta-metoden och Bowmans extraktionsmetod. Anderson (1960) lanserade en modifierad variant på en ursprunglig extraktionsmetod av Mehta et al. (1954), hädanefter benämnd Anderson-Mehta-metoden. Den gick ut på att jordprov skakades med 0,3 M NaOH under 16 timmar, följt av centrifugering, extraktion med 11,3 M HCl och ytterligare skakning med NaOH. Innehållet av  $P_{\text{org}}$  i proven antogs vara summan av  $P_{\text{org}}$  i de sura och basiska extrakten. I Bowmans metod (Bowman, 1989) ersattes HCl med 18 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  och två skakningar med NaOH blev en. Likt Anderson-Mehta-metoden antogs  $P_{\text{org}}$  vara summan av  $P_{\text{org}}$  i de båda extraktionslösningarna.

Inaskningsmetoden utvecklades av Saunders & Williams (1955) och är än idag den mest tillämpade vid bestämning av  $P_{\text{org}}$ . Metoden går ut på att jordprovet extraheras med  $\text{H}_2\text{SO}_4$  med eller utan en timmes föregående bränning ( $550^\circ\text{C}$ ). Differensen i koncentration P mellan extrakten från de brända och obrända proverna antas vara  $P_{\text{org}}$ .

Condron et al. (1990) utvärderade i ett eget mätförsök de tre metoderna (Anderson-Mehta, Bowman och Saunders & Williams) med jordprover från nordöstra Brasilien, Ghana och Västafrika. Jordmånerna var av olika slag men typiska för tropikerna och alla starkt vittrade. Resultaten visade på små skillnader i uppmätta fosforvärden mellan extraktionsmetoderna Anderson-Mehta och Bowman. Mätvärdena vid användandet av Saunders & Williams inaskningsmetod var signifikant högre jämfört med de båda extraktionsmetoderna och Condron et al. (1990) tolkade resultatet som att inaskningsmetoden innebar en konsekvent överskattning av  $P_{\text{org}}$ .

Tidigare invändningar mot inaskningsmetoden presenterades av Dormaar & Webster (1964) som studerade hur bränningstemperaturen påverkade mätresultatet. Två av de felkällor som pekades ut var risken för ofullständig förbränning av kolföreningar och bildandet av svårlösliga fosfatföreningar. Beaktas ska dock att de jämförda extraktionsmetodernas träffsäkerhet inte fullt ut

kan fastställas, då även extraktioner kan ske ofullständigt (Williams et al., 1970). Den främsta invändningen mot kritiken är att det faktiska innehållet av  $P_{org}$  är okänt, och att det med andra ord därför är svårt att avgöra vilken metod som ger mest korrekt resultat.

I en studie från 1967, framlade Williams & Walker (1967) hypotesen att en ökad löslighet av  $P_{oorg}$  i mätlösningarna efter inaskning, kunde vara kopplad till ökad vittringsgrad. I metodutvärderingen av Williams et al. (1970) analyserades jordprover från Nya Zeeland, där även vittringsgradens inverkan på mätresultatet testades. En av slutsatserna var att den relativt ökade lösligheten  $P_{oorg}$  efter inaskning, jämfört med de extraherade proverna, minskade med minskad vittringsgrad. En eventuellt ökad löslighet  $P_{oorg}$  torde därför inte utgöra en större faktor vid mätning av jordprover från Sverige enligt Saunders & Williams (1955), då våra svenska jordmåner får anses mycket unga i sammanhanget.

## 2.6 Frågeställning och hypotes

Mineraliseringen av organisk fosfor ( $P_{org}$ ) är en komplex nedbrytningsprocess som i huvudsak drivs av den markbiologiska aktiviteten. Utöver mikrobbiomassan och växtrötternas efterfrågan på växtnäring framhäver litteraturen även fysikaliska och kemiska förutsättningar som faktorer av betydelse för omsättningen av  $P_{org}$ . I ett flertal studier har man undersökt hur mineraliseringen påverkas av kalkning och pH-förändringar. Den ovan citerade studien av Trasar-Cepeda et al. (1991) rapporterade således att kalkning gynnade enzymaktiviteten, men kunde inte koppla den ökade fosfatasaktiviteten till en ökad mineralisering. Sjöqvist (1995) drog samma slutsatser med avseende på kalkningens aktivitetseffekt på sura och basiska fosfataser, men undersökte aldrig huruvida dessa förändringar återspeglades i mineraliseringen. Halstead et al. (1963) fann i inkubationsförsök att kalkning ökade mineraliseringen av organisk fosfor i prover från sura jordar i Kanada. Kalkning och medföljande pH-effekter simulerades i laboratorium.

Det finns med andra ord anledning att tro att kalkning har en positiv effekt på mineraliseringen av organisk fosfor, åtminstone under de korta till några månader långa tidsrymder som varit gällande i ovan nämnda försök. Hur kalkning under en längre tid, under fältmässiga förhållanden, påverkar omsättningen av organisk fosfor är däremot okänt.

Arbetshypotesen för denna studie har varit att kalkning har en effekt på mineraliseringen av  $P_{org}$ . Denna effekt förväntas ses genom haltbestämningar av kol (C %) och organisk fosfor ( $P_{org}$  %) i jordar som kalkats olika mycket och yttra sig i:

- 1) en lägre halt av organisk fosfor ( $P_{\text{org}}$  %) i kalkade jämfört med okalkade jordar.
- 2) att också kolhalten (C %) minskar med ökade kalkningsgivor.

För det praktiska mätarbetet bedömdes Saunders & Williams (1955) inaskningsmetod ge ett tillfredställande resultat för ändamålet, då de relativa halterna i försöksled med olika kalkbehandling är av störst betydelse. Haltbestämningarna har skett i jordprov från ett permanent kalkningsförsök i Rübäcksdalen, Umeå.

## 3. Material och metoder

### 3.1 De permanenta kalkningsförsöken

År 1962 startades ett nytt långliggande fältförsök i Röbbäcksdalen, *R3-1002 AC-2-1962*, med syftet att undersöka de långsiktiga effekterna av ett antal olika kalknings- och gödslingsbehandlingar. Försöksplatsen (63°48'28.1"N 20°14'36.8"E) är belägen ca 2 km söder om centrala Umeå, och jordarten på platsen är en svagt lerig mo, med ursprungs-pH 5.0 (Simán, 1985).

Tabell 3. En överblick över försökets olika behandlingar och vilka försöksrutor de omfattar

Kalkning till basmättnad	Skörderester	Ersättning PK	Försöksrutor
Okalkat	Återförs	Halv	18, 19, 52
		Hel	17, 20, 53
		Dubbel	16, 21, 54
	Bortförsel	Halv	1, 35, 38
		Hel	3, 34, 39
		Dubbel	2, 37, 36
70 %	Återförsel	Halv	14, 23, 51
		Hel	13, 24, 49
		Dubbel	15, 22, 50
	Bortförsel	Halv	5, 31, 40
		Hel	4, 33, 41
		Dubbel	6, 32, 42
100 %	Återförsel	Halv	10, 27, 47
		Hel	12, 25, 48
		Dubbel	11, 26, 46
	Bortförsel	Halv	9, 30, 45
		Hel	8, 29, 43
		Dubbel	7, 28, 44

Försöket är upplagt som ett trefaktorförsök (tabell 3) där olika nivåer av behandlingar testas med avseende på mullråämne, kalkning och växtnäring (Börjesson, 2014). De två mullråämneshandlingar som förekommer är återförsel (A) eller bortförsel (B) av skörderesterna. Kalkningsnivåerna är I) okalkat, II) uppkalkning till 70 % basmättnadsgrad och III) uppkalkning till 100 % basmättnadsgrad. Växtnäringsnivåerna med avseende på fosfor och kalium fördelar sig på 1) halv ersättning PK, 2) hel ersättning PK och 3) dubbel ersättning PK. Kvävegödslingen varierar med växtföljden. Antalet olika kombinationer



uppgår till  $2 \times 3 \times 3 = 18$  vilka repeteras tre gånger i lika många block, sammanlagt 54 försöksrutor som samtliga undersöktes i denna studie. Underhållskalkning utförs vart fjärde år med kalkstensmjöl (Simán, 1985).

### 3.2 Bestämning av $P_{org}$ i R3-1002

För mätning av  $P_{org}$  i rutvisa prover, hämtade 2012, användes Saunders & Williams (1955) inaskningsmetod. Jordproverna som är tagna på 0-20 cm djup, var lufttorkade, mortlade och siktade (<2 mm).

För extraktionen vägdes 2,00 g lufttorr jord in i porslinsdegler för bränning under en timme i 550°C. Därefter fördes den brända jorden över i 250 ml extraktionsflaskor. Parallellt vägdes 2,00 g lufttorr jord in och fördes över i likadana extraktionsflaskor men utan föregående bränning. Till varje 250 ml extraktionsflaska tillsattes 100 ml 0,1 M  $H_2SO_4$  innan de vändskakades med en hastighet av 16 varv/minut under 16 timmar. Extrakten filtrerades sedan genom filterpapper (Munktell 00H) till 100 ml polyetenflaskor och förvarades i kylrum (5 °C) fram till mätdagen.

För bestämningen av P utfördes en kolorimetrisk analys efter Murphy & Riley (1962). Till 1 ml prov eller standard sattes 33 ml ultrarent vatten (PURELAB Ultra) och 6,4 ml blandreagens i ett 50 ml polypropylenrör. Standarderna innehöll 0, 5, 10, 20 respektive 30mg/l P och både inledde och avslutade mätserien. Standard 10 mg/l P lades även in med åtta provers mellanrum för att undersöka eventuell drift i mät känsligheten.

Blandreagenset bereddes med följande: 2,5M svavelsyra, ammoniumheptamolybdat, 0,1M askorbinsyra och kaliumantimontartrat (tabell 4). Slutligen bestämdes absorbansen vid 880 nm i mätlösningarna med spektrofotometer (SHIMADZU UV-1201V).

Differensen mellan de uppmätta koncentrationerna (bränd/obränd behandling) antogs vara  $P_{org}$ .

Tabell 4. *Ingredienser i det blandreagens som användes vid kolorimetrisk analys av P.*

Kemikalie	Koncentration	Volym till 1000 ml blandreagens
Svavelsyra, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,5 M	500 ml
Askorbinsyra, C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> (OH) <sub>4</sub>	0,1 M	300 ml
Ammoniumheptamolybdat-tetrahydrat, (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> * 4H <sub>2</sub> O	4 g/100 ml H <sub>2</sub> O	150 ml
Kaliumantimon(III)oxidtartrat-hemihydrat, K(SbO)C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> * 0,5H <sub>2</sub> O	0,274 g/100 ml H <sub>2</sub> O	50 ml

### 3.3 Kol- och kväveanalyser

För att få en mer fullständig bild av näringstillståndet i försöksrutorna och se hur förhållandet mellan organisk fosfor (P<sub>org</sub> %), organiskt kol (C %) och kväve (N %) påverkats av försöksplanens tre behandlingar, analyserades kol och kväve i jordproverna genom torrförbränning i en C:N-analysator (Leco, TruMac CN).

### 3.4 Resultatbearbetning

För resultatbearbetningen indelades behandlingar och analysdata i faktorer och variabler. Till faktorerna hör de tre försöksbehandlingarna (skörderesthantering, kalkning och PK-gödning) och den geografiska placeringen av försöksrutorna (blocken). Variablerna omfattar analysdata för halterna av organiskt kol (C %), kväve (N %) och organisk fosfor (P<sub>org</sub> %) samt kvoterna av de tre (C:N, C:P<sub>org</sub> och N:P<sub>org</sub>).

Statistisk resultatbehandling utfördes i Minitab 17 Statistical Software, i vilket en variansanalys (ANOVA), ”General Linear Model” (GLM) gjordes. Där faktorer föll ut som signifikanta (p < 0,05), användes parvisa Tukey-justerade jämförelser med 95 % signifikansgrad för att undersöka vilka behandlingsnivåer som var åtskilda.

Tre jordprov, som gav mätvärden som avvek kraftigt från övriga observationer i materialet, exkluderades ur variansanalysen.

## 4. Resultat

### 4.1 Kol, kväve och fosfor i organiskt material

Variansanalysen visade att skörderesthanteringen hade signifikanta effekter på markens kolhalt (C %,  $p=0,036$ ), som var högre i rutor med återförsel av skörderester (1,90 %) än i rutor med bortförsel (1,75 %) (tabell 5). En än större påverkan kunde ses av blocken ( $p=0,001$ ), med väsentligt högre kolhalt i block 1 (1,99 %) än i block 2 och 3 (1,82 % respektive 1,65 %). Varken kalkning eller PK-gödsling visade sig ha någon effekt på markens kolhalt.

Några signifikanta effekter på kväveinnehållet (N %) kunde inte ses för någon av de fyra faktorerna. Lägst p-värde (0,122) erhöles för skörderestbehandlingarna.

Vad gäller halten organisk fosfor i marken ( $P_{org}$  %), visade variansanalysen på en signifikant effekt ( $p=0,013$ ) av kalkning. De kalkade och okalkade behandlingarna kunde skiljas åt, men inte de olika kalkningsnivåerna till 70 % respektive 100 % basmättnad. De tre övriga faktorerna hade ingen statistiskt säkerställd effekt på innehåll av  $P_{org}$  %.

### 4.2 Kvoterna C:N, C: $P_{org}$ och N: $P_{org}$

I figur 4, 5 och 6 har halterna av kol (C %), kväve (N %) och organisk fosfor ( $P_{org}$  %) vid de tre kalkningsnivåerna okalkat, kalkat till 70 % och 100 % basmättnad, plottats mot varandra. De tre ämnena var olika starkt korrelerade till varandra och kalkningsnivåerna. Högst korrelationskoefficienter fanns mellan kol (C %) och kväve (N %),  $r = 0,96-0,90$  (figur 4) och lägst mellan kol och organisk fosfor,  $r = 0,83-0,45$  (figur 5).

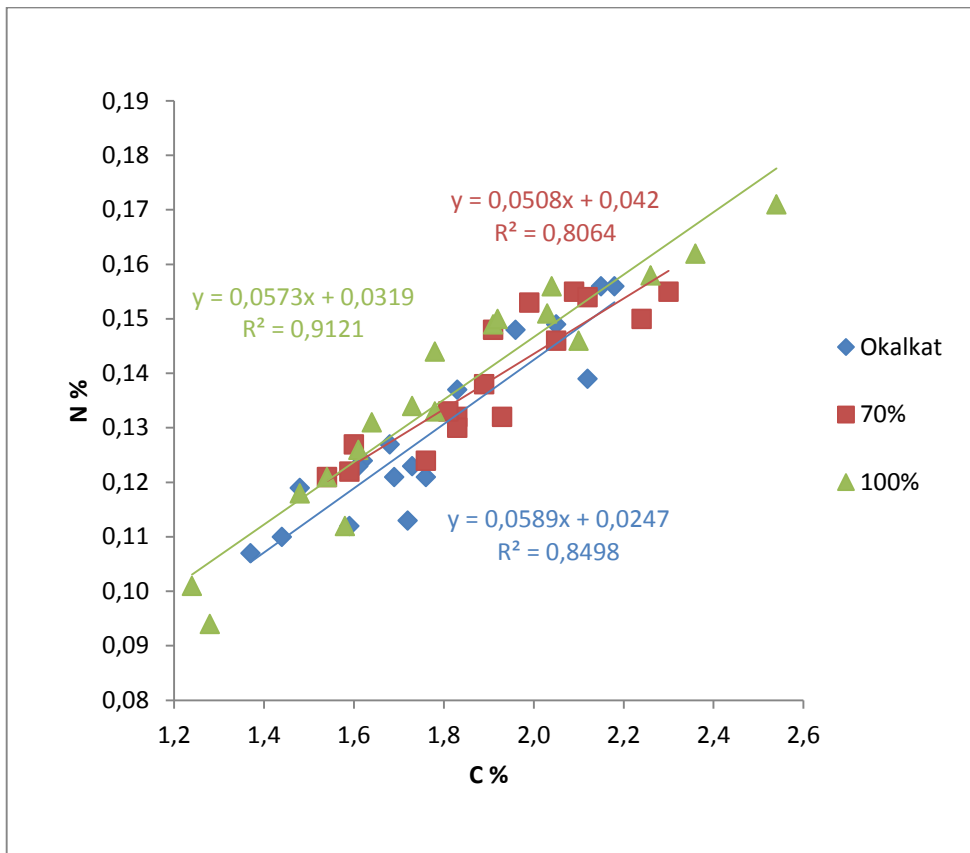
De tre kvoterna av variablerna C %, N % och  $P_{org}$  %, uppvisade var för sig signifikanta effekter av en eller flera av faktorerna i analysen. C:N-kvoten påverkades av flest faktorer, skörderesthantering ( $p=0,012$ ), kalkning ( $p=0,040$ ), blocktillhörighet ( $p=0,000$ ) och försöksrutor med återförsel av skörderester hade signifikant högre C:N-kvot (13,7) än rutor med bortförsel (13,4). Effekten av kalkning på C:N-kvoten hade en måttlig grad av signifikans och rutor kalkade till 100 % basmättnad tenderade att ha en något lägre C:N-kvot än de kalkade till 70 % eller utan kalk. De inbördes skillnaderna mellan kalkningsnivåerna var för små för att Tukey-jämförelsen statistiskt skulle skilja behandlingarna åt.

Tabell 5. Medelvärden av organiskt kol, kväve och organisk fosfor (C %, N % resp. P<sub>org</sub> %) samt kvoterna, C:N, C:P<sub>org</sub> och N:P<sub>org</sub> (masskvoter) för de tre huvudtyperna av behandling samt för blocken. För respektive huvudbehandling följer p-värden beräknade genom variansanalys (ANOVA), "General Linear Model" (GLM), med faktorerna skörderester, kalkning, PK-gödsling och block. Fetstilt p-värde visar på en signifikant effekt ( $p < 0,05$ ) av den aktuella huvudbehandlingen på variabeln i fråga. Medelvärden efterföljda av olika bokstäver (<sup>a,b,c</sup>) är signifikant åtskilda på 95 % konfidensnivå.

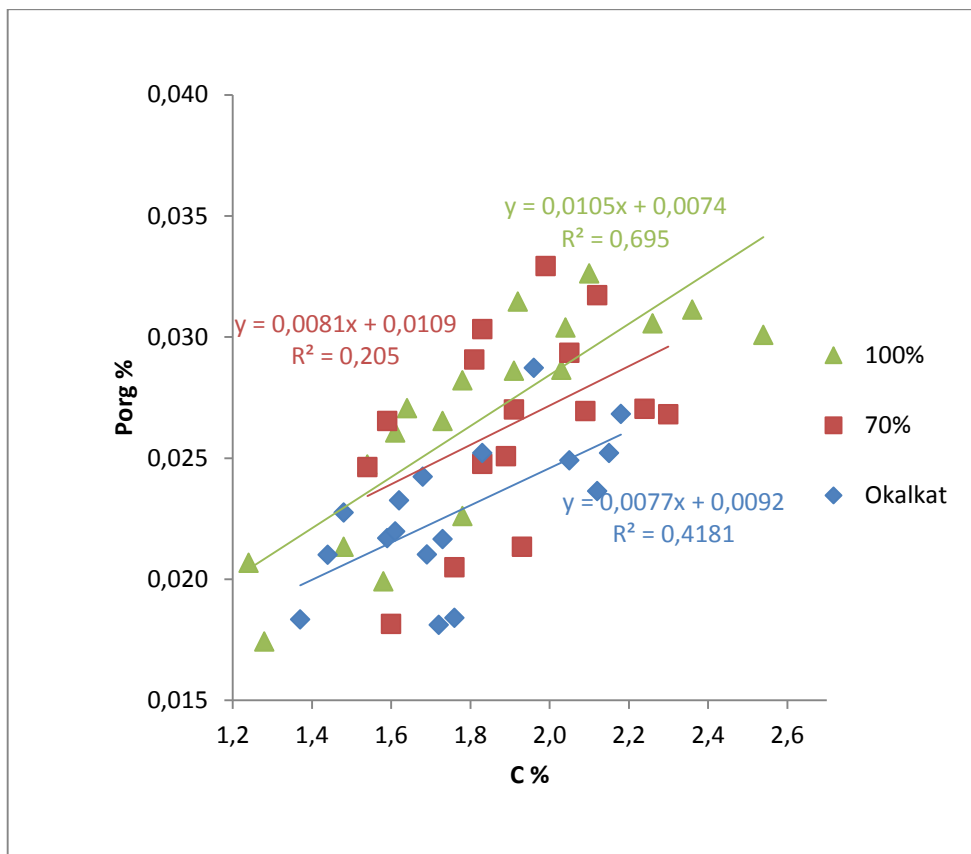
Faktorer	Antal rutor <sup>1</sup>		Medelvärde och p-värde					
			C %	N %	P <sub>org</sub> %	C:N	C:P <sub>org</sub>	N:P <sub>org</sub>
Skörderester			<b>p=0,036*</b>	p=0,122	p=0,125	<b>p=0,012*</b>	p=0,642	p=0,622
	Återföres	26	1,90 <sup>a</sup>	0,138	0,0260	13,7 <sup>a</sup>	73,6	5,35
	Bortföres	25	1,75 <sup>b</sup>	0,130	0,0243	13,4 <sup>b</sup>	72,6	5,42
Kalkning			p=0,362	p=0,229	<b>p=0,013*</b>	<b>p=0,040*</b>	<b>p=0,006**</b>	<b>p=0,021*</b>
	Okalkat	17	1,76	0,128	0,0228 <sup>b</sup>	13,7 <sup>a</sup>	77,5 <sup>a</sup>	5,65 <sup>a</sup>
	70 % basmättnad	16	1,90	0,138	0,0262 <sup>a</sup>	13,7 <sup>a</sup>	73,1 <sup>ab</sup>	5,35 <sup>ab</sup>
	100 % basmättnad	18	1,82	0,137	0,0266 <sup>a</sup>	13,3 <sup>a</sup>	68,8 <sup>b</sup>	5,16 <sup>b</sup>
PK-gödsling			p=0,461	p=0,335	p=0,308	p=0,725	p=0,282	p=0,274
	Halv PK	17	1,79	0,132	0,0252	13,6	71,6	5,30
	Hel PK	16	1,79	0,131	0,0241	13,6	75,6	5,55
	Dubbel PK	18	1,88	0,139	0,0262	13,5	72,1	5,34
Blockindelning			<b>p=0,001**</b>	p=0,215	p=0,826	<b>p=0,000***</b>	<b>p=0,000***</b>	p=0,084
	Block 1	18	1,99 <sup>a</sup>	0,139	0,0251	14,3 <sup>a</sup>	80,0 <sup>a</sup>	5,61
	Block 2	17	1,82 <sup>ab</sup>	0,134	0,0256	13,6 <sup>b</sup>	72,0 <sup>b</sup>	5,30
	Block 3	16	1,65 <sup>b</sup>	0,129	0,0248	12,8 <sup>c</sup>	67,3 <sup>b</sup>	5,26

<sup>1</sup>) Antal rutor i behandlingar m.m. (totalt 54 i försöket) justerade för tre borttagna outliers.

Den starkaste kopplingen vad rör C:N-kvoten, var den till blockindelningen (p=0,000), med högst kvot i block 1 (14,3 %) och lägst i block 3 (12,8 %).



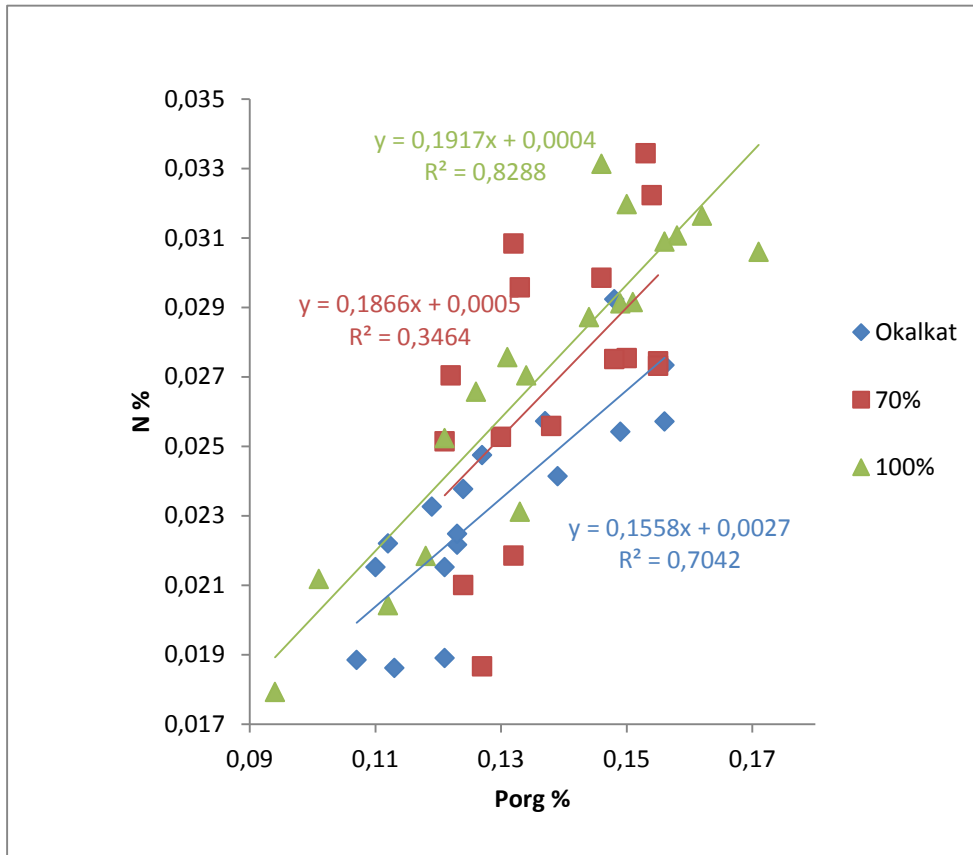
Figur 4. C:N-kvoter vid de tre kalkningsnivåerna okalkat, kalkat till 70% respektive 100% basmättad.



Figur 5. C:P<sub>org</sub>-kvoter vid de tre kalkningsnivåerna okalkat, kalkat till 70% respektive 100% basmättad.

Även C:P<sub>org</sub>-kvoten (figur 5) var tydligt påverkad av både kalkning ( $p=0,006$ ) och blockindelning ( $p=0,000$ ). Effekten av kalkning var starkare än för C:N-kvoten, med högst medelvärde i de okalkade rutorna (77,5) och lägst i rutorna som var kalkade till 100 % basmättad (68,8). Liksom för C:N-kvoten var C:P<sub>org</sub>-kvoten högst i block 1 (80,0) och lägst i block 3 (67,3).

Kalkningen hade en signifikant effekt på N:P<sub>org</sub>-kvoten ( $p=0,021$ ) som minskade med ökande kalkningsgiva, från 5,65 i okalkade led till 5,16 i led kalkade till 100 % basmättad. Övriga tre faktorer hade inga signifikanta effekter på N:P<sub>org</sub>-kvoten.



Figur 6. N:P<sub>org</sub>-kvoter vid de tre kalkningsnivåerna okalkat, kalkat till 70% respektive 100% basmättnad.

## 5. Diskussion

### 5.1 Fosforbalans

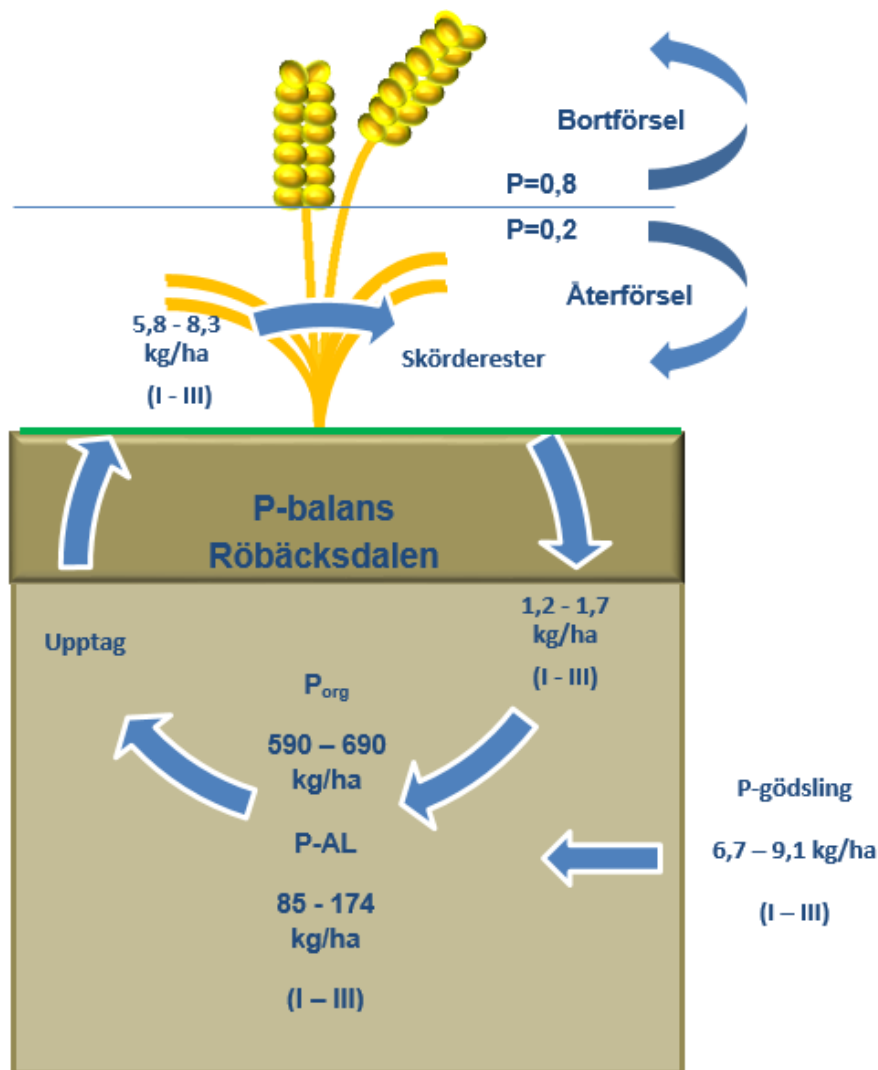
Figur 7 visar en fosforbalans för de tre testade kalkningsnivåerna vid återförsel av skörderesterna och för en av de undersökta PK-nivåerna i Röbbäcksdalen: hel ersättning med P och K. Med hjälp av de i föregående kapitel redovisade halterna av organisk fosfor ( $P_{\text{org}}$  %), opublicerade skördedata samt P-AL-analysresultat för försöket (Simonsson, M., personlig kommunikation), har medelvärden för respektive pool och flöde kunnat beräknas. Varje flöde\* eller pool anges i ett intervall (kg P/ha/år\*), som visar vilket värde som avser den lägsta kalkningsnivån (I) och den högsta (III). Den andel av grödans fosfor, som väntas bortföras i samband med kärnskörd eller motsvarande (skördekoeficient), har uppskattats till 80 %. Växtföljden i Röbbäcksdalen utgörs till hälften av spannmålsgrödor, vars skördekoeficienter för kärna antas följa Noack et al. (2012, 2014), 75 %, och till hälften av grönfoder, vars koeficienter väntas följa Bolinder et al. (2007), 85 %. Utifrån detta är 80 % bortförsel i skördeprodukter av det totala fosforupptaget en rimlig skattning för hela växtföljden. Mängden fosfor som väntas återföras marken som skörderester kan beräknas enligt ekvationen nedan:

$$P_{\text{återförsel}} = P_{\text{upptag}} * (1 - X) \quad \text{där } X \text{ är skördekoeficienten (0,8)} \quad (5.1)$$

Fosforbalansen (figur 7) visar att  $P_{\text{org}}$ , varierar kraftigt med kalkningsnivåerna. I rutor kalkade till 100 % basmättnad uppgår markens organiska fosforpool till 690 kg P/ha, 100 kg mer än i de okalkade (590 kg P/ha). Det framgår även att grödans fosforupptag varit betydligt högre i de kalkade rutorna (8,3 kg P/ha/år) än i de okalkade (5,8 kg P/ha/år). En förklaring är att fosfors växttillgänglighet kan påverkas av ett förändrat mark-pH, men mer troligt är att den högre fosforgivan för kalkningsnivå III jämfört med I (9,1 kg respektive 6,7 kg P/ha/år) varit avgörande. Det skulle vidare förklara skillnaderna i återförsel av P med skörderesterna.

Även mängden lättlöslig fosfor (P-AL) var väsentligt högre i rutor kalkade till 100 % basmättnad än i de okalkade rutorna (174 kg respektive 85 kg P/ha).





Figur 7. Fosforbalansen i Rönkäsdalen med till-, bort- och återflöden av fosfor i odlingsystemet. Figuren visar hur storleken på pooler (kg P/ha) och flöden (kg P/ha /år) varierar mellan kalkningsnivåerna okalkat (I) och kalkat till 100 % basmättad (III). De värden som anges i balansen baseras på 1) i föregående kapitel redovisade mätresultat för halter av organisk fosfor ( $P_{org}$  %), 2) erhållen opublicerad försöksdata och resultat för R3-1002 (Simonsson, M., personlig kommunikation) och 3) antagandet att 80 % av grödans fosforinnehåll bortförs med kärnskorde och resterande 20 % återförs marken.

## 5.2 Omsättningen av $P_{org}$

Mätresultaten visar att mängden organisk fosfor snarare ökat med kalkningsbehandlingarna än minskat. Poolen organisk P i den högsta kalkningsnivån var 100 kg/ha större än i den okalkade. Om halterna organisk fosfor vid försökets start över hela platsen förutsätts ha varit som de nu är i

okalkade led, har poolen i de maxkalkade leden ökat fram till 2011 med i genomsnitt  $\frac{100 \text{ kg}}{53 \text{ år}} = 1,9 \text{ kg P/år}$ , vilket är långt mer än skillnaden i P-återförsl med skörderesterna (0,5 kg P/år). Att kalkningen skulle ha minskat mineraliseringen av återförda skörderester är föga troligt, men att den stimulerats kan inte heller fastställas. Den mest troliga förklaringen ligger i att den för P-balansen beräknade hela PK-ersättningen var 2,4 kg högre vid kalkningsnivå III (9,1 kg/ha/år) än I (6,7 kg/ha/år). Denna skillnad har inte testats i variansanalysen då det är en "dold" variation utanför försöksplanens upplägg i halv, hel och dubbel PK-ersättning. Det som fallit ut som effekter av kalkning kan i verkligheten alltså vara effekter av P-gödslingen. Det förklarar med största sannolikhet även skillnaderna i grödans P-upptag vid sidan av eventuella förändringar av fosforns löslighet.

Vid antagandet att 20 % av grödans totala fosforinnehåll återförs marken är fosforbalansen positiv med 2,1 kg (I) respektive 2,5 kg P/ha/år (III). Denna mergödsling motsvarar under en dryg femtioårsperiod hela nettouppbyggnaden av den organiska fosforpoolen. Mergödslingen kan däremot inte förklara hur markens innehåll av lättlöslig fosfor (P-AL) samtidigt ökat med 89 kg P motsvarande en årlig genomsnittlig ökning om  $\frac{90 \text{ kg}}{53 \text{ år}} = 1,7 \text{ kg P/år}$ . En tänkbar förklaring är att skördecoefficienten för P i kärnskorde är i överkant, så att mer fosfor än i figur 7 återförts marken. Att svaret enbart ligger i skördecoefficienten är dock mindre troligt då det skulle krävas en P-fördelning om 50 % mellan kärna och skörderest för att balans ska nås. För en sådan fördelning finns inget stöd i litteraturen.

Samtidigt som halten organisk fosfor ( $P_{\text{org}}$  %) ökat i kalkade rutor, är markens kolhalt (C %) i stort opåverkad, vilket gör kol-fosforkvoten ( $C:P_{\text{org}}$ ) lägre i kalkade än okalkade led (se tabell 5). Enligt Stevenson (1994) faller båda  $C:P_{\text{org}}$ -kvoterna inom det intervall då nettomineralisering av P kan förväntas ( $C:P_{\text{org}} < 200$ ), men att genom kvoterna tolka mineraliseringens omfattning är svårt. Ett större P-upptag i grödan borde rimligtvis ge en större kolassimilering, mer kol i skörderesterna och på sikt en högre kolhalt i marken. Den effekten har inte kunnat ses i de kalkade leden. En rimlig tolkning är att merparten av uppbyggnaden av markens extra  $P_{\text{org}}$  härrör direkt från mikrobernas upptag av mineralgödsselfosfor snarare än från omsättningen av organiska skörderester. Detta förklarar i så fall även den lägre  $C:P_{\text{org}}$ -kvoten i kalkade försöksled vilket kan vara resultatet av en ökad fosforkoncentration i mikrobbiomassan. Variansanalysen visade också att blockfaktorn hade en stark effekt på kolhalten (C %) och  $C:P_{\text{org}}$ -kvoten, men inte på innehållet av organisk fosfor ( $P_{\text{org}}$  %). Effekten var starkare för blockindelningen än kalkningen med högst C % och  $C:P_{\text{org}}$  i block 1. Då de naturliga skillnaderna inom fältförsöket visat sig vara påtagliga, kan det inte

uteslutas att den aktuella indelningen i block påverkat resultatet av variansanalysen.

Det framgår i tabell 5 att kalkningen inte har haft några signifikanta effekter på kvävehalten (N %). En viss effekt fanns däremot på kol-kväveknoten (C:N), som var något lägre, men inte signifikant lägre, i rutor kalkade till 100 % basmättad än för övriga kalkningsnivåer. Kalkningen uppvisade samtidigt effekt på kväve-fosforknoten (N:P<sub>org</sub>) som minskade med ökad giva. Ingen av ovan nämnda observationer tyder på att nettonedbrytningen av organisk fosfor skulle ha varit större i kalkade behandlingar. Att kalkningen ändå haft effekt på omsättningen av P<sub>org</sub>, t.ex. genom att stimulera den allmänna nedbrytningen av organiskt material, kan dock inte uteslutas. Kolhalterna är, som tidigare nämnts, i samma storleksordning i de olika kalkningsbehandlingarna, trots att olika mycket kol bör ha tillförts marken med skörderesterna. Då P-tillförseln har varierat mellan kalkningsbehandlingarna förefaller flödet genom P<sub>org</sub> mer centralt än själva poolstorleken P<sub>org</sub>. Den senare var större i kalkade led, men kalkningens effekt på flödet är svårare att uttyda. De tämligen konstanta kolhalterna över kalkningsbehandlingarna skulle kunna indikera att även mineraliseringen av P<sub>org</sub> ökat med kalkningen, då biomassaproduktionen enligt skördestatistik varit större vid högre P-gödsling (Simonsson, M., personlig kommunikation).

Sjöqvist (1995) undersökte kalkningens påverkan på sura och basiska fosfataser aktivitet i jordprover från det aktuella fältförsöket i Röbbäcksdalen (R3-1002). Resultatet bekräftade tidigare författares slutsatser, att aktiviteten är starkt pH-beroende och att sura fosfataser aktivitet minskar med ökat pH, tvärtom för basiska fosfataser. Då flera författare, däribland Chen et al. (2002), rapporterat ett starkt samband mellan fosfatasaktivitet och mineralisering, har det funnits anledning att förvänta sig en positiv effekt av kalkning på mineraliseringen även i Röbbäcksdalen. Varför detta samband inte kunnat ses i resultatet till denna rapport kan, utöver begränsningar i använd testmetodik, förklaras med rent markbiologiska mekanismer.

En av dessa mekanismer innebär att mineraliseringen av organisk fosfor i hög grad är behovsstyrd. Växtrötter, svampar och bakterier utsöndrar fosfataser för att frigöra organiskt bunden fosfor till marklösningen om lösta fosfater i övrigt inte finns att tillgå. Nannipieri et al. (1978) och Nakas et al. (1987) visade båda i försök hur fosfatasaktiviteten i testade prover minskade med ökad tillförsel av ortofosfat. De olika behandlingskombinationerna i kalkningsförsöket i Röbbäcksdalen innefattar varierande tillförsel av fosforgödsel. Det är troligt att växtrötter och mikrober i mindre omfattning utsöndrar fosfataser, ju större gödselgiva som tillförs. Resultaten från Röbbäcksdalen antyder att den goda

fosfortillgången kan ha haft starkare effekt på enzymaktiviteten än den pH-effekt som kalkningen eventuellt har gett.

Sammansättningen av mikroorganismfloran i ett stycke jord är en anpassning till den aktuella markmiljön. Detsamma gäller även vilka enzymer som utsöndras och i vilken omfattning (Nakas et al., 1987). Det förefaller därför inte orimligt att tro att de olika kalkningsbehandlingarna med tiden påverkat inte bara förekomsten av enskilda svampar och bakterier, utan även vilka fosfataser vars aktivitet varit dominerande. Frågan är om kalkat eller okalkat i den aspekten, på lång sikt, överhuvudtaget påverkar nettonedbrytningen av organisk fosfor, då endast bättre anpassade arter ökar sin biologiska aktivitet vid givna miljöbetingelser.

## 6. Slutsatser

Denna studie ger inget entydigt svar på den övergripande frågeställningen huruvida kalkning ökar mineraliseringen av organisk fosfor eller inte. Men med hjälp av variansanalys har följande slutsatser kunnat dras:

- Att mängden organisk fosfor i marken ökat med ökad kalkningsnivå samtidigt som kolhalten varit konstant.
- Att försöksrutornas placering i fält haft en stark effekt på kolhalt (C %) och markens innehåll av organisk fosfor ( $P_{org}$ ).

Vidare har en P-balansberäkning visat:

- Att olika stora fosforgivor givits kombinerat med respektive kalkningsbehandling inom en och samma PK-ersättningsnivå (hel).
- Att även mängd löslig fosfor (P-AL) har ökat vid sidan av  $P_{org}$ .

Det förefaller därför troligt att de högre halterna av organisk fosfor i kalkade jämfört med okalkade led är resultatet av variationer inom PK-ersättningsnivåerna, som framkallats av grödornas olika upptag i de olika kalkningsgivorna. Skillnaderna i  $P_{org}$  skulle enligt samma teori snarare vara kopplade till den större mängd fosfor, som cirkulerar i kalkade jämfört med okalkade led, än till effekten av kalkningen i sig själv. Detta är hur som helst något som kräver ytterligare studier.

Då det inte kan ställas utom allt rimlig tvivel att kalkning på lång sikt, under fältförhållanden, saknar effekt på mineraliseringen av organisk fosfor är fortsatta studier på området att önska. Sådana bör utformas med mycket sparsamt gödslade jordar som kalkats i flera olika nivåer under en längre tid. En hypotes kan vara, att kalkning under sådana förhållanden ger mätbar effekt på den organiska fosfors omsättning, då mineraliseringen som markbiologisk process i hög grad är behovstyrd.

## Referenslista

- Anderson, G. (1960). Factors affecting the estimation of phosphate esters in soil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 11(9), pp 497–503.
- Bolinder, M. A., Janzen, H. H., Gregorich, E. G., Angers, D. A. & VandenBygaart, A. J. (2007). An approach for estimating net primary productivity and annual carbon inputs to soil for common agricultural crops in Canada. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 118(1-4), pp 29–42.
- Bowman, R. A. (1989). A sequential extraction procedure with concentrated sulfuric acid and dilute base for soil organic phosphorus. *Soil Science Society of America Journal*, 53(2), p 362.
- Bünemann, E. K., Bossio, D. A., Smithson, P. C., Frossard, E. & Oberson, A. (2004). Microbial community composition and substrate use in a highly weathered soil as affected by crop rotation and P fertilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(6), pp 889–901.
- Börjesson, G. (2014). Plan R3-1002. Försök med olika mullrämnes-, kalknings- och växtnäringsnivåer. Institutionen för mark och miljö, SLU. Available from: <http://www.slu.se/sv/institutioner/mark-miljo/forskning/faltforskning/vaxtnaring/langliggande-vaxtnaringsforsok/r3-1002/>. [Hämtad 2015-05-26].
- Campbell, N. A. & Reece, J. B. (2009). *Biology*. 8th ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings. ISBN 9780805368444 0805368442.
- Celi, L., Lamacchia, S. & Barberis, E. (2000). Interaction of inositol phosphate with calcite. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 57(3), pp 271–277.
- Chen, C., Condon, L., Davis, M. & Sherlock, R. (2002). Phosphorus dynamics in the rhizosphere of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and radiata pine (*Pinus radiata* D. Don.). *Soil Biology and Biochemistry*, 34(4), pp 487–499.
- Condon, L. M., Moir, J. O., Tiessen, H. & Stewart, J. W. B. (1990). Critical Evaluation of Methods for Determining Total Organic Phosphorus in Tropical Soils. *Soil Science Society of America Journal*, 54(5), p 1261-1266.
- Condon, L. M., Turner, B. L., Cade-Menun, B. J., Sims, J. T. & Sharpley, A. N. (2005). Chemistry and Dynamics of Soil Organic Phosphorus. *Agronomy Monograph*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America. ISBN 978-0-89118-269-6.
- Damon, P. M., Bowden, B., Rose, T. & Rengel, Z. (2014). Crop residue contributions to phosphorus pools in agricultural soils: A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 74, pp 127–137.
- Dick, W. A. (1980). *Phosphatases in the soil environment*. Diss. Ames, Iowa: Iowa State

- University.
- Dormaer, J. F. & Webster, G. R. (1964). Losses inherent in ignition procedures for determining total organic phosphorus. *Canadian Journal of Soil Science*, 44(1), pp 1–6.
- Eivazi, F. & Tabatabai, M. A. (1977). Phosphatases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 9(3), pp 167–172.
- Ekenler, M. (2002). *Enzyme activities in soils as affected by management practices*. Diss. Ames, Iowa.
- Gardner, R. & Kelley, O. J. (1940). Relation of pH to phosphate solubility in Colorado soils: *Soil Science*, 50(2), pp 91–102.
- Ghani, M. O. & Aleem, S. A. (1942). Effect of liming on the transformation of phosphorus in acid soils. *Indian Journal of Agricultural Science*, p 873–882.
- Halstead, R. L., Lapensee, J. M. & Ivarson, K. C. (1963). Mineralization of soil organic phosphorus with particular reference to the effect of lime. *Canadian Journal of Soil Science*, 43(1), pp 97–106.
- Haynes, R. J. & Swift, R. S. (1988). Effects of lime and phosphate additions on changes in enzyme activities, microbial biomass and levels of extractable nitrogen, sulphur and phosphorus in an acid soil. *Biology and Fertility of Soils* [online], 6(2). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF00257666>. [Hämtad 2015-05-14].
- Hilderbrand, R., Henderson, T., Glonek, T. & Meyers, T. (1973). Isolation and characterization of a phosphonic acid rich glycoprotein preparation from *Metridium dianthus*. *Biochemistry*, 12(23), pp 4756–4762.
- Kirkby, C. A., Kirkegaard, J. A., Richardson, A. E., Wade, L. J., Blanchard, C. & Batten, G. (2011). Stable soil organic matter: A comparison of C:N:P:S ratios in Australian and other world soils. *Geoderma*, 163(3-4), pp 197–208.
- Kononova, S. V. & Nesmeyanova, M. A. (2002). Phosphonates and their degradation by microorganisms. *Biochemistry. Biokhimiia*, 67(2), pp 184–195.
- Koukol, O., Novák, F. & Hrabal, R. (2008). Composition of the organic phosphorus fraction in basidiocarps of saprotrophic and mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(9), pp 2464–2467.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L. & Cox, M. M. (1993). *Principles of biochemistry*. New York, NY: Worth Publishers. ISBN 0-87901-500-4
- Margesin, R. & Schinner, F. (1994). Phosphomonoesterase, phosphodiesterase, phosphotriesterase, and inorganic pyrophosphatase activities in forest soils in an alpine area: effect of pH on enzyme activity and extractability. *Biology and Fertility of Soils*, 18(4), pp 320–326.
- Martínez, J. R. R. (1968). Organic phosphorus mineralization and phosphatase activity in soils. *Folia Microbiologica*, 13(2), pp 161–174.
- McJannet, C. L., Keddy, P. A. & Pick, F. R. (1995). Nitrogen and phosphorus tissue concentrations in 41 wetland plants: A Comparison across habitats and functional groups. *Functional Ecology*, 9(2), pp 231–238.
- McLatchey, G. P. & Reddy, K. R. (1998). Regulation of organic matter decomposition and nutrient release in a wetland soil. *Journal of Environment Quality*, 27(5), p 1268.
- Mehta, N. C., Legg, J. O., Goring, C. A. I. & Black, C. A. (1954). Determination of Organic Phosphorus in Soils: I. Extraction Method1. *Soil Science Society of America Journal*, 18(4), p 443.
- Mullaney, E. J. & Ullah, A. H. . (2003). The term phytase comprises several different classes of enzymes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312(1), pp 179–184.
- Murphy, J. & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27, pp 31–36.

- Nakas, J. P., Gould, W. D. & Klein, D. A. (1987). Origin and expression of phosphatase activity in a semi-arid grassland soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 19(1), pp 13–18.
- Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L. & Renella, G. (2011). Role of phosphatase enzymes in soil. In: Bünemann, E., Oberson, A., & Frossard, E. (Red.) *Phosphorus in Action*. pp 215–243. Berlin, Heidelberg: Springer. ISBN 978-3-642-15270-2, 978-3-642-15271-9.
- Nannipieri, P., Johnson, R. L. & Paul, E. A. (1978). Criteria for measurement of microbial growth and activity in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 10(3), pp 223–229.
- Naturvårdsverket (2013). *Hållbar återföring av fosfor : Naturvårdsverkets redovisning av ett uppdrag från regeringen* [online]. Stockholm.
- Newman, R. H. & Tate, K. R. (1980). Soil phosphorus characterisation by <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 11(9), pp 835–842.
- Noack, S. R., McLaughlin, M. J., Smernik, R. J., McBeath, T. M. & Armstrong, R. D. (2012). Crop residue phosphorus: speciation and potential bio-availability. *Plant and Soil*, 359(1-2), pp 375–385.
- Noack, S. R., McLaughlin, M. J., Smernik, R. J., McBeath, T. M. & Armstrong, R. D. (2014). Phosphorus speciation in mature wheat and canola plants as affected by phosphorus supply. *Plant and Soil*, 378(1-2), pp 125–137.
- Oehl, F., Oberson, A., Sinaj, S. & Frossard, E. (2001). Organic Phosphorus Mineralization Studies Using Isotopic Dilution Techniques. *Soil Science Society of America Journal*, 65(3), p 780.
- Pierzynski, G. M., McDowell, R. W., Sims, J. T. & Sharpley, A. N. (2005). Chemistry, Cycling, and Potential Movement of Inorganic Phosphorus in Soils. *Agronomy Monograph*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America. ISBN 978-0-89118-269-6.
- Reddy, K. R. & DeLaune, R. D. (2008). *Biogeochemistry of wetlands: science and applications*. Boca Raton: CRC Press. ISBN 9781566706780.
- Šarapatka, B. (2003). *Phosphatase activities (ACP, ALP) in agroecosystem soils*. Uppsala: SLU/Repro. (Acta Universitatis Agriculturae Sueciae Agraria; 396). ISBN 915766403X 915766403X.
- Saunders, W. M. H. & Williams, E. G. (1955). Observations on the determination of total organic phosphorus in soils. *Journal of Soil Science*, 6(2), pp 254–267.
- Schachtman, D.P, Reid, R.J & Ayling, S.M. (1998). Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell. *Plant Physiology*, 116(2), pp 447–453.
- Simán, G. (1985). *Mark- och skördeeffekter i de permanenta kalkningsförsöken under en 20-årsperiod, 1962-1982*: [online]. Sveriges Lantbruksuniv. Available from: <https://books.google.se/books?id=6GQmOwAACAAJ>.
- Sjöqvist, T. (1995). *Soil biochemical and microbial activities as affected by heavy metals and liming*. Uppsala: Swedish Univ. of Agricultural Science, Dept. of Chemistry. ISBN 9157650748 9157650748.
- Speir, T. W. & Cowling, J. C. (1991). Phosphatase activities of pasture plants and soils: Relationship with plant productivity and soil P fertility indices. *Biology and Fertility of Soils*, 12(3), pp 189–194.
- Stevenson, F. J. (1994). *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd ed. New York: Wiley. ISBN 0471594741.
- Stevenson, F. J. & Cole, M. A. (1999). *Cycles of soil: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients*. 2nd ed. New York: Wiley. ISBN 0471320714.
- Stewart, J. W. B. & Tiessen, H. (1987). Dynamics of soil organic phosphorus. *Biogeochemistry*, 4(1), pp 41–60.
- Stewart, W. M., Hammond, L. L., Van Kauenbergh, S. J., Sims, J. T. & Sharpley, A. N.



- (2005). Phosphorus as a Natural Resource. *Agronomy Monograph*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America. ISBN 978-0-89118-269-6.
- Tarafdar, J. C. & Jungk, A. (1987). Phosphatase activity in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus. *Biology and Fertility of Soils*, 3(4), pp 199–204.
- Tate, R. L. (1995). *Soil microbiology*. New York: Wiley. ISBN 0471578681.
- Thames Water (2013). Fertiliser from sewage saving the planet - and cash. Available from: <http://www.thameswater.co.uk/media/press-releases/17393.htm>. [Hämtad 2015-05-22].
- Trasar-Cepeda, M. C., Carballas, T., Gil-Sotres, F. & de Blas, E. (1991). Liming and the phosphatase activity and mineralization of phosphorus in an andic soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 23(3), pp 209–215.
- Turner, B. L., Mahieu, N. & Condon, L. M. (2003). Quantification of myo-inositol hexakisphosphate in alkaline soil extracts by solution <sup>31</sup>P NMR spectroscopy and spectral deconvolution: *Soil Science*, 168(7), pp 469–478.
- Vats, P. & Banerjee, U. C. (2005). Biochemical characterisation of extracellular phytase (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase) from a hyper-producing strain of *Aspergillus niger* van Teijghem. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 32(4), pp 141–147.
- Williams, J. D. H., Syers, J. K., Walker, T. W. & Rex, R. W. (1970). A comparison of methods for the determination of soil organic phosphorus. *Soil Science* [online], 110(1). Available from: [http://journals.lww.com/soilsci/Fulltext/1970/07000/A\\_COMPARISON\\_OF\\_METHODS\\_FOR\\_THE\\_DETERMINATION\\_OF.3.aspx](http://journals.lww.com/soilsci/Fulltext/1970/07000/A_COMPARISON_OF_METHODS_FOR_THE_DETERMINATION_OF.3.aspx).
- Williams, J. D. H. & Walker, T. W. (1967). Comparison of "Ignition" and "Extraction" methods for the determination of organic phosphate in rocks and soils. *Plant and Soil*, 27(3), pp 457–459.
- Wyss, M., Brugger, R., Kronenberger, A., Rémy, R., Fimbel, R., Oesterhelt, G., Lehmann, M. & van Loon, A. P. (1999). Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2), pp 367–373.