黄土高原典型土壤有机氮矿化过程

李紫燕[1,2], 李世清[1,2,*], 李生秀[2]

(1. 西北农林科技大学/中国科学院水利部水土保持研究所 黄土高原土壤侵蚀与旱地农业国家重点实验室陕西 杨陵 712100;
2. 西北农林科技大学资源与环境学院, 陕西 杨陵 712100)

摘要: 以黄土高原从北向南不同地区典型土壤类为对象, 采用 Bremner 淹水培养法, 研究黄土高原典型土壤有机氮的矿化过程。结果表明, 淹水培养期间矿化出的部分 NH_4^+-N 会被粘土矿物固定, 固定量因土壤不同而异, 因此在测定有机氮矿化量时, 只有考虑这一部分氮素, 才可获得可靠结果。不同土壤有机氮量矿化明显不同, 表现为土垫旱耕人为土 > 黄土正常新成土 > 简育干润均腐土 > 干润砂质新成土, 从南到北氮素矿化量呈减小趋势。添加 C/N 低(C/N 比为 21.7)的紫花苜蓿(*Medicago stativa*)茎叶有利于促进土壤有机氮矿化, 而添加 C/N 高(C/N 比为 43.3)的长芒草(*Stipa bungeana*)会促进矿质氮的生物固定; 不同类型植被土壤间在培养 20、40d 和 60d 时的矿化量差异显著(p 值分别为 0.0177、0.0109 和 0.0073), 均表现为均为林地土壤 > 裸地土壤 > 草地土壤 > 农田土壤; 从平均看, 加 $(NH_4)_2SO_4$ 后有机氮矿化量有一定减少。在不同培养阶段, 不同土类间氮素矿化率不同, 在 20d 和 40d 时存在显著差异(p 分别为 0.0092 和 0.0381), 60d 时差异不显著, 不同土类氮素矿化率的大小顺序为干润砂质新成土 > 黄土正常新成土 > 土垫旱耕人为土 > 简育干润均腐土, 这一结果说明在淹水条件下, 黄土高原土壤从南到北易矿化氮所占全氮比例呈增加趋势。

关键词: 黄土高原; 土壤氮素矿化; 非交换性铵态氮

文章编号: 1000-0933(2008)10-4940-11 **中图分类号**: S154.1 **文献标识码**: A

Organic N mineralization in typical soils of the Loess Plateau

LI Zi-Yan[1,2], LI Shi-Qing[1,2,*], LI Sheng-Xiu[2]

1 *State Key Laboratory of Soil Erosion and Dryland Farming on the Loess Plateau, Northwest Sci-Tech Uninersity of Agriculture and Forestry/Institute of Soil and Water Conservation, Chinese Academy of Sciences and Ministry of Water Resources, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*

2 *College of Resources and Environment Sciences, Northwest Sci-Tech Uninersity of Agriculture and Forestry Yangling, Shaanxi* 712100, *China*

***Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(10): 4940 ~ 4950.**

Abstract: The objective of this experiment was to improve our understanding of soil organic N mineralization in the Loess Plateau. Typical soils were sampled from north to south in the Loess Plateau and soil organic N mineralization was measured in the soils using the Bremner incubation method. The soils were incubated for 60 d. The results showed that part of NH_4^+-N released during mineralization was fixed by clay minerals in these soils, so in order to get reliable results, we must consider this when determining total organic N mineralization. The amount of organic N mineralization was significantly different among the soil types. Specifically, the amount of mineralization decreased in the order Eum-Orthic Anthrosols > Los-Orthic Entisols > Hap-Ustic Isohumisols > Ust-Sandiic Entisols. The amount of organic N mineralization decreased from south to north across the Loess Plateau. The addition of *Medicago sativa* residue, which has a low C:N ratio (C/N = 21.7), increased the amount of organic N mineralization. In contrast, the addition of *Stipa bungeana* residue, which has a

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(90502006)

收稿日期: 2007-07-22; **修订日期**: 2008-03-25

作者简介: 李紫燕(1976 ~), 女, 山西柳林人, 博士生, 主要从事土壤-植物营养教学与研究. E-mial: liziyan0161@126.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: sqli@ms.iswc.ac.cn

Foundation item: The project was financially supported by National Natural Science Foundation of China(No. 90502006)

Received date: 2007-07-22; **Accepted date**: 2008-03-25

Biography: LI Zi-Yan, Ph. D, candidate, mainly engaged in soil-plant nitrogen. E-mial: liziyan0161@126.com

high C:N ratio (C/N = 43.3), increased microbial immobilization of soil mineral N. There were significant differences in the amount of organic N mineralization at 20d ($p = 0.0117$), 40d ($p = 0.0109$), and 60d ($p = 0.0073$) depending on the type of vegetation growing on the soil at the time the samples were collected. The amount of organic N mineralization tended to decrease in the order: forest soil > bare land soil > grassland soil > farmland soil. The addition of $(NH_4)_2SO_4$ to the soil resulted in a decrease in the N mineralization rate at 20d ($p = 0.0037$), 40d ($p = 0.0033$), and 60d ($p = 0.0027$) compared to soils which did not receive $(NH_4)_2SO_4$. There was a significant difference in the N mineralization rate among the different soil types when incubated for 20d ($p = 0.0092$) and 40d ($p = 0.0381$), however, there was no significant difference in mineralization rates among the soils (when incubated for 60d. Organic N mineralization rates tended to decrease in the order: Ust-Sandiic Entisols > Los-Orthic Entisols > Eum-Orthic Anthrosols > Hap-Ustic Isohumisols. The results showed that total organic N mineralization rates increased from south to north in the Loess Plateau.

Key Words: the Loess Plateau; soil N mineralization; non-exchangeable ammonium

土壤氮素 80% 以上以有机态存在,有机态 氮中的绝大部分不能被植物直接吸收利用,只有经过矿化作用,才能转化为可被植物吸收利用的矿质态氮。土壤有机氮的矿化过程表征着土壤供氮潜力。因此,研究农田土壤氮素矿化是了解土壤供氮能力及确定氮肥施用量的主要依据,亦是土壤生态系统中氮素循环与平衡研究的重要组成部分。目前国内外有关氮的矿化过程研究很多[1~4],研究表明有机氮的矿化作用受许多环境因素影响,包括水分、温度、土壤 pH 值、土壤质地和粘土矿物类型、土壤有机质的碳氮比等。但过去大部分研究仅考虑了培养期间可浸取态矿质氮的变化,而没有注意培养期间非交换铵态氮的变化,因而得到的有机氮矿化量是表观结果。淹水培养过程是土壤交换铵态氮不断减少或者不断增加的过程,非交换铵态氮含量必然会发生变化,特别对 NH_4^+-N 固定能力强的土壤表现更加突出[5,6]。党亚爱等[7]研究表明,干润砂质新成土,黄土正常新成土和土垫旱耕人为土表层非交换铵态氮占全氮的百分比分别为(39.57 ±0.78)%,(32.91 ± 6.82)%和(29.74 ±7.01)%;孙艳等[8]用^{15}N 标记的研究表明,土垫旱耕人为土"新"固定态铵中有 62.1% ~ 78.9%来自肥料;李世清等[9]研究表明,淹水培养中土垫旱耕人为土和肥熟旱耕人为土是非交换铵态氮增加的过程,从而使土壤有机氮矿化量的测定结果偏低。因此,要准确评价土壤有机氮矿化能力,在测定培养前后可浸取矿质态氮变化量的同时,有必要同时测定非交换铵态氮的变化量。本实验采用淹水培养法,根据一些试验结果[10],在考虑氮矿化过程中非交换性 NH_4^+-N 变化的基础上,研究黄土高原 4 种典型土壤有机氮的矿化过程及影响因素,为准确测定和评价土壤有机氮矿化能力提供一定科学依据。

1　材料与方法

1.1　供试土壤和有机物料

从黄土高原由北向南依次在神木、安塞、富县、洛川、杨陵等地分别采取不同植被类型(林地、草地、农田、裸地)条件下 0 ~20cm 土层土样(表 1 和表 2),并记录海拔高度和经、纬度;土壤类型根据中国土壤系统分类标准确定[11]。在每田块布 3 点采集,将其混合,装入密封袋带回实验室后,土样风干、研磨后过 3 mm 筛,以研究 NH_4^+-N 有机氮矿化及测定有关土壤性质指标。

以 C/N 较高的长毛草(C/N 比为 43.3)和 C/N 较低的紫花苜蓿(C/N 比为 21.7)为供试有机物料。有机物料经烘干、粉碎、过 0.25mm 筛后,备用。

1.2　试验设计

试验设 3 个因子:土壤、添加有机物料和铵态氮肥,土壤包括 24 个;添加有机物料设不加和分别加入低 C/N 的苜蓿、高 C/N 的长毛草等 3 种情况;铵态氮肥设不添加和添加$(NH_4)_2SO_4$等 2 个水平,组成完全方案,共144个处理组合,每个重复6次。有机物料和$(NH_4)_2SO_4$添加量按200 mg N·kg^{-1}土添加,用Waring和 Bremner 提出的淹水法培养法(5g 土壤 +12.5ml 蒸馏水)进行淹水培养,培养管用80 ml 加塞塑料离心管。分

表 1 供试土壤

Table 1 Soil samples

编号 No.	采样点 Sampling place	经度、纬度 Longitude, Latitude	海拔 Elevation(m)	地形 Terrain	植被 Vegetation	土壤类型 Soil type
1	神木六道沟①	E110°22′1.38″ N38°47′35.22″	1198	坡地 Sloping land	黄豆 *Glycine max* (L.) Merr	干润砂质新成土⑦
2	神木六道沟	E110°22′2.22″ N38°47′35.1″	1202	坡地 Sloping land	裸地 Bare soil	干润砂质新成土
3	神木六道沟	E110°22′6.78″ N38°47′34.5″	1291	坡地 Sloping land	紫花苜蓿 *Medicago sativa* L.	干润砂质新成土
4	神木六道沟	E100°22′3.66″ N38°47′40.44″	1216	坡地 Sloping land	裸地 Bare soil	干润砂质新成土
5	神木六道沟	E110°21′57.6″ N38°47′41.28″	1189	坡地 Sloping land	紫花苜蓿 *Medicago sativa* L.	干润砂质新成土
6	神木六道沟	E110°21′56.7″ N38°47′42.05″	1188	坡地 Sloping land	黄豆 *Glycine max* (L.) Merr.	干润砂质新成土
7	安塞墩山②	E109°18′51.18″ N36°51′13.56″	1289	坡地 Sloping land	谷子 Millet *Setaria italica* (L.) Beauv.	黄土正常新成土⑧
8	安塞墩山	E109°18′48.24″ N36°51′12.72″	1293	坡地 Sloping land	沙打旺 *astragalus adsurgens* pall.	黄土正常新成土
9	安塞墩山	E109°19′5.88″ N36°51′33.6″	1193	坡地 Sloping land	刺槐 *Robinia pseudoacacia*	黄土正常新成土
10	安塞纸坊沟③	E109°15′9.72″ N36°44′52.8″	1137	坡地 Sloping land	刺槐 *Robinia pseudoacacia*	黄土正常新成土
11	安塞纸坊沟	E109°15′13.02″ N36°44′33.6″	1250	坡地 Sloping land	柠条 *caragana korshinskii* kom.	黄土正常新成土
12	安塞纸坊沟	E109°15′9.48″ N36°44′25.2″	1123	坡地 Sloping land	谷子 *Setaria italica* (L.) Beauv.	黄土正常新成土
13	富县子午岭④	E109°08′55.2″ N36°05′27.48″	1228	坡地 Sloping land	裸地(开垦时间较短) Bare soil	黄土正常新成土
14	富县子午岭	E109°08′55.2″ N36°05′27.48″	1228	坡地 Sloping land	松树 *Pinus sylvestris*	黄土正常新成土
15	富县子午岭	E109°08′55.2″ N36°05′27.48″	1228	坡地 Sloping land	裸地(开垦时间较短) Bare soil	黄土正常新成土
16	富县子午岭	E109°08′55.2″ N36°05′27.48″	1196	坡地 Sloping land	混交林 Mixed forest	黄土正常新成土
17	富县子午岭	E109°26′59.7″ N35°59′34.44″	1196	坡地 Sloping land	蒿草 *Kobresia myosuroides* (Vill.) Fiovi et Paol.	简育干润均腐土⑨
18	富县子午岭	E109°26′59.7″ N35°59′34.44″	1196	坡地 Sloping land	蒿草 *Kobresia myosuroides* (Vill.) Fiovi et Paol.	简育干润均腐土
19	洛川5	E109°24′25.8″ N35°43′52.5″	1116	平地 Flat land	紫花苜蓿 *Medicago sativa* L.	简育干润均腐土
20	洛川	E109°24′25.8″ N35°43′51.88″	1115	平地 Flat land	玉米 *Zea mays* L.	简育干润均腐土
21	洛川	E109°24′25.8″ N35°43′52.5″	1116	平地 Flat land	紫花苜蓿 *Medicago sativa* L.	简育干润均腐土
22	洛川	E109°24′25.8″ N35°43′51.88″	1115	平地 Flat land	玉米 *Zea mays* L.	简育干润均腐土
23	杨陵⑥	E108°5′10.71″ N34°17′4.35″	520	平地 Flat land	小麦 *Triticum aestivum* L.	土垫旱耕人为土⑩
24	杨陵	E108°5′10.71″ N34°17′4.35″	520	平地 Flat land	小麦 *Triticum aestivum* L.	土垫旱耕人为土

①Shengmu Liudaogou; ②Ansai Dunsan; ③Ansai Zhifanggou; ④Fuxian Ziwuling; ⑤ Luochuan; ⑥Yangling; ⑦ Ust-Sandiic Entisols; ⑧Los-Orthic Entisols; ⑨Hap-Ustic Isohumisols; ⑩Eum-Orthic Anthrosols

表 2　供试土壤性质

Table 2　Properties of soil used in field experiment

编号 No.	有机质 O. M. ($g \cdot kg^{-1}$)	全氮 Total N ($g \cdot kg^{-1}$)	粘粒含量% Clay (<0.001mm)	交换性 NH_4^+-N Exchangeable NH_4^+-N ($mg \cdot kg^{-1}$)	非交换性 NH_4^+-N Non-exchangeable NH_4^+-N ($mg \cdot kg^{-1}$)
1	4.25	0.24	18.9	7.1	155.5
2	2.95	0.26	14.9	5.0	160.7
3	3.94	0.24	11.9	7.3	160.3
4	3.00	0.21	15.4	5.3	169.8
5	6.75	0.31	13.9	8.1	148.5
6	5.19	0.25	13.1	6.3	163.4
7	10.29	0.51	16.7	6.6	167.2
8	10.29	0.53	15.7	6.6	170.1
9	12.54	0.72	17.8	9.7	169.0
10	14.29	0.56	13.2	7.9	156.0
11	15.15	0.70	17.5	8.6	178.6
12	15.89	0.81	19.2	8.7	188.8
13	14.12	0.75	21.3	7.2	191.7
14	40.64	1.52	12.1	11.9	223.5
15	26.53	1.21	19.4	10.6	186.6
16	30.40	1.41	13.9	11.6	188.0
17	17.92	0.98	19.9	8.7	190.7
18	18.88	0.81	18.2	8.4	228.9
19	11.97	0.59	21.3	7.6	208.6
20	13.39	0.69	28.5	6.4	197.7
21	11.97	0.59	21.3	7.6	208.6
22	13.39	0.69	28.5	6.4	197.7
23	18.09	0.93	32.6	9.0	246.8
24	24.57	1.16	40.0	12.9	248.9

别在培养开始(0d,即回收试验)、20、40 d 和 60 d 时浸取 NH_4^+-N。浸提时,首先加入 12.5ml 2 mo1/L KCl,振荡 30 min,离心,将上清液转移到 100 ml 容量瓶中,然后加 25 ml 2 mol/ L KC1,搅拌 1 min,离心,将上清液再转移到上述容量瓶中,再用 1 mol/ L KCl 代替 2 mol/ L KCl,搅拌,浸取,用 10 ml 蒸馏水代替 KCl,同前搅拌淋洗 2 次,最后用 5 ml 蒸馏水淋洗 1 次,以上淋洗液均转移至容量瓶中,浸取液定容至 100 ml。浸取后继续培养的土壤仍加 12.5 ml 蒸馏水在 40℃下培养。在每次浸取后,分别将 2 个重复离心管中的土壤在 50℃下烘干,研细,过 0.25 mm 筛,以测定非交换性 NH_4^+-N,测定时重复 2 次以上。

2.3　测定方法

土壤有机质测定用重铬酸钾-外加热容法[12];植物样品和土壤全氮测定用开氏法[13];粘粒含量用 Mastersizer 200 型激光粒度分析仪测定;土壤起始及培养结束后交换性 NH_4^+-N 用 Bremner 法测定[14]:1 mol/L KCl 浸取后用连续流动分析仪测定;土壤非交换性 NH_4^+-N 用 Bremner-Silvar 法测定[15,16]:培养结束后的土壤烘干,称取土样 1.00g 过 100 目筛,加入 20 ml 碱性次溴酸钾(KBrO)溶液,摇匀静置 2h 后,加蒸馏水 60ml,暴沸 5min,静置过夜倾去上层清液,再以 0.5 mol/L KCl 洗涤土样数次,离心弃去上清液,直至淋洗液中无 NH_4^+-N为止,以去除有机氮化合物和交换性 NH_4^+;将洗净的土样加入 20m1 5mol/L HF-HCl 溶液,振荡 24h,分解含固定态 NH_4^+-N 的矿物后,用自动定氮仪测定。

2　结果与分析

2.1　有机氮矿化过程中包括非交换性 NH_4^+-N 和不包括非交换性 NH_4^+-N 的比较

不同处理培养期间交换性和非交换性 NH_4^+-N 的变化见表 3。从 24 个土样平均看(表 3),经过淹水培养后,土壤非交换性 NH_4^+-N 显著增加,并因土壤不同而异,从各处理平均看,起始非交换性 NH_4^+-N 为 183.8

mg·kg^{-1},培养 20、40 d 和 60 d 时非交换性 NH_4^+-N 分别为 251.6、242.3 mg·kg^{-1}和 233.9 mg·kg^{-1},分别比起始增加 67.8、58.5 mg·kg^{-1}和 50.1mg·kg^{-1}($p<0.01$)。增加的非交换性 NH_4^+-N,来自有机氮分解产生的铵态氮或者添加 NH_4^+-N。土壤中所添加 NH_4^+-N 及有机氮矿化产生的 NH_4^+-N 会导致土壤溶液中NH_4^+-N浓度处于较高水平,为铵的矿物固定提供了氮源;40℃的培养温度和充足的水分,会使粘土矿物晶层空间扩大,为铵的固定创造条件[17,18]。如果不包括非交换性 NH_4^+-N 增加量,从各处理平均看,在培养 20、40d 和 60d 时有机氮的矿化量分别为 18.5、36.6 mg·kg^{-1}和 49.3 mg·kg^{-1},如果包括非交换性 NH_4^+-N 的增加量,则矿化量分别为 86.3、95.1 mg·kg^{-1}和 99.5 mg·kg^{-1}。显然,如果不包括非交换性 NH_4^+-N 的增加量,则对矿化氮量低估 67.8、58.5 mg·kg^{-1}和 50.1 mg·kg^{-1}。因此,在计算矿化量时,只有考虑被粘土矿物固定的非交换性 NH_4^+-N,才能更准确评价有机氮的矿化量。以下仅就包括非交换性 NH_4^+-N 时测定的矿化氮量进行分析。

表 3 添加 NH_4^+-N 及有机物料对土壤交换性及非交换性 NH_4^+-N 各处理的矿化量($n=24$)

Table 3 N mineralization with different N amendments

处理 Treatment	交换性铵态氮(mg·kg^{-1}) Exchangeable ammonium				不包括非交换氮的矿化量(mg·kg^{-1}) The accumulative mineralizable N excluding non-exchangeable ammonium		
	0d	20d	40d	60d	20d	40d	60d
土壤 Soil	8.2	34.7	50.0	60.0	26.5	41.8	51.8
土壤 Soil + $(NH_4)_2SO_4$	176.6	160.7	177.8	187.9	-15.9	1.2	11.3
土壤 Soil + 紫花苜蓿 *Medicago stativa*	11.5	95.8	120.1	132.9	84.3	108.6	121.4
土壤 Soil + 紫花苜蓿 *Medicago stativa* + $(NH_4)_2SO_4$	183.0	232.0	260.4	273.5	49.0	77.4	90.5
土壤 Soil + 长芒草 *Stipa bungeana*	10.8	29.4	39.5	53.9	18.6	28.7	43.1
土壤 Soil + 长芒草 *Stipa bungeana* + $(NH_4)_2SO_4$	183.6	131.9	144.9	161.2	-51.7	-38.7	-22.4

处理 Treatment	非交换性氮(mg·kg^{-1}) Non-exchangeable ammonium				包括非交换态氮的矿化量(mg·kg^{-1}) The accumulative mineralizable N including non-exchangeable ammonium		
	0d	20d	40d	60d	20d	40d	60d
土壤 Soil	183.8	218.2	209.0	204.9	60.9	67.0	73.0
土壤 Soil + $(NH_4)_2SO_4$	183.8	263.7	253.0	244.9	64.0	70.5	72.4
土壤 Soil + 紫花苜蓿 *Medicago stativa*	183.8	245.1	234.3	229.9	145.7	159.1	167.6
土壤 Soil + 紫花苜蓿 *Medicago stativa* + $(NH_4)_2SO_4$	183.8	282.3	282.8	261.3	147.5	176.4	168.0
土壤 Soil + 长芒草 *Stipa bungeana*	183.8	227.4	214.9	211.2	62.3	59.9	70.6
土壤 Soil + 长芒草 *Stipa bungeana* + $(NH_4)_2SO_4$	183.8	273.1	260.0	251.4	37.6	37.5	45.2

2.2 添加有机物料对土壤有机氮矿化的影响

添加有机物料对有机氮矿化的影响见表 4。方差分析表明,添加不同有机物料对培养 20、40 d 和 60d 有机氮的矿化存在极显著影响($p<0.0001$)。添加紫花苜蓿在 20、40 d 和 60 d 有机氮矿化累积量平均分别为 146.6、167.8 mg·kg^{-1}和 167.8 mg·kg^{-1},分别比对照增加 84.1 mg·kg^{-1}(134.6%)、99.8 mg·kg^{-1}(146.8%)和 95.1(130.8%),各个时期的差异均达极显著水平,其原因可能有两方面:一是促进了土壤中原有机氮的矿化,一是紫花苜蓿本身有机氮素的矿化;添加长芒草在培养 20、40d 和 60d 时有机氮矿化累积量平均为 49.9、48.7 mg·kg^{-1}和 57.9 mg·kg^{-1},

表 4 添加有机物料对有机氮矿化累积量的影响(mg·kg^{-1})($n=24$)

Table 4 Effect of organic matter on the accumulative mineralizable N

有机物料 Organic material	培养时间 Incubation time (d)		
	20d	40d	60d
对照 CK	62.5B	68.0B	72.7B
紫花苜蓿 *Medicago sativa*	146.6 A	167.8A	167.8A
长芒草 *Stipa bungeana*	49.9C	48.7C	57.9C

同一列中平均值后不同的大写或小写字母分别表示差异极显著($p<0.01$)或显著($p<0.05$),相同的字母表示差异不显著($p>0.05$),下表同 Means followed by the different capital or small letters in the columns are significant at $p<0.01$ or $p<0.05$, respectively (SSR method); the same indication is used in the following tables

极显著小于同期不添加有机物料土壤(对照)有机氮矿化量,比对照分别减小 12.6 $mg \cdot kg^{-1}$(20.2%)、19.3 $mg \cdot kg^{-1}$(28.4%)和 14.8 $mg \cdot kg^{-1}$(20.4%),说明添加 C/N 高的长芒草促进了矿质氮的微生物固定。

2.3　添加 NH_4^+-N 对土壤有机氮矿化的影响

加入$(NH_4)_2SO_4$显著影响土壤有机氮的矿化过程(表5)。方差分析表明,加入$(NH_4)_2SO_4$在培养 20 d 时的矿化累积量(83.0 $mg \cdot kg^{-1}$)显著低于对照土壤(89.6 $mg \cdot kg^{-1}$)($p = 0.0348$);$(NH_4)_2SO_4$对培养 40 d 时土壤矿化氮累积量的影响不显著($p = 0.961$);而加$(NH_4)_2SO_4$对培养 60d 时土壤矿化氮累积量的影响又达显著水平($p < 0.05$):加入$(NH_4)_2SO_4$时矿化氮累积量为 95.2 $mg \cdot kg^{-1}$,比对照(103.7 $mg \cdot kg^{-1}$)减少 8.5 $mg \cdot kg^{-1}$(8.2 %),产生这一现象的原因可能与 SO_4^{2-} 对土壤中参与有机氮矿化的微生物具有一定抑制作用有关,但其机理仍待进一步研究。

添加有机物料与加$(NH_4)_2SO_4$处理对各个培养时间有机氮矿化累积量的影响间存在交互效应,p 分别为 0.00741、0.0367 和 0.0140。培养 20、40d 和 60d 时土壤有机氮矿化累均以添加紫花苜蓿和$(NH_4)_2SO_4$处理最高,分别为 147.5、176.4$mg \cdot kg^{-1}$和 168.0$mg \cdot kg^{-1}$,以添加长芒草和$(NH_4)_2SO_4$处理最低,分别为 37.6、37.5$mg \cdot kg^{-1}$和 45.2$mg \cdot kg^{-1}$。

2.4　不同类型土壤有机氮矿化的差异

土壤类型不同,有机氮的矿化不同(表6)。由表6 可以看出,无论培养 20、40d,还是培养 60d,各土壤有机氮矿化量均表现为从土垫旱耕人为土、黄土正常新成土、简育干润均腐土、干润砂质新成土呈递减趋势。土垫旱耕人为土和黄土正常新成土相差不大,简育干润均腐土和干润砂质新成土相差不大,前两种土壤矿化氮累积量几乎是后两种土壤的 2 ~ 3 倍,除干润砂质新成土外,其余 3 种土壤均从培养 20 ~60d,矿化氮量变化不大,说明土壤易矿化有机氮的矿化主要发生在培养前 20d。

表 5　氮肥对对有机氮矿化累积量的影响($mg \cdot kg^{-1}$)($n = 24$)

Table 5　The effect of nitrogen application on the accumulative mineralizable N

NH_4^+-N ($mg \cdot kg^{-1}$)	培养时间 Incubation period(d)		
	20	40	60
0	89.6A	95.4A	103.7A
200	83.0B	94.8A	95.2B

表 6　不同类型土壤有机氮矿化的差异($n = 24$)

Table 6　Differences in the accumulative mineralizable N among different soil types

土壤类型 Soil type	矿化量($mg \cdot kg^{-1}$) The accumulative mineralizable N			矿化率(%) The rate of N mineralization		
	培养时间 Incubation time(d)			培养时间 Incubation time (d)		
	20	40	60	20	40	60
干润砂质新成土($n = 6$) Ust-Sandiic Entisols	32.6b	37.0a	34.3a	13.1A	14.5a	13.2a
黄土正常新成土($n = 10$) Los-Orthic Entisols	87.0a	94.0b	101.9b	9.6B	10.4a	11.2a
简育干润均腐土($n = 6$) Hap-Ustic Isohumisols	35.0b	40.9b	50.9a	4.7C	5.3b	6.7a
土垫旱耕人为土($n = 2$) Eum-Orthic Anthrosols	93.6a	101.8a	111.5b	8.8B	9.5b	10.2a

氮矿化率是可矿化氮占全氮的百分比,是评价土壤有机氮易矿化程度的重要指标。从表6 可以看出,矿化率在不同类型土壤间存在显著差异($p < 0.05$)。从平均看,在培养 20d 时的矿化率以干润砂质新成土最大,为 13.1%,显著大于其它土壤类型;黄土正常新成土和土垫旱耕人为土的矿化率分别为 9.6% 和 8.8%,二者差异不显著,但均显著大于简育干润均腐土;简育干润均腐土的矿化率最小,仅为 4.7%,显著小于其它土壤类型;对 40d 的矿化率,以干润砂质新成土和黄土正常新成土的较大,分别为 14.5% 和 10.4%,二者之间差异不显著;而土垫旱耕人为土和简育干润均腐土的矿化率较小,分别为 5.3% 和 9.5%,二者之间差异也不

显著;但前两者显著大于后两者。不同类型土壤在培养 60d 时的矿化率无显著差异($p=0.2426$)。在培养的各个阶段,不同土壤类型矿化率的大小顺序均为干润砂质新成土 > 黄土正常新成土 > 土垫旱耕人为土 > 简育干润均腐土。

2.5 不同类型植被土壤对有机氮矿化的差异

植被类型不同,土壤有机氮的矿化量和矿化率不同(表 7)。由表 7 可以看出,不同类型植被土壤在培养 20、40d 和 60d 时的有机氮矿化量差异显著,p 分别 0.0177、0.0109 和 0.0073,均小于 0.05,表现为林地土壤显著大于其它类型植被,而草地、农田和裸地土壤间差异不显著;不同类型植被土壤在培养 20、40d 和 60d 的矿化率差异不显著,p 分别为 0.0928 和 0.1127、均大于 0.05。不同类型植被土壤在培养 20、40d 和 60d 的矿化量和矿化率大体上为林地 > 裸地 > 草地 > 农田。

表 7 不同类型植被土壤对有机氮矿化的差异($n=24$)

Table 7 The differences of the accumulative mineralizable N among different soil types under different vegetation types

植被类型 Vegetation	矿化量($mg \cdot kg^{-1}$) The accumulative mineralizable N			矿化率% Rate of N mineralization		
	20d	40d	60d	20d	40d	60d
林地($n=4$)Forest land	125.2a	128.3a	144.6a	12.0a	12.0a	13.4a
草地($n=8$)grass land	47.5b	55.7b	60.9b	8.5ab	10.4a	11.2ab
农田($n=8$)Farming land	41.4b	48.6b	53.6b	6.6b	8.3a	8.3b
裸地($n=4$)Bare land	62.6b	65.9b	64.7b	12.6a	10.9a	10.4ab

3 讨论

淹水培养法由 Waring 和 Bremner[19] 最早提出。1964 年,Waring 和 Bremner[19] 在总结好气培养法的缺点后,在前人工作的基础上,首次提出了 3 0℃ 2 周淹水培养法。该法测定的结果与通气培养矿化氮之间高度相关。这个方法的优点在于不必考虑通气及严格的水分控制,方法简单,只需测定铵态氮即可,省去很多手续。1966 年,Keeney 和 Bremner[20] 进一步改进了淹水培养法。Bremner 等[21] 提出在淹水条件下,40 ℃恒温进行培养,这种方法有许多优点胜过好气培养法:(1) 只需要测定 NH_4^+-N;(2) 可以省略在培养过程中保持最适宜的水分和防止水分损失的问题;(3) 在给定时期内比好气条件下有更多的氮素被矿化;(4) 由于不必关心硝化作用的最适温度,可以使用较高的温度,因此能更迅速的矿化。但它仍然存在一定缺陷,即需要颇长的培养时间和专门的培养设备。之后,通过不断改进,逐步形成了淹水间歇淋洗长期培养法[22]。

淹水培养法首先在稻田上应用,直到 1982 年美国土壤学会建议同时在旱地上应用以后,这种方法在旱地上的研究便日益增多。后来许多土壤工作者采用淹水培养法测定旱地土壤的可矿化氮,并对照盆栽试验、大田试验作物的吸氮量和产量,均获得了很高的相关性[23],经过多年的试验研究,淹水培养法已成为一个可靠测定包括旱地土壤在内的土壤供氮能力的方法。

本研究表明,土壤中添加有机物料不同,有机氮的矿化累积量也不同。加入 C/N 比高的长芒草,能源物质丰富,微生物对矿质氮的固定作用强;相反,加入 C/N 比低的紫花苜蓿后,能源物质相对较少,易矿化有机氮多,有利于增加有机氮净矿化[24,25]。过去研究表明[26,27],施氮会促进土壤有机氮的矿化,而本试验研究结果表明,从平均看,施氮后氮素矿化累积量小于不施氮处理(表 9),表现出负的激发效应。加入$(NH_4)_2SO_4$后土样在各培养期内有机氮矿化累积量与对照土壤基本一致(图 1),说明$(NH_4)_2SO_4$的加入并未促进土壤有机氮的矿化。在添加有机物料的情况下,加入$(NH_4)_2SO_4$后的矿化氮累积量在培养 20d 和 40d 时显著小于不加$(NH_4)_2SO_4$时的矿化氮量累积量。由表 9 可以看出,对干润砂质新成土,土壤 + 紫花苜蓿 + $(NH_4)_2SO_4$处理的矿化氮累积量在各培养期均大于土壤 + 紫花苜蓿处理,说明$(NH_4)_2SO_4$的加入在这种情况下表现出了正的激发效应;而在黄土正常新成土、简育干润均腐土和土垫旱耕人为土上,土壤 + 紫花苜蓿 + $(NH_4)_2SO_4$处理的矿化氮累积量在各培养期均小于土壤 + 紫花苜蓿处理,说明在这 3 种土壤上当添加紫花苜蓿后$(NH_4)_2SO_4$均

表现出了负的激发效应,可能与这 3 种土壤全氮及有机质含量相对较高,在淹水培养有机氮氨化过程中,再加入 NH_4^+-N,因溶液中溶解态 NH_3浓度过高,对氨化微生物产生了抑制作用有关,而土壤其它微生物以未矿化有机物为碳源,以矿化的 NH_4^+-N 为氮源,繁衍生息,大量繁殖,导致土壤矿质氮下降。

表 8　不同类型土壤的理化性质($n=24$)

Table 8　Main properties of different soil types

土壤类型 Soil type	有机质 O. M. ($g\cdot kg^{-1}$)	全氮 Total N ($g\cdot kg^{-1}$)	粘粒% (<0.001mm) Clay	粉沙粒含量 Silt (%)
干润砂质新成土 Ust-Sandiic Entisols($n=6$)	4.35	0.25	14.7	51.1
黄土正常新成土 Los-Orthic Entisols($n=10$)	14.59	0.73	16.7	48.4
简育干润均腐土 Hap-Ustic Isohumisols($n=6$)	20.59	0.94	23.0	29.9
土垫旱耕人为土 Eum-Orthic Anthrosols($n=2$)	21.33	1.04	36.3	17.6

表 9　氮肥对不同土壤矿化氮累积量的影响

Table 9　N mineralization under different N amendments

土壤类型 Soil type	NH_4^+-N ($mg\cdot kg^{-1}$)	处理 Treatment	包括非交换态氮的矿化量 Total N mineralized			加氮与不加氮的差值 Difference		
			20d	40d	60d	20d	40d	60d
干润砂质新成土	0	对照 CK	32.6	37.0	34.2			
Ust-Sandiic Entisols		紫花苜蓿 *Medicago sativa*	105.3	119.1	113.3			
$n=6$		长芒草 *Stipa bungeana*	34.6	42.7	44.5			
	200	对照 CK	26.4	29.2	27.8	-6.1	-7.8	-6.4
		紫花苜蓿 *Medicago sativa*	123.9	185.3	132.3	18.6	66.2	19.0
		长芒草 *Stipa bungeana*	17.0	21.8	17.5	-17.6	-20.9	-27.0
黄土正常新成土	0	对照 CK	87.0	94.0	101.9			
Los-Orthic Entisols		紫花苜蓿 *Medicago sativa*	169.9	175.8	193.3			
$n=10$		长芒草 *Stipa bungeana*	76.5	66.7	84.8			
	200	对照 CK	94.1	104.6	110.8	7.1	10.6	8.9
		紫花苜蓿 *Medicago sativa*	155.7	176.3	178.5	-14.1	0.5	-14.7
		长芒草 *Stipa bungeana*	52.9	50.9	67.4	-23.5	-15.8	-17.4
简育干润均腐土	0	对照 CK	35.0	40.9	50.9			
Hap-Ustic Isohumisols		紫花苜蓿 *Medicago sativa*	125.1	145.4	153.3			
$n=6$		长芒草 *Stipa bungeana*	51.9	62.0	57.9			
	200	对照 CK	33.9	40.7	31.7	-1.1	-0.2	-19.2
		紫花苜蓿 *Medicago sativa*	137.0	154.7	162.5	11.9	9.3	9.1
		长芒草 *Stipa bungeana*	23.6	13.3	22.1	-28.3	-48.7	-35.9
土垫旱耕人为土	0	对照 CK	93.6	101.8	111.4			
Eum-Orthic Anthrosols		紫花苜蓿 *Medicago sativa*	207.8	237.3	244.5			
$n=2$		长芒草 *Stipa bungeana*	105.4	72.0	115.7			
	200	对照 CK	116.7	112.2	136.7	23.2	10.5	25.3
		紫花苜蓿 *Medicago sativa*	208.9	215.1	239.3	1.2	-22.1	-5.1
		长芒草 *Stipa bungeana*	64.4	90.0	86.6	-41.0	18.0	-29.1

不同类型土壤有机氮矿化规律不同。本研究表明,在培养的各个阶段,土壤有机氮矿化量均表现为土垫旱耕人为土 > 黄土正常新成土 > 简育干润均腐土 > 干润砂质新成土,而矿化率则表现为干润砂质新成土 > 黄土正常新成土 > 土垫旱耕人为土 > 简育干润均腐土。分析四种土壤所处的地带性可知,干湿砂质新成土主要分布地地理坐标为:东经 110°21′~110°22′,北纬 38°47′,海拔在 1188~1291m 间,属黄土高原北部典型的半干旱区、水蚀风蚀交错地带和农牧交错地带,有机质、全氮、粘粒含量都低;黄土正常新成土主要位于东经

109°8′~109°19′,北纬 36°5′~36°51′,海拔 1123~1293m,属于黄土高原中部典型黄土丘陵沟壑区,在气候上处于暖温带半湿润向半干旱过渡区;植被类型处于暖温带落叶阔叶林向干草原过渡的森林草原区,同时又是典型受人类活动影响的水土流失严重区,有机质、全氮、粘粒含量都较低;简育干润均腐土主要位于东经 109°24′~109°26′, 北纬 35°43′~36°59′, 海拔 1115~1196m 间,属黄土高原中南部丘陵沟壑区,属暖温带气候,有机质、全氮、粘粒含量都较高;土垫旱耕人为土采样地地理坐标为:东经 108°5′10.71″,北纬 34°17′4.35″,海拔在 520m 左右,属黄土高原南部半湿润易旱地区非常高。矿化率的大小顺序与粘粒含量增加,土壤质地由粗变细的顺序基本一致,说明在淹水培养条件下,土壤质地越粗,越有利于有机氮矿化;同时也与有机氮含量依次增大有关(表 8),其原因可能为有机氮含量增加的幅度(分母)大于可矿化氮的增加幅度(分子),导致随有机氮含量增加,易矿化氮所占比例减小。在本研究中,虽然土垫旱耕人为土只有两个样品,其矿化规律有待进一步全面分析研究;但从总体看,黄土高原土壤从南到北氮素矿化量呈减小趋势,易矿化氮所占全氮比例呈增加趋势。

过去研究发现,土壤质地、有机质、全氮及 C/N 等影响有机氮矿化[28,29]。本研究进一步分析了土壤有机氮矿化量与土壤有机质、全氮及粘粒含量的相关性(表 10)。回归分析表明,土壤全氮与培养 20、40d 和 60 的矿化氮累积量呈极显著正相关,相关系数分别为 0.8597($p<0.0001$)、0.8719($p<0.0001$)和 0.8893($p<0.0001$);土壤有机质同样与培养 20、40d 和 60d 时的矿化氮累积量呈极显著正相关,相关系数分别为 0.8992($p<0.0001$)、0.9124($p<0.0001$)和 0.9286($p<0.0001$)。不同类型植被土壤在培养 20、40d 和 60d 时的氮素矿化量及矿化率的大小顺序基本为林地>裸地>草地>农田,这与有机质和全氮含量表现为林地>裸地>草地>农田有关,矿化氮与粘粒的相关性不显著。以上结果说明,影响有机氮矿化的主要因素是土壤有机氮和有机质。

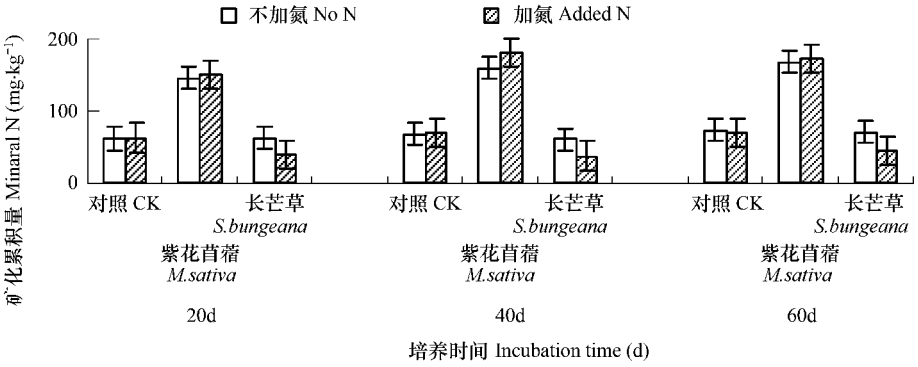

图 1 各处理对有机氮矿化量的影响

Fig. 1 Total N under different treatments

表 10 有机氮矿化量与部分土壤理化性质的相关系数

Table 10 Relationships between the accumulative mineralizable N and some soil physical and chemical properties

矿化量(mg·kg⁻¹) The accumulative mineralizable N		粘粒(<0.001mm) Clay%	全氮 Total N	有机质 O. M.
培养时间 Incubation time(d)	20	0.0111	0.8597**	0.8992**
	40	0.0402	0.8719**	0.9124**
	60	0.0619	0.8893**	0.9286**

*和**分别代表差异达显著和极显著水平 * and ** represents the difference reaching 0.05 and 0.01significant levels, respectively

Reference:

[1] Ju X S, Li S X. The effect of temperature and moisture on nitrogen mineralization in soils. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 1998, 4(1): 37-42.

[2] Fioretto A, Musacchio A, Andolfi G, *et al*. Decomposition dynamics of litters of various pine species in a Corsican pine forest. Soil Biology and Biochemistry, 30: 721 —727.

[3] Wang Y J, Zhou G Y, Fu H, *et al*. Development and advance of soil nitrogen mineralization. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2006, 21 (10):203 —208.

[4] Cheng F S, Zeng D H, Sing Anand Narain, *et al*. Effects of soil moisture and soil depth on nitrogen mineralization process under Mongolian pine plantations in Zhanggutai sandy land, P. R. China. Journal of Forestry Research, 2005, 16(2): 101 —104.

[5] Li S Q, Bu T Y, Li S X. Ammonium nitrification and fixation by clay minerals in calcareous soil. Agricultural Research in the Arid Areas, 1993, 11 (Suppl.): 99 —10.

[6] Li S Q, Li S X, Li F M. Mineralization and nitrification of soil nitrogen in calcareous soil profile. Journal of Lanzhou University (natural sciences), 2000, 36(1): 98 —104.

[7] Dang Y A, Li S Q, Wang G D, Shao M A. The different characteristics of soil fixed ammonium from south to north on the Loess Plateau. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2007, 13(5): 831 —837.

[8] Sun Y, Wu S R, Lv J L. Agricultural research in the arid areas studies on the fixed-NH_4^+ capacity and the accumulating- supplying N ability in Lou soil. Agricultural Research in the Arid Areas, 2000, 18(3): 8 —14.

[9] Li S Q, Lv L H, Fu H F, Li S X. Change of non-exchangeable ammonium nitrogen during procession of soil organic nitrogen mineralization. Scientia Agricultura Sinica, 36(6):663 —670.

[10] Li Z Y, Li S Q. Change of non-exchangeable ammonium nitrogen in the process of organic nitrogen mineralization of typical soils on Loess Plateau. Research of Soil and Water Conservation, 2007, 14 (2): 306 —310

[11] Research Group and Cooperative Research Group on Chinese Soil Taxonomy. Index on Chinese Soil Taxonomy (2nd Version). Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 1995. 1 —218.

[12] Nanjing Agricultural University. Soil Agriculture Chemistry Analysis. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Science and Technology Press, 1981. 33

[13] Bremner J M, Mulvaney C S. Nitrogen Total. In: Page A L ed. Methods of soil analysis, Part 2. American Society of Agronomy. Malison, Wisconsin, 1982. 595 — 624.

[14] Smith K A, Scott A. Continuous flow and discrete analysis. In: Smith K A ed. Soil analysis. Marcel Dekkcer, New York, 1983. 115 — 169.

[15] Silva J A, Bremner J M. Determination and isoloperalio analysis of different forms of nitrogen in soil. Fixed ammonium. Soil Science Society of America Proceeding, 1966, 30: 587 —594.

[16] Keeney D R, Nelson D W. Non-exchangeable ammonium. In: Page A L. ed. Methods of Soil Analysis, Part 2. Madison, Wisconsin: America Society of Agronomy, 1982. 687 — 692.

[17] Zhu W Q, Zhang Y S. Advances in the studies of mineral non-exchangeable ammonium in soils. Soil and Environmental Sciences, 2000, 9(4): 333 —335.

[18] Liao J P, Lin X G, Cao Z H, Zhang Y Z. Factors affecting soil -fixed ammonium. Soil, 2003, 36 —40.

[19] Warning S A, Bremner J M. Ammonium production in soil under water-logged conditions as an index of soil nitrogen availability. Nature, 1964, 201: 951 —952.

[20] Keeny D R, Bremner J M. A chemical index of soil nitrogen availability. Nature, 1966, 211: 892 —893.

[21] Keeny D R, Bremner J M. Comparison and evaluation of laboratory methods of obtaining an index of soil nitrogen availability. Agronomy Journal, 1966, 58(5): 498 —503.

[22] FU H F, LI S X. Soil nitrogen mineralization and soil N-supplying capacities. Ⅰ. Comparison of two incubation methods for measuring dryland soil nitrogen mineralization. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forest (natural science edition), 1992(S1): 48 —52.

[23] Ye Y L, Li S X. Influence of initial nitrate-nitrogen on methods of measuring soil nitrogen supplying capacity in calcareous soils. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2002, 8 (3): 310 —317.

[24] Li S Q, Li S X. Priming effect of ammonium nitrogen fertilizer on soil nitrogen under waterlogged condition. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2001, 7(4): 361 —367.

[25] Hassink J, Bouwman L A, Zwart K B, *et al*. Relationships between soil texture, physical protection of organic matter, soil biota, and C and N mineralization in grassland slils. Geoderma,1993,57(1):105 —128.

[26] Liu Y H, Lu J. The influence of applying nitrogen fertilizer to nitrogen mineralization of the paddy soil. Journal of Qinghai University (Nature Science), 2005, 23(2): 43 —46.

[27] Jenkinson D S, Fox R H and Rayner J H. Interactions between fertilizer nitrogen and soil nitrogen-the so called priming effect. Soil Science, 1985, 36: 425 —444.

[28] Tian M J. Review on the contributing factors to mineralization of soil nitrogen. Journal of Xihua Teachers College (Natural Science), 2004, 25

(3).

[29] Reich P B, Davidf, Grlgal J. Nitrogen mineralization and productivity in 50 hardwood and conifer stands on diverse soil. Ecology, 1997. 72: 335—347.

参考文献:

[1] 巨晓棠,李生秀. 土壤素素矿化的温度水分效应. 植物营养与肥料学报,1998, 4(1): 37~42.

[3] 邹国元; 付桦, 等. 土壤氮素矿化研究进展. 中国农学通报, 2006, 21(10):203~ 208.

[5] 李世清,卜彤英,李生秀. 石灰性土壤中 NH_4^+-N 的硝化与 NH_4^+-N 的粘土矿物固定. 干旱地区农业研究,1993,11(增刊):99~107.

[6] 李世清,,李生秀,李凤民. 石灰性土壤氮素的矿化和硝化作用. 兰州大学学报(自然科学版),2000,36(1):98~104.

[7] 党亚爱,李世清,王国栋,邵明安. 典型土壤矿物固定态铵变化的南北差异. 植物营养与肥料学报,2007,13(5):831~837.

[8] 孙艳,吴守仁,吕家珑. 塿土固定态铵容量及蓄氮供氮能力的研究. 干旱地区农业研究,2000,18(3):8~14.

[9] 李世清,吕丽红,付会芳,李生秀. 土壤氮素矿化过程中非交换铵态氮的变化. 中国农业科学, 2003,36(6):663~670.

[10] 李紫燕,李世清. 黄土高原典型土壤有机氮矿化过程中非交换性铵态氮的变化. 水土保持研究,2007,14 (2):306~310).

[11] 中国科学院南京土壤研究所土壤系统分类课题组,中国土壤系统分类课题研究协作组著. 中国土壤系统分类(修订方案). 北京:中国农业科技出版社,1995. 1~218.

[12] 南京农业大学. 土壤农化分析(第2版). 北京: 中国农业出版社,1981. 33.

[17] 朱维琴, 章永松. 土壤矿物固定态铵研究进展. 土壤与环境, 2000, 9(4): 333~335..

[18] 廖继佩, 林先贵, 曹志洪, 张杨株. 土壤固定态铵的影响因素. 土壤, 2003, 36~40.

[22] 付会芳,李生秀. 土壤氮素矿化与土壤供氮能力. 1. 旱地土壤氮素矿化两种培养方法之比较. 西北农业大学学报, 1992,20(增刊):48~52.

[23] 叶优良, 李生秀. 石灰性土壤起始 NO_3^--N 对土壤供氮能力测定方法的影响. 植物营养与肥料学报, 2002,8 (3): 310~317.

[24] 李世清, 李生秀. 淹水培养条件下铵态氮肥对土壤氮素的激发效应. 植物营养与肥料学报, 2001, 7(4): 361~367.

[26] 刘育红, 吕军. 施外源氮对稻田土壤氮素矿化的影响. 青海大学学报(自然科学版), 2005, 23(2): 43~46.

[28] 田茂洁. 土壤氮素矿化影响因子研究进展. 西华师范大学学报(自然科学版), 2004, 25 (3).