

土壤微生物生物量在团聚体中的分布以及耕作影响

陈 智, 蒋先军*, 罗红燕, 李 楠, 李 航

(西南大学资源环境学院,重庆 400715)

摘要:了解土壤微生物在土壤结构体内部的分布对于预测相关的土壤生物化学过程具有重要意义。由于气候、土壤以及耕作的影响,该领域的研究结果存在很大的空间和时间变异,因此有待进行更多的在不同气候和土壤类型下的研究。首次报道亚热带紫色水稻土中微生物生物量在长期不同耕作方式的土壤中不同水稳定性团聚体中的分布特征。结果表明微生物生物量在紫色水稻土水稳定性团聚体中的分布模式决定于土壤结构本身,而耕作方式的影响不显著;微生物生物量碳在不同粒级土壤团聚体中无显著性差异,微生物生物量氮与可溶性有机碳在 0.25 ~ 0.053 mm 微团聚体中含量最高;垄作免耕显著提高土壤团聚体中的微生物生物量及可溶性有机碳含量,而对微生物生物量及可溶性有机碳在土壤团聚体中的分布模式无显著影响。

关键词:土壤结构;免耕;土壤有机碳;微生物生物量

文章编号:1000-0933(2008)12-5964-06 中图分类号: 文献标识码:A

Distribution of soil microbial biomass within soil water-stable aggregates and the effects of tillage

CHEN Zhi, JIANG Xian-Jun*, LUO Hong-Yan, LI Nan, LI Hang

College of Resource and Environment, Southwest University, Chongqing 400715, China

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(12): 5964 ~ 5969.

Abstract: The distribution of soil microbes within soil aggregates is helpful to predict some essential soil biochemical processes. Results varied spatially and temporally because of factors such as climate, soil type, texture and dominant mineralogy as well. Therefore, further research under different climatic conditions and in different soil types needs to be carried out. The paper firstly reported the distribution pattern of microbial biomass in different sizes of water-stable aggregates under long-term different tillages in a subtropical purple paddy soil. Results showed that the distribution pattern of microbial biomass within water-stable aggregates depended on the structures of aggregates themselves, whereas tillage methods had no significant effect on it; Microbial biomass C had no significant differences among soil aggregates while microbial biomass N and water-soluble organic carbon are maximum in the 0.25 — 0.053mm microaggregates; Combing bridge and no-tillage remarkably increased the content of microbial biomass and water-soluble organic carbon, but had no significant effect on the distribution pattern of microbial biomass and water-soluble organic carbon in soil aggregates.

Key Words: soil structure; no-tillage; soil organic carbon; microbial biomass

在农业以及环境领域里,微生物活动对许多过程有重大的影响,如,N 的矿化、反硝化、生物固 N 和 C、N

基金项目:国家自然科学基金资助项目(40501033)

收稿日期:2008-05-04; 修订日期:2008-09-27

作者简介:陈智(1986 ~),女,硕士生,主要从事土壤生态学研究. E-mail: cz-1986@163.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: jiangxianjun@swu.edu.cn

Foundation item: The project was financially supported by National Natural Science Foundation of China (No. 40501033)

Received date: 2008-05-04; Accepted date: 2008-09-27

Biography: CHEN Zhi, Master candidate, mainly engaged in soil ecology. E-mail: cz-1986@163.com

循环,土壤结构的稳定性以及土壤中有机污染物的降解等^[1]。土壤中的微生物居住在一个由土壤颗粒控制的环境里,这些土壤颗粒的特性、形状和大小各异,并且具有高度复杂的空间分布与组成。土壤水稳定性团聚体是最重要的土壤结构体,了解微生物在土壤团聚体中的分布对于预测这些过程的发生以及反应速率是至关重要的^[2]。土壤微生物量中所含养分所占比例虽然小,但却是活的土壤有机质部分,能综合反映土壤微生物活性和有机质的分解过程^[3]。微生物量的任何变化将直接影响养分的循环和有效性,指示出生态系统功能的变化^[4]。

不同气候和土壤条件下的研究表明,大小不同的团聚体中有机碳含量、微生物数量及种群有较大差异^[5]。土壤微生物生物量在大小不同的土壤团聚体中的分布也有差异^[6]。Franzuebbers 和 Arshad^[7]研究发现,寒冷半干旱地区大团聚体中微生物量含量及其活性比较高,而 Roscoe 等^[8]则在热带地区对高风化淋溶土壤研究发现,<0.25 mm 的微团聚体中微生物具有较高的活性,土壤微生物主要吸附在小颗粒上^[9]。现有的研究显示,微生物生物量在大小不同的团聚体中分布情况在不同地区及耕作方式下存在着显著差异。由于土壤微生物生物量对土壤环境因子的变化极为敏感,农业中的耕作方式、轮作措施^[10]、有机残体的投入与施肥量^[11]都可能会引起土壤微生物生物量的改变。因此需要更多的在不同气候和土壤类型下的研究。

本文首次对长期田间定位试验的亚热带地区紫色水稻土土壤微生物生物量在不同团聚体中的分布特点进行研究,以及观察了耕作方式对微生物生物量在不同团聚体中分布的影响。

1 材料与方法

1.1 区域概况

试验地点位于重庆市北碚区西南农业大学试验农场。该生态区属亚热带季风气候,年平均降雨量为 1100 mm,常年平均温度 18.3 ℃,年日照 1270 h。

1.2 供试土壤

土壤样品采自重庆市北碚区原西南农业大学试验农场,土壤为中生代侏罗系沙溪庙组灰棕紫色沙泥岩母质上发育的中性紫色水稻土,试验前土壤的基本理化性质为:pH 7.1;有机质 23.1 g/kg;全氮 1.74 g/kg;全磷(P)0.75 g/kg;全钾(K) 22.7 g/kg;碱解氮 120.1 mg/kg;速效磷 7.5 mg/kg;速效钾 71.1 mg/kg;物理性粘粒 144.2 g/kg。

试验地在试验前一直采用一季中稻+冬水耕作制。1990 年开始紫色水稻土不同耕作制的长期定位试验,本试验设 2 个处理:(1) 垄作免耕(中稻-油菜)。(2) 常规水旱轮作(中稻-油菜)。土壤样品于 2007 年 10 月采集,两种处理均为每个小区按“S”形选取 4~5 个点,采取 0~20 cm 表层土壤,尽量避免挤压,以保持原状土壤结构。采回样品保存于 4℃ 的冰箱中。团聚体分级采用湿筛法^[12],制备(1)>2.0 mm,(2)2.0~0.25 mm,(3)0.25~0.053 mm,(4)<0.053 mm 的 4 种土样。

1.3 分析项目和方法

1.3.1 土壤微生物量碳

采用氯仿熏蒸浸提方法测定,方法原理和详细操作步骤见 Vance 等^[13]。称取 25 g 相当于烘干土壤质量的预培养湿润土壤于 50 ml 的玻璃瓶中,与盛有 50 ml 氯仿的玻璃瓶一起放入真空干燥器中,抽真空至氯仿沸腾后保持 3 min。将干燥器放入 25℃ 下 24 h 后,再次抽真空至完全去除土壤中的氯仿。将土壤完全转移到 200 ml 三角瓶中,加入 50 ml 0.5 mol·L⁻¹ K₂SO₄ 溶液,充分振荡 30 min 过滤,迅速测定滤液中含碳量。熏蒸开始的同时,另称取等量,加入 0.5 mol·L⁻¹ K₂SO₄ 溶液浸提,测定滤液中含碳量,并根据下式计算微生物量碳含量:

$$\text{土壤微生物量碳 } Bc \text{ (mg} \cdot \text{kg}^{-1}) = 2.64 Ec$$

式中,2.64 为微生物量碳系数,Ec 为熏蒸和未熏蒸土壤 K₂SO₄ 提取液的碳含量的差值。

1.3.2 土壤微生物量氮

采用氯仿熏蒸浸提方法测定,其方法原理和详细操作步骤参见 Brookes^[14]。用半微量凯氏法测定氮含

量,根据下式计算微生物量氮含量。

$$\text{土壤微生物量氮 } Bn \text{ (mg} \cdot \text{kg}^{-1}) = 1.85 En$$

式中,1.85为微生物量氮系数,En为熏蒸和未熏蒸土壤 K_2SO_4 提取液的氮含量的差值。

1.3.3 土壤可溶性有机碳^[15]

称样20 g,加水50 ml,振荡5 h,用0.45 μm 滤膜抽滤获得上清液。提取液用重铬酸钾一双酸(硫酸和硝酸)消煮,硫酸亚铁滴定的方法测定碳。

1.4 数据处理

数据的显著性检验采用SAS 6.12软件中的单因素方差分析(ANOVA)方法分析,不同处理之间多重比较采用LSD(Least Significant Difference)方法,然后进行t检验($p < 0.05$)。通过回归分析讨论土壤微生物生物量C与微生物生物量N以及微生物生物量C、N与可溶性有机碳的相关性程度。

2 结果

2.1 微生物生物量碳在土壤水稳定性团聚体中的分布

微生物生物量碳在土壤水稳定性团聚体中的分布如图1所示。结果表明,垄作免耕和常规耕作下,微生物生物量碳在土壤水稳定性团聚体中的分布具有相同的模式,土壤水稳定性团聚体中微生物生物量碳的分布较均匀。常规耕作下,微生物生物量碳在>2.0 mm粒级土壤团聚体中含量最高,为427 mg·kg⁻¹,最小值在0.25~0.053 mm粒级微团聚体中,为380 mg·kg⁻¹,但差异不显著。垄作免耕下,微生物生物量碳在<0.053 mm的土壤的粉砂与粘粒组分中含量最低,在不同粒级土壤团聚体中,微生物生物量碳分布较均匀,差异不显著。常规耕作土壤团聚体中微生物生物量碳含量介于306~427 mg·kg⁻¹之间,垄作免耕土壤团聚体中微生物生物量碳含量介于770~1009 mg·kg⁻¹之间,是常规耕作的2倍,垄作免耕显著提高土壤团聚体中微生物生物量碳含量。

2.2 微生物生物量氮在土壤水稳定性团聚体中的分布

微生物生物量氮在土壤水稳定性团聚体中的分布如图2所示。结果表明,垄作免耕和常规耕作下,微生物生物量氮在土壤水稳定性团聚体中的分布具有相同的模式,均在0.25~0.053 mm粒级土壤微团聚体中含量最高,是>0.25 mm粒级土壤团聚体和<0.053 mm粒级土壤粘粒的1.5~2.5倍,在>0.25 mm粒级土壤团聚体和<0.053 mm粒级土壤粘粒之间无显著性差异,微生物生物量氮在土壤团聚体中的分布模式不受耕作方式的影响。两种耕作方式下,小团聚体中微生物生物量氮高于大团聚体。常规耕作土壤团聚体中微生物生物量氮含量介于38~116 mg·kg⁻¹之间,垄作免耕土壤团聚体中微生物生物量碳含量介于202~348 mg·kg⁻¹之间,约为常规耕作的3~5倍,垄作免耕显著提高土壤团聚体中微生物生物量氮含量。土壤微生物生物量氮

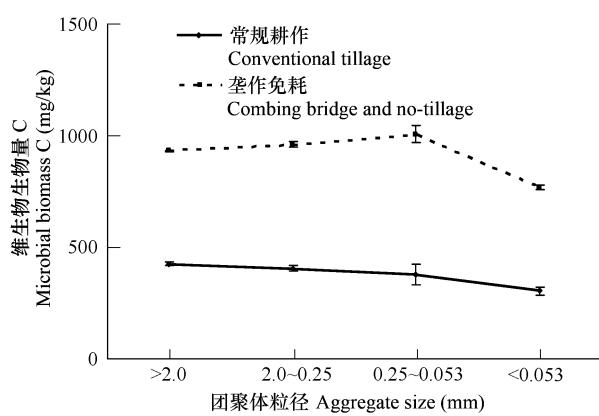


图1 不同耕作方式下土壤团聚体中的微生物生物量碳的分布
(误差线表示标准差)

Fig. 1 Distribution of microbial biomass C in soil aggregates under different tillages (Bars represent standard deviations)

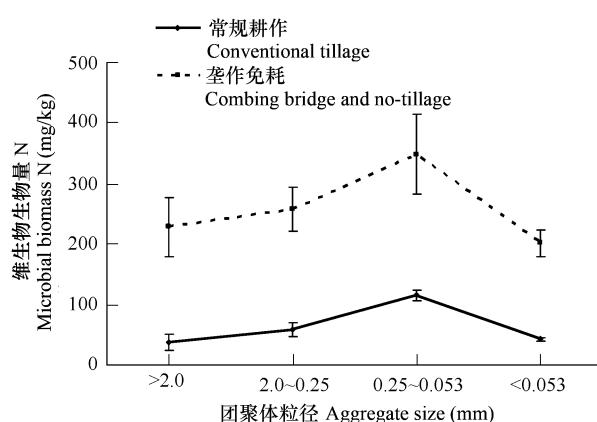


图2 不同耕作方式下土壤团聚体中的微生物生物量氮的分布
(误差线表示标准差)

Fig. 2 Distribution of microbial biomass N in soil aggregates under different tillages (Bars represent standard deviations)

与土壤微生物生物量碳之间存在极显著的相关关系 ($r=0.948, P<0.01$) (图3)。

2.3 可溶性有机碳在土壤水稳定性团聚体中的分布

可溶性有机碳在土壤水稳定性团聚体中的分布如图4所示。结果表明,垄作免耕和常规耕作下,可溶性有机碳在土壤水稳定性团聚体中的分布具有相同的模式,均在0.25~0.053 mm粒级土壤微团聚体中含量最高,0.25~0.053 mm粒级微团聚体和<0.053 mm粒级粘粒中含量显著大于>2.0 mm粒级和2.0~0.25 mm粒级大团聚体,大小不同粒级土壤团聚体间有显著性差异,小团聚体中可溶性有机碳高于大团聚体,可溶性有机碳在土壤团聚体中的分布模式不受耕作方式的影响。常规耕作土壤团聚体中可溶性有机碳含量介于104~213 mg·kg⁻¹之间,垄作免耕土壤团聚体中微生物生物量碳含量介于158~283 mg·kg⁻¹之间,约为常规耕作的2倍,垄作免耕显著提高土壤团聚体中可溶性有机碳含量。

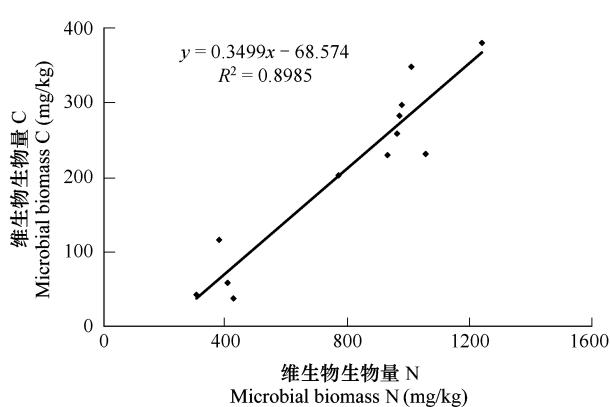


图3 土壤微生物生物量氮与土壤微生物生物量碳的相关性

Fig. 3 The correlation between soil microbial biomass N and soil microbial biomass C ($n=12$)

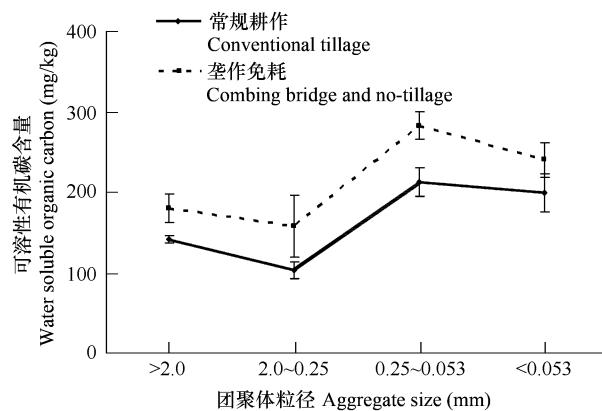


图4 不同耕作方式下土壤团聚体中可溶性有机碳的分布(误差线表示标准差)

Fig. 4 Distribution of water soluble organic carbon in soil aggregates under different tillages (Bars represent standard deviations)

3 讨论

3.1 微生物生物量在土壤团聚体中的分布

土壤微生物是土壤结构形成的重要生物因素,微生物生物量常常作为反映土壤微生物活性的重要指标,决定着土壤中C、N、P的转化及土壤肥力^[16]。微生物生物量在水稳定性团聚体中的分布模式能够灵敏地反映出微生物在团聚体中的分布及作用状况。本研究结果表明,紫色水稻土中微生物生物量碳在团聚体中分布均衡,不同粒级团聚体中的微生物生物量碳无显著性差异。微生物生物量是一个对土壤环境变化极为敏感的因素,土壤的任何变化都将会引起土壤微生物生物量的改变,在一定条件下,有机碳含量愈高,相应地含有较高微生物生物量碳^[17]。有不少研究表明,大团聚体比小团聚体含有更多的有机碳^[18]和易分解的有机物质^[19],有机碳在团聚体中分布有较大差异,微生物生物量在团聚体中分布的研究报道结果也存在很大差异。Gupta和Germida^[20]对加拿大地区的棕色黑钙土的研究中发现大团聚体相对于小团聚体含有更多的微生物生物量碳,Franzluebbers和Arshad^[7]研究表明,寒冷半干旱地区大团聚体中微生物量含量及其活性比较高,Hernández^[21]在热带稀树大草原土壤中也报道大团聚体中微生物生物量碳含量高于小团聚体。而Roscoe等^[8]则在热带地区对高风化淋溶土壤研究发现,<0.25 mm的微团聚体中微生物具有较高的活性,Seech^[22]和Mendes^[23]报道小团聚体中微生物活性相同或更高。在不同的地区和气候土壤条件下,微生物生物量在团聚体中的分布差异很大。在17a的垄作免耕长期田间试验中,我们发现亚热带地区紫色水稻土中微生物生物量碳在团聚体中分布均衡,不同粒级团聚体的微生物生物量碳无显著性差异。Wright和Hons^[24]在20a的长期田间试验中的研究发现5~15 cm的亚表层土壤中,有机碳在团聚体中的分布均衡。文倩等在半干旱地区对微生物量在团聚体中分布的研究结果也表明,不同粒级团聚体的微生物生物量碳无显著性差异。亚热带地区紫色水稻土中微生物生物量碳在团聚体呈现均匀分布,该地区湿润多雨,常年热量适宜的气候,有机质输入

以及微生物活性等表现较稳定,同时长期的田间定位试验也可能使得微生物在团聚体中的分布变异减小而趋于均匀。土壤微生物生物量氮与土壤微生物生物量碳存在极显著的相关关系。总体上,微生物生物量氮含量小团聚体高于大团聚体,尤其在0.25~0.053 mm粒级微团聚体中含量较高,微生物生物量氮主要由粘粒和有机质的含量决定^[27]。

3.2 耕作方式对微生物生物量在团聚体中分布的影响

土壤微生物生物量对土壤环境因子的变化极为敏感,土壤微生物生物量的变化,能够非常灵敏地反映土地利用和管理上的差异,常作为由不同耕作措施引起土壤生物学性质变化的指标^[25]。在研究中发现垄作免耕显著增加团聚体中微生物生物量和可溶性有机碳含量,由于减少对土壤结构的扰动与破坏,大大增加土壤有机质数量和种类,显著增加土壤有机碳和微生物生物量^[26]。在本研究中首次发现亚热带地区紫色水稻土中,微生物生物量及可溶性有机碳在团聚体中的分布模式,在垄作免耕与常规耕作措施下无差异,微生物生物量及可溶性有机碳在团聚体中的分布均不受耕作措施的影响。有研究在不同深度下曾发现土壤微生物生物量碳氮在10~20cm深度不受耕作措施影响^[27],Hernández^[21]则进一步报道耕作措施差异对小团聚体中微生物生物量无显著影响,Elmholt^[28]在丹麦对耕层砂质壤土研究中发现不同作物种植方式下,微生物生物量在不同粒级的土壤团聚体中无显著差异。微生物生活在一个由土壤颗粒空间几何分布决定的环境中,土壤结构中孔隙的分布特点,影响着水分及空气的分布,从而影响着微生物群落在土壤结构中的空间分布及微生物生物量在团聚体中的分布模式。研究表明土壤团聚体孔隙分布特点主要受团聚体本身结构特性影响,而受耕作措施的影响不显著^[29]。Wright和Hons^[24]通过20a的长期田间试验也发现,土壤有机碳在团聚体中的分布不受耕作措施的影响。

4 结论

微生物生物量及可溶性有机碳在亚热带地区紫色水稻土水稳定性团聚体中的分布主要受团聚体结构本身的影响,而受耕作措施的影响不显著;微生物生物量碳在土壤团聚体中分布均匀,微生物生物量氮与可溶性有机碳在微团聚体中含量最高。垄作免耕有利于提高土壤团聚体中的微生物生物量及可溶性有机碳含量。

References:

- [1] Chenu C, Soulard G. Variability of pesticide mineralization in individual soil aggregates of millimeter size. *Developments in Soil Science*, 2002, 28(1):127—136.
- [2] Jiang X J, Li H, Xie D T, et al. Application and prospect of fractal theory in study on soil fertility. *Soils*, 2007, 39(5):677—683.
- [3] Jenkinson D S, Ladd J N. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. *Soil Biochemistry*, 1981, 5:415—471.
- [4] Andeson T H, Dormesch K H. The metabolic quotient for CO₂ ($q\text{CO}_2$) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 1993, 25:393—395.
- [5] Jastrow J D. Soil aggregate formation and the accrual of particulate Organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, 1996, 28(4-5): 665—676.
- [6] Wen Q, Zhao X R, Tuo D B. The distribution characteristics of microbial biomass nitrogen in different soil aggregate in semi-arid area. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38(1):91—95.
- [7] Franzluebbers A J, Arshad M A. Soil organic matter pools with conventional and zero tillage in a cold, semi-arid climate. *Soil and Tillage Research*, 1996, 15:1—11.
- [8] Roscoe R, Buurman P, Velthorst E J, et al. Soil organic matter dynamics in density and particle size fractions as revealed by the ¹³C/¹²C isotopic ratio in a Cerrado's oxisol. *Geoderma*, 2001, 4:185—202.
- [9] Kandeler E, Stermmer M, Klimanek E M. Response of soil microbial biomass, urease and xylanase within particle size fractions to long-term soil management. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31:261—273.
- [10] Zhang L, Xiao J Y, Xie D T, et al. Study on microbial characteristics in paddy soil under long-term no-tillage and ridge culture. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2002, 16(2):111—114.
- [11] Yang J F, Han X F, Yin H B, et al. Effect of different fertilization treatment for the soft microbial biomass carbon of Maize. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2006, 22(1):173—176.
- [12] Elliot E T. Aggregate structure and carbon, nitrogen and phosphorus in native and cultivated soils. *Soils Science. Am. J.*, 1986, 50:627—633.

- [13] Vance E D, Brookes P C, Jenkison D S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, 1987, 19: 703 – 707.
- [14] Brookes P C, Andrea L, Pruden G, et al. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 1985, 17(6): 837 – 842.
- [15] Zhang J S, Tao S, Cao J. Soil sample preservation and pretreatment for water soluble organic carbon determination. *Chinese Journal of Soil Science*, 2000, 31(4): 174 – 176.
- [16] Parton W, Schimel D, Cole C, et al. Analysis of factors controlling soil organic matter levels in Great Plains grasslands. *Soil Science Society of America*, 1987, 51: 1173 – 1179.
- [17] Roy S, Singh J S. Consequences on habitat heterogeneity for availability of nutrients in a dry tropical forest. *Journal of Ecology*, 1994, 82: 503 – 509.
- [18] Lin Q M, Brookes P C. An evaluation of the substrate. Induced respiration method. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31: 1969 – 1983.
- [19] Buyanovsky G A, Aslam M, Wanger G H. Carbon turnover in soil physical fraction. *Soil Science Society of America Journal*, 1994, 58: 1167 – 1173.
- [20] Gupta V V S R, Germida J J. Distribution of microbial biomass and its activity in different soil aggregate size classes as affected by cultivation. *Soil Biology and Biochemistry*, 1988, 20: 777 – 786.
- [21] Hernández R M. Microbial biomass, mineral nitrogen and carbon content in savanna soil aggregates under conventional and no-tillage. *Soil Biology and Biochemistry*, 2002, 34: 1563 – 1570.
- [22] Seech A. G, Beauchamp E. G. Denitrification in soil aggregates of different sizes. *Soil Society of America Journal*, 1988, 52: 1616 – 1621.
- [23] Mendes I C, Bandick A K, Dick R P, et al. Microbial biomass and activities in soil aggregates affected by winter cover crops. *Soil Science Society of America Journal*, 1999, 63: 873 – 881.
- [24] Wright A L, Hons F M. Soil carbon and nitrogen storage in aggregates from different tillage and crop regimes. *Soil Science Society America*, 2005, 169: 141 – 148.
- [25] Chapman S J, Campbell C D, Purl G. Native woodland expansion: soil chemical and microbiological indicators of change. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35: 753 – 764.
- [26] Gao M, Zhang L, Wei C F, et al. Study of the changes of the rice yield and soil fertility on the paddy field under longterm no-tillage and ridge culture conditions. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2004, 10(4): 343 – 348.
- [27] Elliott E T, Coleman D C. Let the soil work for us. *Ecol*, 1988, 39: 23 – 32.
- [28] Elmholt S, Schjonning P, Munkholm L J, et al. Soil management effects on aggregate stability and biological binding. *Geoderma*, 2008, 144(3/4): 455 – 467.
- [29] Shi Z L, Jiang X J, Zhang W, et al. Influences of combing ridge and no-tillage on pore characteristics of soil aggregates in a rice-based cropping system. *Southwest China Journal of Agricultural Science*, 2008, 21(1): 30 – 34.

参考文献:

- [2] 蒋先军,李航,谢德体,等.分形理论在土壤肥力研究中的应用与前景. *土壤*,2007,39(5):677 ~ 683.
- [6] 文倩,赵小蓉,陈焕伟,等.半干旱地区不同土壤团聚体中微生物量氮的分布特征. *中国农业科学*,2005,38(1):91 ~ 95.
- [10] 张磊,肖剑英,谢德体,等.长期免耕水稻田土壤的生物特征研究. *水土保持学报*,2002,16(2):111 ~ 114.
- [11] 杨劲峰,韩晓日,阴红彬,等.不同施肥条件对玉米生长季耕层土壤微生物量碳的影响. *中国农学通报*,2006,22(1):173 ~ 176.
- [15] 张甲坤,陶澍,曹军.土壤中水溶性有机碳测定中的样品保存与前处理方法. *土壤通报*,2002,31(4):174 ~ 176.
- [26] 高明,张磊,魏朝富,等.稻田长期垄作免耕对水稻产量及土壤肥力的影响研究. *植物营养与肥料学报*,2004,10(4):343 ~ 348.
- [29] 施占领,蒋先军,张维,等.稻田垄作免耕对土壤的中小团聚体孔隙分布的影响. *西南农业学报*,2008,21(1):30 ~ 34.