

瞿建宏, 罗永宏, 袁丽萍, 等. 甲萘威对普通小球藻生长和主要生理指标的影响[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(9): 318–321.

甲萘威对普通小球藻生长和主要生理指标的影响

瞿建宏¹, 罗永宏², 袁丽萍¹, 胡庚东¹, 陈家长^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心/农业部长江下游渔业资源环境科学观测实验站/中国水产科学研究院内陆渔业生态环境和资源重点开放实验室, 江苏无锡 214081; 2. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏无锡 214081)

摘要: 为了解甲萘威对水生生态系统中初级生产力的影响, 以普通小球藻 (*Chlorella Vulgaris*) 为供试藻种, 研究了甲萘威对其生物量以及叶绿素 a、丙二醛和可溶性蛋白质含量的影响。结果表明, 甲萘威对普通小球藻生长抑制的 96 h EC₅₀ 为 2.50 mg/L。将普通小球藻暴露于不同浓度的甲萘威 (对照、1.5、10 mg/L) 下, 作用 7 d 后, 发现普通小球藻叶绿素 a 含量随着甲萘威浓度的增加而下降、丙二醛含量逐渐上升、可溶性蛋白质的含量呈先升高后降低的变化趋势。结果表明, 甲萘威对普通小球藻是高毒农药, 对普通小球藻的生长能产生显著的抑制作用, 从而降低水生生态系统的初级生产力。

关键词: 甲萘威; 普通小球藻; 生物量; 生理指标

中图分类号: X52 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2013)09–0318–03

甲萘威属苯基氨基甲酸酯类农药, 主要通过抑制体内胆碱酯酶活性来发挥其毒性作用。目前, 国内外对甲萘威的研究主要集中在检测方法以及对动物激素水平和生化指标的影响^[1–3]方面。而有关甲萘威对水生生态系统中初级生产力影响的研究则鲜有报道^[4–6]。

藻类是水生生态系统的初级生产者, 其种类多样性和初级生产量直接影响水生生态系统的结构和功能, 对生态系统的平衡和稳定也起着重要的作用, 是较为理想的化学物质测试生物^[7]。此外, 藻类对环境污染非常敏感, 通过测定和评价外源污染物对藻类生长的影响, 可以反映出污染物对整个水生生态系统中初级生产力可能产生的综合效应^[8]。因此, 研究污染物对藻类的毒害作用对评价污染物的生态风险具有科学意义。本试验研究甲萘威对普通小球藻生长效应的影响, 以期对合理评价、管理和控制这一类物质提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 试剂、仪器及试验材料

甲萘威 (常州长龙化工有限公司, 纯度 ≥ 87%)、丙酮 (分析纯)、三氯乙酸 (分析纯)、硫代巴比妥酸 (分析纯)、考马斯亮蓝 G-250, 全温光照振荡培养箱 (太仓市华美生化仪器厂), 紫外分光光度计 UV-1200 (上海美谱达仪器有限公司), 血小球计数板, 普通小球藻藻种 (中国科学院水生生物

研究所)。

1.2 试验条件

甲萘威对普通小球藻生物量的影响试验设置 6 个浓度梯度组 [0 (对照组)、0.5、1.2、4.8、7.6、10.0 mg/L], 每组设 3 个平行。试验容器为 500 mL 锥形瓶, 培养体积为 200 mL。普通小球藻的培养采用 BG-11 培养基。培养温度 (25 ± 2) °C、光强 2 800 ~ 3 000 lx、光暗时间 12 h–12 h, 静置培养, 每天定时摇动 3 次。镜检藻细胞正常, 进入对数生长期时进行试验。

根据甲萘威对普通小球藻生物量影响的研究结果, 设置 3 个浓度梯度 (1.5、10 mg/L), 研究甲萘威对普通小球藻叶绿素 a、丙二醛、可溶性蛋白质含量的影响。培养条件同上。

1.3 测定项目及方法

1.3.1 生物量的测定 通过在显微镜下用血小球计数板进行藻细胞计数以及在波长为 680 nm 下测定藻液光密度, 建立不同藻细胞浓度和光密度之间的线性关系, 试验中以测定的光密度和根据线性方程计算出的藻细胞浓度表示生物量。绘制普通小球藻的生长曲线, 确定普通小球藻的对数生长期。

1.3.2 叶绿素含量的测定 用 80% 的丙酮提取叶绿素, 分别在波长为 630、645、663、750 nm 下测定其光密度, 然后参照《水和废水监测分析方法》(第 4 版) 进行叶绿素含量计算, 以 mg/m³ 作为试验测定叶绿素含量单位。

1.3.3 丙二醛含量的测定 参照李合生的《植物生理生化实验原理和技术》^[9], 用硫代巴比妥酸的方法进行丙二醛含量的测定, 以 nmol/10⁷ cell 作为本试验测定 MDA 含量的单位。

1.3.4 可溶性蛋白质的测定 参照李合生的《植物生理生化实验原理和技术》^[9], 用考马斯亮蓝 G-250 染色法进行蛋白质含量的测定, 以 mg/g 作为本试验测定可溶性蛋白质含量的单位。

1.4 数据分析

试验数据采用 SPSS13.0 软件进行统计统计分析, 显著性水平取 α = 0.05, α = 0.01。以“*”表示试验组与对照组差异

收稿日期: 2013–03–22

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (编号: CARS-49); 中央级公益性科研院所基本科研业务 (编号: 2013JBFM05)。

作者简介: 瞿建宏 (1963—), 女, 江苏淮安人, 副研究员, 主要从事渔业生态环境保护方面的研究。Tel: (0510) 85559935; E-mail: qujh@ffrc.cn。

通信作者: 陈家长, 硕士, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为渔业环境保护和水产健康生态养殖技术。Tel: (0510) 85551443; E-mail: chenjz@ffrc.cn。

显著($P < 0.05$), “**”表示差异极显著($P < 0.01$)。

2 结果与分析

2.1 普通小球藻细胞浓度与光密度之间的关系

用血球计数板和分光光度法对一系列对数生长期的普通小球藻进行测定,得到藻液细胞个数(y)与 680 nm 处测定的吸光度($D_{680\text{ nm}}$),拟合两者的关系表明藻液中细胞个数与吸光度之间呈现较好的线性关系,拟合方程为:

$$y = 12.897D_{680\text{ nm}} - 0.0121 \quad (r^2 = 0.9998)$$

式中: y 为藻细胞浓度(10^6 个/mL)。经检验,小球藻细胞密度与光密度相关极显著($P < 0.01$),可用光密度值衡量藻类的密度。因此,本试验使用吸光度的测定值作为衡量小球藻生物量的指标。

2.2 甲萘威对普通小球藻生物量的影响

图1显示,在一个对数培养期(7 d)内,甲萘威在试验浓度范围内对普通小球藻的影响较大,并且不同的浓度对普通小球藻的影响程度不同,表现出了明显的剂量-效应关系。试验一开始,各个浓度处理组就表现出了一定的抑制作用,普通小球藻的生物量均少于对照组,但不同浓度的处理组对普通小球藻生长状况的影响无显著性差异($P > 0.05$),随着暴露时间的延长,各处理组生物量增长率均小于对照组,出现了不同程度的抑制效应,特别是 4.8、7.6、10.0 mg/L 甲萘威浓度处理组,在试验前 4 d,生长几乎处于停滞状态。从试验后 5 d 开始,4.8、7.6 mg/L 的甲萘威剂量组开始有所生长,并且表现为甲萘威浓度越高,普通小球藻的生物量增长越慢。试验后 7 d,除了最高剂量组以外,各浓度处理组普通小球藻生物量均表现出了一定的增长。甲萘威各个浓度处理组对普通小球藻的生长抑制率分别为 6.99%、17.83%、49.82%、65.46%、78.42%。

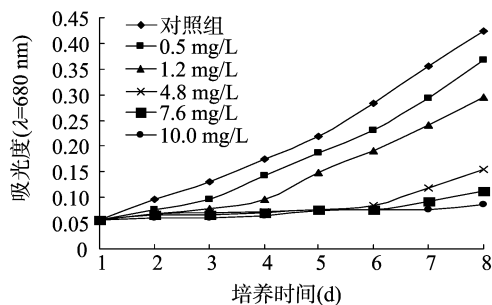


图1 甲萘威对普通小球藻生物量的影响

2.3 甲萘威对普通小球藻叶绿素 a 含量的影响

表1显示,不同浓度的甲萘威处理普通小球藻 7 d 后,对照组普通小球藻的叶绿素 a 的含量为 2 086.726 mg/m³。甲萘威不同浓度处理组(1、5、10 mg/L)的普通小球藻叶绿素 a 的含量分别为 1 590.407、778.597、523.824 mg/m³,是对照组叶绿素 a 含量的 76.22%、37.31%、25.10%。甲萘威对普通小球藻作用 7 d 后,1 mg/L 甲萘威对普通小球藻就表现出了与对照组明显的差异性($P < 0.05$),随着浓度的增加,差异性越来越明显。

2.4 甲萘威对普通小球藻丙二醛(MDA)含量的影响

丙二醛(MDA)是脂质过氧化作用的典型产物,其含量的高低可反映细胞膜脂过氧化的程度,是膜氧化损伤的重要指

表1 不同浓度的甲萘威对普通小球藻叶绿素含量的影响(7 d)

甲萘威浓度(mg/L)	叶绿素 a 含量(mg/m ³)
0	2 086.726 ± 89.940
1	1 590.407 ± 134.295 *
5	778.597 ± 38.372 **
10	523.824 ± 51.793 **

标之一。从图2可以看出,1 mg/L 甲萘威浓度处理组虽然也能引起单位数量普通小球藻 MDA 含量的增加,高出对照组普通小球藻 MDA 含量的 29.31%,然而差异不显著($P > 0.05$)。5 mg/L 和 10 mg/L 甲萘威处理组的 MDA 含量比对照组分别高出 76.88% 和 185.26%,分别达到显著($P < 0.05$)和极显著($P < 0.01$)水平。

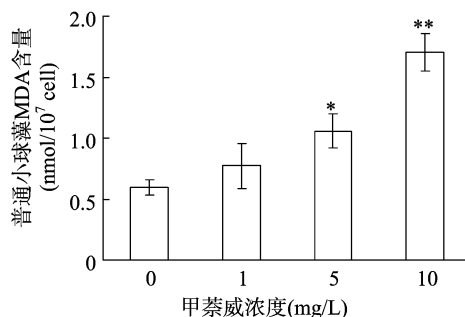


图2 不同浓度甲萘威对普通小球藻MDA含量的影响(暴露7 d后)

2.5 甲萘威对普通小球藻可溶性蛋白质含量的影响

如图3所示,对照组普通小球藻可溶性蛋白质含量为 1.551 mg/g,1、5、10 mg/L 甲萘威浓度组的普通小球藻可溶性蛋白质含量分别为 1.785、1.707、1.503 mg/g。1 mg/L 甲萘威处理组普通小球藻可溶性蛋白质含量高出对照组 15.09%,达到显著水平($P < 0.05$)。5 mg/L 甲萘威处理组普通小球藻可溶性蛋白质含量也高于对照组,但差异不显著($P > 0.05$)。当甲萘威的浓度达到 10 mg/L 时,对普通小球藻可溶性蛋白就产生了抑制作用,但差异不显著($P > 0.05$)。

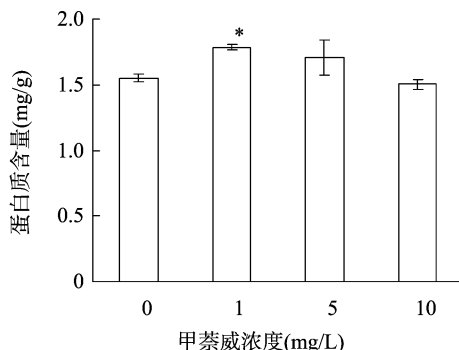


图3 不同浓度甲萘威对普通小球藻可溶性蛋白质含量的影响(7 d后)

3 讨论

根据普通小球藻的生长曲线,当初始接种密度为 $D_{680\text{ nm}} = 0.044$ 时,培养前 3 d 为生长延滞期,3 d 后普通小球藻进入生长对数期, $D_{680\text{ nm}} = 2.305$,其细胞个数为 29.72×10^6 个/mL,比徐晓燕在 N-苯基-2-萘胺对小球藻的毒性机制研究中所作的普通小球藻的生长曲线^[10]大 1 个数量级,

这有可能是因为普通小球藻在不同的培养环境条件下以及不同的初始接种密度,会导致普通小球藻生物量的增长不同。

通过浓度对数(x)与抑制率进行一元回归计算得出 96 h 后,甲萘威对普通小球藻的 EC_{50} 为 2.50 mg/L,根据藻类生长抑制毒性分级标准,可将甲萘威的毒性等级归为高毒,在 1 个对数培养期(7 d)内,甲萘威在试验浓度范围内对普通小球藻的影响较大,并且不同的浓度对普通小球藻的影响程度不同,表现出了明显的剂量-效应关系。在试验前 4 d,4.8、7.6、10.0 mg/L 甲萘威浓度处理组,普通小球藻的生长几乎处于停滞状态,从试验后 5 d 开始,4.8、7.6 mg/L 的甲萘威剂量组开始有所生长,并且表现为甲萘威浓度越高,普通小球藻的生物量增长越慢。试验后 7 d,除了最高剂量组以外,各浓度处理组普通小球藻生物量均表现出了一定的增长。说明甲萘威对普通小球藻具有一定的毒性,且浓度越高,毒性越强。

由甲萘威对普通小球藻叶绿素 a 影响的研究结果看,随着甲萘威浓度的增加,普通小球藻叶绿素 a 含量逐渐下降,并呈明显的剂量-效应关系,表明了藻细胞合成叶绿素 a 的水平下降^[11]。添加了甲萘威的培养基使普通小球藻处于一种胁迫环境,普通小球藻的光合作用呈现不同程度的下降趋势,表明甲萘威主要是使普通小球藻光能吸收和传递的叶绿素 a 含量减少,从而破坏普通小球藻的光合作用,同时,普通小球藻在逆境胁迫下,细胞膜也会受到损伤^[12]。主要是使起光能吸收和传递的叶绿素含量减少,破坏光合作用过程中的某些酶,抑制光合作用过程的进行或者直接破坏光合作用电子传递链降低光合作用效率^[13-14]。

MDA 是细胞氧化损伤的一个重要检测指标,它的含量反映了生物体受损伤的程度^[15]。从图 3 可以看出,随着甲萘威浓度的增加,普通小球藻脂质过氧化产物 MDA 含量也随之而增加。说明甲萘威造成了藻细胞内活性氧清除系统失活,不能有效地与活性氧建立新平衡,造成膜脂过氧化,藻细胞的 MDA 含量就会急剧上升,使藻细胞受到伤害。甲萘威浓度越高,对普通小球藻的氧化损伤越大。

蛋白质是植物体生命过程中重要的结构物质和功能物质^[16],植物在逆境胁迫下,细胞蛋白质合成受抑,植物通过应激反应合成新的蛋白质,以稳定细胞内酶系统^[17]。同时,植物内源蛋白质可能具有清除活性氧的作用^[18]。不同浓度甲萘威处理组对普通小球藻作用 7 d 后,对普通小球藻可溶性蛋白质造成了不同的影响。随着甲萘威浓度的不断加大,普通小球藻可溶性蛋白质含量表现出先升高后降低的趋势。这可能是由于在药物的胁迫下,普通小球藻藻细胞为了应对药物对其造成的胁迫效应,改变基因的表达,关闭一些正常表达的基因,启动一些与逆境相适应的基因,从而合成新的抗氧化酶抑或结构稳定、功能更强的同工酶,用以补偿被自由基破坏的抗氧化酶,基因表达的结果是蛋白质含量的升高。而随着作用药物浓度的升高,蛋白质含量逐渐降低,可能是因为药物大量进入藻细胞,诱导藻体产生过多自由基,破坏其原有体系的平衡,造成代谢紊乱,细胞结构出现不可逆转的破坏,进而抑制普通小球藻蛋白质的形成和积累。

4 结论

甲萘威对普通小球藻的生长具有明显的抑制作用,96 h

EC_{50} 为 2.50 mg/L。第 7 天时,0.5、1.2、4.8、7.6、10.0 mg/L 甲萘威浓度组对普通小球藻的生长抑制率分别为 6.99%、17.83%、49.82%、65.46%、78.42%,具有明显的剂量-效应关系。

生化指标研究显示,甲萘威对普通小球藻叶绿素 a、MDA 和可溶性蛋白质含量能产生明显影响。随着甲萘威浓度的增加,普通小球藻叶绿素 a 含量逐渐下降,MDA 含量逐渐升高,且都呈明显的剂量效应关系;而甲萘威对可溶性蛋白质含量的影响则表现为低促高抑现象。

参考文献:

- [1] Nivedhitha H, Thangavel P, Shaik D K, et al. Adaptive changes in the patterns of carbohydrate metabolites in blood, liver, muscle and heart tissues of *Sarotherodon mossambicus* (Peters) exposed to the carbamate fungicide ziram [J]. Pesticide Science, 1998, 52 (2): 133-137.
- [2] Bhavan P S, Geraldine P. Biochemical stress responses in tissues of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* on exposure to endosulfan [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2001, 70(1): 27-41.
- [3] Sevgiler Y, Oruc E O, Uner N. Evaluation of etoxazole toxicity in the liver of *Oreochromis niloticus* [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2004, 78: 1-8.
- [4] Rao D M, Murty A S, Swarup P A. Relative toxicity of technical grade and formulated carbaryl and 1-naphtol to, and carbaryl-induced biochemical changes in the fish *Cirrhinus mrigala* [J]. Environmental Pollution, 1984, 34: 47-54.
- [5] Ramaswamy M, Thangavel P, Panneer S N. Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamic pyruvic transaminase (GPT) enzyme activities in different tissues of *Sarotherodon mossambicus* (Peters) exposed to a carbamate pesticide, carbaryl [J]. Pesticide Science, 1999, 55(12): 1217-1221.
- [6] Ferrari A, Anguiano O L, Soleño J, et al. Different susceptibility of two aquatic vertebrates (*Oncorhynchus mykiss* and *Bufo arenarum*) to azinphos methyl and carbaryl [J]. Comparative Biochemistry and Physiology: Toxicology & Pharmacology, 2004, 139(4): 239-243.
- [7] 吴颖慧, 蔡磊明, 王捷, 等. 除草剂莠去津对 7 种藻类的生长抑制 [J]. 农药, 2007, 46(1): 48-51.
- [8] Wilson B A, Smith V H, deNoyelles F, et al. Effects of three pharmaceutical and personal care products on natural freshwater algal assemblages [J]. Environmental Science & Technology, 2003, 37(9): 1713-1719.
- [9] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [10] 徐晓燕. N-苯基-2-萘胺对小球藻的毒性机制研究 [D]. 杭州: 浙江工业大学, 2009.
- [11] Bornman J F, Vogelmann T C. Effect of UV-B radiation on leaf optical properties measured with fiber optics [J]. Journal of Experimental Botany, 1991, 42: 547-554.
- [12] Yu J Q, Ye S F, Zhang M F, et al. Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals, on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2003, 31(2): 129-139.
- [13] 宋海亮, 吕锡武. 利用植物控制水体富营养化的研究与实践 [J]. 安全与环境工程, 2004, 11(3): 35-39.

雷 忻,郭兆权,延志莲,等. 镉胁迫对泥鳅血清卵黄蛋白原的诱导作用[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):321-322.

镉胁迫对泥鳅血清卵黄蛋白原的诱导作用

雷 忻,郭兆权,延志莲,王文强,苑彩霞

(延安大学生命科学学院,陕西延安 716000)

摘要:将雄性泥鳅分别暴露于 4 种不同浓度镉(45、58、75、97 mg/L)中持续 7、14、21、28 d,采用碱不稳定性蛋白结合磷法检测泥鳅血清卵黄蛋白原(Vtg)水平的变化。结果显示,与对照相比,泥鳅在低浓度镉溶液(45 mg/L)中暴露 7 d,血清 Vtg 水平极显著升高,并且随着镉浓度的增加,Vtg 水平逐渐升高;在同一暴露浓度下,Vtg 水平在 14 d 略有下降,之后随暴露时间的延长逐渐升高。镉可诱导雄性泥鳅肝脏合成 Vtg,具有一定的环境雌激素效应,其诱导作用随着暴露剂量的增大和时间的延长逐渐增强。

关键词:镉;泥鳅;卵黄蛋白原;血清

中图分类号: Q958 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)09-0321-02

镉(Cadmium)是水中常见的重金属污染物,对水生生物及人体具有一定毒害作用。卵黄蛋白原(Vitellogenin, Vtg)是卵生动物卵黄蛋白的前体,雄性个体在外源雌激素或类雌激素化合物的诱导下可由肝细胞合成,因此雄性动物体内卵黄蛋白原的异常变化可作为生物标志物来检测环境化学污染物的雌激素效应^[1-2]。目前环境雌激素效应多集中于对酚类化合物的研究^[3-4],对重金属镉的环境雌激素效应研究鲜有报道。泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)是一种良好的土壤与水域环境污染的监测动物,是一种鲤形目(Cypriniformes) 鲶科(Cobitidae)泥鳅属(*Misgurnus*)^[5]小型淡水鱼,能适应淤泥、水体 2 种栖息环境,抗病能力较强,食性广,是一种较理想的动物试验材料^[6]。本研究以泥鳅为试验动物,检测镉胁迫下泥鳅血清 Vtg 水平的变化规律,分析其环境雌激素效应,旨在为重金属对鱼类的内分泌干扰作用研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验用泥鳅购于陕西省延安市农贸市场。室温下,用经

过 3 d 自然脱氯的自来水驯养 2 周后,挑选健康强壮的雄性泥鳅进行试验。受试泥鳅平均体重为(12.6 ± 3.5) g,平均体长为(11.4 ± 2.5) cm。氯化镉分析纯购自天津市福晨化学试剂厂。

1.2 暴露试验

根据预试验所确定的安全浓度和最大零致死浓度,将镉设置 4 个浓度处理(45、58、75、97 mg/L)进行毒性暴露试验,同时设置空白对照组。每个处理 3 次重复,每个处理 10 尾雄性泥鳅。24 h 更换 1 次受试药液,以保证药液溶氧量、pH 值、水温及其他理化指标的稳定^[7],并及时捞出死亡泥鳅。隔天喂食少许小米和玉米碎粒,取样前一天停止喂食。每隔 1 周观察 1 次鱼的活动、中毒情况以及体色变化。

1.3 血清样品制备

分别在试验开始后 7、14、21、28 d 处死泥鳅,断尾取血,所得血样在 4 ℃ 下静置 4 ~ 6 h,10 000 r/min 离心 15 min,取上清, -80 ℃ 冷冻保存^[8-10]。采血结束后,解剖泥鳅,根据性腺进一步鉴定其性别,雄性:白色精巢,雌性:黄色卵巢。

1.4 Vtg 含量测定

采用碱不稳定性蛋白结合磷的方法测定血清 Vtg 含量。将血清样品加入含 10% 三氯乙酸(TCA)溶液的离心管中,0 ℃ 过夜,离心;加入 5% TCA 溶液,90 ℃ 孵育 30 min,离心去上清;分别用无水乙醇、氯仿:乙醚:无水乙醇(体积比 1:1:2)、丙酮、乙醚按顺序清洗沉淀,弃上清;加入 NaOH,100 ℃ 水解 3 h,待测。将样品转入比色管中,盐酸中和,加显色液,37 ℃ 孵育 1.5 ~ 2 h。用 7230 型分光光度计测定 780 nm 波长处的吸光度,根据吸光度算出磷含量,即可反映 Vtg 的含量。为使测定的吸光度在有效范围内,将血清稀释

收稿日期:2013-05-02

基金项目:国家自然科学基金(编号:31240076);陕西省自然科学基金研究计划(编号:2012JM3012);陕西省高水平大学建设专项资金(编号:2012SXTS03);陕西省教育厅科学研究项目(编号:2013JK0710);陕西省延安市科学技术研究发展计划(编号:2012KS-15);生态学陕西省重点学科专项。

作者简介:雷 忻(1972—),女,陕西延安人,博士,副教授,主要从事环境毒理学及生态学研究。Tel:(0911)2332030;E-mail:leizz66@126.com。

[14] Srivastava A, Jüttner F, Strasser R J. Action of the allelochemical, fischerellin A, on photosystem II[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1364(3): 326-336.

[15] 梁长华. 纳米 NiO 对小球藻的生物毒性及致毒机制研究[D]. 大连:大连海事大学,2010:1-69.

[16] Longstreth D J, Nobel P S. Nutrient influences on leaf photosynthesis: effects of nitrogen, phosphorus, and potassium for *Goaaypium*

hirsutum L. [J]. *Plant Physiology*, 1980, 65(3): 541-543.

[17] 王丽娜, 克热木·伊力, 侯江涛. 水分胁迫对扁桃砧木叶片脯氨酸、可溶性蛋白质、质膜透性、相对含水量的影响[J]. *新疆农业大学学报*, 2006, 29(3): 53-58.

[18] 马剑敏, 李 今, 张改娜, 等. Hg²⁺ 与 POD 复合处理对小麦萌发及幼苗生长的影响[J]. *植物学通报*, 2004, 21(5): 531-538.