

金雷,成明根,孙斌,等.芽孢杆菌QC-13对咪唑乙烟酸污染土壤的生物修复[J].江苏农业科学,2015,43(6):300-303.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.06.099

芽孢杆菌 QC-13 对咪唑乙烟酸污染土壤的生物修复

金雷¹,成明根¹,孙斌¹,刘慧涛²,孙纪全³,黄星¹

(1.南京农业大学生命科学院,江苏南京 210095; 2.吉林省农业科学院,吉林长春 130013;

3.北京大学工学院包头研究院湿地工程技术研究所,内蒙古包头 014030)

摘要:在实验室条件下,研究了芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)QC-13对咪唑乙烟酸污染土壤的生物修复作用。投加降解菌QC-13可显著提高咪唑乙烟酸在土壤中的降解速率。当咪唑乙烟酸浓度为50 mg/kg干土,且QC-13的接种量为 10^8 CFU/g干土时,21 d后土壤中咪唑乙烟酸的降解率为66.2%,而对照土壤则为14.4%。咪唑乙烟酸的降解速率与接种量呈正相关,当接种量减少至 10^5 CFU/g干土时,降解率降低至31.8%。菌株QC-13降解土壤中咪唑乙烟酸的最适温度为30℃,降解率于21 d可达62.7%;当土壤含水量为40%时,于21 d时咪唑乙烟酸的降解率为62.2%,且降解率随含水量的增加而降低。接种QC-13可不同程度缓解土壤中浓度为50、100 μg/kg干土的咪唑乙烟酸对玉米、小麦的生长抑制作用。

关键词:芽孢杆菌;咪唑乙烟酸;生物修复;降解率;玉米;小麦

中图分类号: S154.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)06-0300-03

咪唑乙烟酸是20世纪80年代美国氰胺公司开发的咪唑啉酮类除草剂,为乙酰乳酸合酶抑制剂^[1-2]。该除草剂具有杀草谱广、活性高、选择性强等优点,是我国用于防治大豆产区杂草的重要农药之一^[3]。但咪唑乙烟酸在土壤中残留期长,随着使用年限的延长将对农田土壤造成污染,对后茬敏感作物产生药害,并导致大豆田轮作困难,造成经济损失^[4-5]。因此,咪唑乙烟酸在农田土壤中的降解以及受污染土壤的修复引起了科研工作者的广泛关注。目前已有研究人员发现TiO₂悬浊液可用于处理咪唑乙烟酸残留。2002年,Elazzouzi等发现以TiO₂作为催化剂可提高咪唑乙烟酸的降解效率^[6]。2005年,Renata等借助TiO₂提高液体中咪唑乙烟酸的降解速率,4 h内最高可达85%以上^[7];但该方法并不适于修复大面积农田土壤的除草剂污染。自Jerry等发现微生物在咪唑乙烟酸降解过程中起着非常重要的作用^[8]以来,咪唑乙烟酸的微生物降解研究引起了广泛关注。近几年,科研工作者在咪唑乙烟酸降解菌株的筛选方面取得了显著进展,分离得到一批高效降解菌株^[9-12]。降解菌株的获得使咪唑乙烟酸污染农田土壤的生物修复成为可能,但相关报道尚较少。本课题组在前期研究工作中分离得到1株咪唑乙烟酸降解菌株——芽孢杆菌QC-13,其降解性状优良。本研究采用盆栽试验法,探讨QC-13对土壤中咪唑乙烟酸的降解效果与影响因素,以及该菌株对敏感作物药害的解除,以为咪唑乙烟酸污染土壤的生物修复提供依据。

1 材料与与方法

1.1 菌株与供试植物

芽孢杆菌QC-13,由笔者所在实验室从咪唑乙烟酸长期污染的土壤中分离得到。以2%接种量将菌株QC-13接种于含50 mg/L咪唑乙烟酸的液体培养基中,7 d时降解率达68.2%。

玉米品种鲜糯1号、小麦品种扬麦16,均购自江苏省农业科学院。

1.2 供试土壤

供试土壤为黄棕壤,取自南京农业大学试验田,为从未接触过咪唑乙烟酸的表层土壤(0~20 cm),并风干过筛($\Phi=2$ mm)。土壤pH值为6.95,有机质含量为19.23 g/kg,有机氮、磷、钾的含量分别为1.57、0.35、16.48 g/kg。

1.3 供试农药、试剂及培养基

咪唑乙烟酸原药(有效成分含量95%以上),购自北京勤诚亦信科技开发有限公司。其他试剂除特别注明外均为分析纯。

LB培养基:蛋白胨10.0 g、酵母膏5.0 g、NaCl 10.0 g、去离子水1 000 mL,pH值为7.0,于121℃灭菌30 min。固体培养基加入2%琼脂粉。

1.4 菌种制备

挑取QC-13菌株接种于LB培养基中,于30℃、160 r/min条件下振荡培养约24 h后,6 000 r/min离心收集菌体并用PBS洗涤2次,再用PBS重悬, $D_{600\text{ nm}}$ 值约1.5,保存备用。

1.5 土壤中咪唑乙烟酸的提取及检测

称取土壤样品10 g于50 mL离心管中,加入25 mL的0.1 mol/L浓度氯化铵与氨水缓冲液(pH值为10.0)^[16],涡旋振荡1 min,6 000 r/min离心3 min,抽取10 mL上清液于50 mL三角瓶中,加入20 mL二氯甲烷,剧烈振荡5 min,静置分层后弃去上清液,过无水硫酸钠柱,取1.0 mL置于微量离心管中,氮气吹干。加入0.5 mL甲醇(色谱纯)溶解,经孔径

收稿日期:2014-07-10

基金项目:江苏省科技支撑计划(编号:BE2011783);吉林省世界银行贷款农产品质量安全应用研究项目(编号:2011-Z17)。

作者简介:金雷(1987—),男,浙江金华人,硕士,主要从事环境微生物学研究。

通信作者:黄星,博士,主要从事环境微生物学研究。E-mail: huangxing@njau.edu.cn。

0.22 μm 的有机相针头过滤器过滤后,液相色谱测定咪唑乙烟酸的含量^[13]。

1.6 土壤中咪唑乙烟酸降解试验

称取 500 g 灭菌和未灭菌的供试土壤,分别置于盆钵中并添加咪唑乙烟酸,充分拌匀后制成咪唑乙烟酸含量为 50 mg/kg 的含药土壤。向含药土壤加入 QC-13 菌液并充分混匀。共设 4 个处理:灭菌土添加菌液、灭菌土不添加菌液、未灭菌土添加菌液、未灭菌土不添加菌液,每处理 3 次重复。将各处理置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中避光培养,分别于 5、7、10、14、21 d 取样,采用 HPLC 法测定土壤中咪唑乙烟酸残留量。

1.7 接种量对降解效果的影响

土壤中咪唑乙烟酸的浓度为 50 mg/kg,接种不同体积的 QC-13 菌液,使土壤中菌体含量分别为 1.0×10^5 、 1.0×10^6 、 1.0×10^7 、 1.0×10^8 CFU/g 干土,置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中避光培养,分别于 5、7、10、14、21 d 取样,采用 HPLC 法测定土壤中的咪唑乙烟酸残留。

1.8 土壤含水量对降解效果的影响

土壤中咪唑乙烟酸的含量为 50 mg/kg,分别调节土壤含水量至最大含水量的 10%、20%、40%、50%,接种 QC-13 菌液,使土壤中菌体含量为 1.0×10^8 CFU/g 干土,置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中避光培养,分别于 5、7、10、14、21 d 取样,采用 HPLC 法测定土壤中的咪唑乙烟酸残留。

1.9 土壤温度对降解效果的影响

土壤中咪唑乙烟酸的含量为 50 mg/kg,接种 QC-13 菌液,使土壤中菌体含量为 1.0×10^8 CFU/g 干土,分别置于 20、25、30、37、42 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养,于 5、7、10、14、21 d 取样,采用 HPLC 法测定土壤中的咪唑乙烟酸残留。

1.10 菌株 QC-13 对玉米、小麦咪唑乙烟酸药害的解除作用

分别配制咪唑乙烟酸含量为 50、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的含药土壤,向 200 g 含药土壤中加入 QC-13 菌液,制成咪唑乙烟酸 + QC-13 土壤。置玉米、小麦种子于恒温培养箱浸种催芽 48 h,取萌发度一致的玉米、小麦种子分别播种于不同处理土壤中,每盆钵播种 5 粒,每处理设 5 次重复,以不加咪唑乙烟酸、降解菌土壤培养的玉米、小麦为空白对照。室温培养,适时喷水保湿,培养 10 d 后取植株地上部分并洗净,用吸水纸吸取植株表面水分,分别测量不同处理玉米、小麦地上部分的长度、质量。

1.11 数据处理

采用 DPSV13.5 软件对试验所得数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 菌株 QC-13 对土壤中咪唑乙烟酸的降解

菌株 QC-13 对灭菌及未灭菌土壤中的咪唑乙烟酸降解 21 d 后,未接种菌株 QC-13 的灭菌土中咪唑乙烟酸含量为 43.4 mg/kg,降解率为 13.2%;而接种菌株 QC-13 的灭菌土中咪唑乙烟酸含量为 18.7 mg/kg,降解率为 62.6% (图 1)。结果表明:添加降解菌 QC-13 可显著提高土壤中咪唑乙烟酸的降解速率。未灭菌土壤的未接种、接种处理中,降解率分别为 14.4%、66.2%,可见未灭菌土壤接种降解菌的降解效果略优于灭菌土壤。分析原因,可能是因为未灭菌土壤中的土著微生物与 QC-13 菌株之间可能存在一定共代谢作用,

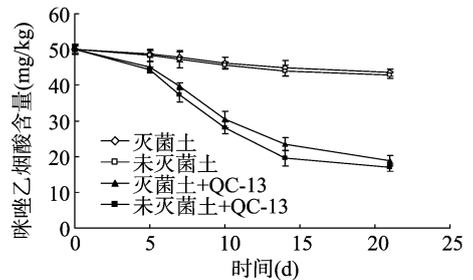


图1 菌株QC-13对土壤中咪唑乙烟酸的降解

从而提高了土壤中咪唑乙烟酸的降解速率。

2.2 接种量对QC-13降解土壤中咪唑乙烟酸的影响

当接种量为 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 CFU/g 干土时,降解率于 21 d 分别达到 31.8%、37.8%、49.2%、58.2% (图 2)。结果表明:接种量与土壤中咪唑乙烟酸的降解速率呈正相关,降解速率随接种量的增加而提高。

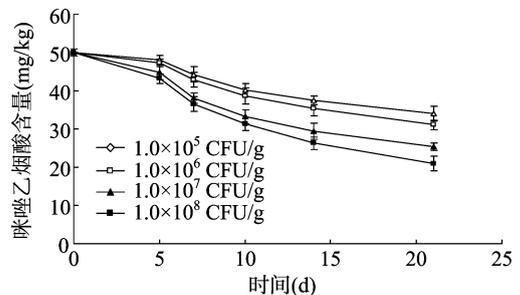


图2 接种量对菌株QC-13降解土壤中咪唑乙烟酸的影响

2.3 土壤含水量对降解效果的影响

土壤含水量为 10%、20%、40% 时,21 d 土壤中咪唑乙烟酸的降解率分别为 47.3%、55.4%、62.2%;土壤含水量为 50% 时,21 d 降解率仅为 25.2% (图 3)。结果表明:土壤含水量为 50% 时,土壤中咪唑乙烟酸的降解效率将明显降低。分析原因,可能由于水量过多导致土壤通气性较差,不利于菌株 QC-13 的生长,从而影响降解效率^[17-18]。

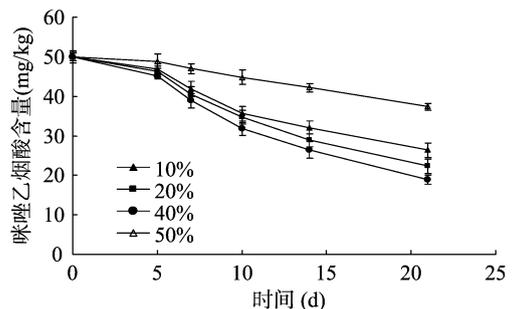


图3 含水量对菌株QC-13降解土壤中咪唑乙烟酸的影响

2.4 土壤温度对降解效果的影响

30 $^{\circ}\text{C}$ 时咪唑乙烟酸的 21 d 降解率为 62.7%;25、37 $^{\circ}\text{C}$ 时 21 d 降解率分别为 53.4%、48.2%;20、42 $^{\circ}\text{C}$ 时 21 d 降解率则分别降低至 33.4%、31.6% (图 4)。分析原因,环境温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 适宜菌株 QC-13 的生长,降解效果好;环境温度为 20、42 $^{\circ}\text{C}$ 则不利于菌株 QC-13 的生长,降解效果较差。

2.5 投加菌株QC-13对玉米、小麦咪唑乙烟酸药害的解除作用

采用土培法,咪唑乙烟酸含量为 50、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的土壤对玉米、小麦的生长均有抑制作用(表 1)。咪唑乙烟酸含量为

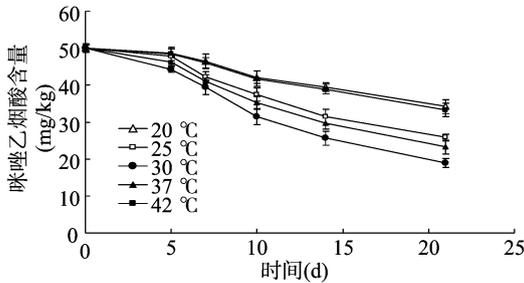


图4 土壤温度对菌株QC-13降解咪唑乙烟酸的影响

表1 接种QC-13对玉米、小麦咪唑乙烟酸药害的解除作用

处理	苗长 (cm)		苗质量 (g)	
	玉米	小麦	玉米	小麦
CK	25.42 ± 2.53A	14.52 ± 1.68A	6.36 ± 0.77A	4.57 ± 0.51A
50 μg/kg	11.27 ± 1.20C	6.94 ± 1.07B	3.52 ± 0.26BC	1.96 ± 0.16C
100 μg/kg	6.37 ± 0.95D	4.18 ± 0.69C	1.83 ± 0.11D	1.03 ± 0.09CD
50 μg/kg + QC-13	18.56 ± 2.87B	11.31 ± 1.24A	4.72 ± 0.21B	3.51 ± 0.31B
100 μg/kg + QC-13	12.32 ± 2.02C	7.12 ± 1.81B	3.45 ± 0.09C	2.12 ± 0.21C

注:表中数据为平均值 ± 标准差,大写字母表示最小显著差异测验在 $P=0.01$ 的差异水平。

3 讨论

关于咪唑乙烟酸残留药害的研究被相继报道。Johnson等研究发现使用咪唑乙烟酸1年以上将对玉米、高粱、水稻、棉花产生药害^[14]。Moyer等发现甜菜和马铃薯因咪唑乙烟酸残留而减产^[15]。Sullivan等经过3年研究发现,应用咪唑乙烟酸1年和2年后种植黄瓜、西红柿、白菜、马铃薯、甘蔗将发生药害和减产^[16]。我国每年咪唑乙烟酸原药使用量为150~300 t^[17],咪唑乙烟酸的大量使用带来环境风险与较严重的药害问题,引起了广泛关注。利用高效降解微生物进行农药污染土壤的原位生物修复具有许多优势,适于田间的推广应用。本研究采用盆钵试验的方法,探讨降解菌株QC-13对土壤中咪唑乙烟酸的降解效果,以及各因素对降解的影响。在土壤中,降解菌QC-13的降解速率受土壤温度、湿度、接种量等因素的影响。这些因素一方面影响土壤的特性;较高土壤温度有利于农药从土壤颗粒的表面释放,使水相中溶解更多咪唑乙烟酸;较高土壤湿度有助于农药在水相中分布^[18-19]。另一方面对降解菌的生长、降解酶的活性起决定性作用;降解菌在适宜的温度、湿度条件下才能更好地生长,降解过程中的酶也需要适宜的条件^[20-21]。摸索适宜的环境条件是降解菌有效降解咪唑乙烟酸的重要保证。本研究以玉米、小麦为供试植物探讨菌株QC-13对咪唑乙烟酸药害的解除作用,发现投加QC-13有较好的解除效果。研究结果表明:QC-13是1株品质优良的咪唑乙烟酸降解菌,对于咪唑乙烟酸污染土壤的生物修复具有一定应用前景。

参考文献:

- [1] Mangels G. Behavior of the imidazolinone herbicides in soil [M]// Mangels G. The imidazolinone herbicides. Boca Raton, FL: CRC Press, 1991: 289-299.
- [2] Zhou Q Y, Liu W P, Zhang Y S, et al. Action mechanisms of acetolac-

tate synthase-inhibiting herbicides [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2007, 89(2): 89-96.

50、100 μg/kg 的含药土壤中,玉米苗长分别为 11.27、6.37 cm,与空白对照玉米苗长 25.42 cm 相比差异显著;小麦苗长分别为 6.94、4.18 cm,与空白对照小麦苗长 14.52 cm 相比差异显著。当含药土壤中接种降解菌 QC-13 后,可一定程度解除药害作用。咪唑乙烟酸含量为 50、100 μg/kg 的含药土壤加入降解菌后,玉米苗长分别恢复生长至 18.56、12.32 cm;小麦苗长分别恢复生长至 11.31、7.12 cm。苗质量也表现出与苗长一样的变化趋势(表 1)表明投加菌株 QC-13 对玉米、小麦咪唑乙烟酸药害有一定解除作用。

- [3] 赵爽,叶非. 咪唑啉酮类除草剂的应用及降解 [J]. 植物保护, 2009, 35(2): 15-19.
- [4] 李为忠,范东升,栾宇博. 胺苯磺隆、氯嘧磺隆和咪唑乙烟酸的应用现状、问题及对策 [J]. 农药, 2008, 47(11): 781-784, 789.
- [5] 黄春艳,陈铁保,王宇,等. 咪唑啉酮类除草剂对后茬作物安全性研究初报 [J]. 农药学报, 2001, 3(2): 29-34.
- [6] Elazzouzi M, Mekkaoui M, Zaza S, et al. Abiotic degradation of imazethapyr in aqueous solution [J]. Journal of Environmental Science and Health. Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, 2002, 37(5): 445-451.
- [7] Renata R I, Mitsugu I H, Takashima K. Photocatalytic degradation of imazethapyr herbicide at TiO₂/H₂O interface [J]. Chemosphere, 2005, 58(10): 1461-1469.
- [8] Jerry L, William W W. Microbial degradation of imazaquin and imazethapyr [J]. Weed Science, 1997, 45: 586-591.
- [9] 曹知平,许景钢,李淑芹,等. 黑曲霉 LZ1 降解咪唑乙烟酸的特性 [J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(7): 66-70.
- [10] 陈玉洁,束长龙,刘新刚,等. 咪唑乙烟酸降解菌的分离、鉴定及降解特性研究 [J]. 农药学报, 2011, 13(4): 387-393.
- [11] 丁伟,白鹤,程苗,等. 咪唑乙烟酸降解菌的分离、鉴定及其降解特性研究 [J]. 环境科学, 2008, 29(5): 1359-1362.
- [12] 刘亚光,马超,庞福德. 降解除草剂咪唑乙烟酸细菌的分离鉴定及生长特性 [J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(2): 7-12.
- [13] 黄安太,车军,赵科华,等. 咪唑乙烟酸在不同土壤和水体中的残留动态研究 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(33): 10769-10770.
- [14] Johnson D H, Jordan D L, Johnson W G, et al. Nicosulfuron, primisulfuron, imazethapyr, and DPX-PE350 injury to succeeding crops [J]. Weed Technology, 1993, 3: 641-644.
- [15] Moyer J R, Esau R. Imidazolinone herbicide effects on following rotational crops in southern Alberta [J]. Weed Technology, 1996, 1: 100-106.

姜春阳,贾春云,张丽芳,等. 微生物胞外聚合物对土壤中芘降解效果的促进作用[J]. 江苏农业科学,2015,43(6):303-306.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.06.100

微生物胞外聚合物对土壤中芘降解效果的促进作用

姜春阳¹, 贾春云², 张丽芳¹, 谷 玥³, 巩宗强²

(1. 沈阳理工大学, 辽宁沈阳 110168; 2. 中国科学院沈阳应用生态研究所污染生态与环境工程重点实验室, 辽宁沈阳 110016;
3. 沈阳师范大学, 辽宁沈阳 110034)

摘要:研究外加不同浓度胞外聚合物(EPS)对芽孢杆菌和黑曲霉降解土壤中芘效果的影响。结果表明,在100 mg/kg 芘污染土壤中添加芽孢杆菌 EPS 由 411.78 mg/kg 增加到 2 779.54 mg/kg,土壤中芘的残余浓度减少 6.27 mg/kg;向土壤中接种芽孢杆菌 0.86 亿 CFU/kg,芘的降解率为 36.99%,EPS 由 411.78 mg/kg 增加到 2 779.54 mg/kg,芘残留浓度下降到 47.72 mg/kg。黑曲霉 EPS 由 1 387.68 mg/kg 增加到 3 844.37 mg/kg,土壤中芘的残余浓度由 42.36 mg/kg 降至 31.12 mg/kg;向土壤中接种黑曲霉 1.0 亿 CFU/kg,EPS 浓度由 1 387.68 mg/kg 增加到 3 844.37 mg/kg,芘残留浓度降至 38.15mg/kg。因此,真菌和细菌的 EPS 具有较强的降解土壤中芘的能力,且 EPS 浓度越高土壤中芘的降解效果越好。

关键词:胞外聚合物(EPS);芘;芽孢杆菌;黑曲霉;土壤;降解

中图分类号: X53 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)06-0303-04

土壤环境中持久性有机污染物的生物修复技术是国际污染修复领域研究的热点^[1]。在多环芳烃(PAHs)污染土壤的多种生物修复技术中,微生物修复技术应用最广泛,主要是通过驯化土著微生物或人为投加外源微生物对土壤中 PAHs 进行转化、降解与去除^[2-3]。目前,有关 PAHs 污染土壤的微生物修复技术及降解机理已有许多文献报道^[4-6],包括高效降解菌分离筛选与鉴定、微生物对 PAHs 的代谢途径、PAHs 降解酶等,且取得了很大进展。有关微生物胞外聚合物(extracellular polymeric substances,EPS)在有机污染土壤修复过程中作用的研究还未见报道。胞外聚合物是一定环境条件下微生物分泌于体外的一种高分子黏性聚合物,还包括一些细胞脱落物以及从环境中吸附的有机物^[7]。EPS 主要由多糖、蛋白质和腐殖酸等组成^[8-9]。EPS 可分为溶解性 EPS

(soluble EPS,sEPS)和结合态 EPS(bound EPS,bEPS)。bEPS 呈现有流变性的双层结构,可分为紧密黏附的内层(tightly bound EPS,TB)和松散附着的外层(loosely bound EPS,LB)。EPS 在水中重金属和有机污染物的去除中起到了很重要作用,Foster 等研究了活性污泥胞外聚合物紧密层和松散层的提取及其对金属离子的吸附,并预测出松散层 EPS 使细胞对金属离子产生了抗毒性^[10-11]。Makoto 等报道,向石油污染海水中同时加入 rhodochrous 的胞外聚合物和矿物能乳化石油,并能提高石油中 PAH 的降解能力^[12]。关于 EPS 在 PAHs 污染土壤修复过程中的作用,Dohse 等指出,胞外聚合物能增加疏水性污染物在土壤中的移动性,并且污染物与 EPS 作用阻止了微生物对污染物的直接消化降解^[13]。可见,EPS 在微生物降解 PAHs 过程中起到了重要的衔接作用。本研究以土壤中芘为研究对象,添加芽孢杆菌 EPS 和黑曲霉 EPS,研究外加 EPS 对土壤中芘降解效果的影响,并通过扫描电子显微镜和透射电子显微镜对微生物及 EPS 的形态进行表征,探索 EPS 对土壤中芘降解效果的促进作用。

1 材料与方法

1.1 试验所用土壤

试验所用土壤采自中国科学院沈阳应用生态研究所生态

收稿日期:2014-07-04

基金项目:国家自然科学基金(编号:41201310、41271336、41101295、40930739);沈阳大学区域污染环境生态修复教育部重点实验室资金。

作者简介:姜春阳(1989—),女,硕士研究生,主要从事土壤污染生态研究。E-mail:396429901@qq.com。

通信作者:贾春云,博士,助理研究员,主要从事土壤污染生态研究。Tel:(024)88087789;E-mail:jiachunyun@126.com。

[16] Sullivan J O, Thomas R J, Bouw W J. Effect of imazethapyr and imazamox soil residues on several vegetable crops grown in Ontario [J]. Canadian Journal of Plant Science, 1998, 78(4): 647-651.

[17] Zhang C P, Xu J, Liu X G, et al. Impact of imazethapyr on the microbial community structure in agricultural soils [J]. Chemosphere, 2010, 81(6): 800-806.

[18] Nemeth-Konda L, Füleky G, Morovjan G, et al. Sorption behaviour of acetochlor, atrazine, carbendazim, diazinon, imidacloprid and isoproturon on Hungarian agricultural soil [J]. Chemosphere, 2002,

48(5): 545-552.

[19] Hees P A, Johansson E, Jones D L. Dynamics of simple carbon compounds in two forest soils as revealed by soil solution concentrations and biodegradation kinetics [J]. Plant and Soil, 2008, 310: 11-23.

[20] 滕 应, 骆永明, 李振高, 等. 多氯联苯复合污染土壤的土著微生物修复强化措施研究 [J]. 土壤, 2006, 38(5): 645-651.

[21] 王庆仁, 刘秀梅, 崔岩山, 等. 土壤与水体有机污染的生物修复及其应用研究进展 [J]. 生态学报, 2001, 21(1): 159-163.