

两株苯唑草酮降解真菌的分离与鉴定

潘国强^{1,2,3}, 杨峰山^{1,2,3}, 刘晓鑫^{1,2,3}, 马玉堃^{1,2,3}, 付海燕^{1,2,3}, 刘春光^{1,2,3}

(¹黑龙江大学农业微生物技术教育部工程研究中心, 哈尔滨 150500;

²黑龙江大学生命科学学院, 黑龙江省寒地生态修复与资源利用重点实验室, 哈尔滨 150080;

³黑龙江大学生命科学学院, 黑龙江省普通高校微生物重点实验室, 哈尔滨 150080)

摘要:为了解决玉米田除草剂苯唑草酮长期施用造成土壤中大量残留问题,本研究利用富集驯化法进行菌株筛选,利用高效液相色谱法测定其降解能力,通过形态和18S rDNA序列分析对其进行种属鉴定。结果表明,本研究从长期施用苯唑草酮的土壤中分离纯化出5株能以苯唑草酮为唯一碳源生长的真菌菌株TOF₁, TOF₂, TOF₃, TOF₄和TOF₅。它们在7天内对初始浓度400 mg/L苯唑草酮的降解率分别为35.86%、34.35%、32.12%、9.91%和27.99%,通过重复验证,发现TOF₁和TOF₂降解重复性较好,这2个菌株分别鉴定为*Penicillium chrysogenum*(产黄青霉)和*Penicillium tardochrysogenum*(缓慢产黄青霉)。这2个种属的获得为苯唑草酮污染土壤生物修复提供了新的菌种资源。

关键词:苯唑草酮;真菌;分离;鉴定;降解

中图分类号:S154.38

文献标志码:A

论文编号:casb20191100862

Two Strains of Topramezone Degrading Fungi: Isolation and Identification

Pan Guoqiang^{1,2,3}, Yang Fengshan^{1,2,3}, Liu Xiaoxin^{1,2,3}, Ma Yukun^{1,2,3}, Fu Haiyan^{1,2,3}, Liu Chunguang^{1,2,3}

(¹Engineering Research Center of Agricultural Microbiology Technology, Ministry of Education, Heilongjiang University, Harbin 150500; ²Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Ecological Restoration and Resource Utilization for Cold Region, School of Life Sciences, Heilongjiang University, Harbin 150080; ³Key Laboratory of Microbiology, College of Heilongjiang, Heilongjiang University, Harbin 150080)

Abstract: To solve the problem of a large number of residues in soil caused by the long-term application of corn field herbicide topramezone, the enrichment and acclimation method was used to screen the strains, and the high efficiency liquid chromatography method was used to determine the degradation ability, and the species were identified by morphology and 18S rDNA sequence analysis in this study. The results showed that five fungal strains TOF₁, TOF₂, TOF₃, TOF₄ and TOF₅, which could grow with topramezone as the sole carbon source, were isolated and purified from the soil using topramezone for a long time. The degradation efficiency of initial concentration 400 mg/L topramezone was 35.86%, 34.35%, 32.12%, 9.91% and 27.99% in seven days, respectively. TOF₁ and TOF₂ were found to be highly repeatable, through repeated degradation validation. These two strains were identified as *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium tardochrysogenum*. The acquisition of these two species provides new resources for bioremediation of contaminated soil with topramezone.

Keywords: topramezone; fungus; isolation; identification; degradation

基金项目:黑龙江省自然科学基金“寒地黑土微生物响应阿特拉津残留群落结构与多样性变化研究”(面上项目:C2018051);黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划“阿特拉津降解复合菌肥研发与农田土壤微生物修复”(UNPYSC2017119)。

第一作者简介:潘国强,男,1999年出生,黑龙江哈尔滨人,本科,研究方向:长残效除草剂的微生物降解与土壤修复。通信地址:150080 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路74号 黑龙江大学生命科学学院, Tel:0451-86608586, E-mail:1435297256@qq.com。

通讯作者:刘春光,女,1982年出生,黑龙江哈尔滨人,高级实验师,硕士,研究方向:长残效除草剂的微生物降解与土壤修复。通信地址:150080 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路74号 黑龙江大学生命科学学院, Tel:0451-86608586, E-mail:2005013@hlju.edu.cn。

收稿日期:2019-11-20, **修回日期:**2019-12-28。

0 引言

苯唑草酮作为新型的优质除草剂^[1],虽然目前使用量与更早生产的草甘膦和磺酰脲类^[2]相比较小,但由于它活性高、杀草谱广、对作物无害等优点,未来它的使用量很有可能会越来越大^[3-6],那么,苯唑草酮长期使用和残留物累积所带来的对生物和环境的伤害^[7]将是不容小觑的。微生物降解方式是降解有机污染物较好的方式,有机磷类除草剂,以草甘膦为例,目前已分离到许多种属的降解菌株,多数为细菌中不同的种属,如假单胞菌属(*Pseudomonas*)和苍白杆菌属(*Ochrobacterum*)等^[8]。磺酰脲类除草剂,目前也已经分离到多株降解磺酰脲类除草剂的菌株,其中大多数降解菌的降解方式是以断裂脲桥C-N键为主,例如氯嘧磺隆降解菌克雷伯氏菌(*Klebsiella jilinsis*)2N3^[9]。氯乙酰胺类除草剂,目前国内外已分离筛选出多株该类除草剂的降解菌株,如从水稻田土壤分离出来的副球菌(*Paracoccus* sp.)FLY-8,乙酸铵降解菌株鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp.)^[10]。目前,国内外研究人员针对苯唑草酮对杂草的防除效果^[11-15]、先导衍生物^[16]、对作物影响^[17-20]、添加助剂增效^[21-22]以及光解、水解和土壤吸附残留^[23-24]等方面进行研究,然而几乎未见苯唑草酮生物降解相关报道,如何有效降解苯唑草酮以改善环境状况已成为我们关注的问题。本试验从长期施用苯唑草酮的玉米田土壤中分离纯化出对苯唑草酮具有高效降解能力的菌株,这将为该除草剂污染土壤的生物修复提供新的菌种资源。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

试验于2018年下半年在黑龙江省寒地生态修复与资源利用重点实验室进行。

1.2 试验材料

1.2.1 土壤样品 采自黑龙江省哈尔滨市道外区巨源镇常年使用苯唑草酮的玉米田中。

1.2.2 试剂 98.4%苯唑草酮标准品(德国巴斯夫公司),97%苯唑草酮原药(德国巴斯夫公司)等。

1.2.3 无机盐液体基础培养基(MM) 在蒸馏水中溶解0.1%硝酸铵、0.05%磷酸二氢钾、0.15%磷酸氢二钠、0.1%氯化钠、0.02%七水硫酸镁,用1 mol/L的氢氧化钠调节pH 7.2,分装后在0.1 Mpa、121℃条件下灭菌20 min,固体培养基加入2%琼脂粉。

1.2.4 孟加拉红培养基(RBA) 在蒸馏水中加入3.5%虎红琼脂和1%琼脂粉,于121℃、0.1 Mpa条件下灭菌20 min,在无菌条件下倒平板。

1.2.5 苯唑草酮无机盐培养基(MM+TO) 基础培养基

(MM)经过高压灭菌,室温冷却到50℃左右后,按照所用浓度加入97%苯唑草酮原药,摇匀备用。

1.3 试验方法

1.3.1 土壤中降解菌的分离与纯化 参考摇瓶富集法,对土壤进行富集驯化,具体操作如下:配制100 mL含氮源的基础液体培养基,将2.0 g土壤加入到浓度为200 mg/L的苯唑草酮基础培养基中,放入恒温摇床培养72 h。从中吸取10 mL转接到浓度为400 mg/L的苯唑草酮基础培养基中,培养72 h,分别连续转接到浓度为600 mg/L、800 mg/L、1000 mg/L的苯唑草酮基础培养基中培养。另配制浓度为400 mg/L的苯唑草酮基础培养基,不加土壤作为对照。用驯化后含菌浓度为400 mg/L的MM+TO作为原液,进行梯度稀释。稀释后分别有原液、 10^{-2} 、 10^{-4} 、 10^{-6} 、 10^{-8} 五个浓度梯度,分别涂布在浓度为400 mg/L的MM+TO。放置于30℃的恒温培养箱培养72 h。将上一步中的5个梯度的菌液分别涂布到RBA上,放置于30℃的恒温培养箱培养72 h。挑取在2种培养基上都生长了的相同菌体,在孟加拉红培养基进行分离纯化,放置于30℃的恒温培养箱中,培养72 h,得到纯化菌体,挑取在浓度为400 mg/L的MM+TO上进行纯化恒温培养72 h,来验证纯化后的菌是否对苯唑草酮耐受。

1.3.2 苯唑草酮降解菌株降解能力的定量分析 苯唑草酮的萃取:将纯化后的菌体分别接种在浓度为400 mg/L的MM+TO中,每种菌做3个平行对照,摇前称重并记录,放置在恒温摇床中摇培7天,培养条件:30℃,170 r/min。设置3个只加同浓度的农药,而不加菌的空白对照,同样条件摇培。7天后取出,根据摇前的称重结果加水至摇前重量。通过萃取方式处理摇瓶中液体,使用高液相色谱分析仪在最佳色谱条件下对处理后的样品进行液相色谱分析,记录峰面积,绘制苯唑草酮的标准曲线并计算苯唑草酮残留浓度,从而计算各个菌株对苯唑草酮的降解率。

苯唑草酮标准曲线的绘制:将苯唑草酮标准品配制成500 mg/L的母液,溶剂使用甲醇,依次稀释为50、100、150、200、250、300 mg/L的浓度梯度,在最佳色谱条件下对各浓度的苯唑草酮标准品溶液进行HPLC色谱分析,流动相:甲醇:水(1.25 g/L乙酸铵)=20:80,流速为1.0 mL/min,压力为 3.4 ± 0.1 Mpa,波长为254 nm。根据分别测得的峰面积与标准品浓度一一对应的关系,绘制出苯唑草酮的标准曲线,并建立回归方程。

苯唑草酮样品含量测定及降解率计算:将摇瓶中萃取处理后得到的苯唑草酮甲醇溶液,在特定的HPLC条件下测定苯唑草酮的峰面积,根据上一步得

出的回归方程计算苯唑草酮的残留浓度和苯唑草酮的降解率。

1.3.3 苯唑草酮降解菌株的种属鉴定 形态特征:在载玻片中央滴一滴无菌水,以接种环取少量纯化后的菌苔放在水中,混合均匀。用镊子夹取一块盖玻片,先将一边与菌液接触,然后慢慢地将盖玻片放下,盖在菌液上,防止产生气泡。放置3 min后进行镜检,在光学显微镜下,用40×镜观察真菌形态。

18S rDNA 序列鉴定:将菌液PCR得到的阳性克隆子送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,测序结果去除载体序列后,通过在线分析,然后与

GenBank 中的已经登录的基因序列进行同源性比对,注册 NCBI 账号,将所得的 18S rDNA 序列提交到 GenBank 数据库并获得登录号,然后用 MEGA5.0 软件构建系统进化树,确定菌株的种属关系。

2 结果与分析

2.1 土壤中降解菌的分离与纯化

经驯化菌株在 400 mg/L 苯唑草酮无机盐培养基中生长状况较好,经梯度稀释后分别涂布到 400 mg/L 的 MM+TO 和 RBA 上,培养 72 h 后,产生了 5 种形态的菌落,分别进行菌种纯化,如图 1 所示,菌株编号为 TOF₁、TOF₂、TOF₃、TOF₄、TOF₅。



图1 苯唑草酮无机盐培养基上的菌落形态

2.2 菌株对苯唑草酮降解能力测定

苯唑草酮标准曲线的线性回归方程为: $y = 3888.6x - 81498$, 其相关系数 $R^2 = 0.995$, 其添加回收率为 92.03%。在初始浓度 400 mg/L 苯唑草酮培养液中,分别添加 5 种菌株 7 天后,其降解率依次为: 35.86%、34.35%、32.12%、9.91%、27.99%, 如图 2 所示,由此可见 TOF₁ 和 TOF₂ 两种菌是对苯唑草酮降解效果最好的, TOF₃ 的重复性较差, TOF₄ 和 TOF₅ 对苯唑草酮的降解效果最低。

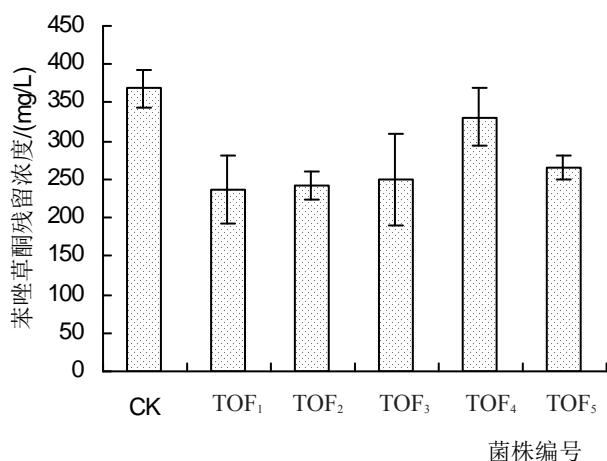


图2 菌株对苯唑草酮降解状况

2.3 菌株种属鉴定

2.3.1 苯唑草酮降解菌株的形态观察 TOF₁、TOF₂ 初步判定为真菌,利用光学显微镜在 40 倍数下观察, TOF₁ 的菌体形态如图 3A 所示,有明显的菌丝和孢子,菌丝为无隔菌丝,孢子为球状,呈淡绿色。 TOF₂ 的菌体形态如图 3B 所示,有明显菌丝和孢子,菌丝体无色,有横隔,分生孢子经多次分枝,形如扫帚,呈球状、浅绿色。

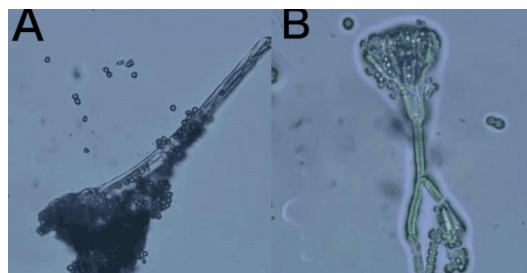


图3 光学显微镜下 TOF₁ 和 TOF₂ 的菌体形态

两株真菌在孟加拉红培养基上的菌落形态如图 4 所示, TOF₁: 菌落疏松、干燥、有放射状褶皱、呈圆形、乳白色绒毛状、菌落反面呈浅黄褐色、菌体可沿培养基表面蔓延生长(图 4A), TOF₂: 菌落疏松、干燥、有褶皱、呈圆形、墨绿色、周边为乳白色绒毛状且菌落周边释放黄色色素(图 4B)。

2.3.2 苯唑草酮降解菌株的 18S rDNA 序列鉴定 将菌株 TOF₁ 和 TOF₂ 的 18S rDNA 阳性克隆子测序后的核

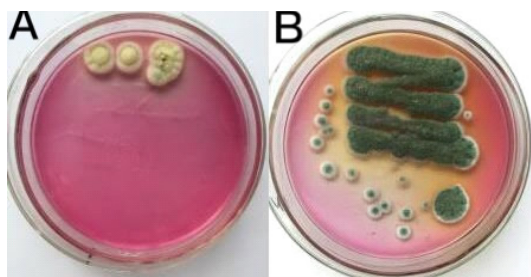


图4 在孟加拉红培养基上 TOF₁和 TOF₂的菌落形态

核苷酸序列经过 BLAST 比对后发现：TOF₁与产黄青霉属温石棉菌株 CHNSCLM-0084、产黄青霉分离株 OUCMDZ- 5182 和产黄青霉蛹青霉分离株 E20399 ITS 等的序列相似性均达到 99% 以上；利用 MEGA5.0 软件所构建的系统发育树如图 5 所示，核苷酸序列提交至 GenBank 获得的登录号为

MK697288.1。TOF₂与青霉属分离株 OUCMDZ-5169、青霉草酸杆菌分离株 OUCMDZ-5189 和青霉高齐分离株 OUCMDZ-5177 等的序列相似性达到 99% 以上；利用 MEGA5.0 所构建的系统发育树如图 6 所示，核苷酸提交至 GenBank 获得的登录号为 MK675693.1。

3 讨论

以微生物修复理论为基础的除草剂残留降解技术是解决土壤修复问题的有效途径^[25]，目前针对有机污染物已分离到许多种属的降解菌株，多数为细菌中不同的种属，如假单胞菌属^[26]，苍白杆菌属^[27]、节杆菌属^[28]、芽孢杆菌属^[29]和黄杆菌属^[30]等；少数为真菌种属如曲霉属、青霉菌属、帚霉属、拟青霉属和木霉属^[31]等。本试验首次发现 *Penicillium chrysogenum* 和 *Penicillium tardochrysogenum* 能够降解苯唑草酮，对于 *Penicillium tardochrysogenum* 几乎未见报道，曾报道 *Penicillium chrysogenum* 能促进木质素和纤维素降

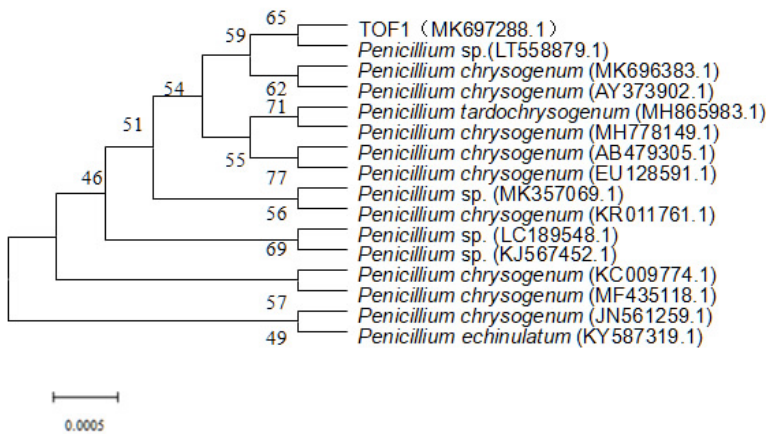


图5 菌株 TOF₁18S rDNA 系统发育树

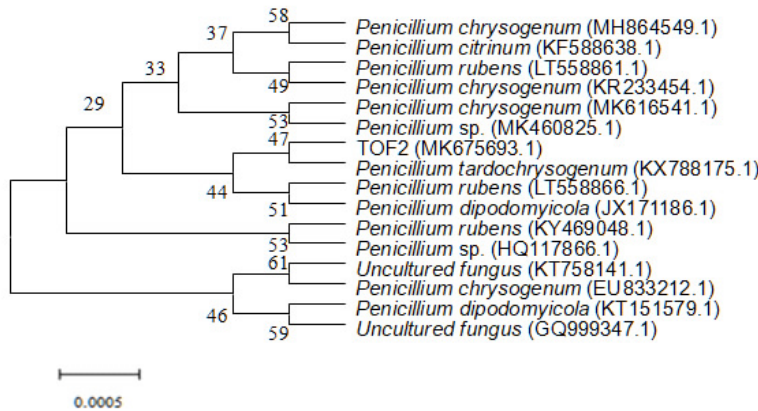


图6 菌株 TOF₂18S rDNA 系统发育树

解^[32-34]、能产生木聚糖酶、青霉素和脂肪酶^[35-37]、能产生二苯甲酮衍生物^[38]、能降解受污染土壤中的重金属和苯并芘代谢产物^[39-41],但未见该种属对除草剂苯唑草酮降解相关报道,这对苯唑草酮污染土壤修复有重要意义。本研究分离出的5株降解菌经苯唑草酮残留测定发现,TOF₃的重复性差,TOF₄和TOF₅的降解率较低,两株苯唑草酮降解菌TOF₁和TOF₂在实验室条件下较其他菌株有更好的降解性能,为苯唑草酮降解菌提供更好的菌种资源,但还未进行深入研究,因此今后需要对菌株的降解特性、生长条件、菌剂制备工艺、分子机制和致病性等方面进行研究,这将为苯唑草酮的微生物降解和生物修复的研究提供理论基础和参考依据。

4 结论

本研究从长期施用苯唑草酮的土壤中分离纯化出2株能以苯唑草酮为唯一碳源生长的真菌菌株TOF₁和TOF₂,在7天内对初始浓度400 mg/L苯唑草酮的降解率分别为35.86%和34.35%,且降解重复性较好,这2个菌株分别鉴定为*Penicillium chrysogenum*和*Penicillium tardochrysogenum*。这2个种属的获得为苯唑草酮的污染土壤生物修复提供了新的菌种资源。

参考文献

- [1] 王晓娜. 除草剂对荞麦田杂草防效及荞麦生长发育的影响[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2019.
- [2] 张静. 我国除草剂的登记现状及其发展趋势分析[D]. 保定:河北农业大学,2013.
- [3] 郭建国. 苯唑草酮在玉米田的应用探究[J]. 农药市场信息,2019(19):62.
- [4] 水清. 玉米田新型除草剂苯唑草酮[J]. 农药市场信息,2011(13):40.
- [5] Liu X, Dong F, Xu J, et al. Miniaturized liquid-liquid extraction coupled with ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for determination of topamezone in soil, corn, wheat, and water[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, 400(9):3097-3107.
- [6] 潘静,高敬雨,刘润峰,等. 24%苯唑草酮·烟嘧磺隆·莠去津可分散油悬浮剂高效液相色谱分析[J]. 现代农药,2018,17(03):33-35.
- [7] 董新风. 色谱与质谱联用技术用于除草剂多残留检测及莠去津降解规律的研究[D]. 保定:河北大学,2015.
- [8] Nath C P, Dubey R P, Hazra K K, et al. Evaluation of new generation post-emergence herbicides in Chickpea (*Cicer arietinum* L.)[J]. National Academy Science Letters, 2018, 41(1):1-5.
- [9] 冯立志,金杰,潘金菊,等. 苯唑草酮在玉米和土壤中的残留消解动态及残留量[J]. 农药,2017,56(09):664-667.
- [10] Ehrhardt T, Grossmann K. On the mechanism of action and selectivity of the corn herbicide topamezone: a new inhibitor of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase[J]. Pest Management Science, 2007, 63(5):429-439.
- [11] 郑庆伟. 噻吩磺隆混加苯唑草酮或灭草松对胡麻田阔叶杂草防效好且安全[J]. 农药市场信息,2019(20):54.
- [12] 陈正州. 苯唑草酮对玉米田杂草的防除效果[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(19):153-155, 158.
- [13] 车晋滇,贾峰勇,王帅宇,等. 30%苯唑草酮防除夏玉米田杂草药效试验[J]. 北京农业,2015(09):130-132.
- [14] Justin C, Solomon M, Caroline C, et al. Evaluation of a pre-formulated post-emergence herbicide mixture of topamezone and dicamba on annual weeds and Bermuda grass in maize in a sub-tropical agro-ecology[J]. Heliyon, 2019, 5(5): e01712.
- [15] 熊战之,袁树忠,钱兰娟,等. 硝磺草酮、苯唑草酮对夏玉米田杂草的防除效果[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(12):134-136.
- [16] 尹振东. 苯唑草酮衍生物的合成和研究[D]. 贵阳:贵州大学,2016.
- [17] 赵芳芳. 除草剂苯唑草酮对小球藻的毒性机制研究[D]. 杭州:浙江工业大学,2017.
- [18] 刘君良,刘伟堂,李小芳,等. 苯唑草酮等3种除草剂对不同玉米品种的安全性[J]. 农药,2011,50(06):426-427, 435.
- [19] 庄占兴,范金勇,胡尊纪,等. 苯唑草酮对玉米田一年生杂草活性及其安全性测定[J]. 山东化工, 2017, 46(12):127-129, 132.
- [20] Gitsopoulos T K, Melidis V, Evgenidis G. Response of maize (*Zea mays* L.) to post-emergence applications of topamezone[J]. Crop Protection, 2010, 29(10):1091-1093.
- [21] 刘小民,王贵启,许贤,等. 助剂对苯唑草酮增效作用研究[J]. 东北农业大学学报, 2014, 45(05):64-68.
- [22] Zhang J W, Jaeck O, Menegat A, et al. The mechanism of methylated seed oil on enhancing biological efficacy of topamezone on weeds[J]. Plos One, 2013, 8(9):e74280.
- [23] 冯立志,金杰,潘金菊,等. 苯唑草酮在玉米和土壤中的残留消解动态及残留量[J]. 农药,2017,56(09):664-667.
- [24] 郭美男. 苯唑草酮的光解、水解与吸附特性研究[D]. 长春:吉林农业大学,2014.
- [25] 刘志培,刘双江. 我国污染土壤生物修复技术的发展及现状[J]. 生物工学报, 2015, 31(06):901-916.
- [26] 张笑宇. 烟田土壤微生物特征及其影响因素分析[D]. 郑州:郑州大学,2018.
- [27] 安霞. 生防细菌的农药降解特性及其降解机制的研究[D]. 济南:山东师范大学,2010.
- [28] 李娟,Constantine Uwaremwe,冷艳,等. 节杆菌属细菌处理有机物和重金属污染物的研究进展[J]. 环境科学与技术, 2017, 40(10):89-97.
- [29] Li Q H, Song W F, Sun M G, et al. Composition change and adsorption performance of EPS from *Bacillus vallismortis* sp. induced by Na₂S[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 185:109679.
- [30] 王宝强,季秀玲,魏云林,等. 一株黄杆菌低温噬菌体的生物学特征研究[J]. 中国微生物学杂志, 2016, 28(10):1117-1122.
- [31] Nath C P, Dubey R P, Hazra K K, et al. Evaluation of new generation post-emergence herbicides in Chickpea (*Cicer arietinum* L.)[J]. National Academy Science Letters, 2018, 41(1):1-5.
- [32] 杨毅. 产黄青霉半纤维素酶促进木质纤维素降解的机制研究[D]. 北京:中国农业大学,2019.

- [33] Yang Y, Yang J S, Wang R N, et al. Cooperation of hydrolysis modes among xylanases reveals the mechanism of hemicellulose hydrolysis by *Penicillium chrysogenum* P33[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1):159.
- [34] Hou Y H, Wang T H, Long H. Cloning, Sequencing and expression analysis of the first cellulase gene encoding cellobiohydrolase 1 from a cold- adaptive *Penicillium chrysogenum* FS010[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2007(02):101-107.
- [35] Ullah S F, Souza A A, Hamann P R V, et al. Structural and functional characterisation of xylanase purified from *Penicillium chrysogenum* produced in response to raw agricultural waste[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 127:385-395.
- [36] Ayesha S, Jasneet G, Isha J, et al. Stability and structure of *Penicillium chrysogenum* lipase in the presence of organic solvents [J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2018, 48(10):977-983.
- [37] Yang J, Xu X X, Liu G. Amplification of an MFS transporter encoding gene penT significantly stimulates penicillin production and enhances the sensitivity of *Penicillium chrysogenum* to phenylacetic acid[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2012, 39(11):593-602.
- [38] Zhao D L, Yuan X L, Du Y M, et al. Benzophenone derivatives from an algal-endophytic isolate of *Penicillium chrysogenum* and their cytotoxicity[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2018, 23(12): e3378.
- [39] 邓新辉, 柴立元, 杨志辉, 等. Preliminary bioleaching of heavy metals from contaminated soil employing indigenous *Penicillium Chrysogenum* strain F1[J]. Journal of Central South University, 2012, 19(07):1973-1979.
- [40] 邓新辉, 彭扶凤. 产黄青霉浸出修复重金属污染土壤[J]. 环境工程学报, 2016, 10(11):6789-6794.
- [41] Zang S Y, Li P J, Yu X C, et al. Degradation of metabolites of benzo[a]pyrene by coupling *Penicillium chrysogenum* with KMnO_4 [J]. Journal of Environmental Sciences (China), 2007, 19(2):238-243.