

彗星试验评价硝酸镧对蚕豆根尖细胞的遗传毒性

杨定明¹, 费红梅¹, 景秀丽¹, 谢 艳¹, 李宗芸^{1,2}

(1.徐州师范大学细胞与分子生物学研究所 生命科学学院, 江苏 徐州 221116; 2.江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室, 江苏 淮安 223300)

摘 要: 设置了 0、1、4、16、64、256 mg·L⁻¹ 6 个浓度的硝酸镧梯度溶液, 运用彗星电泳测试技术, 以彗星尾长、彗星率、尾矩和 Olive 尾矩来评价 La(NO₃)₃ 对蚕豆根尖细胞 DNA 的损伤。结果表明: 与对照组相比, 染毒组的彗星尾长、彗星率、尾矩和 Olive 尾矩随浓度增加而逐渐上升。一定剂量的稀土元素镧 (≥1 mg·L⁻¹) 可以使蚕豆根尖细胞 DNA 出现损伤, 在 1~64 mg·L⁻¹ 范围内随镧浓度的增加伤害程度加大, 256 mg·L⁻¹ 时, 遗传物质损伤严重, 彗星尾长、尾矩和 Olive 尾矩反而下降, 说明硝酸镧具有一定的细胞毒性和遗传毒性。

关键词: 彗星实验; 遗传毒性; 硝酸镧; 蚕豆根尖细胞

中图分类号: X503.231 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2008)06-2387-04

Evaluation of Genotoxicity Induced by Lanthanum Nitrate in the Root Tip Cells of *Vicia faba* by Comet Assay

YANG Ding-ming¹, FEI Hong-mei¹, JING Xiu-li¹, XIE Yan¹, LI Zong-yun^{1,2}

(1. Institute of Cellular and Molecular Biology, School of Life Science, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Eco-Agricultural Biotechnology around Hongze Lake, Huai'an 223300, China)

Abstract: Lanthanum is one of the rare chemicals which are widely used in agriculture in China because of their abilities to increase the yield and to improve quality of crops. But it also has aroused the people's attention to the environmental pollution by the rare-earth elements. To study the genotoxicity of lanthanum nitrate in the root tip cell of *Vicia faba*, six treated groups with different lanthanum nitrate content (0, 1, 4, 16, 64, 256 mg·L⁻¹ respectively) were designed. Comet assay was used to detect DNA damage of root tip cells of *Vicia faba* according to the tail length, comet rate, tail moment, olive tail moment. The results showed that the tail length, comet rate, tail moment, olive tail moment of five treated groups were increased significantly with increasing of lanthanum nitrate concentration compared with the control group. It mean that DNA of root tip cell of *Vicia faba* can be damaged by lanthanum nitrate. In 1~64 mg·L⁻¹ the damage extent was enhanced with increasing of lanthanum nitrate concentration. Genetic material was serious damaged in the concentration of 256 mg·L⁻¹. On the contrary, the tail length, comet rate and tail moment were descent. It suggests that lanthanum nitrate has genotoxicity and cytotoxicity to root tip cells of *Vicia faba*.

Keywords: comet assay; genotoxicity; lanthanum nitrate; root tip cells of *Vicia faba*

稀土(rare earths, 简称 RE)是镧系及钪、钇共 17 种元素的总称。我国稀土储备量占世界的 76%, 是稀土资源最多的国家^[1]。由于低剂量的稀土元素具有使农作物增产和改善品质的特殊性能, 施用稀土元素复合肥料的面积也越来越广。同时, 稀土制品大量进入环境, 对动植物生长、生态环境的影响已经引起广泛

关注。有关的研究表明, La、Gd 和 Ce 能够进入老鼠细胞, 并且主要分布在老鼠细胞的细胞核中^[2], 稀土元素能够在生物体内运输和转化, 具有很多生物学效应, 包括对动物体和人体的诱变、畸变作用^[3-4]、对植物体的遗传学毒性等^[5-9]。

彗星实验也称为单细胞凝胶电泳技术, 可以定量测定真核细胞中多种类型的 DNA 损伤, 早期主要用于研究化学物质对动物细胞 DNA 损伤和修复的影响^[10]。直到 1996 年 Koppen 等^[11]第一次报道了利用蚕豆为实验材料进行彗星试验, 检测环境污染物对基因的损伤。近年来, 植物彗星试验有了较大的进

收稿日期: 2008-02-16

基金项目: 国家自然科学基金(30470421); 江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室开放基金(HZHL0811); 江苏省自然科学基金基础研究项目(08KJD180010)

作者简介: 杨定明(1980—), 男, 本科生。

通讯作者: 李宗芸 E-mail: zongyunli@xznz.edu.cn

展^[12-14]。本实验选择蚕豆作为实验材料,采用彗星试验检测和评价了稀土元素 La³⁺对蚕豆根尖细胞遗传物质的损伤。

1 材料与方法

1.1 材料

蚕豆(*Vicia faba*):小青皮豆,取自徐州师范大学生命科学学院遗传实验室。

1.2 实验分组

硝酸镧分为 1、4、16、64、256 mg·L⁻¹ 5 个剂量组,1 个阴性对照组(双蒸水)。

1.3 彗星电泳实验

1.3.1 细胞核悬液的制备

参照 Gichner T 等^[13]的机械分离方法并略加改进。分别取 6 个蚕豆根尖,将其浸入不同浓度梯度的硝酸镧溶液中,染毒处理 6 h,用蒸馏水冲洗干净。取蚕豆根尖的分生区,将其置于含有预冷的 100 μL PBS 缓冲液的培养皿中,用干净的双面刀片轻轻切碎根尖部分,培养皿应倾斜搁置在冰块上,以便被分离的细胞核收集于缓冲液中。所有操作均在黑暗或暗光的条件下进行。

1.3.2 彗星电泳实验

采用两层凝胶法制片,第一层胶为正常熔点琼脂糖(NMA,1%),第二层胶为低熔点琼脂糖(LMA,0.78%)与细胞悬液(4:1 体积比)的混合液,利用细胞裂解液(2.5 mol·L⁻¹ NaCl,100 mmol·L⁻¹ Na₂EDTA,10 mmol·L⁻¹ Tris,1% 十二烷基肌氨酸钠,pH10,用前加入 1%TritonX-100 和 10% DMSO)室温下裂解 2 h。蒸馏水冲洗后风干,置入电泳缓冲液中静置 20 min,使 DNA 解旋。室温下电泳(电压 15 V,电流 150 mA)30 min,蒸馏水冲洗后风干,中和液(0.4 mol·L⁻¹ Tris-HCl (pH7.5))内中和 3 次,每次 5 min。溴化乙啶染色 10 min,用 Leica DMRA2 荧光显微镜观察,将观察到的彗星样细胞进行拍照。每个浓度铺 4 张平行片子,统计 50 个彗星样细胞核,测量彗星尾长,并计算尾矩、Olive 尾矩。

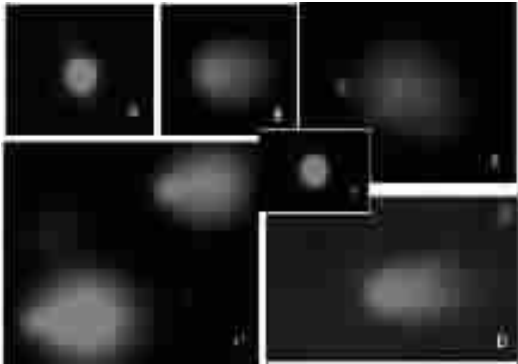
1.4 统计学处理

将所有实验数据输入计算机,采用 Excel 软件进行分析处理,求算术平均值、标准差并进行 t-检验。

2 结果与分析

不同浓度硝酸镧溶液培养的蚕豆根尖细胞彗星电泳图谱见图 1。由图中可以看出,硝酸镧溶液浓度

1~64 mg·L⁻¹ 时出现了明显的彗星形态,其中 1~4 mg·L⁻¹ 时彗星头尾形态明显(图 1,B、C),16 mg·L⁻¹ 时彗星头尾界限不是很明显(图 1,D),64 mg·L⁻¹ 时彗星头非常小,而尾部非常大,彗星头尾有分离现象(图 1,E),256 mg·L⁻¹ 时没有观察到彗星(图 1,F),细胞核也很少,即便有,也和对照组的细胞核(图 1,A)呈现相似的现象,但边缘稍有些毛糙。



A: 对照组, B-F: 不同程度硝酸镧处理组
B: 1 mg·L⁻¹, C: 4 mg·L⁻¹, D: 16 mg·L⁻¹, E: 64 mg·L⁻¹, F: 256 mg·L⁻¹,

图 1 不同浓度硝酸镧处理下蚕豆根尖细胞的彗星图谱(400×)
Figure 1 Comets of root tip cell of *Vicia faba* induced by different Lanthanum nitrate content

不同浓度的硝酸镧对蚕豆根尖细胞彗星尾长、尾矩、Olive 尾矩的变化如图 2 所示。从图 2 中可以看出,在 1~64 mg·L⁻¹ 范围内,蚕豆根尖细胞彗星尾长、尾矩、Olive 尾矩与对照组相比都表现出极显著性升高($P<0.01$)。1~4 mg·L⁻¹ 剂量组蚕豆根尖细胞彗星尾长、尾矩、Olive 尾矩与对照组相比呈现上升趋势,16 mg·L⁻¹ 时,蚕豆根尖细胞彗星尾长、尾矩和 Olive 尾矩

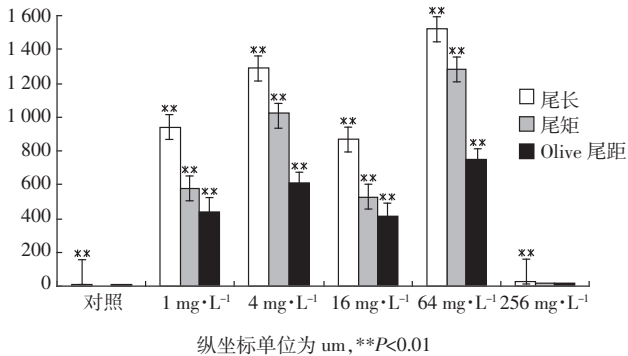


图 2 不同浓度的硝酸镧对蚕豆根尖细胞彗星尾长、尾矩和 Olive 尾矩的影响

Figure 2 The changes of the tail length, tail moment, Olive tail moment about the root tip cells of *Vicia faba* induced by different concentration of lathanum nitrate(the unit of axis of ordinate is um.)

相对减小。 $64 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 剂量组蚕豆根尖细胞彗星尾长、尾距和 Olive 尾距又出现上升, $256 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,蚕豆根尖细胞彗星尾长、尾距和 Olive 尾距下降得比较厉害,并且细胞核形态与对照组很相似(见图 2,F),拖尾较小或不出现拖尾现象。

3 讨论

目前,我国农业上应用的混合稀土微肥(如常乐)是多种稀土硝酸盐的混合物,所含稀土有 La、Ce、Pr 和 Nd 等。稀土微肥可与农药混合施用,稀土微肥不宜直接施入土中,而是作为种肥或喷洒于植株叶面上,拌种每公顷用量为 $375 \sim 525 \text{ g}$,浸种用 0.05% 的溶液,浸泡 $12 \sim 24 \text{ h}$,捞出播种。叶面喷施以 0.05% 浓度为宜,每公顷用 $750 \sim 1\,050 \text{ kg}$ 溶液。陈远孟等^[15]综述了镧在主要农作物上的试验结果表明,如水稻、玉米、小麦浸种浓度分别为 $1.0 \times 10^{-1} \sim 1.0 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时可促进种子萌发,豆类种子用大于 $0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 镧-赤霉素配合物处理可提高发芽率。由于稀土元素镧是稀土微肥中的主成分,因此,对其生物学效应的研究也较为广泛,但对稀土元素镧遗传毒性的研究结果也不尽相同。王学等^[16]研究了镧、铈对高等沉水植物竹叶眼子菜(*Potamogeton malaiianus* Miq.)的毒害作用,结果表明, La^{3+} 对竹叶眼子菜的致死浓度为 $7 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。黄丽玫等^[9]利用微核测试法检测了 14 种稀土元素的致突变性,结果表明,镧的浓度为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时处于轻度污染,但与对照组相比,微核率呈现极显著上升,镧的浓度为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,呈中度污染。屈艾等^[6]的研究表明,镧的浓度为 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,与对照组相比,微核率也呈现极显著上升,但他们确定的镧的遗传毒性阈值却并不相同,前者认为镧的遗传毒性阈值为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,后者认为镧的遗传毒性阈值为 $16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。我们结合农业上的实际应用与前人研究结果,设置了 $1, 4, 16, 64, 256 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 5 个剂量组,用彗星电泳技术在细胞水平上检测稀土导致的 DNA 损伤,以期获得较为准确的镧的遗传毒性阈值,从而为稀土农用提供理论依据。

一种观点认为,在检测 DNA 损伤时,彗星率和彗星尾这两个指标较 Olive 尾矩更敏感^[17]。但目前大多数的观点认为,Olive 尾矩为尾部 DNA 占总 DNA 的百分比与头、尾部中心间距的乘积,因为它既包含尾长度的信息,又包含尾光密度的信息,Olive 尾矩也是各实验室图像分析系统使用的标准指标^[18]。我们对彗星尾长、尾距、Olive 尾距这 3 个指标都进行了测量与

计算,结果发现,与普通组相比,硝酸镧浓度 $\geq 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时根尖细胞彗星尾长、尾距、Olive 尾距与对照组相比为极显著差异。 $1 \sim 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 剂量组蚕豆根尖细胞彗星尾长、尾距、Olive 尾距呈现良好的剂量效应关系,但 $16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,蚕豆根尖细胞彗星尾长、尾距和 Olive 尾距相对减小,当染毒溶液的剂量超出一定的范围后($256 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),由于遗传物质损伤严重,彗星形态已不完整,测量数据已不可靠。表明彗星尾长、尾距、Olive 尾距都可以作为检测 DNA 损伤的指标。结合这 3 个指标,同时结合微核测试的结果(未发表),我们认为,有可能在 $1 \sim 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,硝酸镧导致蚕豆根尖细胞出现的遗传物质损伤是机体可以修复的,而当硝酸镧浓度大于 $16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,硝酸镧导致蚕豆根尖细胞遗传物质的损伤是不可修复的。

前人研究表明,稀土元素被农作物吸收后,按一定规律分布在植物各部位,一般为根 > 茎 > 叶 > 花 > 果实及种子,约有 80% 的稀土元素分布于根部^[19-20]。稀土元素镧导致遗传物质损伤的原因有两种可能性:一方面, La^{3+} 能显著降低植物细胞膜的透性^[21],在 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 La^{3+} 处理下,黄瓜幼苗叶细胞质膜相对透性显著增大^[22]。外源性化学物进入机体后,在靶部位与关键生物大分子作用(包括 DNA 分子),可引起生物大分子的各种结构和功能异常,当超过机体的修复功能和适应能力,就表现出毒物的毒性作用。另一方面,稀土离子是钙的类似物,特别是镧,已有人称之为“超级钙”^[23]。镧与细胞膜外侧的 Ca^{2+} 位点结合而影响 Ca^{2+} 的转运,被认为是 Ca^{2+} 通道的阻塞剂^[24]。高浓度镧可从细胞中大量的移出钙,研究发现, $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 镧将导致玉米根细胞中 Ca^{2+} 的浓度下降 41%,因而破坏了 Ca^{2+} 正常功能^[25]。钙稳态的紊乱可引起各种细胞损伤,包括遗传物质损伤与细胞凋亡等^[26]。

有研究表明,很小的彗星头,大而圆的彗星尾,尾长径与短径的比值约为 1(图 1 C),这样特征性的彗星形态应该是凋亡细胞的特征^[27],这是否意味着 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硝酸镧有可能诱导蚕豆根尖细胞出现凋亡现象,值得进一步探索。

参考文献:

- [1] 王 洋, 聂刘旺, 陈启龙. 稀土元素的生物安全性探讨[J]. 生物学杂志, 2004, 2(12): 30-34.
WANG Yang, NIE Liu-wang, CHEN Qi-long. A research on the biological security of rare earths[J]. *Journal of Biology*, 2004, 2(12): 30-34.
- [2] 风志慧, 王 玺, 张孙曦, 等. 稀土元素 La, Gd 和 Ce 对培养大鼠细胞生物学效应的研究[J]. 中华核医学杂志, 2001, 21(2): 111-114.

FENG Zhi-hui, WANG Xi, ZHANG Sun-xi, et al. A study of the biological effects of rare earth elements at cellular level using nuclear techniques[J]. *Chin J Nucl Med*, 2001, 21(2):111-114.

[3] 杨维东, 王 艇, 雷衡毅, 等. 稀土生物效应研究进展[J]. 稀土, 2000, 21(3):62-65.

YANG Wei-dong, WANG Ting, LEI Heng-yi, et al. Progress in studies on biological effects of rare earth[J]. *Chinese Rare Earths*, 2000, 21(3):62-65.

[4] 傅佑丽. 稀土生物效应机理研究进展[J]. 曲阜师范大学学报(自然科学版), 2001, 27(2):81-84.

FU You-li. Research progress on the mechanism of rare earth's bioeffect[J]. *Journal of Qufu Normal University*, 2001, 27(2):81-84.

[5] 黄淑峰, 李宗芸, 傅美丽, 等. 正交实验设计法检测 6 种硝酸稀土的遗传毒性[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(1):150-155.

HUANG Shu-feng, LI Zong-yun, FU Mei-li, et al. Detection of genotoxicity of 6 kinds of rare earth nitrates using orthogonal experimental design[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(1):150-155.

[6] 屈 艾, 李宗芸, 朱卫中, 等. 稀土多元复合肥和三种稀土元素的遗传毒性研究[J]. 遗传, 2001, 23(3):243-246.

QU Ai, LI Zong-yun, ZHU Wei-zhong, et al. Genetic toxicity research on rare earth multi-element compound fertilizer and three kinds of rare earth elements[J]. *Hereditas*, 2001, 23(3):243-246.

[7] 李宗芸, 屈 艾, 朱卫中, 等. Er³⁺和稀土多元复合肥对蚕豆根尖细胞的微核效应[J]. 应用与环境生物学报, 1999, 5:212-214.

LI Zong-yun, QU Ai, ZHU Wei-zhong, et al. Effects of Er³⁺ and rare earth multi-element compound fertilizer on formation of micronucleus in root tip cells of *Vicia faba*[J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 1999, 5:212-214.

[8] LI Zong-yun, CUI Wen-feng, BO Jun, et al. Detection of genotoxicity and cytotoxicity of Ce(SO₄)₂ in root tip cell of maize using micronucleus test[J]. *J Environ Occup Med*, 2005, 22(3):229-235.

[9] 黄丽玫, 陈志成, 颜戊利, 等. 稀土元素的致突变性研究[J]. 中国环境科学, 1996, 16(4):262-265.

HUANG Li-mei, CHEN Zhi-cheng, YANG Wu-li, et al. Study on mutagenicity of rare earths[J]. *China environmental science*, 1996, 16(4):262-265.

[10] 王 涛, 衡正昌. 彗星试验研究现状及应用前景[J]. 癌变 畸变 突变, 1999, 11(4):208-211.

WANG Tao, HENG Zheng-chang. The research status and application perspective of comet assay [J]. *Carcinogenesis Teratogenesis and Mutagenesis*, 1999, 11(4):208-211.

[11] Koppen G, Verschaeve L. The alkaline comet test on plant cells: A new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cell[J]. *Mutat Res*, 1996, 360:193-200.

[12] Navarrete M H, Carrera P, Miguel M, et al. A fast comet assay variant for solid tissue cells. The assessment of DNA damage in higher plants[J]. *Mutat Res*, 1997, 389:271-277.

[13] Gichner T. DNA damage induced by indirect and direct acting mutagens in catalase deficient transgenic tobacco cellular and acellular comet assays[J]. *Mutat Res*, 2003, 535:187-193.

[14] 林爱军, 张旭红, 张增利, 等. 利用不同植物进行 DNA 损伤彗星实验的方法比较[J]. 生态毒理学报, 2006, 1(2):166-171.

LIN Ai-jun, ZHANG Xu-hong, ZHANG Zeng-li, et al. A comparison study using comet assay to detect DNA damages in different plant species[J]. *A sian Journal of Ecotoxicology*, 2006, 1(2):166-171.

[15] 陈远孟, 白厚义, 李杨瑞. 镧在主要农作物上的应用及其生理生化作用[J]. 广西农业科学, 2003, 6:15-17

CHEN Yuan-meng, BAI Hou-yi, LI Yang-rui. The application and physio-biochemistry effect of Lanthanum in the main field crops[J]. *Agricultural Science of Guang Xi*, 2003, 6:15-17.

[16] 王 学, 施国新, 徐勤松, 等. 镧、铈及重金属元素铬、锌对竹叶眼子菜的毒害作用[J]. 中国稀土学报 2004, 22(5):682-686.

WANG Xue, SHI Guo-xin, XU Qin-song, et al. Toxic effects of Lanthanum, Cerium, Chromium and Zinc on *Potamogeton malaianus* [J]. *Journal of The Chinese Rare Earth Society*, 2004, 22(5):682-686.

[17] Siddique H R, Chowdhuri D K, Saxena D K, et al. Validation of *Drosophila melanogaster* as an in vivo model for genotoxicity assessment using modified alkaline comet assay[J]. *Mutagenesis*, 2005, 20(4):285-290.

[18] Harman D. Free-radical theory of aging: increasing the functional life span[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1994, 717:1-15.

[19] 季红兵, 王立军, 董云社, 等. 稀土元素的环境生物地球化学循环研究现状[J]. 地理科学进展, 2004, 23(1):51-53.

JI Hong-bing, WANG Li-jun, DONG Yun-she, et al. An overview on the study of biogeochemical cycle for rare earth elements (REEs) [J]. *Progress In Geography*, 2004, 23(1):51-53.

[20] 杨元根. 稀土元素的农业地球化学研究[J]. 地质地球化学, 1998, 24(4):39-41.

YANG Yuan-gen. Rare earth elements' agriculture geochemistry research[J]. *Geology-geochemistry*, 1998, 24(4):39-41.

[21] 焦根林, 汤锡珂, 吴兆明. 氯化镧对玉米根切段钾离子外渗影响的动力学研究[J]. 植物学报, 1993, 35(4):286-290.

JIAO Gen-lin, TANG Xi-ke, WU Zhao-ming. Kinetic analysis of the effect of lanthanum chloride on potassium ion exudation of corn root segments[J]. *Acta Botanica Sinica*, 1993, 35(4):286-290.

[22] 史 萍, 曾福礼, 邓汝温. 镧对黄瓜幼苗叶片细胞透性及膜脂的影响[J]. 中国稀土学报, 2004, 22(2):271-274

SHI Ping, ZENG Fu-li, DENG Ru-wen. Effect of Lanthanum on permeability and membrane lipid composition in cucumber seedling leaves [J]. *Journal of The Chinese Rare Earth Society*, 2004, 22(2):271-274.

[23] Poovaiah B W, Leonard A C. Deferral of leaf senescence with calcium[J]. *Plant Physiol*, 1973, 52:236-239.

[24] Pantoja O, Gelli A, Blumwald E. Voltage-dependent Calcium channels in plant *Vacuoles*[J]. *Science*, 1992, 225:1567-1570.

[25] Diatloff E, Asher C J, Smith F W. Effect of rare earth elements on the growth and mineral nutrition of plants[C]. *Rare Earth in Agriculture Seminar*, 1995. 11-23.

[26] 郑 倩, 骆云鹏. 钙稳态紊乱和细胞凋亡[J]. 川北医学院学报, 2001, 16(4):142-144.

ZHENG Qian, LUO Yun-peng. The confused of Calcium steady state and cell apoptosis[J]. *Journal of North Sichuan Medical College*, 2001, 16(4):142-144.

[27] 衡正昌, 李 蕊, 张遵真. 用彗星试验区别凋亡细胞与普通 DNA 链断裂损伤细胞[J]. 卫生研究, 2001, 30(3):149-151.

HENG Zheng-chang, LI Rui, ZHANG Zun-zhen. Distinguishing apoptotic cells from DNA strand broken cells by comet assay[J]. *Journal of Hygiene Research*, 2001, 30(3):149-151.