

苯胺降解菌的分离鉴定及其降解特性研究

王 薇¹, 张逸飞², 顾 挺², 钟文辉²

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046; 2. 南京师范大学化学与环境科学学院, 江苏 南京 210097)

摘 要:通过驯化培养,从活性污泥中分离出一株高效苯胺降解菌,命名为菌株 AN5。对该菌株进行了鉴定及降解特性研究。结果表明,分离菌株呈革兰氏染色阳性,细胞为球状或短杆状,菌落颜色呈橙红色。菌株 AN5 除可降解苯胺外,还可以苯酚、苯甲酸、萘为惟一碳源生长。它的部分长度 16S rDNA 序列分析表明,分离菌株 AN5 与嗜吡啉红球菌(*Rhodococcus pyridinivorans*)的 16S rDNA 序列具有 99%相似性。实验采用 PAUP 4.0 软件包最大似然法对该菌株与相关菌进行系统发生分析。菌株 AN5 耐受苯胺的最高浓度可达 5 000 mg·L⁻¹。投加蛋白胨可以加速菌株对苯胺的降解。代谢机理研究证实,菌株 AN5 在邻苯二酚-1,2-双加氧酶作用下经邻位裂解途径降解苯胺。

关键词:苯胺降解菌;红球菌属;系统发生分析;邻苯二酚-1,2-双加氧酶

中图分类号:X172 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2008)03-0964-06

Isolation, Identification and Characterization of Aniline-degrading Bacterial Strain

WANG Wei¹, ZHANG Yi-fei², GU Ting², ZHONG Wen-hui²

(1.College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China; 2.College of Chemistry and Environmental Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: Aniline is a kind of important chemical material, it is also a harmful substance which pollutes environment and seriously endangers human health, and it has been included in the blacklist of China for priority control in environment protection". Through domestication cultivation, a highly efficient aniline degrading bacterium strain was isolated from an activated mud drained from a chemical plant and named as strain AN5. It is gram positive, spherical or short rod-like, generally shows orange-red colony. Besides aniline, it can grow with phenol, benzoate, or naphthalene as unique carbon source. The isolated strain AN5 showed similarity of 99% to the 16S rDNA sequence of *Rhodococcus pyridinivorans*. The phylogenetic analysis was made on strain AN5 and the relative strains by applying maximum-likelihood (ML) methods with PAUP4.0 software. The optimum temperature and pH value for growth and degradation of strain AN5 were 30 °C and 7.0, respectively. Strain AN5 can grow in the medium containing aniline at the concentration up to 5 000 mg·L⁻¹. The addition of peptone to medium containing aniline resulted in acceleration in the aniline degradation rate. Aniline was degraded by strain AN5 through ortho-cleavage pathway by catechol-1,2-dioxygenase.

Keywords: aniline-degrading bacteria; *Rhodococcus*; phylogenetic analysis; catechol-1,2-dioxygenase

苯胺是一种应用广泛的重要的化工原料,但其同时也严重污染环境和危害人体健康,是一种“三致”物质,已被列入“中国环境优先污染物黑名单”中,在工业排水中要求严格控制。如何减少苯胺对环境的污染,已逐渐成为人们关注的话题。苯胺主要是在微生物

物的作用下进行生物降解,降解速率受微生物活性、环境条件(温度、湿度、pH 值、有机质含量等)等因素的影响^[1-2]。目前,国内外研究学者已筛选到多株苯胺降解菌株^[3-4]。Kahng 等^[5]发现的苯胺降解菌 HY99 在有氧、无氧条件下均能降解苯胺。已报道的降解菌对苯胺的耐受浓度可达 5 000 mg·L⁻¹^[6],可将废水中浓度为 1 000 mg·L⁻¹ 的苯胺于 48 h 内降解 80%以上^[7],降解极限浓度理论上可达到 0.025 mg·L⁻¹^[8]。我们分离到一株高效降解苯胺的红球菌 AN5 (*Rhodococcus sp.* AN5)。

收稿日期:2007-12-27

基金项目:中国科学院知识创新工程重要方向项目(kzcx2-yw-408)

作者简介:王 薇(1983—),女,硕士研究生,主要从事土壤微生物多样性研究。E-mail:xiaojuhao_2001@163.com

通讯作者:钟文辉

本文报道该菌株的分离、鉴定、系统发生分析及降解苯胺的特性,并对其双加氧酶性质进行了初步探究。

1 材料与方法

1.1 苯胺降解菌的分离

1.1.1 培养基组成

采用无机盐培养基^[9]和富集培养基:蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, NaCl 5 g, H₂O 1 L, pH 7.0。

1.1.2 分离纯化

将采自南京化工厂污水处理厂的活性污泥样品, 采用以苯胺作为惟一碳源和氮源的无机盐培养基分离、纯化以及筛选苯胺降解菌。

1.2 分离菌株生长的测定

菌株生长情况以 $\lambda_{600\text{nm}}$ 处的吸光度 OD₆₀₀ 表示。

1.3 苯胺浓度的测定

苯胺浓度采用 N-(1-萘基) 乙二胺偶氮分光光度法(GB 11889—89)测定。

1.4 苯胺降解菌株以苯胺和不同芳香族化合物作为惟一碳源的生长特性研究

将菌株 AN5 接种于富集培养基中, 30 ℃、200 r·min⁻¹ 摇床培养 24 h, 以 1% 的接种量转接到 100 mL 无机盐培养基 (含 500、1 000、2 000 或 3 000 mg·L⁻¹ 的苯胺或 5 mmol·L⁻¹ 的多种芳香族化合物), 30 ℃、200 r·min⁻¹ 摇床培养后每 4 h 测定 OD₆₀₀ 和苯胺浓度。

1.5 菌株 AN5 降解苯胺的影响因素的研究

1.5.1 温度、pH 值对菌株 AN5 降解苯胺的影响

苯胺浓度均为 1 000 mg·L⁻¹, 设置不同温度值 (15、25、30、35 ℃) 或 pH 值 (5、6、7、8、9、10、11), 培养 48 h 后测定苯胺浓度。

1.5.2 苯胺浓度对菌株 AN5 降解苯胺的影响

苯胺浓度设为 500、1 000、2 000 和 3 000 mg·L⁻¹, 培养后每 4 h 测定苯胺浓度。

1.5.3 第二碳源和氮源对菌株 AN5 降解苯胺的影响

苯胺浓度设为 1 000 mg·L⁻¹, 并分别添加 0.2% 的葡萄糖、蛋白胨或硫酸铵, 培养后每 4 h 测定苯胺浓度。

1.6 菌株对苯胺耐受能力和对抗生素、重金属的敏感性测定

将菌株 AN5 接种到含有不同浓度苯胺、不同抗生素或不同重金属的无机盐培养基平板上, 30 ℃培养 4~7 d, 观察菌落生长情况。

1.7 分离菌株的双加氧酶种类的确定

将菌株 AN5 在含邻苯二酚的无机盐培养基中培养 2 d, 5 000 g 离心分离细胞, 用 20 mmol·L⁻¹ 磷酸钠

缓冲溶液(pH 7.0)洗涤两次后悬浮, 悬浮液用超声波细胞破碎机进行细胞破碎 (或加 0.5~1 mol·L⁻¹ 溶菌酶, 37 ℃振荡 30 min), 然后将细胞溶解产物 19 000 g 离心 20 min。通过高效液相色谱法于 280、375 nm 处测定分析粘糠酸和 2-羟基粘糠酸半醛^[10、11]。

1.8 菌种鉴定

1.8.1 生理生化指标鉴定

生理生化指标测定参照文献[12、13]。

1.8.2 16S rDNA 的 PCR 扩增和测序

菌液的 DNA 提取和纯化参考文献[12]。PCR 反应引物为 BSF8/20 (5' -AGAGT TTGAT CCTGG CTCAG -3') 和 BSR1541/20 (5' -AAGGA GGTGA TCCAGCCGCA-3')^[14]。引物由上海生工合成。PCR 反应体系(50 μ L)为 10 $\times$ 5 μ L PCR 缓冲液, 4 μ L MgCl₂(25 mmol·L⁻¹), 2 μ L dNTP, 1 μ L 引物 BSF 8/20 和 BSR 1541/20, 1 μ L 模板 DNA, 0.5 μ L Taq 酶, 35.5 μ L 重蒸水。PCR 程序为: 95 ℃预变性 5 min, 然后 95 ℃变性 1 min, 55 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 1 min; 30 个循环后, 72 ℃延伸 5 min。PCR 产物用 AxyPrep DNA Gel Extraction 试剂盒纯化, 测序由上海英骏生物技术公司完成, 测序用引物为 BSF 8/20 和 BSR 1541/20。

1.8.3 系统发生分析

测序获得分离菌株部分长度的 16S rDNA 序列, 经 SeqMan II (DNASTAR Inc) 软件拼接并赋予人工校对后, 将所测序列通过 Blast 程序与 GenBank 中核酸数据进行序列联配(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)。用 Clustal X 软件进行比对, 用 Modeltest 3.06 计算构建系统发生树的最适模型。用 PAUP 4.0 软件包最大似然法构建分子系统树。

2 结果与讨论

2.1 菌种分离与鉴定

AN5 菌株在 LB 平板上的菌落呈橙红色, 革兰氏阳性, 细胞形态为球状或短杆状, 无鞭毛, 不运动, 不产芽孢。将分离的菌株提取基因组 DNA, 以一对通用的细菌 16S rDNA 的引物 (BSF 8/20 和 BSR 1 541/20) 作 PCR 扩增, 得到的产物经纯化后测序。测序后得到长度为 1 457 bp 的序列。序列联配结果表明, 分离菌株与嗜吡啉红球菌 (*Rhodococcus pyridinivorans*) 的 16S rDNA 序列的相似率达 99%。结合菌株形态和生理生化特性(表 1), 可基本确定分离菌株为与嗜吡啉红球菌近似的种 *Rhodococcus sp.* AN5。已报道的苯胺降解菌还包括芽孢杆菌、不动杆菌、节杆菌、黄杆菌、

表 1 红球菌 AN5 与嗜吡啉红球菌的形态及生理生化特征比较

Table 1 Comparison of morphological and physiological characteristics between <i>Rhodococcus</i> sp. AN5 and <i>Rhodococcus. pyridinivorans</i>								
鉴定项目	菌株 AN5	嗜吡啉红球菌	鉴定项目	菌株 AN5	嗜吡啉红球菌	鉴定项目	菌株 AN5	嗜吡啉红球菌
革兰氏染色	+	+	甲基红	-	-	琥珀酸	+	+
芽孢	-	-	硫化氢	+	+	延胡索酸	+	+
氧化酶	-	-	硝酸盐还原	+	+	苯甲酸钠	+	+
过氧化氢酶	+	+	柠檬酸盐	+	+	乙酸	+	+
VP试验	-	-	酒石酸盐	-	-	葡萄糖产酸	-	-

诺卡氏菌、食酸假单胞菌、恶臭假单胞菌、食酸丛毛单胞菌等^[15-17]。

2.2 菌株 AN5 降解苯胺和不同芳香族底物作为惟一碳源的生长曲线和生长量

苯胺浓度为 500 mg·L⁻¹ 和 1 000 mg·L⁻¹ 时,菌株 AN5 在 24 h 和 28 h 分别达到最大生长浓度;在苯胺浓度为 2 000 mg·L⁻¹ 和 3 000 mg·L⁻¹ 时菌株生长缓慢,第 5 d 才达到最大生长浓度(图 1)。对照 4 组试验,菌株 AN5 在苯胺浓度为 1 000 mg·L⁻¹ 时具有最大细菌生长量。继续培养,培养液的浊度反而下降,可能是由于菌体自溶的结果。同时菌株 AN5 也可以苯酚、苯甲酸、萘等为惟一碳源生长,但细菌生长量均没有以苯胺为底物的高(图 2)。

2.3 温度、pH、苯胺浓度、第二碳源和氮源对菌株 AN5 降解苯胺的影响

2.3.1 温度、pH 对苯胺降解的影响

菌株 AN5 降解苯胺的最佳温度为 30 ℃(图 3-a),

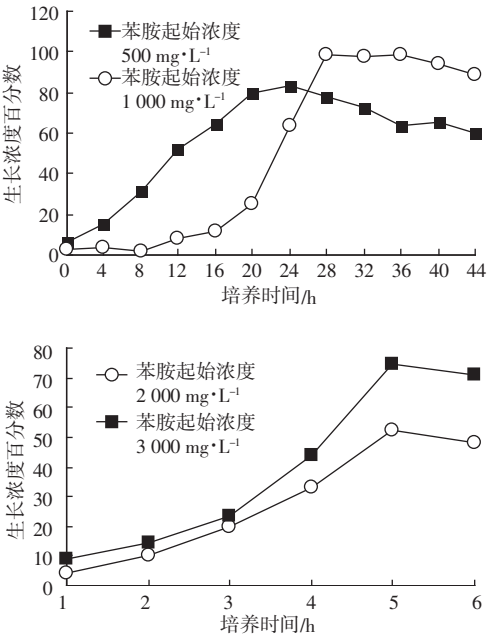


图 1 苯胺浓度对菌株 AN5 生长的影响
Figure 1 Effect of aniline concentration on growth of strain AN5

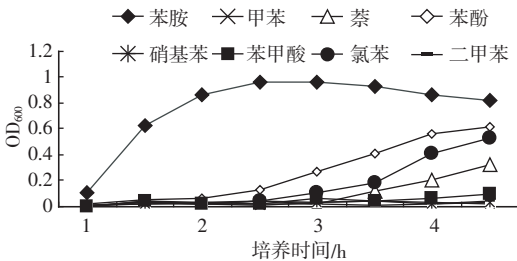


图 2 菌株 AN5 以不同底物为惟一碳源的生长曲线
Figure 2 Growth curves of strain AN5 with different substrates as unique carbon sources

最佳 pH 值为 7.0(图 3-b)。

2.3.2 苯胺浓度对苯胺降解的影响

苯胺浓度低于 2 000 mg·L⁻¹ 时,菌株 AN5 能完全降解所试苯胺;当苯胺浓度为 3 000 mg·L⁻¹ 时,所试苯胺不能被完全降解(图 4)。刘志培等报道的食酸丛毛单胞菌 AN3(*Comamonas acidovorans* AN3)经 3 d 即可将浓度为 2 000 mg·L⁻¹ 的苯胺全部降解,是目前已报道的在该浓度下降解苯胺能力最高的菌株^[16]。与

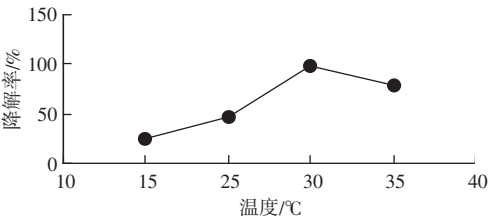


图 3-a 温度对菌株 AN5 降解苯胺的影响
Figure 3-a Effect of temperature on aniline degradation by strain AN5

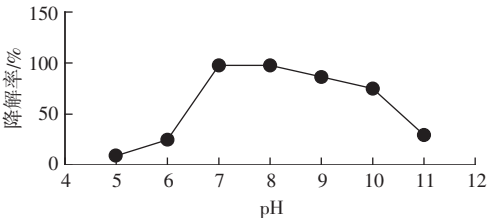


图 3-b pH 对菌株 AN5 降解苯胺的影响
Figure 3-b Effect of pH on aniline degradation by strain AN5

AN3 相比,本研究分离到的菌株 AN5 在苯胺浓度较低时 ($\leq 1\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),其苯胺降解曲线的迟缓期(0.5~1 d)较短,能快速进入到对数期,缩短降解所需时间,约 1~2 d 即可将苯胺完全降解,表明菌株 AN5 在对已被苯胺污染环境的快速生物处理及修复中将具有很高的应用价值。

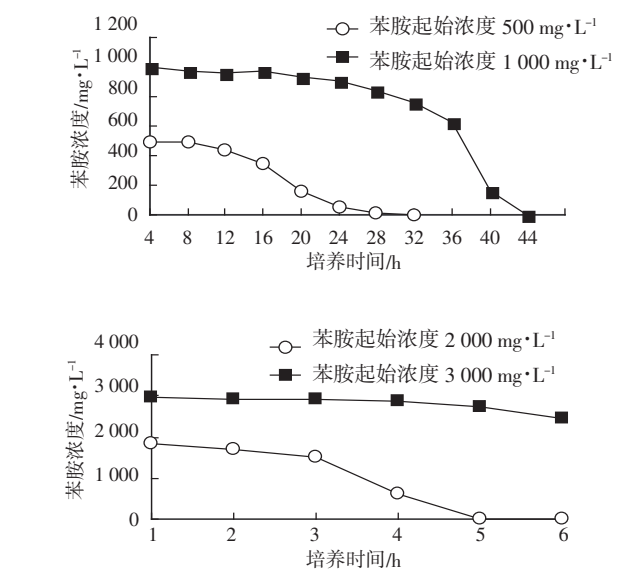


图 4 苯胺浓度对菌株 AN5 降解苯胺的影响
Figure 4 Effect of aniline concentration on aniline degradation by strain AN5

2.3.3 第二碳源和氮源对苯胺降解的影响
葡萄糖或硫酸铵存在时,菌株 AN5 对苯胺的降

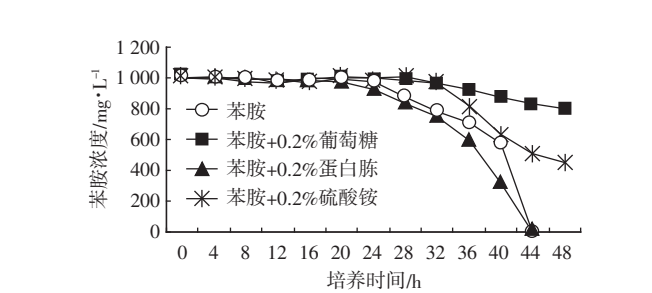


图 5 第二碳源对菌株 AN5 降解苯胺的影响
Figure 5 Effect of secondary carbon sources on aniline degradation by strain AN5

解均受到一定抑制,但蛋白胨却对菌株 AN5 降解苯胺具有促进作用(图 5)。Kahng^[9]也曾报道葡萄糖对菌株 HY99 降解苯胺过程有较强抑制,而蛋白胨能加速苯胺降解。葡萄糖引起的苯胺降解速度下降应是微生物优先利用葡萄糖的结果;而硫酸铵对苯胺降解的抑制可能是因为苯胺降解为邻苯二酚的过程中产生 NH_4^+ ,而硫酸铵中存在的 NH_4^+ 抑制了该过程的进行。

2.4 菌株对苯胺的耐受能力和对抗生素、重金属的敏感性

从培养基上的生长情况可看出:菌株 AN5 对苯胺的最高耐受浓度为 $5\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (表 2);该菌株对金霉素、红霉素具有较好的抗性,而对氨苄青霉素、青霉素无抗性(表 3);所试浓度的重金属离子对该菌株的苯胺降解均具有抑制作用,其中以 Hg^{2+} 和 Ag^+ 最为明显(表 4)。

表 2 菌株 AN5 的苯胺耐受性									
Table 2 The aniline endurance of strains AN5									
苯胺浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	500	1 000	2 000	3 000	4 000	5 000	6 000	7 000	8 000
菌株 AN5 生长情况	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-

注:-为不生长,+,++,+++分别为生长、生长较好、生长很好,下同。
Note:-denotes not growing, +, ++ and +++ denote growing, growing well and growing better respectively, the same as below.

表 3 菌株 AN5 的抗生素耐受性						
Table 3 The antibiotic endurance of strains AN5						
抗生素	氨苄青霉素	金霉素	红霉素	卡那霉素	庆大霉素	青霉素
浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	100	50	50	80	50	50
菌株 AN5 生长情况	-	++	++	+	+	-

表 4 菌株 AN5 的重金属耐受性					
Table 4 The heavy metal endurance of strains AN5					
重金属	HgSO_4	Ag_2SO_4	CuSO_4	NiSO_4	MnCl_2
浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.01	0.025	1	1	1
菌株 AN5 生长情况	-	-	+	+	++

2.5 双加氧酶种类的确定

由液相色谱结果(图 6)可看出菌株 AN5 降解邻苯二酚的代谢产物为粘糠酸 (260 nm 处),说明菌株 AN5 是通过邻苯二酚-1,2-双加氧酶进行邻位开环、经邻位裂解途径降解邻苯二酚及其他芳香族化合物。液相色谱图中未见间位裂解中间产物 2-羟基粘糠酸半醛,说明菌株 AN5 未通过间位裂解途径降解邻苯二酚。微生物经邻苯二酚途径降解苯胺的过程大多数是通过邻位降解,特例如某种粪产碱杆菌、恶臭假单胞菌、食酸丛毛单胞菌^[6]。

2.6 *Rhodococcus* sp. AN5 的系统发生分析

将分离的菌株与某些红球菌菌种以及一些具有代表性的其他放线菌种属进行系统发生分析,获得的系统发生树的结构如图 7 所示。白喉杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)被定义为外群。从图中可以发现,*Rhodococcus* sp. AN5 接近嗜吡啉红球菌(*Rhodococcus pyridinivorans*),两者在系统发生地位上几乎相同。

3 结论

(1) 分离到一株高效苯胺降解菌株 AN5。经 16S rDNA 分析并结合菌株形态和生理生化特性可基本确

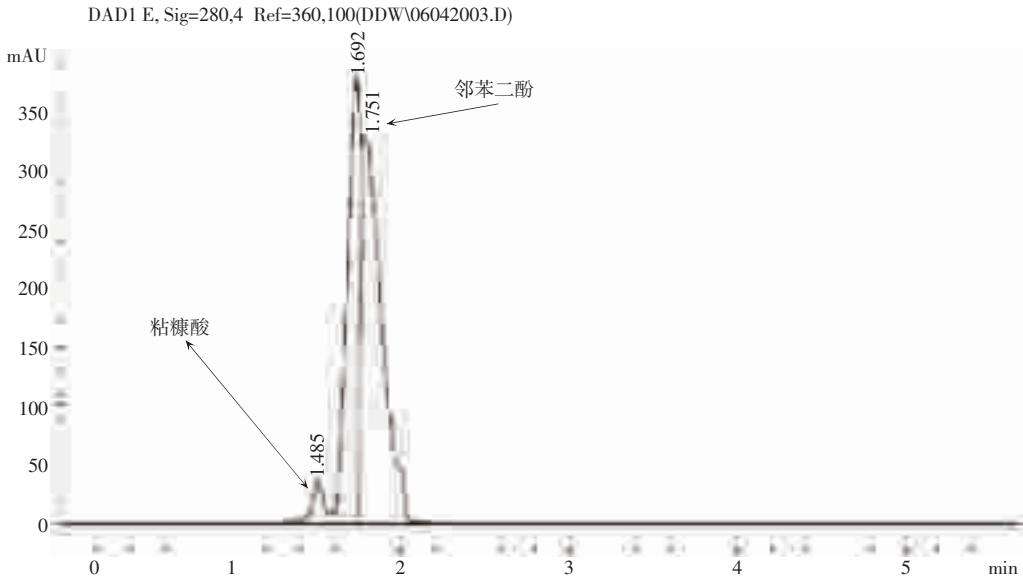


图 6 菌株 AN5 降解邻苯二酚的高效液相色谱分析(邻苯二酚起始浓度 500 mg•L⁻¹)
Figure 6 HPLC analyses of degrading catechol for strain AN5(catechol initial concentration is 500 mg•L⁻¹)

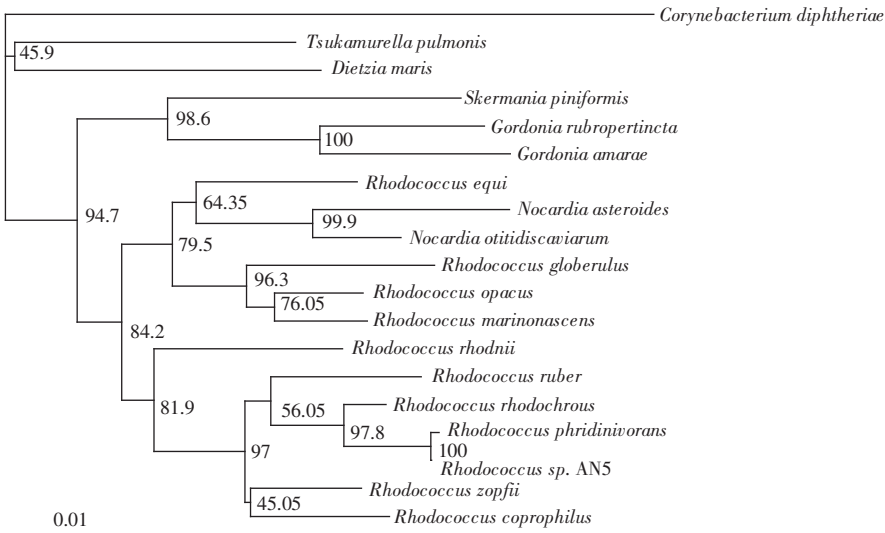


图 7 基于 16S rDNA 序列同源性构建的菌株 AN5 和其他相关细菌的系统发生树
Figure 7 Phylogenetic tree of strain AN5 and other relative species based on 16S rDNA sequences

定为与嗜吡啉红球菌近似的种 *Rhodococcus* sp. AN5。

(2) 菌株 AN5 在苯胺浓度为 $1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时具有最大的细菌生长量; 该菌株在苯胺浓度较低时 ($\leq 1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 降解曲线的迟缓期较短 (0.5~1 d), 能够快速有效地降解苯胺 (约 1~2 d)。菌株 AN5 可以苯胺作为惟一碳源生长, 还可以多种芳香族化合物为惟一碳源生长。

(3) 代谢机理研究证实, 菌株 AN5 在邻苯二酚-1,2-双加氧酶作用下经邻位裂解途径降解苯胺。

参考文献:

- [1] 蔡道基. 农药环境毒理学研究 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1999. 3-18.
CAI Dao-ji. Environmental toxicology of pesticide [M]. Beijing: China Environmental Science Press, 1999. 3-18.
- [2] 李金荣, 杨振放, 吴耀国, 等. 反硝化作用下苯胺降解的实验研究[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(6): 2179-2182.
LI Jin-rong, YANG Zhen-fang, WU Yao-guo, et al. Experimental study on aniline degradation under denitrification conditions[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(6): 2179-2182.
- [3] Wang L, Battington S, Kim J W. Biodegradation of pentyl amine and aniline from petrochemical wastewater [J]. *Journal of Environmental Management*, 2007, 83: 191-197.
- [4] Giti E, Mohamad S, Faremeh M. The utilization of aniline, chlorinated and aniline blue as the only source of nitrogen by fungi in water[J]. *Water Research*, 2001, 35(5): 1219-1224.
- [5] Kahng, Kukor J J, OH K H. Characterization of strain HY99, a novel microorganism capable of aerobic and anaerobic degradation of aniline[J]. *FEMS Microbiology Letter*, 2000, 190: 215-221.
- [6] 刘志培, 杨惠芳, 周培谨. 微生物降解苯胺的特性及其降解代谢途径[J]. 应用与环境生物学报, 1999, 5(1): 5-9.
LIU Zhi-pei, YANG Hui-fang, ZHOU Pei-jin. Characteristics and metabolism pathway of microbial degradation of aniline [J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 1999, 5(1): 5-9.
- [7] 韦朝海, 任源, 吴超飞, 等. 专性好氧菌降解苯胺废水的动力学研究[J]. 环境科学研究, 1999, 12(4): 15-18.
WEI Chao-hai, REN Yuan, WU Chao-fei, et al. Kinetic characteristics of obligate aerobic bacteria in degrading wastewater containing aniline[J]. *Research of Environmental Sciences*, 1999, 12(4): 15-18.
- [8] 周军, 赵庆祥, 金雪标. 苯胺生物降解极限的研究 [J]. 环境污染与防治, 2004, 26(6): 401-403.

- ZHOU Jun, ZHAO Qing-xiang, JIN Xue-biao. Threshold of aniline biodegradation [J]. *Environmental Pollution and Control*, 2004, 26(6): 401-403.
- [9] Konopk A. Isolation and characterization of a subsurface bacterium that degrades aniline and methylanilines [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1993, 111: 93-100.
 - [10] Liu Z, Yang H, Huang Z. Degradation of aniline by newly isolated, extremely aniline tolerant *Delftia* sp. AN3 [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 58(6): 679-682.
 - [11] Strachan P D, Freer A A, Fewson C A. Purification and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259 and cloning and sequencing of its *catA* gene [J]. *Biochemistry*, 1998, 333(3): 741-747.
 - [12] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
DONG Xiu-zhu, CAI Miao-ying. Manual of systematic and determinative bacteriology [M]. Beijing: Science Press, 2001.
 - [13] 钟文辉, 何国庆, 郑平, 等. 2,4-二氯酚降解细菌菌株对含 2,4-二氯酚废水的好氧处理[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2003, 29(5): 550-555.
ZHONG Wen-hui, HE Guo-qing, ZHENG Ping, et al. Application of 2,4-dichlorophenol degrading bacteria strains to treat imitating waste water [J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences)*, 2003, 29(5): 550-555.
 - [14] Yoon J H, Kang S S, CHO Y G, et al. *Rhodococcus pyridinivorans* sp. nov., a pyridine-degrading bacterium [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50: 2173-2180.
 - [15] 曾国驱, 任随周, 许玫英, 等. 微生物降解苯胺的研究现状 [J]. 中国医学生物技术应用杂志, 2003, 4: 74-78.
ZENG Guo-qu, REN Sui-zhou, XU Mei-ying, et al. Recent research situation on microbial degradation of aniline [J]. *The Chinese Academic Medical Magazine of Organisms*, 2003, 4: 74-78.
 - [16] 刘志培, 杨惠芳, 周培谨. 苯胺降解菌的分离和特性研究[J]. 环境科学学报, 1999, 19(2): 174-179.
LIU Zhi-pei, YANG Hui-fang, ZHOU Pei-jin. Isolation and characterization of a bacterial strain for the degradation of aniline [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 1999, 19(2): 174-179.
 - [17] 李岩, 李社增, 鹿秀云, 等. 苯胺高效降解菌的筛选及其生物学特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(5): 1738-1743.
LI Yan, LI She-zeng, LU Xiu-yun, et al. Isolation and characterization of aniline-degradation bacterial strains [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(5): 1738-1743.