

油田回注水中硫酸盐还原原核生物的快速检测和群落结构分析

曾景海, 吴晓磊*, 赵桂芳, 钱易

(清华大学环境科学与工程系环境模拟与污染控制国家重点实验室, 北京 100084)

摘要: 利用荧光原位杂交 (Fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 技术, 采用荧光标记的 rRNA 探针及其组合对胜利油田胜利采油厂回注水中硫酸盐还原原核生物 (Sulfate reducing prokaryotes, SRPs, 包括硫酸盐还原细菌和硫酸盐还原古菌) 进行检测, 分析了该回注水中 SRPs 群落结构. 结果表明: SRPs 在胜利油田回注水中具有极高的种群多样性, 广泛分布于 4 个细菌门和 1 个古菌门; 总数可达 2.86×10^4 个/mL, 占回注水中总微生物细胞的 20% 左右; 其中优势菌属为脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*) 和脱硫肠状菌属 (*Desulfotomaculum*), 分别占回注水微生物总细胞数的 8.71% ($\pm 4.45\%$), 和 12.15% ($\pm 3.90\%$). *Desulfobacteriales* 和 *Syntrophobacteriales* 这 2 个目中的 SRPs, *Thermodesulfobacteriales* 以及 *Thermodesulfovibro* 属的 SRPs 分别占样品微生物总量的 7.59% ($\pm 2.92\%$), 3.57% ($\pm 1.39\%$) 和 2.32% ($\pm 0.80\%$). 除此之外, 也检测到了占微生物总量 4.29% ($\pm 1.75\%$) 的 *Archaeoglobus* 属的 SRPs, 证明了古菌类 SRPs 是回注水中一个不容忽视的硫酸盐还原微生物种群. FISH 法能够快速、准确地检测回注水中 SRPs 数量, 解析 SRPs 群落结构.

关键词: 荧光原位杂交; 硫酸盐还原原核生物; 基因探针; 群落结构; 绝迹稀释法

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3301(2006)05-0972-05

Detection of SRPs in Injection Water of Shenli Oil Field by FISH

ZENG Jing-hai, WU Xiao-lei, ZHAO Gu-fang, QIAN Yi

(ESPC State Key Joint Laboratory, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes was applied for analyzing the structure of sulfate reducing prokaryotes (SRPs) community in injection water of Shengli Oil Field. Eight probes and their various combinations were used to detect SRPs in the water. Results showed SRPs detected in the water were diverse, which followed in 4 bacterial phyla and 1 archaeal phylum. Total amount of SRPs was 2.86×10^4 cells/mL, accounting for 20% of total cells of microorganisms in the water of the Oil Field. *Desulfovibrio* and *Desulfotomaculum* cells were about 8.71% ($\pm 4.45\%$) and 12.15% ($\pm 3.90\%$) of the total microbial cells respectively, being dominant in the water. The relative amounts of SRPs belonging to *Desulfobacteriales* and *Syntrophobacteriales*, *Thermodesulfobacteriales*, and *Thermodesulfovibro* to total microbial cells in the water were 7.59% ($\pm 2.92\%$), 3.57% ($\pm 1.39\%$) and 2.32% ($\pm 0.80\%$) respectively. In addition, SRPs belonging to *Archaeoglobus* were also detected with the amount of 4.29% ($\pm 1.75\%$) of total microbial cells, which tells that archeal SRPs are also very important sulfate reducing microorganisms in the injection water of oil field.

Key words: FISH; sulfate reducing prokaryotes (SRPs); gene probes; microbial community; maximum probable number

在细菌界和古菌界都有微生物能够进行硫酸盐还原反应, 通称为硫酸盐还原原核生物 (Sulfate-reducing prokaryotes, SRPs), 包括硫酸盐还原菌 (SRB) 和硫酸盐还原古菌^[1, 2]. SRPs 在油田回注水中的存在具有很多危害, 所以我国石油、天然气工业执行的注水水质 11 项指标中有 4 项直接与硫酸盐还原微生物有关. 目前检测 SRPs 的标准方法是利用培养的绝迹稀释法, 具有培养法本身的不足: ①无法培养所有的微生物^[3], 包括回注水中所有的 SRPs; ②SRPs 有 130 多种, 涵盖了 4 个细菌门 (Proteobacteria, Nitrospirae, Thermodesulfobacteria, Firmicutes) 和 1 个古菌门 (Euryarchaeota)^[2], 绝迹

稀释法无法对这些 SRPs 的种类进行分别, 所以无法解析回注水中 SRPs 的群落结构; ③绝迹稀释法通常耗时 2 周^[1], 无法及时反馈生产实际情况.

与绝迹稀释法相比, 荧光原位杂交技术 (Fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 不依赖对微生物的培养, 而以微生物 rRNA 中高度保守、物种特异性的片段序列作为鉴别微生物的标志; 设计合成荧光探针, 通过探针与微生物 rRNA 目标特异性

收稿日期: 2005-04-26; 修订日期: 2005-07-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30300008)

作者简介: 曾景海 (1981~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为环境生物技术, E-mail: zengjh04@mails.gscas.ac.cn

* 通讯联系人, E-mail: xiaolei_wu@tsinghua.edu.cn

片段进行的杂交反应,使探针和荧光标记留在目标微生物细胞内;激发荧光信号,对目标微生物进行观察和计数,从而直观、准确地得到目标微生物的存在、数量和空间分布等信息,并由此解析微生物群落结构和生物多样性^[4]. FISH 的优势使其成为了环境微生物学中的重要技术手段,在分析海水沉积物、水体、土壤和根系表面^[5~10]等自然环境,以及反应体系^[11,12]中的微生物群落等方面得到了广泛的应用.国外利用 FISH 技术检测 SRPs 进行了相当多的工作^[13,14],但利用 FISH 法分析油田回注水中 SRPs 群落结构方面的工作则鲜见报道.

本研究运用 FISH 技术对胜利油田回注水中的 SRPs 进行全面检测,分析其群落结构和优势菌群;定量分析 SRPs 的数量,并与绝迹稀释法进行比较,探索利用 FISH 方法检测油田回注水中 SRPs 的可行性.

1 材料与方法

1.1 探针设计

根据目前已知的所有 SRPs 的 16S rDNA 序列和 16S rRNA 的二级结构,利用 ARB 系统分析,筛选了 8 组核酸片段序列(如表 1),合成基因探针.这 8 组探针可以检测已知 134 种 SRPs 中的 124 种,分别属于 Desulfovibrionales, Desulfobacterales, Syntrophobacterales, Clostridiales, Nitrospirales, Thermodesulfobacterales, Archaeoglobales 目中的 Desulfovibrionaceae, Desulfomicrobiaceae, Desulfohalobiaceae, Desulfonatronumaceae, Desulfobacteraceae, Desulfobulbaceae, Nitrospiraceae, Syntrophobacteraceae, Peptococcaceae, Thermodesulfobacteriaceae 和 Archaeoglobaceae 科.利用 6-FAM 荧光素对这 8 种基因探针片段的 5' 端进行标记(由

上海基康生物工程公司合成),合成检测 SRPs 的基因探针.

1.2 试验方法

1.2.1 荧光原位杂交(FISH)法

2003-10-24,采取胜利油田胜利采油厂 1 号综合站的回注水作为研究用回注水样品.对回注水样品进行分级离心和 0.22μm 滤膜过滤,浓缩样品中的微生物细胞;以报道的方法^[10,11],利用多聚甲醛对样品中微生物进行固定,并利用 100% 乙醇对微生物细胞进行处理,将处理后的样品于-20℃保存(不超过 3 周);移取固定处理后的样品 1μL,均匀分布在 FISH 技术标准载波片的圆形储样孔中,室温过夜风干;通过多级乙醇脱水,利用选定探针在最适温度和盐浓度下,与微生物 16S rRNA 进行最优化杂交反应一定的时间;利用清洗液在清洗温度下,对样品清洗 20min;然后利用 DAPI 对所有微生物 DNA 进行染色;用荧光显微镜对样品进行观察,在蓝光激发下,荧光素 6-FAM 发出绿色的荧光,而在紫外激发下,DAPI 发出蓝色的荧光,所以荧光显微镜视野中带绿色荧光的细胞是目标 SRPs 细胞,而带蓝色荧光的细胞为总体微生物细胞(包括 SRPs),对这些微生物细胞进行计数,可以分析目标 SRPs 的种群大小以及在样品微生物总量中所占的比例.

1.2.2 绝迹稀释法

参考中华人民共和国石油天然气行业标准(SY/T 0532-93),利用三管法,对水样进行逐级稀释($10^{-1} \sim 10^{-6}$),将各稀释度的水样 1mL 加入试管中,然后灌满加硫酸亚铁铵培养基,放入 37℃ 恒温培养箱中培养 14~21d,观察是否生成黑色沉淀并伴有硫化氢气味,判断 SRPs 的生长,并计算 SRPs 的数量.

1.3 实验步骤

表 1 实验采用的 16S rRNA 探针

Table 1 16S rRNA probes applied

编号	探针序列	目标 SRPs
探针 1	5'-ACCGGTATTCTCCCGAT-3'	Desulfobacterales, Syntrophobacterales
探针 2	5'-GCCGAAAATTCTCACTG-3'	Desulfobacterales, Syntrophobacterales
探针 3	5'-CTACGGATTTCACTCCTA-3'	Desulfovibrionales
探针 4	5'-ATGGGACGCGGATCCATG-3'	Desulfotomaculum
探针 5	5'-ATGGGACGCGGACCCATG-3'	Desulfotomaculum
探针 6	5'-GCTGTGGAATTCCACCTT-3'	Nitrospirales(Thermodesulfovibro)
探针 7	5'-TGAGGAGGGCTTTCTGGG-3'	Thermodesulfobacterales
探针 8	5'-GCCCGTACGGATCTTCGG-3'	Archaeoglobales

1.3.1 组合探针最优杂交条件的确定

改变甲酰胺浓度、杂交温度和杂交时间,对样品

中 SRPs 进行 FISH 分析,观察样品中 SRPs 的荧光强度以及数量,确定各种情况下组合探针的最优杂

交条件为: 杂交温度 44 ℃, 清洗温度 46 ℃, 甲酰胺浓度 30%, 杂交时间 2.5h.

1.3.2 回注水中 SRPs 群落结构分析

利用 8 种探针分别进行 FISH 反应, 分析这些探针相对应的 SRPs 在回注水中的存在; 对样品中 SRPs 细胞(带有 6-FAM 绿色荧光的细胞)和总体微生物细胞(带 DAPI 蓝色荧光细胞)计数, 计算样品目标 SRPs 对微生物总量的相对数量, 以及目标 SRPs 的种群大小; 根据回注水中存在的 SRPs 种类和种群大小, 分析回注水中 SRPs 的群落结构.

1.3.3 注水中 SRPs 多样性分析

根据 SRPs 的种类和种群大小, 计算物种丰度(Richness), 物种均匀度(Evenness), Shannon 指数和 Simpson 指数, 初步分析回注水中 SRPs 群落的生物多样性.

物种丰度(Richness): $S = \text{SRPs 种类数}$

Shannon 指数: $H = - \sum p_i \log_2 p_i$

Simpson 指数: $D = 1 - \sum p_i^2$

其中: p_i 表示各种 SRPs 的相对数量.

物种均度(Evenness): $E = \frac{H}{H_{\max}}$

其中: $H_{\max} = \log_2 S$

1.3.4 组合探针检测回注水中 SRPs 的检测

将 8 种探针进行 2 种 3 种和 8 种组合, 在优化的实验条件下进行杂交. 计算各种组合探针所能检测的 SRPs 的数量, 分析组合探针检测 SRPs 的覆盖程度, 研究利用组合探针检测回注水样品中所有 SRPs 的可能性, 探索以 FISH 方法检测油田回注水中 SRPs 的可能性.

2 结果与讨论

2.1 胜利油田回注水中 SRPs 群落结构和生物多样性

利用 8 种探针分别对回注水进行检测, 结果表明在胜利油田胜利采油厂 1 号综合站的回注水中各种 SRPs 都普遍存在, 广泛分布于 4 个细菌门(Proteobacteria, Thermodesulfobacteria, Firmicutes, Nitrospirae)和 1 个古菌门(Euryarchaeota)(图 1).

脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)(对应于探针 3)和脱硫肠状菌属(*Desulfotomaculum*)(对应于探针 4 和探针 5)分别占样品中微生物总量的 8.71% ($\pm 4.45\%$) 和 12.15% ($\pm 3.90\%$), 是该回注水中的优势硫酸盐还原微生物, 这一结果与前人利用培养方法所得到的研究相一致^[15, 16]. 探针 8 检测的古

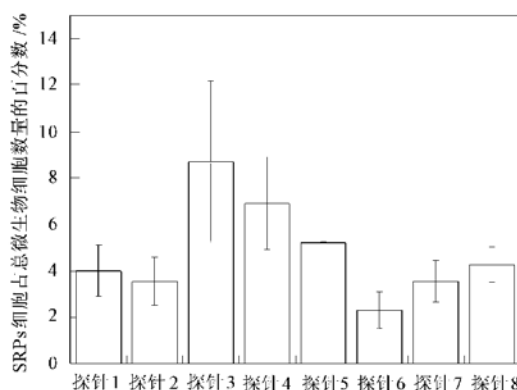


图 1 各探针所检测目标 SRPs 的相对含量

Fig. 1 Amount of SRPs cells in the injection water from Shenli oil field

菌界 Euryarchaeota 门 *Archaeoglobus* 属的 SRPs, 在该回注水中占微生物总量的 4.29% ($\pm 1.75\%$), 证明了古菌界硫酸盐还原微生物在油田回注水中的存在, 并且占有相当大的比例, 是一个不容忽视的硫酸盐还原微生物种群. 对油田回注水中古菌类 SRPs 的检测工作, 目前尚未见报导.

另外, 该回注水中, Desulfobacteriales 和 Syntrophobacteriales 这 2 个目中的 SRPs, Thermodesulfobacteriales 中的 SRPs, 以及 Thermodesulfovibro 属的 SRPs 分别占样品中微生物总量的 7.59% ($\pm 2.92\%$), 3.57% ($\pm 1.39\%$) 和 2.32% ($\pm 0.80\%$). 最大种群的 SRPs (*Desulfotomaculum*) 的种群大小约为最小种群 (*Thermodesulfovibro*) 的 6 倍, 同时, 8 种探针检测的 SRPs 总数占回注水中微生物总量的 38.62% ($\pm 15.21\%$), 说明了回注水中 SRPs 是主要的微生物群落.

不同 SRPs 细胞壁等组成成分, 以及生活习性的差别, 决定了它们对环境影响的不同反应, 所以不同优势菌种组成的 SRPs 群落, 对回注水处理工艺中的药剂将具有不同的敏感性, 也就会影响各种药剂的杀菌效果. 另一方面, 不同 SRPs 新陈代谢所需要的底物也不完全相同, 对底物的控制也可以精细地指导 SRPs 控制工艺的开发和应用. 因此, 对回注水中 SRPs 群落结构的准确分析, 有助于指导对杀菌剂的精确选用, 以及 SRPs 控制工艺精细的调控. 利用 FISH 技术对回注水中 SRPs 群落解析, 种群差异的确定是绝迹稀释法所无法完成.

根据上述检测结果计算回注水中 SRPs 群落微生物多样性指数. Shannon 指数: $H = 1.79$; Simpson 指数: $D = 0.81$; 物种均度(Evenness): $E = 0.92$, 可

以判断该回注水中 SRPs 具有较高的多样性和物种均度.

2.2 各种探针组合对 SRPs 的检测

利用 2 种探针、3 种探针和 8 种探针组合对回注水中 SRPs 进行检测的结果, 及其与单探针检测结果比较如表 2 所示.

表 2 组合探针检测的结果

Table 2 Detection of SRPs by combinations of probes

探针组合	目标 SRPs 细胞占样品中 总微生物细胞的比例/ %	相应单探针检测 结果之和/ %	组合探针	目标 SRPs 细胞占样品中 总微生物细胞的比例/ %	相应单探针检测 结果之和/ %
1-2	5.3±1.2	7.6±2.9	2-6	3.8±0.4	5.9±2.3
1-3	9.8±1.6	12.7±5.8	2-7	5.9±0.8	7.1±2.9
1-4	8.5±0.7	10.9±4.2	3-4	13.5±2.1	15.6±7.3
1-5	8.3±1.8	9.2±2.4	3-5	13.1±1.6	13.9±5.5
1-6	4.7±0.7	6.3±2.2	3-6	9.3±1.2	11.0±5.2
2-3	10.4±1.1	12.3±6.0	3-7	9.4±0.6	12.3±5.8
2-4	10.1±1.9	10.5±4.4	3-8	10.4±0.9	13.0±6.2
2-5	6.1±0.4	8.8±2.6	4-5	10.3±1.4	12.1±3.9
1-2-3	12.3±1.5	16.3±7.4	2-3-4	15.1±1.8	19.2±8.8
1-2-4	10.2±2.0	14.5±5.8	2-3-5	15.4±2.2	17.5±7.0
1-2-5	10.1±1.5	12.8±4.0	2-3-6	12.8±2.0	14.6±6.8
1-2-6	7.3±1.3	9.9±3.7	2-4-5	14.5±1.9	15.7±5.4
1-3-4	14.5±2.4	19.6±8.7	2-4-6	11.7±0.5	12.8±5.2
1-3-5	13.1±2.1	18.0±6.9	3-4-5	17.2±2.5	20.9±8.3
1-3-6	10.3±0.7	15.0±6.6	3-4-6	14.3±2.1	17.9±8.1
1-2-3-4-5-6-7-8	20.20±4.12				

从表 2 可以看出, 含有探针 3、4、5 的各种组合能检测到较多的 SRPs, 而且探针 3、4、5 组合在一起所检测到的 SRPs 与 8 探针组合所检测到的值最为接近, 也间接验证了探针 3、4、5 所对应的脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*) 和脱硫肠状菌属 (*Desulfotomaculum*) 是回注水中的优势种群, 所以对胜利油田回注水中 SRPs 进行快速检测时可以考虑利用 3、4、5 这 3 个探针的组合来进行. 另一方面, 利用各种探针组合检测到的 SRPs 与相应的单探针检测结果的加和相近, 差别都在偏差范围内, 说明了组合探针检测 SRPs 的可重复性. 但是单探针检测 SRPs 结果的加和偏差要大于组合探针检测结果的偏差, 说明了利用组合探针对 SRPs 数量检测的优势.

所以单探针能很好地解析回注水中 SRPs 群落组成, 而组合探针则能较好地检测回注水中 SRPs 的数量. 通过进一步优化 FISH 反应条件, 减少检测偏差, 可以考虑利用组合探针来对回注水中 SRPs 总量进行快速、准确和直观地检测.

2.3 回注水中 SRPs 总数检测

2.3.1 绝迹稀释法检测结果

利用绝迹稀释法, 培养 21d 后, 根据三管法最大可能菌数表, 检测到水样中 SRPs 数量为 9 个/mL.

2.3.2 FISH 法 8 种探针组合检测的结果

利用 8 种探针的组合探针检测出 SRPs 细胞数占回注水中微生物总数的 20.20% ($\pm 4.12\%$); 利用荧光显微镜对样品所有视野进行全自动扫描, 计算 DAPI 染色的微生物总细胞数; 根据样品的体积, 计算单位体积样品中微生物总量; 根据 SRPs 细胞占样品中微生物总量的比例, 计算出水样中 SRPs 含量为 2.86×10^4 个/mL. 这个结果比绝迹稀释法测定结果高出 4 个数量级, 证明了 FISH 技术能够检测出绝迹稀释法所无法培养 SRPs.

FISH 技术则不受微生物可培养性的限制, 能够更加准确地对 SRPs 进行检测, 反应更加真实的情况. 同 FISH 反应和检测需要的时间约为 8~20h, 远少于绝迹稀释法的 14~21d, 所以 FISH 对 SRPs 的检测可以更加及时和准确地了解生产中 SRPs 变化以及指导对 SRPs 控制措施的调控.

3 结论

(1) FISH 方法比绝迹稀释法能检测更多的 SRPs: 不仅基本上能对 SRPs 进行初步分类、解析 SRPs 的群落结构, 还可定量检测水样中 SRPs 的数量. 由于 FISH 法能是对 SRPs 细胞进行直接计数, 结果比绝迹稀释法利用的最大可能数准确; 而且 FISH 方法检测样品所需时间约为 8~20h, 快于比绝迹稀释法的 14~21d, 能更及时地对回注水中

SRPs 检测, 反应生产情况, 指导生产实践。

(2) 在胜利油田胜利采油厂 1 号综合站的回注水中, 脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*) 和脱硫肠状菌属 (*Desulfotomaculum*) 是主要的 SRPs, 分别占样品中微生物总量的 8.71% ($\pm 4.45\%$) 和 12.15% ($\pm 3.90\%$); 而 *Thermodesulfovibrio* 属的 SRPs 则相对较少, 约占 *Desulfotomaculum* 数量的 1/6。另外属于古菌界的硫酸盐还原微生物在回注水中占微生物总量的 4.29% ($\pm 1.75\%$), 是一个不容忽视的硫酸盐还原微生物种群。

(3) 通过实验确立最优化的杂交条件, 利用组合探针检测回注水中 SRPs 进行检测的结果, 与相应单探针检测结果的加和相近, 差别都在标准偏差范围内, 说明了组合探针检测 SRPs 的有效性和可重复性。从而可以考虑利用 FISH 来对回注水中 SRPs 进行快速、准确和直观地检测。

参考文献:

- [1] 王升坤, 硫酸盐还原菌检测技术综述[J]. 石油与天然气化工, 1998, 27: 192~193.
- [2] Loy A, Lehner A, Lee N, *et al.* Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2002, 68: 5064~5081.
- [3] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K-H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. Microbiol. Rev., 1995, 59(1): 143~169.
- [4] Stoffels M, Ludwig W, Schleifer K-H. rRNA probe-based cell fishing of bacteria [J]. Environ. Microbiol., 1999, 1(3): 259~271.
- [5] Glockner F O, Fuchs B M, Amann R I. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1999, 65: 3721~3726.
- [6] Moter A, Gobel U B. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms [J]. J. Microbiol. Method., 2000, 41: 85~112.
- [7] Antoaen J, Llobet-Brossa E, Rodríguez-Valera F, *et al.* Fluorescence in situ hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds [J]. Environ. Microbiol., 1999, 1(6): 517~523.
- [8] Friedrich U, Van Langenhove H, Altendorf K, *et al.* Microbial community and physicochemical analysis of an industrial waste gas biofilter and design of 16SrRNA-targeting oligonucleotide probes [J]. Environ. Microbiol., 2003, 5(3): 183~206.
- [9] Brossa E L, Mora R R, Amann R I. Microbial community composition of Wadden Sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1998, 64: 2691~2696.
- [10] Snaird J, Amann R I, Huber I, *et al.* Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1997, 63: 2884~2896.
- [11] Wu X L, Conrad R. Functional and structural response of a cellulose-degrading methanogenic microbial community to multiple aeration stresses at two different temperatures [J]. Environ. Microbiol., 2001, 3(6): 355~362.
- [12] Wu X L, Chin K J, Stubner S, *et al.* Functional patterns and temperature response of cellulose-fermenting microbial cultures containing different methanogenic communities [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001, 56(2): 212~219.
- [13] Kleikemper J, Schroth M H, Sigler W V, *et al.* Activity and diversity of sulfate-reducing bacteria in a petroleum hydrocarbon contaminated aquifer [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2002, 68: 1516~1523.
- [14] Okabe S, Itoh T, Satoh H, *et al.* Analyses of spatial distributions of sulfate-reducing bacteria and their activity in aerobic wastewater biofilms [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1999, 65: 5107~5116.
- [15] 孔祥平, 包木太, 马代鑫, 等. 油田水中细菌群落分析 [J]. 油田化学, 2003, 20(4): 372~376.
- [16] 黄建新, 马艳玲, 陈志昕, 等. 常庆油田金属管材的腐蚀性细菌类群研究 [J]. 石油大学学报(自然科学版), 2002, 26(2): 66~69.