

不同水稻土微生物群落利用有机酸的铁还原特征

易维洁, 贺江舟, 曲 东

(西北农林科技大学 资源环境学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】研究不同水稻土来源的微生物群落, 在利用甲酸盐、乙酸盐、丙酸盐、丙酮酸盐、柠檬酸盐及琥珀酸盐作为惟一碳源时对异化 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原的影响。【方法】采用四川、吉林和江西 3 种不同水稻土浸提液接种作为微生物群落来源, 以人工合成的 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 为惟一的电子受体, 不同有机酸作为惟一碳源, 在 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 厌氧条件下培养, 定期测定 $\text{Fe}(\text{II})$ 生产量并对测定结果用 Logistic 模型进行分析。【结果】四川水稻土中的微生物群落在 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 还原过程中对所有供试碳源均表现出较高的利用活性, 其对应的 $\text{Fe}(\text{II})$ 累积量较高; 江西水稻土中的微生物群落对碳源的响应很低, 且几乎不能利用丙酸盐进行 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 的还原; 而吉林水稻土中的微生物群落在 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 还原过程中几乎不能利用琥珀酸盐作为电子供体。【结论】3 种微生物群落在 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 还原过程中对供试碳源利用上的不同, 反映了其微生物群落组成和代谢功能上的差异。3 种微生物群落均能较快地利用丙酮酸盐还原 $\text{Fe}(\text{OH})_3$, 说明 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原微生物在碳源利用上具有共性。

【关键词】 异化 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原; 有机酸; 水稻土; 微生物群落

【中图分类号】 S153.3; X172

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)06-0148-05

Iron reducing characteristics of organic acid utilization with microbes in different paddy soil

YI Wei-jie, HE Jiang-zhou, QU Dong

(College of Resources and Environment, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The effect of formate, acetate, propionate, pyruvate, citrate and succinate as sole carbon substrates on dissimilatory iron reduction in incubations with microbial communities from different paddy soils has been investigated. 【Method】 Paddy soil water extracts from Sichuan, Jilin and Jiangxi were sued as inoculums, ferrihydrite synthesized artificially as sole electronic acceptor. Cultured under anaerobic condition at $25\text{ }^\circ\text{C}$, yield of $\text{Fe}(\text{II})$ was mensurated termly and analyzed by Logisitic model. 【Result】 $\text{Fe}(\text{III})$ reduction was clearly observed in the utilizations of all carbon substrates tested by microbes from Si-chuan paddy soil, contrarily, microbes from Jiangxi paddy soil had lower response, especially could hardly use propionate. Succinate could not be used by microbes from Jilin paddy soil. 【Conclusion】 Distinct $\text{Fe}(\text{III})$ reductions in the utilization of all organic acid by different microbes reflect different compositions and metabolic function of the microbial communities from the three paddy soils. But the best utilizations of pyruvate indicates some common characteristics of dissimilatory $\text{Fe}(\text{III})$ reducing bacteria in paddy soil.

Key words: dissimilatory $\text{Fe}(\text{III})$ reduction; organic acid; paddy soil; microbial community

* [收稿日期] 2007-04-04

[基金项目] 国家自然科学基金项目(40271067, 40741005); 西北农林科技大学创新团队项目

[作者简介] 易维洁(1981—), 女, 重庆市人, 在读硕士, 主要从事环境化学研究。

[通讯作者] 曲 东(1960—), 男, 河南陕县人, 教授, 博士生导师, 主要从事土壤环境化学研究。E-mail: dongqu@nwsuaf.edu.cn

异化 Fe(Ⅲ)还原微生物是具有 Fe(Ⅲ)还原功能的一类微生物的总称,其能以 Fe(Ⅲ)作为惟一电子受体氧化有机物质,并从中获得生长的能量。目前,已从不同的厌氧环境中分离纯化出了多种铁还原微生物,并且在纯培养过程中发现,异化 Fe(Ⅲ)还原菌可利用甲酸盐、乙酸盐、丙酸盐、丙酮酸盐、乳酸盐、琥珀酸盐、苹果酸盐、延胡索酸盐等不同的短链有机酸作为电子供体还原 Fe(Ⅲ)^[1-4]。尽管乙酸盐可被多数异化 Fe(Ⅲ)还原菌所利用,常被用作富集异化 Fe(Ⅲ)还原菌的碳源^[5-7],但 Küsel 等^[4]分离得到的嗜酸性菌株(*Acidiphilium cryptum*) JF-5 不但不能利用乙酸盐还原 Fe(Ⅲ),而且当乙酸盐存在(0.3~5 mmol/L)时,菌株 JF-5 利用葡萄糖、乙醇以及 H₂ 生长的 Fe(Ⅲ)还原过程被抑制,表明异化 Fe(Ⅲ)还原微生物在碳源利用上存在一定的差异。水稻土作为研究厌氧微生物的一种模式系统,其微生物铁还原过程一直为研究者所重视。在意大利水稻土中添加易还原的 Fe(OH)₃ 后,乙酸盐和丙酸盐浓度迅速下降,说明乙酸盐和丙酸盐在异化 Fe(Ⅲ)还原过程中被微生物大量消耗^[8-11];在我国的四川、江西及吉林水稻土中添加乙酸盐、葡萄糖及腐殖酸后,可观察到土壤中 Fe(Ⅲ)还原过程有明显的改变,但不同土壤中铁还原程度有所不同^[12-13],说明不同土壤微生物群落在对碳源的利用上存在选择性特征。鉴于不同水稻土中氧化铁形态、电子受体及土壤有机质种类及数量等对铁还原过程的影响,本研究拟采用水稻土浸提液作为微生物群落来源,以人工合成的无定形氧化铁为惟一电子受体,探讨以不同有机酸(甲酸盐、乙酸盐、丙酸盐、丙酮酸盐、柠檬酸盐及琥珀酸盐)作为惟一电子供体时,其对 Fe(Ⅲ)微生物还原过程的影响,比较不同水稻土中异化 Fe(Ⅲ)还原微生物群落的碳源利用特征与差异,以期了解稻田生态群落中有机物代谢的生物学机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

供试水稻土分别采自江西省吉安市安福县竹江乡、四川省邛崃市回龙镇和吉林省吉林市丰满区前二道乡,其有机质含量分别为 23.9、48.9 和 41.2 g/kg,无定型铁含量分别为 1.94、3.08 和 4.94 g/kg,游离铁含量分别为 6.48、11.69 和 10.01 g/kg,pH 分别为 4.84、7.34 和 4.85($m(\text{土}):V(\text{去离子水})=1:5$)。将所取得的水稻土土样自然风

干,磨细,过孔径为 1 mm 的土壤筛,制备用作微生物群落来源的接种液。

1.2 接种液的制备

将供试水稻土以 $m(\text{土}):V(\text{去离子水})=1:9$ 的比例,在 25 ℃下淹水培养 7 d 后,700 r/min 离心 10 min,取上清液用作微生物接种液。将来源于 3 种水稻土的接种液分别用“JX”(由江西水稻土样品中提取的微生物群落)、“SC”(由四川水稻土样品中提取的微生物群落)和“JL”(由吉林水稻土样品中提取的微生物群落)表示。

1.3 试验方案及方法

采用厌氧培养的方法,以人工合成的 Fe(OH)₃ 为惟一电子受体,分别以甲酸盐、乙酸盐、丙酸盐、丙酮酸盐、柠檬酸盐及琥珀酸盐作为惟一碳源进行培养。培养容器为 7 mL 的血清瓶,加入经高温灭菌(121 ℃,30 min)的 5 g/L NH₄Cl 和人工合成的 Fe(OH)₃^[14](含铁量为 12.95 g/L)各 1 mL、磷酸缓冲液(K₂HPO₄ 5.0 g/L,KH₂PO₄ 2.5 g/L)和 9.8 g/L KCl 各 0.5 mL,再添加过 0.22 μm 滤膜(除菌)后浓度均为 100 mmol/L 的碳源及接种液各 1 mL。充氮除氧,密封,置于恒温培养箱中 25 ℃暗光培养。采样及 Fe(Ⅱ)含量的测定方法参见文献[15]。

1.4 动力学模型

异化 Fe(Ⅲ)还原是微生物介导的生物学过程,可用描述微生物生长动力学的 Logistic 方程^[15],对不同处理 Fe(Ⅲ)还原过程中 Fe(Ⅱ)累积浓度和时间的关系进行拟合,用 DPS 数据处理系统进行拟合分析。Logistic 方程的表达式为:

$$y = \frac{a}{1 + e^{-bx}}$$

式中: y 为不同时刻的 Fe(Ⅱ)浓度; x 为反应时间; a, b, c 均为参数。通过方程拟合,可求出 Fe(Ⅲ)还原的最大潜势(即 Fe(Ⅱ)最大累积量,数值等于参数 a)、反应速率常数(数值等于参数 c)、Fe(Ⅲ)最大还原速率($V_{\max}$,数值等于 $0.25ac$)和最大还原速率对应的时间($T_{\max}$,数值等于 $\ln b/c$)。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对 Fe(OH)₃ 还原微生物的影响

来源于不同水稻土的微生物群落,利用不同有机酸时 Fe(Ⅱ)累积量的变化如图 1 所示。由图 1 可知,3 种微生物群落利用甲酸盐时的 Fe(OH)₃ 还原过程总体上反应较慢,在培养后期才出现 Fe(Ⅱ)的大量累积,并呈现出迅速上升趋势,至培养结束时

尚未达到稳定状态; 乙酸盐在培养初期能被 SC 利用进行 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 还原反应, JL 利用乙酸盐处理在培养后期才有缓慢的 $\text{Fe}(\text{II})$ 累积, 而 JX 利用乙酸盐的处理仅在培养结束时才观察到 $\text{Fe}(\text{II})$ 的生成; 3 种微生物群落利用丙酸盐处理的 $\text{Fe}(\text{II})$ 累积量相对较低, 特别是在 JX 中几乎不发生 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原反应; 在 6 种有机酸处理中, 3 种微生物群落均能较好地利用丙酮酸盐, 至培养结束时, $\text{Fe}(\text{II})$ 含量为 $800\sim 900\text{ mg/L}$, JX、SC 和 JL 启动 $\text{Fe}(\text{II})$ 累积的时间分别较以甲酸盐为碳源时提前了 9、6 和 6 d; JX、JL 利用琥珀酸盐的处理在 42 d 的培养过程中几乎没有 $\text{Fe}(\text{II})$ 的累积, 说明琥珀酸盐难以被 JX、JL 水稻土中的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原菌所利用, 而 SC 利用琥珀酸盐的处理, 在培养期间 $\text{Fe}(\text{II})$ 累积量持续升

高, 至培养周期结束时还原反应仍未达到稳定状态; 3 种微生物群落利用柠檬酸盐的 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 还原趋势相同, 但培养前 13 d 的 $\text{Fe}(\text{II})$ 累积速率表现为 $\text{JX} > \text{JL} > \text{SC}$, 而培养 16~42 d 时, SC 的 $\text{Fe}(\text{II})$ 累积速率迅速升高, 且随着时间的延长 $\text{Fe}(\text{II})$ 累积量越来越大, 至培养结束时, $\text{Fe}(\text{II})$ 累积量大小顺序表现为 $\text{SC} > \text{JL} > \text{JX}$ 。

比较 3 种微生物群落的 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原反应可以看出, $\text{Fe}(\text{II})$ 累积量开始迅速增大所需的培养时间不同, 表现为 $\text{SC} < \text{JL} < \text{JX}$; 培养结束时 $\text{Fe}(\text{II})$ 累积量的高低顺序为 $\text{SC} > \text{JL} \approx \text{JX}$ 。表明, SC 具有较大的生物活性, 对供试碳源的响应最快, 而 JX 反应活性较低。

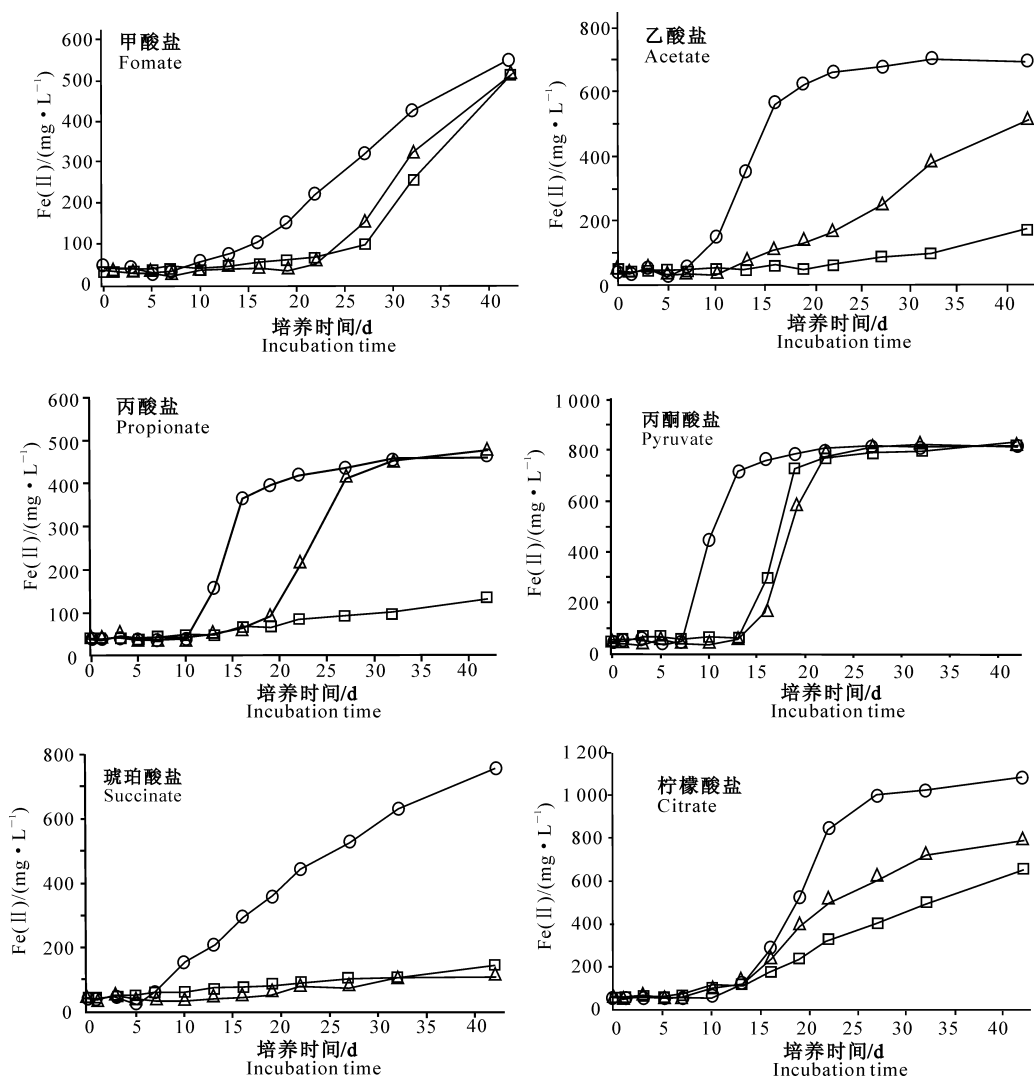


图 1 不同水稻土来源微生物群落利用不同碳源对 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 还原的影响

—□—, JX; —○—, SC; —△—, JL

Fig. 1 Effect of different microbe communities on $\text{Fe}(\text{OH})_3$ reduction used with different carbon sources

—□—, JX; —○—, SC; —△—, JL

2.2 3 种微生物群落的 Fe(OH)₃ 还原特征分析

3 种微生物群落利用不同有机酸的铁还原反应动力学参数见表 1,拟合方程的决定系数(R^2)表示回归模型的拟合值与变量间的相关程度。由表 1 可知,除 JX 利用甲酸盐和乙酸盐的结果不能用方程进行拟合外,SC、JL 利用各种碳源作电子供体还原 Fe(OH)₃ 的过程均可以较好地用 Logistic 方程进行拟合,其决定系数 R^2 为 0.876~0.996。SC 在 Fe(OH)₃ 还原过程中,除了丙酸盐处理外,利用其他碳源的 Fe(Ⅱ) 累积量(a)均最大,表明 SC 在 Fe(OH)₃ 还原时具有较大的还原潜势,可较好地利用试验所提供的碳源,特别是利用柠檬酸盐时的

表 1 来源于不同水稻土微生物群落 Fe(OH)₃ 还原过程的动力学参数

Table 1 Kinetics parameters of Fe(OH)₃ reduction in microbial communities from different paddy soil

微生物群落 Microbes	碳源 Carbon source	Logistic 方程参数 Logistic model parameters				$V_{\max}/$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	$T_{V_{\max}}/\text{d}$
		a	b	c	R^2		
SC	甲酸盐 Formate	619.79	3.62	0.14	0.994	21.14	9
	乙酸盐 Acetate	683.56	5.45	0.42	0.996	72.28	4
	丙酸盐 Propionate	440.26	7.90	0.57	0.984	62.60	4
	丙酮酸盐 Pyruvate	799.56	7.57	0.77	0.993	154.61	3
	柠檬酸盐 Citrate	1 063.44	6.49	0.35	0.993	92.12	5
	琥珀酸盐 Succinate	760.00	3.00	0.15	0.991	28.41	7
JX	甲酸盐 Formate	—	—	—	—	—	—
	乙酸盐 Acetate	—	—	—	—	—	—
	丙酸盐 Propionate	298.29	2.10	0.04	0.978	2.98	19
	丙酮酸盐 Pyruvate	799.21	13.35	0.81	0.984	161.2	3
	柠檬酸盐 Citrate	745.26	2.93	0.12	0.993	21.46	9
	琥珀酸盐 Succinate	237.93	1.50	0.04	0.977	2.38	10
JL	甲酸盐 Formate	603.05	5.89	0.18	0.972	27.66	10
	乙酸盐 Acetate	614.29	3.81	0.13	0.990	19.77	10
	丙酸盐 Propionate	474.92	7.89	0.35	0.979	41.53	6
	丙酮酸盐 Pyruvate	817.48	12.97	0.73	0.992	148.84	4
	柠檬酸盐 Citrate	789.29	3.95	0.20	0.993	39.36	7
	琥珀酸盐 Succinate	324.69	2.28	0.04	0.876	3.30	20

注:“—”表示不能应用 Logistic 方程进行拟合。
Note:“—” indicates logistic equation can not be fitted.

3 讨 论

有研究表明,在多数纯培养条件下,Fe(Ⅲ)还原微生物并不利用柠檬酸盐^[16-17]。由本研究结果可知,来源于 3 种水稻土中的微生物群落均可利用柠檬酸盐还原 Fe(OH)₃,但是其对应的 Fe(Ⅱ) 累积量在培养前期增加缓慢,后期才迅速增加。这说明水稻土中的 Fe(Ⅲ) 还原微生物不是直接利用柠檬酸盐,而是利用其降解的中间产物提供电子还原 Fe(OH)₃,这种转化表现为微生物间的营养“接力”,共代谢产物可以继续降解,表明混合培养和自然环境条件下铁的异化还原是微生物群落层次上的共代谢过程。厌氧条件下,丙酸盐是通过生成乙酸盐来

Fe(Ⅱ) 累积量达 1 063.44 mg/L,说明柠檬酸盐是 SC 的优势碳源;从最大还原速率对应的时间($T_{V_{\max}}$) 上分析,SC 利用各碳源对应的 $T_{V_{\max}}$ 较其他微生物群落提前 2~15 d。与 SC 中的 Fe(Ⅲ) 还原微生物相比,JX 中的 Fe(Ⅲ) 还原微生物活性相对较低,其利用丙酸盐、柠檬酸盐和琥珀酸盐的 $V_{\max}$ 分别只有 2.98,21.46 和 2.38 mg/(L·d)。由此可知,源于不同水稻土土壤中的 Fe(Ⅲ) 还原微生物群落及其功能具有多样性。JX、SC 和 JL 中的微生物群落均能较好地利用丙酮酸盐还原 Fe(Ⅲ),不但均具有较大的 $V_{\max}$,且其 $T_{V_{\max}}$ 分别只有 3,3 和 4 d,均明显早于利用其他碳源的处理。

代谢的,但是丙酸盐氧化的自由能变高于乙酸盐氧化^[18],这可能是 Fe(OH)₃ 还原过程中 3 种微生物群落利用乙酸盐提供电子的能力较利用丙酸盐高的原因所在。

丙酮酸盐是糖酵解途径的终产物。微生物体内的糖酵解途径并不受氧气的影响,是厌氧条件下生物体的主要获能形式之一。因此,丙酮酸盐是厌氧代谢时很活泼的一种中间代谢产物。本研究中,3 种微生物群落在 Fe(OH)₃ 还原条件下,均能很好的利用丙酮酸盐,说明了水稻土中异化 Fe(Ⅲ) 还原微生物在碳源利用上的共性。

从碳源利用情况可知,尽管相同浓度的琥珀酸盐中包含的碳原子数最多,但被铁还原微生物利用

的能力却低于其他有机酸。琥珀酸盐是 TCA 循环中的主要组分,厌氧条件下微生物体内的 TCA 循环遭到抑制,限制了微生物群落对琥珀酸盐的利用,说明在混合培养中,Fe(Ⅲ)还原微生物对碳源的利用具有选择性。

SC 从有机质含量丰富的四川土壤中富集得到,故而在有机物碳源充足的模拟试验条件下,其能迅速恢复到在原来生境中的反应活性,对各种有机酸盐的响应要显著大于其他微生物群落;JX 来自于有机质含量相对较贫瘠的江西水稻土,大部分属于贫营养微生物,故对底物的利用比较迟缓,在“高”浓度有机酸盐的环境中,其微生物活性可能受到一定的抑制。

4 结 论

1)来源于 3 种不同水稻土中的微生物在利用不同碳源进行 Fe(OH)₃ 还原时,Fe(Ⅱ)累积量变化存在着较大差异。来自四川水稻土的 Fe(Ⅲ)还原微生物对供试碳源物质均表现出较高的利用活性,其对应的 Fe(Ⅱ)最终累积量也较高;来自江西水稻土微生物群落中的 Fe(Ⅲ)还原微生物的生物活性很低,对供试碳源的响应很慢,几乎不能利用丙酸盐进行 Fe(OH)₃ 的还原;而吉林水稻土中的微生物群落在 Fe(OH)₃ 还原过程中几乎不能利用琥珀酸盐作为电子供体。

2)3 种水稻土的微生物均能较快地利用丙酮酸盐还原 Fe(OH)₃,说明 Fe(Ⅲ)还原微生物在碳源利用上的共性。3 种微生物在 Fe(OH)₃ 还原过程中对不同有机酸盐的利用程度不同,反映了其在微生物群落的组成、代谢和功能上存在差异。

[参考文献]

- [1] Cummings D E, Anyhony W M, Benjamin B, et al. Evidence for microbial Fe(Ⅲ) reduction in anoxic mining impacted lake sediments [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(1): 154-162.
- [2] Roh Y, Shi V, Liu G S, et al. Isolation and characterization of metal-reducing thermoanaerobacter from deep subsurface environment of the Piceance basin, Colorado [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(12): 6013-6020.
- [3] Finneran K T, Johnsen C V, Lovley D R. Rhodoferrax ferrireducens sp. nov., a psychrotolerant, facultatively anaerobic bacterium that oxidizes acetate with the reduction of Fe(Ⅲ) [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2003, 53: 669-673.
- [4] Kùsel K, Dorsch T, Acker G, et al. Microbial reduction of Fe(Ⅲ) in acidic sediments: isolation of acidiphilium cryptum JF-5 capable of coupling the reduction of Fe(Ⅲ) to the oxidation of

- glucose [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(8): 3633-3640.
- [5] Nevin K P, Finneran K T, Lovley D R. Microorganisms associated with uranium bioremediation in a high-salinity subsurface sediment [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(6): 3672-3675.
- [6] 贺江舟,曲 东,张莉莉. Fe(Ⅲ)的微生物异化还原 [J]. 微生物学通报, 2006, 33(5): 158-164.
He J Z, Qu D, Zhang L L. Dissimilatory Fe(Ⅲ) reduction by microorganism [J]. Microbiology, 2006, 33(5): 158-164. (in Chinese)
- [7] 曲 东, Schnell S. 纯培养条件下不同氧化铁的微生物还原能力 [J]. 微生物学报, 2001, 41(6): 744-749.
Qu D, Schnell S. Microbial reduction on ability of various iron oxides in pure culture experiment [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2001, 41(6): 744-749. (in Chinese)
- [8] 曲 东, Schnell S. 外源氧化铁对水稻土甲烷形成的抑制 [J]. 环境科学学报, 2002, 22(1): 65-69.
Qu D, Schnell S. Suppression of methanogenesis by iron oxides in paddy soil [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2002, 22(1): 65-69. (in Chinese)
- [9] 曲 东, 张一平, Schenell S, 等. 添加氧化铁对水稻土中 H₂、CO₂ 和甲烷形成的影响 [J]. 应用生态学报, 2003, 14(8): 1312-1316.
Qu D, Zhang Y P, Schnell S, et al. Effect of iron oxide addition on hydrogen, carbon dioxide and methanogenesis in paddy soil [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2003, 14(8): 1313-1316. (in Chinese)
- [10] 曲 东, 张一平, Schnell S, 等. 水稻土中铁氧化物的厌氧还原及其对微生物过程的影响 [J]. 土壤学报, 2003, 40(6): 858-863.
Qu D, Zhang Y P, Schnell S, et al. Reduction of iron oxide and its effect on microbial processes in an aerobic paddy soil [J]. Acta Pedologica Sinica, 2003, 40(6): 858-863. (in Chinese)
- [11] 曲 东, Schnell S, Conrad R. 外源氧化铁对水稻土中有机酸含量的影响 [J]. 应用生态学报, 2002, 13(11): 1425-1428.
Qu D, Schnell S, Conrad R. Effect of iron oxides addition on organic acids content in paddy soil [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2002, 13(11): 1425-1428. (in Chinese)
- [12] 曲 东, 谭中欣, 王保莉, 等. 外源物质对水稻土铁还原的影响 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2003, 31(4): 6-10.
Qu D, Tan Z X, Wang B L, et al. Effect of EDTA, fulvic acid and acetate addition on microbial iron reduction in paddy soils [J]. Journal of Northwest University of Agriculture and Forestry: Natural Science Edition, 2003, 31(4): 6-10. (in Chinese)
- [13] 曲 东, 曹 宁, 王保莉. 添加 EDTA 及黄腐酸对水稻土中有效磷浓度的影响 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2003, 31(3): 127-130.
Qu D, Cao N, Wang B L. Effect of EDTA, fulvic acid and iron oxides on available phosphate concentration in paddy soils [J]. Journal of Northwest University of Agriculture and Forestry: Natural Science Edition, 2003, 31(3): 127-130. (in Chinese)