

淞河流域底栖藻类生长特征研究

王 青, 曹金象, 裴国凤*

(中南民族大学生命科学院, 武汉 430074)

摘 要:为更全面地了解淞河流域生态系统的健康状况,于2012年初春测定了淞河干流及其主要支流的水体理化指标、底栖藻类叶绿素a(Chl a)含量和无灰干重(AFDM),同时测定了部分样点底栖藻垫的磷含量及形态组成。结果显示:淞河上游各支流及干流水体的总磷(TP)、总氮(TN)和化学需氧量(COD)分别为0.014~0.072、0.282~1.204、0.77~13.26 mg·L⁻¹,水质较好;流经市区的干流下游河段水体受到一定程度的污染,TP、TN和COD分别为0.214~0.252、2.039~2.748、9.09~16.48 mg·L⁻¹;就总氮、总磷的含量来看,样点S1到S15的水质为Ⅱ类水,S16~S20超过Ⅴ类。各支流底栖藻类Chl a的含量在6.6~16.1 μg·cm⁻²之间,而淞河干流样点为13.5~47.3 μg·cm⁻²,所有样点底栖藻类的AFDM(645~3050 μg·cm⁻²)和Chl a显著相关。底栖藻类对磷的滞留能力在一定范围内随水体营养浓度的增加而增强,下游底栖藻垫的总磷含量比上游高,最高可达82 μg·cm⁻²;底栖藻垫中的磷形态组成以铁结合态磷(Fe-P)为主,占总磷的34%~73%,说明Fe-P对底栖藻类-水界面的磷循环起着主要的作用。研究结果对提高水体监测的认识,加强淞河流域管理和完善淞河生态系统健康状况评价具有一定的参考价值。

关键词:底栖藻类;淞河流域;生物量;磷形态;水质

中图分类号:X522 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2015)03-0532-06 **doi:**10.11654/jaes.2015.03.016

Growth Characteristics of Benthic Algae in Gan River

WANG Qing, CAO Jin-xiang, PEI Guo-feng*

(College of Life Science, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

Abstract: To understand ecosystem health of Gan River, physical and chemical variables of the mainstream and tributaries of Gan River were measured in Spring, 2012. Meanwhile, chlorophyll a (Chl a) and ash-free dry mass (AFDM) of benthic algae at all sites were determined. Phosphorus concentrations and forms in benthic algae in several sites were also measured. Results showed that the water quality of the upper reaches of Gan River was better than that of the lower reaches. Total phosphorus (TP), total nitrogen (TN) and chemical oxygen demand (COD) of water in the upper reaches were 0.014~0.072 mg·L⁻¹, 0.282~1.204 mg·L⁻¹ and 0.77~13.26 mg·L⁻¹, respectively, while those in the lower reaches were respectively 0.214~0.252 mg·L⁻¹, 2.039~2.748 mg·L⁻¹ and 9.09~16.48 mg·L⁻¹. Based on TN and TP, the water quality in sites S1 to S5 belonged to Class II, while it exceeded Class V in sites S16 to S20. The contents of Chl a in benthic algae ranged from 6.6 μg·cm⁻² to 16.1 μg·cm⁻² for all tributaries and from 13.5 μg·cm⁻² to 47.3 μg·cm⁻² for the mainstream of Gan River. There was a significant correlation between AFDM (645~3050 μg·cm⁻²) and Chl a. In certain concentration ranges, higher concentrations of nutrients in river water led to higher phosphorus retention by benthic algae. The total phosphorus was up to 82 μg·cm⁻² at the lower reaches. Fe-P was a dominant form in benthic algae, accounting for 34%~73% of total phosphorus in all sampling sites. These findings would help assess ecosystem health and improve watershed-scale management of Gan River, China.

Keywords: benthic algae; Gan River basin; biomass; phosphorus forms; water quality

大量营养物质排入河流引起全球性水污染问题,有效的河流健康状况评价和管理方法成为研究者们

所关注的问题^[1-2]。治理水污染的关键是控制氮(N)、磷(P)等的输入,而最近国内外的研究表明,仅仅减氮不能控制浮游藻类生物量,反而会诱导固氮蓝藻水华,从而得出重点控制磷而放宽控制氮的结论^[3-4]。作为河流重要的初级生产者,底栖藻类(Benthic algae or periphyton)在生长过程中通过对磷的吸收、转化和储存作用成为水生生态系统的重要调节者^[5-6]。随着研究

收稿日期:2014-10-24

基金项目:国家自然科学基金(30970550);中央专项基金(CZW14003)

作者简介:王 青(1989—),女,硕士研究生,从事水生生态及污染研究。E-mail:576122117@qq.com

* 通信作者:裴国凤 E-mail:peigf@mail.scuec.edu.cn

的不断发展,人们认识到仅用水体理化指标来评价一条河流的健康状况是不够全面的。因此,结合水体理化指标和底栖藻类的生长,不仅可以了解水环境因子对底栖藻类的作用,还可以全面认识河流生态系统的综合状况。

淦河位于咸宁境内,发源于上游山区,流经农田和市区后注入斧头湖,最后从斧头湖汇入长江,其健康状况的好坏直接影响其下游及斧头湖的生态状况。然而,到目前为止,对于这种流域内土地利用方式不同,河流水体对底栖藻类生长影响的研究鲜有报道。为了更全面地了解淦河流域生态系统的健康状况,本研究测定了淦河流域主要支流及干流的水体理化指标,底栖藻类叶绿素 a(Chl a)和无灰干重(Ash free dry mass, AFDM),以及部分样点底栖藻类的磷含量及形态组成,分析不同河段底栖藻类对磷的负荷能力及各组分磷含量,为淦河流域底栖藻类生态学研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 采样点的设置

淦河流域位于长江中游南岸的湖北省咸宁市境内。据十好桥水文站多年实测资料统计,流域面积 854 km²,河长 76.6 km。流域地势南高北低,以马桥白鹤为界,以南为海拔 100 m 以上的山区,占整个流域面积的 59%,以北为海拔 100 m 以下的平原区,占整个流域面积的 41%。综合淦河流域的各支流和干流分布特点,设置 20 个采样点(图 1)。根据其地理位置、生态情况及土地利用格局,将上游所有支流及部分干流样点(S1~S15)视为上游河段,流经咸宁市区的样点(S16~S20)视为下游河段。上游样点为岩石性河床,水质较清澈,耕地密集,河流沿岸地带受到的污染主要为农业生产导致的面源污染、农药污染及农田径流和养分流失等。下游样点为淤泥性河床,水质较浑浊,居民生活用水及工业废水是其主要的污染源。

1.2 样品的采集及水质因子的测定

参照美国环保局(EPA)的方法^[7],于 2012 年 2 月在每个样点取样 3 份,每份随机选取 3~5 块该区域内底栖藻类生长的主要天然基质(石块)^[8],置于冰盒内带回实验室立即处理。同时测定水温(WT)、溶解氧(DO)、电导率(EC)和 pH 值,并用塑料瓶采集约 500 mL 水样,加几滴硫酸保存剂带回实验室,按照《水和废水分析监测方法》^[9]测定 TN、TP 和化学需氧量

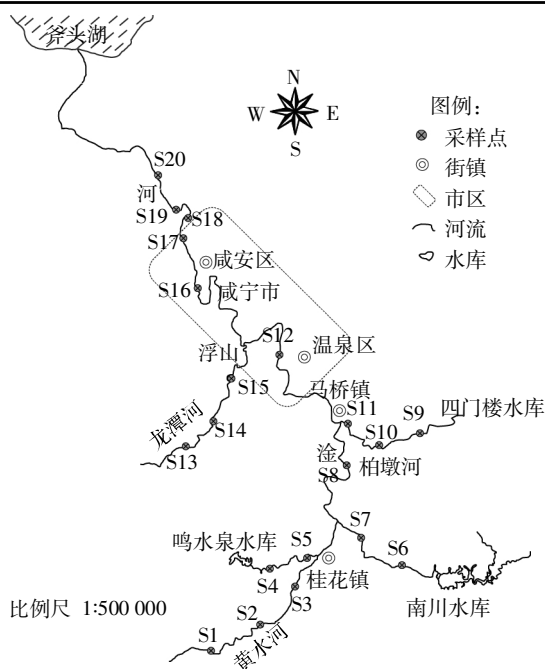


图 1 咸宁市淦河样点位置图

Figure 1 Sampling sites in Gan River basin in Xianning City

(COD)等水化学指标。

1.3 底栖藻类样品的处理

用硬毛牙刷将石块基质表面的底栖硅藻样品洗下并记录总体积,分成 3 份:一份用 90%的丙酮溶液提取 Chl a,一份用于测定 AFDM,方法参考 APHA^[10];一份用于测定 5 个有代表性样点(上游 S4、S7、S8,下游 S18、S19)底栖藻类的总磷含量和磷形态组成。各组分磷含量的提取方法参照欧洲标准测试委员会框架下发展的淡水沉积物磷形态连续分离的 SMT 法^[11],将底栖藻类中所提取到的磷分为 5 种形态,即总磷(Total phosphorus, TP)、无机磷(Inorganic P, IP)、有机磷(Organic P, OP)、铁结合态磷(Iron-bound P, Fe-P)和钙结合态磷(Calcium-bound P, Ca-P),其单位均为 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ 。

1.4 数据处理与分析

数据计算与处理使用 Excel 2003;相关性分析使用统计软件 SPSS 19.0 进行;作图工具使用 Coreldraw X3 及 Photoshop CS5 等软件。

2 结果与分析

2.1 水环境因子

如表 1 所示,初春季节采样点水温变化范围在 10.3~15.8 °C。水体的 pH 值在 7.92~8.84 之间变化,波动不大,其下游 pH 值呈下降趋势,低于上游各样点的值。DO 在 8.5~19.8 mg·L⁻¹ 之间波动,淦河下游

表 1 淦河各采样点水质指标
Table 1 Water quality of different sites in Gan River

样点	WT/℃	pH	DO/mg·L ⁻¹	EC/μS·cm ⁻¹	COD/mg·L ⁻¹	TN/mg·L ⁻¹	TP/mg·L ⁻¹	N/P
S1	10.3	8.30	10.9	241	4.44	0.583	0.036	16.2
S2	11.4	8.44	11.5	220	2.57	0.379	0.028	13.7
S3	10.3	8.22	11.4	203	5.55	0.456	0.014	32.6
S4	12.1	8.17	11.3	308	2.33	0.282	0.014	20.1
S5	11.4	8.21	12.9	190	0.77	0.320	0.017	19.2
S6	12.4	8.24	15.7	368	12.4	1.204	0.020	61.7
S7	11.7	8.23	14.8	379	2.61	0.350	0.033	10.5
S8	12.5	8.54	15.1	331	5.25	0.476	0.033	14.3
S9	12.4	8.24	13.6	285	41.41	0.359	0.020	18.4
S10	12.8	8.50	14.1	275	31.99	0.447	0.033	13.5
S11	12.1	8.62	12.7	279	14.44	0.447	0.025	17.9
S12	12.3	8.38	13.1	370	13.26	0.437	0.047	9.3
S13	15.6	8.84	19.8	260	5.45	0.544	0.041	13.1
S14	15.8	8.54	15.2	278	7.84	0.544	0.072	7.6
S15	13.9	8.56	18.4	345	10.77	0.641	0.047	13.7
S16	13.1	8.05	11.2	455	16.48	2.282	0.214	10.7
S17	14.2	8.23	12.2	430	14.08	2.311	0.214	10.8
S18	13.0	8.05	9.9	452	10.28	2.748	0.252	10.9
S19	13.2	8.10	11.0	440	13.34	2.534	0.241	10.5
S20	13.3	7.92	8.5	467	9.09	2.039	0.250	12.2

S16~S20 样点的 DO 值呈下降趋势。各支流间 EC 的差别比较明显,黄水河样点的均值最小,为 221.3 μS·cm⁻¹,其次是鸣水泉河、龙潭河、柏墩河和南川河,而淦河下游 S16~S20 样点相对较高,均值为 448.8 μS·cm⁻¹。

COD 在各样点间的差异较大,各支流样点除柏墩河 COD 较高外,其他样点普遍较低,在 0.77~7.84 mg·L⁻¹ 范围内波动,干流下游样点 COD 值较高,在 9.09~16.48 mg·L⁻¹ 范围内波动。水体 TP 从样点 S1 到 S15 变化不大,然而在淦河下游 S16~S20 样点的 TP 含量急剧上升,是其上游的 10~20 倍。TN 的含量变化

与 TP 的变化趋势相似,下游 5 个样点的 TN 含量明显高于上游。除 S3、S6 和 S14 外,其他各样点的氮磷比(N/P)均在 9~20 之间,其中上游各支流 N/P 的平均值高于下游样点。

2.2 底栖藻类的生物量

用 Chl a 和 AFDM 两个参数评价底栖藻的生物量。在各样点之间,底栖藻类群落 Chl a 和 AFDM 的含量变化趋势一致(图 2)。Chl a 在各支流样点的变化表现为:黄水河和鸣水泉河支流各样点的 Chl a 含量在 10.94~15.93 μg·cm⁻² 范围内波动,南川河的 S7 样点底栖藻类的生物量约为 S6 样点的 2 倍;柏墩河自

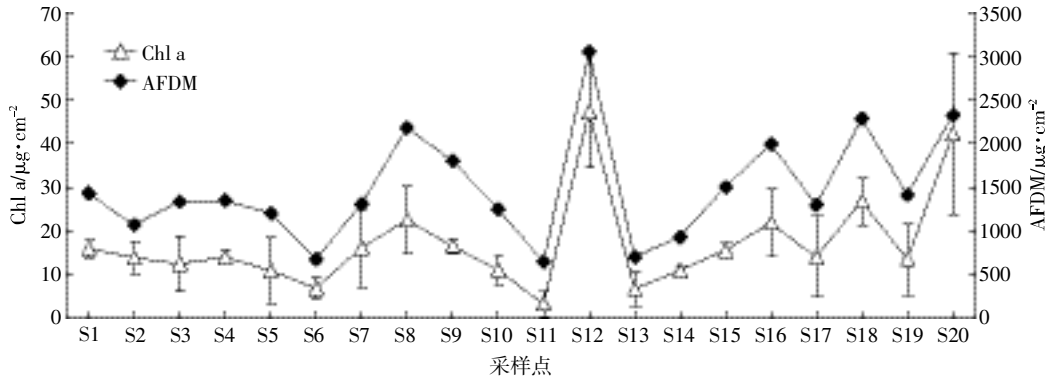


图 2 各样点底栖藻群落的生物量

Figure 2 Biomass of benthic algae at different sampling sites

上而下3个样点(S9~S11)的生物量呈下降趋势;而龙潭河3个样点(S13~S15)呈上升趋势;相对来说,淞河干流的各样点波动较大,最大值在S12样点达到 $47.3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ 。总体来看,上游各支流 Chl a 的均值在 $10.2\sim 14.1 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ 变动,而下游5个样点的均值为 $23.7 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ 。

2.3 底栖藻类磷含量及其形态组成

所测样点的各磷组分含量结果见图3。5个样点底栖藻垫中磷浓度变化与水体COD和TP的变化趋势一致(表1),随着水体营养程度的变化,底栖藻类的磷含量也发生变化,上游的3个样点S4、S7、S8总磷含量逐渐上升(S4、S7、S8分别为 $10、12、22 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$),在市区的S18样点达到最高值($82 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$),而市区下游S19样点的总磷含量有所降低。同时,底栖藻垫中磷浓度变化与生物量浓度变化基本一致,即生物量越高磷含量越高,而且随着河流上游至下游水体污染程度逐渐严重,虽然生物量浓度没有显著增加(图2),但底栖藻类的磷滞留能力(TP/Chl a 比值)却在上升。下游底栖藻垫单位生物量的磷滞留能力平均值比上游高。

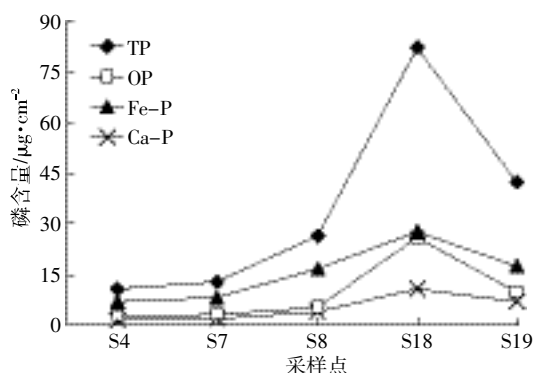


图3 底栖藻类各磷形态含量

Figure 3 Contents of P forms in benthic algae

底栖藻垫中总磷主要成分是无机磷,而无机磷主要由铁结合态磷和钙结合态磷组成,两者占无机磷的比例达85%~97%;不同磷形态占总磷的百分含量不同,其中铁结合态磷含量最高,达总磷的34%~73%,钙结合态磷占13%~18%;与无机磷相比,有机磷占总磷比例较小,为23%~32%(图4)。

3 讨论

河流对人类的生存和发展极为重要,有着众多的生态功能,长期以来注重经济发展的同时,却忽视了由此造成的环境污染。实验期间,淞河水质随土地利

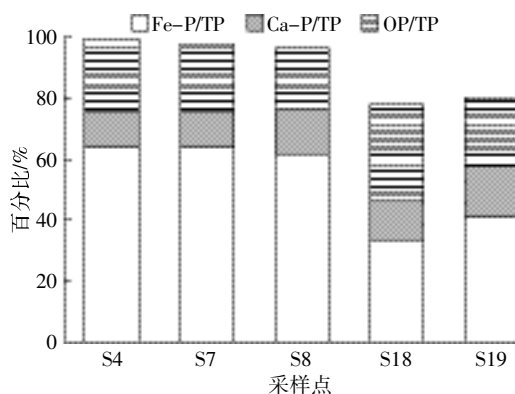


图4 底栖藻类各磷形态占总磷的比例

Figure 4 Percentages of each P-fraction to TP in benthic algae

用格局的不同,变化较为明显,以森林、农业生产为主的上游各支流及干流水质较好,而流经市区后受生活污水及工业废水污染的干流下游段水质急剧下降,水体受到一定程度的污染,水质恶化。

针对氮磷比和藻类 Chl a 的关系,不少研究人员通过比较不同氮磷比下 Chl a 的变化来分析藻类生长的限制类型。Smith^[12](TN/TP:10~17)、Redfield 定律^[13](TN/TP:10~20)、Steven wang^[14](TN/TP:9~20)等分别给出了3种不同的TN/TP阈值判断是否N、P共同限制。在所有样点中,除了S3和S6样点流经刚施用氮肥的农田导致氮磷比超过30,以及S14样点有养鸭排泄物使氮磷比小于9以外,其他各样点均在9~20之间(表1),均在N、P共同限制的范围内,据此可推断淞河流域底栖藻类的生长应该属于氮磷共同限制型。在今后的调查中,氮因子也应得到更多关注。不过,氮磷比在同一水平内时,下游的TN和TP含量是上游的10~20倍左右,其底栖藻类 Chl a 的含量是下游的2倍左右。

Chl a 和AFDM都可以反映底栖藻类群落的现存量^[15],但 Chl a 侧重反映整个自养生物——光合藻类,而AFDM还包括其他底栖生物(如细菌、底栖动物)和沉淀下来的有机碎屑等^[16]。实验期间,发现各样点的AFDM和Chl a变化趋势非常一致,差异较小($r=0.9505$),表明各样点群落中的有机物碎屑和异养生物所占比例非常小,因而用AFDM和Chl a都能较好地评价淞河流域底栖藻类群落的生物量。

底栖藻类对磷的滞留机理十分复杂^[17],从淞河流域上游底栖藻类滞留磷的浓度与下游相比看来,水体污染程度越高,底栖藻类生物量相对越高,滞留磷的能力也越强。Portielje等^[18]的研究表明,单位干重底栖

群落的最大储磷能力和外部的营养负荷水平呈正相关,当水体中的可利用磷在一定范围内增加时,一些藻类吸收和储存磷的能力也会加强,说明底栖藻类对水体中磷的滞留能力与水体营养浓度正相关。另一方面,底栖藻类在生长过程中吸收水体中的可溶性磷酸盐组成自身有机体,将磷滞留在生物体中,加速了磷的流动^[19]。本研究中,淦河流域底栖藻类对磷的滞留能力最高可达 $82 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$,底栖藻类的吸磷起到了缓冲剂的作用,这种缓冲能力可以使污染区域的可溶性磷浓度降低到较低的水平。同时,覆盖在沉积物表面的底栖藻类,能截获底泥和基质中释放的磷,减缓了水体中磷含量的增加^[20]。我们也观察到,河床上生长着丰富的丝状绿藻,经光学显微镜观测发现其上附着大量的硅藻种类。这对降低水体的营养程度、稳定生态系统和水生高等植物的恢复等具有十分重要的作用。底栖藻垫中不同磷形态占总磷的百分比与其他文献报道的结果相近^[21],Fe-P 所占比例最高,该部分磷易释放、易为生物所利用^[22],对底栖藻类-水界面的磷循环起着主要的作用。有机磷占总磷比例为23%~32%,有研究表明,50%~60%的OP可被降解或水解为生物可利用的磷形态^[23],底栖藻垫中的OP在河流生态系统中也可能发挥着重要作用。

4 结论

(1)水体TN、TP、COD和EC的结果显示淦河流域上游各支流及干流河段水质较好,流经市区后的下游河段受到一定程度的污染,就TN、TP的含量来看,样点S1到S15的水质为Ⅱ类水,样点S16~S20的水质超过了V类。

(2)底栖藻类Chl a和AFDM有显著的相关性,都可作为评价淦河流域底栖藻类群落生物量的参数。

(3)底栖藻类对磷的滞留能力在一定范围内随水体营养程度的升高而增强,底栖藻类的磷滞留作用对污染的水体起到一定的缓冲作用。

参考文献:

- [1] 王朝晖,胡 韧,谷阳光,等.珠江广州河段着生藻类的群落结构及其与水质的关系[J]. 环境科学学报, 2009, 29(7): 1510-1516.
WANG Zhao-hui, HU Ren, GU Yang-guang, et al. Community structures of periphytic algae in the Guangzhou reaches of the Pearl River and their relationship to water quality[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2009, 29(7): 1510-1516.
- [2] Gemma U, Sergi S. Epilithic diatom assemblages and their relationship to environmental characteristics in an agricultural watershed (Guadiana River, SW Spain) [J]. *Water Ecological Indicators*, 2009, 9: 693-703.
- [3] 王海军, 王洪铸. 富营养化治理应放宽控氮、集中控磷[J]. 自然科学进展, 2009, 19(6): 599-604.
WANG Hai-jun, WANG Hong-zhu. Eutrophication control should relax control nitrogen and focus on phosphorus control[J]. *Natural Science Development*, 2009, 19(6): 599-604.
- [4] 周 涛, 李正魁. 太湖浮游植物与营养盐相互关系[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(2): 327-332.
ZHOU Tao, LI Zheng-kui. The relationship between phytoplankton and nutrients of Lake Taihu, China[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 32(2): 327-332.
- [5] Liboriussen L, Jeppesen E. Structure, biomass, production and depth distribution of periphyton on artificial substratum in shallow lakes with contrasting nutrient concentrations[J]. *Freshwater Biology*, 2006, 51(1): 95-109.
- [6] 顾新跃, 何 月, 张秀青, 等. 底栖藻类-苦草对猪粪废水中营养物质的去除效果[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(8): 1625-1630.
GU Xin-yue, HE Yue, ZHANG Xiu-qing, et al. Nutrient removal rates from wastewater using benthic algae: *Vallisneria spiralis* [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2014, 33(8): 1625-1630.
- [7] Lazorchak J M, Klemm D, Peck D V. Environmental monitoring and assessment program—surface waters: Field operations and methods for measuring the ecological condition of Wadeable Streams[R]. EPA/620/R-94/004F, 1998: 119-132.
- [8] 吴乃成, 唐 涛, 黎道丰, 等. 雅砻江锦屏段及其主要支流底栖藻类群落与环境因子的关系[J]. 生态学报, 2009, 29(4): 1697-1702.
WU Nai-cheng, TANG Tao, LI Dao-feng, et al. Relationship between the Yalong River and its main tributaries of Jinping section of benthic algal communities and environmental factors[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(4): 1697-1702.
- [9] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
State Environmental Protection Administration of China. Water and wastewater monitoring analysis method[S]. Fourth edition. Beijing: Chinese Environment Science Press, 2002.
- [10] APHA. Standard methods for the examination of water and waste water (19th Edn) [M]. Washington DC: American Public Health Association, 1995.
- [11] Ruban V, López-Sánchez J F, Pardo P, et al. Harmonized protocol and certified reference material for the determination of extractable contents of phosphorus in freshwater sediments: A synthesis of recent works[J]. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 2001, 370(3): 224-228.
- [12] Smith V H. Cultural eutrophication of inland, estuarine, and coastal waters [M]//Pace M L, Groffman P M. Successes, limitations and frontiers in ecosystem science. New York: Springer-Verlag, 1998: 7-49.
- [13] 丰茂武, 吴云海, 冯仕训, 等. 不同氮磷比对藻类生长的影响[J]. 生态环境, 2008, 17(5): 1759-1763.
FENG Mao-wu, WU Yun-hai, FENG Shi-xun, et al. Effects of different nitrogen and phosphorus ratio on the growth of algae[J]. *Ecology and Environment*, 2008, 17(5): 1759-1763.

- [14] Steven W, Andrew R D, William W S, et al. Variability of nutrient limitation on phytoplankton growth in small and medium Kansas Lakes[M]. University of Kansas Press, 2005.
- [15] Biggs B J F. Effects of sample storage and mechanical blending on the quantitative analysis of river periphyton[J]. *Freshwater Biology*, 1987, 18(2): 197–203.
- [16] 裴国凤, 刘梅芳. 武汉东湖底栖藻类在不同基质上生长的比较[J]. 湖泊科学, 2009, 21(3): 357–362.
- PEI Guo-feng, LIU Mei-fang. The compare of benthic algae growth on different substrates in Wuhan East Lake[J]. *Lake Science*, 2009, 21(3): 357–362.
- [17] Amirbahman A, Lake B A, Norton S A. Seasonal phosphorus dynamics in the surficial sediment of two shallow temperate lakes: A solid-phase and pore-water study[J]. *Hydrobiologia*, 2013, 701(1): 65–77.
- [18] Portielje R. Kinetics of luxury uptake of phosphate by algae dominated benthic communities[J]. *Hydrobiologia*, 1994, 275(1): 349–358.
- [19] Dodds W K. The role of periphyton in phosphorus retention in shallow freshwater aquatic system[J]. *Journal Phycology*, 2003, 39(5): 840–849.
- [20] 裴国凤, 刘国祥, 胡征宇. 武汉东湖底栖藻类对磷的滞留作用[J]. 环境科学学报, 2009, 29(4): 840–845.
- PEI Guo-feng, LIU Guo-xiang, HU Zheng-yu. Effects of benthic algae on retention of Wuhan East Lake phosphorus[J]. *Journal of Environmental Science*, 2009, 29(4): 840–845.
- [21] Joseph M M, Kumar C S R, Renjith K R, et al. Phosphorus fractions in the surface sediments of three mangrove systems of southwest coast of India[J]. *Environmental Earth Science*, 2011, 62(6): 1209–1218.
- [22] McCormick P V, Shuford R B E, Chimney M J. Periphyton as a potential phosphorus sink in the Everglades Nutrient Removal Project[J]. *Ecological Engineering*, 2006, 27: 279–289.
- [23] Rydin E. Potentially mobile phosphorus in Lake Erken sediment[J]. *Water Research*, 2000, 34(7): 2037–2042.