文章编号: 1673-1689(2010)03-0359-06

纳米银对海参腐败中优势菌种的抑制作用

李新林, 段续, 张慜*
(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 目前常用的海参干燥方法为水发和盐发, 但是此类方法所得海参品质极低。现在为得到高品质海参产品, 多采用真空冷冻干燥, 但是真空冷冻干燥时间较长, 微生物难于控制。采用液相化学还原法制备纳米银, 然后将海参腐败过程中优势菌进行分离纯化, 研究了纳米银对海参腐败中优势菌, 以及海参中所有菌的抑制作用。结果表明, 浓度在中华人民共和国国家标准– 生活饮用水 卫生标准最大允许量(0.05 mg/L)以下的纳米银与海参腐败中优势菌株, 或海参腐败中所有菌作用 12h 后, 能杀灭 80% 左右的细菌。

关键词: 纳米银; 优势菌; 分离纯化; 杀菌
中图分类号: TS 205 文献标识码: A

Study on the Preparation and Sterilization of Silver Nanoparticles to the Ascendent Bacterium Within the Putrid Sea Cucumber

LI Xin-lin, DU AN Xu, ZHANG Min*
(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In order to overcome the shortcomings of the methods including water-drying, salt-drying and vacuum freeze-drying, this study firstly prepared the silver nanoparticles by chemical reduction in liquid phase, than separated the corruption bacteria from the sea cucumber,. Based on the above results, the sterilizing effect of the silver nanoparticles on the corruption bacteria and on the all microorganisms in the putrid sea cucumber were carefully investigated. It was demonstrated that 0.05 mg/L silver nanoparticles can efficiently sterilize 80% bacterium after 12 h treatment.

Key words: silver nanoparticles, ascendent bacterium, separating, sterilization

目前纳米技术和纳米银材料的科学价值和应用前景已逐渐被人们认识, 纳米材料的制备已经逐渐完善[1]。一些纳米材料的制备技术已经相当成熟, 开始走向工业化生产, 许多商品化的纳米产品已经被应用到了许多领域[2-3]。纳米银既具有纳米材料的异于普通材料的光, 电, 磁, 热, 力, 机械等性

收稿日期: 2008-12-15
基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA09Z430)。
* 通信作者: 张慜(1962–) 男, 浙江平湖人, 工学博士, 教授, 博士生导师. 主要从事农产品加工研究。Email: min@jiangnan.edu.cn

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

能特性,又具有银本身的一些特性:广谱抗菌、杀菌效率高、不易产生抗药性、安全性高等特点,另外,银粒子的抗菌作用有持续性,银粒子在杀灭细菌,从细菌中渗出后还可以继续作用于其他细胞[4-5]。因此,含银或银离子的抗菌剂已经成为商品化无机抗菌剂研究的重要方向[6]。

海参(Sea Cucumber)属棘皮动物门、海参纲、盾手目动物[7]。全世界已知的海参有1 100多种,其中可食用海参40多种。海参是不含胆固醇的动物性食品,且其体内含有丰富的生理活性物质,具有极高的营养价值[8]。海参的高营养,高蛋白,使得其极易滋生微生物而腐败,另外海参离开海水后还会因为自身酶作用而发生自溶,所以新鲜海参的保藏极其困难,目前市场上出售的海参多为水发或盐发产品,此类海参产品的生理活性物质及其他营养物质基本消失殆尽[9]。为得到高品质海参产品,现在多采用真空冷冻干燥,但是真空冷冻干燥时间较长,微生物难于控制。因此,纳米银用于海参加工具有非常大的现实意义和应用前景。

目前,纳米银抗菌剂被广泛应用到建筑材料、陶瓷制品及纤维、塑料、涂料、医疗卫生等诸多领域[10]。在食品行业中关于纳米银的报道多为保鲜膜的研制,而作为食品防腐剂直接添加到食品上的研究[11],纳米银涂膜技术的研究都比较少。中华人民共和国国家标准-生活饮用水卫生标准(GB 5749—2006)中规定,饮用水中银的含量不得超过0.05 mg/L,将纳米银配成质量浓度在0.05 mg/L以下的水溶液,然后在海参真空冷冻干燥前进行纳米银涂膜,可以很好的抑制海参真空冷冻干燥过程中的微生物生长。本文采用液相化学还原法配制纳米银溶胶[12-13],然后研究了质量浓度为0.045 mg/L纳米银水溶液对海参腐败时所有菌及优势菌的抑制作用,为纳米银涂膜技术提供理论依据,也为纳米银在食品加工,贮藏保鲜等方面的进一步应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

冷冻鲜海参:江苏无锡朝阳市场购买;营养琼脂(生化试剂)、氯化钠、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、次亚磷酸钠、六篇磷酸钠、碱性复红、番红、结晶紫、草酸铵、碘、碘化钾、甲醛、孔雀绿、丙酮、黑素、石碳酸、单宁酸、$FeCl_3 \cdot 6H_2O$等试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

SPX型智能生化培养箱:南京实验仪器厂制造;101-1-BS型干燥箱:上海跃进医疗器械厂制造;SW-CJ-1B型无菌操作台:苏净集团安泰公司制造;ZDX-35BI型座式自动电热压力蒸汽灭菌器:上海申安医疗器械厂生产;HJ-3恒温磁力搅拌器:江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司生产;Nano-Zs90型纳米粒度及Zeta电位分析仪:英国Malvern公司生产;UV-2102PCS型紫外可见分光光度计:尤尼科(上海)有限公司生产;KFLOW型纯水机:凯佛隆公司生产。

1.3 实验方法

1.3.1 纳米银制备

1)硝酸银溶液配制:称取1.70 g $AgNO_3$溶于20 mL超纯水中配成Ag^+溶液,在47 ℃水浴中预热。

2)还原液的配制:分别称取1.20 g $NaH_2PO_2 \cdot H_2O$、0.25 g六偏磷酸钠、2.70 gPVP,混合后溶于125 mL超纯水中,搅拌使其完全溶解,然后移入500 mL的三角瓶中,加入2.5 mLH_2SO_4(c=1.0 mol/L)。

3)将还原液置于恒温磁力搅拌器上高速搅拌,温度调至47 ℃,然后将Ag^+溶液移入分液漏斗,以1.5~2.5滴/s的速度加入到还原液中。

4)滴加完成后,在继续高速搅拌60~90 min,即得到墨绿色(偏黑)纳米银溶胶。

5)中华人民共和国国家标准-生活饮用水卫生标准(GB 5749—2006)中规定,饮用水中银的含量不得超过0.05 mg/L,为避免海参涂膜后银含量超标,将纳米银用无菌超纯水配制成浓度为0.045 mg/L的纳米银水溶液。以下所有实验中所用纳米银水溶液浓度均为0.045 mg/L。

1.3.2 纳米银的表征

1)紫外-可见分光光度法:取合适浓度的纳米银进行紫外-可见分光光度计全波扫描。

2)纳米粒度分析:取合适浓度的纳米银进行粒径分析仪分析。

1.3.3 优势菌种的分离纯化及其基本生物学特征鉴定

1)优势菌种的分离纯化 ①海参的变质:将买得的冷冻鲜海参温水解冻,置于干净烧杯内,杯底留有少许水分,水分体积约占海参体积1/3,放置在25℃生化培养箱中3~5d,当烧杯内海参80%腐败成糊状时取样。②涂布:称取25 g腐烂成糊状的海参于500 mL干净灭菌三角瓶内,加入0.85%灭菌生理盐水225 mL,分振荡使之均匀,然后系列稀释至合适浓度,再取合适浓度的细菌稀释液0.2

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

mL 涂布平板。待菌液凉干后置于生化培养箱内培养, 温度 37℃, 培养 48 h。③计数与划线: 涂布平板培养 48h 后, 将平板上菌落分类计数, 确定优势菌菌落, 然后挑取的优势菌单菌落划线。将划线平板置于生化培养箱内培养, 温度 37℃, 培养 24h. ④保种: 挑取划线平板上单菌落, 接种于斜面培养基, 置于生化培养箱内培养, 温度 37℃, 培养 24 h. 然后置于 4℃冰箱保存备用。

2) 优势菌种基本生物学特征鉴定　①简单染色: 先将细菌制片, 然后用碱性复红染色液染色, 最后镜检。②革兰氏染色: 首先将细菌制片, 然后染色, 染色过程是细菌先经结晶紫着色, 然后用媒染剂碘液处理, 再用酒精脱色, 最后用番红复染。待所有完成后镜检。③细菌芽孢染色: 细菌先用石碳酸复红液着色, 然后制片, 再用丙酮酒精脱色, 最后用 5%的孔雀绿复染。待所有完成后镜检。④细胞荚膜染色: 首先制片, 然后用石碳酸复红液着色, 再用 Dorner 黑素液均匀涂布载玻片, 最后镜检。⑤细菌鞭毛染色: 先将细菌菌液在载玻片上制成 2~ 3 条菌液带, 然后用费氏及康氏鞭毛染色液 A 染色, 倾去 A 液, 加费氏及康氏鞭毛染色液 B 液染色 10 min, 然后用齐氏石碳酸复红染色, 晾干后镜检。

1.3.4　*纳米银溶液对不同稀释度菌液的杀菌效果*

1) 取不同稀释度的细菌稀释液与相同体积浓度为 0. 045 mg/ L 纳米银水溶液作用相同时间

2) 然后各取 1 mL 细菌纳米银混合液浇注平板, 待平板凝固后置于生化培养箱内培养, 温度 37℃, 48 h 观察结果。

1.3.5　*作用时间与纳米银杀菌效果的关系*

1) 取合适稀释度的细菌稀释液与浓度为 0. 045 mg/ L 的纳米银水溶液作用, 时间分别为 0 min、30 min、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h, 同时用无菌水与细菌稀释液作用为对照。

2) 作用到规定时间后浇注平板, 待平板凝固后置于生化培养箱内培养, 温度 37 ℃, 48 h 观察结果。

1.3.6　*纳米银对海参腐败中所有菌的杀菌效果*

1) 同 1. 3. 2 中 2) 方法获得合适浓度细菌稀释液, 然后取合适稀释度的细菌稀释液各 1 mL 于 9 mL 质量浓度为 0. 045 mg/ L 的纳米银水溶液中, 得到纳米银溶液稀释的细菌菌液, 作用 12 h。对照为各取 1 mL 相应浓度的细菌稀释液于 9 mL 无菌水中。

2) 12 h 后取合适稀释度的细菌稀释液各 1 mL 浇注平板, 每一稀释度做 2 个平行。待平板凝固后置于生化培养箱内培养, 温度 37 ℃, 48 h 观察结果。

1.3.7　*纳米银分别对海参腐败中优势单菌株的杀菌效果*

1) 将斜面培养基上的菌株挑出, 划线, 置于生化培养箱内培养, 温度 37 ℃, 培养 24 h.

2) 挑取划线平板上单菌落于 1 mL 生理盐水中, 系列稀释至合适浓度。

3) 取合适稀释度的细菌稀释液各 1 mL 分别加入 9 mL 浓度为 0. 045 mg/ L 的纳米银水溶液中, 作用 12 h。对照为各取 1 mL 细菌稀释液于 9 mL 无菌水中。

4) 取合适稀释度的细菌稀释液各 1 mL 浇注平板, 每一稀释度做 2 个平行。然后置于生化培养箱内培养, 温度 37℃, 48 h 后观察结果。

2　结果与讨论

2.1　纳米银表征结果

2.1.1　*纳米银溶液的紫外– 可见吸收光谱*　图 1 显示最大吸收峰在 400 nm, 与文献报道过的纳米银溶胶吸收峰相近。吸收峰的位置随粒径的增大而向长波移动。这种红移现象与纳米银和其周围介质的介电常数的差值有关, 绝对差值越大, 红移越大。

2.1.2　*纳米银的粒度分布*　粒度分析仪结果见图 1~ 3。图 2 最高吸收峰为 42. 25 nm, 粒子平均直径为 65. 34 nm。图 3 最高吸收峰为 47. 29 nm, 粒子平均直径为 67. 77 nm。纳米银溶胶静置 7d 后, 颜色、亮度都没有变化, 也没有有沉淀产生, 从图中可以看出, 纳米银溶胶在放置 7 d 后, 纳米银粒子直径也基本没有变化。放置更长时间后, 纳米银溶胶的颜色、亮度和沉淀情况都没有明显变化, 预计纳米银的粒子直径也变化不大, 此方法所得纳米银溶胶的稳定性很好。

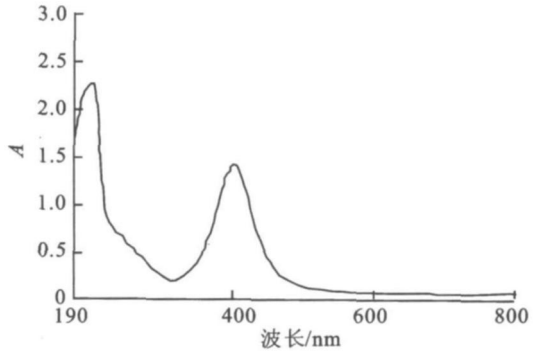


图 1　纳米银溶液的紫外可见光谱

Fig. 1　Typical UV-VIS absorption spectrum of the solution of silver nanoparticles

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

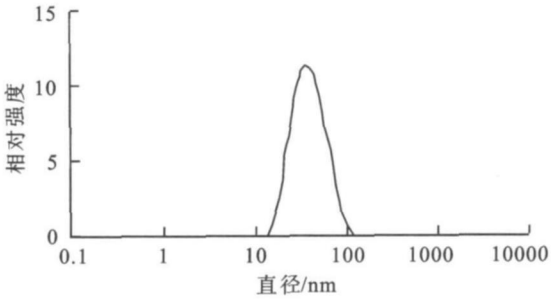


图 2 静置 1d 后的纳米银微粒粒度分布图

Fig. 2 Size distribution of silver nanoparticles on the first day

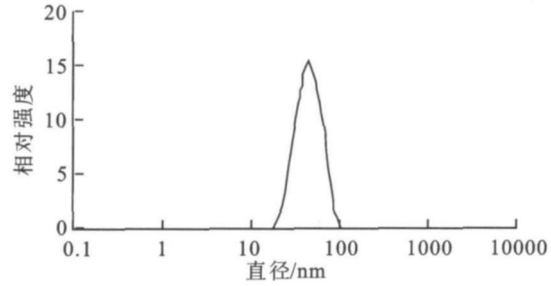


图 3 静置 7d 后纳米银微粒粒度分布图

Fig. 3 Distribution of silver nanoparticle size on the seventh day

2 2 优势菌种分离纯化及其基本生物学特征鉴定

2 2. 1 优势菌种分离纯化 海参腐烂是由多种细菌共同作用的结果。海参腐烂过程中细菌数目最多的菌株为优势菌种,纳米银如果对海参腐败时优势菌种的有很好的抑制作用,那么也从侧面反应了纳米银在海参涂膜中的抑菌作用。海参腐败过程中优势菌种分离纯化结果见表 1,其中稀释度为 10^{10}。

从表 1 可以看出,菌 1,菌 2 总数目占细菌总数的 80% 以上,这两种细菌在海参腐败过程中数目最多,是腐败时的优势菌种。这些细菌的菌落形态见表 2。

表 1 海参腐败过程中优势菌种分离纯化结果

Tab. 1 Results of separating of the ascendant bacterium from the putrid sea cucumber

菌落种类	菌 1	菌 2	其他	总菌落
数目 (cfu/mL)	60±8	105±12	36±5	201±9
比率/%	29.9% ±3.9	52.1% ±5.9	17.9% ±2.5	

表 2 优势菌菌落形态

Tab. 2 The form of colony of the ascendant bacterium

	形状	颜色	突起	表面	边缘
菌 1	圆形	乳白	凸起	光滑湿润	圆整
菌 2	圆点状	乳白	高隆起	光滑湿润	圆整

2 2. 2 优势菌种基本生物学特征 菌 1: 球型; 革兰氏阳性; 无芽孢; 有荚膜; 无鞭毛。菌 2: 杆状; 革兰氏阴性; 无芽孢; 无荚膜; 无鞭毛。

2 3 菌液与纳米银最适体积比的测定结果

我国国家标准-生活饮用水卫生标准中规定银的含量不能超过 0. 05 mg/L,实验中所用纳米银浓度为 0. 045 mg/L,为确定在此浓度下,纳米银与菌液的最适体积比,把相同体积的纳米银与不同浓度的细菌稀释液作用。作用结果见表 3。

表 3 菌液与纳米银溶液最适体积比测定结果

Tab. 3 The optimum volume ratio of bacterium and silver nanoparticles

稀释度	10^6	10^7	10^8
对照 (cfu/mL)	多不可计	276±12	47±5
纳米银作用 (cfu/mL)	多不可计	54±5	5±1

表 3 中 10^6, 10^7, 10^8为一定浓度的菌液与纳米银水溶液混合后,菌液的最终稀释度,在稀释度为 10^7 时,杀菌率为 (276-54) × 10^7/276 × 10^7 × 100% = 80. 4%,在稀释度为 10^8时,杀菌率为 (47-5) × 10^8/47 × 10^8 × 100% = 89. 3%。由此可见,纳米银相对菌液的体积越大,杀菌效果越好,但是国标-菌落总数测定中规定计数取每个平板上菌落数目在 30~ 300 的计数,所以在确保平板上菌落数目在 30 以上时,纳米银相对菌液还未饱和,在确保每平板菌落数目在 30 以上的基础上纳米银相对菌液体积越大,杀菌效果越好。

2 4 纳米银溶液对不同稀释度菌液的杀菌效果

为确定在 0. 045 mg/L 浓度下,纳米银杀菌的最适作用时间,现取稀释了 10^{10} 的海参腐败时所有菌菌液与相同体积的纳米银水溶液作用,作用至相应的时间后,再浇注平板,菌落计数。作用时间分别为 0 min、30 min、1、3、6、12、24 h。结果见图 4。从图中可以看出,作用开始至 12 h 内,菌落数目下降较快,作用从 12 h 至 24 h 内,落落数目降低很少,由此可见,此浓度下的纳米银与菌液的最适作用时间为 12 h 左右。

实验中用无菌水做对照的目的是排除渗透压对细菌死亡率的影响。浓度为 0. 045 mg/L 纳米银水溶液中有高分子的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和一些其他无机离子的存在,其渗透压一定比用去离子水灭菌所得无菌水的渗透压大,因此在不清楚纳米银水溶液渗透压具体值的条件下,用无菌水做对照,参照对照算出的杀菌率更加真实。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

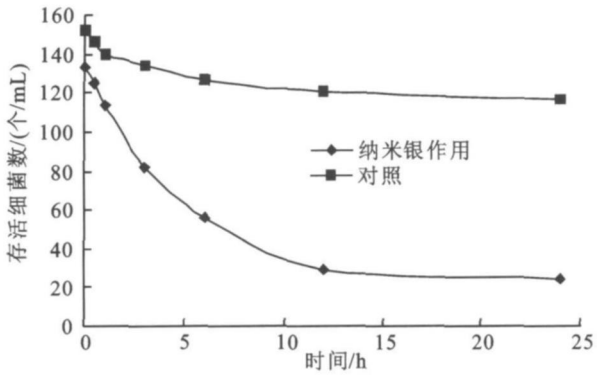


图 4　作用时间与纳米银杀菌效果的关系

Fig. 4　Relation of reaction time and effect of silver nanoparticles

2.5　纳米银对腐败海参中细菌的杀菌效果

2.5.1　纳米银对腐败海参中所有菌的总体杀菌效果　纳米银与腐败海参中所有菌作用 12 h 结果见表 4。从表 4 中可以看出纳米银的抑菌效果为 $(500\times10^{10}-69\times10^{10})/500\times10^{10}\times100\%=86.2\%$, 纳米银对所有菌的总体杀菌效果明显, 为纳米银涂膜提供了理论依据。

表 4　纳米银与腐败海参中所有菌作用 12 h 结果

Tab. 1　Result of sterilizing of silver nanoparticles to all baeterium in the sea cucumber with 12h

稀释度	10^9	10^{10}	10^{11}
纳米银作用 (cfu/mL)	390±15	69±5	5±1
对照 (cfu/mL)	多不可记	480±20	52±5

2.5.2　纳米银对海参腐败中优势菌的作用效果　纳米银与海参腐败中优势菌单菌株作用, 排除了其他因素的干扰, 更真实的反应了纳米银的杀菌能力。纳米银与海参腐败中优势菌菌种 1 和菌种 2 的作用结果见表 5 和表 6。

表 5　纳米银与优势菌种菌 1 作用 12 h 结果

Tab. 5　Result of sterilizing of silver nanoparticles to bacteria-1 with 12h

稀释度	10^9	10^{10}	10^{11}
纳米银作用 (cfu/mL)	205±10	19±3	3±1
对照 (cfu/mL)	多不可计	87±8	30±3

表 6　纳米银与优势菌种菌 1 作用 12h 结果

Tab. 6　The result of sterilizing of silver nanoparticles to baeteria-1 with 12h

稀释度	10^9	10^{10}	10^{11}
纳米银作用 (cfu/mL)	234±10	36±5	6±1
对照 (cfu/mL)	多不可计	126±7	15±3

从表 5 可以看出纳米银对菌 1 的杀菌效果为 $(870-205)/870\times100\%=76.4\%$。从表 6 看出纳米银对菌 2 的杀菌效果为 $(1\,260-234)/1\,260\times100\%=81.4\%$。纳米银对海参中分离出的两种优势菌种的作用效果都在 80% 左右。菌种的不同, 杀菌效果有一定的差异, 但是总体而言, 纳米银对海参腐败时的细菌有很好的抑制作用。

3　结　语

1) 液相化学还原法制得的纳米银尺度较小, 平均粒径为 65 nm 左右, 且分布范围狭窄, 分散性好, 而且实验条件要求不高, 这个方法不适为实验室制备纳米银的好方法。

2) 海参腐败时, 优势菌种主要有两种, 这两种菌大约占总菌数的 80%。

3) 纳米银与菌液的最适作用时间为 12 h, 再延长作用时间杀菌效果变化不大。

4) 质量浓度为 0.045 mg/L 的纳米银与菌液作用, 在确保平板上菌落数目在 30 以上时, 纳米银相对菌液还未饱和, 因此, 在确保每平板菌落数目在 30 以上的基础上纳米银相对菌液体积越大, 杀菌效果越好。

5) 纳米银与海参腐败时所有细菌, 及其中的优势菌种作用, 杀菌效果在 80% 左右。

6) 需进一步研究的问题: 纳米银涂膜与其他杀菌技术相结合, 确保海参在真空冷冻干燥过程中微生物安全, 以及最终产品的保质期。

参考文献(References):

[1] Bell W C, Myrick M L. Preparation and characterization of nanoscale silver colloids by two novel sythetic routes[J]. **Colloid and Interface Science**, 2001, 242: 300-305.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[2] 张媛媛,孙皎. 纳米银作为抗菌材料的生物安全性研究进展.中国医疗器械杂志, 2007,15(2): 21- 23.
ZHANG Yuan-yuan, SUN Jiao. A study on the bio-safety for nano-silver as anti-bacterial materials[J]. **Chinese Journal Instrumentation,** 2007, 15(2): 21- 23. (in Chinese)

[3] 余国文,张高科, 胡波. 金属系无机抗菌材料研究进展[J].工业安全与环境, 2004, 30(4) : 34- 36.
Yu Guo-wen, Zhang Gao-ke, Hu Bo. The research developments on metal-carrying inorganic antibacterial materials[J]. **Industrial Safety and Dust Control,** 2004, 30(4) : 34- 36.

[4] VolkerAlt, Thorsten Bechert, Peter Steinrucke, et al. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement[J]. **Biomaterials**, 2004, 25: 4383- 4391.

[5] Hyung- Jun Jeon, Sung- Chul Yi, Seong- Geun Oh, et al. Preparation and antibacterial effects of Ag- SiO_2 thin films by sol - gel method[J]. **Biomaterials,** 2003, 24: 4921- 4928.

[6] 张文钲,王广文. 纳米银抗菌材料研发现状[J]. 化工新型材料, 2003, 31(2) : 42- 44.
ZHANG Wen-zheng, WANG Guang-wen. Research and development for antibacterial materials of silver nanoparticle[J]. **New Chemical Materials,** 2003, 31(2) : 42- 44. (in Chinese)

[7] 廖玉麟. 中国动物志(第1卷) [M] . 北京: 科学出版社, 1997. 61

[8] 向怡卉.海参细菌的分离鉴定和生长特性研究[J].中国食品学报, 2006,6(1): 25- 29.
XIANG Yi-hui. Isolation, identification and characteristics of bacterium from sea cucumber[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology,** 2006, 6(1): 25- 29. (in Chinese)

[9] 王彩理.海参的发制和加工[J].齐鲁渔业, 2006,23(8):38- 40.
WANG Cai-li. The drying and processing of the sea cucumber[J]. **Shandong Fisheries,** 2006, 23(8):38- 40. (in Chinese)

[10] 陈为忠. HACCP 在水产品中的应用[J]. 食品科技,2002(10):22- 24.
CHEN Wei-zhong. Application of HACCP in aquatic products[J]. **Food Science and Technology,** 2002(10): 22- 24. (in Chinese)

[11] 张慜. 准纳米银对蔬菜汁保鲜的效果[J].无锡轻工大学学报, 2003,22(2):63- 66.
ZHANG Min. Study on preservation of vegetable juice with quasi-nanoscale silver[J]. **Journal of University of Light Industry,** 2003, 22(2):63- 66. (in Chinese)

[12] 顾大明.次磷酸盐液相化学还原快速制备纳米银粉[J].精细化工, 2002,19(11):54- 59.
GU Da-ming. Study on the preparation of silver nanoparticles by chemical reduction using sodium hypophosphite in solution[J]. **Fine Chemicals,** 2002, 19(11):54- 59. (in Chinese)

[13] 何晓燕, 俞梅.纳米银粒子的化学法制备及其表征[J].兰州交通大学学报: 自然科学版, 2005,24(3): 154- 158.
HE Xiao-yan, YU Mei. Chemical preparation and characteristic of silver nanoparticles[J]. **Journal of Lanzhou Jiaotong University: Natural Sciences,** 2005, 24(3): 154- 158. (in Chinese)

(责任编辑: 杨萌)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net