

文章编号: 1008-830X(2013)05-0413-08

养殖锯缘青蟹黄水病的流行病学调查研究

李 凯¹, 王国良², 朱文斌³, 吕永林¹

(1. 温州市渔业技术推广站, 浙江温州 325003; 2. 宁波大学海洋学院, 浙江宁波 315211;
3. 浙江省海洋水产研究所, 浙江舟山 316100)

摘 要: 笔者通过对温州 36 个锯缘青蟹养殖场实地走访、现场调查、及时取样、实验与分析相结合的方法, 利用生物统计软件进行数据整理、作图及分析, 得出主要结论如下: 1. 流行病学调查显示, 锯缘青蟹黄水病与降雨有着高度显著相关性。该病的暴发和流行主要集中于 5-6 月的“梅雨季节”和 8-10 月的“台风季节”, 且梅雨或者台风都会带来较大气温及降雨变化。因此, 黄水病的发生和流行与气温和降雨存在较大的联系。2. 根据锯缘青蟹黄水病发生的时空分布、养殖密度、龄期和大小、环境因子的关系分析, 得出如下结论: 不同的月份对温州地区养殖锯缘青蟹的发病率有极显著影响, 发病率最高的是 9 月份, 其次是 6-8 月。在单养和混养两种养殖模式下, 青蟹黄水病均随着养殖密度的增高, 总死亡率有明显增加, 青蟹最易患病的 4 个时期分别为放苗后半个月、脱壳期、繁殖时期和雌雄差异, 成蟹易患黄水病, 雌性个体发病率高于雄性个体, 气温、降水量的变化将显著影响青蟹黄水病的消长。

关键词: 锯缘青蟹; 黄水病; 流行病学; 环境因子

中图分类号: S945.6

文献标识码: A

Studies on Epidemiology of the Yellow Water Disease in Mud Crab, *Scylla serrata*

LI Kai¹, WANG Guo-liang², ZHU Wen-bin³, et al

(1. Wenzhou Fisheries Technology Extension Service, Wenzhou 325003)

(2. Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211)

(3. Marine Fishery Institute of Zhejiang Province, Zhoushan 316100, China)

Abstract: Study was done in Wenzhou area with interviews, sampling, experiments and analysis. The conclusion we draw from the data and figures are as follows: 1. The investigation of epidemiology shows that the Yellow Water Disease significantly exists during rainfall season. There are two seasons with heavy rainfall annually in Wenzhou area, Meiyu season (May through June) and Typhoon season (August through October). Study shows Yellow Water Disease outbreaks and prevails during rainfall seasons. 2. According to the correlation analysis in distributions of the Yellow Water Disease, age and sizes of mud crabs, and environmental factors. The result of analysis shows that the significant factors affecting the disease are the different months of the

收稿日期: 2013-07-30

基金项目: 温州市科技兴海重大项目(S20080018)

作者简介: 李凯(1980-), 男, 浙江温州人, 工程师, 硕士, 研究方向: 水产养殖病害. E-mail: likai323@21cn.com

year. September is the month when the disease reaches to the highest rate, June to August are the next. The mortality rate increases when the higher density of the pond breeding. The four periods of time when mud crabs get the disease are: the latter half of the month after the seeding, shucking, reproduction, the difference between the male crabs and female crabs. The female has higher disease rate than the male mud crabs. The temperature and rainfall would effect on the disease as well.

Key words : mud crab(*Scylla serrata*); Yellow Water Disease; epidemiology; environmental factors

锯缘青蟹 *Scylla serrata* 现名拟穴青蟹 *Scylla paramamosain* 属甲壳纲 Crustacea、十足目 Decapoda、短尾派 Brachyura、梭子蟹科 Portunidae、青蟹属 *Scylla* 简称青蟹 俗称蟳蛄。近年来 青蟹受高密度放养、强化投饵、过度施肥、滥用药物等人为因素的影响 加上养殖水域受工业、农业和生活污水的污染 导致种质性状退化 抗病力下降 发病率呈显著上升趋势。据我站统计 2007–2009 年整个温州地区锯缘青蟹养殖病害直接经济损失高达 4 691.69 万元。黄水病是当前青蟹养殖中最为主要的疾病之一 其发病范围大 死亡率高 给当地青蟹养殖从业人员造成了巨大的经济损失 严重制约了该行业的发展。为探索锯缘青蟹黄水病死亡原因、流行规律及危害状况 进一步为该病的防治打下坚实基础 2007–2009 年 我们对温州地区的锯缘青蟹病害流行情况进行了跟踪和研究。

1 材料与方法

1.1 锯缘青蟹常规病害监测

2007–2009 年 根据全市锯缘青蟹养殖的面积、分布等整体情况 分别在乐清、瑞安、龙湾、苍南等地开展锯缘青蟹病害监测 共监测池塘 78 口、监测面积 192.1 hm²。对发病青蟹养殖塘采取实地调查、及时取样、实验与分析相结合的方法 对养殖锯缘青蟹疾病的主要症状、流行情况、危害程度、管理方法以及环境因子等作详细记录、分析。监测人员每月定期下到监测点进行指导养殖和了解情况 并详细记录《温州市青蟹病害监测记录表》形成监测点养殖档案。监测内容为 监测点的布置、发病池塘数量和面积、病原、发病面积、发病率、死亡数量、死亡率、疾病造成的经济损失、发病温度、规格、放养密度和养殖面积等指标。

1.2 病害调查的时间与地区

2007–2009 年 我们在锯缘青蟹病害高发季节对乐清、瑞安、龙湾、苍南四个青蟹主要养殖区的 36 个养殖场(面积共 104.1 hm²) 进行了病害调查 共发放调查表 36 份 受访人数 50 余人次。发放《锯缘青蟹养殖病害发生情况调查表》统计养殖面积、放养密度、养殖模式、发病时间、病蟹症状、危害程度及环境变化等主要情况 结合往年发放的调查结果 以分析锯缘青蟹黄水病的发病、流行和死亡情况 找出锯缘青蟹黄水病的流行规律。

此外 我们还分别在龙湾、瑞安等地 召集部分青蟹养殖从业人员 以座谈会的形式开展青蟹养殖病害的社会调查 掌握第一手资料。

1.3 理化环境因子监测方式和方法

1.3.1 日常水质记录

锯缘青蟹监测点养殖管理人员开展水质日常记录 监测指标与方法如下:

水温 表层温度计 气温 温度计 pH 南京特安公司的 2003–MR 水质检测盒 氨氮 南京特安公司的 2003–MR 水质检测盒 透明度 透明度盘。

1.3.2 实验室定期监测

委托瑞安市海洋与渔业局实验室 定期对青蟹养殖区域的池塘水质进行检测。其中 海水温度、pH、盐度等进行现场测量 溶氧、亚硝酸盐、氨氮等固定水样后带回实验室再做检测。参照国家方法测定(国家监

督局,1992) 监测指标与方法如下：

海水温度 温度计法 ,方法来源 GB 13195-91 pH 玻璃电极法 ,方法来源 GB 6920-86 盐度 盐度计；溶氧(DO) 采用碘量法 ,方法来源 GB 7489-87 亚硝酸盐 采用萘乙二胺分光光度法 ,方法来源 HJ/T 84-2001 氨氮 采用次氯酸法 ,方法来源 GB 7481-87。

气象因子从瑞安市气象局获得 ,包括日平均气温、平均气压、降雨量。

1.4 数据统计

利用 EXCEL、WORD 和 SPSS 等数据统计软件进行数据整理、作图及分析。

2 结果与分析

2.1 锯缘青蟹黄水病的症状

在黄水病高发季节里 ,发病初期病蟹往往摄食量大幅下降甚至停止摄食 ,爬行迟缓 ,到后期严重时往往会爬至池塘的斜坡或者滩面上死亡。较前部分死蟹 ,大部分则直接死于池塘底部 ,不容易发现 ,排水时可见。病蟹应激反应强烈 ,人抓之则自切其螯足或步足 ,蟹体较瘦弱 ,有的体表发红 ,内脏及步足充满黄色液体 ,步足基关节膜发白 ,或关节边缘发红 ,脱水 ,步足断口有浊白色的液体流出 ,步足关节失去弹性 ,剖开头胸甲 ,甲壳内充满黄色(部分是乳白色)的粘性液体 ,肝胰腺模糊呈红棕色或乳白色 ,肠胃空 ,肌肉不清晰 ,鳃浑浊 ,有黑色杂质 ,在症状较轻时鳃尖发黑 ,严重时全鳃发黑 ;甲壳内的血淋巴由正常时的蓝青色转变为淡黄色或者浑浊的乳白色牛奶状不能凝固的变性体液 ,肝胰腺明显糜烂 ,胃肠道无食物或肠道末端有小段粪便 ,游泳足色素细胞扩散等(图 1)。



图 1 黄水病的症状

Fig.1 The symptom of "yellow water disease"

2.2 锯缘青蟹黄水病的流行病学特征

2.2.1 锯缘青蟹黄水病发生的时空分布

由表 1 和图 2 可知 ,温州青蟹养殖场发病初期主要集中在 7 月 40%的概率；死亡高峰期则在 7 月底到 9 月中旬之间，均为 33.33%；而发病末期则在 9 月下旬后，概率为 46.66%。这与现场走访调查时青蟹养殖户所提供的资料相吻合。

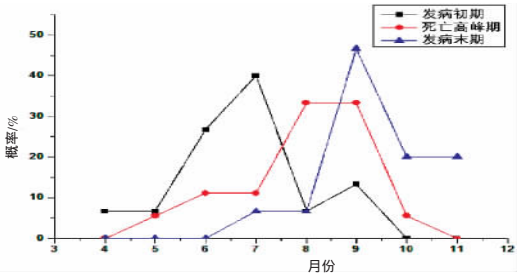


图 2 锯缘青蟹每月各发病时期的概率趋势图

Fig.2 The date of disease rate in mud crab

表 1 锯缘青蟹每月各发病时期的概率

Tab.1 The date of morbidity in mud crab

时间	发病初期	死亡高峰期	发病末期
4 月	6.67%	0	0
5 月	6.67%	5.56%	0
6 月	26.67%	11.11%	0
7 月	40%	11.11%	6.67%
8 月	6.67%	33.33%	6.67%
9 月	13.32%	33.33%	46.66%
10 月	0	5.56%	20%
11 月	0	0	20%
总	100%	100%	100%

2007-2009 年期间,温州地区养殖锯缘青蟹各月的发病情况变化较大,发病率最高可达 100%,为使发病率数据接近正态分布,因此对发病率作反正弦转换。

转换值 $x'=\sin^{-1}\sqrt{p}$ (p 为发病率)

根据转换值再作方差分析,了解锯缘青蟹与季节的关系,分析见表 2。

表 2 锯缘青蟹黄水病发病率的方差分析

Tab.2 Analysis of variance for the disease incidence

变异来源	III 型平方和 SS	自由度	均方 MS	F 值	P 值
校正模型	5 166.750 ^(a)	13	397.442	3.703	0.003
截距	5 696.615	1	5696.615	53.070	0.000
月份	5 148.679	11	468.062	4.361	0.002
年份	18.071	2	9.035	0.084	0.920
误差	2 361.498	22	107.341		
总和	13 224.863	36			
校正总和	7 528.247	35			

由表 2 可知,月份的 $F=4.361$ $P=0.002<0.01$,差异极显著,年份的 $F=0.084$ $P=0.920>0.05$,差异不显著。这说明不同的月份对温州地区养殖锯缘青蟹的发病率有极显著影响。经进一步的多重比较表明,发病率最高的是 9 月,其次是 6-8 月。

2.2.2 锯缘青蟹黄水病发生与养殖密度的关系

锯缘青蟹养殖苗种一般来自本地海捕自然苗,苗规格一般在 1~5 cm 之间。黄水病发生与养殖密度的关系见表 3。

表 3 单养池塘黄水病发生与养殖密度的关系

Tab.3 Colletion between disease occur and density in mud crab

养殖密度(只/亩)	100	200	250	285	333	400	500	750
总死亡率/%	79	75	88	85	87.8	80	96.8	87

图 3 中虽仅考虑单养密度与发病总死亡率的关系,但可根据图的总体趋势发现,随着养殖密度的增高,总死亡率有明显增加。

由表 4、图 3 可知,混养同单养情况相似,随着养殖密度的增高,总死亡率有明显增加。混养主要为青蟹与蛭子、泥蚶,密度此处以青蟹密度为准。

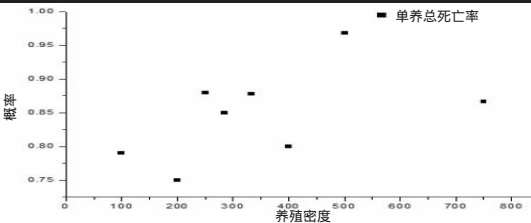


图 3 单养池塘黄水病死亡率与养殖密度的关系
Fig.3 Correlation between mortality of "YWD" and density in mud crab

表 4 混养池塘疾病发生与养殖密度的关系

Tab.4 Colletion between disease occur and density of poly-culture in mud crab

养殖密度(只/亩)	100	100	125	150	200	250	250	400	430	1300
总死亡率/%	0.854	0.850	0.911	0.80	0.825	0.857	0.880	0.861	0.892	0.972

2.2.3 锯缘青蟹黄水病发生与龄期和大小的关系

由表 5、图 4 可知,锯缘青蟹在幼年期(150 g 以下)和成年期(150 g 以上)发病的概率相近,分别为 0.476 和 0.524。说明黄水病在锯缘青蟹整个生长周期内均会出现,因此,在青蟹养殖的各个阶段要做好防病工作,加强防范意识。

由表 6、图 5 可知,病蟹规格在 0~50 g 和 250 g 以上时,青蟹黄水病发病率较高。

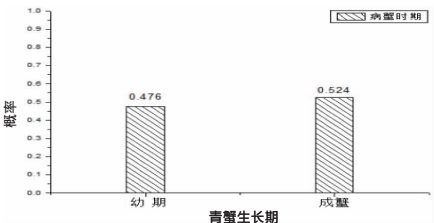


图 4 锯缘青蟹黄水病与龄期的关系
Fig.4 Correlation between "yellow water disease" and the age in mud crab

表 5 锯缘青蟹黄水病发病龄期
Tab.5 The age of "yellow water disease" in mud crab

病蟹龄期	数目	概率
幼期	10	0.476
成蟹	11	0.524
总	21	1

表 6 患黄水病的病蟹规格统计
Tab.6 The specification of "yellow water disease" in mud crab

病蟹规格(g)	统计数目	概率
0~50	4	0.286
50~100	2	0.143
100~150	1	0.071
150~200	1	0.071
200~250	2	0.143
>250	4	0.286
总共	14	1.000

由表 7、图 6 可知 ,锯缘青蟹在放苗半个月、脱壳期、繁殖时期和雌雄差异这 4 个时期都易患病 ,防病时需要特别注意。

表 7 特殊时期、特殊个体的发病情况
Tab.7 The morbidity condition of special period and individuals

特殊时期、个体	数目	概率
放苗半个月	5	0.333
脱壳期	7	0.467
繁殖时期	5	0.333
雌雄差异	6	0.4

总共有 15 个养殖户填有以上信息。概率=特殊时期、个体的个数/15。

2.2.4 锯缘青蟹黄水病发生的环境因素

2.2.4.1 锯缘青蟹黄水病与气象因子的关系

用 SPSS 软件对气象数据作相关性分析 ,结果由表 8 可见 ,气温对锯缘青蟹发病率的影响具有显著作用 ,降水量对发病率的影响是高度显著的 ,气压则无显著影响。

气温对发病率的作用主要是通过影响水体温度来实现的 ,水温对蟹体的新陈代谢反应速率起着控制作用 ,它直接影响蟹体的生理机能。而降水通过改变养殖水体溶氧、pH、氨氮、盐度等水体理化因子而起到影响作用 ,从相关系数分析可知 ,降水量的多少能显著影响青蟹的发病 ,这跟调查所获得的情况想一致。青蟹发病高峰期 为农历八月十五期间 ,正是温州地区台风、暴雨较频繁时期 ,降水量变化较大。而此时的温差变化强烈 ,从而进一步引起的水体温差变化 ,导致青蟹难以适应环境 ,抵抗力下降 ,易染病。

2.2.4.2 其他环境因子与发病率的关系

由图 7~12 可知 ,青蟹发病可能因环境突变而导致青蟹抵抗力

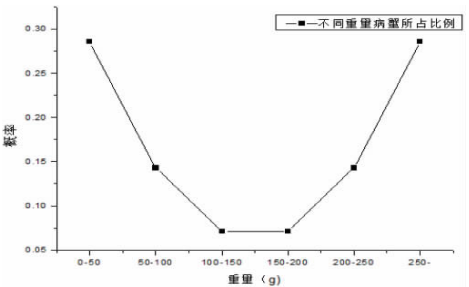


图 5 患黄水病的青蟹规格与发病率的关系
Fig.5 Correlation between morbidity and the specification of mud crab

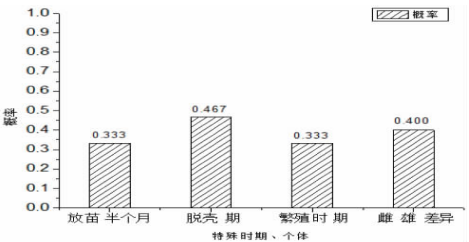


图 6 特殊个体发病情况

Fig.6 The morbidity condition of special individuals

表 8 发病率与气象因子的相关系数

Tab.8 Correlation coefficients between the incidence of diseases and meteorological

气象因子	平均值	标准差	N	相关系数
气温	18.183 3	7.901 87	12	0.623 7*
气压	9 365.83	26 34.89	12	-0.373 1
降水量	1 417.17	1 232.65	12	0.782 2**
发病率	0.068 07	0.077 45	12	

下降 ,影响蟹体的生理机能 ,导致病原容易侵入蟹体 ,引起青蟹黄水病的发生。图中青蟹两个发病高峰期 ,都出现在当地梅雨和台风季节附近。两季节的天气变化明显 ,降水、气温日变化较大 ,导致青蟹水体生活环境也相应变化。而青蟹发病往往具有滞后性 ,环境变化后不久青蟹才开始陆续发病。

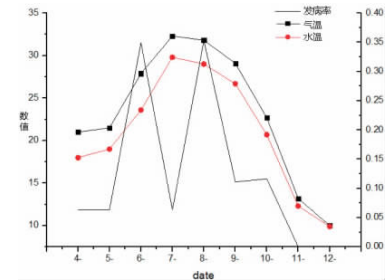


图 7 气温、水温与发病率的关系

Fig.7 Correlation between temperature of air, water and morbidity

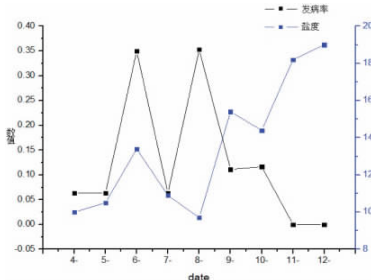


图 8 盐度与发病率的关系

Fig.8 Correlation between morbidity and salinity

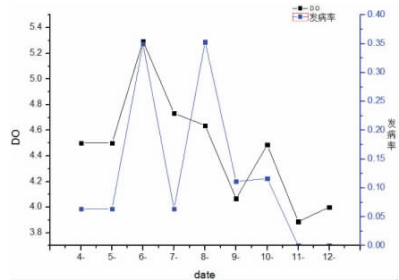


图 9 溶氧与发病率的关系

Fig.9 Correlation between DO and morbidity

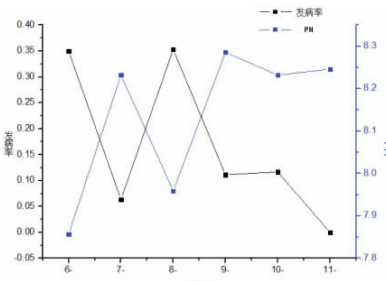


图 10 pH 与发病率的关系

Fig.10 Correlation between pH and morbidity

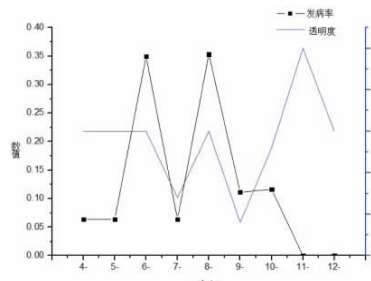


图 11 透明度与发病率的关系

Fig.11 Correlation between diaphaneity and morbidity

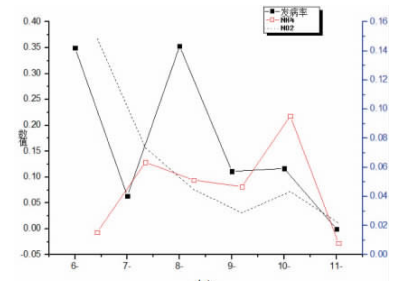


图 12 NO₂ 和 NH₃-N 与发病率的关系

Fig.12 Correlation between NH₃-N ,NO₂-N and morbidity

3 讨论

3.1 锯缘青蟹黄水病的病症特点

本研究发现 ,发病高峰期间疑似患黄水病的锯缘青蟹会爬到池塘的斜坡或者滩面上死亡 ,有些直接死于池塘底部 ,被同类相食 ,排水时容易发现死亡青蟹残骸 ,如遇脱壳时期患病 ,死亡后被同类所食 ,往往连青蟹残骸都难发现 ,正如调查时养殖户所论述 ,未见发病及死蟹 ,产量却很低。

试验对疑似患黄水病的青蟹作了外部及解剖观察 ,发现蟹体普遍消瘦 ,步足基关节膜发白 ,应激性明显 ,易自断足 ,断足处有浊白色液体流出 ,体腔充满黄色液体 ,肝胰腺弥散 ,肌肉肌纤维断裂 ,甚至液化 ,部分病蟹鳃发黑。

3.2 锯缘青蟹黄水病发生的时空分布

根据走访调查青蟹养殖户 ,锯缘青蟹黄水病在温州各地区每年均有发现。每当梅雨季节和台风季节 ,往往会有大量岸上淡水注入青蟹养殖池塘 ,甚至还会出现海水倒灌等现象 ,造成青蟹在这两个特殊时段发病尤为严重 ,损失巨大。

锯缘青蟹黄水病高峰期主要集中在每年的5-6月和8-10月,与韩新全^[1]和程岩雄等^[2]的报道一致。因该时段正值浙江地区的梅雨及台风季节。昼夜温差大,降雨多,且时有台风,造成水体环境极不稳定。

3.3 锯缘青蟹黄水病的发生与养殖密度的关系

养殖密度与锯缘青蟹黄水病的发生具有很高的相关性。前几年温州地区由于养殖密度很大,死亡率也较高,最近几年由于养殖密度逐渐减小,黄水病的发病率也随之减少。当地养殖户发现,随着养殖密度的减少,产量反而相差不大,病害暴发也较以前减少。

梁广耀^[3]通过试验也曾提出,蟹苗的放养密度要根据蟹池、季节、个体大小和饵料等条件来定。各方面养殖条件较好的,可多放苗;各方面养殖条件较差的,可少放苗。一般每亩放苗400~500只较适宜。放养密度跟发病死亡有一定的内部联系。本实验结果也证实了这一观点。

3.4 锯缘青蟹黄水病的发生与龄期和大小的关系

试验结果发现患黄水病的青蟹主要在成年期,主要为250 g以上的成蟹。并且以繁殖期、脱壳期为主。雌雄也有较大差异,雌性个体发病率高于雄性个体,这与相关的文献描述相类似^[4]。同时文中提到甲壳类动物在蜕皮、产卵和交配时尤其容易感染黄水病,宿主往往是在蜕壳或蜕壳不久获得感染,但这个阶段的感染途径还有待深入研究。

3.5 锯缘青蟹黄水病的发生与环境因子的关系

环境因子如温度、盐度等会影响该黄水病的流行^[5]。MESSICK^[6]通过一系列实验发现,低水温、盐度能抑制兰蟹血淋巴当中血卵涡鞭虫的增殖,而血卵涡鞭虫被怀疑为黄水病的病原之一。在水温高于15℃时兰蟹感染黄水病病原较严重,水温低于15℃则感染减少。盐度也是黄水病病原传播的重要因子之一,疾病均发生在狭盐种类中。另外,疾病的流行可能还与潮汐、海流等有关。

试验发现锯缘青蟹黄水病的发生不仅跟气温有关,还与降水量有关,由于降水量的增加,水体中的环境因子也随之变化。因此,温州往往在梅雨季节和台风季节前后,青蟹黄水病高发。冯振飞等^[7]对青蟹发病与养殖环境因子的关系进行了分析研究,得出盐度变化、降雨量对青蟹黄水病的发生与流行具有显著影响。该结论与本文的结论相一致。

3.6 锯缘青蟹黄水病的防治建议

目前因未发现有效治疗“黄水病”的相关药物,因此必须贯彻“以防为主、防治结合”的方针政策。在分析发病病原的同时,了解其流行病学相关特征。在易发病期间我们应该加强巡塘、勤换水,及时发现患病青蟹并将其与其他青蟹隔离,以免传染给其他青蟹,发现死蟹也要及时捞起处理掉。另一方面我们要加强饵料管理,在病发高峰期尽量投喂新鲜的饵料,加强营养,增强蟹的抵抗力,而且饵料量一定要足,保证青蟹不会因饥饿导致同类相食,从而预防疾病的发生、蔓延。

在青蟹放苗季节的选择上,建议选择放秋苗。因秋苗生长期避开了黄水病的高峰期,秋苗一般可在该病的高峰期前就能上市出售。

4 本研究的主要结论与存在的问题

本文对锯缘青蟹黄水病流行病学做了较深入研究。通过对温州的乐清、瑞安、龙湾、苍南等地的10余个乡镇的实地调查走访、连续3年的青蟹养殖病害监测以及池塘环境因子的日常记录和实验室检测,经研究认为锯缘青蟹黄水病的致病因素为季节、养殖密度、盐度和降水量的变化。

本文得出的主要如下:

(1) 锯缘青蟹黄水病流行病学特征

调查研究发现,锯缘青蟹黄水病与降雨有着一定的相关性。该病的暴发和流行主要集中于5-6月的梅雨季节和8-10月的台风季节。梅雨或者台风都将会带来大降水,池塘水质盐度急剧下降,青蟹因环境

突变而导致抵抗力下降,影响蟹体的生理机能,导致病原容易侵入蟹体,引发黄水病的发生。同时研究发现,所检测的其他水质指标与黄水病的相关性较弱,在未来的研究中可增加其他水质因子的监测。

(2)引发锯缘青蟹黄水病的主要因素

根据锯缘青蟹黄水病的疾病发生与时空分布、养殖密度、龄期和大小、环境因子的关系分析,表明如下结论:不同的月份对温州地区养殖锯缘青蟹的发病率有极显著影响,发病率最高的是9月份。其次是6-8月,在单养和混养两种养殖模式下,锯缘青蟹黄水病发病率均随着养殖密度的增高,总死亡率有明显增加;黄水病在锯缘青蟹整个生长周期内均会出现,最易患病的四个时期分别为放苗后半个月、脱壳期、繁殖时期和雌雄差异,成蟹易患黄水病,雌性个体发病率高于雄性个体,气温、降水量的变化将显著影响青蟹黄水病的消长。该结果与历年青蟹黄水病流行病学调查与文献报道的结果相符。

参考文献:

- [1] 韩新全. 锯缘青蟹黄水病及并发病的综合控制措施[J]. 科学养鱼, 2005(8): 56.
- [2] 程岩雄, 罗华明, 丁秀颖, 等. 养殖锯缘青蟹的流行病学调查研究[J]. 科学养鱼, 2007(10): 32-33.
- [3] 梁广耀. 锯缘青蟹养殖中若干问题的探讨[J]. 海洋技术, 1992, 11(2): 79-82.
- [4] FIELD R H, HILLS J M, ATKINSON R J A, et al. Distribution and seasonal prevalence of Hematodinium sp. infection of the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) around the west coast of Scotland[J]. ICES J Mar Sci, 1998, 55: 846-858.
- [5] MESSICK G A. Hematodinium perezii infections in adult and juvenile blue crabs *Callinectes sapidus* from coastal bays of Maryland and Virginia, USA[J]. Dis Aquat Org, 1994, 19: 77-82.
- [6] 许文军, 施惠, 徐广庆, 等. 锯缘青蟹黄水病病原研究及综合防控初报[J]. 中国水产, 2006(8): 23-26.
- [7] 冯振飞, 王国良, 倪海儿. 养殖锯缘青蟹黄水病流行病学及其预报模型[J]. 水产科学, 2009, 28(12): 713-716.