

南方九孔鲍育苗过程中潜在致病菌胞外产物的分析

王 志 蔡俊鹏* 徐 丽 杨吉霞 张 昕

(华南理工大学轻工与食品学院 广州 510640)

摘 要: 从广东汕尾一养殖场鲍苗掉板池中(包括水、藻膜和变白鲍苗)分离筛选到 105 株菌,并对之进行了致病毒力因子(胞外酶及溶血作用)的分析,同时应用 PCR 对溶血毒素的归属进行了初步的探讨,采用 API 对菌株进行了种类鉴定。结果表明,105 株菌中,仅 35 株菌具有较强的分泌胞外蛋白酶、明胶酶和脂肪酶的能力,尤其以菌株 1、2、3、5、9 以及 16 相对强大。在此 35 株菌中,85.6% 的菌株(30/35 株)表现出溶血现象,但仅 16 株菌的 T1h-PCR 呈阳性。API 鉴定表明,35 株菌中弧菌约占 50%,溶藻弧菌又占弧菌的 70%。研究结果揭示,和其它菌株相比,分离自变白鲍苗的 6 株溶藻弧菌(菌株 1、2、3、5、13 和 16)和 2 株副溶血弧菌(菌株 9 和 21)具有较强的分泌胞外酶和/或溶血的能力,意味着极有必要对其作进一步的研究,以观测它们对鲍苗的影响。

关键词: 鲍苗,掉板,胞外产物,溶血作用

中图分类号:Q939.9 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)04-0634-04

随着鲍鱼养殖业的发展,集约化程度的提高,各种病害越来越频繁发生并愈演愈烈^[1]。成鲍病害问题尚未得到彻底解决,鲍苗掉板问题又出现了。自 2002 年下半年开始,培苗成为九孔鲍养殖中的“瓶颈”。问题出现在从附板到 20d 鲍龄这段时间,常有大量鲍苗变白,进而死亡掉板。以前偶尔才出现的问题如今频频发生,而且每次导致鲍苗死亡的数量也是前所未有的。偶尔也有培苗较为成功的情况,但鲍苗存活率仍低于以往的平均水平。鲍苗掉板问题不但给养殖场造成极大经济损失,而且给我们提出了一个迫切需要解决的难题。

对于引发鲍苗病害的病原,除了 Beltran 等(1998)曾对此进行过研究^[2],并认为 *Vibrio alginolyticus* 有此能力外,目前尚未见有其它相关的报道。

溶血素是多数病原菌的重要致病因子之一,目前已在鱼类致病菌气单胞菌、鳃弧菌、副溶血弧菌等的胞外产物中检测到。除了溶血毒素外,致病因子也包括一些具有活性的胞外产物如蛋白酶、磷脂酶、脂肪酶等^[3,4]。对气单胞菌、假单胞菌等胞外产物(蛋白酶)的研究表明,它能分解宿主肌体的各种蛋白,造成广泛的组织损伤,细菌进而大量繁殖^[3,5,6]。此外,蛋白酶还可将毒素原降解成具有活性的毒素^[7]。李太武等^[8]的研究也表明,皱纹盘鲍脓疱病病原菌-河流弧菌即能分泌蛋白酶、脂肪酶等胞外酶。近年来另一受人瞩目的破坏宿主细胞的毒力因子则是磷脂酶^[4]。研究证实,磷脂酶在微生物对宿主细胞的穿入、损伤和溶解中发挥着作用,通过分解构成细胞膜主要成分-磷脂而降低细胞膜的稳定性,进

而致病^[4]。

副溶血弧菌所拥有的不耐热溶血毒素(Thermolabile haemolysin, T1h)是一种非典型磷脂酶,根据其溶血活性,可将其归为溶血磷脂酶(Lysophospholipase)一类^[9]。它是一种具有溶血活性、致死作用和细胞毒性等多种生物学活性的蛋白质,能溶解兔和小白鼠等的红细胞。

本实验从广东省鲍鱼养殖基地汕尾一鲍鱼养殖场出现鲍苗掉板的池中(包括水、藻膜和变白鲍苗)共分离获得 105 株菌株。经蛋白酶等胞外酶和溶血现象的研究,获得 35 株较有潜力的菌株,其中分离自变白鲍苗的 8 株菌具有很强的分泌胞外酶和/或溶血能力。现将结果报道如下。本研究目的在于探讨我国南方九孔鲍育苗大规模掉板死亡的病因,进而为解决鲍苗掉板问题提供科学的依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源: 2003 年 7~8 月份从汕尾一鲍鱼养殖场出现鲍苗掉板的池中(包括水、藻膜和变白鲍苗)采集分离获得。PCR 扩增反应阳性对照菌株为副溶血弧菌标准毒力株 Vp14-90(VP⁻)源自上海疾病预防控制中心,由第一军医大学流行病学教研室陈清教授惠赠。

1.1.2 试剂: 山羊血平板培养基购自广东省微生物研究所。API 20E 鉴定条购自法国梅里埃公司。dNTPs、Taq 酶、PCR 缓冲液、UNIQ-10 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒购自鼎国生物技术发展中心。T1h 引物由上海基康生物技术服务有限公司合

基金项目:广东省自然科学基金重点项目(020964)、华南理工大学“高水平大学建设”苗子项目(321-D76020)

* 通讯作者。Tel:86-20-87538286;E-mail:febjpc@scut.edu.cn

作者简介:王志(1977-),男,湖北人,博士研究生,主要从事生物技术方面的研究。E-mail:Wangzhi2000@vip.sina.com

其他作者:宋志萍,陈惠源

收稿日期:2004-11-25,修回日期:2005-03-04

成。

1.1.3 培养基:异养细菌培养基用 2216E 佐贝尔海洋细菌培养基,蛋白胨 5.0g,酵母膏 1g,磷酸高铁 0.01g,琼脂粉 15g,海水晶 33g,加蒸馏水至 1000mL, pH7.6~7.8。弧菌用 TCBS 培养基,为广东环凯微生物科技公司产品。

1.2 样品的采集

实验所用样品为 2003 年 7~8 月间从汕尾一鲍鱼养殖场出现掉板现象的鲍苗池中采集得到。直接用灭菌三角瓶从养殖池采集水样,将其适当的梯度稀释后作细菌分离,同时从同一鲍苗池的挂板上分别刮取适量藻膜和变白鲍苗放入研钵中,加入 1mL 灭菌人工海水,研磨 10min 后再加入 9mL 灭菌人工海水摇匀,继续做适度稀释后作细菌分离。

1.3 细菌分离

取不同稀释度的 3 种样品(水、藻膜和变白鲍苗)各 0.1mL 加入到制好的平板培养基上(9cm 培养皿),用三角玻棒涂抹均匀,每个稀释度做 3 个平行样,连续做 3 个不同稀释度,置 25℃ 条件下培养(异养细菌培养 7d,弧菌培养 2d)后取出观察菌落,并根据菌落的不同形态特征挑出代表性菌株,接到斜面培养基上作种群鉴定。

1.4 菌株鉴定

菌株纯化后,根据菌株培养特征,细胞形态,革兰氏染色和氧化酶反应选择法国梅里埃公司 API 20E 鉴定条,检测生理生化反应^[10],根据结果应用 API LAB 软件并参照《伯杰氏细菌鉴定手册》进行检索鉴定。

1.5 细菌胞外酶毒力因子

采用杯碟法测定菌株分泌胞外蛋白酶(protease 和 gelatinase)^[11]。将处于对数期的菌株分别点种于含有酪蛋白、明胶的平板中,28℃ 培养 24h 后取出观察。含酪蛋白的平板可以直接观察,含明胶的平板则在观察之前需要加入显色剂 HgCl₂ 溶液^[8],透明的区域显示有酶活。

根据 Mourney 的方法测定菌株分泌胞外脂肪酶^[12]。将处于对数期的菌株接种于含有橄榄油和中性红的平板中,28℃ 培养 24h 后取出,观察菌落是否会变成红色(中性红在中性环境下呈黄色,在酸性环境下呈红色)。

1.6 溶血现象的分析^[8]

将菌株接种至山羊血平板(Goat blood agar)中,置 28℃ 培养箱培养 24~30h,观察菌株周围是否出现溶血圈。若出现溶血圈则为阳性,表明该菌能分泌具有溶血活性的胞外产物。

1.7 溶血基因的分析

1.7.1 基因组 DNA 的制备:所试菌株和阳性对照菌株 Vp⁻ 基因组 DNA 用 UNI-Q-10 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒提取。

1.7.2 引物设计及 PCR 扩增:根据 DNA 序列的分析以及相关文献报道^[13,14],并通过 Blast 的同源性分析,设计 Tlh 引物^[15]。上引物为:5'-AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG-3',下引物为:5'-GCTACTTTCTAGCATTCTCTG-3'。由上海基康生

物技术有限公司合成。

参考《分子克隆实验指南》PCR 设计原则^[16]进行扩增反应,PCR 反应体系(50μL):5μL 的 10 × PCR buffer(含 Mg²⁺ 25mmol/L),1μL 的 dNTPs(10mmol/L),上下引物(0.2mmol/L)各 2.5μL,1μL 的模板,1U 的 Taq 酶。PCR 反应条件:95℃ 5min,94℃ 30s,41℃ 30s,72℃ 30s,循环 30 次,72℃ 7min。设阳性对照和没有模板的阴性对照。经琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

2 结果和讨论

2.1 细菌胞外酶

本实验从鲍苗掉板的池中(包括水、藻膜和变白鲍苗)共分离获得 105 株菌株,但由于只有 35 株菌具有一定的胞外酶分泌能力和/或溶血现象,因此本文将重点报道与之有关的结果。

35 株菌分泌胞外蛋白酶、明胶酶和脂肪酶的情况见表 1。以酪蛋白为底物,82.9% 菌株(29/35)具有分泌水解酪蛋白的胞外酶能力,且其中水解圈直径超过 20mm 的菌株高达 11 株,菌株 1 和 3 的水解圈最大,直径达 25mm,其次为菌株 4、5、8~14。以明胶为底物,除 21、31 和 33 这 3 株菌外,其余 33 株菌(94.3%)在不同程度上均可水解明胶,水解圈最大的为菌株 24 和 34,直径达到 20mm,次之为 1~13,15~18,22~30。以橄榄油为底物,则有 77.1% 菌株(27/35 株)能水解脂质,其中菌株 1、2 和 7 号胞外酶的活力最强,水解圈直径达 25mm。

从表 1 可以看出,许多菌株可同时分泌 2 种甚至 3 种胞外酶,而且活力均很强:同时分泌酪蛋白酶和明胶酶的有 1、3、4、5、6、9、10、11、24 和 34 号菌株,同时分泌可水解明胶和橄榄油胞外酶的有 1、2、3、5、7 和 9 号菌株,同时分泌酪蛋白酶和脂肪酶的有 1~5、8~10、12 和 14 号菌株,可同时分泌蛋白酶、脂肪酶和明胶酶 3 种酶的菌株中,活力最强的有 5 株菌:1、2、3、5 和 9,占总菌数的 14.29%(5/35 株),菌株 16 其 3 种酶的活力则稍弱。

2.2 溶血现象的分析

将 35 株菌点种于血平板中,置 28℃ 培养箱培养 24~30h 观察溶血圈大小(表 1)。很明显,85.6%(30/35 株)菌株有溶血圈出现,其中溶血圈最大的为菌株 2、13 和 21,直径达 30mm,其次为菌株 3、7、9、14、15、17、19、20、22、23、和 35,溶血圈直径也超过 20mm;仅 5 株菌没有溶血现象,即 10、25、27、28、29。

2.3 PCR 扩增

为了阐明导致溶血现象的是否为 Tlh(溶血磷脂酶),依据 McCarthy 等^[13]所研究特异性 Tlh 引物,进行 PCR 扩增。预计扩增条带为 450bp,故只要在该处出现扩增条带的样品,均可定为阳性。本试验中,共有 16 株出现阳性反应,即菌株 1、2、3、4、5、6、13、14、15、17、19、31、32、33、34 和 35(图 1)。

表 1 菌株胞外产物的分析结果

Table 1 Diameters of hydrolysis zones of 3 extra-cellular enzymes and of haemolytic zones of 35 isolates

Strains	Hydrolysis zones of protease	Hydrolysis zones of gelatinase	Hydrolysis zones of lipase	Diameter of haemolytic zones	Source of isolation	Strains	Hydrolysis zones of protease	Hydrolysis zones of gelatinase	Hydrolysis zones of lipase	Diameter of haemolytic zones	Source of isolation
	/mm	/mm	/mm	/mm			/mm	/mm	/mm	/mm	
1. <i>Vibrio alginolyticus</i>	25	13	25	8	Postlarvae	19. <i>Vibrio alginolyticus</i>	16	9	7	24	Biofilms
2. <i>Vibrio alginolyticus</i>	12	11	25	30	Postlarvae	20. <i>Serratia odorifera</i>	14	7	6	26	Water
3. <i>Vibrio alginolyticus</i>	25	15	10	20	Postlarvae	21. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	14	0	4	30	Postlarvae
4. <i>Vibrio alginolyticus</i>	20	12	5	15	Biofilms	22. <i>Providencia rettgeri</i>	15	12	5	23	Water
5. <i>Vibrio alginolyticus</i>	20	14	20	15	Postlarvae	23. <i>Vibrio alginolyticus</i>	14	18	5	23	Biofilms
6. <i>Vibrio cholerae</i> *	15	10	5	15	Water	24. <i>Shewanella putrefaciens</i>	16	20	7	11	Biofilms
7. <i>Undetermined</i>	0	11	25	20	Biofilms	25. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	11	17	5	0	Water
8. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	21	14	8	15	Water	26. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	11	19	0	11	Biofilms
9. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	20	14	9	21	Postlarvae	27. <i>Shewanella putrefaciens</i>	13	16	6	0	Water
10. <i>Vibrio alginolyticus</i>	23	15	7	0	Biofilms	28. <i>Shewanella putrefaciens</i>	11	18	5	0	Water
11. <i>Vibrio alginolyticus</i>	22	13	0	12	Water	29. <i>Providencia rettgeri</i>	0	11	0	0	Biofilms
12. <i>Shewanella putrefaciens</i>	23	15	9	11	Water	30. <i>Enterococcus agglometans</i>	11	10	0	13	Water
13. <i>Vibrio alginolyticus</i>	20	11	0	30	Postlarvae	31. <i>Klebsiella oxytoca</i>	0	0	4	16	Biofilms
14. <i>Undetermined</i>	20	8	5	24	Biofilms	32. <i>Providencia rettgeri</i>	0	5	0	9	Biofilms
15. <i>Serratia ficaria</i>	16	16	6	20	Biofilms	33. <i>Aeromonas salmonicida</i>	0	0	0	16	Water
16. <i>Vibrio alginolyticus</i>	18	10	5	16	Postlarvae	34. <i>Shewanella putrefaciens</i>	15	20	6	9	Biofilms
17. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16	11	5	24	Water	35. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	8	0	22	Water
18. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16	11	5	11	Biofilms						

* Non-epidemic strain

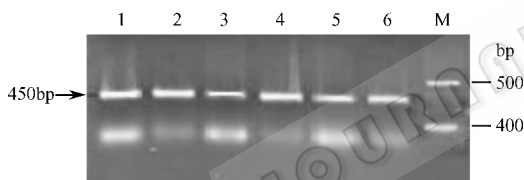


图 1 30~35号菌株 Tlh-PCR 的电泳示意图

Fig. 1 Example of electrophoresis of Tlh-PCR products of strains 31~35
1. Strain 31 ; 2. Strain 32 ; 3. Strain 33 ; 4. Strain 34 ; 5. Strain 35 ; 6. Positive control (vp-); M. 1 kb marker.

另外还有 14 株菌株虽具有溶血现象,但 PCR 扩增 Tlh 基因却为阴性。这可能是因为这些菌株具有其它溶血毒素,如熊焰、朱越雄等研究嗜水气单胞菌的溶血毒素,证明嗜水气单胞菌也具有溶血毒素^[17,18]。与血平板检测结果比较,可以发现,凡是 PCR 扩增出现 Tlh 阳性条带的菌株,在血平板上也具有溶血现象,由此意味着在这些菌中,引发溶血现象的很可能就是 Tlh 所编码的溶血磷脂酶。

2.4 细菌的种类鉴定

为了解这 35 株菌的种类组成,我们应用 API 鉴定条对它们进行了鉴定,表 1 为鉴定结果。

在这 35 株菌中,分离自水体的有 13 株,藻板的有 14 株,变白鲍苗的有 8 株(菌株 1、2、3、5、9、13、16 和 21)。所有菌株均为杆状或短杆状。革兰氏染色表明,除菌株 7 和 14 为阳性外,其余均为阴性。API 鉴定表明,35 株菌中,弧菌 17 株,约占总菌株数的 50%,而溶藻弧菌则为弧菌的优势菌株,有 11 株,约占弧菌总数的 70%(占总菌株数的 35%);其余 18

株除两株未鉴定外,其余由 *Shewanella putrefaciens*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Providencia rettgeri* 等 8 个种类所组成。

17 株弧菌均可分泌蛋白酶。除菌株 21 不分泌明胶酶,菌株 11、13 和 26 不分泌脂肪酶外,其余 13 株弧菌均能同时分泌蛋白酶、明胶酶和脂肪酶。而且,对于弧菌中的优势菌-溶藻弧菌 *Vibrio alginolyticus* 而言,能同时分泌蛋白酶、明胶酶和脂肪酶等酶的菌株比例高达 81.8%(9/11 株)。血平板结果也表明,溶血圈最大的 2、13 和 21 号菌株均为 *Vibrio alginolyticus*。除 10 和 25 号菌株外,所有弧菌整体上所表现的溶血圈平均直径达到 19mm,远高于其他种属的细菌,由此展示出弧菌作为潜在致病菌的可能。而致病性弧菌引发鲍的各种疾病已有陈信忠、龚艳清等报道过^[19]。

在以溶血磷脂酶基因 Tlh 为靶的 PCR 扩增中,有 16 株菌株出现阳性,其中 50% 是弧菌(8/16 株);除 6 号菌株为 *Vibrio cholerae* 外,其余 7 株同属 *Vibrio alginolyticus*。考虑到 Beltran 等^[21]的研究已证明 *Vibrio alginolyticus* 有能力导致鲍苗的死亡,因此进一步的工作将侧重于针对它们的研究。

3 小结

通过对来自鲍苗掉板池中所分离到的 35 株菌的毒力因子分析,我们可以发现,它们均具有较强的分泌蛋白酶、明胶酶、脂肪酶以及溶血能力。和其它菌株相比,分离自变白鲍苗的 8 株菌(菌株 1、2、3、5、9、13、16 和 21),它们或者分泌多种胞外酶的能力较强,或者溶血能力最强。未来的工作将优先研究这 8 株菌对鲍苗的影响。

参 考 文 献

- [1] 张朝霞,王 军,张蕉南,等. 东山九孔鲍细菌性疾病研究. 台湾海峡, 2001, 20(2): 193 - 200.
- [2] Anguiano B C. Pathogenic effects of *vibrio alginolyticus* on larvae and postlarvae of the ren abalone. *J Dis Aquatic Organisms*, 1998, 33(2): 119 - 122.
- [3] Travis J, Maeda H. A bacterial proteases pathogenic factors. *Trends Microbiol*, 1995, 3 : 405 - 407.
- [4] Ghannoum M A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*, 2000, 13 : 122 - 143.
- [5] 张朝霞,苏永全,王 军,等. 斑节对虾病原菌河流弧菌(I 型)的研究. 中山大学学报(自然科学版), 2000, 39(3): 208 - 214.
- [6] 牟海津,李 绮,包振民,等. 副溶血弧菌胞外产物对中国对虾的致病性分析. 海洋与湖沼, 2000, 31(3): 273 - 281.
- [7] 林天龙,陈日升,董传甫,等. 欧鳗嗜水气单胞菌的分离、鉴定和特性分析. 福建农业学报, 2001, 16(4): 35 - 40.
- [8] 李太武,苏秀榕,丁明进. 皱纹盘鲍脓疱病菌—河流弧菌 II 胞外产物的研究. 辽宁师范大学学报(自然科学版), 1999, 22(3): 231 - 235.
- [9] Taniguchi H, Hirano H, Kubomura S, et al. Comparison of the nucleotide sequences of the genes for the thermolabile hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*. *Microb Pathogen*, 1986, 1 : 425 - 432.
- [10] 倪纯治,叶德赞,林燕顺,等. 大亚湾和厦门港水域的嗜盐弧菌. 海洋学报(中文版), 1995, 17(5): 124 - 129.
- [11] 许 兵,纪伟尚,徐怀恕,等. 中国对虾病原菌及其致病机理的研究. 海洋学报, 1993, 15(1): 98 - 107.
- [12] Mournay A, Kilbertus G J. Simple media conditioning stabilized tributyrin for demonstrating lipolytic and soils. *Appl Bacteriol*, 1976, 40 : 47 - 51.
- [13] Mccarthy S A, Depaola A, Cook D W, et al. Evaluation of alkaline phosphatase and digoxigenin labeled probes for detection of the thermolabile hemolysin (tlh) gene of *bibrio parahaemolyticus*. *Lett Appl Microbiol*, 1999, 28(1): 66 - 70.
- [14] Nishibuchi M, Ishibashi M, Takeda Y, et al. Detection of the thermostable direct hemolysin gene and related DNA sequences in *Vibrio parahaemolyticus* and other *Vibrio* species by the DNA colony hybridization test. *Infect Immun*, 1985, 49 : 481 - 486.
- [15] 吴振龙,聂 军,鲍慧宁,等. 副溶血弧菌耐热直接溶血素基因的克隆. 第一军医大学学报, 2001, 21(2): 136 - 139.
- [16] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁,黎孟枫,等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1999 : 19 - 30.
- [17] 熊 焰,周 煜,汪开毓,等. 影响嗜水气单胞菌溶血素产生的因素. 中国兽医科技, 1997, 27(7): 25 - 28.
- [18] 朱越雄,曹广力. 嗜水气单胞菌溶血毒素对草鱼血细胞的溶血作用. 水产养殖, 2000, 6 : 27 - 30.
- [19] 陈信忠,龚艳清. 我国鲍养殖病害研究进展. 福建水产, 2002, 28 : 8 - 14.

Studies on extracellular virulent factors produced by potential pathogenic bacteria isolated from Abalone postlarvae and biofilms

WANG Zhi CAI Jun-peng* XU Li YANG Ji-xia ZHANG Xin

(College of Food Science and Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract : To find out the potential pathogen(s) that caused massive death of abalone postlarvae (*Haliotis diversicolor supertexta*) in Southern China, 105 bacterial strains were isolated from the water, whitened postlarvae and their biofilms of an abalone farm in Guangdong Province. Extra-cellular protease, gelatinase, lipase as well as haemolysis tests were performed on them. Lysophospholipase (Tlh)-targeted PCR was also carried out in order to reveal if the haemolysis caused by bacterial strains were related to Tlh. Results showed that 35 out of 105 strains possessed extra-cellular enzymatic abilities and strains 1, 2, 3, 5, 9 and 16 were the most powerful ones of all. Among these 35 strains, 85.6% strains (30/35) possessed haemolytic activities on goat blood agar and specific PCR revealed that 16 strains were PCR positive, indicating that they contained Tlh genes. In order to identify these strains, API 20 E strips were employed and results indicated that 50% were vibrios, among them *Vibrio alginolyticus* composed 70% of the vibrio population. In conclusion, compared to other strains, 6 *Vibrio alginolyticus* (strain 1, 2, 3, 5, 13, and 16) and 2 *Vibrio parahaemolyticus* (strain 9 and 21) which all were isolated from whitened abalone postlarvae, warrant further studies due to their better abilities in extra-cellular enzyme(s) production and/or haemolytic activities.

Key words : Abalone postlarvae (*Haliotis diversicolor supertexta*), Massive death, Extra-cellular produces, Haemolysis

Foundation item : Natural Science Foundation of Guangdong Province (020964); Project of " building a world class university " of South China University of Technology (321-D76020)

* Corresponding author. Tel : 86-20-87538286 ; E-mail : febjpc@scut.edu.cn

Other authors : SONG Zhi-ping, CHEN Hui-yuan

Received date : 11-25-2004