

文章编号: 1004-0374(2008)05-0768-05

海洋硅藻附着研究进展

李燕¹, 高亚辉², 李雪松², 杨金莹¹, 阙国和¹, 吕建仁^{1*}

(1 中国石油大学(华东)生物工程与技术中心, 青岛 266555; 2 厦门大学生命科学学院, 厦门 361005)

摘要: 随着人类对海洋资源的进一步开发和利用, 越来越多的人工设备用于水下操作, 而海洋生物污损在很大程度上制约了这些设备的应用, 给人类带来重大的经济损失。因此, 海洋生物污损的形成机制与防治成为当前研究的一个热点。海洋硅藻是海洋生物污损过程中形成生物膜的主要物种, 其在水下固相表面的附着可诱导大型污损生物的附着, 从而影响生物污损群落的形成。本文综述了硅藻在固相表面的附着机理、固相表面性质对硅藻附着的影响及具有应用前景的广谱抗污损高分子材料的研究进展, 并展望海洋硅藻附着研究前景。

关键词: 生物污损; 硅藻; 附着; 胞外聚合物物质

中图分类号: X55; Q949.27 **文献标识码:** A

Research progress on marine diatom adhesion

LI Yan¹, GAO Ya-hui², LI Xue-song², YANG Jin-ying¹, QUE Guo-he¹, LÜ Jian-ren^{1*}

(1 Center for Bioengineering and Biotechnology, China University of Petroleum, Qingdao 266555, China; 2 School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Large numbers of artificial equipments were used underwater for the exploitation of marine resource, which was restricted by marine biofouling. The mechanism and removal of marine biofouling had become the focus of the current research. Diatom is one of the most important microfoulers in the marine fouling biofilms, and its adhesion to marine submerged substratum directly influences the subsequent adhesion of macrofoulers as well as the formation of fouling organism community. The mechanisms and behaviors of diatom adhesion to surfaces with different physico-chemical properties and the potential broad-spectrum antifouling polymers were highlighted.

Key words: biofouling; diatom; adhesion; extracellular polymeric substance (EPS)

固相表面浸入海水后, 十几分钟内就会富集上一层有机物, 紧接着细菌和硅藻等微生物相继在这层有机物上附着生长, 形成一层由水、有机物、微生物及其胞外代谢产物组成的生物膜。生物膜的形成可进一步促使藤壶、贝类以及无脊椎动物等大型污损生物在固体表面附着生长, 最终形成复杂的污损生态群落^[1]。水下作业设施表面生物污损层的形成, 增加了水下作业系统的重量和运动摩擦力, 从而增加了作业过程的能耗; 同时, 生物污损层的形成还加速了这些系统部件的腐蚀, 严重影响其操作效率, 给航运、海防、海洋开发及水产养殖业等

海洋作业过程带来重大安全隐患及经济损失, 如全世界每年仅用在处理船舶生物污损一项的经费就高达数十亿美元。

生物膜几乎存在于所有的水下表面上, 其形态和结构在很大程度上决定大型污损生物的附着, 并影响整个生物污损层的形成^[1]。此外, 生物膜的存

收稿日期: 2008-04-14; 修回日期: 2008-05-23

基金项目: 中国石油大学(华东)生物工程与技术中心
专项基金

* 通讯作者: E-mail: lujr@upc.edu.cn

在是刺激海洋大型附着生物幼虫附着变形的最重要的环境刺激信号之一^[2]。水下表面,尤其是可见光照的部分,生物膜中硅藻的比例较高。Horbund和Freiberger^[3]将生物膜分为细菌层和硅藻层,并认为细菌层形成后有助于硅藻的附着,而大型污损生物优先选择硅藻层附着。生物膜中硅藻的种类、密度和性质对多种无脊椎物种的变形时间和变形率具有重要影响。Chiu等^[4]用硅藻和细菌比例不等的一系列生物膜考察香港优势污损物种指甲履螺(*Crepidula onyx*)的变形行为,发现硅藻与细菌对指甲履螺变形的影响同等重要。Dahms等^[5]用没有生物膜的表面、三种细菌生物膜的表面、五种硅藻生物膜表面、细菌和硅藻混合生物膜表面以及在海洋中浸泡5d形成的自然生物膜表面,考察污损物种草苔虫(*Bugula neritina*)幼虫在其上的附着性质发现,几种硅藻包括曲壳藻(*Achnanthes* sp.)、咖啡形双眉藻(*Amphora coffeaeformis*)、细丝双眉藻(*Amphora tenerrima*)、缢缩菱形藻(*Nitzschia constricta*)等形成的生物膜和自然生物膜上草苔虫幼虫附着量最大,这表明了硅藻在海洋污损过程中的重要作用。因此,深入研究硅藻在固相表面的附着机理及其在生物污损中的作用,以及不同高分子防污材料对硅藻污损的防治作用,对指导海洋防污材料的开发具有重要价值。

1 海洋硅藻

硅藻是海洋生态系统中最主要的初级生产者,具有种类多、数量大、繁殖快等特点,在海洋生态系统的物质循环与能量流动中占有极其重要的地位。硅藻是具有有一层硅质外壳的单细胞微藻,其细胞形似一个表面皿,两个硅质壳通过环状腰带套在一起。硅藻个体大小从二微米到几个毫米不等,大多数不超过200 μm 。按细胞壳面花纹对称方式,硅藻可分为中心对称的中心纲硅藻和两侧对称的羽纹纲硅藻。中心硅藻一般浮游生活,而羽纹硅藻主要以底栖方式生存。大部分羽纹硅藻壳面都有连接细胞质和外部环境的纵向壳缝,它可以决定硅藻细胞在固相表面的附着和滑行能力^[6]。海洋环境中存在约10 000个的硅藻物种中,仅有8—10种参与了海水中固相表面的污损^[7]。

2 硅藻的胞外聚合物(extracellular polymeric substance, EPS)

硅藻EPS除了具有稳定其栖息环境、集群、降低渗透压、抗干燥和防止细胞去硅化等作用,还可

帮助硅藻细胞在固相表面附着和滑行^[8]。Acre等^[9]将单个硅藻细胞固定在原子力显微镜的悬臂上形成生物力探针,然后测定其与不同性质表面的作用力发现,不同生长时期的舟形藻(*Navicula*)细胞在石英、污损释放涂料 Intersleek 表面上的脱附功能与固相的表面性质及细胞自身的生长状态没有关系,说明细胞在固相表面的附着特性主要由细胞EPS的性质决定。

硅藻EPS可聚集成柄状、顶垫状、纤丝状、管状和细胞覆层等许多结构^[1],它们的功能各不相同,其中与附着有关的主要有柄状、顶垫状和细胞覆层EPS(图1)。柄状EPS为永久附着结构,包括与表面相连的圆盘、与胞膜相连的领圈、分开细胞和表面的梗三个区域^[1, 10]。柄状EPS将细胞从附着表面举起,以帮助细胞竞争营养和光,并避免细胞与有毒抗污损涂层的接触,同时还可直接影响污损生物层的垂直结构。顶垫状EPS可以作为成链硅藻的连接结构,也可以将细胞连接在固相表面上。细胞覆层EPS是采取俯卧姿态与表面接触的藻种特有的EPS形态,它紧紧包裹在细胞外面,将俯卧硅藻牢牢黏在固相表面上,使细胞具有较强的抗水流冲击能力^[1]。细胞覆层EPS可分为紧紧包裹细胞的鞘状EPS和相对较为松散的囊状EPS。

硅藻EPS的主要成分是含有糖醛酸和硫取代基的酸性多糖,蛋白质只在少数几个物种,如南极硅藻(*Berkeleya rutilans*)^[11]、长柄曲壳藻(*Achnanthes*

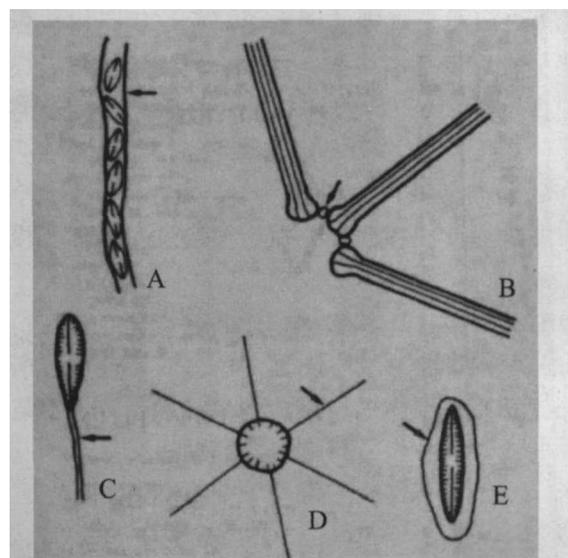


图1 硅藻EPS形态示意图

注: A: 管状EPS; B: 顶垫状EPS; C: 柄状EPS; D: 纤丝状EPS; E: 细胞覆层EPS

longipes)^[11]和新月筒柱藻“*Cylindrotheca closterium* (Ehr.) Reinman et Lewin”^[12]中报道。尽管目前尚未明确硅藻 EPS 中的何种成分(包括多糖、糖蛋白和蛋白糖等)主导硅藻细胞的附着过程,但相关研究已取得了一定进展。Wang 等^[13]发现抑制胞外多糖合成的药物 2,6-二氯苯甲腈及其类似物能可逆地阻止长柄曲壳藻在 Spurr 树脂上的附着和滑行,并导致柄状 EPS 这一永久附着结构无法形成,显示胞外多糖与细胞滑行及永久附着直接相关。Lind 等^[6]以并基辐节藻(*Stauroneis decipiens*)的胞外聚合物为抗原,制备得到两种单克隆抗体 StF.H4 和 StF.H5。其中, StF.H4 可与四种硅壳外蛋白糖(相对分子质量分别为 87、112 和 >200k)上的一个高碘酸盐不敏感抗原结合位点(即非糖结合位点)键合,而 StF.H5 可与相同系列蛋白糖上的糖类结合位点键合。将此两种单抗作用于并基辐节藻的 EPS 发现,单抗 StF.H4 键合到细胞壳缝及细胞滑行轨迹处的 EPS 后,抑制了细胞在玻璃表面的附着和滑行,而键合到同样部位的 StF.H5,对细胞的附着和滑行没有明显作用,表明硅藻胞外蛋白糖调节细胞附着和滑行过程很大程度取决于其分子的蛋白结构部分。

硅藻 EPS 的物理性质也可反映出决定细胞附着 EPS 的结构信息。海洋底栖中心硅藻 *Toxarium undulatum* 是低表面能涂料 Intersleek 上的主要污损生物,其细胞通过 EPS 顶垫附着在固相表面。用原子力显微镜的单分子力谱技术研究 *T. undulatum* 的顶垫 EPS 发现,原子力显微镜探针与顶垫之间作用力-距离曲线呈规则的锯齿形,而这正是模块蛋白的典型指纹特征曲线^[14]。用聚合物的蠕虫状链模型来拟合这种 EPS 力-距离曲线,按曲线的特征参数,如平均断裂力、平均余辉时间等,可将 *T. undulatum* 细胞 EPS 垫上的力-距离曲线分为 5 个类型,并推测此 5 种曲线分别为模块蛋白单体、模块蛋白寡聚体、模块蛋白组装成的粘性纳米纤维 (ANF) I、ANF II 和 ANF III 的特征曲线。在得到的力-距离曲线中,模块蛋白单体的特征曲线所占比例极小,主要为模块蛋白纳米纤维超分子组装体特征曲线。进一步分析这些特征曲线发现,所有的纳米纤维超分子结构均由同一个模块蛋白平行组装而成^[15]。

3 硅藻的初始附着和滑行

硅藻在固相表面的附着过程包括到达表面后着陆、初始附着、滑行及永久附着四个步骤^[16]。如

悬浮状态的并基辐节藻细胞在重力、水流作用下被动到达固相表面,通过细胞和固相表面之间存在的化学引力暂时与固相表面结合。到达表面的细胞大部分以腰带面着陆,偶以壳面或顶端着陆。以壳面和顶端着陆的细胞可在固相表面立即开始滑行,而以腰带面着陆的细胞,可在着陆 30—90s 内通过两个壳面分泌的、与表面相连的 EPS 带间的拔河竞争重新调整姿势,变成壳面着陆,然后开始滑行,直至达到合适的附着位置形成永久附着结构^[6]。硅藻的初始附着可以是暂时的,也可以是永久的,以利于细胞选择合适的生存环境。对比永久附着,硅藻仅在初始附着阶段消耗大量能量。硅藻细胞在固相表面的初始附着与滑行直接影响其永久附着,控制硅藻的初始附着成为防止海洋生物污损的有效途径^[16]。

滑行是硅藻在固相表面特有的运动方式,其机理至今尚不清楚。Poulsen 等^[17]考察从澳大利亚不同港口分离得到的四株硅藻:*Craspedostauros australis*、菱形藻(*Nitzschia* sp.)、羽纹藻(*Pinnularia* sp.)及 *Craticula* spp. 时发现,抗肌动蛋白药物作用细胞后,细胞的滑行受抑制;药物解除后,细胞立即恢复其肌动蛋白染色特性及在玻璃表面的滑行能力。同样,一种抗阻凝蛋白对硅藻细胞的滑行同样具有可逆抑制作用,而抗微管药物对其没有明显影响。这在很大程度上说明硅藻细胞滑行是在肌动蛋白/阻凝蛋白的联合作用下实现的。尽管硅藻细胞在固相表面的滑行影响其永久附着,但 Holland 等^[18]发现,硅藻在特定固相表面的运动能力和附着强度并无明显关联。因此,硅藻在特定固相表面上的运动能力不能作为评价其永久附着强度的指标。

4 固相表面性质对硅藻附着行为的影响

固相表面的物理性质,包括粗糙度、微观拓扑结构以及润滑性等都会影响硅藻细胞的永久附着。与大部分污损生物一样,硅藻细胞容易附着在较为粗糙的表面上。考察硅藻细胞在添加了聚四氟乙烯超细粉末的氟碳树脂基涂层上的附着行为发现,随聚四氟乙烯含量增加,涂层表面粗糙度下降,涂层上被硅藻附着的面积呈比例递减。此外,硅藻更易于附着于具有微细缝隙的涂层表面^[19]。固相表面的微观拓扑结构对硅藻附着的影响可以通过接触点理论阐释,即藻类细胞与固相表面的作用力随着两者的接触点增加而加强,而固相表面的微观拓扑结构可以通过影响细胞与表面的接触点而影响细胞与表面的作用强度。Scardino 等^[20]对比了四种

大小在1—14 μm 范围内的硅藻在激光蚀刻聚酰亚胺表面的附着时发现,细胞个体若比微纹理尺度大,则由于接触点少而使其在表面附着能力降低。表面的润滑性质对硅藻细胞附着量和附着强度影响有限。用碳链分别为8、10、12、16、18的烷基硫醇在金表面形成单分子自组装层(single molecular assembly monolayers, SAMs),其表面的水接触角变化不大,但是随着碳链长度变大,表面摩擦系数降低。*Navidula perminuta*细胞在这种SAMs上的附着量随着碳链长度变大稍有增加。而在一定流体剪切作用下,当SAMs表面摩擦系数小于0.3时,硅藻细胞的去除比例随摩擦系数增大而减小;当摩擦系数大于0.3时,附着量基本保持稳定^[21]。

固相表面的化学性质对硅藻细胞的附着有较大影响,特别是表面自由能。不同于其他大部分污损生物(如绿藻孢子等),硅藻在低表面能固相表面的附着强度大于在高表面能表面上的附着强度。硅藻这一附着特性在许多研究中均得到证实。Finaly等^[22]用甲基硫醇、羟基硫醇或者两者的混合物自组装成单分子膜,得到一系列性质均一、表面能呈梯度变化的表面,然后考察双眉藻(*Amphora* spp.)在其上的附着性质时发现,细胞在不同水接触角的表面附着数量基本相同,但一定水力剪切作用下,硅藻难以从水接触角较大的表面即表面能较高的表面脱附。当表面的水接触角大于60°时,双眉藻*Amphora*细胞因为与表面之间的作用力太强而被“固定”,无法滑行。Holland等^[18]考察三株常见的污损硅藻咖啡双眉藻(*Amphora coffeaeformis* var. *perpusilla* Cleve)、*Craspedostwuros australis* Cox和极细舟形藻(*Navicula perminuta* Grunonw)在疏水的聚二甲基硅氧烷(polydimethyl siloxane elastomer, PDMSE)表面和亲水的酸洗玻璃上的附着时发现,尽管不同种类硅藻在同一表面的附着强度不同,但它们在PDMSE表面比在玻璃表面的附着能力更强。这解释了强水流剪切条件下,无毒低表面能抗污损涂料PDMSE表面上包括细菌在内的大部分污损生物可被剥离,硅藻黏膜却无法去除^[9]。Krishnan等^[23]用含有聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)侧链和液晶态的氟化侧链嵌段共聚物分别形成亲水和疏水表面,考察舟形藻在其上的附着时发现,在一定大小的水剪切力作用下,舟形藻细胞更容易从高表面能的PEG聚合物表面剥离,说明舟形藻细胞在低表面能氟化聚合物表面的附着强度更大。

5 广谱抗污损材料研究进展

海洋硅藻对水下固相界面的附着广泛而顽固^[24],如在被国际海事组织禁止使用的毒性三丁基锡涂层表面亦有硅藻的附着^[25],强的水流剪切力也无法剥离PDMSE上附着的硅藻膜。而固相表面一旦被硅藻占领,其他污损生物随之而上,最终导致防污涂料失效。因此,开发对包括硅藻在内的各种污损生物广谱有效的抗污损材料是解决生物污损问题的必然途径。

绿藻石莼(*Ulva*)和硅藻舟形藻作为两种不同附着性质的代表污损物种,常被用来评价材料的抗污损性能。Krishnan等^[26]在考察一种具有PEG和氟烷单元的两性嵌段共聚物侧链的梳状高分子材料的污损释放性质时发现,这种梳状高分子材料对绿藻*Ulva*孢子、孢苗的剥离效果与PDMSE相当,而对硅藻的剥离效果比PDMSE要好。这可能是由于此种材料的表面在浸入水下后发生结构重组,形成PEG化的亲水表面,而舟形藻对亲水表面的结合力弱。对绿藻的剥离机理无法精确解释,可能是生物膜形成后,表面的疏水链氟烷基起剥离作用。

Statz等^[27]用左旋多巴(L-dihydroxyphenylalanine, DOPA)与金属之间的强作用力将以DOPA的三聚体为终端的PEG链固定在金属Ti表面,并对比了PEG-DOPA₃改性的Ti、SilasticT2(一种PDMSE)以及金属Ti对舟形藻和绿藻缘管浒苔(*Ulva linza*)孢子的污损剥离效果发现,两种细胞在PEG-DOPA₃改性的表面上的附着量相对于其他表面要少,并且在一定的水剪切力作用下,PEG-DOPA₃改性表面上细胞的剥离比例最大,说明这种聚合物具有抗硅藻及其他生物污损的应用前景。

6 展望

硅藻是引起海洋生物污损过程的初始附着生物之一^[1],其在固相表面附着具有一定的顽固性^[15,18]。以硅藻为对象,开展海洋生物污损层的形成过程及相关机理研究,对深入揭示海洋生物污损的形成过程具有重要意义。随着显微表征技术与物理化学的交叉发展,原子力显微镜^[18]、石英晶体微天平^[7]、二次离子飞行质谱^[28]等手段陆续应用于研究细胞及生物大分子在固相表面的行为过程,这为我们深入研究生物污损生物膜以及污损生态群落的形成提供了重要手段。借鉴这些技术,开展硅藻吸附机理的相关研究,对于无毒、环境友好的抗污损材料开发具有极为重要的指导作用。

[参 考 文 献]

- [1] Hoagland KD, Rosowski JR, Gretz MR, et al. Diatom extracellular polymeric substances: function, fine structure, chemistry, and physiology. *J Phycol*, 1993, 29(5): 537-66
- [2] Holmstrom C, Rittschof D, Kjelleberg S. Inhibition of settlement of larvae of *Balanus amphitrite* and *Ciona intestinalis* by a surface-colonizing bacterium. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58(7): 2111-5
- [3] Horbund HM, Freiburger A. Slime films and their role in marine fouling: A review. *Ocean Eng*, 1970, 1(6): 631-4
- [4] Chiu JM, Thivagarajan V, Pechenik J, et al. Influence of bacteria and diatoms in biofilms on metamorphosis of the marine slipper limpet *Crepidula onyx*. *Mar Biol*, 2007, 151(4): 1417-31
- [5] Dahms H, Dobretsov S, Qian PY. The effect of bacterial and diatom biofilms on the settlement of the bryozoan *Bugula neritina*. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2004, 313(1): 191-209
- [6] Lind JL, Heimann K, Miller EA, et al. Substratum adhesion and gliding in a diatom are mediated by extracellular proteoglycans. *Planta*, 1997, 203(2): 213-21
- [7] Molino PJ, Hodson OM, Quinn JF, et al. Utilizing QCM-D to characterize the adhesive mucilage secreted by two marine diatom species in-situ and in real-time. *Biomacromolecules*, 2006, 7(11): 3276-82
- [8] Gebeshuber IC, Thompson JB, Amo YD, et al. *In vivo* nanoscale atomic force microscopy investigation of diatom adhesion properties. *Mater Sci Technol*, 2002, 18(7): 763-6
- [9] Acre FT, Avci RA, Beech IB, et al. A live bioprobe for studying diatom-surface interactions. *Biophys J*, 2004, 87(6): 4284-97
- [10] 王大志, 黄世玉, 程兆第. 三种海洋硅藻胞外多聚物形态、微细结构及组成的初步研究. *海洋与湖沼*, 2004, 35(3): 273-8
- [11] Wustman BA, Gretz MR, Hoagland KD. Extracellular matrix assembly in diatoms (Bacillariophyceae) I. A model of adhesives based on chemical characterization and localization of polysaccharides from the marine diatom *Achnanthes longipes* and other diatoms. *Plant Physiol*, 1997, 113(4): 1059-69
- [12] 陈长平, 高亚辉, 林 鹏. 盐度和 pH 对底栖硅藻胞外多聚物的影响. *海洋学报*, 2006, 28(5): 123-9
- [13] Wang Y, Lu J, Mollet JC, et al. Extracellular matrix assembly in diatoms (Bacillariophyceae) II. 2,6-dichlorobenzonitrile inhibition of motility and stalk production in the marine diatom *Achnanthes longipes*. *Plant Physiol*, 1997, 113(4): 1071-80
- [14] Dugdale TM, Dagastine R, Chiovitti A, et al. Single adhesive nanofibers from a live diatom have the signature fingerprint of modular protein. *Biophys J*, 2005, 89(6): 4242-60
- [15] Dugdale TM, Dagastine R, Chiovitti A, et al. Diatom adhesive mucilage contains distinct supermolecular assemblies of a single modular protein. *Biophys J*, 2006, 90(8): 2987-93
- [16] Wetherbee R, Lind JL, Burke J, et al. The first kiss: establishment and control of initial adhesion by raphid diatoms. *J Phycol*, 1998, 34(1): 9-15
- [17] Poulsen NC, Spector I, Spurck TP, et al. Diatom gliding is the result of an actin-myosin motility system. *Cell Motility Cytoskel*, 1999, 44(1): 23-33
- [18] Holland R, Dugdale TM, Wetherbee R, et al. Adhesion and motility of fouling diatoms on a silicone elastomer. *Biofouling*, 2004, 20(6): 323-9
- [19] 张占平, 刘 红, 齐育红, 等. 含 PTEE 氟涂层表面形貌对底栖硅藻附着的影响. *高分子材料科学与工程*, 2006, 22(6): 122-5
- [20] Scardino AJ, Harvey E, Denys R. Testing attachment point theory: diatom attachment on microtextured polyimide biomimics. *Biofouling*, 2006, 22(1): 55-60
- [21] Bowen J, Pettitt ME, Kendall K, et al. The influence of surface lubricity on the adhesion of *Navicula perminuta* and *Ulva linza* to alkanethiol self-assembled monolayers. *J R Soc Interface*, 2007, 4(14): 473-7
- [22] Finlay JA, Callow ME, Ista LK, et al. The influence of surface wettability on the adhesion strength of settled spores of the green alga *Enteromorpha* and the diatom *Amphore*. *Int Comp Biol*, 2002, 42(6): 1116-22
- [23] Krishnan S, Wang N, Ober CK, et al. Comparison of the fouling release properties of hydrophobic fluorinated and hydrophilic PEGylated block copolymer surfaces: attachment strength of the diatom *Navicula* and the green alga *Ulva*. *Biomacromolecules*, 2006, 7(5): 1449-62
- [24] Sekar R, Venugopalan VP, Satpathy KK, et al. Laboratory studies on adhesion of microalgae to hard substrates. *Hydrobiologia*, 2004, 512(1): 109-16
- [25] Casse F, Swain GW. The development of microfouling on four commercial antifouling coatings under static and dynamic immersion. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2006, 57(3): 179-85
- [26] Krishnan S, Ayothi R, Hexemer A, et al. Anti-biofouling properties of comblike block copolymers with amphiphilic side chains. *Langmuir*, 2006, 22(11): 5075-86
- [27] Statz AR, Finlay JA, Dalsin J, et al. Algal antifouling and fouling-release properties for metal surfaces coated with a polymer inspired by marine mussels. *Biofouling*, 2006, 22(6): 391-9
- [28] de Brouwer JFC, Cooksey KE, Wigglesworth-Cooksey B, et al. Time of flight-secondary ion mass spectrometry on isolated extracellular fractions and intact biofilms of three species of benthic diatoms. *J Microbiol Methods*, 2006, 65(3): 562-72