

中国希瓦氏菌 D14^T 的厌氧腐殖质呼吸

许志诚^{1,2}, 洪义国², 罗 微¹, 陈杏娟², 孙国萍^{2*}

(¹ 中国热带农业科学院橡胶研究所 儋州 571737)

(² 广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)

摘 要 实验证明, 希瓦氏菌新种 (*Shewanella cinica* D14^T) 在厌氧条件下可以利用多种有机酸盐和甲苯等环境有毒污染物作为电子供体, 以腐殖质作为唯一末端电子受体进行厌氧呼吸 (即醌呼吸)。电子在细胞膜呼吸链的传递过程中, 偶联能量的产生来支持菌体的生长, 1mmol/L AQDS 可支持细胞增殖约 60 倍。电子供体的氧化和唯一电子受体腐殖质还原之间存在着动态的偶联过程, 随着电子供体量的增加腐殖质还原的量也随之增加。典型呼吸链抑制剂诸如抑制 Fe-S 中心的 Cu²⁺, 甲基萘醌类似物标桩菌素, 抑制甲基萘醌氧化型向还原型转化的双香豆素和细胞色素 P450 的专一抑制剂甲吡酮等对腐殖质的还原有着极为显著的抑制作用, 为进一步证明希瓦氏菌 (*Shewanella cinica*) D14^T 可利用腐殖质进行厌氧呼吸提供了有力的佐证。而 D14^T 在进行腐殖质呼吸的同时, 对于甲苯, 苯胺等环境有毒物质的有效降解则具有着重要的环境学意义。

关键词: 中国希瓦氏菌 D14^T; 电子传递; 腐殖质还原; 腐殖质呼吸

中图分类号: X172 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2006)06-0973-06

腐殖质物质 (即醌类物质) 在地球的生态环境中大量存在, 它们的形成主要是来自植物组织的分解, 是一种具有羰基结构的高分子量的芳香族有机化合物, 这种结构使其具有可以容易结合疏水和亲水的物质的能力^[1]。但是, 过去普遍认为腐殖质极难被微生物自然降解, 尤其在污染物存在的环境中不能参与微生物的代谢过程^[2]。Lovley 最先提出腐殖质呼吸的概念, 他们以 *Geobacter metallireducens* 为研究对象, 发现该菌能够以腐殖质模式物 AQDS (anthraquinone-2,6-disulfonate) 为唯一电子受体氧化多种有机物或氢并支持菌体的生长。研究表明, 在腐殖质呼吸中, 主要是一些醌类物质 (quinone moieties) 起到电子受体的作用, 因此腐殖质呼吸又叫做醌呼吸 (quinone respiration)^[2]。

腐殖质还原细菌不仅能以腐殖质作为氧化还原中间体, 而且有能力将其作为唯一电子受体对环境中的多种有机物进行氧化, 并接受来自菌体细胞膜上电子传递链的电子从中获得生长所需的能量^[2,3,4]。在此过程中, 腐殖质自身还原成羟醌。因此, 此类微生物在有机污染环境的生物治理和生物修复中起着关键的作用, 是一类重要的环境微生物。

中国希瓦氏菌 (*Shewanella cinica*) D14^T 是本实验室从处理印染废水的活性污泥中分离到的一株希瓦氏菌新菌种^[5], 该菌具有广谱的染料脱色、Fe³⁺ 还原、硝酸盐还原、硫代硫酸钠还原等多种功能^[5]。本文将报道利用中国希瓦氏菌 D14^T 进行的有关厌氧腐殖质呼吸的研究结果。D14^T 菌株能利用腐殖质物质作为末端电子受体进行厌氧呼吸, 为菌体生长提供所需的能量。更重要的是 D14^T 可以利用甲苯、苯胺等重要的环境有毒污染物作为电子供体进行厌氧呼吸, 同时将其氧化降解。这对于深入理解细菌利用腐殖质作为电子受体在厌氧环境中对有毒物质的生物降解和转化具有重要的环境学意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 实验所用菌株中国希瓦氏菌 (*Shewanella cinica*) D14^T, 是本实验室分离的希瓦氏菌新菌种。该菌株已保藏于中国典型培养物保藏中心 (保藏号为 CCTCC M 203093) 和日本东京大学应用微生物研究所 (保藏号为 IAM 15094^T) 并已申请了国家发明专利 (专利申请号 200-310112361.7)^[5]。

基金项目: 国家 863 计划 (2003AA214040); 国家自然科学基金 (30500009); 广东省自然科学基金项目 (015017, 05100365); 广东省科技项目 (2004A30404002)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-20-87684471 E-mail: guopingsun@163.com

作者简介: 许志诚 (1979 -) 男, 山西大同人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物学研究。E-mail: menghu555 @163.com

其他作者: 许玫英², 郭 俊², 岑英华²

收稿日期: 2006-01-31; 接受日期: 2006-03-14; 修回日期: 2006-05-11

1.1.2 培养基 (1) HXM 培养基 :每升含 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.53g), $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.86g), NH_4Cl (0.96g), MgSO_4 (0.12g) 酵母抽提物 (0.2g), 少量维生素和微量无机盐^[6]。(2) 还原实验中在 HXM 培养基中添加一定量的 H_2 、甲酸钠、乳酸钠、丙酮酸钠、甲苯或苯胺做为电子供体, 加入腐殖质作为末端电子受体。

1.1.3 主要试剂 :实验所用腐殖质采用腐殖质构成单元的模式物 AQS (anthraquinone-2-sulfonate), AQDS (anthraquinone-2,6-disulfonate) 为分析纯, 购自 Sigma 公司。还原态 AQS (AH_2QS) 最大吸收峰为 398nm, 还原态 AQDS (AH_2QDS) 最大吸收峰为 450nm。

实验所用细菌呼吸链抑制剂均为分析纯, 其中甲吡酮 (Metryapone), 标桩菌素 (Stigma-tellin), 双香豆素 (Dicumarol) 购自 Sigma 公司。CuCl₂ 购自广东环凯微生物科技公司。

1.2 菌株 D14^T 的厌氧培养

将高纯氮气和二氧化碳混合气 ($\text{N}_2 : \text{CO}_2 = 4 : 1$) 通过一个装有细菌过滤器的塑胶管充入到装有培养液的培养瓶中 (充气时间 $\geq 15\text{min}$), 充气完毕用另一套过滤装置在瓶口剩余的空间充满高纯氮气, 并快速用丁基合成的橡胶塞将其密封放置在 Bugbox 厌氧工作站 (Ruskinm) 33℃ 静置培养。

1.3 D14^T 腐殖质还原的测定

在 HXM 培养基中培养过夜的菌液于 6000r/min 离心收集菌体, 用 0.07mol/L 的磷酸缓冲液 (pH 8.0) 洗涤菌体 2 次, 然后重悬于上述缓冲液中制成菌悬液。以 0.7% (V/V) 接种量接种于 HXM 培养基中, 添加腐殖质浓度为 1mmol/L。分别以不接种和不加甲酸钠的培养基为对照, 在相同的时间间隔测定其还原态的腐殖质的转化量, 以最大吸收峰时的吸光度值反映, 记录其变化。

1.4 腐殖质呼吸生长量的测定

在 HXM 培养基中接种 D14^T 菌, 加入不同电子供体, 以腐殖质模式物 AQS 或 AQDS 作为唯一的电子受体, 按上述厌氧培养方法在厌氧培养箱中 33℃ 培养。每隔一定的时间取样, 用梯度稀释平板计数法计数培养瓶中菌体的浓度 (cfu/mL)。

1.5 电子供体氧化与电子受体腐殖质还原的偶联

在 HXM 培养基中接种 D14^T 菌, 以甲酸钠为典型电子供体, 以腐殖质为唯一电子受体。将甲酸钠按照一定的浓度梯度添加入 11 个试剂瓶中, 添加腐殖质浓度均为 1mmol/L, 将试剂瓶在厌氧培养箱中

33℃ 培养。分别于 0h 和 60h 后测定还原态腐殖质的转化量, 以最大吸收峰时的吸光度值来反映, 记录其变化。

1.6 细菌呼吸链抑制剂对 D14^T 腐殖质呼吸的影响

选用 4 种典型的电子呼吸链抑制剂, 分别为标桩菌素、双香豆素、Cu²⁺ 和甲吡酮。按所需浓度加入到试剂瓶中, 菌体接种培养同 1.3, 培养基为 HXM 培养基, 添加腐殖质浓度为 1mmol/L。分别以不加和加一定量呼吸链抑制剂为处理, 按上述厌氧培养方法在厌氧培养箱中 33℃ 培养。在相同的时间间隔测定其还原态的腐殖质的转化量, 以其最大吸收峰的吸光度值来反映, 记录其变化。

1.7 环境有毒物质为电子供体时腐殖质对偶氮还原的影响

将不同的浓度梯度的腐殖质物质加入到含一定浓度偶氮化合物的 HXM 培养基中, 加入甲苯或者苯胺为电子供体作厌氧培养。分别在相同的时间间隔点取样, 测偶氮染料在最大吸收峰时的吸光度值, 进而分析不同浓度腐殖质对 D14^T 偶氮还原的影响。

2 结果和讨论

2.1 菌株 D14^T 的腐殖质还原

腐殖质 (例如: AQDS, AQS, AQC, PQ, LQ 等) 之所以具有接受电子并转移电子的能力, 是因为其主要组成成分为醌类物质。其作用机制是通过氧化态的羰基结构与还原态的羟醌形式循环转化来完成。本实验以腐殖质构成单元的模式物 AQS, AQDS 进行研究。将 D14^T 菌 (接种量为 0.7% (V/V)) 分别接种于起始浓度为 1mmol/L 的 AQDS 和 AQS 的 HXM 培养基中, 电子供体分别为甲酸钠和甲苯, 将其在厌氧工作站中静置培养, 观察 D14^T 对 AQDS 和 AQS 的还原。结果发现, 甲酸钠作为电子供体时, 在反应开始的 10h 内, D14^T 将 AQDS 迅速还原, 还原态的 AQDS 在其最大吸收峰 450nm 处的吸光值达到 2.2 左右, 在后续的 40h 内基本保持在 2~2.5 的范围内变化。而 AQS 在直到 10h 后才开始被 D14^T 还原, 在 50h 达到最高值。这可能是因为 AQDS 与 AQS 的化学结构不同从而表现出 D14^T 菌对其不同的适应性。甲苯作为电子供体时, D14^T 在反应开始的 10h 内对 AQDS 和 AQS 都没有明显的还原现象, 在后续的时间中表现出了对腐殖质的快速还原 (图 1)。同时, 不加菌体的对照都没有产生还原态的 AH_2QDS 和 AH_2QS , 不加电子供体甲酸钠的对照组有微量的还原态的 AH_2QDS 和 AH_2QS 形成。其原因可能是因

为培养基中含有微量的酵母抽提物,从而为菌体的生长提供所需的还原力,但远低于以甲酸钠为电子供体的实验组值。以上结果可以证明,是 D14^T 菌的生理活动将 AQDS 和 AQS 等腐殖质还原,形成相应

还原态的羟醌 AH₂QDS 和 AH₂QS。还原态的羟醌 AH₂QDS 和 AH₂QS 暴露在空气中后,橙色很快消失。这说明还原态羟醌极易被氧气氧化,重新转化为 AQDS 和 AQS 的氧化态形式(数据未列出)。

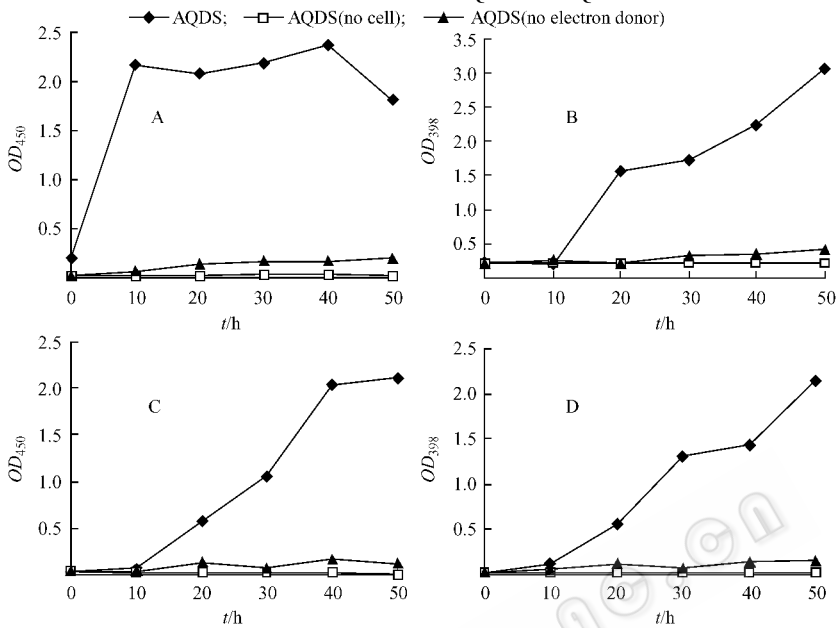


图 1 D14^T 对腐殖质物质 AQDS 和 AQS 的还原

Fig.1 Reduction of AQDS and AQS by *S. cinica* D14^T. A: AQDS reduction with formate as electron donor; B: AQS reduction with formate as electron donor; C: AQDS reduction with toluene as electron donor; D: AQS reduction with toluene as electron donor.

2.2 以腐殖质为唯一电子受体时菌株 D14^T 的生长

目前,在有机物含量丰富的沉积物、土壤以及废水处理厂的活性污泥中发现了多种细菌具有腐殖质呼吸的能力,主要包括 Fe(III)还原菌(例如: *Geobacter* spp.)^[2,4,7],硝酸还原菌(例如: *Shewanella putrefaciens*)^[4],硫还原菌(例如: *Desulfuromonas* spp.)^[3],发酵细菌(例如: *Propionibacterium freudenreichii*)^[8],嗜热产甲烷古细菌(*Methanococcus thermolithotrophicus*)^[9]。为了研究 D14^T 菌能否利用腐殖质进行呼吸,把 D14^T 菌培养在只有 AQDS 或 AQS 为唯一电子受体的 HXM 培养基中,加入不同的电子供体在 33℃ 厌氧培养箱中培养。每隔 5h 取样,进行梯度稀释平板计数 D14^T 菌体量的变化,本实验以有机酸盐甲酸钠作为模式电子供体进行实验(图 2)。结果显示,前 10h 没有表现出明显的生长,这可能是由于菌体对整个反应体系适应的过程。在后续的时间中,D14^T 菌快速的生长,细胞数在 35h 达到 5.288×10^7 cfu/mL,约增殖 60 倍。而未加电子供体甲酸钠或未加电子受体醌类物质的两个对照都没有明显的生长表现。以上结果表明,在厌氧条件下 D14^T 菌具有腐殖质呼吸的能力,可利用 AQDS 为唯一电子受体耦联有机电子供体的氧化获得能量,

支持生长。同时,本实验还分别以 H₂、乳酸钠、丙酮酸钠、甲苯和苯胺作为电子供体进行实验,结果同样证明这几种物质可以支持 D14^T 进行厌氧腐殖质呼吸(数据未列出)。

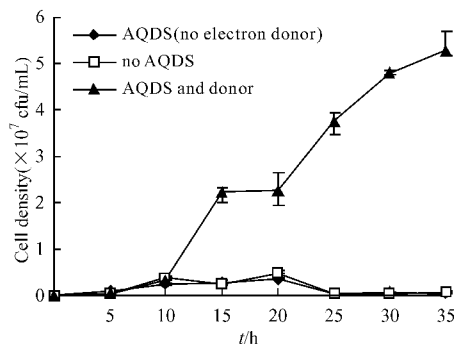


图 2 以甲酸钠作为电子供体, AQDS 作为唯一电子受体的 D14^T 的生长

Fig.2 Growth of D14^T with AQDS as sole electron acceptor.

2.3 电子供体氧化与电子受体腐殖质还原的耦联

随着电子供体甲酸钠量的变化,观察其氧化与唯一电子受体 AQDS 还原量的变化的耦联关系(图 3)。结果显示随着甲酸钠浓度的增加, AQDS 被还原的量也随着增加。按理论计算 1mol/L AQDS 还原需要 2mol/L 的甲酸钠来提供电子。所以甲酸钠在

0 ~ 2mmol/L之间变化时还原态 AQDS 量的变化与其浓度呈正相关的关系,而甲酸钠在 2 ~ 3mmol/L 之间变化时, AQDS 还原的量与其浓度的对应关系明显减弱,渐现平缓。实验结果证明,电子供体甲酸钠的氧化与 AQDS 的还原之间存在明显的偶联关系,并且呈现正相关的关系。

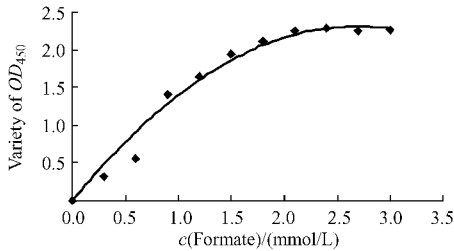


图3 甲酸钠氧化与腐殖质还原的偶联

Fig.3 Oxidization of formate coupled reduction of humus.

2.4 细菌呼吸抑制剂对 D14^T 腐殖质呼吸的影响

观察不同的呼吸链抑制剂对腐殖质呼吸的抑制时间过程(图4)。结果证明4种呼吸链抑制剂都对腐殖质的还原产生了显著抑制作用:标桩菌素在 10 μ mol/L 就明显对腐殖质还原产生抑制作用;双香豆素则在 50 μ mol/L 的浓度对腐殖质还原产生了一定的抑制作用,在 200 μ mol/L 时对腐殖质还原产生彻底抑制作用;Cu²⁺ 的抑制效果更为明显,在 14 μ mol/L 时产生明显的抑制现象。同样,50 μ mol/L 的甲吡酮很明显的抑制了腐殖质的还原。

在厌氧呼吸链的结构中,存在着泛醌或者甲基

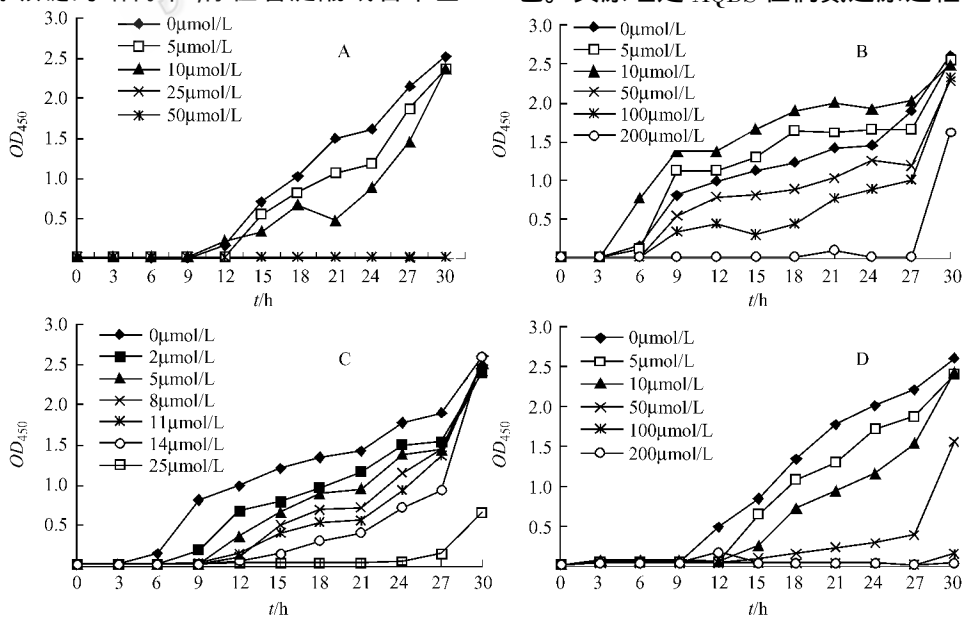


图4 电子传递链典型抑制剂对腐殖质呼吸的抑制

Fig.4 Model inhibitors of electron transfer chain inhibiting humus respiration.

A : Stigmatellin ; B : Dicumarol ; C : Cu²⁺ ; D : Metyrapone.

萘醌物质,它们在电子传递链中起着传递电子的作用。标桩菌素的抑制作用是因为其结构与这些醌类物质极为相似,这样产生了竞争抑制,阻止了该醌类物质与电子传递链中细胞色素 b 的结合,也就阻止了细胞色素 b 接受来自电子传递链的电子,从而对电子传递产生抑制作用^[10]。而双香豆素则是对厌氧呼吸链中的重要组成成分甲基萘醌的氧化态与还原态的重复转化产生了抑制作用,从而阻止了甲基萘醌对电子的传递。Cu²⁺ 则是与呼吸链始端脱氢酶的 Fe-S 蛋白的活性中心相结合,破坏了蛋白的活性中心,从而使该蛋白失去氧化电子供体的能力^[11]。甲吡酮是对电子传递链中的主要组成成分细胞色素 P450 酶产生抑制作用,其原理是因为与该酶的活性中心特异性的结合,使其活性中心的晶体结构发生了改变,从而使 P450 酶失去了对电子传递的能力^[12]。本实验更进一步的证明中国希瓦氏菌 D14^T 的腐殖质还原是与电子传递链密切相关的过程。

2.5 以环境有毒物质为电子供体的腐殖质对 D14^T 偶氮还原的影响

以甲苯为电子供体,苋菜红为模式偶氮染料,观察不同浓度 AQDS 对其还原的影响。每 8h 从 AQDS 不同梯度的处理取样测定在苋菜红最大吸收峰的 OD 值(图 5-A)。变化曲线可以明确的表现出 AQDS 对偶氮化合物苋菜红的还原影响。AQDS 3 个浓度梯度均能够显著的促进偶氮染料苋菜红的还原脱色。其原理是 AQDS 在偶氮还原过程中作为氧化还

原中间体接受来自甲苯提供的电子,自身被还原,生成羟醌。还原态的 AQDS 再将电子传递给偶氮染料断开双键,还原脱色。随着 AQDS 氧化态与还原态形式的循环转换对偶氮还原效率起到明显的促进效应。同时,甲苯失去电子被氧化降解为 CO₂^[7]。并且,苯胺已证实与甲酸钠一样也可以作为电子供体支持 D14^T 的厌氧腐殖质呼吸(数据未显示),其作为电子供体的 AQDS 对偶氮还原的影响同样体现出与甲苯相似的结果,但时间延长了 35h 左右(图 5-B),我们认为这是由于菌株对不同电子供体的特异性所致。我们推测将会有更多其它环境有毒物质可以作为电子供体支持 D14^T 的厌氧腐殖质呼吸,这需要进一步实验证明。

认为中国希瓦氏菌 D14^T 可以将腐殖质作为唯一电子受体进行厌氧呼吸。不仅如此,D14^T 还可以利用环境中有毒物质的电子(例如:甲苯、苯胺等),使其加速氧化降解,同时,腐殖质自身得到还原。

中国希瓦氏菌 D14^T 不仅具有着显著的偶氮还原能力^[5],而且具有明显的腐殖质还原能力,进行厌氧腐殖质呼吸。可以将腐殖质作为氧化还原中间体加速偶氮染料的还原降解^[13]。更重要的是它可以利用环境的重要污染物芳香族化合物作为电子供体加速其降解。据此开发污染物生态环境的生物修复技术和城市废水处理技术的具有着重要的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Coates JD, Cole KA, Chakraborty R, et al. Diversity and ubiquity of bacteria capable of utilizing humic substances as electron donors for anaerobic respiration. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(5): 2445 - 2452.
- [2] Lovley DR, Coates JD. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature*, 1996, **382**: 445 - 448.
- [3] Lovley DR, Fraga JL. Humic substances as a mediator for microbially catalyzed metal reduction. *Acta Hydrochim Hydrobiol*, 1998, **26**: 152 - 157.
- [4] Coates JD, Ellis DR, Roden E, et al. Recovery of humics-reducing bacteria from a diversity of sediment-ary environments. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 1504 - 1509.
- [5] 许玫英,郭俊,孙国萍,等.一株具有染料降解能力的希瓦氏菌新菌种. *微生物学报*, 2004, **44**(5): 561 - 566.
- [6] Wolin MJ, Wolin EA, Wolfe RS. ATP-dependent formation of methane from methylcobalamin by extracts of *Methanobacillus omelianskii*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1963, **12**: 464 - 468.
- [7] Coates JD, Bhupathiraju VK, Achenbach LA, et al. *Geobacter hydrogenophilus*, *Geobacter chapellei* and *Geobacter grbicie*, three new strictly anaerobic dissimilatory Fe(III)-reducers. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, **51**: 581 - 588.
- [8] Ben M, Schink B, Brune A, et al. Humic acid reduction by *Propionibacterium freudenreichii* and other fermentative bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 4507 - 4512.
- [9] Lovley DR, Kashefi K, Vargas M, et al. Reduction of humic substances and Fe(III) by hyperthermophilic microorganisms. *Chem Geol*, 2000, **169**: 289 - 298.
- [10] Hoehn K, Di X, Chang AY, et al. Inhibitor binding changes domain mobility in the iron-sulfur protein of the mitochondrial bc1 complex from bovine heart. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 8026 - 8033.
- [11] Victor MF, Maria LR, Presentacion R, et al. Inhibition of *Desulfovibrio gigas* hydrogenase with copper salts and other metal ions. *Eur J Biochem*, 1989, **185**: 449 - 454.

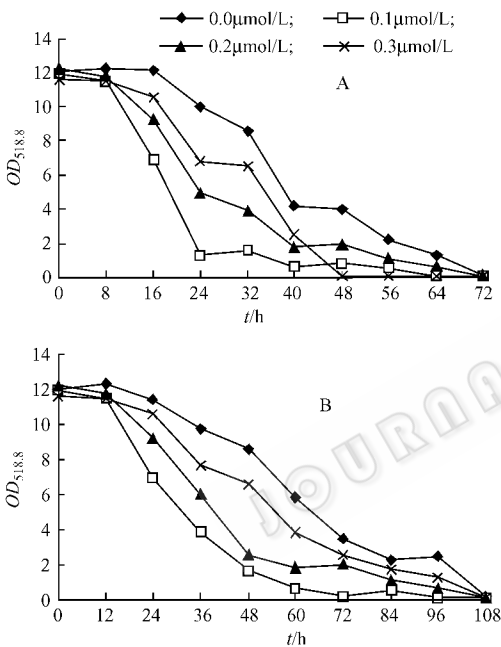


图 5 以甲苯或苯胺为电子供体的 AQDS 对苋菜红还原的影响

Fig.5 Effect of AQDS on amaranth reduction with toluene or aniline as the electron donor. A: Toluene as the electron donor; B: Aniline as the electron donor.

3 结论

上述试验结果证明:中国希瓦氏菌 D14^T 可以在厌氧的条件下以腐殖质作为唯一的电子受体,其接受来自菌体细胞膜上电子传递链的电子被还原。同时,在电子传递的过程中,菌体细胞膜内外形成质子浓度电势梯度,偶联能量的产生,从而支持菌体的生长,同时,电子供体甲酸钠的氧化与唯一电子受体腐殖质还原量的变化之间存在着正向的偶联关系;典型的呼吸链抑制剂实验更进一步证明腐殖质的还原是与电子传递链密切相关的过程。因此,我们

- [12] Williams PA , Cosme J , Vinkovic DM , et al . Crystal structures of human cytochrome P450 3A4 bound to Metyrapone and Progesterone. *Science* , 2004 , **305** : 683 – 686.
- [13] Rau J , Knackmuss HJ , Stolz A . Effects of different quinoid redox mediators on the Anaerobic reduction of Azo dye by bacteria. *Environ Sci Technol* , 2002 , **36** : 1497 – 1504.

Anaerobic humus respiration by *Shewanella cinica* D14^T

XU Zhi-cheng^{1,2} , HONG Yi-guo¹ , LUO Wei¹ , CHEN Xing-juan² , SUN Guo-ping^{2*}

(¹ Rubber Research Insititute , CATAS , Danzhou 571737 , China)

(² Guangdong Institute of Microbiology , Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application , Guangzhou 510070 , China)

Abstract : Experimental results suggested *Shewanella cinica* D14^T is capable of humus respiration utilizing various organic acids and some important environmental pollutants (e.g. , toluene. etc) as electron donors and AQS or AQDS as a sole terminal electron acceptor under anaerobic condition. The dissimilatory reduction of 1mmol/L AQDS can couple to the production of enough ATP to support cell growth about 60 generations ; The oxidization of electron donors was coupled to the reduction of humus , as reduced humus increased corresponding with increasing of electron donor ; The typical inhibitors such as Cu²⁺ which inhibited Fe-S center , Stigmatellin which was methyl-naphthoquinone model , Dicumarol which inhibited oxidized methyl-naphthoquinone transform to reduced one , Metyrapone which was specific inhibitor for P450 enzyme blocked the humus respiration seriously. These were powerful evidences for humus-respiration by D14^T.

Keywords : *Shewanella cinica* D14^T ; Electron transfer ; Humus reduction ; Humus respiration

Foundation item : Chinese National Programs for High Technology Research and Development(2003AA214040) ; Chinese National Programs for Natural Science Foundation (30500009) ; Guangdong Provincial Natural Science Foundation(015017 , 05100365) ; Guangdong Provincial Programs for Science and Technology Development(2004A30404002)

* Corresponding author. Tel/Fax 86-20-87684471 ; E-mail : guopingsun@163.com

Other authors : XU Mei-ying² , GUO Jun² , CEN Ying-hua²

Received : 31 January 2006 / Accepted : 14 March 2006 / Revised : 11 May 2006