

黄曲霉毒素对费氏弧菌发光的影响

李翔, 潘力, 王斌*

华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510006

摘要: 【目的】探讨黄曲霉毒素对一种发光细菌——费氏弧菌发光的抑制效应。【方法】黄曲霉毒素或产黄曲霉毒素的菌株培养液对费氏弧菌进行处理后, 利用多功能酶标仪检测费氏弧菌的发光强度, 研究黄曲霉毒素对费氏弧菌发光的影响。【结果】黄曲霉毒素浓度的对数值与费氏弧菌发光的抑制率呈线性关系, 依据所得的回归方程可以快速准确地检测不同微生物产毒素的情况: 6 株不同来源的黄曲霉菌株均能够产毒素, 以黄曲霉毒素含量表示的毒素量在 14.94-46.45 mg/L 之间, 1 株米曲霉不产毒素。【结论】费氏弧菌发光强度的改变可以较准确地反映微生物产毒素的能力, 尤其是微生物产黄曲霉毒素的能力, 为在工农业生产中快速检测黄曲霉毒素提供了新的线索, 有望发展成为一种检测黄曲霉毒素的新技术。

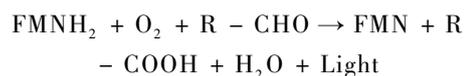
关键词: 黄曲霉毒素, 费氏弧菌, 光抑制, 生物毒素

中图分类号: Q93-3 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011) 12-1669-06

黄曲霉毒素是一类真菌毒素的统称, 主要包括 4 种 (B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2), 其中 B_1 毒性最强。黄曲霉毒素的毒性是氰化钾的 10 倍, 砒霜的 68 倍, 具有强烈的致癌性, 长期摄入黄曲霉毒素会诱发肝癌, 是目前公认的致癌性最强的物质之一。在发霉的大米、玉米、花生中都有发现黄曲霉毒素, 对我国的粮食生产和安全曾造成很大的危害。

自发现黄曲霉毒素以来, 建立了一系列检测黄曲霉毒素的方法, 早期的如 AOAC 法^[1]等, 最常用的是薄层层析法、高效液相色谱法 (HPLC) 等^[2], 近来发展的新方法包括 ELISA 法^[3]和免疫层析法^[4]等。尽管这些方法具有足够的灵敏度, 如 ELISA 法和 HPLC 法的检测限为 0.01-0.1 ppb (ppb 为质量体积浓度, 即 $\mu\text{g/L}$), 但其耗时长、配套设备昂贵。在检测多种毒性物质的综合作用或检测不明毒性物质的情况下, 生物法检测则具有明显的优势^[5]。

费氏弧菌发光是几种生物法毒性检测体系的基础, 包括检测污水、土壤等的化学毒性。发光细菌的发光过程是菌体新陈代谢中的一个生理过程, 是光呼吸进程, 该过程是呼吸链的一个侧支, 其发光波长在 490 nm 左右, 这种发光过程极易受到外界条件的影响, 凡是干扰或损害细菌呼吸或生理过程的因素都会使其发光强度发生变化。当毒性物质与发光细菌接触时, 会影响发光菌的新陈代谢而使其发光强度减弱。其反应机理如下列化学方程式所示^[6]。



本研究旨在通过分析黄曲霉毒素对费氏弧菌发光的抑制效应, 探索黄曲霉毒素影响费氏弧菌发光的规律, 为黄曲霉毒素的快速检测提供线索, 并期望建立检测黄曲霉毒素的新技术。

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (S2011040003020)

* 通信作者。Tel: +86-20-39380616; E-mail: btbinwang@scut.edu.cn

作者简介: 李翔 (1982-) 男, 湖南岳阳人, 硕士研究生, 从事工业微生物方面的研究。E-mail: lx1813@163.com

收稿日期: 2011-06-24; 修回日期: 2011-10-01

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:包括黄曲霉菌 6 株^[7]、米曲霉 1 株,购自广东省微生物研究所(GIM)、中国工业微生物菌种保藏中心(CICC)等单位。6 株黄曲霉为黄曲霉毒素产生菌,1 株米曲霉为野生型菌株,具体信息见表 1。

表 1 测试菌种

Name	Taxonomy	Source
GIM3.18	<i>Aspergillus flavus</i>	GIM
GIM3.17	<i>Aspergillus flavus</i>	GIM
CICC2219	<i>Aspergillus flavus</i>	CICC
CICC2390	<i>Aspergillus flavus</i>	CICC
CICC2402	<i>Aspergillus flavus</i>	CICC
CICC2404	<i>Aspergillus flavus</i>	CICC
<i>A. oryzae</i> niaD300	<i>Aspergillus oryzae</i>	Reserved in our laboratory

1.1.2 主要试剂和仪器:黄曲霉毒素 B₁ 分析纯购自 sigma 公司,其他常规试剂为国产分析纯试剂。使用的仪器包括 BioPhotometer 分光光度计(德国 Eppendorf 公司),Biofuge stratos 型高速冷冻离心机(德国 SORVALL 公司),SpectraMax M5 多功能酶标仪(美国分子仪器公司),PURELAB PLUS 型纯水仪(美国 Pall 公司)等。

1.2 费氏弧菌冻干粉制备

费氏弧菌冻干粉制备参照 ISO-11348 标准。按 OD₆₀₀ = 1 的菌浓度加入保护剂后分装到 2 mL 无菌 EP 小管中,每管 100 μL,真空冷冻干燥后 -20℃ 保存备用。

1.3 黄曲霉毒素样品制备

将黄曲霉毒素 B₁ (分析纯)溶于丙酮,浓度为 1000 mg/L,用无菌水作为稀释液,按 10 倍梯度稀释所得黄曲霉毒素 B₁ 的丙酮溶液得到浓度为 1000 mg/L、100 mg/L、10 mg/L、1 mg/L、0.1 mg/L、0.01 mg/L、0.001 mg/L 的 7 种黄曲霉毒素溶液,调整 pH 值至 7.0 ± 0.1。空白对照为不含黄曲霉毒素 B₁ 的丙酮的水溶液,按黄曲霉毒素 B₁ 的制备方法进行梯度稀释,每一稀释度做一个空白对照,并调 pH 值至 7.0 ± 0.1。然后按 20 g/L 的比例在样品和空白对照中分别加入适量的 NaCl 并混合均匀。

1.4 检测黄曲霉毒素对费氏弧菌发光的抑制

取一管费氏弧菌,加入 100 μL 4℃ 无菌水复苏 10 min,然后取 10 μL 复苏菌液至无菌的 2 mL 离心管

(EP 管)中,加入 500 μL 活化液(2% NaCl、0.2035% MgCl·6H₂O、0.03% KCl),15℃ 条件下活化 15 min。保持酶标仪检测室温度为 15℃,用多功能酶标仪测发光量,记为 I₀;然后加入已恒温至 15℃ 的等体积配制好的黄曲霉毒素溶液,混合均匀,然后用酶标仪分别测定 5 min、15 min 和 30 min 时的发光量,分别记为 I₅、I₁₅、I₃₀。通过以上数据计算 EC₅₀ (细菌的发光量抑制率达到 50% 时黄曲霉毒素溶液的浓度)。费氏弧菌的敏感性用 ZnSO₄ 来校准^[8],按抑制率与黄曲霉毒素 B₁ 浓度的对数作图。

1.5 曲霉培养上清液的制备和处理

将 6 种黄曲霉和一株米曲霉菌接种到 PDA 培养基斜面,30℃ 培养 7 d 至产生孢子。用 5 mL 1% Tween80 溶液洗涤斜面培养物收获孢子,所得混合液经过滤除去菌丝后得到孢子悬液,分装保存备用。各取 7 株菌的孢子悬液,按 10⁶ 个/mL 的浓度接种 50 mL YPD 培养基(250 mL 三角瓶),35℃,250 r/min 条件下培养 4 d^[9],过滤得培养上清液。

用无菌水稀释上述制备的曲霉培养上清液,得到 100%、66.7%、50%、33.3%、25% 梯度的稀释液,调 pH 值至 7.0 ± 0.1,以灭过菌的 YPD 培养基做空白对照,按曲霉培养上清液稀释的方法进行梯度稀释,并调 pH 至 7.0 ± 0.1,每一稀释度做一个空白对照。然后按 20 g/L 的比例在样品和空白对照中分别加入适量的 NaCl 并混合均匀,再用酶标仪检测体系的发光强度(方法见 1.4),并分析曲霉培养上清液对费氏弧菌发光的影响。

1.6 曲霉培养上清液的高温处理

取培养 4 d 后的曲霉培养物,121℃ 灭菌 20 min 后用 HCl 或 NaOH 调整 pH 至 7.0 ± 0.1,7160 × g 离心 5 min,取上清备用。

1.7 曲霉培养上清液的碱处理

为验证曲霉培养上清液中存在黄曲霉毒素,取高温处理后的培养液,一部分用饱和 NaOH 溶液调 pH 至 10.0;另一部分不用调 pH,分别静置 12 h、48 h、144 h 后调 pH 至 7.0 ± 0.1 并检测其对费氏弧菌发光的影响。

2 结果和分析

2.1 微生物毒素对费氏弧菌发光产生抑制

利用费氏弧菌检测六株黄曲霉的培养上清液,

结果显示将各菌株的培养上清液加入到费氏弧菌活化菌液中之后,体系的发光强度发生明显的降低(表2),表明这些菌株产生的微生物毒素抑制了费

氏弧菌的发光,这为微生物毒素的检测提供了新的线索,为此需进一步研究微生物毒素浓度与费氏弧菌发光抑制率的关系。

表2 黄曲霉毒素潜在产生菌对费氏弧菌发光的抑制效应

Table 2 Luminescence inhibition of *V. fischeri* caused by the potential aflatoxin-producing strains

Name	<i>V. fischeri</i> luminous intensity		Inhibition ratio/%
	Without <i>A. flavus</i> supernate	With <i>A. flavus</i> supernate	
GIM3.18	108619.2 ± 946.8	7103.2 ± 76.2	90.3 ± 0.0058
GIM3.17	105544.4 ± 7694.2	1451.1 ± 15.2	97.8 ± 0.076
CICC2219	102960.2 ± 1657.8	15082.9 ± 388.7	78.4 ± 0.26
CICC2390	140977.1 ± 910.7	27934.2 ± 279.3	73.7 ± 0.41
CICC2402	76353.8 ± 1848.6	9660.9 ± 292.7	81.3 ± 0.04
CICC2404	76816.6 ± 6436.5	16598 ± 410.1	65.9 ± 0.19

2.2 黄曲霉毒素 B₁ 对费氏弧菌发光的影响

黄曲霉毒素是黄曲霉等真核微生物产生的典型毒素之一,为了获得微生物毒素浓度与费氏弧菌发光抑制率的关系,本研究将不同浓度的黄曲霉毒素 B₁ 添加至费氏弧菌活化液中并测定加入黄曲霉毒素前后费氏弧菌发光的抑制率,结果如图 1A 所示,由以上数据计算得到黄曲霉毒素 B₁ 的 EC₅₀ 在 50 mg/L 和 5 mg/L 之间。据此配制浓度为 100 mg/L、66.67 mg/L、50 mg/L、33.3 mg/L、25 mg/L、16.67 mg/L、12.5 mg/L、8.33 mg/L 的黄曲霉毒素 B₁ 溶液,检测其对费氏弧菌活化液的发光抑制率,将测得的抑制率与黄曲霉毒素浓度的对数值进行线性回归得回归方程: $y = 67.728x - 28.494$ (如图 1B 相关系数 $R^2 = 0.997$),并计算得到黄曲霉毒素 B₁ 的 EC₅₀ 值为 14.42 mg/L。以上结果表明黄曲霉毒素的浓度与费氏弧菌发光的抑制存在定量关系,因此可以利用费氏弧菌发光法检测微生物毒素。

本研究检测了黄曲霉毒素在费氏弧菌活化液中作用 5 min、15 min 和 30 min 时费氏弧菌发光的抑制率,结果表明 5 min 时抑制率太小,15 min 和 30 min 的抑制率均大于 5 min 时的抑制率,鉴于不同毒性物质对费氏弧菌发光产生影响的速度不同,本研究以黄曲霉毒素作用 30 min 时的数据作为定量研究的数据^[10]。

2.3 黄曲霉培养上清液中微生物毒素的定性

黄曲霉毒素可以耐受较高的温度,在 268℃ 时才会裂解。本研究通过比较高温处理前后黄曲霉培养上清液对费氏弧菌发光的抑制效应以确定上清液中的毒素性质。经过高温处理,大部分具有毒性的蛋白质和其他毒性物质都会因失活或降解而丧失毒

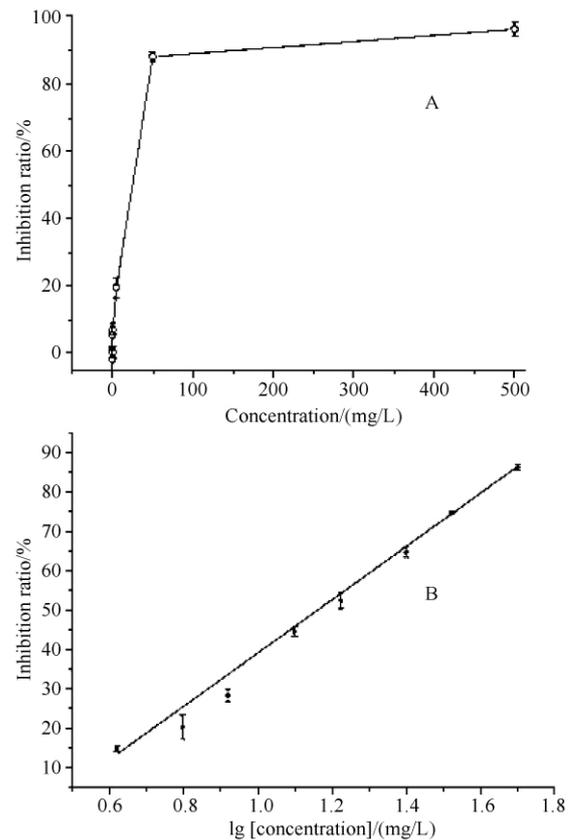


图1 黄曲霉毒素 B₁ 对费氏弧菌发光的抑制效应

Fig. 1 Inhibitory effect of aflatoxin B₁ on *V. fischeri* luminescence. A: the relationship between aflatoxin concentration and luminescence inhibition of *V. fischeri*; B: the relationship between the logarithmic value of aflatoxin concentration and luminescence inhibition of *V. fischeri*. Points represent means, vertical bars show SD mean (n = 3).

力^[11],因此推测经高温处理,各菌株培养上清液对费氏弧菌的发光抑制率会降低。

但实际上经高温处理后大多数菌株培养液对费

氏弧菌的抑制率有 3% - 30% 的提高 (图 2, CICC2402 例外, 抑制率降低约 8%)。这一矛盾可能是高温处理促使霉菌菌丝破裂而使毒性物质释放

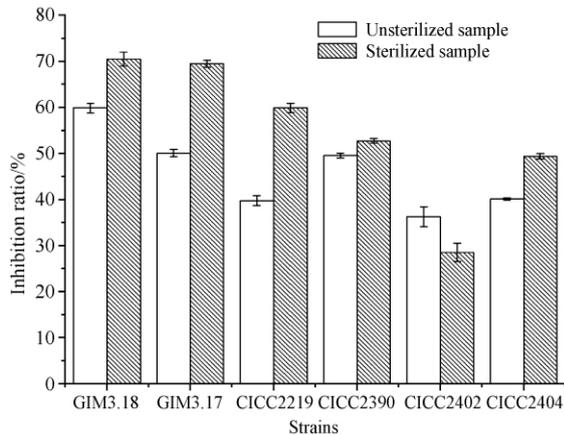


图 2 高温处理对曲霉培养液毒性检测的影响

Fig. 2 The influence of sterilization on toxicity assay of *aspergillus* culture broth. Vertical lines show mean \pm SD ($n = 3$).

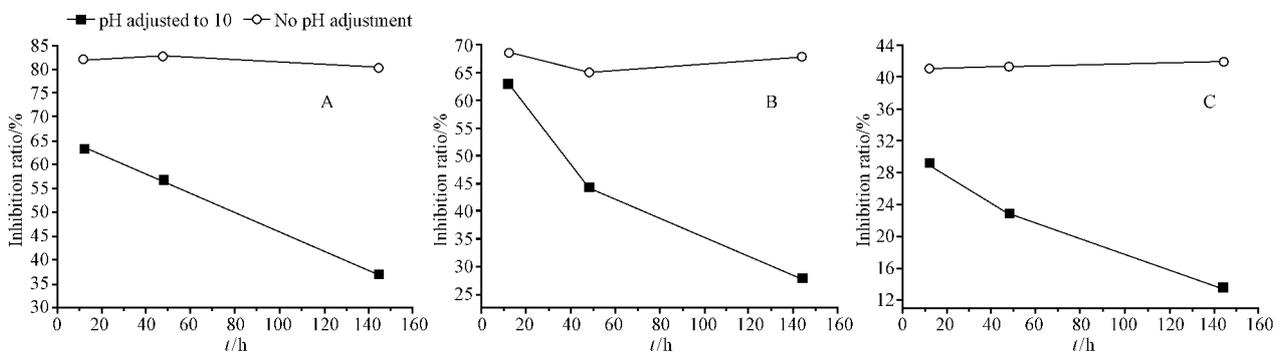


图 3 改变培养上清液 pH 对费氏弧菌发光的抑制率的影响

Fig. 3 Time-related inhibitory effect of culture broth on *V. fischeri* luminescence after pH adjustment. A: the represents GIM3.18; B: the represents GIM3.17; C: the represents CICC2404. Points represent means, vertical bars show SD ($n = 3$).

2.4 黄曲霉培养上清液中微生物毒素的定量

将黄曲霉培养上清液经高温处理后做梯度稀释,并测定各培养上清的稀释液对费氏弧菌发光的抑制率,结果表明各菌株培养上清液稀释度的对数与费氏弧菌发光的抑制率呈线性关系(图 4,相关系数 $R^2 > 0.9$)。

依据费氏弧菌发光的抑制率与黄曲霉毒素 B_1 浓度对数值之间的回归方程可计算得到各菌株以黄曲霉毒素量表示的微生物毒素的产量(表 3):6 株黄曲霉菌株产毒量在 14.94 - 46.45mg/L 之间;而米曲霉 *niaD300* 则不产毒素。

到胞外所致,同时表明为了更准确的检测各菌株的毒性,应将培养液进行高温处理后再检测其对费氏弧菌发光的抑制率。

为了进一步鉴定培养上清液中毒素的性质,本研究根据黄曲霉毒素碱不稳定性的特点(黄曲霉毒素在 pH9.0 - 10.0 时易降解^[12])。设计实验:取高温处理后的培养上清液,分成两份,一份用饱和 NaOH 溶液调 pH 至 10.0,静置 12 h、48 h、144 h 后调 pH 至 7.0 ± 0.1 并检测其对费氏弧菌发光的抑制效应;另一份不用 NaOH 处理,同样静置 12 h、48 h、144 h 后直接检测其对费氏弧菌发光的抑制效应,结果如图 3 所示。从图 3 可以看出,pH 值为 10.0 的培养上清液对费氏弧菌发光的抑制率随着时间延长逐渐降低,到 144 h 时抑制率的降低均超过了 50%,而未调 pH 的培养上清液对费氏弧菌发光的抑制率基本没有改变,由此推测培养上清液中的毒性物质主要是黄曲霉毒素。

3 讨论

黄曲霉毒素是目前发现的化学致癌物中最强的物质之一,主要是诱发肝癌,对肾、肺、胃、结肠等也有致癌作用,其致癌作用主要是抑制 DNA 和 RNA 的合成,从而导致细胞周期紊乱^[13]。因此,黄曲霉毒素的检测对于工农业生产和人体健康具有重要意义。黄曲霉毒素的检测方法很多,HPLC 和免疫化学方法等都能定量定性的检测黄曲霉毒素,且专一性强,因此在评估一个样本的综合毒性时不方便,而

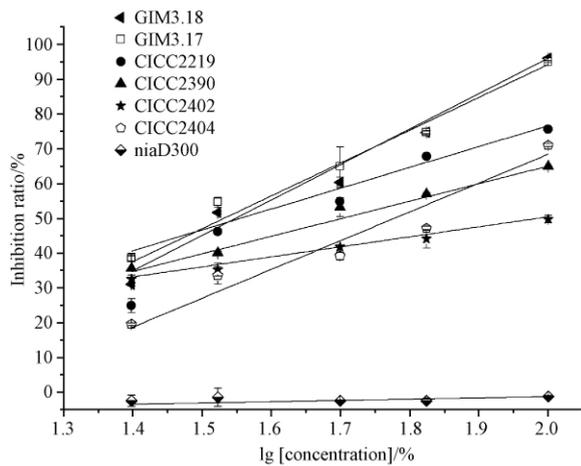


图 4 各曲霉菌株不同稀释度的培养上清液对费氏弧菌发光的抑制效应

Fig. 4 The inhibitory effect of various *aspergillus* culture broth on *V. fischeri* luminescence. Points represent means, vertical bars show SD (n=6).

表 3 费氏弧菌发光法检测各曲霉菌株的黄曲霉毒素产量

Table 3 Aflatoxin yeild of various aspergillus strains assayed by *V. fischeri* luminescence

Name	Linear fitting	Correlation coefficient (R ²)	Aflatoxin yield/(mg/L)
GIM3. 18	y = 101. 66x - 107. 35	0. 9894	46. 45
GIM3. 17	y = 94. 38x - 94. 56	0. 9854	42. 38
CICC2219	y = 59. 81x - 43. 02	0. 9054	40. 14
CICC2390	y = 50. 38x - 35. 75	0. 9927	28. 63
CICC2402	y = 28. 79x - 7. 13	0. 9862	14. 94
CICC2404	y = 82. 77x - 97. 12	0. 9696	24. 07
<i>A. oryzae</i> niaD300	y = 3. 58x - 8. 44	0. 8506	6. 84E - 16*

* Since the deviation of the microbiological tests reaches 2.5%, the aflatoxin yield of *A. oryzae* could be considered as 0.

用生物法检测则可以很好的评估整体毒性。同时，微生物检测法十分快捷，而且重复性较好，在水质检测应用广泛，如 SDI 公司的 Microtox[®] 测试技术就是采用了微生物检测法，在欧美国家应用十分普遍^[14]。

本实验首先研究了费氏弧菌的发光特性。为保证数据的准确性和可重现性，本研究的所有检测实验均使用同一批费氏弧菌冻干粉，并用 Zn²⁺ 做参照物，测得 2.2 mg/L Zn²⁺ 浓度下费氏弧菌产生的抑制率为 51.287 ± 0.8%。在确定检测时间时，研究表明 EC₅₀ (30 min) ≥ EC₅₀ (15 min) ≫ EC₅₀ (5 min)，这与其他研究的结果一致^[15]，而在水质检测 ISO-11348 中也推荐使用 EC₅₀ (30 min)，故本研究以 30 min 检测的 EC₅₀ 值为准。

在上述基础上，本实验研究了黄曲霉毒素对费氏弧菌发光的影响，通过测定黄曲霉毒素浓度与费氏弧菌发光抑制率的关系，确定了黄曲霉毒素的 EC₅₀ 值为 14.42 mg/L。实验数据表明所检测的 6 种黄曲霉菌都能产毒素，产量在 14.94 - 46.45 mg/L 之间；米曲霉 niaD300 则不产毒素，这与米曲霉 niaD300 来源于清酒酿造菌 *A. oryzae* RIB40 相一致^[16]。在碱性条件下，随时间延长，曲霉培养上清液的毒性逐渐减小，到 144 h 时其对费氏弧菌发光的抑制率降低了 50%，这也与黄曲霉毒素在碱性条件下 (pH9.0 - 10.0) 易降解相吻合。

上述结果表明费氏弧菌发光强度的改变可以较准确地反映微生物产毒素的能力，尤其是微生物产黄曲霉毒素的能力，样品的检测过程耗时短（不超过 45 min），快速高效且重现性好。这些数据提供了利用费氏弧菌评估微生物毒素毒性的初步方法，在评估未知样品的整体毒性时优势则更明显，这在工农业生产中快速检测黄曲霉毒素提供了新的线索，有望发展成为一种检测黄曲霉毒素的新技术。

参考文献

- [1] Horwitz W. *Official methods of analysis of AOAC international*. 17th ed. Gaithersbury, MD: AOAC International 2000: 87 - 92.
- [2] Gilbert J. Overview of mycotoxin methods, present status and future needs. *Natural Toxins*, 1999, 7: 347 - 352.
- [3] Chu FS. Immunochemical methods for mycotoxin analysis: from radioimmunoassay to biosensors. *Mycotoxins*, 2004, 54: 1 - 14.
- [4] Sun X, Zhao X. Development of an immunochromatographic assay for detection of aflatoxin B₁ in foods. *Food Control*, 2006, 17: 256 - 262.
- [5] Deng S, Tian L. Toxic effects and residue of aflatoxin B₁ in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) during long-term dietary exposure. *Aquaculture*, 2010, 307: 233 - 240.
- [6] Parveza S, Venkataramanb C, Mukherjia S. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environment International*, 2006, 32 (2): 265 - 268.
- [7] 潘力, 王斌, 郭勇. 曲霉菌的 RAPD 分析及其在酿造工业中的应用. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2007, 47 (3): 533 - 536.

- [8] Alba P , Sánchez-Fortún S , Alvarez-Perez S , Blanco JL , García ME. Use of a microbial toxicity test (Microtox[®]) to determine the toxigenicity of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from different sources. *Toxicon* , 2009 , 53: 729 – 733.
- [9] 庄振宏 , 郑传琦 , 汪世华. 黄曲霉培养条件的优化及黄曲霉毒素 B₁ 的提取. 应用与环境生物学报 (*Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*) , 2010 , 16(5) : 724 – 729.
- [10] 黄正 , 汪亚洲 , 王家玲. 细菌发光传感器在快速检测污染物急性毒性中的应用. 环境科学 (*Environmental Science*) , 1997 , 18(4) : 14 – 17.
- [11] 李玮. 大环内酯类抗生素热稳定性及分解动力学研究. 药物分析杂志 (*Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*) , 2010 , 30(8) : 1544 – 1547.
- [12] 刘罗发 , 黄德娟 , 黄德超 , 许建平 , 耿道行 , 杨新冬. 食品中黄曲霉毒素及理化脱毒措施研究进展. 安徽农业科学 (*Journal of Anhui Agricultural Sciences*) , 2011 , 39(8) : 4756 – 4757 , 4759.
- [13] 徐运杰 , 方热军. 霉菌毒素及其作用机理. 饲料工业 (*Feed Industry*) , 2008 , 29(4) : 52 – 57.
- [14] 张俊强 , 魏建军. Microtox[®] 毒性检测系统与给水水质预警. 中国给水排水 (*China Water&Waste Water*) , 2007 , 23(16) : 79 – 80.
- [15] Ru? z MJ , Lopez-Jaramillo L , Redondo MJ , Font G. Toxicity assessment of pesticides using the Microtox test: application to environmental samples. *Bull. Environ. Contam. Toxicol* , 1997 , 59: 619 – 625.
- [16] Kaieda M , Nagayoshi M , Hama S , Kondo A. Enantioselective transesterification using immobilized *Aspergillus oryzae* overexpressing lipase. *Appl Microbiol Biotechnol* , 2004 , 65: 301 – 305.

Influence of aflatoxin on *Vibrio fischeri* luminescence

Xiang Li , Li Pan , Bin Wang*

School of Bioscience and Bioengineering , South China University of Technology , Guangzhou 510006 , China

Abstract: [Objective] In the present study , we aim to evaluate the inhibitory effect of aflatoxin on *Vibrio fischeri* luminescence. [Methods] *V. fischeri* culture is treated with aflatoxin or the culture broth of aflatoxin-producing strains , and the luminescence intensity of *V. fischeri* is detected to analyze the influence of aflatoxin on *V. fischeri*. [Results] The logarithmic value of aflatoxin concentration and the decrease ratio of *V. fischeri* luminescence is in a linear relationship. Based on the regression equation between aflatoxin concentration and luminescence decrease of *V. fischeri* , the toxin-producing status of different microbes can be detected quickly and exactly: all of six tested *Aspergillus flavus* strains show toxigenicity to *V. fischeri* , and their toxin yield reached 14.94 mg/L – 46.45 mg/L (represented by aflatoxin concentration) , while the tested *Aspergillus oryzae* shows no toxigenicity. [Conclusion] The above data showed that the luminescence change of *V. fischeri* could exactly reflect the capability of various microbes to produce toxin (especially aflatoxin) , which provided a new clue for rapid detection of aflatoxin in industrial and agricultural production and could be developed as a potential method for aflatoxin assay.

Keywords: aflatoxin , *Vibrio fischeri* , luminescence inhibition , biotoxin

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Guangdong Natural Science Foundation (S2011040003020)

* Corresponding author. Tel: +86-20-39380616; E-mail: btbinwang@scut.edu.cn

Received: 24 June 2011 / Revised: 1 October 2011