

砷的微生物转化及其在环境与医学应用中的研究进展

张旭, 于秀敏, 谢亲建, 李红玉*

(干旱与草地生态教育部重点实验室, 兰州大学生命科学学院, 兰州 730000)

摘要: 砷广泛分布于自然界中, 近年来砷污染及砷中毒事件在全球范围内的频繁发生, 严重威胁着全球上千万人口的健康。砷的迁移与转化等地球化学行为的研究对探明环境中砷的来源以及砷污染治理的方法至关重要。越来越多的研究表明, 自然界中的微生物广泛参与了砷的地球化学循环, 在砷的迁移与转化过程中起到关键作用。综述了近年来砷的微生物转化及其相关酶类与编码基因等的研究进展, 同时结合作者的工作分析与展望了砷的微生物转化在环境与医学中的应用前景。

关键词: 砷; 微生物转化; 应用

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 03-0408-05

砷(Arsenic, As)是一种类金属, 常被作为一种有毒元素, 广泛存在于岩石圈、水圈和生物圈中^[1, 2]。砷在全球范围的地下水中广泛存在, 近年来由于过度开采地下水, 印度、孟加拉、美国、阿根廷、中国台湾及其他一些地区出现严重的饮用水砷污染现象, 威胁着大约 3600 万人口的生命与健康, 砷污染已经成为一个全球性的问题^[3]。另外, 随着人类冶金、采矿和燃煤等工业的发展以及含砷农药与三氧化二砷的运用, 更大量的砷释放到环境中^[4], 造成了局部地区高浓度砷污染现象。基于此, 对砷的迁移与转化等地球化学行为的研究逐渐成为国内外学者关注的焦点。近年来的研究表明, 自然界中砷代谢微生物广泛参与了砷的地球化学循环, 在砷的迁移与转化过程中起到关键作用^[4]。本文结合自己的工作对近年来砷的微生物转化及其应用研究进行了综述。

1 砷的微生物转化

微生物在自然界中广泛参与各种元素的物理、化学和生物化学反应, 进而影响诸多元素的迁移和转化。微生物在长期与砷共存过程中, 进化出了多种不同的砷转化机制, 包括砷的氧化、还原以及甲基化等

作用。按照对砷的不同代谢机制, 可以将这些微生物分为砷甲基化微生物(Arsenic methylating bacteria, AMBs)、化能自养型砷氧化微生物(Chemolithoautotrophic arsenite oxidizers, CAOs)、异养型砷氧化微生物(Heterotrophic arsenite oxidizers, HAOs)、异养型砷还原微生物(Dissimilatory arsenate-reducing prokaryotes, DARPs)以及砷抗性微生物(Arsenic-resistant microbes, ARMs)^[4-6]。微生物转化砷的不同机制如图 1 所示。

1.1 砷的微生物甲基化及其相关酶类与编码基因

甲基化是微生物对环境中砷的一种重要的解毒机制, 同时在砷的地球化学循环中也起到重要作用^[5]。自然界中, 许多真菌和细菌能够通过甲基化将无机砷转化为毒性较低的甲基砷酸, 例如一甲基砷酸(MMAA)、二甲基砷酸(DMAA)以及三甲基砷氧化物(TMAO); 有的甚至可以将无机砷转化为具有挥发性的甲基化产物, 例如一甲基胂(MMA)、二甲基胂(DMA)以及三甲基胂(TMA)等^[7, 8]。

2002 年, Ronald^[9]等人对砷的甲基化微生物以及可能存在的甲基化机制进行了全面而又详细的论述。近年来, 国内外学者开始对砷的微生物甲基化遗传学基础进行了初步研究, 取得了一定的成果。Jie

基金项目: 甘肃省科技攻关项目(2GS035-A52-008-01); 教育部科学技术研究重点项目(107108)

*通讯作者。Fax: +86-931-8912561; E-mail: lihy@lzu.edu.cn

作者简介: 张旭(1984-), 男, 江苏宿迁人, 硕士研究生, 研究方向为应用微生物。E-mail: zhang_x06@lzu.cn

收稿日期: 2007-06-18; 修回日期: 2007-08-31

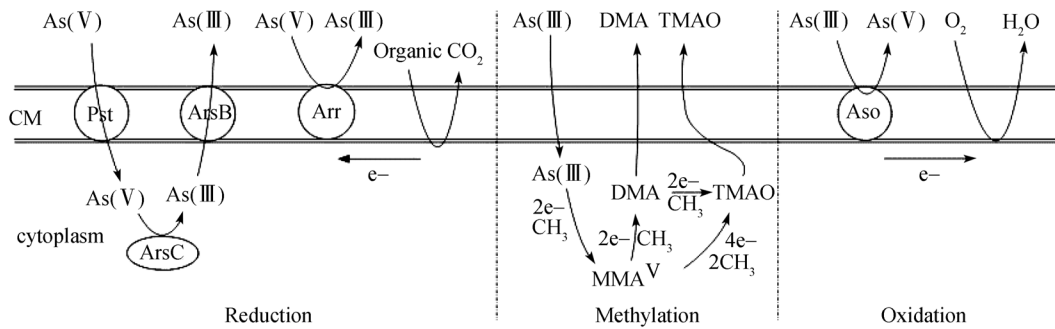


图 1 微生物对环境中砷的转化作用机制

Fig. 1 Mechanisms of microbial transformation of arsenic in the environment. CM: cellular membrane; MMA : monomethylarsonic acid; DMA: dimethylarsenic acid; TMAO: trimethylarsenic oxides; Pst: phosphate transporter; Arr: arsenate reductase; Aso: arsenite oxidase.

等^[10]在对微生物基因组分析的基础上,成功地从 *R. palustris* 中克隆了砷甲基化相关基因 *arsM*, 该基因编码一个约 29.656kDa 的 As(III) S-腺苷甲基转移酶。采用分子生物学技术将 *arsM* 基因整合到砷敏感的 *E. coli* 基因组中后,其能够成功地将培养基中的砷转化为二甲基砷酸、三甲基砷氧化物以及三甲基砷气体。

1.2 砷的微生物氧化及其相关酶类与编码基因

在有氧条件下,微生物主要通过对砷的氧化影响其地球化学行为。迄今为止,已发现的至少有 9 个属 30 种微生物能够将 As(III) 氧化为 As(V), 主要分布在 α -变形杆菌、 β -变形杆菌、 γ -变形杆菌、栖热菌与嗜泉古生菌界中^[4]。化能自养型砷氧化微生物能够以氧气或硝酸盐作为电子受体氧化 As(III), 并利用其产生的能量同化 CO₂、产生细胞内物质,从而实现细胞的生长^[4, 9]。异养型砷氧化微生物同样也能够氧化 As(III), 但是它们需要有机物质作为能量与细胞物质的来源。异养型的砷氧化过程常被作为一种解毒机制,通过将 As(III) 转化为毒性较低的 As(V), 从而降低其细胞毒性^[4-6]。

近年来,对异养型砷氧化微生物的砷氧化酶及其相关编码基因的研究取得了一定的成果。*A. faecalis* NCIB8687 是一种发现较早、研究比较透彻的异养型砷氧化微生物,研究表明其砷氧化能力由包含 *asoA*、*asoB*、*moa*、*Aphn D* 和 *phnC* 等在内的至少 20 种功能相关基因组成的“基因岛”编码控制,这使得人们对砷代谢遗传学基础的认识从一个操纵子的水平提升到更为复杂的“基因岛”水平^[11]。另外, *A. faecalis* 砷氧化酶为异二聚体结构,主要由一个约 85kDa 的 Mo-蛋白大亚基和一个小的 Rieske 亚基组成。

与 *D. desulfuricans* 中周质硝酸还原酶 NapA 的结构相似, *A. faecalis* 砷氧化酶属于 DMSO 还原酶家族^[4, 12]。

Rhizobium NT-26 是一株具有代表性的化能自养型砷氧化微生物^[13]。Santini 等^[13]对 *Rhizobium* NT-26 中砷氧化酶的进行了初步研究, *Rhizobium* NT-26 砷氧化酶是由 AsoA 和 AsoB 构成的 $\alpha_2\beta_2$ 型异四聚体结构。现有的研究表明 *asoA* 与 *asoB* 基因广泛存在于多种原核生物中,但是对化能自养型砷氧化微生物中砷氧化相关酶与编码基因 *asoA* 与 *asoA*(或 *aoxA* 与 *aoxA*)及其上下游基因的研究尚处于起步阶段。

1.3 砷的微生物还原相关酶类与编码基因

在自然界中,尤其是高砷环境下存在一些特殊的细菌,它们能够在无氧环境中利用砷酸盐代替氧气作为电子受体,在有机物存在条件下氧化有机物、合成细胞物质用于细胞生长,这一类细菌称之为异养型砷还原微生物^[6]。自 20 世纪 90 年代 *S. arsenophilum* 和 *S. barnesii* 被发现并确认为异养型砷还原微生物以来^[14],已经在 γ -变形杆菌、 δ -变形杆菌、 ϵ -变形杆菌、革兰氏阳性细菌、嗜热真细菌和嗜泉古生菌等居群中分离与鉴定了至少 16 种异养型砷还原微生物^[4, 14, 15]。与异养型砷还原微生物不同的是,砷抗性微生物虽然也能够还原 As(V),但是不作为提供生长所需能量的过程,仅作为降低砷毒性的一种机制,它利用细胞质中的砷还原酶 ArsC 将 As(V) 还原为毒性更强的 As(III),后者在 ATP 依赖性的亚砷酸盐特异性转运蛋白 ArsB 作用下被排出体外,这一类微生物在自然界中分布极为广泛^[4, 16]。

基于“ArsC”的砷抗性机制是现在研究最为彻底而且存在最为广泛的一种,它是由位于细菌质粒或者染色体上的 *ars* 操纵子决定的。*arsRDABC* 与 *arRBC*

是两种最为常见的 *ars* 操纵子结构^[11, 17], ArsC (EC 1.20.99.1) 是一种发现于细胞质中的小分子蛋白 (13-16kDa)^[16]。迄今为止, 已发现至少有 3 种不同的 ArsC, 即谷氧还蛋白-谷胱甘肽偶联的、谷氧还蛋白依赖性的和谷氧还蛋白偶联的 ArsC, 它们分别以不同的方式催化 As(III) 转化为 As(V)^[17]。ArsA 和 ArsB 分别由 *arsA* 和 *arsB* 基因编码, 共同构成一个 ATP 驱动的铁泵, 在有 As(III) 存在时启动 ATP 的水解, 提供能量驱动 As(III) 的转运^[18, 19, 20]。在 *ars* 操纵子上还存在两个转录调节基因 *arsR* 和 *arsD*, 它们编码的两不同调节蛋白 ArsD 和 ArsR 调节 *ars* 操纵子的转录与表达, 但是在一些细菌中没有发现 *arsR* 和 *arsD*, 至于它们是否必需还是位于其他位置上尚未被发现至今还没有定论, 有待进一步的研究^[21]。

与 ArsC 不同, 异养型砷还原微生物砷还原酶 Arr 是一种位于细胞周质中与细胞膜相连的砷代谢酶, 对于 Arr 的结构至今还没有比较全面地报道, 对其编码基因 *arr* 的研究也只是刚刚起步。*C. arsenatis* 中砷氧化酶是研究较为详细的一种, 它是由一个以 [4Fe-4S] 聚簇为中心的约 29kDa 的小亚基 ArrB 和一个约 84kDa 的钼蛋白大亚基 ArrA 构成的异二聚体, 与砷氧化酶一样属于 DMSO 还原酶家族^[22]。另外, 对革兰氏阴性菌 *Shewanella* ANA-3 和革兰氏阳性菌 *B. selenitireducens* 中砷还原决定基因序列的测定与分析工作也已经完成^[23, 24]。

2 微生物转化砷在环境与医学中的应用

2.1 砷的微生物转化在环境中的应用

近年来砷污染以及砷中毒现象屡见报道, 尤其在印度和孟加拉国由于过度开采地下水等原因, 饮用水中砷含量严重超标高达 1mg/L^[3], 严重威胁人类健康。在中国的新疆、台湾、内蒙古、陕西等地也频频发生高浓度砷污染和砷中毒现象, 因此对饮用水中砷含量的控制引起了各国政府的广泛关注。最近欧盟各国将饮用水中最大砷污染水平从 50 μ g/L 降低至 10 μ g/L, 世界卫生组织与美国环保署都已分别在 1996 年和 2002 年接受了该新标准。为了达到这一标准的要求, 在很多国家, 一些积极有效的方法已经被用于自然水体中砷污染的去除。目前, 使用最多的是传统的物理化学方法, 包括沉淀法、离子交换法、吸附法、膜分离法、电解法以及反渗透法等^[25, 26]。遗憾的是这些方法不能有效的去除环境中的 As(), 因此

需要一个预氧化的过程将 As() 转化为 As(V)。工业上一般采用加入氯气、高锰酸钾、过氧化氢和臭氧等化学氧化剂的方法, 虽然这些方法能够有效的将 As(III) 转化为 As(V), 但是它们存在着成本高、可以带来二次污染等缺点, 因此真正用于实践的不是很多。随着微生物转化砷的基础理论研究, 微生物转化法也逐渐被用于对砷的整治中, 现已被认为是一种最具发展前途的方法。菌藻共生体法和活性污泥法是早期应用比较多的微生物除砷方法, 它们是利用微生物直接吸附的作用降低环境中砷的浓度^[27]。另外, 砷氧化微生物还可以在工业上代替化学氧化剂氧化 As(III), 形成更易被吸附的 As(V), 从而促进砷的去除。这一方法可以大大降低成本, 具有环保、低能耗、无二次污染等优点, 使之成为很多科学家研究的热点。

Anastasios 等^[25, 26]发现溶液中铁的微生物氧化与去除技术可以作为有效去除环境中的砷的方法, 在 *Gallionella ferruginea* 或者 *Leptothrix ochracea* 存在的情况下, 砷被微生物氧化为 As(V), 同时被铁的氧化产物吸附并与其发生共沉淀, 从而实现环境中砷的高效去除(清除率可高达 95%, 残余砷浓度低于新标准规定的 10 μ g/L)。山东大学赵清等^[28]利用 DNA 体外重组技术, 将抗砷基因片段亚克隆到具有广泛寄主范围特性的质粒 pMNB24 上, 成功构建了含有强启动子的抗砷质粒 pSDRA3 和 pSDRA4, 并通过接合转移的方式将其导入专性自养极端嗜酸性的喜温硫杆菌中, 成功构建了抗砷冶金工程菌 *T. caldus*(pSDRA3) 和 *T. caldus* (pSDRA4), 为高砷矿物以及废水的微生物处理研究奠定了基础。

2.2 砷的微生物转化在医学中的应用

砷长期以来一直被作为一种有毒物质, 能够导致癌症的发生。然而, 近年来国内一些研究却发现, 砷制剂在临床治疗急性早幼粒细胞白血病中具有有良好的效果^[29], 这引起了国内外医学界对砷剂抗肿瘤研究的极大兴趣, 大大促进了砷剂抗肿瘤临床与机理的研究。目前的研究一般集中在毒性比较高的的三氧化二砷上。Chen 等对三氧化二砷甲基化代谢产物一甲基亚砷酸与二甲基亚砷酸的凋亡诱导作用的研究表明, 三氧化二砷甲基化代谢产物对急性早幼粒细胞白血病与淋巴细胞的凋亡诱导能力远大于三氧化二砷^[30], 再加上其较低的毒性使得砷甲基化代谢产物成为很有潜力的抗肿瘤药物。利用微生物的转化作用, 例如甲基化、氧化等作用改变砷的存在形式,

从而制备出具有更低毒性、更高疗效的新型抗癌砷剂具有很广阔的研究与应用价值,但是这方面的研究却少有报道。

本研究室经过多年的努力已经成功的利用微生物处理含砷矿物中药雄黄(As_4S_4),并已经申请了国家专利保护^[31],同时也建立了含有经过微生物法溶解去除了有害重金属的雄黄等的药物组合物的制备方法^[32]。另外,利用嗜酸硫杆菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* BY-3 与 *Acidithiobacillus thiooxidans* BY-1 对雄黄的微生物溶解与转化进行了进一步的研究^[33],雄黄微生物溶出液的毛细管电泳分析表明可溶性的一甲基砷酸与二甲基砷酸为主要成分(待发表)。上述溶出液简单处理后分别用于肝癌、肺癌以及白血病等多种肿瘤模型的体内外抗肿瘤作用研究,取得了令人振奋的实验结果。雄黄微生物溶出液(PL/At. f BY-3)在体内外条件下均能够通过诱导肝癌细胞凋亡而起到显著的抗肿瘤作用,并且比三氧化二砷具有更强的肿瘤靶向性与凋亡诱导能力。 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 PL/At. f BY-3 对小鼠肝癌 H22 实体瘤的生长抑制作用就可达到 42.78%,这与 50 mg/kg 的纳米雄黄以及 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 原料雄黄的作用相当。对白血病细胞株 K562 和 K562/ADM 的体外抗肿瘤实验研究得出相似的实验结果。进一步研究显示 PL/At. f BY-3 可以显著上调白血病细胞 Fas 和 Caspase-3 蛋白的表达,同时下调 Bcl-2 蛋白和 P-gp 蛋白的表达,这可能是其诱导细胞凋亡的重要的分子机制(待发表)。这就表明嗜酸硫杆菌能够溶出雄黄中的砷,并通过甲基化作用将其转化为具有更强靶向性与抗肿瘤活性的甲基化砷代谢产物。但是,对于微生物转化雄黄的机制以及不同转化产物的抗肿瘤疗效差异等问题还有待进一步的深入研究。

总之,砷的微生物转化作为一种颇受期待的环境污染治理方法及其在肿瘤治疗中潜在的应用价值,正成为国内外学者广泛研究的热点。对于砷转化微生物的分离与鉴定、新种的发现,尤其是砷转化机制及其砷转化工程菌的构建等问题都将会是未来砷的微生物转化研究的重要方向。

参 考 文 献

[1] Cullen WR, Reimer KJ. Arsenic speciation in the environment. *Chemical Reviews*, 1989, 89: 713–764.
[2] Hughes MF. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol Lett*, 2002, 133: 1–16.

[3] Nordstrom DK. Worldwide occurrences of arsenic in groundwater. *Science*, 2002, 296: 2143–2145.
[4] Oremland RS, Stolz JF. The Ecology of Arsenic. *Science*, 2003, 300: 939–944.
[5] Jonathan RL, Oremland RS. Microbial Transformations of Arsenic in the Environment: From Soda Lakes to Aquifers. *Elements*, 2006, 2: 85–90.
[6] Oremland RS, Stolz JF. Arsenic, microbes and contaminated aquifers. *TRENDS in Microbiology*, 2005, 13(2): 45–49.
[7] Tamaki S, Frankenberger WT. Environmental biochemistry of arsenic. *Rev Environ Contam Toxicol*, 1992, 124: 79–110.
[8] Atiqul ISM, Kensuke F and Kazuo Y. Development of an enumeration method for arsenic methylating bacteria from mixed culture samples. *Biotechnology Letters*, 2005, 27: 1885–1890.
[9] Ronald B, Thomas GC. Microbial Methylation of Metalloids: Arsenic, Antimony, and Bismuth. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002, 66(2): 250–271.
[10] Jie Q, Barry PR, Yang Z, et al. Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase. *PNAS*, 2006, 103(7): 2075–2080.
[11] Silver S, Phung LT. Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71: 599–608.
[12] Anderson GL, Williams J, Hille R. The purification and characterization of arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis*, a molybdenum-containing hydroxylase. *J Biol Chem*, 1992, 267: 23674–23682.
[13] Santini JM, Sly LI, Schnagl RD, et al. A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66: 92–97.
[14] Laverman AM, Blum JS, Schaefer JK, et al. Growth of strain SES-3 with arsenate and other diverse electron acceptors. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61: 3556–3561.
[15] Macy JM, Santini JM, Pauling BV, et al. Two new arsenate/sulfate-reducing bacteria: mechanisms of arsenate reduction. *Arch Microbiol*, 2000, 173: 49.
[16] Paula SP, Monica R. Identification of an arsenic resistance mechanism in rhizobial strains. *World J Microbiol Biotechnol*, 2007, DOI 10.1007/s11274-007-9370-2.
[17] Prerna CP, Florence G. Arsenate detoxification in a *Pseudomonad* hypertolerant to arsenic. *Arch Microbiol*, 2007, 187: 171–183.
[18] Silver S. Bacterial resistances to toxic metal ions—a review. *Gene*, 1996, 179: 9–19.
[19] Suzuki K, Wakao N, Kimura T, et al. Expression and Regulation of the Arsenic Resistance Operon of *Acidiphilium multivorum* AIU301 Plasmid pKW301 in *Escherichia coli*. *Applied*

- and Environmental Microbiology*, 1998, 64(2): 411–418.
- [20] Cervantes C, Ji G, Ramirez JL, *et al.* Resistance to arsenic compounds in microorganisms. *FEMS Microbiol Rev*, 1994, 15: 355–367.
- [21] Rouch DA, Lee BT, Morby AP. Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism choice in bacterial metal resistance. *J Indust Microbiol*, 1995, 14: 132–141.
- [22] Krafft T, Macy JM. Purification and characterization of the respiratory arsenate reductase of *Chrysiogenes arsenatis*. *Eur J Biochem*, 1998, 255: 647–653.
- [23] Saltikov CW, Cifuentes A, Venkateswaran K, *et al.* The ars detoxification system is advantageous but not required for As(V) respiration by the genetically tractable *Shewanella species* strain ANA-3. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69: 2800–2809.
- [24] Afkar E, Lisak J, Saltikov C, *et al.* The respiratory arsenate reductase from *Bacillus selenitireducens* strain MLS10. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, 226: 107–112.
- [25] Anastasios IZ, Ioannis AK. Recent advances in the bioremediation of arsenic- contaminated groundwaters. *Environment International*, 2005, 31: 213–219.
- [26] Anastasios IZ, Ioannis AK. Application of biological processes for the removal of arsenic from groundwaters. *Water Research*, 2004, 38: 17–26.
- [27] 王薇, 徐炎华. 水体中砷污染和治理概况. 微量元素与健康研究(*Studies of Trace Elements and Health*), 2005, 22(5): 59–61.
- [28] 赵清, 刘相梅, 边疆, 等. 抗砷载体的构建及在喜温硫杆菌中的接合转移. 生物技术 (*Biotechnology*), 2005, 15(3): 19–21.
- [29] 陆道培, 邱镜滢. 口服雄黄治疗急性早幼粒细胞白血病(AML-M3)66例. 中国实验诊断学(*Chinese Journal of Laboratory Diagnosis*), 1998, 2(6): 319–320.
- [30] Chen GQ, Zhou L, Styblo M, *et al.* Methylated metabolites of arsenic trioxide are more potent than arsenic trioxide as apoptotic but not differentiation inducers in leukemia and lymphoma cells. *Cancer Res*, 2003, 63(8): 1853–1859.
- [31] 李红玉, 张景红, 支德娟. 矿物药中的重金属去除方法. 中国: 200610200067.5, 2006.
- [32] 李红玉, 支德娟, 张景红. 含有朱砂和/或雄黄的药物组合物. 中国: 200610200273.6, 2006.
- [33] Zhang JH, Zhang X, Ni YQ, *et al.* Bioleaching of arsenic from medicinal realgar by pure and mixed cultures. *Process Biochemistry*. 2007, doi:10.1016/j.procbio.2007.05.021.

Progress on microbial transformation of arsenic and its application in environmental and medical sciences1- A Review

Xu Zhang, Xiumin Yu, Qinjian Xie, Hongyu Li *

(Key Laboratory of Arid and Grassland Ecology of Ministry of Education, School of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 73000, China)

Abstract: Arsenic is widely distributed in the environment. As teratogen, carcinogen or mutagen, it has extremely toxic effect on mammalian health. Recently, as the outbreaks of arsenicosis in many countries such as Bangladesh and China, arsenic toxicity or pollution has been a global problem, severely threatening tens of millions of people's health. Therefore, studies on the transfer of arsenic toxicity or pollution are important. The threat of pollution and toxicity from the dispersal of naturally occurring and anthropogenic arsenic stimulated extensive studies focusing on the geochemical behaviors, such as mobilization and transformation of arsenic. More evidences suggest that microbes play an important role in the geochemical circulation of arsenic. Some microorganisms have evolved to tolerate relatively high concentrations of arsenic by methylation and/or redox. These microbial processes, together with inorganic and physical processes, constitute the global cycle of arsenic. In this article, we review the diversity of microorganisms known to interact with arsenic, and the genes and enzymes involved in these processes. We also briefly discuss the application of arsenic bio-transformation is. Finally, according to the studies in our laboratory, we propose the potential application in medical sciences and its future prospects.

Keywords: arsenic; microbial transformation; application

Supported by the Grant of Technological Research Program of the Gansu Province (2GS035-A52-008-01) and the Key Project of Ministry of Education of China (107108)

*Corresponding author. Fax: +86-931-8912561; E-mail: lihy@lzu.edu.cn

Received: 18 June 2007/Revised: 31 August 2007