

# 高效氯氰菊酯降解菌株 HG-P-01 的培养基筛选及优化

钟国华 何 玥 罗建军 官 珊 胡美英\*

(华南农业大学昆虫毒理研究室 农药与化学生物学教育部重点实验室 广东 广州 510642)

**摘 要:** 通过比较查彼氏培养基、马铃薯葡萄糖培养基、理查德培养基、燕麦片培养基和玉米粉液体培养基等 5 种培养基对高效氯氰菊酯降解菌株 *Fusarium* sp. HG-P-01 生长的影响, 确定了查彼氏培养基是菌丝生长最适宜的培养基。采用中心组分旋转设计技术, 优化了查彼氏培养基中 C、N、P 的组成, 以降解率为衡量指标, 最佳配方包括 C 为 20.94 g/L、N 为 1.82 g/L、P 为 1.66 g/L, 处理后 24 h 对 50 mg/L 高效氯氰菊酯期望降解率 96.34%, HPLC 法测定实际降解率为 93.78%, 对高效氯氰菊酯的降解率模型预测值与实测值一致。

**关键词:** 高效氯氰菊酯, 微生物降解, 培养基, 优化, 中心组分旋转设计

## Screen and Optimization of Cultured Medium Constituents for Biodegradation of $\beta$ -cypermethrin, a Synthetic Pyrethroid Insecticide, by *Fusarium* sp. Strain HG-P-01 via Central Composite Rotatable Design

ZHONG Guo-Hua HE Yue LUO Jian-Jun GUAN Shan HU Mei-Ying\*

(Laboratory of Insect Toxicology, South China Agricultural University, Key Laboratory of Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

**Abstract:** By means of comparing biomasses of biodegradation fungi, *Fusarium* sp. HG-P-01 for  $\beta$ -cypermethrin, a synthetic pyrethroid insecticide used widely in China, in five different media, the Czapek-Dox medium was selected as the best medium for mycelia growth. Furthermore, an experiment of central composite rotatable design (CCRD) was used to optimize the content of nutrient components. The optimal composition of C, N and P in media for HG-P-01 were 20.94 g/L, 1.82 g/L and 1.66 g/L, respectively, in which an expectant or real rate of  $\beta$ -cypermethrin-degradation got to 96.34% or 93.78% by HPLC for a concentration of 50 mg/L after 24 h treatment. The predicted value in degradation rate model was consistent with that from HPLC method.

**Keywords:**  $\beta$ -cypermethrin, Microbiol degradation, Medium, Optimization, Central composite rotatable design (CCRD)

拟除虫菊酯类杀虫剂(Pyrethroid pesticide)是根据天然除虫菊素结构人工合成的杀虫剂, 目前的使用量仅次于有机磷类和氨基甲酸酯类, 约占世界杀虫剂市场份额的 20%<sup>[1]</sup>。拟除虫菊酯类农药急性毒性较小、使用剂量较低, 过去一直被认为在体内易被氧化酶系统降解, 无蓄积性, 可以安全使用, 因而在果蔬生产中使用频繁、用量渐增, 然而, 近年来研究表明, 此类农药有蓄积性, 长期接触即使是低剂量也会引起慢性疾病<sup>[2,3]</sup>; 有些品种有致癌、致畸、致突变作用<sup>[4]</sup>; 对哺乳动物具有中等的神经毒性、免疫系统毒性、心血管毒性和遗传毒性<sup>[5-7]</sup>, 目前尚无特殊的治疗药物。所以, FAO和WHO已对它们在农产品中的残留作出严格的限量, 欧盟、日本、美国等发达国家和地区相应的要求更为严格。我国果蔬拟除虫菊酯类农药残留检出率和超标率现象渐趋严重<sup>[8,9]</sup>, 已成为阻碍我国农产品出口的重要障碍之一。高效氯氰菊酯( $\beta$ -cypermethrin)是此类药剂中最常用的品种之一, 是主要监测对象。生物降解是解决农产品农药残留的新途径之一, 但对拟除虫菊酯类农药降解微生物的研究仍然较少。作者从贫营养极端环境中筛选获得了镰刀菌菌株 *Fusarium* sp. HG-P-01, 此菌对农作物无致病性, 对农产品安全无污染, 对高效氯氰菊酯等拟除虫菊酯类药具有较明显的降解作用, 具备进一步研究开发的潜力。本文在筛选获得适宜培养基种类的基础上, 采用中心组分旋转设计, 优化HG-P-01 菌株培养基的组分配方, 为制备果蔬农药残留生物降解剂提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌种和试剂

供试菌种为 *Fusarium* sp. HG-P-01, 系作者课题组 2004 年从贵州省遵义市所采集的水样中分离获得, 菌种保存于华南农业大学昆虫毒理研究室。

93.2%高效氯氰菊酯由江苏扬农股份化工有限公司提供, 折算成 100%供试。其它均为国产常规分析纯试剂和材料。

### 1.2 培养基的初筛

供试培养基 5 种, 包括查彼氏培养基(Czapek-Dox medium)、马铃薯葡萄糖培养基(Potato dextrose medium)、理查德培养基(Richard medium)、燕麦片培养(Oatmeal medium)、玉米粉液体培养基(Corn meal medium), 各培养基配方见文献[10]。配好后,

调整 pH 至 7.0, 再分装入 250 mL 三角瓶中, 每瓶装 50 mL, 高温灭菌, 冷却备用。将在查彼氏培养基预培养 3 d 的菌液于 4000 r/min 离心 10 min, 弃上清菌液, 取 0.1 g 湿菌体接入供试培养基中, 重复 3 次, 置于气浴恒温振荡器中(28°C, 150 r/min)培养。根据预备试验结果, 培养 4 d~7 d 内菌丝体干重变化很小, 培养 5 d 后, 达到最大值, 因此取一定比例培养 5 d 的菌液, 将培养物用双层滤纸过滤, 然后用蒸馏水清洗 3 遍, 菌体连同滤纸干燥后称重, 得菌体干重。相同的实验重复 2 次。以同等条件下菌丝体干重为指标, 选择降解菌合适的培养基。显著性分析检验以 DPS(Data processing system)统计软件分析求取。

### 1.3 高效氯氰菊酯的定量分析

采用 HPLC 法, 条件如下: HP-1100 型高效液相色谱工作站(Agilente 科技公司, 美国), C18 反相柱(ODS Hypersil 5  $\mu$ m, 125 mm $\times$ 4 mm), 流速为 1.0 mL/min, 柱温 28°C $\pm$ 1°C, 流动相为乙腈:水 = 80:20, 检测波长: 235 nm, 进样量为 10  $\mu$ L/次。

### 1.4 菌株 HG-P-01 对高效氯氰菊酯的降解试验

将预培养 3 d 的降解菌液于 4000 r/min 离心 10 min, 取 0.1 g 湿菌体在无菌条件下接入 250 mL 三角瓶 50 mL 培养液中, 置于气浴恒温振荡器中(28°C, 150 r/min)振荡培养 5 d 后, 添加目标降解农药高效氯氰菊酯样品母液(丙酮为溶剂), 使其终浓度为 50 mg/L。CK 添加等量丙酮。1 d 后测定对高效氯氰菊酯的降解率。每个处理 3 个重复。

培养液中提取残留高效氯氰菊酯的处理过程: 每重复取 30 mL 添加农药的培养液, 分别加入 60 mL 丙酮, 采用超声波提取法提取(2 $\times$ 15 min)。提取液经铺 2 层滤纸的布氏漏斗减压抽滤, 将滤液全部移入 500 mL 分液漏斗, 加入 60 mL 石油醚, 摇匀, 振荡 30 min, 静置, 分层, 弃下层溶液, 取石油醚层溶液, 用 20 g 无水硫酸钠过滤至 250 mL 圆底烧瓶。分液漏斗和无水硫酸钠用 45 mL 石油醚分 3 次洗涤, 洗液并入烧瓶滤液中, 50°C 恒温浓缩, 将浓缩液全部转入 10 mL 刻度试管, 并用 3 mL 石油醚分 3 次洗涤圆底烧瓶, 定容至 5 mL, 取 2 mL 经 0.45  $\mu$ m 有机膜注射式过滤器过滤, 滤液收集于试管中, 按照 1.3 方法测定菌液中高效氯氰菊酯含量<sup>[11]</sup>。

### 1.5 培养基配方的优化和验证

在 1.2 实验基础上, 选择查彼氏培养基作为基本培养基, 分别对 C、N、P 含量进行优化试验。根

据预试验,采用中心组分旋转设计(Central composite rotatable design, CCRD)<sup>[12,13]</sup>, 设置不同配方组合,按照常规条件(pH值 7.0、温度 28℃、培养 5 d)培养降解菌。实验设计 3 个因子分别为 C、N、P 含量(X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>), 各 5 个水平(-1.68、-1、0、1、1.68)。培养 5 d 后,取一定比例的菌液,按照 1.2 方法,测定菌丝体干重。其余培养菌液用以降解高效氯氰菊酯,1 d 后测定对高效氯氰菊酯的降解率,测定前处理程序同 1.4, HPLC 定量测定方法同 1.3。

根据菌丝体干重和高效氯氰菊酯降解率,采用中心组分旋转设计模型,按照统计学要求检验模型显著性,分析配方组合对降解菌生长量、高效氯氰菊酯降解率的影响及效应,根据响应面模型和预测面模型回归模型方差分析,采用二次多项式逐步回归分析方法,得出回归模型  $Y = b_0 + \sum b_i X_i + \sum b_{ij} X_i X_j + \sum b_{ij} X_i^2$ , 并评价模型<sup>[14]</sup>。对菌体干重和高效氯氰菊酯降解率的特征值和鞍点坐标进行分析,得到培养基优化配方。按照最优配方所得 C、N、P 比例培养降解菌,以降解率为主要衡量评价指标,按 1.4 方法进行 HG-P-01 菌株降解高效氯氰菊酯实验,验证模型结论可靠性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 高效氯氰菊酯 HPLC 测定

在 1.3 所述 HPLC 条件下,高效氯氰菊酯标准样品峰形由两个峰组成(存在顺反异构体),且峰形尖锐、对称、稳定,保留时间分别为 3.643 min 和 3.840 min (图 1),标准曲线方程为  $Y = 51.309X + 10.932$ , 相关系数  $R^2 = 0.9999$ , 供试药剂浓度与其对应的峰面积相关性显著,检测方法可信。

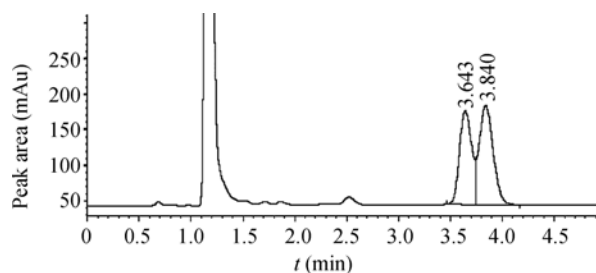


图 1 高效氯氰菊酯标样 HPLC 色谱图  
Fig. 1 HPLC chromatogram of  $\beta$ -cypermethrin

### 2.2 培养基种类的筛选

培养基筛选实验结果表明,从第 3 天起, HG-P-01 菌在查彼氏培养基中菌丝体生长最旺盛,均显著高于其他培养基同期生长量,培养 5 d 后菌丝体干重达到最大值 490.2 mg/50 mL (表 1), 5 d 后干菌丝干重有所降低,但在查彼氏培养液中的菌丝干重显著高于其他培养基类型。其余 4 种供试培养基中,马铃薯培养基和燕麦培养基的培养效果显著高于理查德培养基和玉米粉培养基。

### 2.3 培养基配方的优化

按照中心组分旋转设计得到培养基配方优化试验设计及响应值见表 2。根据试验结果,采用二次多项式逐步回归分析,分别建立了菌丝体干重( $Y_1$ )和降解率( $Y_2$ )的回归模型:

$$Y_1 = -183.6554 + 12.9541X_1 + 166.5525X_2 + 223.1037X_3 - 0.35265X_1^2 - 79.4635X_2^2 - 70.3193X_3^2 + 7.0667X_1X_2$$

$$Y_2 = 35.6094 + 1.1377X_1 + 20.7873X_2 + 35.9560X_3 - 0.0272X_1^2 - 3.9746X_2^2 - 8.7279X_3^3 - 3.8000X_2X_3$$

回归模型诊断结果显示,此两模型均到显著水平(表 3),进而寻优得到各因子的最佳配比值和预期响应值(表 4)得到最适宜菌丝生长的 C、N、P 组含量分别为 42.00 g/L、2.50 g/L 和 1.59 g/L,期望

表 1 不同种类培养基对降解菌菌丝体干重的影响  
Table 1 Effect of different media on dry cell weight of biodegradation fungi

培养基种类 Type of media	干菌丝重(mg/50 mL 培养液) Dry cell weight of biodegradation fungi (mg/50 mL)				
	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
查彼氏培养基 Czapek-Dox medium	310.5±4.3a	419.7±5.3a	490.2±7.3a	458.7±3.4a	430.0±5.4a
马铃薯培养基 Potato dextrose medium	229.7±5.7c	391.3±6.7b	401.8±5.4c	440.0±5.3b	402.6±6.7b
理查德培养基 Richard medium	180.1±5.2d	282.3±7.3c	363.4±6.7d	352.2±5.7d	331.3±4.7c
燕麦培养基 Oatmeal agar medium	290.1±6.7b	381.5±8.7b	441.4±8.9b	431.3±4.5c	401.2±7.1b
玉米粉培养基 Corn meat medium	191.2±4.6d	270.0±11.5c	350.7±5.7d	300.3±6.3e	290.5±6.2d

注:表中同列数据后标有相同字母者表示在 5% 水平差异不显著(DMRT 法)。

Note: Followed the same letters in the same column showed no significantly difference at level  $P=5\%$  by DMRT method.

表 2 培养基配方优化试验设计及响应值  
Table 2 Central composite rotatable design for medium and actual levels with experimental results

试验编号 Test No.	参试因子 Factors of test						响应值 Observed values	
	编码值 Coded level of variables			实际值(g/L) Actual level of variables			菌丝干重(mg/50 mL) Dry cell weight	降解率(%) Biodegradation rate
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	C	N	P	$Y_1$	$Y_2$
1	-1.00	-1.00	-1.00	8.5	0.5	0.5	168.8±5.7g	75.8±0.12f
2	-1.00	-1.00	1.00	8.5	0.5	2.0	160.3±11.5h	92.1±0.09b
3	-1.00	1.00	-1.00	8.5	2.0	0.5	181.5±5.7g	88.2±0.00c
4	-1.00	1.00	1.00	8.5	2.0	2.0	169.2±11.5g	89.4±0.06c
5	1.00	-1.00	-1.00	33.5	0.5	0.5	208.7±5.7f	75.0±0.09f
6	1.00	-1.00	1.00	33.5	0.5	2.0	189.5±5.7g	82.8±0.12e
7	1.00	1.00	-1.00	33.5	2.0	0.5	431.5±0.02b	88.0±2.72d
8	1.00	1.00	1.00	33.5	2.0	2.0	521.3±5.7a	93.8±0.17a
9	-1.68	0.00	0.00	-0.02	1.25	1.25	31.2±0.04j	72.9±0.58g
10	1.68	0.00	0.00	42.0	1.25	1.25	340.7±5.7e	76.1±0.12f
11	0.00	-1.68	0.00	21.0	-0.01	1.25	31.3±5.7j	71.6±0.06g
12	0.00	1.68	0.00	21.0	2.5	1.25	400.0±5.7c	88.7±0.06c
13	0.00	0.00	-1.68	21.0	1.25	-0.01	101.8±0.0i	53.3±0.06h
14	0.00	0.00	1.68	21.0	1.25	2.5	362.2±11.5d	92.1±0.09b
15	0.00	0.00	0.00	21.0	1.25	1.25	351.3±5.7d	93.8±0.06a
16	0.00	0.00	0.00	21.0	1.25	1.25	361.1±5.7d	94.0±0.17a
17	0.00	0.00	0.00	21.0	1.25	1.25	342.3±5.7e	95.5±0.29a
18	0.00	0.00	0.00	21.0	1.25	1.25	399.7±0.0c	89.2±0.06c
19	0.00	0.00	0.00	21.0	1.25	1.25	361.5±11.5d	93.1±0.17b
20	0.00	0.00	0.00	21.0	1.25	1.25	410.3±5.7c	92.3±0.12b
21	0.00	0.00	0.00	21.0	1.25	1.25	391.2±5.7c	93.0±0.12b

注: 1) 以上结果为 3 次重复平均值( $\bar{x} \pm s$ ), 培养时间 5 d; 2) 表中同列数据后标有相同字母者表示在 5% 水平差异不显著(DMRT 法)。

Note: 1) Means of 3 replicates ( $\bar{x} \pm s$ ), 5 d for culture; 2) Means followed the same letters in the same column showed no significantly difference at level of  $P=0.05$  by DMRT method.

表 3 回归模型分析结果  
Table 3 ANOVA and parameter estimations of CCRD model

		$Y_1$ (菌丝体干重模型)(Model of dry cell weight)			$Y_2$ (降解率模型)(Model of biodegradation rate)		
		偏相关系数 Partial correlation coefficient	$t$ 检验值 $t$ test values	显著水平 $P$ Significance level	偏相关系数 Partial correlation coefficient	$t$ 检验值 $t$ test values	显著水平 $P$ Significance level
偏相关 Partial correlation	$r(y, X_1)$	0.6011	2.7118	0.0169	0.5205	2.1980	0.0453
	$r(y, X_2)$	0.5016	2.0905	0.0553	0.4898	2.0254	0.0623
	$r(y, X_3)$	0.6804	3.3478	0.0048	0.6969	3.5034	0.0035
	$r(y, X_1 * X_2)$	-0.7316	3.8693	0.0017	-0.5392	2.3084	0.0368
	$r(y, X_2 * X_3)$	-0.6540	3.1169	0.0076	-0.3175	1.2073	0.2473
	$r(y, X_3 * X_1)$	-0.6076	2.7582	0.0154	-0.5924	2.6512	0.0190
	$r(y, X_2 * X_3)$	0.6860	3.3991	0.0043	-0.2293	0.8493	0.4100
相关系数 $R$ correlation coefficient		0.9476			0.8446		
$F$ 值 $F$ values		16.3903			4.6208		
显著水平 $P^*$ Significance level		0.0000			0.0085		
Durbin-Watson 统计量 $d$ Durbin-Watson statistic $d$		2.2924			1.3376		

注: \*:  $P < 0.05$ , 说明拟合方程显著。

Note: \*:  $P < 0.05$  indicated the fit equation significant level.

表4 培养基的优化配方、响应值及验证实验结果  
Table 4 Optimized formulation, observed values and validation experiment of medium

	X <sub>1</sub> (C, g/L)	X <sub>2</sub> (N, g/L)	X <sub>3</sub> (P, g/L)	Y <sub>1</sub> (菌丝干重mg/50mL) (Dry cell weight, mg/50mL)	Y <sub>2</sub> (降解率, %) (Biodegradation rate, %)
理论预测 Theory predict value	42.00	2.50	1.59	577.11*	
	20.94	1.82	1.66		96.34
验证实验 Validation experiment	20.94	1.82	1.66	450.30	93.78

注: \*: 同列数据差异显著(*t* 检验,  $P=0.05$ ).

Note: \*: In the same column showed significantly difference (*t* test,  $P=0.05$ ).

菌丝产量(即理论预测值)达到 577.11 mg 干重/50mL 菌液; 最适宜氯氰菊酯降解的 C、N、P 组分含量分别为 20.94 g/L、1.82 g/L 和 1.66 g/L, 期望降解率达到 96.34%。

#### 2.4 培养基优化配方的验证

选取降解率预测值最大的配方, 即 C 为 20.94 g/L、N 为 1.82 g/L、P 为 1.66 g/L 进行验证试验, 按此配方培养, 虽然菌体干重 450.30 mg/50 mL 培养液显著低于菌丝干重模型中最大理论预测值, 但处理后 24 h 对 50 mg/L 高效氯氰菊酯降解率即高达 93.78%, 与期望降解率(即理论预测最大降解率)96.34%一致(表 4), 表明该配方较适合 HG-P-01 菌丝生长, 并能保持该菌株对高效氯氰菊酯有较高的降解率。

### 3 结语

中心组分旋转设计注重各因素间的综合作用<sup>[15,16]</sup>, 以最经济的方式和最少的试验次数进行全面研究, 提供局部与整体之间的关系<sup>[17]</sup>, 克服了单次单因子法无法考察各因素间的交互作用从而获得最优条件的弊端<sup>[14]</sup>, 目前国内外学者通过中心组分旋转设计在培养基的优化方面取得了良好的效果, 应用也越来越广泛<sup>[18-21]</sup>。本试验以培养基中 C、N、P 三因素含量为考察对象, 在单因素试验的基础上选择各因素水平, 采用中心组分旋转设计法进行非线性数学模型拟合, 以菌体干重和对高效氯氰菊酯的降解率为考察指标, 采用多元二次回归拟合方程, 最后确定了 HG-P-01 菌株生长的最佳培养基配方为碳(C)为 22.3 g/L、氮(N)为 1.76 g/L、磷(P)为 1.68 g/L。在优化配方条件下菌体干重 450.30 mg/50mL 培养菌液, 处理后 24 h 对 50 mg/L 高效氯氰菊酯降解率即达 93.78%, 为降解菌 HG-P-01 大规模生产提供了参考。

在降解菌研究中, 培养基的组成及配比对降解菌的活性影响极大, 培养基的确定又因采用不同指标而可能有所差异。本文在查彼氏培养基、马铃薯培养基、理查德培养基、燕麦培养基、玉米粉培养基中, 首先以目标降解菌 HG-P-01 菌株生长量为指标确定了查彼氏培养基为作为基础培养基, 其次应该说马铃薯培养基和燕麦培养基的效果也较好(表 1), 这为实际大规模培养又提供了备选的培养基方案。在优化查彼氏培养基 C、N、P 时, 分别采用了菌丝体生长量和降解率为指标建立了模型, 在验证实验中发现, 要求降解率和生长量同时达到理论预测最佳值实际上很困难, 如本文中, 降解率接近理论预测最佳值, 但菌丝体干重就显著低于理论最大值(表 4)。这可能是酶的产生量与菌丝体的生长量在相同时间内未必呈正相关, 由于在两种模型中降解菌培养条件不同, 差异较大(表 4), 也就是降解酶产生条件不同, 造成降解率与菌丝体干重模型理论最佳值的不一致。由于农药降解菌的研究的目的是将环境或农产品表面(如水果、蔬菜)表面残留农药尽可能降低, 所以, 本文认为农药降解菌时以降解率为主要指标进行筛选研究可能更加切合实际。

### 参 考 文 献

- [1] 唐除痴, 李煜昶, 陈 彬, 等. 农药化学. 天津: 南开大学出版社, 1998, pp.174-175.
- [2] Sinha G, Agrawal AK, Islam F, *et al.* Mosquito repellent (pyrethroid-based) induced dysfunction of blood/brain barrier permeability in developing brain. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 2004, **22**(1): 31-37.
- [3] Kolaczinski JH, Curtis CF. Chronic illness as a result of low-level exposure to synthetic pyrethroid insecticides: a review of the debate. *Food and Chemical Toxicology*, 2004, **42**(5): 697-706.

- [4] Kasat K, Go V, Pogo BGT. Effects of pyrethroid insecticides and estrogen on WNT10B proto-oncogene expression. *Environment International*, 2002, **28**(5): 429–432.
- [5] Xia YK, Bian Q, Xu LC, *et al.* Genotoxic effects on human spermatozoa among pesticide factory workers exposed to fenvalerate. *Toxicology*, 2004, **203** (1-3): 49–60.
- [6] Grosman N, Diel F. Influence of pyrethroids and piperonyl butoxide on the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity of rat brain synaptosomes and leukocyte membranes. *Int Immunopharm*, 2005, **5** (2): 63–70.
- [7] Caglan A, Benli K. Investigation of acute toxicity of cyfluthrin on tilapia fry (*Oreochromis niloticus* L. 1758). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2005, **20**(2): 279–283.
- [8] 张俊, 王定勇. 蔬菜的农药污染现状及农药残留危害. 河南预防医学杂志, 2004, **15**(3): 182–185.
- [9] 王瑞, 黄昭瑜, 古松浩, 等. 深圳市 2006 年市售蔬菜农药残留情况分析. 安徽农业科学, 2007, **35**(31): 9961–9962.
- [10] 方中达. 植病研究方法. 北京: 中国农业出版社, 1999, pp.100–227.
- [11] 王兆守, 林淦, 李秀仙, 等. 拟除虫菊酯降解菌的分离、筛选及鉴定. 福建农林大学学报, 2003, **32**(2): 176–180.
- [12] 何良菊, 李培杰, 魏德洲, 等. 石油烃微生物降解的营养平衡及降解机理. 环境科学, 2004, **25**(1): 91–94.
- [13] Ibrahim HM, Yusoff WMW, Hamid AA, *et al.* Optimization of medium for the production of  $\beta$ -cyclodextrin glucanotransferase using Central Composite Design (CCD). *Process Biochemistry*, 2005, **40**(2): 753–758.
- [14] 盖钧镒. 田间试验与统计. 北京: 中国农业出版社, 2000, pp.197–256.
- [15] Kalil SJ, Maugeri F, Rodrigues MI. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. *Process Biochemistry*, 2000, **35**(6): 539–550.
- [16] Kónya A, Jekkel A, Sütő J, *et al.* Optimization of compactin fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1998, **20**(3-4): 150–152.
- [17] 褚以文. 微生物培养基优化方法及其 OPTI 优化软件. 国外医药抗生素分册, 1999, **20**(2): 58–61.
- [18] 常亚飞, 陈守文, 喻子牛. 苏云金素发酵培养基的优化设计. 中国生物防治, 2006, **22**(3): 190–194.
- [19] 张大皓, 谭天伟, 王炳武. 响应面试验设计优化脂肪酶发酵培养基. 北京化工大学学报, 2006, **33**(2): 41–44.
- [20] Ahmadi M, Vahabzadeh F, Bonakdarpour B, *et al.* Application of the central composite design and response surface methodology to the advanced treatment of olive oil processing wastewater using Fenton's peroxidation. *Journal of Hazardous Materials*, 2005, **123**(1-3): 187–195.
- [21] Rigas F, Dritsa V, Marchant R, *et al.* Biodegradation of lindane by *Pleurotus ostreatus* via central composite design. *Environment International*, 2005, **31**(2): 191–196.

## 稿件书写规范

## 论文中有关正、斜体的约定

物种的学名: 菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写, 其余小写, 属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶: 前 3 个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如: *Bam*H I、*Msp* I、*Sau*3A I 等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用 3 个字母表示时, 仅第一个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体, 蛋白质符号首字母大写, 用正体。