

# 生防木霉 SS003 菌株 (*Trichoderma atroviride*) 的固体发酵工艺研究

敖新宇, 程立君, 陈玉惠\*

(西南林业大学/云南省森林灾害预警与控制重点实验室, 云南 昆明 650224)

**摘要:** 为了探索酷绿木霉 SS003 菌株固体发酵产孢子的较优工艺条件。分别以酷绿木霉 SS003 菌株为供试菌和以玉米秸秆、麦麸发酵基质, 分别进行了固体发酵培养基配方和固体发酵条件的优化筛选, 试验设计均采用单因素试验。试验最终检测方法采用血球计数板倍量稀释法镜检孢子量 ( $10^8$  个/g)。分别获得了酷绿木霉 SS003 菌株产孢固体发酵的较优培养基配方和较优固体发酵条件, 即 80 目的玉米秸秆与麦麸配比 1:3, 接种  $1 \times 10^6$  个/mL 的 SS003 孢子液, 保持含水量 55% 和充分通气, 培养 11 d 后, 酷绿木霉 SS003 菌株固体发酵产孢量达到最大 ( $76.14 \times 10^8$  个/g)。初步探索到绿木霉 SS003 菌株固体发酵产孢的较优工艺条件, 为该菌的深入研究提供了有益的试验数据。

**关键词:** 酷绿木霉; 固体发酵工艺; 优化筛选

中图分类号: S482.4 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)06-1256-06

## The Solid Fermentation Technology for Bio-control Strain SS003 of *Trichoderma atroviride*

AO Xin-yu, CHENG Li-jun, CHEN Yu-hui\*

(Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control in Yunnan Province, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

**Abstract:** To explore the better technology for the spore production of the strain SS003 of *Trichoderma atroviride*. Strain SS003 of *Trichoderma atroviride* as testing strain and corn straw and wheat bran as substrates, the methods of single-factor selection were adopted to optimize and select the substrate ingredients and conditions for the solid fermentation. The final test adopted the hemocytometer doubling-dose dilution method to microscopically examine numbers of bacterial colonies ( $10^8$  /g). Comparatively good substrate ingredients for the spore production of the strain SS003 of *Trichoderma atroviride* and good conditions for solid fermentation were as follows: to inoculate  $1 \times 10^6$  个/mL spore suspension of the strain SS003 to the substrates with the ratio of corn straw and wheat bran through 80 mesh sieve was 1:3, maintaining content of moisture as 55% and good ventilation, after 11 d, the spore production of the strain SS003 of *Trichoderma atroviride* under solid fermentation reached maximum at  $76.14 \times 10^8$  /g. The comparatively good technology for the spore of the strain of *Trichoderma atroviride* under solid fermentation was primarily obtained, which would benefit its deep research.

**Key words:** *Trichoderma atroviride*; solid fermentation technology; optimization and selection

收稿日期: 2012-04-18 修回日期: 2012-09-07

基金项目: 西南林业大学重点科研项目资助(110706)和云南省森林灾害预警与控制重点实验室资助(ZK09B101)

作者简介: 敖新宇(1978—), 男, 硕士生, 主要从事生物化学研究, E-mail: axyzym@swfu.edu.cn; \* 通讯作者: 陈玉惠, 教授, 博士, E-mail: cyh196107@126.com。

木霉菌是一种具有重要利用价值的拮抗性真菌,对多种植物病原菌具有拮抗作用,被定义为一种重要的生防因子<sup>[1]</sup>。近十几年内,国内外对木霉菌在植物病害防治方面的研究取得了大量成果,筛选出了一些高效菌株用于生防作用、生防机制以及制剂加工的相关研究,在防治植物病害方面发挥着越来越重要的作用。

如何获得大量的发酵产物如分生孢子、菌丝体或厚垣孢子等是木霉制剂的加工和生产关键技术之一。而固体发酵是目前公认的获得真菌孢子的最好方法之一,它不仅产量高,而且质量好。在固体发酵中,由于菌体在湿度较低条件下生长,因而通常得到的孢子对干旱条件更具抗性,而且在干燥的环境中更稳定<sup>[2]</sup>。本研究在华山松疱锈病菌重寄生木霉(*Trichoderma atroviride* P. Karsten) SS003 菌株生物学特性研究基础上<sup>[3-5]</sup>,对其固体发酵条件进行优化,以获得大量分生孢子,为该生防菌剂的研制奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试菌株: 靛绿木霉(*T. atroviride* P. Karsten) SS003 菌株由西南林业大学提供。

供试固体发酵基质: 经粉碎过 16 目、32 目、60 目、80 目、120 目筛的玉米秸秆粉和麦麸粉。

### 1.2 方法

1.2.1 培养基的配制方法 (1) PDA 平板培养。PDA 平板培养的方法参照周利<sup>[6]</sup>的方法进行。PDA 平板培养后,用无菌水清洗平板,过滤后得到孢子悬浮液,经无菌水稀释至一定浓度后备用。

(2) 固体发酵培养。称量 50 g 固体发酵培养基质,加 100 mL 蒸馏水,混匀(含水量为 66.67%) 装入 500 mL 三角瓶中,灭菌 60 min 后接入供试木霉的孢子悬浮液 10 mL(孢子浓度为  $1.0 \times 10^7$  个/mL),用 6 层纱布封口,以保证良好的透气性。然后于 25 °C 光暗交替(光照:黑暗 = 12:12) 下培养,每处理设 5 个重复。从第 3 天开始,每隔 24 h 搅拌 1 次,培养至第 10 天,取部分发酵产物干燥备用。

1.2.2 固体发酵培养基配方的优化筛选试验方法 (1) 固体发酵培养基质的筛选。称取过 60 目筛的玉米秸秆粉、麦麸粉和 1:1 混合的玉米秸秆与麦麸粉各 50 g,按 1.2.2 的方法进行培养并按 1.2.3 的方法检测孢子量。

(2) 培养基质最佳配比的筛选。将过 60 目筛的玉米秸秆粉与麦麸粉按 5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5 的比例进行混合,混合后各取 50 g,按 1.2.2 的方法进行培养并按 1.2.3 的方法检测孢子量。

1.2.3 固体发酵条件的优化筛选试验方法 (1) 培养基质最佳含水量的筛选。将过 60 目筛的玉米秸秆粉与麦麸粉按 1:3 的比例混合后,分别称取 50 g,加入蒸馏水混匀,并使含水量分别达到 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75% 后,装入三角瓶中按 1.2.2 的方法进行培养并按 1.2.3 的方法检测孢子量。

(2) 培养基质最佳细度的筛选。将过 16 目、32 目、60 目、80 目、120 目筛的玉米秸秆粉与麦麸粉分别按 1:3 的比例混合后,分别称取 50 g,加入蒸馏水混匀(含水量为 55%),装入三角瓶中按 1.2.2 的方法进行培养并按 1.2.3 的方法检测孢子量。

(3) 最佳接种量和发酵时间的筛选。将过 80 目筛的玉米秸秆-麦麸粉按 1:3 混合。每个样称取 50 g,加入蒸馏水混匀(含水量为 55%) 后装入 500 mL 三角瓶中灭菌。灭菌后分别接入浓度为  $1.0 \times 10^5$  个/mL、 $1.0 \times 10^6$  个/mL、 $1.0 \times 10^7$  个/mL、 $1.0 \times 10^8$  个/mL 的孢子悬浮液 10 mL,参照 1.2.2 的方法发酵至 5、7、9、11、13、15 d 后,按 1.2.3 的方法检测孢子量。

(4) 通气量对产孢的影响。取过 80 目筛的玉米秸秆麦麸混合物(1:3) 50 g,加入蒸馏水混匀(含水量为 55%) 后,分别装入 500 mL 三角瓶中灭菌。灭菌后接入孢子悬浮液 10 mL( $1.0 \times 10^6$  个/mL),参照 1.2.2 的方法在不通气(不搅拌)与通气(24 h 搅拌一次)条件下培养 11 d 后,按 1.2.3 的方法检测孢子量。

1.2.4 产孢曲线 在以上筛选获得的产孢最佳条件下培养供试木霉,5 d 后每 24 h 取部分发酵产物干燥,然后按 1.2.3 的方法检测孢子量,以发酵时间为横坐标,产孢量为纵坐标绘制 SS003 菌株的产孢曲线。采用软件 SPSS 13.0 进行数据分析。

1.2.5 孢子量的检测方法 称取 1 g 干燥后的发酵产物,加入 90 mL 无菌水,磁力振荡 10 min,然后用滤纸过滤弃菌丝,制成分生孢子悬液,然后用血球计数板倍量稀释法镜检孢子量,每处理设 5 个重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 固体发酵培养基配方的优化筛选

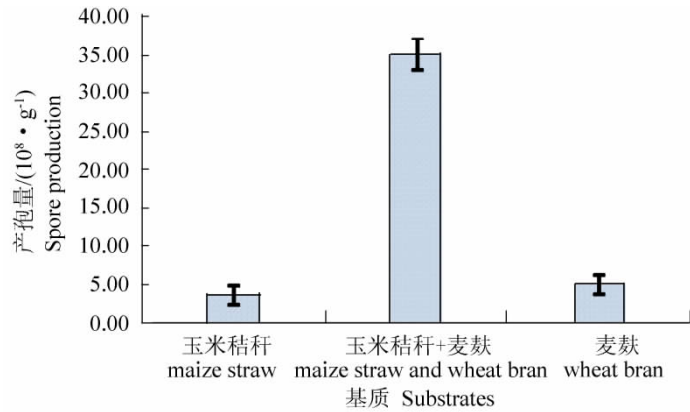
2.1.1 固体发酵基质的筛选 酷绿木霉 SS003 在 3 种发酵基质上的产孢量见图 1。图 1 显示,SS003 在 3 种发酵基质上都能产孢,但产孢量不同。在玉米秸秆与麦麸(1:1)的混合物发酵基质上产孢量最大,达  $35.1 \times 10^8$  个/g,分别是玉米

秸秆和麦麸发酵基质上产孢量的 9.56 倍和 6.88 倍;在玉米秸秆发酵基质上产孢量最低,仅  $3.67 \times 10^8$  个/g,发酵基质的成分组成直接关系着 SS003 分生孢子的产生量。数据分析结果显示,在 3 种发酵基质上,酷绿木霉 SS003 的产孢量存在极显著差异 ( $P < 0.01$ ),玉米秸秆与麦麸的混合发酵基质较适合 SS003 产孢。

2.1.2 固体发酵培养基最佳配比的筛选 SS003 在不同配比的混合基质(玉米秸秆与麦麸)上产孢量存在明显差异 ( $P < 0.01$ ) (图 2)。在 1:3(玉米秸秆:麦麸)配比的发酵基质上平均产孢量最大,达到  $25.87 \times 10^8$  个/g,而在 5:1 和 4:1 配比的基质上产孢量较小,分别仅为  $9.90$  和  $8.07 \times 10^8$  个/g。

### 2.2 固体发酵条件的优化筛选

2.2.1 固体发酵培养基最佳含水量的筛选 发酵基质的含水量对 SS003 分生孢子的产生量具有较大影响,基质含水量不同则产孢量明显不同(图 3)。SS003 在含水量 45% ~ 60% 的基质上生长时分生孢子产生量相对较高,均超过  $26.00 \times 10^8$  个/g,最利于分生孢子产生的基质含水量为 55%,此时产孢量最大,可达  $39.88 \times 10^8$  个/g,与其它含水量的基质产孢量相比,具有极显著的差异 ( $P < 0.01$ )。同时在基质含水量 55% 前后出现了较明显的线性相关,而

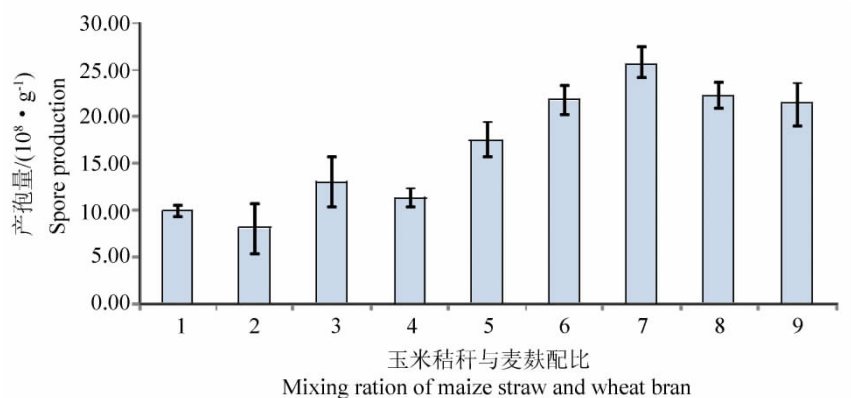


SS003 的平均产孢量由平均值  $\pm$  标准误差 (SE) 表示;在不同基质上平均产孢量的差异用字母表示,小写字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ ),大写字母表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

The average spore production of the strain SS003 is showed by average value  $\pm$  standard error (SE); Differences of the average spore production in different substrates are showed by letters, and small letters stands for significant difference ( $P < 0.05$ ) while capital letters stands for extreme difference.

图 1 酷绿木霉在 3 种发酵基质下的产孢量

Fig. 1 Spore production of *Trichoderma atroviride* in three kinds of fermentation substrates



1 代表 5:1; 2 代表 4:1; 3 代表 3:1; 4 代表 2:1; 5 代表 1:1; 6 代表 1:2; 7 代表 1:3; 8 代表 1:4; 9 代表 1:5。

one represents 5:1, two for 4:1; three for 3:1; four for 2:1; five for 1:1; six for 1:2; seven for 1:3; eight for 1:4; nine for 1:5.

图 2 酷绿木霉在不同配比基质下的产孢量

Fig. 2 Spore production of *Trichoderma atroviride* under different mixing ratio of substrates

在低含水量时,SS003 随着基质含水量的增加产孢量增加;在基质的含水量为 40%~55%,基质含水量与 SS003 产孢量的线性回归方程为  $y = 1.4564x - 40.129$ ,  $R^2 = 0.8992$ 。但当基质含水量超过 55% 时,随着基质高含水量升高产孢量迅速下降,当基质含水量由 55% 增加至 75% 时,产孢量由最大时的  $39.88 \times 10^8$  个/g 下降至  $2.42 \times 10^8$  个/g,下降幅度超过 37.46  $\times 10^8$  个/g 线性回归方程为  $y = -1.8718x + 140.31$ ,  $R^2 = 0.9764$ 。通过以上的分析,可以得出:基质的含水量成为了 SS003 产孢量的主要限制因子。

2.2.2 固体发酵培养基质最佳细度的筛选 SS003 的产孢量随基质细度的变化而变化,当基质细度在 80 目以下时,随着细度的增加,产孢量逐渐增加,当细度达到 80 目时产孢量

最大,达到  $75.6 \times 10^8$  个/g。但当基质细度超过 80 目后,随细度增加产孢量下降。当基质细度达 120 目时,产孢量为  $58.9 \times 10^8$  个/g 较基质 80 目时的产孢量下降  $16.7 \times 10^8$  个/g(图 4)。SS003 在不同细度的玉米秸秆与麦麸混合发酵基质下的产孢量之间存在极显著差异 ( $P < 0.01$ )。

2.2.3 固体发酵最佳接种量和发酵时间的筛选 接种量和培养时间对 SS003 产孢量的影响见表 1。表 1 显示,接种量和培养时间均明显影响 SS003 孢子产量。不同接种浓度下,随培养时间的延长,产孢量均呈现逐渐增加的趋势,前期(培养 5~11 d)增加明显,后期(培养 11~15 d)趋于稳定。在不同培养时间和不同接种量下,产孢量最先达到最大 ( $76.14 \times 10^8$  个/g) 的组合为培养时间 11 d、接种量  $1 \times 10^6$  个/mL。数据分析结果显示,培养时间和接种量 ( $P < 0.01$ ) 对产孢量均具有极显著影响。

表 1 接种浓度和发酵时间对酷绿木霉产孢量的影响

Tab.1 Spore production of *Trichoderma atroviride* under different amount of inoculums concentration and fermentation time  $\times 10^8$  /g

培养时间/d Fermentation time	接种浓度/(个·mL <sup>-1</sup> ) Inoculums concentration			
	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^8$
5	0.19 ± 0.06Aa	0.64 ± 0.06Aa	1.25 ± 0.16Aa	3.36 ± 0.37Aa
7	11.78 ± 0.57Bb	18.84 ± 0.57Cc	22.79 ± 0.49Ccd	21.55 ± 0.87Cc
9	27.86 ± 1.20Dd	38.34 ± 0.75Ee	45.58 ± 1.31Ff	34.72 ± 2.06Ee
11	62.00 ± 1.51Hh	76.14 ± 2.66Ii	63.42 ± 1.87Hh	48.50 ± 1.51FGfg
13	61.05 ± 1.28Hh	73.05 ± 2.86Ii	74.61 ± 1.53Ii	52.77 ± 1.95Gg
15	62.01 ± 1.53Hh	69.36 ± 1.72Ii	73.74 ± 2.30Ii	52.98 ± 0.67Gg

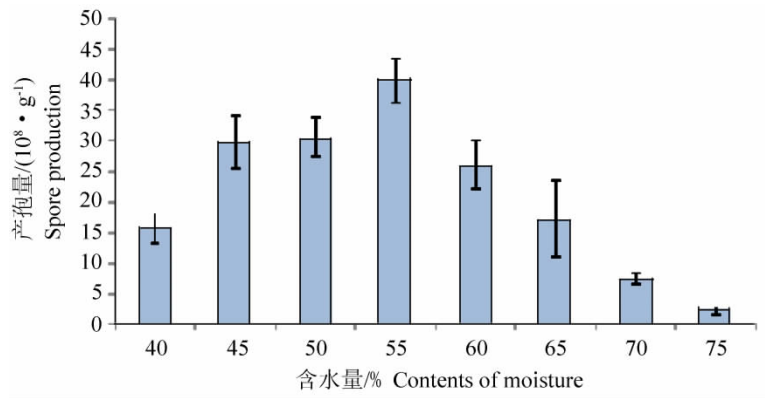


图 3 含水量对酷绿木霉产孢量的影响

Fig.3 Spore production of *Trichoderma atroviride* under different moisture contents

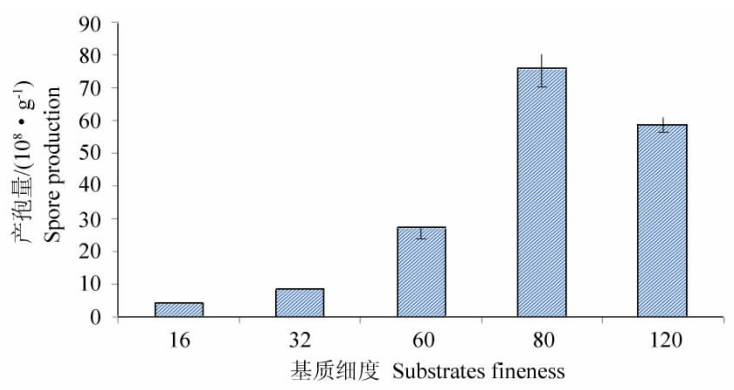


图 4 基质细度对酷绿木霉产孢量的影响

Fig.4 Spore production of *Trichoderma atroviride* under different fineness of substrates

2.2.4 固体发酵通气量对产孢量的影响 SS003 在通气条件下的产孢量明显高于不通气条件下的产孢量(图 5)。在通气条件下,平均产孢量高于  $70.0 \times 10^8$  个/g,而不通气条件下平均产孢量低于  $50.00 \times 10^8$  个/g,方差分析结果显示,两者之间存在极显著差异 ( $P < 0.01$ ),通气有利于提高 SS003 的产孢量。

2.3 固体发酵产孢曲线

赭绿木霉 SS003 的固体发酵产孢量随时间的变化呈“S”型增长,第 6 天以前为增长延迟期,第 7~11 天为对数增长期,11 天以后进入稳定期。因此在赭绿木霉 SS003 发酵工艺生产过程中,在发酵培养 11 天时即可获得较高孢子产量(图 6)。采用 SPSS13.0 进行分析,平均产孢量( $Y$ )与发酵时间( $X$ )的关系符合逻辑斯蒂曲线模型 ( $F = 114.843, P = 0.000 < 0.01$ ),数学模型为  $Y = 46.2 / (1 + EXP(14.1526 - 1.5669X))$ ,产孢量的实际观测值与数学模拟值能够较好的重合(图 6),模型确定系数  $R^2$  达 94.3%,所获得的参数能通过 t 检验 ( $t = 6.839, P = 0.00 < 0.01$ )。

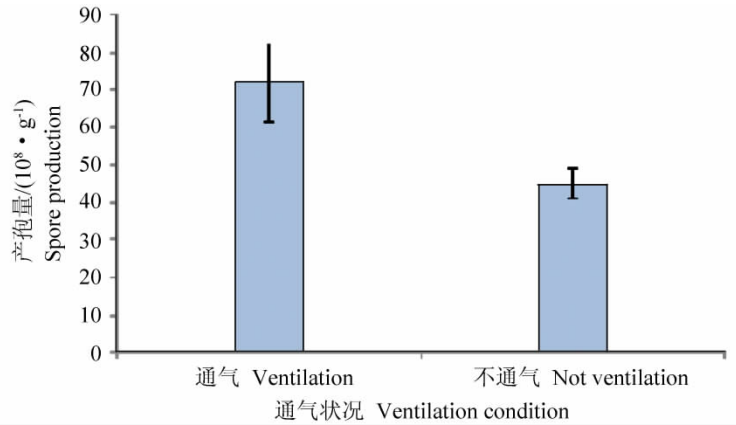


图 5 通气条件对赭绿木霉产孢量的影响

Fig. 5 Effect of ventilation on the spore production of *Trichoderma atroviride*

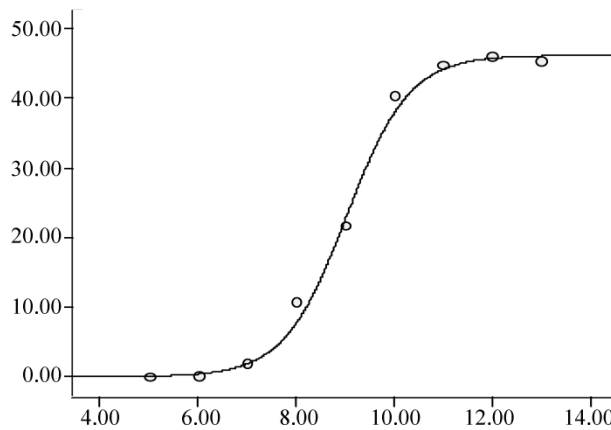


图 6 SS003 固体发酵产孢量观测值与逻辑斯蒂方程拟合值的比较

Fig. 6 Comparison of the observed value of SS003 under solid-state fermentation with the fitted value of logistic equation

3 结论与讨论

(1) 木霉在生物防治上的应用多

为孢子制剂,因此如何获得大量的发酵产物(如分生孢子或厚垣孢子)是木霉菌制剂生产的关键技术之一。本研究在参考大量文献的基础上<sup>[7-11]</sup>,选择玉米秸秆、麦麸、玉米秸秆与麦麸的混合物作为发酵培养基质对赭绿木霉 SS003 的固体发酵条件进行了筛选,结果发现发酵基质种类、基质配比、基质含水量、基质细度、接种量、发酵时间和通气量对发酵的分生孢子产量都具有显著的影响。SS003 在配比 1:3 的过 80 目筛的玉米秸秆与麦麸发酵基质上,接种 10 mL 浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL 的孢子液,保持含水量 55% 和充分通气,培养 11 d 后产孢量达到最大,达到了  $76.14 \times 10^8$  个/g。

(2) 目前,国内外关于木霉的固体发酵的研究较多,而且固体发酵的基质大多为稻草、稻壳、麸皮、玉米秸秆及玉米种皮<sup>[12-15]</sup>。本研究所采用的发酵基质为玉米秸秆和麦麸,都是农作物的废弃材料,两种基质容易得到且节约成本,有利于环保。玉米秸秆与麦麸 1:3 配比时产孢量最大,其中玉米秸秆的作用可能主要是改善了发酵基质的通气条件,因为纯麦麸加水后粘度大通气状况差,不利于分生孢子的产生。

(3) 本研究采用固体发酵的方式得到 SS003 的分生孢子,其孢子的产量高,质量较好。但由于实验室发酵条件的限制,对温度和通气条件的控制不足,夜间温度过低以及三角瓶中通气状况不佳等因素,均对分生孢子的产生造成了一定影响,因而在固体发酵产孢曲线绘制实验中所得最大产孢量( $0.5 \times 10^{10}$  个/g)没有达到图 5 中的最大量( $0.7 \times 10^{10}$  个/g),低于当前木霉固体发酵的研究水平( $1.0 \times 10^{10}$  个/g)。若将发酵室的温度控制在 25 °C 左右,并改善通气条件,产孢量可能会有较大的提高。

## 参考文献:

- [1] Cook R J, Baker K F. The nature and practice of biological control of plant pathogens [J]. American Phytopathological Society, 1983: 318.
- [2] 弓爱君, 孙翠霞, 邱丽娜, 等. Bt 生物农药 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [3] 杨艳红, 陈玉惠, 朱云峰, 等. 西南地区茶藏生柱锈重寄生菌的分离与鉴定 [J]. 浙江林学院学报, 2005, 22(4): 414-419.
- [4] 陈玉惠, 杨艳红, 李永和, 等. 3 株木霉 (*Trichoderma* spp.) 对华山松疱锈病菌孢子的破坏作用 [J]. 植物保护, 2006, 32(6): 62-65.
- [5] 周利, 肖斌, 陈玉惠, 等. 2 株重寄生木霉菌丝生长的生物学特性 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2008, 32(1): 95-98.
- [6] 周利. 3 株木霉的鉴定和生物学特性及对华山松疱锈的防治研究 [D]. 昆明: 西南林学院, 2007.
- [7] 于敏敏, 王守娟, 刘鹏, 等. 木霉 T68 发酵基质的研究 [J]. 中国酿造, 2011, 3: 31-35.
- [8] 王未名, 陈建爱, 高国强, 等. 适宜黄绿木霉 T1010 生长培养料筛选 [J]. 中国生物防治, 2009, 7(21): 58-62.
- [9] 田连生, 李书生, 史延茂, 等. 利用玉米秸秆制备生物杀菌剂的研究 [J]. 中国生态农业学报, 2005, 13(2): 59-61.
- [10] 张丽萍, 钱磊, 程辉彩, 等. 绿色木霉固体发酵产纤维素酶条件及酶性质的研究 [J]. 河北省科学院学报, 2000, 17(2): 120-123.
- [11] 郑亚平, 余晓斌. 碳源对绿色木霉 ZC 产中性纤维素酶的影响 [J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(2): 30-33.
- [12] 史国翠, 尹文新, 张敏. 康氏木霉产纤维素酶固态发酵条件的研究 [J]. 江苏农业科学, 2011(1): 378-380.
- [13] 李杰, 肖连冬, 程爽, 等. 绿色木霉 - M1 固态发酵产纤维素酶条件研究 [J]. 现代农业科技, 2011(12): 49-51.
- [14] 白洪志, 王惠, 韩梅, 等. 绿色木霉 C-08 产纤维素酶的固态发酵条件优化 [J]. 沈阳农业大学学报, 2010, 41(6): 681-685.
- [15] 王敏, 王颖, 孙剑峰, 等. 响应面法优化固态发酵产纤维素酶条件 [C]//中国食品科学技术学会第六届年会暨第五届东西方食品业高层论坛论文集, 2009.

## (上接第 1250 页)

- [7] Hisn-der shih, Yung - ghuan liu, Fen - linhsu, et al. Fungichromin: A substance from *Streptomyces padanus* with inhibitory effects on *Rhizoctonia solani* [J]. Agric Food Chem, 2003, 51(1): 95-99.
- [8] Huang J W, Shih H D, Huang H C, et al. Effects of nutrients on production of fungichromin by *Streptomyces padanus* PMS-702 and efficacy of phytophthora infestans [J]. Can J Plant Patho, 2007, 27(3): 261-267.
- [9] Wu J Y, Huang J W, Shih H D, et al. Optimization of cultivation conditions for fungichromin production from *Streptomyces padanus* PMS-702 [J]. Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers, 2008, 39(1): 67-73.
- [10] 周云, 张智平, 涂晓嵘, 等. 农抗 702 抗真菌活性的测定 [J]. 江西农业大学学报, 2009, 31(6): 1127-1133.
- [11] 姚朔影, 邱德清. 纳他霉素稳定性研究 [J]. 中国食品添加剂, 2011(1): 69-71.
- [12] 魏赛金, 熊智强, 涂国全, 等. 链霉菌 702 菌株所产抗真菌单体组分 DZP-8 和 DZP-9 的分离纯化与制备 [J]. 广东农业科学, 2011, 38(16): 4-7.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部) [M]. 北京: 化学工业出版社, 1990.
- [14] 李德舜, 苏忠锐, 袁志刚, 等. 山东链霉菌产抗真菌物质的理化性质的初步研究 [J]. 山东大学学报, 2004, 39(6): 12.
- [15] 周利娟, 焦阳, 陆姚新, 等. 海洋链霉菌 GB-2 产抗菌物质的分离纯化和稳定性研究 [J]. 中国海洋药物杂志, 2009, 28(4): 395-398.
- [16] 张慧雯, 薛秀园, 张智平, 等. 链霉菌 702 所产抗真菌物质对水稻纹枯病抑菌机制的研究 [J]. 江西农业大学学报, 2007, 29(1): 38-42.