

绿色木霉菌株 Tv04-2 固体发酵条件研究

刘时轮^{1,2}, 李 勇², 傅俊范¹, 万隆², 方焕民³

(1. 沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳 110161; 2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193;

3. 抚松县万良镇农业技术推广站, 吉林 抚松 134521)

摘要: 以产孢量为测定指标, 通过单因子和正交试验对人参根部病害拮抗绿色木霉菌株 Tv04-2 固体发酵条件进行了筛选, 获得了以玉米粉、麦麸等廉价农产品及其副产物为碳、氮源的最佳固体发酵培养基, 其配方为: 在 250 mL 三角瓶中装入 20 g 固体基质, 其中玉米粉 麦麸按 1:1 比例混合, FeSO_4 含量 0.1 g, 水 7 mL, 接种量 4 mL; 最佳发酵条件为: 25、20 和 28℃ 下依次发酵 2 d。利用优化培养基及发酵条件进行发酵试验, 可以获得高达 4×10^9 cfu/g 的产孢量, 为人参根部病害高拮抗活性木霉菌剂的生产和应用奠定了基础。

关键词: 绿色木霉; 固体发酵; 产孢量

中图分类号: S476; TQ920.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)增刊-0244-04

Study on Fermentation Conditions of Antagonistic *Trichoderma viride* Tv04-2 Strain

LIU Shirun^{1,2}, LI Yong², FU Jurfan¹, DING Wannong², FANG Huamin³

(1. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China; 2. Institute of

Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical

College, Beijing 100193, China; 3. The Agro-Tech Extension and Service Center in Wanliang Town of

Fusong County, Fusong 134521, China)

Abstract: Optimal solid-state fermentation conditions were studied according to the sporulation quantity of *Trichoderma viride* isolate Tv04-2 by simple factor and orthogonal experiments. The most optimal medium was formulated as following: 250 mL erlenmeyer flask contained 20 g of equal quality of maize powder and wheat bran mixture, 0.1 g FeSO_4 , 7 mL water and 4 mL inoculum. The fermentation process was at a fluctuant temperature of 25, 20 and 28℃ for 2 days, respectively. Under this optimal medium and fermentation process, the spore concentration of 4×10^9 cfu/g can be obtained, and which accelerated the production and application of *Trichoderma viride* strain with high antagonistic activity of ginseng root diseases.

Key words: *Trichoderma viride*; Solid fermentation; Sporulation quantity

绿色木霉菌(*Trichoderma viride*)能够通过竞争、重寄生、抗生、诱导抗性、植物促生等多种机制实现对病原真菌的拮抗作用, 目前已被广泛应用于由立枯丝核菌、腐霉菌、镰刀菌等引发的植物病害的生物防治^[1,2]。人参是我国传统名贵中药材, 大面积人工栽培造成人参病害普遍发生, 严重影响了人参产量和品质^[3]。室内与病菌对峙培养及田间试验均证实, 绿色木霉 Tv04-2 菌株对人参根病有较好的防治效果, 该菌株在人参病害防治上具有广阔的应用前景^[4]。国内外对绿色木霉菌发酵工艺开展的大量研究表明, 绿色木霉菌对营养要求不是很严格, 纤

维素、半纤维素、几丁质等均可作为碳源被其利用, 且矿质元素对绿色木霉菌生长及产孢具有促进作用^[5]。本试验旨在以廉价的农产品及其副产物为主料, 并辅以微量矿质元素作为发酵培养基, 通过单因子和正交试验筛选最佳的固体发酵培养基及室内发酵条件, 为人参病害拮抗木霉 Tv04-2 菌株的大规模产业化发酵提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

菌种: 绿色木霉 Tv04-2 菌株由中国医学科学院

收稿日期: 2008-08-29

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BA109B04-01)

作者简介: 刘时轮(1982-), 男, 辽宁朝阳人, 在读硕士, 主要从事药用植物病害生物防治技术研究。

通讯作者: 丁万隆(1962-), 男, 辽宁大连人, 研究员, 主要从事药用植物栽培及病害生物防治技术研究。

药用植物研究所植物保护实验室保存。

发酵基质: 麦麸、玉米粉、稻壳。矿质元素: K_2SO_4 、 $FeSO_4$ 、 $MgSO_4$ 、 $CaSO_4$ 、 $CuSO_4$ 、 $ZnSO_4$ 。

1.2 方法

1.2.1 木霉菌发酵及产孢量测定 将固体培养基加入适量蒸馏水搅拌均匀, 装入 250 mL 三角瓶中封口灭菌, 培养好的绿色木霉 Tv04-2 菌株用无菌水配制孢子悬浮液(1×10^5 cfu/mL)。将孢悬液接种培养基, 静置培养。取 0.5 g 培养物, 0.1% 吐温水稀释, 在磁力搅拌器上充分搅拌, 血球计数板测定孢子浓度^[6]。

1.2.2 固体发酵培养基的优化

1.2.2.1 固体培养基筛选 分别设 3 种单一物质培养基: 麦麸、玉米粉、稻壳; 4 种混合物质培养基: 玉米粉+ 麦麸、玉米粉+ 稻壳、麦麸+ 稻壳、玉米粉+ 麦麸+ 稻壳。混合培养基中不同成分等比例混合, 共 7 种处理, 每种处理设 3 次重复。根据产孢量筛选最佳培养基, 并在此基础上筛选培养基中不同成分的最佳配比。

1.2.2.2 培养基加水量 在 20 g 已筛选的培养基中分别加水 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 mL, 共 10 个处理, 每种处理设 3 次重复。

1.2.2.3 矿质元素 在 20 g 已筛选的培养基中分别添加 0.2 g 的 $CuSO_4$ 、 $MgSO_4$ 、 $ZnSO_4$ 、 $CaSO_4$ 、 K_2SO_4 或 $FeSO_4$, 对照不添加矿质元素, 共 7 种处理, 每种处理设 3 次重复。

1.2.2.4 正交试验优化培养基 在单因素试验基

础上, 进行 3 因素多水平正交试验。

1.2.3 固体培养基优化条件下发酵条件的确定

1.2.3.1 瓶装量 分别向 250 mL 三角瓶中添加 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 g 优化培养基, 共 7 个处理, 每种处理设 3 次重复。

1.2.3.2 接种量 分别向 20 g 优化培养基中接种 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 mL 孢悬液, 共 9 个处理, 每种处理设 3 次重复。

1.2.3.3 温度 设 20, 23, 25, 28, 30℃及变温 25~20~28℃(每 2 d 变换温度)等 6 个处理, 每种处理设 3 次重复。

1.2.3.4 时间 每天测定产孢量, 确定达到最大产孢量的培养时间, 每次测定设 3 次重复。

1.2.4 数据统计及分析 试验结果用 Excel 软件(2003 版)进行数据处理。用 SPSS 11.0 中的单因素方差分析(One way ANOVA)结合 LSD 法对统计结果进行单因素显著性方差分析; 用单样本 t 测验检验正交试验统计结果的显著性。

2 结果与分析

2.1 固体发酵培养基的优化

2.1.1 固体培养基单因素分析 对 3 种单一物质培养基和 4 种混合物质培养基的固体发酵研究结果表明, 混合培养基玉米粉+ 麦麸产孢量最大(表 1)。培养基中玉米粉与麦麸的配比试验结果表明, 玉米粉: 麦麸在 3: 7、4: 6 和 5: 5 时产孢量均较高, 且 3 种处理间无显著差异(图 1)。

表 1 不同固体培养基对产孢量的影响

Tab.1 Effect of solid media on sporulation quantity

培养基 Medium	稻壳 R. H.	玉米粉 M. F.	麦麸 W. B.	稻壳+ 麦麸 R. H. + M. F.	稻壳+ 玉米粉 R. H. + M. F.	玉米粉+ 麦麸 M. F. + W. B.	稻壳+ 玉米粉+ 麦麸 R. H. + M. F. + W. B.
孢子浓度/($\times 10^9$ cfu/g) Spore concentration	0.46	1.42	2.20	0.87	1.93	2.82	2.36

注: R. H.: Rice husk; M. F.: Maize flour; W. B.: Wheat bran.

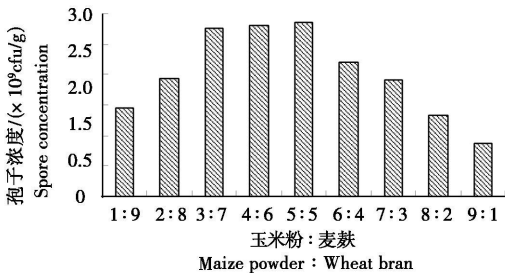


图 1 玉米粉与麦麸不同比例对产孢量的影响

Fig.1 Effect of ratios of maize powder to wheat bran in medium on sporulation quantity

发酵过程中, 培养基中加水的多少直接关系到氧气供应和木霉菌生长状态, 进而影响菌株产孢, 是

影响发酵的关键环节之一。试验结果表明, 在培养基中加 5, 6, 7 mL 水时, 木霉菌株均有较高产孢量, 且三者差异不显著(图 2)。

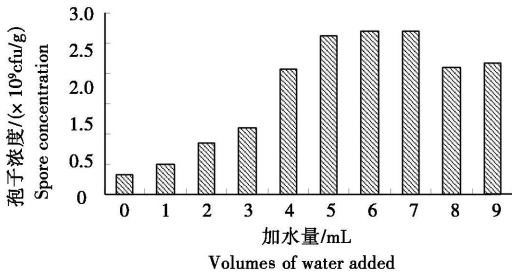


图 2 培养基中不同加水量对产孢量的影响
Fig.2 Effect of volumes of waters added on sporulation quantity

有研究报道, 矿质元素(如 Cu、Zn、Fe、K、Mg、Ca 等)可以影响木霉菌的生长和产孢^[5]。本研究发现, K^+ 和 Fe^{2+} 对木霉菌株 Tv04-2 产孢均有促进作用, 但后者对木霉菌产孢的促进作用更显著(图 3)。

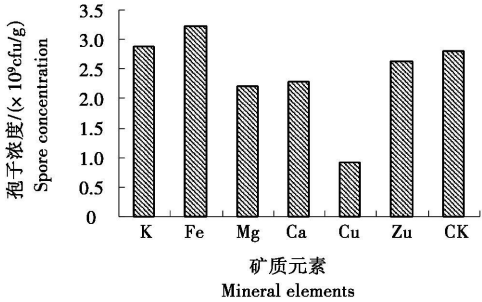


图 3 不同矿质元素对产孢量的影响

2.1.2 培养基正交优化 通过对单因素培养基组分的筛选, 分别对 3 个组分因子, 即玉米与麦麸比例、Fe 元素含量、加水量设置 3 个水平, 根据产孢量按正交设计进行优化组合筛选(表 2)。

表 2 固体培养基优化组合正交筛选
Tab.2 Screening of optimal solid medium by orthogonal experiments

处理 Treatments	玉米粉 麦麸 Maize powder : Wheat bran	FeSO ₄ /g	加水量/ mL Volume of water added	孢子浓度 /(× 10 ⁹ cfu/ g) Spore density
1	3 7	0.1	5	3.06
2	3 7	0.2	6	3.19
3	3 7	0.3	7	2.11
4	4 6	0.1	6	2.84
5	4 6	0.2	7	2.56
6	4 6	0.3	5	3.20
7	5 5	0.1	7	3.80
8	5 5	0.2	5	2.87
9	5 5	0.3	6	2.79

由表 3 可知, 玉米粉: 麦麸比例间的 $F = 1.852$, $p = 0.351 > 0.05$, $FeSO_4$ 含量之间的 $F = 3.613$, $p = 0.217 > 0.05$, 加水量间的 $F = 0.252$, $p = 0.799 > 0.05$, 表明 3 个因素在 3 个水平上对产孢量均无显著影响, 无需进行 3 个因素水平间的多重比较。对 9 个正交组合进行筛选发现, 组合 7(玉米粉: 麦麸 = 1: 1、 $FeSO_4$ 0.1 g, 加水量 7 mL)产孢量最大。

表 3 正交试验结果方差分析

Tab.3 Analysis of variance of orthogonal experimental results

因素 Factors	极差 R	离差平方和 SS	自由度 <i>df</i>	均方 MS	F 值 F value	p 值 p value
玉米粉: 麦麸 Maize powder: Wheat bran	1.10	5.83×10^{17}	2	2.92×10^{17}	1.852	0.351
$FeSO_4$	1.60	1.14×10^{18}	2	5.69×10^{17}	3.613	0.217
加水量 Volume of water added	0.66	7.94×10^{16}	2	3.97×10^{16}	0.252	0.799

2.2 固体培养基优化条件下发酵条件的确定

绿色木霉菌为好气性真菌, 发酵过程中三角瓶中供氧充足与否直接影响产孢。试验结果表明, 绿色木霉 Tv04-2 菌株在 250 mL 三角瓶中的最适瓶装量为 20 g 固体培养基(图 4)。

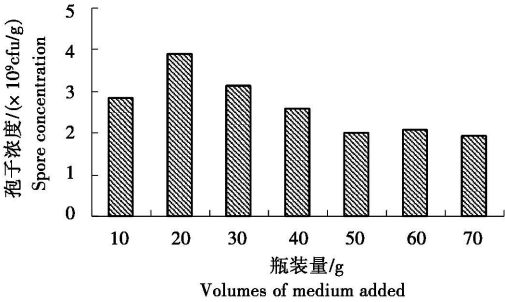


图 4 不同瓶装量对产孢量的影响

Fig.4 Effect of volumes of medium added on sporulation quantity

接种量对产孢量有较大影响。接种量过低, 木霉菌不能充分利用培养基的营养物质, 达到最大产孢量的发酵周期将延长; 接种量过高, 易造成木霉菌营养缺乏, 也不利于产孢。试验结果表明, 20 g 固体发酵培养基接种 4 mL 菌悬液最理想(图 5)。

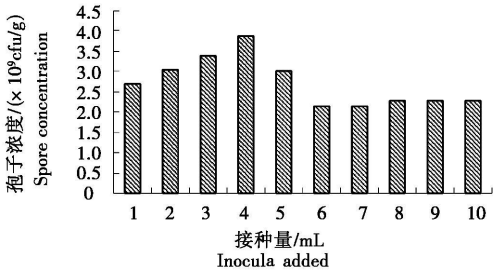


图 5 不同接种量对产孢量的影响

Fig.5 Effect of inocula added on sporulation quantity

5 个恒温处理中, 28℃ 条件下孢子产量最大, 25℃ 菌丝生长最好, 而相对于恒温发酵, 变温发酵对木霉菌产孢量影响显著。根据木霉菌的发酵特点, 本研究采用先降温后升温的变温发酵模式。前期发酵为菌株生长适应期, 在 25℃ 下发酵 2 d; 中期发酵因生物热能释放导致培养基升温, 改为 20℃ 发酵 2 d; 后期发酵木霉菌孢子大量成熟, 培养基养分消耗殆尽, 菌株生长趋缓, 适当提高培养温度, 可以缩短发酵周期。故再次升温至 28℃ 培养 2 d(图 6)。

在优化培养基及最佳发酵条件下, 2 d 后培养基中出现白色菌落并结块, 4 d 后出现浅绿色孢子, 6 d 后培养基转为深绿色, 孢子量达最大, 6~ 10 d 内孢子量基本保持不变, 10 d 后孢子数量有所减少, 可能

与培养基中水分和养分含量降低有关(图7)。

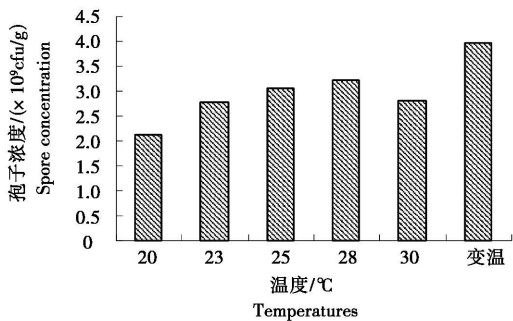


图6 发酵温度对产孢量的影响

Fig.6 Effect of fermentation temperatures on sporulation quantity

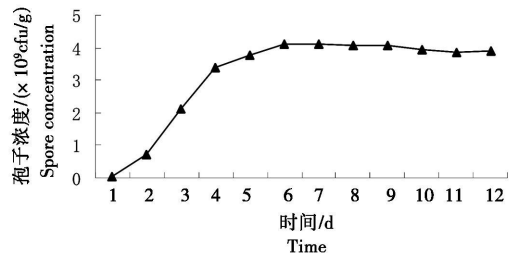


图7 产孢量随时间的变化情况

Fig.7 Time dependent changes of sporulation quantity

3 结论与讨论

麦麸是小麦加工过程中产生的主要副产物,富含纤维素、半纤维素以及蛋白质、脂肪、低聚糖等成分。有研究报道,发酵后麦麸粗蛋白、粗纤维等含量均有显著提高,可为木霉菌后期生长和产孢提供充足养分^[7]。玉米粉不适合木霉菌快速生长,但利于产孢。麦麸和玉米粉混合物是绿色木霉 Tv04-2 菌株发酵的理想培养基。本试验旨在用廉价的农产品及其副产物为木霉菌发酵提供碳、氮成分。研究还发现,培养基中加入适量铁元素可促进产孢。在

对发酵培养基进行筛选的基础上,笔者还对绿色木霉菌的最佳发酵条件进行了摸索,初步明确了绿色木霉 Tv04-2 菌株最佳固体发酵条件为: 250 mL 三角瓶中加装 20 g 等比例混合的玉米粉和麦麸, FeSO₄ 含量 0.1 g, 加水量 7 mL, 接种量 4 mL, 变温发酵 6 d。绿色木霉菌 Tv04-2 菌株对多种人参根部病害有明显的防治效果^[8], 本试验针对其开展的固体发酵培养基筛选及发酵条件研究, 将为该木霉菌的工业化生产提供理论参考, 同时对加速绿色木霉生防菌剂的产业化开发及人参根部病害田间防治都具有重要意义。

参考文献:

[1] 李 森, 檀根甲, 丁克坚, 等. 木霉菌在植物病原真菌生物防治上的研究与应用前景[J]. 植物病理学研究进展, 2003, 5: 14.

[2] Haman G E. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T 22[J]. Plant Disease, 2000, 84(4): 377– 393.

[3] 杨昭霞, 刘长宝, 刘美良. 东部山区人参常见病害的症状及防治[J]. 农业与技术, 2005, 25(2): 62– 63.

[4] 赵阿娜, 丁万隆, 朱殿龙. 拮抗人参根部病原菌木霉的筛选及其生物学特性初步研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(20): 1671– 1673.

[5] 刘 梅, 徐 同. 木霉的营养生长及发酵条件[J]. 云南农业大学学报, 2000, 15(3): 263– 268, 278.

[6] 王永东, 蒋立科, 岳永德, 等. 生防菌株哈茨木霉 IF 13 固体发酵条件的研究[J]. 浙江大学学报, 2006, 32(6): 645– 650.

[7] 王立克, 戴四发, 孙福军. 生物发酵对小麦麸皮营养成分的影响[J]. 安徽技术师范学院学报, 2002, 16(3): 31– 33.

[8] 赵阿娜, 丁万隆. 木菌霉剂对人参根部病害防治效果评价[J]. 中草药, 2006, 37(10): 1552– 1554.