



# 耐低温木霉 TR-165 固态发酵条件的研究

惠有为, 潘亚妮, 孙 勇, 赵 健

(西北大学 化工学院, 陕西 西安 710069)

**摘要:**目的 为使木霉代替农药,对土壤中分离筛选的低温木霉 TR-165 固态发酵条件进行研究。方法 采用单因素实验。结果 在含麸皮、苹果渣及无机盐的固料中,于 pH7.0,含水量 20%,接种量 8% (孢子液/固料),初始 2d 为 24℃,第 3~5 d 为 20℃,第 6 d 为 26℃,固料厚度 2 cm,每 4~5 h 搅拌并喷水 1 次,发酵 7~9 d,孢子密度可达  $10^{10} \text{g}^{-1}$  以上。结论 以麸皮、苹果渣及无机盐为固料发酵生产低温木霉是一种快速、高效和实用的方法。

**关键词:**木霉;固体发酵;发酵条件

**中图分类号:**TQ92 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-274 X (2004)01-0069-04

木霉 (*Trichoderma*) 是一类分布广泛的土壤习居菌<sup>[1]</sup>。除个别为弱病原菌外,大多数对植物病原真菌具有拮抗作用,表现为营养争夺、重寄生作用、产生抗性物质和溶菌酶类<sup>[2]</sup>,同时木霉拌种或土施可促进植物生长<sup>[3]</sup>。

在木霉防治灰霉病的研究中发现,现有木霉制剂对北方大棚蔬菜及贮藏果库内灰霉病防治效果不明显。其主要原因是大棚及果库低温、潮湿,有利于灰霉菌生长和繁殖,但低温却抑制木霉孢子萌发及生长。

本实验室在低温地区采集土样,分离出 6 株耐低温木霉菌 (5℃,萌发率 > 50%)。通过对其拮抗作用的研究,筛选到一株耐低温、高拮抗作用的绿色木霉 (*T. rioides*, TR-165),并对大棚蔬菜及贮藏果库进行处理,防治效果 > 80%,可完全代替目前所使用的农药。为了获得较高和有效的生物量,本研究开展了对 TR-165 固体发酵条件的研究,为低成本、高效率、大规模生产木霉提供重要依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

木霉 TR-165 (本实验室筛选并保存)

### 1.2 培养基

#### 1.2.1 种子培养基 PDA 培养基

1.2.2 发酵培养基 分别以麸皮、苹果渣、猕猴桃渣、花生壳粉、麦秆粉、谷壳粉和麦壳粉为固料,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.24%,  $\text{MgSO}_4$  0.18%,  $\text{NaHCO}_3$  0.5%, 含水量 20%, 配制不同的培养基。

### 1.3 培养和发酵

1.3.1 种子培养 将木霉接种于 PDA 斜面培养基, 20℃, 培养 2~3 d, 当菌丝灰白, 菌落呈淡绿色时即可。

1.3.2 孢子液的制备 取培养好的种子斜面, 加 5 mL 无菌水, 振荡, 将孢子洗脱于无菌三角瓶中, 稀释至孢子浓度为  $1 \times 10^4 \text{mL}^{-1}$ , 待用。

1.3.3 固体发酵 发酵培养基加水拌匀后, 装入布袋, 间歇 (隔夜) 灭菌 2 次, 温度 121℃, 30 min/次, 置于消毒后的容器中。将制备好的孢子液按一定比例接于固料中, 充分混匀, 以一定厚度平铺于消毒后的筛筐中, 上下覆盖两层纱布, 放于具有缓冲间发酵室, 初设 24℃, 定时搅拌, 喷水及通入无菌空气, 进行发酵。

### 1.4 测定孢子含量

称取 1 mg 固料, 梯度稀释, 显微计数<sup>[4]</sup>。

### 1.5 含水量的测定

取 1 g 发酵固料置于鼓风干燥箱, 温度 80℃, 10 min, 迅速称重, 计算出含水量。

收稿日期: 2002-12-26

基金项目: 陕西省自然科学基金资助项目 (2001K02-G7)

作者简介: 惠有为 (1957-), 女, 陕西蓝田人, 西北大学副教授, 从事生物防治研究。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵培养基确定

木霉对于生长环境具有广泛的适应性,可利用

简单或复杂的碳源和氮源,甚至还可转化和降解一些有害或久存的污染物。以上述固料配制培养基,初设含水量 20%,接种量 6%,24℃,发酵 7 d,镜检计数。实验重复 3 次,计算平均产孢量,结果见表 1,2,3。

表 1 不同固料对产孢量的影响

Tab. 1 Effect of the different medium on conidial concentration

培养基 (固料:水=4:1)	麸皮	苹果渣	猕猴桃渣	麦秆粉	稻壳粉	花生壳粉	麦壳粉
平均孢子量/g <sup>-1</sup>	1.4 × 10 <sup>9</sup>	2.1 × 10 <sup>7</sup>	1.3 × 10 <sup>6</sup>	1.8 × 10 <sup>2</sup>	1.8 × 10 <sup>3</sup>	1.2 × 10 <sup>2</sup>	1.9 × 10 <sup>3</sup>

表 2 不同比例的麸皮与苹果渣混合发酵对产孢量的影响

Tab. 2 Effect of the different proportion of wheat bran and apple dreg on conidial concentration

麸皮:苹果渣	1:4	2:3	1:1	3:2	4:1
平均孢子量/g <sup>-1</sup>	1.9 × 10 <sup>6</sup>	1.2 × 10 <sup>8</sup>	2.1 × 10 <sup>8</sup>	1.9 × 10 <sup>9</sup>	2.1 × 10 <sup>9</sup>

表 3 无机盐对产孢量的影响

Tab. 3 Effect of inorganic salt on conidial concentration

固料	麸皮:苹果渣(3:2)	麸皮:苹果渣(3:2)+无机盐
平均孢子量/g <sup>-1</sup>	1.7 × 10 <sup>9</sup>	1.8 × 10 <sup>10</sup>

由表 1 可见,木霉 TR-165 在麸皮上产孢量最高,其次为苹果渣和猕猴桃渣,花生壳粉最低,而加入苹果渣可降低成本、废物利用。所以本研究选用麸皮和苹果渣混合发酵,由表 2 知,麸皮与苹果渣比例为 3:2,产孢量高于单一麸皮培养。

表 3 表明无机盐的加入可提高孢子量。其原因是麸皮具丰富营养,为菌体生长和繁殖提供碳源、氮源、微量元素及生长因子;苹果渣含有纤维素,可作为木霉碳源,纤维素可保水和疏松固料,利于通气;无机盐可缓冲固体发酵过程中 pH 变化,K 和 S 离子可促进发酵后期菌丝产孢<sup>[1]</sup>。因此,选用苹果渣、麸皮和无机盐混合培养,降低了成本,又能得到较高生物量。

### 2.2 含水量的确定

在固态发酵过程中,菌体萌发、生长及繁殖需消耗水分。菌体代谢产生大量生物热,温度升高,水分蒸发,活度  $\alpha_w$  下降。水量的变化,必然会对微生物的生长及繁殖产生重要影响<sup>[5,6]</sup>。因此,在发酵中需要提供合适的含水量,满足菌体正常代谢活动和降低发酵温度。按 2.1 筛选的固料配方,取 5 份培养基,分别按一定比例拌水,24℃,6% 接种量,发酵 7 d,期间每 4 h 喷水 1 次(喷水量按含水量的变化决定)。镜检计数,实验重复 3 次,计算平均产孢量,结果见表 4。

表 4 含水量对产孢量的影响

Tab. 4 Effect of the water percentage on conidial concentration

含水量(水重/固料)/%	16	18	20	24	26
平均孢子量/g <sup>-1</sup>	1.5 × 10 <sup>9</sup>	1.1 × 10 <sup>10</sup>	1.7 × 10 <sup>10</sup>	0.8 × 10 <sup>9</sup>	1.2 × 10 <sup>8</sup>

由表 4 可见,含水量为 20% 时,产孢量最高;含水量为 16% 和 26% 时,产孢量最低。水分过少不利于孢子萌发,水分过高通气受阻,不利于菌丝生长和繁殖。

### 2.3 接种量对木霉生长及产孢量的影响

按 2.2 方法,含水量 20% 配制培养基,以不同接种量接种,24℃,发酵 7 d。镜检计数。实验重复 3 次,计算平均产孢量,结果见表 5。

实验过程中发现,菌体生长与接种量有很大关系。接种量小于 6%,发酵周期延长,同时增大了染菌机率,且产孢量低;大于 8% 时,发酵周期缩短,产孢量高。因此,接种量 8% 较为适宜。

### 2.4 发酵温度对产孢量的影响

按 2.3 方法,8% 接种量,分别在 20,22,24,26,28℃ 的恒温下变温,即初始 2 d 为 24℃,第 3~5 d 温度为 20℃,第 6 d 后为 26℃,镜检计数,实验重复

2次,计算平均产孢量,结果如表6。

由表6知,变温发酵处理,孢子含量最高。这是由于发酵前期为适应期,温度较高有利于孢子萌发,使得适应期缩短;对数生长期菌体生长旺盛,放出大

量生物热,培养基内部温度较高,适当的降低环境温度,加强通气,促进散热;后期大量孢子成熟,基质有效营养降低,菌体生长缓慢,升高温度,缩短发酵周期。

表5 接种量对产孢量的影响

Tab.5 Effect of inoculum percentage on conidial concentration

接种量(孢子液/固料)/%	2	4	6	8	10
平均孢子量/ $g^{-1}$	$0.5 \times 10^{10}$	$1.3 \times 10^{10}$	$2.0 \times 10^{10}$	$2.2 \times 10^{10}$	$2.1 \times 10^{10}$

表6 发酵温度对产孢量的影响

Tab.6 Effect of the fermentative temperature on conidial concentration

温度/ $^{\circ}C$	20	22	24	26	28	24~20~26
平均孢子量/ $g^{-1}$	$1.9 \times 10^9$	$2.0 \times 10^{10}$	$1.7 \times 10^9$	$1.6 \times 10^8$	$1.4 \times 10^8$	$2.3 \times 10^{10}$

### 2.5 发酵层厚度及搅拌时间对产孢量的影响

木霉菌是一种好气性真菌,发酵中通气既可以提供菌体生长所需的氧,又可移走反应热和二氧化碳,提高传质、传热效率,但通气量由多种因素决定,其中包括微生物的特性、发酵过程产生的热量、固料厚度、固料间的空隙大小等。因此,在固体发酵中,固料层厚度及搅拌次数极为重要。按2.4方法,采用变温培养法,以不同发酵层厚度,发酵7d,实验重复2次,计算平均产孢量,结果见表7。

由表7看出,厚度为2cm时最佳,既有利于保持水分,又不影响散热效果。实验过程中还发现每隔4~5h搅拌一次,可促进散热,排出 $CO_2$ ,并有利于通气。

表7 发酵层厚度对产孢量的影响

Tab.7 Effect of the medium thickness on conidial concentration

发酵层厚度/cm	1.5	2	2.5
平均孢子量/ $g^{-1}$	$2.0 \times 10^{10}$	$2.3 \times 10^{10}$	$1.1 \times 10^9$

综上所述,优化木霉 TR-165 发酵条件为:含水量20%;接种量8%;发酵温度早期 $24^{\circ}C$ ,中期 $20^{\circ}C$ ,后期 $26^{\circ}C$ ;发酵层厚度2cm;每4~5h搅拌1次并喷水。

### 2.6 优化条件下菌体生长及产孢量

采用以上优化条件发酵36h后,表面出现少量白色菌落;第2~3d后,培养基上完全覆盖白色绒状物,并开始结块;第4d开始出现绿色孢子;第5~6d,培养基整体变绿,随后绿色加深。对1~12d产孢量进行测定,结果如图1。第1~5d菌体生长繁殖速度较快,第6d后,开始减慢,第7d孢子量达到 $2.2 \times 10^{10} g^{-1}$ ,第9d孢子量为 $2.4 \times 10^{10} g^{-1}$ ,其后基本保持不变,故适宜的发酵周期为7~9d。

## 3 结论

该固体发酵生产木霉孢子,具有制作简单,成本低廉,孢子活性稳定,易于保贮和运输等优点。其主要用于大棚蔬菜种植及果品贮藏,大田实验表明该孢子制剂对多种植物病原菌有不同程度的拮抗作用,防治灰霉病效果更为明显。对番茄、黄瓜等大棚蔬菜处理,发病率约为7%,防效大于80%,特别在冷库中对苹果、蒜苔、葡萄、猕猴桃处理,发病率仅为3%,而且果类硬度、含水量明显提高(有关木霉的防效另文发表)。因此,发酵生产耐低温木霉孢子制剂,对于蔬菜、水果的生产及储藏中防治真菌病害具有重要的意义。

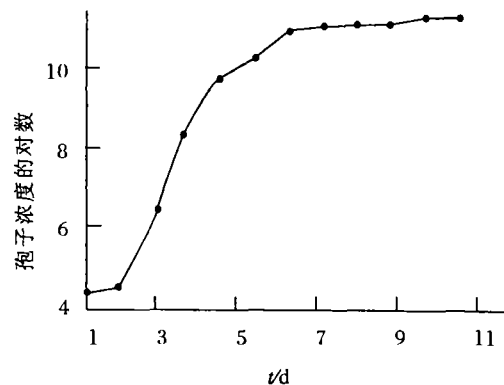


图1 孢子浓度与发酵时间的关系

Fig.1 The relation between conidial concentration and fermentative time

## 参考文献:

- [1] 刘梅,徐同.木霉的营养生长及发酵的条件[J].云南农业大学学报,2000,15(3):263-268.
- [2] 赵蕾.绿色木霉对灰霉菌拮抗机制的初步研究[J].植物保护,1998,24(2):36-37.

- [3] 蔡止荷,吴清平,许红立. 木霉和粘帚霉的生物防治研究进展[J]. 微生物学通报,1998,25(5):284-286.
- [4] 周德庆. 微生物学实验手册[Z]. 上海:上海科技出版社,1986. 78-81.
- [5] JACKSON A M, WHIPPS J M, LYNCH J M. Effects of temperature, pH and water potential on growth of the four fungi with disease biocontrol potential[J]. World Microbiol Biotechnol, 1991, 7(2):494-501.
- [6] KUNDSEN G R, BIN LI. Effects of temperature, soil moisture, and wheat bran on the growth of *Trichoderma harzianum* from the alginate pellets[J]. Phytopathology, 1990, 90(1):724-727.

(编辑 陈懿文)

## The study on solid fermentative condition of *Trichoderma* TR-165

HUI You-wei, PAN Ya-ni, SUN Yong, ZHAO Jian

(College of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an 710069, China)

**Abstract; Aim** The fermentative condition of *Trichoderma* TR-165 from soil of the low temperature area is studied.

**Methods** Single factor experiment. **Results** In the solid medium which include wheat bran, apple dreg and inorganic salt, fermentation processes. The optimum condition is as following: the water containing percentage is 20%; inoculum is 8%; during the fermentation, the temperature of 1st ~ 2nd day is 24°C, 3rd ~ 5th day is 20°C, and after the 6th day is 26°C; the thickness of medium is 2cm, and the medium is agitated and watered every 4 ~ 5 h; the fermentation period is 7 ~ 9 days. The conidial concentration can be over  $10^{10}$  spores  $g^{-1}$ . **Conclusion** The solid fermenting of *Trichoderma* TR-165 with wheat bran, apple dreg and inorganic salt is a fast, efficient and practical method

**Key words:** *Trichoderma*; solid fermentation; culture condition

(上接第 68 页)

## The biocompatibility of human-like collagen

MI Yu<sup>1</sup>, XI Jun-feng<sup>1</sup>, FAN Dai-di<sup>1</sup>, LIU Huan-le<sup>2</sup>

(1. Department of Chemistry Engineering, Northwest University, Xi'an 710069, China; 2. Xi'an Petrol Chemical Head Plant, Xi'an 710086, China)

**Abstract; Aim** To evaluate compatibility of human-like collagen, collagen and gelatin. **Methods** Collagen was used to perform the following biological test: acute systematic toxicity test, hemolytic test, pyrogenic reaction test, test for skin irritation. The data was analyzed and evaluated by criterion. **Results** Human-like collagen presented negative results in those tests. **Conclusion** Results of material biological evaluation tests show that the biocompatibility of human-like collagen is higher than the other two materials and can therefore serve as an ideal medical material.

**Key words:** collagen; human-like collagen; gelatin; biocompatibility