

哈茨木霉发酵条件的初步研究

张爱华, 白石, 周国兴, 张连学* (吉林农业大学中药材学院, 吉林长春 130118)

摘要 [目的]了解哈茨木霉 30371 在自然情况下的培养条件。[方法]将哈茨木霉 30371 的孢子悬液在液体培养基中摇床振荡培养, 研究培养温度、pH 值、无机离子、各种碳源和氮源等条件对其生长的影响。[结果]麦麸培养基中哈茨木霉 30371 的菌丝干重最高, 其次是玉米粉培养基、PDA 培养基, 豆饼粉培养基最低。哈茨木霉 30371 在 22~34 °C 下均能生长, 22 °C 为其最适生长温度; 在 pH 值 4.0~8.5 均能生长, 最适 pH 值是 5.5。各因素对哈茨木霉 30371 生长的影响由大到小依次为: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 > \text{KH}_2\text{PO}_4 > \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} > \text{麦麸} > \text{豆饼粉}$ 。[结论]哈茨木霉最适的发酵条件为: 在麦麸培养基中培养, 培养温度 22 °C, 自然 pH 值, 2.00% 麦麸, 1.00% 豆饼粉, 1.00% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.25% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.50% KH_2PO_4 。

关键词 哈茨木霉; 菌丝干重; 液体培养

中图分类号 S182 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)23-09821-02

Preliminary Study on Fermentation Conditions of *Trichoderma harzianum*

ZHANG Ai-hua et al (College of Traditional Chinese Medicinal material, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract [Objective] The study was to understand the culture conditions of *Trichoderma harzianum* 30371 under natural condition. [Method] The spore suspension of *T. harzianum* 30371 was put in liquid medium for shaking culture to study the effects of culture conditions such as the temperature, pH value, inorganic ions, various carbon sources and nitrogen sources etc. on its growth. [Result] The mycelial dry weight of *T. harzianum* 30371 was highest in wheat bran medium, the second was that in maize powder medium and PDA medium, the lowest was that in bean cake powder medium. *T. harzianum* 30371 could grow under 22~34 °C, and the optimum growth temperature was 22 °C. It could grow under pH of 4.0~8.5, and the optimum pH was 5.5. The effects of these conditions on the growth of *T. harzianum* 30371 from big to small was $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dosage > KH_2PO_4 dosage > $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dosage > wheat bran and bean cake powder dosage. [Conclusion] The best suitable fermentation conditions of *T. harzianum* were: culturing in wheat bran medium, culture temperature of 22 °C, natural pH, 2.00% wheat bran, 1.00% bean cake powder, 1.00% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.25% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 0.50% KH_2PO_4 .

Key words *T. harzianum*; Dry weight of mycelium; Liquid culture

木霉菌(*Trichoderma* spp.)属半知菌类丛梗孢子,是一类普遍存在的、对多种重要植物病原真菌具有拮抗作用,被认为是具有希望的生物防治因子^[1-4]。Weinling 首次报道了木霉菌的拮抗特性^[5-6]。木霉属中应用最多的是哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)。前期实验中,笔者发现 4 株木霉:30371、30048、30153、30167 对人参疫霉、西洋参锈腐病菌等药用植物病原菌均有一定的体外拮抗作用,以 30371 和 30048 菌株效果较为明显。因此,笔者选取 30371 为研究对象,以麦麸、豆饼粉等天然原料作为培养基成分对其发酵条件进行了初步研究,为其进一步的扩大培养、生防菌剂的制备奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种。哈茨木霉 30371,由吉林农业大学中药材学院人参病虫害研究室提供。

1.1.2 培养基。马铃薯、葡萄糖培养基(PDA):马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,水 1 000 ml, pH 值自然。玉米粉培养基:称取 60 g 玉米粉,加水 300 ml 搅匀,沸水浴 3 min,用 8 层纱布过滤,滤液加水至 1 000 ml, pH 值自然。豆饼粉培养基:称取 60 g 豆饼粉,加水 300 ml 搅匀,沸水浴 3 min,用 8 层纱布过滤,滤液加水至 1 000 ml, pH 值自然。麦麸培养基:称取 60 g 麦麸,加水 300 ml 搅匀,沸水浴 3 min,用 8 层纱布过滤,滤液加水至 1 000 ml, pH 值自然。

1.1.3 试剂。蔗糖、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KH_2PO_4 、6 mol/L HCl 和 4 mol/L NaOH,均为国产分析纯;麦麸、玉米粉、豆饼粉等。

1.1.4 仪器。LA-114 电子天平(常熟市衡器厂)、恒温培养箱(上海仪器厂)、pHS-3C 数显酸度计(上海宁隆仪器厂)等。

1.2 方法

1.2.1 供试菌孢子悬液的制备。取哈茨木霉 30371 菌株在马铃薯、葡萄糖琼脂培养基平板上活化后,点接于马铃薯、葡萄糖琼脂试管斜面上,26 °C 培养 6 d 至产孢。然后倒入 9 ml 无菌水,涡漩振荡,制成浓度为 10^7 个/ml 的孢子悬液。

1.2.2 哈茨木霉 30371 在不同条件下培养。取预先制好的孢子悬液(浓度为 10^7 cfu/ml)按 2% 接种量分别接种于不同处理液体培养基中摇床振荡培养,接种 7 d 后过滤菌丝,80 °C 烘干称量,测菌丝干重。每处理设 3 次重复,每次重复 3 个平行。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对哈茨木霉菌丝干重的影响 将菌种接种于自然 pH 值的不同培养基(PDA、玉米粉、豆饼粉、麦麸)中,于 26 °C 摇床培养 7 d,测量菌丝干重,结果见图 1。结果表明,麦麸培养基中菌丝生物量增加最多,其次是玉米粉培养基、PDA 培养基,豆饼粉培养基最少。

2.2 不同温度对哈茨木霉菌丝干重的影响 将菌种接种于自然 pH 值的麦麸培养基中,在不同温度的摇床中培养 7 d,测量其菌丝干重,结果见图 2。结果表明,该菌株在 22~34 °C 均能生长,以 22 °C 为最适生长温度,在培养温度升到 34 °C 时,此菌株同样可以正常生长,只是生长速率较缓慢、生物量较少。

2.3 不同 pH 值对哈茨木霉菌丝干重的影响 将菌种接种于不同 pH 值的麦麸培养基中,于 22 °C 摇床培养 7 d,测量其菌丝干重,结果见图 3。结果表明,该菌在 pH 值 4.0~8.5 均能生长,但在偏酸性条件与中性和偏碱性条件相比生长较好,最适 pH 值是 5.5,与实验室条件下的自然 pH 值接近。

作者简介 张爱华(1978-),女,山东泰安人,博士,从事药用植物学研究。*通讯作者。

收稿日期 2008-06-03

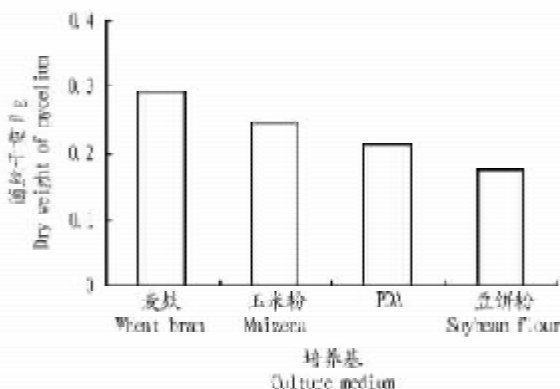


图 1 不同培养基对菌丝干重的影响

Fig.1 Effects of culture medium on dry weight of mycelium

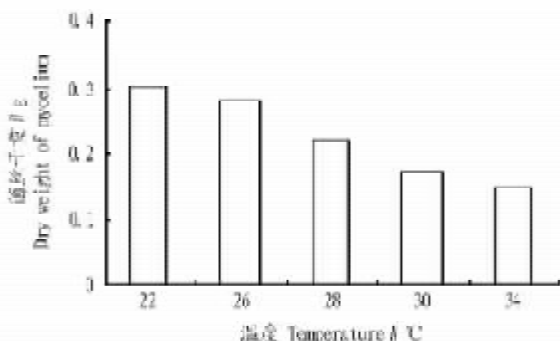


图 2 不同温度对菌丝干重的影响

Fig.2 Effects of temperature on dry weight of mycelium

在 pH 值 7.0 以上时其菌丝干重显著下降。

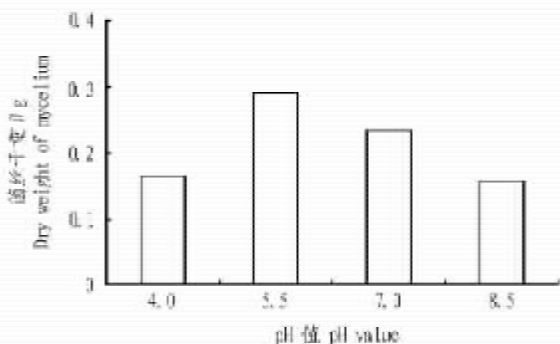


图 3 不同 pH 值对菌丝干重的影响

Fig.3 Effects of pH value on dry weight of mycelium

2.4 正交试验 将菌种接种于自然 pH 值的不同比例麦麸/豆饼粉培养基中,加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 。正交试验的因素与水平设计见表 1,培养条件为:22 °C 摇床培养 7 d。试验结果见表 2。结果表明,最优组合为 $\text{B}_3\text{D}_3\text{A}_2\text{C}_2$,影响因子排序为 $R_B > R_D > R_C > R_A$ 。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验的因素与水平

Table 1 Factors and levels of $L_9(3^4)$ orthogonal test

水平 Level	A 麦麸/豆饼粉//% Wheat bran/ soybean flour	B $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ %	C $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ %	D KH_2PO_4 %
1	1.50/1.50	0.25	0.15	0.15
2	2.00/1.00	0.50	0.25	0.25
3	2.50/0.50	1.00	0.50	0.50

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Table 2 Result of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号 Test No.	A 麦麸/豆饼粉//% Wheat bran/ soybean flour	B $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	C $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	D KH_2PO_4	菌丝干重//g Dry weight of mycelium
1	1	1	1	1	0.233
2	1	2	2	2	0.350
3	1	3	3	3	0.385
4	2	1	2	3	0.310
5	2	2	3	1	0.311
6	2	3	1	2	0.354
7	3	1	3	2	0.277
8	3	2	1	3	0.338
9	3	3	2	1	0.350
I/3	0.323	0.273	0.308	0.298	
II/3	0.325	0.333	0.337	0.327	
III/3	0.322	0.363	0.324	0.344	
R	0.003	0.090	0.029	0.046	

3 结论与讨论

哈茨木霉扩大培养的最适培养条件为:自然 pH 值情况下,温度 22 °C,麦麸 2.00%,豆饼粉 1.00%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.00%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25%, KH_2PO_4 0.50%。今后将进一步对该菌株进行固体发酵及制备生防菌剂。

参考文献

[1] 张先恩, JONCS A, KOLE M, 等. 两性绵霉菌生物量生产的营养要求和发酵条件的研究[J]. 微生物学报, 1994, 34(1): 55-64.
 [2] 张博润, 黄英, 田宇清, 等. 酵母 SOD 高产工程菌培养优化条件研究[J]. 微生物学报, 1994, 21(4): 210-212.
 [3] 赵志鹏, 王学聘, 郭秀珍. 优良外生菌根真菌的筛选及菌剂的制备[J]. 微生物学报, 1992, 32(3): 227-232.
 [4] 严自正, 陶增鑫, 于龙华. L-山梨糖发酵产生维生素 c 前体的研究 II. 发酵条件的研究[J]. 微生物学报, 1981, 21(2): 185-191.
 [5] WEINLING R. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi [J]. Phytopathology, 1934, 24: 1153-1179.
 [6] WEINLING R. Isolation of toxic substances from the culture filtrates of *Trichoderma* and *Gliocladium* [J]. Phytopathology, 1937, 27: 1175-1177.

(上接第 9816 页)

此对棉花需水量进行预测可以为棉花适时适量灌溉提供依据,从而提高棉花的产量和品质。该实例研究表明,根据作物需水量本身的规律建立的非平稳时序随机模型预测效果较好,可用于新疆阿克苏地区棉花需水量的预报。

参考文献

[1] 丁晶, 邓育仁. 随机水文学[M]. 成都: 成都科技大学出版社, 1988.
 [2] 丁裕国, 江志红. 气象数据时间序列信号处理[M]. 北京: 气象出版社, 1998: 32-37
 [3] 王振龙. 时间序列分析法[M]. 北京: 中国统计出版社, 2000.
 [4] 杨叔子, 吴雅. 时间序列分析的工程应用(上\下册)[M]. 武汉: 华中理工大学出版社, 1996.