

利用城市垃圾发酵生产绿色木霉孢子*

朱辉 娄沂春 林福呈 李德葆

(浙江大学生物技术研究所 杭州 310029)

摘要: 研究利用城市生活垃圾发酵生产绿色木霉孢子的可行性,培养条件和发酵过程中的种群密度变化规律。结果表明,城市生活垃圾适宜作为生产木霉孢子的培养基质;合适的培养条件为垃圾培养基质中添加30%(w/w)的麸皮,接种量30%(v/w),发酵8~10d,孢子密度可达 10^9 /g以上。

关键词: 城市垃圾,木霉,发酵,孢子密度

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(1999)-06-0387-04

UTILIZING MUNICIPAL REFUSE TO PROCESS CONIDIAL PREPARATION OF *TRICHODERMA VIRIDE*

ZHU Hui LOU Yichun LIN Fucheng LI Debao

(Biotechnology Institute of Zhejiang University Hang-zhou 310029)

Abstract: The feasibility of utilizing municipal refuse to process, conidial preparation of *Trichoderma viride*, the culture factors, the pattern of population density variation were studied. The results show that the municipal refuse is available to be used as medium of *T. viride*, the optimal culture condition is to add 30%(w/w) bran to the municipal refuse with inoculum 30%(v/w), incubating 8-10 days. The conidial concentration reach 10^9 /g.

Key words: Municipal refuse, *Trichoderma viride*, Fermentation, Conidial concentration

随着经济的发展,我国城市生活垃圾的生产量正在急剧增长。目前,对其处理方法一般是简单的填埋处理。由此造成的侵占耕地问题日益突出,而且使环境再次遭受污染。寻求合理的垃圾处理方法已成为当务之急^[1]。同时,化学农药的大量使用,也严重破坏了农业生产系统,并对环境造成了污染,而生物防治制剂则可以克服这些问题。因此,发达国家开始着手研究生活垃圾的堆肥技术,试图把垃圾转化为生防制剂或肥料,应用于农业生产^[2,3]。

木霉(*Trichoderma*)是一种重要的生防菌,

其作用机理主要是:抗菌、溶解、竞争、重寄生和促进植物的生长^[4]。我们在研究过程中筛选到一株绿色木霉(*T. viride*)菌株。该菌株对多种植物病原菌有不同程度的拮抗作用,对一些土传植物病原菌的抑制作用尤为明显。田间试验表明,使用木霉制剂能显著提高番茄,辣椒等蔬菜的产量和抗病能力。本试验试图以城市生活垃圾处理物为培养基质,发酵生产木霉孢子制

* 国家自然科学基金农业重点倾斜项目和杭州市科委重大项目资助

收稿日期:1998-08-07, 修回日期:1998-12-01

剂。对其可行性和培养条件进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 城市生活垃圾处理物:上海晟隆生物环境公司提供。

1.1.2 菌株:绿色木霉 T1124(本所筛选保存)。

1.2 方法

1.2.1 平皿试验(可行性试验):垃圾处理物 10g,加水 40mL,煮沸 10min,调 pH6.5 左右,加 2% 琼脂。1 × 10⁵Pa, 20min 灭菌,倒平板后,接种绿色木霉,28℃ 培养,观察生长情况。以 PDA 为对照。

1.2.2 种子培养:斜面 → PDB (28℃, 16h) → 二级种子液(面粉 2%, 豆饼粉 1%; 28℃, 18h)

1.2.3 固体发酵试验:垃圾处理物灭菌后,置搪瓷盘中,厚 3cm 左右,接种二级种子。

1.2.4 孢子计数:发酵样品 5g,加入到 45mL 含玻璃珠的无菌水中,震荡 0.5h,梯度稀释后,用血球计数板计数^[5]。

2 结果与分析

2.1 平皿试验结果

菌种接入垃圾平皿后,生长良好。4d 后,菌丝布满整个平皿,菌落形态正常。生长速度及菌丝量甚至超过 PDA 平板(图 1)。这说明垃圾处理物中有足够的营养保证绿色木霉的生长。因此,用该城市垃圾处理物来生产木霉制剂是可行的。

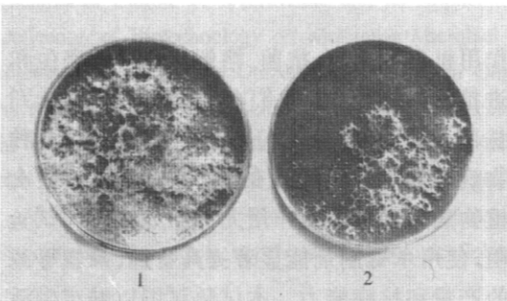


图1 绿色木霉在垃圾和PDA平板中的生长情况

1. 垃圾, 2. PDA

2.2 固体发酵试验

2.2.1 培养基中垃圾和麸皮的配比:垃圾处

理物呈较细的颗粒状,pH约4.0左右。发酵时需加入适量的水,并调pH6.5左右。加水后,物料的粘性大增,并凝结成团块,从而影响固体发酵时的通气性。在垃圾中加入适量的麸皮作疏松剂,以造成空隙防止物料相互粘结,增大培养基质的比表面积,有利于木霉的生长繁殖。在空隙中保存空气供予内部的木霉呼吸作用,对于散热和排除CO₂都有利。将麸皮按10%,20%,30%,40%(w/w)的比例与垃圾混合,以不加麸皮为对照。接入30%(v/w)的二级种子。24h后,各试样都有白色菌落形成,其中麸皮添加量为30%和40%比其它试样显著地多。在以后的生长过程中,此二者的生长速度也明显高于其它试样;对照的生长情况则明显较差,生长速度慢,菌量少。8d后测定各试样中的孢子密度,结果如表1。

表1 培养基中麸皮比例对孢子密度的影响

麸皮比例(%)	孢子密度(/g)
0	无法检出
10	1.40 × 10 ⁸
20	3.25 × 10 ⁸
30	1.70 × 10 ⁹
40	1.85 × 10 ⁹

麸皮比例与孢子密度有较大的关系。麸皮比例低时,基质的分散度较低,因此通气性较差,不利于菌体生长;麸皮比例高达30%和40%时,基质通气良好,孢子密度达到较高水平,此两者无明显差别。考虑到扩大垃圾利用量,在下面的试验中,麸皮的比选定为30%。

2.2.2 接种量对孢子数的影响:培养基按垃圾70%,麸皮30%的比例混合后,分别接入10%、20%、30%、40%、50%(v/w)的二级种子。培养过程中发现,菌丝生长量与接种量有很大的关系。接种量低于30%时,基质起发较慢,菌量较少;高于30%时,基质起发速度明显加快。8d后测定各试样中的孢子密度,结果如表2。

接种量对孢子密度的影响较大。接种量小时,基质起发慢,发酵周期延长,也增大了污染的概率。接种量高于30%时,菌丝生长较快,孢子密度基本处于同一水平。在实际生产中,接

种量大大会增大种子培养的成本。故认为,接种量30%较为适宜。

表2 接种量对孢子密度的影响

接种量(%)	孢子密度(/g)
10	5.0×10^7
20	1.10×10^8
30	1.20×10^9
40	1.85×10^9
50	1.70×10^9

2.2.3 发酵过程中木霉在培养基质中的种群密度变化规律:以30%的接种量接入麸皮比例为30%的垃圾基质中,24h后,表面即有菌落产生。第2~3d,菌落数迅速增多,到第4d,整个基质表面全被菌落覆盖。随后,白色菌落逐渐转变为绿色,说明孢子逐渐释放。对1~14d基质的孢子密度进行测定,孢子密度的对数值与发酵时间的关系如图2。

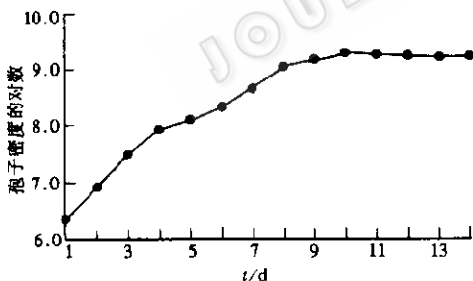


图2 孢子密度与发酵时间的关系

第1~4d,菌体以较快的速度生长繁殖,第5d后,生长速度减慢,第8d孢子密度达到 1.1×10^9 ,第10d达到 1.85×10^9 ,此后基本保持稳定。因此,适宜的发酵周期为8~10d。

3 讨论

目前,木霉在生物防治上的应用多为孢子制剂。这可能是因为孢子制剂与抗生素与酶比较,具有制作简单,成本低廉,且性质稳定,易于保存等优点。孢子制剂在田间应用主要是用于种子处理和土壤处理。将孢子制剂按一定比例与种子混合或添加于土壤中,可起到保护种子,根系及幼苗免受病原菌侵染的作用^[1]。据报道,木霉孢子制剂的田间使用浓度在 $10^5/g$ 以上,就有明显的效果^[6]。因此,本试验所得的木霉孢子制剂有较高的生产应用价值。目前生产孢子制剂的培养基质多为淀粉质原料^[4],与之相比,利用城市生活垃圾发酵生产木霉孢子制剂,不但成本低廉,更重要的是可减少环境污染。因此,利用城市生活垃圾发酵生产绿色木霉孢子制剂,对农业生产和环境保护均有重大的意义。

参 考 文 献

- [1] 郑平,冯孝善主编. 废物物处理理论和技术. 杭州:浙江教育出版社,1995.
- [2] Joergensen. R G, Meyer. B., Roden A *et al.* Biology and Fertility of Soils, 1996, 23(1):43~49.
- [3] Deportes J-L, Benoit-Guyod, Zmirou D *et al.* Journal of Applied Microbiology, 1998, 85:238~246.
- [4] 蔡止荷,吴清平,许红立等. 微生物学通报, 1998, 25(5):284~286.
- [5] 周德庆主编. 微生物学实验手册. 上海:上海科技出版社,1986.78~81.
- [6] Harman G E, Chet I, Baker R. Phytopathology, 1981, 71(6):569~572.