

## 研究报告

## 三株植物促生木霉的固体发酵工艺优化

袁紫仪, 商美妮, 王琰, 李瑞敏, 吕娜娜, 刘红军, 沈宗专\*, 李荣, 沈其荣

南京农业大学资源与环境科学学院 江苏省有机固体废弃物资源化协同创新中心 江苏省固体有机废弃物资源化  
高技术研究重点实验室 作物免疫学重点实验室, 江苏 南京 210095

袁紫仪, 商美妮, 王琰, 李瑞敏, 吕娜娜, 刘红军, 沈宗专, 李荣, 沈其荣. 三株植物促生木霉的固体发酵工艺优化[J]. 微生物学通报, 2023, 50(1): 235-250.

YUAN Ziyi, SHANG Meini, WANG Yan, LI Ruimin, LÜ Nana, LIU Hongjun, SHEN Zongzhan, LI Rong, SHEN Qirong. Optimization of solid fermentation process of three *Trichoderma* strains with plant growth-promoting effects[J]. Microbiology China, 2023, 50(1): 235-250.

**摘要:**【背景】木霉是广泛分布于自然界中的一类真菌, 能产生多种酶类和次生代谢产物, 具有促进植物生长、提高土壤肥力、拮抗多种土传病原菌等作用。【目的】优化 3 株植物根际促生真菌(长枝木霉 MD30、桔绿木霉 JS84 及贵州木霉 NJAU4742)的固体发酵条件, 探究不同发酵条件对木霉产孢量的影响, 为木霉菌的生产提供参考。【方法】采用单因素试验和响应面法, 对 3 种木霉在不同发酵条件下的产孢量进行测定并优化, 分析了氮源添加、初始 pH、物料厚度、接种量、温度等因子对固体发酵的影响。【结果】单因素试验表明, 长枝木霉 MD30、桔绿木霉 JS84 与贵州木霉 NJAU4742 固体发酵时, 最佳发酵温度均为 28 °C、最优木霉菌液接种量均为 10%、物料发酵厚度均为 3.0 cm, 但最佳的初始物料 pH 与氨基酸水解液添加量有所不同, 其中, 长枝木霉 MD30 与贵州木霉 NJAU4742 发酵最佳的初始 pH 值为 5.0, 而桔绿木霉 JS84 为 3.0; 长枝木霉 MD30 与贵州木霉 NJAU4742 发酵最佳的氨基酸水解液添加量为 10%, 而桔绿木霉 JS84 为 5%。通过试验分析, 确定初始 pH、物料厚度、温度为影响产孢量的 3 个重要因素。响应面分析得到最佳发酵条件: 长枝木霉 MD30 固体发酵最佳条件为初始 pH 值为 5.0, 物料厚度 3.0 cm, 温度 27.4 °C, 在此优化条件下每克干重的固体产物中孢子数量高达  $6.3 \times 10^9$  CFU; 桔绿木霉 JS84 固体发酵最佳条件为初始 pH 值为 3.0, 物料厚度 3.0 cm, 温度 28.8 °C, 在此优化条件下每克干重的固体产物中孢子数量高达  $6.9 \times 10^9$  CFU; 贵州木霉 NJAU4742 固体发酵最佳条件为初始 pH 值为 5.0, 物料厚度 3.3 cm, 温度 26.7 °C, 在此优化条件下每克干重的固体产物中孢子数量高达  $5.1 \times 10^9$  CFU。【结论】响应面优化试验能提高试验效率, 增大木霉产孢量,

资助项目: 江苏省政策引导类计划(国际科技合作/港澳台科技合作)项目(BZ2020026); 江苏省农业科技自主创新基金[CX(20)2004]; 中央本级重大增减支项目(2060302)

This work was supported by the Jiangsu Province Policy Guidance Program (International Science and Technology Cooperation/Hong Kong, Macao and Taiwan of China Science and Technology Cooperation) (BZ2020026), the Jiangsu Provincial Agricultural Science and Technology Innovation Fund (CX(20)2004), and the Key Project at Central Government Level (2060302).

\*Corresponding author. E-mail: shenzongz@njau.edu.cn

Received: 2022-04-22; Accepted: 2022-08-08; Published online: 2022-09-06

降低生产成本, 有利于田间应用和菌剂的商业化生产。

关键词: 促生真菌; 木霉菌; 固体发酵; 孢子生产; 响应面法

## Optimization of solid fermentation process of three *Trichoderma* strains with plant growth-promoting effects

YUAN Ziyi, SHANG Meini, WANG Yan, LI Ruimin, LÜ Nana, LIU Hongjun, SHEN Zongzhuan\*, LI Rong, SHEN Qirong

Jiangsu Provincial Key Laboratory for Organic Solid Waste Utilization, Key Laboratory of Plant Immunity, Jiangsu Collaborative Innovation Center for Solid Organic Waste Resource Utilization, College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

**Abstract:**[Background]*Trichoderma* is a kind of fungus widely distributed in nature, which produces a variety of enzymes and secondary metabolites, showing many benefits including promoting plant growth, improving soil fertility, and antagonizing various soil-borne pathogens. [Objective] To optimize the solid fermentation conditions of three plant growth-promoting fungi (*Trichoderma longibrachiatum* MD30, *T. citrinoviride* JS84, and *T. guizhouense* NJAU4742), the effects of different fermentation conditions on the spore production of *Trichoderma* spp. were explored to provide references for *Trichoderma* spp. production. [Methods] In this study, the spore production of three *Trichoderma* spp. under different fermentation conditions was measured and optimized by the single factor experiment and the response surface methodology. The effects of the addition of nitrogen source, initial pH, material thickness, inoculation amount, and temperature on solid fermentation were analyzed. [Results] The single factor experiment showed that the optimal fermentation temperature of *T. longibrachiatum* MD30, *T. citrinoviride* JS84, and *T. guizhouense* NJAU4742 was 28 °C, and the optimal amount of *Trichoderma* liquid inoculum was 10% with 3.0 cm material fermentation thickness. However, the optimal initial pH of the material and the addition amount of amino acid hydrolyzate were different among these three strains. In detail, the optimal initial pH value of *T. longibrachius* MD30 and *T. guizhouense* NJAU4742 for solid fermentation was 5.0, while that of *T. citrinoviride* JS84 was 3.0. The optimum amino acid hydrolyzate addition amount for solid fermentation of *T. longibrachius* MD30 and *T. guizhouense* NJAU4742 was 10%, while that of *T. citrinoviride* JS84 was 5%. Based on the experimental analysis, the initial pH, material thickness, and temperature were selected as three top important factors in the determination of the spore production. Therefore, the optimal fermentation conditions for solid fermentation of these three strains were obtained based on the response surface analysis. The optimal conditions for solid fermentation of *T. longibrachius* MD30 were the initial pH value of 5.0, the material thickness of 3.0 cm, and the temperature of 27.4 °C. Under this optimized condition, the number of spores per gram dry weight of the solid fermentation product was as high as  $6.3 \times 10^9$  CFU. The optimal conditions for solid fermentation of *T. citrinoviride* JS84 were the initial pH value of 3.0, the

material thickness of 3.0 cm, and the temperature of 28.8 °C. Under this optimized condition, the number of spores per gram dry weight of the solid fermentation product was as high as  $6.9 \times 10^9$  CFU. The optimal conditions for solid fermentation of *T. guizhouense* NJAU4742 were the initial pH value of 5.0, the material thickness of 3.3 cm, and the fermentation temperature of 26.7 °C. Under this optimized condition, the number of spores per gram dry weight of the solid fermentation product was as high as  $5.1 \times 10^9$  CFU. **[Conclusion]** Response surface optimization experiment improves the experimental efficiency, increases the spore production of *Trichoderma* spp., reduces the production cost, and is conducive to field application and commercial production of bacterial agents.

**Keywords:** plant growth-promoting fungi; *Trichoderma* spp.; solid fermentation; spore production; response surface methodology

木霉(*Trichoderma* spp.)是自然界广泛分布的一类具有较高生防应用价值的真菌,其适应性强,多存在于植物叶围、根围、树皮和枯枝落叶中<sup>[1-3]</sup>。木霉能产生多种酶类和次生代谢产物,具有促进植物生长、提高土壤肥力及拮抗多种土传病原菌等作用<sup>[4-6]</sup>,被广泛应用于生物防治、生物肥料及土壤改良剂等方面。

木霉生长产生的菌丝体、分生孢子和厚垣孢子均具有一定的生防作用<sup>[7]</sup>。其菌丝体货架期短,厚垣孢子人工培养条件苛刻,而分生孢子更易获得且储存方便<sup>[8-10]</sup>。因此,大多数木霉菌商业制剂都使用分生孢子作为制剂的有效成分。木霉孢子的生产有液体和固体两种发酵工艺,固体发酵工艺因其操作简单、产量高及产生的孢子抗逆性强等特点,成为生产木霉分生孢子最有效的技术手段之一<sup>[11-13]</sup>。浅盘发酵法是一种常用的固体发酵技术,其生产成本低,固体发酵获得的微生物制剂耐储存,便于运输且田间应用效果好<sup>[14]</sup>,但有关木霉固体浅盘发酵工艺参数优化的研究仍相对较少,限制了木霉菌剂的产业化发展。

长枝木霉(*Trichoderma longibrachiatum*) MD30、桔绿木霉(*Trichoderma citrinoviride*) JS84 和 贵 州 木 霉 (*Trichoderma guizhouense*) NJAU4742 是本实验室从温带和热带农田生态系统中分离筛选的 3 株具有植物促生和生防作

用的木霉菌株<sup>[15-17]</sup>,对黄瓜、番茄、香蕉、芒果等作物的生长具有显著的促进作用,并对土传枯萎病的发生也表现出防治作用。相较于贵州木霉 NJAU4742,长枝木霉 MD30 与桔绿木霉 JS84 能够适应较高土温,在 40 °C 土温条件下能够正常生长并产生大量孢子,表现出稳定的促生能力。此 3 株具有不同温敏性能的木霉菌株的浅盘固体发酵工艺与参数仍有待进一步研究。

物料酸碱度、碳氮源、木霉菌液接种量、物料发酵厚度、含水量和温度等参数是木霉浅盘发酵时产孢量的重要影响因素。物料发酵时的含水量是固体发酵的重要条件,本实验室前期研究发现,60%的物料含水量是木霉浅盘发酵的最优含水量<sup>[18]</sup>,因此本研究以含水量 60%进行固体发酵。本研究中所添加的氨基酸水解液是由废弃动物蛋白酸解而成的初产品,具有强酸性且氨基酸种类与含量高,可作为木霉发酵的氮源使用<sup>[19]</sup>。本研究采用浅盘发酵法研究氨基酸水解液的添加量、初始 pH、物料厚度和温度对木霉固体发酵时产孢的影响,同时通过单因素试验和响应面法优化发酵条件,以期探明长枝木霉 MD30、桔绿木霉 JS84 与贵州木霉 NJAU4742 固体发酵的最佳培养条件,为木霉菌种的固体发酵生产提供一定的理论依据和技术指导。

# 1 材料与方

## 1.1 供试材料

实验中所用材料见表 1。3 株木霉菌株由江苏省固体有机废弃物资源化高技术研究重点实验室提供,均保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,其中长枝木霉 MD30 保藏号为 CGMCC 17467、桔绿木霉 JS84 保藏号为 CGMCC 17466、贵州木霉 NJAU4742 保藏号为 CGMCC 3308。

## 1.2 培养基的制备和木霉菌的培养

PDA 培养基参考文献[20]配制,除不加入琼脂外,PDB 培养基其余配方与 PDA 一致。

固体发酵培养基的制备:菇渣和麸皮按照 4:1 (质量比)进行混合制成固体发酵的培养基质。

将木霉菌丝饼接种到 PDA 培养基上,28 °C 培养 5–7 d,待菌丝体长满整个培养基,将其接入 PDB 培养基中,28 °C、180 r/min 振荡培养 3–5 d,用两层纱布过滤制得木霉孢子悬浮液备用,木霉孢子悬浮液的浓度为  $1 \times 10^7$  CFU/mL。

## 1.3 方法

### 1.3.1 氨基酸水解液对木霉固体发酵产孢量的影响

设置氨基酸水解液添加量分别为 5%、10%、15%、20%共 4 个处理,每个处理 3 个重复,在固体发酵培养基中添加不同量的氨基酸水解液并搅拌均匀,115 °C 灭菌 30 min。接入 10%木

霉孢子悬浮液,搅拌均匀装入白色平底塑料盒中,物料厚度调整为 3.0 cm,28 °C 发酵 7 d。

### 1.3.2 初始 pH 对木霉固体发酵产孢量的影响

在固体发酵培养基中添加 10%氨基酸水解液,搅拌均匀后 115 °C 灭菌 30 min。4 mol/L 稀硫酸或 4 mol/L 氢氧化钠调节基质初始 pH 值为 2.0、3.0、4.0 和 5.0,每个处理 3 个重复。接入 10%木霉孢子悬浮液,搅拌均匀装入白色平底塑料盒中,物料厚度调整为 3.0 cm,28 °C 发酵 7 d。

### 1.3.3 厚度对木霉固体发酵产孢量的影响

在固体发酵培养基中添加 10%氨基酸水解液,搅拌均匀后 115 °C 灭菌 30 min。接入 10%木霉孢子悬浮液,搅拌均匀装入白色平底塑料盒中,物料厚度调整为 1.0、2.0、3.0 和 4.0 cm,每个处理 3 个重复,28 °C 发酵 7 d。

### 1.3.4 温度对木霉固体发酵产孢量的影响

在固体发酵培养基中添加 10%氨基酸水解液,搅拌均匀后 115 °C 灭菌 30 min。接入 10%木霉孢子悬浮液,搅拌均匀装入白色平底塑料盒中,物料厚度调整为 3.0 cm,于 20、25、28、32 和 35 °C 发酵 7 d,每个处理 3 个重复。

## 1.4 固体发酵物中木霉产孢量的测定

称取 5 g 发酵好的固体发酵物,加入 45 mL 的超纯水置于 100 mL 的三角瓶中,28 °C、180 r/min 振荡 30 min,使用血球计数板检测发酵物中孢子的个数。

表 1 供试材料理化性状

Table 1 Physical and chemical properties of test material

供试材料	pH	全氮量	全磷量	全钾量
Test material		Total nitrogen (g/kg)	Total phosphorus (g/kg)	Total potassium (g/kg)
杏鲍菇渣 <i>Pleurotuseryngii</i> dregs	5.80	1.90	6.00	8.40
麸皮 Bran	7.50	2.60	10.90	9.80
氨基酸水解液 Amino acid hydrolysate	—	4.60	0.40	0.07

—: 氨基酸液极酸, pH 计无法测定

—: The amino acid solution is extremely acid and can not be directly measured by pH meter.

## 1.5 响应面优化设计

在单因素试验的基础上, 根据 Box-Behnken 设计原理, 采用软件 Design Expert 11 进行三因素三水平的响应面分析试验, 以产孢量为响应量, 确定各因素对菌株产孢量影响的显著性和各组分的最优组合。依据 Box-Behnken 设计原理, 响应因子  $Y$  为菌株的产孢量,  $A$  (初始 pH)、 $B$  (物料厚度, cm)、 $C$  (温度,  $^{\circ}\text{C}$ ) 为三因素, 三水平分为: -1、0 和 1, 每个处理 3 次重复, 培养条件因素水平如表 2 所示。

## 1.6 数据处理

数据处理采用 Office Excel 2013, 采用 SPSS 23.0 软件进行方差分析 (analysis of variance, ANOVA), 并利用最小显著差异法 (least significant difference, LSD) 对方差分析结果进行多重检验 ( $P < 0.05$ )。响应面通过 Design Expert 11 软件, 运用 Box-Behnken 设计原理进行相关数据分析, 对培养条件进行三因素三水平优化, 然后根据响应面预测的最佳培养条件得出相应结果。

# 2 结果与分析

## 2.1 氨基酸水解液的添加量对木霉固体发酵产孢量的影响

如图 1 所示, 氨基酸水解液的添加量对木霉固体发酵产孢量有较大的影响。长枝木霉 MD30 和贵州木霉 NJAU4742 在氨基酸水解液添加量

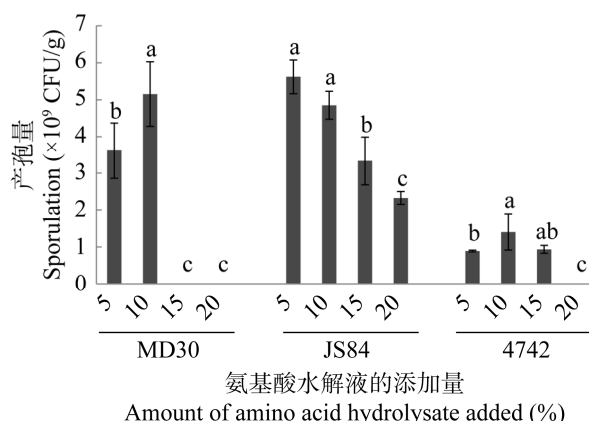


图 1 不同氨基酸水解液的添加量对木霉产孢量的影响 不同小写字母表示不同显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 下同

Figure 1 Effect of different amount of amino acid hydrolysates addition on *Trichoderma* sporulation. Different lowercase letters indicate different significant differences (Duncan-test,  $P < 0.05$ ). The same below.

为 10% 时产孢量显著高于其他处理, 而桔绿木霉 JS84 在氨基酸水解液的添加量为 5% 时产孢量显著高于其他处理。

## 2.2 初始 pH 对木霉固体发酵产孢量的影响

如图 2 所示, 初始 pH 对木霉的产孢量有着不同影响。长枝木霉 MD30 和贵州木霉 NJAU4742 在 pH 值为 5.0 时产孢量显著高于其他处理, 而桔绿木霉 JS84 在 pH 值为 3.0 时产孢量显著高于其他处理。

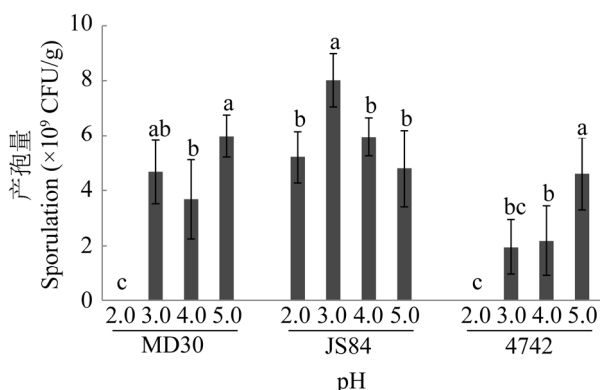


图 2 不同初始 pH 对木霉产孢量的影响

Figure 2 Effect of different initial pH on *Trichoderma* sporulation.

表 2 试验因素水平表

Table 2 Factors and levels of central composite design

水平	因素 Factors		
Level	A 初始 pH	B 物料厚度	C 温度
	A Initial pH	B Material thickness (cm)	C Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )
-1	3	2	25
0	4	3	28
1	5	4	32

### 2.3 物料厚度对木霉固体发酵产孢量的影响

如图 3 所示,不同物料厚度对木霉固体发酵产孢量具有不同影响。在物料厚度为 3.0 cm 时,3 株植物促生木霉的产孢量均最大,其中,长枝木霉 MD30 在 3.0 cm 发酵的处理显著高于其在 1.0、2.0 和 4.0 cm 的发酵处理,桔绿木霉 JS84 在 3.0 cm 发酵的处理显著高于其在 2.0 cm 和 4.0 cm 的发酵处理,而贵州木霉 NJAU4742 在 3.0 cm 发酵的处理仅显著高于其在 2.0 cm 的发酵处理。

### 2.4 温度对木霉固体发酵产孢量的影响

如图 4 所示,不同温度对木霉固体发酵产孢量影响不同,在温度为 28 °C 时,长枝木霉 MD30、桔绿木霉 JS84 及贵州木霉 NJAU4742 的产孢量显著高于其他处理。

### 2.5 固体发酵条件的响应面优化

利用 Box-Behnken 设计原理,以产孢量为响应值,以影响产孢量的 3 个因素 *A* (初始 pH)、*B* (物料厚度)和 *C* (温度)为自变量进行中心组合设计。17 组试验点分别为析因点和零点,其中析因点为 *A*、*B* 和 *C* 构成的三维空间的顶点,零点为区域的中心点,中心试验进行 3 次,用来估计试验误差。由 Design Expert 11 得到的响应曲面图和等高线图,揭示初始 pH、物料厚度和温度 3 种关键因子两两相互作用对孢子产量的影响。

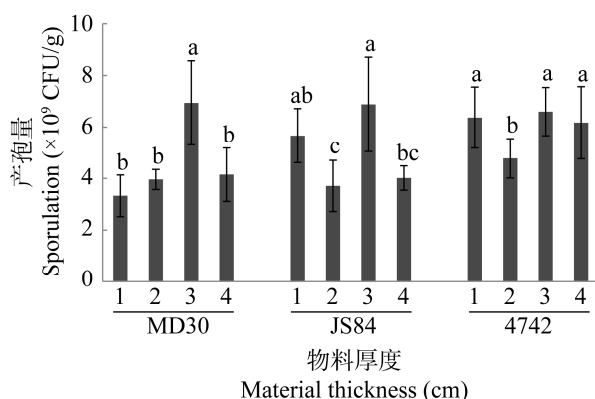


图 3 不同物料厚度对木霉产孢量的影响

Figure 3 Effect of different material thickness on *Trichoderma* sporulation.

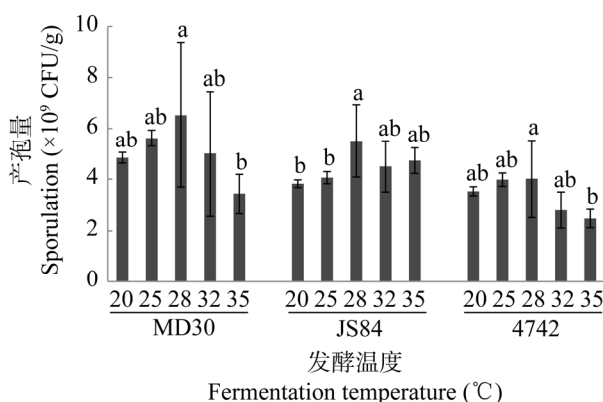


图 4 不同温度对木霉产孢量的影响

Figure 4 Effect of different temperature on *Trichoderma* sporulation.

#### 2.5.1 长枝木霉 MD30 回归模型方差分析及响应曲面图和等高线图

培养条件与产孢量之间的模型回归方程为  $Y = 5.24 + 0.218 \ 8A + 0.031 \ 2B - 0.1C - 0.002 \ 5AB + 0.000 \ 2AC - 0.000 \ 2BC + 0.780 \ 2A^2 - 0.729 \ 7B^2 - 0.161 \ 3C^2$ 。通过对回归模型方差分析可知(表 3),回归模型的概率值  $P = 0.005 \ 8 < 0.05$ ,失拟项的  $P = 1 > 0.05$ ,模型回归极显著,失拟检验不显著,说明未知因素对试验结果干扰很小,模型稳定。回归方程的决定系数  $R^2 = 0.912 \ 4$ ,说明该方程与实际情况拟合很好,较好地反映了长枝木霉 MD30 产孢量与初始 pH、物料厚度和温度的关系,因此可用该模型进行分析和预测。 $F$  值越大表明各因素对长枝木霉 MD30 产孢量的影响也就越强,试验结果表明,3 个因素对该菌产孢量的影响大小依次为初始 pH>温度>物料厚度;由回归方程系数显著性检验可知,  $A^2$  和  $B^2$  为极显著 ( $P < 0.01$ ),其余均为不显著。

依据响应面分析结果可知,回归模型存在最大值,如图 5 所示,当初始 pH 值为 5.0、物料厚度为 3.02 cm、温度为 27.42 °C 的条件下,预测每克干重基质所含的长枝木霉 MD30 孢子量最大值为  $6.26 \times 10^9$  CFU。

表 3 长枝木霉 MD30 回归模型的方差分析

Table 3 Analysis of variance for the regression model of *Trichoderma longibrachiatum* MD30

来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值	显著性
Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	<i>F</i> value	<i>P</i> value	Significance
模型 Model	5.16	9	0.573 1	8.1	0.005 8	Significant
<i>A</i> 初始 pH	0.379	1	0.379	5.35	0.053 9	
<i>A</i> Initial pH						
<i>B</i> 物料厚度	0.007 7	1	0.007 7	0.109 2	0.750 8	
<i>B</i> Material thickness						
<i>C</i> 温度	0.08	1	0.08	1.13	0.323 0	
<i>C</i> Temperature						
<i>AB</i>	0	1	0	0.000 4	0.985 5	
<i>AC</i>	$1.263 \times 10^{-7}$	1	$1.263 \times 10^{-7}$	$1.784 \times 10^{-6}$	0.999 0	
<i>BC</i>	$1.263 \times 10^{-7}$	1	$1.263 \times 10^{-7}$	$1.784 \times 10^{-6}$	0.999 0	
$A^2$	2.56	1	2.56	36.21	0.000 5	
$B^2$	2.24	1	2.24	31.68	0.000 8	
$C^2$	0.103 9	1	0.103 9	1.47	0.264 9	
残差 Residual	0.495 5	7	0.070 8			
失拟项 Lack of fit	0	3	$8.249 \times 10^{-6}$	0.000 1	1	Not significant
纯误差 Pure error	0.495 5	4	0.123 9			
总和 Total	5.65	16				
$R^2$	0.912 4					
调整 $R^2$ Adjusted $R^2$	0.799 7					
预测 $R^2$ Predicted $R^2$	0.863					

### 2.5.2 桔绿木霉 JS84 回归模型方差分析及响应曲面图和等高线图

培养条件与产孢量之间的模型回归方程为:  
 $Y=6.17-0.537\ 7A+0.052\ 3B+0.072\ 5C+0.002\ 5AB-0.002\ 5AC-0.002\ 5BC+0.138\ 2A^2-1.02B^2-0.446\ 2C^2$ 。  
 通过对回归模型方差分析可知(表 4), 回归模型的概率值  $P=0.044\ 8<0.05$ , 失拟项的  $P=1.00>0.05$ , 模型回归极显著, 失拟检验不显著, 说明未知因素对试验结果干扰很小, 模型稳定。回归方程的决定系数  $R^2=0.831\ 7$ , 说明该方程与实际情况拟合很好, 较好地反映了桔绿木霉 JS84 产孢量与初始 pH、物料厚度和温度的关系, 因此

可用该模型进行分析和预测。 $F$  值越大表明各因素对桔绿木霉 JS84 产孢量的影响也就越强, 试验结果表明, 3 个因素对该菌产孢量的影响大小依次为初始 pH>温度>物料厚度; 由回归方程系数显著性检验可知,  $B^2$  为极显著( $P<0.01$ ), 其余均为不显著。

依据响应面分析结果可知, 回归模型存在最大值, 如图 6 所示, 当初始 pH 值为 3.0、物料厚度为 3.02 cm、温度为 28.79 °C 的条件下, 预测每克干重基质所含的桔绿木霉 JS84 孢子量最大值为  $6.85 \times 10^9$  CFU。

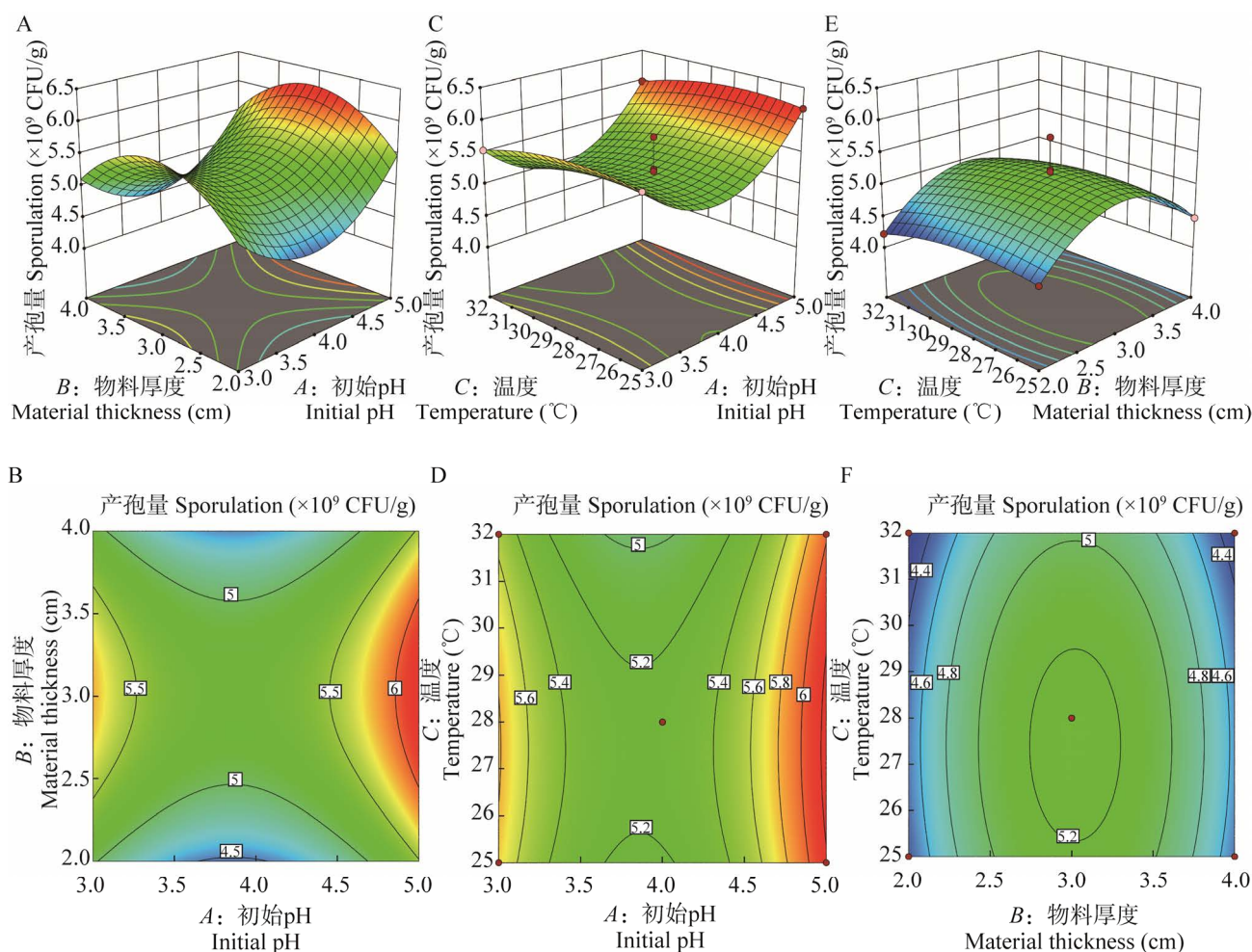


图5 长枝木霉 MD30 的响应面图和等高线图 A 和 B: 初始 pH 和物料厚度对长枝木霉 MD30 产孢量影响的响应面图和等高线图. C 和 D: 初始 pH 和温度对长枝木霉 MD30 产孢量影响的响应面图和等高线图. E 和 F: 物料厚度和温度对长枝木霉 MD30 产孢量影响的响应面图和等高线图

Figure 5 Response surfaces and contour maps of *Trichoderma longibrachiatum* MD30. A, B: Response surface and contour map of the effects of initial pH and material thickness on the spore production of *Trichoderma longibrachiatum* MD30. C, D: Response surface and contour map of the effects of initial pH and temperature on the spore production of *Trichoderma longibrachiatum* MD30. E, F: Response surface and contour map of the effects of material thickness and temperature on the spore production of *Trichoderma longibrachiatum* MD30.

### 2.5.3 贵州木霉 NJAU4742 回归模型方差分析及响应曲面图和等高线图

培养条件与产孢量之间的模型回归方程为:  

$$Y = 4.25 + 0.442 \ 7A + 0.232 \ 7B - 0.197 \ 5C -$$

$0.002 \ 5AB + 0.002 \ 5AC + 0.002 \ 5BC + 0.359 \ 7A^2 - 0.380 \ 2B^2 - 0.190 \ 9C^2$ 。通过对回归模型方差分析可知(表 5), 回归模型的概率值  $P = 0.023 \ 7 < 0.05$ , 失拟项的  $P = 1.00 > 0.05$ , 模型回归极显著, 失拟



检验不显著,说明未知因素对试验结果干扰很小,模型稳定。回归方程的决定系数  $R^2=0.863\ 6$ ,说明该方程与实际情况拟合很好,较好地反映了贵州木霉 NJAU4742 产孢量与初始 pH、物料厚度和温度的关系,因此可用该模型进行分析和预测。 $F$  值越大表明各因素对贵州木霉 NJAU4742 产孢量的影响也就越强,试验结果表明,3 个因素对该菌产孢量的影响大小依次

为初始 pH>物料厚度>温度;由回归方程系数显著性检验可知, $A^2$  和  $B^2$  为显著( $P<0.05$ ),其余均为不显著。

依据响应面分析结果可知,回归模型存在最大值,如图 7 所示,当初始 pH 值为 5.0、物料厚度为 3.30 cm、温度为 26.72 °C 的条件下,预测每克干重基质所含的贵州木霉 NJAU4742 孢子量最大值为  $5.14\times 10^9$  CFU。

表 4 桔绿木霉 JS84 回归模型的方差分析

Table 4 Analysis of variance for the regression model of *Trichoderma citrinoviride* JS84

来源	平方和	自由度	均方	$F$ 值	$P$ 值	显著性
Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	$F$ value	$P$ value	Significance
模型	7.76	9	0.862 2	3.84	0.044 8	Significant
Model						
$A$ 初始 pH	2.29	1	2.29	10.2	0.015 2	
$A$ Initial pH						
$B$ 物料厚度	0.021 7	1	0.021 7	0.096 6	0.765 0	
$B$ Material thickness						
$C$ 温度	0.042 1	1	0.042 1	0.187 4	0.678 1	
$C$ Temperature						
$AB$	0	1	0	0.000 1	0.991 9	
$AC$	0	1	0	0.000 1	0.991 9	
$BC$	0	1	0	0.000 1	0.991 9	
$A^2$	0.080 5	1	0.080 5	0.358 6	0.568 1	
$B^2$	4.4	1	4.4	19.59	0.003 1	
$C^2$	0.795 9	1	0.795 9	3.55	0.101 7	
残差 Residual	1.57	7	0.224 4			
失拟项 Lack of fit	$5.051\times 10^{-7}$	3	$1.684\times 10^{-7}$	$4.287\times 10^{-7}$	1	Not significant
纯误差 Pure error	1.57	4	0.392 7			
总和 Total	9.33	16				
$R^2$	0.831 7					
调整 $R^2$ Adjusted $R^2$	0.615 2					
预测 $R^2$ Predicted $R^2$	0.737					

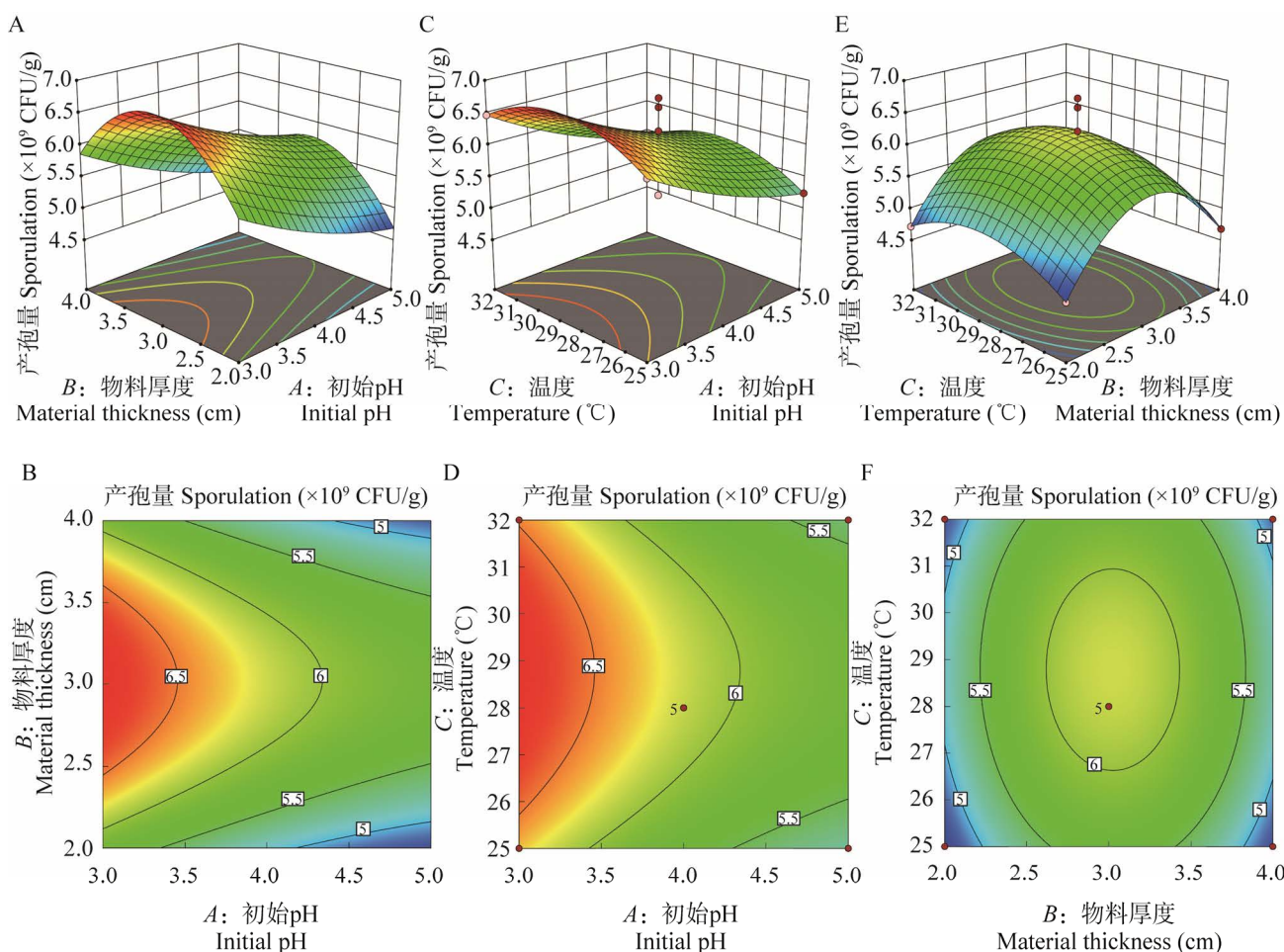


图6 桔绿木霉 JS84 的响应面图和等高线图 A 和 B: 初始 pH 和物料厚度对桔绿木霉 JS84 产孢量影响的响应面图和等高线图. C 和 D: 初始 pH 和温度对桔绿木霉 JS84 产孢量影响的响应面图和等高线图. E 和 F: 物料厚度和温度对桔绿木霉 JS84 产孢量影响的响应面图和等高线图

Figure 6 Response surfaces and contour maps of *Trichoderma citrinoviride* JS84. A, B: Response surface and contour map of the effects of initial pH and material thickness on the spore production of *Trichoderma citrinoviride* JS84. C, D: Response surface and contour map of the effects of initial pH and temperature on the spore production of *Trichoderma citrinoviride* JS84. E, F: Response surface and contour map of the effects of material thickness and temperature on the spore production of *Trichoderma citrinoviride* JS84.

## 2.6 最优条件验证

为了验证响应面优化结果的可行性, 将初始发酵条件下的产孢量与响应面优化后的产孢量进行比较。如图8所示, 培养7 d后测得长枝木霉 MD30、桔绿木霉 JS84 及贵州木霉 NJAU4742 在初始条件下每克干重基质所含的孢子量分别为  $4.50 \times 10^9$ 、

$5.82 \times 10^9$  及  $4.03 \times 10^9$  CFU, 而优化后每克干重基质所含的孢子量分别为  $6.32 \times 10^9$ 、 $6.96 \times 10^9$  及  $5.22 \times 10^9$  CFU。该结果与响应面优化的预测值接近, 而且优化后的产孢量显著高于初始发酵条件下的产孢量, 与初始发酵条件相比, 3 株木霉产孢量分别提高了 40.44%、19.59% 和 29.53%。

表 5 贵州木霉 NJAU4742 回归模型的方差分析

Table 5 Analysis of variance for the regression model of *Trichoderma guizhouense* NJAU4742

来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值	显著性
Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	<i>F</i> value	<i>P</i> value	Significance
模型 Model	3.61	9	0.400 6	4.92	0.023 7	Significant
<i>A</i> 初始 pH	1.55	1	1.55	19.08	0.003 3	
<i>A</i> Initial pH						
<i>B</i> 物料厚度	0.428 8	1	0.428 8	5.27	0.055 3	
<i>B</i> Material thickness						
<i>C</i> 温度	0.312 1	1	0.312 1	3.84	0.091 0	
<i>C</i> Temperature						
<i>AB</i>	0	1	0	0.000 3	0.986 5	
<i>AC</i>	0	1	0	0.000 3	0.986 6	
<i>BC</i>	0	1	0	0.000 3	0.986 6	
<i>A</i> <sup>2</sup>	0.544 9	1	0.544 9	6.70	0.036 0	
<i>B</i> <sup>2</sup>	0.608 8	1	0.608 8	7.48	0.029 1	
<i>C</i> <sup>2</sup>	0.145 7	1	0.145 7	1.79	0.222 6	
残差 Residual	0.569 5	7	0.081 4			
失拟项 Lack of fit	5.051×10 <sup>-7</sup>	3	1.684×10 <sup>-7</sup>	1.182×10 <sup>-6</sup>	1	Not significant
纯误差 Pure error	0.569 5	4	0.142 4			
总和 Total	4.17	16				
<i>R</i> <sup>2</sup>	0.863 6					
调整 <i>R</i> <sup>2</sup> Adjusted <i>R</i> <sup>2</sup>	0.688 2					
预测 <i>R</i> <sup>2</sup> Predicted <i>R</i> <sup>2</sup>	0.786 9					

### 3 讨论与结论

随着微生物技术的发展及设施农业研究的不断深入, 开发和应用微生物菌剂逐渐成为研究的热点。木霉作为一类植物益生真菌, 有着促进植物生长、增加作物产量的作用。在农业生产中, 木霉菌对番茄、黄瓜、豇豆、大豆、棉花、辣椒等作物的生长发育和产量的提高有显著的促进作用<sup>[21-23]</sup>。此外, 木霉菌对病原菌也有着一定的抑制作用, 已被广泛应用于果蔬、农作物土传病害的生物防治<sup>[24-26]</sup>。

本研究中微生物在固体发酵基质上生长时,

氨基酸水解液为其生长提供了有机氮源, 但因氨基酸水解液呈现强酸性, 不同添加量会影响物料的酸碱度<sup>[19]</sup>。氨基酸水解液的添加量偏高会导致微生物生长在一种偏酸的环境下, 从而抑制微生物生长, 导致产孢量降低; 而添加量偏低时微生物生长过程中所需要的营养供给不足, 固体发酵的产孢量也会下降。因此, 在发酵过程中对氨基酸水解液的添加量应该进行控制, 使其保持在合理的范围内, 通过单因素实验得出长枝木霉 MD30 与贵州木霉 NJAU4742 发酵最佳的氨基酸水解液添加量为 10%、桔绿木霉 JS84 为 5%。

pH 是影响微生物生长的重要环境因子, 多

数真菌的最适生长 pH 范围为 3.0–8.0<sup>[27]</sup>。在孢子萌发成菌丝的过程中,受极端 pH、低温、营养贫乏等环境条件影响,使得孢子代谢不活跃,处于休眠状态,影响孢子萌发,从而影响菌丝生长<sup>[28]</sup>。白洪志等<sup>[29]</sup>的研究发现,绿色木霉 C-08

固态发酵的最适培养条件为初始 pH 值为 4.0 时,发酵的木霉数量最高。与之类似,本研究通过单因素试验表明,长枝木霉 MD30 与贵州木霉 NJAU4742 发酵最佳的初始 pH 值为 5.0、桔绿木霉 JS84 为 3.0,响应面优化结果与其一致。

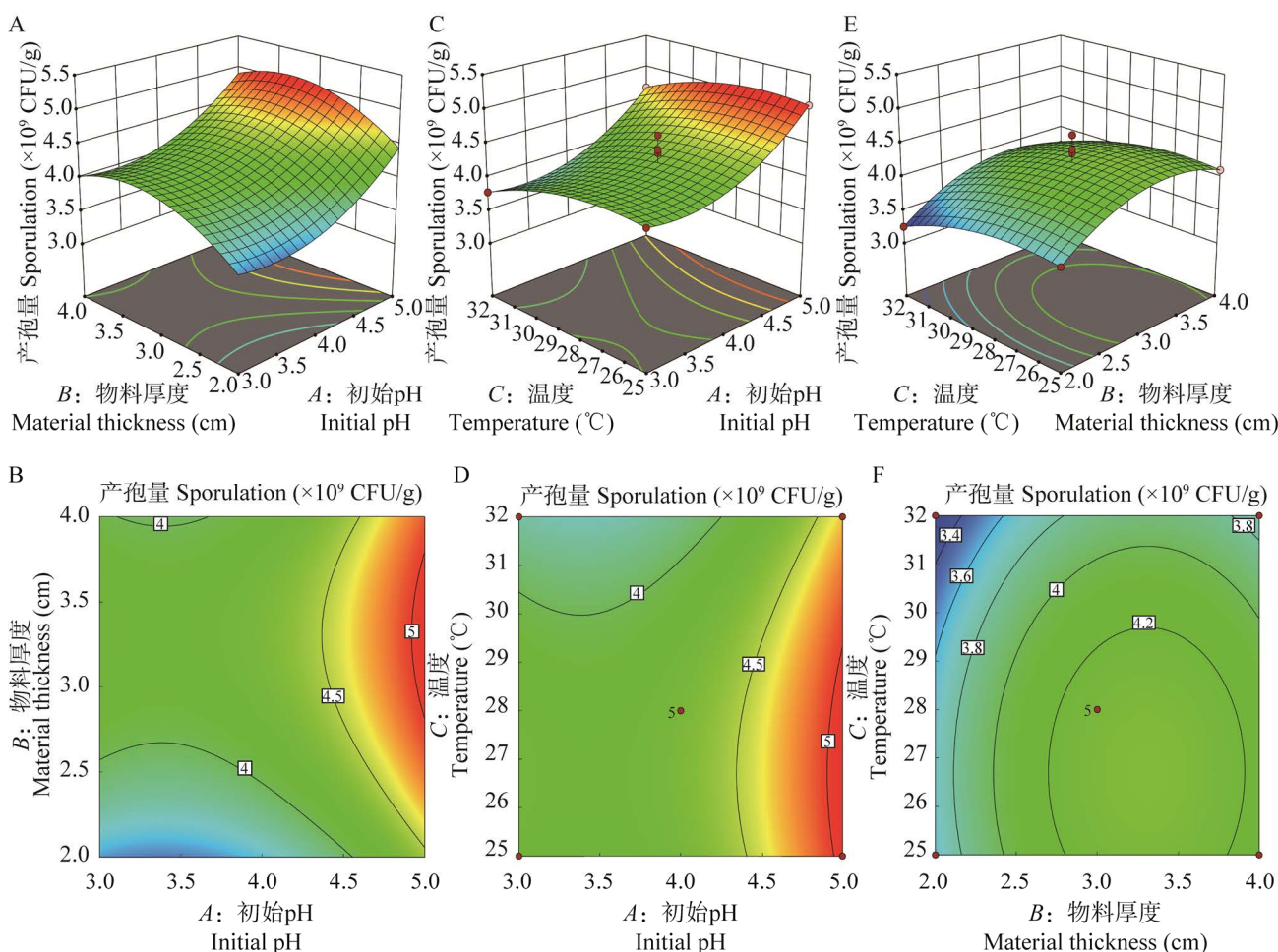


图 7 贵州木霉 NJAU4742 的响应面图和等高线图 A 和 B: 初始 pH 和物料厚度对贵州木霉 NJAU4742 产孢量影响的响应面图和等高线图. C 和 D: 初始 pH 和温度对贵州木霉 NJAU4742 产孢量影响的响应面图和等高线图. E 和 F: 物料厚度和温度对贵州木霉 NJAU4742 产孢量影响的响应面图和等高线图

Figure 7 Response surfaces and contour maps of *Trichoderma guizhouense* NJAU4742. A, B: Response surface and contour map of the effects of initial pH and material thickness on the spore production of *Trichoderma guizhouense* NJAU4742. C, D: Response surface and contour map of the effects of initial pH and temperature on the spore production of *Trichoderma guizhouense* NJAU4742. E, F: Response surface and contour map of the effects of material thickness and temperature on the spore production of *Trichoderma guizhouense* NJAU4742.

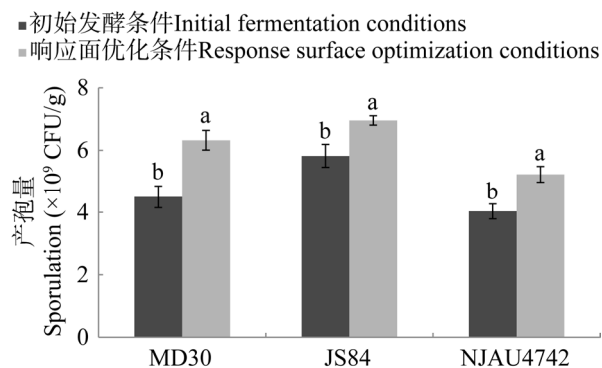


图 8 初始发酵条件及响应面优化条件下产孢量的变化

Figure 8 Changes of *Trichoderma* sporulation under initial fermentation conditions and response surface optimization.

物料厚度是影响木霉菌种固体发酵时产孢量的另一因素。物料过厚, 适合微生物生长的空气减少, 导致微生物呼吸困难, 从而影响产孢量; 物料过薄, 微生物生长过程中的营养物质减少, 影响产孢量<sup>[30]</sup>。张如<sup>[31]</sup>利用秸秆探索固体发酵的条件时发现, 发酵物料的厚度在 1–2 cm 之间时, 产孢量较高达到  $4 \times 10^8$  CFU/g 以上。然而本研究中, 单因素试验与响应面优化分析均表明木霉固体发酵物料的厚度应控制在 3 cm 左右, 这可能是因为本实验所采用的发酵底物为蘑菇渣, 通气性能、孔隙度等可能更优于秸秆, 因而物料厚度可更厚一点。

温度不仅影响着微生物的生长, 也影响固体发酵的产孢量。曾庆才等<sup>[32]</sup>对生防菌哈茨木霉 FJAT-9040 进行固体发酵条件的响应面优化, 得到发酵的最佳培养温度为 29 °C; 夏斯琴等<sup>[33]</sup>以麸皮为发酵基质对绿色木霉 T4 固体发酵工艺进行研究, 得到最适培养温度为 28 °C, 而且低温有利于木霉制剂的贮存, 40 °C 以上的高温对制剂孢子的活力影响较大。张如<sup>[31]</sup>研究了固体发酵的温度对产孢量的影响, 研究发现发酵温度应控制在 22–28 °C 之间。本研究通过单因素试验

得出长枝木霉 MD30、桔绿木霉 JS84、贵州木霉 NJAU4742 的最适发酵温度均为 28 °C, 而响应面优化结果表明这 3 株木霉最适发酵温度分别为 27.4、28.8 和 26.7 °C, 其中贵州木霉 NJAU4742 不耐高温, 与上述学者研究结果接近, 结果具有可行性。

本实验结果仅是在室内培养水平上获得的, 两株耐高温菌种的发酵条件只是在实验室进行模拟, 未真正投入到生产实践, 要实现产业化开发, 还须进行工厂环境条件下的中间放大实验, 对育苗和田间促生效果的研究有待进一步开展。

## REFERENCES

- [1] 刘世祥, 张荣胜, 刘永锋, 谷祖敏, 于俊杰. 深绿木霉 TA-9 分生孢子固体发酵的响应曲面法优化[J]. 农药学报, 2022, 24(1): 96-104.  
LIU SX, ZHANG RS, LIU YF, GU ZM, YU JJ. Optimization of solid-state fermentation process of *Trichoderma atroviride* TA-9 by response surface methodology[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2022, 24(1): 96-104 (in Chinese).
- [2] 葛永怡, 刘阳, 王天鹏, 邓道文, 杨正军, 于凤明. 长枝木霉 GF-10 的固体发酵条件优化[J]. 农药, 2017, 56(1): 27-29, 35.  
GE YY, LIU Y, WANG TP, DENG DW, YANG ZJ, YU FM. Optimization of solid-state fermentation conditions for *Trichoderma longibrachiatum* GF-10[J]. Agrochemicals, 2017, 56(1): 27-29, 35 (in Chinese).
- [3] 蔡枫. 木霉 NJAU 4742 促生作用及其 Hydrophobin 家族基因特性研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2017.  
CAI F. Plant growth promotion study and genetic characterization of hydrophobin family genes within *Trichoderma* NJAU 4742[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [4] 杨丹丹, 杨传伦, 张心青, 潘冬梅, 李佳明, 陈振发. 响应面法优化绿色木霉产孢子固体发酵培养基[J]. 中国农学通报, 2020, 36(36): 84-92.  
YANG DD, YANG CL, ZHANG XQ, PAN DM, LI JM, CHEN ZF. Response surface methodology applied to

- spores production by solid-state fermentation of *Trichoderma viride*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2020, 36(36): 84-92 (in Chinese).
- [5] 景芳, 张树武, 刘佳, 徐秉良. 长枝木霉 T6 生防菌剂发酵条件优化及其对辣椒立枯病的防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2020, 36(1): 113-124.
- JING F, ZHANG SW, LIU J, XU BL. Optimization of the fermentation conditions of biocontrol agent *Trichoderma longibrachiatum* T6 and its efficiency against pepper blight[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2020, 36(1): 113-124 (in Chinese).
- [6] 鲁海菊, 王波, 潘柳君, 孟有波, 张晓永. 深绿木霉 P3.9 生防菌株固体发酵条件优化筛选[J]. 北方园艺, 2014(14): 119-123.
- LU HJ, WANG B, PAN LJ, MENG YB, ZHANG XY. Screening on conditions of solid fermentation for biocontrol strain P3.9 of *Trichoderma atroviride*[J]. Northern Horticulture, 2014(14): 119-123 (in Chinese).
- [7] 潘玮. 绿色木霉厚垣孢子与分生孢子生物学特性及生防效果的比较研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2006.
- PAN W. Study the biological properties and bioefficacy of chlamydospore and conidium from *Trichoderma viride*[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2006 (in Chinese).
- [8] 杨丹丹, 王建平, 马娜娜, 张心青, 倪建龙, 潘冬梅. 绿色木霉固体发酵产孢子的条件优化[J]. 中国农学通报, 2020, 36(12): 111-119.
- YANG DD, WANG JP, MA NN, ZHANG XQ, NI JL, PAN DM. Optimization of solid-state fermentation for spores production by *Trichoderma viride*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2020, 36(12): 111-119 (in Chinese).
- [9] 杨小龙, 石朝慧, 乔焱, 游钟浩, 顾钢, 林智慧, 周挺, 梁颀捷, 陈承亮, 刘国坤, 等. 基于聚氨酯海绵载体的棘孢木霉固体发酵培养基筛选[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(1): 88-96.
- YANG XL, SHI CH, QIAO Y, YOU ZH, GU G, LIN ZH, ZHOU T, LIANG BJ, CHEN CL, LIU GK, et al. Screening of solid fermentation medium for *Trichoderma asperellum* based on polyurethane sponge carrier[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2022, 38(1): 88-96 (in Chinese).
- [10] Fasih UH. 生物炭与微生物(哈茨木霉和枯草芽孢杆菌)复合施用可提高谷类豆科作物的生产力、修复土壤镉污染[D]. 兰州: 甘肃农业大学博士学位论文, 2021.
- Fasih UH. The compound application of carbon and microorganisms (*Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis*) can improve the productivity of cereal legumes and repair soil cadmium pollution[D]. Lanzhou: Doctoral Dissertation of Gansu Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [11] 刘华, 李崇高, 黄建初. 响应面法对绿色木霉产纤维素酶固态发酵条件优化[J]. 安徽农业大学学报, 2017, 44(6): 980-985.
- LIU H, LI CG, HUANG JC. Condition optimization of solid fermentation for cellulase production by *Trichoderma viride* using response surface methodology[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2017, 44(6): 980-985 (in Chinese).
- [12] 张婧迪, 蔡明美, 刘志诚, 陈捷. 响应面设计优化绿僵菌固体发酵条件[J]. 微生物学通报, 2016, 43(9): 2072-2078.
- ZHANG JD, CAI MM, LIU ZC, CHEN J. *Metarhizium* solid-state fermentation optimization by response surface analysis[J]. Microbiology China, 2016, 43(9): 2072-2078 (in Chinese).
- [13] 张瑾, 张树武, 徐秉良, 古丽君, 薛应钰. 长枝木霉菌抑菌谱测定及其抑菌作用机理研究[J]. 中国生态农业学报, 2014, 22(6): 661-667.
- ZHANG J, ZHANG SW, XU BL, GU LJ, XUE YY. Determining antifungal spectrum and mechanism of *Trichoderma longibrachiatum* in vitro[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2014, 22(6): 661-667 (in Chinese).
- [14] 梁昌聪, 刘磊, 张建华, 郭立佳, 杨腊英, 王国芬, 王伟伟, 黄俊生. 绿色木霉菌 H06 固体浅盘发酵工艺优化[J]. 菌物学报, 2014, 33(6): 1313-1326.
- LIANG CC, LIU L, ZHANG JH, GUO LJ, YANG LY, WANG GF, WANG WW, HUANG JS. Optimization of shallow tray fermentation process of *Trichoderma vi-ride* H06[J]. Mycosystema, 2014, 33(6): 1313-1326 (in Chinese).
- [15] 朱佳芯, 张庚, 商美妮, 刘红军, 沈宗专, 李荣, 沈其荣. 耐热木霉菌株筛选及其对热作区香蕉促生效应的研究[J]. 微生物学报, 2021, 61(1): 206-218.
- ZHU JX, ZHANG G, SHANG MN, LIU HJ, SHEN ZZ, LI R, SHEN QR. Isolation and identification of a thermostable *Trichoderma* strain for banana growth promotion in tropic area[J]. Acta Microbiologica Sinica,



- 2021, 61(1): 206-218 (in Chinese).
- [16] 朱佳芯, 商美妮, 李荣, 刘红军, 乔策策, 陶成圆, 沈宗专, 沈其荣. 适用热区芒果园的木霉生物有机肥研制及其应用[J]. 中国土壤与肥料, 2021(3): 155-162.
- ZHU JX, SHANG MN, LI R, LIU HJ, QIAO CC, TAO CY, SHEN ZZ, SHEN QR. Development and application of specific bio-organic fertilizer containing *Trichoderma* strain for mango orchard in tropic areas[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2021(3): 155-162 (in Chinese).
- [17] 李瑞霞. 贵州木霉 NJAU 4742 对矿质元素的活化及对番茄的促生效果研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2016.
- LI RX. Solubilisation of mineral element by *Trichoderma guizhouense* and the effect of its biofertilizer on tomato plant growth[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [18] 段婉冬. 甜叶菊渣固体发酵木霉 NJAU 4742 及发酵菌剂对玉米苗期生长的影响[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2020.
- DUAN WD. Solid state fermentation of *Trichoderma* NJAU 4742 with *Stevia resvia* residue and its effects on corn growth in seeding stage[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [19] LIU HJ, ZHONG X, HUANG Y, QIAO CC, SHAO C, LI R, SHEN QR. Production of free amino acid and short peptide fertilizer from rapeseed meal fermentation using *Bacillus flexus* NJNPD41 for promoting plant growth[J]. Pedosphere, 2018, 28(2): 261-268.
- [20] 孙冬梅, 林志伟. 黄绿木霉发酵液对水稻纹枯病菌作用的研究[J]. 植物保护, 2009, 35(4): 83-86.
- SUN DM, LIN ZW. Effects of *Trichoderma aureoviride* fermentation on *Rhizoctonia solani*[J]. Plant Protection, 2009, 35(4): 83-86 (in Chinese).
- [21] 李松鹏, 崔琳琳, 程家森, 陈桃, 付艳苹, 谢甲涛. 两株哈茨木霉菌株防治水稻纹枯病及促进水稻生长的潜力研究[J]. 植物病理学报, 2018, 48(1): 98-107.
- LI SP, CUI LL, CHENG JS, CHEN T, FU YP, XIE JT. Assessment of two *Trichoderma harzianum* strains for biocontrol against rice sheath blight and growth promotion of rice[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2018, 48(1): 98-107 (in Chinese).
- [22] 李艳娟, 刘博, 庄正, 尚天赦, 刘青青, 朱晨曦, 王正宁. 哈茨木霉与绿色木霉对杉木种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 应用生态学报, 2017, 28(9): 2961-2966.
- LI YJ, LIU B, ZHUANG Z, SHANG TS, LIU QQ, ZHU CX, WANG ZN. Effects of *Trichoderma hazianum* and *T. viride* on seed germination and seedling growth of Chinese fir[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2017, 28(9): 2961-2966 (in Chinese).
- [23] 曲薇, 伍森, 王旭东, 张淑梅, 陈秀玲, 王傲雪. 哈茨木霉菌株 WY-1 对番茄的促生防病效果[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(5): 94-96.
- QU W, WU M, WANG XD, ZHANG SM, CHEN XL, WANG AX. Effects of *Trichoderma harzianum* strain WY-1 on growth and disease control of tomato[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(5): 94-96 (in Chinese).
- [24] 常媛, 杨兴堂, 姜传英, 姚志红, 贾让, 任龙辉, 张荣沐. 一株能拮抗 3 种土传病害病原真菌的长枝木霉[J]. 草业科学, 2017, 34(2): 246-254.
- CHANG Y, YANG XT, JIANG CY, YAO ZH, JIA R, REN LH, ZHANG RS. A *Trichoderma longibrachiatum* strain with antagonistic effects against three soil-borne pathogenic fungi[J]. Pratacultural Science, 2017, 34(2): 246-254 (in Chinese).
- [25] 扈进冬, 杨在东, 吴远征, 魏艳丽, 杨合同, 卢德鹏, 李纪顺. 哈茨木霉拌种对冬小麦生长、土传病害及根际真菌群落的影响[J]. 植物保护, 2021, 47(5): 35-40.
- HU JD, YANG ZD, WU YZ, WEI YL, YANG HT, LU DP, LI JS. Effects of seed dressing treatment with *Trichoderma harzianum* on the growth of winter wheat seedlings, soil borne diseases and rhizosphere fungal community[J]. Plant Protection, 2021, 47(5): 35-40 (in Chinese).
- [26] 谷祖敏, 毕卉, 张兵, 田晓颖. 不同木霉菌株对黄瓜枯萎病菌的拮抗作用[J]. 西北农业学报, 2018, 27(3): 426-431.
- GU ZM, BI H, ZHANG B, TIAN XY. Inhibition action of different *Trichoderma* strains on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2018, 27(3): 426-431 (in Chinese).
- [27] 韩桂云, 齐玉臣, 刘忱, 周玉芝. 温度、pH 对菌根真菌生长影响的研究[J]. 生态学杂志, 1993, 12(1): 15-19.
- HAN GY, QI YC, LIU C, ZHOU YZ. Effects of temperature and pH on mycorrhizal fungus growth[J]. Chinese Journal of Ecology, 1993, 12(1): 15-19 (in Chinese).

- Chinese).
- [28] 董钰鑫, 陈莎, 高梦祥, 李利. pH 对红色红曲菌 (*Monascus ruber*) M7 生长及产孢的影响[J]. 中国酿造, 2022, 41(3): 76-80.
- DONG YX, CHEN S, GAO MX, LI L. Effect of pH on the growth and sporulation of *Monascus ruber* M7[J]. China Brewing, 2022, 41(3): 76-80 (in Chinese).
- [29] 白洪志, 王惠, 韩梅, 肖亦农, 杨谦, 韩晓日. 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.
- BAI HZ, WANG H, HAN M, XIAO YN, YANG Q, HAN XR. Solid state fermentation condition optimizing of *Trichoderma viride* C-08 for producing cellulase[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2010, 41(6): 681-685 (in Chinese).
- [30] 蔡守平. 绿僵菌 MaZPTR-01 菌株固体发酵条件筛选研究[J]. 西南林业大学学报, 2016, 36(5): 100-105.
- CAI SP. Optimization in solid-state fermentation of *Metarhizium anisopliae* MaZPTR-01[J]. Journal of Southwest Forestry University, 2016, 36(5): 100-105 (in Chinese).
- [31] 张如. 利用秸秆和糖厂滤泥固体发酵研制木霉生物有机肥[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2016.
- ZHANG R. Development of *Trichoderma*-containing bio-organic fertilizer through solid fermentation with straw and sugar filter mud as substrates[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [32] 曾庆才, 肖荣凤, 刘波, 陈燕萍, 史怀. 生防菌哈茨木霉 FJAT-9040 固体发酵条件的响应面优化[J]. 福建农业学报, 2015, 30(2): 192-197.
- ZENG QC, XIAO RF, LIU B, CHEN YP, SHI H. Optimization of solid-state fermentation condition for the biocontrol strain of *Trichoderma harzianum* FJAT-9040 by response surface methodology[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2015, 30(2): 192-197 (in Chinese).
- [33] 夏斯琴, 王伟. 绿色木霉 T4 的固体发酵工艺及其制剂稳定性的研究[J]. 化学与生物工程, 2008, 25(12): 52-56.
- XIA SQ, WANG W. Study on solid fermentation process and stability of preparation of *Trichoderma viride* T4[J]. Chemistry & Bioengineering, 2008, 25(12): 52-56 (in Chinese).