

拟康宁木霉 T-51 的固体发酵参数优化

尤佳琪¹, 杨红娟¹, 朱丽华¹, 顾卫红¹, 曹碧婷¹, 吕铎¹, 胡政², 周成³, 李超汉^{*1}

1 上海市农业科学院园艺研究所, 上海 201106

2 上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所, 上海 201403

3 江苏省连云港市灌南县种子站, 江苏 连云港 222500

尤佳琪, 杨红娟, 朱丽华, 顾卫红, 曹碧婷, 吕铎, 胡政, 周成, 李超汉. 拟康宁木霉 T-51 的固体发酵参数优化[J]. 微生物学通报, 2024, 51(10): 4149-4161.

YOU Jiaqi, YANG Hongjuan, ZHU Lihua, GU Weihong, CAO Biting, LYU Duo, HU Zheng, ZHOU Cheng, LI Chaohan. Optimization of solid-state fermentation parameters for the biocontrol strain *Trichoderma koningiopsis* T-51[J]. Microbiology China, 2024, 51(10): 4149-4161.

摘要:【背景】木霉是一类应用广泛的植物病害生防真菌。拟康宁木霉(*Trichoderma koningiopsis*) T-51 是一株能够促进植物生长、诱导植物系统抗性、对多种植物病害有良好的防治效果的优秀生防菌株, 具有较好的应用前景。【目的】研究并优化拟康宁木霉 T-51 分生孢子的固体发酵技术, 提高菌株 T-51 的产孢量, 为该菌株的大规模生产提供理论参考。【方法】采用单因素试验结合响应面法, 筛选菌株 T-51 适宜的发醇基质, 分析优化固体发醇的水分含量、发醇时长、接种浓度, 以及碳氮源成分和比例等因素。【结果】通过对不同固体发醇基质筛选发现, 使用单一稻壳作为发醇基质的产孢效果最好, 水分含量为 75%且发醇时间延长至 11 d 能够显著提高产孢量, 接种浓度在 1×10^6 CFU/mL 时产孢量更高, 高浓度孢子液(1×10^8 CFU/mL)接种则产孢量下降; 稻壳基质中最适宜菌株 T-51 产孢的碳氮源为葡萄糖和硫酸铵。通过响应面法分析得到最佳发醇条件: 水分含量 79.5%, 发醇时长 11 d, 接种浓度 1×10^6 CFU/mL, 最佳碳氮源成分比例: 葡萄糖 2.6%, 乳糖 0.75%和硫酸铵 5%, 于此优化条件下菌株 T-51 预测最高产孢量为 7.76×10^9 CFU/g, 实际产孢量为 7.83×10^9 CFU/g。【结论】建立了基于稻壳基质的菌株 T-51 高效固体发醇技术, 使菌株 T-51 的产孢量能够满足田间应用的需求, 降低生产成本, 为菌株 T-51 未来在田间的规模化应用提供了理论基础。

关键词: 木霉; 固体发醇; 产孢量; 生物防治

资助项目: 上海市科技兴农项目(2022-02-08-00-12-F01199); 上海市西甜瓜产业体系([2022]1); 上海市农业科学院“卓越团队”建设计划(沪农科卓[2022]020)

This work was supported by the Shanghai Agriculture Applied Technology Development Program (2022-02-08-00-12-F01199), the Shanghai Melon and Fruit Industrial Technology System ([2022]1), and the Excellent Team Project of Shanghai Academy of Agricultural Sciences ([2022]020).

*Corresponding author. E-mail: lch505@163.com

Received: 2024-02-18; Accepted: 2024-04-30; Published online: 2024-06-05

Optimization of solid-state fermentation parameters for the biocontrol strain *Trichoderma koningiopsis* T-51

YOU Jiaqi¹, YANG Hongjuan¹, ZHU Lihua¹, GU Weihong¹, CAO Biting¹, LYU Duo¹, HU Zheng², ZHOU Cheng³, LI Chaohan^{*1}

1 Horticultural Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China

2 Institute for Agri-Food Standards and Testing Technology, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China

3 Guannan County Seed Station of Lianyungang City, Lianyungang 222500, Jiangsu, China

Abstract: [Background] *Trichoderma* spp. have been widely used for controlling plant diseases. *Trichoderma koningiopsis* T-51, an effective biocontrol strain, is capable of promoting plant growth, inducing plant systemic resistance, and controlling plant diseases, demonstrating a promising prospect for practical applications. [Objective] To study and optimize the solid-state fermentation technology of *T. koningiopsis* T-51 for improving the spore production, and provide a theoretical reference for the large-scale production of this strain. [Methods] Single-factor experiments and response surface methodology were employed to screen the suitable fermentation substrate for strain T-51 and optimize the key fermentation factors including water content, fermentation duration, inoculation concentration, and carbon and nitrogen source composition. [Results] With rice husk as the fermentation substrate, the strain demonstrated the highest spore production. The water content of 75% and fermentation duration of 11 days significantly increased the spore production. In addition, an inoculation concentration of 1×10^6 CFU/mL exhibited higher spore production, while the inoculation concentration of 1×10^8 CFU/mL showed a decrease in sporulation. Glucose and ammonium sulfate were identified as the optimal carbon and nitrogen sources, respectively, for the spore production of strain T-51 with rice husk as the substrate. The fermentation parameters were optimized by the response surface methodology as water content of 79.5%, fermentation duration of 11 days, inoculation concentration of 1×10^6 CFU/mL, 2.6% glucose, 0.75% lactose, and 5% ammonium sulfate. Under these optimized conditions, strain T-51 was predicted to achieve the maximum spore production of 7.76×10^9 CFU/g, and the measured value was 7.83×10^9 CFU/g. [Conclusion] This study has successfully established an efficient solid-state fermentation technology for strain T-51 with rice husk as the substrate, allowing adequate sporulation for field applications with reduced production costs. This study provided a theoretical basis for the future large-scale application of strain T-51 in the field.

Keywords: *Trichoderma*; solid-state fermentation; conidial production; biocontrol

木霉(*Trichoderma* spp.)是目前植物病害生物防治领域应用最广泛的真菌,对多种植物病害具有良好的防治效果,特别是针对植物病原真菌,例如镰孢菌(*Fusarium* spp.)、核盘菌

(*Sclerotinia* spp.)、葡萄孢(*Botrytis* spp.)和丝核菌(*Rhizoctonia* spp.)等,木霉具有非常强的竞争能力和拮抗效果^[1]。木霉还是一类机会性植物内生菌,能够与植物互作并诱导植物系统抗性

反应,提高植物抗逆性和对营养物质的吸收能力^[2]。木霉商业化生防菌剂已超过 250 多种,Rush 等^[3]在 2021 年统计真菌类生防菌剂中有 50%–60%是木霉属真菌,在植物生长调节、植物病害及害虫防控、有机质分解和生物修复等方面发挥着重要的作用^[4-5]。

木霉菌株在规模化生产和应用时,其生物量和生物活性十分关键,木霉的发酵技术是制约木霉菌株商业化的重要因素之一^[6]。木霉属种类庞大,现已经报道有 375 个种,其生长、产孢、生防能力和环境适应性都存在较大的种间和种内差异^[7-8]。不同木霉菌株的发酵技术和参数也差异巨大,研究开发适宜的生产发酵技术和制剂配方对木霉发挥生防效果和应对田间环境条件具有重要作用^[1]。

木霉的菌丝体、分生孢子或者厚垣孢子均可制成生防制剂^[9],菌丝体虽然生长迅速,但环境抗逆性差,厚垣孢子抗逆性较强,但发酵生产较困难,分生孢子被建议为最适宜田间应用的菌体形式^[10]。分生孢子的发酵可以分为固体发酵和液体发酵,其中液体发酵因为其更容易实现大规模生产而备受重视,但液体发酵条件下木霉分生孢子产量低,通常只产生片状菌丝体,需要再进行粉碎,很难达到理想的应用效果^[11]。筛选固体发酵基质时,为了控制成本,常使用易获得的廉价发酵培养基或者农产品加工废弃原料,例如麸皮、稻壳、豆饼和秸秆等^[12]。

拟康宁木霉(*Trichoderma koningiopsis*) T-51 是从土壤中分离获得的一株木霉野生菌株^[13],对葡萄孢(*Botrytis* spp.)、核盘菌(*Sclerotinia* spp.)、丝核菌(*Rhizoctonia* spp.)、镰孢菌(*Fusarium* spp.) 等的多种植物病原真菌具有强拮抗效果^[14],能够显著促进植物生长,诱导植物抗性,在番茄灰霉病、番茄枯萎病和西瓜枯萎病等植物病害防治中具有应用前景^[15-17]。前期已明确菌株

T-51 在培养基上的产孢条件^[14],然而培养基产孢的方式效率低,成本高,不能满足实际生产应用的需求。因此,本研究对菌株 T-51 的发酵技术进行研究和优化,筛选适宜的发酵基质,并优化其培养条件和补充营养配方,以期开发低成本的高效固体发酵技术,为拟康宁木霉 T-51 的规模化生产应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

拟康宁木霉(*Trichoderma koningiopsis*) T-51 分离自湖北省油菜田土壤中^[13],保藏于中国典型培养物保藏中心(编号 M2015729)。

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基(g/L):去皮马铃薯 200.0,葡萄糖 20.0,琼脂粉 15.0。菌株 T-51 使用前在 PDA 培养基上活化至少 2 代,并打取菌落边缘菌丝块进行后续试验。

稻壳、麦麸皮、玉米粉、油菜饼、小麦粒和稻草碎,上海郊区农产品加工厂。供试试剂均为国产分析纯,国药集团化学试剂有限公司。生化培养箱,广东泰宏君科学仪器股份有限公司;光学显微镜,奥林巴斯(中国)有限公司;血球计数板,上海市求精生化试剂仪器有限公司。

1.2 最适固体发酵基质筛选

菌株 T-51 孢子液的制备:从已活化的 T-51 菌落边缘打取菌丝块,接种在 9 cm 的 PDA 培养基上,在 20 °C 光照下培养 10 d 使其产孢。用 5 mL 无菌水洗下孢子,用血球计数板统计孢子浓度,然后用无菌水配制成试验所需浓度的菌株 T-51 分生孢子悬浮液,配制好的孢子液立即使用。

供试 6 种固体发酵基质为稻壳、麦麸皮、玉米粉、油菜饼、小麦粒和稻草碎。称取 20 g 基质装入一个容量为 270 mL 的直身透明组培

瓶中, 加入 10 mL 蒸馏水, 搅拌混匀, 加透气盖后 121 °C 蒸汽灭菌 25 min。待冷却后于瓶内均匀加入 1 mL 浓度为 1×10^7 CFU/mL 的菌株 T-51 孢子液, 盖好瓶盖, 于 20 °C 光照下静置培养 7 d。根据发酵基质上的产孢情况, 用适量无菌水洗下固体发酵基质上的孢子, 稀释后用血球计数板统计菌株 T-51 产孢量。进一步对稻壳和麦麸皮的不同比例进行筛选, 总固体发酵基质质量为 20 g, 设置稻壳: 麦麸皮的质量比为 1:0、0:1、1:3、1:1、3:1 这 5 种不同的比例配方, 加入 10 mL 蒸馏水, 按上述方法接种菌株 T-51 后发酵并统计产孢量。本试验每种发酵基质均设置 4 瓶作为重复, 试验重复 2 次。

1.3 水分、发酵时长的筛选及优化

以 10 g 稻壳为基质, 设计了 25%、50%、75% 和 100% 这 4 个不同水分含量, 并同时设计 7、9 和 11 d 这 3 个不同的发酵时间, 每种处理设置 4 瓶重复。接种 1 mL 浓度为 1×10^7 CFU/mL 的菌株 T-51 孢子液后 20 °C 光照下发酵不同时间, 统计不同处理下的菌株 T-51 产孢量。试验重复 2 次。

1.4 菌株 T-51 孢子液接种浓度的优化

用无菌水将新鲜的菌株 T-51 孢子液梯度稀释至 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 和 2×10^8 CFU/mL。以 10 g 稻壳为基质, 添加水分 75%, 灭菌后加入 1 mL 上述不同浓度的菌株 T-51 孢子液, 每个处理设置 4 瓶作为重复。20 °C 光照下发酵 11 d, 统计不同接种浓度处理下的菌株 T-51 产孢量。试验重复 2 次。

1.5 碳、氮源成分的筛选及优化

初筛试验使用单因素分析法, 选用果糖、乳糖和葡萄糖这 3 种不同的碳源, 以及硫酸铵和酵母膏这 2 种不同的氮源。以每瓶 10 g 稻壳为基质, 将不同碳源或氮源溶于水后再与稻壳混匀, 使稻壳中最终水分含量为 75%、碳源或

氮源含量为 10%。灭菌后, 加入 1 mL 浓度为 1×10^6 CFU/mL 的菌株 T-51 孢子液, 20 °C 光照下发酵 11 d, 统计不同接种浓度处理下的菌株 T-51 的产孢量。

进一步选用乳糖、葡萄糖和硫酸铵进行浓度筛选试验, 配制方法如前所述, 并针对每种物质设计 0.1%、0.5%、1%、5% 和 10% 这 5 种不同浓度, 发酵条件同前, 11 d 后统计不同处理下的菌株 T-51 产孢量。

1.6 响应面法优化菌株 T-51 固体发酵条件

水分、时间及接种浓度优化的响应面试验: 以水分含量(A)、发酵时间(B)和接种浓度(C)为三因素设计响应面分析试验, 三因素三水平如表 1 所示。采用软件 Design Expert 12, 根据 Box-Behnken 原理设计三因素三水平的响应面分析试验, 以菌株 T-51 产孢量(\log_{10} CFU/g)为响应量设计试验, 每个处理均设置 4 个重复。通过响应面分析确定各因素对产孢量的影响, 并以菌株 T-51 产孢量(\log_{10} CFU/g)最大值来预测各因素的最佳组合设计。

营养物质成分比例优化的响应面试验: 以葡萄糖(A)、乳糖(B)、硫酸铵(C)为三因素设计响应面分析试验, 各因素水平如表 2 所示, 以菌株 T-51 产孢量(\log_{10} CFU/g)为响应量设计试验, 每个处理均设置 4 个重复。试验分析方法如

表 1 水分、时间及接种浓度的响应面试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of response surface experiment designs for water content, time, and inoculation concentration

水平	A: 水分含量	B: 时间	C: 接种浓度
Level	A: Water content (%)	B: Time (d)	C: Inoculation concentration (\log_{10} CFU/mL)
-1	50	7	6
0	100	9	7
1	200	11	8

表 2 营养物质的响应面试验因素水平表

Table 2 Factors and levels of response surface experiment designs for nutrients

水平	A: 葡萄糖	B: 乳糖	C: 硫酸铵
Level	A: Glucose (%)	B: Lactose (%)	C: Ammonium sulfate (%)
-1	0.50	0.1	0.50
0	2.75	0.5	2.75
1	5.00	1.0	5.00

上文所述，以菌株 T-51 产孢量(\log_{10} CFU/g)的最大值来预测各因素的最佳组合设计。

1.7 条件优化后的浅盘发酵

为了验证条件优化后的发酵效率，使用浅盘发酵法在上述试验优化后的条件下进行菌株 T-51 的分生孢子发酵。试验使用不锈钢浅盘，尺寸为 36 cm×27 cm×4 cm (长×宽×高)，称取 100 g 稻壳，在 79.54 mL 水中加入 2.6 g 葡萄糖、0.75 g 乳糖和 5 g 硫酸铵，溶解后混入稻壳，平铺在不锈钢浅盘，用锡箔纸密封灭菌。冷却后均匀加入 10 mL 浓度为 1×10^6 CFU/mL 的菌株 T-51 孢子液，保鲜膜覆盖，于 20 °C 自然光照下培养 11 d，统计菌株 T-51 产孢量。

1.8 数据处理

数据采用 Office Excel 2019 版进行统计分析及 *t*-test ($P < 0.05$)，多个处理之间的差异性采用 SAS 8.1 进行方差分析和多重比较 ($P < 0.05$)。响应面通过 Design Expert 12 软件 Box-Behnken 原理设计并分析，以产孢量最大值预测最佳培养条件。

2 结果与分析

2.1 最适发酵基质筛选结果

结果如图 1 所示，使用不同的固体发酵基质对菌株 T-51 的产孢影响很大，其中，菌株 T-51 在稻壳上基质产孢量最大，达到 9.07×10^6 CFU/g，麦麸皮和油菜饼可以产孢，而在玉米粉、小麦

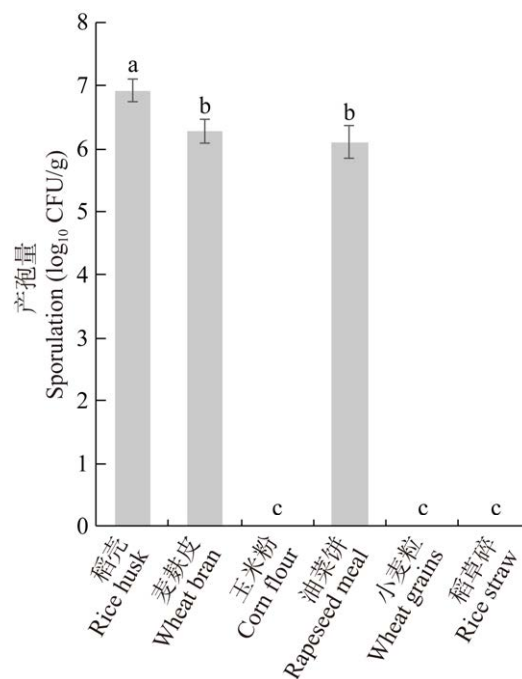


图 1 拟康宁木霉 T-51 在不同固体基质上的产孢量不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)，下同

Figure 1 The sporulation of *Trichoderma koningiopsis* T-51 on different solid substrates. Different lowercase letters indicate significant differences (Duncan-test, $P < 0.05$). The same blow.

粒和稻草碎上菌株 T-51 极少产孢或不产孢。进一步对不同比例的稻壳和麦麸皮复配发酵的结果表明，菌株 T-51 在单一稻壳基质上的产孢量高于其他添加了麦麸皮的基质(图 2)，其中，稻壳:麦麸=1:0 的产孢量达到 6.95 (\log_{10} CFU/g)，即 1.16×10^7 CFU/g，稻壳:麦麸皮为 3:1 的产孢量为 6.99 (\log_{10} CFU/g)，即 1.10×10^7 CFU/g，稻壳:麦麸皮为 1:3 的产孢量最低，为 6.08 (\log_{10} CFU/g)，即 1.20×10^6 CFU/g。综合以上结果，后续试验将以单一稻壳基质作为拟康宁木霉 T-51 的固体发酵基质。

2.2 水分含量、发酵时间和接种浓度的优化

在不同水分和时长下的发酵试验结果如图 3A 所示，当时间从 7 d 延长至 11 d 时，菌株

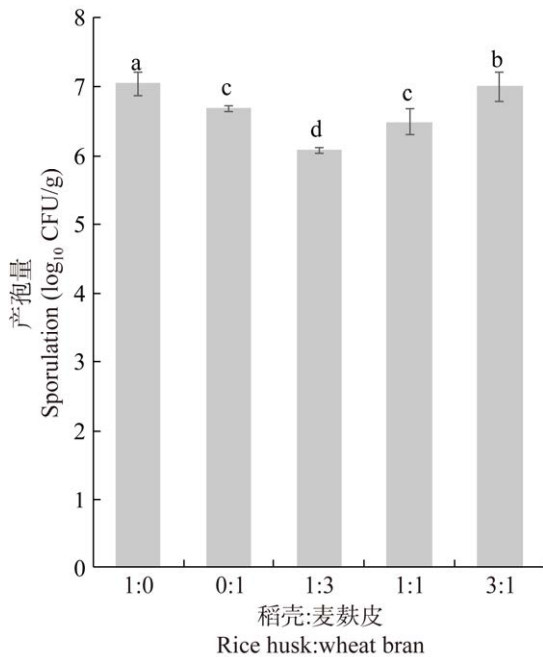


图2 菌株 T-51 在不同比例的稻壳和麦麸皮上的产孢量

Figure 2 The sporulation of strain T-51 on the different ratio of rice husk and wheat bran.

T-51 平均产孢量呈显著上升($P < 0.05$)。在发酵 7 d 和 9 d 时, 不同水分含量对产孢量影响不大, 当发酵 11 d 时, 增加水分含量会提高产孢量, 其中水分含量为 75% 时产孢量最大, 达到 8.27 (\log_{10} CFU/g), 即 1.88×10^8 CFU/g, 显著高于水分含量为 25% 的处理。

对菌株 T-51 孢子液接种量的优化结果表明, 4 种不同的接种浓度对最终产孢量影响较大, 低浓度 (1×10^6 CFU/mL) 接种量获得的产孢量最大, 达到 7.97 (\log_{10} CFU/g), 即 9.37×10^7 CFU/g。随着接种浓度升高, 产孢量逐渐下降(图 3B)。

2.3 营养物质添加种类及比例优化

为提高稻壳基质中菌株 T-51 的发酵效率, 通过单因素试验法筛选了 3 种碳源(果糖、乳糖和葡萄糖)和 2 种氮源(硫酸铵和酵母膏)对菌株 T-51 发酵产孢的影响, 研究结果如图 4 所示, 稻壳基质中额外添加葡萄糖最适宜菌株 T-51 产孢, 达到了 8.86 (\log_{10} CFU/g), 即 7.31×10^8 CFU/g,

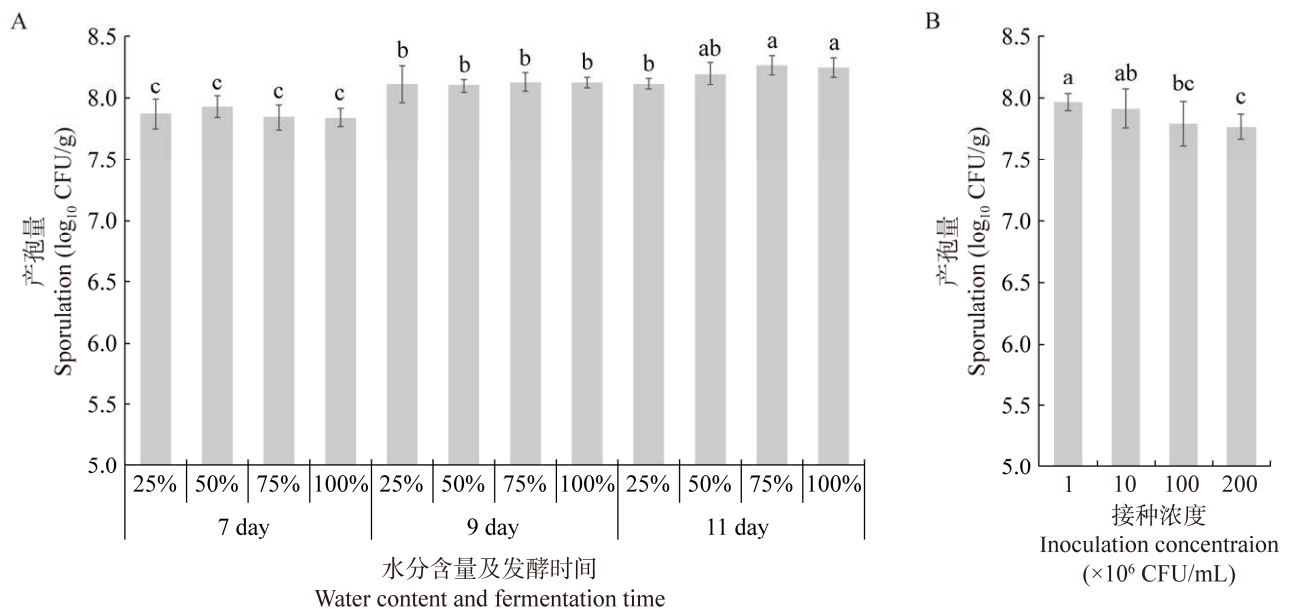


图3 不同水分含量、发酵时间(A)和接种浓度(B)对菌株 T-51 产孢量的影响

Figure 3 Effect of different water content, fermentation time (A) and inoculation concentration (B) on strain T-51 sporulation.

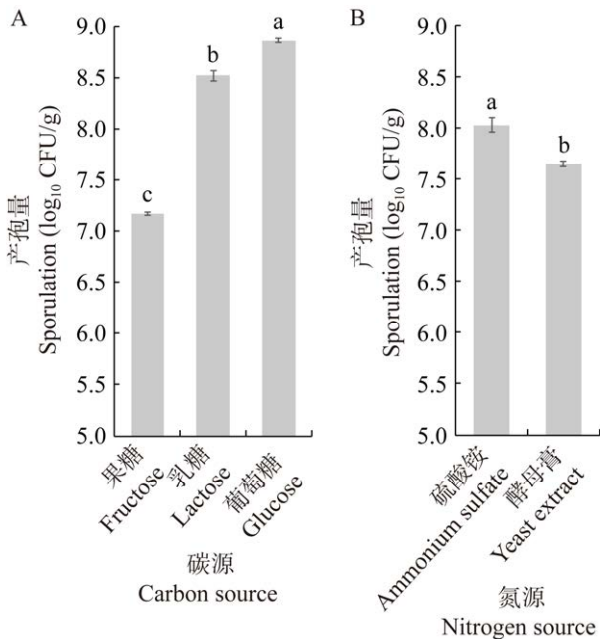


图 4 不同碳源(A)、氮源(B)对菌株 T-51 产孢量的影响

Figure 4 Effect of different carbon source (A) and nitrogen source (B) on strain T-51 sporulation.

显著高于另外 2 种碳源物质, 乳糖次之, 添加果糖产孢量最少, 仅为 7.16 (log₁₀ CFU/g), 即 1.48×10⁷ CFU/g。2 种氮源物质中, 添加硫酸铵产孢量达到 8.03 (log₁₀ CFU/g), 即 1.07×10⁸ CFU/g,

显著高于酵母膏。因此, 选用葡萄糖、乳糖和硫酸铵作为候选碳氮源。

在上述优化的条件下进一步添加葡萄糖、乳糖和硫酸铵作为碳氮源营养物质。在稻壳发酵中碳氮源添加比例优化的结果表明, 菌株 T-51 分别在添加 1%葡萄糖、0.5%乳糖和 1%硫酸铵时产孢量最大, 过高或过低的比例均不利于产孢量的提升(图 5)。

2.4 发酵条件的响应面法优化结果

根据上述试验结果, 首先对水分含量(A)、发酵时间(B)和接种浓度(C)进行三因素水平的响应面法优化, 使用软件 Design Expert 12 进行响应面分析, 得到培养条件与菌株 T-51 产孢量(Y)之间的模型回归方程为: $Y=7.68+0.27A+0.155B+0C-0.19AB+0.25AC-0.15BC-0.57A^2+0.53B^2-0.21C^2$ 。表 3 中方差分析结果表明, 该模型 $P=0.043$, 检验为显著, 失拟检验不显著, 相关系数 $R^2=0.8339$, 表明该回归模型可靠稳定且拟合良好。对 3 个因素的 F 值比较发现, 水分和发酵时长对产孢量影响相对较大, 其中水分含量对菌株 T-51 最终产孢量的影响最大, 而接种浓度对产孢量的影响相对较小。方差分析可得

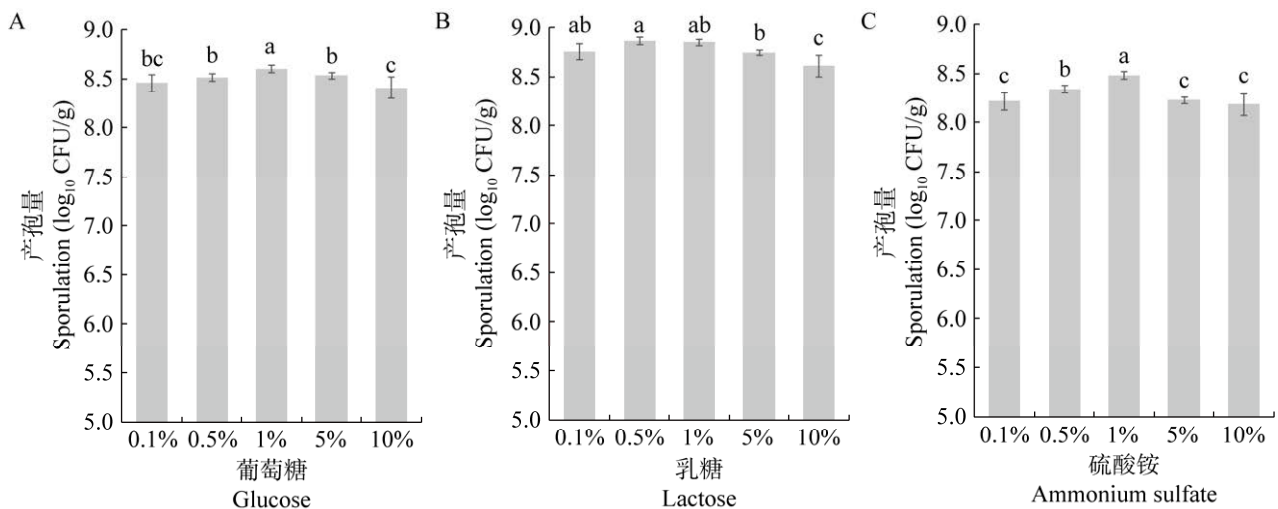


图 5 不同碳氮源添加比例对菌株 T-51 产孢量的影响

Figure 5 Effect of different carbon and nitrogen source addition ratio on strain T-51 sporulation.

表3 不同发酵条件下菌株 T-51 产孢量的回归模型的方差分析

Table 3 Analysis of variance for the regression model of strain T-51 sporulation in different conditions

来源 Source	平方和 Sum of square	自由度 DF	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	3.874	9	0.430	3.906	0.043	Significant
A 水分 Water content	0.583	1	0.583	5.292	0.050	
B 时间 Time	0.192	1	0.192	1.744	0.228	
C 接种量 Inoculation concentration	1.332E-15	1	1.332E-15	1.208E-14	0.999	
AB	0.144	1	0.144	1.310	0.289	
AC	0.250	1	0.250	2.268	0.175	
BC	0.09	1	0.090	0.816	0.396	
A ²	1.368	1	1.368	12.413	0.009	
B ²	1.182	1	1.182	10.732	0.013	
C ²	0.185	1	0.185	1.684	0.235	
残差 Residual	0.771	7	0.110			
失拟项 Lack of fit	0.443	3	0.147	1.802	0.286	Not significant
纯误差 Pure error	0.328	4	0.082			
校正总和 Cor total	4.645	16				
R ²	0.833 9					

A² 和 B² 的 $P < 0.05$, 检验为显著。根据响应面模型(图 6), 预测得到在水分为 79.5%, 发酵时长为 11 d, 接种浓度为 1×10^6 CFU/mL 时, 得到预测最高产孢量 8.30 (\log_{10} CFU/g), 即每克干基质中 2.0×10^8 个孢子。

在优化发酵条件的基础上, 再进一步使用响应面法对营养物质添加比例进行优化, 以葡萄糖(A)、乳糖(B)和硫酸铵(C)为三因素进行分析, 得到营养物质添加比例与菌株 T-51 产孢量(Y)之间的模型回归方程为: $Y = 9.81 - 0.023A + 0.143B + 0.15C - 0.209AB + 0.001AC - 0.058BC - 0.254A^2 - 0.245B^2 - 0.016C^2$ 。表 4 中方差分析结果表明, 该模型 $P = 0.027$, 检验为显著, 失拟检验不显著, 相关系数 $R^2 = 0.919 8$, 表明该回归模型可靠稳定, 且拟合良好。对 3 个因素的 F 值比较发现, 硫酸铵和乳糖对产孢量影响相对较大, 葡萄糖的影响较小。回归方程显著性检验得到 B、C、AB、A² 和 B² 的 P 值均小于 0.05, 为显著。根据响应面模型(图 7), 预测在添加葡

萄糖 2.6%、乳糖 0.75%和硫酸铵 5%时, 得到预测最高产孢量 9.89 (\log_{10} CFU/g), 即每克干基质中 7.76×10^9 个孢子。

2.5 优化后发酵条件的验证

根据上述试验优化后的条件进行浅盘发酵, 获得最终的产孢量为 7.83×10^9 CFU/g, 实际发酵的产孢量结果与响应面法优化后的预测值接近, 符合预期。该条件下菌株 T-51 产孢量显著提高, 能够满足实际生产应用的需要。

3 讨论与结论

优化提升木霉菌株的发酵效率对其在农作物绿色生产中的推广应用意义重大。不同菌株的适用基质差异较大, 例如绿色木霉(*T. viride*) H06 适用于玉米粉和大豆粕^[18]; 绿色木霉 TV04-2 适宜玉米粉和麦麸(1:1), 而在稻壳上产孢效果并不理想^[19]; 哈茨木霉(*T. harzianum*) T-E5 则筛选发现适用于小麦秸秆发酵^[20]; 哈茨木霉 AS12-2 在高粱粒、稻壳、稻草上产孢量最高^[21],

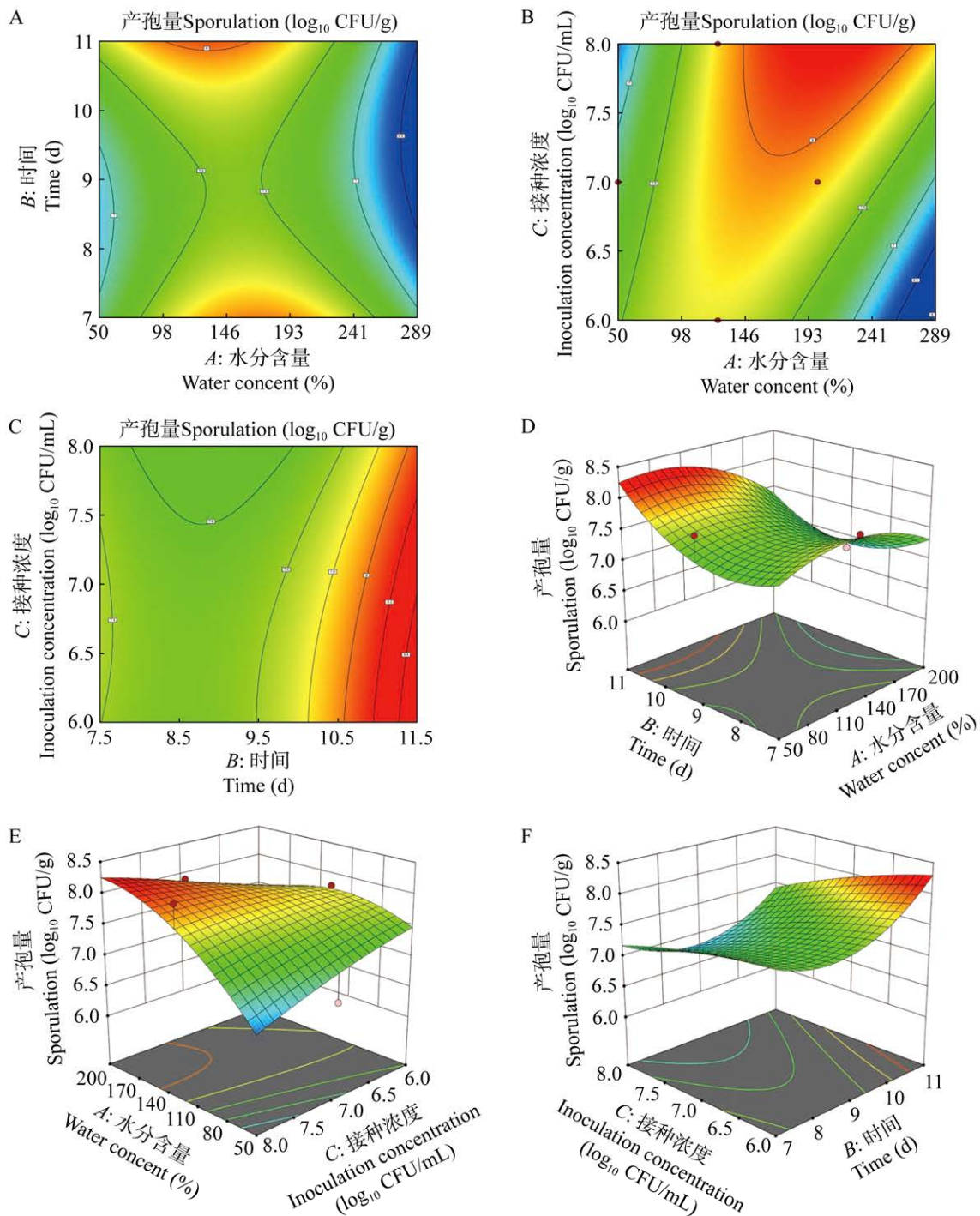


图 6 不同发酵条件下菌株 T-51 产孢量的等高线图(A-C)和响应面图(D-F) A 和 D: 时间和水分. B 和 E: 接种浓度和水分. C 和 F: 时间和接种浓度

Figure 6 The contour maps (A-C) and response surfaces (D-F) of strain T-51 sporulation in different conditions. A and D: Time and water content. B and E: Inoculation concentration and water content. C and F: Time and inoculation concentration.

表 4 不同营养物质条件下菌株 T-51 产孢量的回归模型的方差分析

Table 4 Analysis of variance for the regression model of strain T-51 sporulation in different nutrients

来源 Source	平方和 Sum of square	自由度 DF	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	0.971	9	0.107	6.37	0.027	Significant
A 葡萄糖 Glucose	0.004	1	0.004	0.249	0.638	
B 乳糖 Lactose	0.165	1	0.165	9.770	0.026	
C 硫酸铵 Ammonium sulfate	0.182	1	0.182	10.740	0.022	
AB	0.176	1	0.176	10.410	0.023	
AC	0.000	1	0.000	0.000	0.980	
BC	0.013	1	0.013	0.804	0.410	
A ²	0.238	1	0.238	14.070	0.013	
B ²	0.222	1	0.222	13.150	0.015	
C ²	0.001	1	0.001	0.058	0.818	
残差 Residual	0.084	5	0.016			
失拟项 Lack of Fit	0.075	3	0.025	5.740	0.152	Not significant
纯误差 Pure Error	0.008	2	0.004			
校正总和 Cor Total	1.060	14				
R ²	0.919					

棘孢木霉(*T. asperellum*) DQ-1 在单一麦麸基质上产孢量最大^[22]; 深绿木霉(*T. atroviride*) TA-9 在谷壳和麦麸为 2:3 的条件下产孢量最大^[23]; 本研究中拟康宁木霉 T-51 适宜使用单一稻壳进行发酵。稻壳的主要成分是粗纤维和木质素^[24], 木霉能够产生丰富的纤维素酶和木质素酶, 能够很好地利用稻壳营养成分, 后续也可以对菌株 T-51 在有机质降解方面的应用价值进行开发。

水分含量是影响菌株 T-51 产孢量的重要因素。本研究中的水分含量为初始含水量, 而在实际发酵过程中, 随着发酵时间的延长, 基质内水分会逐渐蒸发减少, 因此, 水分含量和发酵时间是互相影响的, 用响应面法能够更合理地预测水分和发酵时长对最终产孢量的影响。木霉在发酵过程中产孢量存在着先增加后降低的趋势, 例如棘孢木霉 DQ-1 在发酵 12 d 达到最高产孢量, 后期则产孢量逐渐下降至稳定^[22]; 木霉 T-E5 在发酵 8 d 时达到产孢量峰值, 随后下降^[20]。因此, 综合考虑最终孢子产量、时间

成本和后期孢子活性, 不宜发酵过久。

前人研究表明, 木霉产孢对培养基质的碳氮源等养分要求相对比较高, 而对环境因素的要求则比较宽松^[10], 通过添加优化碳氮源能够有效提高木霉孢子产量。菌株 T-51 在察氏培养基为基础的条件下最适宜的碳源为果糖和乳糖, 最适氮源为硫酸铵和硝酸铵^[14], 而在稻壳基质发酵时添加葡萄糖的产孢量更高, 与培养基上的结果并不一致, 这可能与稻壳和培养基的成分差异有关。经过营养成分的添加及条件优化, 多数木霉产孢量都能够达到 10⁹ CFU/g 以上的理想产量, 能够满足田间应用的要求。例如, 哈茨木霉 H-13^[25]、哈茨木霉 T-E5^[20]、绿色木霉^[26]、棘孢木霉 DQ-1^[22]、深绿木霉 TA-9^[23]等菌株在经过发酵条件优化后, 产孢量均提高到 10⁹–10¹⁰ CFU/g。本研究中菌株 T-51 在经过响应面法优化发酵条件和营养物质比例后获得的产孢量为 7.83×10⁹ CFU/g, 与前人研究结果相近, 该发酵产量能够满足田间应用的需求。

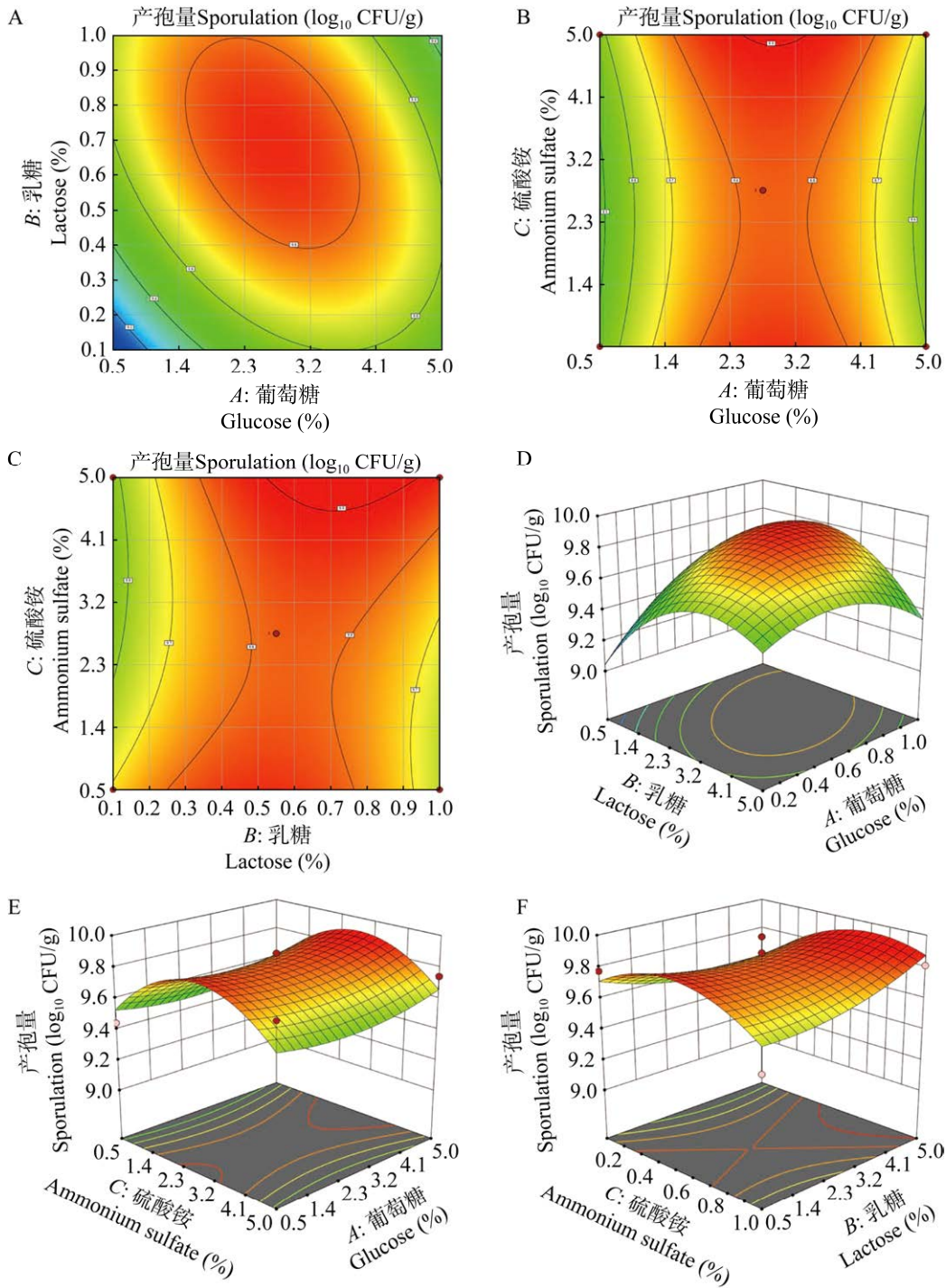


图 7 不同营养物质对菌株 T-51 产孢量影响的等高线图(A-C)和响应面图(D-F) A 和 D: 乳糖和葡萄糖. B 和 E: 硫酸铵和葡萄糖. C 和 F: 硫酸铵和乳糖

Figure 7 The contour maps (A–C) and response surfaces (D–F) of strain T-51 sporulation in different nutrients. A and D: Lactose and glucose. B and E: Ammonium sulfate and glucose. C and F: Ammonium sulfate and lactose.

木霉产孢受光影响, 半数的菌株在黑暗条件下无法产孢^[27]。菌株 T-51 产孢也需要光照条件^[14]。冯程龙^[20]发现木霉 T-E5 固体发酵使用浅盘法比袋装或三角瓶的发酵效率高, 可能与发酵料厚度和透气透光性相关。在本研究中的条件优化试验中均是使用透明瓶装的方式, 而最终验证时, 使用浅盘搭配透明保鲜膜的发酵方式, 其厚度与透光效果与前期瓶装试验差距不大, 因此发酵结果与预期相近。浅盘发酵的方式也更适用于后期工厂化扩大生产。后续将进一步优化菌株 T-51 固体发酵的初始 pH、光照周期、物料厚度、微量元素等发酵条件, 并对菌株剂型及助剂配方等进行研究, 以促进拟康宁木霉 T-51 在田间病害生物防治中的规模化应用。

REFERENCES

- [1] SHARMA A, GUPTA B, VERMA S, PAL J, Mukesh, Akanksha, CHAUHAN P. Unveiling the biocontrol potential of *Trichoderma*[J]. European Journal of Plant Pathology, 2023, 167(4): 569-591.
- [2] HARMAN GE, HOWELL CR, VITERBO A, CHET I, LORITO M. *Trichoderma* species: opportunistic, avirulent plant symbionts[J]. Nature Reviews Microbiology, 2004, 2: 43-56.
- [3] RUSH TA, SHRESTHA HK, MEENA MG, SPANGLER MK, ELLIS JC, LABBÉ JL, ABRAHAM PE. Bioprospecting *Trichoderma*: a systematic roadmap to screen genomes and natural products for biocontrol applications[J]. Frontiers in Fungal Biology, 2021, 2: 716511.
- [4] ZIN NA, BADALUDDIN NA. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications[J]. Annals of Agricultural Sciences, 2020, 65(2): 168-178.
- [5] POVEDA J. *Trichoderma* as biocontrol agent against pests: new uses for a mycoparasite[J]. Biological Control, 2021, 159: 104634.
- [6] KUMAR V, KOUL B, TAAK P, YADAV D, SONG M. Journey of *Trichoderma* from pilot scale to mass production: a review[J]. Agriculture, 2023, 13(10): 2022.
- [7] BISSETT J, GAMS W, JAKLITSCH W, SAMUELS GJ. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015[J]. IMA Fungus, 2015, 6(2): 263-295.
- [8] CAI F, DRUZHININA IS. In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*[J]. Fungal Diversity, 2021, 107(1): 1-69.
- [9] RODRIGUES AO, MAY de MIO LL, SOCCOL CR. *Trichoderma* as a powerful fungal disease control agent for a more sustainable and healthy agriculture: recent studies and molecular insights[J]. Planta, 2023, 257(2): 31.
- [10] VERMA M, BRAR SK, TYAGI RD, SURAMPALLI RY, VALÉRO JR. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control[J]. Biochemical Engineering Journal, 2007, 37(1): 1-20.
- [11] 张丽芳, 曹阳, 张兰. 生防木霉菌 T-102 发酵工艺优化及水悬浮剂配方研制[J]. 花生学报, 2023, 52(3): 35-41.
ZHANG LF, CAO Y, ZHANG L. Fermentation process optimization and suspension concentrate preparation of *Trichoderma harzianum* T-102[J]. Journal of Peanut Science, 2023, 52(3): 35-41 (in Chinese).
- [12] 谢小林, 王勇, 陈猛, 周莲, 李成江, 刘玉敏, 朱红惠. 哈茨木霉 BWT1.221 的固态发酵工艺条件优化研究[J]. 中国生物防治学报, 2023, 39(5): 1224-1234.
XIE XL, WANG Y, CHEN M, ZHOU L, LI CJ, LIU YM, ZHU HH. Optimization of solid state fermentation conditions for *Trichoderma harzianum* BWT1.221[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2023, 39(5): 1224-1234 (in Chinese).
- [13] YOU JQ, ZHANG J, WU MD, YANG L, CHEN WD, LI GQ. Multiple criteria-based screening of *Trichoderma* isolates for biological control of *Botrytis cinerea* on tomato[J]. Biological Control, 2016, 101: 31-38.
- [14] 尤佳琪, 杜然, 顾卫红, 李超汉, 李国庆, 宋荣浩. 拟康宁木霉 T-51 菌株生物学特性及其生物防治潜力[J]. 植物保护学报, 2022, 49(3): 946-955.
YOU JQ, DU R, GU WH, LI CH, LI GQ, SONG RH. Biological characteristics and biological control potential of endophytic fungus *Trichoderma koningiopsis* strain T-51[J]. Journal of Plant Protection, 2022, 49(3): 946-955 (in Chinese).
- [15] 尤佳琪, 杨红娟, 朱丽华, 李超汉, 顾卫红, 宋荣浩. 拟康宁木霉 T-51 促进西瓜种子萌发效果[J]. 北方园艺, 2020(18): 25-31.
YOU JQ, YANG HJ, ZHU LH, LI CH, GU WH, SONG RH. Effects of watermelon seed germination promotion by *Trichoderma koningiopsis* T-51[J]. Northern Horticulture, 2020(18): 25-31 (in Chinese).
- [16] 王前程, 张迎迎, 戴陶宇, 尤佳琪, 郭世荣, 朱为民.

- 拟康宁木霉 T-51 菌株对番茄枯萎病的生物防治及其机理研究[J]. 西北植物学报, 2022, 42(6): 974-982.
- WANG QC, ZHANG YY, DAI TY, YOU JQ, GUO SR, ZHU WM. Study on biological control effect and mechanism of *Trichoderma koningiopsis* T-51 on tomato *Fusarium wilt*[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2022, 42(6): 974-982 (in Chinese).
- [17] YOU JQ, LI GQ, LI CH, ZHU LH, YANG HJ, SONG RH, GU WH. Biological control and plant growth promotion by volatile organic compounds of *Trichoderma koningiopsis* T-51[J]. Journal of Fungi, 2022, 8(2): 131.
- [18] 梁昌聪, 刘磊, 张建华, 郭立佳, 王伟伟, 黄俊生. 响应面法优化绿色木霉 H06 产孢发酵培养基[J]. 热带作物学报, 2014, 35(2): 333-338.
- LIANG CC, LIU L, ZHANG JH, GUO LJ, WANG WW, HUANG JS. Optimization of medium components for sporulation quantity by *Trichoderma viride* strain H06 using response surface methodology[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2014, 35(2): 333-338 (in Chinese).
- [19] 刘时轮, 李勇, 傅俊范, 丁万隆, 方焕民. 绿色木霉菌株 Tv04-2 固体发酵条件研究[J]. 华北农学报, 2008, 23(S2): 244-247.
- LIU SL, LI Y, FU JF, DING WL, FANG HM. Study on solid fermentation conditions of *Trichoderma viride* strain Tv04-2[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2008, 23(S2): 244-247 (in Chinese).
- [20] 冯程龙. 哈茨木霉 T-E5 分生孢子固体发酵工艺及其生物有机肥对黄瓜的促生效果研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2017.
- FENG CL. Study on solid-state fermentation of *Trichoderma harzianum* T-E5 conidia and growth promoting effect of its bio-organic fertilizer on cucumber[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [21] NAEIMI S, KHOSRAVI V, VARGA A, VÁGVÖLGYI C, KREDICS L. Screening of organic substrates for solid-state fermentation, viability and bioefficacy of *Trichoderma harzianum* AS12-2, a biocontrol strain against rice sheath blight disease[J]. Agronomy, 2020, 10(9): 1258.
- [22] 张成, 廖文敏, 薛鸣, 陈迪, 侯巨梅, 刘铜. 棘孢木霉 DQ-1 分生孢子固体发酵优化及其对 4 种作物幼苗生长的影响[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(2): 315-322.
- ZHANG C, LIAO WM, XUE M, CHEN D, HOU JM, LIU T. Optimization of solid substrate and conditions of *Trichoderma asperellum* DQ-1 and effect on four crop seedlings growth[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2021, 37(2): 315-322 (in Chinese).
- [23] 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).
- [24] 周文博. 生物质资源: 稻壳的开发利用研究[D]. 南昌: 南昌大学硕士学位论文, 2013.
- ZHOU WB. Study on development and utilization of biomass resources: rice husk[D]. Nanchang: Master's Thesis of Nanchang University, 2013 (in Chinese).
- [25] 王永东, 蒋立科, 岳永德, 花日茂, 江丽. 生防菌株哈茨木霉 H-13 固体发酵条件的研究[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2006, 32(6): 645-650.
- WANG YD, JIANG LK, YUE YD, HUA RM, JIANG L. Studies on the solid fermentation conditions for the biocontrol agents of *Trichoderma harzianum* strain H-13[J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences), 2006, 32(6): 645-650 (in Chinese).
- [26] 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).
- [27] SCHRÜFER K, LYSEK G. Rhythmic growth and sporulation in *Trichoderma* species: differences within a population of isolates[J]. Mycological Research, 1990, 94(1): 124-127.