

基于响应面法的非洲哈茨木霉 AD-G4 菌株固体发酵条件优化

包雨微, 郝宁科, 负新龙, 彭良忠, 刘香萍*

(黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 黑龙江 大庆 163319)

摘要:【目的】为了获得非洲哈茨木霉 AD-G4 固体发酵的最佳条件。【方法】利用单因素试验、BBD(Box-Behnken Design)响应面试验对非洲哈茨木霉 AD-G4 菌株的固体发酵培养基、发酵条件等影响因素进行了优化。【结果】适合此菌株产生的最佳培养基组成为:燕麦粉和小麦秸秆 1:1;最佳培养条件为初始 pH 值 7.0,含水量 52%,孢子浓度 5.40×10^6 个/mL,温度 28℃,培养天数为 8 d。【结论】在优化的培养条件下,非洲哈茨木霉 AD-G4 分生孢子产量达到 1.91×10^{10} 个/g。通过培养条件优化确定了适合非洲哈茨木霉 AD-G4 菌株产生分生孢子的条件,为高效开发非洲哈茨木霉生防菌剂奠定了基础。

关键词:非洲哈茨木霉;固体发酵;分生孢子;发酵条件;响应面;优化

中图分类号:S54;S476 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2024)05-0033-10

DOI:10.13817/j.cnki.cyyep.2024.05.004



木霉(*Trichoderma* spp.)是一种多用途的真菌,在农业和工业上都有重要的作用^[1-2]。谢盼等^[3]研究表明,长枝木霉(*Trichoderma longibrachiatum*)ft-50对苹果树腐烂病菌具有较强的拮抗活性。李树江等^[4]研究表明,哈茨木霉(*T. harzianum*)菌株 M20210527-2处理对辣椒根腐病相对防效高达 94.25%,可显著降低根腐病发病率和严重程度。木霉在牧草上也有很多应用,陈建妙等^[5]研究表明哈茨木霉的定殖可以促进黑麦草的生长发育;谢琳森等^[6]研究表明哈茨木霉可以提高紫羊茅(*Festuca rubra*)和草地早熟禾(*Poa pratensis*)种子的发芽势、发芽率、发芽指数和活力指数;程玲娟等^[7]研究表明深绿木霉对豆科的三叶草、苜蓿、红豆草,禾本科的黑麦草种子的发芽有明显的促

生作用;曾亮等^[8]研究表明,哈茨木霉和康宁木霉(*T. koningii*)对尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、半裸镰刀菌(*F. semitectum*)、燕麦镰刀菌(*F. avenaceum*)和腐皮镰刀菌(*F. solani*)均有抑制作用。因此,对木霉菌株进行研究,从而研发出相关生防制剂对提高牧草产品质量、推动牧草生产向无公害、有机化方向发展具有一定作用。木霉的微繁殖体以分生孢子的形式存在,由于其生命力强,稳定性强,比厚垣孢子和菌丝更受青睐,所以通常利用木霉分生孢子进一步开发形成相关生防制剂^[9-10]。

固体发酵可用作大规模生产真菌生物制剂,因为它可以得到含量较高的分生孢子。固体发酵与液体发酵相比有较多的优点:固体发酵的产出与产物的特性优于液体发酵;固体发酵大多利用有机固体废弃物作为培养基质,发酵成本较低;固体发酵所需设备简单,易于操作,有利于规模化生产^[11-13]。王巧河等^[14]以废菌棒为主要基质,主要成分为食用菌渣中的木材、麸皮和豆粕,通过固态发酵条件优化,有效提高哈茨木霉菌体数,优化后的产量为 5.91×10^9 CFU/g。李军平等^[15]以麦麸、玉米粉、玉米秸秆为基质,通过固体发酵对长枝木霉进行了发酵条件的优化,产孢量达

收稿日期:2023-11-02;修回日期:2024-03-18

基金资助:科技创新 2030—重大项目(2022ZD04012);黑龙江省饲草饲料现代农业产业技术协同创新推广体系

作者简介:包雨微(1998-),女,黑龙江省富裕县人,硕士研究生。E-mail:1091900624@qq.com

*通信作者。E-mail:lxp110@hotmail.com

2.48×10^{10} CFU/g。因此,固体发酵即涉及微生物(通常是真菌)在没有自由流动水的潮湿固体基质上生长的工艺,在生产食品、饲料、制药和农业产品方面具有相当大的经济潜力^[16]。目前,国内外通过固体发酵获得木霉菌分生孢子的研究较多,通常采用当地易获得的发酵培养基或农业产生的废料作为固体发酵基质^[17-18]。

本团队于前期研究中分离获得一株非洲哈茨木霉(*T. afroharzianum*)AD-G4,经试验证明该菌株对紫花苜蓿镰刀菌根腐病原菌尖孢镰刀菌、腐皮镰刀菌、层出镰刀菌(*F. proliferatum*)和轮枝镰刀菌(*F. verticillioide*)均有一定的抑制作用,可进行进一步研究。本研究以廉价的农副产品(泥炭土、水稻秸秆、小麦秸秆、燕麦粉、玉米秸秆、玉米粉)为原料,采用单因素优化非洲哈茨木霉AD-G4固体产孢培养基及培养条件并结合响应面分析法(response surface methodology, RSM)中的BBD(Box-Behnken Design)试验设计^[19]对非洲哈茨木霉AD-G4菌株培养条件进行优化,提高固体发酵产物中分生孢子含量,降低非洲哈茨木霉菌剂生产成本,为非洲哈茨木霉菌剂开发提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试菌株非洲哈茨木霉AD-G4为黑龙江八一农垦大学草业科学实验室于2021年5月筛选、保存并鉴定。

供试基础培养基为马铃薯葡萄糖琼脂培养基(Potato dextrose agar, PDA)。固体发酵所需培养基质为泥炭土、水稻秸秆、小麦秸秆、燕麦粉、玉米秸秆、玉米粉,均购自农贸市场,过40目筛后备用。

1.2 试验方法

1.2.1 不同固体发酵培养基下AD-G4菌株孢子产量测定 将生长7 d的菌株AD-G4用打孔器打成菌饼(直径6 mm)接种于PDA培养基,28℃恒温培养7 d,使用含0.1%的吐温-80无菌水(含0.1%吐温-80)冲洗孢子,制成孢子悬浮液(约 1×10^7 个/mL)备用^[20]。分别称取10 g泥炭土、水稻秸秆、小麦秸秆、燕麦粉、玉米秸秆、玉米粉于250 mL锥形瓶中,分别加入10 mL无菌水搅拌均匀,121℃高温高压灭菌

26 min,冷却后每瓶接种5 mL孢子悬浮液,搅拌均匀,在28℃下恒温培养7 d,测定孢子产量,设3次重复。孢子产量测定方法如下:向每个固体发酵锥形瓶中加入100 mL无菌蒸馏水(含0.1%吐温-80)及5个无菌玻璃珠,28℃振荡30 min,四层灭菌纱布过滤后采用血球计数板法测定^[21]。

1.2.2 燕麦粉、小麦秸秆和玉米秸秆的最优比例筛选 不同发酵培养基配比更有利于分生孢子的产生^[22],因此选择1.2.1中孢子产量较大的不同固体发酵培养基进行了最优比例的配比,比例分别为1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1。通过对不同配比的培养基进行最适孢子产量筛选,将最优配比的培养基用于后续试验。孢子产量测定方法同1.2.1。

1.2.3 不同初始pH条件下菌株AD-G4孢子产量测定 称取最优配比培养基10 g于250 mL锥形瓶中,121℃高温高压灭菌26 min后,以1 mol/L HCl与1 mol/L NaOH调节培养基初始pH值,分别调为2、3、4、5、6、7,再加入 1.0×10^7 个/mL AD-G4孢子悬浮液5 mL,加入蒸馏水5 mL,搅拌均匀,在28℃条件下培养7 d,设3次重复,孢子产量测定方法同1.2.1。

1.2.4 不同初始含水量条件下菌株AD-G4孢子产量测定 称取最优配比培养基10 g于250 mL锥形瓶中,121℃高温高压灭菌26 min,加入无菌水,分别将含水量调为30%、40%、50%、60%、70%和80%,加入 1.0×10^7 个/mL AD-G4孢子悬浮液5 mL,搅拌均匀,其他培养条件相同下培养7 d,设3次重复,孢子产量测定方法同1.2.1。

1.2.5 不同孢子浓度条件下菌株AD-G4孢子产量测定 称取最优配比培养基10 g装入250 mL锥形瓶中,121℃高温高压灭菌26 min,加入5 mL无菌水,分别加入孢子浓度为 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 个/mL的AD-G4孢子悬浮液5 mL,搅拌均匀,其他培养条件相同下培养7 d,设3次重复,产孢量测定方法同1.2.1。

1.2.6 不同温度条件下菌株AD-G4孢子产量测定 称取最优配比培养基10 g装入250 mL锥形瓶中,121℃高温高压灭菌26 min,加入5 mL无菌水,加入AD-G4孢子悬浮液5 mL,搅拌均匀,其他培养条件相同下培养7 d,设3次重复,分别置于21、25、28、31、34℃温度下恒温培养7 d后测孢子产量,测定方法

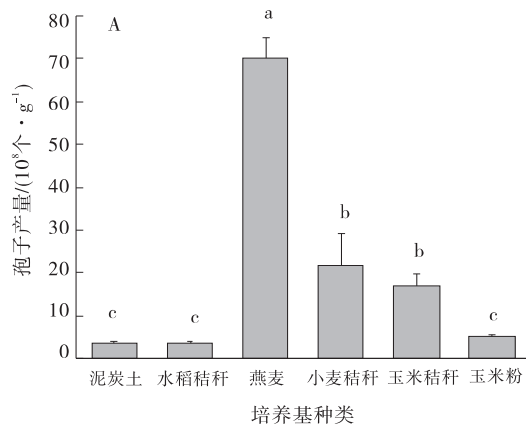
同1.2.1。

1.2.7 不同培养天数条件下菌株AD-G4孢子产量测定 称取最优配比培养基10 g装入250 mL锥形瓶中,121℃高温高压灭菌26 min,加入5 mL无菌水,加入AD-G4孢子悬浮液5 mL,搅拌均匀,其他培养条件相同下培养10 d,设3次重复,分别在3、4、5、6、7、8、9、10 d进行孢子产量测定,测定方法同1.2.1。

1.2.8 BBD实验设计的因素和水平响应面 根据单因素试验结果,选取影响非洲哈茨木霉AD-G4菌株孢子产量3个主要因素作为本试验的自变量,以孢子产量为响应值进行BBD设计。采用Design-Expert 13对试验数据进行方差分析,采用Manual模式进行多项式回归,并建立回归方程。利用 F -检验确定此模型及各参数的显著性。

1.3 数据分析

采用Excel 2010进行数据统计分析,并通过



Origin 2018对数据绘制图表,使用SPSS 26.0软件对数据进行单因素方差分析,并用Duncan's新复极差法检验差异显著性。

2 结果与分析

2.1 不同固体发酵培养基及培养基比例对菌株AD-G4孢子产量的影响

菌株AD-G4在6种供试培养基上均能产孢,其中以燕麦培养基产孢量最大(7.00×10^9 个/g),且显著高于其他选择性培养基($P < 0.05$),其次为小麦秸秆(2.18×10^9 个/g)和玉米秸秆(1.70×10^9 个/g),而在水稻秸秆培养基中产量最少(3.64×10^8 个/g)(图1-A)。将最优单个培养基燕麦粉分别与次优的小麦秸秆和玉米秸秆进行不同比例混合,当燕麦粉与小麦秸秆5:5时即1:1时,孢子产量最大(2.44×10^{10} 个/g),显著高于其他配比($P < 0.05$)(图1-B)。

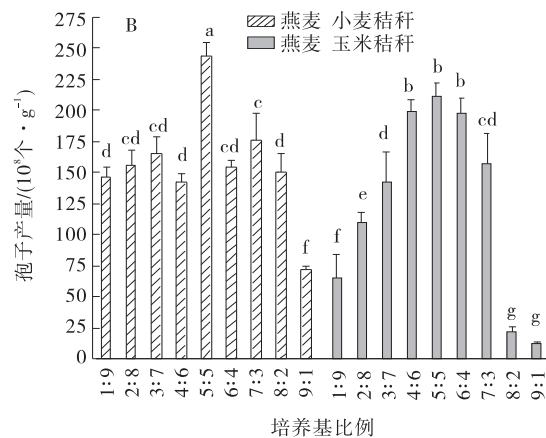


图1 非洲哈茨木霉AD-G4在不同培养基上的孢子产量

Fig. 1 Spore yield of *T. afroharzianum* AD-G4 on different media

注:A:不同成分培养基;B:不同成分比例培养基;不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),下同。

2.2 不同固体发酵条件对AD-G4菌株孢子产量的影响

培养7 d后测定菌株AD-G4在不同初始pH值的培养基中产生孢子的情况,发现初始pH值为7时的产孢量最大,达到 1.80×10^{10} 个/g,显著高于其他pH($P < 0.05$)。初始pH值为2、3、4、5、8、9时孢子产量差异不显著;初始pH值为6时产孢量最小,为 6.80×10^8 个/g,显著低于其他pH值($P < 0.05$)(图2-A)。

培养7 d后,发现初始含水量的不同对最终发酵所得的菌株AD-G4的产量影响较明显,随初始含水量增加孢子产量呈递增趋势,到50%时孢子产量最

高,可达 1.57×10^{10} 个/g,显著高于其他初始含水量($P < 0.05$),随后逐渐降低,于80%时最低,为 2.22×10^9 个/g(图2-B)。

培养7 d后测定菌株AD-G4在孢子浓度不同的培养基中产生孢子的情况,当孢子浓度为 1×10^7 个/mL时孢子产量最大(1.77×10^{10} 个/g),显著高于其他孢子浓度($P < 0.05$)。孢子浓度达到 1×10^6 个/mL及以上时,差异不显著(图2-C)。

培养7 d后,在28℃培养条件下菌株AD-G4孢子产量最大且与其他温度条件下差异显著($P < 0.05$),孢子产量可达 8.47×10^9 个/g。温度过低或过

高均会影响菌株AD-G4的孢子产量,孢子产量在温度达到34℃时最低,为 2.93×10^8 个/g(图2-D)。

培养10 d时孢子产量最大(7.28×10^9 个/g),培养3 d时孢子产量最小(9.17×10^8 个/g)。产孢量随着时间的增加而逐渐增多,培养8 d及以上时对菌株AD-G4孢子产量的影响差异不显著(图2-E),所以根据时间成本及产孢量综合选取8 d为最终培养天数。

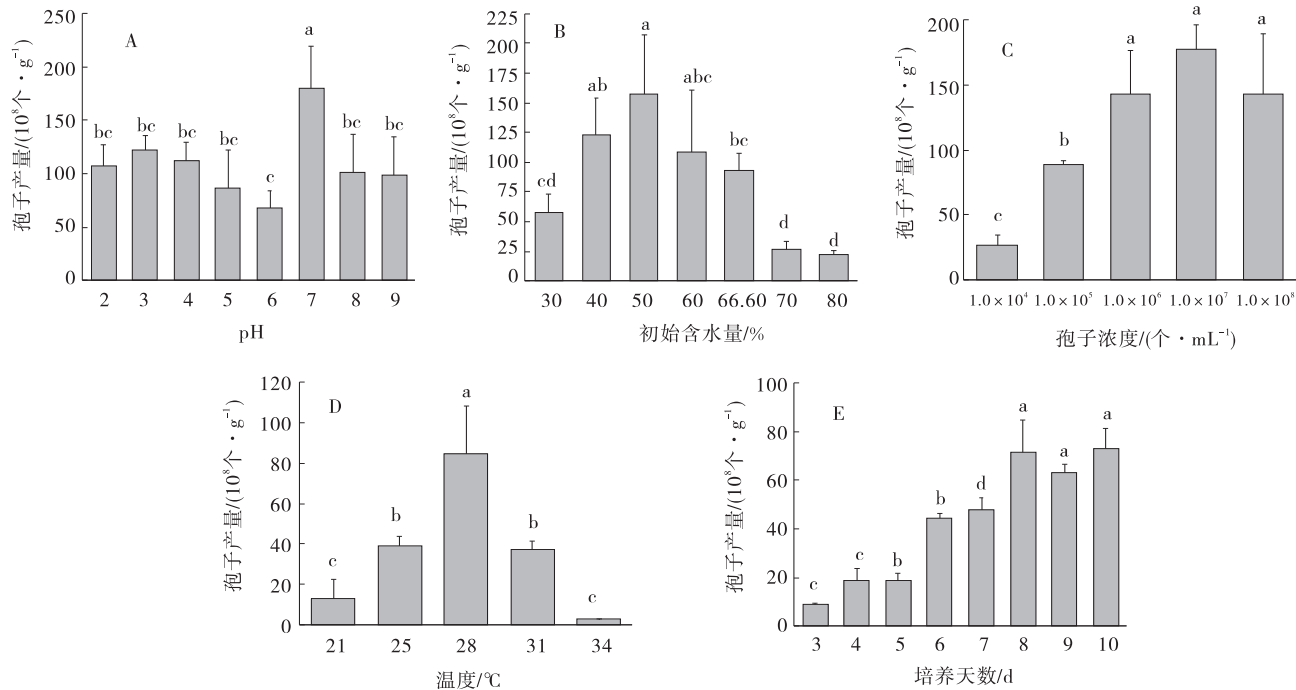


图2 不同固体发酵条件下非洲哈茨木霉AD-G4的孢子产量

Fig. 2 Spore yield of AD-G4 from *T. afroharzianum* under different solid fermentation conditions

注:A 不同初始pH值下AD-G4菌株的孢子产量;B 不同初始含水量下AD-G4菌株的孢子产量;C 不同孢子浓度下AD-G4孢子产量;D 不同温度下AD-G4孢子产量;E 不同培养天数下AD-G4的孢子产量。

2.3 BBD试验结果及分析

单因素试验结果(表1)表明,确定含水量、孢子浓度和温度为影响孢子产量的主要因素。所以,选取含水量、孢子浓度和温度为本试验的自变量,以孢子产量为响应值进行响应BBD(Box-Behnken Design)设计试验因素、水平值及编码值见表2。

表1 非洲哈茨木霉AD-G4在不同固体发酵条件下孢子产量的单因素试验方差分析

Table 1 Single factor test variance analysis of spore yield of *T. afroharzianum* AD-G4 under different solid fermentation conditions

培养条件	平方和	均方和	F值	P值
pH值	2.508×10^{20}	3.135×10^{19}	3.802	0.009
含水量/%	4.631×10^{20}	7.718×10^{19}	8.217	0.001
孢子浓度/(个·mL ⁻¹)	4.174×10^{20}	1.044×10^{19}	14.374	0.000
温度/°C	1.201×10^{20}	3.002×10^{19}	21.809	0.000
培养天数/d	2.099×10^{19}	5.25×10^{18}	9.015	0.002

根据表2进行响应面BBD三因素三水平的试验设计,得到试验共有17组,每组试验结果均为3个平行样品的平均值,不同因素组合发酵孢子产量差异较大,在 $3.15\times 10^9\sim 1.47\times 10^{10}$ 个/g,由此可以看出各发酵因素的优化能显著提高孢子产量(表3)。

多项式回归拟合后得到二次响应面的回归方程如下:孢子产量= $1.44\times 10^{10}+1.25\times 10^9A+1.16\times 10^8B-1.1\times 10^9C+1.8\times 10^8AB+1.45\times 10^8AC-$

表 2 非洲哈茨木霉菌株 AD-G4 孢子产量的 BBD 试验因素水平及编码

Table 2 BBD test factor level and coding of spore yield of *T. afroharzianum* AD-G4

因素	代码	水平		
		-1	0	1
含水量/%	A	40	50	60
孢子浓度/(个·g ⁻¹)	B	1×10 ⁶	5.05×10 ⁶	1×10 ⁷
温度/℃	C	25	28	31

表 3 非洲哈茨木霉菌株 AD-G4 产孢的 BBD 试验设计与结果

Table 3 Design and results of BBD test on spore yield of *T. afroharzianum* AD-G4

组别	因素 1	因素 2	因素 3	结果
	A 含水量/%	B 孢子浓度/(个·mL ⁻¹)	C 温度/℃	孢子产量/(个·g ⁻¹)
1	50	5.05×10 ⁶	28	1.47×10 ¹⁰
2	40	1.00×10 ⁷	28	7.43×10 ⁹
3	50	1.00×10 ⁷	31	6.66×10 ⁹
4	40	5.05×10 ⁶	31	3.15×10 ⁹
5	60	1.00×10 ⁵	28	9.95×10 ⁹
6	50	1.00×10 ⁵	25	8.84×10 ⁹
7	50	5.05×10 ⁶	28	1.42×10 ¹⁰
8	60	1.00×10 ⁷	28	1.04×10 ¹⁰
9	50	1.00×10 ⁷	25	1.01×10 ¹⁰
10	40	1.00×10 ⁵	28	7.70×10 ⁹
11	60	5.05×10 ⁶	31	5.83×10 ⁹
12	40	5.05×10 ⁶	25	5.32×10 ⁹
13	50	1.00×10 ⁵	31	7.17×10 ⁹
14	60	5.05×10 ⁶	25	7.42×10 ⁹
15	50	5.05×10 ⁶	28	1.43×10 ¹⁰
16	50	5.05×10 ⁶	28	1.44×10 ¹⁰
17	50	5.05×10 ⁶	28	1.42×10 ¹⁰

$4.4 \times 10^8 BC - 4.1 \times 10^9 A^2 - 1.4 \times 10^9 B^2 - 4.8 \times 10^9 C^2$ 。

由表 4 得到的方差分析结果可知,该模型 $P < 0.0001$,说明二次回归模型极显著,失拟项 P 值为 $0.2226 > 0.05$,没有显著意义,说明此模型建立能够涵盖所有试验数据,而由试验误差导致的不能拟合情况可以忽略,不必引入更高次项,模型相当。相关系数 $R^2 = 0.9979$,说明方程模型与试验数据有 99.79% 的符合度,调整后 $R^2_{Adj} = 0.9951$,方程模型有很高的可信度,可以应用于非洲哈茨木霉固体发酵产孢的理论预测。含水量和温度的一次项和二次项、孢子浓度的二次项对产孢量的影响均达到极显著水平 ($P < 0.01$)。

2.4 三维响应曲面图和二维等高线分析

响应曲面图,揭示了含水量、孢子浓度和温度 3 种关键因子两两交互作用对菌株 AD-G4 分生孢子产量的影响(图 3—图 5)。由响应面最高点可知,因素所

选范围内存在分生孢子产量最大值,说明各因素选择的试验范围合理有效。等高线的形状可反映出交互作用的强弱,椭圆形表示两因素交互作用显著。

当温度固定在 28℃,含水量在 40.00%~51.51% 时,孢子产量随含水量的增加而增加;含水量在 51.51%~60.00% 范围内时,孢子产量随其含水量的增加而减少,曲面顶点即为孢子产量最大值点;说明最佳的孢子产量出现在含水量在 51.51% 附近,而相对应的孢子浓度在 5.40×10^6 个/mL(图 3)。两因素椭圆形等高线图表明相比孢子浓度的变化,含水量的变化对孢子产量影响更为显著。

当孢子浓度固定在 5.05×10^6 个/mL 时,含水量从 40% 增大到 50%,温度从 25℃ 增加到 28℃ 的过程中,孢子呈现先增大后减小的趋势,明显看到所做试验范围内包括了最大值所在区域。含水量和温度对

表 4 非洲哈茨木霉菌株 AD-G4 孢子产量的的 BBD 试验方差分析 (ANOVA)

Table 4 ANOVA of BBD test on spore yield of *T. afroharzianum* AD-G4

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	2.16×10^{20}	9	2.40×10^{19}	361.95	$<0.000\ 1$	**
A 含水量	1.25×10^{19}	1	1.25×10^{19}	188.32	$<0.000\ 1$	**
B 孢子浓度	1.08×10^{17}	1	1.08×10^{17}	1.63	0.242 6	
C 温度	9.84×10^{18}	1	9.84×10^{18}	148.17	$<0.000\ 1$	**
AB	1.30×10^{17}	1	1.30×10^{17}	1.95	0.205	
AC	8.41×10^{16}	1	8.41×10^{16}	1.27	0.297 4	
BC	7.83×10^{17}	1	7.83×10^{17}	11.8	0.010 9	*
A ²	7.17×10^{19}	1	7.17×10^{19}	1 080.05	$<0.000\ 1$	**
B ²	7.83×10^{18}	1	7.83×10^{18}	117.98	$<0.000\ 1$	**
C ²	9.72×10^{19}	1	9.72×10^{19}	1 463.84	$<0.000\ 1$	**
残差	4.65×10^{17}	7	6.64×10^{16}			
Lack of fit	2.93×10^{17}	3	9.75×10^{16}	2.27	0.222 6	
Pure error	1.72×10^{17}	4	4.30×10^{16}			
Cor total	2.17×10^{20}	16				

注:*表示差异显著($P<0.05$),**表示差异极显著($P<0.01$)。

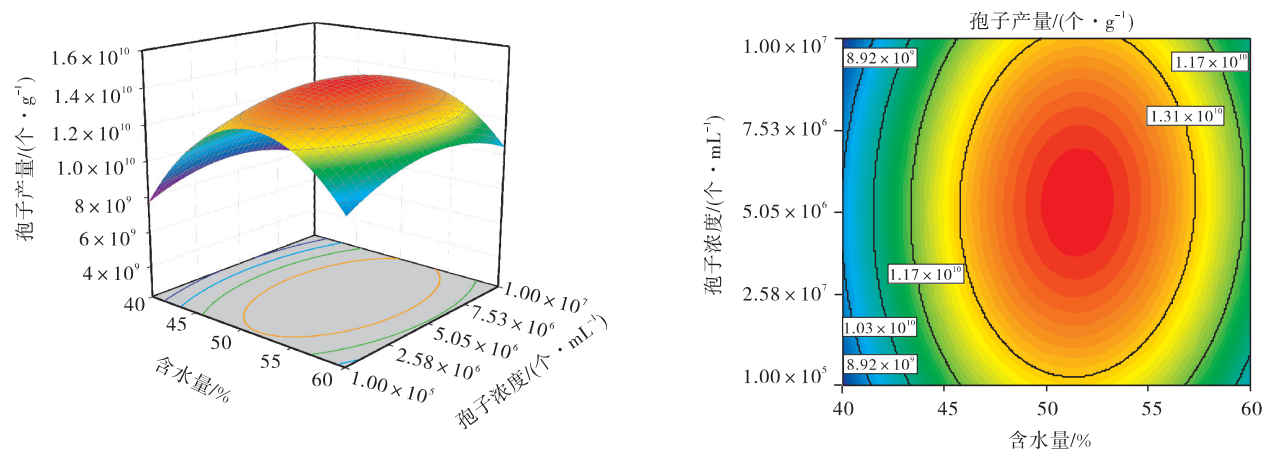


图 3 非洲哈茨木霉菌株 AD-G4 在不同含水量和孢子浓度下孢子产量的响应面及等高线图

Fig. 3 Response surface and contour map of spore yield of *T. afroharzianum* AD-G4 under different water content and spore concentration

孢子产量交互影响效应的等高线为圆形,说明交互作用不明显(图 4)。温度和孢子浓度的交互作用显著,从椭圆的延伸方向可知温度对孢子产量的影响更为显著(图 5)。

2.9 回归方程验证

由模型可得含水量为 51.51%,孢子浓度为 5.40×10^6 个/mL,温度为 27.65℃,预测的最大响应值为 1.45×10^{10} 个/g。为了检验预测值的准确性,进行重复验证试验,同时为方便实际应用,将参数进一步调整为含水量 52%,孢子浓度为 5.40×10^6 个/mL,温度为 28℃,所得实际的孢子产量为 1.44×10^{10} 、

1.50×10^{10} 和 1.86×10^{10} 个/g,平均值为 1.60×10^{10} 个/g,与预测值十分接近,可见该模型具有较高的准确性,可预测实际的产孢量。

3 讨论

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^[23]。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^[24]。由于木霉的分生孢子具有易发酵、易保存、易加工制剂的优点,目前木霉生防制剂大多是利用其固体发酵产生的分生孢子进一步

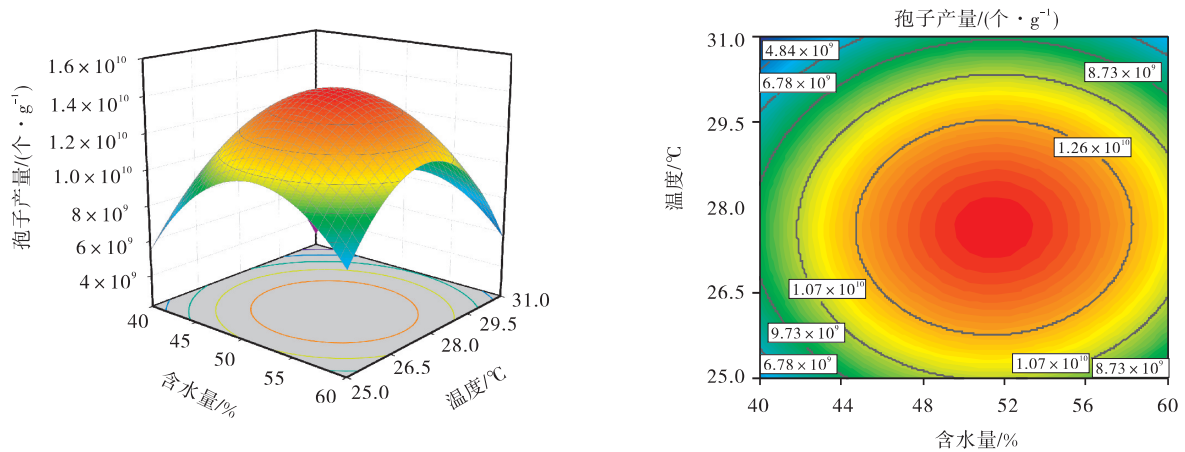


图 4 非洲哈茨木霉菌株 AD-G4 在不同含水量和温度下孢子产量的响应面及等高线图

Fig. 4 Response surface and contour map of spore yield of *T. afroharzianum* strain AD-G4 under different water content and temperature

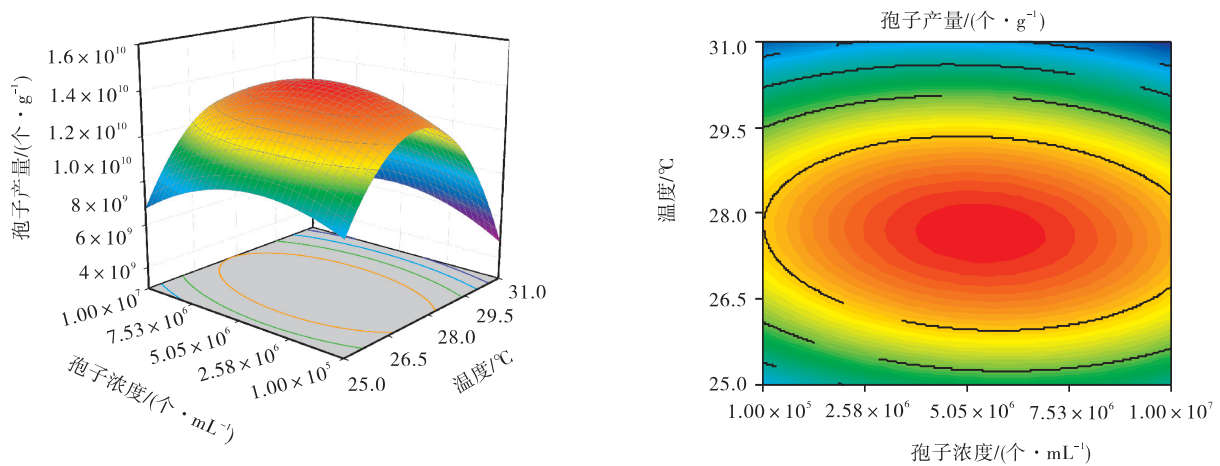


图 5 非洲哈茨木霉菌株 AD-G4 在不同孢子浓度和温度下孢子产量的响应面及等高线图

Fig. 5 Response surface and contour map of spore yield of *T. afroharzianum* AD-G4 at different spore concentrations and temperatures

加工形成^[25-26]。本研究是在单因素试验的基础上,针对培养基成分间的相互作用对非洲哈茨木霉产孢的影响进行详细分析。选用燕麦粉及小麦秸秆为其主要成分,在很多固体发酵产孢的培养基的研究中均包含,如冯程龙^[21]以小麦秸秆为发酵培养基;李锋^[27]以燕麦粉做为液体发酵培养基;邹勇^[28]以燕麦粉培养基培养木霉 T-33 产孢。本研究表明燕麦粉和小麦秸秆配比会显著提高非洲哈茨木霉分生孢子的产生,这可能是因为燕麦粉和小麦秸秆为 AD-G4 提供了不同的营养物质,并且小麦秸秆具有疏松固体培养基、调节通气量的作用。pH 值是影响微生物生长的重要环境因子,大多数真菌的最适生长 pH 值为 3.0~8.0^[29]。本研究通过单因素试验表明,非洲哈茨木霉 AD-G4 菌株发酵的最佳初始 pH 值为 7.0,这与王成

吕等^[30]研究一致。非洲哈茨木霉 AD-G4 菌株发酵的最佳初始含水量为 50%,这与刘世祥等^[31]研究结果相近。温度不仅影响着微生物生长,也影响着固体发酵孢子的产量,张如^[32]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℃。本研究通过单因素试验表明非洲哈茨木霉 AD-G4 菌株发酵的最佳温度为 28℃,这与上述学者研究相近,具有可行性。

本研究是利用响应面对非洲哈茨木霉 AD-G4 的产孢条件进行研究,该方法在发酵中较常被用到,如张铭等^[33]利用响应面法优化森吉木霉 (*T. songyi*) M75 菌株的液体发酵培养条件;郭清华等^[34]采用响应面优化法 (RSM) 与中心组合试验 (CCD) 对粗糙脉孢菌发酵产纤维素酶培养条件进行优化;袁紫仪等^[35]采

用响应面法分析了氮源添加、初始pH值、物料厚度、接种量、温度等因子对3种木霉固体发酵的影响。但目前利用响应面法研究非洲哈茨木霉固体发酵产孢的文献很少,本研究正是以廉价易得的培养基原料进行固体发酵的设计并借助 Design Expert 13 软件进行数据分析,并确定优化条件为燕麦粉和小麦秸秆 1:1; 最佳培养条件为初始pH值为 7.0,含水量为 52%,孢子浓度为 5.40×10^6 个/mL,温度为 28℃,培养天数为 8 d,通过试验验证得到非洲哈茨木霉固体发酵最佳培养基配方,大大提高了孢子产量,降低生产成本。易征璇^[36]研究康氏木霉固体发酵最大产孢量为 9.6×10^9 CFU/g;王英姿等^[37]研究木霉固体发酵产孢量情况为绿色木霉孢子量最高为 9.9×10^{10} 个/g;王永东^[38]研究哈茨木霉 H-13 最高产孢量为 1.0×10^{10} 个/g;由此推断当前木霉菌株发酵产孢量在 $4.00 \times 10^9 \sim 9.9 \times 10^{10}$ 个/g。该研究结果非洲哈茨木霉 AD-G4 菌株最高产孢量可达 1.91×10^{10} 个/g,产孢量处于中间水平还具有一定的上升空间。本研究结果可为大规模发酵提供依据,但在大规模发酵生产时仍需要根据实际情况进行优化。同时,本研究还可为其他木霉以及真菌的固体发酵产分生孢子的优化提供参考。

4 结论

AD-G4 菌株孢子产量受培养条件如培养基的种类、pH、含水量、温度等多种因素的影响。本研究发现非洲哈茨木霉孢子产量的最佳条件为燕麦粉和小麦秸秆 1:1; 最佳培养条件为初始pH值为 7.0,含水量 52%,孢子浓度 5.40×10^6 个/mL,温度 28℃,培养天数 8 d。在此培养条件下,非洲哈茨木霉 AD-G4 分生孢子产量达到 1.91×10^{10} 个/g。

参考文献:

- [1] Hu J, Chen K, Li J, *et al.* Large-scale *Trichoderma* diversity was associated with ecosystem, climate and geographic location [J]. *Environmental Microbiology*, 2020, 22 (3): 1011–1024.
- [2] Lorito M, Woo S L. *Trichoderma*: a multi-purpose tool for integrated pest management [M]//Principles of plant-microbe interactions: microbes for sustainable agriculture. Cham: Springer International Publishing, 2014: 345–353.
- [3] 谢盼, 张荣斌, 王利慧, 等. 苹果树腐烂病生防木霉菌的筛选及鉴定 [J]. *现代园艺*, 2023, 46 (21): 36–39.
- [4] 李树江, 张韵霞, 刘羽, 等. 辣椒根腐病生防菌的筛选鉴定及生防作用 [J]. *中国蔬菜*, 2023, 1 (9): 69–76.
- [5] 陈建妙, 曹英建, 瞿金旺, 等. 哈茨木霉对黑麦草气体交换和生长发育的影响 [J]. *北方园艺*, 2023, 1 (4): 53–59.
- [6] 谢琳森, 常春丽, 姚志红, 等. 哈茨木霉对紫羊茅和草地早熟禾的促生及抗性诱导作用 [J]. *草业科学*, 2018, 35 (9): 2079–2086.
- [7] 程玲娟, 徐秉良, 梁巧兰. 深绿木霉对几种牧草草种发芽率的影响 [J]. *草原与草坪*, 2008, 38 (6): 28–31.
- [8] 曾亮, 柴继宽, 赵桂琴, 等. 苜蓿根腐病生防真菌筛选鉴定及其防治效果研究 [J]. *草地学报*, 2019, 27 (4): 825–831.
- [9] Hyder S, Inam-ul-Haq M, Bibi S, *et al.* Novel potential of *Trichoderma* spp. as biocontrol agent [J]. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 2017, 5 (4): 214–222.
- [10] Amsellem Z, Zidack N K, Quimby Jr P C, *et al.* Long-term dry preservation of viable mycelia of two mycoherbicide organisms [J]. *Crop protection*, 1999, 18 (10): 643–649.
- [11] Hölker U, Lenz J. Solid-state fermentation—are there any biotechnological advantages? [J]. *Current opinion in microbiology*, 2005, 8 (3): 301–306.
- [12] Ali H K Q, Zulkali M M D. Utilization of agro-residual ligno-cellulosic substances by using solid state fermentation: a review [J]. *Hrvatski časopis za prehranbenutehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 2011, 6 (1–2): 5–12.
- [13] Raghavarao K, Ranganathan T V, Karanth N G. Some engineering aspects of solid-state fermentation [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2003, 13 (2–3): 127–135.
- [14] 王巧河, 朱莉, 郑志永等. 固态发酵废菌棒高产哈茨木霉孢子 [J]. *食品与生物技术学报*, 2019, 38 (6): 17–24.
- [15] 李军平, 卢智琴, 罗宁, 等. 燕麦孢囊线虫生防真菌 TL16 发酵条件优化 [J]. *草原与草坪*, 2022, 42 (5): 126–131+141.
- [16] Pandey A, Soccol C R, Mitchell D. New developments in solid state fermentation: I—bioprocesses and products [J]. *Process biochemistry*, 2000, 35 (10): 1153–1169.
- [17] Sargin S, Gezgin Y, Eltem R, *et al.* Micropropagule production from *Trichoderma harzianum* EGE-K38 using

- solid-state fermentation and a comparative study for drying methods[J]. Turkish Journal of Biology, 2013, 37(2):139-146.
- [18] 谭显东,王君君,王浪,等. 三七渣固态发酵生产绿色木霉的工艺条件研究[J]. 环境污染与防治, 2014, 36(9): 18-21.
- [19] Ferreira S L C, Bruns R E, Ferreira H S, *et al.* Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods[J]. Analytica chimica acta, 2007, 597(2):179-186.
- [20] 张晶晶,黄亚丽,马宏,等. 木霉 Tr-92 菌株厚垣孢子发酵条件的优化[J]. 植物保护, 2015, 41(3):25-29.
- [21] 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, 2017.
- [22] 杨丹丹,杨传伦,张心青,等. 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.
- [23] 李松鹏,崔琳琳,程家森,等. 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.
- [24] 扈进冬,杨在东,吴远征,等. 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.
- [25] Arellano A D V, Da Silva G M, Guatimosim E, *et al.* Seeds coated with *Trichoderma atroviride* and soil amended with silicon improve the resistance of *Lolium multiflorum* against *Pyricularia oryzae*[J]. Biological Control: Theory and Application in Pest Management, 2021, 154(3):104499.
- [26] Luisa Coelho, Mário Reis, Guerrero C, *et al.* Biological control of turfgrass diseases with organic composts enriched with *Trichoderma atroviride* [J]. Biological Control, 2021, 159(7):104620.
- [27] 李锋. 木霉厚垣孢子的液体发酵及其可湿性粉剂研制[D]. 成都:四川农业大学, 2010.
- [28] 邹勇. 木霉厚垣孢子的产生、萌发和保存条件研究[D]. 成都:四川农业大学, 2006.
- [29] 韩桂云,齐玉臣,刘忱,等. 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.
- [30] 王成吕,杨鲁栋,王天鹏,等. 混合基质上长枝木霉 GF-10 固体发酵条件的优化[J]. 山地农业生物学报, 2018, 37(6):80-86.
- [31] 刘世祥,张荣胜,刘永峰,等. 深绿木霉 TA-9 分生孢子固体发酵的响应曲面法优化[J]. 农药学学报, 2022, 24(1):96-104.
- [32] 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, 2016.
- [33] 张铭,宁少华,高茜等. 响应面法优化森吉木霉 M75 菌株发酵培养条件[J]. 林业科学研究, 2022, 35(5): 196-205.
- [34] 郭清华,熊本涛,陈少林. 粗糙脉孢菌产纤维素酶培养条件的优化[J]. 西北林学院学报, 2018, 33(2):151-155.
- [35] 袁紫仪,商美妮,王琰等. 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.
- [36] 易征璇,王征,谭著名. 康氏木霉固体发酵产孢子粉工艺研究[J]. 现代农业科技, 2013, 1(8):194-196.
- [37] 王英姿,祁之秋,魏松红,等. 绿色木霉菌固体发酵培养基优化组合正交筛选[J]. 植物保护, 2007, 1(2): 61-63.
- [38] 王永东,蒋立科,岳永德等. 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, 1(6):6645-650.

Optimization of solid-state fermentation conditions of *Trichoderma afroharzianum* AD-G4 strain using response surface method

BAO Yu-wei, HAO Ning-ke, YUN Xin-long, PENG Liang-zhong, LIU Xiang-ping*
(College of Animal Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract:【Objective】To determine the optimal formula for solid-state fermentation of *Trichoderma afroharzianum* AD-G4. 【Method】This study employed single factor test and Box-Behnken Design (BBD) response surface methodology to optimize the solid fermentation medium and conditions for the *T. afroharzianum* AD-G4 strain. 【Result】The findings indicated that the optimal medium composition consisted of a 1:1 ratio of oat flour to wheat straw. The ideal culture conditions were determined to be an initial pH of 7.0, water content of 52%, spore concentration of 5.40×10^6 spores/mL, a temperature of 28 °C, and a culture duration of 8 days. 【Conclusion】Under these culture conditions, conidia yield of *T. afroharzianum* AD-G4 reached 1.91×10^{10} spores/g. The optimized culture conditions provide a foundation for the development of efficient *T. afroharzianum* biocontrol agent.

Key words: *Trichoderma afroharzianum*; solid-state fermentation; conidia; fermentation conditions; response surface; optimization

(责任编辑: 靳奇峰)