

台莲梅,高俊峰,张亚玲,等.拮抗长枝木霉 T115D 菌株发酵条件[J].江苏农业科学,2013,41(10):333-334.

拮抗长枝木霉 T115D 菌株发酵条件

台莲梅¹,高俊峰²,张亚玲¹,靳学慧¹

(1.黑龙江八一农垦大学农学院,黑龙江大庆 163319; 2.中化作物保护品有限公司,黑龙江哈尔滨 150000)

摘要:对拮抗长枝木霉(*T. longibrachiatum*) T115D 菌株发酵条件进行研究。结果表明,以 PD 作为培养液,适宜木霉菌 T115D 产生孢子的 pH 值是 7.0~8.0,温度是 30℃,转速为 200~250 r/min;适宜菌丝生长的 pH 值是 4.0~6.0,温度是 25~30℃,转速为 150~250 r/min。适宜木霉菌 T115D 发酵的碳源是甘露糖,氮源是酒石酸铵。

关键词:长枝木霉;T115D 菌株;发酵

中图分类号: TQ929 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0333-02

木霉菌(*Trichoderma* spp.)分布广泛,对多种植物病原真菌有拮抗作用,具有适应性强、抗菌谱广等优点,还能促进植物生长,在防治土传病害中起着重要作用^[1-2]。庄敬华等研究表明,可以通过控制培养条件来生产不同类型的孢子^[3]。马铃薯葡萄糖培养液与蔗糖培养液可作为生产厚垣孢子的培养基。木霉的孢子类型和产孢速度受温度影响,在适于木霉生长的温度范围内,28℃以上形成分生孢子,30℃时产孢量最大,初始 pH 值低易产生厚垣孢子,pH 值高易产生分生孢子。不同木霉菌发酵条件有一定差异。钩状木霉 Th12 菌株在以葡萄糖为碳源、蛋白胨为氮源、发酵温度为 25℃、初始 pH 值为 6、装瓶量为 50 mL、摇床转速为 180 r/min 的培养液中培养 3 d,最有利于菌丝体生长^[4]。优化后的拟康氏木霉发酵培养基初始 pH 值为 6.0~7.0,发酵温度为 28℃^[5]。笔者对土壤中分离和筛选得到的优势拮抗长枝木霉(*T. longibrachiatum*) T115D 菌株的液体发酵条件进行了研究,旨在为开发利用木霉菌提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

长枝木霉菌(*T. longibrachiatum*) T115D 菌株。

1.2 供试培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA);马铃薯葡萄糖培养液(PD);GPF 培养液(葡萄糖 25 g、酒石酸铵 2.0 g、KH₂PO₄ 1.0 g、MgSO₄·7H₂O 1.0 g、FeSO₄·7H₂O 0.01 g)。

1.3 培养方法

将木霉菌 T115D 在 PDA 平板培养基上培养 3 d,打 5 块直径为 5 mm 的菌碟,接种在 100 mL 培养液中,测定孢子数和菌丝干重。

1.4 不同碳源对木霉菌 T115D 生长的影响

选择 GPF 为基础培养液,分别用蔗糖、棉籽糖、甘露糖、

木糖、果糖、麦芽糖、乳糖、山梨糖、半乳糖等 9 种碳源配制成不同碳源的培养液。

1.5 不同氮源对木霉菌 T115D 生长的影响

选择 GPF 为基础培养液,分别用蛋白胨、酵母膏、半胱氨酸、硫酸铵、天冬酸、丙氨酸、硝酸钾、氯化铵、谷氨酸、硝酸铵等 10 种氮源配制成不同氮源的培养液。

1.6 不同 pH 值对木霉菌 T115D 生长的影响

用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 调节 PD 培养液的 pH 值,将 pH 值设为 7 个梯度。

1.7 不同温度对木霉菌 T115D 生长的影响

将温度设为 20、25、30、35℃ 4 个处理,用 PD 培养液培养木霉菌 T115D。

1.8 不同摇床转速对木霉菌 T115D 生长的影响

将摇床转速设为 0(静止)、150、200、250 r/min 4 个处理,用 PD 培养液培养木霉菌 T115D。

1.9 测定方法

用移液器吸取少许上述 T115D 发酵液,滴入血球计数板中,显微镜下计数孢子数并测定菌丝干重。用滤纸过滤发酵液,将得到的菌丝放入烘箱中,80℃烘干至恒重,称量菌丝干重。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对木霉菌 T115D 生长的影响

以 GPF 为基础培养液,测定不同碳源对木霉菌 T115D 生长的影响,结果见表 1。以山梨糖为碳源的发酵液,木霉菌产孢数量最多;其次为蔗糖、棉籽糖、葡萄糖;半乳糖、乳糖、果糖、麦芽糖、甘露糖、木糖产孢量较低,不利于产生孢子。在甘露糖为碳源的培养液中 T115D 菌丝干重最重,与其他碳源相比差异显著;其次为葡萄糖和果糖;以半乳糖、木糖、麦芽糖、乳糖、棉籽糖、蔗糖为碳源的培养液获得的菌丝干重较轻。以山梨糖为碳源有利于 T115D 产孢,但不利于菌丝生长,以甘露糖为碳源既有利于菌丝生长,也有利于产孢。综合考虑菌丝生长和孢子产生情况,甘露糖是 T115D 的最佳碳源。

2.2 不同氮源对木霉菌 T115D 生长的影响

以 GPF 为基础培养液,测定不同氮源对 T115D 生长的影响,结果见表 2。以硝酸钾、硫酸铵、酒石酸铵为氮源的发酵液木霉菌 T115D 产孢量较高,孢子量分别达 10.0×10^5 、

收稿日期:2013-05-15

基金项目:黑龙江省农垦总局“十一五”科技攻关课题(编号:HNKXIV-02-04c)。

作者简介:台莲梅(1967—),女,山东诸城人,博士,教授,从事生物防治及植物病原真菌学研究。Tel:(0459)6819182;E-mail:tailianmei@sina.com。

表 1 不同碳源对木霉菌 T115D 生长的影响

碳源	孢子量(×10 ⁵ CFU/mL)	菌丝干重(mg)
山梨糖	33.0a	144.5fg
蔗糖	16.0ab	209.4ef
棉籽糖	12.0ab	211.0ef
葡萄糖	11.0ab	583.6b
半乳糖	7.8b	437.2cd
乳糖	6.3b	297.7de
果糖	3.4b	547.3bc
麦芽糖	3.1b	313.2de
甘露糖	9.3b	812.0a
木糖	6.7b	361.5de

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著。下表同。
8.5 ×10⁵、8.2 ×10⁵ CFU/mL。T115D 在以酵母膏为氮源的培养液中菌丝干重最重,为 587.3 mg,与其他氮源相比差异显著;其次是酒石酸铵,菌丝干重为 492.0 mg;以硝酸钾、半胱氨酸为氮源的菌丝干重较轻。硝酸钾有利于产孢,但不利于菌丝生长,酵母膏有利于菌丝生长,但不利于产孢。综合考虑孢子产生和菌丝生长情况,酒石酸铵是 T115D 的最佳氮源。

表 2 不同氮源对木霉菌 T115D 生长的影响

氮源	孢子量(×10 ⁵ CFU/mL)	菌丝干重(mg)
硝酸钾	10.0a	176.7g
硫酸铵	8.5ab	304.2ef
酒石酸铵	8.2ab	492.0b
半胱氨酸	7.0bc	173.2g
蛋白胨	5.8cd	356.4de
硝酸铵	5.0cd	278.1f
天冬酸	4.3de	402.0cd
氯化铵	3.8de	307.1ef
谷氨酸	2.5ef	416.9c
酵母膏	0.6fg	587.3a
丙氨酸	0.2g	292.7f

2.3 不同 pH 值对木霉菌 T115D 生长的影响

由表 3 可以看出,在 PD 培养液中,当 pH 值为 7.0、8.0 时产孢量较大,二者之间差异不显著;当 pH 值为 4.0 时,菌丝干重最重,为 781.0 mg,与其他处理相比差异显著;当 pH 值为 5.0、6.0 时,菌丝干重分别为 668.3、666.0 mg。中性偏碱性条件有利于木霉菌 T115D 产生孢子,酸性条件或碱性过高均不利于产生孢子;酸性条件有利于菌丝生长,碱性条件不利于菌丝生长。

表 3 不同 pH 值对木霉菌 T115D 生长的影响

pH	孢子量 值(×10 ⁵ CFU/mL)	菌丝干重 (mg)	pH	孢子量 值(×10 ⁵ CFU/mL)	菌丝干重 (mg)
8	63.00a	474.2c	10	11.00cd	438.5c
7	61.00a	494.6c	5	5.80cd	668.3b
9	33.00b	470.6c	4	0.33d	781.0a
6	14.00c	666.0b			

2.4 不同温度对木霉菌 T115D 生长的影响

由表 4 可以看出,在 PD 培养液中,30 ℃时 T115D 产孢量最大,为 1.0 ×10⁷ CFU/mL,与其他处理差异显著;35 ℃产孢量最低,为 4.6 ×10⁵ CFU/mL。25 ℃时,菌丝干重最重,为 792.0 mg,与其他处理差异显著;其次是 30 ℃,菌丝干重为

表 4 不同温度对木霉菌 T115D 生长的影响

温度(℃)	孢子量(×10 ⁵ CFU/mL)	菌丝干重(mg)
30	100.0a	723.3b
25	42.0b	792.0a
20	19.0b	635.6c
35	4.6b	655.5c

723.3 mg。
2.5 不同摇床转速对木霉菌 T115D 生长的影响

由表 5 可以看出,当摇床转速为 200 r/min 时,木霉菌 T115D 产孢量最大,为 2.4 ×10⁷ CFU/mL,与其他处理差异显著,其次为 250 r/min。当摇床转速为 150 r/min 时,木霉菌 T115D 菌丝干重最重,为 791.8 mg。

表 5 不同摇床转速对木霉菌 T115D 生长的影响

转数(r/min)	孢子量(×10 ⁵ CFU/mL)	菌丝干重(mg)
200	240.00a	695.3b
250	23.00b	678.9b
150	13.00b	791.8a
0	0.21c	487.7c

3 结论与讨论

王淑军等研究表明,适宜的非蛋白氮如尿素或铵盐,可有效促进木霉菌体的生长^[6]。本研究表明,以 GPF 为基础培养基,最佳碳源为甘露糖,有利于木霉菌 T115D 菌丝的生长和孢子的产生;以硝酸钾、硫酸铵、酒石酸铵为氮源,木霉菌 T115D 产孢数量较多,以酵母膏为氮源菌丝干重最重。温度、pH 值、通气状况等都是影响木霉生长、产孢的重要因素。王晖等认为,最适合钩状木霉 Th12 菌丝生长的 pH 值为 6,温度为 25 ℃,摇床转速为 180 r/min^[4]。本试验表明,经不同的培养液培养时,适合木霉菌 T115D 菌丝生长、产孢的 pH 值不同,酸性条件适合菌丝生长,碱性条件适合产孢。木霉菌 T115D 菌丝生长和产孢的适宜温度是 25 ~ 30 ℃。通常认为木霉是好氧菌,通气量越多越利于菌丝生长。本试验表明,通气量对长枝木霉菌生长影响较大。本试验结果与前人的研究结论不完全一致,这可能是由于不同木霉菌株的适宜发酵条件不同所致。

参考文献:

[1]徐 同,钟静萍,李德葆. 木霉对土传病原真菌的拮抗作用[J]. 植物病理学报,1993,23(1):65-69.
[2]于文喜,吴 昊,郭玉人,等. 木霉对苗木土传病原真菌的拮抗作用[J]. 林业科技,1997,22(6):31-33.
[3]庄敬华,高增贵,刘 限,等. 不同发酵条件对木霉产孢类型的影响[J]. 中国生物防治,2005,21(1):37-40.
[4]王 晖,孙晓东,吕国忠. 钩状木霉 Th12 菌株液体发酵条件的研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(13):7568-7571.
[5]郝林华,牛德庆,陈靠山,等. 拟康氏木霉液态发酵条件的研究[J]. 菌物学报,2005,24(2):235-244.
[6]王淑军,杨从发,陈 静,等. 非蛋白氮对单细胞蛋白生产菌株生长影响的研究[J]. 淮海工学院学报:自然科学版,2002,11(1):48-51.