

钟丽娟,赵新海.一株用于菌糠发酵的木霉菌株的筛选及其培养工艺[J].江苏农业科学,2021,49(3):209-213.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.03.037

一株用于菌糠发酵的木霉菌株的筛选及其培养工艺

钟丽娟,赵新海

(辽宁省微生物科学研究院,辽宁朝阳 122000)

摘要:以污染香菇菌棒和黑木耳菌棒的木霉为来源,筛选到一株适用于菌糠发酵的木霉菌株 X-05,对峙培养试验结果表明,菌株 X-05 对番茄灰霉病菌和黄瓜枯萎病菌均具有较好的抑菌效果。以废弃香菇菌糠、黑木耳菌糠作为培养基质,测定外源氮源、水分及 pH 值对木霉菌丝生长及产孢的影响,结果表明,香菇菌糠、黑木耳菌糠均适合木霉生长,在尿素添加量为 3%、料液比为 1 g : 2.5 mL、初始 pH 值为 4.5 ~ 5.0 的条件下,于 30 ℃ 培养 7 d 后香菇菌糠、黑木耳菌糠的产孢量可达 $3.67 \times 10^9 \sim 7.00 \times 10^9$ CFU/g。

关键词:香菇;黑木耳;菌糠;绿木霉;pH 值

中图分类号:S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-15182302(2021)03-0209-05

菌糠是指食用菌菌棒采收后废弃的固体培养料,其成分主要为尚未被完全利用的纤维素、木质素、粗脂肪和食用菌菌丝体等。目前,食用菌产业已经成为我国第六大种植产业,产量已超过 3 000 万 t,同时产生了大量废弃菌糠。近年来,研究人员针对菌糠的综合利用开展了大量研究,主要集中在将其用作畜禽饲料、有机肥料、蔬菜基质、生物颗粒、食用菌培养料等方面^[1-3],积极推动了食用菌产业链条的延长。此外,生物防治土传病害的潜力和效果越来越得到重视,其中利用木霉菌防治作物各

类病害的效果及其作用机制已有大量相关报道,美国、以色列、中国、印度、瑞典等多个国家已经实现木霉制剂的商品化应用^[4-6]。但在实际生产中,生物防治常存在使用成本高、见效慢、产品货架期短等问题,其中见效慢是由生物防治与化学防治的作用机制不同造成的,而使用成本高、产品货架期短归根结底其实是由生防菌剂生产成本高、菌株抗逆性和定植能力差等导致的^[7-8]。开展利用废弃菌糠培养木霉的研究,一方面可以解决木霉等生防菌定植难的问题,另一方面可有效资源化利用废弃菌糠,对于推广植物病害的生物防治和农业废弃物的资源化循环利用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

木霉菌株来源于喀左县尤杖子乡香菇种植基地的香菇染菌棒和喀左县大营子乡黑木耳种植基地的黑木耳染菌棒。

收稿日期:2020-04-28

基金项目:辽宁省农村科技特派创新示范工程项目(编号:2020JH5010100004);辽宁省农科院乡村振兴科技引领支撑行动项目。

作者简介:钟丽娟(1981—),女,内蒙古乌兰浩特人,硕士,副研究员,从事农业微生物菌种选育与应用工作。E-mail:zlj1217@sina.com。
通信作者:赵新海,研究员,研究方向为微生物资源化利用。Tel:(0421)2976855;E-mail:254531540@qq.com。

[12] Yuan J H, Xu R K, Qian W, et al. Comparison of the ameliorating effects on an acidic ultisol between four crop straws and their biochars [J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2011, 11(5): 741-750.

[13] 王宁,李九玉,徐仁扣.三种植物物料对2种茶园土壤酸度的改良效果[J].*土壤*, 2009, 41(5): 764-771.

[14] 鲁如坤.土壤农业化学分析方法[M].北京:中国农业科技出版社, 2000.

[15] Slattery W J, Ridley A M, Windsor S M. Ash alkalinity of animal and plant products [J]. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 1991, 31(3): 321-324.

[16] Yan F, Schuber T S, Mengel K. Soil pH changes during legume growth and application of plant material [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1996, 23(3): 236-242.

[17] 鲁彩艳,陈欣.有机碳源添加对不同C/N比有机物料氮矿化进程的影响[J].*中国科学院研究生院学报*, 2004, 21(1): 108-112.

[18] Ortiz E M, Hue N V. Temporal changes of selected chemical properties in three manure-amended soils of Hawaii [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(18): 8649-8654.

[19] 马宗国,卢绪奎,万丽,等.小麦秸秆还田对水稻生长及土壤肥力的影响[J].*作物杂志*, 2003(5): 37-38.

番茄灰霉病病菌 (*Botrytis cinerea*)、黄瓜枯萎病病菌 (*Fusarium oxysporum*) 由沈阳农业大学植物保护学院吴元华教授馈赠。

1.2 培养基

综合马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基配方: 200.0 g 马铃薯 (去皮), 20.0 g 葡萄糖, 1.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.0 g KH_2PO_4 , 18.0 g 琼脂, 1 000 mL 蒸馏水, pH 值为 6.0。菌糠培养基配方: 取粉碎后过 60 目筛的香菇菌糠细粉 100.0 g, 加入 1 000 mL 蒸馏水煮沸 15 min, 再加入琼脂 20.0 g 至完全溶化, 定容至 1 000 mL 后, 分装到 500 mL 三角瓶中。马丁氏培养基配方: 5.0 g 蛋白胨, 10.0 g 葡萄糖, 1.0 g KH_2PO_4 , 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20.0 g 琼脂, 1 000 mL 蒸馏水, pH 值自然。每 1 000 mL 培养基中加 3.3 mL 1% 孟加拉红水溶液。临用时在每 100 mL 培养基中加 0.3 mL 1% 链霉素溶液。上述培养基于 121 °C 灭菌 30 min, 冷却后备用。

1.3 原料来源

黑木耳菌糠取自辽宁省朝阳市喀左县大营子乡大营子村黑木耳种植基地, 培养基配方如下: 78% 木屑、19% 麸皮、1% 石灰、1% 石膏, 出耳 5 潮后, 自然风干、粉碎并混合均匀备用, 经测定, pH 值为 5.69。香菇菌糠取自辽宁省朝阳市喀左县尤杖子乡后钢沟村香菇种植基地, 培养基配方如下: 78% 木屑、19% 麸皮、1% 石灰、1% 石膏, 出菇 5 潮后, 自然风干、粉碎并混合均匀备用, 经测定, pH 值为 4.83。

1.4 菌株分离

在无菌条件下用剪刀将染菌棒剪开, 用接种针挑取木霉产孢浓密部位的培养料, 接种至事先倒好的综合 PDA 培养基上, 每个样品设 5 次重复。将接种后的培养皿于 28 °C 培养, 定期观察菌落形态并进行镜检, 挑取目的菌落边缘的菌丝, 接种至综合 PDA 平皿中央进行纯化, 根据菌落来源进行编号, 纯化 2~3 次后, 分别将菌种转接至斜面综合 PDA 培养基上, 于 28 °C 培养至斜面长满菌丝后, 于 4 °C 冰箱保存。

1.5 菌株筛选

1.5.1 菌株的初筛 挑取冰箱中保藏的、大小约为 0.5 cm × 0.5 cm 的各菌株组织块, 接种至综合 PDA 平板培养基中央, 于 28 °C 恒温培养 48 h 后, 分别用 6.0 mm 打孔器打取菌落边缘菌丝, 将菌苔分别接种至事先倒好的含有菌糠培养基的平皿中央, 于 28 °C 恒温培养, 定期观察菌落的生长情况。培养 72 h

后, 用游标卡尺采用十字交叉法测定木霉菌落的直径, 挑选出 3 株在菌糠培养基上生长良好的木霉菌株并标记清楚, 培养 120 h 后分别用 20 mL 无菌水洗涤平板上的木霉孢子, 制成孢子悬浮液, 适当稀释后采用计数器计数法测定孢子数量^[9]。

1.5.2 菌株复筛 分别将初筛得到的 3 株木霉、番茄灰霉病病菌和黄瓜枯萎病病菌接种至事先倒好的综合 PDA 平皿中央, 于 28 °C 培养 72 h (黄瓜枯萎病病菌需培养 120 h) 后, 用 6.0 mm 打孔器沿菌落边缘打取菌落, 将木霉接种至综合 PDA 平皿中央, 番茄灰霉病病菌或黄瓜枯萎病病菌按等边三角形接种 3 点, 通过对峙培养进行抑菌效果的测定。待木霉菌丝与病原菌菌丝接触后, 用游标卡尺测定木霉和病原菌的菌落半径。通过初筛、复筛, 确定 1 株木霉作为菌糠发酵用木霉菌株。

1.6 菌株鉴定

将复筛获得的木霉接种至综合 PDA 培养基上, 用于观察菌落形态。另取平板, 距离接种点约 2 cm, 用灭菌镊子各斜插入 4 片灭菌盖玻片, 用于观察菌丝、孢子等显微形态。将平板于 28 °C 培养, 定期观察菌落生长情况, 及时进行分生孢子梗、分生孢子及菌丝的显微观察。

真菌的形态学鉴定参照魏景超的《真菌鉴定手册》^[10] 和 Gams、Bissett 的分类系统检索表^[11]。

1.7 菌株生物学特性测定方法

1.7.1 温度试验 设置 15、20、25、30、35、40 °C 等 6 个温度处理, 培养基为综合 PDA。

1.7.2 pH 值试验 用 1 mol/L HCl、1 mol/L NaOH 分别将综合 PDA 培养基的 pH 值调至 3、4、5、6、7、8, 制成不同 pH 值的培养基。将 4 °C 冰箱保藏的菌株转接至综合 PDA 平板上, 培养 48 h 备用。用直径为 6 mm 的打孔器将准备好的菌落平板制备成菌苔。将各培养基制备成平板并做好标记, 用移植针将菌苔转接至平板中央, 在进行温度试验时, 分别将各处理放入 15、20、25、30、35、40 °C 培养箱中, 在进行其他处理时, 将平板置于 30 °C 恒温培养箱中进行倒置培养。定期观察并使用游标卡尺测量, 采用十字交叉法测定菌落的直径。

1.8 菌株产孢培养工艺的研究

在菌株生物学特性研究的基础上, 以香菇菌糠、黑木耳菌糠为主要培养基质, 以木霉分生孢子产生量作为检测指标, 测定外源氮、水分及 pH 值对木霉菌丝生长及产孢的影响。在试验设计中结合生

产的可操作性,作如下设计:(1)料水比试验。A1 处理添加 100% 香菇菌糠,料液比为 1 g : 1.5 mL;A2 处理添加 100% 香菇菌糠,料液比为 1 g : 2 mL;A3 处理添加 100% 香菇菌糠,料液比为 1 g : 2.5 mL;A4 处理添加 100% 香菇菌糠,料液比为 1 g : 3.0 mL。(2)pH 值试验。B1 处理添加 100% 香菇菌糠,用 1 mol/L HCl 调节 pH 值至 4.0,料液比为 1 g : 2.5 mL;B2 处理添加 100% 香菇菌糠,用 1 mol/L HCl 调节 pH 值至 4.5,料液比为 1 g : 2.5 mL;B3 处理添加 100% 香菇菌糠,用 1 mol/L NaOH 调节 pH 值至 5.0,料液比为 1 g : 2.5 mL,B4 处理添加 100% 香菇菌糠,用 1 mol/L NaOH 调节 pH 值至 6.0,料液比为 1 g : 2.5 mL。(3)氮源试验。C1 处理添加 97% 香菇菌糠、3% 尿素,pH 值自然;C2 处理添加 97% 香菇菌糠、3% 硫酸铵,pH 值自然;C3 处理添加 97% 香菇菌糠、3% 磷酸铵,pH 值自然。(4)黑木耳菌糠试验。D1 处理添加 100% 黑木耳菌糠,pH 值自然;D2 处理添加 100% 黑木耳菌糠,用 1 mol/L HCl 调节 pH 值至 4.5;D3 处理添加 97% 黑木耳菌糠、3% 尿素,pH 值自然。

将上述各处理三角瓶于 30 ℃ 恒温培养 7 d,定期观察菌丝生长及产孢情况,培养 7 d 时将物料取出,自然风干后备用。采用奥立龙 STAR - A211 测定各培养料初始 pH 值及风干样品 10 倍液的 pH 值,并在马丁氏培养基上采用稀释涂平板法测定各样品的分生孢子数,在进行样品稀释时,用灭菌擦镜纸过滤孢子悬浮液以除去木霉菌菌丝。

2 结果与分析

2.1 菌株分离与筛选结果

木霉感染食用菌菌棒后期会产生大量绿色分生孢子,较容易鉴别,从 12 棒香菇染菌棒、5 棒黑木耳染菌棒上共分离到 19 株木霉,以香菇菌糠作为唯一营养源,测定各菌株在含 10% 香菇菌糠平板上的生长速度。由表 1 可知,木霉菌菌株在香菇菌糠培养基上的生长速度存在差异,但均可良好生长;相比较而言,菌株 X - 05、X - 08、M - 03 的生长速度较快。采用血球计数板镜检法对 3 株木霉的产孢能力进行初步测定,由表 2 可以看出,3 株木霉均具有较强的产孢能力,28 ℃ 培养 120 h 时,产孢量可达 $10^9 \sim 10^{10}$ CFU/皿。

由表 3、图 1 和图 2 可以看出,3 株木霉对供试 2 株病原菌均具有较好的重寄生作用,接种 2 d 后木

表 1 木霉菌株在香菇菌糠培养基上的生长情况

菌株编号	来源	菌落直径 (mm)
X - 01	香菇染菌棒	67.31
X - 02	香菇染菌棒	54.93
X - 03	香菇染菌棒	70.22
X - 04	香菇染菌棒	69.84
X - 05	香菇染菌棒	78.48
X - 06	香菇染菌棒	71.60
X - 07	香菇染菌棒	68.29
X - 08	香菇染菌棒	80.46
X - 09	香菇染菌棒	72.57
X - 10	香菇染菌棒	69.43
X - 11	香菇染菌棒	63.14
X - 12	香菇染菌棒	70.09
X - 13	香菇染菌棒	65.87
M - 01	黑木耳染菌棒	69.28
M - 02	黑木耳染菌棒	70.19
M - 03	黑木耳染菌棒	79.11
M - 04	黑木耳染菌棒	58.78
M - 05	黑木耳染菌棒	69.17
M - 06	黑木耳染菌棒	75.66

注:表中数据为 3 次重复的平均值。

表 2 3 株木霉菌株产孢能力的测定

菌株编号	产孢量 (CFU/皿)
X - 05	8.11×10^9 b
X - 08	9.56×10^9 a
M - 03	6.33×10^9 c

注:采用 Duncan's 法进行差异显著性分析。同列数据后标有不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下表同。

表 3 木霉与病原菌对峙培养试验结果

菌株编号	病原菌菌落半径 (mm)	
	番茄灰霉病病菌	黄瓜枯萎病病菌
X - 05	15.79a	13.22c
X - 08	16.56b	15.73a
M - 03	18.94c	14.51b

霉菌与病原菌菌丝接触,随后病原菌受木霉拮抗而停止生长,木霉继续向病原菌菌落上生长、产孢,最后覆盖整个菌落。通过比较可以看出,菌株 X - 05 对供试 2 株病原菌的拮抗效果最好,与其对峙培养的病菌菌落直径小,并且产孢略早。

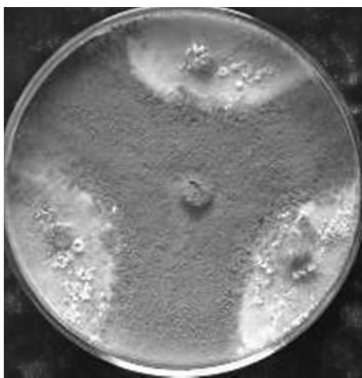


图1 菌株 X-05 与番茄灰霉病菌的对峙培养试验

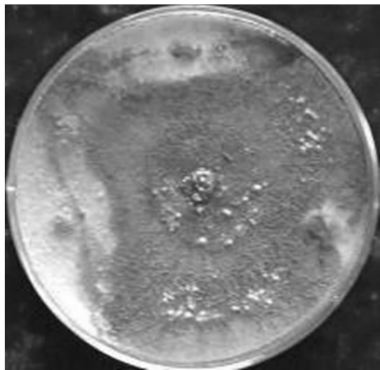
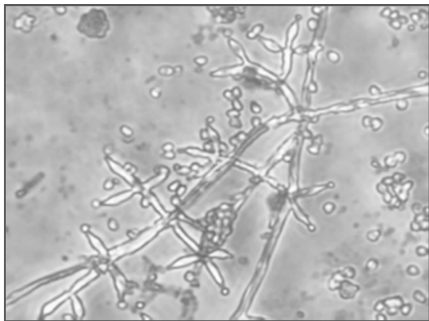
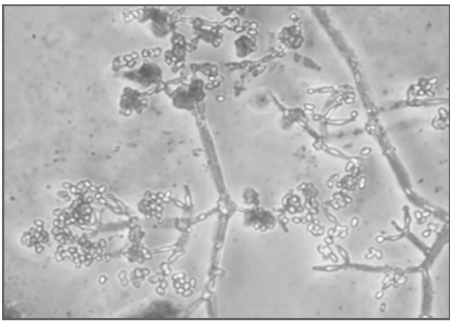


图2 菌株 X-05 与黄瓜枯萎病菌的对峙培养试验



A. 分生孢子梗形态



B. 分生孢子形态

图3 菌株 X-05 的显微形态

表 4 温度对菌株 X-05 菌丝生长的影响

温度 (℃)	平均菌落直径 (mm)
15	22.10e
20	40.62c
25	64.18b
30	73.86a
35	36.93d
40	12.78f

2.2.2 pH 值对菌株 X-05 菌丝生长的影响 结合菌糠初始 pH 值及生产上的可操作性,测定 pH 值为 3~8 对菌株 X-05 菌丝生长的影响。由表 5 可

2.2 菌株 X-05 的形态学鉴定结果

菌株 X-05 在综合 PDA 平板上生长较快,在生长初期菌落为白色,培养 72 h 后开始变稀疏并产孢,后期因产生大量分生孢子而使菌落呈深绿色,产孢后常出现同心轮纹状。菌落背面初期无色,后期略呈浅黄色。菌丝透明,直径为 1.8~3.2 μm,有隔,细胞壁光滑,分生孢子梗由菌丝直立生出,无色,分支多,对生或互生 2~3 级分支;分支与分生孢子梗间近似呈直角,末端为小梗,小梗呈瓶形,顶部缢缩,分生孢子无色,球形或椭圆形,大小为(2.2~2.9) μm × (2.4~3.5) μm,分生孢子常在孢子梗顶端聚集成团状(图 3)。参照魏景超的《真菌鉴定手册》和 Gams、Bissett 的分类系统检索表,鉴定菌株 X-05 为绿木霉(*Trichoderma viride* Pers. ex Fr.)。

2.3 菌株的生物学特性研究

2.2.1 温度对菌株 X-05 菌丝生长的影响 由表 4 可以看出,菌株 X-05 在 15~40℃ 范围内均可生长,温度对其生长的影响显著,最适生长温度范围为 25~30℃;当温度低于 20℃ 时或高于 35℃ 时,菌丝生长缓慢。

以看出,菌株 X-05 菌丝在供试 pH 值条件下均生长良好,其中酸性环境更适于木霉菌菌丝的生长与产孢,最适 pH 值为 4~5。

表 5 pH 值对 X-05 菌落直径的影响

pH 值	菌落直径 (mm)
3	53.50e
4	81.68b
5	86.72a
6	74.34c
7	68.17d
8	66.07d

2.4 菌株 X-05 产孢培养工艺研究

以香菇菌糠、黑木耳菌糠作为培养基质,研究料液比、外加氮源及 pH 值对木霉菌丝生长及产孢的影响。由表 6 可以看出,当料液比为 1 g : 2.5 mL 时,培养料含水量适宜,表层不易失水,三角瓶底部无积水,木霉菌丝生长旺盛,培养料的产孢量更大,原因可能是培养时间长时,料液比过低易导致表层失水干燥,而含水量过高易造成瓶底积水,出现染菌。外加氮源对木霉菌菌丝生长有促进作用,其中添加尿素、硫酸铵的效果明显优于添加磷酸铵的效果。试验结果表明,初始 pH 值对木霉菌菌丝生长及产孢具有明显影响,当培养料的初始 pH 值为 4.0 ~ 5.0 时,木霉菌菌丝生长更旺盛,产孢时间早,产孢量大。

表 6 菌株 X-05 产孢培养工艺

处理名称	培养料初始时 pH 值	样品 pH 值	分生孢子数 (CFU/g)
A1	4.80	4.39	0.83 × 10 ⁹ fg
A2	4.86	4.42	1.33 × 10 ⁹ f
A3	4.79	4.28	3.33 × 10 ⁹ e
A4	4.83	4.52	0.67 × 10 ⁹ fg
B1	4.07	4.01	3.67 × 10 ⁹ de
B2	4.56	4.23	6.33 × 10 ⁹ b
B3	5.04	4.70	6.00 × 10 ⁹ b
B4	6.03	4.95	4.67 × 10 ⁹ c
C1	4.78	4.21	7.00 × 10 ⁹ a
C2	4.65	4.19	5.67 × 10 ⁹ b
C3	4.91	4.20	3.33 × 10 ⁹ e
D1	5.69	4.72	0.33 × 10 ⁹ g
D2	4.52	4.09	3.67 × 10 ⁹ de
D3	5.67	4.36	4.33 × 10 ⁹ cd

3 结论与讨论

木霉是食用菌生产中比较常见的杂菌,严重危害了食用菌生产。从另一个角度看,木霉是生物防治土传病害的主力军,特别是对于设施蔬菜生产而言,常年大量使用化肥农药而导致的不良后果已经受到人们的关注,生物防治理念及其相关产品的推广应用将成为热点。在实际生产中,有机肥的销售半径受限,受经济收益的限制,很多菌糠利用技术

尚未得到有效应用,因此在菌糠利用时,应尽可能考虑就近消化利用。针对县域种植业、养殖业和食用菌产业的特点,拟探索适合区域应用的菌糠利用模式,构建农业废弃物循环经济模式。喀左县的食用菌产业以香菇和黑木耳为主,设施蔬菜生产以黄瓜、辣椒、茄子、番茄等为主。近年来,随着种植年限的延长,土传病害问题日益凸显,本研究以喀左县主栽食用菌香菇、黑木耳菌糠为基础,筛选得到一株既可以在菌糠上良好产孢又兼具生防效果的木霉菌株。模拟培养试验结果表明,菌糠粉碎后,在尿素添加量为 3%、料液比为 1 g : 2.5 mL、初始 pH 值为 4.5 ~ 5.0、30 ℃ 条件下培养 7 d,产孢量可达 3.67 × 10⁹ ~ 7.00 × 10⁹ CFU/g,符合农用微生物制剂菌数高于 0.5 亿/g 的产品要求,具有较好的应用前景。但应注意的是,香菇、黑木耳菌糠及木霉培养物的 pH 值均为酸性,直接施用于土壤存在使土壤酸化的风险,其使用方法及施用量还需要深入研究。

参考文献:

[1] 杨和川,谭一罗,苏文英,等. 食用菌菌糠资源化利用研究进展[J]. 农业工程,2018(10):54-58.

[2] 李亚娇,孙国琴,郭九峰,等. 食用菌菌糠利用的最新研究进展[J]. 中国食用菌,2017,36(4):1-4.

[3] 卫智涛,周国英,胡清秀. 食用菌菌渣利用研究现状[J]. 中国食用菌,2010(5):3-6.

[4] 陈云芳,高 渊. 木霉菌在植物病害生物防治中的应用[J]. 江苏农业科学,2008(5):123-125.

[5] 田连生,王伟华,石万龙. 利用木霉防治大棚草莓灰霉病[J]. 植物保护,2000(2):47.

[6] 宋 漳,陈 辉. 绿色木霉对土传病原真菌的体外拮抗作用[J]. 福建林学院学报,2002(3):219-222.

[7] 彭可为,李 婵. 木霉菌的生物防治研究进展[J]. 安徽农业科学,2010,38(2):780-782.

[8] 惠有为,孙 勇,潘亚妮. 木霉在植物真菌病害防治上的作用[J]. 西北农业学报,2003,12(3):96-99.

[9] 方中达. 植病研究法[M]. 北京:中国农业出版社,1998:122-520.

[10] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979:132-493.

[11] 张广志,杨合同,文成敬. 木霉菌形态学分类检索与分子生物学鉴定[J]. 山东农业大学学报(自然科学版),2011,42(2):309-316.