

粉红粘帚霉 ACM941 固体发酵条件的优化

张涛涛, 刘伟成, 吴慧玲, 董丹, 刘霆

北京市农林科学院植物保护环境保护研究所, 北京 100097

摘要 为提高粉红粘帚霉 ACM941 发酵过程中的分生孢子产量, 本研究对其固体发酵条件进行了优化。以产孢量为测定指标, 通过单因子和正交试验, 确定 ACM941 固体发酵基础培养基为麦麸和棉籽壳混合物, 其比例为 4:6; 在基础培养基中添加 2% 玉米粉、2% 燕麦粉、3% 牛肉膏、2% 蛋白胍可获得更大产孢量; 对发酵温度、接种量等发酵条件进行了优化, 确定发酵培养基初始含水量为 30%; 种龄 48 h; 接种量 6%; 发酵过程中 24 h 全光照; 菌丝生长温度 25℃, 产孢温度 20℃。在最佳发酵条件下, ACM91 产孢量达 1.17×10^9 cfu/g 培养物, 比初始发酵水平提高了 12.4 倍, 为生防制剂的开发奠定了基础。

关键词 粉红粘帚霉; 孢子浓度; 固体发酵培养基; 发酵条件

中图分类号 Q939.95

文献标志码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2014.12.003

Optimization of Solid Fermentation of *Gliocladium roseum* ACM941

ZHANG Taotao, LIU Weicheng, WU Huiling, DONG Dan, LIU Ting

Institute of Plant and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China

Abstract The solid fermentation of *Gliocladium roseum* ACM941 has not been well studied so far, this paper proposes to improve the fermentation titer of ACM941 through the single factor and orthogonal design. The optimum fermentation conditions are obtained as follows: The bran and cottonseed shell ratio is 4:6, the corn flour 2%, the oat flour 2%, the beef extract 3%, and the peptone 2%. The optimum mycelial growth and sporulation temperatures are 25℃ and 20℃. The initial water content is 30% and the inoculation volume is 6%. Under these conditions, the maximum conidial yield comes to 1.17×10^9 cfu/g, 12.4 times higher than the initial fermentation level. This provides a support for the development of the biocontrol agent.

Keywords *Clonostachys rosea*; spore concentration; solid-state fermentation; fermentation conditions

粘帚霉(*Gliocladium* spp.)是一类分布广泛的土壤习居菌,可以寄生多种植物病原真菌的菌丝和菌核,同时还具有促进植物生长的作用^[1]。作为重要的植物病原真菌重寄生真菌,粘帚霉被认为是目前已发现的拮抗微生物中最具潜力的植病生防因子之一^[2]。有研究表明,粘帚霉对由灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)引起的草莓灰霉病^[3],由核盘菌[*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary]引起的大豆、向日葵、油菜、莴苣等菌核病^[4-7]有较好的控制作用。暴增海等^[8]报道粉红粘帚霉

(*G.roseum*)发酵液对小麦根腐叶枯病[*Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem)]和小麦赤霉病[*Gibberella zeae* (Schw.) Petch]表现出较好的防治效果。McQuilken等^[9]报道,粉红粘帚霉的分生孢子能够控制草莓花和果实的灰霉病。链孢粘帚霉(*G. catenulatum*)菌丝可以导致终极腐霉(*Pythium uhimum*)和立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)的菌丝生长畸形,从而有效地控制由*P.ultimum*和*R.solani*引起的苗期猝倒病^[9]。绿色粘帚霉(*G.vitens*)还可以产生对反枝苋(*Amaranthus retroflexus*)有毒

收稿日期:2014-01-27;修回日期:2014-03-26

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(200903049-07);北京市科技计划课题(Z121100001212002);北京市农林科学院科技创新专项(KJ CX201101001)

作者简介:张涛涛,助理研究员,研究方向为生防微生物发酵,电子信箱:zt1024@163.com;刘伟成(通信作者),研究员,研究方向为植物真菌病害及其生物防治,电子信箱:liuwich@163.com

引用格式:张涛涛,刘伟成,吴慧玲,等. 粉红粘帚霉 ACM941 固体发酵条件的优化[J]. 科技导报, 2014, 32(12): 26-30.

害作用而对棉花不表现毒性的毒素,从而用于抑制棉田的反枝苋^[10]。菌株 ACM941 是自豌豆上分离得到的一株粉红粘帚霉(*Clonostachys rosea = Gliocladium roseum*), 研究显示其对引起豌豆根部病害的链格孢(*Alternaria alternata*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)及丝核菌等有较好的抑制作用^[11]。本研究室通过温室盆栽和田间小区防治试验表明, ACM941 对甘蓝枯萎病具有显著控制作用; 其防效与化学药剂多菌灵无显著性差异, 显示了其良好的开发应用潜能。

关于粘帚霉在植物病害中的应用报道多集中于其防治效果, 而对其菌剂研制的关键技术报道较少。发酵工艺是生防菌剂研制的重要环节, 通过发酵条件的优化可以大幅度降低菌剂的生产成本, 提高产品质量和防治效果。固体发酵以农副产品作为发酵基质, 成本低, 发酵过程产生的活菌体、代谢产物及发酵基质能够被全部利用, 无废液及废弃物排放, 兼顾了防治效果和环境保护等多方面因素。本文对菌株 ACM941 的固体发酵培养基和发酵条件进行优化, 旨在为其生防制剂的研发和应用提供技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 供试菌种

粉红粘帚霉 ACM941。

1.2 培养基

液体种子培养基: 3%玉米粉培养基(30 g 玉米粉, 1000 mL 水), 121℃ 灭菌 15 min 待用。

1.3 种子液的制备

将 ACM941 菌种在 PDA 培养基上 25℃ 培养 5 d, 沿菌丝边缘同一直径打菌饼, 接种到液体种子培养基中, 25℃, 180 r/min 振荡培养 48 h, 制成活菌含量为 10^8 cfu/mL 的种子液。

1.4 ACM941 固体发酵培养基的优化

1.4.1 ACM941 固体发酵基础培养基的筛选

以麦秸、菇渣等农副产品为材料, 设计 12 种固体发酵基础培养基。

1) 麦秸, 粉碎为 0.5 cm 小段; 2) 粉碎的平菇菇渣; 3) 粉碎的白灵菇菇渣; 4) 麦麸: 棉籽壳=1:9; 5) 麦麸: 棉籽壳=2:8; 6) 麦麸: 棉籽壳=3:7; 7) 麦麸: 棉籽壳=4:6; 8) 麦麸: 棉籽壳=5:5; 9) 麦麸: 棉籽壳=6:4; 10) 麦麸: 棉籽壳=7:3; 11) 麦麸: 棉籽壳=8:2; 12) 麦麸: 棉籽壳=9:1。

将以上培养基装菌袋, 121℃, 灭菌 15 min, 接种后逐日调查实验各处理产孢量。

1.4.2 ACM941 固体发酵培养基初始含水量的确定

以麦麸和棉籽壳为材料, 配制含水量为 20%、30%、40%、50%、60%、70% 的固体发酵基础培养基, 装菌袋 121℃ 灭菌 15 min, 接种后逐日调查试验各处理产孢量。

1.4.3 ACM941 固体发酵培养基添加碳、氮源的筛选

在固体发酵基础培养基中, 分别添加葡萄糖、麦芽糖、小麦粉、淀粉、玉米粉和燕麦粉为补充碳源, 以基础培养基为

对照, 进行单因素试验, 接种后逐日调查试验各处理产孢量。

在固体发酵基础培养基中, 添加牛肉膏、蛋白胨、酵母粉、玉米浆粉、棉籽蛋白为补充氮源, 以基础培养基为对照, 进行单因素试验, 接种后逐日调查试验各处理产孢量。

1.4.4 ACM941 固体发酵培养基添加碳、氮源筛选正交试验

根据固体发酵培养基成分优化单因素试验结果, 采用正交试验, 确定固体发酵培养基补充碳、氮源添加水平。

1.5 ACM941 固体发酵培养条件的优化

1.5.1 种龄的确定

分别制得培养 24、32、40、48、56、64、72、80、88、96 h 的种子液, 接种于固体发酵基础培养基, 25℃ 条件下培养, 逐日调查各处理的产孢量。

1.5.2 接种量的确定

设 3%、6%、9%、12%、15%、18% 6 个梯度接种量接种固体发酵培养基, 25℃ 条件下培养, 逐日调查各处理的产孢量。

1.5.3 光照条件的确定

设 1) 24 h 全光照, 2) 24 h 全黑暗, 3) 24 h 全紫外线照射, 4) 12 h 光照、12 h 紫外线照射交替和 5) 12 h 黑暗、12 h 紫外线照射交替 5 个处理, 25℃ 条件下培养, 逐日调查各处理的产孢量。

1.5.4 发酵温度的确定

设 25、30℃ 两个菌丝生长温度梯度, 15、20、25℃ 3 个产孢温度梯度, 接种后将菌袋置于菌丝生长温度下培养, 待菌丝长满菌袋后分别转入产孢温度条件下继续培养, 逐日调查各处理的产孢量。

1.6 数据统计及分析

结果用 Excel 软件进行数据处理。用 SPSS 11.0 对试验结果进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 ACM941 固体发酵基础培养基的筛选

由图 1 可以看出, 以麦秸、平菇菇渣和白灵菇菇渣为发酵培养基, 产孢量较低, 分别为 2.08×10^7 、 2.30×10^7 和 1.03×10^7 cfu/g 培养物, 极显著低于以麦麸和棉籽壳为基础发酵培养基的产孢量。在以麦麸和棉籽壳按不同比例混合作为发酵培养基的处理中, 比例为 4:6 和 5:5 时产孢量极显著高于其他处理, 分别为 2.61×10^8 、 2.46×10^8 cfu/g 培养物。因此, 确定 ACM941 固体发酵基础培养基为麦麸和棉籽壳混合物, 其比例为 4:6。

2.2 ACM941 固体发酵培养基初始含水量的确定

图 2 结果表明, 固体发酵培养基初始含水量为 30% 和 40% 时最大产孢量分别为 3.27×10^8 、 3.26×10^8 cfu/g 培养物, 极显著高于其他处理。含水量过低, 不能满足 ACM941 生长及代谢的需要; 含水量过高, 不仅阻碍了发酵过程中对氧的需求, 还增加了污染的机会, 导致产孢量较少。因此确定发酵培养基初始含水量为 30%。

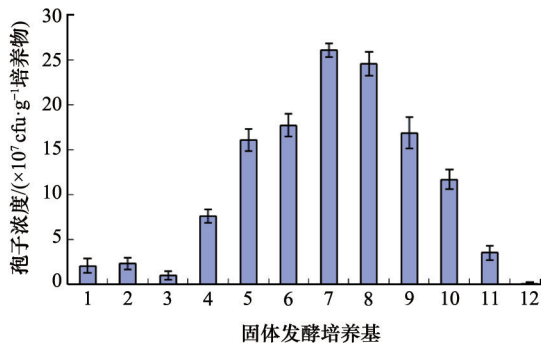


图1 不同发酵培养基对ACM941产孢量的影响
Fig. 1 Effect of different mediums on sporulation of ACM941

注:1,麦秸;2,平菇菇渣;3,白灵菇菇渣;4,麦麸:棉籽壳=1:9;5,麦麸:棉籽壳=2:8;6,麦麸:棉籽壳=3:7;7,麦麸:棉籽壳=4:6;8,麦麸:棉籽壳=5:5;9,麦麸:棉籽壳=6:4;10,麦麸:棉籽壳=7:3;11,麦麸:棉籽壳=8:2;12,麦麸:棉籽壳=9:1

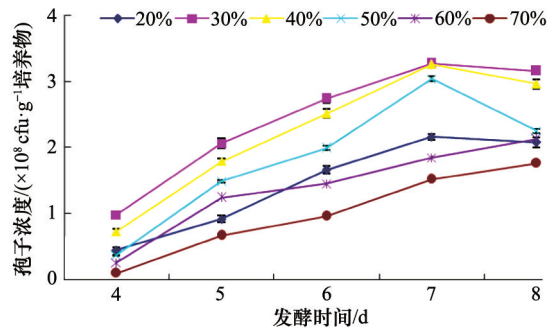


图2 培养基含水量对ACM941产孢量的影响
Fig. 2 Effect of water concentration on sporulation of ACM941

2.3 ACM941 固体发酵培养基添加碳、氮源筛选

在基础发酵培养基中添加2%葡萄糖、2%麦芽糖、2%玉米粉、2%淀粉、2%小麦粉和2%燕麦粉作为补充碳源进行单因素试验。图3表明,以2%玉米粉和2%燕麦粉作为补充碳源的培养基,产孢量最高,分别为 3.64×10^8 、 3.75×10^8 cfu/g 培养物,显著高于其他处理,表明玉米粉和燕麦粉作为补充碳源,对产孢有利。

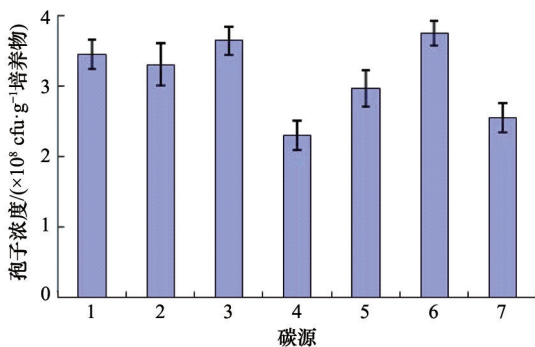


图3 碳源对ACM941产孢量的影响
Fig. 3 Effect of carbon sources on sporulation of ACM941

注:1,葡萄糖;2,麦芽糖;3,玉米粉;4,淀粉;5,小麦粉;6,燕麦粉;7,对照

在基础培养基中添加2%牛肉膏、2%酵母粉、2%蛋白胨、2%玉米浆粉、2%棉籽蛋白作为补充氮源进行单因素试验。图4表明,以2%牛肉膏和2%蛋白胨为补充氮源的培养基产孢量最高,分别为 3.24×10^8 、 3.15×10^8 cfu/g 培养物,显著高于其他处理。由于添加玉米浆粉作为补充氮源致使培养基呈现酸性,对产孢有抑制作用,其产孢量极显著低于其他处理和对照。

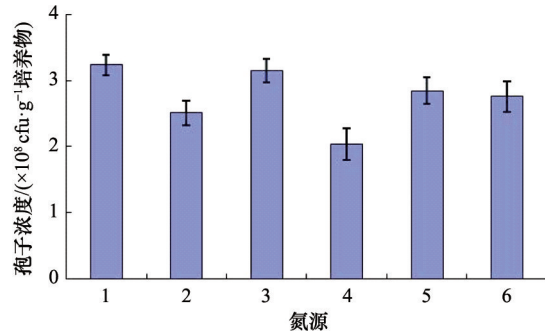


图4 氮源对ACM941产孢量的影响
Fig. 4 Effect of nitrogen sources on sporulation of ACM941

注:1,牛肉膏;2,酵母粉;3,蛋白胨;4,玉米浆粉;5,棉籽蛋白;6,对照

2.4 ACM941 固体发酵培养基添加碳、氮源筛选正交试验

在基础培养基中添加不同量的玉米粉(A)、燕麦粉(B)、牛肉膏(C)、蛋白胨(D),进行4因素3水平正交试验,确定固体发酵培养基补充碳、氮源最佳配方。由表1可以看出,不同碳、氮源对ACM941产孢的影响不同,从大到小依次为A>C>D>B,最佳组合为A2B2C3D2,即2%玉米粉、2%燕麦粉、3%牛肉膏、2%蛋白胨。经验证,以此配方作为补充碳、氮源加入基础培养基,产孢量为 4.12×10^8 cfu/g 培养物。

2.5 ACM941 固体发酵培养条件的优化结果

2.5.1 种龄的确定

由图5可见,种龄不同,产孢量差异较大,以种龄48、56 h时最大,分别为 2.13×10^8 、 2.21×10^8 cfu/g 培养物,显著高于其他处理产孢量,二者之间差异不显著。故确定种龄为48 h。

2.5.2 ACM941 固体发酵接种量的确定

接种量的大小决定菌种在发酵过程中的生长繁殖速度。图6结果表明,接种量为6%时发酵的最终产孢量最大,为 2.53×10^8 cfu/g 培养物,极显著高于其他处理;接种量为9%时,在发酵初期产孢增长迅速,分析其原因,可能是接种量较大,前期菌丝生长旺盛,致使产孢迅速达到高峰,发酵后期由于接种量大导致发酵过程对氧的需求被阻碍,产孢量增长减缓,相同的原因致使接种量大于12%时培养基含水量增加,导致发酵过程产孢量低。因此确定接种量为6%。

2.5.3 光照对发酵过程的影响

发酵过程中,光照能刺激菌丝生长。图7结果表明,24 h全光照条件下,ACM941产孢量最大,为 6.32×10^8 cfu/g 培养物,极显著高于其他处理;黑暗条件不能刺激菌丝生长和产孢,在此条件下产孢量最小,为 2.85×10^8 cfu/g 培养物,极显著低于其他处理。

表1 $L_9(3^4)$ 正交试验结果
Table 1 $L_9(3^4)$ orthogonal test design and results

处理	A	B	C	D	孢子浓度/($\times 10^8$ cfu \cdot g $^{-1}$ 培养物)
1	1	1	1	1	1.68
2	1	2	2	2	3.82
3	1	3	3	3	3.72
4	2	1	2	3	3.30
5	2	2	3	1	4.05
6	2	3	1	2	3.53
7	3	1	3	2	2.77
8	3	2	1	3	2.15
9	3	3	2	1	2.07
K1	3.07	2.58	2.45	2.60	
K2	3.63	3.34	3.06	3.37	
K3	2.33	3.11	3.51	3.06	
R	1.30	0.76	1.06	0.77	

注:K1,K2,K3为每个因素在各个水平下的平均值;R为极差,即各因素平均值的最大差值。

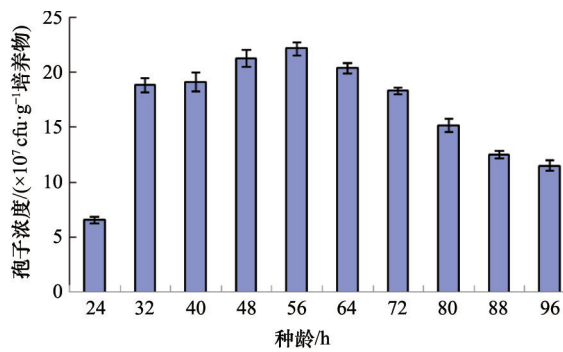


图5 种龄对ACM941产孢量的影响

Fig. 5 Effect of different seeds on sporulation of ACM941

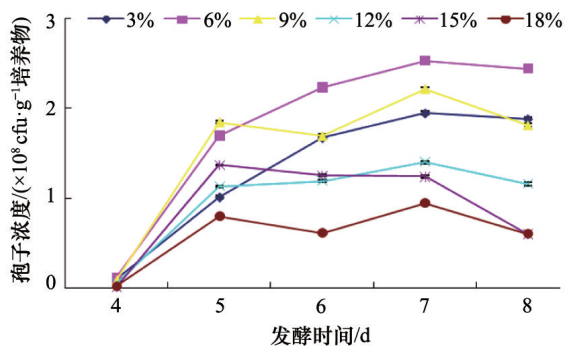


图6 不同接种量条件下固体发酵菌体的生长曲线

Fig. 6 Growth curves of different inoculum levels in solid medium

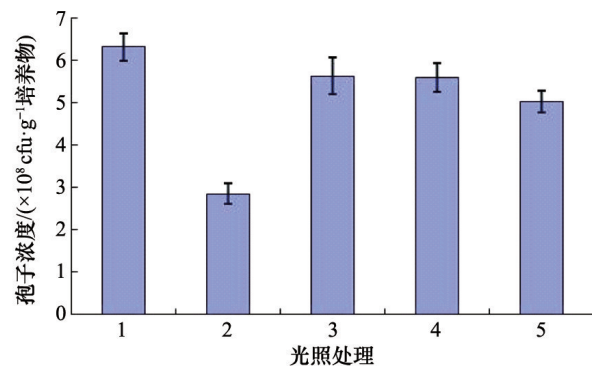


图7 不同光照条件对ACM941产孢量的影响

Fig. 7 Effect of light on sporulation of ACM941

注:1,24 h全光照;2,24 h全黑暗;3,24 h全紫外线照射;4,12 h光照、12 h紫外线照射交替;5,12 h黑暗、12 h紫外线照射交替

2.5.4 ACM941 固体发酵温度的确定

根据本实验室对粉红粘帚霉 ACM941 生物学特性的研究结果,设定菌丝的生长温度为 25、30℃,产孢温度为 15、20 和 25℃。由表 2 可以看出,菌丝的生长温度为 25℃的 3 个处理较菌丝生长温度为 30℃的 3 个处理在发酵结束时产孢量大,经方差分析,差异达极显著水平,表明 25℃条件更利于菌丝生长;在菌丝生长同为 25℃时,产孢温度为 15、20℃的处理产孢量大于产孢温度为 25℃的处理,分别为 1.17×10^9 、 1.00×10^9 cfu/g 培养物,极显著高于其他处理,二者间差异不显著。综合设备能耗等条件考虑,确定发酵温度为 20℃。

表2 ACM941 固体发酵温度对产孢量的影响
Table 2 Effect of fermentation temperatures on sporulation quantity

菌丝生长温度 /°C	产孢温度 /°C	孢子浓度 ($\times 10^8$ cfu·g ⁻¹ 培养物)
25	15	11.74 ^{Aa}
25	20	10.04 ^{Aa}
25	25	8.73 ^{Bb}
30	15	2.03 ^{Dd}
30	20	3.59 ^{Cc}
30	25	3.39 ^{Cc}

注: 实验数据采用LSD法进行分析。标有不同大写英文字母的数据表示差异极显著($P < 0.01$), 不同小写英文字母表示差异显著($P < 0.05$)。

3 讨论

固体发酵培养基不仅提供微生物生长和代谢所需营养, 作为细胞的固定物, 其物理因素和化学因素还会对固体发酵的结果产生影响。本研究以麦秸、平菇菇渣、白灵菇菇渣、麦麸和棉籽壳等廉价易得的农副产品为试验材料, 通过试验, 最终确定麦麸和棉籽壳作为发酵培养基, 降低了发酵成本, 发酵产物及发酵培养基可全部被利用, 无废弃物排放且对环境安全, 适于微生物活菌制剂的发酵生产。

国外学者对粉红粘帚霉的研究比较深入, 中国对该菌的研究主要集中于对病害的防治效果实验及液体发酵研究, 关于固体发酵研究较少。2005年, 马桂珍等^[12]报道, 以棉籽壳、麸皮、豆饼等为原料进行固体培养基的筛选, 结果与本实验基本一致。王海栋等^[13]对固体发酵条件研究结果显示, 其供试菌最佳发酵温度为24°C。本实验根据对菌丝生长温度和产孢温度的研究, 设计不同的发酵温度和产孢温度, 实验结果表明, 变温能得到更大的产孢量。

固体发酵过程中水分含量十分重要。2011年, 白洪志等^[14]报道, 调节基质的初始含水量是控制培养基含水量的最有效措​​施之一。培养基水分含量过高, 影响发酵过程中氧的传递, 且大大增加了污染几率; 含水量过低影响微生物生长, 进而影响发酵产率。基质含水量应控制在发酵菌种能够生长而又低于细菌生长所需要的范围内。

本研究结果是在袋料培养水平上获得的, 还须进行固体反应器条件下的中间放大实验进行验证。

4 结论

通过单因素及正交实验, 确定ACM941固体发酵基础培养基为麦麸和棉籽壳混合物, 其比例为4:6; 在基础培养基中添加2%玉米粉、2%燕麦粉、3%牛肉膏、2%蛋白胨可获得更大产孢量。

通过单因素实验, 确定袋料培养的最佳发酵条件: 发酵培养基初始含水量为30%, 种龄48 h, 接种量6%, 光照条件为发酵过程中24 h全光照, 发酵温度为菌丝生长温度25°C, 产

孢温度20°C为最适发酵温度, 在此发酵条件下ACM941产孢量为 1.17×10^9 cfu/g培养物, 比初始发酵水平提高了12.4倍。

参考文献(References)

- [1] Vargas G S, Pastor G S, March G J. Quantitative isolation of biocontrol agents *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. and actinomycetes from soil with culture media[J]. Microbiological Research, 2009, 164(2): 196-205.
- [2] Kubicek C P, Harman G E. *Trichoderma* and *gliocladium*[M]. Padstow: Taylor & Francis Ltd Press, 1998: 193-200.
- [3] Cota L V, Maffia L A, Mizubuti E S G, et al. Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions[J]. Biological Control, 2008, 45(3): 515-522.
- [4] 张拥华, 高会兰, 马桂珍, 等. 粉红粘帚霉67-1菌株寄生核盘菌研究[J]. 植物病理学报, 2004, 34(3): 211-214.
Zhang Yonghua, Gao Huilan, Ma Guizhen, et al. Mycoparasitism of *gliocladium roseum* 67-1 on *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2004, 34(3): 211-214.
- [5] Sharma B K, Singh B M. Biological control of white rot of pea caused by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary[J]. Journal of Biological Control, 1990, 4(2): 132-134.
- [6] Wu W S. Control of *Sclerotinia* rot of sunflower and chrysanthemum[J]. Plant Protection Bulletin, 1991, 33: 45-55.
- [7] Whipps J M. Behaviour of fungi antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum* on plant tissue segments [J]. Journal of General Microbiology, 1987, 133(6): 1495-1501.
- [8] 暴增海, 马桂珍, 张拥华, 等. 粘帚霉发酵液对小麦的促生作用及对小麦苗期两种病害的防效研究[J]. 中国植保导刊, 2006, 26(8): 5-7.
Bao Zenghai, Ma Guizhen, Zhang Yonghua, et al. Study on effects of *Gliocladium* spp. yeast fermented liquids on promoting wheat growth and control of two wheat seedling diseases[J]. China Plant Protection, 2006, 26(8): 5-7.
- [9] McQuilken M P, Gemmell J, Lahdenperä M L. *Gliocladium catenulatum* as a potential biological control agent of damping-off in beddillg plants [J]. Journal of Phytopathology, 2001, 49(3): 171-178.
- [10] Jones R W, Laniniw T, Hancock J G. Plant growth response to the phytotoxin viridol produced by the fungus, *Gliocladium virens*[J]. Weed Science, 1988, 36: 683-687.
- [11] Xue A G. Biological control of pathogens causing root rot complex in field pea using *Clonostachys rosea* Strain ACM941[J]. Phytopathology, 2003, 93: 329-335.
- [12] 马桂珍, 暴增海, 王文颇, 等. 粘帚霉固体培养基筛选[J]. 吉林农业大学学报, 2005, 27(5): 490-493.
Ma Guizhen, Bao Zenghai, Wang Wenpo, et al. Selection of solid culture medium of *gliocladium* spp[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2005, 27(5): 490-493.
- [13] 王海栋, 乔苗. 粉红粘帚霉固体发酵工艺的研究进展[J]. 抗感染药学, 2013, 10(2): 92-94.
Wang Haidong, Qiao Miao. Recent research progress on solid fermentation process of *gliocladium roseum*[J]. Anti-Infection Pharmacy, 2013, 10(2): 92-94.
- [14] 白洪志, 王惠, 韩梅, 等. 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, 2011, 41(6): 681-685.
Bai Hongzhi, Wang Hui, Han Mei, et al. Solid state fermentation condition optimizing of *trichoderma viride* C-08 for producing cellulase [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2011, 41(6): 681-685.

(责任编辑 吴晓丽)