

# 利用小麦秸秆生产木霉分生孢子及其生物有机肥 对黄瓜的促生效果

冯程龙, 王晓婷, 康文晶, 孟晓慧, 张风革, 冉 炜\*, 沈其荣

(南京农业大学资源与环境科学学院/江苏省固体有机废弃物资源化利用高技术研究重点实验室, 江苏南京 210095)

**摘要:**【目的】木霉是重要的植物根际促生功能菌, 然而木霉类生物肥料生产的应用基础研究很薄弱。本研究以小麦秸秆为发酵基质, 探究哈茨木霉 T-E5 产分生孢子的固体发酵工艺条件, 并验证发酵物作为生物有机肥的促生效果。【方法】在实验室条件下, 以小麦秸秆为固体发酵基质, 研究固体发酵的不同发酵方式, 温度、酸浓度、酸种类、接种量、含水量、外加碳源和氮源等单因子条件下的产孢量; 再利用正交试验设计, 研究温度、酸浓度、含水量、接种量、外加氮源和碳源的发酵条件优化。利用两季温室盆栽试验测定包括施用化肥、有机肥、发酵物 and 不同肥料组合的 5 个不同施肥处理的黄瓜地上部生物量、株高和叶面积。采用稀释涂布法测定黄瓜盆栽根际土中总真菌数量和木霉菌数量。【结果】单因素条件优化: 基质用稀硝酸 (0.1 mol/L) 调节酸度值后接种 3%(v/w) 的  $1 \times 10^7$  个/mL 的 T-E5 孢子液, 调节水分使初始含水量达到 75%; 在此条件下, 添加尿素和玉米粉, 在 28℃ 下发酵培养 8 天, 最大产孢量可达到  $8.87 \times 10^9$  个/g。通过正交优化, 每 10 g 小麦秸秆, 加入调节酸度值的 0.05 mol/L 硝酸 18.3 mL, 含水量 70%(湿基), 接种量 9%, 添加尿素的量为 1%, 30℃ 浅盘培养 8 天, 产孢量达到  $1.1 \times 10^{10}$  个/g。第 1 季盆栽试验结果表明, 与单施化肥处理 (CCK) 相比, 发酵产物与化肥配施 (CT) 使黄瓜的地上部分生物量、株高和叶面积分别提高 14.97%、16.75% 和 14.64%; 与单施有机肥处理 (OCK) 相比, 发酵产物与有机肥配施 (OT) 使黄瓜的地上部分生物量、株高和叶面积分别提高 10.62%、26.06% 和 9.53%。第 2 季盆栽也有类似的促生效果, 与 CCK 相比, CT 使上述指标分别提高 12.83%、11.49% 和 26.93%; 与 OCK 相比, OT 使上述指标分别提高 5.96%、34.29% 和 18.01%。两季盆栽添加木霉发酵物的处理中根际土总真菌数和木霉菌数量相比 CCK、OCK 和不施肥照 (CK) 均增加 1 个数量级以上。【结论】以小麦秸秆为主要原料, 采用固体发酵工艺可生产高分生孢子含量的哈茨木霉菌剂及其生物有机肥, 表明利用农业废弃物生产高附加值的木霉菌剂及其生物有机肥具有可行性。但木霉孢子数量主要受发酵条件影响, 今后应在中试和工厂化生产水平进一步研究木霉孢子固体发酵的工艺参数。

**关键词:** T-E5 木霉; 小麦秸秆; 固体发酵; 生物有机肥; 黄瓜

## *Trichoderma* conidia production using wheat straw and growth promoting effect of its bio-organic fertilizer on cucumber

FENG Cheng-long, WANG Xiao-ting, KANG Wen-jing, MENG Xiao-hui, ZHANG Feng-ge, RAN Wei\*, SHEN Qi-rong  
(College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University/  
Jiangsu Provincial Key Laboratory for Solid Organic Waste Utilization, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** 【Objectives】*Trichoderma* species are important plant growth promotion fungi in rhizosphere of plants, whereas it is insufficient for using them to produce bio-fertilizers. This study tried to use wheat straw powder as substrate for conidia production of *T. harzianum* T-E5 in solid state fermentation (SSF), aimed to optimize process conditions of the fermentation as well as to check the plant growth promoting effect of the ferment produce as a bio-organic fertilizer on cucumber in greenhouse. 【Methods】In laboratory conditions, wheat straw was used as solid fermentation substrate, and numbers of conidia spores were compared under a

收稿日期: 2017-03-23 接受日期: 2017-06-02

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划课题 (2013BAD08B04-7) 资助。

作者简介: 冯程龙 (1993—), 男, 河南扶沟人, 硕士研究生, 主要从事生物有机肥方面的研究。E-mail: fchengl@sina.com

\* 通信作者 Tel: 025-84395210; E-mail: ranwei@njau.edu.cn

series of single factors, including different fermenting containers, temperatures, acid concentration, acid species, amounts of inoculum, moisture contents, and forms of exogenous carbon and nitrogen resources. An orthogonal experiment was then designed to optimize fermentation conditions of temperature, acid concentration, water content, inoculation amount, and external nitrogen and carbon sources. In addition, two seasons of greenhouse pot experiments were conducted with five fertilization treatments, including chemical fertilizer, organic fertilizer, ferment product and its combinations with the chemical fertilizer or the organic fertilizer. The above ground biomass, plant heights and leaf areas of cucumber were measured. The number of total fungi and *Trichoderma* species in the rhizosphere soil of cucumber were counted using the diluted spread plate. 【 **Results** 】 The solid state fermentation of T-E5 in tray with wheat straw powder was suitable for production of conidial spores. The wheat straw powder was prepared by inoculation with 3% (v/w) of  $1 \times 10^7$  spores/mL T-E5 spore suspension prior to acidification with nitric acid solution (0.1 mol/L) and then water was added to reach an initial moisture content of 75%. Under those conditions, fermentation with addition of exogenous urea and corn powder at 28°C for 8 days yielded the maximum number of T-E5 conidial spores of  $8.87 \times 10^9$  spores/g. By the orthogonal optimization, when 18.3 mL 0.05 mol/L of nitric acid, 9% (v/w) inoculation amount, and 1% (w/w) of urea were added to every 10 g of wheat straw with 70% (wet basis) of water content, at 30°C shallow dish and fermented for 8 days, the amount of *Trichoderma* conidia reached to  $1.1 \times 10^{10}$  spores/g. The results of the first season pot experiment showed that the treatment of ferment product with chemical fertilizers (CT) increased cucumber above ground biomass, plant height and leave area by 14.97%, 16.75% and 14.64%, respectively, compared with the treatment of chemical fertilizers (CCK). Compared with the treatment of the organic fertilizer (OCK), the treatment of ferment product with the organic fertilizer (OT) increased the above ground biomass, plant height and leave area by 10.62%, 26.06% and 9.53%, respectively. The results of the second season pot experiment showed similar promoting effects, i.e. compared with CCK, CT increased the above items by 12.83%, 11.49% and 26.93% respectively, and compared with OCK, OT increased above items by 5.96%, 34.29% and 18.01%, respectively. Compared with CCK, OCK and CK, the CT and OT treatments increased the numbers of total fungi and *Trichoderma* species in the rhizosphere soil of cucumber by more than one order of magnitude. 【 **Conclusions** 】 The bio-agent and bio-organic fertilizer with high content of *T. harzianum* conidial spores can be produced using wheat straw as main substrates in SSF process. This suggests it is feasible that using agricultural wastes with SSF process to produce high value added *Trichoderma* bio-agent and its bio-organic fertilizers. But the amount of spores is largely dependent on the fermentation conditions, and the technological parameters of SSF for producing *Trichoderma* spores in the pilot and factory levels need to be further studied.

**Key words:** T-E5 *Trichoderma*; wheat straw; solid state fermentation; bio-organic fertilizer; cucumber

木霉菌 (*Trichoderma* spp.) 属真菌界、双核菌门、半知菌亚门、丝孢纲丛、梗孢目、丛梗孢科, 广泛存在于土壤、森林、植株根际或叶面、树皮及枯枝落叶中<sup>[1]</sup>。大量研究表明, 一些木霉菌株属于重要的植物根际促生真菌 (PGPF), 具有良好的促进植物生长和抑制植物病原菌的功能。木霉菌株通过竞争、重寄生和分泌次生代谢产物等方式, 能抑制多种植物病菌的生长; 通过分泌植物生长激素等物质, 能显著促进作物的生长<sup>[2-5]</sup>。Vinale 等<sup>[6]</sup>利用哈茨木霉 T22 和深绿木霉 PI 对莴苣、番茄和胡椒等作物进行处理后, 植株果实数量、株高、地下部鲜重和干重均显著提高。杨春林等<sup>[7]</sup>利用哈茨木霉菌株 T-h-30

对黄瓜、芹菜和番茄等几种蔬菜进行大田试验, 结果发现木霉对植株的叶片数、株高等具有显著的促进作用, 且有效提高了蔬菜的品质和产量。因此, 一些木霉属菌株如哈茨木霉 (*T. harzianum*) 和绿色木霉 (*T. aviride*) 作为生物肥料或生物农药, 在农业生产上具有广阔的应用前景<sup>[8-9]</sup>。然而, 目前市场上木霉菌生物肥料或生物农药并不常见, 其中限制木霉菌应用的主要瓶颈之一是产品中木霉分生孢子数量偏低。

国内外对木霉发酵工艺的研究并不多见, 有学者利用固体发酵工艺研究了木霉纤维素酶<sup>[10]</sup>、木聚糖酶<sup>[11]</sup>和挥发性有机物<sup>[12]</sup>。Verma 等<sup>[13-14]</sup>利用液体发酵

工艺研究了活性污泥含量和预处理及溶解氧对木霉分生孢子数量的影响。张良等<sup>[15]</sup>通过固液发酵实验表明固体发酵产孢效果明显优于液体发酵。与液体发酵相比,固体发酵能较容易利用低成本的农业或工农业副产物作为培养基质,在资金和操作成本上较液体发酵低。固体发酵是在无重力水状态下进行的,所需设备简单,同时减少了液体发酵下游工程带来的成本<sup>[16-18]</sup>。

小麦秸秆资源丰富,容易获得,其中富含的纤维素在发酵过程中能被木霉利用。本研究以哈茨木霉 T-E5 为试验菌株,以小麦秸秆为发酵基质,经过温度、酸浓度、含水量、接种量、添加氮源、添加碳源等单因子条件优化,再通过正交试验优化,获得产孢量最大的配方。通过盆栽试验,以小麦秸秆发酵物作为生物有机肥研究其对黄瓜生长的影响。本研究初步探索到哈茨木霉 TE-5 菌株固体发酵产孢的较优工艺条件,为该菌的深入研究提供了有益的试验数据,并为木霉菌肥和木霉类生物有机肥的推广应用提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

菌株:哈茨木霉 T-E5,南京农业大学国家有机肥料工程研究中心提供。T-E5 菌株是由本课题组张风革<sup>[19]</sup>通过紫外诱变对野生菌株哈茨木霉 SQR-T037 经过多级筛选,获得一株性状稳定、活性更强的诱变菌株。

固体发酵基质:经粉碎的纯小麦秸秆粉。

供试作物:黄瓜新津春 4 号。

盆栽土壤:江苏宜兴地区养分贫瘠的亚表层水稻土,pH 6.8、有机质 9.61 g/kg、全氮 0.12 g/kg、有效磷 5.42 mg/kg、速效钾 67.30 mg/kg。

有机肥:江苏联业生物科技公司生产的猪粪,养分含量为 N 0.95%、 $P_2O_5$  2.08%、 $K_2O$  1.26%。

木霉生物有机肥:木霉固体发酵物与普通猪粪有机肥以 1:10 的比例复配得到,生物有机肥中木霉菌孢子数量为  $3.0 \times 10^8$  个/g。

### 1.2 试验方法

1.2.1 培养基的配制 PDA 固体培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、自来水 1000 mL、pH 自然。马丁氏培养基: $KH_2PO_4$  1 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g、蛋白胨 5 g、葡萄糖 10 g、琼脂 15~20 g、水 1000 mL,此培养基 1000 mL 加 1% 孟加拉红水溶液 3.3 mL。

临用时每 100 mL 培养基中加 1% 链霉素液 0.3 mL。固体发酵培养基:称取 10 g 固体发酵基质,装入 250 mL 三角瓶中,121℃ 下灭菌 30 min,烘干待用。

1.2.2 孢子悬液的制备 PDA 平板接菌放置在恒温培养箱,温度设置在 28℃,8 天后取出,在平板中添加 10 mL 左右的无菌水,并用无菌的涂布棒来回刮洗平板制备孢子悬液,用血球计数板法测定孢子悬液中的孢子含量。

1.2.3 孢子量的检测 称取 10 g 发酵产物,加入 100 mL 无菌水及 5 粒玻璃珠(破碎混合均匀)至三角瓶中,摇床设置在 28℃,振荡 30 min,四层灭菌纱布过滤后测定孢子悬液的孢子量,用马丁氏培养基通过梯度稀释依次涂布的方法进行准确计数,测定发酵物的含水量,得到每克干物质孢子量,每个处理 4 次重复。

1.2.4 固体发酵培养方式 在 10 g 发酵基质中,加入 15 mL 无菌水及 5 mL 孢子悬液,搅拌均匀,分别放入三角瓶(三角瓶法)、自封袋(袋装法<sup>[20]</sup>)和方盒(浅盘平板法<sup>[21]</sup>) 28℃ 培养 7 天。按 1.2.3 方法检测发酵物中孢子量。

#### 1.2.5 固体发酵条件的单因素优化试验方法

1) 培养温度:在 10 g 发酵基质中,加入 15 mL 无菌水混匀,加入 5 mL 菌液,搅拌均匀,设置温度梯度 24℃、26℃、28℃、30℃、32℃ 浅盘培养 7 天。按 1.2.3 方法检测发酵物中孢子量。

2) 酸浓度:在 10 g 发酵基质中,分别加入 15 mL 浓度为 0.2 mol/L、0.1 mol/L、0.01 mol/L、 $1 \times 10^{-3}$  mol/L、 $1 \times 10^{-4}$  mol/L 和  $1 \times 10^{-5}$  mol/L( $10^{-3} \sim 10^{-5}$ ,稀释得到)的稀硝酸以及超纯水,搅拌均匀,静置 8 小时,再加入 5 mL 菌液,搅拌均匀,28℃ 浅盘培养 8 天。按 1.2.3 方法检测发酵物中孢子量。

3) 酸种类:在 10 g 发酵基质中,分别加入 0.1 mol/L 的硝酸、硫酸、盐酸、磷酸的灭菌稀酸溶液 15 mL,搅拌均匀,静置 8 小时,加入 5 mL 菌液,搅拌均匀,28℃ 浅盘培养 7 天。按 1.2.3 方法检测发酵物中孢子量。

4) 含水量:在 10 g 发酵基质中,加入 0.1 mol/L 的硝酸溶液,静置 8 小时,再加入 5 mL 菌液,使含水量分别达到 50%、60%、70%、75%、80%(湿基)后,搅拌均匀,28℃ 浅盘培养 7 天。按 1.2.3 方法检测发酵物中孢子量。

5) 接种量:在 10 g 发酵基质中,加入 0.1 mol/L 的稀硝酸 25 mL,搅拌均匀,静置 8 小时,再加入 1%、3%、5%、7%、9% 等不同浓度的菌液 5 mL,

并使含水量达 75%, 搅拌均匀, 28℃ 浅盘培养 7 天。按 1.2.3 方法检测发酵物中孢子量。

6) 氮源: 在 10 g 发酵基质中, 加入 0.1 mol/L 的稀硝酸 25 mL, 分别加入 1% 的蛋白胨、酵母粉、尿素、硝酸钾、硫酸铵搅拌均匀, 静置 8 小时, 再加入 3% 的菌液 5 mL, 含水量 75%, 搅拌均匀, 28℃ 浅盘培养 7 天。按 1.2.3 方法检测发酵物中孢子量。

7) 碳源: 在 10 g 发酵基质中, 加入 0.1 mol/L 的稀硝酸 25 mL, 1% 的尿素, 分别加入 1% 的玉米粉、小麦粉、大豆粉、葡萄糖、蔗糖, 搅拌均匀, 静置 8 小时, 再加入 3% 的菌液 5 mL, 含水量 75%, 搅拌均匀, 28℃ 浅盘培养 7 天。按 1.2.3 方法检测发酵物中孢子量。

1.2.6 发酵时间 在 10 g 发酵基质中, 加入 0.1 mol/L 的稀硝酸 25 mL, 1% 的尿素, 1% 的玉米粉搅拌均匀, 静置 8 小时, 再加入 3% 的菌液 5 mL, 含水量 75%, 搅拌均匀, 28℃ 培养, 从第 2 天开始取样至第 10 天。按 1.2.3 方法检测发酵物中孢子量。

1.3 发酵条件正交优化设计

选取发酵条件中影响最大的 6 个因子: 温度、酸浓度、含水量、接种量、氮源 (选取尿素)、碳源 (选取玉米粉), 通过正交试验进一步优化培养基的发酵条件。选用 6 因素 5 水平的  $L_{25}(5^6)$  正交表进行试验, 正交试验因素及水平见表 1, 共安排 25 个试验组, 每个试验组 3 次重复。

表 1 正交试验因素水平表  
Table 1 Factors and levels of the orthogonal test

| 因素<br>Factor                   | 水平 Level |      |     |      |      |
|--------------------------------|----------|------|-----|------|------|
|                                | 1        | 2    | 3   | 4    | 5    |
| 温度 Temperature (℃)             | 24       | 26   | 28  | 30   | 32   |
| 酸浓度 Acid concentration (mol/L) | 0.2      | 0.15 | 0.1 | 0.05 | 0.01 |
| 含水量 Water content (%)          | 65       | 70   | 75  | 80   | 85   |
| 接种量 Inoculation amount (%)     | 1        | 3    | 5   | 7    | 9    |
| 氮源 N source (%)                | 0        | 0.5  | 1   | 1.5  | 2    |
| 碳源 C source (%)                | 0        | 0.5  | 1   | 1.5  | 2    |

1.4 盆栽试验设计及测定方法

试验分 2 季, 第 1 季于 2016 年 4~6 月, 收获后, 盆栽用土暴晒 3 天, 混合均匀, 重新装盆; 第 2 季于 2016 年 7~9 月在江苏宜兴中宜生物肥料工程中心温室内进行。试验设 5 个处理: 1) 不施肥 (CK); 2) 尿素 0.814 g/钵, 过磷酸钙 1.486 g/钵, 硫酸钾 0.935 g/钵 (化肥 CCK); 3) 猪粪有机肥 (干重)

40 g/钵, 氮磷钾养分施用量与化肥处理相等 (有机肥 OCK); 4) 化肥+木霉发酵物 (干重) 4 g/钵 (CT); 5) 猪粪有机肥 (干重) 40 g/钵+木霉发酵物 (干重) 4 g/钵 (OT)。每个处理 6 次重复。每钵装土 3 kg。肥料与土壤搅拌均匀后分别装入盆钵, 将长势均匀的两叶一心的健康黄瓜苗移植到盆钵里面。温室内按日常栽培方法管理。培养至 1 个月后, 按常规方法测定各处理的株高、叶面积及地上部干重。叶面积选取每株黄瓜苗由下至上按叶片顺序同一位置 (第 6 片叶), 测量其长度和宽度, 计算面积 (长 × 宽)。

真菌群落及木霉菌计数: 土壤中真菌总数和木霉菌数的测定采用平板稀释涂布计数法, 称取根际土 5 g 溶于 45 mL 无菌水中, 振荡 30 min 保证土样与无菌水混合均匀后进行梯度稀释, 总真菌稀释涂布于马丁氏培养基平板上, 28℃ 培养平板计数。木霉菌稀释涂布于木霉选择性培养基<sup>[22]</sup>: 马丁氏培养基用前加入 1% 氯霉素 25 mL/L、3% 链霉素 3 mL/L、五氯硝基苯 0.2 g/L、曲拉通 1 mL/L、霜霉威 1.2 mL/L。

1.5 数据分析

采用 Origin8.5 和 SPSS 软件进行数据统计分析并作图, 使用最小显著差异法 (Least significant difference, LSD) 检验进行多重比较 ( $P < 0.05$ )。

2 结果与分析

2.1 固体发酵培养方式

为找到适合木霉菌大量培养的发酵方式, 本研究对三角瓶法、袋装法和浅盘法三种培养方式进行对比。结果表明, 使用袋装法和浅盘法的孢子产量比三角瓶法高 1 倍, 其中使用浅盘平板法所产生的孢子最多, 可达到  $1.06 \times 10^8$  个/g (图 1)。

2.2 固体发酵单因素条件优化

2.2.1 培养温度 温度对微生物生长及固体发酵产生很大的影响, 不同的发酵温度对木霉产孢的影响不同。表 2 表明, 在 28℃ 时孢子产量最高, 达到  $1.34 \times 10^8$  个/g, 其中温度低于 28℃ 时, 木霉的产孢量要大于 30℃ 及 32℃, 因此 28℃ 左右是木霉固体发酵的最佳产孢温度。在接种木霉后的前 3 天, 当温度在 30℃ 及 32℃ 时, 可能是由于培养基上的菌丝生长受到高温抑制, 因而后期的孢子产量较低; 在 24℃ 和 26℃ 时, 菌丝生长速度减缓, 直接影响到孢子的形成。

2.2.2 酸浓度 前期预备试验及查阅文献发现, pH 值对基质产孢量的影响较大。研究采用硝酸溶液调节固体基质的 pH, 基质的 pH 对产孢量的影响差异

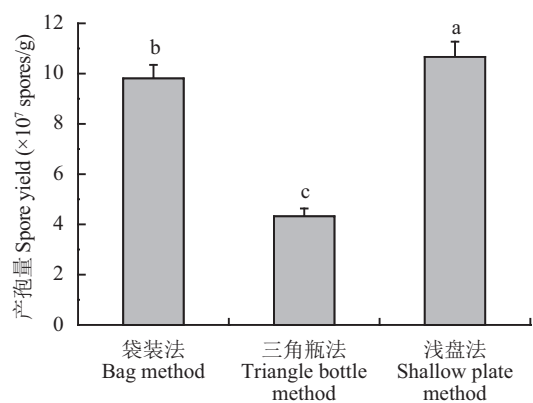


图 1 哈茨木霉 T-E5 在三种培养方式下的产孢量

Fig. 1 Sporulation of *Trichoderma harzianum* T-E5 in three culture modes

[注 (Note): 柱上不同字母表示处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )  
Different letters above the bars indicate significant difference among the treatments ( $P < 0.05$ ).]

显著。直接在固体秸秆物质中调节酸度, 容易出现固体基质 pH 调节不稳定, 木霉不能进行有效的生长, 因此本实验通过加入不同浓度梯度的酸液对固体基质进行调节, 以期达到调节均一稳定的状态。采用 0.1 mol/L 的硝酸溶液进行调节, 固体发酵产物产生的分生孢子产孢量最高, 达到  $1.24 \times 10^8$  个/g, 与超纯水处理相比增加了 2 个数量级。而采用 0.01 mol/L、 $1 \times 10^{-3}$  mol/L、 $1 \times 10^{-4}$  mol/L 和  $1 \times 10^{-5}$  mol/L 的硝酸溶液处理的产孢量均出现降低的现象 (表 2)。

2.2.3 酸种类 pH 对微生物的生长有很大影响, 本实验通过添加相同浓度的四种常用酸溶液进行固体基质 pH 的调节。结果表明, 不同的酸类对木霉孢子的产生具有显著的影响。如表 2 所示, 四种酸均能调节基质 pH, 同时提高木霉固体发酵孢子的产量, 其中以硝酸作为固体发酵培养基的酸度调节剂时尤为显著, 达到  $3.0 \times 10^8$  个/g。

表 2 不同固体发酵单因素条件下的产孢量

Table 2 Spores produced under different single factor condition in solid state fermentation

| 处理<br>Treatment                   | 水平<br>Level          | 产孢量 ( $\times 10^7$ spores/g)<br>Sporulation | 处理<br>Treatment               | 水平<br>Level                                     | 产孢量 ( $\times 10^7$ spores/g)<br>Sporulation |
|-----------------------------------|----------------------|----------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| 培养温度 (°C)<br>Culture temperature  | 24                   | 7.50 $\pm$ 0.69 b                            | 接种量 (%)<br>Inoculation amount | 1                                               | 56.39 $\pm$ 5.49 b                           |
|                                   | 26                   | 5.86 $\pm$ 1.12 bc                           |                               | 3                                               | 72.95 $\pm$ 4.61 a                           |
|                                   | 28                   | 13.44 $\pm$ 1.27 a                           |                               | 5                                               | 62.97 $\pm$ 5.99 b                           |
|                                   | 30                   | 5.47 $\pm$ 1.30 c                            |                               | 7                                               | 33.99 $\pm$ 6.66 d                           |
|                                   | 32                   | 5.86 $\pm$ 1.22 bc                           |                               | 9                                               | 45.36 $\pm$ 7.37 c                           |
| 酸浓度 (mol/L)<br>Acid concentration | 0.2                  | 0 $\pm$ 0                                    | 氮源 (1%)<br>Nitrogen source    | 蛋白胨 Peptone                                     | 64.61 $\pm$ 4.26 c                           |
|                                   | 0.1                  | 12.38 $\pm$ 0.57 a                           |                               | 酵母粉 Yeast                                       | 74.07 $\pm$ 3.26 b                           |
|                                   | 0.01                 | 1.16 $\pm$ 0.12 b                            |                               | 尿素 Urea                                         | 116.93 $\pm$ 9.28 a                          |
|                                   | $1 \times 10^{-3}$   | 0.34 $\pm$ 0.027 cd                          |                               | KNO <sub>3</sub>                                | 32.99 $\pm$ 5.22 e                           |
|                                   | $1 \times 10^{-4}$   | 0.63 $\pm$ 0.025 c                           |                               | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0.62 $\pm$ 0.092 f                           |
|                                   | $1 \times 10^{-5}$   | 0.17 $\pm$ 0.011 d                           |                               | (NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> | 43.06 $\pm$ 6.65 d                           |
| 超纯水 Ultra-pure water              |                      | 0.25 $\pm$ 0.035 d                           | 碳源 (1%)<br>Carbon source      | 玉米粉 Corn flour                                  | 662.0 $\pm$ 47.13 a                          |
| 酸类<br>Acid                        | 磷酸 Phosphoric acid   | 17.46 $\pm$ 3.67 b                           |                               | 小麦粉 Wheat flour                                 | 526.0 $\pm$ 32.91 b                          |
|                                   | 硫酸 Sulfuric acid     | 10.75 $\pm$ 0.56 c                           |                               | 大豆粉 Soybean flour                               | 467.3 $\pm$ 18.01 b                          |
|                                   | 盐酸 Hydrochloric acid | 14.59 $\pm$ 2.06 bc                          |                               | 葡萄糖 Glucose                                     | 469.5 $\pm$ 33.53 b                          |
|                                   | 硝酸 Nitric acid       | 30.07 $\pm$ 5.70 a                           |                               | 蔗糖 Sucrose                                      | 437.0 $\pm$ 21.50 b                          |
| 含水量 (%)<br>Water content          | 50                   | 2.38 $\pm$ 0.59 d                            |                               |                                                 |                                              |
|                                   | 60                   | 4.59 $\pm$ 0.31 c                            |                               |                                                 |                                              |
|                                   | 70                   | 18.19 $\pm$ 1.02 b                           |                               |                                                 |                                              |
|                                   | 75                   | 27.42 $\pm$ 2.37 a                           |                               |                                                 |                                              |
|                                   | 80                   | 19.20 $\pm$ 1.54 b                           |                               |                                                 |                                              |

注 (Note): 同列数据后不同字母表示同一因素不同水平之间差异显著 ( $P < 0.05$ ) Values followed by different letters in a column indicate significant difference among different levels for the same factor ( $P < 0.05$ ).

**2.2.4 含水量** 不同含水量对于木霉孢子的产生具有显著的影响。如表 2 所示, 含水量在 70%~80% 时木霉孢子产量较高, 其中 75% 含水量时孢子产量达到最高  $2.74 \times 10^8$  个/g。含水量在 80% 时, 相比 75% 含水量木霉孢子产量下降 30% 左右。而含水量在 50%~60% 时, 由于培养基较干, 不适宜木霉菌的生长, 产孢量较低。因此在以小麦秸秆作为发酵培养基时, 初始含水量在 75% 时为最适。

**2.2.5 接种量** 木霉接种量对固体发酵的产孢量影响较为明显。在分别加入 1%、3%、5%、7%、9% 接种量的孢子悬液培养 8 天后, 取样测定孢子数。表 2 表明, 1%、5%、7%、9% 的处理木霉的产孢量显著 ( $P < 0.05$ ) 低于 3% 的处理。接种量过低, 木霉在固体基质中的生物量较低; 而接种量过高时, 菌体之间的养分竞争作用增加也不利于木霉生长。

**2.2.6 氮源** 添加 1% 的不同氮源对木霉孢子的产量有显著性的影响 (表 2)。以尿素作为外加氮源时, 木霉孢子产量最高, 可达到  $1.17 \times 10^9$  个/g。以蛋白胨和酵母粉作为氮源时孢子产量分别为  $6.46 \times 10^8$  个/g 和  $7.41 \times 10^8$  个/g, 两者差异显著。而以磷酸铵、硝酸钾、硫酸铵作为外加氮源时孢子产量较低, 相比尿素处理, 磷酸铵处理产孢量下降 62.87%; 硝酸钾处理下降 71.56%; 而硫酸铵处理产孢量下降了 2 个数量级, 这与酸种类实验中使用硫酸处理产孢量较低的趋势相似, 可能与硫能够抑制微生物生长作用相关。

**2.2.7 碳源** 试验选取玉米粉等五种碳源作为添加物, 旨在增加接入菌液后发酵前期的孢子萌发率及菌丝生长量。考虑到生产成本, 故确定其添加量为 1%。添加碳源玉米粉、小麦粉、大豆粉、葡萄糖及蔗糖, 木霉孢子产量分别是  $6.62 \times 10^9$ 、 $5.26 \times 10^9$ 、 $4.67 \times 10^9$ 、 $4.69 \times 10^9$ 、 $4.37 \times 10^9$  个/g。添加碳源均能提高产孢量, 其中以玉米粉处理的木霉孢子产量增加最高。

## 2.3 发酵时间

为确定发酵时间对木霉孢子生长的影响, 从接种后的第 24 h 开始取样, 作为发酵取样的第 1 天, 之后连续取样 10 天。图 2 结果表明, 哈茨木霉在固体发酵培养基上, 1~3 d 产孢量较低; 4~8 d 产孢量大幅度增加; 第 8 d 达到最大值  $5.11 \times 10^9$  个/g。故确定哈茨木霉 T-E5 的最佳发酵时间为 8 天。以上述单因素发酵条件为基础, 浅盘发酵 8 天, 最终木霉菌孢子产量可达  $8.87 \times 10^9$  个/g。

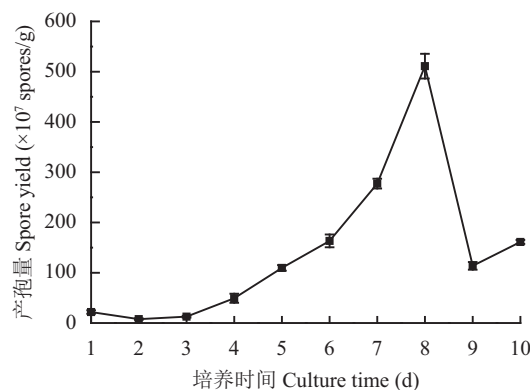


图 2 哈茨木霉 T-E5 在 10 天内孢子产量趋势

Fig. 2 *Trichoderma harzianum* T-E5 spore yield trends in 10 days

## 2.4 发酵条件的正交优化结果

为了优化发酵条件, 进行了六因素五水平  $L_{25}(5^6)$  的正交试验, 选择温度、酸浓度、含水量、接种量、尿素及玉米粉加入量作为 6 个因素。结果 (表 3) 表明, 试验 19 得到的发酵条件下基质的平均产孢量最高达到  $1.10 \times 10^{10}$  个/g, 故选择发酵条件为: 添加硝酸浓度为 0.05 mol/L、含水量 70%、尿素 1%、不添加玉米粉、接种量为 9%、30℃ 下培养 8 天。

优化后的发酵培养基配方为每 10 g 小麦秸秆, 加入浓度为 0.05 mol/L 的硝酸 18.3 mL 调节基质酸度值, 接种 9% 的菌液 5 mL, 含水量 70%(湿基), 添加尿素的量为 1%, 30℃ 浅盘培养 8 天。

## 2.5 木霉发酵物对黄瓜生长的影响

**2.5.1 干重** 两季盆栽结果 (表 4) 显示, OT 处理效果最好, CT 和 OCK 次之, CK 最差。可见, 木霉秸秆发酵物配施肥料比单施肥料对黄瓜的干物量积累更具有积极的促进作用。第一季的 CT 处理比 CCK 处理的干重增加 14.97%, OT 比 OCK 增加 10.62%; 第二季的 CT 处理的干重比 CCK 增加 12.83%, OT 比 OCK 增加 5.96%。

**2.5.2 株高** OT 处理的黄瓜植株明显高于其他四个处理 (表 4)。与有机肥处理相比较, 化肥处理的黄瓜株高较低。两季盆栽 CT 处理比 CCK 处理株高分别增加 16.75% 和 11.49%, OT 处理比 OCK 处理分别增加 26.06% 和 34.29%。其中第一季 OT 处理的株高明显高于 CT 处理。说明木霉发酵物配施有机肥能明显促进黄瓜植株的株高。

**2.5.3 叶面积** 第 1 季和第 2 季盆栽的叶面积, CT 处理比 CCK 处理分别增加 14.64% 和 26.93%, OT 处理相比 OCK 处理分别增加了 9.53% 和 18.01%。

表 3 发酵条件的正交优化结果  
Table 3 Orthogonal optimization of the fermentation conditions

| 组号<br>No. | 温度水平<br>Temperature | 酸浓度水平<br>Acid concentration | 含水量水平<br>Water content | 接种量水平<br>Inoculation amount | 尿素水平<br>Urea | 玉米粉水平<br>Corn flour | 孢子量 (No./g)<br>Spores amount |
|-----------|---------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------------|--------------|---------------------|------------------------------|
| 1         | 1                   | 1                           | 1                      | 1                           | 1            | 1                   | $3.00 \times 10^6$           |
| 2         | 1                   | 2                           | 2                      | 2                           | 2            | 2                   | $5.44 \times 10^8$           |
| 3         | 1                   | 3                           | 3                      | 3                           | 3            | 3                   | $3.43 \times 10^9$           |
| 4         | 1                   | 4                           | 4                      | 4                           | 4            | 4                   | $1.54 \times 10^9$           |
| 5         | 1                   | 5                           | 5                      | 5                           | 5            | 5                   | $3.72 \times 10^6$           |
| 6         | 2                   | 1                           | 2                      | 3                           | 4            | 5                   | $3.90 \times 10^7$           |
| 7         | 2                   | 2                           | 3                      | 4                           | 5            | 1                   | $2.71 \times 10^6$           |
| 8         | 2                   | 3                           | 4                      | 5                           | 1            | 2                   | $3.60 \times 10^5$           |
| 9         | 2                   | 4                           | 5                      | 1                           | 2            | 3                   | $3.47 \times 10^9$           |
| 10        | 2                   | 5                           | 1                      | 2                           | 3            | 4                   | $5.10 \times 10^5$           |
| 11        | 3                   | 1                           | 3                      | 5                           | 2            | 4                   | $3.14 \times 10^3$           |
| 12        | 3                   | 2                           | 4                      | 1                           | 3            | 5                   | $6.90 \times 10^4$           |
| 13        | 3                   | 3                           | 5                      | 2                           | 4            | 1                   | $3.93 \times 10^5$           |
| 14        | 3                   | 4                           | 1                      | 3                           | 5            | 2                   | $1.71 \times 10^3$           |
| 15        | 3                   | 5                           | 2                      | 4                           | 1            | 3                   | $7.31 \times 10^8$           |
| 16        | 4                   | 1                           | 4                      | 2                           | 5            | 3                   | $2.60 \times 10^5$           |
| 17        | 4                   | 2                           | 5                      | 3                           | 1            | 4                   | 0                            |
| 18        | 4                   | 3                           | 1                      | 4                           | 2            | 5                   | $3.29 \times 10^9$           |
| 19        | 4                   | 4                           | 2                      | 5                           | 3            | 1                   | $1.10 \times 10^{10}$        |
| 20        | 4                   | 5                           | 3                      | 1                           | 4            | 2                   | $2.04 \times 10^5$           |
| 21        | 5                   | 1                           | 5                      | 4                           | 3            | 2                   | $7.90 \times 10^2$           |
| 22        | 5                   | 2                           | 1                      | 5                           | 4            | 3                   | $3.94 \times 10^7$           |
| 23        | 5                   | 3                           | 2                      | 1                           | 5            | 4                   | $5.00 \times 10^5$           |
| 24        | 5                   | 4                           | 3                      | 2                           | 1            | 5                   | $5.06 \times 10^8$           |
| 25        | 5                   | 5                           | 4                      | 3                           | 2            | 1                   | $8.45 \times 10^8$           |

表 4 不同肥料处理对黄瓜生长指标的影响  
Table 4 Effects of different fertilizer treatments on cucumber growth

| 处理<br>Treatment | 第一季 First season     |                         |                                     | 第二季 Second season    |                         |                                     |
|-----------------|----------------------|-------------------------|-------------------------------------|----------------------|-------------------------|-------------------------------------|
|                 | 干重 (g)<br>Dry weight | 株高 (cm)<br>Plant height | 叶面积 (cm <sup>2</sup> )<br>Leaf area | 干重 (g)<br>Dry weight | 株高 (cm)<br>Plant height | 叶面积 (cm <sup>2</sup> )<br>Leaf area |
| CK              | 2.78 ± 0.18 c        | 41.16 ± 3.73 c          | 82.06 ± 10.50 c                     | 5.06 ± 0.57 c        | 46.62 ± 6.30 d          | 129.52 ± 6.61 c                     |
| CCK             | 6.58 ± 0.44 b        | 59.70 ± 8.50 b          | 140.60 ± 11.60 b                    | 7.62 ± 0.55 b        | 59.34 ± 5.10 bc         | 158.26 ± 16.43 b                    |
| CT              | 7.57 ± 0.26 a        | 66.68 ± 3.98 b          | 161.19 ± 7.27 a                     | 8.60 ± 0.63 a        | 66.16 ± 6.08 ab         | 200.89 ± 13.11 a                    |
| OCK             | 6.93 ± 0.21 b        | 60.84 ± 7.62 b          | 139.70 ± 10.60 b                    | 8.48 ± 0.75 a        | 54.58 ± 9.79 cd         | 162.23 ± 22.89 b                    |
| OT              | 7.67 ± 0.53 a        | 76.70 ± 9.36 a          | 153.03 ± 17.90 ab                   | 8.98 ± 0.57 a        | 73.30 ± 8.32 a          | 191.45 ± 17.49 a                    |

注 (Note): 同列数值后不同字母表示处理间差异显著 ( $P < 0.05$ ) Values followed by different letters in a column indicate significant difference among treatments ( $P < 0.05$ ).

两季盆栽 CCK 和 OCK 处理的叶面积大小无显著差异且明显小于 CT 与 OT 处理。同时, CT 处理的叶面积略高于 OT 处理。说明木霉秸秆发酵物配施肥料可以明显促进黄瓜叶片的生长。

## 2.6 黄瓜根际总真菌及木霉数量

**2.6.1 总真菌数量** 从盆栽根际土中总真菌涂布计数结果 (图 3) 可知, 两季盆栽 CT 和 OT 处理的总真菌数量均显著高于其他处理, 且 CT 处理显著高于 OT 处理, 分别达到  $3.17 \times 10^5$ 、 $2.10 \times 10^5$  个/g 和  $2.31 \times 10^5$ 、 $1.91 \times 10^5$  个/g。这表明配施木霉菌的处理能够增加土壤中总真菌的数量。

**2.6.2 木霉菌数量** 从黄瓜根际土木霉菌涂布计数结果 (图 4) 可知, 两季盆栽 CT 和 OT 处理的木霉菌数

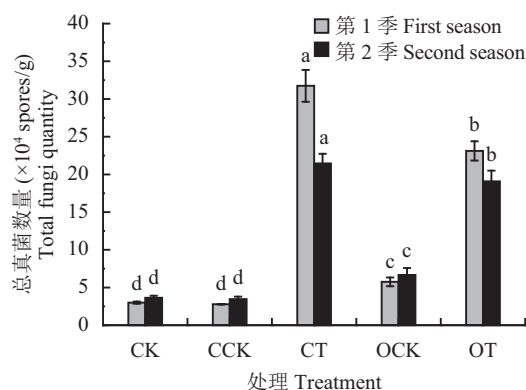


图 3 不同肥料处理下黄瓜根际土总真菌的数量

Fig. 3 Quantity of total fungi in rhizosphere soil of cucumber from different fertilizer treatments

[注 (Note): 柱上不同字母表示同季不同处理间差异显著 ( $P < 0.05$ ) Different letters above the bars indicate significant difference among treatments for the same season ( $P < 0.05$ ).]

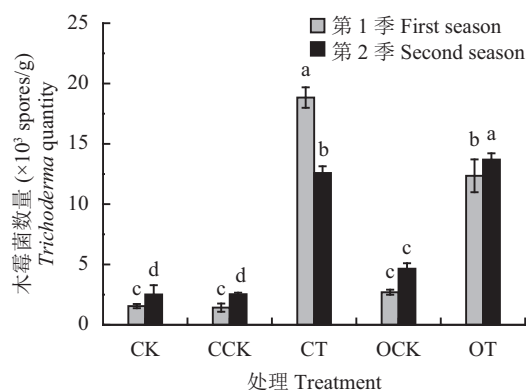


图 4 不同肥料处理下黄瓜根际土木霉菌的数量

Fig. 4 The *Trichoderma* quantity in the rhizosphere soil of cucumber from different fertilizer treatments

[注 (Note): 柱上不同字母表示同季不同处理间差异显著 ( $P < 0.05$ ) Different letters above the bars for the same season indicate significant difference among treatments ( $P < 0.05$ ).]

量均显著高于其他处理。其中第一季盆栽木霉菌数 CT 处理显著高于 OT 处理, 分别为  $1.88 \times 10^4$  和  $1.23 \times 10^4$  个/g; 而第二季盆栽中 OT 处理高于 CT 处理, 分别为  $1.37 \times 10^4$  和  $1.25 \times 10^4$  个/g。添加木霉发酵物的肥料处理中, 涂布得出的木霉菌数量要比未添加处理高 1 个数量级。结果表明, 添加发酵物的处理木霉菌数与总真菌数量相比较, 增加趋势相近, 且均能显著增加土壤中木霉菌的数量。

## 3 讨论与结论

我国小麦秸秆资源量大, 使用秸秆作为发酵基质有利于降低有高附加值的木霉生物有机肥的生产成本。本研究对木霉菌 T-E5 固体发酵条件进行了分析与优化。三种培养方式比较试验中, 平板法即浅盘发酵法的孢子产量明显高于三角瓶法和袋装法, 且采用浅盘法进行发酵有利于工厂化的扩大培养<sup>[23]</sup>。前期预备试验发现, 在不同 pH 值培养基下, 产孢量变化幅度较大。由于直接以秸秆即培养基自身的 pH 值来衡量酸度对木霉菌发酵的影响, 易出现基质 pH 值不稳定、不能有效掌控发酵条件、木霉不能良好生长的问题。由此, 通过单因子试验加入不同浓度的稀酸溶液对固体基质进行调节, 同时比较硫酸、盐酸、磷酸和硝酸四种常用酸对产孢量的影响, 其中加入 0.1 mol/L 硝酸溶液的发酵基质产孢量最大。与类似发酵相比较, 调低发酵基质 pH 值的做法在以往报道中出现较少。Li 等<sup>[24]</sup>在哈茨木霉 SH2303 产厚垣孢子的液体发酵优化实验中, 调节液体培养基的初始 pH 值为 4.17, 得到最大产孢量为  $4.5 \times 10^8$  个/mL。固体发酵培养基中, 水分含量的多少直接影响菌体的生长。含水量低, 培养基较干燥, 不利于菌株孢子萌发及菌丝的生长; 含水量高, 自由水太多, 培养基较湿润, 影响基质的透气性, 同样不利于菌株孢子萌发及菌丝的生长。曾庆才等<sup>[25]</sup>通过单因素试验获得当初初始含水量为 50% 时, 菌株 FJAT-9490 产孢量最大, 为  $3.67 \times 10^9$  个/g; 而张广志等<sup>[26]</sup>以玉米秸秆为培养基, 基质含水量在 60%~70% 时产孢量达到最高。这或许与所选用的培养基以及培养基的孔隙度不同有关。添加营养成分对木霉孢子产量有所影响。王永东等<sup>[27]</sup>在哈茨木霉 H-13 的固体发酵条件优化中添加蔗糖、蛋白胨、硝酸铵等碳源与氮源, 产孢量达到  $1.0 \times 10^{10}$  个/g。在实际生产发酵过程中, 除取样检测菌体生长量外, 还可通过发酵产物的外观判断是否终止发酵过程。综合分析表明, 本研究获得了以小麦秸秆为发酵基

质的哈茨木霉 T-E5 的固体发酵生产分生孢子的最佳条件。

木霉能够对植物的生长产生明显的影响, 可通过对根际微生态环境以及土壤中养分的循环产生直接或间接的影响, 微生物的活动直接增加根际养分的有效性、加速循环利用, 同时也能促进根系的生长发育, 间接影响养分的循环过程及其有效性<sup>[28-31]</sup>。哈茨木霉 SQRT037 是一株高效的植物促生菌, 可产生类植物激素 Harzianolide, 能够显著增加植株的根系长度和根尖数量<sup>[29]</sup>, 同时其可活化部分土壤难溶养分, 包括 P、Fe、Zn 和 Cu<sup>[30]</sup>。本试验采用的哈茨木霉 T-E5 是 SQRT037 经过紫外诱变得到的菌株稳定性更强、活性更高的木霉菌。哈茨木霉 T-E5 通过促进根系生长和根系分泌物的产生对植株的促生长效应已被验证<sup>[32-33]</sup>。木霉菌发酵产物的好坏直接影响其实际应用效果。本研究利用哈茨木霉 T-E5 固体发酵物制成的生物有机肥对黄瓜生长具有显著的促进作用。各生理指标的检测结果表明, 添加有机肥量 10% 的固体发酵产物处理黄瓜苗, 木霉固体发酵物配施肥料比单施肥料对黄瓜的干物质量、株高和叶面积有显著促进作用; 功能菌有效活菌数是生物有机肥在促进作物生长方面的关键因素<sup>[34]</sup>, 根际土总真菌和木霉菌数量结果表明, 促生作用是固体发酵物中哈茨木霉 T-E5 菌体成分为主发挥的作用, 而非固体发酵培养基质所起的作用。本试验结果为推广应用木霉生物有机肥提供了初步的理论基础, 今后应在中试和工厂化生产水平进一步研究木霉孢子固体发酵的工艺参数。

## 参 考 文 献:

- [1] 陈立华. 哈茨木霉及其微生物有机肥对黄瓜土传枯萎病的生物防治及其机理[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2011.  
Chen L H. Biological control and mechanism of *Trichoderma harzianum* and its microbial organic fertilizer on cucumber soil [D]. Nanjing: PhD Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2011.
- [2] Howell C R, Hanson L E, Stipanovic R D, Puckhaber L S. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*[J]. Phytopathol, 2000, 90: 248-252.
- [3] Gravel V, Antoun H, Tweddell R J. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA)[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 39: 1968-1977.
- [4] Yedidia I, Srivastva A K, Kapulnik Y, Chet I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants[J]. Plant and Soil, 2001, 235: 235-242.
- [5] 魏林. 哈茨木霉发酵液中对豇豆具促生活性物质的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学博士学位论文, 2005.  
Wei L. Study on the growth promoting substance of the fermentation liquid of *Trichoderma harzianum* on black straw crop [D]. Changsha: PhD Dissertation of Agricultural University of Hunan, 2005.
- [6] Vinale F D, Ambrosio G, Abadi K, et al. Application of *Trichoderma harzianum* (T22) and *Trichoderma atroviride* (PI) as plant growth promoters, and their compatibility with copper oxychloride[J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences), 2004, 30: 2-8.
- [7] 杨春林, 席亚东, 刘波微, 等. 哈茨木霉 T-h-30 对几种蔬菜的促生作用及病害防治初探[J]. 西南农业学报, 2008, (6): 1603-1607.  
Yang C L, Xi Y D, Liu B W, et al. Primary study on growth-promoting and biological control effects of *Trichoderma harzianum* T-h-30 on vegetable[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2008, (6): 1603-1607.
- [8] 穆红梅, 杨重军, 何宝玉. 哈茨木霉对三种作物种子萌发及生长的影响[J]. 吉林农业科学, 2014, (5): 5-7.  
Mu H M, Yang C J, He B Y. Impact of *Trichoderma* solution on seed germination and growth of three crops[J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 2014, (5): 5-7.
- [9] Masunaka A, Hyakumachi M, Takenaka S. Plant growth-promoting fungus, *Trichoderma koningi* suppresses isoflavonoid phytoalexin vestitol production for colonization on/in the roots of *Lotus japonicas*[J]. Microbes and Environments, 2011, 26: 128-134.
- [10] Sun T, Liu B H, Liu D M, Li Z H. Effect of elevated temperature on *Trichoderma viride* SL-1 in solid state fermentations[J]. Biotechnology Letters, 1997, 19: 171-174.
- [11] Sanjay K, Samiran S G, Arpan D, et al. Process optimization of xylanase production using cheap solid substrate by *Trichoderma reesei* SAF3 and study on the alteration of behavioral properties of enzyme obtained from SSF and SmF[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2013, 36: 57-68.
- [12] Araújo A A D, Pastore G M, Berger R G. Production of coconut aroma by fungi cultivation in solid-state fermentation[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2002, 98: 747-751.
- [13] Verma M, Brar S K, Tyagi R D, et al. Wastewater sludge as a potential raw material for antagonistic fungus (*Trichoderma sp.*): role of pre-treatment and solids concentration[J]. Water Research, 2005, 39: 3587-3596.
- [14] Verma M, Brar S K, Tyagi R D, et al. Dissolved oxygen as principal parameter for conidia production of biocontrol fungi *Trichoderma viride* in non-Newtonian wastewater[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2006, 33(11): 941-952.
- [15] 张良, 纪明山, 张玉芬, 宋佳. 绿色木霉 TR-8 发酵工艺条件筛选[J]. 沈阳农业大学学报, 2005, 36(4): 494-496.  
Zhang L, Ji M S, Zhang Y F, Song J. Screening of fermentation conditions of *Trichoderma viride* TR-8 strain[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2005, 36(4): 494-496.
- [16] Holker U, Lenz J. Solid-state fermentation-are there any biotechnological advantages[J]. Current Opinion in Microbiology, 2005, 8(3): 301-306.
- [17] Nigam P S, Pandey A. Solid-state fermentation technology for

- bioconversion of biomass and agricultural residues[A]. Niqam P S N, Pandey A. Biotechnology for agro-industrial residues utilisation [M]. Springer Netherlands, 2009, 197–221.
- [18] Raghavarao K S M S, Ranganathan T V, Karanth N G. Some engineering aspects of solid-state fermentation[J]. Biochemical Engineering Journal, 2003, 13(2–3): 127–135.
- [19] 张风革. 哈茨木霉诱变菌株T-E5及其生物有机肥对黄瓜生长的影响及机理研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2015.
- Zhang F G. The Effects and mechanisms of putative *Trichoderma harzianum* mutant T-E5 and its bio-organic fertilizer on growth of cucumber [D]. Nanjing: PhD Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2015.
- [20] 肖荣凤, 刘波, 唐建阳, 等. 哈茨木霉FJAT-9040生防菌剂固体发酵及其对苦瓜枯萎病的防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2015, (4): 508–515.
- Xiao R F, Liu B, Tang J Y, *et al.* Solid-state fermentation of biocontrol agent *Trichoderma harzianum* FJAT-9040 and its efficiency against bitter melon fusarium wilt[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2015, (4): 508–515.
- [21] 梁昌聪, 刘磊, 张建华, 等. 绿色木霉菌H06固体浅盘发酵工艺优化[J]. 菌物学报, 2014, 33(6): 1313–1326.
- Liang C C, Liu L, Zhang J H, *et al.* Optimization of shallow tray fermentation process of *Trichoderma viride* H06[J]. Mycosystema, 2014, 33(6): 1313–1326.
- [22] 康萍芝, 张丽荣, 沈瑞清, 等. 哈茨木霉制剂对设施连作番茄根际土壤微生物的生态效应及防病作用[J]. 农药, 2013, 52(2): 128–131.
- Kang P Z, Zhang L R, Shen R Q, *et al.* Ecological effect of *Trichoderma harzianum* preparations on rhizosphere soil microbes in facilities continuous cropping tomato and their disease prevention[J]. Agrochemicals, 2013, 52(2): 128–131.
- [23] 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, (8): 194–196.
- Yi Z X, Wang Z, Tan Z M. Study on production technical of spores by adopting *Koningii Trichoderma* solid-state fermentation[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2013, (8): 194–196.
- [24] Li Y Q, Song K, Li Y C, Chen J. Statistical culture-based strategies to enhance chlamydospore production by *Trichoderma harzianum* SH2303 in liquid fermentation[J]. Journal of Zhejiang University (Science B: Biomedicine & Biotechnology), 2016, 17(8): 619–627.
- [25] 曾庆才, 肖荣凤, 刘波, 等. 生防菌哈茨木霉FJAT-9040固体发酵条件的响应面优化[J]. 福建农业学报, 2015, (2): 192–197.
- Zeng Q C, Xiao R F, Liu B, *et al.* Optimization of solid-state fermentation condition for the biocontrol strain of *Trichoderma harzianum* FJAT-9040 by response surface methodology[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2015, (2): 192–197.
- [26] 张广志, 李纪顺, 扈进冬, 等. 利用玉米秸秆培养木霉菌分生孢子的研究[J]. 中国农学通报, 2013, 29(15): 169–172.
- Zhang G Z, Li J S, Hu J D, *et al.* Study on utilizing corn stalk to cultivate conidiophore of *Trichoderma* spp.[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(15): 169–172.
- [27] 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, 32(6): 645–650.
- Wang Y D, Jiang L K, Yue Y D, *et al.* Studies on the solid fermentation conditions for the biocontrol agents of *Trichoderma harzianum* strain H-13[J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences), 2006, 32(6): 645–650.
- [28] 李成亮, 黄波, 孙强生, 等. 控释肥用量对棉花生长特性和土壤肥力的影响[J]. 土壤学报, 2014, 51(2): 295–305.
- Li C L, Huang B, Sun Q S. Effects of application rates of controlled release fertilizers on cotton growth and soil fertility[J]. Acta Pedologica Sinica, 2014, 51(2): 295–305.
- [29] Cai F, Yu G, Wang P, *et al.* Harzianolide, a novel plant growth regulator and systemic resistance elicitor from *Trichoderma harzianum*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2013, 73: 106–113.
- [30] Li R X, Cai F, Pang G, *et al.* Solubilisation of phosphate and micronutrients by *Trichoderma harzianum* and its relationship with the promotion of tomato plant growth[J]. Plos One, 2015, 10(6): e0130081.
- [31] Cai F, Chen W, Wei Z, *et al.* Colonization of *Trichoderma harzianum* strain SQR-T037 on tomato roots and its relationship to plant growth, nutrient availability and soil microflora[J]. Plant and Soil, 2015, 388: 337–350.
- [32] Zhang F G, Yuan J, Yang X M, *et al.* Putative *Trichoderma harzianum* mutant promotes cucumber growth by enhanced production of indole acetic acid and plant colonization[J]. Plant and Soil, 2013, 368: 433–444.
- [33] Zhang F G, Zhu Z, Yang X M, *et al.* *Trichoderma harzianum* T-E5 significantly affects cucumber root exudates and fungal community in the cucumber rhizosphere[J]. Applied Soil Ecology, 2013, 72: 41–48.
- [34] Wang B B, Yuan J, Zhang J, *et al.* Effects of novel bio-organic fertilizer produced by *Bacillus amyloliquefaciens* W19 on antagonism of *Fusarium* wilt of banana[J]. Biology and Fertility of Soils, 2013, 49: 435–446.