

DB15

内蒙古自治区地方标准

DB15/T 1622—2019

白灵菇菌种生产技术规程

Regulation of Strain Manufacture for *Pleurotus nebrodensis*

地方标准信息服务平台

2019-04-10 发布

2019-07-10 实施

内蒙古自治区市场监督管理局 发布

目 次

前言 II

1 范围 1

2 术语和定义 1

3 生产要求 2

4 母种生产 3

5 原种、栽培种生产 5

6 入库 8

7 留样 8

地方标准信息服务平台

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则编写。

本标准由内蒙古自治区农牧业科学院提出。

本标准由内蒙古自治区农业标准化技术委员会（SAM/TC 20）归口。

本标准起草单位：内蒙古自治区农牧业科学院、食用菌内蒙古自治区工程研究中心。

本标准主要起草人：孙国琴、庞杰、王海燕、于传宗、解亚杰、宋秀敏、潘永圣、高天云、李亚娇、郭俊波、云利俊、成建宏。

地方标准信息服务平台

白灵菇菌种生产技术规程

1 范围

本标准规定了白灵菇（*Pleurotus nebrodensis*）母种、原种和栽培种生产有关的定义、制作技术流程要点等。

本标准适用于工厂化生产企业和合作社生产白灵菇母种、原种和栽培种。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

白灵菇 *Pleurotus nebrodensis*

白灵菇（*Pleurotus nebrodensis*）又称翅鲍菇、百灵芝菇、克什米尔神菇、阿魏蘑、阿威侧耳、阿魏菇、雪山灵芝、鲍鱼菇等。隶属于侧耳属。是一种食用和药用价值都很高的珍稀食药菌，通体洁白、肉质细腻、味道鲜美。

2.2

菌种 *spawn*

菌丝体生长在适宜基质上具结实性的菌丝培养物。分为母种（一级种）、原种（二级种）和栽培种（三级种）三级。

2.3

母种 *stock culture*

经组织分离、孢子分离等方式获得的具有结实性的菌丝体纯培养物及其继代培养物，以玻璃试管或培养皿为培养容器和使用单位，也称为一级种、试管种。

2.4

原种 *pre-culture spawn*

由母种移植、扩大培养而成的菌丝体纯培养物，也称为二级种。

2.5

栽培种 *spawn*

由原种移植、扩大培养而成的菌丝体纯培养物，也称为三级种。栽培种只能用于扩大到栽培出菇袋或直接出菇，不可以再次扩大繁殖菌种。

2.6

固体菌种 solid spawn

以富含木质素、纤维素和半纤维素或淀粉含量高的谷物粒等天然有机物为主要原料，添加适量的有机氮源和无机盐类，具一定水分含量的培养基培养的纯菌丝体。是传统食用菌生产使用菌种状态，也用于菌种保存。

2.7

液体菌种 liquid spawn

培养基营养成分与母种相同、不加琼脂的液体培养基，通过摇瓶震荡培养或深层发酵技术快速获得的大量的纯双核菌丝体，菌丝体在液体培养基中呈絮状或球状。液体菌种可以作为原种或栽培种直接接种在固体培养袋中，不能进行菌种保存。

3 生产要求

3.1 人员

经过专业培训、掌握白灵菇基础知识及白灵菇菌种生产技术规程要求的技术人员和检验人员。

3.2 环境

3.2.1 应选择地势高，通风良好，空气清新，水源近，排水通畅，交通便利的场所。

3.2.2 300 m之内无酿造厂、无食用菌栽培场、集贸市场、规模养殖的畜禽舍、垃圾和粪便堆积场，无污水、废气、废渣、烟尘和粉尘等污染源。

3.3 设施

菌种生产厂房要求有各自隔离的摊晒场、原材料库、配料分装库。配套有配料室、搅拌室、装袋（瓶）室、灭菌室、冷却室、接种室、培养室（通风好，有纱窗）、菌种检测室及菌种冷藏库等各环节的设施。冷却室、接种室，培养室都要有离子净化设施。

3.4 设备

需要粉碎机、电子秤、搅拌机、装袋（瓶）机、高压灭菌锅或常压灭菌锅、离子净化器、超净工作台或接种箱、恒温培养箱、培养架、摇床、液体菌种罐（30 L~250 L）、显微镜等设备。

3.5 容器

3.5.1 母种生产容器

试管选用18 mm×180 mm或者20 mm×200 mm；培养皿选用直径7 cm~9 cm玻璃培养皿或一次性塑料培养皿。

3.5.2 原种、栽培种生产容器

3.5.2.1 固体菌种生产容器

3.5.2.1.1 原种采用 850 ml 以下、瓶口直径≤4 cm、耐 126 °C 高温的透明瓶子，或采用（12~17）cm×（22~28）cm 的聚丙烯塑料袋。

3.5.2.1.2 栽培种采用同原种要求相同的瓶子，也可采用（15~17）cm×（33~35）cm 的聚丙烯塑料袋。

3.5.2.2 液体菌种生产容器

3.5.2.2.1 三角瓶液体菌种容器：采用 150 ml~500 ml 三角瓶，带滤膜的封口膜。

3.5.2.2.2 液体菌种罐：采用专业厂家生产的液体菌种罐。

3.6 培养原料

3.6.1 硫酸镁、磷酸二氢钾、蛋白胨、蔗糖、葡萄糖、石膏、琼脂粉等均采用分析纯。

3.6.2 马铃薯、麦粒、谷粒、玉米粒、柠条粉、棉籽壳、木屑、玉米芯粉、豆秸粉要求无霉变。

4 母种生产

4.1 生产流程

见示例图1。

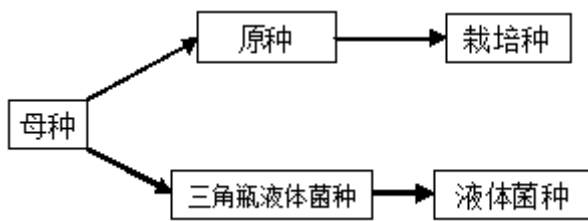


图1 菌种生产流程示例

4.2 培养基

以下培养基任选其一：

——新鲜无病去皮切片马铃薯 200 g，加水 1200 ml 煮沸 20 min，滤液定容至 1000 ml，加入硫酸镁 0.5 g、磷酸氢二钾 1 g、蛋白胨 1 g、蔗糖 10 g、葡萄糖 10 g、琼脂粉 8 g~10 g，pH 自然；

——新鲜无病去皮切片马铃薯 200 g 加水 600 ml 煮沸 20 min，滤液定容至 500 ml；新鲜无霉变的麦粒 100 g 加水 600 ml 煮沸 20 min，滤液定容至 500 ml，二者混合，加入硫酸镁 0.5 g、磷酸氢二钾 1 g、蔗糖 20 g、葡萄糖 10 g、琼脂粉 8 g~10 g，pH 自然。

4.3 分装、灭菌

4.3.1 母种培养基温度降到 90 ℃即可分装至不同容器。

4.3.2 试管母种生产

4.3.2.1 分装

母种培养基至试管1/4处，塞上棉塞（硅胶塞），用牛皮纸将试管5支一把包扎，棉塞（硅胶塞）向上放入灭菌筐内等待灭菌。

4.3.2.2 灭菌

121 ℃~122 ℃（0.11 MPa~0.12 MPa）保持25 min。

4.3.2.3 冷却

灭菌完毕后自然降压，降温至（65±5）℃左右时取出试管，在空气清洁的室内摆斜面，斜面长度不超过试管长度的2/3，自然降温凝固后成斜面。

4.3.3 培养皿母种生产

4.3.3.1 灭菌

培养基至300 ml～500 ml三角瓶2/3处，用带滤膜的封口膜封口后放入灭菌筐内。培养皿10个一组，用报纸或牛皮纸包好，与培养基一同放入灭菌筐内，等待灭菌。121℃～122℃（0.11 MPa～0.12 MPa）保持25 min。

4.3.3.2 分装和冷却

灭菌完毕后自然降压，降温至70℃±5℃时取出三角瓶和培养皿放入无菌超净工作台或接种箱内，将三角瓶内培养基摇匀后快速均匀倒入无菌培养皿中，培养基占培养皿高度的1/3～1/2。迅速盖好上盖。自然降温凝固后制成平板培养基。

4.4 检测

抽取3%～5%的试管和培养皿，在28℃下培养48 h，无微生物长出为灭菌合格。

4.5 接种

4.5.1 在超净工作台或接种箱内接种，接种前用紫外灭菌灯照射30 min后打开风机20 min，之后用75%酒精进行表面消毒。

4.5.2 接种的菌块3 mm左右，菌种块接种在培养皿或试管的中部，培养皿需用石蜡膜密封。

4.5.3 接菌过程严格执行无菌操作，接种后及时贴好标签并做好记录。

4.6 培养

洁净的培养箱或培养室内，温度控制在15℃～25℃，空气湿度在75%以下，通风避光暗培养。

4.7 母种检查

母种接种后第3天、第7天和菌丝体长满培养基后分别逐个进行检验，挑出未活、污染和生长不良的不合格培养物，拿到准备室及时进行淘汰处理。

表1 白灵菇母种感官要求

项目	要求
容器	完整、无损
棉塞或无菌塑料盖	干燥、整洁、松紧适度、能满足透气和过滤要求
培养基灌入量	为试管总容积的四分之一至五分之一
斜面长度	顶端距棉塞40 mm～50 mm

表1 （续）

项目		要求
菌种外观	菌丝生长量	长满斜面
	菌丝体特征	洁白、浓密、旺健、棉毛状
	菌丝体表面	均匀、舒展、平整、无角变
	菌丝体分泌物	无
	菌落边缘	整齐
	杂菌菌落	无
斜面背面外观		培养基不干缩，颜色均匀，无暗斑、无色素

5 原种、栽培种生产

5.1 固体菌种

5.1.1 培养基

以下培养基任选其一：

- A 粮食培养基。A1 谷粒、麦粒或玉米粒 90 %，柠条粉、棉籽壳、木屑、玉米芯粉或豆秸粉 9 %，石膏 1%，水分含量（50±2）%，石灰水调节 pH 至 7.5。
- B 组合培养基：
 - B1 锯木屑 60 %、玉米芯 19 %、麸子 20 %、石膏 1 %、水分含量（60±2）%、石灰水调节 pH 至 7.5；
 - B2 柠条粉 60 %、玉米芯 22 %、麸子 15 %、玉米粉 2 %、石膏 1 %、水分含量（60±2）%、石灰水调节 pH 至 7.5；
 - B3 豆秸粉 60 %、玉米芯 22 %、麸子 15 %、玉米粉 2 %、石膏 1 %、水分含量（60±2）%、石灰水调节 pH 至 7.5；
 - B4 棉籽壳 82 %、麸子 18 %、石膏 1 %、水分含量（60±2）%、石灰水调节 pH 至 7.5。

5.1.2 装袋（瓶）

培养基的多种组成按照比例称量干料搅拌均匀，边加水边混拌均匀，含水量60±2 %。采用装袋（瓶）机或人工进行装袋（瓶）培养料底部松上部较紧实，人工装袋（瓶）需用打孔器从袋（瓶）口处打孔致底部，孔直径1 cm~1.5 cm、深度是袋（瓶）的高度，无棉盖体或海绵封口。

5.1.3 灭菌

- 5.1.3.1 灭菌可选择高压灭菌和常压灭菌，培养基质装袋（瓶）后要求在 3h 之内使菌种袋表面温度达到 100 ℃。
- 5.1.3.2 常压灭菌：保持 100 ℃ 8 h~9 h。
- 5.1.3.3 高压灭菌：组合培养基维持 121 ℃~123 ℃（0.11 MPa~0.13 MPa）2 h；粮食培养基维持 121 ℃~123 ℃（0.11 MPa~0.13 MPa）2.5 h。

5.1.4 接种

- 5.1.4.1 原种、栽培种在超净工作台或接种箱内完成，打开紫外灯照射 30 min 后打开风机 20 min，然后用 75 %酒精对接种工具、手进行表面擦拭消毒。

5.1.4.2 原种接种：每支试管母种接种 5 袋~6 袋（瓶）原种，每个培养皿母种接种 8 袋~12 袋（瓶）原种。

5.1.4.3 栽培种接种：每个栽培种接入的原种量 15 g~20 g。原种块都要求从容器开口处接种，不能采用打孔多点接种方式。

5.1.4.4 要严格按无菌操作接种，每批接种应为单一品种，如中途换品种时采用 75 %酒精对超净工作台或接种箱进行表面擦拭消毒。

5.1.5 培养

温度控制在21℃~252℃，空气湿度在75 %以下，通风避光暗培养。

5.1.6 检验

接种后第7天、第10天和菌丝体长满袋（瓶）后，逐个全面检验，挑出未活、污染和生长不良及破损的不合格菌种袋（瓶），拿到准备室及时进行淘汰处理。

表2 白灵菇原种感官要求

项目		要求
容器		完整、无破损
棉塞或无菌塑料盖		干燥、整洁、松紧适度、能满足透气和滤菌要求
培养基上表面距瓶（袋）口的距离		(50±5) mm
菌种外观	菌丝生长量	长满容器
	菌丝体特征	洁白浓密，生长旺健
	培养物表面菌丝体	生长均匀，无角变，无高温抑制线
	培养基及菌丝体	紧贴瓶壁，无干缩
	菌丝分泌物	无，允许少量无色至棕黄色水珠
	杂菌菌落	无
	现象及角变	无
子实体原基		无

表3 白灵菇栽培种感官要求

项目		要求
容器		完整、无破损
棉塞或无菌塑料盖		干燥、整洁、松紧适度、能满足透气和滤菌要求
培养基上表面距瓶（袋）口的距离		(50±5) mm
菌种外观	菌丝生长量	长满容器
	菌丝体特征	生长均匀，色泽一致，无角变，无高温抑制线
	培养基及菌丝体	紧贴瓶壁，无干缩
	菌丝分泌物	无，允许少量无色至棕黄色水珠
	杂菌菌落	无
	现象及角变	无
	子实体原基	允许少量，出现原基种类≤5 %

5.1.7 贮存

5.1.7.1 原种和栽培种贮存条件在 1℃~4℃下贮存，贮存期不超过 70 d；在 15℃~20℃下贮存，贮存期不超过 30 d。

5.1.7.2 贮存摆放在层架或者贮存在菌种筐内。

5.2 液体菌种

5.2.1 培养基及制作

以下培养基任选其一：

——新鲜无病去皮切片马铃薯 200 g，加水 1200 ml 煮沸 20 min，滤液定容至 1000 ml，加入硫酸镁 0.5 g、磷酸氢二钾 1 g、蛋白胨 1 g、蔗糖 10 g、葡萄糖 10 g、琼脂粉 8 g~10 g，pH 自然；

——新鲜无病去皮切片马铃薯 200 g 加水 600 ml 煮沸 20 min，滤液定容至 500 ml；新鲜无霉变的麦粒 100 g 加水 600 ml 煮沸 20 min，滤液定容至 500 ml，二者混合，加入硫酸镁 0.5 g、磷酸氢二钾 1 g、蔗糖 20 g、葡萄糖 10 g、琼脂粉 8 g~10 g，pH 自然。

5.2.2 三角瓶液体菌种生产

5.2.2.1 装瓶

采用 150 ml~500 ml 三角瓶，培养基添加至刻度的 2/3 处，用带滤膜的封口膜封口后灭菌。

5.2.2.2 灭菌

121℃~122℃ (0.11 MPa~0.12 MPa) 保持 25 min 灭菌。

5.2.2.3 接种和培养

待液体培养基冷却至 30℃ 以下进行接种，接种量取 3 mm 大小 10 块~15 块母种放进液体培养基中，培养温度（在）21℃~25℃，振荡频率（搅拌速度）140 r/min~160 r/min 下振荡培养 6 d~9 d。

5.2.3 菌种罐液体菌种生产

5.2.3.1 装罐和灭菌

填装培养基至液体菌种罐 2/3 处，按照液体菌种罐说明书要求，对液体菌种罐和液体培养基灭菌，待液体培养基冷却至 30℃ 以下时进行接种。接种方式按照液体菌种罐说明书要求在无菌条件下严格操作。

5.2.3.2 接种和培养

将培养好的三角瓶液体菌种接入到液体菌种罐中，接种量为培养基总体积的 3%~5%，培养温度（23±2）℃，搅拌转速 150 r/min~160 r/min，灌压 0.04 MPa，通风量 0.7 Nm³/h，培养 7 d。

液体菌种转接不得超过 3 次。

5.2.4 检验

液体菌种接种后第 3 天对罐内培养基进行纯度检验，及时清理未活或污染的罐内培养基后，对液体菌种罐高压消毒。

表4 白灵菇液体菌种种感官要求

项目	要求
容器	完整、无破损、无裂纹
菌丝生长量	培养基 1/2~1/3
菌丝体特征	白色至透明块状，生长旺健，
培养基及菌丝体	清澈、无杂色
杂菌	无杂菌

6 入库

- 6.1 检验合格的固体菌种应及时入菌种库，详细记录各生产环节，液体菌种生产应该随用随生产，不能进行入库保存。
- 6.2 菌种库温度应该 1℃~4℃，避光，适当通风但应该对空气进行杀菌处理。母种在库中贮存时间不应长于 50 d，贮存时间超出 50 d 的母种应该进行出菇检验后再进行后续生产。
- 6.3 每隔 20 d 进行一次检查，提出破损、污染、生产异常的菌种。

7 留样

各级菌种均应留样，每批次留样3个（支），贮存在1℃~4℃，贮存至购买者购买后正常生产条件下出第一潮菇。