

云南省中药材种植养殖行业协会团体标准

T/YNZYC 0108-2023

绿色药材 乌天麻种植用蜜环菌生产技术 规程

Green Medicinal Materials Technique Regulations of Clostridium Production on
Gastrodia elata

2023-12-01 发布

2023-12-01 实施

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由云南省中药材种植养殖行业协会提出并归口。

本文件起草单位：昭通学院、昆明理工大学、云南省中药材种植养殖行业协会、云南森浩菌业有限责任公司、昭通市天麻研究院。

本文件主要起草人：杨顺强、程立君、崔秀明、杨野、苏豹、陈晓虹、申开泽、唐鹏、何海艳、杨成翠、韩多、张永至、段明政、李世波、缪家云。

全国团体标准

绿色药材 乌天麻种植用蜜环菌生产技术规程

1 范围

本文件规定了适用于昭通乌天麻种植的蜜环菌的技术要求、生产规范、标签、包装、运输和贮存。本文件适用于昭通乌天麻种植用蜜环菌的绿色规范化生产。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 4789.28 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求

GB 4806.1 食品安全国家标准 食品接触材料及制品通用安全要求

GB 5749 生活饮用水卫生标准

GB/T 191 包装储运图示标志

GB/T 6543 运输包装用单瓦楞纸箱和双瓦楞纸箱

GB/T 12728 食用菌术语

GB/T 41220 食品包装用复合塑料盖膜

NY/T 1935 食用菌栽培基质质量安全要求

NY/T 2375 食用菌生产技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

乌天麻

兰科天麻属植物 *Gastrodia elata* Bl. *f. glauca* S. Chow，其花萼、鳞片、花均呈灰乌色；块茎多呈宽卵形、卵形、椭圆形；含水量 60%~70%。

3.2

蜜环菌

保证天麻正常生长的共生真菌，伞菌目小皮伞科蜜环菌属的优良蜜环菌 *Armillariella mellea* (Vahl.ex fr.) Karst。

3.3

锁状联合

为双核细胞形成分裂产生双核菌丝体的一种特有形式，常发生在菌丝顶端，开始时在细胞上产生突起，并向弯曲，与下部细胞连接，形如锁状。锁状联合是双核菌丝的鉴定标准，凡是产生锁状联合的菌丝均可断定为双核菌丝。形成锁状联合的过程保证了双核菌丝在进行细胞分裂时，每节（每个细胞）都能含有两个异质（遗传型不同）的核，为进行有性生殖、通过核配形成担子打下基础。

4 技术要求

4.1 菌种质量要求

4.1.1 母种

应符合表 1 的规定。

表 1 蜜环菌母种的质量要求

项目		要求	
感官要求	容器	使用玻璃试管，规格一般为 18 mm×180 mm 或 20 mm×200 mm，应保证完整无损。	
	容器盖	硅胶塞或棉塞，干燥、洁净，松紧适度，能满足透气和滤菌要求	
	培养基灌入量	为试管总体积的二分之一至三分之二	
	培养基长度	顶端距管塞 40 mm~50 mm	
	接种量（接种块大小）	(3~5) mm×(3~5) mm	
	菌种外观	菌丝生长量	长满培养基
		菌丝体特征	培养基外部有菌丝扭结形成的棕红色菌索，培养基内有白色菌索
		荧光现象	菌丝和幼嫩菌索在阴暗处发出绿白色的荧光
		菌丝体表面	均匀、平整、无老化
		菌丝分泌物	偶有少量棕色物质分泌出使培养基颜色变深
		杂菌菌落	无
斜面背面外观	培养基不干缩，颜色均匀、无暗斑		
气味	有蜜环菌菌种特殊的气味，无酸、臭、霉等异味		
微生物学要求	菌丝生长状态	粗壮、丰满、均匀	
	锁状联合	有	
	杂菌	无	

4.1.2 原种

应符合表 2 的规定。

表 2 蜜环菌原种的质量要求

项目		要求	
感官要求	容器	使用玻璃瓶或塑料瓶，容积 500 mL、耐 126 °C 高温、浅色或无色、瓶口直径 < 4 cm；容器盖使用棉塞或无棉塑料塞；容器和容器盖应完整无损。	
	容器盖	干燥、洁净，松紧适度，能满足透气和滤菌要求	
	培养基灌入量	培养基上表面距容器口 50 mm±5 mm	
	接种量（每支母种接原种数，接种物大小）	(4~6) 瓶，≥12 mm×15 mm	
	菌种外观	菌丝生长量	长满培养基
		菌丝体特征	培养基外部有菌丝扭结形成的棕红色菌索，培养基内有白色菌索

表 2 蜜环菌原种的质量要求（续）

感官要求	菌种外观	项目	要求
		荧光现象	菌丝和幼嫩菌索在阴暗处发出绿白色的荧光
		不同部位菌丝体	生长均匀，无老化
		培养基及菌丝体	偶有少量棕色物质分泌出使培养基颜色变深
		菌丝分泌物	无
	杂菌菌落	无	
	气味	有蜜环菌菌种特殊的气味，无酸、臭、霉等异味	
微生物学要求	菌丝生长状态		粗壮、丰满、均匀
	锁状联合		有
	杂菌		无

4.1.3 栽培种

应符合表 3 的规定。

表 3 蜜环菌原种的质量要求

感官要求	项目		要求	
	容器		容器使用不小于 14 cm×28 cm 塑料袋，中间打一通气孔，盖塞。塑料袋应符合 GB/T 41220 的规定，容器盖使用能满足透气和滤菌要求的塑料盖。	
	容器盖		干燥、洁净，松紧适度，能满足透气和滤菌要求	
	培养基灌入量		培养基上表面距容器口 50 mm±5 mm	
	接种量（每瓶原种接栽培种数）		（4~6）瓶，≥12 mm×15 mm	
	菌种外观	菌丝生长量	长满培养基	
		菌丝体特征	培养基外部有菌丝扭结形成的棕红色菌索，培养基内有白色菌索	
		荧光现象	菌丝和幼嫩菌索在阴暗处发出绿白色的荧光	
		不同部位菌丝体	生长均匀，无老化	
		培养基及菌丝体	偶有少量棕色物质分泌出使培养基颜色变深	
		菌丝分泌物	无	
	杂菌菌落	无		
	气味	有蜜环菌菌种特殊的气味，无酸、臭、霉等异味		
微生物学要求	菌丝生长状态		粗壮、丰满、均匀	
	锁状联合		有	
	杂菌		无	

4.2 培育场地布局与设施设备

4.2.1 厂房布局与建造

应根据场地特点和生产要求合理布局，生产区与原料库、成品库、生活区应严格分开。生产区具有独立隔离的摊晒场、配料分装室、灭菌室、冷却室、接种室、培养室、贮存室、菌种检验室等，并合理安排布局，满足蜜环菌不同生长阶段对环境条件的需求。人流与物流分开、有菌区与无菌区隔离。

摊晒场应地面平整，无遮挡物，远离火源。配料分装室应空间充足，确保水电方便。灭菌室应确保水电安装合理，排期气通畅，进出料方便。冷却室应洁净防尘，易散热。接种室应设置缓冲间，配备换气设备，室内壁和屋顶光滑，并经常清洗消毒。

4.2.2 设施设备

生产各环节的设施规模要配套。冷却室、接种室、培养室和贮存室都要有调温设施。

应配备搅拌机、装瓶（袋）机、高压灭菌锅、超净工作台、磅秤、天平、调温设备、除湿机、培养架、恒温箱、冰箱、显微镜等及常规用具。高压灭菌及计量设备应每年通过有关部门安全检验。

4.3 基本生产工艺

4.3.1 栽培基质

人工配制用于为各级蜜环菌菌种提供营养要素的培养原料。栽培基质所用原辅料应符合NY/T 1935的规定。用水应符合GB 5749的规定。化学添加剂如硫酸镁、磷酸二氢钾等应至少为化学纯。

各级菌种培养推荐的栽培基质配方级基本配制方法见表4。

表4 蜜环菌菌种栽培基质推荐配方

菌种级别	栽培基质推荐配方
母种	去皮马铃薯 200 g，切成 1cm 左右小块，添加或不添加麦麸 20g，用适量水煮沸 30 min；过滤，滤液中加入葡萄糖 20 g、琼脂 15~20 g，用水定容至 1 L，搅拌均匀，即得。
原种	(1) 去皮马铃薯块 100 g、麦麸 30 g、木屑 30 g、松针 20 g、黄豆粉 20 g、玉米粉 20 g、葡萄糖 10 g、硫酸镁 1 g、磷酸二氢钾 2 g、琼脂 18 g，混合均匀，继续加水至 1000 g，混匀，即得。 (2) 麦麸 200 g、木屑 750 g、玉米碴 50 g，加水混合均匀至含水量 75%左右，即得。
栽培种	木棒，用含硫酸镁 0.1%、磷酸二氢钾 0.2%的水溶液浸泡 24 小时，即得。 150 g 玉米装入容器中，加水浸泡 24 小时至玉米粒胀满，继续加水至满，即得。 枝条 500 g、木屑 200 g、麦麸 180 g、玉米粉 100 g、石灰 5~10 g、石膏 5~10 g，搅拌均匀，继续加水混匀至含水量 65%左右，即得。

4.3.2 基本工艺流程

基本工艺流程为：栽培基质制备（配制、分装、灭菌、冷却）→接种→培养（检查）→成品。

4.3.3 母种的生产

生产时间：每年 10 月至 11 月生产，一般在原种生产前 1~2 个月。

栽培基质制备：参照表 1 推荐配方进行配制，可适度增减；基质装入玻璃试管内，每只试管的分装量为试管长度的 1/4 至 2/3，塞上棉塞或硅胶塞；高压蒸汽灭菌 30 min（0.12 MPa~0.15 MPa，121 °C~122 °C），灭菌结束后趁热摆放斜面，斜面的长度为试管长度的 1/3 至 1/2，冷却备用。

接种：采用无菌操作法，在超净工作台上或接种箱内，用接菌铲挑取 0.5 cm 大小的纯菌种，转接于试管斜面培养基上。

培养（检查）：接种后，放置在 18 °C~20 °C 的恒温培养箱中培养，待菌丝长满培养基表面。培养过程中及时剔出菌丝生长缓慢，稀疏、不匀、发黑、污染者。母种转管次数控制在 5 次以内。

4.3.4 原种的生产

生产时间：每年 12 月至次年 1 月生产，一般在栽培种生产前 2~3 个月。

栽培基质制备：参照表 1 推荐配方进行配制，可适度增减；基质装入瓶内至瓶肩处，中间打一通气孔，盖塞；高压蒸汽灭菌 90 min (0.12 MPa~0.15 MPa, 121 °C~125 °C)，冷却后备用。

接种：采用无菌操作法，在超净工作台上或接种箱内，挑取直径 1.5 cm~3.0 cm 的优质母种块（连同栽培基质），移植接种于原种培养基上端中央，随即盖塞或扎口。

培养（检查）：接种后，放置在 18 °C~20 °C 的恒温培养室中培养 30 d~60 d。培养过程中及时剔出菌丝长速慢，稀疏、不匀、发黑、污染者。

4.3.5 栽培种的生产

生产时间：每年 2 月至 4 月，一般在生产用前 2~3 个月。

栽培基质制备：参照表 1 推荐配方进行配制，可适度增减；分装至瓶肩处或距离袋口为 5 cm 左右，盖塞；高压蒸汽灭菌 120 min (0.12 MPa~0.15 MPa, 121 °C~125 °C)，冷却后备用。

接种：采用无菌操作法，在无菌室内，挑取直径 3.0 cm~4.0 cm 左右的优质原种块（连同栽培基质），移植接种于原种栽培基质上端中央，随即盖塞或扎口。

培养（检查）：接种后，放置在 18 °C~20 °C 的恒温培养室中培养 60 d~75 d，培养过程中及时剔出菌丝长速慢，稀疏、不匀、发黑、污染者。

5 质量检验

5.1 组批

同一栽培基质配方、同一天接种、同一培养条件和质量基本一致的符合规定数量的菌种为一批。每批次数量母种≥50 支、原种≥200 瓶（袋），栽培种≥2000 瓶（袋）。

5.2 抽样方法

从每一批中随机抽取样品，母种、原种、栽培种的抽样量分别为该批菌种量的 10%、5%、1%。但每批抽样数量不得少于 10 支（瓶、袋）；超过 100 支（瓶、袋）的，可进行二级抽样，具体方法为：先按照该批菌种量的 10%、5%、1%分成一级抽样单位，再把抽中的一级抽样单位按照菌种量的 10%、5%、1%分成若干更小的二级抽样单位进行检验。

5.3 感官检验

按表 5 相应项目依次进行感官检验。

表 5 感官要求检验方法

检验项目	检验方法	检验结果与判定	检验项目	检验方法	检验结果与判定
容器	肉眼观察	洁净、完整无损	母种	肉眼观察、测量，检查生产记录	(3~5) mm×(3~5) mm 接种块
			原种	肉眼观察、测量，检查生产记录	每支母种接 (4~6) 原种
			栽培种	肉眼观察、检查生产记录	每瓶原种接 (4~6) 瓶栽培种

表 5 感官要求检验方法（续）

检验项目	检验方法	检验结果与判定	检验项目	检验方法	检验结果与判定
棉塞、无棉塑料盖	肉眼观察	干燥、洁净，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	测量	50 mm±5 mm
培养基灌入量	测量	为试管总体积的二分之一至三分之二	菌种外观各项（杂菌菌落除外）	肉眼观察	菌丝扭结形成菌索，菌索长满培养基，培养基外部菌索棕红色，培养基内菌索白色，菌索生长均匀无老化，菌丝和幼嫩菌索在阴暗处发出绿白色的荧光。
斜面长度	测量	顶端距管塞 40 mm~50 mm	杂菌菌落	肉眼观察	无杂菌
斜面背面	外观肉眼观察	培养基不干燥，颜色均匀、无暗斑	气味	鼻嗅	有蜜环菌菌种特殊的气味，无酸、臭、霉等异味

5.4 微生物学检验

5.4.1 形貌观察

原种菌丝生长状态用放大倍数不低于 10×40 倍的光学显微镜对培养物的水封片进行观察，每一检样应观察不少于 50 个视野。

5.4.2 细菌检验

取少量疑有细菌污染的培养物，按无菌操作接入 GB 4789.28 规定的营养肉汤培养液中，25℃~28℃振荡培养 1~2 天，观察培养液是否混浊。培养液混浊，为有细菌污染；培养液澄清，为无细菌污染。

5.4.3 霉菌检验

取少量疑有霉菌污染的培养物，按无菌操作接种于表 1 的母种培养基上，25℃~28℃培养 3 天~5 天，出现非蜜环菌菌丝形态菌落的，或有异味者为霉菌污染物，必要时进行水封片镜检。

5.4.4 检验结果与判定

微生物学检验要求无杂菌。

5.5 留样要求

各级菌种要留样备查，留样的数量应每个批号母种 3~5 支，原种和栽培种 5~7 瓶（袋），于 4~6℃下贮存，母种 150 天，原种 120 天，栽培种 180 天。

6 入库、记录、标签、包装、运输和贮存

6.1 入库与记录

完成培养的菌种及时登记入库。菌种生产各环节应进行详细记录。

6.2 标签

6.2.1 每支（瓶、袋）菌种应有清晰注明以下要素的标签：

- a) 产品名称；
- b) 品种名称；
- c) 生产单位；
- d) 接种日期；
- e) 执行标准。

6.2.2 每箱菌种应有清晰注明以下要素的包装标签：

- a) 产品名称；
- b) 品种名称；
- c) 厂名、厂址、联系电话；
- d) 出厂日期；
- e) 保质期、贮存条件；
- f) 数量；
- g) 执行标准。

6.2.3 包装储运图示标志还应包括：

- a) 小心轻放标志；
- b) 防水、防潮、防冻标志；
- c) 防晒、防高温标志；
- d) 防止倒置标志；
- e) 防止重压标志等。

6.3 包装

6.3.1 母种外包装采用木盒或有足够强度的纸材制做的纸箱，内部用棉花、碎纸、报纸等具有缓冲作用的轻质材料填满。原种、栽培种外包装采用有足够强度的纸材制做的纸箱，菌种间用碎纸、报纸等具有缓冲作用的轻质材料填满。包装箱内应附上使用说明。包装应严密、整齐、无破损。

6.3.2 产品内包装材料的卫生标准应符合 GB 4806.1 的要求。产品运输用外包装用瓦楞纸箱应符合 GB/T 6543 的规定，外包装箱内不应使用过度的隔板；包装应封口牢固，确保箱内产品不受损伤。产品外包装箱图示标志应符合 GB/T 191 的规定。

6.4 运输

6.4.1 运输工具应清洁、干燥，有防晒、防雨措施。

6.4.2 运输过程中应防止日晒、雨淋、重压及撞击。

6.4.3 不应与有毒、有腐蚀性、有异味、易挥发、有污染的物品混运。

6.4.4 气温达 30 °C 以上时，需用 0 °C~20 °C 的冷藏车运输。

6.5 贮存

6.5.1 应根据产品特性进行贮存。常温贮存的，应存于通风、干燥、阴凉、清洁的仓库内，避免重压和阳光直射。

6.5.2 不得与有毒、有腐蚀性、有异味、易挥发、有污染的物品混贮。

全国团体标准信息平台