

T/SYJ

新疆维吾尔自治区食用菌协会团体标准

T/SYJ 0003—2023

黑木耳固体菌种制作技术规程

2023 - 09 - 25 发布

2023 - 09 - 27 实施

目 次

前 言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 原理	2
5 技术要求	2
6 方法与步骤	2

全国团体标准信息平台

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》、GB/T 20000.6—2006《标准化工作指南 第6部分：标准化良好行为规范》、GB/T 20001.10—2014《标准编写规则 第10部分：产品标准》、DB65/T 2035.2—2003《标准体系工作导则 第2部分：农业标准体系框架与要求》的规定起草。

本文件由新疆理工学院提出。

本文件由新疆维吾尔自治区食用菌协会归口。

本文件起草单位：新疆理工学院、新疆黑木耳工程技术研究中心、中国检验认证集团新疆有限公司。

本文件主要起草人：徐恒、裴龙英、魏佳荣、刘鹏、何伟、张恒、魏骊霏、王晓雨、魏鹏。

黑木耳固体菌种制作技术规程

1 范围

本规程规定了黑木耳固体菌种制作的基本原则、方法及技术要求。

本规程适用于各类大型真菌固体菌种的制作

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/T 528 食用菌菌种生产技术规程

GB/T 12728 食用菌术语

NY/T 391 绿色食品 产地环境质量

NY/T 393 绿色食品 农药使用准则

NY/T 394 绿色食品 肥料使用准则

NY/T 794 绿色食品 食用菌

NY/T 1742 食用菌菌种通用技术要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件：

3.1 黑木耳菌种

指以保藏、试验、栽培和其他用途为目的，具有繁衍能力，遗传特性相对稳定的黑木耳孢子、组织或菌丝体及其营养性或非营养性的载体。

3.2 黑木耳 *Auricularia auricular*

隶属于担子菌亚门、木耳目、木耳科的可食用大型真菌。

3.3 菌棒 *artificial bed-log*

特制代料栽培食用菌接种后长有菌丝的棒状菌体。也称菌筒、人造菇木。

4 原理

食用菌的种姓是通过菌丝体的繁衍逐代传递的，所以自然选择就侧重于在不同菌株之间进行，而不是在同一菌株的后代中进行。感官指标

5 技术要求

5.1 接种须无菌操作，避免杂菌污染。

5.2 定期检查

菌种培养期间要定期检查培养菌种的培养箱温度和湿度；检查培养器皿的棉塞、盖子和培养基有无生霉现象，如发现异常则立即取出该管重新纯化，经培养后补上空缺；在低倍解剖镜下抽样检查有无螨虫等害虫，发现时须及时消除。

6 方法与步骤

菌种通常被分为3级。1级种也叫母种或试管种。可用组织分离法或孢子分离法获得母种。2级种也叫原种，是利用母种的菌丝体接入木屑培养基中所产生的菌种。3级种也叫栽培种，是利用原种再扩繁一次所产生的菌种，它直接用于生产，因此也叫生产种。

经过母种—原种—栽培种的不断扩大繁殖后，菌丝体的数量越来越多，越来越强壮，利用这样的菌丝体投入生产就可以生长出优良的子实体。

6.1 母种生产

6.1.1 母种培养基制备

采用PDA加富培养基制作母种培养基，配方：土豆200g、葡萄糖20g、琼脂20g、KH₂PO₄1.5~2g、MgSO₄0.5~1g、10g蛋白胨、水1000mL。

配制方法：将200g马铃薯去皮，去芽眼，切成小条放入铝锅中，加入1000mL水，同时放入20g棉籽壳，煮沸20-30分钟左右至马铃薯酥而不烂时，用6-8层纱布过滤，取滤汁于锅中，加入葡萄糖20g、KH₂PO₄1.5~2g、MgSO₄0.5~1g、10g蛋白胨、补水至1000mL，加入琼脂熔化，趁热分装于试管中，试管使用直径2厘米，长度20厘米的最优。

配制好的培养基用漏斗分装至试管，试管口、壁不粘培养基，塞橡胶塞或棉塞。每7支捆成一捆，管口用牛皮纸包好，直立于灭菌锅内，121℃、0.11~0.15MPa下灭菌30min，待培养基冷却至60~70℃，将其摆成斜面，斜面长度最好占管长的2/3左右比较合适，冷却备用。

6.1.2 菌种分离与转管培养

菌种分离方法有孢子分离法、组织分离法、菌丝体分离法。

孢子分离法是选用当年生无杂菌污染的鲜耳片，以黑、厚、大为佳，经无菌水冲洗几次，用丝线将耳片腹面向下吊挂，另一端吊挂在装有培养基的三角瓶口部，加棉塞封口，在25~28℃温箱中接收孢子并培养成菌丝体。

组织分离法是选用优质耳片，表面用75%酒精棉球擦拭2~3遍，用酒精棉包住耳片约2分钟，剪取远离耳基没有筋的部位约0.2平方厘米。在无菌条件下，接入试管斜面培养基上，经25~28℃左右的温度培养长出菌丝体。

菌丝体分离法是从黑木耳的段木中分离菌丝体获得菌种的方法。切取火柴头大小的木块，经过消毒，在无菌条件下接入试管斜面，经25~28℃的培养就能长出菌丝体。

分离成功的试管母种，还可以在试管斜面培养基上扩大繁殖1~3次，这个过程称为转管或扩管，也叫传代培养。一般1支母种可转30~40支母种，从而满足生产上的需要。

转管培养：当培养基温度降至30℃以下时，于无菌室内接种，将菌种用接种钩接入空白斜面培养基，动作迅速、准确。切取菌种时选远离原老菌种的部位，一般培养基两端的活力最强，菌种块大小为1~2mm，块越小菌龄越一致。

在菌种分离与转管培养时，要在超净工作台上进行无菌操作，防止杂菌污染。分离或转管几天后在试管斜面上就会长出白色的绒毛状黑木耳菌丝。经过10天左右的培养，菌丝可长满斜面，这就是母种。

6.1.3 母种培养

母种培养条件为在恒温培养箱内（26±1）℃避光培养，10天左右菌丝即可长好，期间需要定时观察，挑出污染或死亡的母种。菌丝生长健壮、洁白、均匀一致、无杂菌污染的，为优良菌种。

6.2 原种制备

6.2.1 原种培养基制备

(1) 培养基配方。培养基配方为棉籽壳78%，麦麸20%，蔗糖1%，石膏1%。

(2) 配制方法。将棉籽壳、麦麸、石膏混合均匀，再加水拌料，使培养料的含水量达到60%左右。测定方法是用手紧握培养料，指缝间稍有水印而不成滴。

(3) 培养基装瓶与装袋。原种生产使用接种瓶。培养基配好后，即可装入三角瓶中，装至瓶肩，料面压平。培养料在瓶中要求上紧下松，中间使用木锥扎1个孔。瓶口内外要擦净，用棉塞/橡胶塞封口。

(4) 培养基灭菌。原种装瓶再装入铁筐或塑料筐内准备灭菌。灭菌方法采用高压蒸汽灭菌。采用高压蒸汽灭菌时，锅内在0.15兆帕压力下(锅内温度127℃)灭菌1.5小时。

6.2.2 原种接种

原种是由母种扩接到原种培养基上而得到的菌种。

经过灭菌后的接种瓶或袋，待料温降到30℃以下后，搬入超净工作台或接种室进行接种。接种前，将接种器具、物品搬入接种场所。这些器具和物品主要有接种匙、镊子、酒精灯、酒精棉球、菌种、待接种的料袋。物品放好后，再用紫外线或气雾消毒剂进行熏蒸消毒，40分钟后方可使用。

接种时，先点燃酒精灯，将接种用具、菌种表面、接种人员双手用75%酒精擦抹，再将接种针或镊子、菌种棉塞在火焰上灼烧消毒，然后在火焰上将管(瓶)口棉塞/橡胶塞轻轻拔出，斜对火焰，就可进行正式接种。接原种时将每支母种斜面用接种针横划成4-5段，每瓶原种培养基接入一段；接栽培种时，每个培养基瓶内用镊子挟入一小块原种，即每瓶原种一般可接栽培30-40瓶或40-50瓶。

6.2.3 原种培养

培养场所在使用前也要用气雾消毒剂进行熏蒸消毒。

(1) 培养温度：一般放置在22℃-25℃的温度下培养，25-60天就可长满瓶。

(2) 培养湿度：室内相对湿度保持在60%-70%之间，经常保持室内空气新鲜，以利菌丝的生长。如室内空气湿度过大，应在地面上撒些石灰粉，降低湿度，防止病虫杂菌孳生。

(3) 菌种瓶直立放置：因接入的菌种块还未生长固定，如卧倒叠放，菌种块易落到瓶侧，影响菌种萌发。如生产菌种数量多，应待菌丝萌发并封口后，便可卧倒叠放，以充分利用空间。

(4) 检查去杂：从菌种萌发定植封口开始就要经常检查有无杂菌污染，发现有杂菌的要及时检出，一般检查工作继续到菌丝体覆盖整个培养基表面为止。

(5) 保持清洁卫生：培养室内外要经常保持清洁卫生，同时培育期间每隔7-10天，在室内外及瓶口棉塞上喷1%的敌敌畏或其他杀虫药液一次，防止害虫发生。菌种长好后放在低温、干燥、清洁处避光保藏，准备使用。

6.3 栽培种制备

栽培种是由原种扩接到栽培种培养基上而得到的菌种。

6.3.1 栽培种培养基制备

栽培种培养基配方及制作方法与原种相同，但栽培种一般用塑料袋生产，高压蒸汽灭菌适合使用聚丙烯袋。袋的大小以36厘米×16.2厘米×0.005厘米较为适合。装袋时要保证松紧适当，装袋后使用窝口机进行窝口，插入接种棒。装袋时料袋要轻拿轻放，防止沙粒或杂物将袋刺破引起污染。栽培种培养基装袋后，装入塑料盘中，进入大型高压灭菌锅内在0.14兆帕压力下，锅内温度121℃，灭菌3.5小时。

6.3.2 栽培种接种

栽培种接种方法与原种接种方法一致。

6.3.3 栽培种培养

栽培种培养与原种一致，但是栽培种不宜再做菌种扩大繁殖。

6.4 无菌接种操作程序

无菌操作一般在超净工作台、接种室中进行，工作量较小时使用超净工作台，而如制作栽培种等工作量较大时需在接种室中进行。操作步骤如下：

6.4.1 超净工作台的使用规程

首先将超净工作台、接种室收拾干净，放入培养基、菌种、接种用具。超净工作台使用紫外光灭菌30分钟，菌种需要用报纸遮盖，防止紫外光杀死菌种。接种室用气雾消毒粉进行熏蒸消毒，每立方米空间用量1包(5克)，置于容器中点燃，保持40分钟以上。用75%酒精棉擦抹双手。点燃酒精灯，接种工具灼烧灭菌后开始接种。接种时一定要保持无菌操作，培养基接种后移到培养室进行培养。

6.4.2 接种室的使用规程

①在每次使用前1小时，将所需物品移入接种室，按一定位置摆好，并检查是否齐全。用5%石炭酸溶液在接种室和缓冲室喷雾后，开启紫外线灯照射40分钟；

②关闭紫外灯20分钟后进入缓冲室，穿上无菌工作服、鞋、戴好口罩、工作帽，然后用2%煤酚皂液将手浸洗2分钟；

③进入接种室，并用5%石炭酸溶液重点在工作台的上方和附近的地面上喷雾。

④接种前，用75%的酒精棉球擦手，然后按常规在火焰上进行各项操作。操作时动作要轻捷，尽量减少空气波动，两人操作时要配合默契。用完的火柴杆、废纸不要扔在地上，应放在专用的容器里；

⑤工作结束，及时取出接种材料，然后清理台面，将废物拿出室外，再用5%石炭酸全面喷洒，或打开紫外线灯照射半小时；

⑥接种时如遇棉塞着火，用手紧握即可熄灭，或用湿布扑灭，切勿用嘴吹灭，以免扩大火焰。如遇培养物或有菌容器打碎散落，应及时用抹布沾5%的石炭酸溶液，收拾擦拭，再用酒精棉球擦手后才可继续操作。