ICS
CCS

DB 15

内 蒙 古 自 治 区 地 方 标 准

DB 15/T —
代替 DB 15/T 1056-2016

香菇菌种制作技术规程

Regulation of Strain Manufacture for Lentinula edodes

（征求意见稿）

- - 发布 - - 实施

内蒙古自治区市场监督管理局 发 布

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。

本文件代替DB15/T 1056-2016《香菇菌种制作技术规程》，与DB15/T 1056-2016相比，主要技术变化如下：

a）更改了母种培养基要求（见5.1，2016版5.1）；

b）增加了母种容器要求（见5.2，2016版5.2）；

c）增加了母种检测要求（见5.4）；

d）更改了母种培养要求（见5.6，2016版5.5）；

e）更改了原种、栽培种培养基要求（见6.1.1，2016版6.1.1）；

f）更改了原种、栽培种培养要求（见6.1.6，2016版6.1.6）；

g）更改了原种、栽培种贮存要求（见6.1.7，2016版6.1.7）；

h）增加了瓶装液体菌种检验要求（见6.2.2.4）；

i）更改了菌种罐液体菌种装罐和灭菌要求（见6.2.3.1，2016版6.2.3.1）；

j）更改了母种、原种、栽培种感官要求（见7.1.1、7.1.2、7.1.3，2016版7.1.1、7.1.2、7.1.3）；

k）更改了入库要求（见7.2，2016版见7.2）；

l）删除了留样要求（见7.3，2016版见7.3）。

本文件由内需古自区果蔬标准化技木委会（SAM/TC 25）归口。

本文件起草单位：内蒙古自治区农牧业科学院、清水河华丰食用菌种植合作社、清水河县摇铃沟农业发展有限（克旗）。

本文件主要起草人：李亚娇、孙国琴、王海燕、于传宗、庞杰、王永、李松树叶、吕永伟、张计善刘瑞、鲁亚楠、吴媛、刘晓蕊 。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2016年首次发布为DB15/T 1056-2016《香菇菌种制作技术规程》；

——本次为第一次修订。

香菇菌种制作技术规程

1 范围

本文件规定了香菇（*Lentinula edodes*）母种、原种和栽培种生产有关的定义、菌种生产要求、母种生产、原种和栽培种生产、检验、入库等技术流程要点。

本文件适用于香菇母种、原种和栽培种菌种制作要求。

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 12728 食用菌术语

NY/T 528 食用菌菌种生产技术规程

NY/T 1731 食用菌菌种良好作业规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

香菇 Lentinula edodes

香菇（*Lentinula edodes*(Berk.)Pegler）又名香孽、香信、香苑、冬菇、椎茸(日本)。属担子菌亚门(Basidiomycotina)、层菌纲(Hymenomycetes)、伞菌目(Aganicales)、口蘑科(Tricholomataceae)、香菇属（Lentinus）的一类木腐菌，子实体肉质或近肉质。

3.2

菌种 spawn

通过生产试验验证具有特异性、均一性和稳定性，丰产性好、抗性强的香菇菌株或品种，生长在适宜基质上具结实性的菌丝培养物，包括母种、原种和栽培种。

3.3

母种 stock culture

经分离、杂交、诱变等各种方法选育得到的具有结实性的菌丝体纯培养物及其继代培养物，以玻璃试管和培养皿为培养容器和使用单位，也称为一级种、试管种。

3.4

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。

3.5

栽培种 spawn

由原种移植、扩大培养而成的菌丝体纯培养物，栽培种只能用于栽培，不可再次扩大繁殖菌种，也称为三级种。

3.6

固体菌种 solid spawn

以富含木质素、纤维素和淀粉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，具有一定水分含量的培养基培养的纯菌丝体。

3.7

液体菌种 liquid spawn

在液体培养基中，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。

4 菌种生产要求

4.1 人员

生产所需要的技术人员和检验人员应经过专业培训、掌握香菇基础知识及香菇菌种生产技术规程要求。

4.2 场地

菌种生产应选择地势高、通风良好、空气清新、水源近、排水通畅、交通便利的场所。300m之内无酿造厂、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。场地环境条件符合NY/T 528 规定。

4.3 厂房

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。菌种生产厂房条件符合NY/T 1731规定。

4.4 生产设备

菌种生产需要粉碎机、电子秤、搅拌机、装袋（瓶）机、高压锅或常压灭菌锅、离子净化器、超净工作台或接种箱、恒温培养箱、培养架、摇床、液体菌种灌（30L～250L）、冰箱、显微镜等设备。菌种生产设备条件符合NY/T 1731规定。

5 母种生产

5.1 培养基

马铃薯200 g加水1200 ml煮沸20 min，滤液定容至1000 ml，加入葡萄糖10 g、蔗糖10 g、蛋白胨1.5 g、酵母粉1 .5g、硫酸镁（$MgSO_4$）0.5 g、磷酸二氢钾（KH_2PO_4）1 g、琼脂粉8g～10g，pH自然；

麦粒100 g加水1200 ml煮沸20 min，滤液定容至1000 ml，加入葡萄糖10 g、蔗糖10 g、蛋白胨5 g、硫酸镁（$MgSO_4$）0.5 g、磷酸二氢钾（KH_2PO_4）1 g、琼脂粉8g～10 g，pH自然；

马铃薯200 g加水600 ml煮沸20 min，滤液定容至500 ml；麦麸100 g加水600 ml煮沸20 min，滤液定容至500 ml，二者混合，加入葡萄糖10 g、蔗糖10 g、蛋白胨1.8 g、硫酸镁（$MgSO_4$）0.5 g、磷酸二氢钾（KH_2PO_4）1 g、琼脂粉8 g～10 g，pH自然；

马铃薯200 g加水600 ml煮沸20 min，滤液定容至500 ml；麦粒100 g加水600 ml煮沸15 min，滤液定容至500 ml，二者混合，加入葡萄糖10 g、蔗糖10 g、蛋白胨1.8 g、硫酸镁（$MgSO_4$）0.5 g、磷酸二氢钾（KH_2PO_4）1 g、琼脂粉8 g～10 g，pH自然。

5.2 容器

试管选用18mm×180mm或者20mm×200mm;培养皿选用直径7cm～9cm玻璃培养皿或一次性塑料培养皿，三角瓶规格300ml~500ml。

5.3 分装和灭菌

5.3.1 试管分装和灭菌

分装培养基至试管1/4处，用棉塞或硅胶塞子封闭试管口，每5支试管为1把，牛皮纸包棉塞，橡皮筋扎紧，棉塞向上放置。棉塞应采用梳棉，不能使用脱脂棉。在121℃～122℃（0.11MPa～0.12MPa）下恒温灭菌25min。

降温至（65±5）℃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。

5.3.2 培养皿分装和灭菌

培养基装入300ml～500ml三角瓶至刻度的2/3处，用带滤膜的封口膜封口后灭菌。培养皿用报纸包好，放入灭菌锅。121℃～122℃（0.11MPa～0.12MPa）恒温灭菌25min。

降温至（65±5）℃时，在超净工作台内将三角瓶中的培养基分装至培养皿中，培养基占培养皿高度的1/3～1/2。

5.4 检测

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

5.5 接种

超净工作台或接种箱内紫外灯照射30min后吹风，之后用75%酒精进行表面消毒。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。

将3mm～5mm菌块接种在培养皿或试管培养基的中部。培养皿需用石腊膜密封。

菌丝长满培养基表面即可使用。

5.6 培养

在通风避光、22℃～26℃下培养。

接种后每隔2d~3d检验一次，挑选菌种未活、污染和生长不良的不合格培养物。

6 原种、栽培种生产

6.1 固体菌种

6.1.1 培养基

粮食培养基：谷粒、麦粒或玉米粒89 %，柠条粉、棉籽壳、木屑、玉米芯粉或豆秸粉9%，石膏1%、过磷酸钙1%，水分含量（50±2）%，石灰水调节pH 6.0～6.6。

组合培养基：硬杂木屑79%、麸皮19%、石膏1%、过磷酸钙1%，水分含量（60±2）%，石灰调节pH值6～6.5；

柠条粉79%、麸皮19%、石膏1%、过磷酸钙1%，水分含量（60±2）%，石灰调节pH值6～6.5；

秸杆粉40％、硬杂木屑38%、麸皮20%、石膏1%、过磷酸钙1%，水分含量（60±2）%，石灰调节pH值6～6.5；

秸杆粉40％、柠条粉38%、麸皮20%、石膏1%、过磷酸钙1%，水分含量（60±2）%，石灰调节pH值6～6.5；

柠条粉59 %，玉米芯20 %，麸皮19 %，石膏1 % ，过磷酸钙1%、水分含量（60±2）%，石灰调节pH值6～6.5。

6.1.2 容器

原种采用选用耐126℃高温、有透气膜封口的透明瓶子，或采用（12～17）cm×（22～28）cm×（0.04～0.05）mm的聚丙烯塑料袋。

栽培种采用采用（15～17）cm×（33～35）cm×（0.04～0.05）mm的聚丙烯塑料袋。

6.1.3 装袋（瓶）

采用装袋（瓶）机或人工进行装袋（瓶），人工装袋（瓶）需用打孔器在袋口处打孔，孔直径1cm～1.5cm深度为8cm～12cm，每袋（瓶）装培养基500g～600g。塑料袋用无棉盖体套环或窝口海绵塞封口。培养基质装袋（瓶）后4h内进行灭菌。

6.1.4 灭菌

可采用高压灭菌和常压灭菌。

高压灭菌：组合培养基在121℃～122℃（0.11MPa～0.12 MPa）下灭菌2h；粮食培养基在121℃～122℃（0.11MPa～0.12 MPa）下灭菌2.5h。

常压灭菌：在3h之内使温度升至100℃，恒温保持100℃ 10h～12h。

6.1.5 接种

原种、栽培种在超净工作台或接种箱内接种，接种前打开紫外灯照射30min后吹风，接种时用75%酒精对超净工作台或接种箱进行表面擦拭消毒。每个原种接入2cm～3cm大小母种1~2块；每个栽培种接入原种量不应少于15g。

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及接种工具进行表面擦拭消毒。

6.1.6 培养

通风避光、22℃～27℃下培养。

6.1.7 贮存

原种和栽培种0℃～4℃下贮存，贮存期不超过50d。

6.2 液体菌种生产

6.2.1 培养基

不加琼脂，其他同5.1。

6.2.2 瓶装液体菌种生产

6.2.2.1 装瓶

采用150ml～500ml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。

6.2.2.2 灭菌

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

6.2.2.3 接种和培养

取3mm～5mm大小母种10块～15块接入30℃以下的液体培养基中，培养温度在23℃～25℃，130 r/min～160r/min下振荡培养6d～10d。

6.2.2.4 检验

接种后第3天对三角瓶逐个进行纯度检验，及时清理未活或污染的培养物并高温处理。

6.2.3 菌种罐液体菌种生产条件

6.2.3.1 装罐和灭菌

将液体培养基装至菌种罐体积的2/3进行灭菌，在121℃下灭菌40min。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。

6.2.3.2 接种与培养

将培养好的三角瓶液体菌种接入到菌种罐中，接种量为培养基总体积的8%～10%，在21~25℃，140r/min～180r/min，灌压0.04MPa，通风量0.7N·m3/h下培养5d～7d。

6.2.3.3 出菇袋接种

液体菌种可作为原种或栽培种使用，液体菌种接种在出菇袋中要采用专用液体菌种接种枪进行，严格执行无菌操作，每袋接种10ml～15ml。

7 检验、入库

7.1 检验

7.1.1 母种感官要求

母种感官要求见表1。

表1 香菇母种感官要求

项目		要求
容器		完整、无损、洁净
棉塞或无棉盖体		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1/4，培养皿高度的1/3~1/2
菌种外观	菌丝生长量	长满斜面或平板
	菌丝体特征	洁白、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

7.1.2 原种感官要求

原种感官要求见表2。

表2 香菇原种感官要求

项目		要求
容器		完整、无损、洁净
棉塞或无棉盖体		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、整齐
	培养物表面菌丝体	生长均匀、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
	子实体原基	无

7.1.3 栽培种感官要求

栽培种感官要求见表3。

表3 香菇栽培种感官要求

项目		要求
容器		完整、无损、洁净
棉塞或无棉盖体		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
	子实体原基	无

7.1.4 液体菌种感官要求

液体菌种感官要求见表4。

表4 香菇液体菌种种感官要求

项目	要求
容器	完整、无损、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

7.2 入库

菌种检验完成后及时入菌种库，详细记录各生产环节，库房温度0℃～4℃，避光，适当通风，定期对空间进行杀菌处理。