

食用菌栽培学实验指导

陈秀虹

西南林学院经济林系
一九九六年七月

实验注意事项

- 一、每次实验前必须仔细阅读实验指导书和有关教材内容。掌握本次实验内容和要领，并事先了解各种仪器药品的性能和使用方法。
- 二、进入实验室必须遵守纪律，安静整洁。
- 三、要爱护实验仪器、用具和节省材料及水。
- 四、实验完毕时整理好仪器设备切断电源，报告教师检查后方能离开。
- 五、不遵守实验纪律经教育不改者停止其实验，无故损坏仪器设备者应予赔偿。
- 六、每个学生的实验成绩将记入本课程的总成绩。

(配套教材《食用菌栽培学》黄健屏主编)湖南科技出版社1993, 12第

实验一、母种的制备

目的要求：了解常用食用菌母种培养基的配方内容和各成分比例，以及制备方法。

内 容：首先预习教材的第85至97页，本书把试管斜面菌种称为母种（一级菌种）。

由于食用菌生产不仅要求有“质量”较好的种子，还要求有一定“数量”的种子，才可能大规模生产。要培养菌种，必须先制备母种培养基。

1. 常用培养基配方及制备：

PDA培养基适用于多种食用菌

马铃薯100克；葡萄糖或蔗糖10克；琼脂10克，水500毫升，PH自然。将马铃薯挖去芽眼去皮洗净，切成薄片，称取100克加水600毫升煮沸20分钟，用3--4层纱布过滤，取滤液放入琼脂10克搅拌至溶化，再加入糖10克补充热水至500毫升，搅拌均匀，趁热分装入试管中。

2. 做棉塞：

棉塞用普通棉花即可，不宜采用脱脂棉，因脱脂棉易吸水，时间长了容易生霉，且吸水后通气不良，菌丝生长受影响，脱脂棉成本较高。棉塞不能太松或太紧，要松紧适度为宜。入管长度约棉塞总长的2/3；提起棉塞摆动，以试管不掉为宜，使之便于通气，又可防止杂菌侵入。

3. 装试管：

配制好的培养基要趁热分装入试管，分装时，将漏斗上的皮管插入试管深处，避免培养基沾染试管管口和管内壁，装入量以试管长的1/5为宜。分装完毕，塞上棉塞。

4. 灭菌和摆斜面：

试管装好后，每7-10支捆好，用牛皮纸将管口棉塞包扎好，竖直放

入高压灭菌锅内进行灭菌，使用高压灭菌器时，必须注意遵守操作规程以免发生危险。它是利用蒸汽灭菌以压力提高温度的灭菌锅，用电或者用火加温，以压力表示温度。PDA培养基灭菌以温度约121.1℃压力15磅，或1公斤/厘米²用稳压电源调节保持半小时（或人工调节保持温度120℃）为好。灭菌后，待气压表指针自然下到“0”处时，打开排气阀排尽蒸气。放尽锅内剩余水。如试管棉塞有潮气，不必即时取出，可利用锅内余热将棉塞烘干，从锅内取出试管后，趁热摆成斜面，将试管放在桌面木棒上，使斜面长度约为试管总长的1/3至1/2为宜，冷凝后即成斜面培养基，捆好，包扎管口棉塞待用。

5. 无菌检查：

抽取斜面数支放入30℃左右下培养3—5天，如无杂菌生长，表示灭菌彻底，可以接种。

6. 接种：

应在接种箱（室）内进行。需在无菌条件下操作。接种箱一般每月消毒一次，先用5%石炭酸溶液或0.25%新洁尔灭或2%来苏尔溶液喷雾消毒，再用福尔马林10毫升溶液放入容器内，然后到入5克高锰酸钾，利用高锰酸钾的氧化作用，使甲醛沸腾，很快蒸发完毕。关闭门窗一天后即可使用，如同时用紫外灯（30W）照射30分钟，消毒效果更好（只适用空气或物体表面杂菌）。但有光复活现象，故照射场所遮光半小时，以保持杀菌效果。

接种针、接种环等直接在酒精灯火焰上灼烧，可彻底灭菌，试管口和菌种瓶口通过几次火焰，可杀死一切微生物。

上述准备工作完毕，用75%酒精棉球擦抹双手，左手并排拿菌种和持接种斜面试管，右手持接种钩，将进入试管的部分在火焰上灼烧灭菌。右手小指无名指和手掌夹住棉塞并拔出，将试管口靠近酒精灯火焰，试管应与桌面平行并稍下倾斜不要向上，以防杂菌侵入。接种钩烧后，插入待接斜面培养基中冷却，再伸入菌种管挑取菌种块，迅速接入待接斜面培养基中央。接种后，立即将棉塞塞上，不要用试管套棉塞，以免试管运动时，空气进入，造成污染。棉塞也需在火焰上过一下才塞上为好。

接种时，先用接种锄把管内的气生菌丝刮去，用基内菌丝移接。用接种锄把菌种斜面横向切成若干段再纵向切成几条，然后铲取0.5cm琼脂菌丝块（不能太厚只2mm厚）放在新鲜斜面培养基上。使气生菌丝和内生菌丝同时得到发育。斜面试管接种后，置恒温箱内适温下培养。

7. 杂菌检查：

每天要检查杂菌，及时剔除。如不检查或检查不及时，食用菌菌丝长满管，里面夹有杂菌很难发现，致使菌种不纯。

操作分工：本实验分两次进行，第一次至斜面试管摆好；其余第二次进行（一周后）。

第一组煮PDA培养基；第二组做棉塞，第三组准备接种针、钩和锄及接种箱灭菌，第四组装试管，包扎灭菌及摆斜面；第二次由每人接种三支斜面试管，分组包好做标记，放入接种箱内室温培养。

思考题：

1. 当接种块上菌丝萌发蔓延到培养基上后，为什么要将培养的温度降低2—3℃？
2. 转管接种时为何要将管壁内的气生菌丝刮去？
3. 接种块（菌丝琼脂）为何不能超过2mm厚？
4. 母种接种后为何每天要检查杂菌情况？

实验二、原种的制备

目的要求：了解常用食用菌原种(二级菌种)培养基的配方内容和各成分比例，以及制备法。

内 容：首先预习教材的第97—100页。将母种转接到瓶子或塑料袋的培养基内，进行扩大培养而成的菌种，称为原种，生产程序包括：培养基的配制，装瓶(袋)灭菌，无菌操作接种，适温培养。

1. 培养基的配制：

(1) 木屑麦皮培养基(适用于各种木腐性食用菌，如香菇、木耳、银耳、猴头菌、金针菇等)。

常用配方：锯木屑78%，麦皮(或米糠)20%，蔗糖1%，石膏粉1%，水约125%(拌合料有水渗入手指缝而不下滴为度。 P_H 6.5或自然。

先将木屑麦皮、石膏粉混合均匀，再加糖水拌匀。

(2) 松木屑培养基(适用于茯苓)

松木屑77%，麦皮20%，蔗糖2%，水适量。

(3) 玉米粒培养基(可适于多种食用菌)本配方发菌快，菌种质量高，材料来源广，制作简易，不需添加其他辅料。

先将玉米用清水洗净，浸泡15—20小时，使其充分吸水然后将浸泡过的玉米粒煮沸1—2小时，煮到玉米粒变软膨大而不破，即可捞出，控干水分。

(4) 麦粒培养基(木腐菌、草腐菌都适用，如蘑菇、毛木耳等多种食用菌)。

麦粒200克，蔗糖10克，碳酸钙(建筑用碎公分石末过细筛)6克，石膏粉15克水适量。

将麦粒洗净加水浸泡4—6小时，然后煮沸约20分钟，加糖再煮5分钟，至麦粒无白心但又不胀破为度。捞出滤去水分，按量称取碳酸钙拌入麦粒中，使之充分的混合。石膏粉防止麦粒粘成团，碳酸钙主要用于调节 P_H 值。

2. 装瓶灭菌：

(1) 原种要求保持高的纯度 一般用无色透明的玻璃广口瓶，容量有500、700、1000毫升的数种，也可用容量500毫升的玻璃罐头瓶，因口大、瓶矮、装料，挖料都很方便。装时边装边摇动，并用手指和捣木粗端适当捣实，松紧程度要求在瓶低部和中部稍松一些，以利通气使菌丝生长良好，上部适当压紧，如果过松，用捣木打孔后料面易变形，同时也影响菌丝向下部生长。料装至与瓶肩部齐即可，用捣木细端在料中央钻一圆孔深瓶底，以利通气。打孔后整理料面，擦净瓶内壁，清洗瓶口和外壁，最后塞上棉塞，或用牛皮纸包住瓶口，用绳带扎紧，以待消毒灭菌。

(2) 装袋灭菌 可供食用菌制种和栽培的塑料薄膜，有聚乙烯和聚丙烯两种。聚乙烯薄膜乳白色，比重0.91—0.92，柔软，但不耐高温，只能用于常压灭菌；聚丙烯薄膜透明，比重0.90左右，熔点为165℃，故可用于高压灭菌，但低温性能差，冬季操作不如聚乙烯柔软，且易破裂。

装料方法：与装瓶略有不同，左手撑开袋口，右手抓料，装入一半后用捣木粗端将料压实，使袋底成一平面，以便能直立放置。装满后要压紧松紧程度以手按料不下凹为宜，一般比瓶装要紧一些，以避免料袋变形损伤菌丝，太实又会造成通气不良。装毕后，用捣木在中央打一孔，直径约1.5cm，扎口，塑料袋不能满足菌丝生长对空气的需求，扎口时既要考虑到透气，又要避免杂菌的侵入，一般常用颈圈加塞法较好。取直径3cm，高3—4cm硬塑料颈圈套在袋口头翻过来包住颈圈，用棉塞塞之住袋口。

(3) 消毒灭菌 采用高压蒸气灭菌，使压力达到1.5公斤/平方米，保持1—1.5小时，停止加温后待压力表的指针回到零位，打开放汽活塞，排尽蒸气，开锅取出菌种。也可用蒸笼灭菌，待蒸笼上汽后维持6—8小时即可达到灭菌目的，也可用蒸笼常压间歇灭菌三次，即蒸笼内的水烧开后上汽后保持1小时，然后停火，隔24小时又如法蒸一次，反复进行三次，也可达到灭菌目的。

(4) 接种 按无菌操作法进行，先将已灭菌并放冷的菌种瓶(袋)，母种及用具等放入接种箱，用甲醛和高锰酸钾进行杀菌消毒(方法与母种接种相同)，操作时把接种铲(钩)在酒精灯上烧灼，放冷，把瓶口上包的牛皮纸和棉塞去掉，拔开母种试管棉塞，用酒精灯火焰封口，再用接种铲(钩

取母种一块，放入原种瓶培养料的孔穴边，并使菌丝面紧贴在培养料上，塞好棉塞，在瓶壁上贴上标签，贴有胶布的塑料袋，接种时揭开胶布的一部分接种后，再贴好胶布。

(5) 适温培养 接完后，取出菌种瓶，放在适温下培养，初期应直立于床架上，待菌丝吃料后，将其横放，定期更换方向，使菌丝在瓶内生长伸展均匀，经常检查污染的种瓶，及时淘汰。一般 25—35 天左右菌丝可长满菌种瓶，培养成的原种，菌丝体必须健壮有力，紧贴瓶壁，而不干缩，生活力强，颜色纯正，具有一定香味，无任何杂菌污染。

操作分工：第一组配制木屑麸皮培养基装瓶灭菌及接种（另自己找时间完成）；第二组完成松木屑培养基；第三组完成玉米粒培养基；第四组完成麦粒培养基，后三个组也要完成其他工序（参看第一组的项目）。

思考题：

- ① 玉米和麦粒为主的培养基为何需将它们泡涨，煮透而不能有破损？
- ② 木腐性食用菌是哪些？为何在培养的过程中应使用木屑为主的养料？
- ③ 一级菌种和二级菌种有哪些实质上的区别？为何不用一级菌种直接栽培？
- ④ 新鲜麸皮和米糠在各种培养基中的作用和比例如何？
- ⑤ 培养基中的石膏和碳酸钙用量往往是 1%，主要起何作用？

实验三、栽培种的生产

目的要求：了解母种后怎样扩大生产，栽培出商品食用菌来。

内 容：原种再进行移接扩大就成栽培种，即三级菌种，栽培种培养基的配制，装瓶(袋)，灭菌、接种，培养等方法与原种基本相同，不再重述。

1. 栽培种是从原种瓶的菌种移接而来：

在接种时用接种铲将原种瓶内表面一层老菌皮挖去不用，将菌块挖松切成胡豆大的小块，一般一瓶原种可接栽培种50—80瓶，因接种箱内有燃烧的酒精灯，接种持续时间过长，箱内二氧化碳含量积聚，温度也明显升高，对菌种不利。为了使接种工作快速进行，可用双人接种箱，两人同时工作，一人专管菌种的掏出和接入，另一人专管菌种瓶棉塞的拔出和塞封，工作就顺利。

育成的栽培种要求料块不脱水干缩，菌丝体健壮有力颜色纯正，有清香味，无老化现象，无杂菌污染。

2. 种木菌种：

对一些木腐菌进行段木栽培时，也可用木作为栽培种培养基，种木分为枝条和木块两种。木块又有楔形的和圆形的，制作枝条菌种时，常采用某种食用菌生长的树作种木，若没有也可采用栎、桑、枫、杨、白杨等枝条，砍成1—1.2cm的枝条，长约1.2—1.5cm的小段制作木块菌种，也可制成楔形或圆形木块，将它们浸入1—2%蔗糖水中12小时，使其充分吸足营养液后捞出，同时将其它配料(锯木屑18%，米糠10%，糖1%，石膏粉0.5%)拌匀后加水，其含量与原种培养基相同，从中取出2/3与枝条或木块混合均匀，装入菌种瓶内，适当捣实，把余下的1/3配料盖在每瓶的表面，压平后洗净瓶口及外壁，塞棉塞，灭菌、接种，培养均匀与木屑种同，约经半个月，菌丝长满全瓶且长入枝条或木块内，即可接于段木。

3. 液体菌种的生产：

优点：(1) 生产快速，一瓶固体的菌种需30—50天，而液体菌种只要3—7天；(2) 菌龄一致，因分散均匀，故发育均一，菌龄整齐，且正值旺盛生长期，接种后萌发迅速；(3) 接种简便，适于工厂的大规模生长，流质菌种便于采用机械化、自动化接种，促进产量大幅度提高。

液体培养液配方有：① 葡萄糖 3%，豆饼粉 2%，玉米粉 1%，酵母粉 0.5%， KH_2PO_4 0.1%、 CaCO_3 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.05% 其余为水

(93.15%) pH 自然，121℃ 灭菌 20 分钟，适于多种食用菌培养。

② 可溶性淀粉 3—6%，蔗糖 1%，磷酸二氢钾 0.3%，硫酸镁 0.15%，酵母膏 0.1% 其余为水， pH 6，在 121℃ 下灭菌 30 分钟，适用于平菇、草菇、猴头等。

培养液体菌种，菌丝在液体状态下生长，需要有足够的空气，少量生产，可以用摇床振荡；大量生产可以用发酵罐通气，称为深层培养或深层发酵，需要一整套工业发酵设备，如锅炉、空气压缩机、空气净化系统、发酵罐等，投资大。摇瓶培养规模小，不复杂。装瓶将配好的培养液分装于三角瓶中，装容量的 $\frac{1}{5}$ — $\frac{1}{4}$ 量后用棉塞塞口，瓶口用牛皮纸或聚丙烯稀薄膜包扎好，在 1 公斤/ cm^2 下灭菌 30 分钟，按无菌操纵接入生长旺盛期的斜面母种，每支接 4 瓶，静置培养 3 天，如置于摇床上振荡效果更好。

在温度 23—28℃ 下，振荡培养 6—8 天，即为一级液体菌种，按无菌操作扩接到同样的三角瓶液体培养基中，接种量应为 10—15%，按同样条件培养，3—5 天即可得二级菌种，如再扩接培养，则依次三级、四级液体菌种。必须严格防止污染，一旦污染，则整瓶培养液均应废弃。以保证培养的菌种纯净优良。

液体菌种的使用，可作为原种和栽培种使用，在接种箱内，按无菌操作要领，将液体菌种倒入栽培固体培养基表面，接种量 15—20 毫升，菌丝球应将培养料完全复盖为宜，接种后可按一般栽培种培养和使用；也可直接作栽培种使用，菌种用量每平方米 500—1000 毫升，可散播，但最好穴播，以免菌丝球过于分散；可作深层发酵，直接生产菌丝体，以提取食用菌代谢物质，作为医药和食品工业原料（尚处于试验阶段）。

操作：每组完成栽培种 30 瓶，制种木菌种 2 瓶/人，制液体菌种 1 瓶/人。

思考题：

- ① 液体菌种为何需要摇床或发酵罐？
- ② 液体菌种为什么比固体菌种优越？
- ③ 液体菌种为什么不分1—4级？可视同级？
- ④ 菌种在栽培时为何穴播比散播好些？
- ⑤ 不同培养基的灭菌保持时间为何不同？请举例说明？
- ⑥ 接种后的试管口、瓶口除了塞棉塞外，为何还要加包一牛皮纸或聚丙乙稀薄膜扎好？
- ⑦ 为何各级菌种接种时均强调必须有一定的接种量？