

食 用 菌

菌 种 制 作 技 术

周玉林 编

华中农学院植保系
湖北省食用菌研究所

一九八五年元月

1844



0180

目 录

一	制种设备.....	(1)
二	消毒和灭菌.....	(7)
三	培养基配.....	(14)
四	菌种.....	(30)
五	菌种的分离.....	(48)
六	菌种的检验.....	(57)
七	菌种的质量鉴定.....	(62)
八	菌种的保藏.....	(66)
九	菌种的 与 生.....	(71)

菌种制作技术

食用菌的菌种，相当于农作物的种子，是食用菌生产最基本、最重要的生产资料，它是用人工分离培养的纯菌丝体，并供进一步扩大繁殖应用于生产。菌种的优劣，是食用菌生产成败的关键，也是高产优质的内因，因此，分离培育优良菌种，是提高食用菌生产水平的首要环节。

一 制种设备

菌种必须在无菌条件下进行分离、接种。制种设备可以因地制宜，土洋结合，但要讲究实效，符合科学要求，一般要具备以下设备。

(一) 洗涤室

器皿的清洁是保证工作质量的重要条件，洗涤室内要有一个洗槽和一个放置器皿的空心格子木架，以便滤水，自制几个抽屉式的木盒，便于放置洗涤后的玻璃器皿。条件允许时，要制几个器皿柜，以便存放洁净的器皿等物。洗涤室还须有电炉、煤炉或煤油炉，各种型号的钢精锅，以便加热之用。并要具备洗涤剂如去污粉、肥皂以及各种类型毛刷等。洗涤室应与分离、接种、培养室适当远离，以免旧器皿洗涤前掏出的废弃物质污染环境。

(二) 配料室

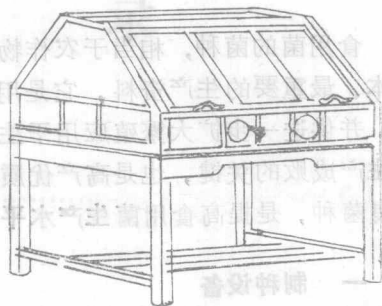
配料室是配制各种培养基和放置灭菌设备的房间，室内可用水泥砌成三面有埂，一面无埂的拌料槽（槽底高于地平

一尺)，室内要较为宽敞，便于配料、装瓶（袋），灭菌进行流水作业。

（三）接种箱

接种箱（图一）又叫无菌箱，主要用木材和玻璃制成，有各种形状和规格。可

以密闭，便于消毒达到无菌状态，以防止接种时杂菌感染，一般接种箱长143厘米，宽86厘米高，154厘米，箱的四个侧面都安装玻璃，但前后两扇玻璃窗可以上下启闭，可启闭的两扇玻璃窗下方各开两个洞口，洞口装上布套袖，



图一 接种箱

以便双手伸入箱内操作。箱内顶部安装一支20瓦日光灯和一支30瓦紫外线灭菌灯。接种箱大小以装80-100瓶为宜，过大操作不方便，过小则工作效率低。

（四）接菌室

接种室又叫无菌室，主要是进行接种的房间。接种室应设在向阳、干燥处，面积不宜太大，房顶不要太高，面积以6—8平方米为宜，以便于空气灭菌。室内墙壁要光滑无缝隙，应刷上白油漆，如在墙表铺上白磁砖则更好，以便打扫清洗，室内所有双层玻璃窗、房顶和门上应有通气孔（大小一尺见方，用纱布挡灰尘）。室外应有一条无菌过道作缓冲间，接种室和缓冲间都要用拉门，两门不要对开，要以相反的方向错开，以减少空气对流，缓冲间不要与其他房间或走

道相通，以免杂菌污染。

接种室内的工作台（桌），要求表面光滑，室内安装2支30瓦的紫外线灯以一支日光灯，紫外线灯离工作桌面为一米，此外，还要备用一套分离接种用的消毒溶液和工具。

缓冲间也应安装紫外线灯和日光灯，最好安放一个小型药品柜，以存放消毒药剂和临时存放分离接种时用的培养基和菌种等。

缓冲间内应备有专用的工作服、拖鞋、口罩、毛巾等物。接种室内应备有酒精灯、接种工具（接种针、环、勺）小刀、剪刀、镊子，75%酒精，棉球、玻璃腊笔、火柴、铅笔，记录本等。

一般菌种分离，少量接种用接种箱就可以了，而较大规模的接种则需使用接种室可以提高工作效率。

（五）培养室

培养室主要指保温培养室，在房间的四周应是双层夹壁，在夹壁中间放填充物（如锯木屑、谷壳等），在门上要有一个双层纱布的通气孔（一尺见方），室内主要设施有升温用的立式电炉或通热气的管道，有条件的可安装降温用的空调机，放置菌种的架子。

培养室是培养菌种的房间，其大小可根据生产规模而定。培养室要求洁净、干燥，通风、保温。室内地板以水泥或木板为宜，放菌种架子以木、竹、铁质结构均可，以4—6层较方便。培养室要经常进行清扫、消毒，培养好的材料必须及时取走。

（六）实验室

用于进行小型试验。要有试验台、柜子，水电装置、仪器设备、显微镜、冰箱、恒温箱、天平、电炉，以及各种药

品和玻璃器皿。

(七) 分离培养菌种所需工具及器皿

1. 酒精灯：用于接种工具、试管口和棉塞的过火灭菌。

2. 接种针：用于分离挑取孢子和菌丝。一般用较粗的电炉丝7—8公分长，一端用小砂轮磨尖并弯成3—4毫米长的小钩，另一端安在一个特制的柄上（塑料柄头加一段金属管）即成。

3. 镊子：长度12.5厘米、20厘米的各一把

4. 解剖刀：用于切割组织、剖开菇木或耳木等。

5. 小榔头：用于敲击劈开种木。

6. 广口瓶：用于盛酒精。

7. 试管：用于制作斜面培养基，培养原种。常用的有三种，不要翻口的。

(1) $1.8 \times 180\text{mm}$ ：作为菌种保藏用。

(2) $1.5 \times 150\text{毫米}$ ：作斜面培养基作。

(3) $1.0 \times 100\text{毫米}$ ：作斜面培养基，供野外采种用，携带方便。

8. 培养皿：有三种规格。

(1) 150毫米（底面直径）：可在内放置若干载玻片，作孢子发芽用。

(2) 90毫米：常用于分离培养，这种规格用量最多。

(3) 60毫米：可在野外采种时用。

9. 漏斗：用于分装配好的培养基，以300毫升左右的玻璃漏斗较好。

10. 分装漏筒：作用同上，容量为2000毫升，适用于制备大量斜面培养基试管。

11. 三角瓶：有50毫升、100毫升、250毫升、500毫升

1000毫升等规格，进行小型试验及孢子分离常用50毫升小三角瓶，内盛培养基。无菌水常用250毫升。

12. 量筒或量杯：用于计量溶液的体积，常用50毫升、100毫升、500毫升、1000毫升等几种规格。

13. 烧杯：有50毫升、100毫升、250毫升、500毫升、1000毫升玻璃烧杯，各种规格可以适当比例购置。500毫升、1000毫升的唐瓷量杯常在配制培养基时使用。

14. 吸管：可备用较多的1毫升刻度吸管及少量5毫升刻度吸管。

15. 滴瓶：常用的规格是25毫升滴瓶，用于盛酸、碱液（调节培养基pH值），以及蒸馏水等。

16. 载玻片和盖玻片：常用的载玻片长宽为7.6厘米、2.6厘米，厚度为0.1—0.13厘米。盖玻片为1.8厘米平方。

17. 唐瓷盘：用于盛各种用具和器皿。

18. 铝锅：用于制作培养基，因制作量常常有多有少，故须购置大、中、小各一个。

19. 电炉：用于加热溶解琼脂等培养基原料，可设置2000瓦电炉一个。

20. 天平：用于称量各种原料。

21. 棉花：制作试管塞和瓶塞可用普通棉花，用于消毒的棉花则要用脱脂棉。

22. 温度计：用于测量温箱、冰箱、干燥箱的温度。

23. 干湿球温度计：用于测量培养室的温、湿度。

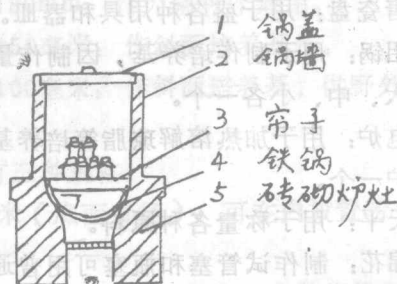
24. 铁丝试管架：用于盛放试管培养基进行灭菌和消毒，一般每架可装试管45—50支。

25. 菌种瓶：用于培养母种（二级种）及栽培种（三级种），常用的有500毫升罐头瓶，和容量750毫升玻璃菌种瓶。

两种。

26. 塑料袋：有16.5×38厘米、10×38厘米、9×18厘米等不同规格的聚丙烯塑料袋，用于制作生产种和栽培，容量大，经济，可降低生产成本。

27. 灭菌设备：用于培养基的高温灭菌，常用各种规格高温蒸汽灭菌器，为适应工作的需要，可设置卧式或立式灭菌器一个，手提式灭菌锅一个。缺乏电源的，也可用砖、水泥、铁锅等建造常压蒸气消毒锅。一般先砌灶，安放一个大铁锅，锅上用砖和水泥砌成桶状结构，制成多层活动木架，用于灭菌时摆放种瓶。桶顶制一大木盖，力求封闭严密。桶内容积一般可装菌种瓶200—400瓶。消毒灭菌的时间，一般水烧开上汽后，再保持6—8小时。同时要注意锅内水分烧干，要定时注入开水。（图二）



图二 土蒸锅

28. 电热烘干箱：用于玻璃器具的干热灭菌和测定基质含水量。需制作盛装培养皿的铁质带盖的盒子。盒的大小以能容8—10套培养皿为宜。吸管同样也用上述材料制成的盒子装好进行干热灭菌，试管、三角瓶要塞上棉花。如无铁

盒，培养皿、吸管也可用报纸包好，在150—160度保持30分钟，灭菌结束，待器皿冷却后即可取出。

29. 恒温培养箱：用于恒温培养菌种。也可自制一个有夹层的木箱，内衬隔热物，箱内可设一至数个电灯泡以调节温度，无电源也可用几个保温玻璃瓶盛开水作为热源。

30. 冰箱：用于低温保存菌种。

31. 显微镜：用于观察、鉴别菌丝和孢子的形态和特征。

32. 玻璃特种铅笔及测定酸碱度的比色试纸等。

二、消毒和灭菌

（一）消毒和灭菌的定义

消毒和灭菌是制种工作中的一项重要操作技术，也是获得纯培养的必要条件。

灭菌和消毒的含义不同。灭菌是指用物理或化学的方法，完全杀死器物表面和内部的一切微生物，又叫完全的灭菌。消毒是指消灭部分微生物，保留所需要的微生物，即部分灭菌。例如进行分离工作时，子实体表面必须进行表面消毒，其目的是为了消灭组织表面的杂菌而保留组织内部的活细胞组织。

（二）常用消毒药剂及使用方法

分离培育菌种时，接种箱（室），器具，手等都要进行充分地消毒，才能开始进行操作。现将常用的消毒药剂、性质、配制使用方法介绍如下：

1. 石炭酸：是有效的常用杀菌剂。大多用5%溶液，能于数小时内杀死芽孢。但对真菌的孢子效用较差。石炭酸很稳定，无腐蚀金属作用，而酒精能使其效力大减，故不可与

酒精混用。通常用5%溶液作接种箱(室)喷雾消毒或器皿、工作服、实验桌的消毒。对皮肤有刺激性,使手发麻。5%石炭酸溶液的配制,可用石炭酸(苯酚)50毫升(原为固体,可用浴锅加温溶化),加水950毫升配成。

2. 酒精(乙醇): 酒精是常用消毒剂,具有脱水作用,可使菌体蛋白变性或沉淀,致使菌体死亡。但无水乙醇杀菌力很低,加水后效力增加。70%酒精杀菌效果最好。95—100%的酒精杀菌力弱,其原因是接触菌体后,立即引起菌体表层蛋白质凝固,形成保护膜,阻止酒精分子继续渗入。70%酒精可用95%酒精750毫升,加水250毫升配成。适合用于操作前手指,试管外壁,金属刀具的表面消毒以及载玻片,盖玻片的浸泡等。

3. 甲醛: 甲醛是常用的杀细菌与杀真菌剂。腐蚀性和刺激性强。纯甲醛为气体,37—40%甲醛水溶液称为福尔马林,其杀菌力很强,一般用于接种箱(室)和培养室的熏蒸消毒。喷洒用的5%甲醛水溶液,可用35%福尔马林原液100毫升,加水600毫升配成。

4. 新洁尔灭: 主要用于皮肤表面、器皿、接种室空气等消毒灭菌。一般用0.25%的水溶液,可用5%原液50毫升,加水950毫升配成,新洁尔灭对无芽孢病原菌、革兰氏阳性和阴性菌,霉菌等杀菌作用强,对革兰氏阳性菌杀菌力更大。

5. 漂白粉水: 用于室内消毒,用漂白粉10克,加水140毫升配成,要用前配制,静置一小时,取上清液喷雾。

6. 升汞: 因有剧毒,只用0.1%水溶液作分离材料的表面消毒。可取升汞1克,溶于2.5毫升的浓盐酸中,再加水1000毫升。汞是重金属,其金属离子能沉淀蛋白质,使酶失

去活性，即使浓度很低，也能不断地进入细胞，造成毒害。

7. 煤酚皂（来苏儿）：通常以1—2%溶液用于手的消毒（浸泡2分钟）和用于无菌室的喷雾消毒。3%来苏儿用于器皿消毒，浸一小时，一般煤酚皂原液含煤酚47—53%，取原液40毫升，加水960毫升配成。

8. 高锰酸钾：是一种强氧化剂。0.1%的水溶液可用于皮肤消毒。2—5%的溶液能使细菌芽孢在24小时内死亡。

9. 0.5%波尔多液：用硫酸铜0.5斤溶于50斤水（用木桶或缸）、用0.5斤生石灰溶于另50斤水，然后等量混合于一容器，充分搅拌后可用于菌种架，段木的消毒。

10. 药皂：用于器具、手指的消毒。

（三）干热灭菌

1. 火焰灭菌：接种针、环、勺等接种工具，可直接在酒精灯火焰上灼烧至红。接种中，试管口、三角瓶口也采用通过火焰而达到灭菌目的。

2. 热空气灭菌：即在干燥箱内（电烘箱）通过加热，使箱内空气温度上升而达到灭菌目的。其温度一般调节在160—180℃之间，不宜超过180℃，常用的温度为165℃，维持1小时。灭菌后当温度降至70℃以下时，方可打开箱门，如高温时打开，玻璃器皿可因突然降温而破裂。用干燥箱灭菌，只适用于玻璃仪器，金属用具，对于培养基等含水份的物质则不能使用。

（四）湿热灭菌

湿热灭菌是常用的灭菌方法，湿热灭菌效果高于干热灭菌，由于热蒸气穿透力强，可以迅速引起菌体细胞中的蛋白质变性、凝固，因此不需要干热灭菌那样高的温度。湿热灭

菌的作用是促使细胞蛋白质变性，而蛋白质变性与含水量、温度有关。含水量大时使其变性所需的温度低。相反，含水量小使其变性所需的温度高，所以湿热灭菌比干热灭菌所需温度低。许多物品（如培养基、无菌水等），必须采用湿热灭菌。湿热灭菌有以下两种：

1. 高压蒸气灭菌

这是食用菌实验，科研和生产中常用的灭菌方法。一般培养基、无菌水、玻璃器皿等都可用此法灭菌。

高压蒸气灭菌的原理是：水的沸点可随压力的增加而提高，当水在密闭的加压灭菌器中煮沸时，加热使蒸气在密闭的容器中不能逸出，至使压力不断加大，水的沸点和温度也随之增高，因而，可以获得比 100°C 更高的蒸气温度。高压蒸气灭菌就是利用高压蒸气产生的高温、及其热蒸气的穿透能力，以达到灭菌的目的。

各种高压蒸气灭菌锅的结构，都有可密闭和耐受高压的特点，都必须具有压力表及温度计，以表示锅内的压力及温度。锅上有排气孔，用于加热时排出冷空气，及灭菌后放出热蒸气。还必须装有安全阀，当压力超过规定限度时，安全阀可以自动排气。

高压蒸气灭菌锅的操作步骤：

（1）打开锅盖或以加水口向锅内加入适量的水。然后将须灭菌的物品放入锅内，不要放得太挤，以免影响蒸气流通。

（2）盖好锅盖，勿使漏气，开始加热。锅内（或卧式灭菌器的夹层内）产生蒸气后，待压力表显示达到 10磅/英寸^2 时，打开放气阀，约数分钟，待冷空气排尽，再关闭放气阀。

(3) 待压力和温度达到具体要求，恒温保持一定时间（按具体要求），此时必须注意勿使压力继续上升或下降。

(4) 灭菌完毕，停止加热，等压力降到零时，打开放气阀，排出残留蒸气，打开锅盖取出灭菌物品。

(5) 如连续使用，要补足水份。使用完毕，则应排尽锅内余水，保持锅内干燥，以免生锈或形成水垢。

使用高压灭菌锅时应特别注意：

(1) 正式加压以前，必须排除锅内冷空气，否则压力虽然升高，而温表达不到要求，造成假升压的现象，以至灭菌不彻底。高压锅内有冷空气时，压力与温度的关系如下表。

高压灭菌锅中空气排除量与温度的关系

压力 磅/时 ²	灭菌锅内温度 (°C)				
	空气未排除	1/3空气 排除时	1/2空气 排除时	2/3空气 排除时	空气尽排
5	72	90	94	100	109
10	90	100	105	109	115
15	100	109	112	115	121
20	109	115	118	121	126
25	115	121	124	126	130
30	121	126	128	130	135

(2) 灭菌后，应使锅内压力徐徐下降，压力降到 5 磅/时²以下时，才能打开放气阀，否则锅内突然减压，培养基或其他液体会从容器内冲出或沾湿棉塞，以至使用时容易污染杂菌。

2. 流动蒸气灭菌：这种灭菌器不是密闭的（如各种土法蒸锅）、蒸气的压力与大气压力相等，蒸气不断地从灭菌器中放出，所以称为流动蒸气灭菌。蒸气温度不超过 100°C ，有些易受高温破坏的培养基或没有高压灭菌器的单位可用这种灭菌方法。流动蒸气灭菌不能一次杀死芽孢和某些真菌孢子，必须间歇地连续进行三天，每天灭菌30—60分钟（指有效温度），第一次灭菌时可杀死培养基中一切微生物的营养体（如菌丝），只剩下部分芽孢没有被杀死，因此，将培养基置 $25-30^{\circ}\text{C}$ 培养24小时，待芽孢发芽成为营养体，在第二次灭菌时就可以杀死。极少数在第一次培养中新形成的芽孢在第二次培养中转化为营养体，在第三次蒸煮时杀死。流动蒸气灭菌上大汽后（ 100°C ），连续保持8—10个小时（勿使断水，要注入开水），也能达到灭菌效果。

（五）接种室与接种箱的消毒方法

1. 接种室的消毒

（1）药物熏蒸：接种室内空间较大，不易保持无菌状态，使用前一天必须进行熏蒸消毒灭菌。一般每立方米空间，需要40%甲醛8毫升、高锰酸钾5克气化熏蒸，使用时先密闭窗子，把称好的高锰酸钾放在大烧杯内，然后将甲醛液倒入杯内，立即出室关门。几秒钟后，甲醛液即沸腾挥发。高锰酸钾是一种强氧化剂，当它与一部分甲醛液作用时，由氧化反应产生的热可使其余的甲醛液体挥发为气体。甲醛对人的眼、鼻有强烈的刺激作用。可在熏蒸后12小时，量取与甲醛液等量的氨水，倒在另一烧杯里，迅速放入室内，可减少对人体的刺激作用。使用氨水中和，至少应在工作前二小时进行。

（2）药物喷雾：每次接种前，一般常用5%石炭酸溶

液喷雾，除具有杀菌作用外，还可使空气中微粒和杂菌孢子沉降，使室内空气净化，并防止工作桌（台）面和地面微尘飞扬。

（3）紫外线灯照射：接种室使用前，与药物喷雾的同时，应打开紫外线灯进行消毒。一般6平方米左右大小的接种室（长3米、宽2米、高2米），能容纳1—2人工作，安装一支紫外线灯管即可（波长2537，功率30瓦）。照射时，人要离开室内，以防辐射伤人，照射结束后，须隔半个小时，待溴氧散尽后再入室开始工作。紫外线灯每次照射1小时为宜。

2. 接种箱的消毒

接种箱一般多用于分离工作和小规模接种，使用前应进行严密的消毒灭菌。

（1）药物揩擦：使用前首先用0.25%新洁尔灭液将箱揩擦干净。

（2）甲醛熏蒸：特别是进行分离工作和接种量较大情况下，箱内摆满了各种工具、器皿，因为液体药物喷雾难以触及器物所有表面，就必须进行熏蒸消毒灭菌，从而保证分离工作的成功。方法同接种室的熏蒸消毒。另外也可将甲醛放烧杯内，置三角铁架上，用酒精灯直接加热，使甲醛液蒸发，进行熏蒸。

（3）紫外线照射：经甲醛熏蒸过的接种箱，工作前再用紫外线灯照射20—30分钟，以达到空间杀菌的目的。照射结束后，隔半个小时就可以开始工作。

（4）药物雾喷：如果接种箱只用于少量的接种工作（如试管原种），则在使用前半小时，喷一次5%石炭酸液，并同时用紫外线灯照射20分钟就可以了。因为接种时试