

张楠,李鑫,唐宗福,等.猴头菇液体菌种中杂菌的分离鉴定及变化规律[J].江苏农业科学,2019,47(17):157-161.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.17.038

# 猴头菇液体菌种中杂菌的分离鉴定及变化规律

张楠<sup>2</sup>,李鑫<sup>1</sup>,唐宗福<sup>1</sup>,徐杨<sup>1</sup>,陶辉<sup>1</sup>,李莹莹<sup>1</sup>,胡洪敏<sup>1</sup>

(1.内江师范学院生命科学学院,四川内江 641100; 2.四川省高等学校特色农业资源研究与利用重点实验室,四川内江 641100)

**摘要:**为掌握猴头菇液体制种过程中主要感染杂菌的种类及变化规律,以采取有效的措施降低染菌率,分析猴头菇活化菌种保存时间与种子液染菌率的关系,鉴定种子液中感染杂菌的种类和来源,评价 6 种抗生素对杂菌的抑制作用。结果表明,猴头菇活化菌种在温度为 4℃ 条件下,于 0~5 d 时间段内接种于液体培养基时染菌率最低,均在 20% 左右,随着时间的延长,染菌率呈上升趋势。感染种子液的杂菌有 5 种(分别命名为 WR1、WR2、WR3、WR4、WR5),其中 4 种为芽孢杆菌和 1 种为葡萄球菌,主要来源于进行试验场所的空气中,它们对硫酸庆大霉素和乳酸链球菌素较为敏感。综上所述,要解决猴头菇液体制种过程中染菌的问题,首先是严格规范试验操作,其次是减少活化菌种保存时间,最后是保持实验室空气清洁。必要时在种子培养基中可以加入一定量的乳酸链球菌素,以减少染菌率。

**关键词:**猴头菇;液体菌种;杂菌;分离鉴定;杂菌的来源;最小抑/杀菌浓度;变化规律

**中图分类号:** S646.904 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)17-0157-05

猴头菇(*Hericium erinaceus*),因其形状酷似猴子头而得名,别称猴头菌、猴头蘑、刺猬菌等,是一种重要的药食两用菌<sup>[1]</sup>。它含有多肽、多糖、酰胺、甾体化合物、萜类化合物、酚类化合物、生物碱类化合物和吡喃酮类化合物等,具有抗肿瘤、抗溃疡、抗氧化、抗炎症、抗疲劳、增强免疫力、保护肝脾、降血糖、降血脂等功效<sup>[2-3]</sup>,对神经衰退及老年痴呆等神经性疾病有较好的治疗效果。这些良好的生理功效正日益受到人们的关注和重视,许多猴头菇相关的食品和保健品得以开发利用,猴头菇市场需求不断扩大,猴头菇产品的主要生产原料主要来自猴头菇成熟的子实体和通过发酵产生的菌丝体<sup>[4]</sup>,猴头菇子实体和菌丝体的获得均需要大量的猴头菇菌种,菌种生产是首道工序,其直接关系到猴头菇产量与品质,是生产成败的关键<sup>[5]</sup>。

猴头菇菌种的生产方式主要有 2 种,一种是传统的固体菌种,另一种是液体菌种,与固体菌种相比,液体菌种具有很多优越性<sup>[6]</sup>。首先,液体菌种没有级别之分,既可以作为母种接种到原种培养基中,也可以作为栽培种直接接种到栽培袋中,既简化了生产工艺,又降低生产成本;其次,液体菌种在完全无菌条件下制得,菌种纯度高,菌龄一致;再次,液体菌种萌发速度快,可降低污染率;最后,液体菌种操作简便,生产周期短,易于工业化生产<sup>[7-8]</sup>。目前,液体菌种的制备多采用“(斜面)母种→一级摇瓶种→二级摇瓶种→培养器”的生产工艺<sup>[9-10]</sup>,其中由斜面母种制备一级摇瓶种这一环节最容易出现感染杂菌的现象,这一环节染菌可最终导致培养器染菌。染杂菌的发生主要是由母种带菌(感染了杂菌)造成的,食用菌母种在转接或保存过程中最容易感染细菌(这种现象很难

用肉眼去发现),往往造成食用菌的一级摇瓶种和二级摇瓶种染菌,这也是食用菌产业合作社和食用菌种植户在栽培过程中不采用液体菌种的主要原因。

前人将染菌预防措施的研究重点放在加强环境卫生管理、选用纯度高和菌丝健壮的菌种等方面,并未对液体菌种易感染的杂菌种类、来源及相关规律进行探究<sup>[7]</sup>。因此,本研究分离和鉴定猴头菇液体菌种易感染的细菌,并分析它们的来源,探讨杂菌感染率与活化的斜面母种(从沙土管和液体石蜡保存的菌种)保存时间的变化规律,还提出了相应的防治措施。目的是为了帮助食用菌专业合作社或者食用菌种植户能采取防治液体菌种染菌的措施,预防或减少猴头菇液体菌种制备过程中染菌的发生,从而加快猴头菇液体菌种的应用和推广。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种 猴头菇 TJH-03 分离自四川省唐家河国家级自然保护区的猴头菇鲜标本。

1.1.2 培养基 猴头菇菌株活化培养基为改良 PDA 培养基<sup>[11]</sup>,猴头菇液体种子液培养基为改良 PDA 液体培养基,猴头菇液体菌种中感染的杂菌分离培养基为 LB 固体培养基。

1.1.3 抗生素 硫酸庆大霉素(效价 $\geq 590 \mu\text{g}/\text{mg}$ )、硫酸卡那霉素〔效价(无水) $\geq 750 \mu\text{g}/\text{mg}$ 〕、氨苄青霉素钠(效价 $845 \sim 988 \mu\text{g}/\text{mg}$ )和硫酸链霉素(效价 $650 \sim 850 \mu\text{g}/\text{mg}$ )均为 USP 级(美国药典标准),均购于美国 Amresco 公司。乳酸链球菌素(nisin)为食品级,购于石家庄春信生物科技有限公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 菌株的活化 用直径为 10 mm 的无菌打孔器在培养好的猴头菇 TJH-03 平板上打取长势一致的菌饼,用灭菌小镊子挑取打好的菌片接种到 PDA 平板中央上(培养基体积为 15 mL),每皿放 1 片菌,于温度为 25℃ 条件下倒置培养 5~

收稿日期:2019-03-11

基金项目:四川省教育厅科技成果转化重大培育项目(编号:17CZ0018)。

作者简介:张楠(1980—),男,山东青岛人,博士,副教授,主要从事食用菌栽培和液体发酵工作。E-mail:zhangnan@njtc.edu.cn。

7 d,得到 TJH-03 活化菌种,用封口膜密封保存备用。

1.2.2 不同保存时间对种子液染菌率的影响 将活化的 TJH-03 菌种保存于 20 ℃ 恒温培养箱和 4 ℃ 冰箱中。在保存 0、1、5、10、15、20 d 同一条件下取 8 个平板,接种于种子液培养基(50 mL/500 mL 三角瓶)中,每瓶取 4 片菌饼,接种 50 瓶,在 25 ℃ 温度条件下 120 r/min 培养 7 d,计算染菌率。每天观察种子液的状态变化,在培养的过程中如果种子液出现浑浊的现象,说明它们感染了杂菌。每组试验重复 3 次,数据以平均数表示。

1.2.3 种子液中杂菌的分离与纯化 采用稀释平板涂布法对猴头菇感染杂菌的种子液中的细菌进行分离<sup>[12]</sup>,在无菌条件下取 10 mL 种子液加到装有 90 mL 灭菌生理盐水的三角瓶中,充分振荡混匀,静置 15 min,再以无菌生理盐水进行 10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup> 梯度稀释,取 3 个连续梯度的稀释液各 0.2 mL 涂布于 LB 固体培养基上,37 ℃ 条件下倒置培养 24~36 h 待培养皿长出菌落,根据形态、颜色等挑选典型菌落在 LB 固体培养基上划线纯化,重复 3~4 次,直至出现单菌落,将纯化后的单菌株接入 LB 培养基中扩大培养并保存菌种。

1.2.4 杂菌的分类鉴定 通过形态、生理生化特性并结合 16S rRNA 基因序列对种子液中感染的杂菌进行分类鉴定。形态特征采用革兰氏染色观察法,生理生化鉴定参照东秀珠等《常见细菌系统鉴定手册》上的方法<sup>[13]</sup>进行测定。

16S rDNA 鉴定:用 TaKaRa miniBEST Bacteria Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0 试剂盒提取菌株 DNA,具体步骤参见试剂说明书,用 27F(5′-AGATTGATCCTGGCTCAG-3′)和 1 492R(5′-GGTACCTGTTACGACTT-3′)引物扩增 16S rDNA,所用试剂为 TaKaRa PCR Amplification Kit,PCR 步骤和程序采用吴晓晖等的方法<sup>[14]</sup>。PCR 扩增产物送于生工生物工程(上海)股份有限公司进行基因序列测定。将基因序列在 NCBI 的 BLAST 检索系统中进行序列同源性分析,并使用 MEGA 6.0 软件对基因序列进行系统发育分析和进化树的构建。

1.2.5 杂菌的来源分析 参照 GB/T 16294—2010《医药工业洁净室(区)沉降菌的测试方法》<sup>[15]</sup>对进行猴头菇液体菌种相关试验场所(主要包括接种室、超净工作台、培养室、保存室、冰箱)环境中的微生物进行收集,采样结束后于 TSA 平板 32 ℃ 培养箱中倒置培养 3 d<sup>[16]</sup>。根据形态、颜色等挑选平板中典型菌落,划线纯化,通过形态、生理生化特性并结合 16S rRNA 基因序列进行分类鉴定,并与 WR1、WR2、WR3、WR4、WR5 进行同源性分析。

1.2.6 最小抑/杀菌浓度的测定 取无菌 96 微孔板,第 1 孔加入 150 μL 的 MH 肉汤培养基(不含抗生素)作为阴性对照,第 2 孔至第 11 孔分别加入 75 μL 的 MH 肉汤培养基 2 倍稀释各抗生素溶液,使各孔最终质量浓度分别为 2 000.00、1 000.00、500.00、250.00、125.00、62.50、31.25、15.63、7.81、3.95 μg/mL<sup>[17-18]</sup>。第 2 孔至第 12 孔分别加入 1 × 10<sup>6</sup> CFU/mL 细菌悬液 75 μL,第 12 孔再加入 75 μL 的 MH 肉汤培养基作为阳性对照,将微孔板置于 37 ℃ 培养箱中恒温培养 24 h,观察各孔的变化。最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration,简称 MIC)和最小杀菌浓度(minimum

bactericidal concentration,简称 MBC)测定参照美国临床试验标准委员会(clinical and laboratory standards institute,简称 NCCLS)的第 25 版信息增刊 M100-S25 文件<sup>[19]</sup>。以菌株 WR1、WR2、WR3、WR4 和 WR5 为指试菌,测定硫酸庆大霉素、卡那霉素、氨苄青霉素、乳酸链球菌素和硫酸链霉素对它们的 MIC 和 MBC。

1.2.7 数据统计处理 所有试验重复 3 次,检测数据以“平均数±标准差”表示,用 SAS 9.4 软件进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同保存温度及时间对种子液染菌率的影响 由表 1 可知,在 4 ℃ 条件下冷藏和在 20 ℃ 恒温条件下,染菌率的变化趋势较为一致,均随着保存时间的延长,染菌率逐渐上升,4 ℃ 温度条件下染菌率从 16.00% 升到 45.33%;在 20 ℃ 温度条件下,染菌率从 18.00% 升到 46.00%。在 1~5 d 的时间段出现了平稳区域,染菌率差异不显著(P>0.05),均在 20% 左右;而在 5~15 d 时染菌率显著上升,5、10、15 d 染菌率的差异极显著(P<0.01);从 15 d 之后染菌率又开始出现平稳区域,差异不显著,4 ℃ 温度条件下染菌率维持在 43.33%~45.33%,20 ℃ 温度条件下维持在 44.67%~46.00%。此外,在 4、20 ℃ 条件下,相同时间段内的染菌率无显著差异性,但在 4 ℃ 温度条件下,固体菌种的菌丝体代谢缓慢,可保持较好的活性。

表 1 在 4 ℃ 冷藏和 20 ℃ 恒温条件下种子液染菌率随种子保存时间的变化

保存时间 (d)	染菌率(%)	
	4 ℃	20 ℃
0	16.00 ± 0.02Cc	18.00 ± 0.02Cc
1	18.00 ± 0.02Cc	19.33 ± 0.01Cc
5	20.00 ± 0.02Cc	21.33 ± 0.01Cc
10	35.33 ± 0.02Bb	36.67 ± 0.02Bb
15	43.33 ± 0.31Aa	44.67 ± 0.01Aa
20	45.33 ± 0.03Aa	46.00 ± 0.002Aa

注:同列数据后不同大写、小写字母表示在 0.01、0.05 水平上差异显著。

2.2 种子液中杂菌的分离与鉴定

从感染细菌种子液中共分离纯化得到 5 种菌株,分别记为 WR1、WR2、WR3、WR4、WR5。随着菌种保存时间的延长,在接种时不但导致染菌率的增加,同时还导致感染细菌种类的增加(表 2)。菌种在保存 0、1 d 接种时,从感染的种子液中分离纯化得到 2 种菌株,即 WR1、WR2;在保存 5 d 时,WR1、WR2、WR5 被分离纯化得到;在保存 10 d 时,分离纯化得到菌株在 WR1、WR2、WR5 的基础上增加了 WR4;在保存 15、20 d 时,5 种菌株全部被分离纯化得到。

参考《伯杰细菌鉴定手册》和《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[13,20]</sup>,结合表 2、表 3 的试验结果,初步确定菌株 WR1、WR2、WR4、WR5 分别与蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、阿耶波多氏芽孢杆菌(*B. aryabhattai*)、贝莱斯芽孢杆菌(*B. aryabhattai*)鉴定特征接近,菌株 WR3 与 *Staphylococcus petrasii* 鉴定特征接近<sup>[21-22]</sup>。

表 2 菌株 WR1、WR2、WR3、WR4、WR5 的表型特征和分布特点

菌株	表型特征	分离结果											
		4 ℃						20 ℃					
		0 d	1 d	5 d	10 d	15 d	20 d	0 d	1 d	5 d	10 d	15 d	20 d
WR1	杆状,菌落似圆形,乳白色,表面粗糙,不透明似融蜡状,边缘不整齐	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
WR2	杆状,菌落圆形,污白色,表面粗糙有褶皱,不透明,边缘不整齐	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
WR3	球状,菌落圆形,浅黄色,表面光滑,不透明,边缘整齐	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
WR4	杆状,菌落圆形,黄色,表面湿润,不透明,边缘整齐	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
WR5	杆状,菌落圆形,乳白色,表面粗糙有褶皱,不透明,边缘不整齐	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+

注:“+”表示分离到;“-”表示未分离到;表 4 同。

表 3 菌株 WR1、WR2、WR3、WR4 和 WR5 的生理生化特征

试验名称	试验结果				
	WR1	WR2	WR3	WR4	WR5
革兰氏染色	+	+	+	+	+
产芽孢	+	+	-	+	+
淀粉水解	+	+	+	+	+
明胶液化	+	+	+	+	+
柠檬酸盐利用试验	+	+	+	+	+
接触酶试验	+	+	+	+	+
硝酸盐还原	+	+	+	+	+
V-P 测定	+	+	-	+	+
吡啶试验	-	-	-	-	-
酪氨酸水解	-	-	-	-	+
甲基红反应	-	+	-	-	+
苯丙氨酸脱氨酶试验	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S 产气	-	-	-	-	-
D-葡萄糖	+	+	+	+	+
D-木糖	+	-	+	+	+
D-甘露醇	+	-	-	+	+
D-阿拉伯糖	+	-	+	+	+

注:“+”表示阳性反应;“-”表示阴性反应。

将 5 株细菌 16S rRNA 序列通过 BLAST 软件与 GenBank 数据库进行同源性比对分析,选取同源性较高的模式菌株,通过 MEGA 6.06 软件采用 Neighbour-Joining 法构建系统发育

树(图 1、图 2),并用 DNAMAN 8.0 软件计算序列的相似性。结果表明,菌株 WR1 与蜡样芽孢杆菌 ATCC 14579 (NR\_074540.1)高度相近,相似性高达 99.86%;菌株 WR2 与枯草芽孢杆菌 JCM 1465 (NR\_113265.1)相似性高达 100.00%;菌株 WR3 与 *S. petrasii* CCM 8418 (NR\_118450.1)高度相近,相似性高达 100.00%;菌株 WR4 与阿耶波多氏芽孢杆菌 B8W22 (NR\_115953.1)高度相近,相似性高达 99.65%;菌株 WR5 与贝莱斯芽孢杆菌 FZB42 (NR\_075005.2)高度相近,相似性高达 99.86%。结合形态特征及生理生化鉴定结果,最终将菌株 WR1、WR2、WR3、WR4、WR5 分别鉴定为蜡样芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、*S. petrasii*、阿耶波多氏芽孢杆菌和贝莱斯芽孢杆菌。

2.3 杂菌的来源分析

将 WR1、WR2、WR3、WR4、WR5 与相关试验场所内的微生物进行对比,结果(表 4)发现,WR1、WR2、WR4 和 WR5 均存在于接种室、培养室、保存室和冰箱中,说明猴头菇液体菌种在制备过程中污染的杂菌主要来自于进行试验的场所内。从杂菌来源来看,严格规范试验操作是减少污染最主要的途径,减少实验室的内空气流动也十分必要<sup>[23]</sup>。此外,WR3 还未找到来源,须进一步研究。

2.4 最小抑/杀菌浓度的测定

由表 5 可知,硫酸庆大霉素和乳酸链球菌对菌株 WR1、WR2、WR3、WR4、WR5 均具有较好抑菌效果,硫酸庆大霉素对菌株 WR1、WR2、WR3、WR4、WR5 的 MIC 分别为 31.25、

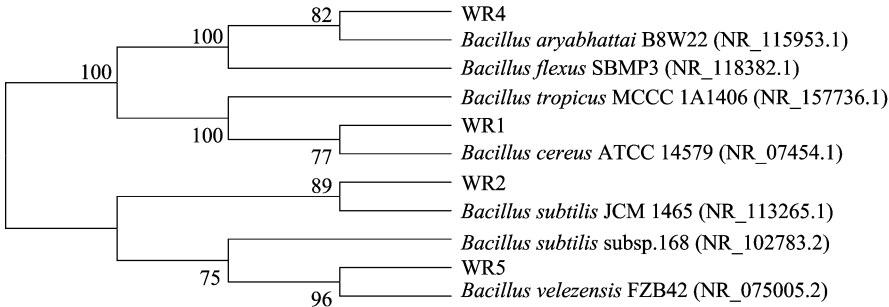


图1 基于 16S rRNA 序列建立菌株 WR1、WR2、WR4 和 WR5 的系统发育树

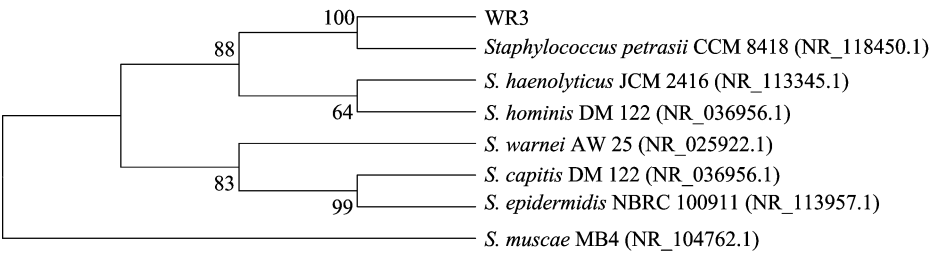


图2 基于16S rRNA 序列建立菌株 WR3 的系统发育树

表 4 WR1、WR2、WR4 和 WR5 在相关试验场所中出现情况

菌株	接种室	超净工作台	培养室	保存室	冰箱
种类	5	0	6	4	4
WR1	+	—	+	+	+
WR2	+	—	+	+	+
WR3	—	—	—	—	—
WR4	+	—	+	+	+
WR5	+	—	+	+	+

注:从培养室分离到 6 种菌株,分别为 WR1、WR2、WR4、WR5、松鼠葡萄球菌和 1 种未鉴定出来的菌株。

表 5 6 种抗生素对 WR1、WR2、WR3、WR4 和 WR5 的 MIC 与 MBC μg/mL

菌株	硫酸庆大霉素		卡那霉素		氨苄青霉素		乳酸链球菌素		硫酸链霉素	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
WR1	31.25	250.00	—	—	—	—	250.00	1 000.00	—	—
WR2	31.25	125.00	—	—	—	—	500.00	1 000.00	125.00	500.00
WR3	62.50	500.00	1 000.00	—	—	—	125.00	500.00	250.00	1 000.00
WR4	31.25	500.00	15.63	62.50	—	—	125.00	250.00	31.25	62.50
WR5	31.25	125.00	—	—	—	—	500.00	1 000.00	250.00	500.00

注:“—”表示没有抑菌作用。

31.25、62.50、31.25、31.25 μg/mL,乳酸链球菌对菌株 WR1、WR2、WR3、WR4、WR5 的 MIC 分别为 250.00、500.00、125.00、125.00、500.00 μg/mL。取 MIC 以上无细菌生长的清亮管中 100 μL 培养液涂布肉汤固体培养基平板上,进行活菌计数,37 ℃ 恒温条件下培养 12 h,观察有无细菌生长。平板上细菌计数少于 5 个菌落者的最低浓度为 MBC。因此,确定硫酸庆大霉素对菌株 WR1、WR2、WR3、WR4、WR5 的 MBC 分别为 250.00、125.00、500.00、500.00、125.00 μg/mL,乳酸链球菌素对菌株 WR1、WR2、WR3、WR4、WR5 的 MBC 分别为 1 000.00、1 000.00、500.00、250.00、1 000.00 μg/mL。

3 结论与讨论

食用菌液体菌种是指采用液体深层培养法获得的菌种<sup>[24]</sup>,是在发酵罐中采用液体培养基通入无菌空气并加以搅拌,以增加培养基中的溶氧量,控制发酵工艺参数,给菌丝生长提供一个最佳的营养、酸碱度、温度、供氧量,使菌丝快速生长,迅速扩繁,在短时间内获得大量菌种。液体菌种在香菇<sup>[9]</sup>、草菇<sup>[25]</sup>、双孢蘑菇<sup>[26]</sup>、杏鲍菇<sup>[27]</sup>、金针菇<sup>[28]</sup>的生产和栽培上得到应用,并表现出制种周期短、接种效率高、定植封面快、发菌周期短、菌龄一致以及污染率和生产成本低等优点,适合食用菌规模化、工厂化生产。

食用菌液体制种技术不同于传统的固体制种技术,生产

环节较多,易引起杂菌感染菌种,使食用菌商品率降低,经济效益下降。研究发现,造成猴头菇液体菌种污染的主要原因是专用母种带菌,即专用种在制作过程中造成污染或者是在存贮过程中造成二次污染,这就要求活化好的猴头菇菌种应在 0~1 d 内进行液体培养基接种,最长不超过 5 d,不仅可以降低染菌概率,还可以保持菌种良好活性。从感染杂菌的种类看,主要是芽孢杆菌(WR1、WR2、WR4、WR5)和葡萄球菌(WR3),其中 WR1 和 WR2 为主要感染菌。此外,WR1、WR2、WR4 和 WR5 主要存在于微生物接种室、培养室、保存室和冰箱中,说明猴头菇液体菌种染菌可能是研究人员在微生物研究过程中操作不当引起的污染。因此,液体菌种栽培对操作人员要求更高,生产中要严格实行操作技术规程,具有较强的无菌意识,同时要 对菌种制备室进行定期有效的消毒,消除杂菌。

最小抑/杀菌浓度的测定结果显示,硫酸庆大霉素和乳酸链球菌素对菌株 WR1、WR2、WR3、WR4 和 WR5 的抑菌效果佳,因此,在试验允许的前提下可以在培养基中加一定量的抗生素,可优先选择乳酸链球菌素。乳酸链球菌素是由乳酸链球菌产生的一种新型多肽,对许多革兰氏阳性菌具有强烈的抑制作用,摄入后可被人体中的蛋白酶降解为各种氨基酸,没有毒副作用,因此它是目前世界上唯一允许使用在食品防腐方面的抗菌素<sup>[18,29]</sup>。乳酸链球菌素耐酸、耐热性能优良,在

酸性条件下高温灭菌时仍呈现稳定性<sup>[30]</sup>,而猴头菇菌丝适宜在酸性环境下生长,一般要求 pH 值在 4.5~6.5<sup>[31]</sup>,这样就可以在液体种子培养基中加入乳酸链球菌素,与培养基一起高温灭菌,冷却到适宜的温度后,接入菌种即可。这也为猴头菇菌液体深层发酵和猴头菇菌丝体的应用提供了技术支持,用液体发酵法生产的猴头菇菌丝体要比栽培生产子实体简便、快速,并且通过发酵生产的猴头菇菌丝体的营养成分无论是蛋白质、氨基酸含量还是维生素含量均类似于子实体,用液体发酵菌丝体可以制备食用菌饮料、调味品、食品添加剂及饲料添加剂等<sup>[32]</sup>,开发利用猴头菇液体发酵获得菌丝体及其代谢产物来制备药物具有较好的发展前景。

本研究表明,在猴头菇液体菌种制备过程中,活化菌种应在 0 d 内进行接种,最长不要超过 5 d,既能保持菌种的活性,又能降低染菌率。感染液体菌种的主要杂菌是蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*),其次是 *S. petrasii*、阿耶波多氏芽孢杆菌(*B. aryabhattai*)和贝莱斯芽孢杆菌(*B. aryabhattai*)。防治猴头菇液体菌种污染的有效措施是严格规范试验操作、减少菌种保存时间和保持实验室空气清洁。乳酸链球菌素作为唯一被允许用作食品添加剂的细菌素,不仅能够减少猴头菇液体菌种和菌丝体发酵的染菌率,还能够满足食品安全要求。

#### 参考文献:

- [1] 张维瑞,刘盛荣,苏贵平,等. 金针菇松杉木屑菌糠栽培猴头菇的技术研究[J]. 热带作物学报,2017,38(4):597-601.
- [2] 张微思,何容,李建英,等. 猴头菇的营养药用价值及产品研究现状[J]. 食品与发酵科技,2018,54(1):104-108.
- [3] 谭佳媛,王栩俊,王星丽,等. 猴头菇的养生保健价值[J]. 食药菌,2015,23(3):188-193.
- [4] 何晋浙,樊鹏,孙培龙. 猴头菌素分离纯化、结构鉴定及体外活性研究[J]. 核农学报,2018,32(2):318-324.
- [5] 张金霞,陈强,黄晨阳,等. 食用菌产业发展历史、现状与趋势[J]. 菌物学报,2015,34(4):524-540.
- [6] 王玉,李政,班立桐,等. 猴头菇液体菌种培养基配方的研究[J]. 北方园艺,2011(9):202-204.
- [7] 姜国胜,张娣,杜萍,等. 食用菌液体发酵罐制种技术[J]. 食用菌,2016(6):49-51.
- [8] 张腾霄,王斌,苏适,等. 液体菌种栽培食用菌关键技术应用探析[J]. 山西农业科学,2015,43(4):425-427,443.
- [9] 周峰,李巧珍,杨仁智,等. 香菇液体菌种与固体菌种的生产成本和使用效果分析[J]. 食药菌,2017,25(3):199-202,204.
- [10] 刘敏,刘鹏冀,赵玉涛,等. 白背毛木耳液体发酵条件优化[J]. 江苏农业科学,2017,45(21):149-151,175.
- [11] Zhang N, Song Z, Xie Y H, et al. Identification and characterization of antifungal active substances of *Streptomyces hygroscopicus* BS-112[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013,29(8):1443-1452.
- [12] 王佳楠,石妍云,郑力燕,等. 石油降解菌的分离鉴定及 4 株芽孢杆菌种间效应[J]. 环境科学,2015,36(6):2245-2251.
- [13] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:242-294.

- [14] 吴晓晖,谢永丽, Renato D, 等. 3 株分离自高寒草甸根际芽孢杆菌的分子鉴定及其生物活性[J]. 草业科学,2017,34(12):2454-2463.
- [15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 医药工业洁净室(区)沉降菌的测试方法:GB/T 16294—2010[S]. 北京:中国标准出版社,2010:1-7.
- [16] 苏远科,张晓敏,刘同辉,等. 基于 16S rRNA 对洁净室环境微生物的分析研究[J]. 食品安全质量检测学报,2017,8(11):4161-4168.
- [17] 李钟美,黄和. 高良姜提取物抑菌活性及稳定性研究[J]. 食品与机械,2016,32(2):55-59.
- [18] 张楠,李武,彭慧娟,等. 吸水链霉菌多糖的纯化鉴定及其性质[J]. 核农学报,2017,31(12):2367-2376.
- [19] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty - Fifth informational supplement M100 - S25[S]. Pennsylvania: NCCLS, 2015:156-179.
- [20] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:242-294.
- [21] de Bel A, Švec P, Petrůš P, et al. Reclassification of *Staphylococcus jettensis* as *Staphylococcus petrasii* subsp. *jettensis* subsp. nov. an emended description of *Staphylococcus petrasii* pantucek [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014,64(12):4198-4201.
- [22] Švec P, de Bel A, Sedláček I, et al. *Staphylococcus petrasii* subsp. *pragensis* subsp. nov., occurring in human clinical material [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015,65(7):2071-2077.
- [23] 胡进玲,古丽君,曹师,等. 草类植物微生物实验室的杂菌种类及其来源[J]. 草业科学,2018,35(5):1315-1322.
- [24] 丁米田,李灿. 食用菌液体菌种摇瓶培养操作技术要点[J]. 现代农业科学,2009,16(4):53.
- [25] 杨璐. 草菇(*Volvariella volvacea*) YL-93 液体菌种及熟料栽培研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2017:39-47.
- [26] 曾志恒,曾辉,程翊,等. 双孢蘑菇液体菌种应用研究初探[J]. 福建轻纺,2016(9):30-34.
- [27] 杨丽维. 杏鲍菇液体菌种生产技术的研发与应用[D]. 北京:中国农业科学院,2014:12-26.
- [28] 柴慈桐,祁勇. 金针菇液体菌种培养条件的筛选及应用研究[J]. 食用菌,2010(6):13-14.
- [29] Gharsallaoui A, Oulahal N, Joly C, et al. Nisin as a food preservative: physicochemical properties, antimicrobial activity, and main Uses [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2016,56(8):1262-1274.
- [30] 高蕾蕾,李迎秋. 乳酸链球菌素及其在食品中的应用研究进展[J]. 中国调味品,2017,42(3):157-160,165.
- [31] 丁智权. 猴头菇母种培养基调酸技术[J]. 食用菌,1994(6):44.
- [32] Cui F J, Liu Z Q, Li Y, et al. Production of mycelial biomass and exo-polymer by *Hericium erinaceus* CZ-2: optimization of nutrients levels using response surface methodology [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2010,15(2):299-307.