

# T/WSWXH

## 新疆维吾尔自治区微生物学会团体标准

T/WSWXH 010—2024

### 棉花耐盐防病促生菌种衣剂生产技术规程

Technical regulations for the production of salt-tolerant, disease-resistant and growth-promoting cotton seed coating agent

2024 - 09 - 11 发布

2024 - 09 - 12 实施

## 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。

本文件由新疆农业科学院微生物应用研究所提出。

本文件由新疆维吾尔自治区微生物学会归口。

本文件起草单位：新疆农业科学院微生物应用研究所。

本文件主要起草人：史应武、杨红梅、楚敏、高雁、霍向东、曾军、林青、詹发强、包慧芳、王宁、杨蓉、牛新湘、娄恺。

# 棉花耐盐防病促生菌种衣剂生产技术规程

## 1 范围

本标准规定了耐盐防病促生菌种衣剂生产中涉及的术语和定义、生产环境、生产车间、菌种、发酵增殖、后处理、包装、储运及质量检验等技术环节作出要求。

本标准适用于耐盐防病促生菌种衣剂产品生产（或执行）。

## 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 3095 环境空气质量标准
- GB 3838 地表水质量标准
- GB 20287 农用微生物菌剂
- NY/T 883 农用微生物菌剂生产技术规程
- DB23/T 823 种子包衣操作技术规程

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**耐盐防病促生细菌** salt-tolerant, disease-proof and growth-promoting bacteria

具有提高棉花苗期对盐耐受性，同时兼具防治棉花土传真菌和细菌病害的一种或几种细菌。

### 3.2

**微生物菌剂** microbial agents

一种或一种以上目的（或者用途）微生物经工业化生产增殖后直接使用，或经浓缩、载体吸附而制成的活菌制品。

### 3.3

**生物种衣剂** biological seed coating agent

生物种衣剂是利用有益的拮抗菌与病原菌之间的拮抗原理，将拮抗菌作为生物活性成分，辅以成膜剂和着色剂等非活性成分混合而创制出的一种新型种衣剂。

### 3.4

**种子包衣** seed coating

种子包衣是指利用粘着剂或成膜剂，用特定的种子包衣机，将杀菌剂、杀虫剂、微肥、植物生长调节剂、着色剂或填充剂等非种子材料，包裹在种子外面，以达到种子成球形或者基本保持原有形状，提高抗逆性、抗病性，加快发芽，促进成苗，增加产量，提高质量的一项种子技术。种衣剂能迅速固化成膜，因而不易脱落。

## 4 生产环境及生产车间要求

### 4.1 生产环境

厂区空气质量达到大气环境质量标准GB 3095中II类标准要求；

发酵用水达到地表水质量标准GB 3838中III类水质要求，冷却水及其他用水达到标准中IV类水质要求。

### 4.2 生产车间

发酵车间与吸附等后处理车间距离适当，相对隔离，有密闭且可以灭菌的传输通道；  
菌种的储藏间、无菌操作间与生产车间相对隔离；  
发酵等生产关键性车间采用双路供电或备用一套发电机；  
建立定期用消毒剂进行生产设备和环境消毒的车间环境卫生制度。

## 5 生产技術流程

耐盐防病促生菌剂的生产按照NY/T 883进行，一般生产技術环节见附录A。

### 5.1 菌种

#### 5.1.1 原种

原种是耐盐防病促生菌剂生产用菌种的母种，对原种的要求如下：  
有菌种鉴定报告和效果应用证明；  
菌种的企业编号、来源等信息。

#### 5.1.2 菌种的保存和管理

采用合适的方式保存菌种，确保无杂菌污染，菌种不退化。应选用一种以上适宜的方法保藏，常见菌种类型及相应保藏方式见附录B；  
分类存放，定期检查；  
建立菌种档案。

#### 5.1.3 菌种质量控制

在生产之前，应对所用菌种进行检查，确认其菌落形态、细胞形态、芽孢大小、位置、形状和耐盐防病促生性能没有发生退化。出现污染或退化的菌种不能作为生产用菌种，需进行5.1.4或5.1.5操作。

#### 5.1.4 菌种的纯化

菌种不纯时，应进行纯化。可采用平板划线分离法或稀释分离法，得到纯菌种。必要时可采用显微操作单细胞分离器进行菌种分离纯化。对纯化的菌种应进行生产性能的检查。

#### 5.1.5 菌种的复壮

菌种发生下列现象之一，应进行菌种复壮：  
菌体形态及菌落形态发生变化；  
代谢活性降低，发酵周期改变；  
重要功能性物质的产生能力下降；  
其他重要特性的退化或丧失；  
菌种复壮方法：回接到原宿主或原分离环境传代培养，重新分离该菌种。

### 5.2 发酵增殖

#### 5.2.1 种子扩培

原菌种应连续转接活化至生长旺盛后方可应用。

种子扩培过程包括试管斜面菌种、摇瓶（或固体种子培养瓶）、种子罐发酵（或种子固体发酵）培养三个阶段，操作过程要保证菌种不被污染、生长旺盛。

#### 5.2.2 培养基

培养基重要原料应满足一定的质量要求，包括成分、含量、有效期以及产地等。对新使用的发酵原料需经摇瓶试验或小型发酵罐试验后方可用于发酵生产。

##### 5.2.2.1 种子培养基

种子培养基要保证菌种生长延滞期短，生长旺盛。原料应使用易被菌体吸收利用的碳、氮源，且氮源比例较高，营养丰富完全，有较强的pH缓冲能力。最后一级种子培养基主要成分应接近发酵培养基。

### 5.2.2.2 发酵培养基

发酵培养基要求接种后菌体生长旺盛，在保证一定菌体（或芽孢、孢子）密度的前提下兼顾有效代谢产物。原料应选用来源充足、价格便宜且易于利用的营养物质，一般氮源比例较种子培养基低。

可采用对发酵培养基补料流加的方法改善培养基的营养构成以达到高产。

### 5.2.3 灭菌

常用的灭菌方式及适用对象见附录C。

#### 5.2.3.1 高压蒸汽灭菌操作要求

a) 液体培养基、补料罐（包括消泡剂）、管道、发酵设备及空气过滤系统灭菌温度为121℃~125℃（压力0.103Mpa~0.168Mpa），0.5h~1.0h。液体培养基装料量为50%~75%发酵罐容积。

b) 固体培养基物料灭菌温度为121℃~130℃，1.0h~2.0h；或采用100℃灭菌2h~4h，24h后再灭菌一次。

c) 在高温灭菌会产生对菌体生长有害物质或对易受高温破坏物料灭菌时，应采用物料分别灭菌或降低灭菌温度延长时间。

培养基灭菌后按5.2.3.2进行检查。若灭菌不彻底，培养基不得使用。

#### 5.2.3.2 灭菌效果检查

采用显微镜染色观察法和/或发酵管试验法检查培养基的灭菌效果。

##### 5.2.3.2.1 染色观察法

a) 对待检测培养基无菌操作取样，在洁净载玻片上涂片、染色、镜检。

b) 若镜检发现有菌体，即可认为灭菌不彻底，需要进行5.2.3.2.2操作，无活菌体后培养基方可使用。

c) 若未发现菌体，初步认为灭菌彻底，培养基可以使用。在必要时，可进行5.2.3.2.2操作，以进一步确认培养基灭菌彻底。

##### 5.2.3.2.2 发酵管试验法

用无菌操作技术将1mL供试培养基加至5mL已灭菌的营养肉汤中，重复三次。置于37℃培养，24h内无浑浊、镜检无菌体即可认为灭菌彻底。反之，即可判定培养基灭菌不彻底。

### 5.2.4 无菌空气

发酵生产中所通入的无菌空气采用过滤除菌设备制得，空气过滤系统应采用二级以上过滤。对制得的无菌空气按如下步骤检验合格后方可用于发酵生产。

用无菌操作技术，向装有100mL~200mL无菌肉汤培养基的三角瓶中通入待监测滤过空气10min~15min。三角瓶置于37℃培养，24h内无浑浊、镜检无菌体即判定合格。

## 5.3 发酵控制

### 5.3.1 接种量的要求

摇瓶种子转向种子发酵罐培养的接种量为0.5%~5%；

在多级发酵生产阶段，对生长繁殖快的菌种（代时<3h），从一级转向下一级发酵的接种量为5%~10%；对生长繁殖较慢的菌种（代时>6h），接种量不低于10%。

### 5.3.2 培养温度

发酵温度应控制在25℃~35℃，对特殊类型的菌种应根据其特性而定。在发酵过程中，可根据菌体的生长代谢特性在不同的发酵阶段采用不同的温度。

### 5.3.3 供氧

通常采用的供氧方式是向培养基中连续补充无菌空气，并与搅拌相配合，或者采用气升式搅拌供氧。

对于好氧代谢的菌株或兼性厌氧类型菌株，培养基中的溶解氧不得低于临界氧浓度；严格厌氧类型菌株培养基的氧化还原电位不得高于其临界氧化还原电位。

### 5.3.4 物料含水量

固体发酵初期适宜发酵的物料含水量为50%~60%。发酵结束时，应控制在20%~40%。

### 5.3.5 发酵终点判断

下列参数为发酵终点判定依据：

镜检观察菌体的形态、密度，要求芽胞菌发酵结束时芽胞形成率 $\geq 80\%$ ；

监测发酵液中还原糖、总糖、氨基氮、pH值、溶解氧浓度、光密度及粘度等理化参数；

监测发酵过程中摄氧率、 $\text{CO}_2$ 产生率、呼吸熵、氧传递系数等发酵代谢特征参数；

固体发酵中物料的颜色、形态、气味、含水量等变化。

## 5.4 棉花耐盐防病促生菌剂产品技术指标

耐盐防病促生菌剂产品技术指标应符合GB 20287中的有关规定。

### 5.5 棉花生物种衣剂制备

以耐盐防病促生菌液体菌剂作为活性成分，加入4%聚乙烯醇和4%壳聚糖以8:2的比例混合配制而成的复合成膜剂，0.5%山梨酸钾防腐剂，5%丙二醇防冻剂，即制得含不同活性成分的耐盐促生菌种衣剂；应为可流动的均匀悬浮液，长期存放可有少量沉淀或分层，但置于室温下用手摇动应能恢复原状，不应有结块。生物种衣剂应符合表1要求。

## 5.6 生物种衣剂各项指标的测定

### 5.6.1 有效成分含量的检测

配制种衣剂，用稀释平板计数法检测种衣剂中活菌的数量，重复测定3次，所得菌的浓度范围，即为所研制生物种衣剂有效成分含量。

表1 生物种衣剂控制项目指标

项目	指标
总有效活菌数(cfu) <sup>a</sup> /(亿/ml)	$\geq 2.0$
pH值范围	5.0~8.0
悬浮率/(%)	$\geq 90$
粘度范围(25℃)/(mPa·s)	$\geq 100\sim 600$
成膜性 <sup>b</sup>	合格
包衣均匀度 <sup>b</sup> /(%)	$\geq 90$
包衣脱落率 <sup>b</sup> /(%)	$\leq 8$
低温稳定性 <sup>b</sup>	$\geq$ 合格
热贮稳定性 <sup>b</sup>	$\geq$ 合格
保质期 <sup>c</sup> /月	$\geq 3$

a 复合菌剂，每一种有效菌的数量不得少于0.01亿/ml，以单一的枯草芽孢杆菌制成的粉剂产品中有效活菌数不少于2.0亿/ml，标明含量应精确至0.1%。  
b 在正常生产时，每3个月至少进行一次试验。  
c 此项仅在监督部门或仲裁双方认为有必要时检测。

### 5.6.2 pH的测定

用移液枪吸取0.5ml种衣剂样品放至100ml烧杯中，用50ml蒸馏水稀释，混合均匀后用pH计测定其酸碱度，平行测定3次，求取平均值，即为所研制生物种衣剂的pH。

### 5.6.3 粘度的测定

配制种衣剂，取适量(250ml)样品置于烧杯中，在25℃，用NDJ-1型旋转式粘度计2号转子，在30r/min条件下测定粘度，重复测定3次，取其平均值，即为所研制生物种衣剂的粘度。

#### 5.6.4 热贮稳定性测定

配制种衣剂，将其密封储藏于 $(54\pm 2)$ ℃恒温箱中14d，以未处理的种衣剂样品作为对照，通过稀释平板计数法检测菌量的多少，设3个重复，求取平均值，以活菌下降率来判断其稳定性。

#### 5.6.5 种衣剂的保质期测定

配制种衣剂，将其于室内自然放置，一年内每隔30d用稀释平板计数法检测剩余活菌量，设3次重复，取平均值，以剩余活菌量来判断其保质期。

贝莱斯芽孢杆菌制剂剂型为悬浮剂；有效成份为芽孢，含量为 $1\times 10^8$  CFU/mL。

瓶装制剂贮存于阴凉、干燥处，室温保存半年或低温(4℃) 1年半不影响治疗效果。

#### 5.6.6 种衣剂的防效试验

采用室内离体平皿生长速率法测定种衣剂的杀菌活性，待培养于直径90 mm培养皿中的立枯丝核菌菌丝长至约70 mm时，于菌落边缘打取新鲜菌碟(直径7mm)，分别接种于含有不同浓度各药剂的培养基平板上，25℃下黑暗培养，当空白对照菌丝长至70 mm以上时采用十字交叉法测量菌落直径，与不含药剂的空白对照比较。每处理重复3次，试验重复2次。6 d后用十字交叉法测量菌落直径，取其数据，求出抑菌率，3次重复，并求出毒力回归方程，计算其EC<sub>50</sub>值，以此衡量各种衣剂的毒力大小。

室内生测试验共设7个处理，包括5个耐盐防病促生菌种衣剂处理和2个对照(市售种衣剂CK1，CK2为不包衣处理)。选取健康、饱满、均一的棉花种子，种衣剂处理按药种重量比1:50进行包衣处理，阴干后播种于塑料发芽盒中，基质选用蛭石与草炭(1:1)的混合基质，置于光照培养箱中培养，光照强度12000 lux，光照周期为12 h/12 h(昼/夜)，相对湿度70%~75%，温度26~28℃。测定种子活力、出苗率、株高、幼苗干重、根冠比，每处理重复3次。

## 6 建立生产档案

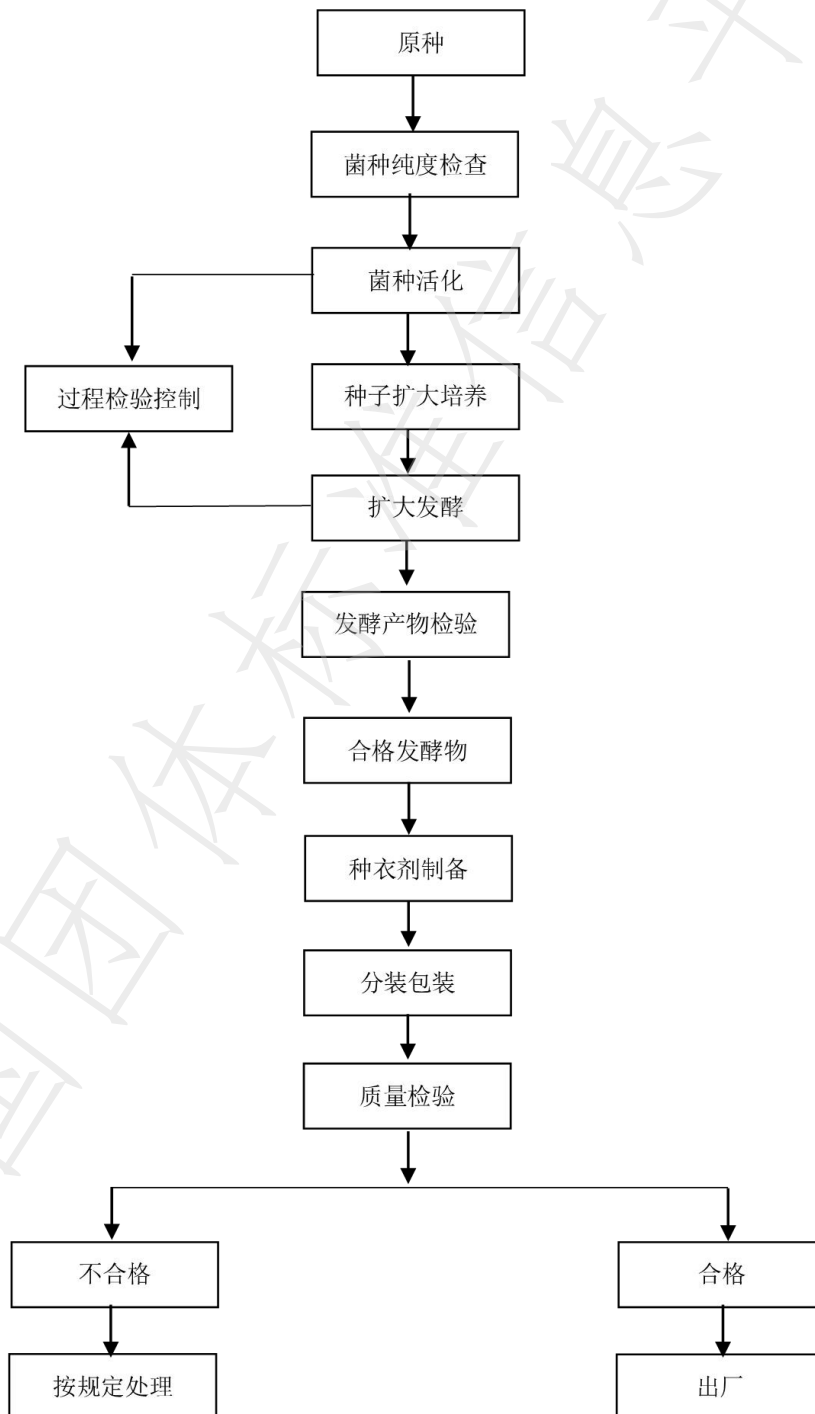
每批产品的生产、检验结果应存档记录，包括检验项目、检验结果、检验人、批准人、检验日期等信息。

## 7 产品质量跟踪

定期检查产品质量，并对产品建立应用档案，跟踪产品的应用情况。

附录 A  
(规范性)

图 A.1 耐盐防病促生菌种衣剂生产工艺流程图示意图



附录 B  
(规范性)

表 B.1 农用微生物菌剂生产中菌种的常用保藏方式

保藏方式	一般存放条件	适合的微生物菌种类型	一般保存期限
冻干管保藏	冰箱或室温	各类菌种	5年以上
沙土管保藏	干燥条件	芽胞杆菌、真菌、放线菌	2年以上
石蜡油保藏	4℃冰箱	各类菌种	1年以上
甘油管保藏	-18℃冰箱或更低温度	主要是细菌	1年以上
固体曲保藏	干燥条件,4℃冰箱	产生各类孢子的真菌	1年以上
常规保藏	4℃左右冰箱	各类菌种	2个月~12个月

附 录 C  
(规范性)

表 C.1 农用微生物制剂的生产中常用灭菌方法及适用对象

灭菌方式	操作要求	一般应用对象
高压蒸汽灭菌	115℃~130℃, 20 min~60min	培养基, 耐热器皿, 废弃物
干热灭菌	160℃~170℃, 1.5 h~2h	耐热器皿, 耐热物料
紫外线灭菌	距离紫外灯管 (15W) ≤1.2m, 0.5h 以上	洁净间, 洁净台
化学药剂灭菌	浓度和用量根据具体情况而定	洁净间, 设备及器材
辐射灭菌	辐射强度和时间根据具体情况而定	不适宜于热灭菌的物料
膜过滤除菌	过滤器的膜孔径≤0.2μm	空气, 不宜于热灭菌的试剂