

# T/HBSF

林 业 团 体 标 准

T/HBSF 002—2025

## 球孢白僵菌粉剂生产技术规程

Code of practice for production of *Beauveria bassiana* powder formulation

2025 - 08 - 05 发布

2025 - 08 - 11 实施

## 目 次

前言 .....	II
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 一级菌种培养 .....	1
4.1 培养基制备 .....	1
4.2 分装灭菌 .....	1
4.3 菌种复壮 .....	1
4.4 接种培养 .....	1
5 二级液体菌种培养 .....	1
5.1 培养基制备 .....	1
5.2 种子罐灭菌 .....	2
5.3 种子罐接种培养 .....	2
5.4 发酵罐灭菌 .....	2
5.5 发酵罐接种培养 .....	2
6 三级固体发酵 .....	2
6.1 培养基灭菌 .....	2
6.2 接种 .....	2
6.3 装盘培养 .....	2
6.4 干燥 .....	3
7 粉碎提纯 .....	3
7.1 粉碎 .....	3
7.2 提纯 .....	3
8 质量检验 .....	3
8.1 抽样 .....	3
8.2 含孢量测定 .....	3
8.3 活孢率测定 .....	3
8.4 含水率测定 .....	3
8.5 杂菌率测定 .....	3

## 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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由湖北省林业标准化技术委员会提出、归口并宣贯。

本文件起草单位：湖北省林业科学研究院、宜昌兴林生物科技有限公司。

本文件主要起草人：查玉平、赵东容、张文颖、蔡三山、徐小文、张子一、刘印茹、夏永刚、洪承昊、徐红梅、夏剑萍。

本文件实施应用中存在疑问或修改意见，可咨询或反馈至湖北省林学会，联系电话：027-87698180，邮箱：hbsf2023@126.com。



# 球孢白僵菌粉剂生产技术规程

## 1 范围

本文件确立了球孢白僵菌粉剂生产流程,并规定了球孢白僵菌的一级菌种培养、二级液体菌种培养、三级固体发酵、粉碎提纯以及质量检验方法。

本文件适用于湖北省球孢白僵菌粉剂生产。

## 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 25864 球孢白僵菌粉剂

NY/T 883 农用微生物菌剂生产技术规程

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**种子罐 seeding tank**

生产中用于菌种扩大培养的小型发酵罐。

### 3.2

**发酵罐 fermentation tank**

生产中用于菌液扩大生产的大型发酵罐。

## 4 一级菌种培养

### 4.1 培养基制备

去皮马铃薯200 g切块(1 cm×1 cm×1 cm),加适量去离子水煮沸30 min,过滤,取滤液,定容到1000 ml,加入琼脂20 g,全部溶解后加蔗糖20 g、牛肉膏1 g、蛋白胨1 g、磷酸二氢钾0.2 g,加热至完全溶化,用盐酸或者氢氧化钠调pH值至7。

### 4.2 分装灭菌

按照每支试管(20 mm×200 mm)10 ml培养基分装。121℃,1.5 MPa灭菌40 min,放置成斜面。

### 4.3 菌种复壮

菌种复壮按照NY/T 883的方法进行。

### 4.4 接种培养

在无菌条件下,用无菌接种针挑取25 mm<sup>2</sup>~50 mm<sup>2</sup>原种菌块,接种到斜面培养基上。于24℃~28℃恒温箱中培养7 d,进行菌丝形态一致性检验,包括镜检菌丝粗细、分支均匀度,剔除污染和生长不健康菌株,其余斜面于4℃~5℃保存备用。

## 5 二级液体菌种培养

### 5.1 培养基制备

大豆1% (w/v) 熬制豆汁4 h, 过滤, 加白糖1% (w/v), 搅拌均匀。

## 5.2 种子罐灭菌

### 5.2.1 种子罐参数

罐体设计压力0.30 Mpa, 工作压力0.15 Mpa, 工作温度130 °C, 全容积0.2 m<sup>3</sup>, 罐体有效容积100 L, 电机功率1.1 kw, 搅拌转速: 328 r/min, 传热面积1.5 m<sup>2</sup>。

### 5.2.2 种子罐空罐消毒

200 L种子发酵罐121 °C、0.1 MPa~0.15 MPa空气灭菌0.5 h~1 h。

### 5.2.3 种子罐培养基灭菌

将140 L大豆白糖培养基装罐, 121 °C、0.1 MPa~0.15 MPa灭菌0.5 h~1 h, 冷却至28 °C~30 °C备用。

## 5.3 种子罐接种培养

### 5.3.1 种子罐菌种准备

在无菌条件下, 用无菌接种针挑取一级菌种, 每1000 mL的三角瓶中接种1支~2支一级菌种, 共接种2瓶~3瓶, 26 °C~28 °C, 180 rpm~220 rpm振荡培养1 d。

### 5.3.2 种子罐接种培养

在无菌条件下, 打开接种罐接种口迅速完成摇瓶菌液(2瓶)接种, 密封后26 °C~28 °C、0.15 MPa、50 rpm~300 rpm种子罐发酵培养2 d。

## 5.4 发酵罐灭菌

### 5.4.1 发酵罐参数

罐体设计压力 0.30 Mpa, 工作压力 0.15 Mpa, 工作温度 130 °C, 全容积 2 m<sup>3</sup>, 罐体有效容积 2000 L, 电机功率 5.5 kw, 搅拌转速 246 r/min, 传热面积 6 m<sup>2</sup>。

### 5.4.2 发酵罐空罐消毒

发酵罐121 °C、0.1 MPa~0.15 MPa空气灭菌0.5 h~1 h。

### 5.4.3 发酵罐培养基灭菌

将1400 L大豆白糖培养基装罐, 121 °C、0.1 MPa~0.15 MPa灭菌0.5 h~1 h, 冷却至28 °C~30 °C备用。

## 5.5 发酵罐接种培养

种子罐菌液全部通过压力(0.05 MPa)输送至发酵罐, 26 °C~28 °C、0.15 MPa、50 rpm~300 rpm发酵培养1 d。

## 6 三级固体发酵

### 6.1 培养基灭菌

麦麸和谷壳的质量比为7:3, 2000 L拌料罐装罐, 搅拌均匀后121 °C、0.1 MPa~0.15 MPa灭菌0.5 h~1 h。

### 6.2 接种

拌料罐料搅拌冷却至30 °C时, 通过移液灌装设备接种, 接种量0.375 L/ kg, 将发酵罐菌液移至固体罐, 补水至60%~70%, 继续搅拌均匀。

### 6.3 装盘培养

将培养料分装到多孔塑料盘（63 mm×63 mm×6 mm），培养5 d~7 d。前3 d，保持90%~95%相对湿度，后期保持80%~90%相对湿度，料温为30 ℃~35 ℃。

#### 6.4 干燥

三级培养后，室内干燥48 h，温度为28 ℃~30 ℃。干燥后粗孢粉含孢量 $\geq 100$ 亿孢子/g，活孢率达到85%~90%，含水率 $< 10\%$ 。

### 7 粉碎提纯

#### 7.1 粉碎

用粉碎机将干燥后的粗孢粉进行粉碎。

#### 7.2 提纯

##### 7.2.1 刷理机参数

设计压力320 pa，容量22 m<sup>3</sup>/min，电机功率5.5 kw，电压380 V，转速2980 r/min。

##### 7.2.2 孢子粉提纯

粉碎后的粗孢粉用刷理机提纯收集孢子粉（粒径0.05 mm）。

##### 7.2.3 孢子粉质量参数

提纯后孢子粉含孢量 $\geq 1600$ 亿孢子/g，活孢率 $\geq 90\%$ ，含水率 $\leq 10\%$ ，杂菌率 $\leq 5\%$ 。

### 8 质量检验

#### 8.1 抽样

抽样按照GB/T 25864描述的方法进行。

#### 8.2 含孢量测定

含孢量按照GB/T 25864描述的方法测定。

#### 8.3 活孢率测定

活孢率按照GB/T 25864描述的方法测定。

#### 8.4 含水率测定

含水率按照GB/T 25864描述的方法测定。

#### 8.5 杂菌率测定

杂菌率按照GB/T 25864描述的方法测定。