

《植物种子载体固定化微生物菌剂（征求意见稿）》
编制说明

上海应用技术大学

浙江科峰生物技术有限公司

南开大学

北京建筑大学

目 录

1 工作简况	1
1.1 任务来源	1
1.2 协作单位	1
1.3 主要工作过程	1
1.3.1 工作安排	1
1.3.2 实地调研	2
1.4 起草组成员及主要工作	2
2 标准编制原则	3
2.1 尊重科学事实	3
2.2 突出针对性	3
2.3 注重操作性	3
3 标准编制的主要内容论据	3
3.1 主要论据	3
3.2 标准的主要内容	5
3.2.1 范围	5
3.2.2 规范性引用文件	5
3.2.3 术语和定义	5
3.2.4 总体要求	6
3.2.5 检测方法	7
3.2.6 包装、运输与贮存	8
3.2.7 附录（资料性附录）	9
4 综述报告和试验分析	9
4.1 综述报告	9
4.2 试验分析	10
4.2.1 相关工作基础	10
4.2.2 载体制备技术及评价方法	10
4.2.3 复合种子载体固定化菌剂的制备	11
4.2.4 复合型种子载体的性能测试	11

4.3 预期效益	11
5 标准涉及的相关知识产权说明	12
6 采用国际标准的程度及水平	12
7 现行有关法律法规和强制性标准的关系	12
8 重大意见分歧的处理经过和依据	12
9 其他应予说明的事项	13

1 工作简况

1.1 任务来源

科技部目前正致力于推动“场地土壤污染成因与治理技术”国家重点研发计划，寻求场地污染的有效治理。北京建筑大学作为牵头单位，联合清华大学、上海应用技术大学、华南理工大学、吉林大学就此重点研发计划中的关键项目“中低浓度典型有机污染场地生物修复关键材料与技术”（SQ2020YFC180080）展开技术攻关，目的是通过有机污染场地生物修复关键材料和技术的突破，全面提高有机污染场地修复的能力和品质。

上海应用技术大学承担“中低浓度典型有机污染场地生物修复关键材料与技术”（SQ2020YFC180080）专项中“长效广谱生物修复载体与固定化菌剂制备技术”的课题，本标准为其中的任务之一，旨在解决植物种子载体固定化微生物菌剂制备和生产过程中的规范问题，以保证植物种子载体固定化微生物菌剂发挥其污染治理效果，推进植物种子载体固定化微生物菌剂的使用。

1.2 协作单位

本标准由上海应用技术大学作为牵头单位，浙江科峰生物技术有限公司、南开大学、北京建筑大学作为协作单位共同撰写。

编制组成员：王宏伟、柳卫东、李法云、王玮、周纯亮（上海应用技术大学）
高大文（北京建筑大学）
章亭洲（浙江科峰生物技术有限公司）
刘维涛（南开大学）

1.3 主要工作过程

1.3.1 工作安排

国家重点研发课题关于本标准任务下达以来，课题主持单位和协作单位组织开展了植物种子载体固定化微生物菌剂的编制工作，研究确定了标准编制工作方案，明确了标准编制的工作机制、目标、框架、进度等主要内容。

1) 建立机制，组建团队，明确分工

为有效推进标准编制工作，提升编制成果的针对性、系统性、权威性和先进性，建立由起草团队和专家团队多方参与、有序分工、协同推进的工作机制，组建了由协调工作组和专家起草组共同构成的标准编制工作小组。

2) 确定标准内容框架

根据标准要求,结合实际要求,确定使用技术标准由范围、规范性引用文件、术语与定义、总体要求、检测方法和包装、运输与贮存 6 个部分构成。

3) 确定时间进度安排

2021 年 7-12 月:开展基础信息的收集和研究,广泛调研查阅相关国家、省市、团体以及行业在使用指标上的选取以及经验,制定“植物种子载体固定化微生物菌剂”标准初稿。

2022 年 1-6 月,组织专家和课题组全体成员对“植物种子载体固定化微生物菌剂”标准初稿进行分析讨论。

2022 年 7-12 月,进一步根据讨论意见进行标准的修订和调研、分析研究工作。

2023 年 1-6 月,广泛征求团队成员的意见,进一步修订“植物种子载体固定化微生物菌剂”标准。

2023 年 7-10 月,部分验证“植物种子载体固定化微生物菌剂”标准,收集实际应用中的反馈意见。

2023 年 11 月,根据专家意见的征询和修订,形成草案,提交中国土壤学会申请立项。

2023 年 12 月,中国土壤学会发布团标立项公告。

2024 年 1 月,中国土壤学会组织专家对标准草案就行了审查,形成了征求意见稿。

1.3.2 实地调研

2021年1-12月,集中对课题团队工作全面调研,深入了解植物种子载体固定化微生物菌剂的研发和生产情况,包括存在的问题及改进建议等等。

2022年1-12月,调研山东石化、山西污染场地,讨论污染场地修复过程中植物种子载体固定化微生物菌剂的使用标准、方法等问题。

2023年1-10月,参加国家重点研发工作团队会议,征询意见。

1.4 起草组成员及主要工作

起草组成员单位:上海应用技术大学、浙江科峰生物技术有限公司、南开大学、北京建筑大学。

起草组成员：王宏伟、柳卫东、李法云、章亭洲、刘维涛、高大文。

其中：

协调工作由北京建筑大学、上海应用技术大学的相关负责同志组成，主要负责协调配合标准编制工作有序开展，根据标准编制需要及时向标准起草组提供相关材料，参与相关调研及研讨，提出标准制定和修改完善的意见建议。

指导工作由中国土壤学会专家组成，主要负责标准制定过程中的编制工作和程序工作的指导。

标准起草组由上海应用技术大学李法云教授领衔，王宏伟副教授负责，上海应用技术大学、浙江科峰生物技术有限公司、南开大学和北京建筑大学的相关研究人员组成。主要负责标准的组织推动及分析比较国家、行业及地方相关法规、标准和政策文件，研究起草技术指标，以及规范性引用文件汇编、配套工作规范等。

2 标准编制原则

2.1 尊重科学事实

尊重科学事实，充分考虑不同环境的影响。充分发挥固定化微生物菌剂的优势。

2.2 突出针对性

紧紧围绕固定化微生物菌剂效用目标，确定使用路线。根据环境因素，确定注意事项和方法。

2.3 注重操作性

标准尽可能简化，选择最少、最有代表性的因素。做到数据可获取、方法可操作、结果可检验，确保适用、能用、好用。

3 标准编制的主要内容论据

3.1 主要论据

我国城市化进程的快速推进加速了城市产业结构升级和布局优化调整，使得原来处在主城区的工业企业纷纷搬迁至城外。这些工业企业大多高能耗、高污染、生产工艺落后，生产早期缺乏相关的环保设施，厂区搬迁遗留下来的工业场地对周边居民存在巨大环境风险，污染场地土壤修复和环境安全利用现已成为备受政府和广大人民群众关注的重大环境问题，当前上海陆家嘴集团状告苏钢集团有毒

地块污染，则是典型代表性案件。

目前，有机污染场地土壤修复主要包括物理、化学和生物等技术方法。其中，生物修复方法因其具有成本低、无二次污染等优点正受到世界各国研究者的广泛关注。石油烃、卤代烃、多环芳烃等有机污染土壤生物修复主要包括植物、微生物、植物-微生物联合修复等技术方法。污染土壤植物修复机理主要包括直接吸收有机污染物、植物根系释放分泌物和酶及植物和根际微生物的联合作用三个方面，可分为植物降解（Phytodegradation）和根降解（Rhizodegradation）二个类型。已有研究发现，88种植物能够有效吸收和富集70余种有机污染物。胡枝子属、松属、桑科植物、蔷薇科中的一些植物及杂交杨的根系分泌物能明显促进土壤中多氯联苯降解菌的生长。一些学者曾尝试采用黑麦与大豆轮作修复石油烃污染场地土壤，取得了较好的石油烃降解效果。

然而，单独应用植物修复污染场地土壤一般存在耗时长和修复效率低的问题，为了缩短土壤修复时间，提高修复效率，常将植物修复与其他强化修复措施相结合进行联合修复，较为常见的是植物-微生物联合修复。研究表明，植物-微生物联合修复体系可以促进有机污染物的快速降解和转化，这一方面是由于植物根区的分泌物含有丰富的有机质（如氨基酸、糖类、有机酸等），可作为微生物生长和繁殖的天然培养介质，可以加速微生物的代谢转化，同时植物还可为微生物的生存提供良好的生存环境；另一方面，植物根际微生物改善了植物对营养盐和水分获得，而且微生物能够降解石油烃、卤代烃、多环芳烃、多氯联苯等有机污染物或改变其存在状态，降低了污染物对植物的毒性，同时微生物还可以提高污染物的生物可利用性，便于植物的吸收转化。运用植物和专性微生物可以有效去除土壤中多环芳烃等污染物，通过接种菌根真菌可以增加植物对多环芳烃的降解。植物根际微生物对有机污染物的降解也起了重要作用，至于植物吸收、积累和降解与植物通过根际活动而促进有机污染物降解相比何者更为重要，则因土壤污染物性质的不同或同种化合物在不同土壤-植物系统中的降解行为不同而存在明显差异。将构建好的高效降解菌应用于植物的根际微域环境，使之能够与土著微生物相比存在明显活性竞争优势，并繁殖和生长成为优势菌群，是外接菌种应用于植物-微生物协同修复的技术关键。

在农业生产实践中，为了保障作物种子出苗齐、全和壮，国外自20世纪80

年代开始，种衣剂（Seed coating agent）逐渐广泛地应用于种子加工，新型高效的种衣剂产品受到美国FMC、德国拜耳和瑞士先正达等世界各大农用化学品公司的高度重视。我国于1981年研制出适用于牧草种子飞播的种子包衣技术。1983年，成功研制了主要用于玉米，小麦，棉花，水稻，大豆，蔬菜等作物的种衣剂产品。目前种衣剂市场中，种衣剂功能集中于农作物病害防治，面向污染土壤修复植物种衣剂的研发甚少。因此，创新性地将对污染土壤具有高修复效率的植物种子作为载体，综合利用种子包衣与微生物吸附-包埋-交联固定化技术，研发和生产具有促进植物-微生物协同修复作用的生物型种子载体固定化菌剂，无疑将为污染土壤生物修复提供新材料和新方法。

在此过程中，植物种子、菌种、包衣、固定化技术的选择以及植物种子固定化微生物菌剂的性质及其检测、贮存和运输等方式，则对植物种子固定化微生物菌剂的性能发挥具有重要决定性作用。因此，需要对其研发和生产过程中涉及到的参数，诸如性能要求、试验方法等进行标准化，以推动和规范植物种子固定化微生物在有机污染土壤修复中的发展和应用。

3.2 标准的主要内容

3.2.1 范围

本文件规定了植物种子载体固定化微生物菌剂的内容和技术要求、术语和定义等内容，是根据植物种子载体固定化微生物菌剂的技术特征和标准而制定的。本文件适用于植物种子载体固定化微生物菌剂研发和生产过程的质量控制和检测等。

3.2.2 规范性引用文件

标准引用了国内的部分规范性文件，以便于标准中内容的检测和规范。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

GB 4404.1 粮食作物种子禾谷类

GB 4404.2 粮食作物种子豆类

GB 4407.1 经济作物种子纤维类

GB 4407.2 经济作物种子油料类

GB 16715.1 瓜类作物种子瓜类

GB 20287-2006农用微生物菌剂

HG/T2843化肥产品化学分析常用标准滴定溶液、标准溶液、试剂溶液和指示剂溶液

NY/T 525有机肥料

NY 885农用微生物产品标识要求

NY/T1978肥料 汞、砷、镉、铅、铬、镍含量的测定

NY/T 2321微生物肥料产品检验规程

3.2.3 术语和定义

为了规范文件内容的使用范围，本文件规定了以下术语。

1) 植物种子载体 **Plant seed carriers**

将特定的植物种子作为固定化微生物的载体。

2) 固定化微生物 **immobilized microbial**

将特定的微生物固定在选定的载体上，使其高度密集并保持生物活性，在适宜条件下能够快速、大量增殖。

3) 植物种子载体固定化微生物菌剂 **Plant seed carriers immobilized microbial agents**

利用种子包衣技术，将特定的微生物固定在选定的植物种子载体上所形成的微生物菌剂。

3.2.4 总体要求

(1) 种子

因为用作载体的种子来源多样，且承担着固定化微生物的载体的功能，故种子必须符合 GB 4404.1、GB 4404.2、GB 4407.1、GB 4407.2、GB 16715.1 等关于种子质量的国家规定。

(2) 菌种

微生物菌种首先考虑的是安全、有效。故要求生产者应提供菌种的分类鉴定报告，包括属及种的学名、形态、生理生化特性及鉴定依据等完整资料。生产者应提供菌种安全性评价资料。采用生物工程菌，要求具有允许大面积释放的生物安全性有关批文。

(3) 包衣剂

应安全且能为种子和菌种提供基础营养。

(4) 菌剂

菌剂质量应符合 GB 20287-2006 相关规定。因为植物种子固定化菌剂将进入土壤，符合农用菌剂的相关范畴。

(5) 产品外观

产品应无明显机械杂质，大小、颜色、形状均匀，具有吸水性，以便种子可以在土壤中顺利萌发。

(6) 技术指标，此项内容规定了植物种子载体固定化微生物菌剂的技术指标，包括有效活菌数，杂菌率等，均根据现有的资料、标准、规范以及本标准编制组的实验数据而来。

项目	指标
有效活菌数 CFU ^a ，亿个/g	≥1.0
杂菌率 (%)	≤30
水分质量分数 (%)	≤20
pH 值	5.5-8.5
保质期 (月)	≥6
发芽率 (%)	≥85
完整率 (%)	≥60
传质性 (%)	≥50
溶胀率 (%)	≥60

(7) 无害化指标

固定化菌剂无害化指标按照 GB 20287-2006 及 NY/T1978 相关标准执行和检验相关标准执行和检验。

3.2.5 检测方法

(1) 试剂

在有必要的检测中，本标准所用试剂、水和溶液的配制，在未注明规格的配制方法中，应按 HG/T 2843-1997-2016 中的规定执行。

(2) 外观指标

外观指标是产品质量的重要表征，一般用目测法测定。取少量样品置于白色容器中，仔细观察样品颜色、形态、质地等。

(3) 有效活菌数的测定

有效活菌数是固定化微生物菌剂的核心指标，可按 GB 20287-2006 中的规定执行。

(4) 杂菌率的测定

杂菌率低是产品质量的必要要求，按 NY/T 2321-2013 中的规定执行。

(5) 水分的测定

水分是植物种子载体的必要条件，可保持种子的适当活力，但不宜过高，否则会导致种子载体在贮存过程中腐烂。其测定按 NY/T 2321 中-2013 的规定执行。

(6) pH 的测定

种子载体的贮存需要保持一定的 pH 值范围，按 NY/T 2321-2013 中的规定执行。

(7) 发芽率的测定

发芽率是种子载体的核心指标，按 GB 4404.1 中的规定执行。

(8) 完整率的测定

机械强度保证了植物种子载体在土壤中的有效存活时间，可参照附录 A 执行。

(9) 传质性的测定

传质性是固定化微生物菌剂中微生物繁殖难易的核心指标，的可参照附录 A 执行。

(10) 溶胀率的测定

溶胀率是植物种子载体保持形状的重要参数，可参照附录 A 执行。

3.2.6 包装、标识、运输与贮存

(1) 包装和标识

包装和标识

不同产品剂型应选择适当的包装材料、容器、形式和方法。产品包装中，应有产品合格证，标识符合 NY 885 标准要求。

(2) 运输

运输过程中有遮盖物，防止雨淋、日晒、高温及自发酵。气温应保持在 5-40℃，

15-28℃最佳。轻装轻卸，避免包装破损。严禁与对微生物菌剂有毒、有害的其他物品混装、混运。

(3) 贮存

产品应贮存在阴凉、干燥、通风的场所，不得露天堆放，避免不良条件的影响。

3.2.7 附录（资料性附录）

列出了完整率、传质性和溶胀率的检测方法，以供参考。

4 综述报告和试验分析

4.1 综述报告

为了保持环境中有机污染物优势降解菌微生物的高密度和生物活性，增强微生物抵抗不利环境的能力，并促进其在适宜条件下快速增殖，微生物固定化技术越来越受到国内外环境科学工作者的重视。其中，固定化载体是微生物生存的重要微环境，其比表面积、孔道结构、机械强度等性能对固定化微生物功能的发挥起着至关重要的作用。目前，国内外相关研究主要集中在无机载体、有机载体、合成高分子载体和复合载体制备等方面。然而，现有固定化载体应用研究主要集中在污水处理领域，固定化载体材料对有机污染土壤修复处于实验室研究阶段的成果较多而工程化应用甚少，尤其是集植物-微生物协同修复于一体的固定化载体材料研发尚未见报道，也缺乏相应标准。因此，研发适合有机污染场地土壤修复工程化应用的环境友好型一体化修复载体材料是当前污染环境修复领域亟待解决的重要问题。

目前，安全、环保的生物修复备受关注，探讨未来的发展方向尤为重要。研究内容应从机理探究、关键因素挖掘、联合修复模式建立和修复技术风险评估等方面入手，提高修复效率，扩展应用范围。利用群落指纹图谱和环境基因组学技术研究不同时空尺度下污染土壤微生物群落结构和功能及其对不同刺激响应，将能更好了解微生物群落的合作机制。调控土壤中的营养物质，合理施加有机肥，根据不同地区气候条件选择套种间种，运用微生物工程提升植物降解潜能，将缩短植物修复时间，提高降解效率。植物种子载体固定化微生物菌剂可以克服生物修复面对大面积、高浓度、环境要素复杂的实际污染场地存在修复周期长、效率相对低等难点问题，故已成为污染土壤修复的研究前沿热点，也是本标准提出的

重要依据。

4.2 试验分析

4.2.1 相关工作基础

为保证标准的科学性、先进性和可操作性，起草组就部分技术内容进行了必要的研究。自 2006 年开始，上海应用技术大学不断加强载体、菌剂与固定化技术相关科研队伍，与“中低浓度典型有机污染场地生物修复关键材料与技术”项目团队队伍一起，在载体、菌剂研发和筛选方面进行了积极、有效的探索。目前，起草人正承担或参与有机-无机多孔有机载体材料研发、交联方法优化微生物固定技术以及生物型植物种植载体固定化菌剂一体化修复材料等工作，且取得显著成果，并形成《应用技术学报》专刊（2021.4），同时申请了国家发明专利“一种污染板结土壤硬度快速测定装置与方法”（专利号 202210159944.8）。浙江科峰生物技术有限公司正承担或微生物固定技术等工作，且取得显著进展。其以美国麻省理工学院(MIT)、中国科学院微生物研究所、浙江大学、中国农科院为技术后盾，长期专注微生物发酵与生物工程方面的研究，首席章亭洲博士先后毕业于浙江大学生命科学学院与北京大学生命科学学院，并曾留学美国麻省理工学院（MIT），具有资深的生物学背景和技术管理资质。

南开大学研发的改性生物炭吸附-交联固定化漆酶已完成多环芳烃污染土壤修复实验，制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NaBC}@\text{GA}@\text{LC}$ 对不同环数多环芳烃有显著去除效果，在修复实验中，固定化漆酶 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NaBC}@\text{GA}@\text{LC}$ 对 2-6 环 PAHs 的去除率高于原始土壤，其中 5 环 PAHs 去除率达到 91.36%。

以上研究、试验和测试工作，为标准的形成和应用提供了必要的科学保障。

4.2.2 载体制备技术及评价方法

供试材料：紫花苜蓿种子，于江苏萌蕴种业有限公司购买；海藻酸钠（SA，500-1000mPa·s），于阿达玛斯试剂有限公司购买；无机材料：陶粒、虹彩石、白石子、火山岩、碳球、蛭石、珍珠岩、麦饭石，于河北德沃多肥料有限公司购买；植物凝胶（植物细胞培级），于上海源叶生物科技有限公司购买。

种子消毒处理：挑选饱满、无破损种子，用蒸馏水洗净，将种子放入2%的次氯酸钠溶液中浸泡并振荡10min，用无菌水快速冲洗3次，最后用滤纸吸干种子外面的水分。

4.2.3 复合种子载体固定化菌剂的制备

将一定质量的海藻酸钠溶于10ml菌液中，在搅拌均匀之后，分别加入一定质量的植物凝胶、质量分数为2%的无机载体、紫花苜蓿种子，于30℃下磁力搅拌30min，待混合均匀后，通过胶头滴管滴入质量分数为4%的CaCl₂溶液，交联30min，取出后用去离子水洗涤三次，备用。

4.2.4 复合型种子载体的性能测试

机械强度的测定：随机取4颗粒径为4mm左右制备的大小均匀的固定化菌种小球，在桌面上呈正方形摆放，小球上面放一个塑料平皿，缓慢加入粉末状物质，观察固定化菌种小球的形态变化，到开始变形停止加入，记录固定化菌种所能承受的最大质量，以此表示固定化菌种的机械强度大小。

传质性的测定：选取粒径为4mm左右制备的大小均匀的固定化菌种小球10颗，浸入20 mL体积分数为1%的惰性红墨水溶液中，分别于1min和5min取出固定化微球于球心处进行切片，在解剖镜下观察固定化菌种小球内部颜色，通过计算染色部分的面积占整个面积的比值，以此表示固定化菌种的传质性，比值越大说明传质性越好。

溶胀率的测定：选取粒径为4mm左右制备的大小均匀的固定化菌种小球，将固定微球烘干1h后，称取一定量（W₀）放入盛有碳酸氢钠缓冲溶液（pH值7.5）的烧杯中，于30℃恒温静置直至溶胀平衡；分别在第12h、24h、36h时将固定微球从溶液中取出，滤纸吸干表面水分后称重（W_t），按下式（1）计算溶胀率（SR，%）均值：

$$SR = \frac{W_t - W_0}{W_0} \times 100\% \quad (1)$$

4.3 预期效益

针对有机污染场地土壤传统的物理、化学修复技术存在的修复成本高及易产生二次污染问题，筛选对有机污染物耐受性强、生物量大且生长迅速的植物品种；探索利用吸附-包埋-交联复合固定化技术与营养型缓释种衣剂技术，编制生物型种子载体固定化菌剂一体化标准，为建立有机污染场地低成本和景观化的绿色生态修复模式新思路、新材料和新方法提供规范，形成未来植物种子载体固定化微生物菌剂大范围研发、生产和使用的必要参考性文件。。

该标准实施后，将对应用植物种子载体固定化微生物菌剂控制土壤污染，改善环境以及促进经济活动的开展，推动社会进步方面具有重要现实意义。

5 标准涉及的相关知识产权说明

本标准不涉及相关知识产权。

6 采用国际标准的程度及水平

经查询植物种子载体固定化微生物菌剂方面的相关国际标准，目前还没有相关国外标准。

在本文件的制定过程中，充分考虑了行业市场需求，标准的技术指标合理、先进。本文件的编写，有助于填补国内外用于污染场地修复的植物种子载体固定化菌剂相关标准的空白。

7 现行有关法律法规和强制性标准的关系

本文件在行业内属于首次制定，与本行业现有其他标准配套协调。完全遵照国家相关法律法规及规范标准，所涉及内容完全符合国家对固定化微生物菌剂等使用的要求，与相关法律法规、标准、规范无冲突。

本文件依据的法律法规及政策主要有：《中华人民共和国环境保护法》、《中华人民共和国固体废物污染环境防治法》、《国务院关于印发土壤污染防治行动计划的通知》国发〔2016〕31号、《土壤污染防治行动计划实施情况评估考核规定（试行）》环土壤〔2018〕41号等国家法律法规，符合国家相关法律。

本文件引用了以下相关标准：

GB 4404.1 粮食作物种子禾谷类

GB 4404.2 粮食作物种子豆类

GB 4407.1 经济作物种子纤维类

GB 4407.2 经济作物种子油料类

GB 16715.1 瓜类作物种子瓜类

GB 20287-2006 农用微生物菌剂

HG/T2843 化肥产品化学分析常用标准滴定溶液、标准溶液、试剂溶液和指示剂溶液

NY/T 525 有机肥料

NY 885 农用微生物产品标识要求

NY/T1978肥料 汞、砷、镉、铅、铬、镍含量的测定

NY/T 2321微生物肥料产品检验规程

8 重大意见分歧的处理经过和依据

目前无重大意见分歧。后续，建议由中国土壤学会组织贯彻本文件的相关活动，在国家部委、省、市相关部门的协调下，有针对性地开展本文件的管理。

9 其他应予说明的事项

无。