ICS 65.080
B 10

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 883—2004

农用微生物菌剂生产技术规程

Technical regulation for production of agricultural microbial inoculants

2005-01-04 发布　　2005-02-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前　言

本标准的附录A、B、C为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出并归口。

本标准起草单位：农业部微生物肥料质量监督检验测试中心、农业部肥料质量监督检验测试中心（沈阳）。

本标准主要起草人：李力、李俊、姜昕、沈德龙、王来福、于向华、陈慧君。

农用微生物菌剂生产技术规程

1 范围

本规程规定了农用微生物菌剂生产中所涉及的生产环境、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。

本标准适用于农用微生物菌剂产品。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB 3095—1996 环境空气质量标准

GB 3838—2002 地表水质量标准

3 生产环境及生产车间要求

3.1 生产环境

——厂区空气质量达到大气环境质量标准 GB 3095—1996 中Ⅱ类标准要求；

——发酵用水达到地表水质量标准 GB 3838—2002 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。

3.2 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。

4 生产技术流程

农用微生物菌剂的一般生产技术环节为：菌种→种子扩培→发酵培养→后处理→包装→产品质量检验→出厂。流程图见附录 A。

4.1 菌种

4.1.1 原种

原种是生产用菌种的母种，对原种的要求如下：

——有菌种鉴定报告；

——菌种的企业编号、来源等信息。

4.1.2 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。

4.1.3 菌种质量控制

在生产之前，应对所用菌种进行检查，确认其纯度和应用性能没有发生退化。出现污染或退化的菌种不能作为生产用菌种，需进行4.1.4或4.1.5操作。

4.1.4 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。

4.1.5 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。

4.2 发酵增殖

4.2.1 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。

4.2.2 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。

4.2.2.1 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。

4.2.2.2 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（或芽胞、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。

4.2.3 灭菌

常用的灭菌方式及适用对象见附录C。

4.2.3.1 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0.103 MPa～0.168 MPa），0.5 h～1.0 h。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℃，1.0 h～2.0 h；或采用100℃灭菌2 h～4 h，24 h后再灭菌1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4.2.3.2进行检查。若灭菌不彻底，培养基不得使用。

4.2.3.2 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。

4.2.3.2.1 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 4.2.3.2.2 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 4.2.3.2.2 操作，以进一步确认培养基灭菌彻底。

4.2.3.2.2 发酵管试验法

用无菌操作技术将 1 mL 供试培养基加至 5 mL 已灭菌的营养肉汤中，重复 3 次。置于 37℃ 培养，24 h 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。

4.2.4 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 100 mL～200 mL 无菌肉汤培养基的三角瓶中通入待监测滤过空气 10 min～15 min。三角瓶置于 37℃ 培养，24 h 内无浑浊、镜检无菌体即判定合格。

4.3 发酵控制

4.3.1 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＜3 h），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＞6 h），接种量不低于 10%。

4.3.2 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。

4.3.3 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。

4.3.4 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%。

4.3.5 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≥80%；

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

——监测发酵过程中摄氧率、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。

4.4 后处理

后处理过程可分为发酵物同载体（或物料）混合吸附和发酵物直接分装两种类型。

4.4.1 发酵物同载体（或物料）混合吸附

对载体及物料的要求如下：

——载体的杂菌数≤1.0×10^4 个/g；

——细度、有毒有害元素（Hg、Pb、Cd、Cr、As）含量、pH、粪大肠菌群数、蛔虫卵死亡率值达到产品质量标准要求；

——有利于菌体（或芽胞、孢子）的存活。

发酵培养物与吸附载体需混合均匀，可添加保护剂或采取适当措施，减少菌体的死亡率。吸附和混合环节应注意无菌控制，避免杂菌污染。

4.4.2 发酵物直接分装

对于发酵物直接分装的产品剂型，可根据产品要求进行包装。

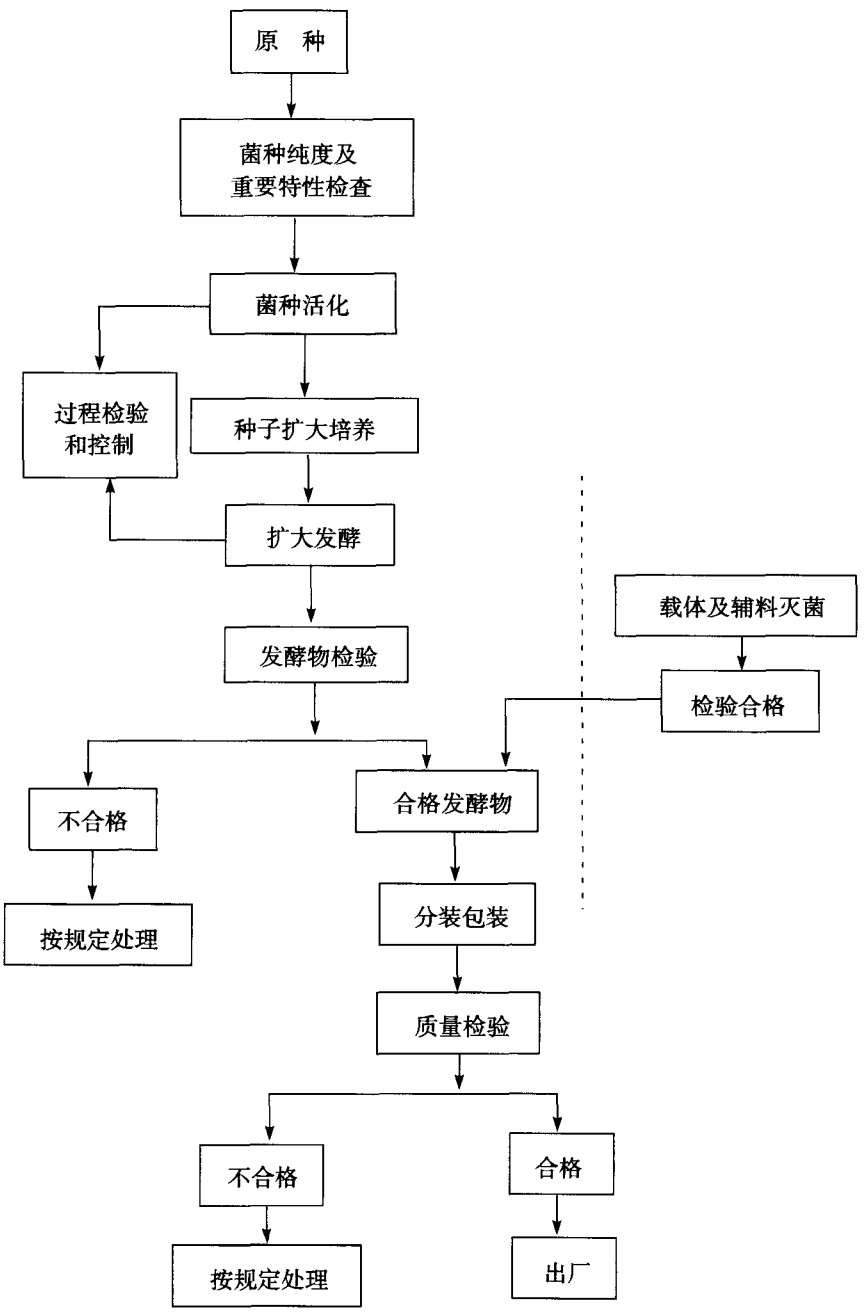
4.5 建立生产档案

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。

4.6 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
（资料性附录）
农用微生物制剂生产工艺流程示意图



（注：虚线右侧部分操作过程应根据企业的具体产品类型决定是否采用）

附 录 B
（资料性附录）
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
（资料性附录）
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～60 min	培养基，耐热器皿，废弃物
干热灭菌	160℃～170℃，1.5 h～2 h	耐热器皿，耐热物料
紫外线灭菌	距离紫外灯管(15W)≤1.2 m，0.5 h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≤0.2 μm	空气，不宜于热灭菌的试剂