



中华人民共和国国家标准

GB/T 25864—2010

球孢白僵菌粉剂

Powder of Beauveria bassiana

2011-01-10 发布

2011-06-01 实施

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 发布

前 言

本标准的附录 A、附录 B 为规范性附录，附录 C 为资料性附录。

本标准由国家林业局提出并归口。

本标准起草单位：国家林业局森林病虫害防治总站、安徽农业大学、中国林业科学院、华中农业大学微生物农药国家工程研究中心。

本标准主要起草人：郭志红、李增智、陈昌洁、宋玉双、喻子牛、樊美珍、胡加富、崔永三、苏宏钧、李林、任浩章。

引 言

球孢白僵菌粉剂是一种真菌杀虫剂。白僵菌经过发酵获得分生孢子,经萌发侵入目标害虫体内,破坏害虫组织并产生毒素,使害虫致死。

球孢白僵菌的名称及基本参数如下:

菌种中文通用名:球孢白僵菌。

菌种拉丁文学名:*Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.

分类地位:球孢白僵菌在分类上属于真菌门(Eumycota),半知菌亚门(Deuteromycotina),丝孢纲(Hyphomycetes),丛梗孢目(Moniliales),丛梗孢科(Moniliaceae),白僵菌属(*Beauveria*)。

鉴定特征:在麦芽浸膏培养基上,菌落的菌丝呈白色绒状,后期呈丛卷毛状至粉状,背面初期无色,菌落产孢后呈淡黄色至粉红色。分生孢子梗常浓密簇生(但有时单生或轮生),呈瓶状,形成“之”字状弯曲产孢轴。分生孢子球形,透明,薄壁。大小为 $(2\ \mu\text{m}\sim 3\ \mu\text{m})\times(2\ \mu\text{m}\sim 2.5\ \mu\text{m})$ 。

菌种保藏条件:温度 $5\ ^\circ\text{C}$;避光;封装。

有效成分主要存在形式:分生孢子。

生物活性:主要用于防治鳞翅目害虫。

适宜生长条件:麦芽浸粉或 PDA 培养基、适宜温度 $25\ ^\circ\text{C}$ 、pH6。

最适贮存温度: $5\ ^\circ\text{C}$ 。

球孢白僵菌粉剂

1 范围

本标准规定了球孢白僵菌粉剂的要求、检验方法及标签、包装、贮运等规则。

本标准适用于球孢白僵菌经生物发酵与加工而获得的分生孢子粉剂。

本标准不适用于布氏白僵菌或其他种类白僵菌生产的杀虫剂。

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/T 1605—2001 商品农药采样方法

GB 3796—2006 农药包装通则

GB/T 16150—1995 农药粉剂、可湿性粉剂细度测定方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

球孢白僵菌粉剂 *Beauveria powder product*

由球孢白僵菌纯菌种经生物发酵生产与加工而获得的分生孢子粉剂。是防治多种害虫的真菌杀虫剂。

3.2

球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.

一种半知菌类的虫生真菌,分类上属于真菌门(Eumycota),半知菌亚门(Deuteromycotina),丝孢纲(Hyphomycetes),丛梗孢目(Moniliales),丛梗孢科(Moniliaceae),白僵菌属(*Beauveria*)。

3.3

分生孢子 *conidia*

一种无性繁殖细胞。着生于分生孢子梗上的瓶状产孢细胞顶端,对昆虫具有致病力。球孢白僵菌的分生孢子大部分呈球形。

3.4

含孢量 *conidia content*

每克白僵菌粉剂中所含的分生孢子数。

3.5

孢子萌发率 *germination rate of conidia*

白僵菌粉剂中所萌发的白僵菌孢子数占孢子总数的百分比。

3.6

毒力测定 *bioassay*

用杀虫剂感染目标害虫或指示昆虫使其感病死亡,是检验杀虫剂毒力的过程。

3.7

毒力 virulence

对目标害虫的致死能力,以通过活体生物测定得到的致死中时 LT_{50} 表示。

3.8

干燥减量 loss in weight

样品在规定条件下,经加热干燥后质量减少的百分数,即样品中水分及少量低挥发物的量。

3.9

杂菌率 microbial contaminant

真菌农药中除有效成分真菌外,其他影响有效成分真菌生长的菌占总菌量的百分比。

4 要求

4.1 外观

白色或浅灰白色粉末,不可以有团块。

4.2 控制项目指标

球孢白僵菌粉剂应符合表 1 的要求。

表 1 球孢白僵菌粉剂控制项目指标

项 目	指 标
含孢量	高孢粉 $\geq 1\ 000$ 亿孢子/g
	低孢粉 $100(\pm 10)$ 亿孢子/g
孢子萌发率	高孢粉 $\geq 90\%$
	低孢粉 $\geq 90\%$
毒力 LT_{50}	高孢粉 $LT_{50} \leq 5$ d
	低孢粉 $LT_{50} \leq 6$ d
杂菌率	高孢粉 $\leq 5\%$
	低孢粉 $\leq 10\%$
干燥减量	高孢粉 $\leq 10\%$
	低孢粉 $\leq 10\%$
细度	高孢粉 全部通过 160 目筛
	低孢粉 全部通过 35 目筛
贮存稳定性	在 5 °C 条件下贮存 180 d, 孢子萌发率大于标明值的 80%

5 检验方法

5.1 抽样

按照 GB/T 1605—2001 中 5.1.3“商品农药采样方法”进行,用随机数表法确定抽样的包装件,最终抽样量不少于 100 g。

5.2 鉴别试验

5.2.1 菌种鉴别

根据所提供的菌种形态学、生物化学、DNA 分子特征或国际公认机构的鉴定特征,用显微镜观察法从生物形态上进行鉴定或采用其他(如生物化学、DNA 片段序列)方法进行鉴定。

5.2.2 菌种仲裁鉴定

当对鉴别结果有怀疑或争议时,应有菌种认证资质的单位,与菌种保藏中心保藏的生产菌株进行

对照,由2名以上的专家确定后,出具菌种鉴定报告,作为仲裁依据。

5.3 含孢量的测定

5.3.1 方法提要

本试验采用显微记数法。将粉剂稀释至适当倍数,在显微镜下用血球记数板计孢子数,然后计算含孢量。

5.3.2 试剂

吐温 80(化学纯)。

5.3.3 仪器及设备

光学显微镜、精度为千分之一的天平、组织捣碎机、血球记数板(16×16)、微量移液器、玻璃器皿等。

5.3.4 检验程序

用精度为千分之一的天平准确称取低孢粉 1.00 g 或高孢粉 0.10 g,装入组织捣碎机的盛液杯中,同时加入 0.1 mL 的吐温 80、200 mL 清水,以 5 000 r/min 的速度搅拌 2 min,加清水定容至 500 mL,再以 5 000 r/min 的速度搅拌 1 min,使之成为均匀的孢子悬浮液。将孢子浓度控制在每中格 20~40 个,如果不合适可以稀释样品调节成此浓度。取深度为 0.1 mm、血球计数板格为 16×16 个中格,盖上配套专用盖玻片,用吸管吸取配制好的悬浮液沿盖玻片的边缘滴入,使孢子液恰好充满盖玻片于载玻片之间,以孢子液不入槽为度,多余孢子液用滤纸吸去。放在显微镜载物台上静置 1 min~2 min,待浮动的孢子静止后,放大 400 倍检视计数。

5.3.5 检验结果计算

血球计数板记数格为 16 个中格,每个中格为 16 个小格,则计算双线范围内任一斜对角线上的四个中格共 64 个小格的孢子总数。记数时每中格的四周如有压线的孢子,计上线不计下线,计左线不计右线。按公式(1)计算待测样品的孢子含量:

$$S = \frac{(S_1 + S_2 + S_3 + S_4) \times 4 \times 10^6 \times T}{64} \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

S——含孢量,亿孢子/g;

$S_1 \sim S_4$ ——任意 4 个中格中孢子的数量;

T——稀释倍数。

每个样品设 3 个重复。允许误差率为 10%。

5.4 孢子萌发率的测定

将 50 mL 麦芽浸粉培养液(麦芽浸粉 2%,用蒸馏水配制)注入预先放入 20~30 个直径 5 mm 玻璃珠的 250 mL 三角瓶中,在 121 °C 条件下灭菌 20 min 后,放入待测低孢粉 0.2 g(或根据含孢量换算成适合镜检的克数,高孢粉亦然),置于 120 r/min 的摇床上,在 25 °C 条件下培养 8 h~16 h(视菌种特性而定),取样制片镜检。用血球数板计数,芽管大于孢子半径的孢子计为萌发孢子。按公式(2)计算孢子萌发率:

$$R = \frac{N}{M} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

R——孢子萌发率,%;

N——萌发孢子总数;

M——检查孢子总数。

每个样品设 3 个重复。允许误差率为 10%。

5.5 干燥减量的测定

5.5.1 仪器及设备

扁形称量瓶(50 mm);

电热恒温干燥箱(±2℃)。

5.5.2 测定步骤

将扁形称量瓶在 110℃干燥箱烘 15 min,取出称量、记录。准确称取 5.00 g 样品放入皿内,在 (105±2)℃ 电热恒温干燥箱中烘 1 h。取出后将样品和扁形称量瓶一起称重,减去扁形称量瓶的重量。按公式(3)计算干燥减重(含水率):

$$W = \frac{5.00 - W_1}{5.00} \dots\dots\dots(3)$$

式中:

W——干燥减重,%;

W₁——烘干后样品重量,g。

每个样品设 3 个重复。允许误差率为 2%。

5.6 毒力测定

按附录 A、附录 B 进行。

5.7 杂菌率测定(CFU 法)

5.7.1 采用 2%麦芽浸膏、2%营养琼脂配制培养基,121℃高压灭菌 20 min 后凉至 45℃左右,倒入培养皿制成 2 mm~4 mm 的平板。

5.7.2 按 5.3.4 中的操作步骤称样、均散、稀释(用无菌水)。稀释倍数依具体情况而定,或同时做几个稀释梯度,使每个培养皿中的菌落保持在 10~20 个。

5.7.3 用微量移液器接种 100 μL 菌液到培养基平板上,用曲玻棒涂布均匀。做 10 次重复。

5.7.4 在 27℃条件下培养 48 h,根据菌落特征分辨球孢白僵菌或杂菌,分别计数。计算出杂菌占总菌落数的百分比。

5.8 细度的测定

按照 GB/T 16150—1995 中的 2.1 干筛法(适用于粉剂)执行。高孢粉应全部通过 160 目筛,低孢粉应全部通过 35 目筛。

5.9 贮存稳定性的测定

将产品在 5℃条件下贮存 180 d,孢子萌发率应大于标明值的 80%。

6 标志、标签、包装和贮运

6.1 标志、标签

球孢白僵菌粉剂的标志及标签应符合 GB 3796—2006 的规定。标签上应注明贮运条件。

6.2 包装

产品包装要求应符合 GB 3796—2006 的相关规定。

6.3 贮运

6.3.1 贮藏地点

球孢白僵菌粉剂的贮藏应选择低于 20℃、干燥、通风、蔽光的场所。有条件的应在 5℃条件下保存。

6.3.2 运输

球孢白僵菌粉剂在运输中应密封防潮、防晒、防高温、防雨淋。避免与皮肤、眼睛接触,防止由口鼻吸入。

6.4 产品特殊要求

产品应采用塑料袋密封包装,以保证干燥减量在 10%以下。

6.5 保证期

在规定的贮运条件下球孢白僵菌粉剂的保证期为 6 个月。从生产日期算起,至少 6 个月内孢子萌发率不低于标明值的 80%。

附 录 A
(规范性附录)

以松毛虫为目标昆虫的毒力测定

A.1 供试虫种

马尾松毛虫 *Dendrolimus punctatus* Walker

A.2 试剂和材料

麦芽浸粉(生化试剂);
葡萄糖(医用);
吐温 80(化学纯);
新洁尔灭(医用)。

A.3 仪器设备

电子秤(千分之一精度);
加湿器(超声波低温加湿器);
养虫笼(由 30 cm×30 cm×50 cm 的木制框架构成,上下两面用木板,四个侧面用窗纱,有一个可以开关的侧门);
三角瓶(250 mL);
不锈钢镊子(医用)。

A.4 供试幼虫的饲养

A.4.1 蛹的采集

在林间用带有橡皮头的镊子轻轻取下成熟的马尾松毛虫蛹,放入养虫笼内。每笼 30 只。保持温度在 25 ℃、相对湿度在 80%以上(必要时用加湿器)。

A.4.2 成虫的饲养和产卵

待蛹羽化后,同时放入 1 只 250 mL 三角瓶水培的新鲜马尾松枝,作为成虫产卵的场所。一般成虫羽化后,当天或次晚交配,历时 7 h 以上可以完成受精并产卵,7 d~10 d 为产卵高峰期。卵约 7 d 开始孵化。

A.4.3 幼虫的饲养

在孵化高峰期,每天清除虫粪,用新洁尔灭消毒用过的器具,并换上新鲜松枝饲养幼虫。幼虫生长 7 d~10 d 以 2 龄幼虫为主,10 d~15 d 以 3 龄幼虫为主。应选择虫龄一致、生理状态良好的健康幼虫作为毒力测定的供试幼虫。室内饲养一般不超过 4 代。

A.5 接种感染

准确称取 2.00 g 低孢粉或 0.20 g 高孢粉,加入 0.1 mL 吐温 80,置于高速搅拌器的盛液杯中,加入 1%的麦芽浸粉液 200 mL。以 5 000 r/min 速度搅拌 2 min,配制成 1 亿孢子/mL 的待测样品悬浮液。

每个养虫笼放入 1 只 250 mL 三角瓶,装入水,插入新鲜松枝。挑选健康马尾松毛虫 3 龄幼虫 30 头,浸入待测样品悬浮液中 2 s,用滤纸吸掉余液,放入已在三角瓶中插好鲜松枝的养虫笼中。每个样品 3 次重复。以含有同样浓度吐温 80 的麦芽浸粉液做对照,3 次重复。置于温度在 25 ℃、相对湿度在 80%以上(必要时用加湿器)的环境中培养观察。每天换一次新鲜松枝。

处理的浓度剂量应不少于 5 个。每个处理 30 头试虫,至少重复 3 次。

A.6 观察记录

接种 48 h 后开始检查死亡率,每 24 h 记录一次。用镊子轻触虫体,无反应者计为死亡数。对照要放在另外的房间中,并用单独的镊子。对照的死亡率应小于 10%,如果大于 10%应重新测定。

A.7 测定结果

根据对照与处理的数据,采用 Abbott 表或按式(A.1)计算校正死亡率 $Y(\%)$:

$$Y = \frac{(Y_1 - Y_2)}{1 - Y_2} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A.1)$$

式中:

- Y ——校正死亡率, %;
- Y_1 ——药剂处理样本的死亡率, %;
- Y_2 ——对照样本的死亡率, %。

然后,将处理浓度换算成对数值,校正死亡率转换成死亡几率值,用最小二乘法求出样品致死中时 LT_{50} 。

A.8 允许误差

每次平行测定结果之差,应不大于 20%。样品各剂量引起的死亡率应在 10%~90%之间。测 LT_{50} 时,在 50%死亡率上下应至少设置 2 个时间。

附 录 B

(规范性附录)

以玉米螟为目标昆虫的毒力测定

B.1 供试昆虫

亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Guenee)

B.2 试剂和材料

吐温 80(化学纯);
 酵母粉(化学纯);
 维生素 C(化学纯);
 玉米粉(饲料用玉米,80 °C 烘干,过 80 目筛);
 大豆粉(食用大豆,80 °C 烘干,过 80 目筛);
 葡萄糖(食用);
 氢氧化钾(分析纯);
 氯化钠(分析纯);
 磷酸氢二钾(分析纯);
 磷酸二氢钾(分析纯);
 琼脂条(凝胶强度大于 300 g/cm²,食品用);
 红霉素(医疗注射粉剂);
 山梨酸(分析纯);
 山梨酸钾(分析纯);
 10%甲醛溶液(分析纯,甲醛溶于蒸馏水);
 95%乙醇溶液(分析纯);
 磷酸缓冲液(氯化钠 8.5 g,磷酸氢二钾 6.0 g,磷酸二氢钾 3.0 g,吐温 80 2 mL,蒸馏水 1 000 mL);
 微量移液器(200 mL 微量移液器,对应的灭菌微量移液管);
 搪瓷盘(25 cm×40 cm);
 组织板(24 孔板组织板)。

B.3 仪器设备

光学显微镜;
 血球计数板;
 水浴锅;
 医用手术刀;
 磨口三角瓶(250 mL,具塞);
 振荡器(100 r/min~600 r/min);
 养虫管(9 cm×2.5 cm);
 烧杯(50 mL、500 mL、1 000 mL);
 试管(18 mm×180 mm);
 玻璃珠(直径 5 mm);
 移液管(1 mL、10 mL);

带塞磨口试管(10 mL);
玻璃培养皿(9 cm);
不锈钢镊子(医用)。

B.4 玉米螟的饲养

B.4.1 饲料的配制

饲料配方:玉米粉 60 g、酵母粉 36 g、黄豆粉 60 g、维生素 C 4.0 g、山梨酸 4.0 g、10%甲醛 1.6 mL、琼脂 20 g、蒸馏水 750 mL。

将蔗糖、琼脂粉加入 600 mL 的蒸馏水中调匀,搅拌煮沸,使琼脂完全溶化。玉米粉、黄豆粉、酵母粉用剩余的 150 mL 水润湿浸泡。维生素 C、山梨酸钾用少量水溶解。冷却至 80 °C 加入黄豆粉、玉米粉等的润湿物,搅匀。稍等再将维生素 C 和山梨酸钾的混合液加入,搅匀。以微粒不下沉为标准,最后加入溶化的红霉素和甲醛溶液搅匀,置 65 °C 水浴中,每个养虫管加入 5 mL 饲料。凝固后保存于 4 °C 条件下待用。

B.4.2 饲养

取玉米螟的卵放入养虫盒中,保持温度在 27 °C ± 1 °C,保持湿度在 100%,约 3 d 时间孵化出初孵幼虫。再将初孵幼虫转入已加入饲料的养虫管中,放置在 27 °C ± 1 °C,湿度在 75%~100%的环境中培养。

B.4.3 供试昆虫的挑选

培养 5 d 后挑选供试幼虫,选择健康、活跃、个体大小一致的幼虫供试验用。

B.5 待测样品悬浮液的制备

准确称取 2.00 g 低孢粉或 0.2 g 高孢粉,加入 0.1 mL 吐温 80,置于高速搅拌器的盛液杯中,加入 200 mL 1%的麦芽浸粉液。以 5 000 r/min 速度搅拌 2 min,配制成 1 亿孢子/mL 的溶液。

B.6 接虫感染

将选好的幼虫 10 头一组,放入待测样品悬浮液的中浸 2 s,迅速取出,用滤纸吸掉多余水滴。放入已放置饲料的养虫管中,每处理做 5 管,塞上棉塞,写好标签。口朝下倾斜放置,27 °C ± 1 °C,保持湿度在 75%~100%,感染饲养 120 h。

B.7 药效检查

接种 24 h 后开始检查死亡率,每天检查一次。用镊子轻触虫体,无反应者计为死亡数。每天检查一次。记录死亡虫数。应注意先检查对照,并使用单独的镊子。对照的死亡率应小于 10%,如果大于 10%应重新测定。

B.8 测定结果

根据对照与处理的数据,采用 Abbott 表或按公式(A. 1)计算校正死亡率 $Y(\%)$ 。然后,将处理浓度换算成对数值,校正死亡率转换成死亡几率值,用最小二乘法求出样品致死中时 LT_{50} 。

B.9 允许误差

每次平行测定结果之差,应不大于 20%。样品各剂量引起的死亡率应在 10%~90%之间。测 LT_{50} 时,在 50%死亡率上下应至少设置 2 个时间。

附 录 C
(资料性附录)
白僵菌产品分类

C.1 球孢白僵菌产品分类

C.1.1 球孢白僵菌高孢粉

分生孢子含量为1 000亿孢子/g以上、细度是全部通过160目筛的白僵菌菌粉。主要用于防治鳞翅目害虫。适用于对喷洒物细度要求较高的航空喷洒、静电喷洒等。

C.1.2 球孢白僵菌低孢粉

孢子含量为80亿孢子/g、细度是全部通过35目筛的白僵菌菌粉。主要用于防治鳞翅目害虫。适用于一般喷粉器。

C.1.3 球孢白僵菌粉炮

通过点燃引捻抛向或发射到空中后点爆扩散的白僵菌粉剂。适用于高山地区和树木较高的林区。

C.1.4 球孢白僵菌油悬浮剂

以油类为介质的白僵菌液体制剂。适用于飞机喷洒。

C.1.5 球孢白僵菌挂条

以无纺布或不同质地的纺织品为载体制成的杀虫产品。主要用于防治鞘翅目害虫。

C.2 布氏白僵菌粉剂

以布氏白僵菌(*Beauveria brongniartii*)为生产菌株,经过发酵和加工制成的,分生孢子含量为50~100亿孢子/g、细度为全部通过35目筛的粉剂。主要用于防治地下害虫。
