

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2295.1—2012

真菌微生物农药 球孢白僵菌 第1部分：球孢白僵菌母药

Fungal pesticides—*Beauveria bassiana*—
Part 1: *Beauveria bassiana* technical concentrates(TK)

2012-12-24 发布

2013-03-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

NY/T 2295《真菌微生物农药 球孢白僵菌》为系列标准,分为两部分:

——第1部分:球孢白僵菌母药;

——第2部分:球孢白僵菌可湿性粉剂。

本部分为 NY/T 2295 的第1部分。

本部分按照 GB/T 1.1 给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本标准由农业部种植业管理司提出并归口。

本标准起草单位:农业部农药检定所、中国农业科学院植物保护研究所。

本标准主要起草人:林荣华、姜辉、农向群、张泽华、袁善奎、王晓军、韩先国、刘琼、王红、王以燕。

真菌微生物农药 球孢白僵菌

第1部分:球孢白僵菌母药

1 范围

本部分规定了球孢白僵菌母药的要求、试验方法、检验与验收以及标志、标签、包装、贮运。
本部分适用于以分生孢子为主要成分的粉状球孢白僵菌母药。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 191 包装储运图示标志

GB/T 1601 农药 pH 值的测定方法

GB/T 1604 商品农药验收规则

GB/T 1605 商品农药采样方法

GB 3796 农药包装通则

GB/T 8170—2008 数值修约规则与极限数值的表示和判定

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文件。

3.1

球孢白僵菌母药 *Beauveria bassiana* technical concentrates (TK)

由球孢白僵菌纯菌种经液固两相发酵而获得的高含量分生孢子粉,通常情况下还会包含伴随发酵过程的少量生物组分和化学杂质。

3.2

含孢量 spore content

每克球孢白僵菌母药中所含的分生孢子数量。

3.3

活孢率 rate of living spores

球孢白僵菌母药中可萌发的分生孢子数占孢子总数的百分比,单位为百分率(%)。

3.4

活孢数 number of living spores

在单位质量球孢白僵菌母药样品中能正常萌发或能形成菌落的分生孢子数量。

3.5

菌落形成单位 colony forming units (CFU)

是将球孢白僵菌母药用水稀释后得到的孢子悬浮液通过涂布的方法,让其单个分生孢子分散在琼脂平板上,待培养后每一活的分生孢子形成一个菌落,即一个菌落形成单位(CFU),通过肉眼观察菌落的数量来推算单位微生物农药样品中的活孢子含量。

3.6

杂菌率 rate of microbial contaminants

球孢白僵菌母药样品中除了球孢白僵菌外,其他菌(真菌和细菌等)量占总菌量的百分率。

3.7

贮存稳定性 storage stability

球孢白僵菌母药在室温和(或)低于室温下贮存一定时间后,产品的活孢数占其标明值的相对百分率。

4 要求

4.1 外观

通常为白色或浅灰白色粉末。由于发酵基质的不同颜色偶有差异,但应为均匀疏松的粉末,不可有团块。

4.2 指标

球孢白僵菌母药质量控制项目指标应符合表 1 要求。

表 1 球孢白僵菌母药质量控制项目指标

项 目	指 标
活孢数,孢子 /g 或 CFU/g	$\geq 8.0 \times 10^{10}$
杂菌率,%	≤ 3
pH	6.0~8.0
干燥减量,%	≤ 8
细度(通过 150 μm 试验筛),%	≥ 90
贮存稳定性 ^a ,%	≥ 80
^a 为定期检验项目;3 个月检测一次。	

5 试验方法

除非另有说明,试验方法所用试剂级别为化学纯及以上,所用溶液均为水溶液。

5.1 抽样

按照 GB/T 1605 规定进行样品的采集,用随机数表法确定抽样的包装件,最终抽样量不少于 100 g。抽样时从不同部位随机抽取至少 3 个样点的孢子粉,混合均匀。采样时还应特别注意样品的代表性和避免污染,采样容器和采样工具应经过消毒灭菌,样品采集后应立即进行检验,若不能立即检验,可贮存在 4℃ 冰箱中。

5.2 菌种鉴别

常规检测主要根据代表菌株的形态学特征进行菌种鉴别,并可辅助 ITS 等基因序列分析、白僵菌毒素鉴别等手段。当对鉴别结果有争议或者需要进行法律仲裁检验时,应到具有菌种鉴定资质的单位,将待检菌种与模式菌种进行比对,由专家确认后,出具菌种鉴定报告,作为仲裁依据。

形态学特征观察:以划线或稀释涂布法将样品在马铃薯葡萄糖培养基(PDA)平板上纯化培养,观察菌落特征,用显微镜观察孢子及产孢梗等细胞形态特征,对比球孢白僵菌的形态学描述(参见附录 A)进行鉴定。

5.3 活孢量测定

可采用显微计数法或平板菌落计数法,单位分别为孢子/g 或 CFU/g。

5.3.1 显微计数法

5.3.1.1 方法提要

将样品润湿,配制成孢子悬浮液,并稀释至适当倍数,在显微镜下用血球计数板测定含孢量。并将样品接种到培养基平板上,培养后于显微镜下观察孢子萌发率。最后根据含孢量和孢子萌发率计算活孢数。

5.3.1.2 仪器和试剂

5.3.1.2.1 仪器

- a) 天平:精度为 0.001 g。
- b) 移液器:20 μL ~200 μL ,200 μL ~1 000 μL 。
- c) 恒温振荡器。
- d) 旋涡混合器:转速 $\geq 2\ 000\text{r}/\text{min}$,振幅 $\geq 5\text{mm}$ 。
- e) 显微镜:物镜 \times 目镜倍数 400 倍。
- f) 血球计数板:1/400 $\text{mm}^2 \times 0.1\text{mm}$ 精度,25 \times 16 规格。
- g) 计数器:1~9 999。
- h) 高压蒸汽灭菌器。
- i) 超净工作台。
- j) 恒温培养箱。

5.3.1.2.2 试剂

- a) Tween-80。
- b) 蔗糖。
- c) 琼脂。

5.3.1.3 含孢量测定

5.3.1.3.1 试验步骤

- a) 按 5.1 规定抽取样品。
- b) 称取母药样品 1.00 g,共称取 3 个试样作为 3 个重复。
- c) 在每份样品中加入 0.05% Tween-80 溶液 100 mL,浸泡 30 min,使孢子充分润湿,然后振荡 30 min,得到稀释 100 倍的孢子悬浮液。
- d) 用移液器从溶液中部移取孢子悬浮液 2 mL 到试管中,加蒸馏水 8 mL,于旋涡混合器上振荡约 30 s,进行梯度稀释(稀释至血球计数板 5 个中格孢子数为 100~300)并用血球计数板在显微镜下观察计数。每样品重复点样计数 3 次,取平均值。

5.3.1.3.2 计算

试样中的含孢量按式(1)计算。

$$X = \frac{K \times 400 \sum N_i \times 10^3}{0.1 \times 80 \times 3} = \frac{K \times \sum N_i \times 10^5}{6} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X——含孢量,单位为孢子/g(CFU/g);
i——为称取样品序号,*i*=1,2,3;
 K——稀释倍数;
 N——3 次计数的 5 中格孢子数的平均值。

5.3.1.4 活孢率的测定

5.3.1.4.1 试验步骤

- a) SA 培养基(蔗糖 2%,琼脂 1.5%)经高压蒸汽灭菌后凉至 50 $^{\circ}\text{C}$ 左右,制成 1 mm~2 mm 厚的平板。
- b) 按 5.3.1.3.1 操作步骤称样、润湿、稀释、计数,然后配成 1.0×10^4 孢子/mL 的孢子悬浮液。
- c) 接种 100 μL 孢子悬浮液到 SA 培养基平板上,并用曲玻棒涂布均匀,重复 3 个平板。

d) 在 25℃~28℃下培养 12 h~24 h,于显微镜(10×40)下观察平板,统计孢子萌发数和孢子总数。以芽管长度大于孢子半径计为萌发孢子。每平板观察多个视野,累计观察孢子总数不少于 300 个。

5.3.1.4.2 计算

活孢率按式(2)计算。

$$Y = \frac{N_1}{N_1 + N_2} \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

式中:

Y ——活孢率,单位为百分率(%);

N₁——萌发孢子总数,单位为个;

N₂——未萌发孢子总数,单位为个。

5.3.1.5 活孢数的计算

活孢数按式(3)计算。

$$Z = X \times Y \dots\dots\dots (3)$$

式中:

Z ——活孢数,单位为孢子/g(CFU/g);

X ——含孢量,单位为孢子/g(CFU/g);

Y ——活孢率,单位为百分率(%)。

5.3.2 平板菌落计数法

5.3.2.1 试剂和溶液

a) 试剂

Tween - 20 或 Triton X - 100;

马铃薯葡萄糖培养基(PDA)。

b) 溶液

0.05% Tween - 20 或 0.05% Triton X - 100。

5.3.2.2 主要仪器、设备

a) 天平:精度为 0.01 g;

b) 移液器:20 μL~200 μL,200 μL~1 000 μL;

c) 高压蒸汽灭菌器;

d) 超净工作台;

e) 恒温振荡器;

f) 恒温培养箱。

5.3.2.3 实验步骤

5.3.2.3.1 样品的准备

在无菌操作条件下,将样品搅拌均匀,准确称取 1.00 g 样品,溶于 100.0 mL 的含 0.05% Tween - 20 或 0.05% Triton X - 100 的无菌水中浸泡 30 min 后,振荡 30 min,得到稀释 100 倍的样品溶液,标记为 0 号。然后参照表 2(以稀释 6 次为例)进行梯度稀释:

表 2 梯度稀释示例

编 号	0	1	2	3	4	5	6
灭菌水体积,mL	100.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
加入上一稀释浓度溶液的体积,mL	—	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
累计稀释倍数	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸

5.3.2.3.2 涂板计数

将上述各梯度稀释液分别吸取 100 μL 于 PDA 平板上,并用曲玻棒均匀涂布在整个平板表面,每 1 稀释度做 3 次重复,然后置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 24 h~48 h 后,选择适宜的稀释度,取菌落数在 20 个~150 个之间的平板进行计数。

5.3.2.3.3 计算

- a) 若只有一个稀释度平板上的菌落数在适宜计数范围内,则计算该稀释度 3 个重复平板菌落数的平均值,再将平均值乘以相应的稀释倍数,作为每克母药中的菌落数。如第 6 号稀释度 3 个平板的菌落数(CFU)分别为 79、80、81,则该母药的含孢量为:

$$N = [(79 + 80 + 81)/3] \times 10^8 \times 10 = 8.0 \times 10^{10} \text{CFU/g}$$

- b) 如有两个连续稀释度的平板菌落数均在适宜计数范围之内,则按式(4)计算。

$$N = \sum C / [(1 \times n_1 + 0.1 \times n_2) \times 0.1 \times d] \dots\dots\dots (4)$$

式中:

N ——单位样品(g)中的菌落数(CFU/g);

$\sum C$ ——平板(含适宜范围菌落数的平板)菌落数之和;

n_1 ——第 1 个适宜稀释度的调查平板数;

n_2 ——第 2 个适宜稀释度的调查平板数;

d ——第 1 稀释度的稀释因子。

示例:

如果第一稀释度(10^{-7})的菌落数(CFU)为 140、148、142,第二稀释度(10^{-8})的菌落数(CFU)为 20、21、23,则根据式(4)计算。

$$N = (140 + 148 + 142 + 20 + 21 + 23) / [(1 \times 3 + 0.1 \times 3) \times 0.1 \times 10^{-7}] = 1.50 \times 10^{10} \text{CFU/g}$$

5.4 杂菌率的测定

按 5.3.2 方法进行测定,用营养琼脂培养基(NA)检测样品中的细菌杂菌;用 PDA 培养基检测样品中的真菌杂菌。然后统计总的可见杂菌菌落数量,杂菌率按式(5)计算。

$$X = \frac{N_1 + N_2}{N_1 + N_2 + N_3} \times 100 \dots\dots\dots (5)$$

式中:

X ——杂菌率,单位为百分率(%);

N_1 ——细菌杂菌菌落数的总和,单位为 CFU;

N_2 ——真菌杂菌菌落数的总和,单位为 CFU;

N_3 ——有效成分球孢白僵菌菌落数总和,单位为 CFU。

5.5 pH 的测定

按 GB/T 1601 的要求进行测定。

5.6 细度的测定

按 GB/T 16150—1995 中 2.2 的规定进行测定。

5.7 干燥减量的测定

5.7.1 仪器、设备

扁形称量瓶:直径 40 mm;

电热干燥箱:控温范围(50 $^{\circ}\text{C}$ ~200 $^{\circ}\text{C}$),误差 $\pm 2^{\circ}\text{C}$;

干燥器。

5.7.2 试验步骤

称取试样 10 g(精确至 1 mg),置于预先恒重的称量瓶中,将此瓶放入 105 $^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 的电热恒温干燥

箱内干燥,1 h后取出,在干燥器中冷却至室温,称重。

5.7.3 测定结果

干燥减量按式(6)计算。

$$W = \frac{m - m_1}{m} \times 100 \dots\dots\dots (6)$$

式中:

W ——干燥减量,单位为百分率(%);

m ——试样的质量,单位为克(g);

m_1 ——干燥后试样的质量,单位为克(g)。

5.8 贮存稳定性

5.8.1 方法提要

将试样密闭放置于5℃贮存12个月或20℃~25℃贮存6个月后,对活孢数进行测定,计算其占标明值的百分率,要求不低于80%。

5.8.2 仪器、设备

冰箱;

恒温箱:控温范围(0℃~50℃),控温误差±2℃;

玻璃瓶:带有密封盖或瓶塞,能充分保证其密封性。

5.8.3 试验步骤

将20 g试样放入玻璃瓶中,使其铺成平滑均匀层,密封后置于5℃冰箱中放置12个月或20℃~25℃恒温箱中放置6个月后按5.3方法测定样品中的活孢数,并计算其占标明值的百分率。

6 产品检验与验收

应符合GB/T 1604的规定。极限值的处理应按GB/T 8170—2008中4.3.3的要求进行。

7 标志、标签、包装、贮运

7.1 标志、标签

产品的标志、标签应符合GB 3796的规定,同时注明贮运条件。

7.2 包装

包装应符合GB 3796和GB/T 191的规定。

7.3 贮运

贮运时严防日晒及35℃以上高温,置于阴凉干燥处。运输时,注意轻放,防止破损。不得与有毒有害物质混装、混运。

7.4 安全

在使用说明书或包装标签上应注明毒性、防护措施等。

7.5 保质期

在正常贮运条件下,质量保证期从生产日期算起,6个月内产品活孢数不低于标明值的80%。

附 录 A
(资料性附录)
有效成分描述

- A.1 中文通用名称:球孢白僵菌菌+菌株编号。
- A.2 拉丁学名:*Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill。
- A.3 分类地位:真核生物域 (Eukaryota); 真菌界 (Fungi); 双核亚界 (Dikarya); 子囊菌门 (Ascomycota); 盘菌亚门 (Pezizomycotina); 粪壳菌纲 (Sordariomycetes); 肉座菌亚纲 (Hypocreomycetidae); 肉座菌目 (Hypocreales); 虫草科 (Cordycipitaceae); 虫草属 (*Cordyceps*); 球孢虫草的无性型 (Anamorph of *Cordyceps bassiana*)。
- A.4 形态学特征:分生孢子和分生孢子梗无色; 产孢细胞轮生、簇生或单生于菌丝上, 小梗瓶状, 即下部膨大, 上部细长呈瓶颈状, 产孢轴短小, 向顶部合轴式产孢呈“Z”型排列; 分生孢子单生或疏松的聚生, 不串生, 球形, 直径 $1.8\ \mu\text{m}\sim 2.5\ \mu\text{m}$; 该菌培养初期菌落为白色, 后逐渐变为乳白色, 菌丝疏松呈绒毛状, 产孢子后呈粉状。
- A.5 有效成分主要存在形式:分生孢子。
- A.6 主要生物活性:杀虫。
- A.7 培养保存条件:最适生长温度为 $25^{\circ}\text{C}\sim 30^{\circ}\text{C}$; 适合培养基为马铃薯葡萄糖培养基 (PDA); 适宜贮存温度为 $0^{\circ}\text{C}\sim 4^{\circ}\text{C}$ 。
-