

## 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3282.3—2018

---

### 真菌微生物农药 金龟子绿僵菌 第3部分:金龟子绿僵菌可湿性粉剂

Fungal pesticides—*Metarhizium anisopliae*—  
Part 3: *Metarhizium anisopliae* wettable powder (WP)

2018-07-27 发布

2018-12-01 实施

---



中华人民共和国农业农村部 发布

## 前 言

NY/T 3282《真菌微生物农药 金龟子绿僵菌》分为3个部分：

- 第1部分：金龟子绿僵菌母药；
- 第2部分：金龟子绿僵菌油悬浮剂；
- 第3部分：金龟子绿僵菌可湿性粉剂。

本部分为NY/T 3282的第3部分。

本部分按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本部分由农业农村部种植业管理司提出并归口。

本部分起草单位：农业农村部农药检定所、重庆大学、重庆重大生物技术发展有限公司。

本部分主要起草人：郭明程、王中康、杨峻、殷幼平、王晓军、李向英、胡丽。

# 真菌微生物农药 金龟子绿僵菌

## 第3部分:金龟子绿僵菌可湿性粉剂

### 1 范围

本部分规定了真菌微生物农药金龟子绿僵菌可湿性粉剂的术语和定义、要求、试验方法、产品的检验和验收,以及标志、标签、包装、储运、安全和保质期。

本部分适用于由真菌农药母药与适宜的助剂和填料加工而成的金龟子绿僵菌可湿性粉剂。

### 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 5451 农药可湿性粉剂润湿性测定方法

GB/T 8170 数值修约规则与极限数值的表示和判定

GB/T 14825 农药悬浮率测定方法

GB/T 16150 农药粉剂、可湿性粉剂细度测定方法

NY/T 3282.1 真菌微生物农药 金龟子绿僵菌 第1部分:金龟子绿僵菌母药

### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

#### 3.1

**金龟子绿僵菌可湿性粉剂** *Metarhizium anisopliae* wettable powder (WP)

由金龟子绿僵菌母药与适宜的填料及助剂加工成的可分散于水中形成的悬浮液的粉状制剂。

#### 3.2

**润湿时间** wetting time

将一定量的可湿性粉剂从规定的高度倾入盛有一定量标准硬水的烧杯中,测定其完全润湿的时间。

#### 3.3

**含孢量** spore content

每单位金龟子绿僵菌可湿性粉剂样品中所含金龟子绿僵菌孢子的数量。

#### 3.4

**活孢率** percentage of living spores

即孢子萌发率,指在一定培养条件下,萌发的金龟子绿僵菌孢子数占总孢子数的百分率。

#### 3.5

**菌落形成单位** colony forming units (CFU)

以涂布方法,使单个分生孢子分散生长在营养琼脂培养基上,每一活孢子形成一个菌落,即为菌落形成单位(CFU)。

3.6

**杂菌率 rate of microbial contaminants**

金龟子绿僵菌母药样品中除绿僵菌孢子外,其他菌(真菌和细菌等)量与总菌量的百分率。

3.7

**储存稳定性 storage stability**

金龟子绿僵菌可湿性粉剂样品在室温或低于室温下存储一定时间后,产品的活孢数与其标明值的相对百分率。

4 要求

4.1 组成和外观

金龟子绿僵菌可湿性粉剂由真菌农药母药与适宜的助剂和填料加工制成。外观通常呈灰白色至浅绿色均匀疏松粉末,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,不应有结块。

4.2 规范项目及指标

金龟子绿僵菌可湿性粉剂质量控制项目应符合表1的要求。

表1 金龟子绿僵菌可湿性粉剂控制项目指标

项 目	指 标
含孢量,亿孢子/g	≥50
活孢率,%	≥95
杂菌率,%	≤5
干燥减量,%	≤10
细度(通过175 μm 试验筛),%	≥90
悬浮率,%	≥80
pH	5.5~7.0
湿润时间,s	≤20
储存稳定性*,%	≥80

\* 定期检测项目,每6个月测定一次。

5 试验方法

5.1 一般规定

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。

5.2 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 300 g。采样时,应特别注意样品的代表性和避免污染,采集容器和采样工具应经过消毒灭菌。样品采集后,应立即检验。若不能立即检验,可储存在 4℃ 冰箱中。

5.3 菌种鉴别试验

有效成分的特征描述参见附录 A。

将可湿性粉剂湿润、稀释后,均匀涂布在萨氏培养基 1/4SDAY 平板上,选择典型单菌落菌株作为代表菌株,并按照附录 B 进行菌种鉴别。

5.4 含孢量测定

按照 NY/T 3282.1 中 5.4 的规定进行测定。

5.5 活孢率测定

按照附录 B 的规定进行测定。

#### 5.6 杂菌率测定

按照 NY/T 3282.1 中 5.4 的规定测定样品的杂菌率。

#### 5.7 干燥减量测定

按照 NY/T 3282.1 中 5.7 规定的方法测定样品的干燥减量。

#### 5.8 细度测定

按照 GB/T 16150 的规定进行测定。

#### 5.9 pH 测定

按照 GB/T 1601 的规定执行。

#### 5.10 湿润时间测定

按照 GB/T 5451 的规定执行。

#### 5.11 悬浮率的测定

##### 5.11.1 方法提要

将试样于具塞量筒中,在 $(30\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 恒温箱内静置 30 min 后,通过分别测定底部 1/10 悬浮液与上悬浮液的含孢量,计算绿僵菌可湿性粉剂样品的悬浮率。

##### 5.11.2 仪器及设备

三角瓶:250 mL。

磨口具塞玻璃量筒:250 mL(内径 38.5 mm~40 mm,刻度间距 20.0 cm~21.5 cm,250 mL 刻度线与瓶塞底部间距 4 cm~6 cm)。

真空泵。

恒温箱:控温误差 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

光学显微镜:目镜 $\times$ 物镜=400 倍。

水平振荡仪:转速 $\geq 100$  r/min。

亮线血球计数板:25 $\times$ 16。

微量移液器:0.2 mL~1.0 mL。

手动计数器:1~9 999。

##### 5.11.3 试验步骤

将 250 mL 试样充分摇匀后倒入 250 mL 具塞量筒,盖上瓶塞在 1 min 内上下颠倒 30 次,使之充分均匀。直立量筒,打开塞子,静置约 30 秒。用微量移液器快速从量筒中取样(约 5 mL),按照 NY/T 3282.1 中 5.4 的规定测定悬浮液的含孢量  $c_1$ 。再将具塞量筒放入 $(30\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 超级恒温器中静止恒温 30 min。轻轻取出,并用一接有真空泵的吸管将瓶中菌液由上液面逐渐向下吸出 225 mL,盛于三角瓶中(此为上悬液)。控制整个操作过程在 15 s~30 s 内完成。

量筒中所剩孢子悬浮液为下悬液,测定量筒底部剩余的 25 mL 悬浮液,按照 NY/T 3282.1 中 5.4 的规定测定其含孢量  $c_2$ ,计算悬浮率。

##### 5.11.4 测定结果

试样的总悬浮率  $W_1$  按式(1)计算。

$$W_1 = \frac{10}{9} \times \frac{250c_1 - 25c_2}{250c_1} \times 100 = \frac{100 \times (10c_1 - c_2)}{9c_1} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$W_1$  ——试样的总悬浮率,单位为百分率(%);

$c_1$  ——静置前悬浮液含孢量,单位为亿孢子每毫升(亿孢子/mL);

$c_2$  ——静置后底部 1/10 悬浮液含孢量,单位为亿孢子每毫升(亿孢子/mL)。

## 5.12 储存稳定性

### 5.12.1 方法提要

将试样密闭放置于 5℃ 储存 12 个月或 15℃~25℃ 储存 6 个月后,按照附录 B 规定的方法测定活孢率。储存后不低于活孢率初始值的 80%。

### 5.12.2 仪器及设备

冰箱:5℃。

样品柜:室内控温范围 15℃~25℃。

棕色磨口玻璃瓶:带有磨口瓶塞,确保样品密闭。

### 5.12.3 试验步骤

将 20 g 试样放在玻璃瓶中,使其铺成平滑均匀层。密封后,置于 5℃ 冰箱中放置 12 个月或 15℃~25℃ 恒温箱中放置 6 个月。最后,按照附录 B 的规定测定活孢率。

## 6 产品的检验和验收

应符合 GB/T 1604 的规定。极限数值处理应按照 GB/T 8170 中 4.3.3 的要求执行。

## 7 标志、标签、包装、储运安全和保质期

### 7.1 标志、标签

应符合 GB 3796 的规定,同时注明储运条件。

### 7.2 包装

应符合 GB 3796 和 GB/T 191 的规定。

### 7.3 储运

储运时,应防止日晒及 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

在本部分的储存条件下,质量保证期从生产日期算起,12 个月内产品活孢率不低于标示值。

附 录 A  
(资料性附录)  
金龟子绿僵菌有效成分描述

A.1 中文通用名称

金龟子绿僵菌。

A.2 拉丁文学名

*Metarhizium anisopliae*

A.3 生物学分类地位

菌物界、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、麦角菌科 Clavicipitaceae、绿僵菌属 *Metarhizium*、金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae*。

A.4 生物学特性

A.4.1 菌落特征

在 1/4SDAY 培养基上菌落初期白色,背面可见淡黄色色素,后期产孢后呈暗绿色,分生孢子聚集成堆。菌株可以在 SDAY 上 28℃ 生长 1 周,直径可达 3.5 cm。

A.4.2 形态特征

菌丝具分枝分隔,粗 1.4 μm~2.1 μm。瓶梗型产孢细胞,大小幅度为(2.1~2.9) μm×(7.1~7.5) μm;从瓶梗顶端产生分生孢子链;孢子链连接点倾斜度小;分生孢子单细胞,长椭圆形至近柱状,两端钝圆形。分生孢子有时单生于菌丝分枝末端;分生孢子长度大于 15 μm。

A.4.3 核糖体基因分子鉴定结果

通过菌株总 DNA 扩增、克隆转化、测定绿僵菌菌株的 ITS1 - 5.8S rDNA - ITS2 的特征序列(见图 A.1)。金龟子绿僵菌菌株的 ITS1 - 5.8S rDNA - ITS2 目的基因序列全长为 552 bp,其中 5'端包含部分 18S rRNA 基因序列:1~49 为部分 18S rRNA 基因序列。3'端包含部分 28S rRNA 基因序列:520~552 为部分 28S rRNA 基因序列。其余的则为 ITS 区:50~195 为 ITS1 区域全序列,196~342 为 5.8S rRNA 基因全序列,343~519 为 ITS2 区域的全序列。综合培养性状及形态特征以及 ITS1 - 5.8 - ITS2 rDNA 分子克隆测序比对结果,鉴定该菌株为金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)。

```
TTTTATGCTTTAATTCAGCGGGTAGTCCTACCTGATTCGAGGTCAACTATAAAAAGTTGGGGGTTTT
TACGGCAGTGGACCGCGCCGGGCTCCTGTTGCGAGTGTTTTACTACTGCGCAGAGGAGGGCCACG
GCGAGACCGCCAATCAATTTAAGGGACGGCTGTGCTGGAAAACCAGCCTCGCCGATCCCCAACAC
CAAGTCCACAGGGGACTTGAGGGGCGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGAC
GGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATACTTATCGCATT
TCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTTT
```

```
TAACCACTCAGAAGATACTTATTAATAAAATTCAGAAGGTTTGGGTCCCCGGCGGGCGCGAAGTCC  
CGCCGAAGCAACAATGAAAGGTATAATTCACAGGGGTTGGGAGTTGGATAACTCGGTAATGATCCC  
TCCGCAGGTTCACTAAACGGAAACA
```

图 A.1 金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)核糖体基因扩增序列

A.5 有效成分主要存在形态

分生孢子。

A.6 生物活性

杀虫。

A.7 适宜生长条件

最适培养基为萨氏培养基(1/4SDAY);最适生长温度为 28℃。分生孢子及菌落形态见图 A.2。

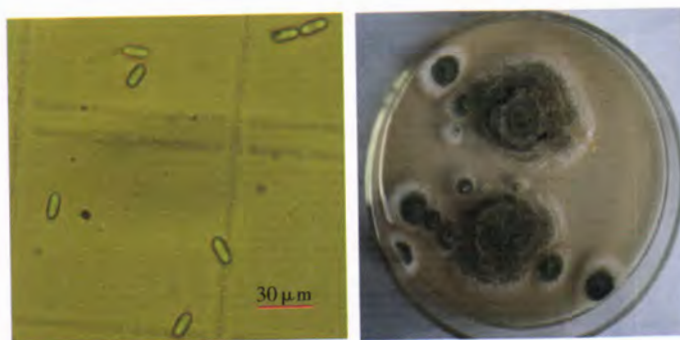


图 A.2 金龟子绿僵菌分生孢子及菌落形态



## 附录 B

(规范性附录)

## 玻璃纸片萌芽孢子显微计数法

## B.1 方法提要

在无菌操作条件下,将绿僵菌可湿性粉剂样品用吐温 80 溶液适当稀释后,均匀涂抹在玻璃纸片上;再放入 1/4 SDAY 平板,在 $(25\pm 1)^\circ\text{C}$ 下培养 24 h,取玻璃纸制片镜检计数萌芽与未萌芽的孢子总数,计算孢子萌芽百分率。以孢子萌芽长度大于孢子长度的一半视为萌芽。

## B.2 试剂和溶液

吐温 80。

0.1%吐温 80 溶液:(吐温 80 : 水)=1 : 1 000。

## B.3 仪器及设备

高速匀浆器:转速 $\geq 1\ 000\ \text{r/min}$ 。

光学显微镜:目镜 $\times$ 物镜=400 倍。

亮线血球计数板:25 $\times$ 16。

微量移液器:0.2 mL~1.0 mL。

手动计数器:1~9 999。

容量瓶:100 mL。

三角瓶:250 mL。

## B.4 测定步骤

B.4.1 将萨氏培养基(1/4SDAY)在无菌条件下倒入直径为 9 cm 培养皿中(每皿约 15 mL),待其凝固后,放入大小为 1 cm $\times$ 1 cm 的灭菌玻璃纸片。

B.4.2 将试样混合均匀后,称取约 0.01 g(精确至 0.001 g)试样 2 份,分别进行以下操作:

- 取 30 mL 吐温 80 配成约  $1.0\times 10^7$  个孢子/mL 孢子悬浮液,在高速匀浆器中混合均匀,再用接种环蘸取配制好的孢子悬浮液均匀涂于 3 片 1/4SDAY 平板内的玻璃纸片上;
- 在恒温箱内 $(25\pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 12 h~24 h,取 3 片玻璃纸片放于载玻片上;
- 用锥蓝染色液滴于玻璃纸上,约 2 min 后盖上盖玻片;
- 在光学显微镜下观察并计数萌芽的孢子数与未萌芽的孢子数;
- 计算其孢子萌芽百分率(以孢子萌芽长度大于孢子长度的一半视为萌芽);
- 每次计数至少 300 个孢子,3 次测定结果的平均值作为 1 份试样的测定结果。

## B.5 测定结果

试样的活孢率  $W_2$  按式(B.1)计算。

$$W_2 = \frac{N_1}{N_2} \times 100 \dots\dots\dots \text{(B.1)}$$

式中:

$W_2$  ——试样的活孢率,单位为百分率(%);

$N_1$  ——萌芽孢子数,单位为个;

$N_2$  ——检查孢子总数,单位为个。

#### B.6 允许差

2次平行测定结果之差应不大于20%,取算术平均值作为测定结果。通过肉眼观察萌芽孢子的数量来计算单位可湿性粉剂样品中的活孢子数量。

---