附件9

真菌微生物农药球孢白僵菌颗粒剂

（征求意见稿）

## 1 范围

本部分规定了真菌微生物农药球孢白僵菌颗粒剂术语和定义、要求、试验方法、产品的检验和验收规则，以及标志、标签、包装、贮运。

本标准适用于由球孢白僵菌母药或由生物发酵直接获得的球孢白僵菌产品与适当填料和必要助剂加工而成的颗粒型产品。

2 引用标准

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）或修订本均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究可使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T191包装储运图示标志

GB/T1601 农药pH值的测定方法

GB/T1604 商品农药验收规则

GB/T1605 商品农药采样方法

GB3796 农药包装通则

GB/T 8170 数值修约规则与极限数值的表示和判定

~~GB/T 21459.1 -2008 真菌农药母药产品标准编写规范~~

GB/T 30360-2013 颗粒状农药粉尘测定方法

GB/T 33810-2017农药堆密度测定方法

NY/T2295.1-2012 真菌微生物农药球孢白僵菌第1部分：球孢白僵菌母药

HG/T 2467.12-2003农药颗粒剂产品标准编写规范

3 术语和定义

NY/T 2295.1-2012中确定的以及下列术语和定义适用于本标准。

3.1

球孢白僵菌颗粒剂*Beauveria bassiana*Granules（GR）

由球孢白僵菌母药或由生物发酵直接获得的球孢白僵菌产品与适当填料和助剂加工而成的颗粒型产品。

3.2

含孢量 spore content

每单位球孢白僵菌颗粒剂样品中所含球孢白僵菌活孢子的数量。

3.3

活孢率 percentage of alivespores

指孢子的萌发率，即在一定培养条件下，萌发的球孢白僵菌孢子数占总孢子数的百分率。

3.4

含菌量 ingredient content

每单位球孢白僵菌颗粒剂样品中所含球孢白僵菌活菌总数量，包含菌丝、孢子等生物形态，一般用菌落形成单位表示。

3.5

菌落形成单位数 colony forming units (CFU)

以稀释涂布方式，使产品中分生孢子和菌丝等菌体尽可能单个地分散在营养琼脂培养基上，经培养形成单独菌落，即菌落形成单位（CFU），计算得到每单位质量菌剂所含的菌落形成单位数（CFUs）。

3.6

杂菌率 percentage of contaminating microorganisms

球孢白僵菌颗粒剂样品中除球孢白僵菌外，其他菌（真菌和细菌）的数量占总菌量的百分数。

3.7

堆密度bulk density，松密度 pour density，实密度 tap density

堆密度指球孢白僵菌颗粒剂的体积密度，包括松密度和实密度。松密度指没有任何外界物体压力下堆放入容器内的球孢白僵菌颗粒剂单位容积的质量。实密度指一定体积容器内装入的球孢白僵菌颗粒剂在一定条件下振动之后单位容积的质量。容积是指颗粒及颗粒间空隙所占的总容积。

3.8

粉尘dust

指粒径小于75μm的固体悬浮物。

4要求

4.1外观

通常为灰白色或棕褐色、干燥、自由流动的颗粒或微粒，无可见的外来物和硬块，基本无粉尘，适用于机器或人工撒施。

4.2指标

球孢白僵菌颗粒剂的质量控制项目指标应符合表1的要求。

表1球孢白僵菌颗粒剂质量控制项目指标

|  |  |
| --- | --- |
| **项目** | **指标** |
| 含菌量，孢子/g或CFU/g ≥ | 2×108 |
| 杂菌率，% ≤ | 5 |
| 干燥减量，% | 5-15 |
| pH值 | 6.0～8.0（或自定范围） |
| 松密度a，g/mL | （自定范围） |
| 实密度a，g/mL | （自定范围） |
| 粒度范围，（粒径上、下限之比不超过4:1），%≥ | 85 |
| 粉尘，mg/g ≤ | 30 (或自定范围) |
| 脱落率，% ≤ | 5 |
| 贮存稳定性b， % | 合格 |
| 注：a视需要，指标值据实际产品而定  b为备选的定期检测项目，3个月检测一次。贮存条件可根据具体产品自定，建议为15℃以下贮存的活菌量不低于标明值的80%。 | |

5试验方法

除非另有说明，试验方法所用的试剂级别均为化学纯以上，所述溶液均为水溶液。

5.1抽样

按GB/T 1605中“固体制剂采样”方法进行。用随机数表法确定抽样的包装件，最终抽样量应不少于300 g。采样时必须注意样品的代表性和避免污染，采样后应当日检验，或贮存于4℃冰箱中。

5.2菌种鉴别试验

在无菌操作条件下，将颗粒剂用水或适当溶液润湿、分散和稀释后，均匀涂布在培养基上，选择典型菌落作为代表菌株，按照NY/T 2295.1-2012中 5.2方法进行菌种鉴别。有效成分的特征描述参见NY/T 2295.1-2012的附录A。当对鉴别结果有争议或需要进行法律仲裁检验时，应到具有菌种鉴定资质的机构，将待检菌种与模式菌种进行对比，出具菌种鉴定报告，作为仲裁依据。

5.3含孢量的测定

采用显微计数与孢子萌发率检测结合方法，单位为孢子/g；也可采用平板菌落计数法，单位为CFU/g。

5.3.1 显微计数与孢子萌发率检测方法

5.3.1.1 方法提要

将试样润湿分散并稀释至适当倍数，在显微镜下用血球计数板计孢子数，然后计算孢子量。并通过平板培养法检测孢子萌发率，计算得到产品单位质量的活孢子数即含孢量。

5.3.1.2仪器及设备

显微镜（物镜×目镜400倍）；

电子天平（精度为0.01g）；

旋涡混合器（转速≥2000r/min，振幅≥5mm）

摇床；

粒度上限的标准筛；

血球计数板。

蒸汽灭菌器；

超净工作台；

恒温培养箱。

5.3.1.3 试验用试剂

吐温-80。蔗糖，酵母浸出粉，琼脂。

5.3.1.4试验步骤

（1）孢子计数

a)用电子天平准确称取产品试样，范围在4.00g，于250mL三角瓶中，加入0.1%吐温-80 36mL。3个样份重复，分别进行以下操作。

b)三角瓶中加玻璃珠并在摇床上振荡(建议120-160r/min不少于2h)，使颗粒完全松散。（如果必要，可另行制定使颗粒完全松散的操作方法）

c)用粒度上限的标准筛过滤去杂后，充分悬浮状态下从样液中部吸取10mL到试管中，在旋涡混合器上振荡1min。

d)振荡后静置5-10 sec，从中部吸取5mL，加蒸馏水5mL，并在旋涡混合器上振荡30sec。（如果产品标明的含孢量较高，可再稀释适当倍数。）

e) 用1/400×0.1mm精度的血球计数板计数，每次计5中格即80小格。点样及计数不少于3次。

（2）孢子萌发率检测

f)配制培养基：蔗糖4%，酵母浸出粉0.5%，琼脂粉2%。灭菌后凉至55℃左右，制成约1mm厚度的薄平板。

g)按上述a～d步骤称样、分散、稀释。

h)接种100μL到上述平板上，并用玻璃刮刀（或玻璃珠，直径4 mm 每皿10粒）涂布均匀，重复3个平板。

i)在25℃培养箱中培养16～24h，显微镜下观察平板，计孢子萌发数和不萌发数。每平板观察多个视野，观察孢子总述不少于300个。

5.3.1.5 计算

含孢量X1（孢子/g）按（1）式计算：

k×400N×103N1

X1= ×…………………（1）

0.1×80n N1+N2

式中：

X1—每克产品孢子数;

k—稀释倍数，按本操作过程为20；

N—计数总孢子数；

n—计数次数，本操作过程为3。

N1—萌发孢子个数总和；

N2—未萌发孢子个数总和。

5.3.2 平板菌落计数法

5.3.2.1仪器及设备

显微镜（物镜×目镜400倍）；

电子天平（精度为0.01g）；

旋涡混合器（转速≥2000r/min，振幅≥5mm）

摇床；

粒度上限的标准筛；

血球计数板。

蒸汽灭菌器；

超净工作台；

恒温培养箱。

5.3.2.2 试验用试剂

吐温-80。马铃薯葡萄糖琼脂培养基（PDA）。

5.3.2.3 试验步骤

a）按上述5.3.1.4中a～d步骤称样、分散、稀释，得到20倍的样品稀释液标记为0号。然后参照表2按1:9第次稀释成梯度浓度：

表2梯度稀释系列

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 编号 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 灭菌水体积，mL | 10 | 9.0 | 9.0 | 9.0 | 9.0 | 9.0 | 9.0 |
| 上一稀释浓度的体积，mL | -- | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| 累计稀释倍数 | 2×10 | 2×102 | 2×103 | 2×104 | 2×105 | 2×106 | 2×107 |

b) 将上述第3、4、5号的稀释液分别吸取100μL，接种于PDA平板上，并用曲玻棒均匀涂布在整个平板表面，每个稀释度重复5个平板。

c)在25℃培养箱中培养36-48h后，选择适宜的稀释度，取菌落数在20-200个为宜，进行计数。

**5.3.2.4 计算**

按照NY/T2295.1中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。

∑C

X2 = ×d ……………………………… (2)

n×0.1

式中：

X2—单位样品中的菌落数(CFU/g)；

∑C —平板上(适宜范围菌落数的平板)菌落数之和；

n —适宜稀释度的调查平板数；

d —适宜稀释度的稀释倍数。

例如，第4号稀释度（即2×105倍）3个平板的菌落数(CFU)分别为99、100、101，则该颗粒剂的含孢量（CFU/g）为：

99+100+101

X2 = ×2×105= 2.0×108

3×0.1

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(2’)计算。

∑C

X2=×d……………………(2’)

(1×n1+0.1×n2)×0.1

式中：

X2—单位样品中的菌落数(CFU/g)；

∑C —平板上(含适宜范围菌落数的平板)菌落数之和；

n1 —第一个适宜稀释度的调查平板数；

n2 —第二个适宜稀释度的调查平板数；

d —第一个稀释度的稀释倍数。

例如，第一稀释度(2×105倍)的菌落数（CFU）为182、186、184，第二稀释度(2×106倍)的菌落数（CFU)为25、26、27，则根据式（2）计算，

（182+186+184+25+26+27）

X2 = ×2 ×105= 3.82×108

(1×3+0.1×3) ×0.1

5.4杂菌率的测定

称样、分散、稀释按上述5.3.1.4中a～d步骤。测定方法按照NY/T2295.1-2012中5.4所述。

5.5干燥减量的测定

按照NY/T2295.1-2012中5.7方法进行测定。

5.6 松密度的测定

按照GB/T 33810-2017中松密度的测定和计算方法进行。

5.7 实密度的测定

按照GB/T 33810-2017中实密度的测定和计算方法进行。

5.8 粒度的测定

5.8.1 方法提要

按照HG/T 2467-12 2003中粒度范围的测定方法进行。

5.8.2 仪器及设备

符合产品粒度上、下限的标准筛1和标准筛2，振筛机（150次/min）。

5.8.3 试验步骤

将标准筛叠装，标准筛1在上，标准筛2在下，下面装接收盒，将组合好的标准筛固定在振筛机上。准确称取试样100 g（精确至0.01 g），置于标准筛1上，加盖密封，启动振筛机振荡5 min，收集标准筛2上组分，称重。

5.8.4 计算

试样的粒度X3（%）按式（3）计算:

m1

X3= ——— × 100% …………………………（3）

m0

式中 m0—试样的质量（g）；m1—标准筛2中收集组分的质量（g）。

5.9粉尘的测定

按照GB/T 30360-2013进行。

5.10脱落率的测定

5.10.1方法提要

采用振动摩擦法检测。

5.10.2 仪器与设备

符合产品粒度下限的标准筛，振筛机（150次/min）、玻璃珠10 个（Φ5 mm)。

5.10.3 试验步骤

准确称取已测过粒度的试样50 g（精确至0.01 g），置于标准筛上，同时放置10个玻璃珠，装接收盒，加盖密封，移至振筛机中固定，振荡5 min，收集接收盒中组分，称重。

5.10.4 计算

破损率X4（%）按式（4）计算:

m2

X4 = ——— × 100% ……………………………………（4）

m0

式中*m0*—试样的质量（g）；*m2*—接收盒中组分的质量（g）。

5.11pH值的测定

按照GB/T1601进行。

5.12贮存稳定性

在一定温度（一般 4℃～30℃）下密封包装，避光（或按规定条件）贮存，按 3 个月检测一次，对活菌数进行测定，计算其占标明值的百分率，要求不低于80%。检测方法按NY/T2295.1中5.11进行。

6产品检验与验收

应符合GB/T 1604的规定，极限值处理应按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个月内产品活菌量不低于标明值的70%。