



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

淡紫拟青霉母药

Purpureocillium lilacinum Technical concentrate

（征求意见稿）

（本稿完成日期：2025.10）

（在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上）

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会

发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

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专利的责任。

本文件由农业农村部种植业管理司提出。

本文件由全国农药标准化技术委员会（SAC/TC 133）归口。

本文件起草单位：。

本文件主要起草人：

淡紫拟青霉菌母药

警告：使用本文件的人员应有实验室工作的实践经验。本文件并未指出所有的安全问题。使用者有责任采取适当的安全和健康措施。

1 范围

本文件规定了淡紫拟青霉菌母药的技术要求、检验规则、验收和质量保证期以及标志、标签、包装、储运，描述了淡紫拟青霉菌母药的试验方法。

本文件适用于淡紫拟青霉菌母药产品的质量控制。

注：淡紫拟青霉拉丁名称、分类地位和形态学特征等描述参见附录A。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 1601 农药 pH 值的测定方法

GB/T 1604 商品农药验收规则

GB/T 1605—2001 商品农药的采样方法

GB 3796—2018 农药包装通则

GB 20813—2006 农药产品标签通则

GB/T 30361 农药干燥减量的测定方法

GB/T 37874-2019 核酸提取纯化方法评价通则

3 术语、定义和缩略语

下列文件的术语和定义适用于本文件。

3.1 术语和定义

3.1.1

孢子 spore

真菌的繁殖体。

注：其为真菌农药中最常见的孢子类型。

3.1.2

分生孢子 conidia

GB/T 33031—XXXX

由分生孢子梗上产孢细胞（有顶生/侧生、串生/簇生、形状大小多种、单胞/多胞）产生的无色或有色的无性繁殖细胞。

注：真菌农药单位质量或体积中形态为活孢子的数量。

3.1.3

含菌量 microbial density

淡紫拟青霉菌母药单位质量中所含有效成分形态为活菌落体的数量。

3.1.4

含孢量 spore content

每单位质量淡紫拟青霉菌母药样品中所含淡紫拟青霉活孢子的数量。

3.1.5

活孢率 percentage of living spores

即孢子萌芽率，在一定培养条件下，萌发（孢子萌芽长度大于孢子长度一半的视为）生长的孢子数占总孢子数的百分率。

3.1.6

菌落形成单位 colony forming units (CFU)

淡紫拟青霉菌母药稀释后得到的菌液通过涂布的方法，让其单个分生孢子分散在马铃薯葡萄糖琼脂培养基上，待培养后，每个活孢子形成一个菌落，即一个菌落形成单位（CFU）。

3.1.7

杂菌率 rate of microbial contaminants

母药中除淡紫拟青霉外，其它菌（如细菌和真菌等）占总菌量的百分率。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ITS：内转录间隔区（Internal Transcribed Spacer）

4 技术要求

4.1 外观

淡紫色均匀疏松的粉末。

4.2 技术指标

淡紫拟青霉菌母药应符合表1要求。

表 1 淡紫拟青霉母药技术指标

项 目	指 标
淡紫拟青霉含菌量 ^a /(CFU/g)	≥标示值 ^b
杂菌率/%	≤5.0
干燥减量/%	≤6.0
pH 值	5.0~8.0
^a 若采用含孢量，活孢率≥90%， ^b 标示值可以是 200 亿 CFU/g、100 亿 CFU/g	

5 试验方法

5.1 一般规定

本文件所用试剂和水在没有注明其他要求时，均指生化试剂和蒸馏水。

5.2 取样

淡紫拟青霉母药按 GB/T 1605—2001中5.3.1进行。用随机数表法确定取样的包装件数，最终取样量应不少于100 g。

5.3 菌种鉴别

菌种鉴别采用形态学特征观察和分子鉴定相结合的方式进行。
根据形态学特征，观察菌落形态、颜色等特征。用显微镜观察菌丝体、产孢梗和分生孢子，排列方式，以及区别于其它真菌的形态特征。
分子鉴定则采用ITS基因进行检测。
有效成分的形态学特征、鉴别方法参见附录A。

5.4 淡紫拟青霉含量

5.4.1 含菌量（仲裁法）

5.4.1.1 方法提要

采用菌落形成单位法。将母药润湿、稀释后，均匀涂布在培养基平板上，待各孢子形成菌落后，统计菌落总数，以单位样品（g）中菌落形成单位数（CFU）表示活孢数（CFU/g）。

5.4.1.2 试剂、培养基和溶液

5.4.1.2.1 水。

5.4.1.2.2 吐温-80。

5.4.1.2.3 马铃薯葡萄糖琼脂（PDA）培养基（g/L）：马铃薯浸出粉 12.0 g，葡萄糖 20.0 g，琼脂 15.0 g，蒸馏水 1000 mL，浸泡 3 min~5 min，加热煮沸使琼脂溶解，补充水至 1L，分装后 121℃ 高压灭菌 15 min。

5.4.1.2.4 PDA 平板制备：5.4.1.2.3 培养基冷却至约 50℃，倾倒入直径 90 mm 平板，厚度不小于 5 mm，静置待凝固，琼脂表面适当干燥后，倒置，以免产生冷凝水污染培养基。

5.4.1.2.5 0.05%吐温-80 水溶液：取 1L 水，用移液器移入 0.5 mL 吐温-80，超声振荡 10 min，分装后，于 121 ℃高压灭菌 30 min，冷却后备用。

5.4.1.3 仪器

5.4.1.3.1 天平：精度为 0.0001g。

5.4.1.3.2 移液器：20 μL~200 μL，1 mL~10 mL。

5.4.1.3.3 高压蒸汽灭菌器。

5.4.1.3.4 振荡器。

5.4.1.3.5 超净工作台。

5.4.1.3.6 恒温培养箱。

5.4.1.4 试验步骤

5.4.1.4.1 试样处理

样品搅拌均匀，准确称取3.0 g样品（精确至0.01g），加入装有10粒无菌玻璃珠的三角瓶中，移入 27.0 mL的0.05%吐温-80水溶液，浸泡30 min后，以200 r/min 振荡30 min，得到稀释10倍的样品溶液，标记为0号。然后参照表2（以稀释8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	7	8
0.05%吐温-80 水溶液体积, mL	27.0	9.0	9.0	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	1.0	1.0
累计稀释倍数	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹

5.4.1.5 涂板计数

按母药规格选择适宜梯度稀释液，吸取100 μL于PDA平板上，用无菌涂布棒均匀涂布在整个平板表面，每一稀释度做3次重复。涂布至少三个稀释度，涵盖菌落数大于200 CFU、30 CFU~200 CFU及小于30 CFU稀释度；同时取100 μL的0.05%吐温-80水溶液涂布于PDA培养基平板上，做3次重复，作为空白对照。

上述平板倒置于（28±2）℃下培养48 h~72 h后，选择适宜的稀释度，取菌落数在30 CFU~200 CFU之间的平板进行计数。

5.4.1.6 计算

若只有一个稀释度平板上的菌落数在适宜计数范围内，含菌量 N_1 按式（1）计算：

$$N_1 = \frac{\sum C}{3 \times 0.1} \times d \dots\dots\dots (1)$$

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：

$$N_1 = \frac{\sum C}{(1 \times 3 + 0.1 \times 3) \times 0.1} \times d \dots\dots\dots (2)$$

式中：

N_1 ——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，CFU；

3 ——每个稀释度调查平板数；

d ——连续两个稀释度中的前一个稀释度；

0.1——涂布平板使用的稀释液的体积，mL。

5.4.1.7 菌落数报告

按GB 4789.2-2022中7.2进行。

- 1) 菌落总数小于 100 CFU 时,按“四舍五人”原则修约,以整数报告。
- 2) 菌落总数大于或等于 100 CFU 时,第三位数字采用“四舍五人”原则修约后,采用两位有效数字,后面用 0 代替位数;也可用 10 的指数形式来表示,按“四舍五人”原则修约后,采用两位有效数字。
- 3) 若空自对照上有菌落生长,则此次检验结果无效。

5.4.1.8 允许差

两次平行测定结果之相对差应不大于10%，取其算术平均值作为测定结果。

5.4.2 含孢量

5.4.2.1 总孢子数

5.4.2.1.1 方法提要

显微镜血球计数板计数法。将孢子样品加入吐温-80溶液中，制成孢子悬浮液，并稀释至适当倍数后，在光学显微镜下用血球计数板直接计数孢子数，然后计算单位质量试样中的含孢量。

5.4.2.1.2 试剂、培养基和溶液

5.4.2.1.2.1 水。

5.4.2.1.2.2 吐温-80。

5.4.2.1.2.3 稀释液（0.05%吐温-80 水溶液）：取 1L 水，用移液器移入 0.5 mL 吐温-80，超声振荡 10 min，分装后，于 121 °C 高压灭菌 30 min，冷却后备用。

5.4.2.1.3 仪器

5.4.2.1.3.1 分析天平：精度为 0.0001 g。

5.4.2.1.3.2 移液器:20 μL~200 μL，1 mL~10 mL。

5.4.2.1.3.3 光学显微镜：目镜×物镜=400×。

5.4.2.1.3.4 涡旋混合仪。

5.4.2.1.3.5 超净工作台。

5.4.2.1.3.6 Thoma(汤麦氏)血球计数板：25×16 规格。

5.4.2.1.3.7 压力灭菌器。

5.4.2.1.3.8 恒温振荡器。

5.4.2.1.4 试验步骤

5.4.2.1.4.1 试样处理

样品混匀，称取1.0 g（精确至0.0001g）试样，加入装有10粒无菌玻璃珠的三角瓶中，加入70 mL的稀释液中浸泡润湿30 min后，以200 r/min 振荡30 min，然后全部转移至100 mL容量瓶中，并用稀释液分两次清洗三角瓶，清洗液全部转移至上述容量瓶中，用稀释液定容至刻度，得到稀释100倍的样品孢子悬浮液，标记为A液。

用移液器吸取1 mL A液置于100 mL容量瓶中，用稀释液稀释至刻度，混合均匀。按此方法进行梯度稀释（稀释至血球计数板5个中格孢子数为100 个~300 个）并用血球计数板在显微镜下观察计数。

5.4.2.1.4.2 点板

用玻璃棒蘸1小滴水涂抹在血球计数板计数区两侧的突条上，盖上盖玻片使之贴紧固定；用可调移液器吸取孢子悬浮液，在盖玻片边缘滴入，使液体沿边缘渗入盖玻片下，刚好充满盖玻片与计数板计数区域之间，应无气泡且计数区域四周凹槽无液体，如有多余液体用吸水纸吸去。

5.4.2.1.4.3 计数

待孢子静止后用显微镜观察计数，在血球计数板的中心大方格区（参考图 1），采取对角线 5 点（四周及中央的 5 个中格）计数的方法，计上下区域各 5 个中方格（16 个小方格/中方格），即双线范围内 160 小方格内孢子数。计数时，对于中方格四周如有压线的孢子，计上双线不计下双线，计左双线不计右双线的孢子数。每份试样点样计数 2 次。每个试样重复测定两次。

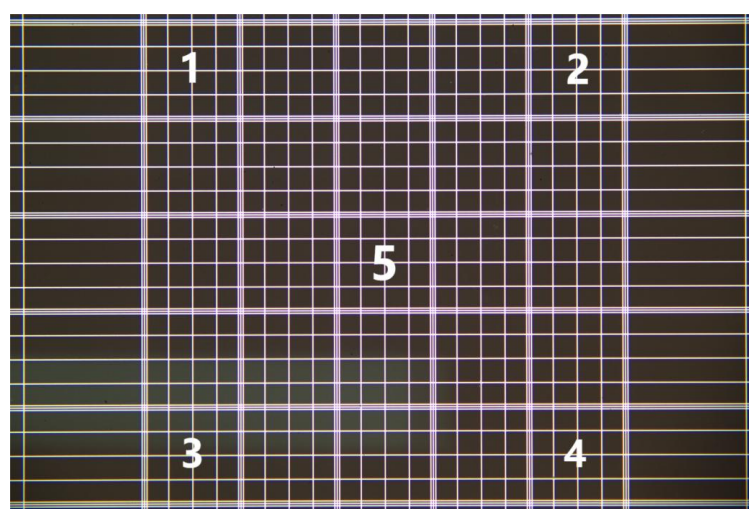


图 1 血球计数板一个计数区镜下示意图（100×）

5.4.2.1.4.4 计算

试样中的总孢子量 W_1 按公式 (3) 计算

$$W_1 = \frac{K_1 \times 400 \times N_2}{160 \times 2 \times m_1 \times 0.1 \times 10^{-3}} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

W_1 —试样的总孢子量, 单位为个每克 (个/g);

K_1 —稀释倍数;

N_2 —2 次计数的总孢子数 (上下区域各 5 个中方格中计数的总孢子数);

400—血球计数板计数室小方格总数 ($25 \times 16 = 400$);

160—血球计数板上下区域各 5 个中方格的小方格的总数 ($5 \times 16 \times 2 = 160$);

2—计数次数;

m_1 —试样质量, 单位为克 (g);

0.1—血球计数板计数室体积, 单位为立方毫米 (mm^3);

10^{-3} —立方毫米换算为立方厘米的倍数。

5.4.2.1.4.5 允许差

两次平行测定结果的允许差不应超过10%, 取其算数平均值作为测定结果。

5.4.2.2 活孢率

5.4.2.2.1 方法提要

将孢子悬浮液均匀涂在放有玻璃纸的PDA培养基上, 培养后制片镜检。以孢子萌芽长度大于孢子长度的一半视为萌芽, 计数萌芽与未萌芽的孢子总数, 计算活孢率。

5.4.2.2.2 试剂、培养基和溶液

5.4.2.2.2.1 乳酸酚棉蓝染色液或锥蓝染色液。

5.4.2.2.2.2 玻璃纸片 (1cm×1cm): 经 160℃ 高温灭菌 2 h。

5.4.2.2.2.3 其余同 5.4.1.2。

5.4.2.2.3 仪器

5.4.2.2.3.1 同 5.4.1.3。

5.4.2.2.4 试验步骤

在超净工作台内, 用无菌镊子将玻璃纸片放入PDA培养基上, 静待玻璃纸片吸收琼脂上的水分铺平, 取5.4.3.1中配置好的含孢子约 10^6 个/mL~ 10^7 个/mL的孢子悬浮液, 均匀涂于3片玻璃纸片上, 然后放入 (28 ± 2) ℃恒温箱内培养18h~24h。

5.4.2.2.5 计数

用尖镊子分别取下 3 片玻璃纸片放于载玻片上, 吸取一滴乳酸酚棉蓝染色液滴于玻璃纸上, 约 3min 后盖上盖玻片 (尽量避免气泡存在)。

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。每个纸片计数至少 300 个孢子。

5.4.2.2.6 计算

试样的活孢率 W_3 按公式 (4) 计算

$$W_3 = \frac{N_3}{N_3 + N_4} \times 100 \dots\dots\dots (4)$$

式中:

W_3 —试样的活孢率, 单位为百分率 (%);

N_3 —萌发孢子个数总和, 单位为个;

N_4 —未萌发孢子个数总和, 单位为个。

5.4.2.3 含孢量

试样中含孢量 W_4 按公式 (5) 计算:

$$W_4 = W_2 \times W_3 \dots\dots\dots (5)$$

式中:

W_4 —试样的含孢量, 单位为个每克 (个/g);

W_2 —试样的总孢子量, 单位为个每克 (个/g);

W_3 —试样的活孢率, 单位为百分率 (%).

5.5 杂菌率

5.5.1 方法提要

采用平板菌落计数法。按 5.4.1 进行, 选择同有效成分计数相同稀释度的稀释液涂布在培养基平板上, 统计细菌杂菌、真菌杂菌菌落数, 结合淡紫拟青霉菌落数, 计算杂菌率。

5.5.2 试剂、培养基和溶液

5.5.2.1 营养琼脂 (NA) 培养基 (g/L): 蛋白胨 10 g, 牛肉浸粉 3 g, 氯化钠 5 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1000 mL, 浸泡 3 min~5min 后, 加热煮沸使琼脂溶解, 补充水至 1L, 摇匀, 分装后, 121℃ 高压蒸汽灭菌 15 min。

5.5.2.2 NA 平板制备: 5.5.2.1 培养基冷却至约 50℃, 倾倒入直径 90 mm 平板, 厚度不小于 3 mm, 静置待凝固, 且琼脂表面适当干燥后, 倒置, 以免产生冷凝水污染培养基。于 (30±2)℃ 培养 (24±2) h, 验证无微生物污染后方可使用。

5.5.2.3 其余同 5.4.1.2。

5.5.3 仪器

5.5.3.1 同 5.4.1.3。

5.5.4 试验步骤

5.5.4.1 细菌杂菌

按 5.4.1 含菌量测定进行, 选择 5.4.1 中涂布平板的相同稀释溶液, 取 100 μL 涂布在 NA 平板上,

每一稀释度做3次重复，同时取100 μL的0.05%吐温-80水溶液涂布于NA平板上，做3次重复，做为空白对照。然后置于（30±2）℃下培养24 h后，进行细菌计数。

5.5.4.2 真菌杂菌

与5.4.1含菌量测定同时进行。

5.5.4.3 杂菌计数

细菌杂菌，选择5.4.1中淡紫拟青霉菌菌落在30 CFU~200 CFU的平板相同稀释度的稀释液涂布NA平板，计数菌落数。

真菌杂菌，选择5.4.1中淡紫拟青霉菌菌落在30 CFU~200 CFU平板，计数与紫拟青霉菌落形态不同的菌落。

若5.4.1测定中有两个稀释度的菌落数在30 CFU~200 CFU，杂菌数选择第一稀释度的平板进行计数。

5.5.4.4 计算

杂菌率 W_5 按公式（6）计算：

$$W_5 = \frac{N_5 + N_6}{N_5 + N_6 + N_7} \times 100 \dots\dots\dots (6)$$

式中：

W_5 ——试样中的杂菌率，%；

N_5 ——细菌杂菌菌落数总和，CFU；

N_6 ——真菌杂菌菌落数总和，CFU；

N_7 ——淡紫拟青霉菌菌落数总和，CFU。

5.6 干燥减量

按GB/T 30361进行。

5.7 pH值

按GB/T 1601进行。

6 检验规则

6.1 出厂检验

每批产品均应做出厂检验，经检验合格签发合格证后，方可出厂。出厂检验项目为第4章中外观、淡紫拟青霉含量、杂菌率、干燥减量、pH值。

6.2 型式检验

型式检验项目为第4章中的全部项目，在正常连续生产情况下，每3个月至少进行一次。有下述情况之一，应进行型式检验：

- a) 原料有较大改变，可能影响产品质量时；
- b) 生产地址、生产设备或生产工艺有较大改变，可能影响产品质量时；
- c) 停产后又恢复生产时；

d) 质量监管机构提出型式检验要求时。

6.3 判定规则

按 GB/T 8170-2008 中4.3.3判定检验结果是否符合本文件要求。

按第4章技术要求对产品进行出厂检验和型式检验，任一项目不符合指标要求判为该批次产品不合格。

7 验收和质量保证期

7.1 验收

应符合 GB/T 1604的规定。

7.2 质量保证期

在8.2的储运条件下，淡紫拟青霉母药的质量保证期从生产日期算起为2年。质量保证期内，淡紫拟青霉母药含量应不低于出厂检验值的70%，且各项指标仍符合本文件要求。

8 标志、标签、包装、储运

8.1 标志、标签、包装

淡紫拟青霉母药的标志、标签、包装应符合 GB 3796 的规定；淡紫拟青霉母药采用聚酯瓶、聚乙烯瓶包装或高阻隔瓶包装，并应有铝箔封口，每瓶的净含量可以为 50 g、100 g、250 g、500 g、1 kg 等，也可采取更大包装；外包装可用纸箱、瓦楞纸板箱，每箱的净含量不应超过 15 kg，也可根据用户要求或订货协议，采用其他形式的包装，但需符合 GB 3796 的规定。

8.2 储运

淡紫拟青霉母药包装件应储存在通风、阴凉、干燥的库房中，严防日晒；储运时，产品对温度敏感，要关注储运时的温度变化，要严防潮湿、日晒和高温，不得与食物、种子、饲料混放，避免与皮肤、眼睛接触，防止由口鼻吸入。

附录 A (资料性)

A.1 淡紫拟青霉的拉丁学名、分类地位和形态学特征参数

- 中文通用名：淡紫拟青霉；
- 其它名称：淡紫紫孢菌、淡紫紫霉；
- 当前拉丁学名：*Purpureocillium lilacinum*；
- 曾用拉丁学名：*Paecilomyces lilacinum*、*Paecilomyces lilacinus*；
- 分类地位：真菌（*Fungi*）；子囊菌门（*Ascomycota*）；粪壳菌纲（*Sordariomycetes*）；肉座菌目（*Hypocreales*）；蛇形虫草科（*Ophiocordycipitaceae*）；紫霉属（*Purpureocillium*）。
- 菌落形态学特征：菌落初期（3d）为白色，质地绒毛状至絮状，产孢后（7d）逐渐变成浅粉红色，培养14天后，菌落呈紫色，圆形、隆起，表面质地粉状、致密，边缘整齐，可出现环状褶皱，菌落背面淡黄色至黄褐色。
- 分生孢子：为单细胞，椭圆形至纺锤形，呈链状，多数约 $2\ \mu\text{m}\sim 4\ \mu\text{m}$ 。
- 分生孢子梗：直立生长，多数单生于菌丝上，梗上簇生梗基和产孢瓶梗。
- 瓶梗：瓶状，顶端长而细，成轮状分枝。
- 有效成分主要存在形式：分生孢子。
- 生物活性：杀线虫。

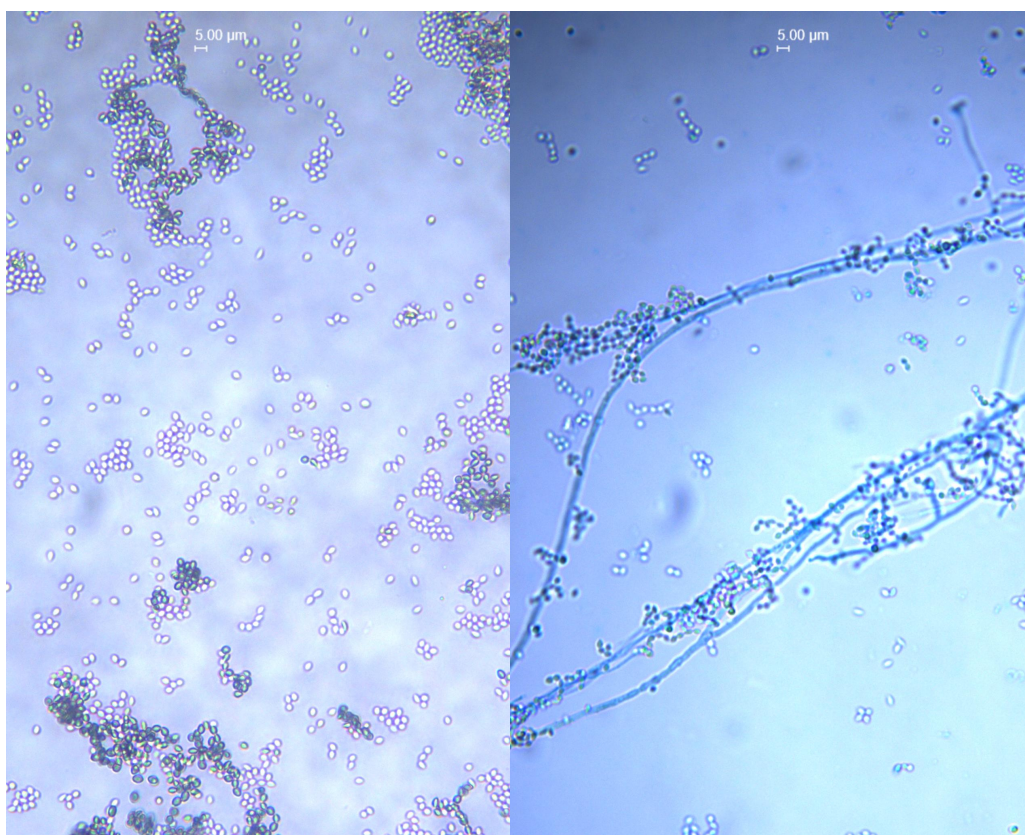
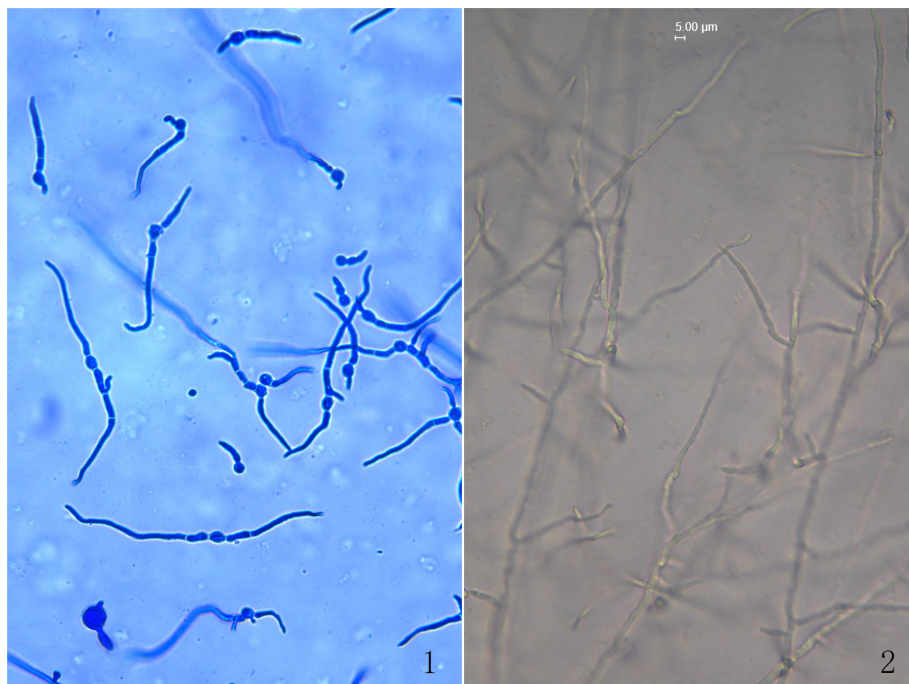


图 A.1 淡紫拟青霉孢子形态（14d，400×）



- 1——孢子萌发。
2——菌丝形态。

图 A.2 淡紫拟青霉孢子萌发形态及菌丝形态（400×）

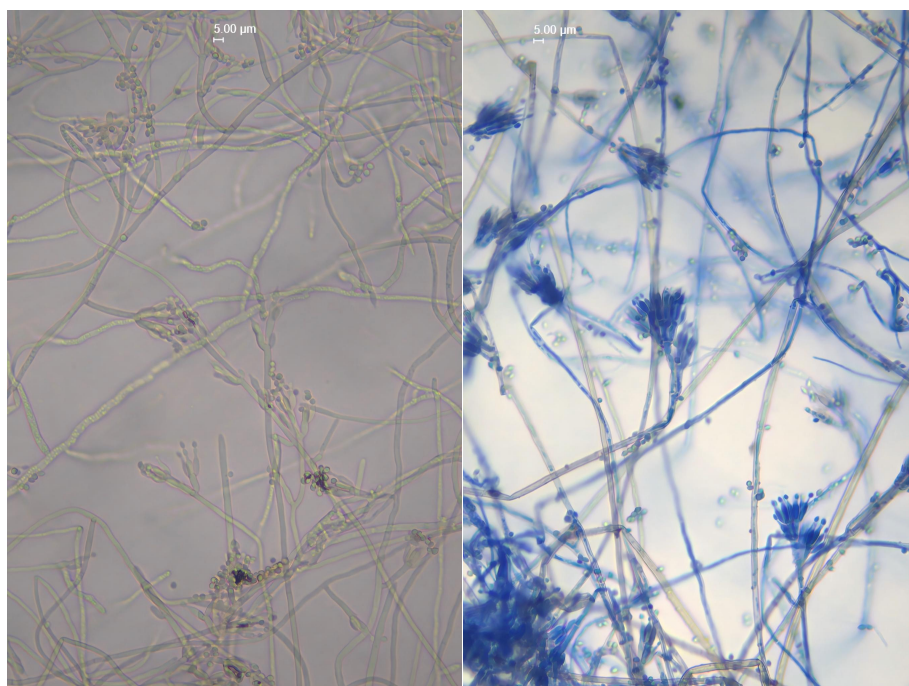


图 A.3 淡紫拟青霉分生孢子梗形态特征图（400×）

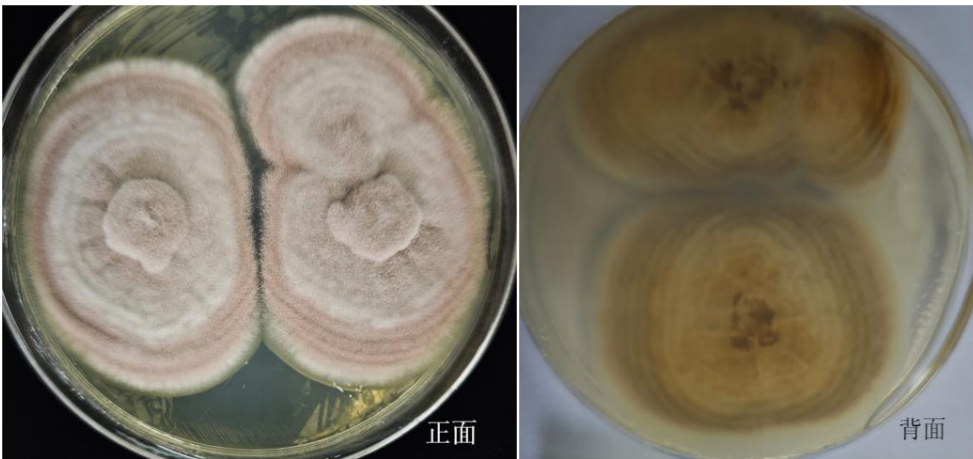


图 A.4 淡紫拟青霉 PDA 培养基菌落图（28℃，14d）

A. 2 菌种基因序列鉴定法

A. 2. 1 淡紫拟青霉基因组DNA提取

采用真菌基因组DNA提取试剂盒提取淡紫拟青霉基因组DNA。DNA的纯度应符合GB/T 37874的要求，DNA的浓度和总量应符合文库构建的相关要求。提取的基因组DNA于-20℃保存，备用。

A. 2. 2 PCR扩增引物

表 A.1 PCR 扩增引物

基因名称	引物	目的片段长度
ITS	ITS1:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' ITS4-R: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	600 bp

A. 2. 3 测序和比对

扩增产物进行测序，登录 NCBI 利用 BLAST 对所测菌株的 ITS 序列与参考序列 NR_165946.1 进行比对，一致性大于 98%，确定试样为淡紫拟青霉。

淡紫拟青霉基因序列

NCBI Reference Sequence: NR_165946.1

```
1 tctccgttg tgaaccagc gagggatcat taccagtta tacaactccc aaaccactg
61 tgaaccttac ctcaattgcc tcggcgggaa cgccccggcc gcctgcccc gcgccggcgc
121 cggaccagg cgccccggc agggacccca aactctcttg cattacgccc agcggggcgga
181 attctctc tgagttgcac aagcaaaaac aaatgaatca aaactttcaa caacggatct
241 cttggttctg gcatcgatga agaacgcagc gaaatgcgat aagtaatgtg aattgcagaa
301 ttcagtgaat catcgaaatc ttgaacgcac attgogcccc ccagcattct ggcgggcatg
361 cctgttcgag cgtcatttca accctcgagc cccccgggg gcctcggtgt tgggggacgg
421 cacaccagcc gccccgaaa tgcagtggcg accccggcgc agcctccct gcgtagtagc
481 acacacctcg caccggagcg cggaggcggc cagccgtaa aacgcccaac ttcttagag
541 ttgacctcgg atcaggtagg aataccgct gaacttaa
```