

引用格式:杨肖,葛喜珍,刘国新,等.绿僵菌与小檗碱复配制备水分散粒剂[J].北京化工大学学报(自然科学版),2022,49(1):79-89.

YANG Xiao, GE XiZhen, LIU GuoXin, et al. Preparation of water-dispersible granules by combination of *Metarhizium anisopliae* and berberine[J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science), 2022, 49(1): 79-89.

## 绿僵菌与小檗碱复配制备水分散粒剂

杨肖<sup>1</sup> 葛喜珍<sup>2</sup> 刘国新<sup>3</sup> 田平芳<sup>1\*</sup>

(1.北京化工大学 生命科学与技术学院,北京 100029; 2.北京联合大学 生物化学工程学院,北京 100023;

3.河北省化工研究院有限公司,石家庄 050031)

**摘要:**将金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)和小檗碱复配为水分散粒剂,可以起到既抗虫又抗病的双重效果,并且可降低田间施药的成本。测得小檗碱对绿僵菌的有效中浓度(EC<sub>50</sub>)为 47.2 mg/mL,表明小檗碱对绿僵菌没有明显的抑制作用;根据以往绿僵菌的田间试验及小檗碱的抗真菌实验,确定小檗碱的最终添加量为 3% (质量分数)。在单因素试验的基础上,利用响应面法确定水分散粒剂的配方为:25% 绿僵菌孢子粉、3% 小檗碱、3% 乳化剂 NP-10(润湿剂)、2.1% 亚甲基双甲基萘磺酸钠(分散剂)、5.3% 木质素磺酸钙(分散剂)、18% 海藻酸钠(崩解剂)、1.7% 羧甲基纤维素钠(黏结剂),用硅藻土(载体)补足 100% (均为各成分占制剂的质量分数)。按照此配方在造粒机中制备了水分散粒剂,质量检测结果表明:所制备的水分散粒剂的崩解时间为 174 s,孢子萌发率为 85.4%,孢子悬浮率为 86.34%,含水量为 1.88%,杂菌率为 2.01%,符合相关行业标准。

**关键词:**小檗碱;绿僵菌;水分散粒剂;崩解时间;生物农药

**中图分类号:** R944.9 **DOI:** 10.13543/j.bhxbzr.2022.01.010

## 引 言

金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)是广谱昆虫病原菌<sup>[1]</sup>,可感染 200 多个种属的昆虫,其作为生物杀虫剂用于防治有害昆虫已有百年历史<sup>[2-4]</sup>。与化学农药相比,生物杀虫剂具有毒性小、专一性强、环境友好等优点,逐渐成为今后农业杀虫剂发展的趋势,具有广阔的应用前景<sup>[5]</sup>。近 40 年来,已经有 80 多种绿僵菌农药进行了登记,其制备工艺取得重要进展,不仅改进了传统粉状剂型,而且产生了许多能较好地适应环境变化的新剂型,例如油乳剂<sup>[6-7]</sup>、水剂<sup>[8]</sup>、颗粒剂<sup>[9]</sup>、乳粉剂<sup>[10]</sup>、悬乳剂<sup>[11]</sup>和微胶囊剂<sup>[12]</sup>等剂型。雷仲仁等<sup>[7]</sup>用绿僵菌 LA06 油剂防治东亚飞蝗(*Locusta migratoria manilensis*),

当以  $V(\text{大豆油}):V(\text{煤油})=3:7$  配制油剂时,第 18 天虫口减退率达 81.1%,虽然防治效果好,但其破坏环境且成本偏高。杨华等<sup>[12]</sup>用绿僵菌微胶囊剂对林间黄脊竹蝗(*Ceracris kiangsu*)跳蝻进行防治,防治效果达 92.59%,但微胶囊剂的制备工艺复杂且成本较高。水分散粒剂(water-dispersible granule, WG)是遇水即迅速崩解并分散为悬液的粒状制剂<sup>[13-14]</sup>。与传统剂型相比,水分散粒剂具有粉尘少、成分均匀、流动性强、对环境友好等优点,并且对运输和包装的要求低。此外,水分散粒剂可兼容高浓度药物,许多不适合制备成粉剂或乳油的有效成分可采用该剂型。

小檗碱(berberine)又称黄连素,是从黄连(*Coptis chinensis*)、黄柏(*Phellodendron chinense*)等药用植物中提取的一种季铵生物碱<sup>[15]</sup>。小檗碱在传统临床上用于治疗腹泻。此外,小檗碱还能有效抑制许多植物病原菌,例如白粉病菌等,因此作为天然农药得到了推广应用<sup>[16-19]</sup>。

早在上世纪 70、80 年代,许多化学农药出现抗药性,农药复配成为研发热点<sup>[20]</sup>。随着生物农药的

收稿日期:2021-10-15

基金项目:河北省重点研发计划项目(19226509D/20322501D);北京市自然科学基金(KZ201911417049)

第一作者:女,1996 年生,硕士生

\*通信联系人

E-mail: tianpf@mail.buct.edu.cn

不断出现,复配已不局限于化学农药,而是拓展到了生物农药,甚至是将化学农药和生物农药进行复配<sup>[21]</sup>。本课题组前期研究发现小檗碱在试验浓度下对很多真菌病原具有较强的抑制作用,而在相同浓度下对绿僵菌的生长没有明显抑制作用<sup>[22]</sup>。为了开发既抗虫又抗病的双效制剂并降低田间施药成本,本文将绿僵菌与小檗碱复配,制备了水分散粒剂。测定了小檗碱对绿僵菌的有效中浓度( $EC_{50}$ ),通过单因素试验及响应面法分析筛选合适的载体以及润湿剂、分散剂、黏结剂、崩解剂等助剂。以筛选的配方制备的水分散粒剂,其质量检测结果符合相关行业标准。

## 1 实验部分

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 供试菌种和小檗碱

金龟子绿僵菌 CQMa421 孢子粉(含水量 2.39%,孢子萌发率 90.02%,含孢量  $4.26 \times 10^{10}$  cfu/g,杂菌率 1.32%),重庆聚立信生物工程有限公司;小檗碱(含量 97%),陕西慧科植物开发有限公司。

#### 1.1.2 供试载体和助剂

载体 硅藻土、滑石粉、高岭土、白炭黑,均为药用级,上海麦克林生化科技有限公司。

润湿剂 十二烷基硫酸钠(SDS)(分析纯)、十二烷基磺酸钠(SDBS)(分析纯),上海麦克林生化科技有限公司;拉开粉 BX(化学纯)、脂肪醇聚氧乙烯醚 JFC-U(日化级),山东优索化工科技有限公司;乳化剂 NP-10(分析纯),无锡市亚泰联合化工有限公司;润湿剂 HR-3408,吉水文山航润化工厂。

分散剂 木质素磺酸钙、木质素磺酸钠、亚甲基二萘磺酸钠(NNO)、亚甲基双甲基萘磺酸钠(MF),均为化学纯,上海麦克林生化科技有限公司;羟丙基纤维素(HPC)Ⅱ型,上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

黏结剂 糊精(生物试剂)、马铃薯淀粉(生物试剂),北京索莱宝科技有限公司;聚乙烯醇 1799(化学纯)、明胶(生物试剂),上海麦克林生化科技有限公司;聚乙二醇(平均数均分子量 10000)、羧甲基纤维素钠(黏度  $1\,000 \sim 1\,400$  mPa·s),上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

崩解剂 海藻酸钠(分析纯),上海源叶生物科

技有限公司;可溶性淀粉(分析纯),北京索莱宝科技有限公司;尿素(分析纯)、氯化钠(分析纯),国药集团化学试剂有限公司;无水硫酸钠(分析纯),上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

#### 1.1.3 供试培养基

马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基 将 200 g 马铃薯切成小块,水煮(煮沸 20 ~ 30 min,能被玻璃棒戳破即可),用 8 层纱布过滤。加入葡萄糖 20 g 溶解,再加入琼脂粉 20 g 溶解。加水至 1 000 mL,115 ℃ 高压蒸汽灭菌 20 min。

液体培养基 蛋白胨 1 g,酵母粉 1 g,葡萄糖 4 g, $K_2HPO_4$  0.1 g, $MgSO_4$  0.1 g,KCl 0.1 g,加入蒸馏水 200 mL,115 ℃ 灭菌 20 min。

### 1.2 实验仪器

XB-K-25 型血球计数板,上海市求精生化试剂仪器有限公司;YKY-700 型光学显微镜,上海永科光学仪器有限公司;LSHE-600 型生化培养箱,上海勒丰实业有限公司;标准检验筛,40 目(筛孔径 0.425 mm),浙江上虞市公路仪器厂;WD101A 型烘箱,天津市中环实验电炉有限公司;KLJ-150 型粉末造粒机,广州市大祥电子机械设备有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 小檗碱对绿僵菌的 $EC_{50}$ 测定

将小檗碱粉末加入到 PDA 培养基中,配制含药固体培养基,质量浓度梯度设为 0、200、400、600、800、1 000、2 000、3 000  $\mu\text{g/mL}$ ,每个质量浓度重复测试 3 次。用打孔器从生长绿僵菌的 PDA 培养基上打取菌饼,接种到含小檗碱平板的中心处,恒温培养箱正面放置,于 26 ℃ 静置培养,7 d 后用十字交叉法测量菌丝直径,采用菌丝生长抑制法计算小檗碱对绿僵菌的  $EC_{50}$ <sup>[23]</sup>。

#### 1.3.2 待测样品制备

载体筛选 70% (质量分数,下同)载体、30% 绿僵菌孢子粉;

润湿剂筛选 25% 绿僵菌孢子粉、3% 小檗碱,不同种类润湿剂的含量分别为 1%、3%、5%,硅藻土补足 100%;

分散剂筛选 25% 绿僵菌孢子粉、3% 小檗碱、3% 乳化剂 NP-10,不同种类分散剂的含量分别为 1%、3%、5%,硅藻土补足 100%;

黏结剂、崩解剂筛选 25% 绿僵菌孢子粉、3% 小檗碱粉、3% 乳化剂 NP-10、崩解剂与黏结剂各

10% ,硅藻土补足 100%。

将以上各组成分充分混匀,室温保存一个月,作为待测样品。

1.3.3 生物相容性测定

将上述待测样品粉末制成悬液,以纯孢子悬液为对照(每毫升孢子数为 10<sup>3</sup> 个),测定其生物相容性。

孢子萌发率 将 500 μL 待测样品滴加至含有 100 mL PDA 液体培养基的锥形瓶中,于 160 r/min、(25 ± 1)℃ 培养 16 h。在光学显微镜下用血球计数板统计总孢子数和萌发孢子数,设置 5 个重复,按照式(1)计算孢子萌发率。

$$G = (X_1/X_0) \times 100\%$$
 (1)

式中,G 为孢子萌发率,X<sub>1</sub> 为发芽孢子数,X<sub>0</sub> 为孢子总数。

菌丝生长速率<sup>[24]</sup> 配制 PDA 培养基,115℃ 高压蒸汽灭菌,倒板凝固后,在固体培养基中间打孔,接种上述待测样品悬液 20 μL,每个载体处理 5 个平板,以不加载体的培养基作为对照组。(25 ± 1)℃ 下培养 10 d,用游标卡尺测量菌丝直径,按照式(2)计算菌丝生长速率。

$$\Phi_1 = \Phi_2/10$$
 (2)

式中,Φ<sub>1</sub> 为菌丝生长速率,mm/d;Φ<sub>2</sub> 为菌丝直径,mm。

产孢量 在上述菌丝半径的 1/2 处用打孔器取 3 次样,置于 0.05% 吐温 80 的无菌水中,加入适量小玻璃珠,160 r/min 振荡 2 h,使孢子充分散开,在光学显微镜下用血球计数板计数,按照式(3)计算产孢量。

$$C = X_0/S$$
 (3)

式中,C 为产孢量,S 为菌饼面积。

1.3.4 载体和助剂的筛选

为了获得最佳成分组合,减少试验次数,通过单因素试验,确定载体和润湿剂的种类与用量。对于分散剂、崩解剂、黏结剂的种类与用量,先通过生物相容性试验进行粗筛,然后使用 Box – Behnken 响应面法进行优化,最终确定分散剂、崩解剂、黏结剂的用量。

1.3.5 水分散粒剂制备

按照确定的比例将绿僵菌孢子粉和小檗碱充分混匀,制成母粉。在母粉中按照筛选好的处方比例添加润湿剂、分散剂、崩解剂,最后用载体补足全量,

混匀后喷入黏结剂的水溶液,使混合物的含水量保持在 30% (质量分数)。加入粉末造粒机中造粒,于 35℃ 低温干燥,以水分 ≤ 5% 为干燥终点,得到绿僵菌与小檗碱复配的水分散粒剂。

1.3.6 水分散粒剂的质量评价方法

崩解时间 在 25℃ 下,向含有 90 mL 蒸馏水的具塞量筒(100 mL,内高 22.5 cm、内径 28 mm)加入 0.5 g 水分散粒剂(粒径 250 ~ 1 410 μm),塞住筒口,夹住量筒中部,以 8 r/min 的速度旋转,一般以样品在水中完全崩解(无可见颗粒)的时间小于 3 min 为测试合格。

润湿时间和含水量 按照 GB/T 5451—2001<sup>[25]</sup> 测定润湿时间,按照 GB/T 1600—2001<sup>[26]</sup> 中的“共沸蒸馏法”测定含水量。

悬浮率和杂菌率 按照 GB/T 14825—2006<sup>[27]</sup> 测定悬浮率,按照 NY/T 3282.1—2018<sup>[28]</sup> 测定杂菌率。

1.3.7 数据统计与分析

采用 Excel 2016 和 SPSS 22.0 软件进行数据处理,结果以“平均值 ± 标准差”表示。使用 Duncan 法进行多重比较分析,P < 0.05 说明差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 载体筛选结果

由于分散剂中载体的添加量较大,故载体的选择要综合考虑其理化性质、生物相容性及成本等因素<sup>[29-31]</sup>。表 1 为不同种类的载体对绿僵菌生长的影响。

表 1 载体对绿僵菌的影响

Table 1 Effects of different carriers on <i>M. anisopliae</i>			
载体	孢子萌发率/%	菌丝生长速率/ (mm·d <sup>-1</sup> )	产孢量/ (10 <sup>8</sup> ·cm <sup>-2</sup> )
对照组	99.17 ± 1.2878a	7.0833 ± 0.9352a	8.2417 ± 0.8493a
硅藻土	98.35 ± 1.7556a	6.7083 ± 1.6680ab	7.9585 ± 0.7887a
滑石粉	86.25 ± 1.4698b	6.1875 ± 0.7587abc	3.3625 ± 0.0186b
高岭土	98.38 ± 1.8387a	5.7083 ± 0.4233c	8.1338 ± 1.0065a
白炭黑	85.55 ± 1.7047b	5.9167 ± 0.4233bc	2.6055 ± 1.9605b

标有不同字母者代表组间差异显著(P < 0.05),标有相同字母者代表组间差异不显著(P > 0.05),下同。

通过表 1 结果可知,滑石粉和白炭黑的孢子萌发率与产孢量均显著低于对照组(不含载体),说明

二者与绿僵菌的生物相容性较差,推测可能与两种载体的性能有关:滑石粉的 pH 值在 6 ~ 10 之间,白炭黑的 pH 值在 3.5 ~ 4.6 之间,偏酸性或偏碱性均不利于孢子生长。硅藻土和高岭土的孢子萌发率和产孢量与对照组相比无明显差异,而硅藻土的菌丝生长速率显著高于高岭土,同时考虑到硅藻土的密度小、吸水量大,因此选择硅藻土作为水分散粒剂的载体。

将绿僵菌孢子粉以 40%、35%、30%、25%、20% 的添加量(质量分数,下同)加入筛选的硅藻土载体中,混匀后测定润湿时间,结果见图 1。湿润时间随着孢子粉添加量的增大而增大。参考行业标准 NY/T 3282.3—2018<sup>[32]</sup> 对润湿时间的要求(小于 2 min),当孢子粉的添加量为 25% 时,湿润时间为 243 s。考虑后续添加润湿剂可以减少湿润时间,同时为了尽量保证含药量大,确定绿僵菌孢子粉的添加量为 25%。

2.2 EC<sub>50</sub>测定结果和小檗碱用量的确定

2.2.1 EC<sub>50</sub>测定结果

图 2 为不同质量浓度的小檗碱对绿僵菌生长的影响。由结果可知,绿僵菌在含有不同质量浓度的小檗碱的培养基中生长情况不同,随着小檗碱质量浓度的增大,绿僵菌的菌丝生长变慢。按照 1.3.1 节的方法计算小檗碱对绿僵菌的 EC<sub>50</sub>,几率值可从生物统计机率值换算表<sup>[33]</sup> 中查找,得出 EC<sub>50</sub> =

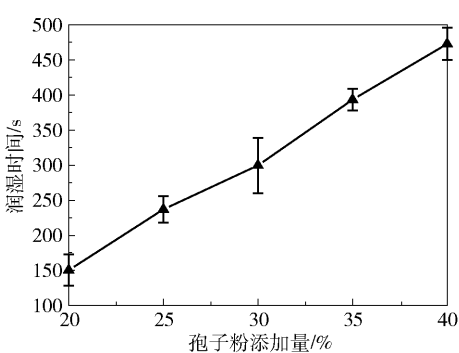


图 1 不同绿僵菌孢子粉添加量下的润湿时间

Fig. 1 Wetting time with different amounts of *M. anisopliae* conidia

47.2 mg/mL。此值每毫升达到了毫克级,表明小檗碱对绿僵菌的生长无明显抑制作用。

2.2.2 小檗碱用量的确定

有研究发现小檗碱可强烈抑制桃褐腐病菌(*Monilinia fructicola*), EC<sub>50</sub> 为 4.69 ~ 8.72 μg/mL<sup>[16-17]</sup>。以往田间试验发现金龟子绿僵菌 CQMa421 防治白背飞虱<sup>[34]</sup>、甘蓝菜青虫和小菜蛾<sup>[35]</sup>、苹果桃小食心虫和草地蝗虫<sup>[36]</sup>以及辣椒病毒病<sup>[37]</sup>的最适施药浓度为 (2.5 ~ 3.33) × 10<sup>6</sup> cfu/mL, 防效可达 88.35% ~ 93.08%。根据绿僵菌分生孢子的最适施药浓度为 (2.5 ~ 3.33) × 10<sup>6</sup> cfu/mL 时小檗碱用量可达到 10 μg/mL, 计算出小檗碱的添加量为 2.66% ~ 3.54% (质量分数,下同),为便于计算和操作,本文选取 3% 的添加量。

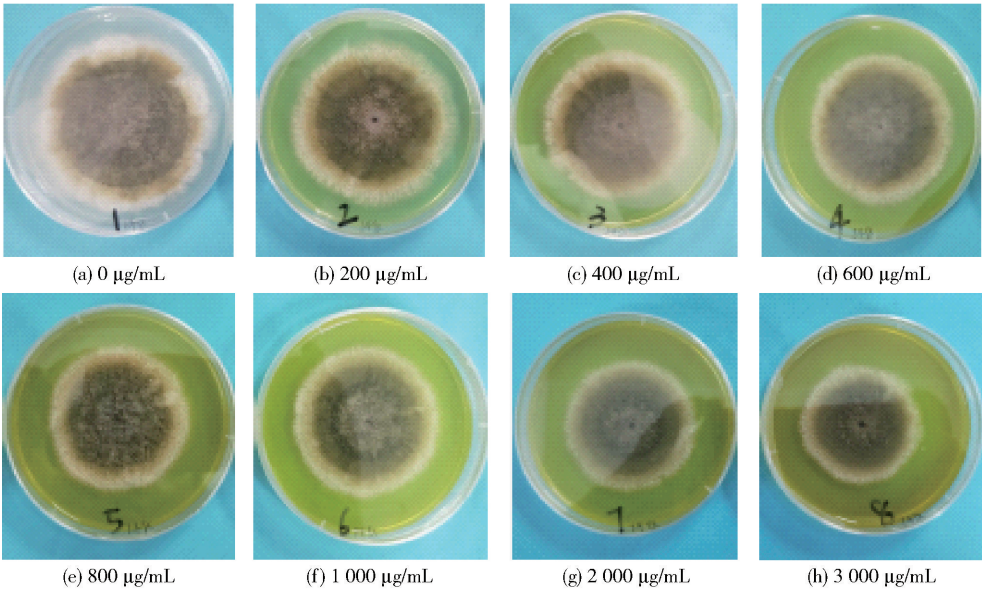


图 2 不同质量浓度的小檗碱对绿僵菌生长的影响

Fig. 2 Effect of different mass concentrations of berberine on the growth of *M. anisopliae*

2.3 助剂筛选结果

2.3.1 润湿剂

润湿剂的润湿能力因种类和浓度不同而存在差异。表 2 为润湿剂的种类和添加量对润湿时间和孢子萌发率的影响。当不添加润湿剂(对照组)时,绿僵菌孢子粉和载体的润湿时间超过 2 min。当润湿剂的添加量为 1% 时,只有 SDBS 和 BX 的润湿性不满足行业标准<sup>[32]</sup>的要求,JFC-U 和 HR-3408 的润湿时间最短,分别为 8 s 和 25.25 s。当润湿剂的添加量为 3% 时,除 JFC-U 组外,其他实验组的润湿

时间与 1% 添加量相比均有所缩短,并且润湿时间降幅较大,其中 BX 的润湿时间减至 120 s 以内。当润湿剂的添加量为 5% 时,只有 BX 和 NP-10 较添加量为 3% 时润湿时间降幅较大。进一步考虑润湿剂与分生孢子的生物相容性,当润湿剂的添加量为 1% 时,除 BX 和 NP-10 外,其他实验组和对照组之间的孢子萌发率均存在显著差异。随着润湿剂添加量的增加,孢子萌发率总体上有所减小。只有添加量为 1% 的 BX 组以及添加量为 1%~5% 的 NP-10 组符合行业标准<sup>[32]</sup>对孢子萌发率的要求( $\geq 85\%$ )。

表 2 润湿剂的种类和添加量对润湿时间和孢子萌发率的影响

润湿剂	润湿时间/s			孢子萌发率/%		
	1%	3%	5%	1%	3%	5%
对照组	> 120	> 120	> 120	94.03 ± 2.92a	94.03 ± 2.92a	94.03 ± 2.92a
SDS	70.67 ± 1.39b	37.62 ± 0.68d	24.95 ± 1.20d	74.86 ± 4.27c	70.98 ± 5.15c	53.06 ± 3.15d
SDBS	> 120	84.05 ± 1.07b	74.94 ± 1.44a	83.09 ± 3.21b	72.97 ± 4.68c	73.50 ± 3.81c
BX	> 120	119.55 ± 0.05a	54.64 ± 0.45b	90.02 ± 1.14ab	80.11 ± 1.18b	74.58 ± 3.66c
NP-10	116.50 ± 2.26a	63.25 ± 8.18c	26.25 ± 4.03c	93.51 ± 1.63a	91.52 ± 2.75a	88.06 ± 2.41b
JFC-U	8.00 ± 1.41d	9.50 ± 1.00e	6.75 ± 0.96e	54.26 ± 4.21e	43.02 ± 2.64e	31.21 ± 2.71f
HR-3408	25.25 ± 3.86c	7.25 ± 0.50f	5.00 ± 0.01f	65.51 ± 4.72d	53.35 ± 2.47d	35.78 ± 5.23e

综合润湿时间和生物相容性,并兼顾后续助剂及制备过程对孢子活性的影响,确定润湿剂种类为 NP-10,其添加量为 3%,此时测得的孢子萌发率达 91.52%,润湿时间为 63.25 s。

2.3.2 分散剂

表 3 为分散剂的种类和添加量对悬浮率和孢子萌发率的影响。当 MF 的添加量为 1%~5% 时,悬浮率均高于其他分散剂,说明 MF 的分散能力较强。当分散剂的添加量为 1% 和 3% 时,各分散剂组与对照

组(不含分散剂)的孢子萌发率无显著差异;当分散剂的添加量为 5% 时,只有 MF 与对照组的孢子萌发率有显著差异( $F = 3.942, P < 0.05$ )。因为分散剂均不能满足行业标准<sup>[32]</sup>对悬浮率的要求( $\geq 80\%$ ),故将悬浮性能最好的两种分散剂 MF 和木质素磺酸钙进行复配;2% MF + 5% 木质素磺酸钙,此时测得的悬浮率为 81.34%,孢子萌发率为 86.45%,满足相关行业标准的要求,因此确定以 MF 和木质素磺酸钙的质量比为 2:5 的混合物作为制剂的分散剂。

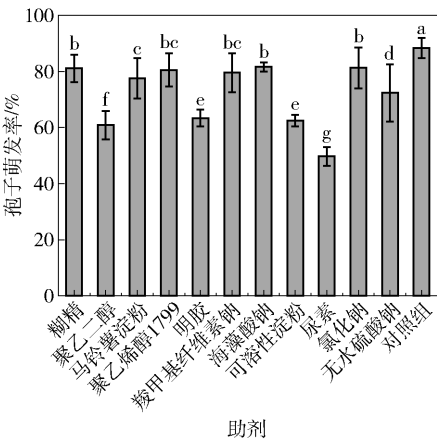
表 3 分散剂的种类和添加量对悬浮率和孢子萌发率的影响

分散剂	悬浮率/%			孢子萌发率/%		
	1%	3%	5%	1%	3%	5%
对照组	-	-	-	94.03 ± 2.92a	94.03 ± 2.92a	94.03 ± 2.92a
木质素磺酸钙	56.33 ± 0.42b	62.98 ± 0.51b	65.06 ± 0.32b	92.16 ± 1.85a	90.27 ± 0.64a	89.49 ± 1.29ab
木质素磺酸钠	55.33 ± 0.34b	62.31 ± 0.25c	63.25 ± 0.28c	91.87 ± 1.74a	90.97 ± 0.16a	89.06 ± 1.13ab
羟丙基纤维素	51.67 ± 0.32c	57.66 ± 0.46d	61.50 ± 0.38d	92.08 ± 2.10a	91.71 ± 1.61a	90.55 ± 0.68ab
NNO	49.03 ± 0.11d	52.11 ± 0.12e	56.58 ± 0.36e	93.50 ± 1.41a	90.60 ± 1.15a	89.40 ± 1.01ab
MF	62.67 ± 0.16a	63.53 ± 0.27a	67.97 ± 0.24a	92.18 ± 1.53a	89.52 ± 2.00a	87.36 ± 2.02b

- 表示无悬浮率。

2.3.3 黏结剂和崩解剂

图3为不同黏结剂和崩解剂对绿僵菌的生物相容性。各实验组和对照组的孢子萌发率均有显著差异。糊精、马铃薯淀粉、聚乙烯醇和羧甲基纤维素钠的孢子萌发率高于其他黏结剂;海藻酸钠与氯化钠的孢子萌发率高于其他崩解剂。结果表明这些助剂的生物相容性较好,可进行下一步粗筛。



标有不同字母者代表组间差异显著( $P < 0.05$ ),标有相同字母者代表组间差异不显著( $P > 0.05$ )。

图3 黏结剂和崩解剂与绿僵菌的生物相容性  
Fig. 3 Biocompatibility of binders and disintegrants with *M. anisopliae*

使用1.3.5的方法制备水分散粒剂,测定不同黏结剂(糊精、马铃薯淀粉、聚乙烯醇和羧甲基纤维素钠)的崩解性能,并且将所制备的颗粒的性状与市售的同种剂型(70%吡虫啉水分散粒剂,江西禾益化工股份有限公司)进行粗略对比,结果见表4。与市售制剂相比,用糊精和马铃薯淀粉制备的颗粒偏硬,结块严重,导致崩解迟缓;以聚乙烯醇为黏结剂时,颗粒粉末较多,且易碎;以羧甲基纤维素钠为黏结剂时,颗粒硬度适中。因此本文选择羧甲基纤维素钠为最优黏结剂。表5为不同添加量的羧甲基

表4 黏结剂筛选			
Table 4 Screening of the binder			
黏结剂	添加量/%	崩解时间/min	颗粒性状
糊精	3	32 ± 2.45b	偏硬,结块严重
马铃薯淀粉	3	35 ± 1.63a	偏硬,结块严重
羧甲基纤维素钠	3	24 ± 3.27c	硬度适中
聚乙烯醇	3	2 ± 0.16d	粉末较多,易碎

纤维素钠对崩解时间和颗粒性状的影响。崩解时间随着羧甲基纤维素钠添加量的增加而增加;当羧甲基纤维素钠的添加量为3%时,水分散粒剂的颗粒硬度适中。

表5 羧甲基纤维素钠的添加量筛选		
Table 5 Screening of the amount of sodium carboxymethylcellulose		
添加量/%	崩解时间/min	颗粒性状
1	8 ± 0.82c	偏软,少量粉末
3	24 ± 0.47b	硬度适中
5	38 ± 0.47a	偏硬,结块
7	> 60,崩解迟缓	偏硬,结块严重

表6为海藻酸钠和氯化钠对崩解时间的影响。使用海藻酸钠为崩解剂时,制剂的崩解时间比氯化钠制成的制剂短。由表7可知,当海藻酸钠的添加量为2%和6%时,制剂的崩解时间大于10 min,原因是崩解剂的添加量太少造成崩解迟缓。随着崩解剂添加量的增加,制剂的崩解性能逐渐提高,当崩解剂的添加量为10%和15%时,崩解时间较短,分别为360.48 s和228.48 s。

表6 崩解剂筛选	
Table 6 Screening of the disintegrating agent	
崩解剂	崩解时间/s
海藻酸钠	256.80 ± 0.13b
氯化钠	489.00 ± 0.45a

表7 海藻酸钠的添加量筛选	
Table 7 Screening of the amount of sodium alginate	
添加量/%	崩解时间/s
2	> 600
6	> 600
8	586.12 ± 8.94a
10	360.48 ± 6.43b
15	228.48 ± 12.45c

2.4 Box-Behnken 响应面法试验设计与结果

为了进一步优化制剂的处方,以单因素试验结果为基础,根据 Box- Behnken 采样原理,以木质素磺酸钙添加量、羧甲基纤维素钠添加量、海藻酸钠添加量为变量(后期为保证悬浮率合格,根据木质素磺酸钙含量添加 MF),以崩解时间为响应值,设计3

因素 3 水平的响应面分析试验(表 8),试验方案及结果如表 9 所示。

表 8  各因素编码和水平

Table 8  Coding and level of each factor			
因素	水平		
	-1	0	1
木质素磺酸钙添加量 $A/\%$	3	5	7
羧甲基纤维素钠添加量 $B/\%$	1	3	5
海藻酸钠添加量 $C/\%$	10	15	20

表 9  试验方案与结果

Table 9  Test scheme and results				
序号	$A$	$B$	$C$	崩解时间/s
1	0	-1	-1	277
2	0	1	1	334
3	0	0	0	224
4	1	-1	0	225
5	0	-1	1	178
6	0	0	0	224
7	-1	0	1	256
8	0	0	0	224
9	-1	-1	0	227
10	-1	1	0	384
11	1	0	1	249
12	1	1	0	380
13	0	1	-1	436
14	1	0	-1	356
15	-1	0	-1	360
16	0	-1	-1	277
17	0	1	1	334

使用 Design-Expert 10.0.1 分析试验结果,获得二次多项式回归方程:

$$Y = 224 - 2.12A + 78.38B - 51.50C - 0.5AB - 0.75AC - 0.75BC + 39.5A^2 + 40.5B^2 + 41.75C^2$$

式中, $Y$  为崩解时间, $A$  为木质素磺酸钙添加量, $B$  为羧甲基纤维素钠添加量, $C$  为海藻酸钠添加量。

响应面模型的方差分析结果如表 10 所示。回归模型的  $P < 0.0001$ ,失拟项的  $P > 0.05$ ,此值不显著,说明模型的预测值和真实值之间的拟合度较高。该模型的复相关系数  $R^2 = 0.9998$ ,表明该模型可以解释响应面中 99.98%的可变性。模型中自变量  $A$ 、

表 10  响应面模型的方差分析结果  
Table 10  Variance analysis results of the response surface model

方差来源	平方和	自由度	均方差	$F$ 值	$P$ 值	显著性
模型	93 662.78	9	10 406.98	4 349.18	<0.0001	**
$A$	36.13	1	36.13	15.10	0.0060	**
$B$	49 141.13	1	49 141.13	20 536.59	<0.0001	**
$C$	21 218.00	1	21 218.00	8 867.22	<0.0001	**
$AB$	1.0000	1	1.0000	0.4179	0.5386	
$AC$	2.25	1	2.25	0.9403	0.3645	
$BC$	2.25	1	2.25	0.9403	0.3645	
$A^2$	6 569.47	1	6 569.47	2 745.45	<0.0001	**
$B^2$	6 906.32	1	6 906.32	2 886.22	<0.0001	**
$C^2$	7 339.21	1	7 339.21	3 067.13	<0.0001	**
残差	16.75	7	2.39			
失拟项	16.75	3	5.58	5.58	0.0650	
纯误差	0.0000	4	0.0000			
合计	93 679.53	16				
$R^2$	0.9998					
$R^2_{\text{adj}}$	0.9996					
$R^2_{\text{pred}}$	0.9971					

$R^2_{\text{adj}}$  为校正复相关系数, $R^2_{\text{pred}}$  为预测复相关系数,\*\* 代表差异极显著( $P < 0.01$ )。

$B$ 、 $C$ 、 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  的  $P$  值达到极显著水平,说明分散剂添加量、黏结剂添加量和崩解剂添加量对制剂崩解性能的影响最为显著,且各影响因素和响应值之间不是线性关系。根据  $F$  值大小,确定这 3 个因素对崩解时间的影响程度大小是: $B > C > A$ 。

根据建立的回归模型,得出最优处方为:分散剂添加量  $A$  为 5.267%,黏结剂添加量  $B$  为 1.667%,崩解剂添加量  $C$  为 18.333%。在此条件下模型预测的崩解时间为 174.702 s。根据软件预测结果并考虑实际工艺设置,选取分散剂添加量  $A$  为 5.3%、黏结剂添加量  $B$  为 1.7%、崩解剂添加量  $C$  为 18%,进行 3 次重复试验,测得平均崩解时间为 178 s,与模型预测的结果接近,表明基于该响应面模型分析优化崩解时间的方法有效可行。

2.5  水分散体粒剂粒径与崩解时间的关系

表 11 为不同粒径的水分散体粒剂对崩解时间的影响。结果表明,水分散体粒径为 0.8 mm 时,崩解时间 <180 s;粒径大于 0.8 mm 时,崩解时间 >180 s,

表 11 不同粒径的水分散粒剂对崩解时间的影响  
Table 11 Effect of different particle sizes of water-dispersible granules on the disintegration time

粒径/mm	崩解时间/s			
	1	2	3	平均值
0.8	171.35	174.19	178.4	174.6±3.55
1.0			>180	
1.2			>180	

原因是较大的粒径与水接触的相对表面积较小。因此本文最终选择粒径为 0.8 mm 的颗粒。

综上,绿僵菌与小檗碱复配为水分散粒剂的最佳配方为:25% 绿僵菌孢子粉、3% 小檗碱、3% 润湿剂 NP-10、2.1% 分散剂 MF、5.3% 分散剂木质素磺酸钙、18% 的崩解剂海藻酸钠、1.7% 的黏结剂羧甲基纤维素钠,用载体硅藻土补足 100%。按照 1.3.5 的方法,将各种组分按比例混合均匀,喷入黏结剂,放入造粒机中造粒,选择粒径 0.8 mm 的颗粒,于 35℃ 干燥后过 40 目筛,得到绿僵菌与小檗碱复配的水分散粒剂。经测定,所制备的水分散粒剂的平均崩解时间为 174 s,孢子萌发率为 85.4%,孢子悬浮率为 86.34%,含水量为 1.88%,杂菌率 2.01%,符合相关行业标准。

3 结论

(1) 本文将绿僵菌与小檗碱复配,测定了小檗碱对绿僵菌的 EC<sub>50</sub> 为 47.2 mg/mL,表明小檗碱对绿僵菌没有明显的抑制作用,二者可以复配;根据以往绿僵菌的田间试验及小檗碱的抗真菌实验,确定小檗碱的添加量为 3%;通过处方筛选试验,最终确定水分散粒剂的配方为:25% 绿僵菌孢子粉,3% 小檗碱,3% NP-10(润湿剂),2.1% MF(分散剂),5.3% 木质素磺酸钙(分散剂),18% 海藻酸钠(崩解剂),1.7% 羧甲基纤维素钠(黏结剂),硅藻土(载体)补足 100%。

(2) 按照确定的配方加入绿僵菌孢子粉和小檗碱的母粉、润湿剂、分散剂、崩解剂及载体,混匀后喷入黏结剂水溶液,使含水量保持在 30%。加入造粒机中造粒,选择粒径 0.8 mm 的颗粒,于 35℃ 低温干燥以尽量保证孢子活力,以水分≤5% 为干燥终点,过 40 目筛,得到绿僵菌与小檗碱复配的水分散粒剂。经质量检测,所制备的水分散粒剂的平均崩解

时间为 174 s,孢子萌发率为 85.4%,孢子悬浮率为 86.34%,含水量为 1.88%,杂菌率为 2.01%,符合相关行业标准。

参考文献:

[1] 刘军,魏钦平,刘松忠,等. 梨园病虫害生态控制及生物防治[M]. 北京:科学技术文献出版社,2014: 26-27.  
LIU J, WEI Q P, LIU S Z, et al. Ecological management and biological control of diseases and pests in pear orchard[M]. Beijing: Scientific and Technical Documentation Press, 2014: 26-27. (in Chinese)

[2] SCHRANK A, VAINSTEIN M H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins[J]. Toxicon, 2010, 56(7): 1267-1274.

[3] 农向群,张英财,王以燕. 国内外杀虫绿僵菌制剂的登记现状与剂型技术进展[J]. 植物保护学报, 2015, 42(5): 702-714.  
NONG X Q, ZHANG Y C, WANG Y Y. Advances in registration and formulation techniques of *Metarhizium* biological insecticides [J]. Journal of Plant Protection, 2015, 42(5): 702-714. (in Chinese)

[4] LI J, XIE J Q, ZENG D Y, et al. Effective control of *Frankliniella occidentalis* by *Metarhizium anisopliae* CQ-Ma421 under field conditions [J]. Journal of Pest Science, 2021, 94: 111-117.

[5] 刘文军,李宝忠. 我国生物杀虫剂的发展趋势及市场前景[J]. 商情, 2013(29): 31.  
LIU W J, LI B Z. Trends and market prospect of biological insecticides in China [J]. Shangqing, 2013(29): 31. (in Chinese)

[6] MARCIANO A F, GOLO P S, COUTINHO-RODRIGUES C J B, et al. *Metarhizium anisopliae* sensu lato (s. l.) oil-in-water emulsions drastically reduced *Rhipicephalus microplus* larvae outbreak population on artificially infested grass [J]. Medical and Veterinary Entomology, 2020, 34(4): 488-492.

[7] 雷仲仁, 问锦曾, 谭正华, 等. 绿僵菌油剂防治东亚飞蝗田间试验[J]. 植物保护, 2003, 29(1): 17-19.  
LEI Z R, WEN J Z, TAN Z H, et al. Field trial with *Metarhizium* oil liquid for controlling *Locusta migratoria manilensis* [J]. Plant Protection, 2003, 29(1): 17-19. (in Chinese)

[8] 石晓珍. 绿僵菌水剂剂型的初步研究[D]. 海口:海南大学, 2008.  
SHI X Z. Preliminary study on the formulation of *Metarhizium anisopliae* aqueous solution [D]. Haikou: Hainan

- University, 2008. (in Chinese)
- [9] 农向群, 张泽华, 高松, 等. 一种防治害虫的真菌颗粒剂的制造方法: CN101502271A[P]. 2009-08-12.
- NONG X Q, ZHANG Z H, GAO S, et al. A manufacturing method of fungal granules for pest control: CN101502271A[P]. 2009-08-12. (in Chinese)
- [10] 谢宁, 王中康, 张建伟, 等. 绿僵菌 CQMa128 乳粉剂对蛴螬时间-剂量-死亡率模型分析[J]. 中国生物防治, 2010, 26(4): 436-441.
- XIE N, WANG Z K, ZHANG J W, et al. Time-dose-mortality model analysis of emulsifiable powder formulation of *Metarhizium anisopliae* CQMa128 against white grubs [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2010, 26(4): 436-441. (in Chinese)
- [11] 王双, 叶幸, 张燕, 等. 金龟子绿僵菌油悬浮剂的孢子萌发率测定方法优化研究[J]. 农药科学与管理, 2017, 38(5): 25-28, 34.
- WANG S, YE X, ZHANG Y, et al. Method optimization for determination of spore germination rate of *Metarhizium anisopliae* oil miscible flowable concentrate [J]. Pesticide Science and Administration, 2017, 38(5): 25-28, 34. (in Chinese)
- [12] 杨华, 徐金柱, 赵丹阳, 等. 绿僵菌微胶囊剂防治黄脊竹蝗的潜力评价[J]. 中国生物防治学报, 2018, 34(4): 553-558.
- YANG H, XU J Z, ZHAO D Y, et al. Evaluation of the potential of *Metarhizium* microcapsules for controlling *Ceracris kiangsu* Tsai[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2018, 34(4): 553-558. (in Chinese)
- [13] YADAV S, SHARMA A, KHAN M A, et al. Enhancing hexahydro-1, 3, 5-trinitro-1, 3, 5-triazine (RDX) remediation through water-dispersible *Microbacterium esteraromaticum* granules[J]. Journal of Environmental Management, 2020, 264: 110446.
- [14] MOIROUX N, DJÈNONTIN A, ZOGO B, et al. Small-scale field testing of alpha-cypermethrin water-dispersible granules in comparison with the recommended wettable powder formulation for indoor residual spraying against malaria vectors in Benin[J]. Parasites & Vectors, 2018, 11: 508.
- [15] DA SILVA A R, DE ANDRADE NETO J B, DA SILVA C R, et al. Berberine antifungal activity in fluconazole-resistant pathogenic yeasts: action mechanism evaluated by flow cytometry and biofilm growth inhibition in *Candida* spp. [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2016, 60(6): 3551-3557.
- [16] HOU D Y, YAN C Q, LIU H X, et al. Berberine as a natural compound inhibits the development of brown rot fungus *Monilinia fruticola* [J]. Crop Protection, 2010, 29: 979-984.
- [17] PEI Q H, LI Y, GE X Z, et al. Multipath effects of berberine on peach brown rot fungus *Monilinia fruticola* [J]. Crop Protection, 2019, 116: 92-100.
- [18] BASHA S A, MISHRA R K, JHA R N, et al. Effect of berberine and (±)-bicuculline isolated from *Corydalis chaerophylla* on spore germination of some fungi[J]. Folia Microbiologica, 2002, 47(2): 161-165.
- [19] YANG P, LI F J, HUANG S W, et al. Physiological and transcriptional response of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* to berberine, an emerging chemical control[J]. Phytopathology, 2020, 110(5): 1027-1038.
- [20] 韩丽娟. 研究农药复配剂的意义及其要求[J]. 江苏农业科学, 1989(7): 25-26.
- HAN L J. The significance and requirements of research on pesticide compounds [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 1989(7): 25-26. (in Chinese)
- [21] SADHASIVAM S, SHAPIRO O H, ZIV C, et al. Synergistic inhibition of mycotoxigenic fungi and mycotoxin production by combination of pomegranate peel extract and azole fungicide[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1919.
- [22] 薛科科, 李映, 李朋钰, 等. 小檗碱与绿僵菌复配的相容性及对桃褐腐病菌的抑制作用[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(3): 178-181.
- XUE K K, LI Y, LI P Y, et al. Compatibility of berberine with *Metarhizium anisopliae* and the inhibition against *Monilinia fruticola* [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2017, 45(3): 178-181. (in Chinese)
- [23] 包媛媛, 赵娟秀, 杨加艳, 等. 不同杀菌剂对三七黑斑病菌的毒力测定[J]. 中国农学通报, 2018, 34(2): 74-78.
- BAO Y Y, ZHAO J X, YANG J Y, et al. Toxicity determination of different fungicides on *Alternaria panax* [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2018, 34(2): 74-78. (in Chinese)
- [24] 王磊, 陆永跃, 许益鏊, 等. 绿僵菌与8种红火蚁防控常用农药相容性[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(2): 172-179.
- WANG L, LU Y Y, XU Y J, et al. Compatibility of *Metarhizium* spp. with eight pesticides used in the control of *Solenopsis invicta* [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2016, 32(2): 172-179. (in Chinese)
- [25] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 农药可湿性粉剂润湿性测定方法: GB/T 5451—2001[S]. 北

- 京: 中国标准出版社, 2001.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Testing method for the wettability of dispersible powders of pesticides: GB/T 5451—2001 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2001. (in Chinese)
- [26] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 农药水分测定方法: GB/T 1600—2001 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2002.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Testing method for water in pesticides: GB/T 1600—2001 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2002. (in Chinese)
- [27] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 农药悬浮率测定方法: GB/T 14825—2006 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Determination method for suspensibility for pesticides: GB/T 14825—2006 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2007. (in Chinese)
- [28] 中华人民共和国农业农村部. 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: NY/T 3282.1—2018 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
- Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. Fungal pesticides—*Metarhizium anisopliae*—Part 1: *Metarhizium anisopliae* technical concentrate (TK): NY/T 3282.1—2018 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2018. (in Chinese)
- [29] 张礼生, 张泽华, 高松, 等. 绿僵菌生物农药的研制与应用 [J]. 中国生物防治, 2006, 22 (S1): 141—146.
- ZHANG L S, ZHANG Z H, GAO S, et al. Application and development of *Metarhizium* biological pesticide [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2006, 22 (S1): 141—146. (in Chinese)
- [30] 华乃震. 农药载体或填料的性能及在 WP、WG 中应用 (1) [J]. 中国农药, 2018 (7): 6—11.
- HUA N Z. Properties of pesticide carrier or auxiliary material and their applications in WP and WG (1) [J]. Journal of China Agrochemicals, 2018 (7): 6—11. (in Chinese)
- [31] 华乃震. 农药载体或填料的性能及在 WP、WG 中应用 (2) [J]. 中国农药, 2018 (8): 9—14.
- HUA N Z. Properties of pesticide carrier and auxiliary material and their applications in WP and WG (2) [J]. Journal of China Agrochemicals, 2018 (8): 9—14. (in Chinese)
- [32] 中华人民共和国农业农村部. 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: NY/T 3282.3—2018 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
- Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. Fungal pesticides—*Metarhizium anisopliae*—Part 3: *Metarhizium anisopliae* wettable powder (WP): NY/T 3282.3—2018 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2018. (in Chinese)
- [33] 董时富. 生物统计学 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- DONG S F. Biostatistics [M]. Beijing: Science Press, 2002. (in Chinese)
- [34] 车正明, 朱楚波, 李正祥, 等. 金龟子绿僵菌 CQ-Ma421 防治水稻白背飞虱试验 [J]. 云南农业科技, 2018 (6): 42—43.
- CHE Z M, ZHU C B, LI Z X, et al. Test on control of rice *Sogatella furcifera* by *Metarhizium anisopliae* CQ-Ma421 [J]. Yunnan Agricultural Science and Technology, 2018 (6): 42—43. (in Chinese)
- [35] 崔元英, 张安盛, 李丽莉, 等. 金龟子绿僵菌乳粉剂防治甘蓝菜青虫和小菜蛾田间药效试验 [J]. 山东农业科学, 2012, 44 (9): 102—103.
- CUI Y Y, ZHANG A S, LI L L, et al. Field trials of controlling *Pieris rapae* and *Plutella xylostella* in *Brassica oleracea* using *Metarhizium anisopliae* emulsifiable power [J]. Shandong Agricultural Sciences, 2012, 44 (9): 102—103. (in Chinese)
- [36] 庄乾萑, 刘同金, 赵维, 等. 金龟子绿僵菌防治苹果桃小食心虫和草地蝗虫的效果 [J]. 山东农业科学, 2010, 10: 92—93.
- ZHUANG Q Y, LIU T J, ZHAO W, et al. Control effects of *Metarhizium anisopliae* on *Grapholitha inopinata* and grasshopper [J]. Shandong Agricultural Sciences, 2010, 10: 92—93. (in Chinese)
- [37] 张武军, 张辉, 王朝斌, 等. 0.3% 苦·小檗碱·黄酮水剂防治辣椒病毒病的研究 [J]. 西南师范大学学报 (自然科学版), 2007, 32 (1): 115—118.
- ZHANG W J, ZHANG H, WANG C B, et al. Control of pepper virus disease with the new bio-combination pesticide 0.3% radix sophorea flavescentis-berberine-flavone bactericide AS [J]. Journal of Southwest China Normal University (Natural Science), 2007, 32 (1): 115—118. (in Chinese)

# Preparation of water-dispersible granules by combination of *Metarhizium anisopliae* and berberine

YANG Xiao<sup>1</sup> GE XiZhen<sup>2</sup> LIU GuoXin<sup>3</sup> TIAN PingFang<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029;

2. College of Biochemical Engineering, Beijing Union University, Beijing 100023;

3. Hebei Chemical Engineering Institute Co., Ltd., Shijiazhuang 050031, China)

**Abstract:** Combining *Metarhizium anisopliae* and berberine into water-dispersible granules offers the dual effects of insecticidal action and disease control, and can reduce the cost of field application. The median effective concentration ( $EC_{50}$ ) of berberine against *M. anisopliae* was 47.2 mg/mL, indicating that berberine has no obvious inhibitory effect on *M. anisopliae*. According to previous field trials of *M. anisopliae* and antifungal experiments with berberine, the final amount of berberine was determined to be 3% (mass fraction). Based on single factor tests, the response surface method was used to determine the optimized formulation of the water-dispersible granules: 25% *M. anisopliae* spore powder, 3% berberine, 3% emulsifier NP-10 (wetting agent), 2.1% sodium methylene dimethyl naphthalene sulfonate (dispersant), 5.3% calcium lignosulfonate (dispersant), 18% sodium alginate (disintegrant), 1.7% sodium carboxymethylcellulose (binder), and diatomaceous earth (carrier) as the remainder (the amount of ingredients refers to the mass fraction used in the preparation). Using this formulation, water-dispersible granules were prepared in a granulator. Quality test results showed that the disintegration time of the prepared water-dispersible granules was 174 s, the spore germination rate was 85.4%, the spore suspension rate was 86.34%, the water content was 1.88%, and the rate of microbial contaminants was 2.01%, which meets the relevant industry standards.

**Key words:** berberine; *Metarhizium anisopliae*; water dispersible granule; disintegration time; biological pesticide

(责任编辑: 于少云)