

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXXX—XXXX

农药登记微生物农药母药组分分析
试验指南

Test Guidelines on Component Analysis of Microbial Pesticide

Technical Concentrate for Pesticide Registration

(征求意见稿)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

中华人民共和国农业农村部

发布

前　　言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由本标准由中华人民共和国农业农村部种植业管理司提出并归口。

本标准负责起草单位：农业农村部农药检定所。

本标准参加起草单位：中国农科院植物保护研究所。

本标准起草人：

微生物农药母药组分分析试验指南

1 范围

本标准规定了微生物农药组分分析试验的基本内容、试验方法和试验报告等要求。

本标准适用于为申请微生物农药登记所进行的母药的组分分析试验。

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，仅所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 4789.2 食品卫生微生物学检验 菌落总数测定

NY/T 2886 农药登记原药全组分分析试验指南

NY/T 2887 农药产品质量分析方法确认指南

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1 微生物农药 microbial pesticide

微生物农药是以真菌、细菌、病毒和原生动物或基因修饰的微生物等活体作为有效成分的农药。

3.2 微生物农药母药 microbial pesticide technical concentrate

微生物农药母药是用于生产微生物农药产品的微生物原料，通常情况下还会包含伴随发酵过程的相关生物组分和少量化学杂质，或扩增而产生的宿主昆虫或细胞的生物组分。

3.3 真菌农药母药 fungal pesticide technical concentrate

由相关靶标生物的病原真菌的纯菌种经生物发酵产生而获得的高含量的单一或组合形态的活菌体母药，通常情况下还会包含伴随发酵过程的相关生物组分和少量化学杂质。

3.4 细菌农药母药 bacterial pesticide technical concentrate

由细菌菌种经发酵而获得的高含量菌粉，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。

3.5 病毒农药母药 viral-based pesticide technical concentrate

以病毒包涵体为主要成分，有效含量为病毒的含量，通常情况还会包含伴随病毒扩增而产生的宿主昆虫或细胞的生物组分。

3.6 真菌类农药中孢子 spore

真菌的繁殖体，有多种类型。

3.7 真菌类农药中分生孢子 conidia

真菌的一种无性繁殖细胞，由分生孢子梗上产孢细胞产生，是真菌农药中最常见的形态。

3.8 真菌类农药中含菌量 fungal density

真菌农药的单位质量中所含有效成分真菌的数量。

3.9 真菌或细菌类农药中含孢量 spore content

形态为孢子的真菌或细菌农药的单位质量中所含有效成分真菌或细菌孢子的数量。

3.10 真菌类农药中活孢率 percentage of living spores

即孢子萌发率，指在一定培养条件下，可萌发生长的孢子数占总孢子数的百分率。

3.11 真菌或细菌农药中杂菌率 rate of microbial contaminants

真菌或细菌农药中除了有效成分外，其他菌（真菌和细菌等）量占总菌量的百分率。

3.12 微生物污染物 microbial contaminant

指产品中除了微生物农药的特定微生物(或其产生的物质)外,还存在的任何其他微生物或物质；如微生物农药取代物或突变体等。

3.13 有害杂质 harmful impurity

对人、畜或环境生物有毒理学意义的代谢物和化学物质。

3.14 细菌类农药中杂菌数 number of microbial contamination

细菌农药检测中，除有效成分细菌以外的其他微生物菌落数之和。

3.15 病毒包涵体 polyhedral inclusion body

病毒水平传播的主要载体形式，其结构特征是病毒粒子包埋于蛋白质基质的多角体内。

3.16 菌落形成单位 colony forming units

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。

3.17 病毒类农药中杂菌菌落总数 number of microbial contaminants

将病毒母药样品稀释后涂抹在琼脂营养培养基上，所得到的微生物（真菌和细菌）菌落数之和。

4 试验要求

4.1 定性分析

4.1.1 真菌类农药鉴别

根据所提供的菌株形态学、生物化学、DNA分析特征或国际公认机构的鉴定特征，用显微观察法从生物形态上进行鉴定。对于新菌种的真菌农药，还需进行全基因组序列测定，并描述其与同种标准基因组之间所存在差异；对于真菌农药的新菌株进行特异基因序列测定即可。

4.1.2 细菌类农药鉴别

根据代表菌株的形态学和生理生化特征进行菌种鉴别，还需进行全基因组序列测定，并描述其与同种标准基因组之间所存在差异，还可借助脂肪酸分析、Biolog、16SrRNA序列分析等手段进行。

4.1.3 病毒类农药鉴别

采用PCR扩增及DNA测序分子鉴定的方法对病毒毒种进行鉴定，生物测定法可作为分子鉴定的补充。

4.1.4 微生物种类仲裁鉴定

当对鉴别结果有怀疑或争议时，应到具有微生物种类认证资质的单位，将在微生物保藏中心保藏的生产微生物及其母药与模式微生物描述进行对照，由2名以上的专家确认后，出具微生物鉴定报告，作为仲裁依据。

4.1.5 有害杂质及其他化学成分的定性分析

按NY/T 2886-2016的规定执行。

4.2 定量分析

4.2.1 真菌农药母药

4.2.1.1 含菌量的测定

根据母药中真菌的微生物形态提出检测方法，可采用如显微计数法、菌落形成单位的方法等，简述方法基本原理。

根据需要可修订或提出其他方法，但应做说明，包括样品制备步骤、测定步骤和计算方法等。

4.2.1.2 活孢率的测定

根据母药中真菌的生物形态特点提出检测方法。对分生孢子形态的母药一般采用接种培养后显微镜观察孢子萌发的方法。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，计算孢子萌芽百分率，即活孢率。

4.2.1.3 杂菌率的测定

一般采用菌落形成单位法，即接种培养，根据不同菌的生长速度和菌落形态特征，从平板上直接分辨菌落并计菌落数，计算杂菌率。

根据需要可修订或提出其他方法，但应做说明，包括样品制备步骤、测定步骤和计算方法等。

4.2.2 细菌农药母药

4.2.2.1 含孢量测定

采用平板菌落计数法，即将母药润湿、稀释后，均匀涂布在培养基平板上，待各芽孢菌体形成菌落后，统计菌落总数，以单位样品（g）中的菌落形成单位数（CFU）表示活芽孢含量（CFU/g）。

4.2.2.2 杂菌率测定

按照方法进行测定，选择NA培养基检测样品中的细菌杂菌；选择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（1）计算。

$$X = \frac{N_1 + N_2}{N_1 + N_2 + N_3} \times 100 \quad \dots \dots \dots \quad (1)$$

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 ——有效成分菌落数的总和，单位为CFU；

4.2.3 病毒农药母药

4.2.3.1 病毒包涵体的定量检测

称取少量病毒试样，用定量的蒸馏水稀释成水悬浮液，并稀释至适当倍数后，滴加在血球计数板上，在光学显微镜下计数。根据血球计数板上病毒包涵体的数量以及稀释倍数，计算出单位质量（体积）病毒的数量。

4.2.3.2 允许差

病毒包涵体含量2次平行测定结果之差，应不大于20%，取其算数平均值作为测定结果。

4.2.3.3 杂菌菌落总数的测定

按GB/T 4789.2的规定执行。

4.2.4 有害杂质及其他化学成分的定量分析

按NY/T 2886—2016的规定执行。

4.3 不溶物、水分/干燥减量等项目的测试参照相应标准方法进行。

4.4 方法选择

优先选择现行有效的国家标准、行业标准中规定的分析方法。如没有合适方法，建立的新方法应由至少一个实验室进行验证，且第二家实验室必须能将第一家实验室的验证数据再现到可接受的范围内。

4.5 试验报告

试验报告一般应至少包括以下内容：

- 封面，包括试验项目备案号、试验项目编号、试验项目负责人、试验项目完成时间、试验机构、委托方等内容。
- 质量管理规范符合性声明和质量保证声明，具有相关人员的签字和日期。
- 目录，一般是自动生成的内容。

- d) 摘要, 对试验结果和结论进行综述, 一般用表格表述。
- e) 综合信息, 包括委托方、试验目的、试验导则、试验机构、试验项目负责人、试验人员、试验项目开始时间、实验开始时间、实验完成时间、试验项目完成时间、档案内容和地点、试验计划的修订、试验计划的偏离、对 SOP 的偏离、数学统计方法等内容。
- f) 试验信息:
 - 1) 有效成分信息, 包括中文通用名称、英文通用名称、生物活性、性状、溶解度、稳定性等信息, 并注明出处。
 - 2) 被试物信息, 包括样品名称、样品批号、标称值、毛重、生产日期、失效日期、来样日期、性状、生产商、生产商地址、储存条件等内容。
 - 3) 应包括但不限于以下内容: 1 批次产品的有效成分、微生物污染物 (杂菌)、有害杂质及其他化学成分的定性分析; 5 批次产品的有效成分、微生物污染物 (杂菌)、有害杂质及其他化学成分的定量分析。
- g) 有效成分定性分析:
 - 1) 包括菌种中文通用名称、英文通用名称、拉丁文名 (属, 种, 亚种, 变种或专化型及定名人)、拉丁文学名异名 (属, 种, 亚种, 变种或专化型)、来源及株系分型或代码 (获得地点或单位、原寄主、人工处理如诱变等)、生物学分类地位 (纲、目、科)、鉴定特征、有效成分主要存在形态 (分生孢子、芽生孢子、菌丝体等)。
 - 2) 鉴定特征结果描述: (以分生孢子形态学为实例)
在……培养基上, 菌落的菌丝呈……色……状 (如绒状、絮状、卷毛状、粉状等), 背面……色或无色, 菌落产孢后呈……色或由……色转变为……色。分生孢子梗单生/聚集, 有/无分隔, 有/无分枝, 直立/弯曲, 壁光滑/粗糙, ……。产孢细胞呈……形 (如瓶形、锥形等), 单生/对生/轮生/簇生于分生孢子梗的顶端。分生孢子为单细胞/多细胞, 呈……形 (如圆形、椭圆形、肾形、菱形、针形等), 表面光滑/粗糙/有疣突或……纹饰, 大小为…… μm —…… μm 或…… μm ×…… μm —…… μm 。
- h) 有效成分、微生物污染物 (杂菌) 的定量分析
包括方法提要、试剂和溶液、仪器、操作条件、测定步骤、计算、测定结果等内容。
- i) 有害杂质及其他化学成分的定量分析
内容要求同 h), 如果未检出, 需要给出检出限。
- j) 水分或干燥减量测定, 包括方法提要 (方法来源)、试剂和仪器、测定步骤、计算、测定结果等内容。
- k) 固体不溶物测定, 内容要求同 k)。
- l) 附录:
 - 1) 主要表格索引。
 - 2) 主要图谱索引。
 - 3) 主要照片, 包括典型批次母药 (至少 1 批次) 的显微镜观察照片。
 - 4) 试验机构证书。
 - 5) 微生物农药母药组分分析试验协议备案表。

4.6 归档

试验计划、标准品和样品、原始数据和试验报告等应在试验完成后及时归档。

参 考 文 献

- [1] GB/T 21459.1 真菌农药母药产品标准编写规范
 - [2] GB 4789.2-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定
-