###

GB/T XXXXX—201X

中华人民共和国国家标准

ICS 07.080

A 21

**微生物源抗生素类次生代谢产物抗细菌活性测定 抑菌圈法**

**The method of assaying antibacterial activity for microbial secondary metabolites——inhibition zone method**

（征求意见稿）



发布

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局

中国国家标准化管理委员会

201X-XX-XX 发布

201X-XX-XX实施

前言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由中国标准化研究院提出并归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

微生物源抗生素类次生代谢产物抗细菌活性测定 抑菌圈法

1 范围

本标准规定了微生物源抗生素类次生代谢产物抗细菌活性抑菌圈法测定原理、仪器设备及器具、试剂和材料、操作步骤和结果判定。

本标准适用于微生物源抗生素类次生代谢产物抗细菌活性测定.

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

抑制中浓度 median inhibition concentration，IC50

次生代谢产物对细菌的抑制率达到50%时所用的浓度。

3.2

抑细菌活性 antibacterial activity

具有抑制细菌生长繁殖的能力。

3.3

抗菌圈 zone of microbial inhibition

也称抗菌圈，固体培养基表面与试样接触的边界处无菌繁殖的环带区域。

4 原理

利用待测次生代谢产物在琼脂平板中扩散使其周围的细菌生长受到抑制形成的抑菌圈大小，计算IC50来判定待测次生代谢产物抑菌效果。

本方法适用于微生物源抗生素类次生代谢产物的抗细菌活性测定方法。

5 仪器设备及器具

5.1 超净工作台

可满足无菌要求的洁净工作台、生物安全柜或无菌室。

5.2 恒温培养箱

温度范围5 ℃~50 ℃。

5.3 电子天平

精度为0.0001g。

5.4 无菌培养皿

带陶瓦盖，直径90 mm。

5.5 牛津杯

不锈钢，标准规格：内径6 mm、外径8 mm、高10 mm。

5.6 测量仪

游标卡尺或抑菌圈测量仪，精度0.1 mm。

5.7 分光光度计

检测波长600 nm。

6 试剂和材料

本方法所用试剂均为分析纯，除特殊说明外，实验用水均为GB/T 6682规定的二级水。

6.1 LB液体培养基

胰蛋白胨 10.0 g

酵母提取物 5.0 g

氯化钠 10.0 g

蒸馏水 1000 mL

将上述各成分加于蒸馏水中，煮沸溶解，调节pH至7.0±0.2，分装至锥形瓶中，121 ℃灭菌20 min，备用。也可采用市售的商业培养基。

用途：用于指示菌菌种的活化及菌悬液的培养。

6.2 LB固体培养基

胰蛋白胨 10.0 g

酵母提取物 5.0 g

氯化钠 10.0 g

琼脂 20.0 g

蒸馏水 1000 mL

将上述各成分加于蒸馏水中，煮沸溶解，调节pH至7.0±0.2，分装至锥形瓶中，121℃灭菌20 min，备用。也可采用市售的商业培养基。

用途：用于指示菌的培养及含菌检测平板的制备。

6.3 指示菌标准菌株

革兰氏阳性菌：金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）ATCC 6538。

革兰氏阴性菌：大肠杆菌（*Escherichia coli*）ATCC 11229。

7 操作步骤

7.1 冻干菌活化

将冻干菌融化分散在5 mL 的LB液体培养基中成悬浮状，在37 ℃±2 ℃下培养18~24 h。用接种环取菌悬液以划线法接种到LB固体平板上，在37 ℃±2 ℃下培养18~24 h。从培养皿上挑取典型菌落接种在LB固体培养基斜面试管内，，在37 ℃±2 ℃下培养18~24 h。将试管斜面贮存于冰箱内（5 ℃~10 ℃），作为保存菌，保存期不超过一个月，每月传代一次，传代次数不超过10代。

7.2 试验菌悬液制备

7.2.1 用接种环取保存菌，以划线法接种到LB固体平板上，37 ℃±2 ℃下培养24 h。

注：平皿在5℃~10℃条件下保存，在1周内使用。

7.2.2 取LB液体培养基20 mL放入100 mL的三角烧瓶内，用接种环取7.2.1平皿上的典型菌落接种在LB液体培养基内培养。培养条件为：温度37 ℃±2 ℃，振动频率110 min-1，时间18~24 h。

7.2.3 用蒸馏水20倍稀释LB液体培养基，用其调节培养后的菌浓度为1×108 CFU/mL~5×108 CFU/mL，作为试验菌液。采用分光光度计或适当的方法测定菌液浓度。

注：试验菌液冰冷保存（3℃~4℃），在4h内使用。

7.3 供试样品制备

将供试样品配置成一定浓度的母液，并用无菌水将母液按2倍浓度稀释，制备成至少5个不同浓度的待测溶液，备用。

7.4 检测平板制备

倾注融化并冷却至55℃左右的LB固体培养基10 mL于无菌培养皿内，待其凝固后制成LB平板，备用。

将7.2.3中的试验菌液分别用冷却至55℃左右的LB固体培养基按1∶10的比例稀释，充分混匀后各取5 mL至上述已制备好的LB平板内，轻轻摇动平板使菌液均匀铺平，待其凝固后制成检测平板，备用。

7.5 抑菌活性测定

分别将牛津杯轻轻地放在7.4制备的平板中，而后用无菌吸管分别将7.3中制备的200 μL不同浓度的供试样品溶液加入牛津杯中，空白对照组加入200 μL无菌水，每个处理三个重复。将平板正置于36 ℃±1 ℃恒温培养箱中培养12 h，取出，用测量仪测量待测样品和空白对照形成的抑菌圈直径。

8 结果判定

8.1 计算方法

抑制率按式（1）计算：

*R*=$\frac{CK\_{处理}-CK\_{对照}}{CK\_{对照}}×100$…………………………………………………………（1）

式中：

*R*——抑制率（%）；

*CK*处理——供试次生代谢产物平板中形成的抑菌圈直径（mm）；

*CK*对照——空白对照平板中形成的抑菌圈直径（mm）。

8.2 结果分析

根据药剂浓度对数值与对应抑制率的几率值作回归分析，得到回归曲线Y=aX+b，其中Y为抑制率的几率值，X为药剂浓度对数值，a为回归曲线斜率，b为常数，并给出回归曲线的R2值，计算供试药剂分别对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的IC50值。