

ICS 07.080

A 20/39

中华人民共和国国家标准

**微生物源抗生素类次生代谢产物抗真菌活性测定 菌丝生长速率法**

**The method of assaying antifungal activity for microbial secondary**

**metabolites——mycelial growth rate method**

（征求意见稿）

201X-XX-XX实施

201X-XX-XX 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

1. 前 言
2. 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真菌活性测定

菌丝生长速率法

1 范围

本标准规定了微生物源抗生素类次生代谢产物抗真菌活性菌丝生长速率法测定原理、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真菌活性测定。

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

次生代谢产物对真菌的抑制率达到50%时所用的浓度。

3.2

抗真菌活性 antifugal activity

具有抑制真菌生长繁殖的能力。

3.3

菌丝生长抑制 mycelial growth inhibition

丝状真菌与试样接触，在固体平板上表现出的菌丝生长受到限制的现象。

4 原理

将供试次生代谢产物与培养基混合，以培养基上菌落的生长速度来衡量次生代谢产物的抑丝状真菌效果。

本方法适用于微生物源抗生素类次生代谢产物的抗丝状真菌活性测定方法。

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

感量为0.0001g。

5.4 无菌培养皿

直径90 mm。

5.5 测量仪

游标卡尺，精度0.1mm。

5.6 无菌打孔器

内径5±0.1mm。

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 马铃薯葡萄糖琼脂培养基（PDA）成分

马铃薯浸粉 3.0 g

葡萄糖 20.0 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，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。

6.2 指示菌标准菌株

立枯丝核菌（*Rhizoctonia solani* Kühn ）ATCC76145。

7 操作步骤

7.1 供试菌培养

将立枯丝核菌冻存菌株用无菌接种针挑取接种到PDA平板中，28℃±1 ℃下培养至菌丝覆盖整个平板，备用。

7.2 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。

7.3 检测平板制备

将7.2中制备的供试样品分别用冷却至46 ℃±1 ℃的PDA培养基按1∶9的比例稀释，充分混匀后各取10 mL移至无菌培养皿内，轻轻摇动培养皿使其均匀铺平，待其凝固后制成检测平板，用无菌水和PDA混合制备的平板作为空白对照平板，备用。

7.4 抑菌活性测定

用无菌打孔器（内径5 ±0.1mm）在7.1中活化的供试菌平板边缘打孔，用无菌镊子取菌饼放置于7.3制备的检测平板中间。每个处理三个重复。将平板倒置于28 ℃±1 ℃恒温培养箱中培养24 h，取出，采用十字交叉法测定菌落直径。

8 结果判定

8.1 计算方法

抑制率按式（1）计算：

*C*=$\frac{\left（CK\_{对照}-5\right）-（CK\_{处理}-5）}{CK\_{对照}-5}×10$…………………………………（1）

式中：

*R*——抑制率（%）；

*CK*处理——供试次生代谢产物平板中形成的菌落直径（mm）；

*CK*对照——空白对照平板中形成的菌落直径（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立枯丝核菌的IC50值。