**《微生物源抗生素类次生代谢物抗真菌活性测定**

**菌丝生长速率法》国家标准**

**编 制 说 明**

（征求意见稿）

一、任务来源

本国家标准的制定任务列入国家标准化管理委员会《国家标准委关于下达2018年第二批国家标准制修订计划的通知》（国标委综合〔2018〕41号》，项目编号“20181037-T-424”。本项任务由中国标准化研究院提出并归口，定于2019年完成。本标准起草工作组由中国计量大学等单位共同组成。

二、目的和意义

微生物源抗生素类次生代谢产物化学结构复杂，种类繁多，在医药、食品、农业等领域发挥着重要的作用，对国民经济所作的贡献令人瞩目。日本和美国等国家对次生代谢产物的研究一直处于世界领先地位。我国次生代谢产物研究起步较晚，总体处于跟跑阶段，且产品同质化严重，缺乏核心竞争力。目前，我国次生代谢物研究领域存在的主要问题有：活性测定和功效评价缺乏统一的试验方法和标准；以次生代谢物为主要活性成分的产品质量控制缺乏统一的标准和先进的技术等。因此，本课题拟在前期工作基础上，研究建立次生代谢产物活性测定、功效评价技术等相关标准。研究结果将为以次生代谢产物为主要活性成分的活性评价、产品研发和质量控制提供强大的技术保障，有效推动次生代谢物产业的发展。

抗菌活性是指抗菌物质抑制或杀灭病原微生物的能力，可用体外抑菌试验和体内实验治疗法测定。体外抑菌实验对临床用药或者农业上病害防治以及食品领域均具有重要参考意义。生长速率法是杀菌剂抗真菌活性测定的常规方法之一，又叫含毒介质法，它是将供试药剂与培养基混合，以培养基上菌落的生长速度来衡量化合物的毒力大小。一般多用于那些不产孢子或孢子量少而菌丝较密的真菌。该方法操作简单，结果可靠。但在利用该方法测定活性物质抗真菌作用时，往往由于不同研究者采用的供试菌和培养基的不同，以及培养时间和培养温度等条件的不一致，从而得出不同的抑制效果。同时现有的抗菌活性测定相关标准中，往往以对供试菌的生长抑制率作为评价指标。抑制率虽然很直观地反应了供试药剂对供试菌的抑制强弱，但缺乏抗菌物质的量和抑菌的效果间的关系方程，也无法用于不同抗生素间抑菌效果强弱的比较。因此，统一微生物源抗生素类次生代谢产物抑真菌活性测定的方法和评价指标，是目前次生代谢产物领域亟待解决的问题。

为了规范微生物源次生代谢产物抗真菌活性测定方法和评价指标，本标准将对抗真菌活性实验中的培养基、培养条件等进行优化，同时以半抑制浓度IC50（Median Inhibition Concentration，指对供试菌的抑制率达到50%时所用的药物浓度）作为评价指标，明确微生物源次生代谢产物抗真菌活性的量效关系和IC50。本标准的制定可为监管部门提供技术支撑以及为以次生代谢产物为活性成分的产品研发提供活性测定和评价方法。

三、标准制定原则

**（一）标准编制原则**

本标准遵循GB/T1.1-2009《标准化工作导则第1部分：标准的结构和编写》，标准编写内容参考了与抑菌活性测定标准相关的文献。

1. 操作性和安全性并重

抗真菌活性测定时，供试的真菌种类很多，有农业上引起植物病害的病原真菌、食品中引起霉变的真菌以及医学上的病原真菌等。考虑到方法测定和评价试验的易操作性和安全性，标准起草小组重点选取了常用的引起植物病害的病原真菌作为指示菌。这充分体现了标准的通用性特点。

2. 注重高效性

丝状真菌在生长过程中不同种类的菌生长速度差异显著，有些菌在合适的培养基上培养24 h菌丝就能覆盖整个培养皿，有些菌一周都不能长满整个平板。为了注重评价的高效性，在供试菌的选择上，应充分考虑菌丝的生长速率。

**（二）标准制订主要依据**

1、标准编写遵循GB1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》的有关要求。

2、标准编写内容参考我国与抑菌活性测定相关的标准，包括《微生物源酶制剂抗菌活性的测定》和《纺织品 抗菌性能的评价 第1部分：琼脂平皿扩散法》等等。

四、标准主要技术内容

本标准中主要技术指标说明如下：

**（一）供试菌选择**

生长速率法测定常用的指示菌有苹果腐烂病菌（*Valsa mali*）,水稻纹枯病菌（*Rhizoctonia solani* Kühn ），棉花枯萎病菌（*Fusarium oxysporium*），辣椒疫霉病菌（*Phytophthora capsici*）和葡萄白腐病菌（*Coniothyrium diplodiella*）等。结合起草组前期制定的标准编制原则，将立枯丝核菌（*Rhizoctonia solani* Kühn ）ATCC76145也就是水稻纹枯病的病原真菌作为抗真菌活性测定的供试菌，主要理由如下：

（1）该菌株是水稻纹枯病的病原真菌，也就是农业上引起植物病害的病原真菌。水稻纹枯病是水稻上最常见的真菌病害，几乎每年都发生此病害，得到此病原真菌的标准菌株相对容易。

（2）植物病害病原真菌不会与人或动物产生交叉感染，实验条件不苛刻，在实验室研究既具有操作性又兼具安全性。

（3）该菌株生长速度很快，在合适的培养基上培养24-36 h菌丝就能覆盖整个平板（直径9 cm培养皿），而且菌丝生长致密，不产生孢子，是利用菌丝生长速率法测定药物抗真菌活性的理想的供试菌株。

根据微生物源抗生素类次生代谢产物应用领域的不同，也可以采用其它菌株作为供试菌，如农业领域还可以采用链格孢菌（*Alternaria alternata* ）ATCC 42012，稻梨孢菌（*Pyricularia oryzae* Cav anamorph）ATCC15024等供试菌株。食品领域可以采用能产生毒素的镰刀菌(*Fusarium oxysporium*)等。具体可按照实际情况进行选择。

**（二）培养基选择**

实验室常用培养真菌的培养基有马铃薯葡萄糖培养基、麦芽汁培养基和马丁氏培养基等。其中马铃薯葡萄糖培养基更常用，主要理由如下：

（1）该培养基可以提供真菌生长的全部营养，也就是能确保真菌良好生长。

（2）该培养基配方极其简单，成分就是马铃薯汁、葡萄糖和琼脂，易取材。

（3）有市售的商业培养基，且相比其它培养基价格上有优势。

**（三）抗真菌活性测定时间的优化**

在抑菌试验中，时间短可能导致抑菌效果不明显，时间长可导致抑菌效果下降。以立枯丝核菌作为供试菌株，培养24 h为较合理时间，此时处理组和对照组菌落生长直径差异明显，抑菌效果明显。

**（四）微生物源次生代谢产物浓度选择**

本标准中IC50值是根据回归方程计算获得，所以为了使方程更准确，至少需要配置5个不同的浓度，分别测定它们对供试菌的抑制作用。但抗菌物质浓度选择上应注意浓度过高或过低引起的抑菌效果差异不明显。最理想的结果是回归方程中既有抑制率大于50%分布的点，也有抑制率小于50%分布的点，需要避免所有的点都分布在50%以上或者以下。得出的毒力学方程相关系数应R2≥0.95。

**（五）试验方法和结果**

1、供试菌培养

将立枯丝核菌（ATCC 76145）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。

2、供试样品制备

将井冈霉素样品配置成1600 μg/mL的母液，并用无菌水将母液按2倍浓度稀释，制备成5个不同浓度的待测溶液（1600 μg/mL，800 μg/mL，400 μg/mL，200 μg/mL 和100 μg/mL），当天配置当天使用。

3、 检测平板制备

将上述不同浓度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。

4、 抑菌活性测定

用无菌打孔器（内径5 ± 0.1 mm）在活化的供试菌平板边缘打孔，用无菌镊子取菌饼放置于制备好的检测平板中间。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。

5、结果判定

5.1 计算方法

抑制率按式（1）计算：

菌丝生长抑制率（%）**= （1）**

式中：

*CK*处理——供试次生代谢产物平板中形成的菌落直径。

*CK*对照——空白对照平板中形成的菌落直径。

5.2 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=1.6076X+2.7357，R2为0.9501，其中Y为抑制率的几率值，X为井冈霉素药剂浓度对数值，计算出井冈霉素对立枯丝核菌的IC50值为25.61 μg/mL。

同时在该标准研制过程中，进行了多抗霉素对链格孢菌的抗真菌活性测定，具体步骤和结果如下：

供试菌株为链格孢菌（*Alternaria alternata* ）ATCC 42012，将多抗霉素样品配置成300 μg/mL的母液，并用无菌水将母液按2倍浓度稀释，制备成5个不同浓度的待测溶液（300 μg/mL，150 μg/mL，75 μg/mL，37.50 μg/mL 和18.75 μg/mL），当天配置当天使用。抑菌活性测定时培养时间为48 h，其它操作均同井冈霉素对立枯丝核菌抗菌活性测定。得到回归曲线Y=1.1128X+3.9076，R2为0.9619，其中Y为抑制率的几率值，X为多抗霉素药剂浓度对数值，计算出多抗霉素对链格孢菌的IC50值为9.58 μg/mL。

**五、主要工作过程**

1、组成标准起草小组

标准制定任务下达后，2016年6月，组成了标准起草工作组，明确了任务要求，安排了工作进度，成立了标准起草工作小组，会议研究讨论了标准的总体框架和制定原则。

2、文献资料的收集

为制定本标准，起草组收集和查阅了与抗菌活性测定方法和抗菌效果评价相关的材料，其中包括《微生物源酶制剂抗菌活性的测定》和《纺织品 抗菌性能的评价 第1部分：琼脂平皿扩散法》、日本抗菌检测标准JIS Z 2801、《国内外标准基础知识大全》、《临床合理应用抗菌药物的质量评价标准与方法探讨》、《我国抗菌产品性能检测标准体系现状》等等，为标准草案的制定奠定了基础。

3、开展相关调研情况

2016年8月，在前期资料分析的基础上，课题组又针对项目的特点有针对性地选择了从事抗菌活性评价相关的单位进行了调研，吸收了其在实践中的经验和做法，并融入到标准草案当中。通过前期的基础研究，起草组对微生物源抗生素类次生代谢产物抗菌活性评价的现状有了清晰的认识。

4、标准起草完善过程

依据GB/T 1.1—2000《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》、GB/T 1.2—2002《标准化工作导则 第2部分：标准中规范性技术要素内容的确定方法》等标准编制要求，对《微生物源抗生素类次生代谢物抗真菌活性测定方法 菌丝生长速率法》标准开展了研制工作，确定了本标准方法的重要参数，开展了实际样品的抗真菌活性检测。2017年6月起草工作小组完成了《微生物源抗生素类次生代谢物抗真菌活性测定方法 菌丝生长速率法》国家标准（草案）。2017年8月，起草组为了提高标准的科学性和适用性，分别邀请了中国标准化研究院、中国测试技术研究院、浙江中医药大学、江南大学和浙江省农业厅等科研机构和有关高校的多名专家召开了标准草案讨论会，从标准工作方案、技术路线、主要研究方法等方面，对标准草案提出了完善建议。在此基础上，2019年1月征求了专家意见，起草组按照专家意见对标准内容进行了修改完善，形成了标准征求意见稿。

具体工作过程如下：

2016年6月，成立了标准起草工作组，安排了工作进度。

2016年6月至2016年9月，起草工作组查阅了国内和国外与抗菌活性测定方法和抗菌效果评价相关的材料，并且有针对性地选择了从事抗菌活性评价相关的单位进行了调研。

2016年10月至2017年5月，开展研究性工作。

2017年6月至7月，完成标准草案。

2017年8月至9月，对标准草案进行了讨论，形成第二稿。

2017年10月，标准草案研制推进会，对研制过程中的问题进行讨论，商讨解决方案。

2017年12月，邀请中国标准化研究院专家对标准草案提供意见，对标准草案撰写中的一些问题进行了修订，形成第三稿。

2018年5月，本标准经国家标准化管理委员会批准，获得立项。

2018年8月，完成标准征求意见稿和编制说明的初稿。

2019年1月，完成三方论证，召开专家征求意见会，根据专家意见修改和完善征求意见稿。

**六、方法验证及结果**

为了验证本标准制定的微生物源次生代谢产物抗真菌活性测定方法的准确性，分别委托杭州师范大学、浙江理工大学、浙江工商大学三家单位进行了验证，结果如下：

**表1 井冈霉素对立枯丝核菌的抑制效果**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **委托单位** | **杭州师范大学** | **浙江理工大学** | **浙江工商大学** | **标准研制单位** |
| IC50  （单位：μg/mL） | 26.89 | 27.52 | 26.14 | 25.61 |
| 平均值 | 26.54±0.83 μg/mL | | | |

**表2 多抗霉素对链格孢菌的抑制效果**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **委托单位** | **杭州师范大学** | **浙江理工大学** | **浙江工商大学** | **标准研制单位** |
| IC50值  （单位：μg/mL） | 8.94 | 8.68 | 9.21 | 9.58 |
| 平均值 | 9.10±0.38 μg/mL | | | |

**七、与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系**

本标准符合国家现行法律、法规、规章和强制性国家标准的要求。本标准的实施不涉及对现行标准的废止情况。

**八、标准属性的建议**

本标准属于基础管理标准，建议作为推荐性标准批准发布。

**九、贯彻国家标准的要求和措施建议**

无