



中华人民共和国国家标准

GB/T 38480—2020

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

Determination of antifungal activity for microbial secondary metabolites—
Mycelial growth rate method

2020-11-19 发布

2020-11-19 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

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：中国计量大学、中国标准化研究院。

本标准主要起草人：申屠旭萍、叶子弘、马爱进、俞晓平、崔海峰、张雅芬、许益鹏。



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

本标准规定了用菌丝生长速率法测定微生物源抗生素类次生代谢产物抗真菌活性的方法。
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 inhibitory concentration

IC_{50}

对真菌生长的抑制率达到 50%时的浓度。

3.2

抗真菌活性 antifungal activity

抗制真菌生长繁殖的能力。

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抑丝状真菌的能力,通过计算 IC_{50} 来判定活性。

5 试剂或材料

除非另有规定,所用试剂均为分析纯。

5.1 水。GB/T 6682 一级水。

5.2 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)。称取马铃薯浸粉 3.0 g、葡萄糖 20.0 g、琼脂 20.0 g,然后将上述各成分加入 1 000 mL 蒸馏水中,煮沸溶解,pH 自然,分装至 250 mL 锥形瓶中,121 °C 灭菌 20 min,备用。也可采用市售的商业培养基。

5.3 指示菌标准菌株:立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* Kühn) ATCC76145。

根据微生物源抗生素类次生代谢产物应用领域不同,也可以采用其他菌株作为供试菌。

6 仪器设备

- 6.1 恒温培养箱:温度偏差在 $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以内。
- 6.2 超净工作台。
- 6.3 无菌培养皿:直径 90 mm。
- 6.4 测量仪:游标卡尺,精度 0.1 mm。
- 6.5 无菌打孔器:内径 $5\text{ mm}\pm 0.1\text{ mm}$ 。
- 6.6 无菌吸管:1 mL(具 0.01 mL 刻度)、10 mL(具 0.1 mL 刻度)或微量移液器。

7 操作步骤

7.1 指示菌培养

倾注融化并经 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌冷却至 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右的 PDA 固体培养基 15 mL 于无菌培养皿内,待其凝固后制成 PDA 平板,将立枯丝核菌冻存菌株用无菌接种针挑取少量菌丝接种到 PDA 平板中间, $28\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱培养至菌丝覆盖整个平板,备用。上述操作均在超净工作台内进行。

7.2 供试样品制备

极性样品直接用水充分溶解(非极性样品加一定浓度的表面活性剂充分溶解),配制成一定浓度的母液,经无菌 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤,然后用无菌水(或相应的表面活性剂)按 2 倍或 5 倍浓度逐级稀释,制备成至少 5 个不同浓度的待测溶液,逐级稀释时应确保既有抑制率大于 50% 分布的浓度点,也有抑制率小于 50% 分布的浓度点,现配现用。

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 $55\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 PDA 培养基按 1:9 的比例稀释,充分混匀后用无菌吸管各取 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,用对应的溶剂和 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 $5\text{ mm}\pm 0.1\text{ mm}$)在活化的指示菌平板中相同的半径边缘打孔,用无菌镊子取菌饼正置于 7.3 制备的检测平板中间。每个处理重复 5 次。将平板正置于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 24 h~48 h,取出,采用十字交叉法测量菌落直径,两次测量所得的平均值即为菌落直径。

8 结果计算

抑制率按式(1)计算:

$$I = \frac{(D_1 - 5) - (D_2 - 5)}{D_1 - 5} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

I ——抑制率;

D_1 ——空白对照平板中形成的菌落直径,单位为毫米(mm);

D_2 ——供试次生代谢产物平板中形成的菌落直径,单位为毫米(mm)。

以五个平行样的平均值为最终结果,计算结果保留到小数点后两位。

根据药剂浓度对数值与对应抑制率的概率值作回归分析,得到回归曲线 $Y=aX+b$,其中 Y 为抑制率的概率值, 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 R^2 值,计算供试药剂对立枯丝核菌的 IC_{50} 值。

9 重复性

在重复条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 15%。
