



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 38483—2020

---

## 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

Determination of antibacterial activity for microbial secondary  
metabolites—Inhibition zone method

2020-11-19 发布

2020-11-19 实施

国家市场监督管理总局  
国家标准化管理委员会 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、许益鹏、崔海峰、张雅芬。



# 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

本标准规定了用抑菌圈法测定微生物源抗生素类次生代谢产物抗细菌活性的方法。  
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

GB 19489 实验室生物安全要求

## 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**

$IC_{50}$

对细菌的抑制率达到 50%时的浓度。

### 3.2

**抗细菌活性 antibacterial activity**

抑制细菌生长繁殖的能力。

### 3.3

**抑菌圈 inhibition zone**

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  $IC_{50}$  来判定活性。

## 5 实验室生物安全要求

应符合 GB 19489 的规定。

## 6 试剂或材料

除非另有规定,所用试剂均为分析纯。

6.1 水。GB/T 6682 一级水。

6.2 LB 液体培养基。称取胰蛋白胨 10.0 g、酵母提取物 5.0 g、氯化钠 10.0 g,然后将上述各成分加于 1 000 mL 蒸馏水中,煮沸溶解,调节 pH 至  $7.0 \pm 0.2$ ,分装至锥形瓶中,121 °C 灭菌 20 min。

6.3 LB 固体培养基。称取胰蛋白胨 10.0 g、酵母提取物 5.0 g、氯化钠 10.0 g、琼脂 20.0 g,然后将上述各成分加于 1 000 mL 蒸馏水中,煮沸溶解,调节 pH 至  $7.0 \pm 0.2$ ,分装至 250 mL 锥形瓶中,121 °C 灭菌 20 min。

6.4 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:大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) ATCC 11229。

也可以采用其他标准菌株作为供试菌,具体可参照实际情况进行选择。

## 7 仪器设备



7.1 恒温培养箱:温度偏差在  $\pm 1$  °C 以内。

7.2 无菌培养皿:带陶瓦盖,直径 90 mm。

7.3 无菌牛津杯:不锈钢,标准规格:内径 6 mm、外径 8 mm、高 10 mm。

7.4 抑菌圈测量仪:精度 0.1 mm。

7.5 分光光度计:检测波长 600 nm。

7.6 无菌锥形瓶:容量 100 mL、250 mL。

7.7 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。

## 8 操作步骤

### 8.1 菌株活化

将菌株接种到装有 2 mL 的 LB 液体培养基的试管中,37 °C  $\pm 1$  °C 下培养 12 h~18 h。用接种环挑取菌悬液以划线法接种到 LB 固体平板上,37 °C  $\pm 1$  °C 恒温培养箱中培养 18 h~24 h,然后从平板中挑取单菌落接种在 LB 固体培养基试管斜面内,37 °C  $\pm 1$  °C 恒温培养箱中培养 18 h~24 h,后将试管斜面贮存于 1 °C~4 °C 冰箱内作为保存菌,保存期不超过一个月,每月传代一次,传代次数不超过 10 代。

### 8.2 菌悬液制备

8.2.1 用接种环取保存菌,以划线法接种到 LB 固体平板上,37 °C  $\pm 1$  °C 下培养 24 h。

注:LB 固体平板在 1 °C~4 °C 条件下保存,1 周内使用。

8.2.2 取 LB 液体培养基 20 mL 加入容量为 100 mL 的无菌锥形瓶内,用接种环取 8.2.1 平皿上的单菌落接种在 LB 液体培养基内,37 °C  $\pm 1$  °C 培养 12 h~18 h。

8.2.3 用 LB 液体培养基调节培养后的菌浓度至  $1 \times 10^8$  CFU/mL~ $5 \times 10^8$  CFU/mL 并以此作为试验菌悬液。采用分光光度计测定试验菌悬液 OD<sub>600</sub> 为 0.5~0.65 或(其他)适当的方法测定菌悬液浓度。

注:试验菌悬液在 1 °C~4 °C 条件下保存,在 4 h 内使用。

### 8.3 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 μm 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。

8.4 检测平板制备

将 8.2.3 中的菌悬液用冷却至 55 ℃左右的 LB 固体培养基按 1 : 10 的比例稀释,充分混匀后取 15 mL 于无菌培养皿内,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。

8.5 抑菌活性测定

分别将无菌牛津杯轻轻地放在 8.4 制备的检测平板中,而后用无菌吸管分别将 8.3 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 对应的溶剂,每个处理重复 5 次。将平板正置于 37 ℃±1 ℃恒温培养箱中培养 12 h~18 h,取出,用抑菌圈测量仪测量待测样品和空白对照组形成的抑菌圈直径。



9 结果计算

抑制率按式(1)计算:

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

式中:

- I ——抑制率;
- D<sub>1</sub> ——供试次生代谢产物平板中形成的抑菌圈直径,单位为毫米(mm);
- D<sub>2</sub> ——空白对照平板中形成的抑菌圈直径,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<sup>2</sup> 值,计算供试药剂分别对大肠埃希氏菌和金黄色葡萄球菌的 IC<sub>50</sub> 值。

10 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应超过算术平均值的 15%。

\_\_\_\_\_