

# 管碟法测定抗生素效价方法的优化研究\*

雷波

(重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 400047)

**摘要:**以实验室发酵的抗生素、杆菌肽为测试品,通过用管碟法测定其效价,从而得到管碟法测定抗生素效价的较优化的一般方法。研究结果表明,上层培养基N源的成分以骨蛋白胨、鱼蛋白胨、胰酪蛋白胨较好,培养基的厚度影响显著,其次是指示菌的浓度和上层培养基的酸碱度对测定结果影响较大。

**关键词:** 抗生素,效价,管碟法

中图分类号: Q93-33

文献标识码: A

文章编号: 1672-6693(2006)03-0085-03

## Research on Optimization of Cup-plate Method for Determining Antibiotic Potency

LEI Bo

(College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China)

**Abstract:** Fermented antibiotic got from laboratory and bacillus peptide are used as testing objects. Cup-plate method is used upon them to determine the disinfection potency. An optimized cup-plate method is then founded. The result of this research shows: I. Bone-peptone, fish-peptone and casein-peptone are fine components of N source of the upper layer of culture medium. II. The thickness of culture medium has a striking effect on the determination. III. The density of the indicating bacteria and the acidity and alkalinity of the upper layer of culture medium also have the striking effect on the determination.

**Key words:** antibiotic potency, cup-plate method

测定抗生素效价的国际常用方法是管碟法,是利用抗生素在特定实验菌的琼脂培养基内的扩散作用,形成一定浓度的含抗生素的球型区,抑制了试验菌的繁殖而呈现出透明的抑菌圈,将已知效价的标准溶液和未知效价的供试样品溶液在相同条件下进行培养,比较两者的抑菌圈的大小,利用各种不同的计算原理,就可以准确地测定出供试样品的效价。但是在使用标准样品比较时,由于各种因素的影响,使得抑菌圈在相同剂量下偏小,不规则,且对低剂量的效价难于测定,使效价测定的误差更大。为此,本实验通过对影响测定抑菌圈大小的各种因素进行比较试验及分析,得出杆菌肽效价测定的最佳条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 指示菌及发酵菌菌种来源 指示菌金黄色

葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*, 发酵试验菌地衣芽孢杆菌 *B. licheniformis* 均由重庆师范大学应用微生物研究所提供。

1.1.2 培养基成分 ①固体培养基。下层培养基:牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、氯化钠 5 g、琼脂 20 g、H<sub>2</sub>O 1 000 mL、pH7.2、121℃灭菌 30 min。上层培养基:牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、氯化钠 5 g、琼脂 8 g、H<sub>2</sub>O 1000 mL、pH7.2、121℃灭菌 30 min。②蛋白胨水培养基。牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、氯化钠 5 g、琼脂 20 g、H<sub>2</sub>O 1 000 mL、pH7.5。

1.1.3 杆菌肽标准品 美国 Sigma-Aldrich 有限公司购得。

1.1.4 设备 离心机(湘仪),电子天平 JA-FA9 (FA1004A),多功能微生物自动测量仪(ZY-300IV),高压灭菌锅,酸度计 pH5-2C,培养皿,牛津杯,振荡培养箱,生化培养箱 HSP-1500,细菌过滤

\* 收稿日期 2006-03-16

作者简介:雷波(1977-)男,重庆人,硕士研究生,研究方向为现代生物教育及技术。

器,Pipette 取液器(北京青云)。

## 1.2 方法

1.2.1 杆菌肽的制备 将地衣芽孢杆菌接种于装有 100 mL 豆芽汁培养基中振荡培养,37℃ 发酵 48 h<sup>[1]</sup>,离心后用细菌过滤器除菌即得杆菌肽发酵液。

1.2.2 指示菌的活化与菌悬液的制备 将葡萄球菌接种于牛肉膏蛋白胨上,活化培养 24 h 后用 5 mL 无菌水将菌苔洗入到 95 mL 带玻璃珠的无菌水中,把指示菌制成  $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$  cfu/mL 不同浓度的菌悬液。

1.2.3 抑菌圈的测定<sup>[3]</sup> 采用不同上下层培养基的厚度,加入同一发酵液测定抑菌圈的大小,同时采用不同 pH 的上层培养基,加入同一发酵液测定抑菌圈的大小,再采用不同浓度的指示菌,加入同一发酵液测定抑菌圈的大小。

## 2 结果与讨论

### 2.1 培养基的厚度对抑菌圈的影响

下层 20 mL 不变,上层分别取 5、7.5、10、12.5、15 mL 与下层 10 mL 不变,上层分别取 5、7.5、10、12.5、15 mL 两种处理进行比较,其结果如图 1。

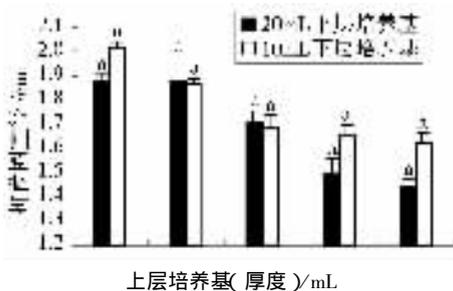


图1 培养基厚度对抑菌圈的影响

从图 1 可看出两种条件下都是上层量越少抑菌圈越大,上层量为 5 mL 的与 10 mL 后的差异显著。说明杆菌肽在牛津杯中的球形扩散过程中,上层培养基越薄,越有利于杆菌肽的横向扩散,以及培养基越薄,指示菌数相对更少一些,故而抑菌圈大。由于上层量为 5 mL 不容易铺满上层,并且冷却快,未铺平就凝固了,所以在添加上下层时最好将环境温度升高一些。所以可以根据情况,在不需要低计量效价测定时可选用上层 7.5 mL 到 10 mL。需要低计量效价测定时选用上层 5 mL。同时,下层为 10 mL 的普遍比下层 20 mL 效果好。考虑到节省材料和更好效果,下层的量 10 mL 较好,既可起到支撑作用,又可节省药品。

### 2.2 上层培养基 pH 对抑菌圈的影响

分别配制 4 种 pH 为 6.5、7.0、7.5、8.04 的上层

培养基,进行抑菌圈的大小测定试验,结果如图 2。

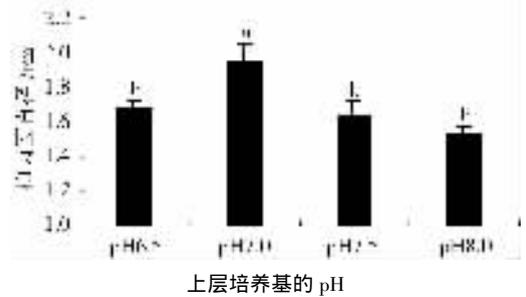


图2 上层培养基的 pH 对抑菌圈的影响

从图 2 可知,当上层培养基 pH 为 7.0 时,抑菌圈的直径最大,并与 pH6.5、pH7.5、pH8.0 差异显著。说明上层培养基的 pH 对抑菌圈的直径有影响。这可能与该菌最适 pH 和杆菌肽的稳定性有关,因为该菌的生长条件中,最适生长的是 pH7.4。当 pH7.0 时,既避开了该菌的最适生长 pH 值,此时的酸碱度又对杆菌肽的稳定性影响最小。

### 2.3 不同蛋白胨的影响

通过实验表明,下层培养基对测定结果的影响较小,上层培养基对测定结果的影响较大,上层培养基的蛋白胨分别用骨蛋白胨、鱼蛋白胨、胰酪蛋白胨、大豆蛋白胨、肉蛋白胨配牛肉膏蛋白胨培养基,结果如图 3。

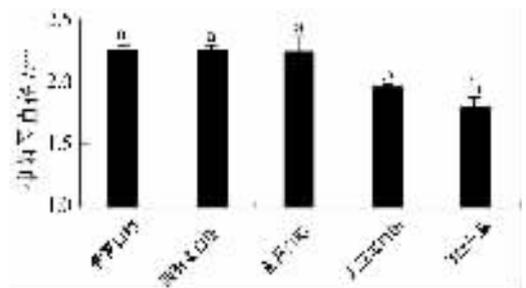


图3 不同蛋白胨的影响

从图 3 可知,骨蛋白胨、鱼蛋白胨、胰酪蛋白胨,抑菌圈较大,且差异不大;大豆蛋白胨、肉蛋白胨效果较差。说明不同上层蛋白胨培养基,对管碟法抑菌圈的大小有影响,从而影响效价的测定。

### 2.4 实验指示菌浓度对抑菌圈的影响

本研究采用金黄色葡萄球菌作指示菌,把菌悬液分别稀释为  $10^6$  (抑菌圈不明显)、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$  cfu/mL 不同浓度的菌悬液,然后按照 1 mL/dL 分别加入到 100 mL 上层培养基中,实验结果如图 4。

从图 4 可知,指示菌浓度的影响对抑菌圈的大小影响非常显著,浓度越高抑菌圈越小,当菌悬液稀释到  $10^{-2}$  和  $10^{-3}$  时抑菌圈直径较大,都与  $10^{-1}$  的差异显著,与原液差异极显著。但由于菌数  $10^{-3}$  太少,有的边缘已不太明显,并且它与稀释到  $10^{-2}$  的抑菌圈

直径差异不明显,因此稀释到 $10^{-2}$ 时(此浓度的菌悬液用平板活菌计数法计数得 $10^8$  cfu/mL),所得的抑菌圈效果最好。这可能是由于指示菌浓度过大,菌数太多,直接影响抑菌作用;而被抑制的菌数太少,抑菌圈边缘就不整齐,甚至显示不出来。

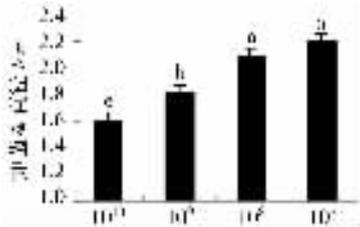


图4 指示菌浓度的影响

### 3 结论

综上所述,管碟法测定中,培养基的厚度,酸碱度及指示菌浓度,以及不同的蛋白胨对抑菌圈的大小都有显著影响。其最佳条件是:上层培养基的蛋白胨以骨蛋白胨、鱼蛋白胨、胰酪蛋白胨较好,培养基厚度为下层10 mL,对于微量杆菌肽的测定,上层培养基用5 mL的薄层法最好;上层培养基为pH7.0;指示菌浓度为 $10^8$  cfu/mL。在上述条件下,发酵液抑菌圈的平均直径最大为2.26 cm。

致谢:本文得到胡尚勤教授的悉心指导,在此表示感谢!

### 参考文献:

- [1] 胡尚勤. 地衣杆菌抗生素的发酵及效价测定[J]. 重庆师范大学学报, 2004, 21(4): 64-67.
- [2] VELMURUGU R, DONALD T. Performance and Welfare of Broilers as Affected by Stocking Density and Zinc Bacitracin Supplementation[J]. Animal Science Journal, 2006, 77(1): 110-116.
- [3] ANDREWS J. M. and the BSAC Working Party on Susceptibility Testing BSAC Standardized Disc Susceptibility Testing Method[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2001, 48: 43-57.
- [4] HUYS G, HAENE K D, SWINGS J. Influence of the Culture Medium on Antibiotic Susceptibility Testing of Food-associated Lactic Acid Bacteria with the Agar Overlay Disc Diffusion Method[J]. J Letters in Applied Microbiology, 2002, 34(6): 402-406.
- [5] ALP M M, KOCABAGLI R, KAHRAMAN K. Effects of Dietary Supplementation with Organic Acids and Zinc Bacitracin on Ileal Microflora, pH and Performance in Broilers[J]. J of Veterinary and Animal Sciences, 1999, 23: 451-455.
- [6] 张玫, 袁耀佐. 管碟法与 HPLC 法测定盐酸环丙沙星软膏的比较[J]. 中国现代药学杂志, 2001, 18(3): 215-216.

(责任编辑 许文昌)