

## 有关杯碟法测定壮观霉素灵敏度的影响因素

徐宝梁 李瑾 马颖

(中国进出口商品检验技术研究所 北京 100025)

**摘要** 通过对菌种、培养基种类及 pH、缓冲液种类及 pH、培养温度、添加葡萄糖和吐温等因素的研究,确定了壮观霉素测定条件,使其测定灵敏度达  $0.4 \times 10^{-6}$ 。

**关键词** 杯碟法,壮观霉素,灵敏度,影响因素

壮观霉素是一种广谱抗菌素,用于治疗淋球菌和鸡的支原体感染。抗菌素的微生物学检测,常用的方法是杯碟法。应用杯碟法测定壮观霉素效价,根据现有资料,灵敏度可达  $1.3 \times 10^{-6}$ <sup>[1]</sup>。美国分析化学家协会应用杯碟法对饲料中的壮观霉素残留进行了分析,灵敏度为  $2.8 \times 10^{-6}$ <sup>[2]</sup>。我们对壮观霉素的检测作了下述研究,为壮观霉素效价的进一步测定和食品中残留分析打下了一定的基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:**克雷伯氏肺炎杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*), 菌株号为 46114-7, 代号 K, 由卫生部药品生物制品检定所提供;大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*), 菌株号为 I543.44102, 无编号, 代号为 E1、E2、E3, 分别由中科院微生物所、中国商检所、农业部植检所提供;金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*), 菌株号为 26112-3.743SEA, 代号为 S1、S2, 由中国商检所提供。

**1.1.2 试剂:**壮观霉素标准品, sigma 生产, 分析纯。胰蛋白胨、牛肉浸出粉、酵母浸出粉由陆桥商检新技术公司生产, 琼脂粉为日本进口分装产品, 其它试剂均为分析纯。

#### 1.2 方法

**1.2.1 培养基:**根据文献资料配制培养基 S<sup>[1]</sup>、A<sup>[2]</sup>、Z<sup>[3]</sup>。SG: S 培养基中含有 0.2% 葡萄糖,

pH8.6。

**1.2.2 缓冲液:**W: 蒸馏水; P: 0.2mol / L 磷酸缓冲液<sup>[4]</sup>; B: 0.2mol / L 巴比妥缓冲液<sup>[4]</sup>; C: 醋酸缓冲液; 磷酸 3.92g, 醋酸 2.4g, 硼酸 2.48g 溶解于蒸馏水中定容至 1000ml, 取该液 40ml, 加入适量的 0.2mol / L 氢氧化钠至一定 pH。

**1.2.3 杯碟法:**一般情况下为单层琼脂<sup>[5]</sup>, 5ml, 双层琼脂时指明<sup>[6]</sup>。一般情况下 26℃ 培养; 即加完标准液的培养皿在 4℃ 冰箱中放置 2h, 26℃ 培养 16h; 20℃ 培养时指明: 即加完标准液的培养皿在 20℃ 下培养 12h, 然后在 36℃ 下培养 4h。

**1.2.4 结果记载:**记录抑菌斑直径, 以 mm 表示, 当抑菌斑直径小于 10mm 时, 呈阴性反应, 用 - 表示。记录抑菌斑清晰度, a 表示很清晰, b 表示清晰, c 表示尚清晰, d 表示不清晰。

### 2 结果与分析

#### 2.1 菌种

S 培养基, 双层琼脂, 2% 菌种浓度, 以蒸馏水配制  $10 \times 10^{-6}$  (W-10)、 $5 \times 10^{-6}$  (W-5) 壮观霉素标准液, 以 pH8.0 磷酸缓冲液配制  $10 \times 10^{-6}$  (P-10)、 $5 \times 10^{-6}$  (P-5) 壮观霉素标准液, 不同菌种的抑菌斑直径和清晰度见表 1。E3、S1 和 S2 对  $10 \times 10^{-6}$  和  $5 \times 10^{-6}$  标准液的反应都为阴性。E1 和 E2 对  $10 \times 10^{-6}$  标准液的反应为阳性,

而对  $5 \times 10^{-6}$  标准液的反应为阴性。K 对壮观霉素较为敏感, 当标准液为  $10 \times 10^{-6}$  时, 抑菌斑直径可达 17mm 以上, 标准液为  $5 \times 10^{-6}$  时, 抑菌斑直径为 12mm 以上, 因而选用克雷伯氏肺炎杆菌作为指示菌。

表1 菌种对壮观霉素的敏感性 (抑菌圈直径: mm)

标准液	K	E1	E2	E3	S1	S2
W-10	17.22a	12.87a	13.39a	—	—	—
W-5	12.86b	—	—	—	—	—
P-10	17.66a	13.31a	13.02a	—	—	—
P-5	12.54b	—	—	—	—	—

## 2.2 培养基和缓冲液

**2.2.1 培养基种类:** 三种培养基 S、Z、A, 双层琼脂, 用蒸馏水配制  $5 \times 10^{-6}$  和  $1 \times 10^{-6}$  标准液, 用 pH8.0 磷酸缓冲液配制  $1 \times 10^{-6}$  标准液。结果在相应的培养基上, 用蒸馏水配制的  $5 \times 10^{-6}$  标准液, 抑菌斑直径 (mm) 和清晰度分别为 12.39c、11.02c、12.23d; 用蒸馏水配制的  $1 \times 10^{-6}$  标准液, 抑菌结果为阴性; 用磷酸缓冲液配制的标准液, 抑菌斑直径 (mm) 和清晰度分别为 11.75c、11.25c、11.66c。由此可知, 在这三种培养基中, 其抑菌斑直径大小顺序为  $S > A > Z$ , 清晰度顺序为  $S、Z > A$ , 因而选用 S 作为检定用培养基。在同样条件下, 单层琼脂培养法产生的抑菌斑直径比双层琼脂培养法的大, 即单层琼脂培养法的测定灵敏度高, 由于本试验中,  $1 \times 10^{-6}$  标准液在双层琼脂上所产生的抑菌结果为阴性或接近阴性, 因而在以后的试验中改而采用单层琼脂培养法。

**2.2.2 琼脂种类:** 用普通琼脂和电泳用纯化琼脂配制 S 培养基: 用 pH8.0 磷酸缓冲液配制  $5 \times 10^{-6}$  和  $1 \times 10^{-6}$  标准液, 用蒸馏水配制  $1 \times 10^{-6}$  标准液。结果用普通琼脂配制的培养基中, 相应标准液的抑菌斑直径 (mm) 和清晰度分别为 16.80a、11.03d、11.33b; 用纯化琼脂配制的培养基中, 相应标准液的抑菌斑直径 (mm) 和清晰度分别为 18.63a、10.49d、11.83b。由此知, 当标准液浓度为  $5 \times 10^{-6}$  时, 纯化琼脂优于普通琼脂; 而当标准液浓度为  $1 \times 10^{-6}$  时, 纯化琼脂和普通琼脂对抑菌效果的影响差异不大, 因而在试验

中采用普通琼脂。

**2.2.3 培养基 pH 和缓冲液 pH:** 配制不同 pH 浓度的 S 培养基, 用不同 pH 浓度醋酸缓冲液配制  $1 \times 10^{-6}$  标准液。结果见表 2。由于磷酸缓冲液的 pH 调节范围在 8.0 以下, 因而采用醋酸缓冲液配制不同 pH 的标准液进行试验。当培养基 pH 在 8.4~8.6 时, 抑菌斑直径较大, 当缓冲液 pH 在 8.4~8.8 时, 抑菌斑直径较大, 因而将培养基和缓冲液的 pH 都定在 8.6。当缓冲液 pH 为 8.0 时, 试验结果呈阴性, 在 pH8.2 的培养基上, 试验结果也呈阴性, 原因待查。

表2 不同pH的培养基和缓冲液对抑菌效果的影响 (抑菌圈直径: mm)

标准液 pH	培养基 pH					
	S8.0	S8.2	S8.4	S8.6	S8.8	S9.0
C8.0	—	—	—	—	—	—
C8.2	12.28d	—	13.65d	12.64d	11.93d	12.13d
C8.4	13.79d	—	14.45d	14.63d	12.71d	13.47d
C8.6	14.24d	—	14.23d	14.13d	13.98d	13.47d
C8.8	12.96d	—	14.27d	14.48d	13.48d	14.72d
C9.0	12.36d	—	13.29d	13.37d	13.67d	14.17d

**2.2.4 缓冲液种类:** S 培养基: 用 pH8.0 磷酸缓冲液配制  $5 \times 10^{-6}$  和  $1 \times 10^{-6}$  标准液, 用 pH8.6 醋酸缓冲液、pH8.6 巴比妥缓冲液、蒸馏水配制  $1 \times 10^{-6}$  标准液。结果相应的抑菌斑直径 (mm) 和清晰度分别为 17.49b、13.04d、15.12d、16.02d、12.14c。溶液中壮观霉素的降解作用能被缓冲液离子如磷酸盐、硼酸盐和碳酸盐所催化, 形成放线壮观菌酸。由于磷酸缓冲液含磷酸盐, 醋酸缓冲液含磷酸盐和硼酸盐, 因而增加了不含这些盐的巴比妥缓冲液。对于这些缓冲液, 其抑菌斑直径大小顺序为巴比妥缓冲液 > 醋酸缓冲液 > 磷酸缓冲液 > 蒸馏水, 表明用不同缓冲液配制的标准液, 其抑菌效果是不一样的, 这可能和壮观霉素在不同缓冲液中的稳定性有关; 蒸馏水的抑菌斑直径较小, 但其清晰度却相对要好些, 因而在最终灵敏度测定时, 选用蒸馏水作稀释液, 配制标准液。

## 2.3 培养温度

S 培养基, pH8.6。用 pH8.0 磷酸缓冲液、pH8.6 醋酸缓冲液、pH8.6 巴比妥缓冲液、蒸馏

水配制  $1 \times 10^{-6}$  标准液。24℃、26℃ 培养。结果在 26℃ 培养下, 相应标准液的抑菌斑直径 (mm) 和清晰度分别为 12.69d、14.47d、14.29d、11.30b; 在 24℃ 培养下, 相应标准液的抑菌斑直径 (mm) 和清晰度分别为 14.71d、16.10d、13.35d、14.17c。由此知, 磷酸缓冲液、醋酸缓冲液、蒸馏水配制的标准液, 在低温培养下, 抑菌斑直径均有所增加, 尤其是蒸馏水配制的标准液, 抑菌斑直径增加较为明显, 但其清晰度有所降低。在试验中, 还采用了更低的温度 20℃ 培养, 发现抑菌斑直径进一步增加, 因而在以后试验中培养温度定为 20℃。

## 2.4 葡萄糖和吐温的作用

**2.4.1 葡萄糖:** S 培养基, pH8.6; SG 培养基。用 pH8.0 磷酸缓冲液、pH8.6 醋酸缓冲液、pH8.6 巴比妥缓冲液、蒸馏水配制  $1 \times 10^{-6}$  的标准液。结果在 S 培养基上, 相应标准液的抑菌斑直径 (mm) 和清晰度分别为 12.69d、14.47d、14.29d、11.30b; 在 SG 培养基上, 相应标准液的抑菌斑直径 (mm) 和清晰度分别为 12.86b、17.43b、16.06b、13.07a。由此知, 在 S 培养基中加入 0.2% 葡萄糖后, 抑菌斑直径明显增加, 清晰度变好。

**2.4.2 吐温:** S 培养基, pH8.6, 内含 0.3%、0.6%、1.2%、2.4% 吐温 80。用蒸馏水和含有 0.6% 吐温 80 的蒸馏水配制  $1 \times 10^{-6}$  标准液, 20℃ 培养。结果在相应吐温浓度的培养基上, 用蒸馏水配制的标准液, 抑菌斑直径 (mm) 和清晰度分别为 12.27b、11.72b、13.46b、13.15b; 用含有 0.6% 吐温 80 的蒸馏水配制的标准液, 抑菌斑直径 (mm) 和清晰度分别为 11.69b、12.19b、14.10c、12.80b。由此知, 培养基中加入适量吐温后, 抑菌斑直径有所增加, 并且清晰度不变, 加入吐温的浓度以 1.2% 为宜; 在稀释液中加入一定量的吐温, 对抑菌斑直径的影响不大。

## 2.5 测定灵敏度的确定

通过上述研究, 认为在下述条件下能取得较灵敏的测定结果: 2%K 菌; SG 培养基, 吐温 80 浓度 1.2%; 蒸馏水作稀释液; 20℃ 培养。结果表明, 当标准液浓度为 0.2、0.3、0.4、0.5、 $1.0 \times 10^{-6}$  时, 其相应抑菌斑直径 (mm) 为 7.43、

8.87、11.68、13.55、16.72, 清晰度均为 b, 因而认为应用该方法测定壮观霉素的灵敏度为  $0.4 \times 10^{-6}$ , 即当壮观霉素浓度为  $0.4 \times 10^{-6}$  时, 测定结果呈阳性, 抑菌斑直径大于 10mm。

## 3 讨论

应用微生物测定抗菌素的影响因素很多<sup>[7]</sup>, 本研究中, 探索了以下因素对测定结果的影响: 菌种、培养基种类及 pH、琼脂种类、缓冲液种类及 pH、培养温度、添加葡萄糖<sup>[8]</sup>和吐温<sup>[7]</sup>。其中菌种种类、培养基种类及 pH、缓冲液种类及 pH、培养温度、葡萄糖和吐温的加入量显著地影响抑菌斑的直径和清晰度。

在研究过程中, 采用了文献中认为比较灵敏的三种细菌, 即克雷伯氏肺炎杆菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌, 以克雷伯氏肺炎杆菌最为灵敏。三种培养基中, 有中国药典采用的培养基、有 AOAC 采用的培养基、有链霉素检定培养基, 以链霉素检定培养基为好。中国药典采用的培养基和链霉素检定培养基的 pH 为 8.0, 而 AOAC 采用的培养基 pH 为 9.0, 我们发现, 培养基 pH 以 8.4~8.6 为好, 因而将检定培养基的 pH 改为 8.6。在有关文献中, 稀释标准品的缓冲液多用 pH8.0 的磷酸缓冲液, 而我们在试验中发现, 以 pH8.6 的巴比妥缓冲液和醋酸缓冲液为好, 其抑菌斑直径明显大于磷酸缓冲液; 但用缓冲液配制的标准液, 其抑菌斑清晰度不够, 而用蒸馏水配制的标准液, 其抑菌斑清晰度明显比缓冲液好。壮观霉素在碱性溶液中显示活性, 但也易降解而失活, 并且缓冲液中的盐类如磷酸盐、硼酸盐、碳酸盐可催化降解作用, 因此缓冲液种类和 pH 对抑菌斑直径和清晰度的影响较大。文献中的培养温度有定 32℃ 的, 也有定 26℃ 的, 培养温度适合指示菌生长, 则清晰度好, 但抑菌斑直径小; 当要增加测定灵敏度时, 以低温培养为宜, 低温培养时, 可以延长抑菌斑出现时间, 从而延长了抗菌素在培养基中的扩散时间, 使得抑菌斑直径增大, 因此本研究中采用了 20℃ 低温培养法。有文献认为, 在培养基中添加适量葡萄糖, 可增加抑菌斑的清晰

度,我们经过试验发现,培养基中添加适量的葡萄糖后,除能增加抑菌斑的清晰度外,还可增加抑菌斑的直径。在培养基中加入适量的吐温,可以增加抗生素在培养基中的扩散速度,在一定程度上能增加抑菌斑直径,但在稀释标准品的稀释液中添加吐温,则对抑菌斑直径的影响不大。经过这些研究,使得杯碟法测定壮观霉素的灵敏度达  $0.4 \times 10^{-6}$ ,比文献记载的要灵敏,为进一步的效价测定和食品中壮观霉素残留检测打下了一定的基础。

### 参 考 文 献

[1] Mason D J, Sokolski W T, Clapp H W. Antimicrobial Agents and Chemotherapy-1961,1962,965~970.

[2] Neef A W, Barbiers A R, Miller C C *et al.* Journal of the AOAC, 1973, 6(4):834~839.

[3] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典第二部附录,北京:化学工业出版社,人民卫生出版社,1990,113.

[4] 尹光琳,战立克,赵根楠主编. 发酵工业全书,北京:中国医药科技出版社,1992,547~548.

[5] 石如彦,曹宗君,孟萍生等. 现代商检科技,1995,5(2):1~3.

[6] 郭行彦,熊宗贵,胡章勋. 抗生素生产工艺学,北京:化学工业出版社,1987,436.

[7] 张绪敏. 抗菌素微生物效价测定法,北京:人民卫生出版社,1963,76~105.

[8] Oliver T J, Goldstein A, Bower R R *et al* Antimicrobial agents and Chemotherapy-1961,1962,495~502.

## STUDY ON FACTORS EFFECTING THE SENSITIVITY IN ACTINOSPECTACIN DETECTION BY CYLINDE-PLATE METHOD

Xu Baoliang Li Jin Ma Ying

(China Import and Export Commodity Inspection Technology Institute, Beijing 100025)

**Abstract** Through the study of bacterial strains, medium and its pH, buffer and its pH, temperature of culture, adition of glucose and Tween-80, the conditions for detection of actinospectacin was fixed and the minimum level of detection is  $0.4 \times 10^{-6}$ .

**Keywords** Actinospectacin, Cylinde-plate methode, Sensitivity, Effecting factors