

#### 4.防霉剂的防霉性能评价试验法（2018 年度版）

##### 最小抑菌浓度测定法

##### MIC 测定法--琼脂平板稀释法

### 1 适用范围

本试验方法适用于防霉剂。

### 2 试验菌种<sup>1</sup>

- (1) 黑曲霉 NBRC 105649
- (2) 嗜松青霉 NBRC 6345

### 3 试验准备

一般情况下，试验中使用的化学药品和器具应为日本工业标准以及日本药典中指定的化学药品和器具。

#### 3.1 器具、仪器

- (1) 玻璃试管(长 170 ~ 200mm，外径 18mm)
- (2) 灭菌培养皿(内径 80 ~ 100mm，高 15 ~ 25mm)
- (3) 恒温器（精度在±1℃以内的机型）
- (4) 移液管（牛奶移液管、容量为 1 ml 和 10 ml 以上的刻度移液管或自动移液器）
- (5) 天平（化学天秤）
- (6) 高压灭菌器
- (7) 显微镜（光学显微镜）
- (8) pH 计
- (9) 白金环

---

#### 备注<sup>1</sup>

参考 JIS Z 2911 等资料，选择在防霉性能评价试验中常用的黑曲霉和具有天然耐药性的嗜松青霉作为试验菌种。

以上记载的 2 个菌种都是中湿性霉菌，因此根据用途不同，最好同时使用高渗散囊菌、帚状曲霉等好干性霉菌，出芽短梗霉等好湿性霉菌，以及球毛壳霉、绿木霉等纤维素分解菌等作为试验菌种。

### 3.2 培养基

#### (1) 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA 培养基)

马铃薯提取液	200 g
葡萄糖	20 g
琼脂	15 g
精制水	1000 ml
	pH 5.6±0.2

#### (2) 葡萄糖蛋白胨 (GP 培养基)

葡萄糖	20.0 g
酵母提取物	2.0 g
硫酸镁	0.5 g
蛋白胨	5.0 g
磷酸二氢钾	1.0 g
精制水	1000 ml
	pH 5.7±0.1

#### (3) 琥珀酸二甲基钠溶液<sup>1</sup>

琥珀酸二甲基钠	0.05 g
精制水	1000 ml

## 4 试验方法

### 4.1 试验菌的培养

将试验菌移植到 PDA 培养基，在  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  下培养 7~14 天。

### 4.2 接种用菌液的制备

将培养的试验菌的孢子悬浮在 0.005% 的琥珀酸二甲基钠溶液中，除去子实体·菌丝体后，用 GP 培养基稀释，制备浓度为  $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6/\text{ml}$  的孢子溶液<sup>2</sup>。

---

<sup>1</sup> 参考 JIS Z2911，选择 0.005% 的琥珀酸二甲基钠溶液作为润滑剂。

<sup>2</sup> 日本化学疗法学会的琼脂平板稀释法中试验菌种为细菌，菌液浓度为  $10^6/\text{ml}$ 。而在该试验方法中，试验菌种是霉菌，由于霉菌孢子比细菌大，因此将浓度降低一个数量级，设置为  $1.0 \times 10^5$  至  $1.0 \times 10^6/\text{ml}$ 。

#### 4.3 试验液的制备

将试样溶解在精制水、乙醇或 DMSO 等溶剂中，进行乳化、悬浊·稀释，并以 800 μg/ml 为基准依次制备 2 倍或 1/2 稀释液作为试验液。另外，通过阶段稀释制备试验液时需使用同一溶剂。

#### 4.4 感受性测定用平板及对照试验用平板的配置

分别在灭菌并冷却到 50~60℃ 的「GP 培养基--1.5 % 琼脂添加」中加入 1/9 量的各试验溶液，充分混合后，在培养皿中分注·凝固，作为感受性测定用平板。按照相同的步骤，准备未添加试验液的平板、以及仅加入了等量的用于制备试验液的溶剂的平板。将这两种平板作为对照试验用平板。

#### 4.5 试验操作

用镍铬合金线环（内径 1 mm）将接种用菌液在感受性测定用平板和 2 种对照试验用平板上进行画线，画线长度为 1cm，并在 25° C ± 1° C 下培养 7 天。

#### 4.6 判定

培养后，用肉眼观察感受性测定用平板上的试验菌有无生长，将试验菌未生长的最低浓度作为最小抑菌浓度。另外，在感受性测定用平板中，若有 2 个或以上<sup>2</sup>的连续菌落生长，即便菌落再微小也视为「生长」。

同时，用肉眼观察培养后的 2 种对照试验用平板，确认霉菌菌落发育良好。在菌落发育不良的情况下(菌落自身不发育，或只有微小菌落的发育等)，可更换溶剂的种类或更换试验液重的试料浓度，根据溶剂的特性减少培养基成分的添加量后再次进行试验<sup>3</sup>。

以上

---

<sup>1</sup>在日本化学疗法学会琼脂平板稀释法中，试验菌的画线长度为 2cm。但在本试验方法中，试验菌种是霉菌，而真菌(霉菌、酵母菌)的画线长度一般为 1cm，因此采用此长度。

<sup>2</sup>在日本化学疗法学会琼脂平板稀释法中，平板上有 5 个或以上的菌落生长，才称为「生长」但在本试验方法中，试验菌种为霉菌，只要有 2 个或以上的连续菌落生长，就认为是「生长」。

<sup>3</sup>当使用指定量（培养基量的 1/9）的乙醇或 DMSO 等有机溶剂时，霉菌的生长会受到明显抑制。例如，已证实通过添加少于 1/99 的乙醇和少于 1/19 的 DMSO 时，菌落可以充分生长。

改訂：2018 年 12 月 11 日

除非法律许可，否则在未经授权的情况下复制本文档的全部或部分即构成侵害著作权。

抗菌制品技术协议会