

## 研究课题

潮湿环境下普境安的抗菌活性

## MicroChem Laboratory 项目认证编号

在 1ml 的无菌的塑料培养皿中，细菌或真菌被标记，以模拟池水或尿液。用小瓶立即在 3 个培养皿分别撒上 0.365 g 的普境安标记，另外三个培养皿作为对照，不处理。混合后暴露 8 分钟、30 分钟、60 分钟、8 小时和 24 小时，培养皿侧倾斜，0.8-0.3 ml 被移出，放入 9ml 的中和介质中。将试管在涡流振荡器中搅拌了 30 秒，连续 10 倍稀释制成 1ml 溶液，并加入 9ml 的中和介质。将一个半 (0.5) ml 的稀释剂放置在培养皿中的营养琼脂上，在环境温度下检测 20 分钟时间内细菌或真菌的存活数量。

## 材料

普境安

微生物

营养液体培养基 (NB)

生产批号 2196531, 保质期 01/07

Difco Laboratories

Detroit, MI

营养琼脂 (NA)

生产批号 3183317, 保质期 05/08

Difco Laboratories

Dey Engley 液体培养液 (DE)

生产批号 3141414, 保质期 04/06

Difco Laboratories

甘氨酸

生产批号 02613CB, 保质期 06/06

Aldrich Chemical Company

Milwaukee, WI

消毒去离子水 (SDIW)

MicroChem Laboratory, Inc.  
Euless, TX

培养皿, 塑料, 一次性 15x100mm

Fox Scientific  
Alvarado, TX

恒温器  $35 \pm 2^\circ\text{C}$

蒸汽灭菌器, STM-E 模型

Market Forge

玻璃器皿:

试管架、闭合和支撑架

各种尺寸的烧杯和烧瓶

法国方瓶 (FSQB)

1ml、10ml、50ml 吸量管, 玻璃

VWR Scientific  
Sugarland, TX

镍铬合金线圈

Baxter Diagnostic, Inc.  
McGraw Park, IL

黑色签名记号笔

剪刀

涡流振荡器

Fisher Scientific

镊子

## 步骤

### 1. 细菌培养

试验所需的细菌来自美国标准菌库。将储备的细菌和真菌放在营养琼脂上保持在  $3 \pm 2^\circ\text{C}$ , 之后每月转移到新鲜的营养琼脂  $48 \pm 8$  小时, 温度为  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 。从储备的细菌中, 将一接种环量的细菌加入到 10ml 的营养液体培养基中, 并在  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  的条件下培养  $24 \pm 4$  小时。

将 100 倍的细菌稀释液制成 1ml 的培养液，加入 99ml 的营养液体培养基中。

## 2. 标注 2×2cm 的方形纸载体及培养皿

每一个无菌培养皿都使用无菌 1ml 的玻璃吸管，标记为 1ml 的培养液。

## 3. 普境安的应用

每个培养皿取 0.365g 用于试验组培养皿。普境安直接标记使用 1.6oz/10.5ft<sup>2</sup>。之后转换成 1ft<sup>2</sup>：1.6oz = 45.36g/10.5ft<sup>2</sup>

$$\frac{45.36\text{g}}{10.5\text{ft}^2} = \frac{\quad 1\text{ft}^2}{0.0929\text{m}^2} = 46.5 \text{ g/m}^2$$

然后计算培养皿的面积。A= (π) (r<sup>2</sup>)

$$A= 3.14(50)^2 = 7850\text{mm}^2$$

得出每个培养皿需要的普境安的用量。

$$\frac{46.5\text{g}}{1\text{m}^2} \times \frac{1\text{m}^2}{10^6\text{mm}^2} \times \frac{7850\text{mm}^2}{1} = 0.365\text{g/培养皿}$$

## 4. 混合物暴露于普境安后，检测存活的细菌与真菌的 CFU。

经过暴露后，将培养皿略微倾斜。用 1ml 的无菌玻璃吸管，从培养皿中取出 0.8-0.3ml，放入一个 9ml 的 DE 培养液试管中。试管在涡流搅拌器上搅拌 30 秒。将 1ml 10 倍稀释剂加入 9ml DE 培养液中。将每个稀释管的 1.5 倍，即 0.5ml 放置在培养皿中的营养琼脂 (NA) 上。将试管和培养皿在 35±2℃ 条件下培养 48±8 小时。菌落被记录并通过稀释因子相乘，以确定每个培养皿存活下来的 CFU。三个培养皿同等试验。

对于对照组，每个试验重复上述过程，以确定每个暴露时间中没有普境安作用时细菌或真菌的存活数量。

## 5. 计算普境安的杀死百分比

C = 对照组菌落形成单位

T = 试验组菌落形成单位

$$\text{试验 1: \%杀死} = \frac{C_0 - T_{48}}{C_0} \times 100$$

$$\text{试验 2 和 3: \%杀死} = \frac{C_0 - T_{20}}{C_0} \times 100$$

## 6. 中和反应可行性的验证

为了验证普境安的中和作用，两个无菌的培养皿被标记 1ml 的消毒去离子水，并且在培养皿中立即撒上 0.365g 的普境安。用无菌 1ml 的玻璃吸管，从培养皿中取出 0.45ml，放入 9ml 中和恢复培养基中。每根 1ml 稀释管中加入约 1000 个 CFU，每个 0.5ml 试管在培养皿中被镀上营养琼脂 (NA)。

对于对比数，将 1ml 10 倍稀释剂加入 9ml 的中和恢复介质管中。在培养皿中，每根 1ml 稀释管中加入约 1000 个 CFU，每个 0.5ml 试管被镀上营养琼脂 (NA)。