



普通高等教育“十三五”规划教材

· 水生动物医学专业教材 ·

张庆华 主编

# 水生动物病原微生物学实验

MICROBIOLOGY EXPERIMENT  
—— / FOR AQUATIC ANIMAL PATHOGENS / ——

非外借



科学出版社



普通高等教育“十三五”规划教材

水生动物医学专业系列教材

# 水生动物病原微生物学实验

张庆华 主 编

科学出版社

北 京

## 内 容 简 介

全书分三部分,第一部分为水生动物病原微生物学基本实验技术,第二部分为水生动物病原微生物学综合型和研究型实验,第三部分为水生动物病原微生物的免疫学检测。全书图文并茂,书后附有详细的附录和参考书目,供读者查阅和参考。

本书适合于高等院校水生动物医学、水产养殖、水族等专业及生命科学专业的本科生和研究生学习使用,也可供相关高校、科研院所、管理与生产单位从事教学、科研、生产和管理的人员查阅参考。

### 图书在版编目(CIP)数据

水生动物病原微生物学实验 / 张庆华主编. —北京: 科学出版社, 2018. 11

普通高等教育“十三五”规划教材. 水生动物医学专业系列教材

ISBN 978-7-03-059184-5

I. ①水... II. ①张... III. ①水生动物-动物疾病-病原微生物-实验-高等学校-教材 IV. ①S94-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 245274 号

责任编辑: 陈 露 / 责任校对: 谭宏宇  
责任印制: 黄晓鸣 / 封面设计: 殷 靓

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

南京展望文化发展有限公司排版

当纳利(上海)信息技术有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2018 年 11 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2018 年 11 月第一次印刷 印张: 9 1/2

字数: 250 000

定价: 40.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

# 《水生动物病原微生物学实验》编辑委员会

主 编 张庆华

副主编 郭 婧

编 委 (以姓氏笔画排序)  
张庆华(上海海洋大学)  
金 珊(宁波大学)  
郭 婧(上海海洋大学)  
黎睿君(大连海洋大学)

# 前 言

2013年3月,上海海洋大学获教育部批准设立国家控制布点的新专业——水生动物医学,专业代码:090604TK。该专业的设立,也是应农业农村部要求重点支持培育的特色优势专业,为国内首个水生动物疾病防控领域的本科专业。水生动物病原微生物学是该专业的专业基础课,2014年学校在对该专业核心课程进行梳理时,将《水生动物病原微生物学》列为核心课程群的课程之一,确定了该课程在水生动物医学专业中的重要地位。2015年遴选为校级重点课程建设项目,经过2年的建设,2017年又作为上海市重点课程建设项目,鉴于其对本科生在专业能力提升方面的重要作用,提出了加紧建设的要求,当下之急,是进行理论和实验教材的建设。承蒙学校和学院领导的大力支持,在2016年通过申报遴选获科学出版社“普通高等教育‘十三五’规划教材”的立项。在近2年的课程建设及教材编写过程中,编写及修订了新的实验教学大纲,调整了内容,编写《水生动物病原微生物学大实验讲义》,使该课程的内容既注重微生物学的基础技能的训练,又突出该专业的特色。

随着对执业兽医制度的大力推进,考虑到水生动物执业兽医人才的匮乏,2014年教育部又在大连海洋大学批准设立了水生动物医学专业,其他海洋、水产类高校也在积极筹备中。因此,针对新专业的教材编写迫在眉睫。为进一步提高本教材的质量和实用性,邀请了大连海洋大学水产与生命学院黎睿君博士和宁波大学海洋学院的金珊教授作为编委。本教材在充分保证学生扎实掌握普通微生物学实验的基础上,添加水生动物病原微生物学最核心的内容,既强调基础,又注重专业技能的培养和训练。另外,考虑到使用本教材的各高校对于学时数和免疫学技术的掌握不同,在前面两部分内容的基础上又增加了病原微生物的免疫学技术检测实验,可供条件成熟的高校选做,因此形成目前的三部分共24个实验。第一部分,水生动物病原微生物学基本实验技术,共13个实验。强调微生物学实验的基础,涵盖了显微镜使用、细菌的简单染色、鉴别染色,常见微生物的形态及菌落比较,微生物常用器材的洗涤、包装及灭菌以及培养基的制备等。在此基础上,循序渐进,进一步了解微生物纯种分离、移植与计数的方法,细菌的生长表现及运动力检查、细菌的生化试验、理化因子对微生物生长的影响、细菌药物敏感试验(K-B纸片扩散法)以及大肠杆菌生长曲线的制



作等。第二部分,水生动物病原微生物学综合型和研究型实验,共6个实验。吸取近年来在科研上及教学改革创新上的部分成果,体现目前最新研究热点。如利用造成弧菌病的病原——副溶血弧菌进行的细菌毒力的测定,即半数致死剂量的测定;利用科赫法则进行淡水鱼类常见的败血症的主要病原——嗜水气单胞菌和海水养殖的支柱产业之一的刺参腐皮综合症的病原——灿烂弧菌的人工感染及分离鉴定;对主要海水经济鱼类——大黄鱼体表及肠道菌群进行分离、鉴定及保藏;对白斑综合征病毒(WSSV)进行跨宿主感染试验及锦鲤疱疹病毒的细胞培养、人工感染及特异性PCR检测等。这些实验项目的设置,旨在让学生充分理解实验原理的基础上,解决生产实践中细菌和病毒性疾病感染的实际问题,牢固专业基础,开拓专业思想。第三部分,水生动物病原微生物的免疫学检测,共5个实验。将经典的免疫学检测技术,如凝集试验和沉淀试验以及逐步发展起来的酶联免疫吸附试验(ELISA)、荧光抗体技术以及免疫印迹等方法用于水生动物病原微生物的检测,体现了免疫学检测技术从诞生开始,在众多领域的实际应用效果突出,在水生动物病原微生物领域也不例外,相信将来也必将有更广泛的应用。综上所述,《水生动物病原微生物学实验》讲义在试用的过程中内容不断更新和完善,历经多次修改,终于完稿。

全书图文并茂,第一部分和第二部分的绝大多数实验项目中附有实验操作和实验结果的图片,方便大家理解具体的操作步骤和过程以及正确对照自己的实验结果。书后附有详细的附录和参考书目,供读者查阅和参考。本书适合于高等院校水生动物医学、水产养殖、水族等专业及生命科学专业的本科生和研究生学习使用,也可供相关高校、科研院所、管理与生产单位从事教学、科研、生产和管理的人员查阅参考。对于同行而言,也是一本有价值的参考书。

在编写过程中,得到上海海洋大学水产与生命学院领导及各参编单位及其领导的大力支持,硕士研究生周泽斌同学帮助进行了文字校对及部分插图的整理工作,在此一并表示感谢!

由于能力和水平有限,错误之处在所难免,恳请读者不吝赐教和批评指正。

编者

2018年5月

# 目 录

## 前言

### 第一部分 水生动物病原微生物学基本实验技术

实验一 显微镜的构造与使用 .....	3
实验二 细菌的涂片及简单染色法 .....	8
实验三 细菌的复杂(鉴别)染色法 .....	11
实验四 酵母菌的形态学观察及直接计数法 .....	18
实验五 细菌、放线菌、酵母菌、霉菌的形态及菌落观察 .....	21
实验六 常用器材的洗涤、包装和灭菌及培养基的制备 .....	25
实验七 细菌分离培养及移植 .....	31
实验八 微生物的纯种分离与活菌计数 .....	38
实验九 细菌在培养基中的生长表现及运动力检查 .....	41
实验十 细菌的生化试验 .....	45
实验十一 物理、化学因素对微生物生长的影响 .....	53
实验十二 细菌药物敏感试验(K-B 纸片扩散法) .....	58
实验十三 大肠杆菌生长曲线的制作 .....	60

### 第二部分 水生动物病原微生物学综合型和研究型实验

实验十四 副溶血弧菌对斑马鱼的半数致死剂量(LD <sub>50</sub> )测定 .....	65
实验十五 嗜水气单胞菌人工感染异育银鲫及病原菌的分离与鉴定 .....	69
实验十六 灿烂弧菌感染刺参及病原菌的分离与鉴定 .....	78



实验十七	大黄鱼体表、鳃及肠道菌群的分离、鉴定及保藏	81
实验十八	白斑综合征病毒(WSSV)的跨宿主感染试验	87
实验十九	锦鲤疱疹病毒的感染与鉴定	91

### 第三部分 水生动物病原微生物的免疫学检测

实验二十	凝集试验	97
实验二十一	沉淀试验	100
实验二十二	荧光抗体技术	102
实验二十三	酶联免疫吸附试验	105
实验二十四	免疫印迹法	108

## 附 录

附录一	常用培养基成分	113
附录二	染色液和试剂的配制	122
附录三	常用消毒剂表	126
附录四	市售常用浓酸、氨水密度及浓度	129
附录五	致病性嗜水气单胞菌检验程序	130
附录六	细菌的传统鉴定方法	131
附录七	测序菌株 BLAST 比对和进化树构建方法与步骤	132
附录八	细菌序列号(accession number)查询网址及方法	134
附录九	部分常用的菌种保藏机构名称	137
参考文献		139



# 第一部分

## 水生动物病原微生物学基本实验技术

第一部分,水生动物病原微生物学基本实验技术,共 13 个实验。强调微生物学实验的基础及无菌操作技术,涵盖了显微镜使用、细菌的简单染色、鉴别染色,常见微生物的形态及菌落比较,微生物常用器材的洗涤、包装及灭菌以及培养基的制备。在此基础上,循序渐进,进一步了解微生物纯种分离、移植与计数的方法,细菌的生长表现及运动力检查、细菌的生化试验、理化因子对微生物生长的影响、细菌药物敏感试验(K-B 纸片扩散法)以及大肠杆菌生长曲线的制作等。



# 实验一 显微镜的构造与使用

## 【实验目的】

1. 了解普通光学显微镜的基本构造和原理。
2. 掌握正确使用显微镜油镜的方法。

## 【实验内容】

1. 学习普通光学显微镜的基本构造和原理。
2. 使用普通光学显微镜的油镜观察细菌的基本形态。

## 【实验材料与仪器用品】

### 1. 实验材料

细菌标本：金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的封片标本。

二甲苯、香柏油等。

### 2. 仪器用品

普通光学显微镜、擦镜纸等。

## 【实验原理】

由于微生物个体微小，肉眼很难看到其个体形态特征，需要借助显微镜来研究微生物。被称为“微生物学之父”的荷兰科学家安东尼·列文虎克 (Antonie van Leeuwenhoek, 1632—1723) 发明了第一架单式显微镜，揭开了微生物世界的奥秘。随着科学技术的不断发展，显微镜的光源已从可见光扩展到紫外线；而非光源电子显微镜的发明，大大提高了显微镜的分辨率和放大率。利用显微镜，可以观察真菌、细菌、病毒及亚病毒的形态和构造。

除了暗视野显微镜和相差显微镜可用于直接观察活的细菌细胞外，其他普通光学显微镜主要用于观察染色后的细菌细胞。

### 1. 普通光学显微镜的基本构造

现代普通光学显微镜由目镜和物镜两组透镜系统来放大成像，因此属于复式显微镜。主要由机械装置和光学系统两大部分组成。

机械装置：镜座、镜臂、镜筒、物镜转换器、镜台、调焦装置。

光学系统：目镜、物镜、聚光器、反光镜。

#### (1) 目镜

目镜的功能是把经物镜放大的物相再次放大。目镜的放大倍数有 5x、10x、15x。

#### (2) 物镜

物镜有低倍 (4x, 10x)、中倍 (20x)、高倍 (40~65x) 和油镜 (90x~100x)。油镜上刻有



“OI”或“HI”字样,也有一圈红线或黑线为标记。

### (3) 聚光器

聚光器起汇聚光线的作用,可上下移动。用低倍镜时聚光器应下降,当用油镜时聚光器应升到最高位置。聚光器下方有可变光圈,用以调节光强度和数值孔径 NA。在观察较透明的标本时,应缩小光圈,分辨率虽有下降,但增加反差。

### (4) 反光镜

反光镜的功能是采集光线,并将光线射向聚光器。反光镜有平、凹两面,光源较弱时用凹面。

## 2. 普通光学显微镜的使用原理

在显微镜的光学系统中,物镜的性能最为关键,直接影响显微镜的分辨率。普通光学显微镜通常配置低倍(4x, 10x)、中倍(20x)、高倍(40~65x)和油镜(90x, 100x)四种物镜,其中以油镜的放大倍数最高,对微生物学研究最为重要。与其他物镜相比,油镜的使用方法比较特殊,需要在载玻片和镜头之间加香柏油,用以增加照明亮度和显微镜的分辨率。

油镜的放大倍数可达 100 倍,焦距短,直径小,所需要的光照强度大。承载标本的玻璃片透过来的光线,因介质密度的差异(从玻片进入空气,再进入镜头)造成有些光线因折射和全反射不能进入镜头,因射入的光线较少,物像会显现不清。所以,为了减少光线的损失,在使用油镜时必须在油镜与玻片之间加入与玻璃的折射率( $n = 1.55$ )相仿的镜油,如香柏油(其折射率  $n = 1.52$ )。由此可见,香柏油可以增加照明亮度。

显微镜的分辨率(resolution)或分辨力(resolving power)是指显微镜能辨别两点之间的最小距离的能力,最小分辨距离( $D$ )越小,分辨率越高。从物理学角度看,光学显微镜的最小分辨距离受光的干涉现象及所用的物镜性能的限制,可表示为:

$$D = 0.61\lambda/NA \quad (\lambda: \text{入射光波长}, NA: \text{物镜数值孔径})$$

光学显微镜的光源为可见光,波长范围在  $0.4 \sim 0.7 \mu\text{m}$ ,而数值孔径值取决于物镜的镜口角和玻片与物镜间介质的折射率,可表示为

$$NA = n\sin(\alpha/2) \quad (n: \text{物镜与标本间介质的折射率}, \alpha: \text{镜口角})$$

镜口角取决于物镜的直径和工作距离,一般来说,在实际应用中物镜的镜口角最大只能达到  $120^\circ$ 。由于香柏油的折射率(1.52)比空气(1.00)和水的折射率(1.33)要高,因此以香柏油作为镜头与玻片之间介质的油镜所能达到的数值孔径值( $NA$ 一般在  $1.2 \sim 1.4$ )要高于低倍镜、高倍镜( $NA$ 值都低于 1.0)。若以可见光的平均波长  $0.55 \mu\text{m}$  来计算,数值孔径通常在 0.65 左右的高倍镜只能分辨出距离不小于  $0.4 \mu\text{m}$  的物体,而油镜的分辨率却可达  $0.2 \mu\text{m}$  左右。由此可见,香柏油可以增加分辨率。

以下照片分别是尼康光学显微镜(Nikon YS100)的正面观(图 1-1)、侧面观(图 1-2)和背面观(图 1-3)。

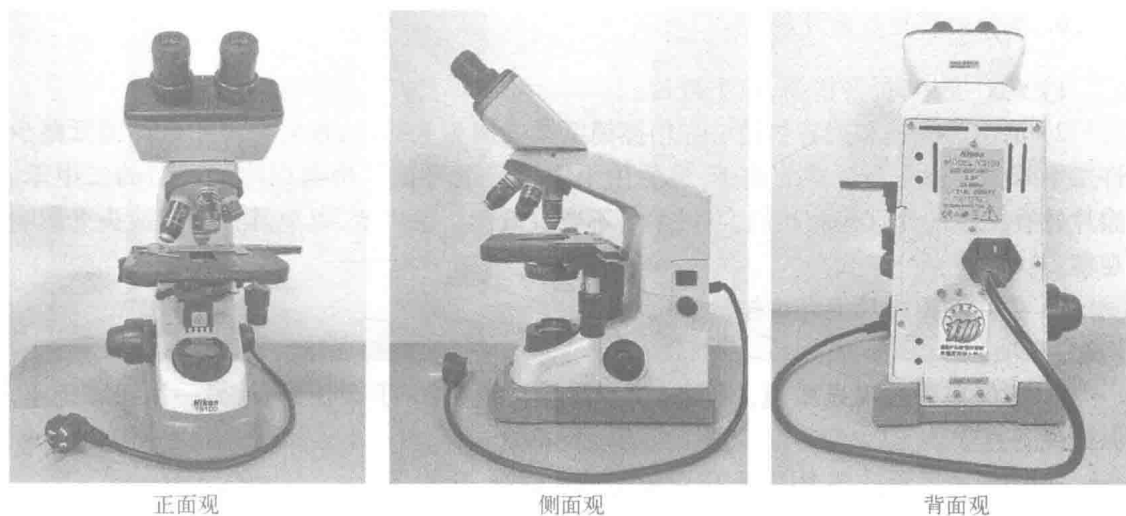


图 1-1 Nikon YS100 光学显微镜

### 【实验方法】

普通光学显微镜的使用主要包括调节光源、放置标本、调焦和观察(低倍、高倍和油镜)、显微镜用后的处理等四个环节。

#### 1. 调节光源

- 1) 将低倍镜转到工作位置,上升聚光器,将可变光圈完全打开,转动反光镜采光。
- 2) 调节聚光器和物镜数值孔径相一致。

#### 2. 放置标本

上升镜筒,放置好标本,再降下低倍物镜,使其下端接近于玻片。

#### 3. 调焦和观察

- 1) 先转动粗调节螺旋,逐渐上升镜筒直到看见模糊物像。
- 2) 再转动细调节螺旋,直至物像清晰为止。

#### 4. 用高倍镜观察

- 1) 在低倍镜下寻找视野。
- 2) 转换高倍镜。
- 3) 调焦并观察。

#### 5. 用油镜观察细菌

- 1) 放置标本,然后在低倍镜下寻找合适的视野。
- 2) 换油镜、调节聚光器与油镜数值孔径相一致。
- 3) 加香柏油、调焦并观察。



## 6. 显微镜用毕后的处理

1) 观察完毕,提升镜筒,取下玻片。

2) 清洁显微镜和搁置物镜。先用擦镜纸拭去镜头上的油,接着用另一张擦镜纸蘸少许二甲苯擦去镜头上残留的油迹,最后用干净擦镜纸再擦拭两遍以除去残留的二甲苯。涂片处香柏油的处理与此相同。(注意:不要过量使用二甲苯,以免其残留在镜头上影响观察。)

3) 去除细菌涂片上的香柏油。

### 【注意事项】

1. 切勿单手拎提显微镜,搬动时须双手抱在胸前,一手握住镜臂,另一手托着镜座,保持镜身直立。

2. 切忌用手涂抹各个镜面,以免镜面沾上油渍、汗渍等。

3. 用二甲苯擦镜头时,用量要少,不宜久抹,以防透镜上的树脂被溶解。

4. 切勿用乙醇擦镜头和支架。

5. 油镜的工作距离很短,操作时要谨慎,切忌用眼睛对着目镜边观察边下降镜筒,以免油镜头压碎玻片,导致油镜头刮划受损,应从显微镜的侧面用眼睛观察,缓缓下降镜筒,然后小心地寻找观察视野。

### 【实验报告】

根据观察结果,绘制金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)的形态图,并描述其形态特点。

### 【思考题】

1. 用油镜观察时应注意哪些问题?

2. 在载玻片和镜头之间滴加香柏油有什么作用?

3. 影响显微镜分辨率的因素有哪些?

4. 如何根据所观察的微生物大小选择合适的物镜进行有效的观察?

### 【细菌的油镜观察实例】

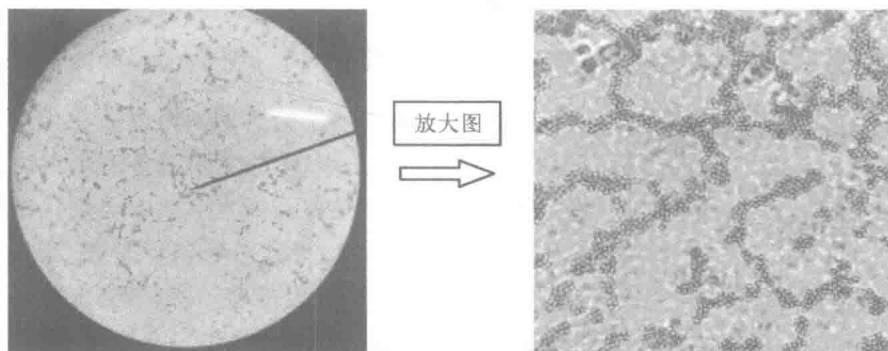
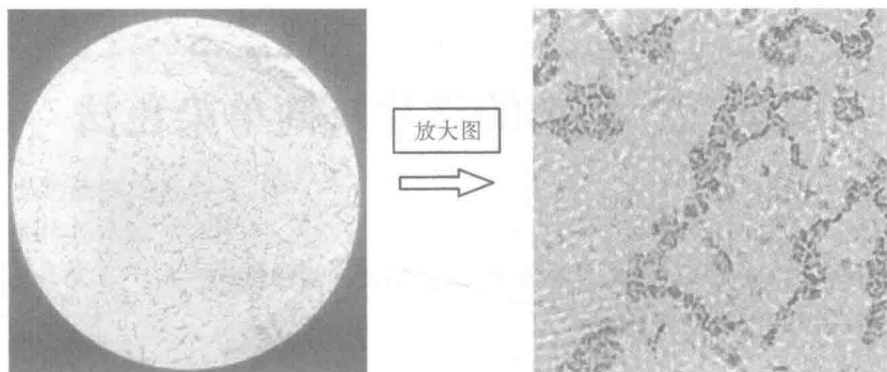


图 1-2 金黄色葡萄球菌(球状)



扫一扫看彩图



扫一扫看彩图

图 1-3 大肠杆菌(杆状)

## 实验二 细菌的涂片及简单染色法

### 【实验目的】

1. 学习微生物涂片、染色的基本技术,掌握细菌的简单染色法。
2. 初步认识细菌的形态特征。
3. 巩固显微镜(油镜)的使用方法和无菌操作技术。

### 【实验内容】

1. 蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的简单染色。
2. 普通光学显微镜下蜡状芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌的形态观察。

### 【实验材料与仪器用品】

#### 1. 实验材料

菌株:蜡状芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌(12~18 h 营养琼脂斜面培养物)。

#### 2. 仪器用品

普通光学显微镜、酒精灯、载玻片、接种环、香柏油、二甲苯、擦镜纸、吸水纸和玻片搁架等;吕氏碱性美蓝染液(或石炭酸复红染液)。

### 【实验原理】

#### 1. 简单染色法

细菌的染色方法分为简单染色法(又称一般染色法)和复杂染色法(又称特殊染色法或鉴别染色法)两大类。简单染色法是利用单一染料对细菌进行染色。细菌细胞小而透明,在普通光学显微镜下不易识别,只有在染色后与背景形成明显的色差,从而观察到细菌的形态,适用于菌体一般形状和细菌排列的观察。

#### 2. 生物染色染料

用于生物染色的染料主要有碱性染料、酸性染料和中性染料三大类。

常用碱性染料进行简单染色,主要因为细菌蛋白质等电点较低,当它生长于中性、碱性或弱酸性的培养基中时常常带负电荷,而碱性染料在电离时,其分子的染色部分带正电荷(酸性染料电离时,其分子的染色部分带负电荷),因此碱性染料(如美蓝、结晶紫、碱性复红或孔雀石绿等)染色部分很容易与细菌结合使细菌着色,便于细菌形态结构的观察。

当细菌分解糖类产酸使培养基 pH 下降时,细菌所带正电荷增加,此时可用酸性染料(如伊红、酸性复红或刚果红等)进行染色。

中性染料是两者的中和,又称为复合染料,常见的有伊红美蓝、伊红天青等。





### 【实验方法】

简单染色法主要包括涂片、干燥、固定、染色、水洗、干燥、镜检、清理等步骤。

#### 1. 涂片

取洁净无油腻的载玻片,滴一小滴(或用接种环挑取1~2环)蒸馏水,用无菌接种环挑取少量菌体与水充分混匀,涂成极薄的菌膜,面积约 $1\text{ cm}^2$ 。

注意:载玻片一定要洁净无油;滴蒸馏水和挑取菌体不宜过多;涂片要均匀,不宜过厚。

#### 2. 干燥

室温自然干燥。

#### 3. 固定

涂片朝上,通过微火3次(右手持过火后的细菌涂片,反面置于自己的左手手背上,以不烫手背为宜,否则会改变甚至破坏细胞形态)。此操作称为热固定,目的是使细胞质凝固,以固定细胞形态,使之牢固附着在载玻片上。

#### 4. 染色

待载玻片冷却后,置于玻片搁架上,滴加美蓝染液(或石炭酸复红染液)于菌膜部位,染液以刚好覆盖涂片薄膜为宜,染1~2 min。

#### 5. 水洗

倾去染色液,用洗瓶(或自来水)冲洗,自玻片一端缓缓流向另一端,冲去染色液,直至流下的水无色为止。

注意:冲洗过程中不能直接冲洗菌膜部位,水流不宜过急过大,防止涂片薄膜脱落。

#### 6. 干燥

自然干燥,或用电风吹干,也可用吸水纸吸干。

#### 7. 镜检

用油镜观察并绘制细菌形态图。

#### 8. 清理

将染色片放入含有5%苯酚的废片缸中,统一处理。

### 【实验报告】

根据观察结果,绘制两种细菌的形态图,注明放大倍数,并描述它们的排列方式,比较两种细菌形态的不同。

### 【思考题】

1. 在进行细菌涂片时应注意哪些环节?