



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

P HARMACOLOGY EXPERIMENTS
OF FISHERY DRUGS

渔药药理学实验

胡鲲 主编



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

渔药药理学实验

胡 鲲 主编

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书共 14 个实验,内容涵盖渔药的识别、渔药活性物质(含量)测定、药理学及毒理学评价、药物残留测定及渔药质量评价等方面内容,符合我国水产养殖行业对渔药专业知识的需要。书后附有常用溶液的的成分和配制,供读者查阅和参考。

本书可作为水产养殖、水产动物医学及相关专业专科生、本科生及研究生使用的课程教材,也可以作为水产病害防治生产实践工具性参考书。

图书在版编目(CIP)数据

渔药药理学实验 / 胡鲲主编. — 北京: 科学出版社, 2017.6

水生动物医学专业系列教材

ISBN 978-7-03-052868-1

I. ①渔… II. ①胡… III. ①水产生物-药理学-实验-高等学校-教材 IV. ①S948-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 111939 号

责任编辑: 陈 露

责任印制: 谭宏宇 / 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

江苏凤凰数码印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2017 年 6 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2017 年 6 月第一次印刷 印张: 3 1/2

字数: 90 000

定价: 20.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《渔药药理学实验》编辑委员会

主 编 胡 鲲(上海海洋大学)

编 委 (以姓氏笔画排序)

阮记明(江西农业大学)

杨移斌(中国水产科学研究院长江水产研究所)

林 茂(集美大学)

胡 鲲(上海海洋大学)

前 言

随着我国水产动物疫病管理体制及人才培养制度的改革,渔药的科学使用被纳入水产品质量安全领域的重要范畴。渔药药理学是水产动物医学的重要学科分支,但目前国内尚无一本针对本科生教学使用的渔药实验教材,这种现状严重制约了我国执业兽医制度的发展和专业人才的培养。《渔药药理学实验》正是在这种背景下诞生的。

“十二五”期间,上海海洋大学及相关高校、科研院所在渔药药理学教学及实践领域做出了大胆的创新和尝试,聚焦渔药药代动力学、新型渔药创制、药物残留检测方法等前沿领域研究,积累了一大批符合我国水产养殖产业特点的技术成果,为《渔药药理学实验》的编写出版奠定了基础。

本书结构合理,内容丰富,共设置 14 个实验。实验 1、实验 2、实验 3、实验 6、实验 7 及附录由胡鲲编写;实验 4、实验 5 和实验 8 由阮记明编写;实验 9、实验 10、实验 14 由杨移斌编写;实验 11、实验 12、实验 13 由林茂编写。

此外,在本书文字整理过程中还得到了董龙香、刘思雅等的协助,在此一并表示衷心的感谢!同时,本书在编写过程中参阅了大量国内外出版发行的(或即将出版发行的)文献、资料和书籍,限于篇幅的原因,未能一一列出,在此也一并向原作者和出版单位致谢。

衷心期待本书的出版为我国水生动物医学人才培养发挥重大作用!

编 者

2017 年 1 月

目 录

前言

实验 1	常用渔药的识别及给药方法	1
实验 2	渔用氯制剂的种类及漂白粉中有效氯含量的测定	3
实验 3	防霉剂的种类及其对水霉的抑制效果	5
实验 4	精制敌百虫粉对斑马鱼的急性毒性	7
实验 5	鲫对氟苯尼考粉的剂量耐受性评价	9
实验 6	恩诺沙星耐药性突变株的分离	11
实验 7	来苏尔石碳酸系数的测定	13
实验 8	阿维菌素光稳定性实验	15
实验 9	管碟法测定恩诺沙星等药物的最低抑菌浓度	16
实验 10	试管稀释法测定硫酸庆大霉素的最低抑菌浓度	18
实验 11	面积归一法测定氟苯尼考粉中氟苯尼考的含量	20
实验 12	高效液相色谱法测定水产品肌肉组织中恩诺沙星残留量	22
实验 13	恩诺沙星在草鱼体内的残留消除过程	24
实验 14	酶联免疫法测定草鱼肌肉组织中盐酸环丙沙星残留	26
主要参考书		28
附录 I	培养基的配制	29
附录 II	无公害食品 渔用药物使用准则	30
附录 III	无公害食品 水产品中渔药残留限量	36
附录 IV	渔药临床试验技术规范	40
附录 V	欧盟、美国等国家与组织规定水产品中渔药最高残留限量	47

实验1 常用渔药的识别及给药方法

【实验目的】

1. 识别常用渔药,了解并掌握各种药品的主要特性与基本用途。
2. 训练渔药的正确使用方法。
3. 训练正确的渔药给药方法。

【实验内容】

1. 常用渔药的识别。
2. 渔药给药方法——口服法和药浴法。

【材料与仪器用品】

1. 实验材料

活鱼:草鱼(100~200 g/条)、鲫(50~100 g/条)或其他鱼类。

常用渔药:恩诺沙星粉(规格:100 g:10 g)、高锰酸钾。

2. 仪器用品

水族箱、搪瓷脸盆、瓷碗、烧杯、量筒、注射器、玻璃皿、吸管、吸水纸等。

【实验原理与方法】

1. 渔药的种类

药物是指对机体产生某种生理生化影响,并在疾病的治疗、预防和诊断方面有一定效果的化学物质。渔药的种类分为以下几类。

(1) 抗菌药物

如多西环素、磺胺类、恩诺沙星等。

(2) 抗寄生虫药物

如敌百虫、硫酸铜等。

(3) 环境改良及消毒类药物

聚维酮碘(PVP-I)、苯扎溴铵等。

(4) 生殖及代谢调节药物

绒毛膜促性腺激素等。

(5) 中草药

板蓝根等。

选择渔药的原则:① 疗效高(有效性);② 毒性低(安全性);③ 使用方便(方便性);

④ 价格便宜(廉价性)。

2. 渔药的使用方法

(1) 遍洒法(全池泼洒法)

首先要准确测量池塘水体,计算药量,之后,称取适量药物用水溶解后均匀地泼到全池中去。此法适用于中、小型水体,施药方便,能较彻底地杀死养殖动物身上及其生活水



体中的病原生物。

(2) 悬挂法

在食场周围形成一消毒区,在水产动物摄食时杀灭病原体。此法具有用药少、简便、副作用少等优点,但杀灭病原体不彻底,只适用于预防和早期治疗。一般需持续用药三天。

(3) 浸洗法(药浴法)

在较小的容器内,配制一定浓度的药液,将患病水产动物放入其中进行短时间浸泡,以消灭寄生于体表的病原体。此法经常被用于转池及运输前后的苗种消毒。

(4) 口服法

即将药物与水产动物喜吃的饲料一起拌以黏合剂,制成适口的药饵投喂,而达到杀灭体内病原体的方法。适用于预防和治疗疾病,但当病情严重时,患病动物已失去食欲,停止摄食或摄食不多时,则不能用。

口服药饵的制作方法一般有以下几种。

1) 药面:将药物、饵料和黏合剂,按适当的比例混合调匀后,做成适口的条状、颗粒状,晾干后投喂。

2) 药物草料:将药物混合在黏合剂中加热水调成糊状,再黏附于青草上投喂。

3) 药物米糠:将药物混合在黏合剂中加热水调成糊状,拌入米糠做成薄饼投喂。

4) 新鲜肉质药饵:将药物混合于黏合剂中搅匀,再把药糊涂在肉质饵料上投喂。

5) 混药:在饲料中加入药物,放入适量的水拌匀,直接投到食台上喂养。

(5) 涂抹法

在体表患处涂抹较浓的药液以杀灭病原体,适用于产卵亲体检查和注射催产剂时。

(6) 浸沤法

应用中草药防治疾病时采用的方法,将捆扎好的中草药放在鱼池上风处,渗出药汁杀灭水体及水产动物体表的病原体。

(7) 注射法

有两种类型,一类是给放养鱼种注射疫苗,另一类是给已患病的个体注射抗菌素等治疗药物。方式有肌肉注射和腹腔注射两种。

(8) 口灌法

采用注射器(针尖套一软管)将药液向水产动物的口腔或食道深部灌入。

【实验报告】

1. 计算水缸水体的体积和施放高锰酸钾的药量 $[20\sim 50\text{ g}/(\text{m}^3\cdot\text{次})]$,水体浸浴消毒 $10\sim 15\text{ min}$,给活鱼药浴 20 min 。

$$\text{总用量}(\text{g}) = \text{水体体积}(\text{m}^3) \times \text{药物浓度}(\text{g}/\text{m}^3)。$$

2. 根据鱼体重计算施放恩诺沙星粉(规格: $100\text{ g}:10\text{ g}$)的药量[每 1 kg 鱼体重用恩诺沙星粉 $0.1\sim 0.2\text{ g}$],在饲料中加入恩诺沙星粉,给活鱼喂食一次。

实验 2 渔用氯制剂的种类及漂白粉中有效氯含量的测定

【实验目的】

- 1. 了解渔用氯制剂种类。
- 2. 掌握漂白粉中有效氯含量的测定方法。

【实验内容】

- 1. 认识常用的渔用氯制剂的种类。
- 2. 采用碘量法、维生素 C 法测定漂白粉中有效氯的含量。

【材料与仪器用品】

1. 实验材料

漂白粉、漂粉精(次氯酸钙)、氯胺-T(甲苯磺酰氯胺钠)、优氯净(二氯异氰尿酸钠)、防消散(二氯异氰尿酸)、强氯精(三氯异氰尿酸)、精制淀粉(配制：将可溶性淀粉加无水乙醇润湿，研磨 2 h，烘干而成)、碘化钾晶体、维生素 C(含量 100 mg/片)、乙酸、0.1 mol/L 硫代硫酸钠液、稀盐酸、蒸馏水。

2. 仪器用品

电子天平、研钵、玻璃棒、500 mL 容量瓶、量筒、移液管、吸管、滴定管、大小烧杯、白瓷碗。

【实验原理与方法】

1. 渔用氯制消毒剂种类及其有效氯的标准含量

氯制消毒剂药物主要用于鱼、虾类体表或环境消毒，没有严格的抗菌谱，对微生物与机体也无明显的选择作用，只存在差异，是一类较能迅速杀灭微生物的药物。其杀灭机理是氧化细菌原浆蛋白中的活性基团，并和蛋白质的氨基结合而使其变性。渔用氯制消毒剂药品主要有 6 种(表 2-1)。

表 2-1 渔用氯制消毒剂的种类及其有效氯的标准含量

名 称	化 学 名	分 子 式	性 状	有效氯的标准含量
漂白粉	含氯石灰	$\text{Ca}(\text{ClO})_2 + \text{CaCl}_2 + \text{CaO} + \text{Ca}(\text{OH})_2$	白色颗粒状粉末，有氯臭	25%~35%
漂粉精	次氯酸钙	$\text{Ca}(\text{ClO})_2$	白色粉末，有氯臭	60%~70%或 80%~85%
氯胺-T 别名：氯亚明	甲苯磺酰氯胺钠	$\text{C}_7\text{H}_7\text{O}_2\text{NCISNa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	白色微黄晶粉	24%~26%
优氯净	二氯异氰尿酸钠	$\text{C}_3\text{O}_3\text{N}_3\text{Cl}_2\text{Na}$	白色晶粉，有浓氯气味	原粉 60%~64%
防消散	二氯异氰尿酸	$\text{C}_3\text{HO}_3\text{N}_3\text{Cl}_2$	白色粉末，有氯臭	原粉 71%
强氯精	三氯异氰尿酸	$\text{C}_3\text{O}_3\text{N}_3\text{Cl}_3$	白色粉末，有氯臭	原粉约 90%



2. 漂白粉的鉴别和有效氯含量的测定方法

漂白粉是水产药物中一种廉价和使用广泛的强力杀菌剂和消毒剂,药浴和泼洒均很方便,能预防和治疗多种微生物引起的疾病。但是,漂白粉在空气中容易潮解而失去有效氯,受日光作用迅速分解,对金属有腐蚀作用,故必须盛放在密闭陶器内,存放于阴冷干燥处。如保管不善,会造成失效。用这种有效成分减少或已完全失效的漂白粉,若按正常用量使用,会大大降低对疾病的防治作用甚至无防治效果。

(1) 漂白粉的鉴别方法

本品遇稀盐酸,即产生大量的氯气。

(2) 漂白粉有效氯含量的测定方法

1) 碘量法

称取漂白粉 2 g,置研钵中,分次加水 25 mL,研磨调匀,移置 500 mL 的容量瓶中,并将研钵用水洗净,洗液并入容量瓶中。然后,用蒸馏水稀释至刻度,密塞,静置 10 min;摇匀,准确量取混悬液 100 mL,加碘化钾 1 g 与乙酸 5 mL,用硫代硫酸钠溶液(0.1 mol/L)滴定,至近终点时,加淀粉指示液,继续滴定至蓝色消失,即得漂白粉有效氯含量(每 1 mL 的 0.1 mol/L 硫代硫酸钠溶液相当于 3.546 mg 的氯)。

2) 维生素 C 法

① 取 100 mg 维生素 C 1 片,压成粉状,加入 15~20 mL 清洁水中使其溶解。

② 加碘化钾晶体 2 小匙(约 200 mg)和精制淀粉 2 小匙至维生素 C 溶液内。

③ 用吸管吸取欲测定的 1%漂白粉溶液,滴入上述溶液内,边滴入边搅动,至出现蓝色 1 min 不褪色为止。记录用去 1%漂白粉溶液的毫升数,代入下列简化公式:

$$\text{漂白粉有效氯含量(\%)} = 400 / \text{用去 1\% 漂白粉溶液毫升数}$$

注意事项: ① 滴漂白粉上清液及蓝黑墨水时,滴管要垂直,这样滴出的滴量较均匀; ② 漂白粉加水搅拌,静置澄清后的上清液,测定过程要在 0.5 h 内完成,所得结果才基本一致,因此要求动作要快。

【实验报告】

1. 利用盐酸鉴别漂白粉。

2. 分别利用碘量法和维生素 C 法测定漂白粉中有效氯的含量。

实验3 防霉剂的种类及其对水霉的抑制效果

【实验目的】

1. 掌握常见防霉剂的种类。
2. 测定次氯酸钠、五水硫酸铜对水霉的抑制效果。

【实验内容】

1. 识别常见防霉剂。
2. 测定次氯酸钠、五水硫酸铜对水霉菌丝和孢子的最低抑菌浓度。

【材料与仪器用品】

1. 实验材料

微生物：水霉。

防霉剂：山苍子、土霉素、次氯酸钠、敌草腈、五水硫酸铜。

2. 仪器用品

培养箱、培养皿、烧杯、吸管、吸水纸等。

【实验原理与方法】

1. 防霉剂的种类

防霉剂的种类包括中草药(山苍子)、抗生素(土霉素)、消毒剂(次氯酸钠)、农药(敌草腈)、重金属盐(五水硫酸铜)等。

2. 防霉剂对水霉的抑制效果

(1) 水霉孢子悬液制备

挑取保藏于试管的水霉菌丝转接于平板上，在平板上滴加适量无菌水在 25℃ 下培养 48 h，期间适量增添无菌水。待铺满整个培养皿后，倒出诱生有孢子的无菌水，再用无菌水轻轻冲洗平板 1 次，将洗液与诱生孢子的无菌水合并。经 8 层纱布过滤，分别调整孢子浓度为 10^2 个/mL、 10^3 个/mL、 10^4 个/mL 待实验用。

(2) 药物母液配制及梯度稀释

将次氯酸钠、五水硫酸铜用蒸馏水配制成 100 mg/L 的药物母液，通过倍释法将该母液依次稀释成梯度浓度的工作溶液。

(3) 水霉孢子的体外抑制实验

以不同梯度浓度的药物倍释液 2 mL 加至 18 mL 经 56℃ 融化的 PDA 培养基并使之均匀，迅速倾倒入培养皿中待凝固用于实验，即药物 PDA 平板浓度为原浓度的 1/10。

取 0.1 mL 水霉孢子菌悬液涂布于凝固的培养基上。设空白对照组，25℃ 培养 5 d。孵育期每 24 h 观察一次，肉眼判定无菌落生长的最低药物培养皿的药物浓度为最低抑菌浓度(MIC)。每个浓度设两个对照，同时设不加药液的空白 PDA 培养基为对照。



(4) 水霉菌丝杀灭实验

将经 PDA 培养基 25℃ 培养 48 h 后,铺满平板的水霉用无菌刀片切成约 1 cm²、2 cm²、3 cm² 的小块。将切好的水霉小块放入盛有上述各浓度的药物倍释液的离心管中分别浸泡 10 min、0.5 h、1 h、2 h。用无菌镊子取出浸泡过的水霉小块置于马铃薯葡萄糖琼脂培养基上,25℃ 培养观察 5 d。孵育期每 24 h 观察一次,肉眼判定无水霉菌菌落生长的,表示此种药物在该浓度该作用时间下对水霉菌丝具有杀灭作用。每个浓度设两个对照,同时设经蒸馏水浸泡过的水霉块为空白对照。

【实验报告】

测定次氯酸钠、五水硫酸铜对水霉菌丝和孢子的 MIC 值(表 3-1)。

表 3-1 药物对水霉菌丝的抑制效果

药 物	MIC/(mg/L)	
	水霉菌丝	水霉孢子
次氯酸钠		
五水硫酸铜		

实验 4 精制敌百虫粉对斑马鱼的急性毒性

【实验目的】

观察受试鱼急性中毒的表现和经过,掌握测定渔药半数致死浓度(LC_{50}/LD_{50})的方法。

【实验内容】

渔药可通过浸泡、口服等途径进入鱼体。当鱼体中渔药达到一定浓度时,就会引起一系列中毒反应,如行为异常、生理功能紊乱、组织细胞病变,直至死亡。通过将经过曝气驯化的鱼,放入不同浓度的精制敌百虫粉溶液中进行 96 h 的观察,记录不同浓度组在不同时间点受试鱼的死亡率,计算 LC_{50} 。

【材料与仪器用品】

1. 实验材料

精制敌百虫粉、斑马鱼。

2. 仪器用品

温度控制仪、玻璃水槽、电子分析天平、烧杯、移液管、量筒等。

【实验原理与方法】

1. 实验动物

斑马鱼是国际标准化组织(ISO)推荐的实验鱼种,其个体较小,性成熟期短,繁殖能力强,价格便宜,是实验室标准毒理学检验最常用的实验动物。

2. 实验药物

以精制敌百虫粉为实验渔药,实验溶液的母液由蒸馏水配制而成,配好后,低温保存。配制好的母液可以稀释为进行毒性实验的溶液,以等比或等对数间距设置浓度系列。

3. 急性毒性实验

(1) 预实验

1) 实验一般采用 3~5 尾斑马鱼,在 2 L 的烧杯中进行,用对数比例形成的系列浓度,同时设立对照组,以确定精制敌百虫粉对斑马鱼 24 h 100% 致死的最低浓度和 96 h 不引起死亡的最高浓度。

2) 尽可能使 LC_{50} 在设置的浓度范围内,每个浓度设三个平行。

3) 实验开始后每隔一段时间观察记录,整理 24 h、48 h、72 h、96 h 观察记录,需要统计各容器中实验鱼的存活情况和行为特征,实验观察时发现死鱼需要及时捞出。

4) 记录不同精制敌百虫粉浓度下斑马鱼的死亡情况。

(2) 正式实验

1) 实验结束时,对照组的死亡率不得超过 10%。

2) 从预实验得到的无死亡浓度和 100% 死亡浓度之间,以实验配制好的母液以及稀



释水,按照一定的间隔设置 6 个实验浓度组(4.5 mg/L、5.0 mg/L、5.5 mg/L、6.0 mg/L、6.5 mg/L、7.0 mg/L)和一个空白对照组(曝气自来水),每组设三个平行。

3) 每组 10 条斑马鱼,以 96 h 为一个实验周期,采用静水流的方式,在 24 h、48 h、72 h、96 h 后分别观察斑马鱼存活状况,并记录溶解氧、pH、温度、鱼的死亡情况及行为变化等(如鱼体侧翻、失去平衡,游泳能力和呼吸能力减弱,色素沉积等);要及时捞出死鱼。

4) 最终确定死鱼达 50%时受试物的浓度,半数致死浓度用 24 h - LC₅₀、48 h - LC₅₀、72 h - LC₅₀、96 h - LC₅₀ 来表示。判断斑马鱼死亡需要用玻璃棒轻轻按压斑马鱼的尾部,如果没有反应即认为斑马鱼已经死亡。

5) 实验数据记录。

表 4-1 不同时间、不同浓度下各组斑马鱼死亡情况

死亡率 浓度/ (mg/L)	24 h				48 h				72 h				96 h			
	x ₁	x ₂	x ₃	平均值	x ₁	x ₂	x ₃	平均值	x ₁	x ₂	x ₃	平均值	x ₁	x ₂	x ₃	平均值
曝气自来水																
4.5																
5.0																
5.5																
6.0																
6.5																
7.0																

【实验报告】

根据斑马鱼在各观察时间段的死亡率,计算出 LC₅₀、SC、MAC 等急性毒性特征参数。

1. 半致死浓度(LC₅₀): 采用概率单位-质量浓度直线回归计算。

2. 安全浓度(SC): SC=0.1×各观察时段的半致死浓度。

3. 毒性累积程度(MAC): MAC=某观察时段的半致死浓度差值/最初观察点与实验结束时的半致死浓度差值×100%。

4. 以暴露浓度为横坐标,死亡率为纵坐标,在计算机或对数概率纸上,绘制暴露浓度对死亡率的曲线。用直线内插法或常用统计程序计算出 6 h、24 h、48 h、72 h、96 h 的半致死浓度值(LC₅₀),并计算 95%的置信限。

5. 根据渔药对鱼类毒性的分级标准(具体见表 4-2),判断精制敌百虫粉对斑马鱼的毒性。

表 4-2 渔药对鱼类毒性分级标准

毒性等级	LC ₅₀ /(mg/L)
剧 毒	<1
高 毒	1~100
中等毒	100~1 000
低 毒	1 000~10 000
微毒或无毒	>10 000

实验 5 鲫对氟苯尼考粉的剂量耐受性评价

【实验目的】

掌握评价鱼类对渔药剂量耐受性的评价方法。

【实验内容】

鱼类对渔药的剂量具有一定的耐受性。当剂量过大,鱼类可能出现不良反应,甚至出现毒性反应。

【材料与仪器用品】

- 1. 实验材料
 鲫(100 g 左右)、氟苯尼考粉(规格: 10%)。
- 2. 仪器用品
 灌药导管、微量移液器、烧杯、量筒、天平等。

【实验原理与方法】

- 1. 实验分组
 称取体重相近的鲫,随机分为 3 组,每组 3 个平行,每个平行 10 尾。
- 2. 实验用药
 根据实验设计的 2 个用量,采用单次口灌用药(建议 10 min 内全部灌完)。
 用量: 150 mg/kg 鱼。
- 3. 实验观察
 在实验第 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h 观察鲫用药后的反应。

【实验报告】

鲫对氟苯尼考粉的剂量耐受性结果填入表 5-1 中。

表 5-1 不同渔药剂量对药物作用的影响

给药剂量/(mg/kg)	时间点/h	观察结果 (是否死亡、死亡数量、活性、不良反应等)
0	6	
	12	
	24	
	48	
	72	
	96	
150	6	
	12	
	24	
	48	
	72	
	96	



续 表

给药剂量/(mg/kg)	时间点/h	观察结果 (是否死亡、死亡数量、活性、不良反应等)
10 000	6	
	12	
	24	
	48	
	72	
	96	

实验6 恩诺沙星耐药性突变株的分离

【实验目的】

学习梯度平板法分离耐药性突变株。

【实验内容】

梯度平板的制备及使用梯度平板法分离恩诺沙星耐药性突变株嗜水气单胞菌。

【材料与仪器用品】

1. 实验材料

嗜水气单胞菌、恩诺沙星、牛肉膏蛋白胨液体培养基、牛肉膏蛋白胨培养基、10 mL 琼脂培养基试管 2 支。

2. 仪器用品

1 mL 无菌吸管、盛有 70% 乙醇的烧杯、玻璃涂布棒、水浴锅等。

【实验原理与方法】

细菌的耐药性突变是 DNA 分子的某一特定位置的结构改变所致，与药物的存在无关，药物的存在只是作为分离耐药性菌株的一种手段，而不是引发突变的诱导物。

为了便于选择适当的药物浓度，分离耐药性突变株常用梯度平板法。利用培养皿的一侧至另一侧铺有药物浓度呈梯度分布的琼脂培养基，以筛选相应抗药性突变株。一般先将培养皿一侧搁高约 5 mm，倒入约 10 mL 熔化的琼脂培养基，待凝固后放回水平位置，再倒上等体积含适当浓度药物的相同培养基，放置一天后，即成梯度平板。培养基内的药物浓度呈线性梯度，一端浓度高，另一端浓度低。若在梯度平板上涂布经过诱变的菌悬液，经培养后，某些突变的菌株就可以在适当药物浓度的培养基表面生长，然后选择在较高药物浓度下生长的菌株，分离培养即可得到抗药性突变株。本实验采用梯度平板法分离嗜水气单胞菌抗恩诺沙星的突变株。

1. 接种嗜水气单胞菌于盛有 5 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基的试管中，28℃ 振荡培养 24 h。

2. 在热水浴中融化琼脂培养基。

3. 倒 10 mL 已熔化的不含药物的牛肉膏蛋白胨培养基于一套无菌培养皿中，立即将培养皿一端垫起，使琼脂培养基覆盖整个底部并使培养基表面在垫起的一端刚好达到培养基的底与边的交界处，让培养基在这一倾斜的位置凝固。

4. 在已凝固的平板底部高的琼脂这一边标上“低”，并放回水平位置，然后再在底层培养基上加入每毫升含 100 μg 恩诺沙星的牛肉膏蛋白胨培养基 10 mL，凝固后，即得一个恩诺沙星浓度从一端的 0 μg/mL 到另一端 100 μg/mL 的梯度平板。

5. 用 1 mL 无菌吸管吸取 0.2 mL 嗜水气单胞菌培养液到梯度平板上。用无菌玻璃棒将菌液涂布到整个平板表面。

6. 将平板倒置于 28℃ 培养 48 h。