

影响大肠菌群革兰氏染色的几个因素

沈 杰, 刘效农

(启东市环境监测站, 江苏 启东 226200)

中图分类号: Q 93- 333

文献标识码: C

文章编号: 1006- 2009(2001)04- 0036- 01

无论在地表水环境质量评价还是在医院污水综合排放标准中, 大肠菌群都是一项很重要的指标。在对大肠菌群测定过程中, 革兰氏染色又是一步很重要的鉴定阶段, 革兰氏染色的正确性直接关系到能否正确判断该菌落是不是大肠菌群, 而革兰氏染色正是一门难以掌握的最基本的细菌学实验技术。现通过纯培养一株大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 并进行多种条件下的革兰氏染色, 以观察革兰氏染色受哪些因素影响。

1 材料

1.1 大肠杆菌

大肠杆菌是大肠菌群中很重要也很有代表性的 1 种。在某次大肠菌群测定过程中, 选取伊红美蓝琼脂培养基上不同的典型菌落, 按照方心芳著的《应用微生物学实验法》中大肠菌群细菌分离法得到具有甲基红试验阳性、V.P 试验阴性、发酵柠檬酸盐阴性、脲酸试验阴性等特征的一株大肠杆菌。

1.2 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)

枯草芽孢杆菌从四川大学生物工程系购得。它是革兰氏阳性菌, 作为大肠杆菌的对照菌。

2 方法和结果

2.1 不同培养时间(菌龄)的比较

分别取在营养琼脂培养基上已培养 16 h、24 h、32 h 以上的大肠杆菌和枯草芽孢杆菌进行革兰氏染色。

16 h 和 24 h 的大肠杆菌和枯草芽孢杆菌革兰氏染色均能得到正确结果, 但 32 h 以上的枯草芽孢杆菌有 13.3% 出现阴性结果。出现阴性反应的枯草芽孢杆菌同时发现其有很多菌体已不呈典型杆状, 显然由于培养时间过长, 枯草芽孢杆菌(阳性菌)或已死亡或部分菌自行溶解, 造成细胞壁通透性增大而呈假阴性。因此, 在对大肠菌群测定时,

细菌在伊红美蓝琼脂培养基上培养时间不宜超过 24 h, 以免阳性菌呈现假阴性, 干扰革兰氏染色的正确性。

2.2 涂片时细菌的堆积密度

用直径 3 mm 的接种环分别挑起培养 24 h 的大肠杆菌和枯草芽孢杆菌满环、半环、甚至更少量涂片, 使细菌在生理盐水中的堆积密度由浓厚到均匀分散渐变, 作革兰氏染色观察。

涂片中生理盐水内细菌浓厚时, 菌体明显堆积在一起, 甚至仍残留结晶紫, 因而无论大肠杆菌还是枯草芽孢杆菌, 凡密集成堆的常常呈阳性反应, 而均匀分散的大肠杆菌和枯草芽孢杆菌都能得到正确结果。因此, 测定时应以分散开的细菌革兰氏染色反应为准。

2.3 媒染时间

将培养 24 h 的大肠杆菌和枯草芽孢杆菌革兰氏染色, 用碘作媒染剂, 覆盖时间由 30 s、1 min、2 min 渐变, 结果列表 1。

表 1 不同媒染时间的染色正确率

媒染时间	30 s	1 min	2 min
枯草芽孢杆菌正确率/ %	95	100	100
大肠杆菌正确率/ %	100	98	92

由表 1 可看出, 媒染时间过短, 不利于初染液结晶紫与细胞的结合, 因而可能造成阳性菌呈阴性结果; 反之, 媒染时间过长, 容易使阴性菌呈假阴性。媒染时间应控制在 1 min 为宜。

2.4 酒精脱色程度

将培养 24 h 的大肠杆菌和枯草芽孢杆菌革兰氏染色, 酒精脱色时间从 20 s 到 (下转第 42 页)

收稿日期: 2000- 11- 18; 修订日期: 2001- 03- 22

第一作者简介: 沈 杰(1974-), 男, 江苏启东人, 助理工程师, 学士。

$$C(x, 0) = \frac{2M}{H \sqrt{4\pi E_y x u}} \quad (3)$$

将(2)、(3)式代入(1)式得:

$$\frac{C(x, B)}{C(x, 0)} = 2\exp(-\frac{uB^2}{4E_y x}) = 90\% \quad (4)$$

对(4)式求解得: $x = 0.313 \frac{uB^2}{E_y}$ (5)

对非持久性污染物, 控制断面距排污口的距离计算如下:

$$C(x, B) = \frac{2M}{H \sqrt{4\pi E_y x u}} 2\exp(-\frac{uB^2}{4E_y x} - \frac{K_1 x}{86400u}) \quad (6)$$

$$C(x, 0) = \frac{2M}{H \sqrt{4\pi E_y x u}} \exp(-\frac{K_1 x}{86400u}) \quad (7)$$

将(6)、(7)式代入(1)式得:

$$\frac{C(x, B)}{C(x, 0)} = 2\exp(-\frac{uB^2}{4E_y x}) = 90\% \quad (8)$$

对(8)式求解得:

$$x = 0.313 \frac{uB^2}{E_y} \quad (9)$$

各式中:

x ——控制断面距排污口的距离, m;

u ——河流的平均流速, m/s;

B ——河流平均宽度, m;

E_y ——横向混合系数, m^2/s 。

根据上述计算可知, 控制断面的位置与河流平均宽度、河流平均流速及横向混合系数有关, 而与污染物的性质无关。不论是持久性污染物还是非持久性污染物, 其控制断面距排污口的距离皆可按

下式进行计算:

$$x = 0.313 \frac{uB^2}{E_y}$$

2 对河流监测断面设置的几点建议

2.1 在作为环境监测人员工作依据的《水和废水监测分析方法》及《环境监测质量保证手册》等书中, 有关监测断面设置的规定过于笼统, 给实际工作带来无所适从的困惑。建议有关部门组织科研力量, 研究出各种典型水文条件下, 河流监测断面设置的计算方法。同时, 对于计算过程中涉及的河流水文参数, 给出相应的测量规范。

2.2 在环境监测人员合格证考核中, 适当增加监测布点方面内容的比重。除进行理论考核外, 还要进行现场水文测验能力及现场监测断面设置能力的考核, 进而起到对各级环境监测站从宏观上实施调控作用。

2.3 要准确地掌握河流水质时空分布规律, 准确地设置监测断面, 必须具备相关的水文参数的测验能力。因此, 基层环境监测站在人员构成和仪器设备配置等方面, 应不断调整与完善, 尽快从单一的污染物浓度监测阶段过渡到浓度监测和水文测验相结合的复合型监测阶段。

[参考文献]

[1] 国家环保局监督管理司. 环境影响评价培训教材下册[M]. 北京: 国家环保局监督管理司, 1996. 13~ 33.

本栏目责任编辑 董思文

(上接第 36 页) 1 min 渐变, 以观察脱色程序对革兰氏染色的影响, 结果列表 2。

表 2 不同脱色时间的染色正确率

酒精脱色时间 t/s	20	30	40	60
枯草芽孢杆菌正确率/%	100	100	90	58
大肠杆菌正确率/%	95	100	100	100

由表 2 可看出, 酒精脱色程度不够, 阴性菌可被染为阳性菌; 脱色过度, 阳性菌易呈阴性结果。虽然只差 10 s、20 s, 但染色结果可截然不同。因此, 革兰氏染色, 一定要严格控制酒精脱色时间, 一般以 25 s~ 30 s 为宜。

通过以上实验, 可以认为菌龄、细菌密集程度、媒染时间、酒精脱色程度等会影响大肠菌群革兰氏染色的正确性。在对大肠菌群测定时, 细菌在伊红美蓝琼脂培养基上培养时间不宜超过 24 h; 涂片时应以分散开的细菌染色为准; 碘媒染时间以 1 min 为宜; 酒精脱色程度是革兰氏染色的关键, 脱色时间应严格控制在 25 s~ 30 s 之间。为进一步确证染色技术正确, 建议在同一载玻片上, 一端涂布未知菌, 另一端涂布已培养 24 h 的枯草芽孢杆菌和大肠杆菌(已知)的混合菌, 然后同片染色, 如果混合菌能分辨出阳性菌和阴性菌, 则也能肯定未知菌革兰氏染色的正确。