

# 快速区别革兰氏阳性和阴性细菌的简易方法

何世川 张克勤

(贵州农学院植保系植病教研室)

周 薇

(贵州科学院生物研究所)

革兰氏染色阳性反应和阴性反应是细菌分离和鉴定的最重要、最基本的方法之一。但是使用革兰氏染色时经常发现某些革兰氏阳性菌会褪色；某些革兰氏阴性菌会由于菌龄或培养基的不同而染色反应不准确。

1938年 Ryu<sup>[1]</sup>报道了用 KOH 试验区别革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌，即在 KOH 溶液里革兰氏阴性菌出现粘丝，而革兰氏阳性菌无粘丝。这一方法极大地有助于革兰氏染色反应可凝细菌的鉴定。但 Gregersen<sup>[3]</sup> (1978) 在

应用这种方法时发现需氧芽孢菌 (*Bacillus*) 的某些菌株出现相反的结果。T. V. Saslow<sup>[2]</sup> 等 (1982) 也同样发现如果培养的菌株超过 24 小时, *Agrobacterium* sp. 的某些菌株粘丝很弱, 或者无粘丝。我们用 Ryu 的方法对大量菌株进行了试验, 除观察到某些菌株培养超过 24 小时结果不稳定外, 还观察到这种方法粘丝短, 而且持续时间也极短。鉴于此, 我们筛选了 20 多种药品如 NaOH, NH<sub>4</sub>OH, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KNO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, AgNO<sub>3</sub>, HCl, C<sub>6</sub>Cl<sub>5</sub>NaO · 2H<sub>2</sub>O 等, 以及用这些药品进行适当组合, 结果只有 NaOH 能将革兰氏阳性菌和阴性菌区别开, 其效果比 KOH 好。经植物病原细菌、腐生细菌、动物病原细菌、寄生真菌的细菌等 118 个菌株的试验, 无论是新鲜培养菌还是超过 48 小时的衰老菌均未出现不正常反应, 效果极明显, 粘丝长且持续时间也较长。现将试验结果报道如下。

## 材 料 和 方 法

### 1. 试验菌株: 本试验所用的菌株有的为实

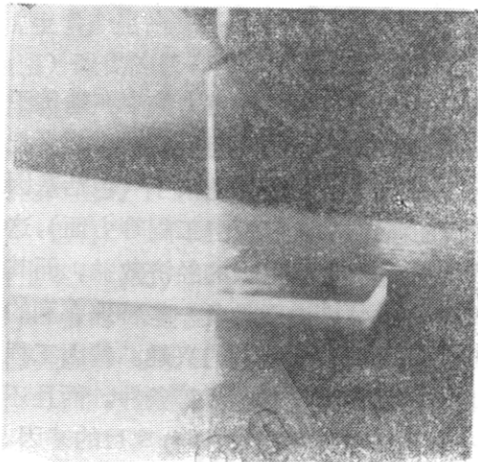


图 1 革兰氏阴性菌在 3% NaOH 中产生阳性粘丝

表 1 区分革兰氏阳性和阴性细菌的革兰氏染色与 NaOH 方法的对比试验

属 或 种	菌株数	革兰氏染色反应 <sup>1</sup>	NaOH 反应 <sup>1</sup>	
		新鲜菌株 <sup>3</sup>	新鲜菌株	老菌株 <sup>4</sup>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	3	—	+	+
<i>A. rhizogenes</i>	1	—	+	+
<i>Bacillus globisporus</i>	1	—	+	+
<i>B. coli.</i>	1	—	+	+
<i>B. sp.</i>	10	+	—	—
<i>B. Licheniformis</i>	1	✓	—	—
<i>Corynebacterium sepeidonium</i>	2	+	—	—
<i>Erneinia carotovora</i> pv. <i>carotovora</i>	4	—	+	+
<i>E. carotovora</i> pv. <i>atroseptica</i>	9	—	+	+
<i>E. chrysanthemi</i>	4	—	+	+
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	8	—, ✓	+	+
<i>Ps. tolassii</i>	20	—	+	+
<i>Ps. margineli</i>	1	—	+	+
<i>Ps. cichorii</i>	1	—	+	+
<i>Ps. sp.</i>	40	—	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	+	—	—
<i>S. sp.</i>	2	+	—	—
<i>Xanthomonas oryzae</i>	3	—	+	+
<i>X. campestris</i>	1	—	+	+
<i>X. campestris</i> pv. <i>oryzicola</i>	1	—	+	+
<i>X. citri</i>	2	—	+	+
<i>X. zingibericola</i>	2	—	+	+

1. 细菌染成紫色至蓝黑色称为“+”;红色称为“—”,染色反应不稳定为“✓”。2. 产生粘丝为“+”,不产生粘丝为“—”。3. 24—48 小时菌株。4. 28℃ 培养 48—72 小时后转入冰箱保存 3 周的菌株。

(下转第 35 页)

(上接第 41 页)

实验室保存菌株, 或大田新分离鉴定的菌株。大田分离鉴定程序按标准进行<sup>[4,5]</sup>。全部菌株都是在 NA 平板培养基上 28℃ 培养 24—48 小时。

2. 革兰氏染色和 NaOH 试验: 革兰氏染色是采用 N. W. Schaad<sup>[4]</sup> 最近介绍的方法。NaOH 试验是先配制 3% 的 NaOH, 在干净的载玻片上用普通滴管加一滴 3% NaOH 液, 用削尖的火柴棍分别挑取待测菌置于 NaOH 滴液中, 迅速用火柴棍调匀后, 将火柴棍提起, 即产生一根鉴别性的粘丝(图 1)。在 20 秒种内拉得起丝, 为阳性反应, 反之为阴性反应。

## 结 果 与 讨 论

NaOH 试验能迅速而准确地区别出革兰氏阳性菌和阴性菌, 118 株菌试验结果见表 1。

NaOH 试验的作用原理, 可能是由于革兰氏阴性细菌在 NaOH 溶液里细胞壁受到破坏而释放出粘性物质, 导致拉起粘丝之故, 用 NaOH

处理后的革兰氏阴性菌再用革兰氏染色时, 镜检观察到全部细胞已溶为一体, 看不到单个菌体, 说明细胞壁已被破坏, 而处理后的阳性菌染色镜检仍然是单个的菌体, 菌体形状未改变。该试验是对革兰氏染色的一个有效的补充试验, 操作简便。值得提出的是 NaOH 阳性就相当于革兰氏染色阴性, NaOH 阴性则相当于革兰氏染色阳性, 是否适用于无芽孢厌氧菌和梭状芽孢菌的革兰氏染色反应, 还有待进一步试验。

## 参 考 文 献

- [1] Ryu, E.: *Jpn. Soc. Vet. Sci.* 17: 31, 1978.
- [2] T. V. Suslow et al.: *Phytopathology*, 72(7): 917—918, 1982.
- [3] Gregersen, T.: *Eur. J. Appl. Microbiol.* 5: 123—127, 1978.
- [4] N. W. Schaad: *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. N. W. Schaad, ed. Am. Phytopathol. Soc., St. Paul, MN. pp. 72, 1980.
- [5] John, G. Holt: *The Shorter Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, pp. 77—82, 1977.