

刘战 聿立 太克

芽孢杆菌属

abdooga
unshu

农业出版社

S 154.3-A³

69259

GDR

芽孢杆菌属

〔美〕 R. E. 戈登 著
W. C. 海恩斯
C. HN. 帕格

蔡妙英 刘聿太 战立克 译

农业出版社

The Genus Bacillus

by

Ruth E. Gordon, professor,

Institute of Microbiology, Rutgers University

New Brunswick, N. J.

William C. Haynes, principal bacteriologist,

Northern Regional Research Laboratory

Peoria, Ill.

C. Hor-Nay Pang, research assistant,

Institute of Microbiology, Rutgers University

New Brunswick, N. J.

1973

Agricultural Research Service

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE

芽孢杆菌属

〔美〕R. E. 戈登

W. C. 海恩斯 著

C. H. 帕格

蔡妙英 刘聿太 战立克 译

农业出版社出版 (北京朝内大街130号)

新华书店北京发行所发行 农业出版社印刷厂印刷

850×1168 毫米 32 开本 9 印张 220 千字

1983 年11月第1版 1983 年11月北京第1次印刷

印数 1—4,100 册

统一书号 16144·2622 定价 1.70 元

前 言

三十年代中期，在土壤微生物学部，此后又在美国农业部作物栽培局工作的资历老的细菌学家Smith已看厌烦了土壤微生物学上的那些仅仅把分离的细菌记录为革兰氏阳性球菌、革兰氏阳性杆菌或革兰氏阴性杆菌这样一些一般称呼的文章。他相信土壤微生物学家将可以把土壤中的细菌鉴定为属和种。具有这样的信念，1935年他提出了一个关于土壤细菌的大群之一——梭菌属(*Clostridium*)分类的计划。土壤微生物学部主任C. R. Thom, 本人是个坚韧不拔的分类学家，安排了必要的行政工作的细节并对这一计划进行了充分的鼓励。F. E. Clark, 当他在科罗拉多大学是I. C. Hall的学生时已研究过梭菌，他曾是一个助教细菌学家。1938年R. E. Gordon接替了F. E. Clark的工作。

除了梭菌的菌种外，F. E. Clark还带到N. R. Smith实验室一些芽孢杆菌(*Bacillus*)的菌种，包括一株暹罗芽孢杆菌(*B. siamensis*)，这株菌是从本种的定名者L. Siribaed处取得的。N. R. Smith认为暹罗芽孢杆菌和他1923年从美国国家历史博物馆得到的W. W. Ford蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)菌株相似。这个试图证明这两个菌株属于同一个种的工作导致了最初计划的从梭菌属的分类学研究改变为芽孢杆菌属的分类学的研究方向。

收集了1134株芽孢杆菌，这些菌最终变成了知名的NRS保藏菌。这些菌记录在“农业专著16号”(1952)中，其中有643个是未鉴定的分离株，491株是命名菌株，它们是从为了保藏和放而建立起来的各个大的保藏机构得到的，以及对芽孢杆菌属

感兴趣的个人研究工作者处得到的。这广泛收集的菌种中，衣阿华大学的J. R. Porter慷慨赠送是特别有价值的。

第二次世界大战期间，尽管由于战争条件的各种干扰和缺乏人力，本计划仍继续实行。根据 625 个菌株的第一篇报道在1964年由美国农业部作为“杂项出版物”发表了。1952 年，与N. R. Smith退休同时，这个计划的最终报道以“农业专著 16 号”发表。这 1134 株菌的比较研究结果陈述了其中 1114 株，由原来接受时的 158 个种名合并为 19 个种。

本手册代替了自 1958 年不再出版的“农业专著 16 号”。它的目的是校订和补充芽孢杆菌种的描述，包括自 1952 年以来在文献中出现或保藏的菌种中的其他的种的鉴别特征。列举芽孢杆菌菌株的鉴别特征，主要是尽可能提供正确的种名。由微生物学家发放适当定名的菌种而建立微生物学家之间的通讯网。我们曾经特别注意必须菌株的重要意义，由于发现在美国模式菌株保藏委员会(ATCC)的“菌种目录”(7 版，1964)中记录的名字是接受它们时所带的名称，而不是核定鉴定后的名称。因此，这些名称的意义不大。目录中的内寄生芽孢杆菌(*Bacillus endoparasiticus* Benedek)就是一例。在N. R. Smith保藏的菌株中有 6 株最初由T. Benedek定为内寄生芽孢杆菌，Smith、Gordon和Clark (1952)将其中 3 株定为巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)，2 株定为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)，1 株定为蜡状芽孢杆菌。而且，由于Benedek的描述不明确而使这 6 株菌缺乏可靠性。我们主要是以ATCC芽孢杆菌各个种的菌株为基础的研究，保证了这些必须菌株的实现。

为了说明我们的结论而追加数据和补充证据，所以也包括了一些以前发表的资料，即“研究过的命名菌株索引”以及摘自“农业专著 16 号”的少数种的研究和 R. E. Gordon 及T. K. Ry nearson的“芽孢杆菌的菌株保藏”，以上资料来自“菌种保藏：展望和问题，1963”。

本工作得到美国农业部农业研究服务社的部分帮助，由W. C. Haynes监督的，由北方利用和发展部(现称北方地区研究实验室)准许证12-14-100-9200 (71) 号下拨款资助。其他的财政支持是由Johnson和Johnson, New Brunswick, N. J. 和微生物学基金会拨款提供的。还要感谢苏格兰爱丁堡大学农业学校的 T. Gibson 以及退休的 N. R. Smith, 介绍有关芽孢杆菌属的经验给了我们很大的帮助。也要鸣谢许多其他的协作，特别是英国伦敦中心公共健康实验室前主任S. T. Cowan; 研究工作的副指导E. R. L. Gaughran、Johnson和Johnson; 新泽西州，新布兰斯维克，鲁特格斯大学微生物研究所，图书馆员E. C. Gergeiy女士; 英国伦敦国家模式菌株保藏馆，馆长S. P. Lepage; 新泽西州，新布兰斯维克，鲁特格斯大学微生物研究所，微生物学教授H. A. Lechevalier; 苏格兰阿伯丹研究站，国家工业细菌保藏馆，馆长J. M. Shewan。

译 者 的 话

本书是由美国农业部出版的一本“芽孢杆菌属”专著。此版本与以往版本一样，有检索表、各个种的描述和测定方法及其影响因素等内容。不同之处，除内容相同部分的写法比前版本更为明白易懂，便于读者使用之外，还增添了农用杀虫菌—乳状病原菌，这部分除种的描述之外，还详细介绍了它们的保存和保藏。因此本书除分类鉴定使用之外，在农业实践上也更具有实用价值。读者对象除大、专院校师生和科研工作者可作参考外，也可作为广大的农业工作者的工作手册。由于我们水平有限，在翻译中定有不妥之处，请批评指正。

译 者

1980年6月

目 录

引言	1
培养基和方法	4
显微形态	4
培养温度	6
接触酶反应	6
厌氧生长	6
V—P测定	7
V—P培养液的pH	7
最高和最低生长温度	8
卵黄反应	8
对溶菌酶的抗性	9
氯化钠中的生长	9
pH5.7 生长	9
叠氮化合物葡萄糖培养液中的生长	10
从碳水化合物产酸	10
葡萄糖和酪氨酸产生黑色素	11
淀粉水解	11
马尿酸盐水解	11
结晶糊精	12
柠檬酸盐和丙酸盐的利用	12
硝酸盐还原到亚硝酸盐	13
二羟基丙酮的产生	13
吡啶的产生	14
苯丙氨酸脱氨作用	14
酪朊分解	14

酪氨酸分解	15
石蕊牛奶中的反应	15
营养肉汤中的生长	15
明胶液化	16
乳状病原细菌和幼虫芽孢杆菌的保存和保藏	17
芽孢杆菌种的描述	19
巨大芽孢杆菌 (<i>Bacillus megaterium</i>)	21
蜡状芽孢杆菌 (<i>Bacillus cereus</i>)	25
地衣芽孢杆菌 (<i>Bacillus licheniformis</i>)	38
枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	41
短小芽孢杆菌 (<i>Bacillus pumilus</i>)	47
坚强芽孢杆菌 (<i>Bacillus firmus</i>)	49
凝结芽孢杆菌 (<i>Bacillus coagulans</i>)	51
多粘芽孢杆菌 (<i>Bacillus polymyxa</i>)	55
浸麻芽孢杆菌 (<i>Bacillus macerans</i>)	59
环状芽孢杆菌 (<i>Bacillus circulans</i>)	60
嗜热脂肪芽孢杆菌 (<i>Bacillus stearothermophilus</i>)	65
蜂房芽孢杆菌 (<i>B. alvei</i>)	68
侧孢芽孢杆菌 (<i>Bacillus laterosporus</i>)	72
短芽孢杆菌 (<i>Bacillus brevis</i>)	74
幼虫芽孢杆菌 (<i>Bacillus larvae</i>)	76
日本甲虫芽孢杆菌 (<i>Bacillus popilliae</i>)	81
缓病芽孢杆菌 (<i>Bacillus lentimorbus</i>)	86
球形芽孢杆菌 (<i>Bacillus sphaericus</i>)	90
未定位菌株的描述	94
菌株的鉴定	104
检索表 1: 鉴定芽孢杆菌属各种模式株的步骤	106
检索表 2: 芽孢杆菌属各种模式株的鉴定	107
芽孢杆菌属各种菌株的保存	109
材料和方法	110
结果	111

讨论.....	117
总结.....	118
影响产生乙酰甲基甲醇的因素.....	119
培养基高压灭菌.....	120
培养.....	122
蛋白胨的种类.....	123
培养基反应.....	124
通气.....	124
测定乙酰甲基甲醇的试剂.....	125
产生乙酰甲基甲醇的结论.....	126
蕈状芽孢杆菌菌落的变异.....	128
变异株的获得.....	129
变异株的检查.....	130
噬菌体对变异株的溶菌作用.....	131
非假根状变异株的稳定性.....	131
从国立模式菌株保藏馆(NCTC)和国立工业细菌保藏馆(NCIB)	
得到的复制菌株对照表.....	132
表 1—57	138
参考文献	242

引 言

这里所谈的芽孢杆菌属只包括具有好氧、能生成折光力强的芽孢杆状菌，这些芽孢比营养细胞对于热、干燥和其他破坏因素更有抵抗力。然而，由于细菌的变异性，因此不能强符于这个简单的定义。例如，少数菌株在研究的过程中未观察到芽孢的生成，但具有生芽孢菌株的所有其它的测定特性；因此，它们仍被认为是芽孢杆菌属的成员。

我们的指导思想是对细菌的种作如下的定义：种是一群新分离、老的和变异的菌株所组成的，它们都具有一系列与其它群菌株鉴别的相关特征。这个定义要求检查许多的菌株，包括新分离的、在体外保存多年的菌株以及尽可能多的变异菌株；同时要鉴定种的稳定性，即在试管中保存几年后仍然存在的特性。正如经常发生的那样，如一个类群只有少数菌株可用时，则它们种的描述一直到研究更多菌株之后才能肯定。

由于种的这个定义，因此不稳定的特征如色素形成、生长阶段和致病性就不能应用。虽然可不管可变的特性，描述时，应用新分离菌株的特性，而保存菌株却被叫做逐渐不用（正在走向死亡）的菌株，但是分类学家还应考虑到老菌株。细菌命名国际法规（细菌命名国际委员会，1966）*的第一个原则的主要目的在于名称的固定。这个目的只能在包括以前命名、并鉴定过的菌株的研究中才能实现。

对鉴定种有用的稳定特性是很多的。当研究者比较大量菌株

• 引证的参考文献是以作者或作者们的名字，随后为发表的年份所表示。

时，他就想建立每个种有关特征的鉴别模型。为了建立这个模型，他选择并应用一些便利和适用于他们试验室的方法。采用的测定和程序包括一些已弃除而过去应用过的方法；另外一些是新近设计而通常使用的；还有一些是这个分类单位中可以新应用的。

新的资料应该欢迎，但必须要经过充分验证后才能接受。有些研究者倾向于在未确立其应到许多菌株的分类价值之前，就过于匆忙地接受新资料。微生物学家在细菌研究中，设计和应用了新的培养基、新方法和新仪器；但这些新方法和指征“在分类单位的认识和排列很少导致根本性的改变，这种认识和排列是由一个具生物学思想的分类学家所作的（Mayr, 1964）”。用一系列稳定特性定的有效种的一组菌株，因此，用其它稳定特性类型的有关特征也能定为同一个种。

在微生物分类学方面提出的大部分问题和争论，是由于代表种的一些菌株的同源性有很大变化所引起的。遗憾的是有的（一个）种的概念和用一个模式株作的种的定义是以一些同源种为根据的。多粘芽孢杆菌 [*Bacillus polymyxa* (Prazmowski) Mace] 是一个例子。它的菌株在他们反应方面相当一致；但其他种的组成株是相对异源的，形成一系列不同程度的差异如同一连串色彩彼此浓淡不同的光谱。如果对在这样的光谱末端的少数菌株进行观察，差别是显著的；然而，在更多菌株的研究中出现大量的过渡类型，这就抹掉了起初提出的界线。

某些种，例如环状芽孢杆菌 (*Bacillus circulans* Jordan) 可描述为变形虫状的，因为它们是一些不能适当分开的蔓延的聚合体。Gibson 和 Topping (1938) 把环状芽孢杆菌描述为一个复合体而不是一个单一的种，我们也认为特别合适。随着对各类群认识的增进，可测定复合体数目也增加，并且也需要更实用的命名系统。

用这些和另外与标准不符合的种进行工作，细菌学家以大量和不断增加的菌株朝着建立“一个能够鉴定，并归群所有已有类

别的分类和命名系统”的目标奋斗 (Blackwelder, 1967)。朝着这个目标奋斗如何辛苦都没有关系, 但分类学家常常痛苦地发觉他自己努力还不够, 还有大量留下要做的工作。充其量, 他仅能作出一篇进展的报告。

这个手册主要以美国菌种保藏馆 (ATCC) 的菌株为根据。有些种的代表的扩充是从 N. R. Smith 保藏的菌株 [NRS 保藏菌与在“农业专著 16 号”所描写的基本相同 (Smith 等, 1952, 145—148)] 和从美国农业部在 Peoria III 的 ARS 保藏的菌株得到的。从 NRS 和 ARS 保藏菌中来的菌株带着“农业专著 16 号”和从 ATCC 来的菌株所无的种名。

在已检查并报道过性质的 607 株中, 有 530 株已定为 18 个种。剩下未定位的 77 株 (13%) 菌可以代表或不代表特殊的种, 其中一些毫无疑问地可成为新种的模式。然而, 对这很少的菌, 我们只能指出它们表现的特征及其与其他种的关系。37 株附加的菌株, 使总数为 644 株。这 37 株中有些菌株已经鉴定, 但它们的性质没有报道。另一些列为未检查的。一个这样规模的手册需要一个终止的日期。索引 1 和 2 包括所有我们在本手册所收集的并已命名的芽孢杆菌的菌株, 以及 NRS 保藏的已命名的菌株。我们十分感谢从其他微生物学家得到的并已命名的其它芽孢杆菌的种和在这里代表性差的不同菌株。

培养基和方法

当收到培养物后，就划线于营养洋菜的平板（蛋白胨 5 克，牛肉膏 3 克，洋菜 15 克，蒸馏水 1000 毫升，pH6.8）或在 J-洋菜平板（胰胨 5 克，酵母膏 15 克， K_2HPO_4 8 克，洋菜 20 克，蒸馏水 1000 毫升，pH7.3—7.5，葡萄糖 2 克）分别过滤灭菌，加入已高压灭菌过的培养基中。J-洋菜用于营养要求苛刻、生长缓慢的幼虫芽孢杆菌（*B. larvae*）、日本甲虫芽孢杆菌（*B. popilliae*）和缓病芽孢杆菌（*B. lentimorbus*）的培养物。如果在平板上只出现一个类型的菌落，则从土壤浸汁洋菜*上所得的培养物（而非从菌落）和营养肉汤中（与营养洋菜成分相同，而不加洋菜）制备保藏的菌种。如果在营养洋菜平板上出现一个以上的菌落，就要选每类型的一个菌落并作为一个各别的菌株进行研究。在“乳状病原细菌和幼虫芽孢菌的维持和保存”一节中列出三个昆虫病原菌的保藏菌种的制备。

除非另外注明，所有培养物都以保藏菌种接种在土壤浸汁洋菜上，除了昆虫病原菌（幼虫芽孢杆菌、日本甲虫芽孢杆菌和缓病芽孢杆菌）用半固体（0.1%洋菜）或双相的 J-洋菜。除非说明例外，所有的培养基都要 121℃ 20 分钟高压灭菌。

显微形态

在土壤浸汁洋菜或 J-洋菜上幼虫芽孢杆菌、日本甲虫芽孢杆菌和缓病芽孢杆菌的生长 18—24 小时的涂片，或为了看得见的生

* 见“芽孢菌属各种菌株的保存”部分。

长需要更长的时间的幼龄培养物的涂片空气干燥（而非热固定），用番红（番红 0.25 克；95% 乙醇 10 毫升；蒸馏水 100 毫升）或用 Hucker 氏的 (Soc. Amer. Bact., 1957) 草酸铵结晶紫 (5—10 秒)，观察细胞的大小和形状，有无阴影类型或链，以及原生质有无空泡或液泡型。为了与土壤浸汁洋菜的培养物进行比较，培养在葡萄糖洋菜〔土壤浸汁加上 1.0% (W/V) 的葡萄糖〕18 到 24 小时或在可见生长物出现时的年幼培养物也轻度染色。虽然有些培养物在 18 到 24 小时含有孢囊和游离孢子，但还有许多菌株需要培养 3—7 天或更久的时间，才观察到孢囊、成熟芽孢的大小、形状以及它们在孢囊中的位置。幼虫芽孢杆菌、日本甲虫芽孢杆菌和缓病芽孢杆菌需要特殊培养基和条件 (Bailey 和 Lee, 1962; Haynes 和 Rhodes, 1972; Rhodes 等, 1965; Steinkraus 和 Tashiro, 1955) 或者接种在昆虫寄主内才生芽孢 (Pridham 等, 1964)。芽孢不用染色，因为在单染的涂片中不着色的芽孢很容易识别。

在测定运动性的制片中，培养物接种在带凝结水或加入 0.2 毫升无菌蒸馏水的土壤浸汁斜面上。在最适的温度培养 6—6.5 小时以后，从斜面底部取一接种环的液体在载玻片上与一滴蒸馏水混合，制片，立即用显微镜观察运动性。如果培养物 6 小时后不生长，在培养 24 小时或生长物出现时再观察。在液体或双相培养物中，活跃生长的幼虫芽孢杆菌、日本甲虫芽孢杆菌和缓病芽孢杆菌用相差显微镜观察运动性。

观察运动性的制片风干以后，用 Hucker 氏的革兰氏染色的改良方法来染色。

蜡状芽孢杆菌 (*B. cereus*) 及其变种在土壤浸汁的培养物 28℃ 培养 3—7 天以后并在冰箱内贮藏 5—7 个月以后，用相差显微镜观察伴孢晶体。

培 养 温 度

培养物在它们最高生长温度之下约 10—15℃ 下培养。适冷菌株的培养物培养在 20—25℃；适嗜中温的培养物（最高温度 37—50℃）培养于 28—35℃。最高温度为 55—60℃ 菌株的培养物在 37—45℃ 培养；能在 65℃ 或更高温度下生长的培养物，除非特别说明其温度之外，都在 45—55℃ 下培养。在 50—55℃，培养物通常培养一星期，其余的温度一般保持二个星期。

接 触 酶 反 应

有不同的方法测定接触酶的产生。在贮存菌种常规转接之后，吸取 10% H_2O_2 0.5 毫升放在每管弃去的培养物上。如果立刻观察到大量的气泡，则培养物记录为接触酶阳性。如果只有极少数气泡或没有，则在土壤浸汁洋菜上制备一新鲜培养物，培养时间决定于生长速度，一般培养 1—2 天，注满 H_2O_2 。如果一个菌株的幼龄培养物（除了幼虫芽孢杆菌、日本甲虫芽孢杆菌和缓病芽孢杆菌之外的一个）不分解 H_2O_2 ，在煮过的血洋菜（巧克力洋菜，BBL）的另一个培养物于 1 或 2 天时测定接触酶（Whittenbury, 1964）。如果仍然没有产生分解 H_2O_2 明显的证据，即认为是接触酶阴性。

适合于幼虫芽孢杆菌、日本甲虫芽孢杆菌和缓病芽孢杆菌观察有无接触酶的另一方法是用 10% H_2O_2 注满在 J-洋菜平板上生长的菌落或汇合生长的边缘。由于营养苛求的昆虫致病菌生长缓慢，测定一般不能少于 8 天的培养物， H_2O_2 加入之后，平板宏观检查气泡的释放。

厌 氧 生 长

一小环（外径 1.5 厘米）的营养肉汤的培养物穿刺到无葡萄

糖或Eh指示剂的厌氧洋菜的试管（酪朊水解物 20 克，氯化钠 5 克，硫甘醇钠 2 克，甲醛次硫酸钠 1 克，蒸馏水 1000 毫升，pH 7.2）。这个脱水的培养基可得自Baltimor生物试验室*。培养幼虫芽孢杆菌、日本甲虫芽孢杆菌和缓病芽孢杆菌，厌氧洋菜每1000 毫升中加入 15 克酵母膏。

记载洋菜表面的生长物（好氧）和沿着穿刺线的生长物（厌氧）。在 45℃以下温度的培养物，于 3 天和 7 天记录其生长；在 45℃或更高的温度，1 天和 3 天记录。三个难长的昆虫致病菌常常需要 14 天的培养。

V—P测定

5 毫升葡萄糖培养液〔胰胰(Difco)** 7 克，葡萄糖 5 克，氯化钠 5 克，蒸馏水 1000 毫升，或J-肉汤培养液（与J-洋菜相同，但没有洋菜）加 0.5% (W/V) 葡萄糖和或省略磷酸钾〕在 20 毫米的试管中高压灭菌。培养物准备一式三份，在3、5 和 7 天时，用 40% (W/V) 氢氧化钠和培养物并加入 1 毫克肌酸（一小刀尖）混和测定乙酰甲基甲醇。室温中 30 到 60 分钟后出现红色，说明有乙酰甲基乙醇***。

V—P培养液的pH

培养 7 天和测乙酰甲基甲醇之前的培养物，pH用pH试纸（纽约Brookly, 微生物基础试验室）或用pH计测定。V—P肉汤（胰胰-蛋白胨基础）的pH在灭菌以后和接种以前通常是 6.5；J-培养通常是 6.8。

* Baltimore产品，Md公司的商品名称为BBL。

** Difco 实验室，Detroit，Mich产品的商品名是“Difco”和更常称“Bacto”。

*** 见影响乙酰甲基甲醇产生的因素。