

炭疽杆菌与其他需氧芽孢杆菌鉴别方法的研究

张孝齐 曹巧珊
(指导者 汪美先)

炭疽杆菌与其他需氧芽孢杆菌间的鉴别至今尚无较可靠方法。本文乃报导 43 株标准炭疽杆菌, 33 株标准的其他需氧芽孢杆菌及 212 株新分离的需氧芽孢杆菌实验结果: (1) 串珠试验, 43 株标准炭疽杆菌中 95.3% 阳性, 80 株新分离炭疽杆菌 92.5% 为阳性而 165 株其他需氧芽孢杆菌全部为阴性。(2) W 噬菌体裂解试验, 所有炭疽杆菌全部被裂解, 其他的需氧芽孢杆菌中仅有 1 株新分离的蜡样杆菌被裂解, 其余全不被裂解。(3) 碳酸氢钠培养基上 CO₂ 培养试验, 43 株标准炭疽杆菌中除 7 株弱毒株外, 均出现粘液菌落, 80 株新分离的炭疽杆菌中 78 株出现粘液菌落而其他的则均不出现粘液菌落。(4) 青霉素抑制试验、水杨苷发酵试验、动力试验及溶血试验在炭疽杆菌为阴性, 在其他需氧芽孢杆菌中则不一致。因此提出, 串珠试验、W 噬菌体裂解试验及碳酸氢钠培养基上 CO₂ 培养下菌落的观察可作为炭疽与非炭疽杆菌的主要鉴别方法; 而普通培养基上菌落的观察、青霉素抑制试验、水杨苷发酵试验、动力试验及溶血试验可作为辅助的鉴别方法。

炭疽杆菌与其他需氧芽孢杆菌的鉴别, 特别是与蜡样杆菌的鉴别报告已有, 虽然文献报告很多^[1-3], 但至今尚缺乏一套较可靠的鉴别方法。本文用标准炭疽杆菌及其他需氧芽孢杆菌菌种, 考查几种鉴定方法, 鉴别新分离的需氧芽孢杆菌。提出下面几项比较可靠的鉴别方法, 供实际工作中应用。

材料与方 法

1. 用于研究的 76 株标准菌种 炭疽杆菌 (*Bacillus anthracis*) 43 株, 蜡样杆菌 (*B. cereus*) 10 株, 蕈状杆菌 (*B. cereus var. mycoides*) 2 株, 巨大杆菌 (*B. megatherium*) 3 株, 短小杆菌 (*B. pumilus*) 4 株, 枯草杆菌 (*B. subtilis*) 4 株, 软化杆菌 (*B. maceraus*) 2 株, 多粘杆菌 (*B. polymyxa*) 4 株及球形杆菌 (*B. sphaericus*) 4 株。除我们原保存的 5 株外, 其余是由军事医学科学院、西北农学院、长春兽医大学、兽医研究所及中国科学

院微生物研究所赠给。用于研究的 212 株新分离的菌种中, 198 株是我室从空气、水及皮革中分离出来的, 14 株是来自中国科学院微生物研究所及西北农学院。W 噬菌体是军事医学科学院赠给, 经我们以 CTN₁ 菌株作被感染菌种传代, 噬菌斑效价达每毫升 3×10^8 ^[4]。

2. 脂肪染色法 按 Burdon 的报告进行^[1,5]。

3. 溶血试验 以 5% 绵羊血液琼脂 15 毫升, 倒于陪替氏平皿中, 接种菌种后, 37°C 培养 18—24 小时观察结果。

4. 青霉素抑制试验 将菌种接种于肉汤中, 37°C 水浴培养 3 小时后, 取 1 接种环线接种于每毫升含 10 单位、5 单位青霉素琼脂培养基上, 37°C 培养 24 小时观察结果^[1,2]。

5. 串珠试验 参考 Jensen^[6] 及李良寿等^[7] 的报告, 将炭疽杆菌接种于 5% 绵羊血液琼脂斜面, 次日移种至肉汤经 37°C 18 小时培养后, 以相当 Brown 比油管^[8] 第 1 号浓度菌液作 10⁻³ 倍稀

表 1 标准需氧芽孢杆菌的鉴别 I

标准菌种		炭疽杆菌	蜡样杆菌	蕈状杆菌	巨大杆菌	短小杆菌	枯草杆菌	软化杆菌	多粘杆菌	球形杆菌	
株 数		43	10	2	3	4	4	2 ⁷	4	4	
芽 孢	肿大	圆								4	
		卵圆						2	4		
	不肿大	<0.9 微米					4	4			
>0.9 微米		43	10	2	2 ⁶						
脂肪染色	无或少					4	4	2	4	4	
	大颗粒		43	10	2						
	充 满					3					
动 力 (悬滴)	+			10	2	3	4	4	4	4	
	-		43								
菌 落	肉眼	粗糙	42	2		3					
		蜡样	1 ³	8							
		光滑					4	1	2	4	4
		根状			2						
		干涩						3			
	镜下	卷发	41	8							
		粗糙	2 ⁴	2		3		4			
		光滑					4		2	4	4
		根状			2						
	溶血试验	溶 血			9	2		1	2		
不溶血 ²		43	1		3	3	2	2	4	4	
青霉素抑 制试验	10单位	生长		8	1						
		抑制	43	2	1	3	4	4	2	4	4
	5单位	生长		9	1						
		抑制	43	1	1	3	4	4	2	4	4
	对照	生长	43	10	2	3	4	4	2	4	4
		不生长									
NaHCO ₃ 培养 基CO ₂ 培养下 的菌落形态	粘 液		36								
	与普通培养基同		7 ⁵	10	2	3	4	4	2	4	4
串珠试验	+		41								
	-		2 ⁴	10	2	3	4	4	2	4	4
W噬菌体裂 解 ¹ 试验	裂 解		43								
	不裂解			10	2	3	4	4	2	4	4

注: 1. W噬菌体是以 CTN₁ 菌株增殖; 2. 不溶血包括微溶血; 3. 为 Ba₇ 株; 4. 为苗 I、苗 II 株; 5. 为 CTN₁、CTN₃、470007、Ba₃、Ba₄、Ba₅、Ba₆ 株; 6. 有 1 株始终无芽孢; 7. 在肉汤中不生长。

释, 37℃ 水浴中培养 3 小时, 然后加青霉素, 使其最后浓度为每毫升 0.5 单位, 37℃ 水浴中再培养 1 小时, 加甲醛(使其最终浓度为 2%) 固定, 制成湿片, 在显微镜下直接观察。

6. W 噬菌体裂解试验 接种菌种于普通琼脂培养基上, 然后以接种环滴入 1 滴噬菌体, 经 37℃ 18—24 小时培养后观察结果。

7. 碳酸氢钠培养基, CO₂ 培养观察菌落性状 按 Thorne 方法^[9] 将菌种接种于 0.75% 碳酸氢钠培养基上, 燃烛培养 37℃ 经 48 小时观察结果。

8. 牛奶腓化试验 将接种了菌种的培养基, 置 37℃ 培养, 每日观察结果持续 2 周。

9. 淀粉水解试验 将菌种接种入淀粉培养基内, 37℃ 培养 7 天, 加革兰氏碘液, 观察其蓝色褪色程度, 无蓝色反应证明淀粉已全部被水解。

10. V.P. 试验 将菌种分别接种入 7 管 V.P. 培养基中, 37℃ 培养, 每天取 1 小管加等量 40% NaOH (含 0.3% 肌酸), 观察结果。

11. 明胶液化试验 将菌种穿刺接种于明胶 (12%) 培养基中, 热天置室温培养, 每天取出置冰箱中观察结果; 冷天置 37℃ 孵箱中培养, 每天取出置室温观察结果, 共培养观察 2 周。

12. 糖发酵试验、硝酸盐还原试验、柠檬酸盐利用试验及尿素利用试验 按实验室常规方法进行。

试验结果

1. 标准需氧芽孢杆菌的鉴别

如表 1 所列, 革兰氏染色镜检, 芽孢的形状软化杆菌、多粘杆菌的芽孢为卵圆形, 比菌体横径大; 球形杆菌的芽孢为圆形, 比菌体横径大; 其他菌的芽孢则不比菌体横径大。

从脂肪染色镜检看, 炭疽、蜡样及蕈状杆菌所含脂肪是大颗粒; 巨大杆菌所含脂肪是均匀分布, 充满整个的细胞; 而其他菌的脂肪, 则很少或几乎不易看到。

动力试验除炭疽杆菌外, 其他均有动

力。

菌落观察, 炭疽杆菌为粗糙菌落、镜下呈卷发如狮子头状; 蜡样杆菌为蜡样菌落、镜下呈卷发但不成狮子头状; 蕈状杆菌为根状菌落; 巨大、枯草杆菌的菌落粗糙; 短小、软化、多粘及球形杆菌的菌落光滑。

溶血试验, 炭疽、巨大、软化、多粘及球形杆菌不溶血; 10 株蜡样杆菌中 9 株不溶血; 蕈状杆菌溶血; 其他则兼有溶血及不溶血。

青霉素抑制试验, 43 株炭疽杆菌均被抑制; 10 株蜡样杆菌中 8 株在 10 单位青霉素培养基上生长, 9 株在 5 单位青霉素培养基上生长; 其他菌多被抑制。

串珠试验, 43 株炭疽杆菌中 41 株阳性 (包括 2 株疫苗株即 470008、470009), 2 株阴性 (为 I 苗、II 苗即 470005、470006); 其他菌种均为阴性。

W 噬菌体裂解试验, 43 株炭疽杆菌均被裂解; 其他菌种不被裂解。

碳酸氢钠培养基 CO₂ 培养, 43 株炭疽杆菌中 36 株呈现粘液菌落。如以 Olt 荚膜染色法^[10] 染粘液菌落上的细菌, 可见肥厚的荚膜, 7 株弱毒株不出现粘液菌落 (470007、470008、470009、Ba₃、Ba₄、Ba₅、Ba₇); 其他菌种所出现的菌落在普通培养基上相似, 如多粘杆菌在此培养基上虽菌落均呈粘液样, 但荚膜染色阴性。

如表 2 所列, 炭疽杆菌的水杨苷发酵为阴性; 蜡样杆菌与蕈状杆菌在生化反应上是一致的; 巨大杆菌 V.P. 试验阴性; 短小杆菌与枯草杆菌间, 前者硝酸盐、淀粉水解试验为阴性, 后者这两个试验为阳性; 软化、多粘杆菌发酵糖类产酸产气; 球形杆菌不发酵糖类, 并且其他生化反应为阴性。

2. 新分离的需氧芽孢杆菌的鉴别

203 株新分离的菌种中, 鉴定为炭疽杆菌的 80 株; 蜡样杆菌的 73 株; 蕈状杆菌

表2 标准需氧芽孢杆菌的鉴别 II

标准菌种		炭疽杆菌	蜡样杆菌	覃状杆菌	巨大杆菌	短小杆菌	枯草杆菌	软化杆菌	多粘杆菌	球形杆菌
株数		43	10	2	3	4	4	2	4	4
葡萄糖	+	43	10	2	3	4	3	2	⊕4	
	-						1			4
水杨苷	+		10	2	2	4	2	2	⊕4	
	-	43			1		2			4
木糖	+							2	+1 ⊕3	
	-	43	10	2	3	4	4			4
阿拉伯糖	+				3	1	1	+1 ⊕1	+1 ⊕3	
	-	43	10	2		3	3			4
蔗糖	+	25	9	1	3	4	4	2	⊕4	
	-	18	1	1						4
乳糖	+							⊕2	⊕4	
	-	43	10	2	3	4	4			4
石蕊牛乳	+	43	10	2	3	3	4	2	4	
	-					1				4
硝酸盐	+	43	10	2			4	2	4	
	-				3	4				4
淀粉水解	+	43	8	2	3		4	1	4	
	±		2							
	-					4		1		4
柠檬酸盐	+				1	4	4			
	-	43	10	2	2			2	4	4
尿素	+		1	1	3		1			
	±						3			
	-	43	9	1		4		2	4	4
V.P. 试验	+	43	10	2		4	4		4	
	-				3			2		4
明胶液化	+	43	10	2	3	4	4			
	-							2	4	4

的6株；巨大杆菌的9株；短小杆菌的8株；枯草杆菌的5株；不发酵糖类的22株^[11-13]。另外由于标准菌种不全，有9株

未能定种。

80株炭疽杆菌均无动力，其中76株不溶血（093、094、107、124号菌株溶血）；

表 3 203 株新分离的需氧芽孢杆菌的鉴别 I

新分离菌种		炭疽杆菌	蜡样杆菌	匏状杆菌	巨大杆菌	短小杆菌	枯草杆菌	不发酵糖杆菌	
株 数		80	73	6	9	8	5	22 ⁷	
芽 孢	胀 大	圆							
		卵圆						1	
	不胀大	<0.9 微米					8	5	
		>0.9 微米	80	73	6	9			7
脂肪染色	无或少					8	5	22	
	大颗粒		80	73	6				
	充 满					9			
动力(悬滴)	+			38	6	9	8	5	22
	-		80	35					
菌 落	肉 眼	粗糙	79	5		7			14
		蜡样	1 ³	68		1			3
		光滑				1	8		5
		根状			6				
		干涩						5	
	镜 下	卷发	80	66		3			10
		粗糙		7		5		5	7
		光滑				1	8		5
根状				6					
溶血试验	溶 血		4 ⁴	44	3		4	4	1
	不溶血 ⁵		76	29	3	9	4	1	21
青霉素抑制试验	10 单 位	生长		44	1				3
		抑制	80	29	5	9	8	5	19
	5 单 位	生长		53	1				4
		抑制	80	20	5	9	8	5	18
	对 照	生长	80	73	6	9	8	5	22
		不生长							
NaHCO ₃ 培养基 CO ₂ 培养下的菌落形态	粘 液		78						
	与普通培养基同		2 ⁵	73	6	9	8	5	22
串珠试验	+		74						
	-		6 ⁶	73	6	9	8	5	22
W 噬菌体裂解 ¹ 试验	裂 解		80	1					
	不裂解			72	6	9	8	5	22

注: 1.同表1; 2.同表1; 3.为021株; 4.为093、094、107、124株; 5.为021、162株; 6.为093、094、107、124、164、165株; 7.其中14株始终不产生芽孢。

表 4 203 株新分离的需氧芽孢杆菌的鉴别 II

新分离菌种		炭疽杆菌	蜡样杆菌	蕈状杆菌	巨大杆菌	短小杆菌	枯草杆菌	不发酵糖杆菌
株 数		80	73	6	9	8	5	22
葡 萄 糖	+	80	73	6	9	8	5	
	-							22
水 杨 苷	+		40	5	3	8		
	-	80	33	1	6		5	22
木 糖	+				3	1		
	-	80	73	6	6	7	5	22
阿 拉 伯 糖	+		1		4	4		
	-	80	72	6	5	4	5	22
蔗 糖	+		50	5	6	6	2	
	-	80	23	1	3	2	3	22
乳 糖	+		1					
	-	80	72	6	9	8	5	22
石 蕊 牛 乳	+	80	72	6	3	6		5
	-		1		6	2	5	17
硝 酸 盐	+	80	69	6	1		5	14
	-		4		8	8		8
淀 粉 水 解	+	65	67	3	5	1	5	4
	±			3	2			2
	-	15	6		2	7		16
柠 檬 酸 盐	+		1		2	5	5	
	-	80	72	6	7	3		22
尿 素	+				4		2	
	±		1	1		1		
	-	80	72	5	5	7	3	22
V.P. 试 验	+	80	73	6		8	5	11
	-				9			11
明 胶 液 化	+	80	73	6	9	8	5	20
	-							2

79 株菌落粗糙呈狮子头状, 均被青霉素抑制; 74 株串珠试验阳性 (093、094、107、124、164、165 号菌株为阴性), 均被 W 噬

菌体裂解; 78 株在碳酸氢钠培养基 CO_2 培养下, 出现粘液菌落 (021、162 号菌株不出现粘液菌落), 均不发酵水杨苷。

73 株蜡样杆菌中 38 株有动力；44 株溶血；68 株菌落为蜡样；29 株被青霉素抑制，串珠反应均为阴性；72 株不被 W 噬菌体裂解（161 号菌株被裂解），在碳酸氢钠培养基上均不出现粘液菌落。

蕈状杆菌除菌落为根状外，其他特性均似蜡样杆菌；巨大杆菌的脂肪充满整个细胞，V.P. 试验阴性；短小杆菌硝酸盐还原试验及淀粉水解试验为阴性；枯草杆菌硝酸盐还原及淀粉水解试验阳性。

讨 论

通过 76 株标准菌株及 212 株新分离的需氧芽孢杆菌的鉴定结果看，以串珠试验、W 噬菌体裂解试验及碳酸氢钠培养基上形成的粘液菌落，可以鉴别炭疽杆菌与其他需氧芽孢杆菌。因为除炭疽杆菌外，其他的需氧芽孢杆菌串珠试验为阴性，W 噬菌体裂解试验除个别的蜡样杆菌外均为阴性，碳酸氢钠培养基 CO₂ 培养下均不形成粘液菌落。

在 43 株标准炭疽杆菌中，苗 I、苗 II 2 株串珠试验为阴性，镜下不呈卷发状；在 80 株新分离的炭疽杆菌中，有 6 株串珠试验为阴性，这 6 株中有 4 株表现溶血，但由于这 6 株均属于无动力，对青霉素敏感，不发酵水杨苷，均被 W 噬菌体裂解，在碳酸氢钠培养基上又都形成粘液菌落，保持了炭疽杆菌的主要特征，所以虽然串珠试验阴性，但仍被定为炭疽杆菌。串珠试验在 43 株标准炭疽杆菌中，阳性率为 95.3%，在 80 株新分离的炭疽杆菌中阳性率为 92.5%；在标准 23 株及新分离的 132 株其他需氧芽孢杆菌中，串珠试验均为阴性。说明串珠试验在鉴别炭疽杆菌与其他需氧芽孢杆菌的特异性高，这点与 Jensen 和 Kleemeyer^[6]、Gustafson^[14]、Leisc^[3] 等的见解一致，即串珠试验特异性高，对鉴定有很大的价值。

W 噬菌体对标准及新分离的炭疽杆菌均裂解，对其他需氧芽孢杆菌中除 1 株新分离的蜡样杆菌外（161 号），均不裂解。161 号菌株其串珠试验阴性，被 W 噬菌体裂解，碳酸氢钠培养基上不形成粘液菌落，溶血，无动力，对青霉素敏感，不发酵水杨苷，综合以上特征定为蜡样杆菌。以上说明 W 噬菌体裂解试验对炭疽杆菌的特异性不是 100%；这点和 Brown 及 Cherry^[15] 的结果基本一致，他们报告 69 株蜡样杆菌中，2 株被 W 噬菌体裂解；本实验结果是 73 株蜡样杆菌中，有 1 株被裂解。

在碳酸氢钠培养基上、CO₂ 环境中培养，是否形成粘液菌落，在鉴别炭疽杆菌与其他需氧芽孢杆菌的准确性上，虽然曾为 Burdon^[16] 等所强调，但本实验中，43 株标准炭疽菌株中有 7 株不出现粘液菌落，其中 2 株为疫苗株；2 株为无毒株；1 株为弱毒株；2 株为强毒株。80 株新分离的炭疽杆菌中有 2 株不出现粘液菌落，其中 1 株菌落呈蜡样。而这些不形成粘液菌落菌株的串珠试验与 W 噬菌体裂解试验均为阳性，这些菌株是否目前已成为无毒的或弱毒的炭疽杆菌，尚待进一步研究证实。

炭疽杆菌对青霉素很敏感，在每毫升含 10 个单位或 5 个单位的青霉素培养基上均被抑制；蜡样杆菌则大多数能生长；蕈状杆菌个别能生长；其他需氧芽孢杆菌也多被抑制。这个结果和 Burdon^[1]、Burdon、Wende^[17] 以及 Gustafson^[14] 的结果一致；和 Brown^[2] 的结果则不一致；Brown 使用的是每毫升含 6 个单位的青霉素培养基，比一般学者所用青霉素浓度低，所以 Brown 发现炭疽杆菌在青霉素培养基上也有生长的，这可能与接种菌量较多也有关，因为我们使用每毫升培养基含 5 个单位的青霉素甚至更低浓度的青霉素培养基上，炭疽杆菌均不生长。因此，从鉴别炭疽杆菌角度上

可作为排除试验,即凡在青霉素培养基上生长的可认为不是炭疽杆菌。

动力试验及溶血试验阴性对炭疽杆菌的鉴定有支持的意义,因为没有一株炭疽杆菌是既有动力又溶血的,而其他的非炭疽杆菌则通常是阳性。Brown^[2]认为炭疽杆菌和其他需氧芽孢杆菌的溶血反应无明显差别,但 Burdon^[1]、Leise^[3]等则认为炭疽杆菌不溶血或微溶血而其他需氧芽孢杆菌大多呈强烈溶血可以鉴别。正如 Leise 分析的原因,认为血球存放时间、血液培养基的厚薄以及培养时间的长短均能影响炭疽杆菌的溶血结果,故应控制条件。而蜡样杆菌可表现既无动力又不溶血,因此,动力试验与溶血试验只能作为辅助试验。

从菌落的特征看,所有炭疽杆菌菌落,肉眼观察为粗糙型,镜检呈狮子头状;而蜡样杆菌肉眼观察为蜡样,镜检虽呈卷发,但不成狮子头状;因此在菌落的观察上也有助于鉴别。

至于芽孢的观察,只能分为不肿胀,卵圆形肿胀及圆形肿胀组,组内的菌种靠芽孢形态与大小,则无法识别,而脂肪染色有助于在芽孢不肿胀、大于 0.9μ 组内识别巨大杆菌;动力的观察上由于巨大、蕈状杆菌动得慢,常可被误认为无动力,这一点应该注意。

生化反应方面,炭疽杆菌不发酵水杨苷,蜡样杆菌在 10 株标准菌种中均发酵水杨苷,73 株新分离的菌种中 40 株发酵(54.7%),这和 Burdon 的结果基本一致,他们的报告中蜡样杆菌有 53% 分解水杨苷,因此,应用水杨苷鉴别炭疽与蜡样杆菌有辅助意义,凡分解水杨苷的可以认为不是

炭疽杆菌。

根据上述结果,鉴定炭疽与非炭疽杆菌可以采用串珠试验、W 噬菌体裂解试验、碳酸氢钠培养基上 CO_2 培养下菌落的观察为主要鉴别方法,而普通琼脂培养基上菌落的观察、青霉素抑制试验、水杨苷发酵试验、动力试验及溶血试验等可作为辅助鉴别方法;非炭疽杆菌间的其他需氧芽孢杆菌的鉴别可选用菌落、芽孢染色、脂肪染色、溶血、动力及生化试验等。

参 考 文 献

- [1] Burdon, K. L.: *J. Bact.*, **71**: 25—41, 1956.
- [2] Brown, E. R.: *J. Bact.*, **75**: 499—509, 1958.
- [3] Leise, J. M.: *J. Bact.*, **77**: 655—660, 1959.
- [4] McCloy, E. W.: *J. Hyg.*, **49**: 114—125, 1951.
- [5] Burdon, K. L.: *J. Bact.*, **52**: 665—678, 1948.
- [6] Jensen, J. and Kleemeyer, H.: *Zentr. Bakteriol. Parsitenk. Abt. J. Orig.*, **159**: 494—500, 1953.
- [7] 李良寿等: *微生物学报*, **11**: 80—87, 1965.
- [8] Mackie and Mccarlny's Handbook of Bacteriology, 10th Ed., E and S. Livingstone LTD., 1960.
- [9] Thorne, C. B.: *J. Bact.*, **63**: 363—368, 1952.
- [10] 丁锡康、刘雪园、威斯馨: *微生物学报*, **6**: 361—363, 1958.
- [11] Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th Ed., 709.
- [12] Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity, 4th Ed., 957.
- [13] 凌代文: *微生物*, **2**: 275, 1960.
- [14] Gustafson, B. A. and Srebag, S. E.: *Nordisk Veterinar Medicin*, **11**: 902—907, 1956.
- [15] Brown, E. R. and Cherry, W. B.: *J. Inf. Dis.*, **96**: 34—39, 1955.
- [16] Burdon, K. L.: *Bact. Proc.*, 106, 1955.
- [17] Burdon, K. L. and Wende, R. D.: *J. Inf. Dis.*, **107**: 224, 1960.

THE DIFFERENTIATION OF *BACILLUS ANTHRACIS* FROM OTHER AEROBIC SPOREFORMING BACILLI

CHANG SHIAO-CHI AND TSAO CHIAO-LI

Forty-three strains of *Bacillus anthracis*, 33 strains of other aerobic sporeforming bacilli and 212 unknown strains of aerobic sporeforming bacilli have been included in this study.

1. "String of pearls" Test: 95.3% were positive among 43 strains of known *B. anthracis*, 92.5% of 80 unknown strains, all other 165 strains of aerobic sporeforming bacilli were negative. It is concluded that this test can differentiate *B. anthracis* from other aerobic sporeforming bacilli.

2. Lysis by W bacteriophage: To this phage, 43 known strains and 80 unknown strains of *B. anthracis* were susceptible, while only one strain of *B. cereus* among 132 unknown strains was susceptible. This shows a relatively specificity of this reaction.

3. Growth on sodium bicarbonate medium under CO₂: Under this condition among 43 known strains of *B. anthracis*, 36 highly virulent strains and

78 strains of 80 unknown strains produced mucoid colonies, 165 strains of other aerobic sporeforming bacilli, did not produce mucoid colonies. It seems that this test can also be applied to the differential identification and the primary diagnosis of virulent *B. anthracis*.

4. *B. anthracis* could not grow on penicillin agar, showed no motility and hemolysis and could not ferment salicin while the other aerobic sporeforming bacilli showed different results. Therefore, these methods can be applied as necessary tests for differential identification.

Besides the colony appearance and biochemical reactions, the following tests were also helpful in the differentiation of this group of the organisms: *B. anthracis* could not ferment salicin, *B. sphaericus* was negative in all biochemical reactions, the other aerobic sporeforming bacilli had different results.