

简报

一种生芽孢培养基——淡薄培养基

战立克 刘聿太

(中国科学院微生物研究所, 北京)

芽孢的有无在细菌中是一项重要的分类指征。在《伯杰氏细菌分类手册》第七版^[1]中, 曾将形成芽孢的细菌分散置于芽孢杆菌科(Bacillaceae)的芽孢杆菌属(*Bacillus*), 芽孢梭菌属(*Clostridium*), 螺菌科(*Spirillum*)的脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)和微球菌科(Micrococccaceae)的八叠球菌属(*Sarcina*)中。而该手册第八版^[2], 把所有形成芽孢的细菌集中起来, 归成一个大的独立类群。该群共分五属: 芽孢杆菌属, 芽孢乳酸杆菌属(*Sporolactobacillus*), 芽孢梭菌属, 脱硫肠状菌属(*Desulfotomaculum*)和芽孢八叠球菌属(*Sporosarcina*)。用于区分芽孢菌与其他细菌的主要的、也是唯一的指征是芽孢菌能形成芽孢。因此检查一个细菌能否生芽孢是一个非常重要的鉴定项目。细菌分类学的发展史上, 在这一点上常发生差错。例如, 枯草芽孢杆菌 [*Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Conn, 1872], 在1835年就因未发现芽孢而被埃伦伯格(Ehrenberg)误定为柔弱弧菌(*Vibrio subtilis*)^[3]。由于芽孢菌既可能是革兰氏阳性菌, 也可能是革兰氏阴性菌, 既可能是杆菌也可能是球菌。也就是说, 在许多类群的菌内均有产生芽孢的可能性。因此能否在培养物中最大限度地检出芽孢菌, 关系到各类菌鉴定工作的正确性。

由于芽孢菌营养体的生长条件和形成芽孢所需条件不同^[4], 要确定一株菌能否生芽孢, 需要利用特殊的生芽孢培养基。常用的生芽孢培养基有黄豆浸汁培养基^[5], 土壤浸汁培养基^[6, 7]。牛肉汁(或牛肉膏)蛋白胨培养基和玉米粉酵母膏培养基也可用于检查芽孢。我们在实践中发现, 有一种培养基具有生芽孢快、制备简易、检出率高等优点。并选择了一批有代表性的芽孢菌, 用此培养基与几种常用的生芽孢培养基进行了生芽孢能力的比较研究。

材料和方法

(一) 培养基

比较了五种培养基的芽孢形成率。淡薄培养基是根据山田和镰田^[8]用于观察革兰氏阳性菌个体形态的培养基将其成份加以改进而成。土壤浸汁和黄豆浸汁培养基是长期以来国内外观察芽孢用的培养基。玉米粉-酵母膏培养基是我们曾用于观察芽孢的培养基。以牛肉汁培养基为对照。

各种培养基成份:

I. 淡薄培养基(克): 酵母膏0.7, 蛋白胨1.0, 葡萄糖 1.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, K_2HPO_4 1.0, 琼脂 20, 加自来水至 1,000 毫升。pH 7.0—7.2; 8 磅 30 分钟灭菌。

II. 土壤浸汁培养基(克): 蛋白胨 5, 牛肉膏 3, 琼脂 20, 土壤浸汁* 250 毫升, 自来水 750 毫升。pH 7.0—7.2; 15 磅 30 分钟灭菌。

III. 黄豆浸汁培养基: 100 克黄豆在 1200 毫升水中浸泡过夜, 蒸煮 90 分钟, 然后用棉花过滤, 将滤液补足至 1000 毫升。加 0.5 克 K_2HPO_4 和 15 克琼脂。pH 6.8—7.0; 15 磅 30 分钟灭菌。

IV. 玉米粉-酵母膏培养基(克): 牛肉汁 1000 (毫升), 蛋白胨 10, NaCl 5, 玉米粉 50, 酵母膏 10, 琼脂 15, pH 7.2—7.4; 15 磅 30 分钟灭菌。

V. 牛肉汁培养基(克): 牛肉汁 1000 (毫升), 蛋白胨 10, NaCl 5, 琼脂 20。pH 7.2; 15 磅 30 分钟灭菌。

以上培养基均制成斜面。

本文于 1977 年 6 月 30 日收到。

* 菜园土加等重的 0.1% Na_2CO_3 溶液, 15 磅蒸汽加热 1.5 小时, 过滤得土壤浸汁, 备用。

表 1 在五种培养基

培养基 \ 菌号		AS 1.126					AS 1.196					AS 1.152					AS 1.864					AS 1.269				
		1	2	4	7	14	1	2	4	7	14	1	2	4	7	14	1	2	4	7	14	1	2	4	7	14
I	芽孢形成 (%)	65	75	90			90	90				35	40	40	35	35	5	5	15	10	50	<5	40	65	85	90
II		5	30	50	75	90	60	90				20	15	40	75	70	0	15	55	45	45	25	35	55	65	70
III		75	90				90	90				60	70	70	75	80	55	15	20	20	75	<5	45	65	75	90
IV		0	55	75	90		25	75	90			<5	30	25	40	35	0	20	80	65	45	0	35	65	80	90
V		50	70	90			50	45	90			40	40	50	50	55	0	25	55	85	90	5	35	60	65	60

培养基 \ 菌号		AS 1.910					AS 1.197					AS 1.261					AS 1.180					AS 1.224				
		1	2	4	7	14	1	2	4	7	14	1	2	4	7	14	1	2	4	7	14	1	2	4	7	14
I	芽孢形成 (%)	90	90				50	90				90	90				90	90				15	40	80	90	
II		0	50	90			<5	55	90			5	75	90			70	75	90			<5	<5	75	85	85
III		<5	<5	45	45	45	0	10	70	90		80	80	80	85	85	40	40	90			<5	25	75	90	
IV		0	0	<5	<5	0	0	<5	40	45	90	0	<5	5	<5	10	40	60	70	90		0	0	5	85	85
V		0	90				0	<5	<5	<5	5	0	10	<5	<5	5	55	85	85	90		5	10	35	70	60

培养基 \ 菌号		AS 1.930					AS 1.263					AS 1.384					AS 1.268					AS 1.309				
		1	2	4	7	14	1	2	4	7	14	1	2	4	7	14	1	2	4	7	14	1	2	4	7	14
I	芽孢形成 (%)	90	90				90	90				5	15	35	35	30	85	85	90			90	90			
II		50	45	90			70	85	75	90		15	15	5	50	65	65	40	30	65	80	60	90			
III		45	45	90			85	90				5	10	50	60	70	85	90				50	50	90		
IV		<5	30	65	70	85	0	<5	70	90		<5	<5	5	60	55	0	0	10	40	80	0	15	35	90	
V		<5	35	75	55	60	40	50	70	75	70	45	55	55	75	85	15	25	45	55	60	50	70	90		

培养基 \ 菌号		5-16					7-5					7-6					7-9					7-11				
		1	2	4	7	14	1	2	4	7	14	1	2	4	7	14	1	2	4	7	14	1	2	4	7	14
I	芽孢形成 (%)	90	90				90	90				90	90				0	0	<5	<5	45	10	10	40	25	20
II		50	90				45	45	10	20	45	70	45	90			0	0	0	0	<5	0	0	0	<5	<5
III		75	90				40	65	75	90		40	40	70	70	85	30	15	20	25	35	<5	<5	20	15	10
IV		0	0	<5	25	90	0	0	0	0	0	0	0	0	<5	90	0	0	0	0	0	5	0	35	<5	0
V		0	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	<5	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0

上的芽孢形成率

AS 1.66					AS 1.67					AS 1.68					AS 1.69					AS 1.234					AS 1.231				
1	2	4	7	14	1	2	4	7	14	1	2	4	7	14	1	2	4	7	14	1	2	4	7	14	1	2	4	7	14
25	30	70	90		25	40	35	50	75	5	10	35	45	70	<5	5	5	5	5	90	90				75	90			
50	70	70	75	85	70	90				0	30	70	85	80	<5	30	75	90		55	90				<5	40	40	45	45
20	25	30	70	60	15	20	15	30	35	5	10	40	80	90	<5	<5	<5	<5	<5	65	75	90			5	<5	50	55	45
0	0	40	75	90	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	70	90		0	<5	15	90		<5	5	55	80	70	45	45	45	90	
30	40	55	70	60	60	70	70	70	30	<5	10	35	40	55	<5	15	30	30	50	40	60	80	80	85	未长菌				

AS 1.441					AS 1.442					AS 1.515					AS 1.271					AS 1.326					AS 1.560				
1	2	4	7	14	1	2	4	7	14	1	2	4	7	14	1	2	4	7	14	1	2	4	7	14	1	2	4	7	14
35	80	85	90		0	5	5	55	65	50	55	65	75	90	65	70	85	90		40	50	80	85	90	10	20	35	30	25
20	60	90			0	5	<5	10	50	<5	45	75	70	70	5	55	80	90		5	20	40	75	90	15	30	5	65	45
15	10	90			0	0	<5	<5	10	5	10	20	25	90	60	90				40	60	80	85	90	20	20	25	35	50
20	75	90			0	0	0	15	25	0	5	5	75	90	<5	15	55	45	90	0	<5	45	85	90	0	0	<5	5	5
15	25	70	60	70	0	0	<5	5	50	0	10	<5	90		25	55	80	90		40	50	70	85	90	<5	<5	<5	10	15

AS 1.784					1.560 A					1.560 B					4-3					4-12					4-14				
1	2	4	7	14	1	2	4	7	14	1	2	4	7	14	1	2	4	7	14	1	2	4	7	14	1	2	4	7	14
90	90				30	30	55	45	80	25	25	40	40	80	90	90				65	90				50	90			
80	40	90			20	50	60	65	60	25	25	45	65	55	40	45	90			60	65	90			30	45	45	65	45
35	85	90			30	40	40	55	60	35	45	40	50	80	20	25	30	85	90	50	55	90			70	80	90		
0	0	45	90		0	15	5	10	25	0	0	<5	10	10	0	0	0	30	0	0	0	0	0	25	30	0	0	0	<5
<5	10	50	40	90	<5	<5	15	10	40	<5	<5	10	50	45	0	10	0	0	0	0	0	0	<5	10	0	0	0	0	0

13-2					13-3					16-2														
1	2	4	7	14	1	2	4	7	14	1	2	4	7	14										
90	90				<5	20	25	15	35	0	0	<5	<5	20										
90	90				0	0	0	0	0	<5	0	0	0	0										
90	90				85	90				15	30	30	25	45										
0	0	<5	25	60	0	0	0	<5	20	0	0	0	0	0										
0	0	0	0	<5	0	10	0	0	<5	0	0	0	0	0										

表 2 试验菌种

菌号	种名	菌号	种名
AS 1.126*	腊状芽孢杆菌(<i>Bacillus cereus</i>)	AS 1.560	球状芽孢杆菌(<i>Bacillus sphaericus</i>)
AS 1.196	腊状芽孢杆菌(<i>Bacillus cereus</i>)	AS 1.930	球状芽孢杆菌(<i>Bacillus sphaericus</i>)
AS 1.152	凝固芽孢杆菌(<i>Bacillus coagulans</i>)	AS 1.263	枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)
AS 1.864	侧孢芽孢杆菌(<i>Bacillus laterosporus</i>)	AS 1.384	枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)
AS 1.269	地衣芽孢杆菌(<i>Bacillus licheniformis</i>)	AS 1.268	枯草芽孢杆菌黑色变种 (<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>aterrimus</i>)
AS 1.66	浸麻芽孢杆菌(<i>Bacillus macerans</i>)	AS 1.309	苏云金芽孢杆菌(<i>Bacillus thuringiensis</i>)
AS 1.67	浸麻芽孢杆菌(<i>Bacillus macerans</i>)	AS 1.784	苏云金芽孢杆菌(<i>Bacillus thuringiensis</i>)
AS 1.68	浸麻芽孢杆菌(<i>Bacillus macerans</i>)	1.560A+	芽孢杆菌(<i>Bacillus</i> sp.)
AS 1.69	浸麻芽孢杆菌(<i>Bacillus n.acerans</i>)	1.560B+	芽孢杆菌(<i>Bacillus</i> sp.)
AS 1.234	巨大芽孢杆菌(<i>Bacillus megaterium</i>)	4-3++	芽孢杆菌(<i>Bacillus</i> sp.)
AS 1.231	胶质芽孢杆菌(<i>Bacillus n.ucilanginosus</i>)	4-12	芽孢杆菌(<i>Bacillus</i> sp.)
AS 1.910	胶质芽孢杆菌(<i>Bacillus mucilanginosus</i>)	4-14	芽孢杆菌(<i>Bacillus</i> sp.)
AS 1.197	犁状芽孢杆菌(<i>Bacillus mycoides</i>)	5-16	芽孢杆菌(<i>Bacillus</i> sp.)
AS 1.261	犁状芽孢杆菌(<i>Bacillus mycoides</i>)	7-5	芽孢杆菌(<i>Bacillus</i> sp.)
AS 1.180	多粘芽孢杆菌(<i>Bacillus polymyxa</i>)	7-6	芽孢杆菌(<i>Bacillus</i> sp.)
AS 1.224	多粘芽孢杆菌(<i>Bacillus polymyxa</i>)	7-9	芽孢杆菌(<i>Bacillus</i> sp.)
AS 1.441	多粘芽孢杆菌(<i>Bacillus polymyxa</i>)	7-11	芽孢杆菌(<i>Bacillus</i> sp.)
AS 1.442	多粘芽孢杆菌(<i>Bacillus polymyxa</i>)	13-2	芽孢杆菌(<i>Bacillus</i> sp.)
AS 1.515	多粘芽孢杆菌(<i>Bacillus polymyxa</i>)	13-3	芽孢杆菌(<i>Bacillus</i> sp.)
AS 1.271	短小芽孢杆菌(<i>Bacillus pumilus</i>)	16-2	芽孢杆菌(<i>Bacillus</i> sp.)
AS 1.326	短小芽孢杆菌(<i>Bacillus pumilus</i>)		

注: *菌种来自中国科学院微生物所菌种保藏组。“+”工作中分离的菌种。“++”由山东烟台地区花生根际分离。

(二) 供试菌株

共 41 株。其中已定名的包括 13 个种和 1 个变种,共 28 株;未定名的 13 株。详见表 2。

(三) 观察和记载方法

观察时间: 培养 1、2、4、7、14 天,涂片观察。

记载方法: 常规涂片,革兰氏染色,油镜观察,估测菌体分布均匀的视野 3—5 个,计算其菌体形成芽孢的百分比。凡不足 5%者计为 <5,从 5%至 90%以 5%的级差分级记载;90%以上者仍记为 90%。

全部试验重复两次,取平均值。

结 果

1. 从表 1 和表 3 可以看出,淡薄培养基较其他培养基具有下述优点: (1)芽孢形成起势快,在淡薄培养基上培养一天即能形成 50%芽孢的菌株占 52.7%。黄豆浸汁培养基只达 36.3%。(2)最终形成芽孢的比率高。唯淡微薄培养基最终能使全部试验菌形成芽孢。(3)芽孢数量丰富。在淡薄培养基上培养一天,形成芽孢达 90%者占 34.1%,

表 3 在五种培养基上生芽孢的结果比较

培养基	形成芽孢达50%						形成芽孢达90%						7天,14天不形成芽孢或“<5”者			
	1天		2天		4天		1天		2天		4天		7天		14天	
	菌株	%	菌株	%	菌株	%	菌株	%	菌株	%	菌株	%	菌株	%	菌株	%
I	22	53.7	24	58.5	28	68.8	14	34.1	18	43.9	20	48.8	2	4.9	0	0
II	14	34.1	16	39.0	26	63.4	1	2.4	6	14.6	15	36.6	4	9.8	4	9.8
III	15	36.6	17	41.5	25	61.0	2	4.9	8	19.5	16	39.0	4	9.8	1	2.4
IV	0	0	4	9.8	11	26.8	0	0	0	0	2	4.9	7	17.1	6	14.6
V	5	12.2	11	26.8	18	43.9	0	0	1	2.4	4	9.8	10	24.4	6	14.6

黄豆浸汁培养基只占 2.4%。

2. 黄豆浸汁培养基和土壤浸汁培养基仅次于淡薄培养基。在这两种培养基上形成芽孢的菌株数和速度都近似，而在黄豆浸汁培养基上最终形成芽孢的比率较在土壤浸汁培养基上高。玉米粉-酵母膏和牛肉膏培养基比上述 3 种培养基都差。

讨 论

1. 淡薄培养基形成芽孢速度快与其营养物淡薄有关，克奈西 (Knaysi)^[9]认为：“芽孢是由健康细胞面临饥饿时形成的。”淡薄培养基中营养物浓度低，很快就能被培养物耗尽，出现细胞“饥饿”的环境条件，从而迅速形成芽孢；另一方面淡薄培养基营养较全面，能确保“面临饥饿”前细胞的“健康”，因而淡薄培养基不但生芽孢快，而且芽孢量丰富，并能使最多的菌株形成芽孢。

2. 鉴于芽孢菌生芽孢所需条件因种、甚至因株而异，因此到目前为止，在培养基上能生芽孢的菌只是芽孢菌的一部分^[10]，尚无一种万能生芽孢培养基。从本试验也可以看出，淡薄培养基和其他几种培养基都不能使全部菌株大量生芽孢。表 2 结果表明，浸麻芽孢杆菌 (*Bacillus macerans*) 的几株菌在土壤浸汁培养基上生芽孢较好，而凝固芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*) 则以黄豆浸汁培养基为最优。

3. 芽孢的形成除与培养基成份有关外，尚受培养温度、pH 以及通气量等因素的影响^[10]。本文只是 30℃ 的培养结果。在实际检查中应注意到影响芽孢形成的各种因素。

参 考 资 料

- [1] Breed, R. S. et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed., Williams & Wilkins, Baltimore, 1957.
- [2] Buchanan, R. E. et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Williams & Wilkins, Baltimore, 1974.
- [3] Buchanan, R. E. et al.: *Index Bergeyana*, Livingstone, Edinburgh, p. 266, 1966.
- [4] Gould, G. W. et al.: *The Bacterial Spore*, Academic Press, London, p. 78, 1969.
- [5] Tsen, E. T. H. and Sung, S.: *China Med. Jour.*, 46:603—606, 1932.
- [6] Waksman, S. A.: *Principles of Soil Microbiology*, 2nd ed. Williams & Wilkins, Baltimore, p. 15, 1932.
- [7] Gordon, R. E. et al.: *The Genus Bacillus*, US GPO, Wash., p. 101, 1973.
- [8] Yamada, K. and Komagata, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 18:399—416, 1972.
- [9] Knaysi, G.: *Bact. Rev.*, 2:19, 1948.
- [10] Gould, G. W. et al.: *The Bacterial Spore*, Academic Press, London, p. 74, 78—80, 81, 1969.