

芽孢杆菌属的一个新种

蔡妙英 王大帮

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从苏芸金芽孢杆菌戈氏变种 (*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*) 的混杂培养物中, 分离得到编号为 55B 的三株菌。与已知的芽孢杆菌相比, 在形态、生理生化和营养特征方面均不相同。其主要特征为: 同时具有圆形和椭圆形两种芽孢, 在芽孢游离之前, 二者比例为 1/3—1/2; 游离后, 比例降至 1/10。好氧。在 5% NaCl 中生长, 而在 10% NaCl 中不生长。不从葡萄糖产酸。不还原硝酸盐。产脲酶和酪氨酸酶, 但苯丙氨酸不脱氨。不水解淀粉, 也不产生二羟基丙酮。以酪朊为唯一碳、氮源时, 生长需要外源吡哆醛。其 DNA 中 G + C 含量为 42.3—43.2 克分子 %。我们将其定为新种, 根据菌落极易扩散的特点, 命名为扩散芽孢杆菌 (*Bacillus diffusus* Cai & Wang sp. nov.)。

在芽孢杆菌属的分类中, 芽孢的形状占有重要地位。在 Smith 等^[1]和 Gordon 等^[2]的检索表中, 都将它作为分群的主要鉴别特征。在他们的分类大纲中, 同时具有圆形和椭圆形两种芽孢的种有: 泛酸芽孢杆菌 (*B. pantothenicus*) 和植表芽孢杆菌 (*B. epiphytus*) 两个种。本文描述的 55B 系菌株除了与上述两个种比较之外, 还与其近似种——短芽孢杆菌 (*B. brevis*)、圆形芽孢杆菌 (*B. sphaericus*) 和巴氏芽孢杆菌 (*B. pasteurii*) 作了比较。

材料和方 法

(一) 菌种来源

55B 系菌株是从苏芸金芽孢杆菌戈氏变种 (*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*) H_{3,35b} 菌株斜面上分离得到。与此变种混合时, 生长十分缓慢。一般在 30℃ 培养 5—7 天后, 才能看到极细的革兰氏阴性杆状菌体, 有时还能看到其顶端有膨大的球状体。在营养肉汁平板上, 用稀释划线法^[3], 挑取不透明的苏芸金芽孢杆菌菌落四周扩展透明的部分, 连续划线, 分离得到在菌落透光度和大小上稍有差异的三株菌, 编号为 55B。经过已测的各项试验, 未发现这三株菌之间有多大差别。

(二) 方法

一般形态、生理生化试验按常规方法^[4,5]。

根据 Bradley 等^[4]和 Brown 等^[5]的方法进行孢子表面结构观察: 取培养 48 小时已产生芽孢的培养物, 于盛有无菌水和玻璃珠的 20ml 三角瓶中, 制成菌悬液, 置康氏振荡器上振荡 3 小时后, 加入溶菌酶 (0.5mg/ml, 过滤灭菌), 于 37℃ 作用 2 小时, 调 pH 至 10, 5 分钟后又调回 pH 至 7.0, 然后用无菌水反复洗 10 次左右, 为避免还有营养细胞, 于 98℃ 处理 5 分钟。直接用接种针点取适宜浓度的孢子悬液至小块盖玻片 (约 0.5cm²) 上, 经喷金处理后, 用导电胶粘在样品台上, 置扫描电镜下观察。

取培养 48 小时的菌液一小环, 接种于营养肉汁中, 置 3、20、30、37、45、50、60℃ 下培养, 于 2 天和 5 天观察生长情况。

营养试验采用 Proom 和 Knight^[6]的无机盐和酪朊基础培养基, 测定吡哆醛、硫胺素、菸酸、泛酸、生物素、叶酸、核黄素、维生素 B₁₂ 和对氨基苯甲酸 9 种维生素。

DNA 中 G + C 克分子 % 测定系采用熔解温度法 (T_m)^[7]。

本文于 1980 年 8 月 22 日收到。

承中国科学院动物研究所任改新同志 (现在天津南开大学工作) 提供由日本交换来的 H_{3,35b} 菌株, 本所顾跃文同志拍摄电镜照片, 特此致谢。

结 果

(一) 形态特征

个体形态: 革兰氏阴性杆菌, 一般为 $0.3-0.5 \times 3.5 \mu\text{m}$ (干染片)。芽孢在游离前, 圆形与椭圆形的比例为 $1/3-1/2$, 游离后, 其比例降至 $1/10$, 绝大多数芽孢为椭圆形(图 1)。芽孢表面结构以光滑为主, 偶见有棱(图 2)。以发达的周生鞭毛运动。

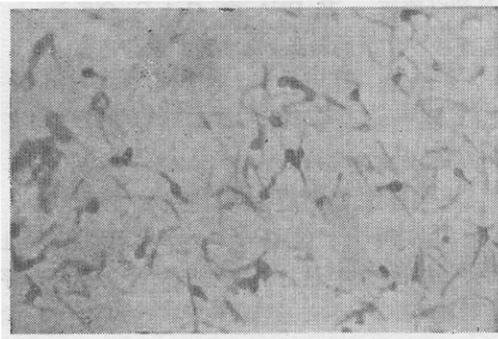


图 1 55B 系菌株的芽孢形状

Fig. 1 The spore shape of strain 55B

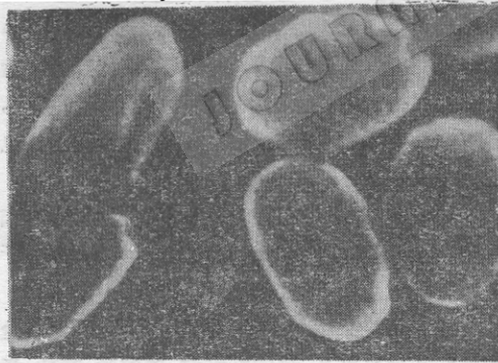


图 2 55B 系菌株芽孢表面结构以光滑为主, 偶见有棱 ($\times 20,000$)

Fig. 2 Surface configuration of spores is smooth predominantly, ribs rarely

菌落形态: 薄而透明, 乳脂色, 无水溶性色素。在一般平板上易扩散, 接种于加倍琼脂的干燥平板上, 培养 7 天后, 出现的单菌落直径为 1—2 毫米, 光滑, 边缘整齐。

(二) 生理生化特性

不从葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、甘露醇、果糖和甘油产酸。不利用乙酸盐、琥珀酸盐、柠檬酸盐、反丁烯二酸和乳酸。在 5% NaCl 中生长, 在 10% NaCl 中不生长。pH 5.7 不生长。3°C 不生长, 最适温度 37°C。好氧, 在振荡培养时生长迅速, 不能厌氧生长。对溶菌酶(0.001%)敏感。石蕊牛奶产碱迟缓。产生接触酶和脲酶。分解酪氨酸。VP 反应阴性, VP 液的 pH 为 6.5—7.0。以葡萄糖为碳源时, 不利用无机氮。以酪朊基础培养基为唯一碳、氮源时, 生长需要外源吡哆醛 ($0.5 \mu\text{g/ml}$)。不水解淀粉。不从硝酸盐还原到亚硝酸盐。不从甘油产二羟基丙酮。苯丙氨酸脱氨酶阴性。

(三) DNA 中 G + C 的含量

55B 系 3 菌株的 DNA 中 G + C 克分子 % 分别为 42.5、43.2 和 42.3。

讨 论

55B 系菌株与其近似种的比较: 它与短芽孢杆菌(*B. brevis*)相比, 成熟芽孢都是以椭圆形的为主, 此外, 还共同具有膨大的孢囊, 不从碳水化合物产气, 接触酶阳性, 好氧, DNA 中 G + C 克分子 % 相近等特征。但是, 前者 VP 液的 pH 值在 8.0 以下, 以及还产生圆形芽孢等特征, 这又与后者不同。它与产生圆形芽孢的球形芽孢杆菌(*B. sphaericus*)相比, 虽然二者均产生圆形芽孢, 但后者不产生椭圆形芽孢, 而且二者 DNA 中 G + C 克分子 % 相差很远。它与同时产生圆形和椭圆形两种芽孢的泛酸芽孢杆菌(*B. pantothenicus*)和植表芽孢杆菌(*B. epiphytus*)相比, 虽然芽孢的形状相似, 但仍有很多不同之处。55B 系菌株在芽孢游离前, 圆形芽孢数量较多, 一般圆形的与椭圆形的比例为 $1/3-1/2$; 游离后, 则以椭圆形的为主, 圆形的仅占

表 1 55B 系菌株与其近似种的鉴别特征

Table 1 Differential Characteristics of 55B Strains and Related Species

特征 Characteristics		种 Species	55B 系 Strains 55B	短芽孢杆菌 (<i>B. brevis</i>)	球形芽孢杆菌 (<i>B. sphaericus</i>)	泛酸芽孢杆菌 (<i>B. panto- thenticus</i>)	植表芽孢杆菌 (<i>B. epi- phytus</i>)	巴氏芽孢杆菌 (<i>B. pasteurii</i>)
革兰氏染色 Gram stain			-	V	V	+	+	V
菌体宽度 (μm) Width of rods			0.3—0.7	0.6—0.9	0.6—1.0	0.4—0.7	0.7—0.9	0.6—0.9
芽孢 Spores	形 状 Shape		ES	E	S	SE	ES	S
	表面结构 Surface configuration		光滑, 偶有核 smooth, rarely ribs	光滑, 偶有 核和网 smooth, rarely ribs and network	光 滑 smooth	稍 粗 糙 slightly rough		粗糙, 偶有核 rough, rarely ribs
厌氧生长 Anaerobic growth			-	-	-	+	-	+
VP 反应 VP reaction			-	-	-	+	-	-
VP 液的 pH pH in VP broth			6.5—7.0	8.0—8.6	7.4—8.6	5.0—5.8	5.7	8.6
在 5%NaCl 中生长 Growth in 5% NaCl			+	-	-	+	+	
在 10%NaCl 中生长 Growth in 10% NaCl			-	-	-	+	+	+
葡萄糖产酸 Produce acid from glucose			-	+	-	+	+	
硝酸盐还原 Nitrate reduction			-	V	-	V	+	+
淀粉水解 Hydrolysis of starch			-	-	-	+	+	-
酪氨酸水解 Hydrolysis of tyrosine			+	+	-	-	-	
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase			-	-	+	+	+	
脲 酶 Urease			+	-	-	-		+
G + C 克分子 % G + C mol%			42.3—43.2	43	37			

符号: + 阳性; - 阴性; V 可变化; E 椭圆形; S 球形。

Symbol: + positive; - negative; V variable; E elliptical; S spherical.

1/10 左右。前面的数字与泛酸芽孢杆菌的相近, 而后面的数字又与植表芽孢杆菌的相近。但他们又有一些特征不相同, 如前者不从葡萄糖产酸、不从硝酸盐还原到亚硝酸盐、分解酪氨酸、不水解淀

粉、不产生苯丙氨酸酶等。就产生强的脲酶反应来说, 55B 系菌株与 Smith 等^[1]描述的巴氏芽孢杆菌 (*B. pasteurii*) 类似, 但后者只产生球形芽孢, 菌体较大, 在 10% NaCl 中生长, 还原硝酸盐, VP 反应阳性,

这些特性又与 55B 系菌株不同(表 1)。因此, 55B 系菌株区别于所有已知种, 可定为新种, 根据其菌落易扩散的特点, 命名为扩散芽孢杆菌 (*Bacillus diffusus* Cai & Wang sp. nov.)。模式菌株存放于中国科学院微生物研究所菌种保藏室, 菌号为 AS 1.1845。

继 1944 年 ZoBell 和 Upham^[3] 从海洋分离到具有两种形状芽孢的植表芽孢杆菌之后, 1950 年 Proom 和 Knight^[9] 从土壤中分离到两种形状芽孢数量几乎相等的泛酸芽孢杆菌。我们从苏芸金芽孢杆菌的混杂菌株中也分离得到了具有两种形状芽孢的芽孢杆菌。由此看来, 自然界确实存在着介于椭圆形芽孢和圆形芽孢两大菌群之间的另一类菌群。种间关系正如 Cowan 和 Steel (1965)^[10] 所指出的那样: “不同的细菌种类不是截然分开的, 而是在特性上有少量和细微的差异, 以致它们似乎互相交叉有如光谱。”此类菌群可能就是连续“光谱”中的一段, 至于它们之间的界

限和相互关系, 有待于对更多菌株进行研究之后, 才能逐步明确。

参 考 文 献

- [1] Smith, N. B. et al.: *Aerobic Sporeforming Bacteria*, Agr. Monograph, No. 16, United States Department of Agriculture, Washington, Pariss, 1952.
- [2] Gordon, R. E. et al.: *The Genus Bacillus*, Agr. Handbook, No. 427, United States Department of Agriculture, Wash., US GPO, 1973.
- [3] 中国科学院微生物研究所细菌分类组: 《一般细菌常用鉴定方法》, 科学出版社, 北京, 1978.
- [4] Bradley, D. E. & Franklin, J. G.: *J. Bacteriol.*, 76(6): 618, 1958.
- [5] Brown, W. L. et al.: *Appl. Microbiol.*, 5: 156, 1957.
- [6] Proom, H. & B. C. J. G. Knight: *J. Gen. Microbiol.*, 13: 474—480, 1955.
- [7] 林万明等: 微生物学通报, 8(5): 245, 1981.
- [8] ZoBell, C. E. & H. C. Upham: *Scripps Inst. Oceanogr. Bull.*, 5: 239—292, 1944.
- [9] Proom, H. & B. C. J. G. Knight: *J. Gen. Microbiol.*, 4: 539—541, 1950.
- [10] Cowan, S. T. & K. J. Steel: *Manual for the Identification of Medical Bacteria*, Cambridge, The Univ. Pr., 1974.

A NEW SPECIES OF *BACILLUS*

Cai Miaoying Wang Dasi

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

A culture as a contaminate of a type culture of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* was isolated in pure culture. It differs from all known species of *Bacillus* in morphological, physiological, biochemical and nutritional characteristics. Before the spores are liberated from sporangia, the proportion of round and ellipsoid spores is about 1:3 to 1:2. When the spores are liberated, the proportion falls down to about 1:10. It is an aerobic

Bacillus. Growth occurs in broth containing 5% NaCl but does not occur in 10% NaCl broth. Acid is not produced from glucose and nitrate not reduced. No dihydroxyacetone is produced. Tyrosin is decomposed but starch not hydrolyzed. Phenylalanine is not deaminated. The G + C content in DNA is 42.3—43.2 mol% (Tm). We consider this culture as a new species of *Bacillus*, *Bacillus diffusus* Cai & Wang sp. nov.