

第十四届国际微生物学大会的情况介绍(续)

焦瑞身 李庆余 何超刚 黄谷良 姚敬业

近年来由于在枯草杆菌中克隆表达外源基因的需要,发展了一种称为辅助质粒协同转化的系统。枯草杆菌的感受态细胞转化要求转化的质粒以寡聚体形式存在,否则转化频率将大大下降。假如感受态的受体细胞中存在和将要转化的质粒有部分同源顺序的质粒,转化频率将显著提高。例如 pUB110 可以作为具有卡那霉素抗性和氯霉素抗性的 pBD 64 的辅助质粒。另一个问题是如何直接选择大量的重组子。近年来人们发展了一个正选择系统,以提高工作效率。首先用 pBD 64 质粒作为载体克隆了枯草杆菌的噬菌体 β 22 基因组中的一个 thy 基因,由此产生的质粒被称为 pBD 214。thy 基因内有 EcoRV、EcoRI、PvuII、BclI 四个单一酶切点,插入的外源片段能使该基因失活。基因型为 Thy^- 的枯草杆菌和大肠杆菌都对三甲氧苄二氢嘧啶具有抗性。质粒 pBD 214 能互补 Thy^- 的枯草杆菌,使受体菌对三甲氧苄二氢嘧啶敏感。所以同时选择对氯霉素、三甲氧苄二氢嘧啶有抗性的转化子就可得到重组子。实践证明这样的方法是简便有效的。

在发酵过程及控制讨论会中,英国一家生物工程有限公司报告用 rDNA 技术生产啤酒和人体血白蛋白(CHSA)。所用酵母载体 pEK 1014 A1B,含有酵母基因, HIS 基因和半乳糖的启动子。在酵母细胞进行啤酒发酵时, HIS 基因不表达,啤酒发酵完毕,酵母分离,悬浮于半乳糖培养基中,启动子受到诱导连带地表达 HIS 基因。报告者声称所用重组啤酒酵母产生的啤酒味道正常。

在大肠杆菌、枯草杆菌、酵母菌中表达克隆化的基因,却具有某些局限性,因为某些较高等的真核生物的蛋白质需要转译后的修饰而获得生物活性。例如,需要糖基化和装配成粒子的蛋白质。为此,需要有具有这种修饰作用的酶类和细胞因子的真核细胞宿主系统来合成这些蛋白质。而 SV 40-猴细胞系统被证明能有效地进行真核基因的表达。美国 Smith 报告了他们用 SV 40 载体在猴细胞中成功地表达、加工和分泌人生长激素和乙型肝炎病毒表面抗原。

植物基因工程是重要的领域。摆在各国植物分子遗传学家面前的课题是如何克隆所需要的基因在高等植物细胞中表达。比利时的 Van Montagu 报告了他们运用 Ti 质粒克隆了一个昆虫病毒的毒蛋白质的基

因,并成功地在烟草细胞中表达。含有这个基因的烟草细胞通过单细胞培养发育成植株,这样的烟草植株的叶子含有百万分之二、三(重量)的昆虫病毒毒蛋白质,这微量的含量足以使咀嚼烟叶的害虫致死,但并不影响烟叶的质量。小面积的种植试验表明这样的烟草植株能有效地防治该种虫害的危害,节省了大量的农药,因此降低了生产成本和防止了农药的污染。

关于工程药安全问题,会上进行了讨论。诺贝尔奖金获得者 Werner Arber 认为我们对微生物学一些领域知之甚少,特别有关基因在菌间相互传递问题。许多基础方面尚未研究。因此,目前对 rDNA 工作的限制是对的。不过各国之间的条例应一致。英国 John Beringer 认为大国释放工程菌应知道在天然环境中这些菌的去向如何,有的菌能降解在土壤中除草剂,但也能将遗传信息传递给基地天然细菌。

真菌也能交换信息,但比较少见。总之政府应小心对待,释放工程菌到环境中可能引起的问题。

日本 Furukawa 费了 10 年努力终于研究成功了 *Ps. pseudocaligenes* 降解 PCBs 成为无害物质。PCBs 极毒,有致癌、致突变作用,内服会引起呕吐等。

4. 应用微生物学

在国际第十四届微生物学会上应用微生物的专题报告是安排在“工业和应用”和“应用与生态学”两个专题报告会来场进行的,见表 1、2。

这次学会上有关应用微生物专题报告和论文体现了以下几方面的特点:

(1) 应用微生物所涉及的部门和范围越来越广泛,不仅仅是应用于工农业生产,医疗保健,环境保护、有机废物转化、有毒物质降解,金属回收等等方面。

(2) 现代分子生物学成就如 DNA 重组技术,分子杂交等不仅应用于工农业生产,也应用于生态学的研究和系统演化的研究方面,如英国 Hinchcliffe 的“高档产品生产中 DNA 重组子的用处”、英国 Smith “rDNA 技术生产疫苗”、荷兰 Schoone 等“DNA 杂交作用检测痰中的嗜血杆菌”、新西兰 Reaney “基因转移系统与演化”、美国 Anagnostakis “自然界中真菌间胞质基因的转移”等,我国复旦大学遗传所提出了“热稳定性 α -淀粉酶基因的细胞系”的论文,台湾食品工业研究所等单位提出了“淀粉质假单胞菌异构淀粉酶基因的特性与表达”的论文。

表1 “工业与应用”专题报告题目

专 题	报 告 题 目
发酵过程及其控制 I	1. 单细胞蛋白技术, 2. 生化聚合物: 透明质酸的微生物生产, 3. 微生物技术合成乙醇, 4. 金属回收中微生物的潜力, 5. 微生物氧化物与胆代谢
发酵过程及其控制 II (与 I 共 27 篇)	1. 发酵工程中的反应控制, 2. 微生物, 甲烷与氢, 3. 高档产品中 DNA 重组子的用途, 4. 生物传感器, 5. 疫苗生产
与农业和食品工业有关的有机废物的微生物转化 (共 31 篇)	1. 产甲烷生物与厌氧分解的生理生化, 2. 微生物解毒作用: 细菌脱硝化作用等, 3. 改进木质纤维素质有效微生物方法, 4. 作为从废物中来的燃料之外的微生物, 5. 在厌氧分解中微生物参数与控制
食品贮存毒害测定和预测微生物 (共 42 篇)	1. 食品安全与兽医控制, 2. 有关微生物安全与食品理化因子, 3. 腌肉的内毒中毒害测定, 4. 食品微生物无危害之保险的相关性的抽样设计, 5. 预测微生物
微生物检测鉴定和计数的快速方法 (共 32 篇)	1. 食品微生物学新方法的探讨, 2. 检测微生物的电测法, 3. 病理微生物学中分析化学方法的应用, 4. 遗传探测器, 5. 临床微生物学免疫方法探讨
脆弱细胞培养 (共 5 篇)	1. 脆弱细胞的生物技术, 2. 动物细胞培养物的不同方法, 3. 生物分子大批量生产的细胞培养系统, 4. 固定化植物细胞的次生代谢物之生产, 5. 大批量植物细胞生长的操作系统

(3) 食品工业微生物的研究引起了各国学者的高度重视,在这次大会上,工业与应用的专题讨论的 6 次报告会中,讨论主题涉及食品工业微生物的有“农业和食品工业有关的有机废物的微生物转化”和“食品贮存毒害测定和预测微生物”两次专题讨论,此外“发酵过程的控制”的二次专题讨论以及应用与生态的专题讨论中也有不少直接或间接地和食品工业发展有关,和这些方面有关专题论文布告达 70 篇。英国 Senior 的“单细胞蛋白技术”,英国 Wood 的“改进木质纤维素的有效微生物方法”,“栽培蘑菇生物降解木质素”,“栽培蘑菇对两种芳香物质化合物的代谢作用”,西德 Sinell 的“食品安全与兽医控制”,加拿大 Hauschild “腌肉的内毒中毒害测定”,加拿大 Sharpe “食品微生物学新方法的探讨”瑞典 Liturin “动物细胞的不同培养方法”,日本 Tanaka 的“大批量植物细胞生长的操作系统”等报告和论文引起了与会者的关注。英国食品研究所 Roberts 认为保存猪肉、腌肉须用亚硝酸盐,否则肉品易感染肉毒杆菌。

“发酵过程及其控制”讨论会,有水平的报告很多,现仅就澳大利亚 Docile 有关运动发酵单细胞菌的报告扼要介绍。当前酒精发酵微生物研究引起各国的重视,其中运动发酵单胞菌是公认最有希望的菌种。他

表2 “应用与生态”专题报告题目

专 题	报 告 题 目
国际食品与旅行	1. 食品致生疾病和食物腐败对国家和国际经济的冲击, 2. 从世界人口密集地区人种学食品传播的疾病防止措施, 3. 由食品携带者的迁徙而传播的食品产生疾病及防止措施, 4. 霍乱弧菌和非霍乱弧菌传播及其防止, 5. 国际贸易中食品传播疾病及其防止
DNA 重组技术和特异性基因表达的近期进展	1. 灭活基因融合辅助分离和多肽缺损表现型的特征, 2. 用植物系列作基因转移可能性, 3. 真核细胞中克隆基因的表述, 4. rDNA 技术生产疫苗, 5. 酵母异种基因的表达
热环境 (共 26 篇)	1. 温泉环境中的化学抑制和适应性, 2. 热细菌: 不同属的生态学分类及其特性, 3. 嗜热细菌: 生物化学多种特性和工业上有用厌氧微生物, 4. 嗜热性菌蛋白质的结构和功能, 5. 一种极端的热细菌: 嗜热细菌热稳定酶及基因生化研究
多细胞分化 (共 4 篇)	1. 放线菌和真菌菌丝的生长, 2. 丝状细菌的鉴别, 3. 担子菌纲裂殖菌子实体的形成, 4. 粘霉菌的细胞交互作用, 5. 水霉孢子的交互作用
工业微生物的筛选 (共 14 篇)	1. 高温微生物的应用, 2. 从微生物筛选生物活性化合物, 3. DNA 重组子技术在筛选中的作用, 4. 符合工业微生物需要的特性, 5. 微藻类和植物细胞的极能的生物转化

认为用细菌发酵酒精可达 12% (v/v), 甚至更高。抑制更高酒精的生成是过饱和的 CO_2 , 而不是酒精。如果 CO_2 很快地排出, 酒精可达 15%。副产物 levan 很少。蔗糖转化率 92—93%, 淀粉水解液可达 97—98%。和酵母相比优点如下:

细菌	酵母
发酵时间: 20—24 小时	30—40 小时
酒精: 10—12%	7—9% (菌体不循环使用) 9—11% (循环)
最适 pH: 5—6	4.0
杂醇: 无	有

会议中有关透明酸 (hyaluronomic acid, HA) 的信息。HA 用于眼外科手术、关节炎治疗, 以及伤口治疗, 可促进痊愈, 防止受伤组织与绷带粘着。HA 在鸡冠、脐带、沙鱼皮等物中含量较多。一般从公鸡鸡冠提取。瑞典 Pharmacia 占领这一市场。最近的进展是用 Streptococcus 发酵生产, 已获得美国 FAD 批准使用。

另外, Manchester 大学的 Norris 教授透露, 英国 mycoprotein 已进行中试, 菌体经加工后, 可生产出具有一定结构的食品, 类似于肉松、牛肉干。

(4) 农业微生物的专题论文也是较多的, 这方面的专题论文布告一共有 29 篇。此外, 在应用微生物的专题论文布告也有 20 篇左右属于农业微生物的范围。加拿大 Chahe 等“纤维素霉菌把猪粪转化为富于蛋白质的饲料的污染降解”, 民主德国 Malik “固氮细菌

在低压冻干法方面的稳定性与存活力”，印度 Sounder 等“混合细菌培养物降解纤维素”意大利 Tomati “小麦对不同微生物转化垃圾的反应”，埃及 Shinnawi “在生长棉花土壤中杀虫药剂对一些细菌状况的影响”，英国 Lappin-Scott 等“两种苯氧基除草剂的生物降解——瞿粟扑草胺和 2,4-D”、英国 Stephenson 等“免疫强化：病毒感染式接种时发病机理可能机制”等。

5. 医学和兽医学

① 医院内感染与细菌在粘膜表面的相互作用：Konig 等提出细菌粘附素与溶血素促使肥大细胞释放组胺，中粒释放白三烯等，增强毛细血管通透性。某些肥大杆菌除菌毛外尚有蛋白质粘附素，可使细菌粘附于粘膜，使之遭受破坏，引起婴儿腹泻。此菌具有质粒，质粒消失，粘附力也随之消失。Scotland 从出血性肠炎患者分离出一株大肠杆菌，能产生毒素对 vero 细胞有毒，称之为 vero 毒素 (VT)。

EUis 认为耐药性产生有二种情况：1. 不同病区不同菌种中均见有庆大霉素耐药株。有的与质粒，有的与染色体有关。2. 同一病区同一菌种的不同型别中见有共同耐药质粒，说明耐药因子由质粒传递。

② 抗菌素对细菌影响：Marino 对 1286 株不同细菌测定了药敏与内酰胺酶，发现耐药株大多有内酰胺酶，二者间的关系有待证实。Lewis 认为氨基甙类抗菌素可加强茶啉酸的作用，四环素、氯霉素与利福平可干扰茶啉酸的作用。Master 提出金黄色葡萄球菌产生内酰胺酶，可破坏青霉素。棒酸可抑制内酰胺酶，二者合用可治疗金黄色葡萄球菌与链球菌混合感染。

③ 弯曲菌：Marshall 提出除禽畜外，实验动物也携带此菌，其中以猫最多，达 52%。Gubina 发现患空肠弯曲菌阴道炎妇女的婴儿，因感染发生呕吐。近年来发现有一种幽门弯曲菌可引起慢性胃炎。此菌在含血或血清培养基中均可生长。液体培养 3 天可见混浊。此菌不分解糖，产生尿素酶分解尿素。

④ 拟杆菌：存在于厌氧感染的标本中，72% 有产黑色素拟杆菌，57% 有脆弱拟杆菌。脆弱拟杆菌荚膜厚者无血凝能力，薄者有。此菌荚膜与纤毛的产生不同步。荚膜稳定期多，对数期少，纤毛相反。齿龈拟杆菌可引起牙周炎，但不同菌株对小鼠致病性不同，即使同一菌株在无血蛋白的培养基中生长，即失去致病性。

⑤ 新菌苗：Russell 提出变链球菌菌苗经动物试验证实可预防龋齿，对人则在试验中。Hyde 提出口服粪链球菌或大肠杆菌可提高天然免疫对抗伤寒与流感杆菌攻击。Mahadevan 认为麻风杆菌脱脂后细胞壁有免疫原性，可引起迟发性变态反应，限制麻风菌生长。Bailey 将梅毒螺旋体的基因克隆到大肠杆菌内，注入小鼠产生的抗体可作螺旋体制动试验。Martin 提出淋球菌与脑膜炎球菌的 DNA 很相似，从脑膜炎球菌提出一种共同抗原对淋球菌有交叉反应。

⑥ 致病性与遗传的关系：Barrow 提出鸡沙门氏菌有大小二种质粒，除去小质粒即失去致病性，除去大质粒则不能。Brownlie 将百日咳杆菌毒素与溶血素的基因同时插入大肠杆菌不表达出此二种特性。若插入无此二种特性的百日咳菌变种，则能获得致病。

⑦ 细菌毒素：婴儿服肉毒杆菌芽胞因发芽产毒，在美国引起大量死亡，称婴儿肉毒症。毒素进入婴儿体内，使神经与肌肉的联系中止，婴儿麻痹，发生窒息。一岁婴儿最危险。据了解土壤肉毒杆菌，经尘土落于花粉上，蜜蜂采花粉时将菌带入蜂巢，最后到蜂蜜中，再进入婴儿体内。Honda 从非霍乱弧菌中提出一种耐热性肠毒素 (NAG-ST) 可引起胃肠炎。McIntosh 提出临床 50% 金葡菌可产生肠毒素与中毒性休克综合症毒素。

⑧ 混合感染：Makkiya 对 200 例创伤感染进行了研究。院内与院外感染率相等，均为 84%。但院外感染的细菌主要为金葡菌 (57%)。院内感染的主要为大肠杆菌 (28%)，其次为链球菌 (6.5%)，其他如产气克雷伯氏菌、绿脓杆菌和变形杆菌等。Hashimoto 证明小鼠感染亚致死量鼠巨细胞病毒后再用肺炎克雷伯氏菌攻击比单用肺炎克雷伯氏菌攻击死亡率高。原因是病毒引起中性粒细胞反应缺陷，使机体对细菌繁殖失去控制，最终导致死亡。Namavor 证明大肠杆菌对多核白细胞 (PMN) 的趋化作用远比脆弱拟杆菌为强，但脆弱拟杆菌的培养上清和外膜有抑制大肠杆菌对 PMN 的趋化作用。

⑨ 环境对疾病的影响：Thom 等报道 0-1 霍乱弧菌曾在无该病流行地区的碱水中检出。实验证明此菌需在带盐的水中存活。但事实上某些流行地区的水并不带有多少盐分，故推测在此情况下霍乱弧菌可能储存于鱼类和阿米巴中。Brayton 等实验证明 0-1 霍乱弧菌在玻片凝集中至少需要 10⁷ 个细菌与抗体结合才可出现 4 个十的反应。

Fu 认为小猪一般在 1—6 周时均感染到猪轮状病毒，排毒持续 1 周，2 月龄以上即不得此病。故直接传染是传播的唯一方式。作者采集猪圈污物，用 ELISA 法检查，检出有轮状病毒抗原。甚至在猪已撤出圈后三月之久，污物中仍可检出抗原。故环境因素是维持传播的重要因素之一。

⑩ 医学微生物学：Bettelheim 将新西兰分离的军团菌分为 19 种血清群，其中较为多见的有 *L. pneumophila* 血清群 6。 *L. jordanii*、*L. longbeachae* 血清群 1, 2 与 *L. micdadei*；而较少见的为 *L. pneumophila* 血清群 2, 3, 5 与 *L. gormanii*。Tomov 发现嗜肺军团菌在 Mueller-Hinton 琼脂和 Feeley-Gorman 琼脂培养基上生长时，鞭毛消失菌体延伸呈长丝状。在血炭琼脂培养基上生长时也见有同样的变化，但变化较慢。

(下转第 232 页)

但在含碳与酵母浸膏的缓冲琼脂培养基上则嗜肺军团菌很稳定,移种 10—15 代后才鞭毛消失,出现长丝。

Frampton 发现百日咳杆菌能产生一种胞浆内的不耐热的毒素 (HLT),对小鼠皮下注射可引起出血反应,经腹腔内注射导致死亡。粗制的毒素 56℃ 加热 30 分钟即被破坏。作者设计了一种新的纯化毒素的方法。Olusanya 发现致病性大肠杆菌产生的乳糖酶显著地比非致病者多,纯化的乳糖酶分子量 56,000。在 40℃ pH 7.0 时活性最强。推测此酶可能与细菌的毒力、侵袭力等有关,在小儿腹泻中起一定的作用。

Haumann 分析了 13600 份血培养在有氧环境下分离的结果: 其中培养阳性者占 6.9%, 阴性者占 72.0%, 污染者占 18.4%。败血症由 1 种致病菌所致者占 90.9%, 2 种致病菌所致者占 8.1%, 3 种致病菌所致者为 0.9%。其中以金葡菌最为多见,其次为大肠杆菌。Salman 调查了伊拉克 400 名 3 岁以下儿童的腹泻,引起腹泻的病原体有: EPEC (14%)、兰氏贾第鞭毛虫 (11%)、轮状病毒 (10%)、沙门氏菌 (7.8%)、溶组织内阿米巴 (4%)、志贺氏菌 (3.5%)。

卡介苗接种后人体中抗体产生的情况至今没有一种良好的测定方法。Ranger 报道应用间接免疫过氧化物酶法由 42 只免疫豚鼠血清测定特异性 IgG 与 IgM。活卡介苗注射后 IgG 抗体水平迅速上升,21 天达最高峰,然后逐渐下降,而 IgM 则始终缺如。

Vickery 认为耐甲氧苯青霉素金葡菌仍是澳大利亚医院交叉感染的病原菌。作者应用标准噬菌体再加以 11 株辅助噬菌体可将 1300 株金葡菌分成 5 个菌群,其中 4 株噬菌体特别有用。

Kedzar 由波兰医院内感染的新生儿中检出 1723 株致病菌,其中 77% 属革兰氏阴性。主要有,绿脓杆菌、肺炎杆菌和大肠杆菌等 12 个属、球菌占 23%,其中最常见者为金葡菌 (16%),次则为链球菌。

英国应用微生物研究中心的 Turnbull 报告两种未知细菌引起致命的疾病——脑膜炎、肺炎、败血症、引起这些病的致病菌属 *Aeromonas*, *Plesiomonas*。最易受到这些菌侵袭的是缺欠的残废人、受伤者、免疫系统作用很弱的人,健康人受不受感染尚不清楚。作者认为病原菌来自未经处理的饮用水。