

# 放线菌分类学研究进展

姜成林

(云南大学 云南省微生物研究所, 昆明 650091)

伯杰手册是世界公认的细菌(包括放线菌)分类鉴定的权威著作。1989年出版了《伯杰系统细菌学手册》第4卷<sup>[1]</sup>。这一卷全是放线菌,由英国著名放线菌学家 Williams 主编。与1974年出版的八版比较,本书有几个明显的特点。一是取消“科”这一分类单元,而用 Section (部分,群)把一些比较相关的属暂时归在一起;二是属的描述增加了许多化学特征和部分分子分类的内容;三是链霉菌作了重大合并,仅留下150多个种。现将这五年有关进展评述如下。

## 1 新属不断被发现

放线菌研究已有100年的历史。根据 Okami<sup>[2]</sup>的估计,已分离到的放线菌大约只有实际存在的10%~20%。换言之,绝大部分放线菌还没有分离到。因此,建立新的分离方法,分离新的菌种,始终是放线菌学家不可忽视的工作。近几年有效发表的放线菌新属有8个。

### 1.1 假无枝菌酸菌属 *Pseudoamycolata* Akimov et al., 1989<sup>[3]</sup>

革兰氏阳性,不抗酸,中温,好气。气生菌丝和基内菌丝都断裂成杆球体,不游动。气生菌丝上产生短孢子链。细胞壁IV型。磷脂PII型。饱和分枝脂肪酸以 iso-和 anteiso-型为主,还有微量的直链饱和、不饱和、2-OH 和 10-甲基分枝脂肪酸。主要的甲基萘醌为 MK-8(H4)。DNA的 G+Cmol% 为 72。代表种:嗜盐假无枝菌酸菌 (*Pseudoamycolata halophobica* Akimov et al., 1989)。

1994年 Mcveigh<sup>[4]</sup>等通过16S rDNA 序列分析研究认为,该属单个化学特征的缺乏不足以建立一个新属,建议将 *Pseudoamycolata halophobica* 再分回假诺卡氏菌,称为 *Pseudo-*

*nocardia halophobica*。

### 1.2 双孢放线菌属 *Actinobispora* Jiang and Xu et al., 1991<sup>[5]</sup>

革兰氏阳性,不抗酸。气生菌丝和基内菌丝分枝不断裂。在基内菌丝上产生成纵对的双孢子。气生菌丝稀少,有的较丰富,产生纵对双孢子或单个孢子。有的菌种会自溶。细胞壁含 meso-DAP, 半乳糖,阿拉伯糖。含磷脂酰胆碱,磷脂酰乙醇胺及含葡糖胺未知结构磷脂(PVI型)。主要的甲基萘醌为 MK-7(H2), MK-9(H2)。无枝菌酸。DNA的 G+C mol% 为 71。代表种:云南双孢放线菌 (*Actinobispora yunnanensis* Jiang and Xu et al., 1991)。

### 1.3 游动四孢菌属 *Planotetraspora* Hu et al., 1993<sup>[6]</sup>

革兰氏阳性,不抗酸。基内菌丝发育良好,深入培养基,致密。菌落凸起。气生菌丝稀少,偶有隔,形成柱状孢囊,囊内单行排列4个孢子。当孢囊遇水,就释放孢子。孢子极生单鞭毛,会游动。细胞壁含 meso-DAP, 谷氨酸。全细胞水解物含半乳糖,阿拉伯糖,木糖。代表种:奇异游动四孢菌 (*Planotetraspora mira* Hu et al., 1993)。

### 1.4 草孢菌属 *Herbidospora* Kudo et al., 1993<sup>[7]</sup>

好气,革兰氏阳性,不抗酸。无真正的气生菌丝。从营养菌丝的短梗顶端长出孢子链,成丛。每个孢子链有10~30个孢子。孢子不游动。细胞壁含 N-乙酰胞壁酸和 meso-DAP,

1994-12-29 收稿

无甘氨酸(胞壁Ⅲ型)。全细胞水解物含微量马杜拉糖。含磷脂酰乙醇胺和葡糖胺的磷脂(PIV型)。脂肪酸有 iso-16 碳烷酸, n-16 碳、17 碳烷酸, 10-甲基 17 碳烷酸(3C)。主要的甲基萘醌为 MK-10(H4), 亦含 MK-10(H2, H0, H6)和 MK-9(H4)。DNA 的 G+Cmol% 为 69—71。代表种: 粉白草孢菌(*Herbidospora cretacea* Kudo *et al.*, 1993)。

#### 1.5 游动多孢菌属 *Planopolyspora* Petrolini *et al.*, 1993<sup>[8]</sup>

基内菌丝发育良好, 致密。气生菌丝中等或稀少。从基内菌丝长出管状长孢囊, 成丛, 或从菌丝束样的结构上长出。孢囊孢子单行排列, 孢子无数。孢子有 2~6 根亚极生鞭毛, 会游动。细胞壁含 meso-DAP(Ⅲ型)。全细胞水解物含马杜拉糖(B型)。代表种: 萎缩游动多孢菌(*Planopolyspora crispa* Petrolini *et al.*, 1993)。

#### 1.6 游动短链孢菌属 *Catenuloplanes* Yakota *et al.*, 1993<sup>[9]</sup>

革兰氏阳性, 不抗酸, 好气。基内菌丝分枝不断裂。气生菌丝稀少, 双歧分枝, 有短孢子链, 1~2 圈。孢子链和气生菌丝常聚集成丛, 象一团花。孢子杆状, 直或弯, 有周生鞭毛, 会游动。细胞壁含谷氨酸, 丝氨酸, 甘氨酸, 丙氨酸, 赖氨酸(VI型)和甘露糖, 木糖。无枝菌酸。含二磷脂酰甘油, 磷脂酰甘油, 磷脂酰肌醇, 磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺(PⅢ型)。主要的甲基萘醌为 MK-9(H8)和 MK-10(H8)。DNA 的 G+Cmol% 为 72.7。代表种: 日本游动短链孢菌(*Catenuloplanes japonicus* Yokota *et al.*, 1993)。

#### 1.7 珊瑚放线菌属 *Actinocorallia* Tinuma *et al.*, 1994<sup>[10]</sup>

革兰氏阳性, 好气菌。基内菌丝发育良好, 多分枝, 不断裂。从基内菌丝珊瑚状孢子梗顶端长出有 30 个以上孢子的长孢子链。孢子不游动。偶尔出现孢梗束。细胞化学类型Ⅲ型。全细胞糖类型 C 型(无特征性糖)。脂肪酸 1a 型(直链饱和脂酸和单不饱和脂酸)。优势甲基

萘醌为 MK-9(H4), MK-9(H6)。磷脂 PⅡ型(磷脂酰乙醇胺)。DNA 的 G+Cmol% 为 73。代表种: (*Actinocorallia herbida* Tinuma *et al.*, 1994)。

#### 1.8 库茨勒属 *Kutzneria* Stackebrandt *et al.*, 1994<sup>[11]</sup>

该属是从链孢囊菌属分出来的。形态上属链孢囊菌 1 组。气生菌丝棉花状, 产生大的球形孢囊, 直径 10~48 $\mu$ m。孢囊壁厚。孢囊梗长达 50 $\mu$ m。孢子球形, 卵形或杆状, 不游动。细胞壁含 N-乙酰胞壁酸, meso-DAP, 无特征性糖(Ⅲ型)。磷脂为磷脂酰乙醇胺、羟基磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇和二磷脂酰甘油。主要的甲基萘醌为 MK-9(H4)。主要的脂肪酸有 iso-16: 0, 2-OH-iso-16: 0, 10 甲基-16: 0, anteiso-17: 0 和 2-OH-anteiso-17: 0 脂酸。DNA 的 G+Cmol% 为 70.3~70.7。代表种: 绿灰色库茨勒菌(*Kutzneria viridogrisea* Stackebrandt *et al.*, 1994)。

## 2 分子分类进展迅速

1978 年, Woese 等<sup>[12]</sup>根据细胞色素 C、rRNA 及其他生物大分子研究的结果, 第一次提出第三类生物“古细菌”以来, rRNA 作为研究系统进化的生物大分子极受重视。

由于 PCR 技术的应用, DNA 合成仪、DNA 顺序分析仪的普及, 使分子分类不但需要, 而且变得容易。近几年, 每年测定大约 100 种 rRNA 的全顺序, 可见进展之快。

1989 至 1995 年, 在 Int.J.System. Bacteriol. 发表的放线菌分类论文约 50 篇。有关分子分类的有 15 篇。在 System. Appl. Microbiol. 中也有大量分子分类的论文。

1993 年 Kim 等<sup>[16]</sup>研究了 *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* 编码 rRNA 的 6 个基因族(rDNA)。克隆并测定了其中一个 rDNA 族(rrnE)的顺序。它是一个 8.7kb 的 BamHI 片断。rDNA 按 16S-23S-5S 的顺序排列, 中间有基因间隔分开。在间隔区, 没有编码 tRNA 的顺序存在。三种成熟的 rRNA 长度分别是 1528, 3120 和 120nt。早在 1988 年,

Embley 等<sup>[17]</sup>根据 16S rRNA 顺序分析的结果研究了无枝菌酸胞壁 IV 型放线菌的系统发育, 把除 *Amycolata* 外的无枝菌酸胞壁 IV 型的 *Actinopolyspora*, *Amycolatopsis*, *Faenia*, *Pseudonocardia*, *Saccharopolyspora* 等属划在一起, 建立假诺卡氏菌科。Warwick 等<sup>[18]</sup>也分析了 16S rRNA 的核苷酸顺序。结果却认为 *Amycolata* 和 *Pseudonocardia* 两个属应该合并为一个属, 同时建议把 *Actinokineospora* 和 *Saccharothrix* 两个属放在假诺卡氏科。Witt 等<sup>[19]</sup>对 *Streptomyces* 和 *Streptoverticillium* 的 37 个种进行了 DNA-DNA 分子杂交和 16S rRNA 的顺序分析, 研究了它们的亲缘关系。结果把这两属归并为链霉菌属。

值得指出的是, 核糖体蛋白图谱用于放线菌分类已开始受到重视。原核生物的核糖体由三种 rRNA 和五六十种蛋白质组成。由于结构和功能的稳定性, 核糖体蛋白的变化比其他蛋白小得多。因此, 核糖体蛋白可用于研究生物的分类和系统进化。研究核糖体蛋白最早也是从大肠杆菌开始。Wittmann<sup>[20]</sup>的报告表明, 大肠杆菌的核糖体大约有 60 个蛋白, 他们的分子量、氨基酸数均已知道。最近几年, 核糖体蛋白图谱才在放线菌分类中应用起来。

核糖体蛋白作为分类指征有三个不同的层次。

第一个层次是作不同生物核糖体蛋白的单相凝胶电泳图谱, 比较核糖体蛋白的种类。由于蛋白的种类变化有限, 用于大类之间的分类比较奏效。

第二个层次是作双相凝胶电泳 (2D-PAGE), 测定 AT-L30 蛋白的 REM (相对电泳离行率), 取 100 个单位。Ochi<sup>[21]</sup>把数值分类中不同组的 11 株链霉菌与 2D-PAGE 图谱作比较, 发现每种图谱是特异性的, 而且两种方法的结果一致。证明此方法可在属和种的分类中应用。

Ochi<sup>[22]</sup>测定了若干属放线菌及细菌, 它们 AT-L30 蛋白的 REM 值如下:

*Microtetraspora glauca* -5.0

*Microbispora aerata* 6.5

*Streptomyces antibioticus* 14.5

*Actinomadura madurae* 19.0

*Actinoplanes utahensis* 21.0

*Streptosporangium reseau* 21.0

*Nocardiopsis dassonvillei* 24.0

*Streptomyces griseus* 25.0

*Kitasatospora setae* 29.0

*Micromonospora purpurea* 29.0

*Nocardioides luteus* 29.0

*Streptoverticillium orinoci* 29.0

*Kineospora aurantiaca* 43.0

*Actinopolyspora halophila* 46.0

*Dactylosporangium aurantiacum* 46.0

*Nocardia asteroides* 59.0

*Thermoactinomyces vulgaris* 66.5

*Saccharopolyspora hirsuta* 70.0

*Saccharomonospora caesia* 97.0

*Saccharomonospora glauca* 98.0

*Saccharomonospora viridis* 100.0

*Staphylococcus aureus* 72.5

*Escherichia coli* 73.0

*Bacillus subtilis* 75.0

*Pseudomonas aeruginosa* 76.0

由于马杜拉菌和小四孢菌的分类比较混乱, Ochi<sup>[23]</sup>作了属于这两个属的 26 株典型菌的 2D-PAGE, 把它们分为明显的两个群。一个群的 REM 在 14.0~41.5 之间, 它们是马杜拉菌; 另一群的 REM 在 -6.5~0, 它们是小四孢菌。可见其差异很明显。

Ochi<sup>[22]</sup>进一步测定了 18 株链霉菌, 它们 AT-L30 蛋白的 REM 在一个很窄的范围 (14.5~25.5)。Ochi 和 Miyadoh<sup>[24]</sup>测定了 11 种链孢囊菌的 AT-L30 蛋白, REM 在 21.0~30.5, 将该属分成三组, 与形态划分的三个组很吻合。但链霉菌和链孢囊菌两属菌的 REM 有重叠。Ochi 等 (1993) 又分析了 11 种小双孢菌、6 种马杜拉菌 AT-L30 蛋白的 REM, 前者在 6.5~29.0 之间, 后者在 21.0~28.5 之间。这两个属之间又有重叠。由此 Ochi 认为

AT-L30 蛋白的 REM 是一个特征值,它可以用于放线菌分类。

上述情况说明,菌种越多,重叠会越多。对于重叠的部分,尚需其他指征的配合。搞清“非驴非马”菌种的分类地位正是分类学面临的困难任务之一。

第三个层次是测定蛋白质的氨基酸顺序。

核糖体 AT-L30 或其他蛋白是可以用于放线菌分类的分子。它们的 REM 的不同反映了氨基酸组成和顺序的不同,进而反应它们功能的不同。因此,研究 AT-L30 蛋白或其他蛋白的氨基酸顺序有可能为放线菌分类建立一套有利的工具。Ochi 等<sup>[25]</sup>新近分析了 7 种马杜拉菌、5 种小双孢菌及各一种链孢囊菌和小四孢菌的 AT-L30 蛋白 N-末端的氨基酸顺序,并据此用聚类分析法计算每个蛋白 N 末端第 10~18 氨基的 SAS 值(Similarity of the amino acid sequences)。发现小双孢菌彼此间的 SAS 值高达 91%~100%,可见它们的同源性很高;马杜拉菌之间的 SAS 值只有 67%,其中 *A.madurae*, *A.echinospora*, *A.rugatobispora* 之间的 SAS 值有 90%, *A.atramentaria*, *A.cremea*, *A.malachitica* 之间在 72%~83%。这个结果与以前的报导有些相符,有的不相符。这也说明分析 AT-L30 蛋白全顺序的必要性。我们认为,还可以进一步找其他更合适的核糖体蛋白分子,分析其氨基酸的全顺序,可能获得更有用、更可靠的信息。

### 3 国内进展

1992 年出版了阎逊初的《放线菌的分类和鉴定》<sup>[26]</sup>。这是中国放线菌分类史上一个重要事件。该书是我国放线菌分类研究 40 年的总结。它刊载了 1986 年以前全世界发表的 69 个属,链霉菌就有大约 1000 种,是迄今为止刊载放线菌种类最多的著作之一。1991 年和 1993 年,姜成林等<sup>[5]</sup>和胡润茂等<sup>[6]</sup>先后在 *Int. J. System. Bacteriol.* 发表了放线双孢菌属和游动四孢菌属。1994 年阮继生等<sup>[27]</sup>研究了不同放线菌属的化学与分子分类。

### 4 展望

4.1 化学分类定量化日趋明显。六七十年代建立的大部分化学分类指征都是定性的。而这些指征的定量对化学家来说并不困难。采用现代分析仪器测定氨基酸、糖、磷脂、醌、脂肪酸等完全可以作到快速,微量,准确。例如,Wellington 等<sup>[26]</sup>分析了 9 个属的 DAP 组分。结果是每个属几乎都同时含 meso-DAP 和 L-DAP,只是两种 DAP 的比例不同而已。现在,用气相色谱定量分析糖组分(Saddler 等<sup>[29]</sup>),分析脂肪酸(Paradis 等<sup>[30]</sup>),用高压液相色谱定量分析醌等已经开始。可以肯定,随着化学指征的定量化,属和属之间、种和种之间将出现越来越多的交叉,重叠,很多菌种又得重新认识。

4.2 分子分类将扮演越来越重要的角色:现在,各种凝胶电泳技术和 PCR 技术等已日趋完善和微量化,超微量化。DNA 合成仪、顺序分析仪、氨基酸顺序仪等测试仪器已在外国和国内许多实验室普及。我们知道在西方几个发达国家已建立了三个 DNA 信息库(EMBL, 1992; GenBank, 1992; RDP, 1993)向全世界提供信息。其中 RDP(The ribosomal Database Project, Illinois)就是 Woese 主导之下建立起来的。这将推动 DNA 信息的网络化、国际化。这几方面的综合将使核酸、蛋白质等生物大分子的顺序分析和信息交换变得容易起来,从而大大加速生物分类与进化研究的进程,提高研究工作的质量和水平。其必然的趋势是把分类与进化更紧密的结合在一起,搞清各分类单元的分类地位及系统进化关系,使当代放线菌分类学的理论日臻完善。

4.3 各种分类手段的综合运用:近五年, *Int. J. System Bacteriol.* 发表的放线菌分类论文,几乎一半是化学分类和分子分类等几种分类依据的结合,几乎没有单纯的化学和形态分类的文章。很显然,分类指标越多,越定量,各分类单元之间的界线越模糊,因此我们认为,放线菌分类将面临一个“混乱”的局面。这个“混乱”局面的澄清将迎来放线菌分类的新时代。

## 参 考 文 献

- [1] Williams S T, Sharpe M E, Holt J G. *Bergey's manual of systematic bacteriology* Vol. 4. Baltimore, Hongkong, London *et al*: Williams & Wilkins, 1989.
- [2] Okami Y. SIM-ISBA '91 workshop on actinomycetes, Madison, 1991, 1~3.
- [3] Akimov V N, Evtushenko L. I Dobritsa S. V. *Int J System Bacteriol*, 1989, **39**: 457~461.
- [4] McVeigh h P, Munro J, Embley T M. *Int J System Bacteriol*, 1994, **44**: 300~302.
- [5] Jiang C, Xu L, Yang Y *et al*. *Int J System Bacteriol*, 1991, **41**: 526~528.
- [6] Hu R M, Wei G, Li J. *Int J System Bacteriol*, 1993, **43**: 468~470.
- [7] Kudo T, Itoh T, Miyadoh S, *et al*. *Int. J System Bacteriol*, 1993, **43**: 319~328.
- [8] Petrolini B, Quaroni S, Sarcchi M, *et al*. *Actinomycetes*, 1993, **4**: 8~16.
- [9] Tamura T, Nakagaito Y, Nishii T, *et al*. *Int. J System Bacteriol*, 1994, **44**: 193~203.
- [10] Tinuma S, Yokota A, Hasegawa T, *et al*. *Int J System Bacterio*, 1994, **44**: 230~234.
- [11] Stackebrandt E, Kroppenstedt R M, Jahnke K D, *et al*. *Int J System Bacteriol*, 1994, **44**: 265~269.
- [12] Woese C R, Magrum L. J. Fox G E. *Archaeobacteria. J Mol Evol*, 1978, **11**: 245~252.
- [13] Zuckerkandl E, Pauling L. *J Theor Biol*, 1965, **8**: 357~366.
- [14] Woses C R. *Microbiol Reviews*, 1987, **51**: 221~271.
- [15] Stackebrandt E, Liesack W, Webb R. *Actinomycetes*, 1991, **2**: 54~61.
- [16] Kim E, Kim H, Hong S P, *et al*. *Gene*, 1993, **132**: 21~31.
- [17] Embley M T, Smida J, Stackebrandt E. *System Appl Microbiol*, 1988, **11**: 44~52.
- [18] Warwick S, Bowen T, McVeigh, H, *et al*. *Int J System Bacteriol*, 1994, **44**: 293~299.
- [19] Witt D, Stackebrandt E. *System Appl Microbiol*, 1990, **13**: 361~371.
- [20] Wittmann H G. *Ann Rev Biochem*, 1982, **51**: 155~183.
- [21] Ochi K. *J Gen Microbiol*, 1989, **135**: 2635~2642.
- [22] Ochi K. *Int J system Bacteriol*, 1992, **42**: 144~150.
- [23] Ochi K, Miyadoh S, Tamura T. *Int J System Bacteriol*, 1991, **41**: 234~239.
- [24] Ochi K, Miyadoh S. *Int J System Bacteriol*, 1992, **42**: 151~155.
- [25] Ochi K, Haraguchi K, Miyadoh S. *Int J System Bacteriol*, 1993, **43**: 58~62.
- [26] 阎逊初. *放线菌的分类和鉴定*, 北京: 科学出版社, 1992.
- [27] 阮继生, 郎艳军, 石彦林, 等. *微生物学报*, 1994, **34**: 241~244.
- [28] Wellington E M H, Stackebrandt E, Sanders D, *et al*. *Int J System Bacteriol*, 1992, **42**: 156~160.
- [29] Saddler G S, Tavecchia P, Lociuoro S, *et al*. *J Microbiol Methods*, 1991, **14**: 185~191.
- [30] Paradis E, Goyer C, Hodge N C, *et al*. *Int J System Bacteriol*, 1994, **44**: 561~564.
- [31] Higgins D G, Fuchs R, Stoechr P J, *et al*. *Nucleic Acid Res*, 1992, **20**: 2071~2074.
- [32] Burks C, Cinkosky M L, Fisher W M, *et al*. *Nucleic Acid Res*, 1992, **20**: 2065~2069.
- [33] Larsen N, Olsen G J, Maidak B L., *et al*. *Nucleic Acid Res*, 1993, **21**: 3021~3023.