

放线菌研究及应用

阮继生 刘志恒 编著
梁丽梅 杨德成

科学出版社

内 容 简 介

本书是配合放线菌生物资源开发而写的关于放线菌分类学新技术新方法的一本著作。全书共分 17 章,分别叙述了放线菌目中 53 个属的分类学特征,放线菌的形态建成,当今放线菌分类学中的化学分类特征如细胞壁化学组分、类脂、醌的分析,分子生物学技术如 DNA-DNA、DNA-rRNA 杂交、16S rRNA 寡核苷酸序列编目,免疫学及数值分类,生态学,放线菌噬菌体,人畜放线菌病诊断与治疗,共生固氮弗兰克氏菌和放线菌的资源开发。内容与方法详尽、实用、附有大量的图表和文献。

本书可供大专院校有关师生,微生物学研究人员,医药卫生检验人员以及从事微生物资源开发的有关人员学习和参考。

放线菌研究及应用

阮继生 刘志恒 编著
梁丽糯 杨德成

责任编辑 王秀盈 王惠君

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100707

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1990 年 4 月第 一 版 开本: 787×1092 1/32

1990 年 4 月第一次印刷 印张: 15 5/8 插页: 1

印数: 0001—1300 字数: 357 000

ISBN 7-03-001499-5/Q·215

定价: 18.00 元

序

这本书主要是研究放线菌分类学的新技术、新方法的一部著作,分别叙述了细胞壁化学组分、磷酸类脂、甲基萘醌、DNA 碱基、16S rRNA 寡核苷酸序列分析以及 DNA-DNA 和 DNA-rRNA 分子杂交、蛋白质凝胶电泳、免疫学、数值分类等方法在放线菌分类学中的应用。由于每个章节的作者都是从事有关研究的科研人员,故对每一技术都阐述了原理并讲明应用过程中的操作细节,感兴趣的读者只要按所述程序进行实验,就能得到预期的结果。

自从 19 世纪末发现放线菌以来,不断有人进行分类研究。直到 S. A. Waksman (1961) 和 N. A. Krasilnikov (1970) 关于放线菌的专著问世,以及 1972 年《国际链霉菌计划》(ISP) 发表了国际协作的最后一批研究结果,于是以形态和培养特征为主、以生理生化特性为辅的放线菌经典分类学便达到了极盛时期。

由于数、理、化等学科,特别是化学向生物学的渗透,使放线菌分类学向着分子生物学的方向发展,化学分类学即应运而生。本世纪 60 年代初,首先由 M. P. Lechevalier 和 H. A. Lechevalier 拟定了细胞壁化学组分分析的实用方法。其推广应用的结果,发现了几个新属,如类诺卡氏菌(*Nocardioides*)、拟诺卡氏菌(*Nocardiopsis*)、链异壁菌(*Streptoalloteichus*)、北里孢菌(*Kitasatosporia*)、异壁放线菌(*Actinoalloteichus*)、类链霉菌(*Streptomycooides*) 等属。原来用枝菌酸区分分枝杆菌、诺卡氏菌和棒状杆菌,后来又进一步用它发现了无

枝酸菌 (*Amycolata*) 和拟无枝酸菌 (*Amycolatopsis*) 两属。数值分类只能显示菌株间的表观相似性, 而 DNA 中 GC mol%、DNA-DNA 杂交和 16SrRNA 寡核苷酸序列分析则可检验菌株间的同源性。这些技术已为放线菌分类学做出很多贡献。但其他方法目前尚未广泛应用。有些方法一旦普及开来, 必然会使放线菌分类学向更纵深的方向发展。

此外, 本书还描述了放线菌的几十个属、放线菌的形态建成、生态学、放线菌噬菌体等, 阐述了放线菌病的诊断和治疗以及近十年来刚兴起的与非豆科植物共生结瘤固氮的弗兰克氏菌的研究结果。最后, 简要探讨了放线菌资源的开发、利用及其前景。

这部著作内容很丰富又比较新, 出版后将会使我国放线菌分类学的发展更加深入; 同时, 还可间接提高并扩大这类微生物的经济效益乃至社会效益。

阎述初

1988 年 10 月 4 日

前 言

微生物是极其丰富的自然资源,它的种类多,分布广,如土壤、河流、海洋、湖泊等环境里都有微生物。而放线菌是微生物中重要的一类菌,其中绝大部分是腐生、好气菌;少数为厌气、寄生菌;还有的菌能与非豆科植物共生固氮。此外,放线菌与人类有着非常密切的关系。

放线菌有多种代谢产物,如抗生素、维生素、氨基酸、蛋白质、淀粉酶、脂肪酶、纤维素酶等,其中很多产物已在工业、农业、医疗、食品以及国防等领域产生了巨大的经济效益。据不完全统计,当前世界上报道的抗生素有8 000种左右,其中80%是放线菌产生的。因而,世界各国对放线菌的研究与资源开发给予极大的重视。我国幅员辽阔,地形、气候复杂,生态多样,放线菌的种类与资源比其他国家更丰富,亟待深入研究与开发。

随着科学的迅速发展和新技术的广泛应用,美、英、苏和联邦德国的放线菌分类学研究已达到分子生物学水平。而日本、美国在放线菌资源开发、利用方面居世界前列。近几年来,国外的放线菌分类研究与资源开发两方面密切配合,且发展迅速。而我国与先进国家相比,尚有很大差距。如实验手段落后、属的数量发现尚少等。为了尽快赶上世界先进水平,我们已将国内外近十年来有关放线菌分类研究的新观点、新技术和新方法加以系统介绍。特别是将我们在国内外工作和学习中使用的新技术与方法予以详细介绍。为我国放线菌分类学的发展或许能起到抛砖引玉的作用。

本书从实用出发,首先着重介绍放线菌的形态与属的简单特征。其目的在于使读者对放线菌目中几十个属有个全面的认识,以利于放线菌资源的开发与利用。其次,用大量篇幅介绍放线菌分类研究中的新技术和新方法,如放线菌的磷酸类脂、枝菌酸、醌、DNA-DNA、DNA-rRNA 分子杂交、16S rRNA 寡核苷酸序列分析、数值分类方法以及蛋白电泳与免疫技术在放线菌分类学中的应用等,以求有的放矢,使放线菌的研究能更好地与实际应用相结合,尽快为社会主义建设做出贡献。

除了我们研究结果制成的图表外,书中有许多图表引自各种杂志和专著,恕不一一单独注明出处。

由于我们的业务水平所限,加之作者较多,难免出现遗漏和错误,敬请读者批评指正。

此外,本书在编写过程中得到了姜成林、张寅、石彦林和马俊才等同志的帮助。全书承蒙中国科学院生物学部委员阎逊初教授审阅,特此一并致谢。

阮继生

1988年10月

目 录

• v •

类中的作用	217
第一节 基本原理	218
第二节 方法	222
第三节 序列资料的编目分析	255
第四节 研究进展	261
第五节 16S rRNA 寡核苷酸编目分析在放线菌分类中的应 用	278
第六节 评论	279
第十章 数值分类在放线菌分类中的作用	283
第一节 基本概念	287
第二节 数值分类的方法	289
第三节 数值分类法在放线菌分类鉴定中的应用	299
第十一章 蛋白电泳技术在放线菌分类中的应用	316
第一节 基本原理	316
第二节 蛋白电泳方法	317
第三节 凝胶蛋白电泳在放线菌分类鉴定中的应用	329
第十二章 免疫学方法在放线菌分类中的应用	338
第一节 基本原理	338
第二节 凝集反应	340
第三节 沉淀反应	341
第四节 免疫荧光技术	350
第五节 免疫学鉴定法在放线菌分类中的应用	351
第十三章 放线菌噬菌体	357
第一节 放线菌噬菌体的种类	357
第二节 放线菌噬菌体的生态学	359
第三节 放线菌噬菌体的分离与提取	363
第四节 放线菌噬菌体在分类学研究中的意义	364
第十四章 放线菌生态学	367
第一节 自然环境中放线菌的分离和检测方法	367
第二节 土壤放线菌	372

第三节	水生放线菌	376
第四节	堆肥及其他材料中的放线菌	382
第五节	动植物病原放线菌	384
第六节	极端环境中的放线菌	385
第十五章	放线菌病的诊断与治疗	392
第一节	概述	392
第二节	内源性放线菌感染及损害	393
第三节	外源性放线菌感染	402
第四节	放线菌孢子性变态反应	410
第五节	发酵型致病放线菌的临床实验室检验	413
第六节	致病性好气放线菌的临床实验室检验	427
第十六章	非豆科植物共生固氮弗兰克氏菌资源	439
第一节	放线菌结瘤植物的种类及其分布	441
第二节	非豆科植物的固氮能力	442
第三节	弗兰克氏菌的研究历史与分离方法	442
第四节	弗兰克氏菌的形态结构	454
第五节	弗兰克氏菌的分类	461
第六节	弗兰克氏菌的侵染与固氮	472
第七节	弗兰克氏菌的应用前景	473
第十七章	放线菌资源开发与利用	477
第一节	放线菌在实际应用中的重要性	477
第二节	放线菌生物资源的利用	478
第三节	放线菌生物资源开发的前景	486

第一章 放线菌的形态建成

放线菌 (Actinomycetes) 广泛地分布于自然界中, 土壤是它们的主要习居场所。放线菌中大多数是腐生好气、革兰氏阳性菌。放线菌的产物多种多样, 如当前世界上报道有 8000 种抗生素, 其中约有 80% 是放线菌产生的, 其他有工农业生产中的各种酶制剂, 如蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、木质素酶等, 还有维生素与有机酸等。少数放线菌为厌气、兼性厌气寄生菌, 能引起人、动物、植物患病, 如引起放线菌病 (actinomycosis)、诺卡氏菌病 (nocardiosis)、马铃薯的疮痂病等。还有能与非豆科植物共生、在根部形成瘤、固定空气的氮气、肥化土壤的放线菌。因此, 放线菌是微生物中与人的关系非常密切而有应用前途的一类菌, 受到世界各国学者的极大重视。

第一节 放线菌在微生物中的地位

放线菌的特点是, 绝大部分菌具有生长发育良好的菌丝体。19 世纪以前, 人们将放线菌安排在真菌中。随着科学的发展, 科学家对之认识的深入, 才将放线菌放在细菌中。关于放线菌属于哪个界、门、纲内, 不同分类学家的观点不同, 在微生物中的分类地位也各异。克拉西里尼科夫 (Krasilnikov) 的分类体系是将放线菌放在植物界, 原生植物门, 裂殖菌纲内。由于人们对微生物认识的不断深入, 有人认为把无真正细胞核的细菌和放线菌放在植物界内不够妥当, 于是有人将放线菌列入动

• 1 •

物界和植物界之外的原生生物界(Protista)内。由于原生生物界内既包含有无真正细胞核的微生物,又包含有真正细胞核的微生物,因而Murray 1968年提出原核生物界(Procaryotae)与真核生物界(Eucaryotae)。之后,放线菌归于原核生物界。1978年, Gibbens 和 Murray 根据细胞壁の有无和性质建议将原核生物界分为4个门,即薄壁菌门(Gracilicutes),包括革兰氏阴性细菌;厚壁菌门(Tenericutes),包括革兰氏阳性细菌与放线菌;疵壁菌门(Mendosicutes),包括无肽聚糖细胞壁的细菌,如甲烷菌、嗜盐菌和硫化裂叶菌;柔膜菌门(Mollicutes),包括无细胞壁的枝原体类细菌。

Woese 等(1977,1980)以16S rRNA 寡核苷酸序列分析的 S_{AB} 值,将原核生物界分成真细菌界(Eubacteriae)(相当Gibbens的薄壁菌门、厚壁菌门和柔膜菌门)与古细菌界(Archaeobacteria),而古细菌界即Gibbens, (1978)的疵壁菌门。古细菌界的特点是,有原核生物细胞结构的特点,但与真细菌不同: 1) 细胞膜中所含的类脂是不可皂化的,其中中性类脂以类异戊二烯类碳氢化合物为主,极性类脂以植烷甘油醚为主; 2) 细胞壁系多种多样,有的是蛋白质性质的,有的是杂多糖类,有的类似肽聚糖,但都不含胞壁酸、D型氨基酸与二氨基庚二酸(diaminopimelic acid, DAP); 3) 16S rRNA 中核苷酸序列分析有其特殊性,不同于真细菌,也不同于真核生物。其tRNA有独特的序列顺序。《伯杰氏系统细菌学手册》中关于高级分类单位又有所变化,即原核生物界下分4个门7个纲: 1) 薄壁菌门: 暗细菌纲(Scotobacteria), 无氧光细菌纲(Anoxyphotobacteria), 产氧光细菌纲(Oxyphotobacteria); 2) 厚壁菌门: 厚壁菌纲(Firmibacteria), 放线菌纲(Thallobacteria); 3) 软壁菌门(Tenericutes): 柔膜菌纲(Mollicutes); 4) 疵壁菌门: 古

细菌纲 (Archaeobacteria), 这清楚表明, Murray 将 Woese 提出的古细菌界变为古细菌纲了。

由此可见, 放线菌在微生物中属原核生物界, 厚壁菌门, 放线菌纲, 放线菌目 (Actinomycetales)。

放线菌目已发表了 60 多个属。由于各国分类学家观点的不同, 科的标准、科内属的划分也各异, 长期难以统一。经国际放线菌分类分委员会广泛征求意见, 建议取消科的分类等级。《伯杰氏系统细菌学手册》编委会采纳了这一建议。同时, 他们将已发表的属又进行了整理, 删去了一些有争议的属。将菌体有横隔断裂的诺卡氏菌形放线菌 (Nocardioform actinomycetes) 9 个属刊登在第 2 卷中 (全书共分为 4 卷)。它们是诺卡氏菌属 (*Nocardia*)、红球菌属 (*Rhodococcus*)、厄氏菌属 (*Oerskovia*)、原小单孢菌属 (*Promicromonospora*)、间孢囊菌属 (*Intrasporangium*)、假诺卡氏菌属 (*Pseudonocardia*)、糖多孢菌属 (*Saccharopolyspora*)、糖单孢菌属 (*Sacchromonospora*) 及放线多孢菌属 (*Actinopoly-spora*)。其他属刊登在第 4 卷中 (刊登在第 2 卷内的内容也将再复印在第 4 卷上)。它们是:

1) 多腔孢囊放线菌 (*Actinomycetes with multi-locular sporangia*): 嗜皮菌属 (*Dermatophilus*)、地嗜皮菌属 (*Geodermatophilus*)、弗兰克氏菌属 (*Frankia*); 2) 游动放线菌 (*Actinoplanetes*): 游动放线菌属 (*Actinoplanes*)、小瓶菌属 (*Ampullariella*)、发仙菌属 (*Pilimelia*)、指孢囊菌属 (*Dactylosporangium*)、小单孢菌属 (*Micromonospora*); 3) 链霉菌及其相关属 (*Streptomyces and related genera*): 链霉菌属 (*Streptomyces*)、链轮丝菌属 (*Streptovercillium*)、鱼孢菌属 (*Sporichthya*)、动单孢菌属 (*Kineosporia*); 4) 马杜拉放线菌 (*Maduromycetes*): 马杜拉放线菌属

(*Actinomadura*)、小双孢菌属 (*Microbispora*)、小四孢菌属 (*Microtetraspora*)、游动双孢菌属 (*Planobispora*)、游动单孢菌属 (*Planomonospora*)、螺孢菌属 (*Spirillospora*)、链孢囊菌属 (*Streptosporangium*); 5) 高温单孢菌及其相关属 (*Thermomonospora* and other genera): 高温单孢菌属 (*Thermomonospora*)、束丝放线菌属 (*Actinosynnema*)、拟诺卡氏菌属 (*Nocardiopsis*)、链异壁菌属 (*Streptoalloteichus*); 6) 高温放线菌 (*Thermoactinomycetes*): 高温放线菌属 (*Thermoactinomyces*); 7) 其他属: 糖霉菌属 (*Glycomyces*)、拟孢囊菌属 (*Kibdelosporangium*)、北里孢菌属 (*Kitasatospora*)、糖丝菌属 (*Saccharothrix*)。

还有我国发表的 4 个新属: 小链孢菌属 (*Microstreptospora*)、异壁放线菌属 (*Actinoalloteichus*)、三歧孢菌属 (*Trichotomospora*)、类链霉菌属 (*Streptomycoides*) 以及最近 Lechevalier (1986) 等发表的无枝酸菌属 (*Amycolata*) 与拟无枝酸菌属 (*Amycolatopsis*)。

第二节 放线菌的形态特征

一、基内菌丝体

基内菌丝体 (substrate mycelia) 简称基丝。放线菌孢子、孢囊孢子或菌丝断裂小体在固体培养基上萌发长出芽管, 芽管伸长即为初生菌丝体 (primary mycelia)。少数放线菌如放线菌属 (*Actinomyces*) 只有初生菌丝体并随即断裂。菌丝伸入培养基内或长在培养基表面, 系基内菌丝体或称营养菌丝体 (vegetative mycelia) 或初级菌丝体。菌丝有单分枝、双分枝之分; 其生长方式分互生或对生。

基丝直径一般为 $0.2-1.0\ \mu\text{m}$ 或 $2-3\ \mu\text{m}$ 。大多数基丝不形成横隔也不断裂,按 Williams 等人 (1973) 电子显微镜下超微结构的研究表明,横隔分裂有两种: 1) 往往在菌丝壁和膜内出现环状内生长物,向内逐渐伸长而贯通。间体 (mesosome) 时常参与横隔的形成。断裂发生于横隔中的中间线,借助于物质的自溶而断裂,这谓之 I 型。这种断裂型往往发生在真细菌如蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 或基丝不断裂的放线菌中。2) 从菌丝体壁和膜内部发生环状二层内生长物,有一共同的中间空隙,保留在发育过程的各个阶段。这种内生生长物从开始就清楚地表现出二层壁,壁贯通后形成横隔,中间空隙沟通内壁自溶而断裂。这种断裂方式谓之 II 型,多发生于基丝有横隔断裂的诺卡氏菌形放线菌中 (图 1-1)。

基丝有白、黄、橙、红、绿、蓝、紫、褐、黑等各种颜色,在无机与有机培养基中分泌与基丝相应颜色的色素。色素溶于水的,称水溶性色素;溶于有机溶剂的,谓之脂溶性色素。

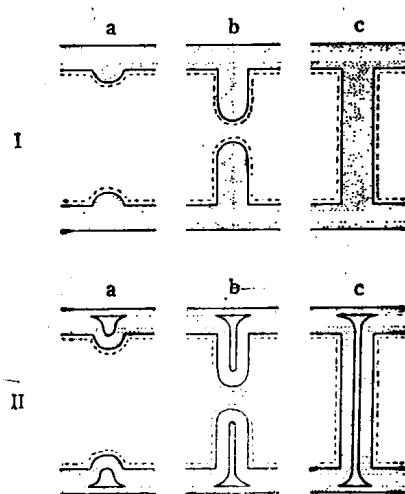


图 1-1 基丝横隔形成的 I 型与 II 型

二、气生菌丝体

气生菌丝体简称气丝。基丝发育到一定阶段向空间长出

的菌丝体，叫做气生菌丝体 (aerial mycelia) 或二级菌丝体 (secondary mycelia)。气丝与基丝有时很难分，在显微镜下观察时一般气丝颜色较深，而基丝颜色浅、发亮。按直径看，前者一般比后者粗。也有的属，如假诺卡氏菌属、嗜皮菌属等则不是这样。

气丝一般不分化为孢子，但拟诺卡氏菌属、糖霉菌属除外。气丝发育到一定阶段，在顶端形成孢子丝，有直、波曲、螺旋、轮生等形状。轮生孢子丝就是从气丝上同一部位长出三个以上的孢子丝，有一级、二级轮生，直形与螺旋形之分。孢子丝的形状是定种的重要标志之一，轮生是链轮丝菌属的特征。

生孢囊放线菌的特点是形成典型孢囊，孢囊着生的位置因属而异。有的菌孢囊长和气丝上，有的菌长在基丝上。孢囊形成大体上分两种形式：有些属菌的孢囊是由孢子丝卷绕而成；有些属的孢囊是由孢囊梗逐渐膨大。孢囊分圆形、棒状、指状、瓶状或不规则之分。但孢囊外围都有囊壁，无壁者一般称假孢囊。孢囊内原生质分化为孢囊孢子 (sporangiospora)，带鞭毛者遇水游动，无鞭毛者则不游动。因而，孢囊着生位置、孢囊形状与孢囊孢子有无鞭毛，都是属划分的重要指征。

三、孢子的形成过程

孢子丝发育到一定阶段，即分化为孢子。1949 年克拉西里尼科夫在光学显微镜下观察孢子分裂，发现有凝集分裂与横隔分裂两种方式。随着科学的发展和新技术的应用，通过电子显微镜下超微结构的观察表明，孢子丝分裂方式只有横隔分裂，而无凝集分裂。根据 Henssen 等 (1981) 对链霉菌属

不同种以及嗜热假诺卡氏菌 (*Pseudonocardia thermophila*) 的孢子形成过程的超微结构观察的结果表明, 对链霉菌的孢子形成提出了三个基本型: I 型——双层横隔壁将孢子丝分成若干份, 这种横隔谓之间隙横隔 (interspace septum) (图 1-2-I-a, b, c)。II 型——孢子形成的横隔是由缢缩细胞壁与间隙环组成 (sporulation septum composed of constriction and interspace annulus) (图 1-2-II-a, b, c, d)。III 型——根本不形成间隙横隔, 只是缢缩细胞壁将孢子丝分成若干部分 (图 1-2-III-a, b); 当原生质膜全部凹入后, 孢子的新细胞壁就形成了, 原来的孢子丝壁不参与孢子的新细胞壁 (图 1-2-III-c) 而自溶掉 (图 1-2-III-d), 缢缩壁内的积存物质也分解了, 在成熟的孢子可看到残余物 (图 1-2-III-c, d)。IV 型——除上述三种型外, 还发现了 IV 型。IV 型是嗜热假诺卡氏菌孢子形成的过程, 其间隙横隔的形成不同于链霉菌属的上述三种类型。嗜热假诺卡氏菌的菌丝壁是由具有一个电子透明区和二个电子稠密层组成的多层结构 (图 1-2-IV-a, a', b, c)。

孢子丝分化为孢子的横隔比基丝横隔形成的方式花 样多, 孢子丝成熟后可以象基丝横隔形成的 I 型或 II 型 (Williams, 1973) 方式分化孢子, 也可以在这基础上以其他形式出现 (Locci and Sharples, 1984)。所谓其他形式就是上边提到 Henssen 的三种分化方式 (三种型)。看来孢子丝分化为孢子的横隔形成方式比基丝横隔形成方式复杂得多, 而链霉菌属的孢子丝分化为孢子的横隔形成方式更为复杂 (Hardisson and Manzanal, 1976)。

无数资料表明, 放线菌的孢子不是内生的就是由亲代菌丝形成的 (Cross, 1970; Williams *et al.*, 1973, 1976; Cross and Attwell, 1975)。

放线菌孢子形成基本上有三种方式: