



细菌与古菌的多相分类

朱旭芬 方明旭 编著



科学出版社

非外借

细菌与古菌的多相分类

朱旭芬 方明旭 编著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书系统阐述了自然环境中新型细菌与古菌的分离、筛选、多相分类、命名与研究发表,包括 5 部分 41 个实验,既有微生物分离纯化、形态观察、生理生化特征及生态特征等基础性研究,又涵盖了基因型特征、化学特征和系统进化分类等综合性研究内容。每个实验均详细说明了所需要的实验试剂、仪器设备和操作过程,介绍了实验原理、提示与注意事项,并展示了一些实验结果的照片。书后还附有中英文名词和缩写。

本书可供微生物相关专业的学生及研究人员使用。

图书在版编目 (CIP) 数据

细菌与古菌的多相分类/朱旭芬,方明旭编著. —北京:科学出版社, 2018.2

ISBN 978-7-03-055107-8

I. ①细… II. ①朱… ②方… III. ①微生物学—分子生物学—研究 IV. ①Q93

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 271230 号

责任编辑:王海光 王 好 / 责任校对:郑金红

责任印制:张 伟 / 封面设计:刘新新

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京京华虎彩印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2018 年 2 月第 一 版 开本: B5 (720×1000)

2018 年 2 月第一次印刷 印张: 13

字数: 300 000

定价: 99.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

微生物个体微小，杂居混生，分布很广，但发现较晚，且由于研究手段的限制，加上鉴定工作及划分种的标准等问题复杂，估计已被研究和记载过的种类还不到总数的 1%。因此，新型微生物的开发，包括分离、鉴定及应用的工作是大量且繁重的。

本书系统介绍了目前细菌与古菌分类中常用的多相分类研究，包括其形态特征、生长特征、生理生化特征、基因型特征与化学分类特征。总共包含了 41 个实验，按类归纳为 5 部分，每个实验均系统介绍了其原理、试剂、设备仪器和实验操作过程。此外，作者还依据多年研究工作的心得与体会总结了每个实验的提示与注意事项，并展示了部分实验结果的图片。本书的编写突出了当前微生物学及分子生物学研究领域中采用的新技术与新方法，可对科研人员的研究工作及学生的学习提供有益的帮助。

本书的出版得到了浙江大学生命科学学院教学经费的资助。在本书的编写过程中，我们参考了大量国内外微生物学实验技术方面的书籍和互联网资料，并引用了其中一些图片。贾小明老师提供了许多资料，研究生韩帅波、胡爽依及张冉做了大量的工作，在此一并表示衷心的感谢。

限于我们的学识水平，疏漏错误在所难免，敬请专家和同仁给予指导，热切欢迎读者提出宝贵意见。

朱旭芬

2017 年夏于启真湖畔

目 录

导论	1
参考文献	8
第一章 菌种分离与培养	9
实验 1.1 采样与保存	9
实验 1.2 非培养样品的分析	12
实验 1.3 变性梯度凝胶电泳	16
实验 1.4 目标菌株的富集	24
实验 1.5 目标菌株的分离纯化	27
实验 1.6 目标菌株的筛选	31
实验 1.7 厌氧菌的研究	35
实验 1.8 厌氧培养箱的使用	41
实验 1.9 疑似新种的确定	44
实验 1.10 菌株保藏	48
参考文献	51
第二章 表型分类特征	53
实验 2.1 革兰氏染色	54
实验 2.2 个体细胞特征	57
实验 2.3 群体菌落特征	64
实验 2.4 生长曲线	67
实验 2.5 生长温度	69
实验 2.6 生长 pH	71
实验 2.7 耐受渗透压	74
实验 2.8 抗生素敏感性	76
实验 2.9 无氧呼吸的电子受体	80
实验 2.10 微量多项试验鉴定系统	84
参考文献	91
第三章 基因型分类特征	92
实验 3.1 基因组 DNA 的提取	92

实验 3.2	核酸 DNA 检测	95
实验 3.3	16S rRNA 基因的 TA 克隆	98
实验 3.4	质粒 DNA 的提取	101
实验 3.5	16S rRNA 基因测序及同源性分析	103
实验 3.6	系统发育特征	108
实验 3.7	G+C 含量的测定	113
实验 3.8	核酸 DNA 杂交	118
实验 3.9	亲缘关系分析	123
实验 3.10	芽孢基因的检测	126
实验 3.11	全基因组序列分析	129
参考文献		135
第四章	化学分类特征	138
实验 4.1	肽聚糖分析	139
实验 4.2	呼吸醌分析	146
实验 4.3	脂肪酸分析	151
实验 4.4	极性脂分析	158
实验 4.5	多胺分析	170
参考文献		172
第五章	菌种命名与发表	173
实验 5.1	系统分类与发育树	176
实验 5.2	多相分类研究	185
实验 5.3	菌种的命名	188
实验 5.4	菌种的公共保藏	191
实验 5.5	新菌种的发表	193
参考文献		194
附录	中英文名词和缩写	196

导 论

地球形成至今已有 46 亿年的历史,人们发现的微生物细胞在叠层石和沉积岩石中的化石遗骸为 36 亿~38 亿年。漫长的进化历史使微生物具备了近乎无限的代谢能力,似乎没有什么极端环境是其无法承受的。微生物个体微小,杂居混生,分布很广,自然界中除火山中心区域以外,在生物圈的每一个角落都有其踪迹。万米深的海底、千米以下的地层、几万米的高空,以及动植物的体表、体内,几乎都有微生物的存在。

土壤有“微生物大本营”的称号,是人类最丰富的“菌种资源库”。土壤中的微生物包含细菌、放线菌、真菌、藻类和原生动物等类群。其中细菌最多,占土壤微生物总量的 70%~90%,放线菌、真菌次之,藻类和原生动物等较少。

海洋被誉为“生命的摇篮”,覆盖了地表总面积的 70.8%,贡献了全球生物量的 95%。浩瀚的海洋拥有独特的生态环境,是生物多样性水平最高的生态系统。海洋平均深度为 4 km,含盐 3.2%~4%。其微生物总数估计有 10^{29} 个,所蕴藏的碳源高达 3×10^{17} g,承担了海洋初级生产活动的 98%,地球初级生产活动的 50%。海洋具有高盐、高压、低温、无太阳辐射及寡营养等特点,深海的大部分区域保持在 2~3℃,海水多为碱性 (pH 8.3~8.5)。按每 10 m 水深增加 1 大气压 (0.101 325 MPa) 计算,在 11 000 m 的海洋深处,压力可以达到 100 MPa。据估计,浮游植物光合作用产生的 95% 的有机质在海水表层 100~300 m 循环,仅有 1% 的有机质可以到达深海底部。深海由于海底地质作用,形成了包括海底平原、海山、深海峡谷、热液口、冷渗口 (cold seep) 等复杂多样的特殊生境,蕴含丰富的能量和物质,加之季风洋流等影响,形成了形形色色的海底生态系统,孕育了各式各样的深海微生物群落,有“海底的生命绿洲”之称。

深海热液口 (hydrothermal vent) 是由于海洋板块漂移,海底地壳碰撞或断裂,海水浸入海底裂缝,同时受到地壳深处的地热加热,溶解地壳内的多种金属化合物,成为海底热液后从海底喷口喷发而出形成的柱状物。海底热液一般温度很高,达 300~400℃,pH 低,呈酸性,硫化物、甲烷、 H_2 、 CO_2 浓度大,铁、锰、锌等金属元素含量高,但化学组分随地理位置及周围环境差异很大。在热液喷发地点,炽热而不含 O_2 的热液与冰冷而富含 O_2 的海水混合,导致热液中多种硫酸盐和金属硫化物发生沉淀,从而在喷口处形成以硫酸盐和硫化物为主的烟囱状结构,称为黑烟囱 (black chimney)。当热液中钙和硅含量较高时,便形成以碳酸盐为主

的“白烟囱”。黑烟囱附近的生物量往往是附近深海环境中生物量的数万倍，生活着大量奇形怪状的生物。此外，深度在 1 万 m 的海底温泉中，硫细菌的含量达每毫升 100 万~100 亿个，它们既耐高温（100℃）又耐高压（1140 大气压）。所以，海洋热液口生态系统被认为与生命形成初期的环境特征相类似，对了解生命起源和进化都具有十分重要的意义（图 i）。

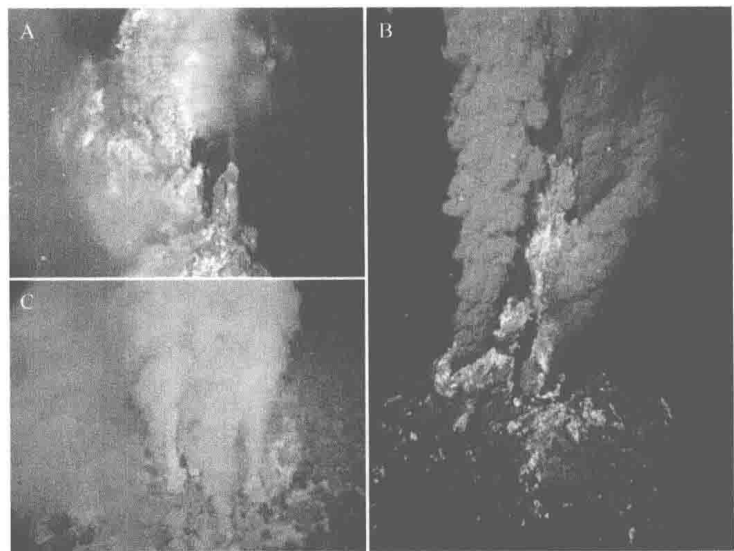


图 i 深海热液区中由硫化物构成的烟囱结构（A）、黑烟囱（B）和白烟囱（C）
(wikipedia, <http://www.wikipedia.org>)

研究发现，人体肠道中栖居着多达上千种不同的微生物，每个人肠道中平均有 160 种微生物物种，其细胞数量超过人体自身细胞的 10 倍，所含的基因数约是人类自身基因组总和的 100 倍。这些肠道菌群（intestinal flora）形成了复杂而动态平衡的微生物区系，对宿主的消化吸收、营养代谢、肥胖、自身发育、免疫及疾病的产生有着极其重要的作用。肠道菌群的稳态可以调节机体免疫、拮抗病原微生物定植，与炎症性、代谢性、过敏性、精神心理性疾病及心血管病、肿瘤的发生发展相关。最新的研究表明，神经退行性疾病帕金森病（Parkinson disease）和自闭症（autism）可能与肠道中的微生物变化有关，即肠道菌群的组成变化，可能促使甚至导致运动机能恶化，成为帕金森病的重要推手；肠道微生物多样性的大幅增加，并且某些细菌，特别是一种革兰氏阴性菌普雷沃菌属（*Prevotella*）数量的大量增加，与以前发现的自闭症儿童患病率很低是相关联的。

此外，自然界还存在着形形色色的极端(extremophile)微生物，如嗜热(thermophile)、嗜冷(psychrophile)、嗜酸(acidophile)、嗜碱(alkaliphile)、嗜压(barophile)、嗜盐(halophile)和抗辐射(radiation-resistant)等类型。嗜盐微生物是指最适生长盐浓度大于 0.2 mol/L 的微生物，有的细菌可在饱和盐水中生长。嗜酸微生物

(acidophilus) 是指生长的最适 pH 在 4 以下, 典型的是酸矿水中的化能自养硫氧化细菌、自发热的煤堆和酸热泉中的嗜热嗜酸细菌; 而极端嗜酸微生物则是那些生长 pH 上限为 3.0、最适生长 pH 为 1.0~2.5 的微生物, 一般分布于金属硫矿床酸性矿水、生物滤沥堆、煤矿床酸性矿水及含硫温泉和土壤中, 如硫杆菌属的细菌可在 pH 为 1~2 的条件下生存。已发现的支持极端微生物生长的最低 pH 为 0, 1996 年发现的广古菌门热原体目 (Thermoplasmatales) 中的嗜苦菌属 (*Picrophilus*) 是迄今发现的最为嗜酸的微生物, 最适生长 pH 为 0.7。嗜热微生物的温度上限高于 50℃。例如, 在大西洋热液口的热泉中发现了一种生活在 113℃ 的古菌; 目前已知的最嗜热的是 121 菌株, 这是一种能够在 121℃ 高温下生长繁殖的嗜铁微生物, 被发现于温度高达 400℃ 的太平洋深海海床火山口。

有分析表明, 微生物占地球生物总量的 60%, 全世界海洋中微生物的总量估计达 280 亿 t。但由于微生物很小, 发现较晚, 现有的实验室无法完全再现其原位环境条件, 大多数微生物难以获得纯培养, 且一部分微生物处于活的不可培养 (viable but nonculturable, VBNC) 状态。海水和沉积物的细菌可培养率分别为 0.01%~0.1% 和 0.25%。再加上鉴定工作及划分种的标准等问题复杂, 1973 年已知微生物约有 10 万种, 1995 年据《国际微生物学会联盟通讯》(*IUMS News*) 的报道, 微生物约 20 万种, 估计不到微生物总数的 1%。最新的研究预测, 自然界微生物总数可达到 $10^{11} \sim 10^{12}$ 种, 截至 2017 年 5 月, 通过标准发表的微生物有 15 626 种。所以, 微生物的研究工作是大量且繁重的, 新种微生物的分离、定位也是任重而道远的。

微生物主要包括原核微生物、真核微生物和病毒, 其中原核微生物又分为细菌和古菌。按照微生物的亲缘关系, 把它们安排成条理清楚的各种分类单元或分类群, 这就是微生物分类学的任务。其包括鉴定、分类与命名。鉴定 (characterization) 是详细描述微生物各项生理生化及遗传、化学指标的工作。分类 (classification) 则是根据鉴定的结果将生物归属为类群或分类单元。命名 (nomenclature) 是给予分类类群单元与公布规则相符的名称。微生物分类学的发展历史可分为兴起、发展与分子生物学 3 个时期。

一、兴起时期

在地球上的各种生命形式中, 微生物发生最早、分布最广、生物量最大、生物多样性也最丰富。真正认识微生物是从显微镜技术出现后开始的, 自从 1676 年列文虎克 (Leeuwenhoek) 在显微镜下发现微生物, 之后就不断有新微生物的描述, 报道的种类也日益增多, 促使人们对所观察到的微生物进行归类、归群, 从而推动了微生物分类学的产生。

第一个分类系统是丹麦动物学家 O. F. Muller 于 1773 年提出的, 包括了原生

动物、藻类、细菌等。他将微生物分为百余种，根据形态分成弧菌属 (*Vibrio*) 和单胞菌属 (*Monas*)。并首次倡导在微生物中使用林奈 (Linnaeus) 的双名法。1838 年，德国生物学家 C. G. Ehrenberg 把微生物归为纤毛虫纲，分为单胞菌科与弧菌科两科，还引入了模式种的概念。1857 年，德国植物学家 K. M. Nageli 在植物学杂志上发文，认为这些微小具有细胞壁的生物，应归为植物界，另立裂殖菌纲 (*Schizomycetes*)。

催生微生物学诞生的除了显微镜技术外，还有培养技术，即通过创造一定的环境条件，把微生物培养成群体的生存状态，从而开展生物学性状的一系列研究。1854 年，科赫 (R. Kock) 等发明了固体培养基，出现了细菌纯培养技术，这对细菌分类学产生了深远影响。1872~1876 年，德国的植物学教授 Cohn 根据系统的形态学特征，把细菌分为 4 个类群 6 个属。①球菌类：细胞球形，小球菌属 (*Micrococcus*)。②微杆菌类：细胞单个短杆状，杆菌属 (*Bacterium*)。③丝状细菌类：细胞长或呈丝状，芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、弧菌属 (*Vibrio*)。④螺旋菌类：细胞螺旋形，螺旋菌属 (*Spirillum*)、螺旋体属 (*Spirochaeta*)。1875 年，Cohn 对细菌分类又做了重大修改，认为细菌与蓝绿藻有关，其主要区别在于细菌缺少叶绿素，把细菌与蓝绿藻归入裂殖植物门。1888 年，荷兰细菌学家 M. W. Beijerinck 发现根瘤菌，最先对分离获得的根瘤菌进行纯培养，1891 年又分离出固氮菌。1887 年，俄国微生物学家 S. Winogradsky 发现了硝化细菌，1889 年发表了对硫细菌的形态与生理的研究。此后，细菌分类开始采用生理特征作为分类指标。

19 世纪最后 10 年出现了两种重要的新分类法。一是 1894 年首次发表并于 1900 年修订的 Migula 分类法；二是 1896 年发表的 Lehmann 和 Neumann 的分类法。Migula 把裂殖菌纲分为两个目。①真细菌目 (Eubacteriales)：细胞无核，无色或淡色，不含硫磺颗粒或菌紫素，无叶绿素。②硫细菌目 (Thiobacteriales)：细胞无核，含有硫磺颗粒或菌紫素。真细菌目再按形态特征分为球菌科、杆菌科和螺菌科 3 个科。Lehmann 和 Neumann 在《细菌学大纲和图谱》中，把染色反应和形成内生芽孢的能力作为分类的表观判别特点。提议把裂殖菌纲分为两个目：裂殖菌目与放线菌目。裂殖菌目包括球菌科 (Coccaceae)、杆菌科 (Bacteriaceae) 与螺菌科 (Spirillaceae)；放线菌目包括原放线菌科 (Proactinomycetaceae) 与放线菌科 (Actinomycetaceae)。原放线菌科包括棒状菌属 (*Corynebacterium*) 与分枝杆菌属 (*Mycobacterium*)。

1901 年，Chester 把化学引入细菌分类的领域。Orla-Jensen 首先应用生化特征作为主要鉴别依据，突破了纯形态的分类局限。1905 年后，不少学者提出了动植物病原菌的分类，除了形态外，还引用了对空气的敏感性、色素和致病性等生理及生态指标。1915 年后，美国微生物学家 R. E. Buchanan 在《细菌学杂志》上发表了“细菌的命名和分类研究”系列论文。依据形态、染色反应、生理生化及病

原性等方面的特征,把细菌分成科、族和属。1916年, Buchanan 在美国细菌学会上提出了“细菌分类纲要”,后经补充,把裂殖菌都归入裂殖菌纲(Schizomycetes),共分为真细菌目(Eubacteriales)、放线菌目(Actinomycetales)、鞘杆菌目(Chlamydobacteriales)、粘细菌目(Myxobacteriales)、硫细菌目(Thiobacteriales)与螺旋体目(Spirochaetales)6目。该纲要又经数次修改补充,成为美国细菌学会出版的《伯杰氏细菌鉴定手册》的基础。

从 Leeuwenhoek 发现细菌到 1773 年 Muller 提出最初的细菌分类系统经历了一个世纪。1773 年后细菌分类学从无到有,至 20 世纪 30 年代末已初具规模。例如,在《伯杰氏细菌鉴定手册》第 8 版中,肠杆菌科共描述了 12 属,其中有 8 属是这一时期建立的。这一时期细菌分类的主要依据是形态特征、生理性状和生态环境。

二、发展时期

20 世纪 40~50 年代是细菌分类学的发展时期,增加了更多的生理学、生物化学、血清学反应及生态学等内容。但由于实验手段的限制,只能是各持己见,出现了美国的伯杰(Bergey)分类系统、苏联的克拉西里尼柯夫(Krassilnikov)分类系统与法国的普雷沃(Prévot)分类系统 3 个系统并存的局面。

1) 美国的伯杰手册是由美国细菌学家协会所属的细菌鉴定和分类委员会直接指导、布瑞德(R. S. Breed)等主编的一本有代表性、参考价值极高、比较全面系统的《伯杰氏细菌鉴定手册》(*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*)。该手册自 1923 年出版第 1 版后,于 1925 年、1930 年、1934 年、1939 年、1948 年、1957 年、1974 年相继出版了第 2~第 8 版,每个版本均反映了当时细菌学发展的新成就,其内容不断扩充和修改,逐渐确立了在国际上对细菌进行全面分类的权威地位。其中第 8 版由美国、英国、德国、法国等 15 个国家的 130 多位细菌学家参加了编写,对系统内的每个属和种都做了较详细的属性描述。

1984 年初,美国 Willams & Wilkins 公司分卷出版了伯杰氏系统另外一种新版本,称为《伯杰氏系统细菌学手册》(*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*),1986 年出版了第 2 卷,1989 年出版了第 3、第 4 卷。2001 年后又出了《伯杰氏系统细菌学手册》第 2 版,到 2012 年出齐了 5 卷。

2) 1949 年,苏联的克拉西里尼柯夫著有《细菌和放线菌的鉴定》,该分类系统是在植物界原生植物门下分为裂殖菌类及裂殖藻类,将所有的细菌及近似于细菌的裂殖菌都归入裂殖菌类,下分为放线菌纲、真细菌纲、粘细菌纲和螺旋菌纲 4 纲。各纲下设目、科、属、种。分类系统以形态作为分类的主要依据,特别强调鞭毛的有无。

3) 1961 年, 法国的普雷沃著有《细菌分类学》, 1977 年著有《细菌学概论》。普雷沃把细菌归入原核生物界, 下分真细菌、分枝细菌、藻细菌和原动物状细菌四大类群, 下设纲、目、科、属、种。

三、分子生物学时期

微生物培养技术的形成奠定了微生物分类、生理、生化、遗传、代谢等发展的基础。20 世纪 60 年代后, 由于科学的发展和各种新技术的广泛应用, 细菌分类学的内容不断增加, 如电子显微镜的发明和超薄切片技术的应用, 在分类的表型特性中增添了细胞超微结构的指征。电子计算机的发展普及, 致使数学方法渗入细菌分类, 使以质的差别为主的分类学增加了量的概念, 并建立了细菌数值分类学。特别是 50 年代初 Watson 和 Crick 提出 DNA 双螺旋结构后, 分子分类成为主要方法, 如蛋白质的氨基酸序列、细胞壁和细胞化学组成分析、DNA 的 (G+C) % 测定、rRNA 基因分析系统发育关系、杂交技术得到广泛应用。从分子水平上分析微生物类群之间的亲缘关系, 展示了一个更为丰富多彩的微生物世界, 发现了大量多样的微生物栖生在不同的环境中或宿主内 (包括人、动物、植物等), 形成微生物群系 (microbiota) 和多种形式的复杂生态体系。研究还发现能在实验室培养的微生物, 仅占自然界总微生物的很小一部分, 而绝大多数是“未培养微生物” (uncultured microorganism), 如处理生活污水的活性污泥中未知的微生物占了 85% 以上。海洋和陆地上 99% 的微生物, 目前还不能培养。对未培养微生物的生物学及生态学的特性与功能的认识, 依赖于宏基因组 (metagenome) 技术的广泛应用, 从而跳出纯培养的限制, 进入微生物菌群的层次, 甚至可将菌群的宏基因组与其生态环境的基因组进行整合并加以研究, 即微生物组。微生物组 (microbiome) 是指一个特定环境或者生态系统中全部微生物及其遗传信息, 包括细胞群体和数量、全部遗传物质, 涵盖了微生物群体及其全部遗传与生理功能, 也包括微生物与其环境和宿主的相互作用。微生物组是保证地球生态系统健康的重要因素之一, 一旦出现结构失衡和功能失调, 系统就会出现病态。例如, 目前面临的疾病流行、生态恶化、气候变化等复杂系统, 背后几乎都有微生物组失调的影响。而微生物组学 (microbiomics) 则是以微生物组为对象, 研究其结构与功能、内部群体间的相互关系和作用机制, 研究其与环境或者宿主的相互关系。

微生物分类学现已有 5 个技术层面。①细胞形态和行为: 显微结构、运动性、酶实验、生理学实验及营养需求。②细胞组分: 细胞壁组分、脂类分析、细胞色素、噬菌体等。③蛋白质: 氨基酸序列, 可溶性蛋白凝胶电泳及血清等。④基因组: (G+C) %、核酸 DNA 杂交、DNA 的随机引物扩增、DNA 测序、质粒及遗传物质的转导等。⑤生物信息学: 需要电子计算机、互联网数据库。

20 世纪 70 年代前，微生物分类利用的是以生理生化等表型特征为主的传统分类法。仅仅依靠某些特征就确定一个物种的分类往往具有一定的局限性，生物 的每个特征都有可能在不同的条件下呈现不同的现象，并且对于结果的观察，人 为因素较多，难以正确认识微生物系统的发育地位。当前，使用的是 1970 年 Colwell 提出的微生物多相分类法(polyphasic taxonomy)，即综合了一系列不同的研究特征， 如表型、生态、生理生化、化学分类、基因型及系统发育等，对未知微生物，特别 是细菌与古菌进行分类和系统进化的研究(表 i)。多相分类所包括的众多研究特征， 有一些占主导地位，如基因型研究，有一些仅仅用于区别种或亚种，甚至只能作为 辅助或是支持其他分类方法的结果，如形态、生理生化特征等。利用多种方法相互 结合及相互印证，可以比较全面合理地确定细菌的分类地位及系统进化的关系。

表 i 细菌与古菌的分类鉴定

技术	内容
培养特性	菌落、形态、颜色、气味
形态观察	细菌染色形态、大小、运动性、形成芽孢否、鞭毛、内含物等
生理特性	生长温度范围、pH 范围、耐盐性、需氧特性等
生化特性	碳源利用、碳水化合物氧化反应与发酵、酶谱等
抑制实验	选择培养基、抗生素抗性、染料等
核酸分析技术	16S rRNA 序列的分析、核酸杂交、(G+C) %的测定
化学分类技术	脂肪酸、极性脂、分枝菌酸、醌类、糖类、多胺分析、全菌蛋白和外膜蛋白电泳分析等

通常可培养微生物的研究思路为：微生物分离→DNA 提取→PCR 法扩增 16S rRNA 基因→16S rRNA 序列测定与分析→系统进化树的构建（图 ii）。

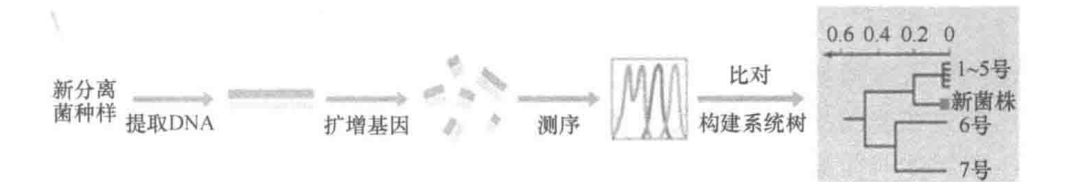


图 ii 可培养微生物的研究

当 16S rRNA 的序列与基因库中其他微生物的同源性小于 97%时（目前提高到 98.8%以上），可初步认定为疑似新种。接着，进行系统进化分析，构建系统发育树。在此基础上，进行表型特征（形态、生态、生理生化等）、化学特征（肽聚糖、脂肪酸、极性脂、呼吸醌等）、基因型特征 [(G+C) %] 等研究。如果 16S rRNA 基因的相似度大于 97%，还需要进行核酸杂交来进行进一步的判断。当 DNA 杂交值小于 70%，可确认为是不同的种。微生物多相分类包括了现代分类中所有的方面，被认为是目前研究各级分类单位最有效的手段。

参 考 文 献

- 杨苏声. 1997. 细菌分类学. 北京: 中国农业大学出版社: 1-145.
- Bourzac C. 2014. The bacterial tightrope. *Nature*, 516: S14-S16.
- Eisentein M. 2016. Bacterial broadband. *Nature*, 533: S104-S106.
- Kashefi K, Lovley DR. 2003. Extending the upper temperature limit for life. *Science*, 301: 934.
- Kennedy J, Flemer B, Jackson SA, et al. 2010. Marine metagenomics: new tools for the study and exploitation of marine microbial metabolism. *Mar Drugs*, 8: 608-628.
- Loceya KJ, Lennon JT. 2016. Scaling laws predict global microbial diversity. *PNAS*, 113(21): 5970-5975.
- Stackbrandt E, Ebers J. 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today*, 33: 152-155.
- Steward EJ. 2012. Growing uncultureable bacteria. *J Bacteriol*, 194: 4151-4160.
- Takai K, Nakamura K, Toki T, et al. 2008. Cell proliferation at 122°C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high pressure cultivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(31): 10949-10954.
- Ulrich NP, Gmajner D, Raspor P. 2009. Structural and physicochemical properties of polar lipids from thermophilic archaea. *Appl Microbiol Biotechnol*, 84(2): 249-260.
- Volckaert FA, Barbier M, Canário AV, et al. 2008. Empowering marine science through genomics. *Marine Genomics*, 1: 33-35.
- Whitaker RJ, Grogan DW, Taylor JW. 2003. Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science*, 301(5635): 976-978.
- Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 6578-6583.

第一章 菌种分离与培养

自然界微生物的样品极其丰富，据估计目前已知的微生物还不到其总量的 10%，而未知微生物或许是环境微生物的主体，也是地球上最大的尚未开发的新资源。

地球上微生物生存的环境类型多样，特别是各种极端环境，有众多复杂的因素，且天然生境中微生物种群间关系复杂，如共生(symbiosis)、拮抗(antagonism)、寄生(parasitism)、竞争共栖(competition)、协同共栖(synergism)、互利共栖(mutualism)、偏利共栖(commensalism)、互生(metabiosis)等。不同微生物群落之间还存在着群体感应(quorum sensing)，通过信息交流来判断群体密度大小和生长环境中出现的变化。

要获取新的微生物资源，寻找合适的取样地点，获取样品是非常重要的一个环节。另外，采集样品后，利用富集培养将自然环境下的劣势菌培养成为优势菌，并设计合适的分离培养基，以及采用快速有效的筛选方法也是至关重要的。由于各种微生物对碳源、氮源的需求不同，有的还有特殊的要求，事先了解目标微生物的营养要素及培养条件，设计一种合理的富集培养基及分离培养基，会有事半功倍的效果。

实验 1.1 采样与保存

一、实验原理

采集微生物样品应根据其营养需求、代谢类型、生理特性等确定采样地点。要获得新种微生物，就需要到没人去的地方或很少有人采集样品的地方采样，如海洋的水体与沉积物、盐山、盐湖、盐碱地、火山、温泉与极端的环境等地，各种污水、废水处理厂、活性污泥及垃圾处理场等地，这些地方什么样的物质都有，降解相关物质的微生物就有可能存在。如果是要处理某种污水，就可以在这种污水周围采集样品，进行研究。

所以，采集微生物样品应参考前人的实践经验，根据所要分离微生物的分布特点，有针对性地确定取样的地点，如土壤、污泥、海洋、空气等，收集那些最有可能存在目标微生物的样品。

(一) 土壤中采样

土壤具备微生物所需的营养、空气和水分，是微生物聚集地，且空气、水中

的微生物也来源于土壤。通常，土壤中含细菌数量最多，每克土壤的含菌量大约有如下的递减规律：细菌（ 10^8 ）>放线菌（ 10^7 ）>霉菌（ 10^6 ）>酵母菌（ 10^5 ）>藻类（ 10^4 ）>原生动物（ 10^3 ），其中放线菌和霉菌指其孢子数。从土层的纵剖面看，5 cm 的表层土由于阳光照射，蒸发量大，水分少，且有紫外线的杀菌作用，因而微生物数量比 5~25 cm 土层少；25 cm 以下土层则因土质紧密，空气量不足，养分与水分缺乏，含菌量也逐步减少。

（二）水中采样

水体微生物是第二大微生物资源，地球表面有 70.8% 为海洋，储存了地球上 97% 的水，其余 2% 储存于冰川与两极，0.009% 储存于湖泊中，0.000 09% 储存于河流中，还有少量储存于地下水中。海洋是一个特殊的局部环境，尽管许多微生物也是经河水、污水、雨水或尘埃等途径而来，但由于深海独特的高盐、高压、低温与无太阳辐射等条件，海洋微生物具备特殊的生理活性，相应也产生了一些不同于陆地来源微生物的特殊产物。

从海洋中采样，可参考其中不同种类微生物的分布规律：海洋海面 0~10 m 微生物较少，主要为光合藻类，如绿藻、硅藻等；而 10~50 m 微生物较多，一般为兼性厌氧菌；50 m 以下微生物的数量随海洋深度增加而减少。在海底沉积有丰富的有机质，微生物数量增加，但溶解氧缺乏，硫化氢含量高，兼性厌氧菌、厌氧异养菌和硫酸盐还原菌较多，海底表层与底层之间则多为紫色硫细菌。

二、实验器具

小铲子、塑料袋、采样瓶、水采集器、滤膜（如 0.22 μm 或 0.45 μm ）、pH 计、冰箱等。

三、实验操作

（一）土样

1) 确定采样的地点，了解该土样的酸碱度、有机质含量及周围的生态环境。

2) 采样的方式：用无菌的小铲子，将表层 5 cm 左右的浮土除去，取 5~25 cm 处的土样 10~25 g，装入事先准备好的塑料袋内扎好。北方土壤干燥，可在 10~30 cm 处取样。

3) 标明每个土样所取的地点、周围环境的情况。给塑料袋编号并记录地点、土壤质地、植被名称、时间及其他环境条件。

4) 采集的样品一般要求立即进行研究，或置于 4℃ 冰箱中保存。

(二) 水样

1) 确定采样的位置及周围的环境条件。

2) 先将带有塞子的灭菌空瓶浸入水中距水面 10~15 cm 的深度, 打开盖子, 水样即流入瓶中, 装满后, 将塞子塞好, 再从水中取出; 或采用海洋水采集器(图 1-1)采集样品。

3) 水样取出后最好立即进行分离与检测或放入冰箱 4℃ 保存备用。

4) 测定水样的盐度、pH, 作为培养基配制的参考条件。

5) 将适量的水样通过一定孔径的滤膜(如 0.22 μm 或 0.45 μm)过滤器过滤, 然后将截留有细菌的滤膜进行富集培养。

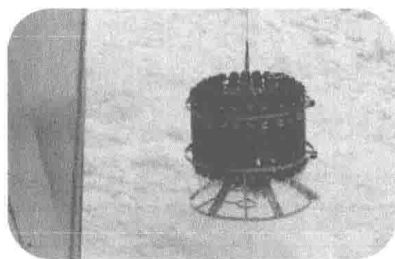


图 1-1 海洋水采集器

(三) 生物体上的样品

对于生物体上的微生物样品的采集, 通常要求取下一定量的组织, 用无菌溶液把其中的微生物洗涤下来。所采样品应尽快进行实验研究, 或置于冰箱中保存。

四、实验提示与注意事项

1) 水中的微生物含量较少, 需经滤膜进行富集。但滤膜法不适用于悬浮物含量高的水样。且水体样品采集用的容器或过滤用滤纸、滤膜等过滤器应是无菌的。

2) 深水微生物的取样, 使用一种泥芯提取装置进行深度采样, 然后剥去样品表面污染层。为使微生物细胞从样品中释放游离出来, 要对样品进行浸泡或振摇处理。

3) 样品取回后应立即分离, 但有时样品较多, 或到外地取样, 路途遥远, 则可事先用选择性培养基做好试管斜面, 随身带走。每到一处将取好的土样混匀, 取 3~4 粒土粒撒到试管斜面上, 可避免菌株因不能及时分离而死亡。

五、思考题

1) 土样的采集过程中应注意什么?