

诺卡氏菌型放线菌的分类

张建丽 刘志恒

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

TAXONOMY OF THE NOCARDIOFORM ACTINOMYCETES

Zhang Jianli Liu Zhiheng

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

关键词: 诺卡氏菌型放线菌, 分类, 系统进化

中图分类号: Q939.13 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2001)04-0513-05

诺卡氏菌型放线菌在分类学上属于细菌域, 厚壁菌门, 放线细菌纲, 放线菌目中的一类形态相似的微生物。在自然界中分布广泛, 但由于分离、分类方法所限, 绝大多数(85%以上)还没有被人们所认识。诺卡氏菌型放线菌是一类重要的自然资源, 某些种能产生抗生素, 如利福霉素等; 有些种产生可供利用的重要的代谢产物, 如 2,3-二羟基-苯甲酸、环己乙酸、羟基苯酮丁酸、L-组氨酸、16 α -羟基甾体等; 某些种产生重要的酶类, 如胆固醇氧化酶、葡萄糖异构酶、溶菌酶等; 有些种可用于废水(物)的生物处理。另一方面, 也有些种引起人和动物的诺卡氏菌病和足菌病。

对诺卡氏菌型放线菌分类的研究不仅为其资源的开发利用和有效控制有害放线菌提供理论指导; 而且为研究放线菌的系统进化关系提供材料和依据, 丰富生物多样性研究的内容。随着科学技术的发展, 诺卡氏菌型放线菌的分类已由最初的以形态描述、生理生化特征为主发展到现在的多相分类。

1 诺卡氏菌型放线菌的经典分类

1967 年, Prauser 第一次提出了“诺卡氏菌型放线菌(Nocardioform Actinomycetes)”的概念, 以概括那些形态上具有初生菌丝体, 并多少呈规律性断裂成球状或杆状小体的一类 G⁺ 放线菌。其中诺卡氏菌属是较为重要且最早发现的一个属。

诺卡氏菌属(*Nocardia*)的概念是 1889 年由 Trevisan 首次提出, 共有 5 个种, Harz 发现的牛型放线菌(*Actinomyces bovis*)也包括在内。16 年后, Wright 建议把厌氧致病性放线菌从诺卡氏菌属中划出, 建立放线菌属(*Actinomyces*), 而保留好气性放线菌作为诺卡氏菌属的成员。他还提出“诺卡氏菌病(Nocardiosis)”的术语^[1]。1923 年, Oerskov 根据菌丝体断裂与否, 以及孢子的形成方式把放线菌分为三个类群, 诺卡氏菌属包括在 II a、II b 两群里。Gordon 和 Mihm 应用孢子形成和菌落边缘等形态学指标区分链霉菌(*Streptomyces*)、诺卡氏菌和分枝杆菌(*Mycobacterium*), 他们把诺卡氏菌作为菌落有丝状边缘的形态群^[2]。另外, Schenidan 和 Shaffer(1957)、Bradley(1959)、McClung(1961)等也都从形态学、培养特性等方面对诺卡氏菌进行过分类地位的探讨。1961 年 Waksman 的著名专著《放线菌的属和种分类鉴定和描述》^[3]的出版, 标志着放线菌分类学这一独立学科的形成, 这个时期的诺卡氏菌型放线菌分类称为经典分类, 主要的依据是

作者简介: 张建丽(1964-), 女, 山东平度市人, 副教授, 现为中国科学院微生物研究所博士生, 主要从事放线菌系统分类学研究。

收稿日期: 2000-07-03, 修回日期: 2000-09-04

形态、培养特征和生理生化特性。

2 化学分类研究和多相分类概念的提出

在分类研究的实践中,一些学者逐渐意识到,单纯依靠形态观察和生理试验不能解决分类过程中遇到的诸多问题,从 60 年代开始,Lechevalier 等学者进行了放线菌化学分类的研究,提出以化学与形态特征相结合划分属的观点,并于 1971 年发表了主要依据细胞化学指征的分类系统,将放线菌分为 9 个胞壁类型和 4 个糖型^[4]。从而打破了传统分类观念,奠定了化学分类学的基础。

与此同时,Colwell 提出了一个新的细菌分类学术语“多相分类(Polyphasic taxonomy)”,指综合利用微生物多种不同信息,包括表型和基因型的信息进行分类的方法^[5]。之后,诺卡氏菌型放线菌分类也开始采用多相分类的方法,在当时的技术条件下,实际上就是在原来分类的基础上,更多的融入了化学分类的内容。从 70 年代开始,化学分类被各国放线菌分类学者所接受,逐步建立起一整套细胞化学分析方法,如细胞壁化学组分、磷酸类脂、醌、枝菌酸、脂肪酸分析等。70 年代末至 80 年代初全细胞蛋白质图谱分析、核糖体蛋白双向凝胶电泳分析和其它特定蛋白的氨基酸序列分析等也开始应用于诺卡氏菌型放线菌的分类研究。1973 年,Cross 和 Goodfellow 提出建立诺卡氏菌科(*Nocardiaceae*),包括那些好气的、基丝经常断裂成杆状或球状小体的放线菌。孢子可能在基丝上形成,也可能在气丝上形成孢子短链。含有枝菌酸,细胞壁 IV 型,糖型 A。他们在这个科里共列出了小多孢菌属(*Micropolyspora*)、诺卡氏菌属和分枝杆菌属^[6]。科的鉴定是以形态特征为主,同时参考细胞化学的内容。红球菌属(*Rhodococcus*)是由 Tsukamura 和 Goodfellow 等建立^[7],在此之前,这类菌被归到分枝杆菌属或诺卡氏菌属中。

化学分类方法的应用深刻地影响着诺卡氏菌型放线菌分类的进展。诺卡氏菌型放线菌形态结构简单,但其化学特性各有不同,与形态特征和生理生化特性相比,化学指标更为重要。例如,诺卡氏菌属主要依据细胞壁和类脂组分等化学分类学信息进行定义,这种定属原则一直沿用至今。

枝菌酸是诺卡氏菌属及相关放线菌最具特征性的胞壁成分之一,根据分子中所含碳原子数的多少可将枝菌酸分为四类:分枝杆菌枝菌酸,约含 80 个碳原子;诺卡氏枝菌酸,约含 60 个碳原子;红球菌枝菌酸,约含 40 个碳原子;棒杆菌枝菌酸,约含 30 个碳原子。

甲基萘醌是放线菌原生质膜的组分,醌作为属划分指标的基础在于其异戊烯侧链长度和氢饱和度的差异。Howarth 等用质谱分析诺卡氏菌属的甲基萘醌时发现,真正属于诺卡氏菌属的成员,其主要的醌型并非以往认为的 MK-8(H4),而是一种新的甲基萘醌,它含 8 个异戊烯单位,且末端 2 个单位成环,分子中有 3 个饱和单位,检测这种特殊的甲基萘醌类型,有助于把诺卡氏菌属与系统发育上相关的乳酪杆菌属(*Caseobacter*)、分枝杆菌属、棒杆菌属(*Corynebacterium*)、红球菌属区别开来。通过上述研究他们认为侧链中是否带有部分成环的结构也具有重要的分类学意义,它可作为系统发育的指征^[8]。

3 分子分类和系统进化研究

80 年代 Stackebrandt 和 Woese 根据 16S rRNA 相似性、DNA-rRNA 和 DNA-DNA 杂交的结果,构建了放线菌和其它生物之间的系统发育树^[9],这标志着放线菌分类学分子分类时期的开始。分子分类和系统发育信息丰富了多相分类的内容,共同推动诺卡氏菌型放线菌分类向着自然分类系统靠近。应用于分类的分子主要为 DNA 和 RNA。常用的分子指征包括 DNA G+C mol%、DNA-DNA 杂交、DNA-RNA 杂交、核酸序列分析和 rRNA 转录间隔区序列(ITSs)分析等。

DNA-DNA 杂交适用于种水平的分类学研究,是分析 DNA 同源性的有效手段,而 DNA 同源性分析是确定正确的分类地位,建立自然分类系统的最直接的方法。近年来,随着分子生物学的发展又出现了一些直接以 DNA 为基础的分型方法,如核酸分型(Ribotyping)、限制性酶切片段长度多形性(RFLP)分析、扩增性 rDNA 限制性酶切片段分析(ARDRA)、随机扩增的多形性 DNA(RAPD)分析及低频限制性酶切片段分析(LFRFA)等^[10,11],这些方法简便易行,分辨率高,在诺卡氏菌型放线菌系统分类学研究中起着越来越

越重要的作用。Maldonado 认为用基于荧光标记的改良扩增片段长度多形性(AFLP)分析能有效地澄清诺卡氏菌属内各种间的分类关系^[12]。许多研究已经证明星状诺卡氏菌(*N. asteroides*)是一个异质的种,采用核酸分型或 RFLP 分析可区别该种的不同菌株。

一般认为 rRNA 是研究系统进化关系的最好材料,16S rRNA 序列分析的方法主要有两种:一种是 16S rRNA 提纯后用反转录酶和保守引物进行测序;另一种是扩增 16S rRNA 基因,用 PCR 产物直接测序^[13]。得到的序列与 RDP(Ribosomal Database Project)比较,根据返回结果,从 RDP 或 GenBank 调相似性较高的序列构建系统发育树。假诺卡氏菌科就是在 16S rRNA 序列分析基础上建立的^[14]。构建发育树的方法有四种:邻接法(Neighbour \ Joining method)、最小平方法(Least squares)、极大似然法(Maximum-likelihood)和简约法(Maximum-parsimony),其中邻接法是最常用的方法。

Goodfellow 等较早采用分子分类方法研究诺卡氏菌型放线菌,依据 16S rRNA 部分寡核苷酸序列分析和化学指标,把放线菌分为 8 个群,其中诺卡氏菌型放线菌包括 2 个科,一是棒杆菌科(*Corynebacteriaceae*),只有棒杆菌属(*Corynebacterium*);另一科是分枝杆菌科(*Mycobacteriaceae*),包括分枝杆菌属、诺卡氏菌属和红球菌属^[15]。

1989 年出版的《伯杰氏系统细菌学手册》^[16]除更多地使用了化学指标外,也承认 16S rRNA 部分序列分析的重要性,以菌丝体断裂与否及孢子着生方式将放线菌目分成 8 个群,编入第 4 卷,且取消了科这一分类等级。将诺卡氏菌型放线菌的 11 个属刊登在第 4 卷第 26 部中。某些属内种的数量与第八版相比有很大变化,如诺卡氏菌属八版中记载了 31 个种,而在第 4 卷中只剩下 9 个种,这说明,以前的属内种的分类方法与定种指标存在问题。

分子分类和系统进化研究在多相分类中占有越来越重要的地位,尤其表现在用于确定那些用惯常方法难以搞清的微生物间的相互关系。目前,对诺卡氏菌型放线菌的分类着重于含枝菌酸的类群(枝菌酸菌, Mycolic acid-containing actinomycetes),基于 16S rRNA 全序列分析,用邻接法构建的系统发育树表明了枝菌酸菌分类单元之间的相互关系(图 1)^[17],并把它归为 8 个属:棒杆菌属、迪茨氏菌属(*Dietzia*)、冢村氏菌属(*Tsukamurella*)、分枝杆菌属、斯科氏菌属(*Shermania*)、戈登氏菌属(*Gordona*)、红球菌属和诺卡氏菌属,运用多相分类的方法可把它们区别开。在棒杆菌的进化分枝中有 2 个种缺少枝菌酸,它们是无枝菌酸棒杆菌(*C. amycolatum*)和耳炎苏黎士菌(*Turicella otitidis*)。1999 年, Kampfer 从幼儿园室内环境中分离到 1 种新的枝菌酸菌,由此建立了新属,称为威廉姆氏菌属(*Williamia*)^[17]。

1997 年,Stackerbrandt 根据 16S rRNA/rDNA 序列分析结果建立了放线细菌纲(*Actinobacteria*),并在纲和属之间提出了一个新的放线菌分类系统,但并不改变目前种和属的描述^[18]。他将放线细菌纲分为 5 个亚纲,诺卡氏菌型放线菌隶属放线细菌亚纲中的放线菌目,棒杆菌亚目,胞壁 IV 型,含枝菌酸,共有 6 个科:棒杆菌科、迪茨氏菌科(*Dietziaceae*)、戈登氏菌科(*Gordoniaceae*)、分枝杆菌科、诺卡氏菌科和冢村氏菌科(*Tsukamurellaceae*)。红球菌属和诺卡氏菌属亲缘关系最密切,所以把红球菌属放在诺卡氏菌科里。即将出版的《伯杰氏系统细菌学手册》第 2 版采纳了这一分类系统,把它编入第 4 卷,这足以说明,在多相分类的众多方法中,分子生物学方法,尤其是 16S rRNA/rDNA 序列分析的作用日益突出,已成为建立新分类单位必不可少的资料。

但 16S rRNA 只是反映细菌 DNA 信息中的一小部分,且保守性很强,有时难以区分亲缘关系较近的种和相关属。在这种情况下就必须运用其它多种分类手段。Nam 等在 1999 年从活性污泥泡沫中分离的几株冢村氏菌有极其相似的 16S rRNA 序列,Rep-PCR 基因指纹图谱分析提供了一种有效的手段,可把这些分离株分成几个密切相关的类群,且易于与对照模式种区别开^[19]。

近年来,随着现代分类方法,尤其是化学分类、数值分类和分子分类的应用,才得以更为准确地描述已有的和新的分类单位,修正过去那些不正确的分类单元。例如,对沟诺卡氏菌(*N. amarae*)重新分类后,转入戈登氏菌属,称为沟戈登氏菌(*G. amarae*);爱知红球菌(*R. aichiensis*)被转成爱知戈登氏菌(*G. aichiensis*);热黄诺卡氏菌(*N. thermoflava*)转为热黄拟无枝菌酸菌(*Amycolatopsis thermoflava*)等等。运用多

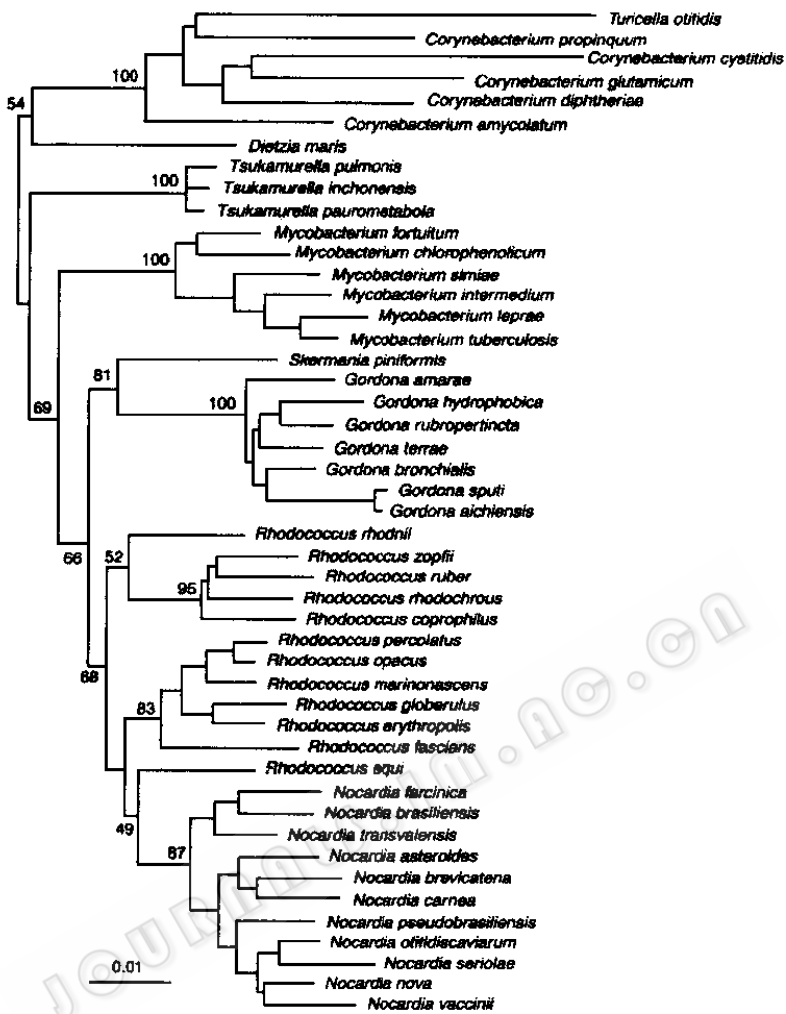


图 1 枝酸菌的系统发育树(图中数字表示基于 1000 次重复的 bootstrap 值)

相分类方法使诺卡氏菌型放线菌各个属以下的分类有了显著的改进,修正后的诺卡氏菌属成为一个均一的分类单元,属内至少可归为 3 个 rRNA 亚群,集中于最早描述的种,即星状诺卡氏菌(*N. asteroides*)、巴西诺卡氏菌(*N. brasiliensis*)和豚鼠耳炎诺卡氏菌(*N. otitidiscaviarum*)。

4 总结与展望

诺卡氏菌型放线菌分类体系在经历了曲折的发展历程后,人们的认识已经从表观现象到基因本质逐步深入,多相分类成为研究各级分类单位的最有效手段。对新的分离菌株,一种方法是不可靠的,需要表型分类(形态和生理生化)数值分类、化学分类和分子分类等几种信息的综合,最直接的方法就是先把它放在进化的框架中,再用多相分类的方法确定精确的位置,使用的信息越多,结果越可靠,人为因素的影响越小。Mheen 等对分类的计算机程序进行了改进,建立了 BIOSYS 程序^[20]。将化学分类、分子分类和数值表型分类等数据输入计算机,用标准方法分析,估计相似性,提供聚类分析结果,最后构建出系统发育树。BIOSYS 程序也可用于比较不同分类方法所得出的分类结果。

我国开展诺卡氏菌型放线菌分类学研究始于 70 年代中期,著名放线菌分类学家阎逊初院士等人创

立的中科院微生物所放线菌分类学研究室最早从事此项研究,先后从我国土壤中分离和描述诺卡氏菌属新种或新变种 8 个,主要从事形态学、生理生化特性、化学分类、数值分类等方面对其进行了深入细致的分类学研究,其研究论文均在《微生物学报》上发表。然而由于受当时研究技术条件的限制,研究结果没有及时在国际刊物上有效发表,其中一些分类单位被国外学者进行了分子再分类研究,并已有效发表,从而失去了优先发表权。

为了使我国的诺卡氏菌型放线菌分类学研究与国际同步发展,90 年代,我们实验室进一步加强了国际间合作,相继与波兰免疫化疗所 M. Mordarski 教授分子微生物学实验室、英国 Newcastle 大学微生物学系 M Goodfellow 教授、比利时根特大学 K. Kersters 教授实验室等进行了合作研究,近年来,我们使用多相分类方法重新对我国一些无效发表的新的分类单位进行再分类,并做到有效发表。当前,国内外许多分类学家面临的问题是如何建立一个规范的多相分类体系,快捷、准确地确定研究对象的分类地位,随着这一体系的不断完善,诺卡氏菌型放线菌的系统分类研究将有更大的发展。

参 考 文 献

- [1] Goodfellow M. *Nocardia* and related genera. In: Balows A & Duerden B I ed. *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 9th ed. Vol. 2. Systematic Bacteriology. London: Arnold, 1997. 463 ~ 489.
- [2] Gordon R E, Mihm J M. *J Bacteriol*, 1958, 75(2): 239 ~ 240.
- [3] Waksman S A. *The Actinomycetes. Classification, Identification and Descriptions of Genera and Species*. Vol. 2, Baltimore: The Williams and Wilkins Co., 1961, 1 ~ 363.
- [4] Lechevalier H A, Lechevalier M P. *Adv Appl Microbiol*, 1971, 14: 47 ~ 72.
- [5] Colwell R R. Polyphasic Taxonomy of Bacteria. Symposium on Taxonomic Studies of Microorganisms by Instrumental Analysis of their Components and Metabolites, International Conference on Culture Collections. Tokyo, Japan. ICRO/UNESCO, Baltimore: University Park Press, 1968.
- [6] Cross T, Goodfellow M. Taxonomy and classification of the actinomycetes. In: Sykes and Skinner ed. *Actinomycetales: characteristics and Practical Importance*. London: Academic Press, 1973. 11 ~ 112.
- [7] Tsukamura M. *Jpn J Microbiol*, 1974, 18: 37 ~ 44.
- [8] Howarth O W, Grund E, Kroppenstedt R M, et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986, 140(3): 916 ~ 923.
- [9] Stackebrandt E, Woese C R. *Current Microbiology*, 1981, 5: 197 ~ 202.
- [10] Wilson R W, Steingrube V A, Brown B A. *J Clin Microbiol*, 1998, 36: 148 ~ 152.
- [11] Steingrube V A, Wilson R W, Brown B A, et al. *J Clin Microbiol*, 1997, 35: 817 ~ 822.
- [12] Maldonado L, Ward A C, Goodfellow M. Genotypic Characterisation of Representatives of the Genus *Nocardia*. In: 11th International Symposium on the Biology of Actinomycetes. October 24 ~ 28, 1999, Crete, Greece, 161.
- [13] Dorsch M, Stackebrandt E. *J Microbiol Method*, 1992, 16: 271 ~ 279.
- [14] Embley T M, Smida J, Stackebrandt E. *Syst Appl Microbiol*, 1988, 11: 44 ~ 52.
- [15] Goodfellow M, Cross T. Classification. In: Goodfellow M, Mordarski M and Williams S T ed. *The Biology of the Actinomycetes*. London: Academic Press, 1984b, 7 ~ 164.
- [16] Lechevalier H A. Nocardioform Actinomycetes. In: Williams S T, Sharpe M E and Holt J C ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 4. Baltimore: The Williams and Wilkins Co., 1989, 2348 ~ 2404.
- [17] Kampfer P, Andersson M A, Rainey F A, et al. *Int J Syst Bacteriol*, 1999, 49: 681 ~ 687.
- [18] Stackebrandt E, Rainey F A, Ward-rainey N L. *Int J Syst Bacteriol*, 1997, 47(2): 479 ~ 491.
- [19] Nam S W, Kim W Y, Park Y H, et al. Genotypic Characterisation of *Tsukamurella* Strains Associated with Foaming in an Activated Sludge Plant. In: 11th International Symposium on the Biology of Actinomycetes. October 24 ~ 28, 1999, Crete, Greece, 162.
- [20] Mheen H S, Ward A C, Park Y H, et al. Improved Software for Polyphasic Taxonomy. In: 11th International Symposium on the Biology of Actinomycetes. May 27 ~ 30, 1997, Beijing, China, 7P31.