

江苏地区农民肺病病原菌——高温放线菌的分离和鉴定

卢运玉

沈贻谔

(中国科学院微生物研究所,北京)

(上海第一医学院,上海)

1963年 Pepys^[1,2] 发表了由放线菌引起的农民肺病的病原菌主要是干草小多孢菌 (*Micropolyspora faeni*)。1968年 Cross 详细报道了引起人和动物的“农民肺”病的致病菌为最常见的普通高温放线菌 (*Thermoactinomyces vulgaris*)^[3,4]。此后对这类菌又不断有所报道^[5-7], 对各个种在微生物生理变化, 孢子结构, 孢子特性, 免疫学以及遗传学等方面进行了较为详细的研究。目前报道的高温放线菌属共有四个种即: 普通高温放线菌 (*Thermoactinomyces vulgaris*)^[13]、纯白高温放线菌 (*Thermoactinomyces candidus*)^[14]、甘蔗高温放线菌 (*Thermoactinomyces sacchari*)^[10]、中间型高温放线菌 (*Thermoactinomyces intermedius*)^[11], 特别对与农民肺病有关的普通高温放线菌及纯白高温放线菌进行了较为详细的研究。

农民肺病是吸入植物性粉尘引起的外源性变应性肺炎, 在我国研究较少。但在我国南方广大农村, 农作物的秸秆堆积霉变情况严重, 干草、粉尘的污染引起农民患有咳嗽、畏寒、气喘、胸闷、发烧等类似上呼吸道感染疾病的症状, 严重影响农民健康。本文主要报道对引起农民肺病的病原菌进行分类、鉴定结果, 为进一步防治、治疗农民肺病提供依据。

我们于1980—1981年从江苏省大丰县发病地区的干草及病人痰三次采样, 并分离出80株嗜热放线菌。经过系统鉴定, 证明引起病害的主要菌株是普通高温放线菌 (*Thermoactinomyces vulgaris*), 另有少数菌株属于嗜热链霉菌 (*Thermophilic Streptomyces*)、高温小单孢菌 (*Thermomonospora*)、嗜热诺卡氏菌 (*Thermophilic Nocardia*)。本文只对高温放线菌进行报道。

材料和方法

(一) 菌株的分离与培养

1. 样品来源: 采集自江苏省大丰县不同农场

和公社, 其中第一批为稻草、稻穗壳, 黄豆秸共9份, 痰样7份; 第二批为干草, 积灰、积尘, 粉碎干草、大麦秸共9份; 第三批为蚕豆秸, 杂草、麦秆, 玉米秸, 稻草共19份及病人痰样24份。

2. 培养基:

采用多种有机培养基: 伊姆松 (Emerson) 琼脂、燕麦琼脂、酵母膏葡萄糖琼脂、半营养琼脂、马铃薯浸汁琼脂; 无机培养基: 高氏淀粉琼脂、苹果酸钙琼脂、甘油天门冬素琼脂, 琼脂量为3%, pH 7.2—7.5。

3. 分离、培养温度及时间:

采用样品直接涂布法; 把稻草切成1cm左右小段, 或粉末状样品直接涂布在琼脂平板上, 置52℃温箱培养, 24小时后待菌落长出挑取放线菌菌落并接种于琼脂斜面上, 每日挑菌1次, 连续挑取5次。

(二) 培养特征和生理生化特性试验

采用嗜热放线菌类群分类的研究方法^[12]。

(三) 孢子抗热性试验

参照 Cross^[13] 等人的方法。

(四) 细胞壁组分分析

参照 Becker^[14] 等人的方法。

(五) 血清学试验

用接触枯草粉尘后一个月的病人血清进行平板双向扩散法试验。

(六) 试验对照菌株

菌株150B、101、106系美国威斯康辛医学院 (Medical College of Wisconsin) 提供。

结 果

(一) 分离菌株的分布结果

本文于1984年10月12日收到。

承阎逊初先生指导并审阅本文; 谢家仪同志制做超薄切片; 本所电镜室摄制电镜照片; 菌株分离样品系江苏农民肺病科研协作组采集, 特此一并致谢。

从所采样品中分离到的高温放线菌占嗜热性放线菌分离总数的61.2%，嗜热链霉菌占31.2%，高温小单孢菌占2.5%，嗜热诺卡氏菌占5%。

(二) 高温放线菌菌株鉴定

1. 菌株: 801、806 等 49 株菌。代表菌株 801、806。
2. 形态和培养特征:

气丝白至污白,长菌丝及短分枝,直径 0.5—0.7 μm ,基丝长,分枝,直径 0.5 μm ,孢子着生于气丝及基丝上,孢子单个,孢子柄短,有时似无。在有机培养基上孢子丝丰茂,菌落平坦,粉状,有皱和同心环纹,孢子为抗热性的内生孢子,周围多角,表面光滑,直径 0.6—0.7 μm (图版 1) 培养特征见表 1。

表 1 801 等菌株的培养特征

培养基	气生菌丝体	基内菌丝体	可溶性色素
甘油天门冬素琼脂	生长丰茂,16 小时左右可生孢子,粉状,污白	凋叶绿* ochraceous buff	无
葡萄糖天门冬素琼脂	生长丰茂,污白,粉状	杏黄 warm buff	无
高氏淀粉琼脂	生长弱,微量污白	无色	无
伊姆松琼脂	生长极丰茂,12 小时生孢丰茂,污白,粉状	锌桔黄** zinc orange	日久同基丝
苹果酸钙琼脂	生长中等,3 天后逐渐丰茂,浅灰白	无色	无
贝奈特琼脂	生长丰茂,污白粉状	甘草黄 antimony yellow antique brown	无
燕麦粉琼脂	生长丰茂,污白至微黄	淡奶白色 light ochraceous buff	无
查氏琼脂	生长弱,污白,细粉状	无色	无
半营养琼脂	生长丰茂,污白,粉状	浅黄 pale ochraceous salomon	无
半营养琼脂+2.5%NaCl	生长中等,污白,粉状	褐色、深桔色	无

* <色谱>, 科学出版社,北京,1957。

** Ridgway, R.: Color standards and color nomenclature, 1912.

3. 生理生化特性:

明胶液化力强;牛奶凝固并胨化;淀粉水解阳

表 2 江苏省大丰县农民肺病人血清学试验结果

抗原编号	受试人数	阳性反应人数	阳性率(%)
801	29	4	13.8
805	29	3	10.3
806	29	26	79.3
816	29	10	34.5
832	29	10	34.5
835	29	18	62.1
836	29	3	10.3
852	29	6	20.7
150 B	29	5	17.2
106	29	23	79.3
101	29	20	69.0

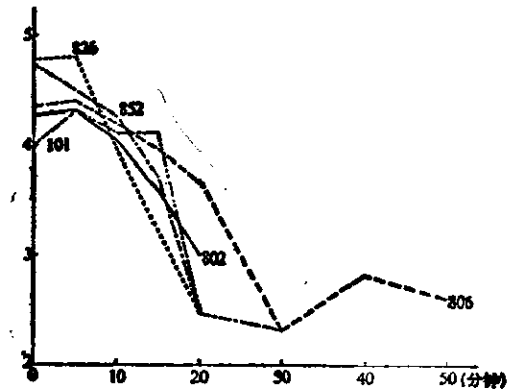


图 1 高温放线菌孢子抗热性 D₁₀₀ 值曲线图 (在 100°C 下)

性;酪氨酸酶阳性;次黄嘌呤分解阳性;七叶树素

表 3 普通高温放线菌橙色亚种与已如菌的比较

项 目	<i>Th. vulgaris</i> subsp. <i>aurantiifacis</i> 801	<i>Th. vulgaris</i> 101	<i>Th. candidus</i> 106	<i>Th. intermedius</i>	<i>Th. sacchari</i>	<i>M. faeni</i>
形态特征	气丝和基丝上都着生孢子。孢子短，有微皱和同心环纹，粉末状，侧影呈多角形，一般直径 0.6—0.7 μ m	气丝和基丝上都着生孢子。孢子短，有时类似无皱和同心环纹，粉末状，有光泽，表面光滑，周围多角，直径 0.5—1.5 μ m (平均 0.75 μ m)	气丝和基丝上都着生单个孢子，直径 0.5—1.5 μ m，有时基丝断裂成节孢子	气丝和基丝上都着生单个孢子，直径 0.7—1.2 μ m，菌落平坦，有同心环纹	气丝和基丝上都着生单个孢子，孢子少，孢子柄达 3 μ m，孢子表面光滑	气丝直径 1 μ m，侧生短孢子链约 5 个孢子，顶端孢子链长，约 5—10 个孢子。孢子链总为直形或弯曲形。孢子表面光滑，长 0.1—1.3 μ m，厚圆至卵圆，不规则，基丝上有单个孢子及短孢子链
培养特征	在各种有机培养基上生长丰茂，气丝白、棕、杏黄、砖红、深桔色，在 52 $^{\circ}$ C 的肉汁培养基上产鲜艳的桔红色	在有机培养基上生长丰茂，气丝白及纯黄，菌落浅黄、浅橙黄	在各种培养基上生长较弱，孢子较少，成稀疏状。气丝白及污白色，基丝淡黄，在血琼脂上有溶血作用	在有机培养基上生长丰茂，气丝白、污白，基丝微黄	在各种培养基上气丝白色，有时自溶，菌落黄褐	在各种培养基上无气丝或微白，基丝橙黄或浅橙褐，无可溶性色素
酪素水解	+	+	+	+	+	
酪氨酸水解	+	+	-	+	-	
七叶树素水解	-	-	+	-	-	
次黄嘌呤水解	+	+	-	-	-	
硝酸盐还原	+	-	-	-	-	
在含 2.5%NaCl 培养基上产生色素	III	III	III	III	III	IV
细胞壁组分	+	+	-	-	+	-
淀粉水解	+	+	-	-	+	-
内生孢子	+	+	+	+	+	-

水解阴性;酪素水解阳性;在柠檬酸铁琼脂上不产生 H_2S ; 在纤维素上不生长;硝酸盐还原阴性;在半营养 + 2.5% NaCl 琼脂上产褐色素;能利用葡萄糖、甘露醇;不利用阿拉伯糖、木糖、果糖、鼠李糖、蔗糖、棉子糖、肌醇。

4. 生长温度:

28℃ 不生长, 37—60℃ 生长好, 65—75℃ 生长弱, 80℃ 不生长, 最适温度 52℃。

5. 孢子抗热性:

以 802、806、852、826、101 等菌株进行孢子抗热性试验, 从图 1 曲线中看出 806 菌株抗热性最强, D_{100} 值达 50 分钟; 101、802、826 菌株抗热性较前者弱, D_{100} 值为 20 分钟, 从曲线中还可以得到热处理 5 分钟后, 可以促进孢子萌发。

6. 细胞壁组分:

细胞壁含内消旋二氨基庚二酸, 无特征性糖, 化学组分属于细胞壁 III 型。

7. 血清学试验:

以江苏省大丰县农民肺病人(接触枯草粉尘后一个月)抽取的血清, 以 801、806 等普通高温放线菌为抗原, 用平板双向扩散法进行血清学试验, 结果所试菌株以 806 阳性率为最高(835、836 菌株为假诺卡氏菌), 其结果如表 2。

8. 菌种鉴定:

通过形态、培养特征、孢子结构及抗热性、细胞壁组分分析以及与所述的高温放线菌相比较的结果表明, 从江苏地区所分离到的高温放线菌可以列入高温放线菌属。其生理生化特性基本上与普通高温放线菌相同, 唯有硝酸盐反应阴性。从菌落培养特征上比较, 我们所鉴定的菌落为桔黄黄棕色色调, 在各种无机及有机培养基上分别为凋叶棕、杏黄、锌桔黄、褐色等色调, 这与纯白放线菌、中间型高温放线菌、甘蔗高温放线菌都有差异(见表 3)。因此认为 801 等菌株可以定为普通高温放线菌橙色亚种 *Thermoactinomyces vulgaris* subsp. *aurantiacus* subsp. nov.。

讨论和结论

1. 由江苏农民肺发病地区的干草及病人痰三次采样分离出的高温放线菌, 主要为普通高温放线菌(占 61.2%)以及高温链霉菌(占 31.2%), 两者占总分离菌数的 92.4%。

2. 根据形态、培养特征、生理生化特性, 细胞形态结构以及细胞壁组分, 证明所鉴定的菌株与文献报道的纯白高温放线菌、中间型高温放线菌、甘蔗高温放线菌不同, 更有别于干草小多孢菌。

3. 1899 年 Tsiklinsky 描述的 *Th. vulgaris* 不水解淀粉。1953 年 Waksman 等报道 Tsiklinsky 的原始种及保藏的 *Th. vulgaris*, 以及 1974 年《伯杰氏鉴定细菌学手册》中所包括的 *Th. vulgaris* 淀粉酶都为阳性, 硝酸盐还原阳性, 而我们所分离并鉴定的菌株是符合所描述的各种形态以及生理特性, 唯有培养特征有明显差异, 硝酸盐还原为阴性。因此, 可定名为普通高温放线菌橙色亚种

Thermoactinomyces vulgaris subsp. *aurantiacus* subsp. nov.。

4. 806、816、832 等菌株的抗原在病人血清学试验中阳性率较高, 实验证明江苏省大丰县的农民肺病因可能主要与普通高温放线菌有关。此研究结果可以为农民肺病因研究提供依据。

参 考 文 献

- [1] Pepys, J.: *Lancet*, 2: 607, 1963.
- [2] Terho, E. O. et al.: *Clin. Allergy*, 9: 43, 1979.
- [3] Cross, T. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 50: 351—359, 1968.
- [4] Corbaz, R. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 32: 449, 1963.
- [5] Gregory, P. H. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 33: 147, 1963.
- [6] Gregory, P. H.: *J. Gen. Microbiol.*, 36: 429, 1964.
- [7] Festenstein, G. N.: *J. Gen. Microbiol.*, 41: 389, 1965.
- [8] Tsiklinsky, P.: *Ann. Inst. Pasteur*, 13: 500—505, 1889.
- [9] Kurup, V. P. et al.: *Int. J. System Bacteriol.*, 25: 150—154, 1975.
- [10] Lacey, J.: *J. Gen. Microbiol.*, 66: 327, 1971.
- [11] Kurup, V. P. et al.: *Science-Ciencia*, 7 (4): 104—108, 1980.
- [12] 阎逊初、卢运玉: *微生物学报*, 15 (4): 282—291, 1975.
- [13] Cross, T. et al.: *Nature*, 220: 352—354, 1968.
- [14] Becker, B. et al.: *Appl. Microbiol.*, 13: 236—242, 1968.

STUDIES ON PATHOGENS OF FARMER'S LUNG IN JIANGSU—ISOLATION AND CLASSIFICATION OF THERMOPHILIC ACTINOMYCETES

Lu Yunyu

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Shen Yie

(*Frist Medical College of Shanghai, Shanghai*)

Farmer's lung disease occurs in Jiangsu farms. Eighty cultures were isolated from 49 samples of haystack and sputa in three time. The main cultures were *Thermoactinomyces* (61.2%) and the other were Thermophilic *Streptomyces*. According to the morphological cultural, and physiological characteristics and cell wall composition. We found that the cultures were different from *Thermoactinomyces intermedius*, *T. candidus*, *T. sacchari*

and more obviously from *Micropolyspora faeni*. We consider these strains appertain to a variety named as *Thermoactinomyces vulgaris* subsp. *aurantiacus* subsp. nov. Using the culture of *Thermoactinomyces vulgaris* subsp. *aurantiacus* 801 etc. as antigen in the serum of patients and a string precipitin reaction was shown. Then the relations between the farmer's lung disease and the *Thermoactinomyces vulgaris* were demonstrated.