

嗜热放线菌类群分类的研究

VI. 嗜热吸水链霉菌类群的分类*

卢运玉 徐大雅 戴华平**

(中国科学院微生物研究所, 北京)

农民肺病是一种外源性、过敏性肺炎, 多数学者认为是与发霉干草接触的农民吸入含有嗜热性放线菌孢子的霉变粉尘而发病。从江苏、湖北、上海等省市采集发病地区干草、霉草、病人痰样, 分离出 60 株嗜热吸水链霉菌。本文报道农民肺病病原菌中的二个新种, 讨论了嗜热吸水链霉菌与农民肺病的关系。

关键词 农民肺病; 嗜热吸水链霉菌; 嗜热涂链霉菌; 嗜热双角吸水链霉菌

吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*) 在中温条件下生长的菌株, 国内外已有许多报道^[1-3], 在 50℃ 以上高温条件下生长的菌株也有报道^[4]。作者在农民肺病原菌的研究中, 发现这类菌是我国引起农民肺病发病的病原体之一。对这类有“吸水”特征的嗜热链霉菌进行了分类鉴定, 确立了两个新种, 定名为嗜热涂链霉菌 (*Streptomyces thermoendus* sp. nov.) 和嗜热双角吸水链霉菌 (*Streptomyces thermobicorno-hygroscopicus*)。

对这类菌的代谢产物进行了提取, 并进行了动物实验, 临床证明这类菌生长繁殖时产生并分泌于胞外的蛋白酶具有抗原性, 并可以诱发兔的实验性农民肺病, 也能引起人类农民肺病。

材料和方 法

(一) 材料

从江苏、上海、湖北等地采取的粉尘、干草、痰样及同济医科大学分离的菌株。

(二) 分离培养

采用直接涂布分离, 置 50℃ 培养。

(三) 分类鉴定

采用嗜热放线菌分类研究法进行^[4]

(四) 细胞壁化学组份分析

采用快速薄层层析法^[5]。

(五) 胞外蛋白酶的提取及酶活性检测

将嗜热放线菌接种于酪氨酸液体培养基内, 置 37℃ 振荡培养 2—3 天后, 离心 5000r/min 30 分钟, 留上清液, 按 1:2 体积加无水酒精, -20℃ 沉淀过夜, 再离心 10000r/min 30 分钟, 去上清液, 取沉淀冻干成粉状, 置 -20℃ 冰箱保存备用。酶活性按碱性蛋白酶测定: 1ml 酶液, 40℃, pH 10.5, 每分钟水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸的酶量为 1 个酶活力单位。

(六) 动物实验

采用杂种白兔, 用环甲膜穿刺气管注入法, 注入 H₂L₄ 菌胞外蛋白酶液 2ml (1.5 mg/ml)。每周一次, 连续三次后, 在 48—72 小时取肺组织标本, 染色, 光学显微镜

本文于 1990 年 3 月 30 日收到。

* 国家自然科学基金资助课题。

** 北京朝阳医院呼吸科。

观察。

(七) 血清学试验

胞外蛋白酶为抗原, 抗体来自农民肺或蔗尘肺病人血清。

制备普通高温放线菌 (*T. vulgaris*) 及干草小多孢菌 (*M. faeni*) 的抗原。

采用对流免疫电泳技术进行血清沉淀试验^[6]。

结 果

嗜热涂链霉菌 *Streptomyces thermoendus* sp. nov

代表菌 H₃₋₁。

(一) 形态和培养特征

这类菌在各种有机、无机培养基上都生长丰盛; 菌落表面粉状, 生长快, 孢子成熟后孢子丝吸水, 使菌落表面形成黑褐色并带有粘性的湿斑, 在高氏淀粉琼脂培养基上最显著。孢子丝螺旋形, 孢子椭圆形, 孢子外鞘有短粗刺(图版 I-1—3), 在各种培养基上的培养特征见表 2。

(二) 生理生化特性

明胶液化快; 牛奶酪化而不凝固; 水解淀粉; 在纤维素上生长; 在柠檬酸铁琼脂上不产生 H₂S; 能利用阿拉伯糖、木糖、葡萄糖、果糖、蔗糖、甘露醇、肌醇; 不利用鼠李糖、棉子糖。酪氨酸水解产生褐色素。七叶树素琼脂上产生褐色素。

(三) 生长温度

该菌在 10℃ 以下或 65℃ 以上不生长; 28℃ 生长慢, 适温 37—55℃; 60℃ 生长弱。

(四) 细胞壁化学组分

细胞壁化学组分为 I 型, 含 L-DAP、甘氨酸, 无特征性糖。

(五) 粗酶性质

用 H₃₋₁ 菌株经培养, 发酵提取, 酶活性检测, 定为碱性蛋白酶, 最高酶活性在

60℃, 发酵液酶活性为 430 u/ml。

(六) H₃₋₁ 所产蛋白酶与农民肺致病作用

由气管经二次注入 H₃₋₁ 菌的蛋白酶后, 实验组兔的肺肉眼观察可见散在的粟粒样或斑片状灰白色病灶沿支气管分布, 有些尚可见点状或灶状出血。显微镜下观察的病变有肺泡炎, 血管炎, 细支气管炎。肺泡炎的表现肺泡腔内和间隔内有巨噬细胞, 淋巴细胞及中性粒细胞渗出, 其中以巨噬细胞渗出为主(图版 II-7), 并形成双核或多核巨噬细胞, 未见肉芽肿。细支气管炎的表现细支气管管壁增厚, 巨噬细胞、淋巴细胞及少许中性粒细胞浸润, 部分管腔可见炎性渗出物, 细支气管周围淋巴组织增生(图版 II-8), 血管炎的表现肺小血管壁炎性浸润。有巨噬细胞, 淋巴细胞及中性粒细胞渗出(图版 II-9), 血管周围淋巴细胞增多。对照组兔的肺组织正常(图版 II-10)。

(七) 血清免疫学试验

A 组血清均能和 H₃₋₁ 菌的蛋白酶和 *T. vulgaris* 抗原反应形成特异性沉淀线, 阳性率为 100%, 并与 *M. faeni* 抗原反应形成特异性沉淀线的阳性率为 35.71%。B 组为 81.25% 和 31.25%。C 组的血清均不能和三种抗原中的任何一种反应(表 1)。

(八) 菌种鉴定

H₃₋₁ 菌株分离自我国湖北省洪湖地区农民肺病死者家中的铺草。该菌株能耐热, 生长快, 显然与中温的吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus* Jensen 1931) 不同。其孢子螺旋形, 孢子表面有短粗刺, 在各种培养基上生长丰盛, 有黑褐色的湿斑, 蛋白酶活性高, 有别于已报道的热吸水链霉菌 (*Streptomyces thermohygroscopicus*)^[4] 及热吸水链霉菌锈赤变种

表 1 A 组血清和 B 组血清的沉淀素抗体阳性率

Table 1 The positive ratio of precipitating antibodies of sera in Group A and Group B

	受检例数	EPST		<i>T. vulgaris</i>		<i>M. faeni</i>		P
		N	%	N	%	N	%	
A 组	14	14	100	14	100	5	35.71	<0.01
B 组	16	13	81.25	13	81.25	5	31.25	<0.01
P		>0.05		>0.05		>0.05		

EPST: H₉₋₄ 菌株的蛋白酶。

N: 阳性例数。

A 组: 农民肺或蔗尘肺病人血清 14 份。

B 组: 有接触史的无症状人员血清 16 份。

C 组: 无接触史的健康人员血清 10 份。

表 2 H₉₋₄ 菌株和 T₅₆₂ 菌株的培养特征Table 2 Cultural characteristics of strain H₉₋₄ and strain T₅₆₂

培养基	菌株特征	H ₉₋₄				T ₅₆₂			
		生长	气丝	基丝反面	可溶性色素	生长	气丝	基丝反面	可溶性色素
伊姆松琼脂		良好,粉状	猴毛灰	黄褐	无	丰盛,粉状	黑灰	黄褐	无
半营养琼脂		丰盛,粉状	浅灰	黄褐	无	丰盛,粉状	黑灰	黑褐	无
马铃薯块		良好,粉状	浅灰至浅褐	黑褐	无	丰盛,粉状	浅灰褐	黑	无
蔗糖察氏琼脂		良好,绒状	浅灰,有白色次生菌丝,有吸水斑	黑褐	无	良好,粉状	褐灰	无色	无
燕麦粉琼脂		丰盛,粉状	浅灰黑	黄褐	无	丰盛,粉状	黑褐,有吸水斑	黑褐	无
葡萄糖天门冬素琼脂		生长弱,粉状	浅灰	无色	无	生长弱,粉状	灰白	无	无
高氏淀粉琼脂		丰盛,粉状	深灰,有吸水斑	污浅黄	无	丰盛,粉状	灰,有吸水斑	浅黄	无
酵母膏琼脂		丰盛,绒状	猴毛灰,有吸水斑	黑褐	无	丰盛,绒状	黑灰,有吸水斑	桂皮淡棕	微染浅褐
苹果酸钙琼脂		丰盛,粉状	浅灰	谷黄	无	生长弱,粉状	黑灰	黑褐	无

注:《色谱》,科学出版社,北京,1957。

(*Streptomyces thermohygroscopicus* var. *rubiginosus*)⁽⁴⁾。因此,认为该菌株属于嗜热链霉菌类群中的一个新种,命名为嗜热涂链霉菌(*Streptomyces thermoendus* sp. nov.), H₉₋₄ 为模式株。

嗜热双角吸水链霉菌 *Streptomyces thermobicornohygroscopicus* sp. nov.

代表菌株 T₅₆₂

(一) 形态和培养特征

这类菌在各种培养基上生长好,孢子

丝呈黑灰色,在燕麦、高氏淀粉、酵母膏等琼脂斜面上都呈现吸水现象,基丝呈黄褐至黑褐色,孢子丝螺旋形,孢子表面外鞘有一对短粗刺呈双角状(图版 I-4-6),在各种培养基上培养特征见表 2。

(二) 生理生化特性

明胶液化强;牛奶脓化而不凝固;淀粉水解中度;纤维素上生长弱;硝酸盐转化成亚硝酸盐。在柠檬酸铁上产生 H_2S ; 能利用葡萄糖、果糖、蔗糖、甘露醇、肌醇; 不利用阿拉伯糖、木糖、鼠李糖、棉子糖。酪氨酸水解阳性,产生褐色素。七叶树素水解阳性,产生黑色素。

(三) 生长温度

该菌株在 $10^{\circ}C$ 以下或 $65^{\circ}C$ 以上不生长, $28^{\circ}C$ 生长弱,最适温度为 $50-55^{\circ}C$, $60^{\circ}C$ 生长弱。

(四) 细胞壁化学组分

细胞壁化学组分为 I 型,含 L-DAP、甘氨酸,无特征性糖。

(五) 粗酶性质

T_{56} 菌株接种于酵母膏葡萄糖液体培养基中,经培养、发酵提取、酶活性检测为碱性蛋白酶,最高酶活性在 $60^{\circ}C$,发酵液酶活性为 $392 u/ml$ 。

(六) 菌种鉴定

T_{56} 菌株分离自上海嘉定县王楼村蘑菇堆料,能耐热、生长快。该菌株孢子丝螺旋形,孢子椭圆形 ($0.6 \times 1.2 \mu m$),孢子表面有粗刺,在透射电镜下单个着生状;在扫描电镜下可见两个粗刺,形如双角,长度约 $0.2-0.3 \mu m$ 。在各种培养基上生长丰盛,有黑褐色的湿斑,蛋白酶活性高,有别于已报道的热吸水链霉菌。因此,该菌属

于嗜热链霉菌中一个新种,命名为嗜热双角吸水链霉菌 (*Streptomyces thermicornohygroscopicus* sp. nov.)。

讨论与结论

1. 嗜热涂链霉菌经过动物试验及临床检测证明,它是我国农民肺的主要病原菌之一。Schallibaum 用 *M. faeni* 的胞外酶对兔进行试验,结果主要表现为肺炎,血管周围炎和支气管周围炎。在我国也曾经报道由 *T. vulgaris* 引起农民肺^[8-10]。作者认为嗜热涂链霉菌的胞外蛋白酶同样可诱发兔的实验性农民肺。

2. 嗜热吸水链霉菌类群的菌在我国分布极广,种类也繁多,嗜热涂链霉菌为吸水链霉菌类群一新种,已为动物实验证明具有抗原性,能刺激机体免疫系统,产生特异性的沉淀素抗体,可为诊断农民肺提供依据。

参 考 文 献

- [1] Jensen, H. L.: *Linnean Soc. N. S. Wales.*, **56**: 345-370, 1931.
- [2] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组编者: 链霉菌鉴定手册, 科学出版社, 北京, 1975.
- [3] Waksman, S. A. (阎逸初译): 放线菌(第二卷), 科学出版社, 北京, 第 253-254 页, 1974.
- [4] 阎逸初、卢运玉: 微生物学报, **15**(4): 282-291, 1975.
- [5] 王平: 微生物学通报, **13**(5): 228-231, 1986.
- [6] 杨履谓: 微生物学及检验技术(第一版), 广东科技出版社, 广州, 第 499-450 页, 1986.
- [7] Schallibaum, M.M. et al.: *Clin. Exp. Immunol.*, **28**: 535-541, 1977.
- [8] 车东媛等: 同济医科大学学报, **1**: 36-38, 1986.
- [9] 卢运玉等: 微生物学报, **25**(4): 351-355, 1985.
- [10] Tao Binggen et al.: *Biomedical and Environmental Science*, **1**: 13-18, 1988.

STUDIES ON THE CLASSIFICATION OF THERMOPHILIC ACTINOMYCETES

IV. DETERMINATION OF THERMOPHILIC STREPTOMYCES HYGROSCOPICUS GROUP

Lu Yunyu Xu Daya Dai Huaping

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The thermophilic streptomyces *hygroscopicus* is one of the pathogens of farmer's lung disease.

The identified 60 strains of thermophilic streptomyces *hygroscopicus* coming from the isolates from the haystack, moldy hay and sputa collected from Jiangsu, Hubei province and Shanghai in China. These strains are grown around 50°C and have moist patches on the surface of colonies. It is proved that protease can be extracted from cultured H₅₋₄ strain. This protease is provided with antigene, the farmer's lung disease of rabbit can be induced in animals experiments. On clinical diagnosis the farmer's lung disease can be detected by sera test.

From the identification of the 60 ther-

philic streptomyces *hygroscopicus* strains, we found the morphological cultural, physiological characteristics and cell wall composition of H₅₋₄ and T₅₆₂ well different from description hitherto. So two of them are identified as new species. H₅₋₄ is named as *Streptomyces thermoendus* sp. nov. and T₅₆₂ is named as *Streptomyces thermobicorno-hygroscopicus* sp. nov.

Key words

Farmer's lung disease; Thermophilic streptomyces *hygroscopicus*; *Streptomyces thermoendus*; *Streptomyces thermobicorno-hygroscopicus*;

图 版 说 明

Explanation of plates

图 版 I

1. H_{9-4} 菌株的螺旋状孢子丝(10000 \times); 2. H_{9-4} 菌株有少量短刺孢子(10000 \times); 3. H_{9-4} 菌株在扫描电镜下的孢子丝和孢子(17000 \times); 4. T_{9-1} 菌株表面带角的孢子(15000 \times); 5. T_{9-1} 菌株扫描电镜下的孢子丝(20000 \times); 6. T_{9-1} 扫描电镜下带双角的孢子(20000 \times)。

图 版 II

7. 肺泡腔和肺泡间隔炎性细胞渗出, 其中以巨噬细胞渗出为主, 伴少量淋巴细胞和中性粒细胞(HE, 300 \times); 8. 细支气管腔内有炎性渗出物, 管壁各层炎性细胞浸润, 细支气管淋巴组织增生(HE, 100 \times); 9. 肺小血管壁巨噬细胞, 淋巴细胞及中性粒细胞渗出(HE, 300 \times); 10. 对照组兔组织无病理变化(HE, 75 \times)。

Plate I

1. Spiral sporechain of strain H_{9-4} ; 2. Spores with

short spines of strain H_{9-4} ; 3. Scanning electron micrograph of the strains sporechains and spores; 4. Horn spores of strain T_{9-1} ; 5. Scanning electron micrograph of the strain T_{9-1} sporechains; 6. Scanning electron micrograph of the strain T_{9-1} double horn spores.

Plate II

7. Alveolar interstitial infiltration of inflammatory cell, mostly consisting of macrophages with a few lymphocytes and neutrophils; 8. Inflammatory cell found in all layer of the bronchiole wall and inside the bronchiole, and lymphocytes proliferation in the surrounding area; 9. Pulmonary vasculitis characterized by infiltration of the vessel wall with macrophages lymphocytes and neutrophils; 10. Normal lung tissue structure in the control rabbit.