

诺卡氏菌形放线菌的化学分类

刘志恒 秦 敏 马俊才 阮继生

(中国科学院微生物研究所, 北京)

通过对 28 株分别代表 12 个属的诺卡氏菌形放线菌及有关分类单位的胞壁组分、枝菌酸、甲基萘醌、磷酸类脂等化学特性的分析, 结合数值分类, 在相似值 (S_m) 80% 水平上将这类菌分成了两个大的化学类群, 在 90% 水平上再分成四个小的类群。除拟诺卡氏菌属是显著的化学异源类群外, 其余均与传统分类的属一致, 形成独立的化学分类单位。讨论了化学分类在诺卡氏菌形放线菌分类研究中的应用及对出现的化学异源类群的认识。

关键词 诺卡氏菌形放线菌; 化学分类; 数值分类

近年来, 化学与分子生物学技术在分类学中的应用, 已经深刻地影响着放线菌分类学的发展^[1]。不仅纠正了过去那些以形态和生理描述分类所产生的种属划分的错误, 同时许多新的种属也不断被提出来^[2]。诺卡氏菌形放线菌 (Nocardioform-actinomycetes) 是一类形态结构简单, 培养特征易变的多个类群的集合体, 但细胞组分、枝菌酸有无、甲基萘醌类型和特征性磷酸类脂等化学特性各有不同。因此, 应用化学分类方法去探讨这类微生物的分类学地位已经越来越多地受到各国分类学者的重视^[3]。

本文将报道我们对分别代表诺卡氏菌形放线菌中 12 个属和有关分类单位的 28 株菌的化学分类研究结果, 并结合化学特性的相似值平均链锁聚类分析, 讨论了他们的分类学关系。

材料和方法

(一) 菌株

实验菌株及其来源列于表 1。所有菌株均接种在加有 0.5% 酵母膏的葡萄糖天冬素液体培养基中, 28℃ 振荡培养 4—6d, 离心收集菌体, 洗净, 冻干备用。

(二) 细胞壁组分分析

细胞壁氨基酸和糖分的分析, 参照 Becker (1965) 和 Lechevalier (1971) 建立的方法^[4,5]。

(三) 枝菌酸分析

参照 Minnikin (1980)^[6] 和 刘志恒、阮继生 (1988)^[2] 使用的方法。

(四) 磷酸类脂分析

参照 Lechevalier (1980)^[7]、Minnikin (1979)^[8]、John (1964)^[9] 等人的方法。

(五) 甲基萘醌分析

参照 Collins (1985)^[10] 的萘醌薄层析 (TLC) 和 吴诚华等人 (1989)^[11] 使用的高压液相层析 (HPLC) 法。

(六) 数值分类

使用中国科学院微生物研究所 MINTS 数值分类系统^[12]。相似系数 $S_m = (a + b) / (\text{total} - NC)$, 聚类方式为平均链锁聚类。

结 果

(一) 28 株菌的化学分类特性分析 (表 2)

本文于 1990 年 3 月 6 日收到。

表1 实验菌株及来源
Table 1 Source of testing strains

No.	中文名 Chinese name	种名 Species name	菌株号 Strain No.	菌株来源 Source
01	星状诺卡氏菌	<i>Nocardia asteroides</i>	IMRU 727 (ATCC 19247)	IMRU, USA
02	褐色诺卡氏菌	<i>Nocardia fusca</i>	AS 4,1160 (IFO 14340)	CCCCM, CHINA
03	黄粉色诺卡氏菌	<i>Nocardia flavorosa</i>	AS 4,1175 (IFO 14341)	CCCCM, CHINA
04	酱红色诺卡氏菌	<i>Nocardia purpurea</i>	AS 4,1182	CCCCM, CHINA
05	鲜黄色诺卡氏菌	<i>Nocardia galba</i>	AS 4,1177	CCCCM, CHINA
06	土星无枝菌核菌	<i>Amiccolata saturna</i>	IMRU 1181	IMRU, USA
07	东方拟无枝菌核菌	<i>Amiccolatopsis orientalis</i>	ISP 5040	IMRU, USA
08	苛求假诺卡氏菌	<i>Pseudonocardia fastidiosus</i>	IFO 14105	IFO, JAPAN
09	嗜热假诺卡氏菌	<i>Pseudonocardia thermophila</i>	IFO 12133	IFO, JAPAN
10	思茅假诺卡氏菌	<i>Pseudonocardia simaoensis</i>	No. 64	IMAS, CHINA
11	达松维尔拟诺卡氏菌	<i>Nocardioopsis dassonvillei</i>	IMRU LL-H,	IMRU, USA
12	恶劣拟诺卡氏菌	<i>Nocardioopsis atra</i>	IFO 14198	IFO, JAPAN
13	非洲拟诺卡氏菌	<i>Nocardioopsis africana</i>	JCM 6240	IFO, JAPAN
14	天蓝褐拟诺卡氏菌	<i>Nocardioopsis coeruleofusca</i>	JCM A-0313 (IFO 14520)	JCM, JAPAN
15	达松维尔拟诺卡氏菌亚种	<i>Nocardioopsis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i>	JCM 3237	JCM, JAPAN
16	达松维尔拟诺卡氏菌葱绿亚种	<i>Nocardioopsis dassonvillei</i> subsp. <i>praisina</i>	JCM 3336 (IFO 14521)	JCM, JAPAN
17	黄色拟诺卡氏菌	<i>Nocardioopsis flava</i>	JCM 3296 (IFO 14522)	JCM, JAPAN
18	长孢拟诺卡氏菌	<i>Nocardioopsis longispora</i>	JCM 3314 (IFO 14522)	JCM, JAPAN
19	链孢拟诺卡氏菌	<i>Nocardioopsis streptosporus</i>	AS 4,1176 (IFO 14475)	CCCCM, CHINA
20	突变拟诺卡氏菌	<i>Nocardioopsis mutabilis</i>	JCM 3380 (IFO 14475)	JCM, JAPAN
21	海藻糖拟诺卡氏菌	<i>Nocardioopsis trehalosae</i>	AS 4,1174	CCCCM, CHINA
22	藤黄英诺卡氏菌	<i>Nocardioidea luica</i>	IMET 7830	CCCCM, CHINA
23	红色红球菌	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	R372	IMET, DRG
24	草分枝杆菌	<i>Mycobacterium phlei</i>	A81	IMRU, USA
25	北京棒杆菌	<i>Corynebacteria pekinesis</i>	A891	ITB, CHINA
26	蓝灰色异藤放线菌	<i>Actinonolletichus cyanogriseus</i>	AS 4,1159 (IFO 14455, NRRL B-16252, JCM 6095)	IMAS, CHINA
27	灰色链霉菌	<i>Streptomyces griseus</i>	AS 4,139	CCCCM, CHINA
28	马杜拉放线菌	<i>Actinomadura madura</i>	AS 4,1178	CCCCM, CHINA

注: IMRU=美国拉格斯大学微生物研究所 Institute of Microbiology, Rutgers University; CCCCM=中国微生物菌种保藏委员会 China Committee for Culture Collections of Microorganisms; IFO=大阪发酵研究所 Institute for Fermentation, Osaka; JCM=日本菌种保藏中心 Japan Collection of Microorganisms; ITB=北京结核病研究所 Institute of Tuberculosis, Beijing, China; IMAS=中国科学院微生物研究所 Institute of Microbiology, Academia Sinica.

表2 实验菌株化学分类学特性
Table 2 Summary of chemotaxonomic properties of testing strains

No.	种 名 Species name	胞壁型 Cell wall type				糖 型 Sugar type				核菌酸 Myc- late	甲基萘醌组成 Menaquinone composition				磷酸类脂类型 Phospholipid patterns							
		I II III IV				A B C D					MK-8				MK-9				MK-10			
											$(H_2)(H_4)(H_6)(H_8)(H_{10})$				$(H_2)(H_4)(H_6)(H_8)(H_{10})$				$(H_2)(H_4)(H_6)(H_8)(H_{10})$			
01	<i>Nocardia asteroides</i>	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
02	<i>Nocardia fusca</i>	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
03	<i>Nocardia flavoviridis</i>	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
04	<i>Nocardia purpurea</i>	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
05	<i>Nocardia galba</i>	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
06	<i>Amycolata saturnea</i>	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
07	<i>Amycolatopsis orientalis</i>	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0
08	<i>Pseudonocardia fastidiosus</i>	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0
09	<i>Pseudonocardia thermophila</i>	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
10	<i>Pseudonocardia simaoensis</i>	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
11	<i>Nocardioptopsis dasonvillei</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
12	<i>Nocardioptopsis atra</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0
13	<i>Nocardioptopsis africana</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0
14	<i>Nocardioptopsis coeruleofusca</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
15	<i>Nocardioptopsis dasonvillei</i> subsp. <i>dasonvillei</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
16	<i>Nocardioptopsis dasonvillei</i> subsp. <i>pratensis</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
17	<i>Nocardioptopsis flava</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
18	<i>Nocardioptopsis longispora</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
19	<i>Nocardioptopsis streptosporus</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
20	<i>Nocardioptopsis mutabilis</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
21	<i>Nocardioptopsis trehalosus</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
22	<i>Nocardioptopsis lutea</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
23	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
24	<i>Mycobacterium phlei</i>	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
25	<i>Corynebacteria pekinensis</i>	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
26	<i>Actinomyces cyanogriseus</i>	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
27	<i>Streptomyces griseus</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0
28	<i>Actinomyces madura*</i>	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0

1. 28 株菌的细胞壁组分分析结果均在文献报道的范围内^[3]。代表诺卡氏菌 (*Nocardia*)、假诺卡氏菌 (*Pseudonocardia*)、无枝菌酸菌 (*Amycolata*)、拟无枝菌酸菌 (*Amycolatopsis*)、红球菌 (*Rhodococcus*)、棒杆菌 (*Corynebacterium*)、分枝杆菌 (*Mycobacterium*) 属的 13 株菌的细胞壁 (CW) 为 IV 型, 糖型 (Sugar type) A。11 株拟诺卡氏菌 (*Nocardioopsis*) 的胞壁为 III/C 型。类诺卡氏菌 (*Nocardoides* 和链霉菌 (*Streptomyces*) 为 I/C 型^[4]。异壁放线菌 (*Actinoalloteichus*) 为 II/C 型^[4]。马杜拉放线菌 (*Actinomadura*) 为 III/B 型。

2. 胞壁 IV/A 型的 13 株菌中, 代表诺卡氏菌、红球菌、棒杆菌、分枝杆菌属的 8 株菌含有枝菌酸 (Mycolate), 1 株嗜热假诺卡氏菌 (*Pseudonocardia thermophilus*) 含枝菌酸可疑, 其余菌株均不含枝菌酸。

3. 11 株拟诺卡氏菌中, 代表种达森维尔拟诺卡氏菌 (*Nrdp. dassonvillei*) 和葱绿达森维尔亚种 (*Nrdp. dassonvillei* subsp. *parasina*) 的甲基萘醌 (Menaquinone) MK-10_(H₂) 组分为主, 与文献中报道的结果^[5]一致; 黄色拟诺卡氏菌 (*Nrdp. flava*) 和长孢拟诺卡氏菌 (*Nrdp. longispora*) 的 MK-10_(H₂) 组分可疑; 其余均以 MK-9_(H₂/H₄) 为主要成分。其他实验菌株的甲基萘醌组分分析结果均在文献报道的有关属范围内。

4. 11 株拟诺卡氏菌的磷酸类脂类型 (Phospholipid type) 分析, 代表种达森维尔拟诺卡氏菌为 PIH 型, 其余除达森维尔拟诺卡氏亚种 (*Nrdp. dassonvillei* subsp. *dassonvillei*) 为 PI 型外, 均为 PII 型。其他实验菌株中, 异壁放线菌属代表种 (*Actinoalloteichus cyanogriseus* 为 PI 型,

马杜拉放线菌属代表种 (*Actinomadura madura*) 为 PII 型, 其余菌株均与文献中描述的一致。

(二) 数值分类

根据 28 株菌的 20 项化学分类特性 (表 2), 使用非加权匹配分析, 得到一平均链锁聚类树状谱 (图 1)。

在相似值 (S_m) 80% 水平上, 可以明显地形成两个大的化学链锁群: 胞壁 IV/A 型的类群 I 和胞壁 III/C 型的类群 II。马杜拉放线菌、链霉菌、异壁放线菌、类诺卡氏菌, 以及一株达森维尔拟诺卡氏菌亚种均被单独划分出来。

在相似值 (S_m) 90% 水平上, I、II 两个大类群又各分为两个小的类群:

类群 I₁ 包括所有的诺卡氏菌及红球菌、嗜热假诺卡氏菌的实验菌株, 且红球菌与诺卡氏菌有 100% 的 S_m 值。无枝菌酸菌明显地划分出来。

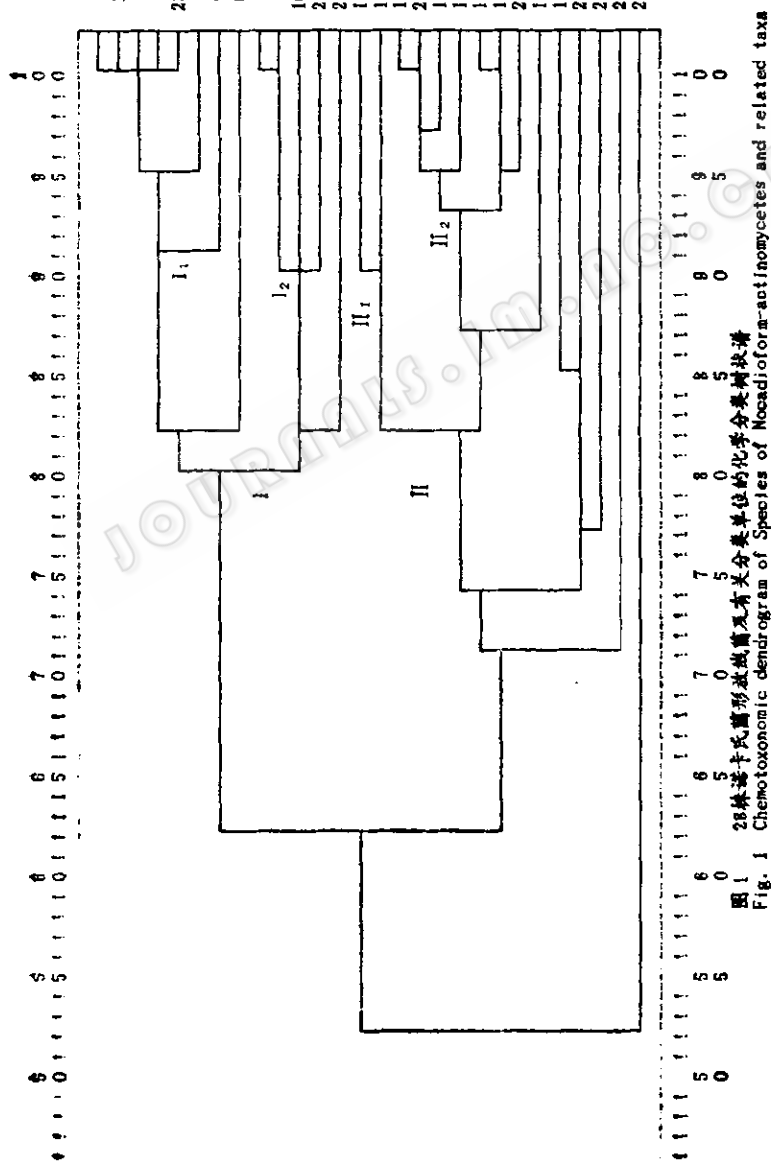
类群 I₂ 包括拟无枝菌酸菌、假诺卡氏菌、分枝杆菌的实验株, 且苛求假诺卡氏菌 (*N. fastidios*) 与东方拟无枝菌酸菌 (*Amycolatopsis orientalis*) 有 100% 的 S_m 值。棒杆菌被明显地划分出来。

类群 II₁ 只包括拟诺卡氏菌属的代表种达森维尔拟诺卡氏菌和葱绿达森维尔拟诺卡氏菌亚种。

类群 II₂ 包括了其余的 7 株拟诺卡氏菌。链孢拟诺卡氏菌 (*Nrdp. streptospora*) 及达森维尔拟诺卡氏菌亚种被划分出来。

讨 论

1. 根据对化学分类结果的数值分析, 诺卡氏菌属 (链锁群 I₁) 可以定义为胞壁 IV/A 型, 含枝菌酸、甲基萘醌主要成分为 MK-8_(H₂/H₄)、磷酸类脂类型 PII 的一类诺卡氏菌形放线菌。这一定义不仅可以区别不含枝菌酸的假诺卡氏菌、无枝菌酸菌和



拟无枝菌酸菌;还可以将含甲基萘醌 MK-9_(H₂)的分枝杆菌和磷酸类脂 PI 型的棒杆菌区分开来。与其化学分类特性完全相同的红球菌,可另借助枝菌酸气相色谱分析^[19]和测定 DNA 的同源性^[17]来鉴别。

2. 细胞壁 IV/A、形态学表现顶向芽生的假诺卡氏菌,因不含枝菌酸,与 Lechevalier (1986) 等人新建立的无枝菌酸菌和拟无枝菌酸菌属^[14]的化学分类关系更为密切(链锁群 I₁)。尤其实验菌 *Nrdp. fastidios* 与 *Amycolatopsis orientalis* 有 100% 的化学相似值。这一结果与 Embey 等人(1988)将 *Nrdp. fastidios* 转入拟无枝菌酸菌属,重新命名为苛求拟无枝菌酸菌 *Amycolatopsis fastidios*^[19] 的描述是一致的。另外的两株假诺卡氏菌,有待全面比较了他们与 Henssen (1971) 等人^[120]描述的这个属的典型种的化学分类特性和 DNA 同源性后,去确定他们的分类学地位。

3. 关于拟诺卡氏菌的化学分类,我们的实验结果表明这个属是明显的化学异源属 (Chemical heterogenus)。它至少有两个以上的化学链锁类群。这与日本学者 Shimazu 等人(1989)^[15]的研究结果基本一致。因此,我们赞成保留那些在化学分类特性上 (CW III/C、MK-10_(H₂)、磷酸类脂 PI_{III}) 与这个属的代表种 *Nrdp. dassonvillei* 相同的种(如链锁群 II₁) 归为拟诺卡氏菌属^[21]。对于其余在化学特性上与 *Nrdp. dassonvillei* 有较大差别的一些种(如链锁群 II₂),以及 *Nrdp. streptospora* 和 *Nrdp. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* 等,有待进一步研究了他们的分子遗传学特性后,再给予适合的分类学地位。

4. 我们的研究还说明刘志恒等人(1984)^[14]建立的异壁放线菌属,其典型种蓝灰异壁放线菌 (*Actinoalloteichus cya-*

nogriseus) 化学特性与日本伊藤等人(1987)^[22]建议进行比较的拟诺卡氏菌和链霉菌显然不在同一化学分类链锁群里(图 1)。

总之,我们认为化学分类对于在属级水平上去研究划定诺卡氏菌形放线菌各分类单位的地位与关系,比传统的形态和生理描述分类更加确切。这一结果如能进一步与分子遗传学技术分析相结合,则会更有益于在分子生物学水平上认识这类微生物的分类学关系和地位。

参 考 文 献

- [1] Goodfellow, M. et al.: Biology of Actinomycetes '88, Japan Scientific Societies Press, pp 233—238, 1988.
- [2] 刘志恒、阮继生: 微生物学报, 23(3): 206, 1988.
- [3] 阮继生等: 放线菌研究及应用, 科学出版社, 北京, 1990.
- [4] Becker, B. et al.: Appl. Microbiol., 13: 236—243, 1965.
- [5] Lechevalier, M. P.: Chemical Methods Criteria for the Separation of Nocardiae from other Actinomycetes, Inst. of Waksman Microbiol., USA, 1971.
- [6] Minnikin, D. E. et al.: J. Chromatography, 188: 221—233, 1980.
- [7] Lechevalier, M. P. et al.: A University Laboratory Approach, Society for Industrial Microbiology Special Publication No. 6, Arlington VA, Ed. by Dietz A. & D. W. Thayer, pp. 277—284, 1980.
- [8] Minnikin, D. E. et al.: J. Appl. Bacteriol., 47: 87—95, 1979.
- [9] John, C. E. et al.: J. Lipid Res., 5(1): 126—149, 1964.
- [10] Collins, M. D.: Chemical Methods in Bacterial Systematics (Goodfellow, M. and D. E. Minnikin Ed.), Academic Press, London, pp. 267—287, 1985.
- [11] 吴诚华等: 微生物学通报, 16(3): 176—178, 1989.
- [12] 马俊才、赵玉峰: 微生物分类和鉴定技术进展, 光明出版社, 哈尔滨, 第340—355页, 1989.
- [13] Lechevalier, H. A. & M. P. Lechevalier: The Prokaryotes (Ed. Mortimer P. et al.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp. 1915—1922, 1981.
- [14] 刘志恒等: 微生物学报, 24(4): 295—298, 1984.
- [15] Shimazu, A. et al.: Trends in Actinomycetology

- in Japan, Y. Koyama Society for Actinomycetes, Japan, pp. 13—16, 1989.
- [16] 刘志恒等: 微生物学通报, 17 (5): 307—310, 1990.
- [17] Mordarski, M. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 94: 235—245, 1976.
- [18] Lechevalier, M. P. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 36(1): 29—37, 1986.
- [19] Embley, T. M. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 134: 953—960, 1988.
- [20] Hessen, A. & D. Schafer: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 21(1): 29—34, 1971.
- [21] Myer, S.: *ibid.*, 26: 487, 1976.
- [22] Takashi, I. et al.: *Actinomycetologica*, 1(1): 43—59, 1987.

CHEMOTAXONOMIC STUDY ON SOME STRAINS OF NOCARDIOFORM-ACTINOMYCETES

Liu Zhiheng Qin Min Ma Juncui Ruan Jisheng

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Through chemical analysis of cell wall composition, mycolate, menaquinones and phospholipids for 28 strains respectively representative of 12 genera in Nocardioform-actinomycetes, the test strains were circumscribed by numerical classification two great chemotaxonomic groups at 80% S_{90} value and four subgroups at 90% S_{90} value. The results showed that the *Nocardioopsis* genus was a markedly chemical heterogenous. The other test strains were diversity of some related chemotaxonomic clusters or independent

taxa at generical level. Their taxonomic status and interrelationship have been discussed. The facts have proved that chemotaxonomic informations are particularly important criteria as to define, evaluate and circumscribe Nocardioform-actinomycetes at generical level.

Key words

Chemotaxonomy; Nocardioform-actinomycetes; Numerical classification