



小单孢菌属的分类及应用研究*

张学武 张建丽**

(北京理工大学生命科学与技术学院 北京 100081)

摘要: 小单孢菌在自然界分布广泛,但由于分离、分类方法所限,绝大多数还没有被人们所认识。在小单孢菌的分类学研究中,最初主要依据的是形态特征、培养特征及生理生化特征等表观分类学指征,随着“多相分类”的广泛应用,分子分类在小单孢菌的分类学研究中起到了越来越重要的作用。小单孢菌是寻找新的生物活性物质的重要菌源,某些种能产生抗生素,如庆大霉素、利福霉素、新霉素等;某些种能降解天然橡胶和纤维素。近年来的研究表明,小单孢菌能产生具有独特化学结构的生物活性物质,对肿瘤细胞有靶向和识别作用,并能有效地杀死肿瘤细胞。

关键词: 小单孢菌属, 分类学, 生物活性物质

中图分类号: Q939.13 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 05-0117-05

Taxonomy and Application of *Micromonospora*

ZHANG Xue-Wu ZHANG Jian-Li**

(School of Life Science and Technology, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081)

Abstract: *Micromonospora* distributes extensively in environment. But most of them have not been known because the limitation of isolation and taxonomic approach. The phenotypic information such as morphological, cultural and physiological characteristics have been applied widely in the taxonomy of *Micromonospora*. The functions of molecular methods become more and more important in the taxonomy of *Micromonospora* accompanying with the development of the polyphasic taxonomy. *Micromonospora* is one of the most important sources in finding new bioactive compounds, some of them can yield antibiotics, such as gentamicins, rifamicins and newmicins, some of them can degrade natural rubber and fibrin. It indicated in recent years' study that some bioactive compounds with particular chemical construction could be found from *Micromonospora*. These compounds can identify cancer cells and kill them effectively.

Key words: *Micromonospora*, Taxonomy, Bioactive compounds

小单孢菌属 (*Micromonospora*) 在分类学上属于放线杆菌纲,放线杆菌亚纲,放线菌目,小单孢菌科中的一类形态相似的微生物。小单孢菌属中的大多数种为好氧型。最适生长温度为 20℃ ~ 40℃。小单孢菌的生存环境十分广泛,在土壤及水生环境、低温环境、碱性环境均有分布,在河流或湖泊的沉积物中出现的频率要相对高于在土壤

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30570002)

北京市自然科学基金资助项目 (No. 5062024)

北京理工大学基础研究基金资助项目 (No. BIT_UBF_200306C08)

** 通讯作者 Tel: 86-10-86717064-804, E-mail: zhangjianli@bit.edu.cn

收稿日期: 2005-10-13, 修回日期: 2005-12-12

中的频率。在土壤中，小单孢菌占放线菌总数一般不高于5%；但姜成林等^[1]的研究结果表明在云南境内的湖底泥中是优势菌，小单孢菌占放线菌总数的30%~90%。

1 小单孢菌的研究历史及现状

小单孢菌属是1923年由Ørskov建立的。在Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1989年)中，小单孢菌属包括8个种，分别为*M. carbonacea*、*M. halophytica*、*M. chalcona*、*M. inositola*、*M. coerulea*、*M. purpureochromogenes*、*M. olivasterospora*、*M. echinospora*。此外还有几个种的分类地位并不明确，它们的绝大部分分类学指征与小单孢菌一致，但有一些表观特征如孢子形态和培养特征与小单孢菌存在差别，经进一步研究确定，它们中的两个种属于小单孢菌属，并延续最初的命名：*M. gallica*和*M. aurantiaca*。本世纪初，小单孢菌属的新种建立工作进入了一个崭新的阶段，尤其是近两年，共有12个新种发表^[2-6]。该属2000年后发表的所有新种见表1。

表1 小单孢菌属2000年后发表的新种

种名	作者	时间(年)
<i>Micromonospora pallida</i>	Kasai 等	2000
<i>Micromonospora nigra</i>	Kasai 等	2000
<i>Micromonospora matsumotoense</i>	Lee 等	2000
<i>Micromonospora endolithica</i>	Hirsch 等	2004
<i>Micromonospora auratinigra</i>	Thawai 等	2004
<i>Micromonospora eburnea</i>	Thawai 等	2005
<i>Micromonospora citrea</i>	Reiner M 等	2005
<i>Micromonospora echinaurantiaca</i>	Reiner M 等	2005
<i>Micromonospora echinufusca</i>	Reiner M 等	2005
<i>Micromonospora fulvioviridis</i>	Reiner M 等	2005
<i>Micromonospora inyonensis</i>	Reiner M 等	2005
<i>Micromonospora peuceetia</i>	Reiner M 等	2005
<i>Micromonospora sagamiensis</i>	Reiner M 等	2005
<i>Micromonospora viridifaciens</i>	Reiner M 等	2005
<i>Micromonospora mirobrigensis</i>	Martha E 等	2005

2 不同分类方法在小单孢菌分类学研究中的应用

在以往小单孢菌的分类学研究中，主要进行的是经典分类。随着“多相分类(Polyphasic taxonomy)”这一分类学术语的提出和广泛应用，小单孢菌的分类也开始采用多相分类的方法。把表型和基因型的信息进行综合，在原来分类的基础上，更多的融入了化学分类和分子分类的内容。

2.1 经典分类 主要指依据形态特征、培养特征及生理生化特征等表观分类学指征进行分类学研究。虽然经典分类不能确切说明微生物的进化地位和关系，但它却是人们认识微生物实际重要性和研究生物进化的基础，因此也是多相分类研究的基础。小单孢菌菌丝体发达，有分枝，有横隔，直径平均0.5µm。孢子单生，有柄或者生长在或长或短的孢子梗上，时常分枝成簇。孢子梗单轴分枝，有的情况为合轴。无气生菌丝体，在有些培养基中出现少量白色或淡灰色茸状物。

2.2 化学分类 化学分类 (chemotaxonomy) 是根据生物细胞中某些特定化学物质的特征对生物个体进行分类的方法, 是放线菌属划分的主要特征之一。1972年, Lechevalier 根据形态和细胞壁化学组成将放线菌分为9个细胞壁类型和4个糖型, 从而奠定了化学分类的基础。从此化学分类被各国放线菌分类学者所接受, 并逐步建立起一整套细胞化学分析方法, 如细胞壁化学组成、枝菌酸、脂肪酸、磷酸类脂、甲基萘醌等分析。随后, 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获得了越来越广泛的应用。

2.2.1 细胞壁化学组分分析: 细胞壁化学组分是放线菌的一个重要的分类学指标。细胞壁化学组分分析在小单孢菌属的分类学研究中一直发挥着重要的作用, 该属是细胞壁型为 II 型、全细胞糖型为 D 型的一类放线菌。

2.2.2 磷酸类脂分析: 研究表明, 放线菌中具有分类学意义的磷酸类脂为: 磷酸酰乙醇胺 (PE)、磷酸酰胆碱 (PC)、磷酸酰甲基乙醇胺 (PME)、磷酸酰甘油 (PG) 和含葡萄糖未知结构的磷酸类脂五类。小单孢菌属的磷酸类酯类型为 P II。

2.2.3 脂肪酸分析: 脂肪酸分析具有快速方便, 自动化程度高等优点, 适用于大量菌株的快速分析。脂肪酸组分一般较为复杂, 分别归属三种类型: 直链、分枝和复杂形式的脂肪酸。小单孢菌属的脂肪酸为 iso-和 anteiso-两种分枝脂肪酸组成的混合物。

2.2.4 醌的分析: 放线菌细胞膜上的醌主要是甲基萘醌, 甲基萘醌分子中的多烯侧链长度和 3 号位碳原子上多烯侧链的氢饱和度具有分类学意义。小单孢菌的醌型较复杂, 包括 MK-9 (H₄)、MK-10 (H₄)、MK-10 (H₆)、MK-12 (H₄)、MK-12 (H₆)、MK-12 (H₈)。

2.2.5 核糖体蛋白图谱分析: 由于核糖体蛋白图谱要比全细胞蛋白电泳图谱简单得多, 因此在放线菌的分类学研究中, 核糖体蛋白图谱分析逐渐受到重视。研究表明, 核糖体蛋白图谱能很好地区分小单孢菌属中的各个种^[5]。

2.2.6 MALDA-TOF 质谱分析: MALDA-TOF 质谱分析作为一种强有力的分析手段已开始用于小单孢菌属的种间相似性分析^[5]。实验结果表明对同一菌株的重复分析所得的质谱值相似性在 70% 以上, 但不同的菌株所得的质谱值相似性却十分低, 仅为 0 ~ 42%。该结果与 16S rRNA 序列分析结果一致。

小单孢菌属与相关菌属不同特征的比较情况见表 2。

表 2 小单孢菌属与相关菌属不同特征的比较情况

	形态特征				化学指征		
	有无气生菌丝	孢子个数	孢子活动性能	细胞壁类型	酰基类型	全细胞糖型	磷酸类脂类型
<i>Micromonospora</i>	无	单个	较差	II	Glycolyl	D	P II
<i>Thermoactinomyces</i>	有	单个	较差	III	ND	C	ND
<i>Thermomonospora</i>	有	单个	较差	III	ND	B/C	ND
<i>Saccharomonospora</i>	有	单个	较差	IV	Acetyl	A	P II
<i>Kineosporia</i>	无	单个	较强	I	ND	A/D	P III
<i>Dactylosporangium</i>	无	3~6个	较强	II	Glycolyl	D	P II
<i>Actinoplanes</i>	无	许多	较强	II	Glycolyl	D	P II
<i>Anpullariella</i>	无	许多	较强	II	Glycolyl	D	P II

续表2

<i>Amorphosporangium</i>	无	许多	较强	II	Glycolyl	D	P II
<i>Pilimelia</i>	无	许多	较强	II	Acetyl	D	P II

2.3 分子分类 分子分类是在分子水平上对生物个体的 DNA、RNA 和蛋白质进行研究分类的方法。目前经常使用的常规分子指征包括 DNA G + C mol%、DNA 同源性分析、16S rRNA 序列分析等。近年来,一些新的序列分析方法已用于小单孢菌属的分类学研究。PCR 技术出现以后,应运而生了一系列新的技术,如 rep-PCR 技术。

2.3.1 常规分子分类方法: DNA 碱基分析 (G + C mol% 测定) 主要用于验证已建立的分类关系是否正确。通常认为:种内菌株间 G + C mol% 相差不超过 3%, 属内菌种间相差不超过 10%, 相差低于 2% 没有分类学意义^[7]。常用的测定方法有熔点法 (T_m 值法) 和高效液相色谱法。小单孢菌的 G + C mol% 为 71% ~ 73%。

一般认为 rRNA 是研究系统进化关系的最好材料。由于 PCR 技术和序列分析技术的发展,16S rRNA 序列分析逐渐成为研究 rRNA 同源性的主要方法。DNA 杂交是研究 DNA 同源性的经典方法, DNA 的杂交值和结合率可反映两碱基序列的相似性。

2.3.2 gyrB 序列分析: *gyrB* 是螺旋酶 B 亚单元的结构基因。Kasai 等^[8] 对小单孢菌属的 15 个种和 4 个亚种进行了 *gyrB* 序列分析, 结果表明除 1 个种的其它种和亚种形成了一个紧密的种群, 这与 16S rDNA 序列分析结果高度一致; 以 *gyrB* 序列分析为基础所获得的分类结果也与 DNA-DNA 杂交所得的结果一致。这说明 *gyrB* 序列分析适用于高 G + C% 含量的革兰氏阳性菌的系统发育分析。

2.3.3 rep-PCR 基因指纹分析: 重复片断 PCR 基因指纹分析 (Repetitive-element PCR genomic fingerprinting, rep-PCR) 是一种以 DNA 为基础的分型方法, 它所采用的分类信息来自于全基因组。该方法具有分辨率高、稳定、重现性好、简单易行等特点, 在一定程度上与 16S rDNA 序列比较结果相一致, 是一种快速而有效的 DNA 指纹技术, 因此可作为一种快速鉴定方法。rep-PCR 基因指纹分析已用于链霉菌属的分析并获得了较好结果^[9]。

3 小单孢菌产生的生物活性物质

20 世纪 60 年代从棘孢小单孢菌 (*Micromonospora echinospora*) 和绛红小单孢菌 (*Micromonospora purpureochromogenes*) 发酵液中分离到强效广谱抗细菌的庆大霉素后, 小单孢菌属作为寻找新抗生素和其他新生物活性物质的重要菌源逐步受到重视。统计数据表明小单孢菌产生的生物活性物质仅次于占放线菌总数量 95% 的链霉菌, 位居稀有放线菌首位^[10]。抗生素作为小单孢菌产生生物活性物质的主体包括以下几大类: 氨基糖苷类、大环内酯类、安莎类、萜环类、多环占吨酮和醌类、寡糖类、肽类、放线菌素类, 其中庆大霉素、利福霉素、新霉素、红霉素 B 和放线菌素 D 都已广泛地应用于临床。小单孢菌能产生多种抑制剂, 如 β -内酰胺酶抑制剂、血管紧张素 I 转化酶 (ACE) 抑制剂、DNA 抑制剂、环核苷酸二酯酶抑制剂、肌浆球蛋白轻链激酶抑制剂、肌浆球蛋白轻链激酶抑制剂、黑色素生物合成酶抑制剂、细菌酪氨酸 tRNA 合成酶抑制剂、脂过氧化酶抑制剂等, 尽管其中大部分酶抑制剂的化学结构和功能与链霉菌的类似, 但这方面的工作仅处于开始阶段, 还有待于进一步深入的研究和开发^[11]。

小单孢菌不仅能产生链霉菌产生的抗生素化学结构类型, 还能产生具有独特化学

结构的生物活性物质^[12]。有些活性物质对肿瘤有一定疗效^[13,14]。这是由于这些物质具有对肿瘤细胞有靶向作用的官能团,能够准确识别肿瘤细胞,同时具有抑制肿瘤细胞生长和杀死肿瘤细胞的官能团,能抑制并杀死肿瘤细胞;有些活性物质能有效抑制真菌^[15,16]。此外,小单孢菌在废物处理中也发挥着重要的作用。一些小单孢菌能降解天然橡胶^[17];还有一些小单孢菌具有很强的分解纤维素的能力。

随着一些微生物来源新药筛选新技术^[18]的广泛应用,大量未发现的小单孢菌属来源的生物活性物质必将被不断发现。

4 结束语

新菌种必然有新的基因,新基因必然产生新的代谢产物。新种的分离与分类工作是放线菌分类学研究及开发新的生物活性物质的基础。另一方面,由于抗生素类药物的不正确使用,许多致病菌对现有的抗生素产生了抗药性现象,这就对新抗生素的研发工作提出了更高的要求。小单孢菌是发现新的生物活性物质的重要菌源,其新种的分离工作越来越受到重视。近年来,国内外学者对小单孢菌选择性分离的研究工作取得了较大的进展,但由于受到分离方法的限制,大部分小单孢菌并未被人们所认识。小单孢菌的选择性分离技术仍然是小单孢菌生物学研究和资源开发中的重大课题,同时这也是药用微生物筛选工作者在大规模的菌种筛选过程中所必须解决的实际问题。小单孢菌的分类学研究具有理论和实际意义,一方面可以建立小单孢菌资源库和信息数据库,以供人们查证;另一方面小单孢菌的分类学研究对于阐明它们的生态作用、寻找和发现新的天然活性物质及其产生菌具有相当重要的意义,不仅为其资源的开发利用提供理论指导;而且为研究放线菌的系统进化关系提供材料和依据,推动放线菌分类学的发展。

参考文献

- [1] 姜成林,徐丽华,许宗雄.放线菌分类学.昆明:云南大学出版社,1995.127.
- [2] Thawai C, Tanasupawat S, Itoh T, et al. *Actinomycetologica*, 2004, **18**: 8~14.
- [3] Thawai C, Tanasupawat S, Kudo T, et al. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, **55**: 417~422.
- [4] Hirsch P, Mevs U. *Systematic and Applied Microbiology*, 2004, **27** (2): 166~174.
- [5] Reiner M, Joachim M, Wibke K, et al. *Systematic and Applied Microbiology*, 2005, **28** (4): 328~339.
- [6] Martha E T, Reiner M K, Pedro F M, et al. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, **55**: 877~880.
- [7] Stackebrandt E, Liesack W. *Nucleic Acids and Classification Systematics*. In: Goodfellow M, O'Donnell A G. ed. *Handbook of new bacteriasystematics*. London: Academic Press Ltd, 1993.
- [8] Kasai H, Tamura T, Harayama S, et al. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, **50**: 127~134.
- [9] 张建丽,刘志恒.微生物学报,2004, **44**: 281~285.
- [10] Ameriga L, Linda C, Giorgio T, et al. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2000, **78**: 399~405.
- [11] 程元荣,黄威.国外医药抗生素发分册,1998, **11** (6): 407~418.
- [12] 程元荣,郑卫.中国抗生素杂志,2002, **27** (10): 632~640.
- [13] Wang H, Yeo S L, Xu J, et al. *Journal of Natural Product*, 2002, **65** (5): 721~724.
- [14] He H, Ding W, Valerie S, et al. *Journal of the American Chemical Society*, 2001, **123**: 5362~5363.
- [15] Beom S K, Surk S M, Byung K H, et al. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1999, **47**: 3372~3380.
- [16] Shafiee A, Hamis G., Motimeddi M, et al. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2001, **11**: 237~242.
- [17] Tomasi G, Kemdrpsell D, Reiner M, et al. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, **150**: 179~188.
- [18] 文孟良,李铭刚,吴少华,等.微生物学通报,2003, **30** (5): 142~144.