

厌氧微生物研究的新进展

凌代文

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

厌氧微生物是整个微生物世界的一个重要组成部分。厌氧微生物绝大多数为细菌, 极少数是放线菌, 极少数是枝原体, 厌氧真菌尚见于个别的报道。厌氧微生物在自然界分布广泛。人类生活的环境和人体本身就生存有种类众多的厌氧微生物, 它们与人类的关系密切。然而由于厌氧微生物的分离和纯种培养的困难, 研究厌氧微生物的技术和方法进展又相当缓慢, 致使人类对厌氧微生物的认识和利用远远落后于对好氧和兼性厌氧微生物的研究工作。直到近二十多年随着厌氧操作技术的不断完善, 厌氧微生物研究方法的不断改进, 尤其近十多年来许多新技术和方法的应用, 致使厌氧微生物学取得很大的进展, 获得了丰硕的成果。发现了众多种类的厌氧微生物, 它们在自然界不仅生存于一般的常温的无氧和少氧环境中, 最近尚发现有生存于高温环境最适生长温度为 100—103℃ 甚至有高达 105℃ 的超嗜热专性厌氧细菌, 亦发现有能生长在极冷的嗜冷厌氧菌, 尚发现有能在 22—25% 盐浓度中生长的专性厌氧发酵的嗜盐菌。涌现出众多的新目、新属和新种。某些已知的属种分类位置也有很大变动。尤其是现已明确厌氧微生物在生物进化中系统发育的特殊地位更显示出它们的重要性。厌氧微生物可利用的基质极为广泛, 包括了自然界各种各样含氮和不含氮的有机物及 CO₂ 等。它们在氮和碳等元素地球生物化学大循环中起着很重要的作用。厌氧微生物在各方面应用所进行的广泛而深入的研究, 也开阔

了人们对丰富多彩的厌氧微生物世界的认识, 揭示了厌氧微生物广阔的应用前景。

厌氧微生物涉及面广。现就厌氧微生物的分类及其在生物系统发育中的地位以及厌氧微生物的重要类群研究的新进展概要地综述如下。

1 厌氧微生物的分类及其在生物系统发育中的地位

厌氧微生物中绝大多数是细菌, 极少数为放线菌, 极少数是枝原体, 个别的属于真菌。目前所知有研究者从动物的瘤胃中分离到着生鞭毛的属于藻状菌纲 (Phycomycetes) 的厌氧真菌。也有极个别报道厌氧消化器中也存在有厌氧真菌^[1-4]。

枝原体 (mycoplasmas) 这一俗名是指在表型上比一般细菌小, 缺乏细胞壁的一大群原核生物。因其特征分类学上将其置于柔膜菌纲 (Mollicutes)。厌氧的枝原体发现于牛羊的瘤胃内, 原作为柔膜菌纲下的一个属。从营养、生化、血清和基因组的资料分析, 表明厌氧枝原体与兼性厌氧的枝原体不相同。在分类上现已将它们升为“目”的位置——厌氧原体目。其主要的科属列如下^[5,6]。

厌氧原体目 (Anaeroplasmatales)

厌氧原体科 (Anaeroplasmaceae)

厌氧枝原体属 (*Anaeroplasma*)

无甾醇枝原体属 (*Asteroleplasma*)

1994-06-08 收稿

以上属内的成员目前均分离自牛的瘤胃。

厌氧细菌和放线菌在 Bergey 氏细菌鉴定手册第八版(1974)^[6]总计有 45 属。在 Holdeman 等的厌氧菌实验室手册第四版(1977)^[7],也即国内不少人引用的《VPI》手册中归纳的厌氧细菌共列入 30 个属。而在新版的 Bergey 氏系统细菌学手册^[2-4](1984—1989)中列入的厌氧菌已超过 100 属,有 500 多个种,最近几年报道的不少新属和新种尚未能编入。厌氧菌的分类工作不仅由于厌氧操作技术的改进表现为量的增长,而且因许多现代的新技术方法在厌氧菌分类研究上的应用更显示出在质上的飞跃变化。尤其近十多年来分子生物学和遗传学研究的技术方法: G + Cmol%、DNA/DNA 和 DNA/rRNA 杂交技术和 16SrRNA 寡核苷酸序列分析法等的应用,使厌氧菌分类研究提高到分子生物学的水平,并从遗传学的角度探索厌氧菌各类群之间的亲缘关系及其在生物进化中系统发育的地位。

Woese 氏实验室于 1976 年开始应用 16S rRNA 寡核苷酸序列分析法对微生物中有代表性的 60 个种进行了实验,发现其中产甲烷细菌与其它类群菌明显不一。以后他们又扩大了研究范围,也使更多的研究者应用这一方法寻求在微生物世界建立一个自然发育系统,也导致了古细菌界的建立^[8]。Woese (1987)^[9]的论述中又概括了大量的研究资料,绘制了原核生物和真核生物的 16S rRNA 寡核苷酸的序列谱。经分析比较古细菌、真细菌和真核生物按其综合系数各自成为一群。古细菌与典型的真细菌不同之处还显示出它们具有独特的细胞结构和特有的辅酶等性状。它们既不能归属于真核生物,也不属原核生物,而是构成一个新的古细菌分支。研究结果表明在自然系统发育史上生命是按遗传的三条干线即古细菌、真细菌和真核生物进化的。三条干线的发源根基来自一个共同的祖先,而古细菌离共同的祖先较之真细菌和真核生物要近得多。古细菌包括专性厌氧的产甲烷细菌、极端嗜盐细菌和嗜酸嗜热细菌。它们生存的环境正是生命起源的环境条

件。这与地球曾是厌氧的和生命开始出现于厌氧时期的理论是相吻合的。微生物是整个生物界起源最早生物,而厌氧微生物是地球处于厌氧状况下发展起来的最早生命体。好氧菌是地球逐渐积累有氧的条件下由部分厌氧菌长期地适应环境进化而来的。为了研究微生物在进化中的关系,探索生命起源的源头,构建生物界完整的系统发育图谱,很显然对厌氧微生物的研究占有极重要的地位,其意义也是重大的。

2 性状独特的古细菌和极端嗜热的真细菌

2.1 古细菌的初始代表——产甲烷细菌

产甲烷细菌是众所周知的一类有代表性的严格厌氧的古细菌。能利用 H_2 、 CO_2 、甲酸、乙酸、甲醇和甲胺类等基质生成甲烷。其细胞壁结构和组分与真细菌截然不同:无胞壁酸,含假胞壁质。细胞膜主要成分为聚类异戊二烯或是其甘油醚。细胞内含有独特的辅酶 M、 F_{420} 、 F_{430} 和甲烷蝶呤、甲烷呋喃等。

在 1979 年前产甲烷细菌主要以形态和生理性状为分类的依据列入一个甲烷细菌科,科以下按形态分为三属,共九个种^[10]。1979 年 Balch 和 Woese 等^[11]根据 16S rRNA 碱基序列的同源性大小将甲烷细菌分为 3 目、4 科、7 属、13 种。此分类法因基于 13 种 17 个菌株的分析,对以后陆续发表的新种远不相适应。由 Boone 提议并在 1987 年系统细菌学国际委员会产甲烷细菌分类学分会的会议上讨论确定的描述新种的最低标准特征,除了包括细胞和菌落形态、培养特征、代谢和合成基质,最适生长温度和 pH,适宜的盐及 G + Cmol% 等以外,尚推荐应用 DNA/DNA 杂交, RNA 序列分析,蛋白指纹印和电子显微镜等技术。为确定一个新种的分类位置,有的实验则是必须的^[12]。例如高温甲烷属中近期报道有 2 个种 *Methanothermus fervidus* 和 *M. sociabilis*。按 16S rRNA 分类法与甲烷杆菌科的其它成员比较 S_{AB} 为 0.38,不能归入此科,而另列一新科,但它们和甲烷杆菌科又同属于一个目——甲烷杆菌目^[13]。

在 Bergey 氏系统细菌学手册新版第三卷

(1989), 产甲烷细菌已列有 3 目、6 科、13 属, 43 种。在此以后又陆续报道了一些新属新种。由 Garcia^[13] 归纳及近期的报道^[14] 又汇集为 3 目、7 科、20 属和 70 多种, 列表如下:

目 I 甲烷杆菌目 (Methanobacteriales)

科 1 甲烷杆菌科 (Methanobacteriaceae)

属 1 甲烷杆菌属 (*Methanobacterium*) 12 个种。

属 2 甲烷短杆菌属 (*Methanobrevibacter*) 3 个种。

属 3 甲烷球形菌属 (*Methanosphaera*) 2 个种。

科 2 高温甲烷菌科 (Methanothermaceae)

属 1 高温甲烷菌属 (*Methanothermus*) 2 个种。

目 II 甲烷球菌目 (Methanococcales)

科 1 甲烷球菌科 (Methanococcaceae)

属 1 甲烷球菌属 (*Methanococcus*) 8 个种。

目 III 甲烷微菌目 (Methanomicrobiales)

科 1 甲烷微菌科 (Methanomicrobiaceae)

属 1 甲烷微菌属 (*Methanomicrobium*) 1 个种。

属 2 甲烷叶状菌属 (*Methanolacinia*) 1 个种。

属 3 甲烷螺菌属 (*Methanospirillum*) 1 个种。

属 4 产甲烷菌属 (*Methanogenium*) 6 个种。

属 5 甲烷袋形菌属 (*Methanoculleus*) 4 个种。

科 2 甲烷八叠球菌科 (Methanosarcinaceae)

属 1 甲烷八叠球菌属 (*Methanosarcina*) 7 个种。

属 2 甲烷叶菌属 (*Methanolobus*) 3 个种。

属 3 甲烷拟球菌属 (*Methanococcoides*) 2 个种。

属 4 甲烷嗜盐菌属 (*Methanohalophilus*) 5 个种。

属 5 甲烷毛状菌属 (*Methanosaeta*) 2 个种。

属 6 甲烷丝菌属 (*Methothrix*) 1 个种。

属 7 甲烷嗜盐菌属 (*Methanohalobium*) 1 个种。

属 8 盐甲烷球菌属 (*Halomethanococcus*) 2 个种。

科 3 甲烷盘菌科 (Methanoplanaceae)

属 1 甲烷盘菌属 (*Methanoplanus*) 2 个种。

科 4 甲烷微粒菌科 (Methanocorpusculaceae)

属 1 甲烷微粒菌属 (*Methanocorpusculum*) 5 个种。

Boone (1993)^[15] 所列并提议的产甲烷菌的分类表中(表 1)对产甲烷菌的分类又有些变动。产甲烷菌和它的极端嗜盐菌、嗜热枝原体及某些极端嗜热的非产甲烷菌包括在广义古细菌界“Euryarchaeota”。由于 Winkler 和 Woese 等提出一个高于界 (Kingdom) 的新分类单位称之为域 (domain)^[16,17], 将所有的生物分为三个域, 除真核生物 (Eucarya) 一域外其它二域即细菌 (Bacteria) 和古细菌 (Archaea)。真细菌包括蓝细菌在内, 古细菌包括所有的古细菌各类群。产甲烷菌置于古细菌域, 也可称广义古细菌界。在其下又分为 5 个目。除上述的甲烷杆菌目、甲烷球菌目、甲烷微菌目外, 甲

烷八叠球菌科升为“目”的位置, 其下包括有 2 个科: 甲烷八叠球菌科和甲烷毛状菌科。甲烷丝菌属并入甲烷毛状菌属内。此外 Burggraf 等^[18] 发现一新菌, 建立了一个新目——火热产甲烷菌目 (Methanopyrales)。

产甲烷细菌是有机物厌氧降解食物链的最后一类微生物, 位于自然界碳循环厌氧生物链的末端。产甲烷细菌能利用的基质大多为最简单的一碳和二碳化合物。其利用甲醇和甲胺基质以及利用乙酸形成甲烷的途径早已有报道, 并获得验证。 H_2 和 CO_2 是大多数产甲烷菌可利用的底物, 氧化 H_2 将 CO_2 还原为 CH_4 。随着对产甲烷细菌甲烷形成研究的深入和产甲烷细菌中许多辅酶的相继发现对 CO_2 还原转化为 CH_4 的机理越来越明确。Jone 等近年来提出嗜热自养甲烷杆菌中 CO_2 还原为 CH_4 的途径, 他们发现有三种辅酶作为 C_1 的载体。即 MFR (甲烷呋喃)、MPT (甲烷蝶呤) 及 CoM (辅酶 M)。最后由 $CH_3-S-CoM$ 还原酶系统催化还原成 CH_4 ^[19,20]。

2.2 极端嗜热的厌氧菌

2.2.1 异形嗜热菌目 (Thermoproteales)

在古细菌中作为两条主线之一的是极端嗜热的分支。根据 16S rRNA 杂交和 16S rRNA 序列分析的结果显示此分支是以专性厌氧的异形嗜热菌目和兼性厌氧的叶硫菌目 (Sulfolobales) 为代表的。这两目依赖 DNA 的聚合酶相似性也说明它们在系统发育上的密切关系^[21]。

异形嗜热菌目细菌是革兰氏阴性专性厌氧菌, 生成杆、盘形或球状不同大小的细胞。最适生长温度为 85—105℃。一般在 60℃ 下未见生长, 有些菌株在 80℃ 下就不能生长。这样的极端嗜热细菌称之为“超嗜热菌” (hyperthermophiles), 以区别于较低适宜生长温度的其它嗜热菌。异形嗜热菌目在分类上包括 2 科 7 属 14 个种^[22]。

科 I 异形嗜热菌科 (Thermoproteaceae)

细胞形状不一, 可化能自养, 以分子氢还原硫产生 H_2S 而获得能量, 以 CO_2 为碳源。

表1 产甲烷细菌的分类

目 科 属 种	目 科 属 种
甲烷杆菌目 (Methanobacteriales) 甲烷杆菌科 (Methanobacteriaceae) 甲烷杆菌属 (<i>Methanobacterium</i>) 10 个种 ^a 甲烷热杆菌属 (<i>Methanoshthermobacter</i>) 2 个种 甲烷短杆菌属 (<i>Methanobrevibacter</i>) 3 个种 甲烷球形菌属 (<i>Methanosphaera</i>) 2 个种 高温甲烷菌科 (Methanothermaceae) 高温甲烷菌属 (<i>Methanothermus</i>) 2 个种 甲烷球菌目 (Methanococcales) 甲烷球菌科 (Methanococcaceae) 甲烷球菌属 (<i>Methanococcus</i>) 4 个种 ^a 甲烷热球菌属 (<i>Methanoshthermococcus</i>) 1 个种 ^b 甲烷高热球菌科 (Methanocaldococcaceae) ^a 甲烷高热球菌属 (<i>Methanocaldococcus</i>) 1 个种 ^a 甲烷火热菌属 (<i>Methanohalobium</i>) 1 个种 甲烷微菌目 (Methanomicrobiales) 甲烷微菌科 (Methanomicrobiaceae) 甲烷微菌属 (<i>Methanomicrobium</i>) 1 个种 甲烷叶状菌属 (<i>Methanolacinia</i>) 1 个种 产甲烷菌属 (<i>Methanogenium</i>) 3 个种	甲烷微菌科 (Methanomicrobiaceae) (续) 甲烷盘菌属 (<i>Methanoplanus</i>) 2 个种 甲烷袋形菌属 (<i>Methanoculleus</i>) 3 个种 ^a 甲烷囊菌属 (<i>Methanofollis</i>) 1 个种 甲烷微粒菌科 (Methanocorpusculaceae) 甲烷微粒菌属 (<i>Methanocorpusculum</i>) 4 个种 ^b 甲烷螺菌科 (Methanospirillaceae) 甲烷螺菌属 (<i>Methanospirillum</i>) 1 个种 甲烷八叠球菌目 (Methanosarcinales) 甲烷八叠球菌科 (Methanosarcinaceae) 甲烷八叠球菌属 (<i>Methanosarcina</i>) 5 个种 甲烷叶菌属 (<i>Methanobolus</i>) 4 个种 甲烷拟球菌属 (<i>Methanococcoides</i>) 1 个种 甲烷嗜盐菌属 (<i>Methanohalophilus</i>) 2 个种 甲烷盐菌属 (<i>Methanohalobium</i>) 1 个种 ^a 甲烷盐渍菌属 (<i>Methanosalsus</i>) 1 个种 ^b 甲烷毛状菌科 (Methanosetaeaceae) 甲烷毛状菌属 (<i>Methanoseta</i>) 2 个种 ^a 火热产甲烷菌目 (Methanopyrales) ^b 火热产甲烷菌科 (Methanopyraceae) 火热产甲烷菌属 (<i>Methanopyrus</i>) 1 个种

^a“a” 新目, ^b“b” 新科, ^c“c” 新属

异形嗜热菌属 (*Thermoproteus*) 2 个种。

火盘菌属 (*Pyrobaculum*) 2 个种。

丝状嗜热菌属 (*Thermofilum*) 2 个种。

科 II 硫还原球菌科 (Desulfurococcaceae)

球形菌, 利用蛋白胨, 肽或碳水化合物, 以硫呼吸或发酵。

硫还原球菌属 (*Desulfurococcus*) 3 个种

嗜热葡萄球菌属 (*Staphylothermus*) 1 个种

火盘网菌属 (*Pyrodictium*) 3 个种

嗜热盘菌属 (*Thermodiscus*) 1 个种

2.2.2 嗜热球菌目 (Thermococcales)^[23]

厌氧嗜热球形菌, 它们生存于海洋或陆地含硫质的场所。可利用肽类、酵母膏或蛋白、氨基酸类等作为碳源。元素硫常可刺激其生长, 并形成 H_2S , 但 *T. stetteri* 这个种除外。对这个种而言, 在缺硫情况下酵母膏可使其生长。该目的主要特征见表 2。

根据 *T. celer* 的 16S rRNA 的序列及 *T. celer*、*P. woesei* 和分离物 ANI 的 rRNA-DNA

杂交所建立的关系, 嗜热球菌目处于古细菌的主要分支中最低最短的线上。而与产甲烷菌、嗜热枝原体 and 嗜盐细菌目等古细菌相近^[24]。

2.2.3 嗜热外袍菌目 (Thermotogales)

是一群极端嗜热的独特的厌氧微生物。根据 Achenbach 和 Woese(1987)^[25]等 16S rRNA 序列分析的系统发育树图谱上在真细菌界中它处于最慢进化线上, 最深的一个分支。Bachleitner 等(1989)^[26]对比分析了真细菌的 DNA 序列建立的系统发育树与以上的结果是很一致的。这个目的共同特征如下: 嗜热厌氧, 革兰氏阴性无芽孢、杆状发酵性的真细菌; 在其肽聚糖中不含有二氨基庚二酸, 对溶菌酶敏感, 分子氢抑制其生长, 在类脂物中存在不寻常的长链二羧酸的脂肪酸。此目仅有一个代表性的科——嗜热外袍菌科 (Thermotogaceae), 包含有三个属: *Thermotoga*、*Thermosiph* 和 *Feroidobacterium*^[27]。

嗜热外袍菌目的菌分布广泛, 可能是世界

表 2 嗜热球菌目成员的主要特征^[24-27]

	GC 含量 (mol%)	生长温度(℃)		最适 NaCl 浓度 (g/L)	碳源
		最适	最高		
<i>Thermococcus</i> (嗜热球菌属)					
<i>T. celer</i>	57	88	>93	38—40	肽类、蛋白类
<i>T. lisoralis</i>	38	85—88	96—98	18—65	肽类
<i>T. stetteri</i>	50	75	98	25	肽类、氨基酸、淀粉
<i>Pyrococcus</i> (火球菌属)					
<i>P. furiosus</i>	38.3(39.8)°	100	103	15—35	肽类、蛋白类、淀粉、麦芽糖
<i>P. woesei</i>	38	100—103	105	30	肽类、淀粉
分离物 AN1	ND	75	ND	3	肽类

性的。它们在活跃的地热区域繁衍,生长在两个不同的小生境:深海和浅层海洋的湿热系统以及大陆的硫质低盐的喷泉处,至今已知的仅从高温(55—100°C)和微酸到碱性的 pH(5—9)的生境样品中分离到它们^[22-24]。

2.2.4 嗜热厌氧菌属和嗜热杆菌属及其它未定位的嗜热厌氧解糖细菌的发现

嗜热厌氧菌属(*Thermoanaerobacter*)和嗜热杆菌属(*Thermobacterium*)的属名首先分别由 Wiegel 和 Ljungdahl^[31]及 Zeikus 等^[34]提出用以描述嗜热厌氧的革兰氏阳性无芽孢杆菌。它们能发酵糖,基本产物是乙醇和乳酸。近十年来 Weimer 等^[35,36]、Schmid 和 Kondratieva 等^[37,38]又陆续分离到属于这两个属的许多菌株。它们分离自热泉和其它多样的热环境,最适生长温度范围 60—70°C。可利用多种基质,包括木聚糖、淀粉、纤维二糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖和葡萄糖。解糖后生成乙醇和/或乳酸,尚有少量 H₂、CO₂ 和乙酸。其 DNA 的 GC 含量为 30—32mol%。根据 DNA/DNA 杂交和 16S rRNA 序列分析的材料,它们与其相似的生芽孢的种在分类上进行了新的组合。在本文梭菌属一节中还将论述有关此问题。

3 极端和中度嗜盐的厌氧发酵及化能异养菌的发现及新科属的建立

在极高盐份的水体(如盐湖、死海)沉积物中由于含溶解氧少,而可利用的有机物通常很丰富,在这样的生境无疑生存着众多的厌氧嗜

盐类群细菌。然而目前对此生境中有机物厌氧降解过程及其菌类相对说仍知之甚少。

1983 年 Zeikus 等^[39]首次描述了分离自美国犹他州大盐湖—专性厌氧极端嗜盐的发酵细菌。在此之后又陆续发现中度嗜盐的专性厌氧化能异养的五种种分类归入三个新属内。

3.1 嗜盐厌氧菌属(*Haloanaerobium*)

属内一个种 *H. praevalens*, 即由 Zeikus 首次描述的嗜盐厌氧发酵菌,杆状,可生长在 3—25% 盐份中,最适浓度为 13%。

3.2 嗜盐拟杆菌属(*Halobacteroides*)

现报道有二个种。盐生嗜盐拟杆菌(*H. halobius*),一细长的杆形运动厌氧菌,可生长在 8—16% 盐度中^[40],并显示产生抗热的内生芽孢^[41]。

乙基乙酰嗜盐拟杆菌(*H. acetoehtylicus*),短杆形运动厌氧菌,生长在 5—22% 盐度中,最适生长盐度为 10%^[42]。

3.3 生孢嗜盐菌属(*Sporohalobacter*)

现有二个种(*S. lortetii* 和 *S. marismortui*),前者为可运动的杆菌,生成的内生芽孢末端附有一气泡。原菌初命名为梭菌属的种,后来又重新定为生孢嗜盐菌属的种。要求生长的盐度 6—12%。后者也是可运动的杆菌,但其产生的芽孢不附有气泡,生长适宜盐浓度为 3—12%^[43]。

以上 3 属 5 个种的 DNA 的 GC 含量均低(范围为 27—32mol%),其细胞壁均是革兰

氏阴性型的。对于它们之间及与其它类群细菌间的关系已应用 16SrRNA 寡核苷酸序列分类法予以阐明。除了乙基乙酰嗜盐拟杆菌外,所有菌株经上法分析结果表明它们都是真细菌,并形成一族群,因而提议建立一嗜盐厌氧菌科(Haloanaerobiaceae)^[44,45]。

4 生有芽孢的厌氧菌属种增多,并打破了分类上以芽孢的有无划分属界

生芽孢的革兰氏阳性厌氧菌主要是梭菌属(*Clostridium*)和能还原硫酸盐和亚硫酸盐为 H_2S 的脱硫肠状菌属(*Desulfotomaculum*) (5个种)以及能解糖的八叠球菌属(*Sarcina*)。

梭菌属细菌的细胞大多为宜或稍弯的杆菌,某些种也有形成长丝体者。通常一个细胞仅生成一个芽孢,但也有个别种可形成二个芽孢。Horn 从老鼠盲肠中分离到能形成两个芽孢的新种,命名为二孢梭菌(*C. disporicum*)^[46]。包括在这个属内的种数相当多,迄今已成为原核微生物中种数最多的细菌属。在 Bergey 氏系统细菌学手册新版^[3]内列有 83 个种。该手册发表后陆续又报道至少 25 个新种。近 10 年来报道的新种就有 50 种之多,新种中能分解纤维素的占相当大的比例^[44]。

梭菌属可利用的基质极为广泛,包括了自然界各种各样含氮和不含氮的有机物以及 CO_2 , 大多数种是化能异养型的,也有极少数种是以 CO_2 为碳源营化能自养生活的。例如 Wiegell 等^[47]分离到的嗜热自养梭菌(*C. thermoautotrophicum*)可自养地在 H_2/CO_2 、 CO 和甲醇- CO_2 生长,而且能利用 H_2 和 CO_2 形成乙酸。

梭菌属细菌可利用的基质、营养需求和代谢活性的多样性及 $G + C$ mol% 范围分为两端 22—34 及 40—55,因而有人建议至少可分为两个属。Tanner^[3]用 rRNA 寡核苷酸的序列法对该属种间的关系进行了分析。

近年来又发现有新的生孢厌氧菌,并提出另建新属。Oren 和 Möller 等^[44,48,49]分别报道了有些具有革兰氏阳性菌的细胞壁结构的生孢厌氧菌,它们在系统发育上与梭菌属有区

别^[50],因而将它们分别定为新属——生孢菌属(*Sporemusa*) (2 个种)和生孢盐细菌属(*Sporohalobacter*) (2 个种)。

Duda 等^[51]还发现每个细胞中生有超过五个芽孢的革兰氏阳性厌氧菌,提出建立厌氧菌属(*Anaerobacter*)。但 Duda 等将这个多孢厌氧菌的 5S rRNA 仅与丁酸梭菌的进行了对比分析。目前对该属的确立仍有异议。

此外原定名为布氏梭菌(*Clostridium bryantii*)的生孢厌氧菌,原与亨氏甲烷螺菌互营共生,后在巴豆酸上适应培养后获得纯培养物。Zhao^[52]根据对该纯培养物的 16SrRNA 的序列分析而将它定为一个新属的第一个种布氏生孢互营菌(*Syntrophospora bryantii*)。

近年来尚发现一些生孢嗜高温解糖的厌氧菌,它们和其它的非生孢的高温厌氧菌从热泉及别的热环境中已分离到,生长温度近 $70^\circ C$ 。Bateson 等^[53]分析了它们的 16SrRNA 序列。Yong-eok Lee 等(1993)对这类菌进行了蛋白质图谱及 DNA-DNA 杂交试验,在分类上他们提出见解,并建议成立嗜热厌氧杆菌属(*Thermoanaerobacterium*)。这个属中包括有生孢的和不生孢的解糖菌。原定名为热硫梭菌(*Clostridium thermosulfurogenes*)也归入该属内,而将原名为嗜热硫氢梭菌(*C. thermohydrosulfuricum*)转至由 Wiegell 等建立的嗜热厌氧细菌属(*Thermoanaerobacter*)^[47]。这样也就打破了以往按生芽孢与否作为划属界的特征^[54]。Cato 和 Stackebrandt (1989)也曾提出有无芽孢不是分类学的标志。形成芽孢的梭菌在系统发育上并非同源,或应置于一科内。当今在分子水平上对这类菌进行分类,生孢菌归于不同的分类单位或生孢和不生孢的厌氧菌划归在一个属也是合乎自然的。

5 拟杆菌科内细菌的分类经历了大的变动

在 Bergey 氏细菌鉴定手册第八版^[6]中原拟杆菌科(Bacteroidaceae)包括有三个属:拟杆菌属(*Bacteroides*)、梭杆菌属(*Fusobacterium*)和纤毛菌属(*Leptotrichia*)及六个亲缘关系未定属。在 Bergey 氏系统细菌学手册

新版^[4]中在拟杆菌科内包括了上述的三个属外, 关系未定属中除脱硫弧菌属归入硫酸还原菌类外, 其它已都作为拟杆菌科的属。它们是: 丁酸弧菌属 (*Butyrivibrio*)、琥珀酸单胞菌属 (*Succinimonas*)、琥珀酸弧菌属 (*Succinivibrio*)、月形单胞菌属 (*Selenomonas*)、毛螺菌属 (*Lachnospira*)。此外还增加了厌氧螺菌属 (*Anaerobiospirillum*)、厌氧弧菌属 (*Anaerovibrio*)、乙酸弧菌属 (*Acetivibrio*)、栉形菌属 (*Pectinatus*) 和沃林氏菌属 (*Wolinella*)。共计 13 个属。

近年来拟杆菌科在分类上又经历了大的修改。当今对于这个科的拟杆菌属而言已限定于高度发酵的在表型上与模式种——脆弱拟杆菌 (*B. fragilis*) 相似的种, 包括: 粪拟杆菌 (*B. caccae*)、吉氏拟杆菌 (*B. distasonis*)、埃氏拟杆菌 (*B. eggerthii*)、屎拟杆菌 (*B. merdae*)、卵 (*B. ovatus*)、便拟杆菌 (*B. sterco-* *ris*)、多形拟杆菌 (*B. thetaioaomicron*)、单形拟杆菌 (*B. uniformis*) 和普通拟杆菌 (*B. vulgatus*)。原拟杆菌属现普遍被认为是在表型和系统发育上不同源的, 除以上种外, 其它的种已分别归入若干新建立的新属中。现将这个属

列入 Bergey 氏系统细菌学手册新版(1986 年) 及其后最近发表的新种重新分类列入新建立的属附简表(表 3) 说明。

从表 3 可看出原拟杆菌属的厌氧菌分类近年来发生的大变动。到目前为止原来这个属的种分类位置现已确定的至少划归 12 个属内。尚有不少种, 如多毛拟杆菌 (*B. capillosus*)、凝固拟杆菌 (*B. coagulans*) 和侵肺拟杆菌 (*B. pneumosintes*) 等 10 多个种一些研究者提出它们不是拟杆菌, 但其分类位置尚不能确定。这也由于近年来细胞壁和膜组分的化学分析、核酸的测定、酶学等方面的技术方法在这属菌分类上广泛应用的结果。

拟杆菌科内沃林氏菌属 (*Wolinella*) 除了 GC 含量外, 它在形态学、生理学及在系统发育上类似于弯曲杆菌属 (*Campylobacter*), 它们是革兰氏阴性直的、弯曲或螺旋形的厌氧杆菌, 以单极毛运动。可利用氢或甲酸作为电子供体, 以富马酸或硝酸盐作为受体, 富马酸也可作为唯一碳源。沃林氏菌的种不氧化或发酵碳水化合物, 但肽类可刺激其生长^[63]。Paster 和 Dewhirst^[67] 应用 16 S rRNA 序列的分析试验沃林氏菌属在系统发育上与有关属的关系。研究证

表 3 原拟杆菌属的种群近年分类地位的变化

种 或 群	现分类地位(属)	建立属的提议者及年代
脆弱拟杆菌和有关种	<i>Bacteroides</i> (按修正定义)	Shah 和 Collins, 1989. ^[59]
非解糖拟杆菌 (<i>B. asaccharolyticus</i>)	<i>Porphyromonas</i>	Shah 和 Collins, 1988. ^[59]
牙龈拟杆菌 (<i>B. gingivalis</i>)		
内芽拟杆菌 (<i>B. endodontis</i>)		
分叉拟杆菌 (<i>B. furcosus</i>)	<i>Anaerorhabdus</i>	Shah 和 Collins, 1986. ^[59]
产琥珀酸拟杆菌 (<i>B. succinogenes</i>)	<i>Fibrobacter</i>	Montgomery <i>et al.</i> 1988. ^[58]
趋巨拟杆菌 (<i>B. hypermegas</i>)	<i>Megamonas</i>	Shah 和 Collins, 1982. ^[59]
多酸拟杆菌 (<i>B. multiacidus</i>)	<i>Mitsuokella</i>	Shah 和 Collins, 1982. ^[60]
小梭拟杆菌 (<i>B. microfusis</i>)	<i>Rikenella</i>	Collins <i>et al.</i> 1985. ^[61]
嗜淀粉拟杆菌 (<i>B. amylophilus</i>)	<i>Ruminobacter</i>	Stackebrandt 和 Hippe, 1986. ^[62]
白蚁拟杆菌 (<i>B. termitidis</i>)	<i>Sebaldella</i>	Collins 和 Shah, 1986. ^[63]
锐利拟杆菌 (<i>B. praecacatus</i>)	<i>Tissierella</i>	Collins 和 Shah, 1986. ^[64]
赭黄拟杆菌 (<i>B. ochraceus</i>)	<i>Capnocytophaga</i>	Leadbetter <i>et al.</i> 1979. ^[65]
产黑拟杆菌 (<i>B. melaninogenicus</i>)	<i>Prevotella</i>	Shah 和 Collins, 1990. ^[66]
口腔拟杆菌 (<i>B. oralis</i>) 及有关种		
解脲拟杆菌 (<i>B. ureolyticus</i>)	<i>Campylobacter</i> 或 <i>Wolinella</i>	Paster 和 Dewhirst, 1988. ^[67]
细拟杆菌 (<i>B. gracilis</i>)		

明沃林氏菌属的种应归入二个不同的但有关的亚群；一亚群包含产琥珀酸沃林氏菌和螺菌属的二个种(*Helicobacter pylori* 和 *H. mustelae*)及弯曲螺菌属的种(*Flexispira rappini*)；另一亚群包括一紧密的簇群：由直沃林氏菌(*W. recta*)和弯曲沃林氏菌(*W. curva*)以及大多数的弯曲杆菌属的种和两个需要甲酸和富马酸的原定名为拟杆菌属的两个种(*B. gracilis* 和 *B. ureolyticus*)。直沃林氏菌和弯曲沃林氏菌与该属模式种产琥珀酸沃林氏菌比较它们平均同源性为 88%，而与弯曲杆菌的这个簇群的平均同源性为 95%，故与弯曲杆菌属更为接近。尽管沃林氏菌属与弯曲杆菌在 DNA 的 GC 含量上差异大，Paster 和 Dewhirst 仍建议直沃林氏菌和弯曲沃林氏菌应为弯曲杆菌属的成员。在革兰氏阴性菌中按 16S rRNA 序列分析，通观沃林氏菌属在系统发育上的位置是不应归属于拟杆菌科内。按序列分析该属和有关菌的某些寡核苷酸的特征是较独特的。Romanuk 等^[68]还提出它们可成为系统发育上的独立类群或“门”。对于沃林氏菌及有关菌的分类地位根据其它的试验特征看来将进一步明确。

6 革兰氏阳性球菌类群分类的大修改

包括在这类群菌的链球菌属(*Streptococcus*)的分类近年来由于分子生物学和化学分类法的应用而有大的修改^[70]，也导致肠球菌属(*Enterococcus*)属和乳酸球菌(*Lactococcus*)两个新属的建立，也即是以前链球菌属的“肠球菌”(或类球菌)群和“乳酸”群的种分别归入以上两个属^[2]。此外以往作为链球菌属的种：汉氏链球菌(*S. hansenii*)，麻疹链球菌(*S.*

morbilorum)及微链球菌(*S. parvulus*)和多态链球菌(*S. pleomorphus*) Schleifer 等^[70]认为它们在遗传上与链球菌属的其它种关系甚远，而应从这个属排除掉。现保留在这个属的有脓脓群(pyogen group)的医学链球菌和草绿色群(Viridans group)的口腔链球菌。即使保留在该属的这些菌也重新进行了定义和命名。

现包括在链球菌属的细菌限定是无芽孢的化能异养菌，它们形成类球或球杆形细胞，排列成对或链。这些营养要求高的菌发酵碳水化合物产生乳酸作为主要产物。虽然链球菌代谢不能利用氧，但可在氧中生长。它们被认为是耐氧的厌氧菌，另外还有些是嗜碳(要求 CO₂)的菌株^[3]。Ludwig 等的工作说明以往认为是专性厌氧的链球菌在遗传上与链球菌不相关^[71]。

过去重要的医学链球菌的特征局限于少数几个容易检测的性状，例如溶血反应和 Lancefield 发现的抗原。仅以溶血和血清学反应的特征使链球菌形成一个不适当的分类系统。近年来综合的应用生理的和遗传的同源性研究已导致对这类菌建立一现代化的分类系统。

肠球菌属(*Enterococcus*)首先是由 Schleifer 和 Kilpper-Bälz 提议^[72]，并接受 Lancefield 的 D 群的粪链球菌(*S. faecalis*)和屎链球菌(*S. faecium*)为该属的种。按化学分类法现又将几个其它的 D 群的链球菌置入这个属，它们是 *Enterococcus avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum* 和 *E. malodoratus*，尚有已报道的五个新种 *E. hirae* 等^[73-76]。

(待续)