

专论与综述

假诺卡氏菌科的分类学研究进展\*

吕志堂 刘志恒

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

关键词 假诺卡氏菌科, 分类学, 研究进展

分类号 Q939.13 文献标识码 C 文章编号 0253 2654(1999)-03-0210-215

假诺卡氏菌科是一类进化上相近、形态各异、胞壁肽聚糖含有 Meso-DAP(内消旋二氨基庚二酸)、全细胞水解液中含有半乳糖和阿拉伯糖、不含枝菌酸的放线菌[1~3]。该科的许多成员都能产生重要的生物活性物质,见表 1[4],包括抗生素、酶类、维生素等。其中如红霉素、利福霉素等已商业化,产生了巨大的社会和经济效益。在当今的生物活性物质筛选中,这类放线菌被看作

是最有希望获得新的抗生素、酶制剂等生物活性物质的资源菌;此外,该科在环境污染的治理上也有广阔的前景,如假诺卡氏菌属的一些种可以将工业上大量产生的甲基硫化物分解为无害物质[5];同时,该科中极少有病原菌,是一类安全的微生物。日前假诺卡氏菌科成员不多,仍有较大潜在的理论 and 实际研究意义。

表1 假诺卡氏菌科中产生生物活性物质的成员

Table with 2 columns: 菌株 (Strain) and 生物活性物质 (Bioactive substance). Rows include Actinopolyspora moriavallis, Amycolata autrophica, Amycolatopsis azutea, Amycolatopsis fastidiosa, Amycolatopsis mediterranei, Amycolatopsis orientalis, Amycolatopsis orientalis subsp. lurida, Amycolatopsis rugosa, Amycolatopsis sulphurea, Kibdelosporangia, and Kibdelosporangium aridum.

\* 国家自然科学基金资助项目 (No.3957002) Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No.3957002) 1998-03-25收稿, 1998-07-20修回

菌株	生物活性物质
<i>Kibdelosporangium aridum</i> subsp. <i>largum</i>	糖脂多肽: kibelins
<i>Kibdelosporangium philippinense</i>	与瑞斯托菌素相关的糖肽类抗生素
<i>Kibdelosporangium aibatum</i>	抗病毒类抗生素, 环病毒素
<i>Pseudonocardia thermophila</i>	促进纤维素降解的物质
<i>Saccharomonospora viridis</i>	热绿啶, 弱的藻类生长刺激因子
	与万古霉素相关的糖肽类抗生素
<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	N-乙酰溶菌酶, 类似胰蛋白酶的丝氨酸蛋白酶, 红霉素(已商业化), 相关的大环内酯, Erythronolide A凝乳酶类似酶
<i>Saccharopolyspora hirsuta</i>	大环内酯, 氨基糖化合物, 环聚酮肽, Nargensin A, arparmycin及衍生物, nodusmicin
<i>Saccharopolyspora hirsuta</i> subsp. <i>kobensis</i>	Sporacin, 相关的氨基多糖类抗生素
<i>Saccharopolyspora</i> sp. strain AC3440	4-deam-ino-4-hydroxyaparamycin
<i>Saccharopolyspora interjecta</i>	糖肽类抗生素的绿多孢素

## 1 假诺卡氏菌科的建立及研究现状

1.1 假诺卡氏菌科的建立 1988年, Embley等人在研究总结了细胞壁化学组分IV型、糖型A、无枝菌酸放线菌类群的16S rRNA序列关系之后, 将在进化关系上具有明显同源性的属归为一个类群, 提出了假诺卡氏菌科(Pseudonocardiaceae)的概念<sup>[6]</sup>。假诺卡氏菌科建立时包括8个属: 放线多孢菌属(*Actinopolyspora*)、无枝菌酸菌属(*Amycolata*)、拟无枝菌酸菌属(*Amycolatopsis*)、干草菌属(*Foenia*)、拟孢囊菌属(*Kibdelosporangium*)、假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)、糖单孢菌属(*Saccharomonospora*)和糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)。

1.2 假诺卡氏菌科的研究现状 1989年 Akimov等建立的假无枝菌酸菌属(*Pseudoamycolata*)归入了此科<sup>[7]</sup>, 后由 McVeigh等转入假诺卡氏菌属<sup>[3]</sup>; 干草菌属唯一的种 *Faenia rectiviegula* 由 Korn-Wendisch 等人转入糖多孢菌属<sup>[8]</sup>, 定名为 *S. rectiviegula*; 此后, Bowen等分析了假诺卡氏菌科中各属间的进化关系<sup>[2]</sup>, 见图1。根据

Warwick等人(1994年)的研究报道, 假诺卡氏菌和无枝菌酸菌属形成交叉的16S rRNA序列进化树状谱(phylogenetic tree pattern), 故二者合并成假诺卡氏菌属一个属<sup>[9]</sup>。

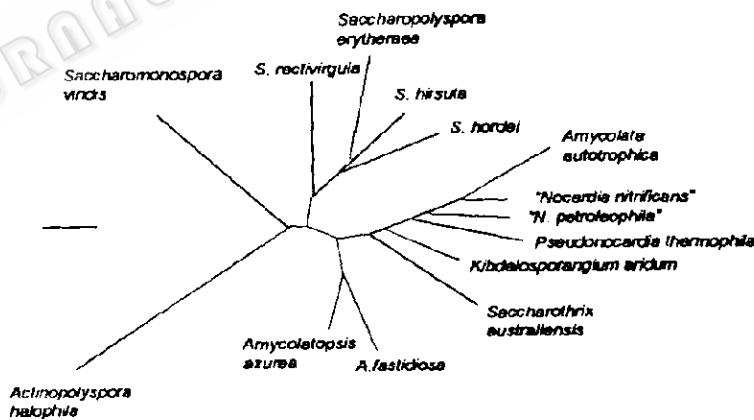


图1 假诺卡氏菌科中各属间的16S rRNA进化树状谱(标尺: 0.002K nuc)

16S rRNA序列分析还表明糖丝菌属(*Saccharothrix*)、放线孢囊菌属(*Actinokinosporea*)、束丝放线菌属(*Actinosynnema*)、库茨勒菌属(*Kutzneria*)、李茨菌属(*Lentzea*)和嗜热卷曲菌属(*Thermocristum*)之间亲缘关系很近, 构成一个假诺卡氏菌科的姊妹群, 但需进一步的序列和遗传进化分析资料才能确定该群能否归入此科。

表2 1988年该科建立以来发表的新(亚)种

(亚)种名	作者, 时间
<i>Pseudoamycolata halophobica</i>	Akimov <i>et al.</i> , 1989
<i>Amycolata alni</i>	Evtushenko <i>et al.</i> , 1989
<i>Saccharopolyspora gregorri</i>	Goodfellow <i>et al.</i> , 1989
<i>Saccharopolyspora hirsuta</i> subsp. <i>kobensis</i>	Lacey, 1989
<i>Saccharopolyspora hordei</i>	Goodfellow <i>et al.</i> , 1989
<i>Saccharopolyspora rectivigula</i>	Korn-Wendisch <i>et al.</i> , 1989
<i>Saccharopolyspora taberi</i>	Korn-Wendisch <i>et al.</i> , 1989
<i>Amycolatopsis methanolica</i>	de Boet <i>et al.</i> , 1990
<i>Saccharopolyspora spinosa</i>	Mertz and Yao, 1990
<i>Actinopolyspora mortivallis</i>	Yoshida <i>et al.</i> , 1991
<i>Kibdelosporagium albatum</i>	Tomita <i>et al.</i> , 1993
<i>Actinopolyspora iraqiensis</i>	Ruan <i>et al.</i> , 1994
<i>Pseudonocardia petroleophila</i>	Warwick, 1994
<i>Pseudonocardia nitrificans</i>	Warwick, 1994
<i>Amycolatopsis coloradensis</i>	Lebeda, 1995
<i>Amycolatopsis japonicum</i>	Goodfellow <i>et al.</i> , 1997
<i>Saccharopolyspora spinosporotrichia</i>	Zhi-Hong Zhou <i>et al.</i> , 1998
<i>Pseudonocardia asaccharolytica</i>	K Reichert <i>et al.</i> , 1998
<i>Pseudonocardia sulfidoxydans</i>	K Reichert <i>et al.</i> , 1998

所以,目前假诺卡氏菌科包括有:放线多孢菌属、拟无枝菌酸菌属、拟孢囊菌属、假诺卡氏菌属、糖单孢菌属及糖多孢菌属等共6个属,有效发表的种39个及亚种6个。其中该科建立以后(1988年至今)发表的新种18个,亚种1个(表2)。

**1.3 有关假诺卡氏菌属描述的修正** 最近, K. Reichert 等对假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia* Henssen 1957)的描述做了修正<sup>[5]</sup>,修正后的描述为:营养菌丝直径0.4~2.0 $\mu$ m分枝或不分枝。有些菌株形成膨大的菌丝片断。有或无气丝。菌丝在不同方向呈细胞状断裂,某些种的菌丝覆盖有高电子密度的外层。孢子大小不等,一般光滑;孢子链顶生芽殖或由基丝、气丝分化而来。不运动。生物化学多样性。某些种可营自养生长,有些菌株可氧化糖类。有些种可将甲基硫化物氧化为硫酸盐。嗜热假诺卡氏菌(*P. thermophila*)可降解纤维素。主要甲基萘醌是MK-8(H<sub>4</sub>)。脂肪酸的组成以*iso*-分枝脂肪酸为主,主要组分是*iso*-C<sub>16,0</sub>分枝脂肪酸。磷酸类脂含有磷脂酰甲基乙醇胺(PME),磷脂酰乙醇胺(PE)和磷脂酰胆碱(PC),不同种之间有差异。胞壁IV型(含有阿拉伯糖,半乳糖和Meso-DAP)。无枝菌酸。DNA的G+

Cmol%为68%~79%。该属成员的16S rRNA序列数据形成一个相关的类群。

## 2 不同分类方法在假诺卡氏菌分类学研究中的应用

由于假诺卡氏菌科是基于胞壁类型等化学特征,结合16S rRNA序列分析结果而形成的分类单位,该科的成员的形态在属间甚至属内均存在较大的差异,因而在此科进行分类学研究时,化学和分子分类方法具有更重要的意义。

**2.1 化学分类** 化学分类(Chemotaxonomy)是放线菌属划分的主要特征之一。目前在假诺卡氏放线菌分类学中经常使用的化学指征包括:细胞壁化学组分、枝菌酸、脂肪酸、磷酸类脂、甲基萘醌、全细胞蛋白及核糖体蛋白电泳分析等。

**2.1.1 细胞(壁)化学组分分析:**1976年, Lechevalier 根据形态和细胞壁化学组成将放线菌分为9个胞壁类型和4个糖型,从而奠定了化学分类的基础。细胞壁化学组分分析在假诺卡氏菌研究中一直发挥着巨大的作用,该科属于胞壁IV型,糖型A的一类放线菌。

**2.1.2 枝菌酸分析:**枝菌酸的测定是诺卡氏菌形放线菌

表3 假诺卡氏菌科的化学特征

属	磷酸类脂类型	脂肪酸组分*	主要甲基萜醌
拟无枝菌酸属	II	S, A, I, M	MK-9 (H <sub>2</sub> , H <sub>4</sub> )
放线多孢菌属	III	S, A, I, M	MK-9 (H <sub>4</sub> )
拟孢囊菌属	II	A, I	ND
假诺卡氏菌属	III/II	S, A, I, M	MK-8 (H <sub>4</sub> )
糖多孢菌属	II	S, A, I	MK-9 (H <sub>4</sub> )
糖单孢菌属	III	S, A, I, M	MK-9 (H <sub>4</sub> )

\* S: 饱和与不饱和脂肪酸, A: *anteiso*-一枝脂肪酸, I: *iso*-一枝脂肪酸, M: 甲基-一枝脂肪酸, ND: 未测定

研究中必不可少的化学指征。无枝菌酸菌属(现划归假诺卡氏菌属)和拟无枝菌酸菌属的建立便是 Lechevalier 等根据枝菌酸的有无, 结合其它化学特征将不含枝菌酸的诺卡氏菌从诺卡氏菌属中划分出来而形成的。假诺卡氏菌科中的成员均无枝菌酸。

**2.1.3 磷酸类脂分析:** 研究表明, 假诺卡氏放线菌中具有分类学意义的磷酸类脂为: 磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰甲基乙醇胺(PME)、磷脂酰甘油(PC)和含葡萄糖未知结构的磷酸类脂(GluNus)等五种。根据其组成可将放线菌分为5个磷酸类脂类型。假诺卡氏菌磷酸类脂组分因属而异, 属PII、PIII两种类型。

**2.1.4 脂肪酸组分分析:** 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。例如, 糖单孢菌属的脂肪酸是由 *iso*-, *anteiso*-, 分枝和直链的系列不饱和脂肪酸组成的混合物; 假诺卡氏菌属中以 *iso*-一枝脂肪酸为主, 主要是 *iso*-C<sub>16:0</sub>, 同时含有 C<sub>16:0</sub> 和 10-甲基-C<sub>16:3</sub> 等组分<sup>[5]</sup>。脂肪酸的链长、双键位置和数量及取代基团在细菌中具有分类学意义。在高度标准化的培养条件下细胞的脂肪酸甲基脂(Fatty acid methyl esters)组分是一较稳定的分类学科。脂肪酸定性分析结果限于属和属以上的分类; 脂肪酸定量分析结果可为种和亚种分类提供有用的基本资料, 但对化学组成有影响的环境因素应严格控制, 此外菌龄等对脂肪酸组成也有影响。

**2.1.5 醌组分分析:** 放线菌细胞膜上的醌主要是甲基萜醌(MK), 甲基萜醌分子中的多烯侧链长度和3位碳原子上多烯侧链的氢饱和度具有分类学意义。除拟孢囊菌属未见报道外, 假诺卡氏菌科多为MK-9(H<sub>2</sub>)或MK-9(H<sub>2</sub>, H<sub>4</sub>), 或MK-8(H<sub>4</sub>)。

假诺卡氏菌科各属的磷酸类脂、脂肪酸和甲基萜

醌的组成见表3<sup>[5]</sup>。

**2.1.6 全细胞蛋白电泳分析及核糖体蛋白图谱分析:** 高度标准化的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)是对密切相关菌株进行比较和归类的有效方法。大量研究证明全细胞蛋白组分和DNA-DNA杂交有高度相关性<sup>[10]</sup>, 此法进行种或种以下分类单位的研究是可行的。

由于全细胞蛋白电泳图谱较为复杂, 核糖体蛋白的图谱用于放线菌分类已开始受到重视。核糖体蛋白图谱已开始用于小双孢菌、链霉菌等的分类研究。目前, 核糖体蛋白作为分类指征有单相凝胶电泳图谱比较核糖体蛋白种类, 双向凝胶电泳(2D-PAGE)测定AT-L30蛋白的相对电泳离率(REM)及氨基酸序列分析三个层次。氨基酸序列分析结果显示假诺卡氏菌科可分为4个群: i) 放线多孢菌属; ii) 糖多孢菌属; iii) 拟无枝菌酸属; iv) 无枝菌酸属, 假诺卡氏菌属, 糖单孢菌属。拟孢囊菌属与无枝菌酸属及假诺卡氏菌属系统进化关系很近。该结果与16S rRNA序列结果<sup>[6,9]</sup>相一致, 同时也支持Warwick无枝菌酸属与假诺卡氏菌属应合并为假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)一个属<sup>[11]</sup>的观点。

除此之外, 同功酶、逆转录酶及陪伴分子(Chaperone)等某些特殊蛋白亦开始用于分类研究, 并证明有分子保守, 方法简便等优越性。

**2.2 分子分类学** 分子分类(Molecular taxonomy)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。目前经常使用的分子指征包括DNA G+Cmol%、DNA同源性分析(DNA-DNA杂交、DNA分型等)及RNA同源性分析(DNA-RNA杂交、16S rRNA序列分析、间隔区序列分析等)等。

**2.2.1 DNA碱基组成分析(G+Cmol%测定):** G+Cmol%主要用于验证已建立分类关系是否正确。通常认为: 种内菌株间G+Cmol%相差不超过3%, 属内

菌株间相差不超过10%，相差低于2%时没有分类学意义<sup>[12]</sup>。常用的测定方法有熔点法(T<sub>m</sub>值法)，高压液相色谱法等。假诺卡氏菌科各属的G+Cmol%在64.2%—79%之间，其中糖单孢菌属、糖多孢菌属和部分假诺卡氏菌属含量较高，在74%以上。

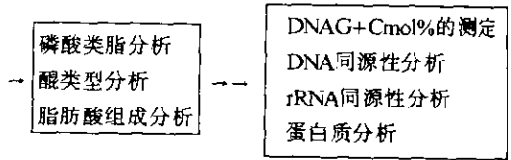
**2.2.2 DNA 同源性分析:** DNA 杂交是研究 DNA 同源性的经典方法，DNA 的杂交值和结合率可反映两基因组序列的相似性；国际系统细菌学委员会规定，DNA 同源性≥70%，杂交分子的热解链温差ΔT<sub>m</sub>≤5℃为细菌种的界限。已经证明，每错配1%，杂交热稳定性降低1%~2.2%<sup>[13]</sup>，但目前还不能确切地将杂交值或结合率转化为基因组序列的相似性。第一代以 DNA 为基础的分型方法是全细胞基因组限制性酶切片段分析(RFLP)，其缺点是 DNA 酶切片段组往往较复杂，难于比较。如果选用专一识别6~8个碱基序列的限制性内切酶，则 DNA 片段数量就会大大减少，这就是低频限制性酶切片段分析(LFRFA)。但是，这样切出的 DNA 片段太大，只能用脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis)分开。LFRFA 被认为是目前分辨率最高的 DNA 分型法<sup>[14]</sup>之一。Ribotyping 分析是将 DNA 酶切以后电泳，然后转移到膜上进行与标记的 rRNA (rDNA) 探针进行杂交的一种方法，它的特点是简便快速。PCR 技术出现以后，应运而生随机扩增多型性 DNA 分析(RAPDA)，DNA 扩增和限制性酶切分析相结合的扩增多型性 rDNA 限制性酶切片段分析(ARDRA)、扩增片段长度多型性分析(AFLP)等。这些技术多用于种水平的研究，在假诺卡氏菌科分类研究中均有广泛应用。

**2.2.3 rRNA 同源性分析:** 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，使得 16S rRNA 甚至 23S rRNA 的序列分析逐渐成为研究 rRNA 同源性的主要方法。但 Yassin 等认为 16S rRNA 序列过于保守，在放线菌定种上受到限制，而杂交更为可靠<sup>[15]</sup>。此外，常应用的还有 16S-23S rRNA 间隔区序列分析等研究方法。假诺卡氏菌科就是建立在 16S rRNA 序列分析基础之上的。

**2.3 假诺卡氏菌的多相分类研究** 多相分类学(Polyphasic taxonomy)可用于描述各种水平的分类单元。原则上，所有基因型的、表型的和系统发育的信息都属于多相分类的范畴。概括地讲，多相分类是传统的表型分类(形态和生理生化特征)、数值分类及化学分

类和分子分类等各种手段的综合应用，其目的是使分类方法更趋于客观合理，更能反映生物间系统进化关系。多相分类被认为是研究各级分类单位的最有效手段。目前假诺卡氏菌的多相分类研究过程可概括如下：

分离菌株 → 形态特征 → 细胞(壁)化学组  
分析(氨基酸和糖类型) → 核苷酸分析 →



### 3 结束语

假诺卡氏菌科分类学研究进展缓慢，1995 年至今共 5 个新种发表(见表 2)。近几年来，我们实验室也开展了假诺卡氏菌的多相分类研究，并从我国土壤中分离出了这类菌，周志宏等发表了新种棘孢丝糖多孢菌(*Saccharopolyspora spinosporatrichia*)<sup>[16]</sup>。

需要指出的是多相分类是纯经验性的，当前没有严格的规章可循；因为各项分类指标和标准都是人为选定的，各种可能的方法原则上对菌株生物学特性产生的影响都是等同的，所以，进行多相分类研究时应包括尽可能多的方法，以减小人为因素的影响。同时，目前的化学分类多是定性的，对于一些模棱两可的结果难以确定，以后研究中应尽量做到分类指征的可重复性。分子分类，目前最高水平仅局限于 16S rRNA(或 rDNA)序列分析，然而它毕竟具有很大的局限性，应逐步选用更广泛核酸与蛋白质序列分析结合化学和其它表型分析才能较为客观地确定其分类地位，反映生物间的进化关系。

### 参 考 文 献

[1] Embley T M, O'Donnell A G, Bostron J et al. J Gen Microbiol, 1988, 134: 953~960.  
 [2] Bowen T, Stackebrandt E, Dorsch M et al. J Gen Microbiol, 1989, 135: 2529~2536.  
 [3] Mc Veigh H P, Munro J, Embley T M. Int J Syst Bacteriol, 1994, 44: 300~302.  
 [4] Embley T M. The family *Pseudonocardiaceae*. In: Balows A, Trüper H G, Dworkin M et al. ed, The Prokaryotes. Berlin: Springer-Verlag, 1992.  
 [5] Reichert K, Lipski A, Pradella S et al. Int J Syst Bacteriol, 1998, 48: 441~449.

- [6] Embley T M, Smida J, Stackebrandt E. *Syst Appl Microbiol*, 1988, 11:44~52.
- [7] Akimov V N, Evtushenko LL, Dobitsa S V. *Int J Syst Bacteriol*, 1989, 39:457~461.
- [8] Kom-Wendisch F, Kempf A, Grund E *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1989, 39:430~441.
- [9] Warwick S, Bowen T, Mc Veigh H P *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1994, 44:293~299.
- [10] Kersters K, Pot B, Dewettinck D *et al.* Identification and typing of bacteria by protein electrophoresis. In: Priest PG, Ramos-Cormenzana A, Tyndall B ed. *Bacterial diversity and systematics*. New York: Plenum Press, 1994.
- [11] Ochi K. *Int J Syst Bacteriol*, 1995, 45:110~115.
- [12] 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.
- [13] Stackebrandt E, Goebel B M. *Int J Syst Bacteriol*, 1994, 44:846~849.
- [14] Tenover F C, Arbeit R D, Goering R V *et al.* *J Clin Microbiol*, 1995, 33:2233~2239.
- [15] Yassin A F, Rainey F A, Gierth D *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1997, 47:983~988.
- [16] Zhi-Hong Zhou, Zhi-Heng Liu, Yu-Dong Qian *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1998, 48:53~58.