

第十章

微生物的分类和鉴定

概念：

微生物分类学：按微生物亲缘关系将其排成多种分类单位或分类群的科学。

从原有的按微生物表型进行分类的经典分类学发展到按它们的亲缘关系和进化规律进行分类(微生物系统学)

分类：将有关个体的大量资料经科学的归纳整理或反映生物进化规律的自然分类系统。

鉴定：检测未知纯种微生物的多种性状特征，查找分类系统进行归类命名。

命名：为新发现的微生物按国际命名法给出一个学名。

第一节 通用分类单元

一、种以上的系统分类单元

(一)7级分类单元

界Kingdom

门Phylum or Division

纲Class

目Order

科Family

属Genus

种Species

(二) 种的概念:

- 种是最基本的分类单位,
- 每一分类单位之后可有亚门、亚纲、亚目、亚科.....

种是一个基本分类单位，是一大群表型特征高度相似、亲缘关系极其接近，与同属内其他种有明显差别的菌株的总称。

这里的种仅仅是指种的模式种或典型种

2. 新种:

权威性的分类、鉴定手册中从未记载过的一种新分离并鉴定过的微生物学

发表文章时，确定为新种，在学名后加sp.nov (species nova)或nov.sp。

3. 种的分类地位举例

表 10-2 3种代表性微生物的分类地位

单元	詹氏甲烷球菌 ^①	大肠埃希氏菌 ^②	八孢裂殖酵母
界	古生菌界(域)(Archaea)	细菌界(域)(Bacteria)	菌物界(Fungi)
门	广古生菌门(Euryarchaeota)	腕细菌门 ^③ (Proteobacteria)	真菌门(Eumycota)
亚门(组)	产甲烷菌组 ^④ (Methanogens)	γ-腕细菌组(γ-Proteobacteria)	子囊菌亚门(Ascomycotina)
纲	甲烷球菌纲(Methanococci)	发酵细菌纲(Zymobacteria)	半子囊菌纲(Hemiascomycetes)
目	甲烷球菌目(Methanococcales)	肠杆菌目(Enterobacteriales)	内孢霉目(Endomycetales)
科	甲烷球菌科(Methanococcaceae)	肠杆菌科(Enterobacteriaceae)	内孢霉科(Endomycetaceae)
属	甲烷球菌属(Methanococcus)	埃希氏菌属(Escherichia)	裂殖酵母属(Schizosaccharomyces)
种	詹氏甲烷球菌(<i>M. jannaschii</i>)	大肠埃希氏菌(<i>E. coli</i>)	八孢裂殖酵母(<i>S. octosporus</i>)
分类系统	《系统手册》(2000年) ^⑤	《系统手册》(2000年)	《Ainsworth 词典》(1983年) ^⑥

注:①是人类第一个测定基因组的古生菌代表(1996年);②“组”(Section),在此相当于亚门;③Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Edition(简称《系统手册》,2000年)[本资料引自"Brook Biology of Microorganisms"第九版(2000年)中的有关报道];④“大肠杆菌”的正式名称;⑤《系统手册》(2000年)中的新名词,相当于革兰氏阴性细菌;⑥Hawksworth, D. L. et al. Ainsworth and Bisby's Dictionary of Fungi (7th ed), 1983

二、学名

名称为两类:

Ø地区性的俗名(**common name**)

大众化, 简明, 不确切, 易重复

Ø学名(**scientific name**): 国际通用

拉丁词: 斜体; 手写时下加下划线

1. 双名法(binominal nomenclature):

林奈创立。此为国际命名法规，即：每一微生物的学名都依属与种而命名

属名+种名加词+（首次定名人）+现定名人+定名年份

属名：拉丁文的名词或用作名词的形容词，字首大写，表示微生物的主要特点，由微生物构造，形状或由科学家命名

种名：为拉丁文形容词，为微生物次要特征，字首小写，为微生物色素、形状、来源或科学家姓名等。

如：*Escherichia coli*

当文章中前面已出现学名时，后面可将属名缩写成一至三个字母。如：*E.coli*

2. 三名法(trinominal nomenclature):

当某种微生物是亚种或变种时

属名+种名+subsp+亚种

如: *Staphylococcus aureus* subsp

3. 有关学名的其他知识

(1) 属名

是表示该微生物主要特征的名词或用作名词的形容词，单数，首字母大写

当前后有两个或多个学名连在一起时，若它们的属名相同，则后面的一个或几个属名可缩写成一个、两个或三个字母，后加一个点

(2) 种名加词

是表示一个物种的次要特征，字母一律小写，

实际工作时，以常遇到确定了属名，但不能确定种名时，进行学术交流或发论文，学名后的种加词可以暂时用“sp.”

或“spp.”

(3) 学名发音

三、亚种以下的分类名词

不受国际命名法规的限制

(一) 亚种: (**subspecies, subsp, ssp**):

指某一明显而稳定的特征与模式种不同的种, 有时称**小种**。

如: **E.coli k12**模式种(野生型)是不需要特

殊aa的, 而实验室变异后, 可从k12获得某aa的缺陷型, 此即称为**E.coli k12**

的

亚种或小种。

(二) 变种

亚种的同义词，已不主张使用

(三) 型 (**form**) :

同种微生物的各种类型。

如：血清型、抗原型（现已作废）

(四) 菌株 (**strain**) :

又称品系：一种微生物的不同来源的纯培养物。

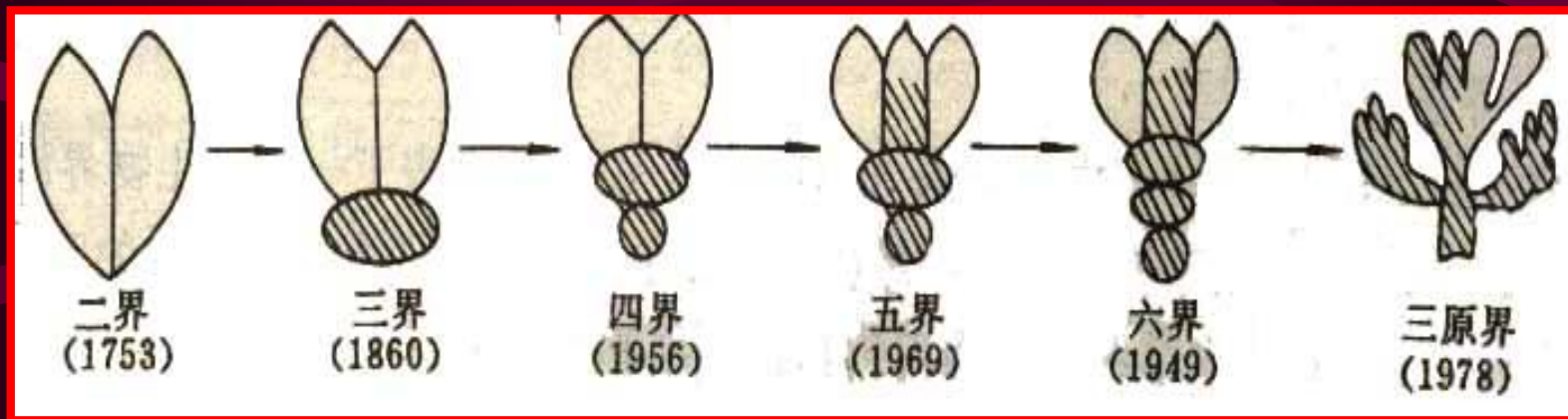
菌株的特性:

- (1) 菌株实为一个物种内遗传多态性的客观反映，其数目无数
- (2) 强调的是遗传型纯的谱系
- (3) 菌株与克隆的概念相同
- (4) 不同菌株间，不作为鉴定用的小性状不同
- (5) 遗传性型的标志，变异后为新菌株
- (6) 菌种后应标以菌株名称
- (7) 名称可随意定

第二节 微生物在生物界的地位

一、生物的界级分类学说

在生物学发展史上，生物的分类经历了：



1. 二界系统：瑞典：林奈

植物界：藻类（光合作用、有细胞壁）

动物界：原生动物（细胞柔软、无细胞壁、
无叶绿体、可运动）

2. 三界系统：德国Haeckel

E.N.Haeckel提出三界系统，在二界上加上原生生物界（主要由一些单细胞生物和无核类组成），此观点直到本世纪初。

3. 四界系统: 1938, Copeland

植物界、动物界、原始生物界（原生动物，真菌，藻类）、菌界（细菌，蓝细菌）

4. 五界系统:

Whittaker (69年) 提出 纵横统一五界学说



图 11-2 Whittaker 的五界系统示意图

纵: 从原核 → 真核单细胞
→ 真核多细胞

横: 从光合营养 → 吸收营养
→ 摄食营养

纵: 反映细胞进化

横: 反映营养方式进化

5. 六界系统:

我国王大耜, 陈世骧等提出, 病毒应单独一界

6. 三总界五界系统:

我国, 陈世骧, 1979

非细胞总界

原核总界 (蓝细菌界, 细菌界)

真核总界 (植物界, 真菌界, 动物界)

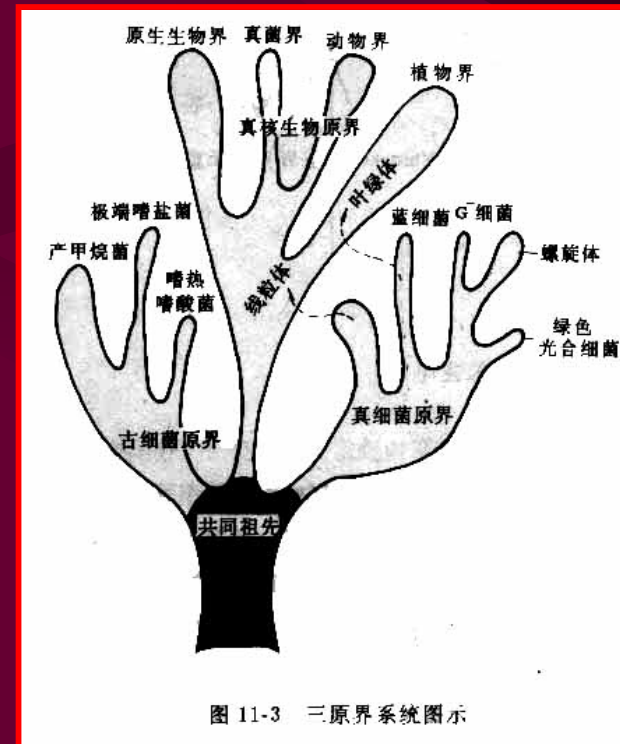
二、三域学说及发展:

(一) 78年Whittaker和Marguilis提出三原界学说

古细菌原界 (产甲烷菌, 极端嗜盐菌, 嗜酸嗜热菌)

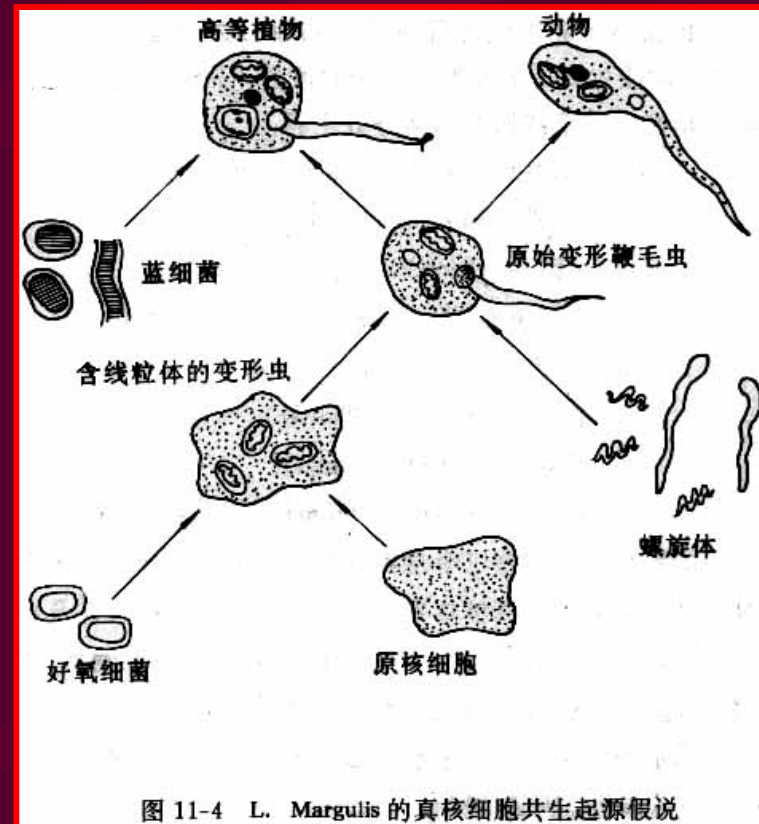
真细菌原界 (蓝细菌, 除古细菌以外许多原核生物)

真核生物界 (原生动物, 真菌, 动植物)



三原界的提出：

1. 理论：70年代, Margulis的“**内共生学说**”认为：进化过程中，一种细胞捕抓了另一种细胞，未消化它，二者形成内共生，产生质的飞跃。
2. 根据：**基于古细菌的发现；16SrRNA碱基顺序的同源性**



(二) 三域学说(Three Domains Theory)

70年代，美国伊利诺斯大学Woese基于16s和18srRNA寡核苷酸序列提出：

域比界高，过去称原界

Ø细菌域（以前称真细菌域）

Ø古生菌域（以前称古细菌域）

Ø真核生物域

内共生假说：蓝细菌和 α -朊细菌内共生成真核微生物（具线粒体和叶绿体）

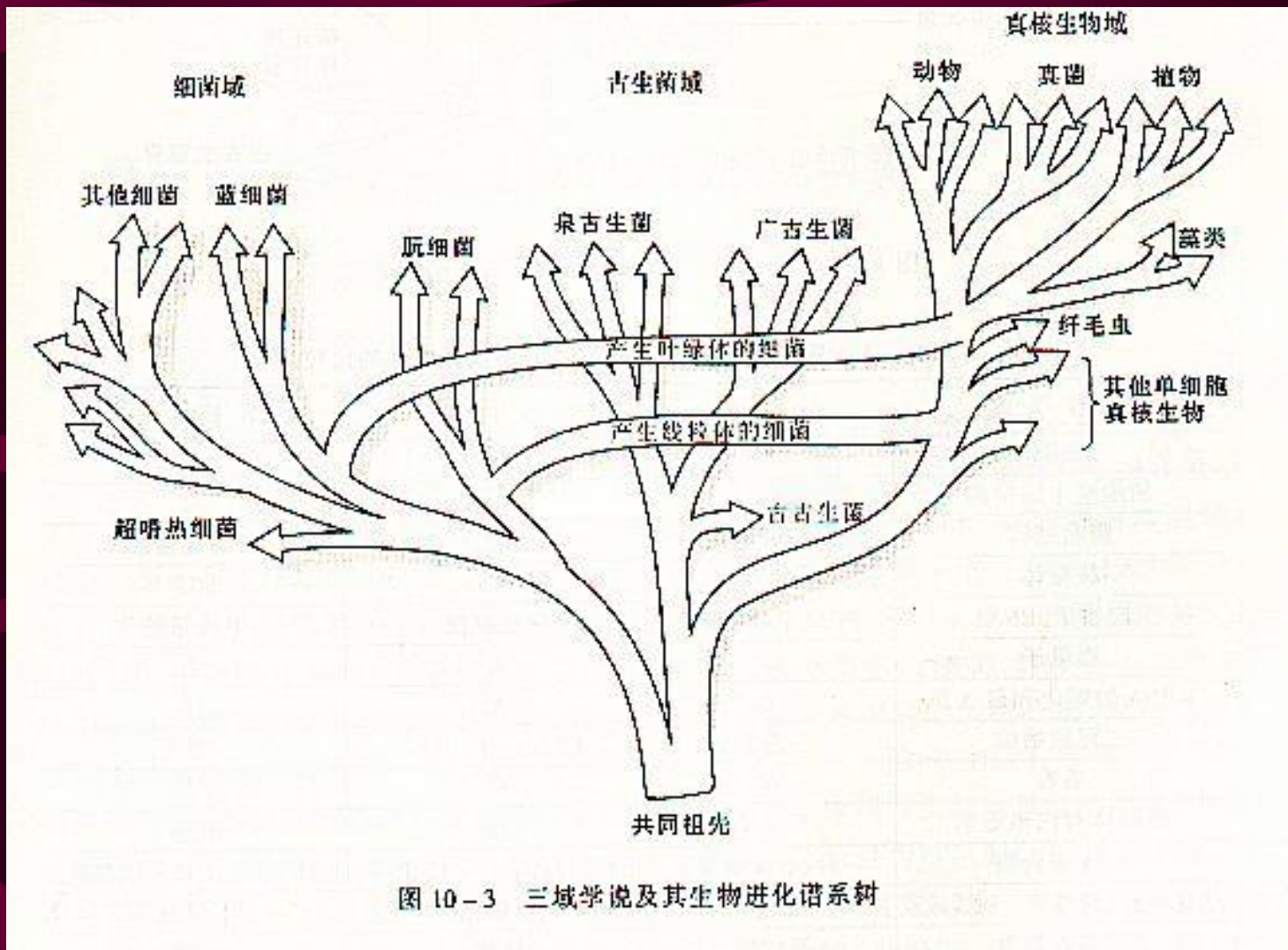


图 10-3 三域学说及其生物进化谱系树

对三域学说的质疑

- 16s或18srRNA的分子进化很难代表整个基因组的分子进化
- 已知许多真核生物的基因组和它们表达的功能蛋白更接近于细菌而非古生菌
- 各种生物全序列测序挑战更大

第三节 各大类微生物的分类系统 纲要

一、Bergey氏原核生物分类系统纲要

1. 《伯杰氏手册》简介

德国 Lehmann 《细菌分类图说》

美国 Bergey 《伯杰鉴定细菌学手册》

前苏联 克拉西尔尼可夫 《细菌与放线菌鉴定》

法国 Prevot 《细菌分类学》

Starr 《原核生物》

《伯杰氏鉴定细菌学手册》

1923年第一版

1948年第六版

1925年第二版

1957年第七版

1930年第三版

1974年第八版

1934年第四版

1994年第九版

1939年第五版

- 由于G+C mol%测定，核酸杂交和16S rRNA寡核苷酸序列测定等新技术引入，使原核微生物分类从表型、实用性鉴定指标为主进入遗传型的系统分类，
- 因此1980年起开始编《伯杰氏系统细菌学手册》简称《系统手册》

《伯杰氏系统细菌学手册》1984-1989（第一版）

1986年第一卷

一般医学上或工业的重要的革兰氏阴性菌

1988年第二卷

除了放线菌之外的革兰氏阳性菌

1989年第三卷

古细菌、蓝细菌和第一卷以外的其余的G-菌

1989年第四卷

放线菌

《伯杰氏系统细菌学手册》2000 年（第二版）5卷

- 原核生物分为古生菌界和细菌界，相当于Woese的细菌域和古生菌域
 - 古生菌界包括2门，5组，8纲，11目，17科和63属，共208个种
 - 细菌界包括16门，26组，27纲，62目，163科和814属，共4727个种
- 故整个原核生物界包括4935种

二、Ainsworth等人的菌物分类系统纲要 菌物，1990年提出：

包括：粘菌门，假菌门和真菌门

目前被认同的是Ainsworth第七版（1983年）的分类系统

1995年又进化到第八版

第七版(1983年):



第八版(1995年):



第四节 微生物分类鉴定的方法

4个水平：

- (1) 细胞的形态和习性水平
- (2) 细胞组分水平
- (3) 蛋白质水平
- (4) 核酸水平

一、微生物分类鉴定中的经典方法

- (1) 获得纯培养物；
- (2) 测定一系列指标
- (3) 查权威菌种鉴定手册

(一) 经典的鉴定指标

- (1) **形态特征**: 大小, 排列, 分化, 结构, 染色等
- (2) **培养特征**: 营养要求, 生长的物理环境 (酸碱度, 温湿度), 菌落, 菌苔, 液体培养特征。
- (3) **代谢特征**: 微生物生命活动的方式。如: I.M.Vit
- (4) **化学组成特征**: 细胞主要特征性化学成分的鉴定
如: **细胞壁成分、细胞内含物**
- (5) **抗原特征**: 抗原成为化学组成的一个特殊方面, 微生物具有许多不同类型的抗原。
- (6) **生态特征**: 与其他生物的关系、自然界的分布、致病性等

(二) 微生物的微型、简便、快速或自动化鉴定技术

1. API细菌数值鉴定系统

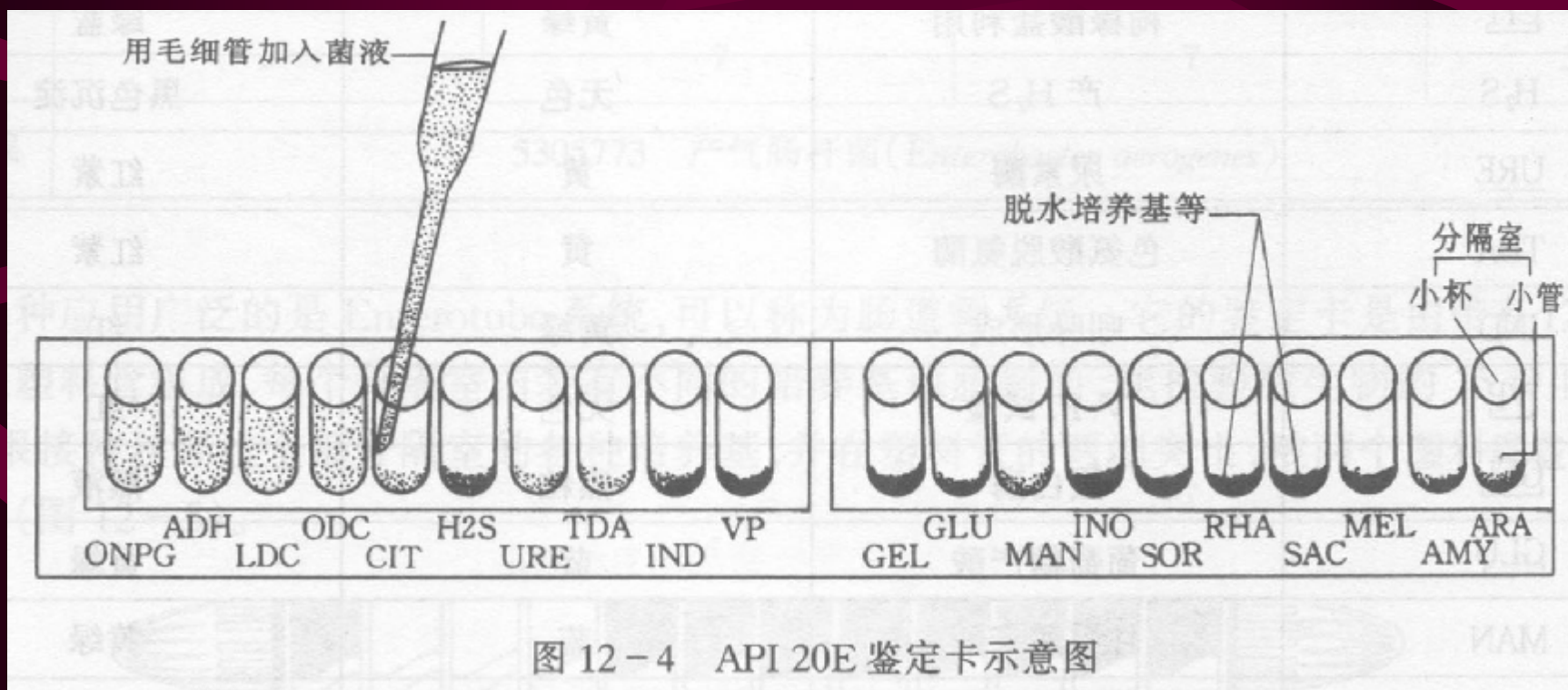


图 12-4 API 20E 鉴定卡示意图

表 12-9 API20E 反应判定表

鉴定卡上的反应项目		反应结果	
代号	项目名称	阴性	阳性
ONPN	β -半乳糖苷酶	无色	黄
ADH	精氨酸水解	黄绿	红,橘红
LDC	赖氨酸脱羧	黄绿	红,橘红
ODC	鸟氨酸脱羧	黄绿	红,橘红
CIT	枸橼酸盐利用	黄绿	绿蓝
H ₂ S	产 H ₂ S	无色	黑色沉淀
URE	尿素酶	黄	红紫
TDA	色氨酸脱氨酶	黄	红紫
IND	吲哚形成	黄绿	红
VP	V.P. 试验	无色	红
GEL	蛋白酶	黑粒	黑液
GLU	葡萄糖产酸	蓝	黄绿
MAN	甘露醇产酸	蓝	黄绿
INO	肌醇产酸	蓝	黄绿
SOR	山梨醇产酸	蓝	黄绿
RHA	鼠李糖产酸	蓝	黄绿
SAC	蔗糖产酸	蓝	黄绿
MEL	蜜二糖产酸	蓝	黄绿
AMY	淀粉产酸	蓝	黄绿
ARA	阿拉伯糖产酸	蓝	黄绿

表 12-10 API20E 举例说明

项目名称	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND		
所定数值	1	2	4	1	2	4	1	2	4		
试验结果	+	-	+	+	+	-	-	-	-		
记下数值	1	0	4	1	2	0	0	0	0		
编码	5				3			0			
检索结果											
项目名称	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
所定数值	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
试验结果	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
记下数值	1	0	4	1	2	4	1	2	4	1	2
编码	5			7			7			3	
检索结果	5305773 产气肠杆菌(<i>Enterobacter aerogenes</i>)										

2. Enterotube系统

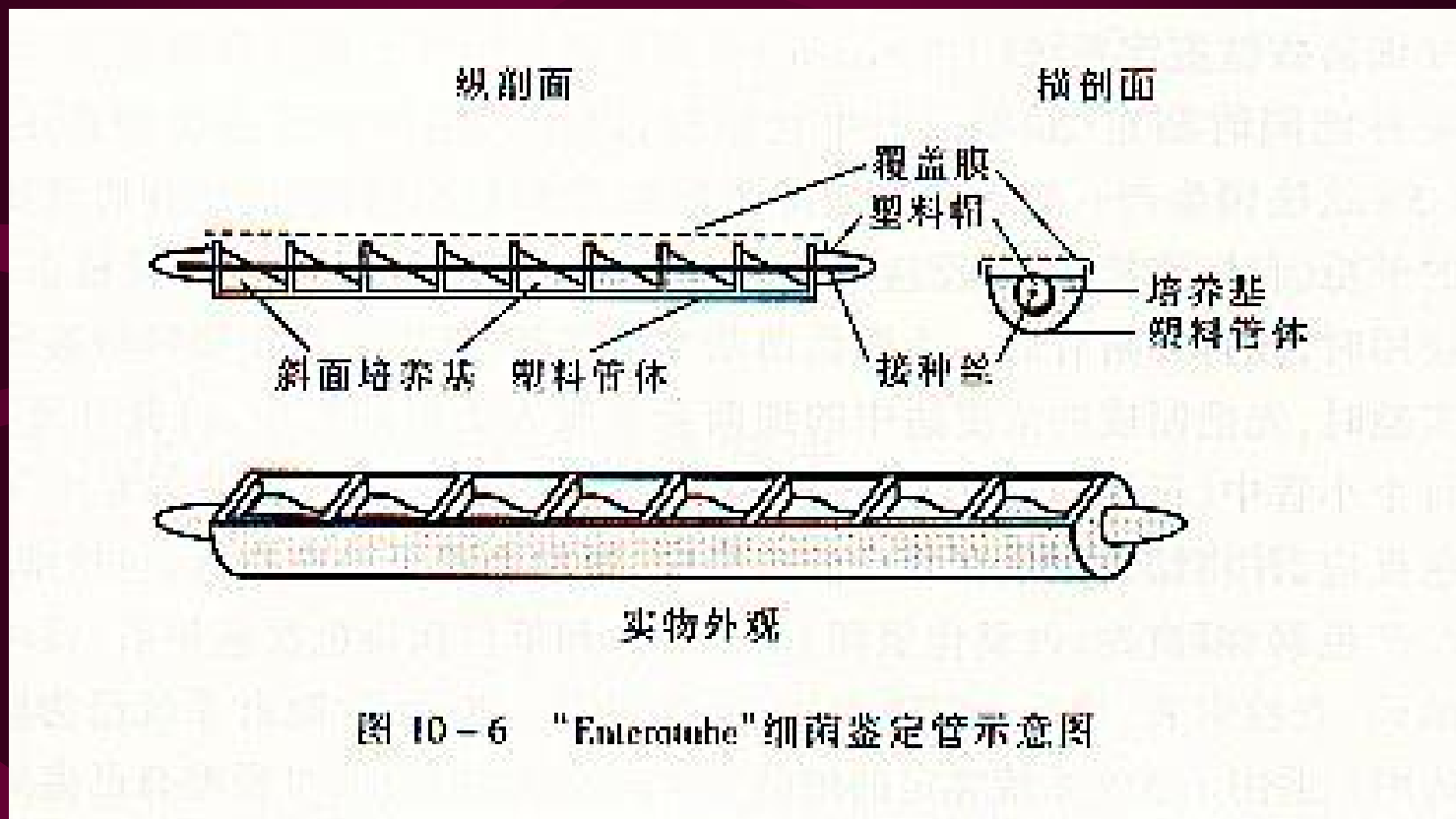


表 12-11 6 个鉴定系统的优、缺点比较

特 点	Enterotube	R/B	API20E	Minitek	PathoTec	Micro-ID
准确性(和常规法比较)	95%	90%~98%	93%~98%	91%~100%	95%	95+%
诊检时间(小时)	18~24	18~24	18~24	18~24	4	4
最后报告时间(小时)	48	48	48	48	24~30	24~30
系统的简单性	简单	简单	不简单	较简单	不简单	较简单
底物载体	培养基	培养基	脱水培养基	圆纸片	纸条	圆纸片
试验项目数	15	14	20	14(35)	12	15
选择性	良好	良好	良好	很好	一般	良好
不够稳定的项目	枸、尿	乳、葡/气 DNase	H ₂ S、赖、鸟、枸	H ₂ S	尿、七	赖、山、肌

**优点：快速、敏感、准确、重复性好、
简易、节省人力、物力、时间和空间**
缺点：价格贵、个别反应不准，难判定

3.Biology全自动和手动细菌鉴定系统

二、微生物分类鉴定中的现代方法：

(一) 通过核酸分析鉴定微生物遗传型

1. DNA碱基比例的测定

某一特定种的DNA碱基组成是恒定的。GC含量以碱基全部克分子中G和C的摩尔百分数表示：

$$\frac{G + C}{G + C + A + T} \times 100\% = (G + C) \text{ mol}\%$$

所得数值范围从23~75

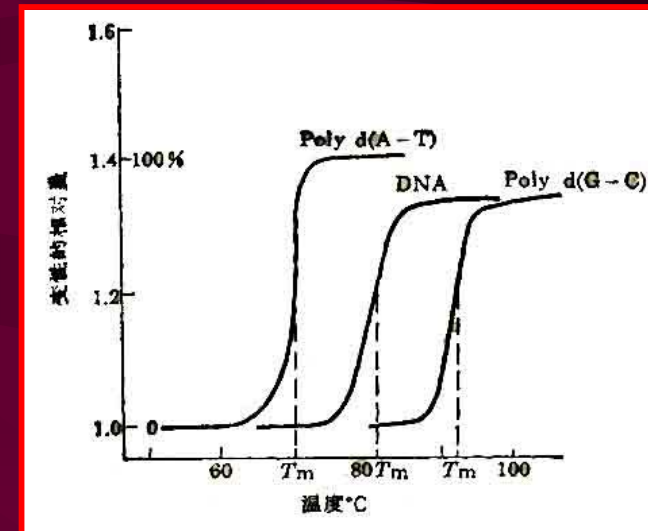
- 种内各株可差2.5~4.0% ;若相差< 2%为同种。
- 不同种相差5%以上; 若相差> 10%为不同属。

方法：解链温度法

原理：

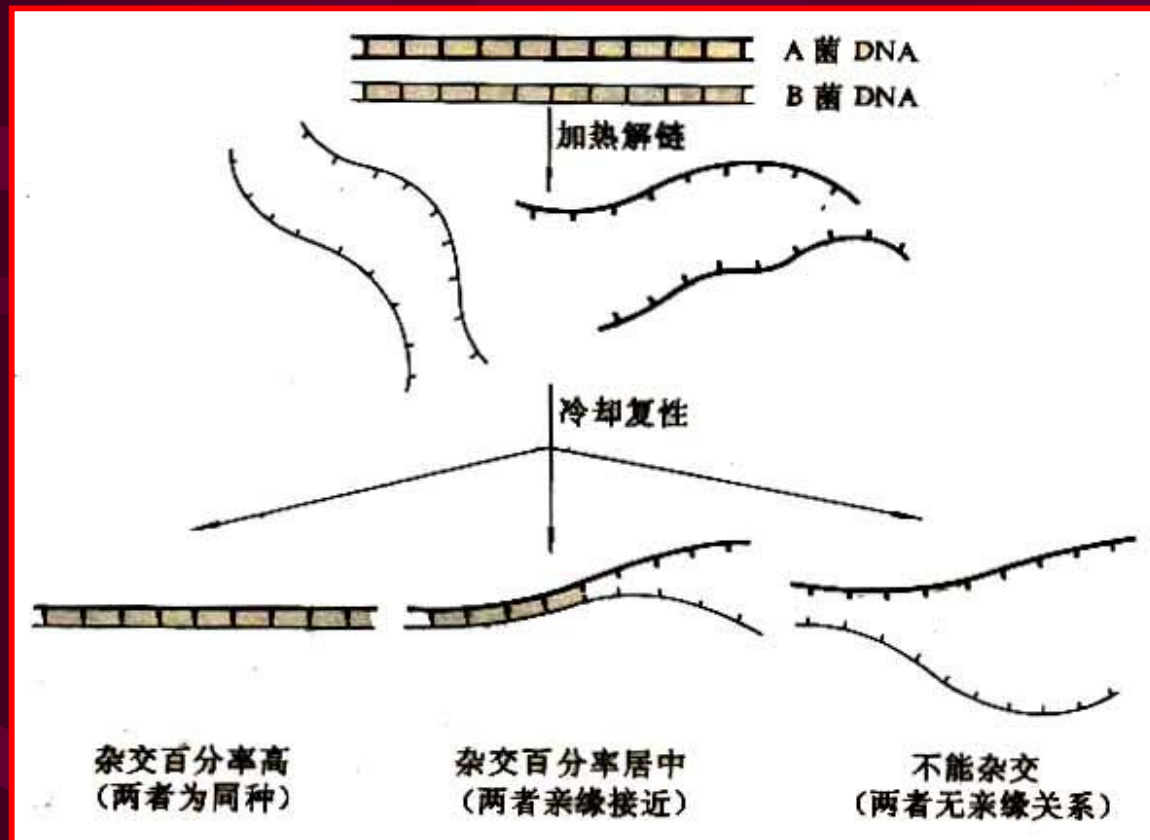
- 一定 pH 和离子强度下加热 DNA，氢键打开；
- 在 260nm 处，随着温度增加，双链变单链导致紫外吸收增加，引起增色效应。增色效应一半时的温度（热变性温度， T_m ）可反映出不同的 DNA 中的 (G+C) % 值。

$$T_m = 69.3 + 0.41 * (G+C)\%$$



2. 核酸杂交法:

原理: 根据DNA解链的可逆性和碱基配对的专一性。
若同源性70%以上为种的水平, 20%以上可能是属的水平



3. rRNA寡核苷酸编目分析

原理： 16SrRNA

优点：

- (1) 普遍存在于一切细胞内
- (2) 生理功能稳定且重要
- (3) 含量高，易提取
- (4) 编码基因稳定
- (5) 序列保守
- (6) 相对分子量适中

4. 微生物全基因组测序

1995年，流感嗜血杆菌(*haemophilus influenzae* Rd KW20)，首次报道全基因组图谱
现今已有50多种报道

(二) 细胞化学成分作用鉴定指标

1. 细胞壁的化学成分：肽桥，肽尾
2. 全细胞水解液的糖型：
 - (1) 阿拉伯糖、半乳糖；
 - (2) 马杜拉糖
 - (3) 无糖；
 - (4) 木糖，阿拉伯糖
3. 磷酸类脂的成分分析
4. 枝菌酸的分析
5. 醌类的分析
6. 气相色谱

(三) 数值分类法

2000年前由Adanson(植物学家)提出
与电子计算机联系紧密,又称电子计算机分类学
OUT(操作分类单元): 待研究的菌株和有关典型
菌种的菌株

相关系统 S_{sm} (简单匹配相关系统): 以被研究菌
株间共同特征的相关性为基础

特点:至少50个特征,越多越好

步骤:

(1)计算两菌株间的相关系数

$$S_{sm} = \frac{a+d}{a+b+c+d}$$

$$S_j = \frac{a}{a+b+c}$$

(2)列出相似度矩阵

每两个菌株配对,计算相关系数,填入相似度矩阵中,
按高低重新排列

(3)将矩阵图转化为树状谱

表元或表观群,不能作严格分类单元

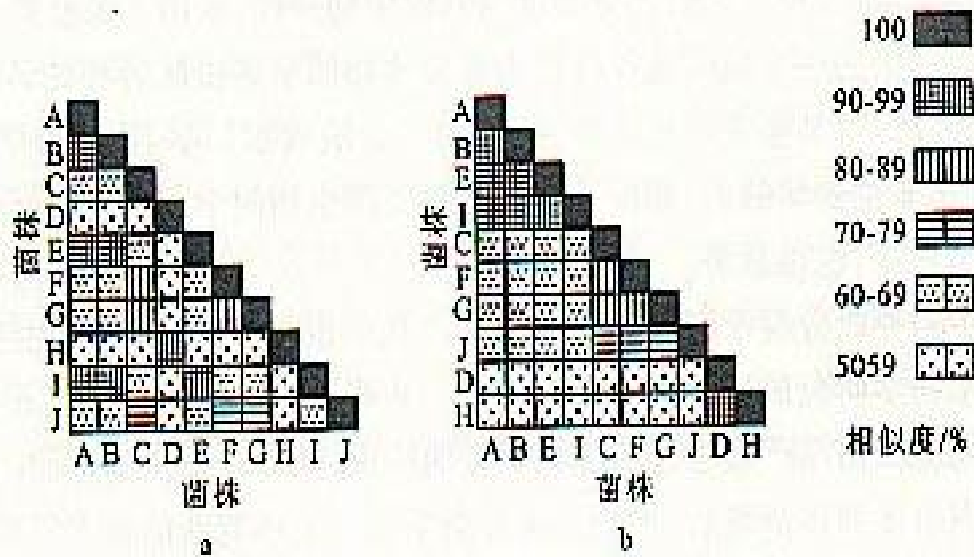


图 10-11 10个细菌菌株的相似度矩阵

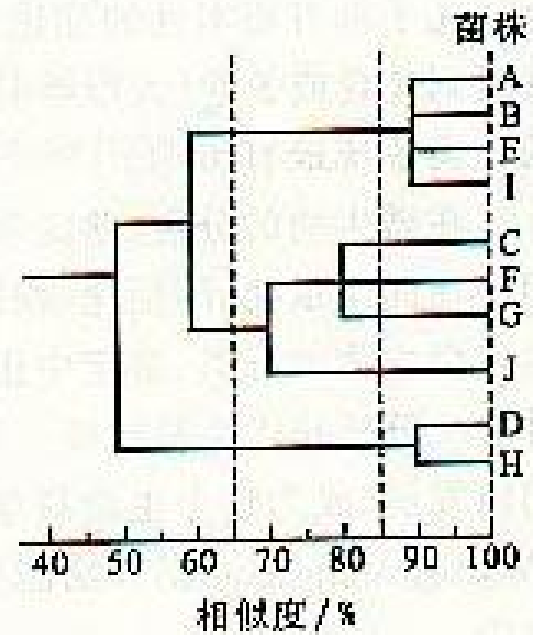


图 10-12 显示 10 株细菌相似关系的树状谱

(二) 常用分类方法：

1. **经典分类法：**将形态、结构特征作为初步特征，再比较生理、生化特征，采用双歧法整理结果，进行分类。
2. **数值分类法：**根据数量特征进行分类，可根据50~60个或100以上，用电脑进行计算统计。
3. **遗传分类法：**主要依据GC含量及DNA杂交试样为依据

结束语

一、微生物在解决人类面临的五大危机的作用

1. 微生物与粮食增产

防霉,增产,病虫害,土壤肥力

2. 微生物与能源供应

(1)纤维素→乙醇; (2)发酵产甲烷和氢

(3)石油采矿; (4)能源

3. 微生物与资源开发

发酵工程,耗能少,产量多

4. 微生物与环境保护

治理污染,变废为宝

虫害,白色污染,难降解物质

5. 微生物与人类健康

微生物制药

多肽药物,青霉素等天然药物

二、现代微生物学的特点及其发展趋势

1. 向纵深和分子水平发展
2. 深入基础研究,新学科生成
3. 学科交叉,渗透,融合,形成边缘学科
4. 新技术,新方法在微生物学中应用
5. 向复合生态系统和宏观范围拓宽
6. 应用性微生物学科正在形成

三、微生物在“生命科学世纪”中的作用

索引时，生命科学为主

人类对微生物的研究约占总数的5%

四、大力开展我国的微生物学研究

五、学好微生物学、推动人类进步