



第十章 微生物的分类和鉴定

- 地球上的物种估计大约有150万，其中微生物超过10万种，而且其数目还在不断增加。





分类与鉴定

分类是认识客观事物的一种基本方法。我们要认识、研究和利用各种微生物资源也必须对它们进行分类。

生物分类学研究生物类群间的异同以及异同程度，阐明生物间的亲缘关系、进化过程和发展规律。

分类学涉及三个相互依存又有区别的组成部分：

分 类 命 名 鉴 定

生物分类的二种基本原则

- 根据**表型(phenetic)**特征的相似程度分群归类，这种表型分类重在应用，不涉及生物进化或不以反映生物亲缘关系为目标。
- 按照生物系统发育相关性水平来分群归类，其目标是探寻各种生物之间的进化关系，建立反映生物系统发育的分类系统。

从进化论诞生以来，已经成生物学家普遍接受的分类原则



生物系统学(systematics)

分类(classification): 根据系统发育的亲缘关系和生物学性状对微生物进行分群归类，并对各个分类群的特征进行描述，根据相似性或相关性水平分门别类地排成一个系统，以便考查和对未被分类的微生物进行鉴定；

命名(nomenclature): 是根据命名法规，给每一个分类群一个专有的名称；如果是新种，则给以新的名称，补充到检索表中去。

鉴定(identification或determination): 对某个未知微生物，借助于现有的微生物分类系统，通过特征测定，确定未知的、或新发现的、或未明确分类地位的微生物所应归属分类群的过程。



章节内容

第一节 通用分类单元

系统分类单元、种相关的概念、命名

第二节 微生物在生物界的地位

生物界级分类学说、五界系统、三域学说及其发展

第三节 各大类微生物的分类系统纲要

原核微生物分类系统纲要、真菌的分类系统纲要

第四节 微生物的鉴定

经典分类鉴定方法、现代分类鉴定方法。



第一节 通用分类单元

1. 分类单元
2. 种的概念
3. 命名法



1. 微生物分类单元

Taxonomy

域 (Domain)

界 (Kingdom)

门 (Phylum) (Phyla)

纲 (Class)

目 (Order)

科 (Family)

属 (Genus) (Genera)

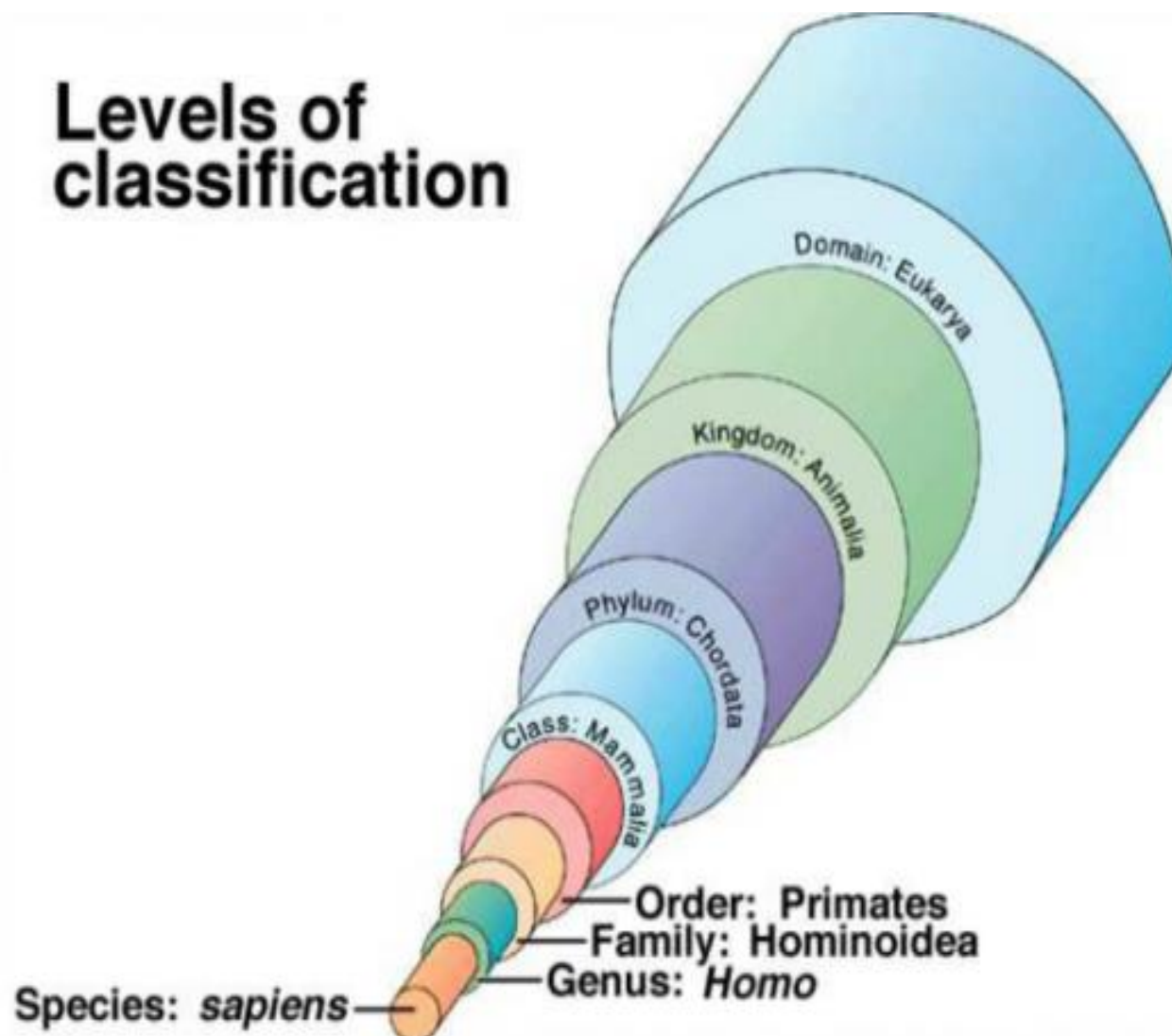
种 (Species) (Species)



1. 微生物分类单元

Taxonomy

Levels of classification





2. 种的概念

- 种是最基本的分类单位，它是一大群**表征特征高度相似、亲缘关系极其亲近、与同属内的其他物种有着明显差异**的一类菌株的总称。
- 种是抽象的概念。



种 (species)

- 种 species 是最基本的分类单位。
- 客观存在，相对稳定。
- 来自共同祖先，有着相近的亲缘关系。
- 形态、生理特征上表现十分相似。
- 存在差异和变异。
- 变异发展到一定程度，即形成新种或变种。



模式种 (Type species)

- 在微生物中，一个种只能用该种内一个**典型菌株**来作为具体标本，这一典型菌株就是该种的模式种。
- 模式种必须是该种的一个具体的活标本，是该菌种的活可培养物，它保持着纯培养状态，在形状上与原初描述密切相符。
- 模式种可以作为鉴定未知种的参考。



新种

- 权威性的分类、鉴定手册中从未记载过的一种新分类并鉴定过的微生物。
- 按法规命名发表时，应在其学名后附“sp. nov”或“nov. sp”，是species nova的缩写。
- 在新种发表前，其模式菌株的培养物就应该存放于一个永久性的菌种保藏机构，并允许人们得到。
- 16S rDNA序列同源性低于97% (98.5%)



菌种保藏中心

- 美国典型微生物菌种保藏中心 (ATCC)
- 美国农业研究菌种保藏中心 (NRRL)
- 德国微生物菌种保藏中心 (DSMZ)
- 荷兰微生物菌种保藏中心 (CBS)
- 英国微生物菌种保藏中心 (NCTC)
- 中国菌种保藏中心 (ATCC)
- 中国工业微生物菌种保藏管理中心 (CICC)
- 中国农业微生物菌种保藏管理中心 (ACCC)
- 中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC)

CGMCC 中国普通微生物菌种保藏管理中心
China General Microbiological Culture Collection Center

国家微生物资源平台
National Infrastructure of Microbial Resources
国家科技基础条件平台
National Science & Technology Infrastructure

首 页 服务项目 平台建设项目 收费标准 地理位置 联系我们 English

• 中心简介 更多>> • 新闻·通知·公告 更多>>

 中国普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC)成立于1979年, 是以提供专业技术服务为主的公益性机构, 1995年获得布达佩斯条约国际保藏中心的资格, 是我国唯一同时提供一般菌种资源服务和专利生物材料保存的国家级保藏中心。中心设立在中国科学院微生物研究所。
中心致力于微生物资源的保护、共享和持续利用...

国家知识产权局指定专利微生物保藏中心 布达佩斯条约国际保藏单位 质量 环境 职业健康安全管理体系认证证书

• 菌种细胞供应 • 菌种鉴定 • 下载中心 更多>>

订购流程	菌种目录	鉴定流程
付费方式	标准菌种	服务项目
邮寄地址	新增菌种	收费标准及账号
意见反馈	细胞系目录	邮寄地址
	培养基	

► 菌种订购
表1.生物材料订购单(word)
表2.生物材料提供和利用协议书
表3.数据利用协议书
► 信息反馈
表4.意见反馈登记表
► 专利保藏

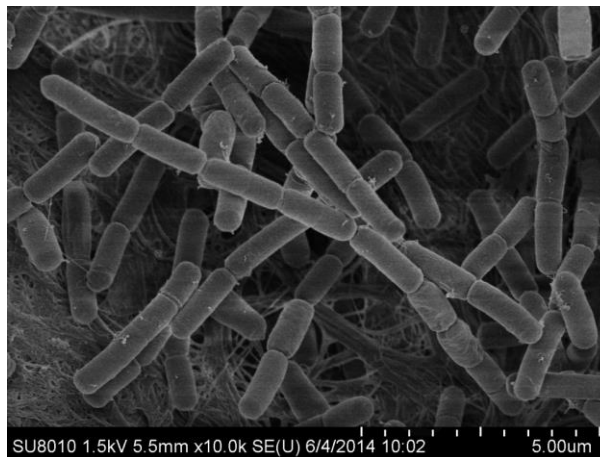


变种 (Variety)

- 从自然界分离到的微生物的纯种，如果与典型种之间存在着某种差异，而这些特征又是稳定遗传的，可将这一纯种称为典型种的变种。

- 如枯草芽孢杆菌黑色变种

Bacillus subtilis var. niger



- 变种是亚种的同义词，《国际细菌命名法规》现已不主张使用这一名词。



变种

- 分离到的纯种微生物，除了大多数指标符合典型种的特征，还存在某个显然不同的特征，而且此特征稳定遗传。
- 生物分类学上种以下的分类单位。但其基本特征仍未超脱原种范围的一群个体。
- 种内某一个体可能由于突变而发生变异，在自然选择和人工选择下，这种变异会在种内不断扩散，最后形成某些遗传性不同于原种的一个群体。
- 变种仍能和原种进行基因交流。
- 变种和亚种没有本质差别，有时常混用。



亚种 (subspecies, subsp. Ssp)

- 种以下的分类单元，指某一明显而稳定的特征与模式种不同的种，有时称小种。
- 在微生物学中，通常把实验室所获得的变异菌株称之为亚种。
- 如金黄色葡萄球菌厌氧亚种

Staphylococcus aureus subsp. anaerobius



型 (form, type)

- 自然界中存在的差异较小的同种微生物（同一菌种）的不同类型。
- 在某些方面存在较小差异的为同一菌型，通常一个菌种内的细菌可以分为多种不同的菌型。
- 同种微生物彼此之间的区别不如变种显著，一般表现在菌体的化学组分上。
- 如结核分枝杆菌依寄生宿主不同，可分为人型、牛型和禽型。
- 菌株的不同血清型。
- 还有形态型、生物型、生理型、化学型、溶菌型、致病性等等。



菌株 (strain)

- 又称品系，指同种微生物的每一个不同来源的纯培养物均可称为该菌种的一个菌株。
- 表示任何由一个独立分离的单细胞繁殖而成的纯种培养物及其后代。
- 从自然界中分离到的每一个纯培养物都可以称为一个菌株或品系。
- 自然界“种”应是有限的，菌株是无限的。
- 菌株是实际应用的单位，摸得着、看得见。
- 如大肠杆菌的菌株

Escherichia coil B; Escherichia coil K12;



菌株 (strain)

• 特性

菌株实为一个物种内遗传多态性的客观反映，其数目无限;

强调的是遗传型纯的谱系;

菌株与克隆的意义相同;

不同菌株间，不作为鉴定用的小性状不同;

遗传性型的标志，变异后为新菌株;

菌种后应标以菌株名称;

名称可随意定.



类群 (group)

- 通常指属以下几个比较近似的集合。
- 选取特征最为明显的典型菌株，再把和它近似的菌株放在一起归为一个类群。
- 有时类群可用来表示两种微生物和介于这两种微生物之间的中间类型。



种的分类地位（举例）

单元	詹氏甲烷球菌	大肠埃希氏菌	八孢裂殖酵母
界	古生菌界(域)	细菌界(域)	菌物界
门	广古生菌门	脢细菌门	真菌门
亚门(组)	产甲烷菌组	γ 脢细菌组	子囊菌亚门
纲	甲烷球菌纲	发酵细菌纲	半子囊菌纲
目	甲烷球菌目	肠杆菌目	内孢霉目
科	甲烷球菌科	肠杆菌科	内孢酶科
属	甲烷球菌属	埃希氏菌属	裂殖酵母属
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>
	<i>Methanobacterium</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Schizosaccharomces</i>
分类系统	《系统手册》2000年	《系统手册》2000年	《Ainsworth词典》1983年



3. 微生物命名

- 命名：给予菌种一个科学名称。
- 菌种的**学名** scientific name：是按照《国际细菌命名法规》命名的国际学术界公认，并通用的名称。
- **俗名**：不同国家和地区的习惯名称。

结核杆菌 (tubercle bacillus) 是结核分枝杆菌的俗名 (*Mycobacterium tuberculosis*)

“红色面包霉”是粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 的俗名

- **双名法**和三名法。



微生物命名规则

- 每个具有显著区分的微生物，称之为“种”。
- 每一个种一个学名，由两个拉丁词组成。
- **属名在前**，一般用拉丁字名词表示，**首字母大写**，名词，表示该属的主要特征。
- **种名在后**，常用拉丁文形容词表示，**全部小写**，表示该属的次要特征。
- 通常种名后还跟命名人的姓名及命名时间。



微生物命名规则

- 双名法

- 学名 = 属名 + 种名加词 + (首次定名人) + 现名定名人 + 现名定名年份

斜体

正体

可以忽略

如: *Escherichia coli* (Migula) Castellani et Chalmers 1919

Bacillus subtilis (Ehernberg) Cohn 1872

Mycobacterium tuberculosis (Zopf) Lehmann et Newmann 1926



微生物命名规则

- 若所分离的菌株只鉴定到属，而未鉴定到种，可用sp.或spp.来表示。
- 如：*Bacillus* sp. 一株芽孢杆菌(单数)
Bacillus spp. 若干芽孢杆菌(复数)
- 当文章前面出现过某学名时，后面再次出现时可将其属名缩写为1~3个字母。
- 如：*Escherichia coli* 可缩写为 *E. coli*



大家来找茬

The most abundant OTU, accounting for $1.14 \pm 0.05\%$ of the sequence abundance in activated sludge samples and occurring in 85% of all samples, was 99% similar to the γ -proteobacterium *Dokdonella kunshanensis* DC-323. The second most abundant OTU ($0.89 \pm 0.06\%$ in relative abundance and occurring in 96% of all samples) belonged to *Zoogloea*, a dominant genus in activated sludge communities, with *Zoogloea ramigera* known to enhance the flocculation of activated sludge. A *Nitrospira* OTU (OTU_6) was also identified as a core taxon, reflecting its importance for nitrite oxidation or complete ammonia oxidation in activated sludge. OTU_7 is closely related to *Arcobacter* species, which are highly abundant in raw sewage and include potential pathogens such as *Arcobacter cryaerophilus*, *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter skirrowii*.



思考题

1. 种、新种、亚种、型、菌株的概念及区别
2. 双名法的规则
3. 三名法的规则



第二节 微生物在生物界的地位

1. 生物的界级分类学说
2. 三域学说及其发展



生物的界级分类学说

- 两界系统 (1753年)
- 三界系统 (1860年)
- 四界系统 (1956年)
- 五界系统 (1969年)
- 六界系统 (1949年)
- 三总界五界系统 (1978年)

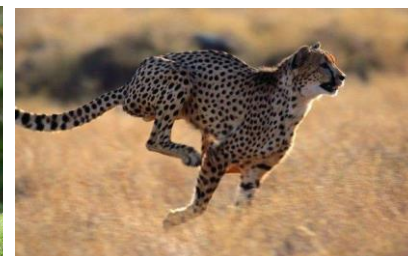


生物的界级分类学说

两界系统
(1753年)
(林奈)

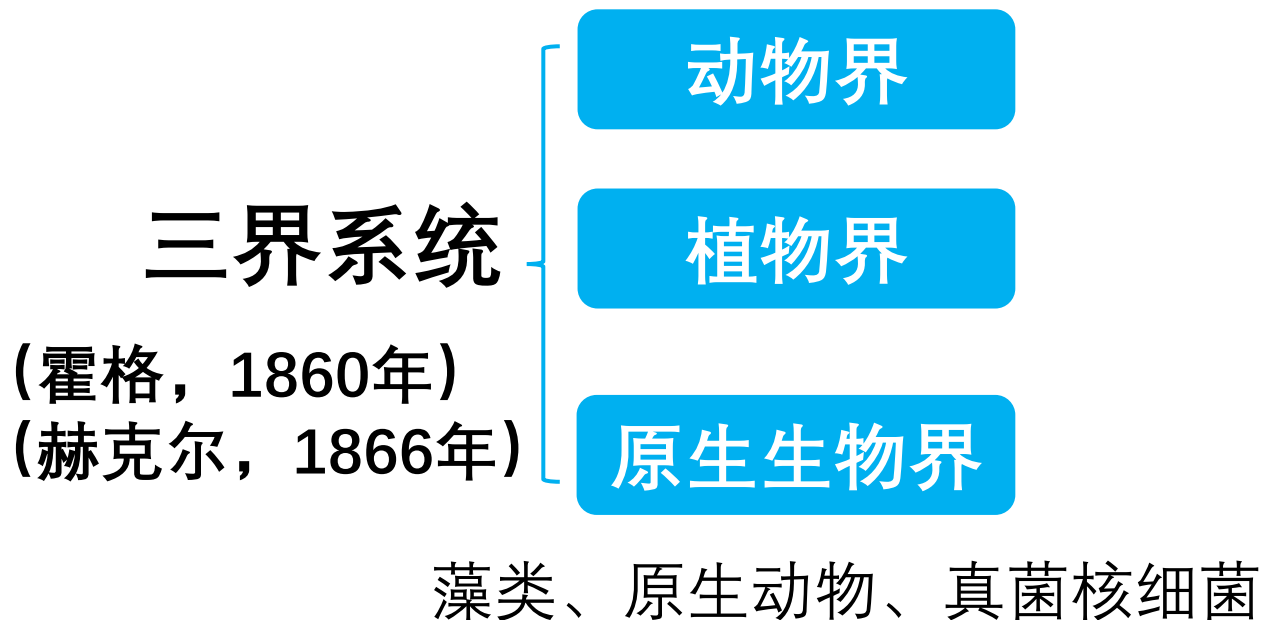
动物界

植物界





生物的界级分类学说





生物的界级分类学说

四界系统 (1956年)

动物界

植物界

原生生物界

菌界

原始动物、真菌、部分藻类-真菌界

细菌、蓝细菌-真菌界-原核生物界



生物的界级分类学说

五界系统
(魏泰克, 1969年)

动物界

植物界

原生生物界

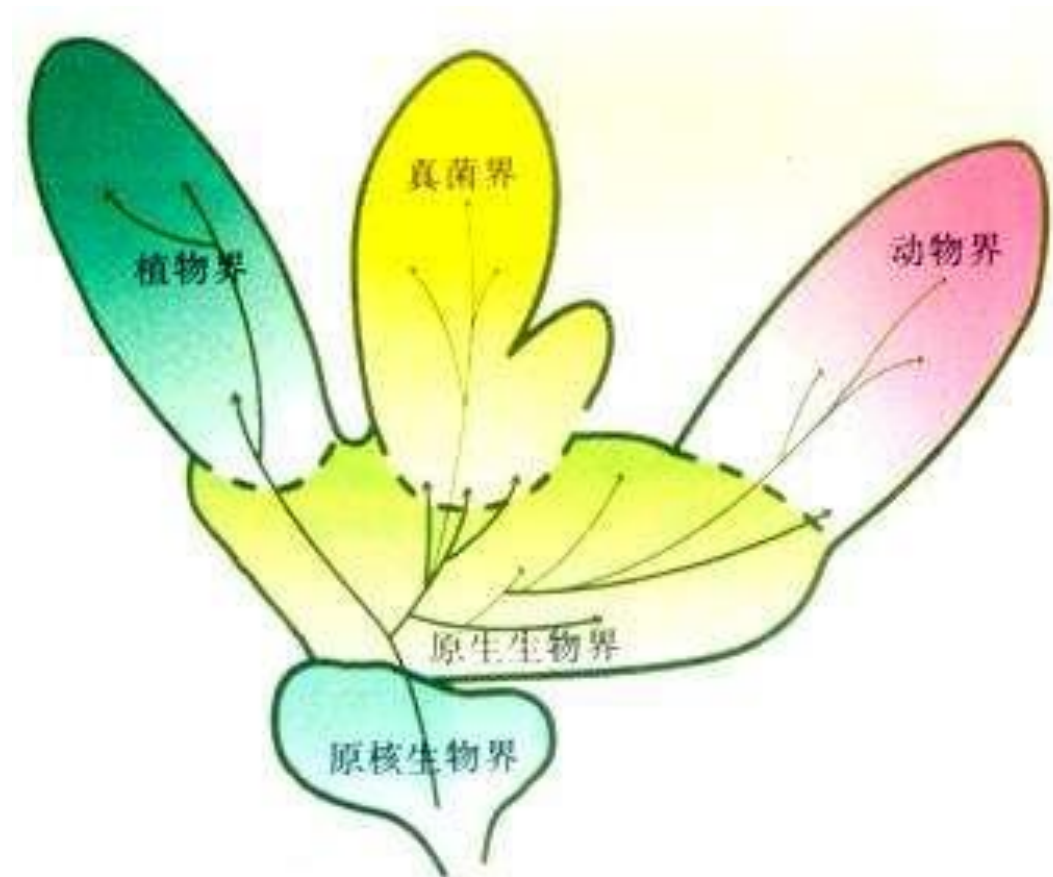
原核生物界

真菌界

光和营养型

吸收式营养型

摄食式营养型





生物的界级分类学说

六界系统
(特劳巴, 1975年)

后生动物界

后生植物界

真菌界

原生生物界

原核生物界

病毒界

动物界

植物界

原生生物界

真菌界

真细菌菌界

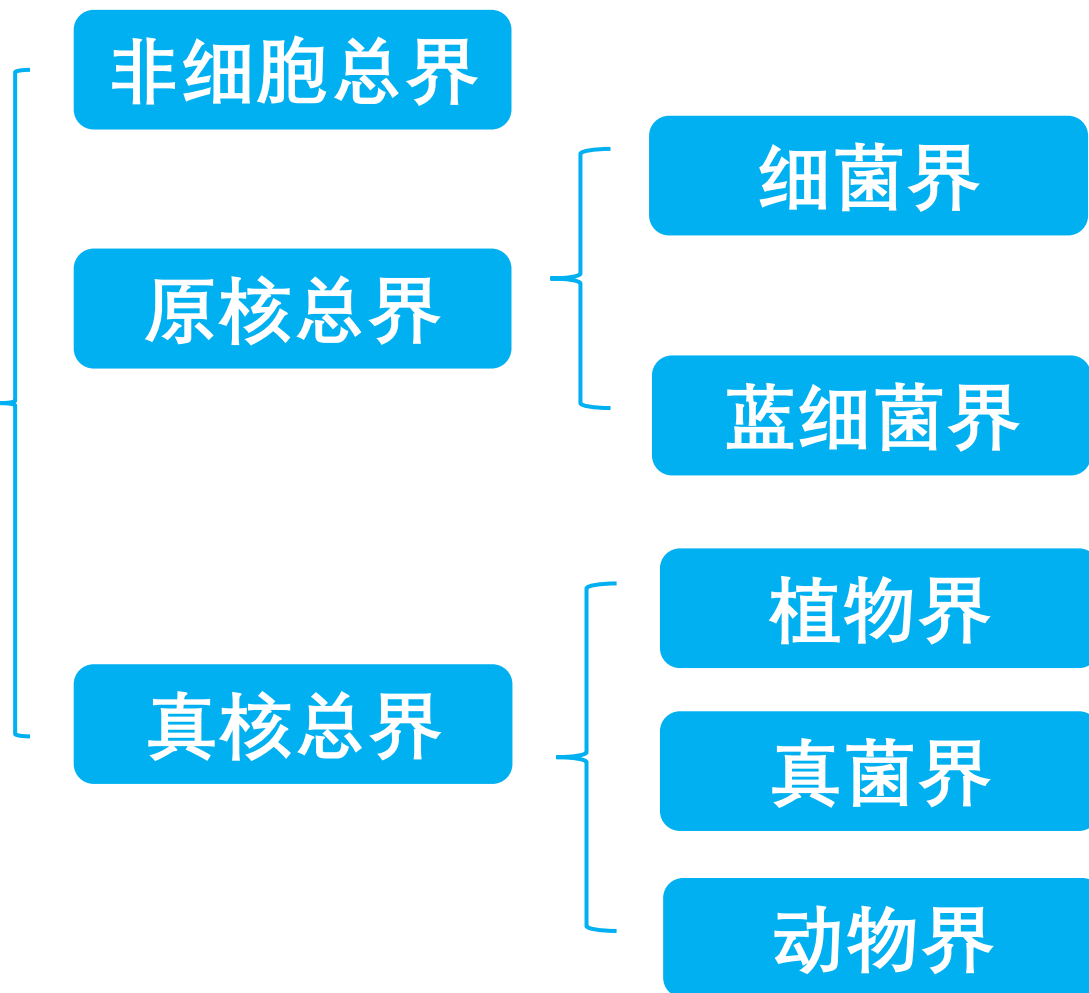
古细菌菌界

1996年



生物的界级分类学说

三总界五界系统 (陈世骧, 1979年)





生物的界级分类学说

- 三总界五界系统存在明显缺陷，简单地将非细胞生物病毒列为单独的总界之一，与有细胞的生物区分开来，但从进化的角度考虑，病毒并不是比原核生物和真核生物更低级的生物。
- 因此，有关病毒在生物分类系统中的位置尚是一个无法解决的难题。



生物的界级分类学说

- 三域学说

20世纪70年代末美国伊利诺斯大学的Carl Woese (伍斯) 等人对大量微生物和其他生物进行16S rRNA和18S rRNA的寡核苷酸测序, 并比较其同源性水平后, 提出了一个与以往各种界级分类不同的新系统, 称为三域学说 (three domain theory) 。

三个域指的是细菌域 (Bacteria)、古菌域 (Archaea) 和真核生物域 (Eukarya) 。

与其他系统最大的差别是把原核生物分成了两个明显区别的域。



生物的界级分类学说

- 三域学说

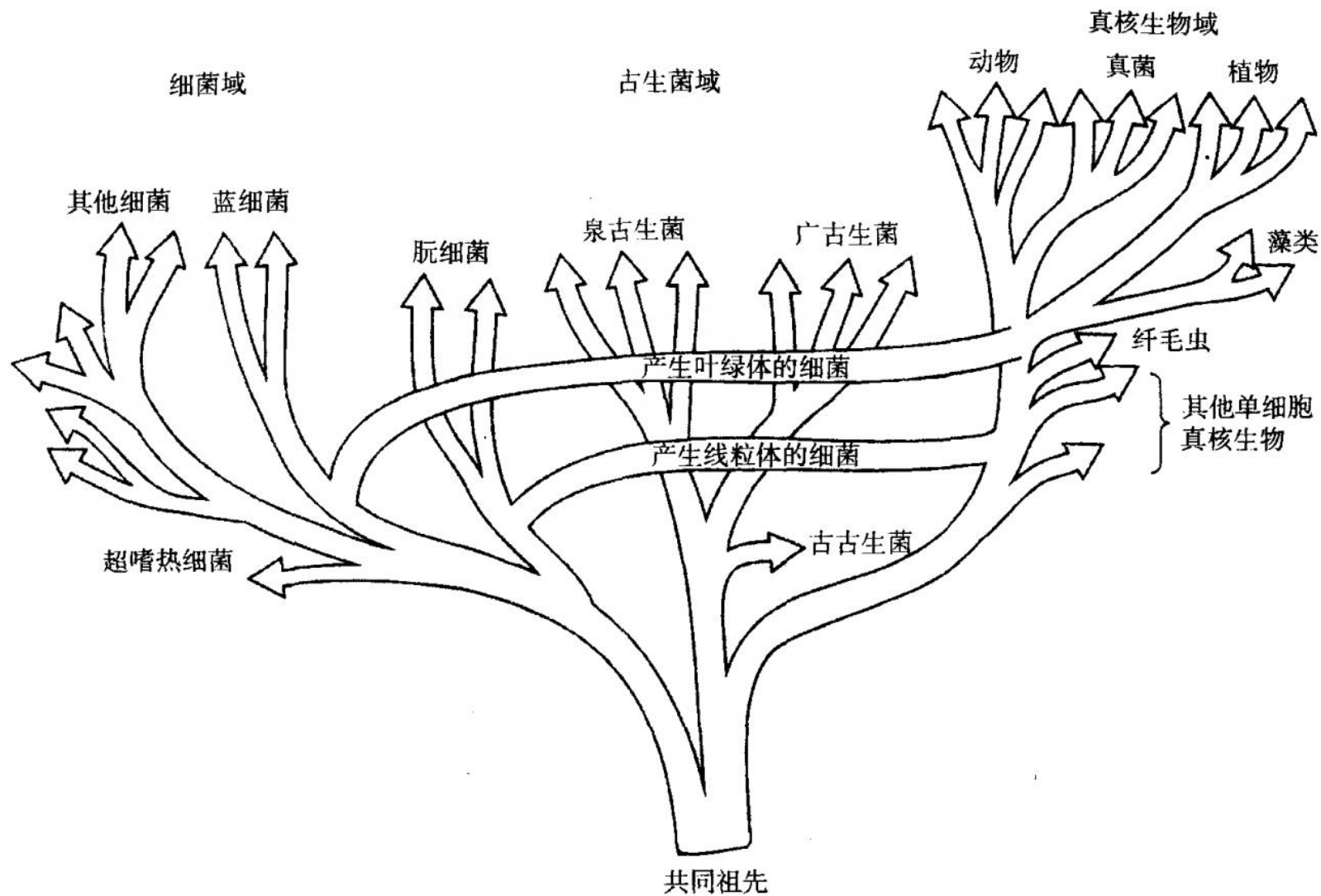
古菌域包括嗜泉古菌界 (Crenarchaeota)、广域古菌界 (Euryarchaeota) 和初生古菌界 (Korarchaeota)。

细菌域包括细菌、放线菌、蓝细菌和各种除古菌以外的其它原核生物。

真核生物域包括真菌、原生生物、动物和植物。



三域学说



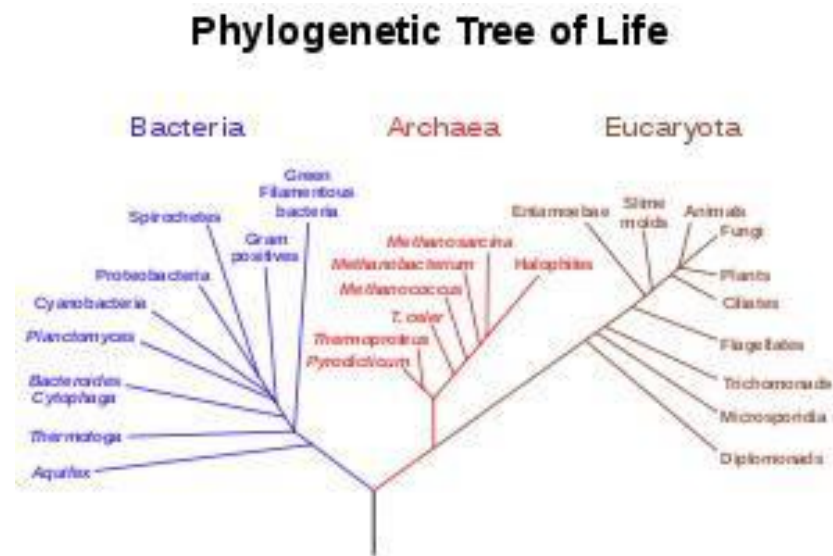


Carl Woese 及 三域学说

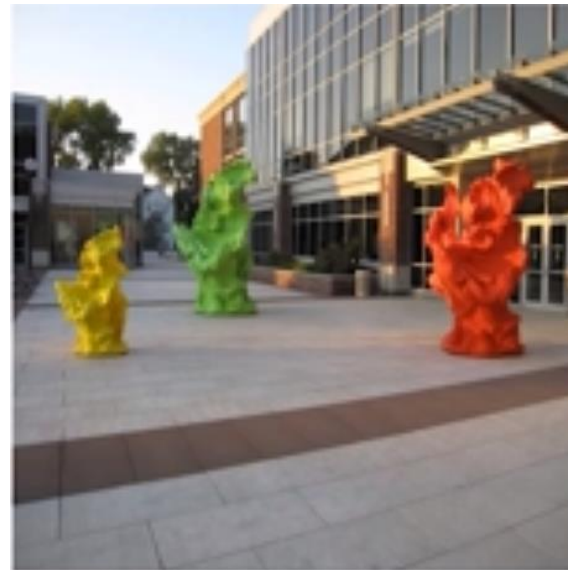


1928年-2012年

<https://www.igb.illinois.edu/people/archaea>



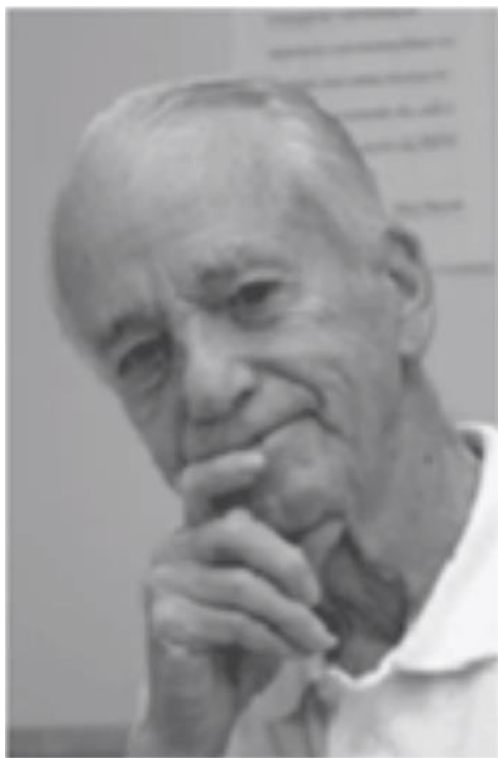
16S ribosome RNA
16S 核糖体RNA



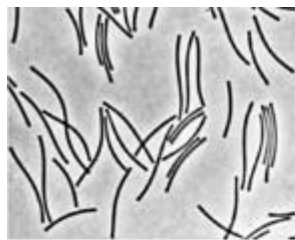
“Ribosomes of three domains”
in UIUC



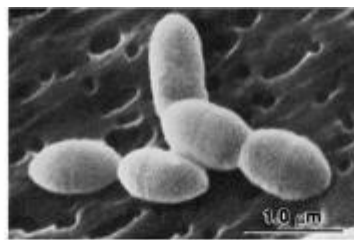
Carl Woese 及 三域学说



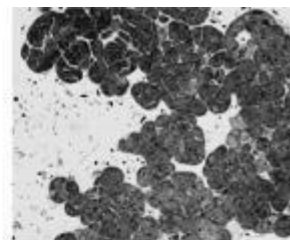
Ralph Wolfe
1921年-



(a)



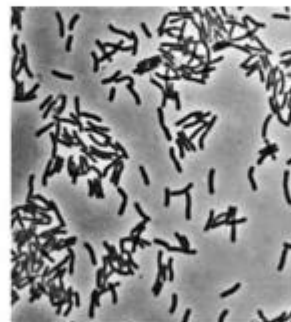
(b)



(c)



(d)



(e)

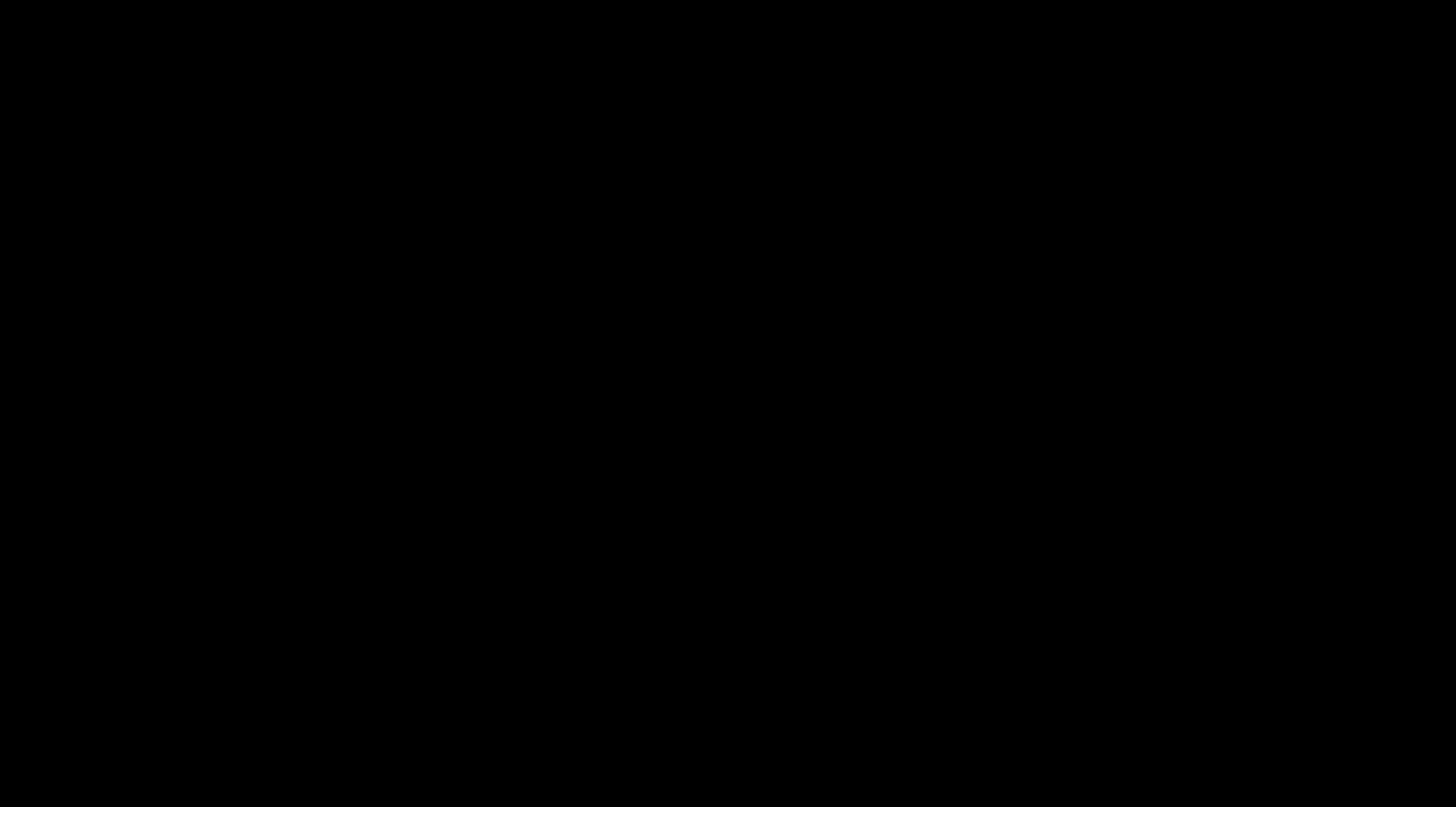


(f)

产甲烷菌



Carl Woese
微生物学家和物理学家





16S rRNA

- 核糖体RNA，即rRNA，是细胞内含量最多的一类RNA，也是3类RNA（tRNA，mRNA，rRNA）中相对分子质量最大的一类RNA，它与蛋白质结合而形成核糖体，其功能是在mRNA的指导下将氨基酸合成为肽链。
- 16S核糖体RNA（16S ribosomal RNA），简称16S rRNA，是原核生物的核糖体中30S亚基的组成部分。
- 16S rRNA的长度约为1,542 nt。一个细菌的细胞中可包含多种具有不同序列的16S rRNA。

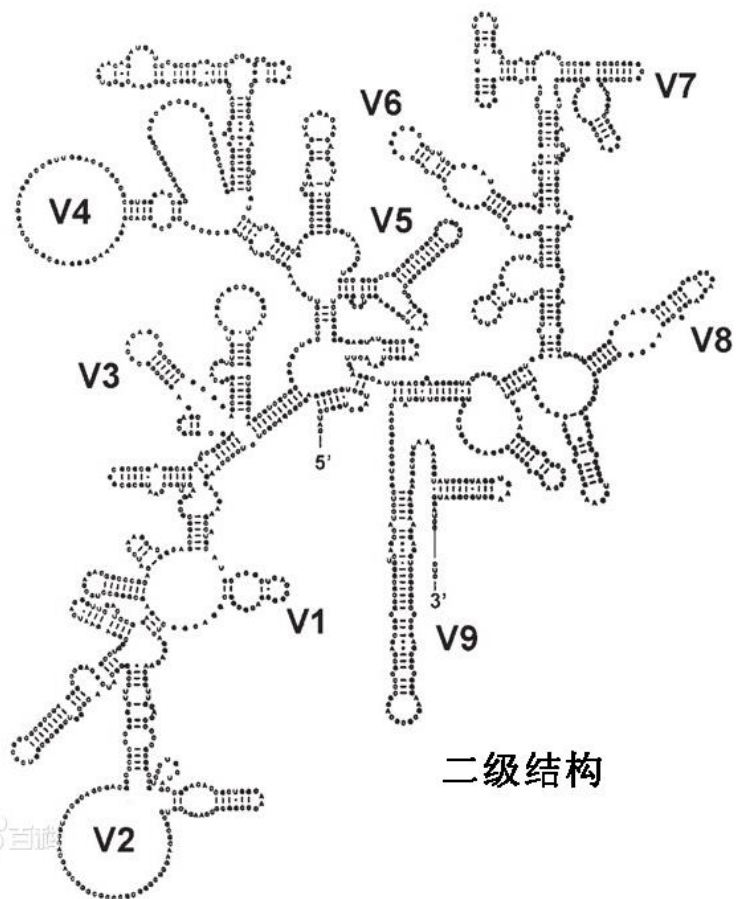


16S rRNA

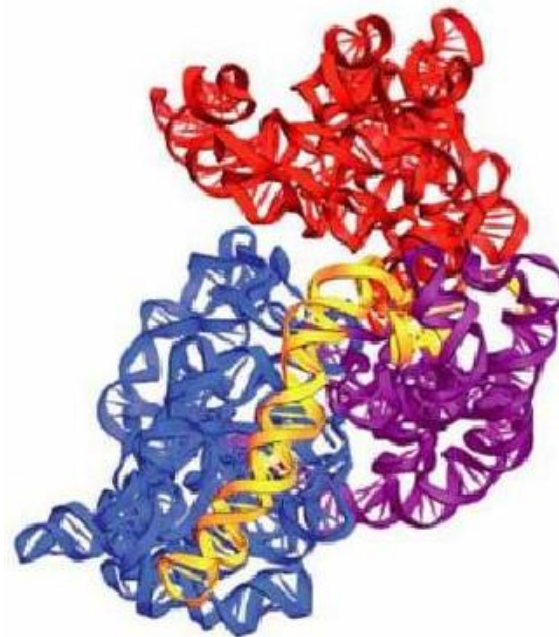
0 100 200 300 400 500 600 700 800 900 1000 1100 1200 1300 1400 1500 bp



V1-V9: 可变区



V4-V5区其特异性好，数据库信息全，是细菌多样性分析注释的最佳选择



三级结构



16S rRNA作为研究微生物进化分类的依据

- 高保守基因 有效性
- 所有细胞生物中都存在 普遍性
- 没有（较少）水平基因转移 可靠性
- 细胞中含量高（高拷贝） 易获取



思考题

1. 什么是三域学说?
2. 细菌、古菌与真核生物的区别?
3. 为什么用16S rRNA来研究微生物进化分类?



第三节 各大类微生物的分类系统纲要

1. 原核微生物分类系统
2. 真核微生物分类系统



1. 原核微生物分类系统

□ 《伯杰氏鉴定细菌学手册》

(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology)

美国宾夕法尼亚大学的细菌学教授伯杰(D.Bergey)(1860-1937)

伯杰氏手册：是目前进行细菌分类、鉴定的最重要参考书，其特点是描述非常详细，包括对细菌各个属种的特征及进行鉴定所需做的实验的具体方法。



1. 原核微生物分类系统

□ 《伯杰氏鉴定细菌学手册》

1923年以来已出至第九版(1994);

第九版伯杰氏细菌鉴定手册设立35个群，将古细菌部改编为5个群，全书描写了约500个属。

划分为四大类：

第一类 具细胞壁的革兰氏阴性真细菌

第二类 具细胞壁的革兰氏阳性真细菌

第三类 无细胞壁的真细菌

第四类 古细菌



1. 原核微生物分类系统

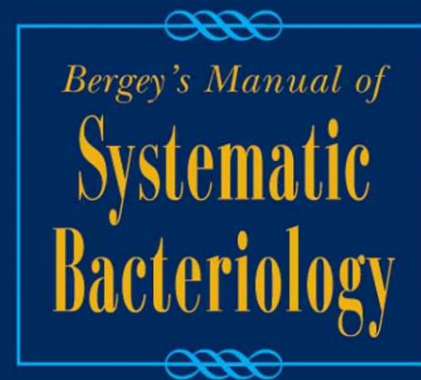
□ 伯杰氏系统细菌学手册

(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)

第一版 1984年问世，至1989年出齐，共4卷。

第二版 由George Garrity主编分为5卷，将从2000年起陆续出版。这一版纳入了研究核糖体RNA测序所产生的许发育)分类系统。

第二版 分古菌域和细菌域。



SECOND EDITION

Volume Two

The Proteobacteria

Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria



1. 原核微生物分类系统

□ 伯杰氏系统细菌学手册

第二版 分古菌域和细菌域。

古菌域包括2个门（**泉古菌门**和**广古菌门**）、9纲、13目、23科和79属，共有289个种。

细菌域包括25个门、34纲、78目、230科和1227属，共有6740个种。



2. 真菌（菌物）分类系统

□ Ainsworth 系统

《安·贝氏菌物词典》

“菌物”-20世纪90年代初提出的，以“菌物”代替“真菌”。

菌物界 {
黏菌门
假菌门
真菌门



第四节 微生物的分类鉴定的方法

1. 经典分类鉴定方法
2. 现代分类鉴定方法



微生物的分类鉴定

微生物分类鉴定主要从**5个**水平进行

✓ 细胞的形态和习性水平

经典方法

✓ 细胞组分化学水平

✓ 蛋白质水平

✓ 核酸水平

✓ 数学统计或计算生物学水平

现代方法



微生物的分类鉴定

微生物分类鉴定主要从**5个**水平进行

- ✓ **细胞的形态和习性水平** 形态特征、运动性、酶反应、生长条件、营养需求 ← 显微镜、API
- ✓ **细胞组分化学水平** 细胞壁、脂质等 ← 红外光谱、气质联用、液质联用
- ✓ **蛋白质水平** 氨基酸序列 ← 凝胶电泳、各种免疫标记技术
- ✓ **核酸水平** GC含量/比值 ← 核酸分子杂交、16S rRNA或18S rRNA、全基因组测序
- ✓ **数学统计或计算生物学水平**



1. 微生物分类鉴定的经典方法

□ 鉴定指标

- ✓ 形态特征 **真菌** 大小、形态、运动性、特殊构造、生长状态……
- ✓ 生理、生化反应 营养需求、酶、代谢产物、对药物的敏感性……
放线菌 **细菌**
- ✓ 生态特性 生长温度、氧气、pH、宿主的关系……
- ✓ 生活史，有性生殖情况
- ✓ 血清学反应
- ✓ 对噬菌体的敏感性



1. 微生物分类鉴定的经典方法

微型、简便、快速或自动化的鉴定技术

1. API细菌数值鉴定系统
2. “Enterotube” 系统
3. “Biolog” 鉴定系统
4. 其他方法



API细菌鉴定系统的原理

- ✓以微生物生化理论为基础，借助微生物信息编码技术，为微生物检验提供了简易、方便、快捷、科学的鉴定程序。
- ✓生理生化鉴定：根据微生物对各种生理条件（温度、pH、氧气、渗透压）、生化指标（唯一碳氮源、抗生素、酶、盐碱性）代谢反应进行分析，并将结果转化成软件可以识别的数据，进行聚类分析，与已知的参比菌株数据库进行比较，最终对未知菌进行鉴定的一种技术。
- ✓Analytica Products INC的简称。法国生物-梅里埃公司生产的细菌数值分类分析鉴定系统，约有1000种生化反应，可鉴定的细菌大于800种。目前中国各级疾病预防控制机构在细菌学检验中比较多地应用了此项技术。



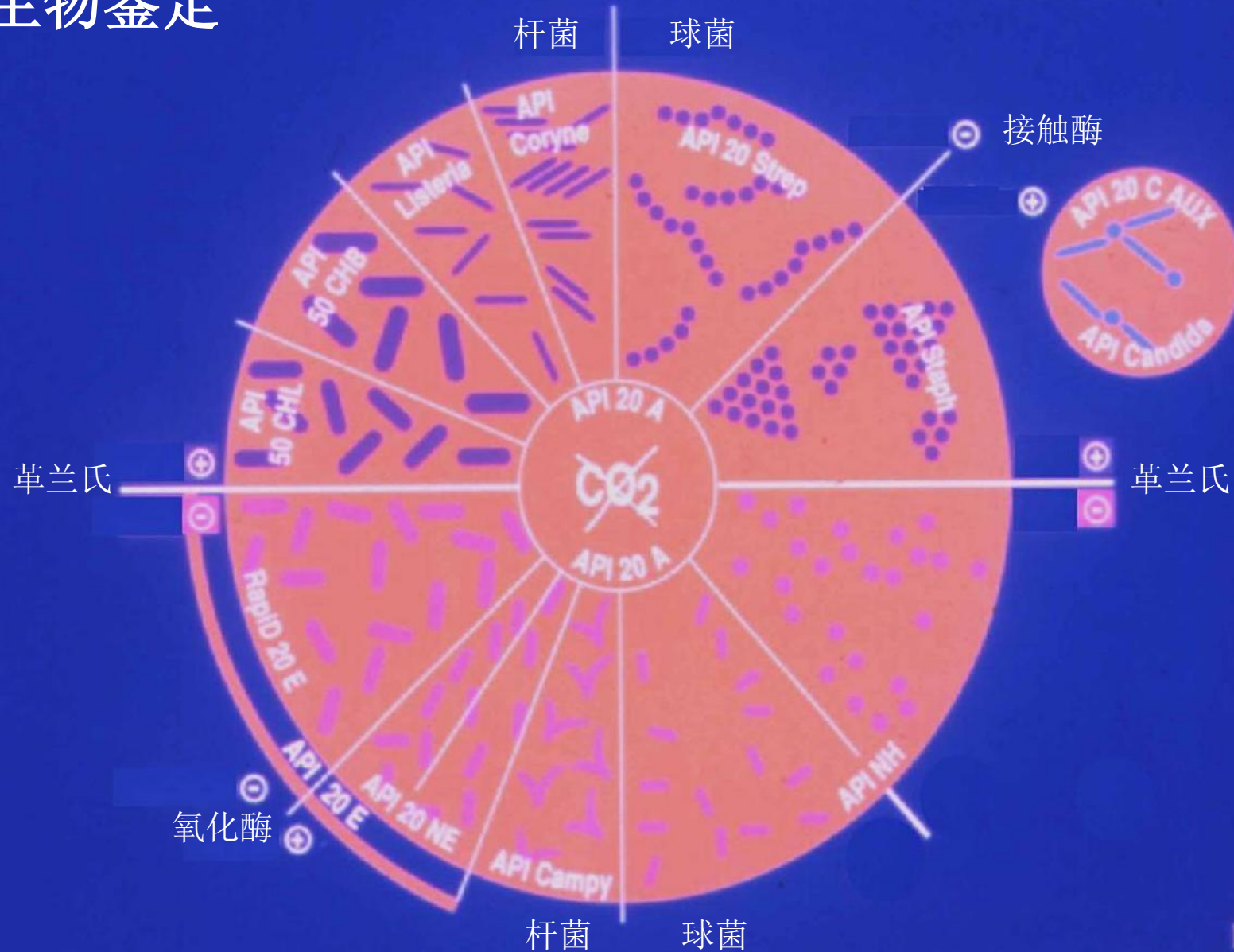
API细菌鉴定系统

- **API 鉴定系统的主要部分是API试剂条、辅助试剂及结果判读系统组成。**
- **鉴定主要依据API试剂条的生化反应结果，将一种细菌与其它细菌相鉴别,并用% id (鉴定百分率) 表示每种细菌的可能性。**

- API 20E /RapiD 20E革兰氏阴性杆菌鉴定
- API 20NE非发酵菌鉴定
- API STAPH葡萄球菌及微球菌
- API STREP链球菌鉴定
- API 20C AUX酵母菌
- API 20A厌氧菌
- API LISTERIA李斯特菌
- API CAMPY弯曲菌属
- API CORYNE棒状杆菌
- API CH芽胞杆菌/乳酸杆菌

完整的鉴定谱

微生物鉴定





API细菌鉴定系统



API 套件



API 试剂盒及其配套试剂

- 石蜡油(容量: 125ml)
覆盖在指定小孔上

- 悬浮液 (容量: 5ml)
用於调菌液

- 附加试条
加进指定的生化孔内

- PSlpettes 接种管
挑菌落, 混匀及接种



安培架

- 培养盒
保持潮湿环境

- API 试条
每个小孔载有风乾的底物



API 试剂条

在API 鉴定系统中有15 个鉴定系列, 20 余个品种, 对于不同的细菌, 分别使用不同的试剂条



API试剂条由透明的PVC材料制成, 不同的试剂条有不同数量的反应杯, 每个反应杯内包被有相应的干燥生化基质

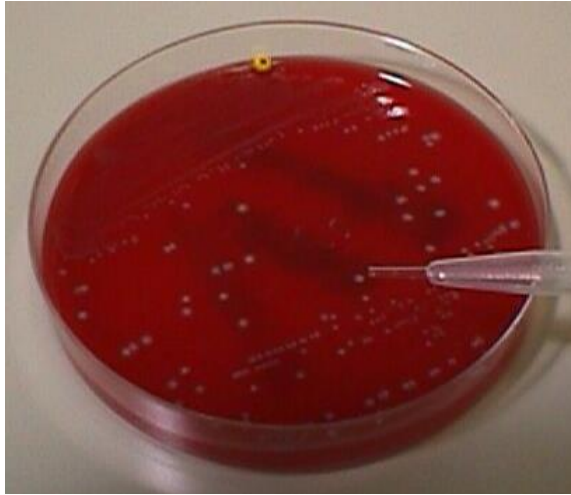


API 试剂条

常见的生化反应有以下5 类:

- 发酵试验: 为碳水化合物与酸的分解代谢试验, 结果是通过PH 的变化引起酸碱指示剂颜色的改变来判断。如葡萄糖、乳糖、甘露糖、蔗糖、甘露醇、肌醇、山梨醇等。
- 同化试验: 根据待测菌能否利用反应杯中的单一碳水化合物作为碳源而得以生长来判断。如葡萄糖、阿拉伯糖、甘露糖、甘露醇、N - 乙酰葡萄糖铵、葵酸、乙二酸、苹果酸等。
- 发酵或同化抑制试验: 是根据待测菌是否受到反应杯中特异抑制物的抑制而不能产生分解代谢或不能生长来判断。
- 酶试验: 根据待测菌含有相应的酶就可分解底物, 再通过显色反应来判断。如碱性磷酸酶、氧化酶、B- 半乳糖苷酶、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶、色氨酸脱羧酶、吲哚产生等。
- 其它生化反应: 如硝酸盐还原酶、七叶苷、明胶、硝酸盐还原等。

操作步骤 1 (API 20E)



- 分离单个菌落

挑单个可疑菌落

尽量避免使用高度选择性培养基



- 调制菌液



- 悬浮液 (容量: 5ml)

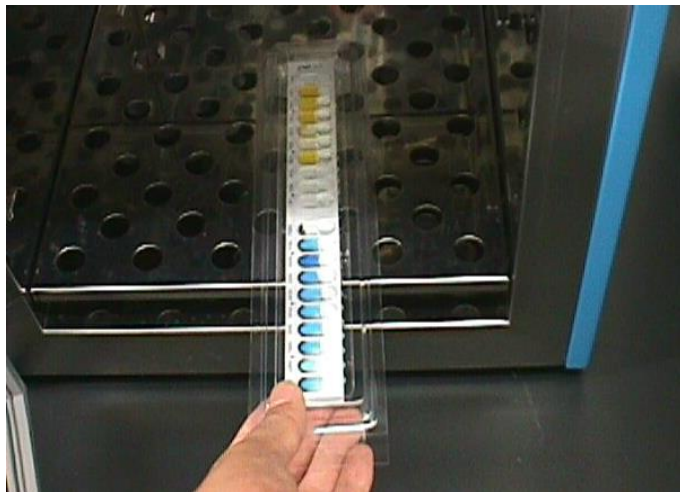


操作步骤 2 (API 20E)



- 将菌液接种到小管或小管及小杯 (CIT, VP和 GEL)
- 将试条放进培养盒内
- 将 5ml 无菌水放进培养盒里
- 利用石蜡油覆盖指定的生化孔 (有划线的孔)
ADH ODC H2S URE
- 把培养盖盖上

操作步骤3 (API 20E)



- 把试条放进孵育箱内，利用指定温度及时间

API20E : 35 - 37°C, 18-24 小时

↓ 18-24 小时后



- 按操作说明书规定，将附加试剂加进适当小孔内



API20E 试剂

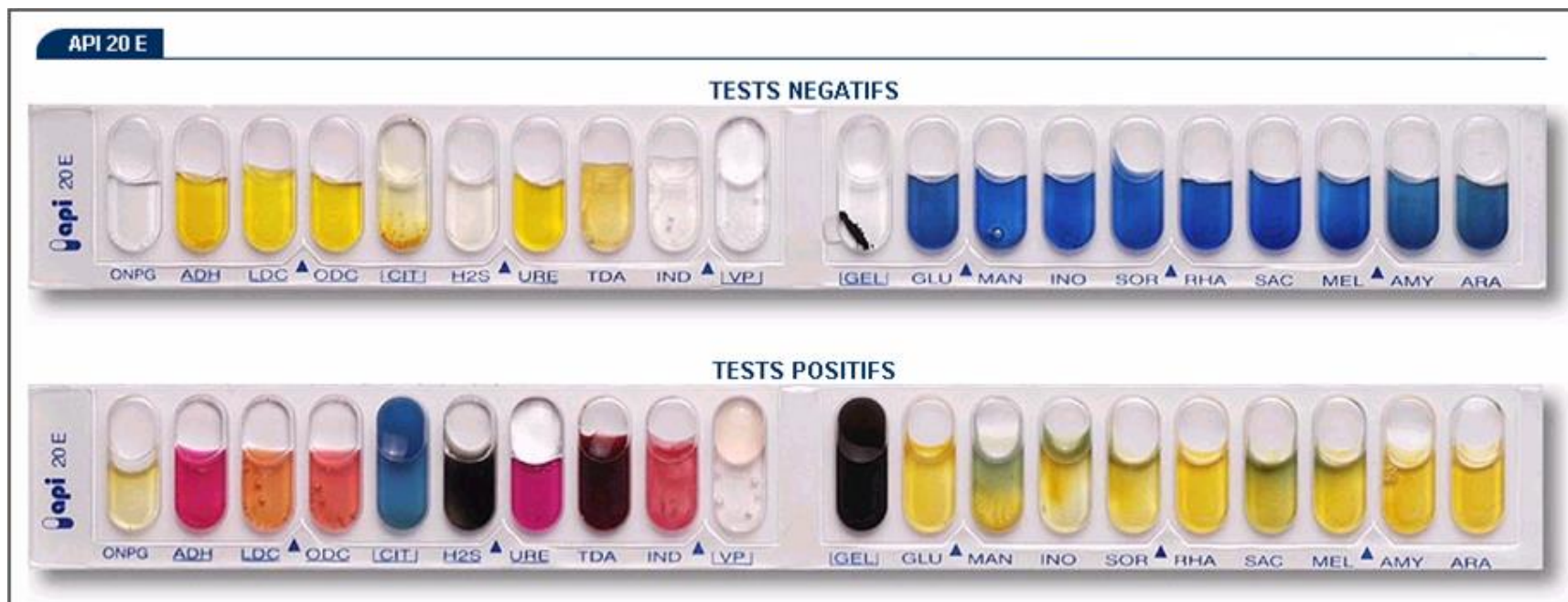


辅助试剂

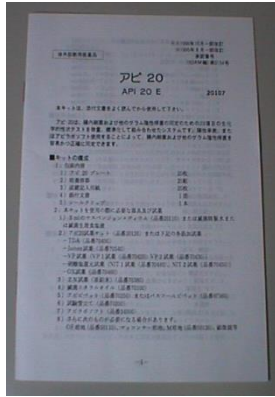
某些试验在孵育完成后需添加试剂才能进行判断。如吲哚试验需添加IND 或James 试剂, VP 试验需添加VP1、VP2 试剂, 硝酸盐还原试验需添加NIT1、NIT2 试剂、色氨酸脱羧酶试验需添TDA 试剂等



API 试剂条

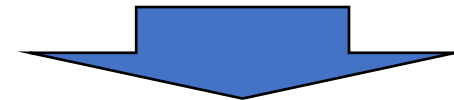


阅读结果



- 根据说明书上，
或彩图的指示，
记录结果於报告
单上。

反応/酵素	成績	
	陽性	陰性
ガラクトシダーゼ	黄色(1)	無色
ギニンジヒドロラーゼ	赤色/オレンジ色(2)	黄色
ノデカルボキシラーゼ	オレンジ色	黄色
チンデカルボキシラーゼ	赤色/オレンジ色(2)	黄色
ノ酸の利用性	青-緑色/青色(3)	淡緑色/黄色
産生	黒色の沈殿	無色/灰色がかった沈殿



- 利用编码手册
或APILAB PLUS软件进出分析



结果判读

API LAB Plus 分析软件

原理：生化结果组合跟资料库内的典型条目作比较，经计算得出：

$$\text{鉴定百比率 (\%Id)} = \text{机会率}$$

与数据库中各个项的接近程度来确认未知菌是否属于某一个分类单位(科, 属, 种)

$$\text{T值 (T index)} = \text{变异程度}$$

待检菌的分类单位被确定以后，T值表示其生化反应结果与该菌最典型生化谱的接近程度



[Modify my account](#)

bioMérieux - Marcy l'Etoile



Welcome to **apiweb**



- ▶ API 10S
- ▶ API 20 A
- ▶ API 20 C AUX
- ▶ API 20 E
- ▶ API 20 NE
- ▶ API 20 STREP
- ▶ API 50 CHB
- ▶ API 50 CHE

- ▶ API 50 CHL
- ▶ API CAMPY
- ▶ API CANDIDA
- ▶ API CORYNE
- ▶ API LISTERIA
- ▶ API NH
- ▶ API STAPH
- ▶ RAPID 20 E

- ▶ ID 32 C
- ▶ ID 32 E
- ▶ ID 32 STAPH
- ▶ rapid ID 32 A
- ▶ rapid ID 32 E
- ▶ rapid ID 32 STREP

> [Legal information](#)
> [Terms of use](#)



BIOMÉRIEUX



API

- API 10S
- API 20 A
- API 20 C AUX
- API 20 E
- API 20 NE
- API 20 STREP
- API 50 CHB
- API 50 CHE
- API 50 CHL
- API CAMPY
- API CANDIDA
- API CORYNE
- API LISTERIA
- API NH
- API STAPH
- RAPID 20 E

ID32

API 20 E V4.0

指令

颜色检查

重新启动

+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX			
3			4			0			7			5			2			0					

1	2	4	1	2	4
NO ₂	N ₂	MOB	McC	OF-O	OF-F
●			●		

确认



- API 10S
- API 20 A
- API 20 C AUX
- API 20 E
- API 20 NE
- API 20 STREP
- API 50 CHB
- API 50 CHE
- API 50 CHL
- API CAMPY
- API CANDIDA
- API CORYNE
- API LISTERIA
- API NH
- API STAPH
- RAPID 20 E

ID32

可疑生化谱	
试验条	API 20 E V4.1
生化谱	4 2 4 4 1 2 0
注	

有意义的分类单位	鉴定%	T值(T指数)	不一致的试验			
<i>Edwardsiella hoshinae</i>	68.6	0.53	ODC 99%	H2S 94%		
<i>Vibrio alginolyticus</i>	31.2	0.51	ODC 75%	GEL 75%	OX 100%	

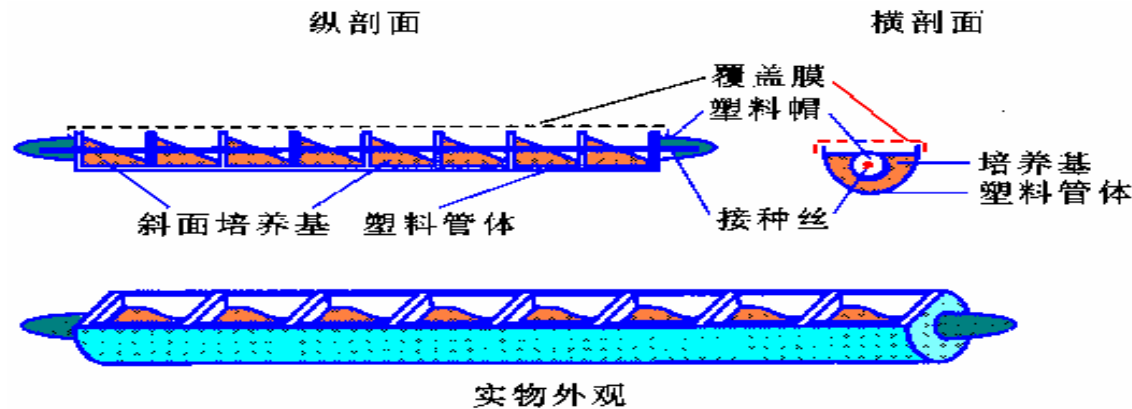
下一个分类单位	鉴定%	T值(T指数)	不一致的试验			
<i>Escherichia coli</i> 2	0.1	0.18	CIT 0%	SAC 3%		

补充试验	纤维二糖产酸			
<i>Edwardsiella hoshinae</i>	0%			
<i>Vibrio alginolyticus</i>	100%			



Enterotube 系统

- ✓ 也称作肠管系统，由8~12个分隔小室的划艇形塑料管制成。
- ✓ 每个小室中有不同的培养基，可检测微生物的不同生化反应。一根金属接种丝纵贯全部分隔小室的各种培养基，并在塑料管的两端突出，使用前有塑料帽盖遮着。



- ✓ 接种时除去接种丝外端的帽盖，并用该丝从原始培养皿上挑取菌落，然后伸入进塑料管中，将菌种接种到培养基上，接着在另一端拉出接种丝，然后再恢复原位，以使每个小室的培养基上都接上菌种。



Enterotube 系统接种过程

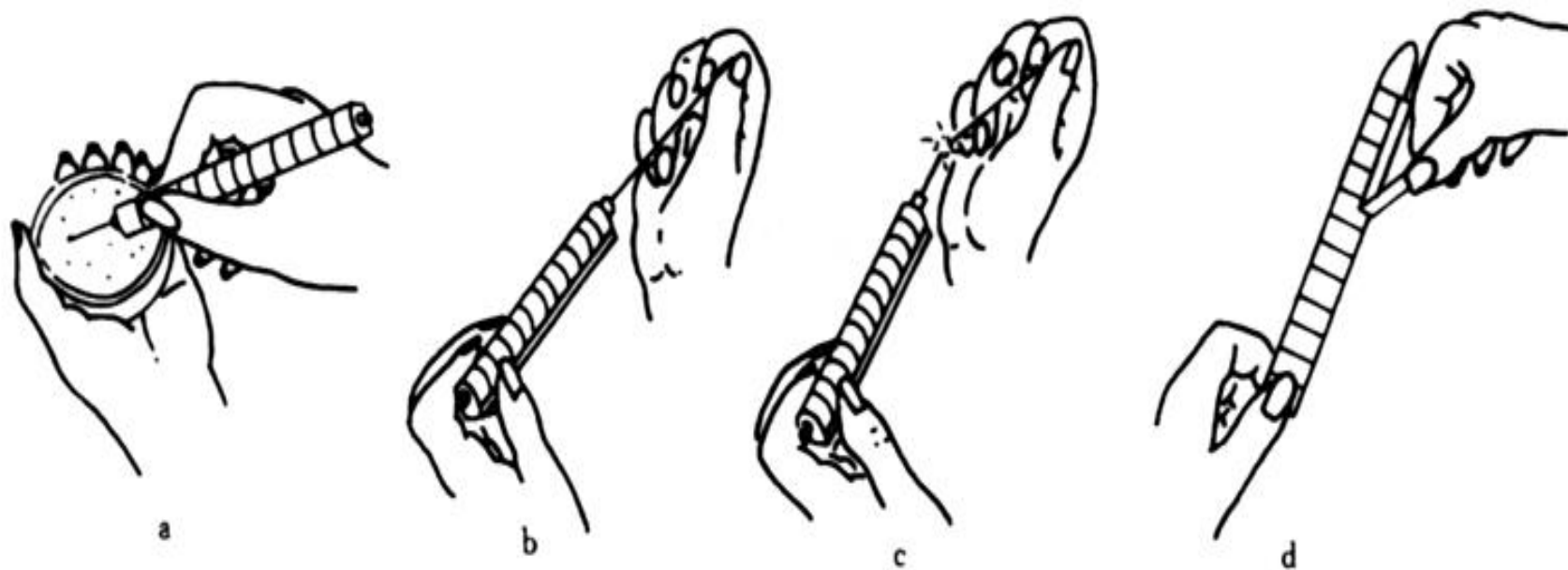


图 12-6 Enterotube 系统的接种过程

- a. 接种丝尖端接触单个菌落 b. 拉出接种丝接种 c. 再将一段接种丝插回到培养基中
d. 撕开蓝色带条, 呈现出塑料管的裂口, 使反应在培养基中能进行



Biolog全自动或手动细菌鉴定系统

- ✓ 由美国安普科技中心 (ATC US) 1989 年开发的产品, 1991 年被列为全球 100 项最好的科技产品。特点是自动化, 快速 (4~24 h)、准确、高效和应用范围广。
- ✓ 目前可鉴定 2100 多种微生物, 包括细菌、真菌、放线菌等。
- ✓ 关键部件是一个 96 孔细菌培养板。原理是利用细菌对 95 种不同碳源培养基利用和代谢情况进行鉴定。
- ✓ 手动系统以手动形式将鉴定板的结果输入电脑, 进行菌种的自动鉴定。



Biolog全自动或手动细菌鉴定系统

检测原理

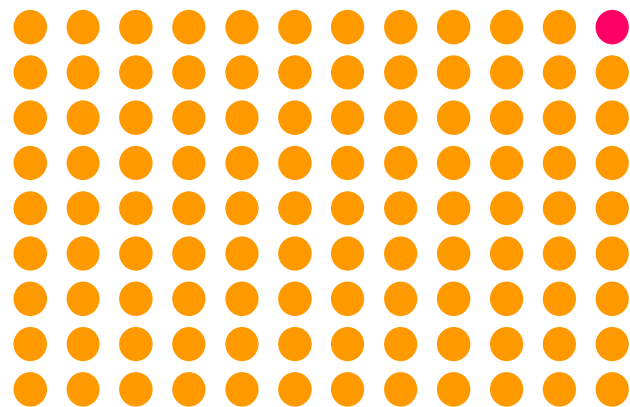
通过检测微生物细胞利用不同碳源进行新陈代谢过程中产生的酶与四唑类物质（如TTC、TV）发生颜色反应和浊度差异为基础，运用独有的显型排列技术检测出每种微生物的特征指纹图谱，在大量试验和数学模型基础上，建立起指纹图谱与微生物种类相对应的数据库。检测时通过智能软件将待鉴定微生物的图谱与数据库参比，即可得出鉴定结果。



Biolog全自动或手动细菌鉴定系统

在96孔的细菌培养板上检测微生物对
不同发酵性碳源利用情况进行的分类鉴定。

每个孔中含有
不同的底物



菌悬液或
无菌水



自动化、快速

可鉴定细菌有2000多种。



2. 微生物分类鉴定的现代方法

- 通过核酸分析鉴定微生物遗传型
- 细胞化学成分鉴定
- 数值分类方法



通过核酸分析鉴定微生物遗传型

1. DNA碱基比例的测定
2. 核酸分子杂交法
3. rRNA寡核苷酸编目分析
4. 微生物全基因组序列的测定



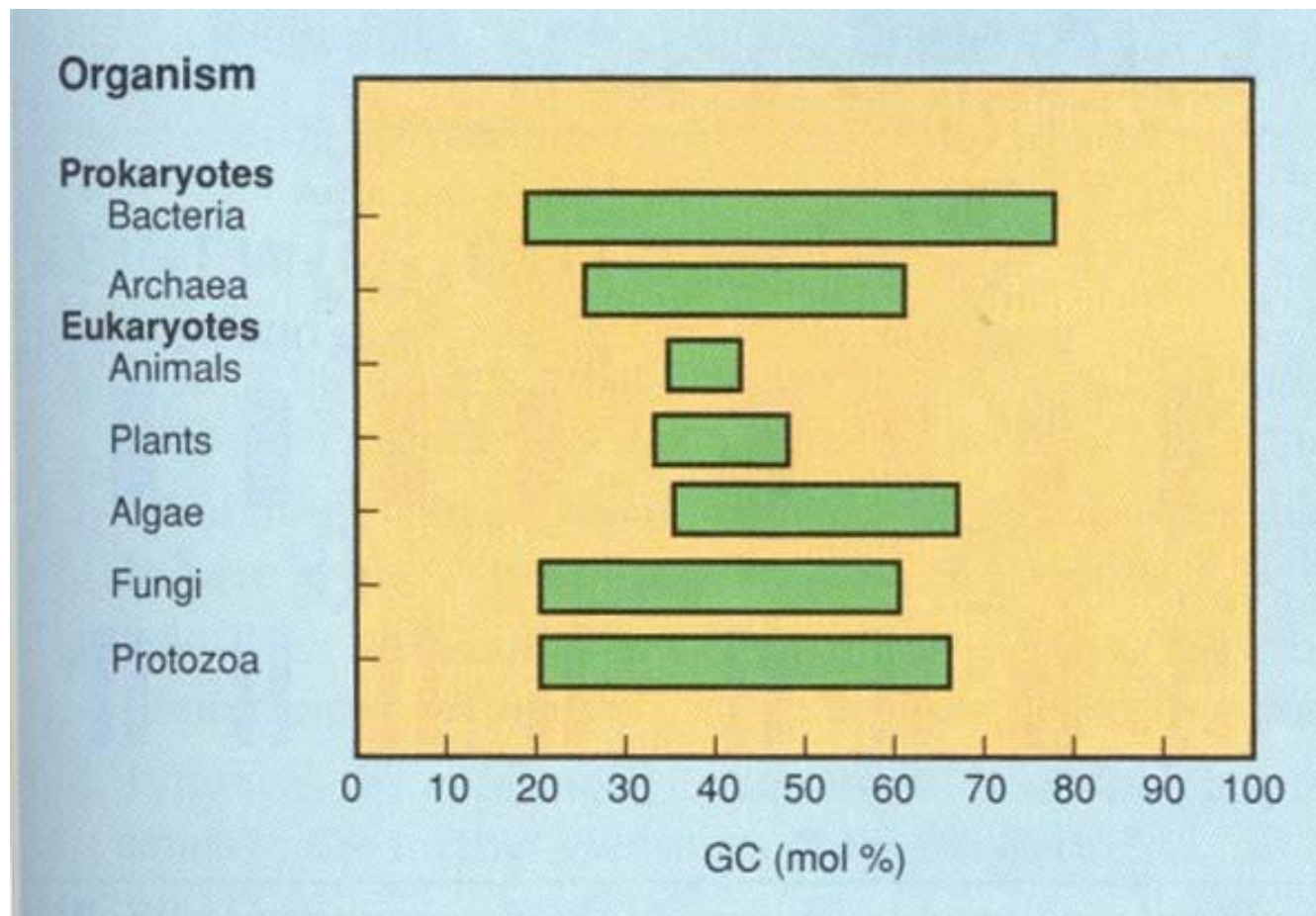
DNA碱基比例的测定

- ✓ DNA碱基比例 (GC比) 是 (G+C) mol%值
- ✓ DNA碱基基因组是各种生物一个稳定的特征，即使个别基因突变，碱基组成也不会发生明显变化。



DNA碱基比例的测定

- 每个生物种都有特定的GC%范围，因此可以作为分类鉴定的指标。
- 细菌的GC%范围为25-75%，变化范围最大，因此更适合于细菌的分类鉴定。





DNA碱基比例的测定

- 亲缘关系相近，GC比例接近。
- GC比例差距大，亲缘关系必定远。

GC%测定主要用于对表型特征难区分的细菌作出鉴定，并可检验表型特征分类的合理性，从分子水平上判断物种的亲缘关系。



DNA碱基比例的测定

- GC比已经作为建立新的微生物分类单元的一项基本特征，它对于种、属甚至科的分类鉴定有重要意义。
- 若二个在形态及生理生化特性方面及其相似的菌株，如果其GC比差别大于5%，则肯定不是同一个种，大于10%则肯定不是同一个属。



核酸分子杂交法

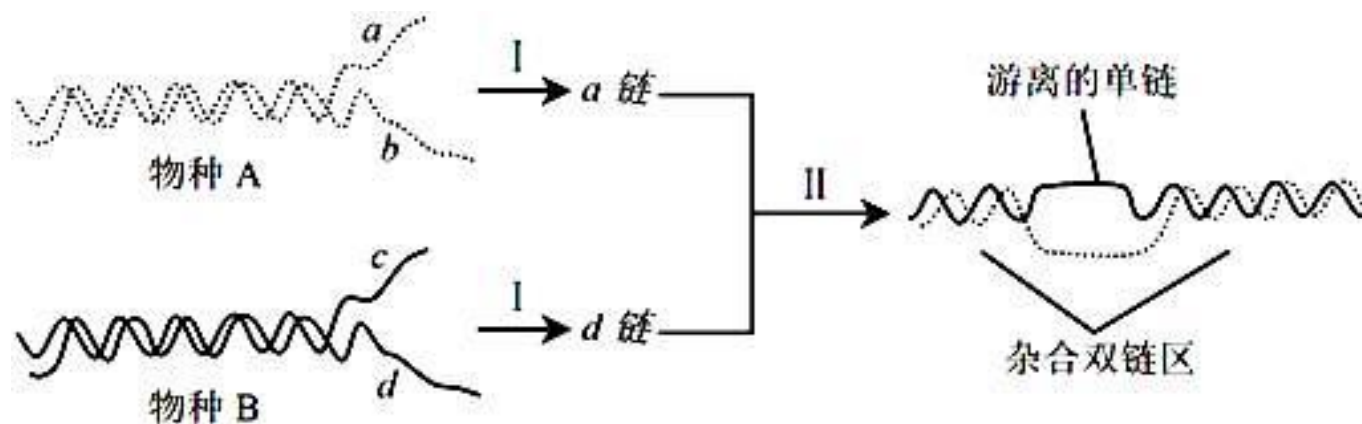
- ✓ 具有互补序列的两条单链核酸分子在一定条件下按碱基互补配对原则退火形成双链的过程。
- ✓ 通过生物DNA碱基排列顺序的异同直接反映生物之间亲缘关系的远近。
- ✓ DNA-DNA, DNA-rRNA, rRNA-rRNA分子杂交。



核酸分子杂交法测定物种亲缘关系

检测原理

不同来源的待测DNA (RNA) 加热解链成单链DNA (RNA)，在合适条件下混合复性并形成杂合dsDNA (RNA)，测定杂交百分率，确定物种亲缘关系。





核酸分子杂交法测定物种亲缘关系

- ✓ GC比在5%以内的菌株，通过DNA-DNA间的分子杂交确定是否属于同一个种。
- ✓ DNA-DNA杂交同源性在20~60%之间是同一个属
 - >60%的菌株是同一个种
 - >70%的菌株是同一亚种



核酸分子杂交法测定物种亲缘关系

1. DNA-DNA 杂交

亲缘关系相对近的微生物之间的亲缘关系比较

2. DNA-rRNA 杂交

亲缘关系相对远的微生物之间的亲缘关系比较

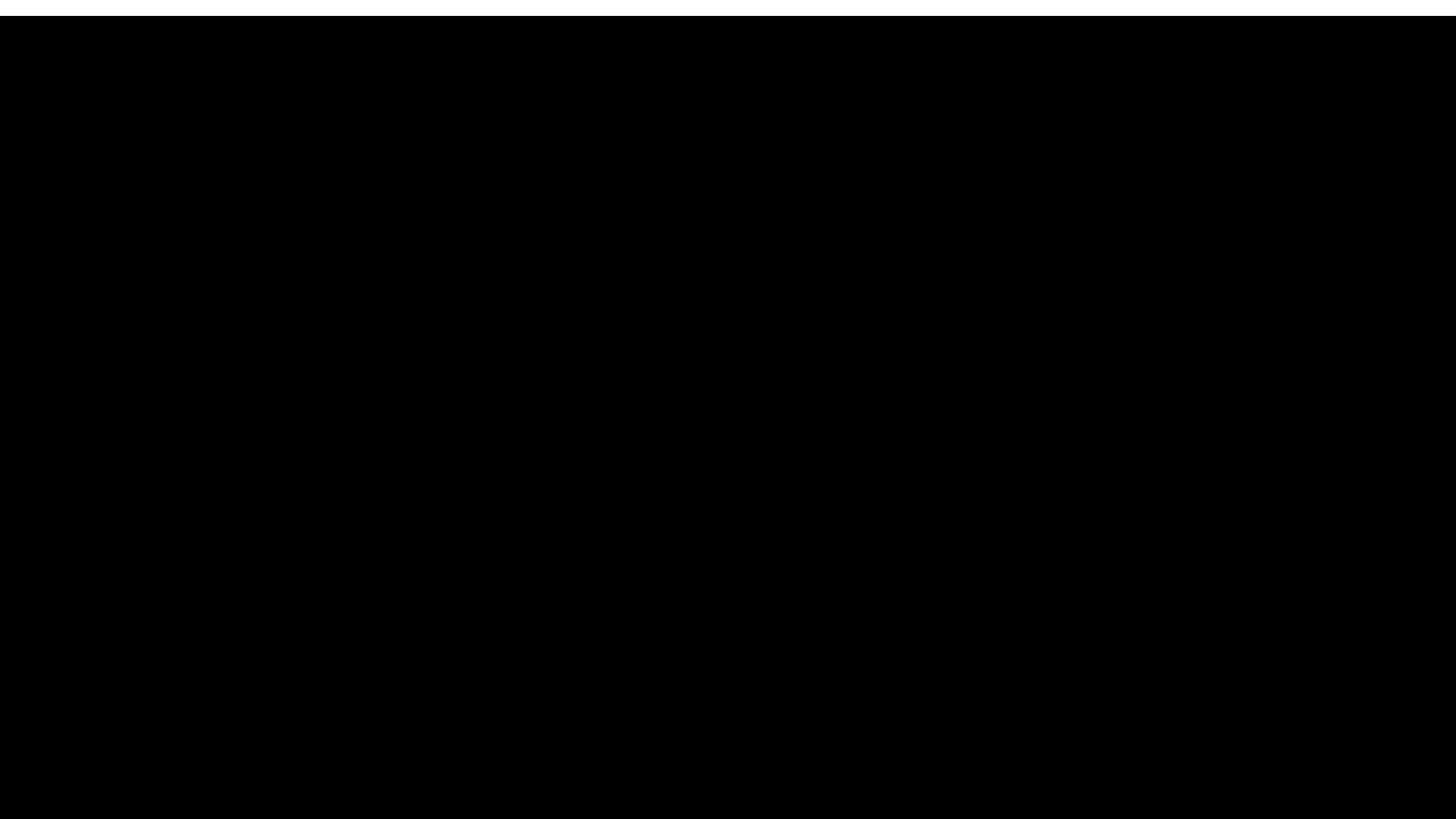
3. 核酸探针

利用特异性的探针，用于细菌等的快速鉴定



rRNA寡核苷酸分析

- ✓ 测定原核或真核细胞中核糖体核苷酸序列的同源性来确
定生物间的亲缘关系。
- ✓ Carl Woese 三域学说
- ✓ 原核生物 16S rRNA
- ✓ 真核生物 18S rRNA





微生物全基因组测序

- ✓ 全基因组测序 (WGS) 针对人类样本、模式生物体和微生物生物体执行。
- ✓ 微生物全基因组测序可用于鉴定和发现新生物体或鉴定特定的细菌生物体。



细胞化学成分鉴定

1. 细胞壁的化学成分

原核生物细胞壁的成分分析，对菌种鉴定有一定的作用。

肽聚糖短尾肽的第三位氨基酸的不同：

- ① 内消旋二氨基庚二酸 (meso-DAP)
- ② 赖氨酸 (Lysine)
- ③ L-DAP



细胞化学成分鉴定

2. 全细胞水解液的糖型

放线菌全细胞水解液可分为4种主要糖型：

- ① 阿拉伯糖、半乳糖 诺卡氏菌
- ② 马杜拉糖 马杜拉放线菌属
- ③ 无糖 高温放线菌属
- ④ 木糖、阿拉伯糖 小单孢菌属



细胞化学成分鉴定

3. 磷酸类脂成分的分析

位于细菌、放线菌细胞膜上的磷酸类脂成分，在不同属中有所不同，可用作鉴别属的指标。



细胞化学成分鉴定

4. 枝菌酸的分析

不同微生物的枝菌酸有所差别，碳原子数目有所差异，以此来区别微生物。

5. 醌类的分析

原核微生物有的含有甲基萘醌，有的含有泛醌，它们在放线菌鉴定上有一定的价值。

6. 气相色谱技术用于微生物鉴定

可分析微生物细胞和代谢产物中的脂肪酸和醇类等成分，对厌氧菌的鉴定十分有用。

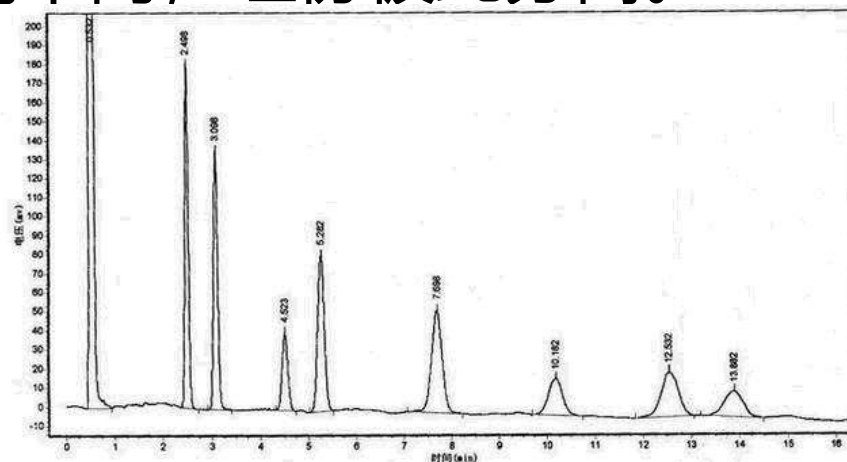
气相色谱法

气相色谱法是利用**气体**作流动相的色层分离分析方法。

汽化的试样被载气（流动相）带入色谱柱中，柱中的固定相与试样中各组份分子作用力不同，各组份从色谱柱中流出时间不同，组份彼此分离。



气相色谱仪



峰号	峰名	保留时间	峰高	峰面积	含量
1	溶剂	0.532	858706.375	4624160.500	47.5250
2	α -BHC	2.498	180235.297	892678.625	9.1745
3	β -BHC	3.098	136158.000	805961.625	8.2833
4	γ -BHC	4.523	39747.000	336677.188	3.4602
5	δ -BHC	5.282	81741.102	793069.313	8.1508
6	PP'-DDE	7.698	53724.957	872771.875	8.9699
7	PP'-DDD	10.182	19794.328	441226.813	4.5347
8	OP'-DDT	12.532	23371.328	584256.000	6.0047
9	PP'-DDT	13.882	13516.465	379153.094	3.8968

气相色谱图



数值分类法

借助现代计算机技术对拟分类的微生物对象按大量表型性状的相似程度进行统计、归类的方法。

1. OTU (操作分类单元)

分类研究的个体，细菌研究中一般指菌株。

2. 表观群 (phenon)

指建立在表面特征相似的基础上的类群，一般是指通过数值分类法得到的类群。



计算两菌株间的相关系数

$$S_m = \frac{a + b}{a + b + c + d} \quad \text{包含正负反应性状}$$

$$S_i = \frac{a}{a + b + c} \quad \text{仅包含正反应性状}$$

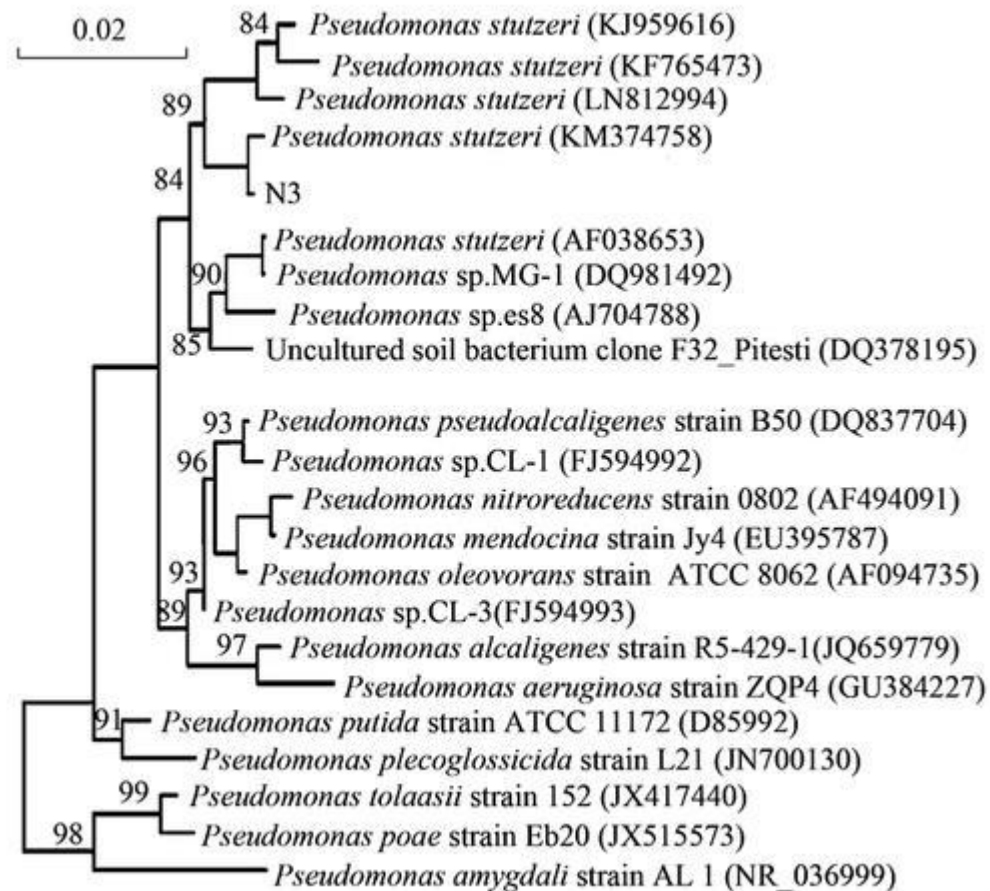
a 为两菌株呈正反应的性状数， b 为两菌株甲呈正反应而乙呈负反应的性状数， c 为甲呈负反应而乙呈正反应的性状数， d 为两菌株均呈负反应的性状数。



数值分类法

列出相似度矩阵

将矩阵图转换成树状谱





思考题

1. 微生物鉴定的经典方法有哪些?
2. 微生物鉴定的现代方法有哪些?