

细菌系统分类学现状

高俊莲 陈文新

(北京农业大学生物学院, 北京 100094)

生物的系统分类是指以其亲缘关系为依据所进行的分类。系统分类能够真正反映生物的起源及进化途径, 具有较大的稳定性。动植物的系统分类要比细菌的系统分类早得多。主要是由于动植物有丰富的化石资料为依据; 虽然也发现了一些细菌化石, 但是可用于系统分类的化石资料非常少。这是因为细菌总体形态学简单, 细菌化石也只是一些小球或小杆的印迹, 几乎不含任何结构方面的信息。

最早尝试细菌系统分类的是 Orla-Jensen^[1]。1909年他通过一些主观推测提出: 甲烷氧化细菌是所有细菌的祖先, 依据是: (1) 早期地球

上没有有机物存在, 因此地球上的第一个细菌必定是自养的; (2) 从热力学角度来考虑, 甲烷的氧化较其他可利用物质的氧化更为合理。接着 Kluver 和 Van Niel^[1] 于 1936 年提出: 球菌是最原始的细菌, 因为球菌的形态学最简单。他们认为, 球菌的伸长或者融合就变为杆菌, 弧菌来自杆菌, 螺旋菌来自弧菌等等。这些看法纯属推测。今天看来, 这些推测的基本前题是错误的, 但是这些看法中包含了细菌系统分类的思想。

随着分子生物学的兴起, 细菌系统分类的局面得以改善。随着人们对 DNA 分子的不

认识以及分子生物学技术的迅速发展,人们认识到虽然细菌缺少化石资料,然而细菌的系统分类不仅仅局限于地质学上的化石资料,细胞本身的遗传序列即基因组记录着它过去的进化历史。这种活的生化记录较其化石记录更为丰富更为广泛。它所追溯的细菌系统发育的历史超过了最古老的化石。细胞的基因组被称为活化石。今天存在于细胞内的每个基因都是许多年前的基因的拷贝,当然不可能是精确的拷贝,这是因为进化过程中的突变使原始的基因组有所改变。但是,这种改变非常缓慢,基因组原始状态的遗迹依然存在。基因组作为极好的活化石首先因为其分子的简单性,其次是它的遗传序列的“空间”非常庞大,所以,在整个进化过程中也仅仅一小部分合理的遗传序列曾被表达。因此,如果通过严格比较大量的核苷酸得出两个基因组是相似的,这就意味着这两个基因组具有共同的祖先,也就是说它们的亲缘关系很近。由此可以得出拥有这两个基因组的生物体的亲缘关系也很近的结论。

另外,一般情况下基因与其产物(蛋白质或RNA分子)的关系是呈线性关系的。因此,在细菌系统分类中,基因产物的序列也同基因序列本身一样有用。在高等生物中,通过比较细胞色素C的序列证实并扩大了高等生物的系统发育树。但是,在细菌系统分类中,象细胞色素C这样的分子就不那么有效了。这样的蛋白质并非广泛存在,其功能也非严格不变,所以不是完全可比。同时由于细菌的谱系比较古老,细菌之间序列上的差异远较真核生物间的差异大。以上因素使得基于蛋白质进化的细菌系统发育不完全而且不确定。

另一种基因产物RNA可作为细菌系统分类的依据。所有自我复制的实体必须有维持和繁殖信息以及将其翻译为氨基酸链进而合成蛋白质的系统。参与这个过程分子多数起源于细胞进化的早期阶段,它们必定出现在细胞发育成为原核生物之前。因此,这些分子具有作为细菌系统分类依据的特性。在RNA分子中,最合理的首选分子是rRNA分子,它与核

蛋白一起构成核糖体,正是在核糖体上遗传信息被翻译为蛋白质。rRNA分子容易分离,一个典型的细菌细胞具有10,000—20,000个核糖体。而且,rRNA分子在长期的进化过程中保持着不变的功能。它的另一优点是至少其序列中的某些部分变化相当缓慢,足以使其共同祖先的序列不至于被完全抹去。

细菌的系统分类真正起步于本世纪六十年代初。自60年代以来,人们通过比较细菌的基因组(包括直接比较和间接比较)来测定其亲缘关系,从而进行细菌系统分类。所采用的方法主要包括以下五类。

(一) DNA G + C mol%

它是最先用于细菌系统分类的方法。该方法通过比较DNA的碱基组成(即G + C mol%值)来比较细菌的基因组。从伯杰手册第八版中可以看出:60年代至70年代初细菌系统分类主要采用这种方法。但是这种方法比较粗放,只有G + C mol%显著不同的细菌才可判为不属于同一个种;而G + C mol%相同的细菌则难以判断是否属于同一个种。

(二) DNA-DNA 杂交技术

1963年,Marmur^[2]等人将DNA-DNA杂交技术引入细菌的系统分类。该方法通过比较细菌DNA的核苷酸序列来比较细菌的亲缘关系。采用DNA-DNA杂交法所作的工作主要有两个方面:①细菌种群的界定:1973年,Pallearoni^[3]等用DNA-DNA杂交法界定了假单胞菌(*Pseudomonas*)属内的种;同年,Brenner^[4]用同样的方法界定了肠杆菌科细菌的种。②修正传统分类:DNA-DNA杂交法与传统分类方法确定的细菌群有时往往不吻合,有些群的细菌已据DNA-DNA杂交法的结果进行了重新编排;而另一些群出于实用上的原因仍保持原来的分类地位。部分实例见表1。

这种方法最大的特点是DNA同源性的不连续性,即DNA-DNA杂交的结果指出两个菌株或者亲缘关系非常近或者无亲缘关系,因为非配对碱基超过10—20%时就不能形成双

表1 传统分类与 DNA-DNA 杂交结果的比较

群	传统分类	DNA-DNA 杂交结果	重排结果
脆弱拟杆菌 (<i>Bacteroides fragilis</i>)	含 5 个亚种	这些亚种代表不同的 DNA 同源群 ^[1]	分为 5 个独立的种 ^[10]
沙门氏菌属 (<i>Salmonella</i>)	含 4 个亚属, 11 个种	仅含有一个 DNA 同源群 ^[2]	建议只定一个种 ^[2]
植物病原性假单胞菌 [<i>Pseudomonas (Phytopathogenic)</i>]	依寄主植物定为许多不同的种	原来的种并不反映这些细菌之间的亲缘关系 ^[3]	定为较少的几个种 ^[2]
梅毒密螺旋体 (<i>Treponema pallidum</i>) 极细密螺旋体 (<i>T. pertenue</i>)	定为两个种	二者为一个 DNA 同源群 ^[10]	同一个种的两个亚种: <i>T. pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i> 和 <i>T. pallidum</i> subsp. <i>pertenue</i>
埃希氏菌属和志贺氏菌属 (<i>Escherichia & Shigella</i>)	为两个独立的属	为一个 DNA 同源群 ^[11]	未重排
昆虫耶尔森氏菌和假结核耶尔森氏菌 (<i>Yersinia pestis & Pseudotuberculosis</i>)	为两个种	为一个 DNA 同源群 ^[12]	未重排

链。因此, DNA-DNA 杂交对细菌种的水平上的分类是非常有用的, 但它不能用来测定种间或亲缘关系更远的细菌。

(三) rRNA-DNA 杂交技术

60 年代的研究表明: 通过分析 DNA 的特殊片段可以测定细菌之间的亲缘关系。直接测定法有 rRNA-DNA 杂交技术, Doi 和 Igarashi^[13] 及 Dubnau^[14] 对芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 各个种的研究表明: 细菌 rRNA 的顺反子的保守性比整个基因组的保守性大。随后在其他细菌中也观察到了类似的结果。Palleroni^[3] 等报道了假单胞菌属由 5 个 rRNA 群组成。De Vos 和 De Lay^[15] 进一步报道了这 5 个 rRNA 群之间的亲缘关系较它们与其他格兰氏阴性细菌属之间的亲缘关系还远, 于是建议只有荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) 这一 rRNA 群仍保留在假单胞菌属中, 其它群另立新属。梭菌属 (*Clostridium*) 是伯杰手册中最大的一个属。Johnson 和 Francis^[16] 报道该属至少由 4 个 rRNA 同源群组成, 有可能将该属定为四个或更多的属。

间接测定特殊基因的方法是通过测定基因产物来进行的。主要有氨基酸序列分析法和蛋白质血清学性质的测定。Bowditch^[17] 等在研究过氧化物歧化酶和谷氨酰胺合成酶血清学特性

的基础上, 将某些直杆菌也并入海洋螺菌属 (*Oceanospirillum*) 中, 使得螺旋状不再是这个属的鉴定特征。

无论是 rRNA-DNA 杂交技术, 还是蛋白质血清学方法, 都要求直接比较细菌的 rRNA 或蛋白质, 涉及到 rRNA 或特定蛋白质提取等问题, 所以比较费时。

(四) rRNA 寡核苷酸编目法

1965 年, Sanger 等建立了一种寡核苷酸分离技术——双向电泳法。在该技术的基础上建立了 rRNA 寡核苷酸编目法。其原理^[18]是: 先用 T₁ 核酸酶水解 rRNA, 水解液走双向电泳得出寡核苷酸指纹图, 对指纹图上的每个点 (代表一种寡核苷酸) 进行序列分析, 即可得出某种细菌 rRNA 的寡核苷酸目录。比较任何两个细菌的寡核苷酸目录即可确定它们之间的相似系数 S_{AB}。其计算公式:

$$S_{AB} = \frac{2N_{AB}}{N_A + N_B}$$

其中: N_A = A 细菌中长度大于 6 个核苷酸的寡核苷酸片段的数目;

N_B = B 细菌中长度大于 6 个核苷酸的寡核苷酸片段的数目;

N_{AB} = A、B 细菌中序列相同的寡核苷酸数目。

表2 三类生物部分代表之间的相似系数 S_{AB}

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 <i>Saccharomyces</i> 18S	—	0.29	0.33	0.05	0.06	0.08	0.09	0.11	0.08	0.11	0.11	0.08	0.08
2 <i>Lemna minor</i> 18S	0.29	—	0.36	0.10	0.05	0.06	0.10	0.09	0.11	0.10	0.10	0.13	0.07
3 <i>L cell</i> 18S	0.33	0.36	—	0.06	0.06	0.07	0.07	0.09	0.06	0.10	0.10	0.09	0.07
4 <i>Escherichia coli</i>	0.05	0.10	0.06	—	0.24	0.25	0.28	0.26	0.21	0.11	0.12	0.07	0.12
5 <i>Chlorobium vibrioforme</i>	0.06	0.05	0.06	0.24	—	0.22	0.22	0.20	0.19	0.06	0.07	0.06	0.09
6 <i>Bacillus firmus</i>	0.08	0.06	0.07	0.25	0.22	—	0.34	0.26	0.20	0.11	0.13	0.06	0.12
7 <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	0.09	0.10	0.07	0.28	0.22	0.34	—	0.23	0.21	0.12	0.12	0.09	0.10
8 <i>Aphanocapsa</i> 6714	0.11	0.09	0.09	0.26	0.20	0.26	0.23	—	0.31	0.11	0.11	0.10	0.10
9 <i>Chloroplast</i> (Lemna)	0.08	0.11	0.06	0.21	0.19	0.20	0.21	0.31	—	0.14	0.12	0.10	0.12
10 <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	0.11	0.10	0.10	0.11	0.06	0.11	0.12	0.11	0.14	—	0.51	0.25	0.30
11 <i>M. ruminantium</i> strain M-1	0.11	0.10	0.10	0.12	0.07	0.13	0.12	0.11	0.12	0.51	—	0.25	0.24
12 <i>Methanobacterium</i> sp., <i>Cariacoisolate</i> JR.1	0.08	0.13	0.09	0.07	0.06	0.06	0.09	0.10	0.10	0.25	0.25	—	0.32
13 <i>Methanotaricina barkeri</i>	0.08	0.07	0.07	0.12	0.09	0.12	0.10	0.10	0.12	0.30	0.24	0.32	—

据 S_{AB} 值可确定细菌之间的亲缘关系。

1977年之前,人们普遍认为生物界由两大类生物组成,即原核生物和真核生物。1977年 Woese 和 Fox^[19] 比较了各种生物的 16S rRNA 或 18S rRNA 的寡核苷酸目录(表2)。其结果表明:古细菌和真细菌之间的亲缘关系就象它们与真核生物之间的亲缘关系一样远。于是他们将整个生物界划分为三大类:(1)古细菌;(2)真细菌;(3)真核生物,包括除线粒体和叶绿体之外的真核细胞。他们认为古细菌、真细菌和真核生物是由一个共同的祖先(progenote)经过不同的进化途径进化而来。

自1977年以来, Woese 和他的同事及其他微生物工作者已经用寡核苷酸编目法做了大量工作。1981年, Woese^[20] 总结了几百个寡核苷酸编目法研究的结果,提出一个生物进化树(图1)。Woese 推测所有生物由一个共同祖先 progenote 进化而来,progenote 的含义是早期的、比较简单的细胞,它具有原始的遗传和翻译机制。progenote 存在的时间大约25亿年。progenote 在其细胞壁发育过程中分化出三条不同的进化线。

寡核苷酸编目法用于确定细菌主要类群是足够的,但该方法不能解决这些主要的细菌类群内进一步的分类问题。

(五) rRNA 全序列分析法

目前,16S rRNA 全序列分析法正在取代寡核苷酸编目法。运用这种方法,细菌系统分类又向前推进了一步。1987年, Woese^[21] 在总结大量 rRNA 全序列分析结果的基础上,提出了更为精确的系统发育树。图中线段的长度与进化距离成正比,而进化距离是通过比较 16S rRNA 的序列,得出 rRNA 序列相似百分数,再经过一些数学运算而得出的。与1981年 Woese 提出的系统发育树相比较,这是一棵无根树^[22],由于缺乏对生物共同祖先的了解,因此没有画出。rRNA 全序列分析法的结果与寡核苷酸编目法得出的结果大致相同。rRNA 全序列分析法也将生物界分为三大部分:古细菌、真细菌和真核生物。但该方法将每一部分生物

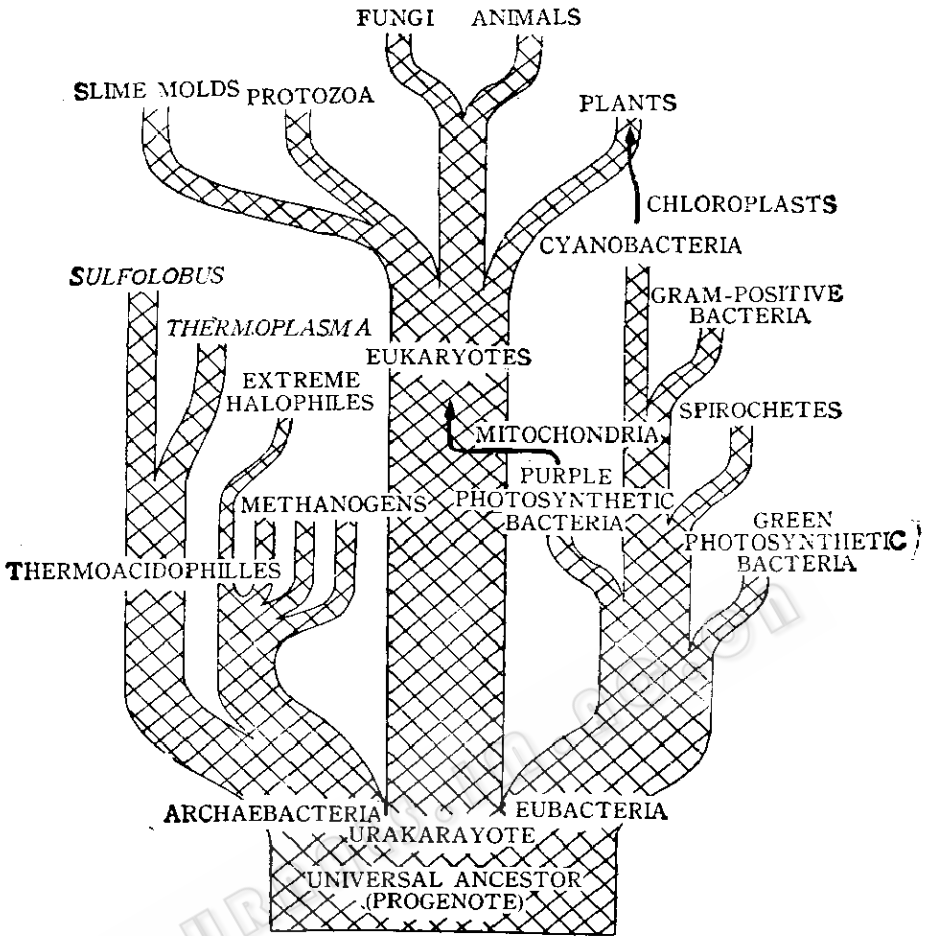


图1 寡核苷酸编目法确定的系统发育树

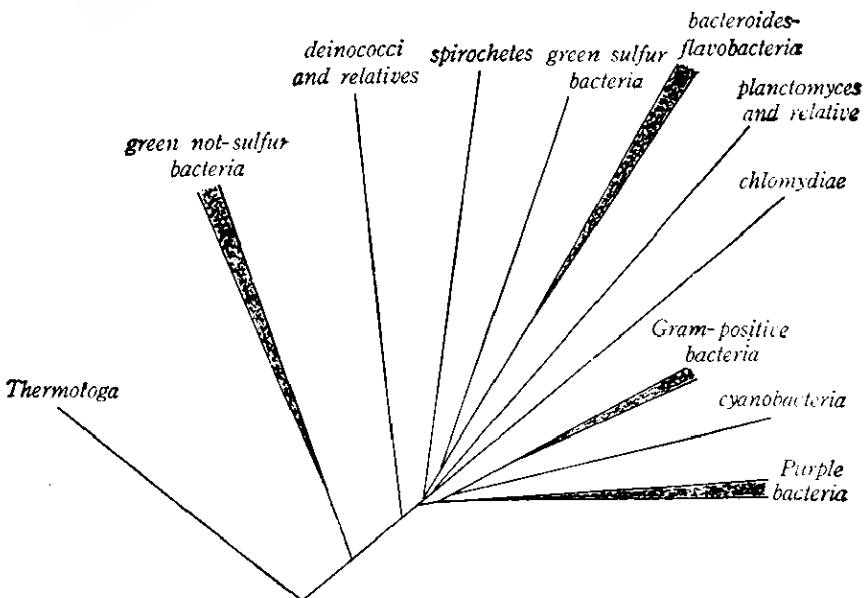


图2 真细菌的系统发育树

作了进一步的分类。其中将真细菌分为10个“亚门”：紫细菌、蓝细菌、格兰氏阴性细菌、衣原体、浮霉菌及其亲缘关系较近的细菌、拟杆菌及黄杆菌、绿硫细菌、螺旋体、奇异球菌及其相关的菌、绿色非硫细菌和单独的一个属——被覆好热菌属(图2)。从图2中可以看出,这10个亚门的细菌中除绿色非硫细菌外,其他9个亚门的细菌几乎同时起源于系统发育树的同一个区域。这棵树的根把被覆好热菌属和其他十个亚门的细菌分开。所有真细菌中,被覆好热菌属与根(指古细菌中的一致序列)的亲缘关系最近。

与以表型特征为依据的传统分类相比较,系统分类的稳定性大,但实用性较差;而传统分类实用性强,稳定性差些。目前的情况是两种分类系统的结果有时可以达到很好的统一,有时无法统一。究竟两个系统能否达到最后的统一,目前仍然是一个问题。有些微生物学家正在考虑同时建立两种分类系统的可能性,一个是系统分类,仅仅依据核酸序列的相似性来分群;另一个是实用分类即传统分类,根据表型特征来分类。

参 考 文 献

1. King N R: *Can. J. Microbio.*, **34**: 536—540, 1988.
2. Marmut J et al.: *Annu. Rev. Microbiol.*, **17**: 329—372, 1963.
3. Palleroni N J et al.: *Int. J. Bacteriol.*, **23**: 333—339, 1973.
4. Brenner D J et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **23**: 1—7, 1973.
5. Johnson J L et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **23**: 308—315, 1973.
6. Cato E P et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **28**: 230—237, 1976.
7. Le Minor L et al.: *Ann. Microbiol.*, **133B**: 245—254, 1982.
8. Pecknold P C et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **23**: 111—121, 1973.
9. Krieg N R et al.: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, pp. 141—199, 1984.
10. Miao R et al.: *J. Bacteriol.*, **141**: 427—429, 1980.
11. Brenner D J.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **23**: 298—307, 1973.
12. Bercevier H et al.: *Cuur. Microbiol.*, **4**: 225—230, 1980.
13. Doi R H et al.: *J. Bacteriol.*, **90**: 384—390, 1965.
14. Dubnau D et al.: et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **54**: 491—498, 1985.
15. De Vos P et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **33**: 487—509, 1983.
16. Johnson J L et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **88**: 229—244, 1975.
17. Bowditch R D et al.: *Curr. Microbiol.*, **4**: 221—229, 1984.
18. Stackebrandt E et al.: *Methods in Microbiology*, **18**: 75—93, 1985.
19. Woese C R & G E Fox: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**: 5088—5090, 1977.
20. Woese C R: *Scientific American*, **244**(6): 98—122, 1981.
21. Woese C R: *Microbiological Review.*, **51**: 221—271, 1987.
22. 汪恩涛, 陈文新: *微生物学通报*, **17**(6): 346—350, 1990.