

革兰氏阳性细菌分类研究概况

凌代文

(中国科学院微生物研究所, 北京)

细菌分类学既是一门基础学科, 又是综合性学科。它的任务是在全面了解细菌生物学特性的基础上, 研究细菌的种类, 探求其起源、演化与其它类群生物及其内部各类群间的亲缘关系, 从而提出反映自然发展的分类系统, 并将细菌加以分门别类。

细菌分类学发展较晚, 开始也是以外部形态为分类依据, 以后逐渐采用一般生理生化特征, 但是, 依此所建立分类系统仍摆脱不了人为因素。近二十年来, 由于细菌形态学、细胞学、遗传学、生理学和生物化学等学科的发展, 使细菌分类学有可能通过综合上述学科的研究成果, 了解细菌的一些类群在上述各方面的特性。从而对细菌在生物界的地位, 以及内部各类群、属种间的亲缘关系有了进一步的认识。在细菌分类学研究中, 革兰氏阳性细菌的研究进展具有一定代表性, 本文拟在叙述这类细菌研究概况的同时, 也提供一些一般细菌分类研究的情况, 并探讨细菌分类学的发展趋势。

美国细菌学协会所属的 Bergey 氏手册董事会主编的《Bergey 氏鉴定细菌手册》(以下简称“手册”)中, 革兰氏阳性细菌的各分类单位, 与其它类群细菌一样, 自 1923 年第一版出版以来, 逐版均有修改, 特别是最新的第八版, 较之第七版变动更大。在第七版中^[1], 这类细菌归属于植物界、原生植物门、裂殖菌纲、真细菌目内, 而在第八版中^[2], 它们归属于原核生物界、细菌门, 以下分列在第 14、15、16 和 17 部分中。关于第八版“手册”的分类系统, 有人在本刊已作过介绍, 不再赘述。

最近 Gibbons 和 Murray^[3] 对细菌的较高级分类单位提出建议, 主张将革兰氏阳性菌归在原核生物界、硬壁菌门 (Firmacutes) 内, 门下的目, 即包括“手册”第八版中的第 14—17 部分。

革兰氏阳性细菌分类位置的变动, 综合了近 20 年来细菌学各分支学科的研究成果, 反映了细菌分类学的进展。本文拟从五个方面加以概述。

分类系统正逐步向反映自然的系统过渡

在对细菌各类群的生物学特性缺乏全面了解以

前, 人们不可能对它们进行综合全面的研究, 从而难于获得系统发育的资料以建立反映自然的系统。所建立的体系, 也不过是将过去报道过的细菌和现在新发现的细菌, 按命名原则, 依据分类的单位, 将其放置一个“适当的”位置, 以编目录的方式排列起来而已。这样的编排只是为了鉴定菌种。早期重要的分类系统, 如 Cohn (1872)、Zopf (1883) 和 Migula (1900) 所建立的系统, 都属此类。

Orla-Jensen (1909) 最早试图根据细菌的系统发育提出一个分类系统, 他依据生理特征, 假定自养菌最原始, 而不问其形态是球形或杆形^[4,5]。Stanier 和 van Niel 绘制的进化图谱, 假定早期的细菌是原始的球菌, 由它开始分为 5 支, 第 1 支通过一些过渡类型进化为八叠球菌; 第 2 支由假单胞菌通向弧菌和螺菌; 第 3 支通向棒状杆菌和放线菌; 第 4 支通向芽孢杆菌; 第 5 支通向圆褐菌目 (Chroococcales)^[6]。

在 Красильников 绘制的微生物系统发育简图中, 设想他所定义的放线菌纲、细菌纲、粘细菌纲和螺旋体等, 是从原生植物通过不同中间类型发展而来的^[7]。Yamanaka 根据对细菌的呼吸机制和细胞色素的研究认为, 细菌是从厌氧菌进化为好氧菌的^[8]。从地球的演变和生命起源来看, Yamanaka 的设想是可信的, 但他当时未能勾划出进化详情。甚至还有人根据细菌化石的研究来寻找原始细菌, 并探求其演化过程。虽然已发现估计约在 20—31 亿年前类似现代球衣细菌和杆状细菌的细菌化石标本, 然而这些证据毕竟很有限^[9,10]。

因此, 尽管一些微生物学家试图根据自己的研究资料来绘制细菌的系统发育图, 却仍无一致的看法。要绘制一个比较统一的、反映细菌系统发育的分类体系, 时机自然还不成熟。但是, 随着对细菌的深入认识, 对细菌与其它微生物类群间关系的逐渐明确, 建立一个合乎自然系统的细菌分类体系, 并非是不可能的。近年来, 根据反映细菌本质和彼此亲缘关系的一些性状, 细菌分类体系已作了较大改变。“手册”第八版的变化及 Gibbons 和 Murray 的建议就是证明。这是细菌分类学逐步走向反映细菌本质, 从而向自然系统过渡的一种形式。

认放线菌和其他革兰氏阳性细菌同, 应归入原核生物界^[12, 14]。

细菌包括革兰氏阳性细菌和放线菌在内均属于原核生物界

鉴别特征进一步明确

Müller 于 1773 年首次试图进行细菌分类。Ehnenberg 等在 1838 年对 Müller 的分类作了修改, 将细菌分为单胞菌科和弧菌科。但他们当时把细菌和纤毛虫类等原生动物混在一起分类。直到 Cohn 才将细菌与原生动物分开, 并将细菌归在植物界, 下分球菌、小菌、丝菌和螺旋菌 4 个类群。以后, Lehmann 和 Neumann (1896)、Chester (1897) 和 Mugula (1900) 等又作了重要修改, 提出了新的螺旋菌科和硫细菌目; 并注意到细胞分枝的细菌, 将它们列为分枝杆菌属和棒状杆菌属, 以后又并为分枝杆菌科, 其中还包括了放线菌(如链霉菌)等。这些细菌分类的基本原则, 沿用了很长时期^[4, 7]。

Stanier 和 van Neil 概括了细菌亲缘关系的研究, 考虑到植物界、裂殖菌纲的概念不适宜, 提出了无核微生物界(Monera)的概念, 把当时认为无真正的核、质体和性过程的所有微生物包括在内, 细菌亦在其中^[5, 6]。后来不少学者提出的三界系统(无核生物界、植物界、动物界)、四界系统(无核生物界、植物界、动物界、原生生物界)和五界系统中^[10, 11], 都包括了无核生物界。不过, 以后发现细菌有核区, 而且有类似“性”的现状, 便以原核生物界(Prokaryotes)代替无核生物界这个名称。

近廿年来, 电子显微镜的广泛使用和超薄切片技术的发展, 证实细菌具有核区。核区中含有 DNA, 而且除在迅速生长的细胞核区有 RNA 外, 显然不含有其它大分子, 缺乏真核生物染色体中的组蛋白。并且不具备真核生物细胞具有的下列结构特征和功能特征: 核的结构, 有丝分裂, 遗传重组方式以配子接合形成双倍体的合子; 细胞质中有内质网状结构、高尔基体、线粒体、叶绿体; 有微管系统、鞭毛为 9+2 结构等; 吞噬作用、胞饮作用、细胞内消化、高尔基体的物质分泌、供养细胞内共生者、细胞质环流和类似变形虫式的运动等。但是原核生物的细胞壁含有真核生物所没有的磷壁酸和二氨基庚二酸, 磷壁酸是革兰氏阳性细菌特有的成分^[12]。

由此可见, 对细菌的认识是逐步深化的。最初与原生动物混在一起, 后来分出而归入植物界, 近年来又发现其细胞内结构和功能特征均与真核生物有别, 而归入原核生物界。

放线菌中除枝动杆菌属(*Mycoplana*)外, 均为革兰氏阳性细菌, 放线菌虽曾被人误认为与真菌相近, 但根据其核结构、细胞壁组成和鞭毛结构(为单丝)、菌丝和孢子的直径(约 0.2—1.2 微米)等特征, 现已确

根据细胞外层结构, 可把细菌分为革兰氏阳性、阴性菌和枝原体(*Mycoplasma*)。前二者与无细胞壁的后者可明显地区分开。革兰氏阳性和阴性细菌, 是 1884 年 Gram 创立革兰氏染色法后将细菌分成的两大类群。由于细菌的革兰氏染色性受到各种因素的影响, 因此这种方法尚有一定局限性。

近年来使用电镜和超薄切片技术, 确定了革兰氏阳性菌和阴性菌切面结构的差异。阳性菌细胞切片断面的外层细胞壁呈单一的厚而清晰的连续层; 阴性菌则具有多层结构, 外壁层松散, 中间层类似膜的外形^[12]。

Salton 和 Cummins 从五十年代开始分析细菌细胞壁的化学成分^[9, 13], Cummins^[13]还首先将细胞壁的化学组分应用于细菌分类。有关细胞壁较为详细的结构, 是由 Perkin^[14]和其它人测定的。革兰氏阳性和阴性细菌的外层结构的区别如图 1 及表 1 所示^[12, 17]。因此, 根据细胞壁的结构和组成, 可将细菌分为两大类。在“手册”第七版中将革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性的肠杆菌科和根瘤菌科都放在真细菌目内^[1], 很不合理。“手册”第八版将阳性菌与阴性菌分开, 另列为第 14—17 部分, 较前版有改进。

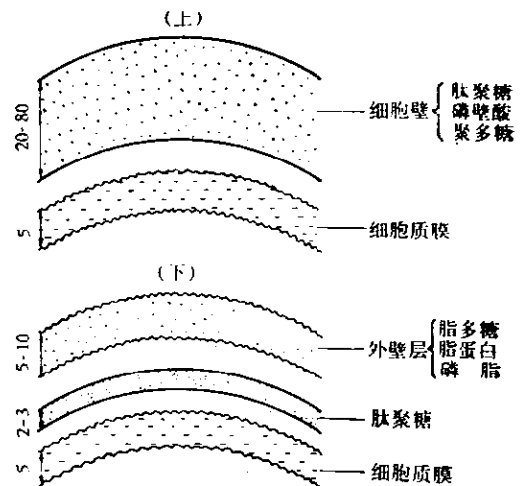


图 1 革兰氏阳性和阴性细菌的细胞外层结构示意图。
(长度单位: 毫微米)

上: 阳性细菌 下: 阴性细菌

最近 Gibbons 和 Murray^[3]建议根据细菌细胞壁的结构和性质, 将原核生物界列为三门: 薄壁菌门(Gracilicutes)、硬壁菌门(Firmacutes)和柔膜体门(Mollicutes)。它们分别相当于革兰氏阴性细菌、阳性

细菌和枝原体。原核生物中的蓝绿藻,被作为蓝绿细菌归在薄壁菌门内。他们认为可能需要另列第四门——疵壁菌门(Mendocutes),包括有细胞壁而未注明具肽聚糖,或无明确类型的某些甲烷细菌、嗜盐细菌和硫化裂片菌(Sulfolobus)。

表1 革兰氏阳性细菌和阴性细菌细胞壁的主要化学成分

主要化学成分	阳性菌	阴性菌	
		硬壁层	外壁层
肽聚糖	有	有	无
{厚度(毫微米)}	20—80	2—3	
{占全壁重百分比}	50—80	1—10	
磷壁酸	有	无	无
聚多糖	有	无	无
脂多糖	无	无	有
脂蛋白	无	有或无	有
磷脂	无	无	有

预计“手册”的未来版本,可能会进一步吸取一些细菌分类学家的意见,将革兰氏阳性菌在原核生物界的分类位置作进一步变动。

革兰氏阳性细菌与放线菌 的关系密切

革兰氏阳性细菌与放线菌中的类群,尤其是分枝杆菌属和诺卡氏菌属常发生混淆不清的情况。近年来,通过细胞壁组成及脂肪酸组分的分析,进一步明确了它们的亲缘关系。Cummins 对棒状杆菌属、诺卡氏菌属和分枝杆菌属细菌的细胞壁组分进行了比较,确定它们有共同的抗原,这表明它们在血清学上也是同源群。近年来,一些工作者,如 Etemadi 和 Bordet, Lanecelle 和 Asselineau 等,还证实这三属细菌都含有 α -分枝- β -羟基酸($R_1-CHOH-CH(R_2)-COOH$)。例如,结核分枝杆菌所含枝菌酸的分子式为 $C_{26}H_{44}O_8$,分枝杆菌其它种也有类似结构,其所含枝菌酸的碳原子数在 79 个到 85 个之间,而诺卡氏菌属的碳原子数为 48—58 个,棒状杆菌属则为 32—36 个^[12,18]。

从细胞壁肽聚糖的结构来看,革兰氏阴性细菌的结构较单一,而阳性细菌较多样化,且与放线菌类有相似性,这也表明阳性细菌与放线菌类关系密切。阳性细菌和放线菌类的细胞壁肽聚糖类型 A 的主要结构,可用图 2 简单表示^[12]。

根据肽聚糖分子第 3 位氨基酸的性质、中间肽桥和邻近四肽交联的位置,可将革兰氏阳性细菌和有关放线菌分为五种类型:

1. 第 3 位为内消旋二氨基庚二酸,与邻近肽链以

3 位和 4 位交联。这类菌包括棒状杆菌属、分枝杆菌属、诺卡氏菌属和乳酸杆菌属、节杆菌属及丙酸杆菌属中的某些种。

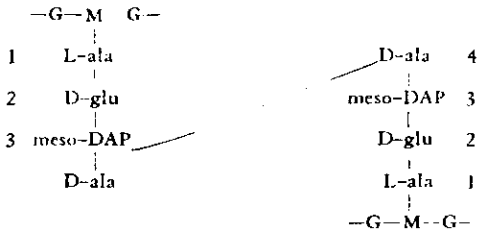


图 2 肽聚糖类型 A 的主要结构简图

G: N-乙酰葡萄糖胺; M: N-乙酰胞壁酸; ala: 丙氨酸;
glu: 谷氨酸; DAP: 二氨基庚二酸

2. 第 3 位为赖氨酸,中间肽桥在 3 位和 4 位交联。包括链球菌属、片球菌属、明串珠菌属、葡萄球菌属、微球菌属和乳酸杆菌属、节杆菌属和双歧杆菌属的某些菌。

3. 第 3 位为 L,L-二氨基庚二酸,中间肽桥在 3 位和 4 位交联。包括链霉菌属、节杆菌属和丙酸杆菌属的某些菌。

4. 第 3 位为 L-鸟氨酸,中间肽桥在 3 位和 4 位交联。包括某些乳酸杆菌属和双歧杆菌属中的细菌。

5. 第 3 位结构不定,中间肽桥包括二氨基酸、第 2 位的 D-谷氨酸和第 4 位的 D-丙氨酸之间的羧基在内。属于这种类型的有某些节杆菌和其它棒状杆菌等^[12]。

由此可见,放线菌中的分枝杆菌属、诺卡氏菌属、双歧杆菌属和链霉菌属划归上述 1—4 型,和革兰氏阳性细菌的一些属有共同性,表明它们的亲缘关系相近。棒状杆菌类群与放线菌的关系更为密切,有将此类群归入放线菌类群的趋势。

革兰氏阳性细菌中某些属种 之间关系的明确,将使其 分类位置相应改变

由于细菌学各专业学科的发展和新技术的应用,澄清了一些属种间的亲缘关系,从而使其分类位置相应改变。这在革兰氏阳性细菌中有不少例证。例如已证明一些好氧的八叠球菌,其形成立方堆的能力并不是恒定的。这类菌的代谢、细胞壁组分和 DNA 成分与藤黄微球菌没有区别,并已证明藤黄八叠球菌的 DNA 能够转化藤黄微球菌。因此,“手册”第八版已取消好氧的八叠球菌一类,其大多数种已归到藤黄微球菌一种内。

在厌氧的棒状杆菌中,以前称为痤疮棒状杆菌

(*C. acnes*) 和食棒状杆菌 (*C. avidum*) 的厌氧细菌因为其主要发酵终产物为丙酸, 而且细胞壁组分与棒状杆菌的模式种不同, 其中主要脂肪酸是含 15 个碳原子枝链的枝菌酸, 与棒状杆菌属的特征显然不同, 因此“手册”第八版已将这两种菌划归丙酸杆菌属内。

在乳酸杆菌属内也有类似情况。1972 年 Kandler 重新检查了发酵乳酸杆菌的新模式株和许多在形态特征上相同的菌株, 它们的细胞壁肽聚糖是 L-鸟氨酸-D-门冬氨酸型的。早期研究中, 大家几乎全用 ATCC 9338 作发酵乳酸杆菌的模式菌株, 而它的肽聚糖是 L-赖氨酸-D-门冬氨酸型。因此该菌应属于短乳酸杆菌^[2]。从 DNA 的 GC 含量和酶学方面也证明了这一点。再如詹氏乳酸杆菌与莱氏乳酸杆菌, 在表型方面看来无差异, 但它们的乳酸脱氢酶在淀粉凝胶电泳时的迁移率不同, 而且 DNA 的 GC 含量分别为 36% 左右和 51%, 因此可加以区别^[11]。

DNA-DNA 和 DNA-RNA 杂交试验的开展, 使得人们有可能依据细菌 DNA 结构的同源程度来确定细菌类群间的关系, 限定种的范围。近年来这方面的试验已在革兰氏阳性细菌中应用。如 Miller 等^[20]研究 DNA-RNA 的互补情况, 发现干酪乳酸杆菌与其干酪亚种间 90—100% 同源; 而与它的鼠李糖亚种间 50—58% 同源。再如 Johnson 使用 DNA-DNA 杂交技术表明, 干酪乳酸杆菌干酪亚种的不同菌株间 86—100% 同源, 而与其鼠李糖亚种 33—37% 同源, 且与其不发酵乳糖亚种 77—83% 同源。因此, 也证明了 Rogosa 在 1953 年定名的三亚种间的差异。此外, Johnson^[21] 还在粪链球菌不同菌株间, 以及粪链球菌和干酪乳酸杆菌间进行 DNA-DNA 杂交试验, 结果粪链球菌菌株间 95—100% 同源, 而粪链球菌和干酪乳酸杆菌间仅 2—3% 同源。这表明了不同属种间的差别。

在乳酸杆菌属和链球菌属中还应用了免疫血清法进行有关酶的同源性研究, 在探索这类菌和其它革兰氏阳性细菌之间的亲缘关系方面, 近年来也有所进展^[20]。

在棒状杆菌类和分枝杆菌、诺卡氏菌、利斯特氏菌及链球菌等属细菌中, 近年来有人应用数值分类法进行分群^[22, 23]。这些类群的细菌, 当以它们的某些特征作为属的主要鉴别特征时, 常会发现一些属界限不清。如通常把生活史中有发育循环 (多形态细胞变为球形) 作为节杆菌属的明显特征, 但这种发育循环在棒状杆菌属、纤维单胞菌属和短杆菌属的某些种中也能见到^[24]。采用数值分类法, 将所取各项特征按同等重要性来衡量, 对处理这类问题, 将是一种可取的途径。

芽孢杆菌科内绝大多数为革兰氏阳性细菌, 因此, 其生芽孢的特征可作为革兰氏阳性细菌中的一个特例来讨论。在“手册”第八版中, 这个科比以前诸版本又增加了芽孢乳杆菌属 (*Sporolactobacillus*)、芽孢八叠球

菌属 (*Sporosarcina*) 和脱硫肠状菌属 (*Desulfotomaculum*) 等三个属。前二属菌原在其它属内, 现因其生芽孢而归于此科。这种以芽孢为主要特征的分类方法有不妥之处, 因生芽孢条件受诸如培养基成分和浓度、pH 值、培养温度、通气条件等复杂因素影响。亲缘关系相近的, 甚至同种内不同株系的菌, 由于生芽孢条件各异而可能未被人们所认识, 因而被划归完全不同的分类单位; 相反, 亲缘关系远的菌, 只因观察到它的生活史中产生芽孢的阶段, 就有可能列入同科同属中。因此, 要客观地反映这类菌的合适分类地位, 还需要对生芽孢的机制, 结合细胞学、遗传学和生理学等方面的特征, 与其它菌类进行比较研究, 才有可能。近年来在这些方面也有较大进展, 国外不少实验室已分离到许多停留在某一孢子阶段的突变体, 可使用电子显微镜和超薄切片观察生芽孢各阶段的形态。关于芽孢形成过程中细胞的组分、生理变化及遗传学等方面, 也进行了大量研究工作, 取得了一些成果^[25]。尤其是最近 Tatsui 等^[26]用芽孢杆菌属内 16 个种 56 株菌进行了 DNA-DNA 杂交试验, 结果表明, 芽孢杆菌属内大多数种的 DNA 只有 1—5% 同源。甚至同一种内不同菌株间 DNA 的同源性程度也不高, 例如在其试验用的五株球形芽孢杆菌 (*B. sphaericus*) 中三株菌的 DNA 只有 18% 同源; 三株环状芽孢杆菌 (*B. circulans*) 的 DNA 只有 2% 同源。以上材料说明, 芽孢杆菌属是由一些亲缘关系不相近的细菌凑成的。阐明这类菌的分类地位及与其它菌群的自然关系, 目前仍较困难。

从以上五方面的概括可以看出, 近年来, 由于细菌学中各分枝学科, 尤其是细胞学和分子遗传学等方面取得的成果, 以及新技术应用于细菌分类, 使人们对于革兰氏阳性细菌本身以及它和其它类群细菌关系的认识正在逐步深入和明确。目前的细菌分类体系仍有一些模糊不清、尚待解决的问题, 革兰氏阳性细菌的分类就是如此。但是, 随着科学技术的发展, 细菌分类学提高到分子生物学水平, 这类问题必将逐渐澄清和解决。细菌分类学所建立的分类系统, 必将逐渐接近反映自然系统。

参 考 文 献

- [1] Breed, R. S. et al. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 7th. ed. 1957. pp. 4—14, 218—634.
- [2] Buchanan, R. E. et al. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th. ed. 1974. pp. 4—9; 478—593; 599—641.
- [3] Gibbons, N. E. and R. G. E. Murray: *Intern. J. Syst. Bact.* 28(1):1—6, 1978.
- [4] Breed, R. S.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 6th. ed. pp. 5—38, 1948.
- [5] Lamanna, C., M. F. Mallette and L. N. Zimmerman: *Basic Bacteriology*, 4th ed. pp. 21—27, 1973.

(下转 47 页)

(上接 38 页)

- [6] Stanier, R. Y. and C. B. van Niel: *J. Bact.*, **42**:437—466, 1941.
- [7] Красильников Н. А.: *Определитель Бактерий и Актиномицетов*. 细菌和放线菌的鉴定, 阎遜初、钮家洪等译, 科学出版社, 1965 pp. 27—41.
- [8] Yamanaka, T.: *Nature*, **213**:1183—1186, 1967.
- [9] Ambrose, E. J. and Easty, D. M.: *Cell Biology*. 细胞生物学, 上海实验生物研究所译, 科学出版社, 1977, pp. 343—358.
- [10] Lynn Margulis: *Evolutionary biology*. **7**: 45—48, 1974.
- [11] Whittaker, R. H.: *Science*, **163**:150—160, 1969.
- [12] Stanier, R. Y., E. A. Adelberg and J. L. Ingraham: *The Microbial World* 4th. ed. 1973, pp. 86—87; 122—126, 326—331, 672—677.
- [13] Waksman, S. A.: *The Actinomycetes II*. 放线菌 (第二卷) 放线菌的分类位置, 阎遜初译, 科学出版社, 1974, pp. 3—4.
- [14] 阮继生: «放线菌分类基础», 科学出版社, 1977 pp. 7—9.
- [15] Cummins, C. S. and H. Harris: *J. Gen. Microbiol.*, **14**:583—600, 1956.
- [16] Perkins, H. R.: *Bacteriol. Rev.*, **27**:18—25, 1963.
- [17] Sutherland, I. W.: *Process Biochem.* **10** (3):4—8, 1975.
- [18] Cummins, C. S.: *J. Gen. Microbiol.*, **28**(1):35—50, 1962.
- [19] Gasser, F. and M. Rogosa: *ibid*, **62** (2):219—222, 1970.
- [20] London, J.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **30**:279—301, 1976.
- [21] Johnson, J. L.: *Intern. J. Syst. Bact.*, **23**(4):308—315, 1973.
- [22] Bousfield, I. J.: *J. Gen. Microbiol.*, **71**:441—455, 1972.
- [23] Davis, G. H. et al.: *ibid*, **57**:333—348, 1969.
- [24] Veldkamp, H.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **24**:209—240, 1970.
- [25] Gould, G. W. and A. Hurst: *The Bacterial Spore*, Academic Press, New York, 1969.
- [26] Tatsuji S. et al.: *Intern. J. Syst. Bact.*, **28**(2):182—189, 1978.