

第九章 微生物的进化、系统发育及分类鉴定

第一节 进化测量的指征

进化指征的选择

70年代以前，生物类群间的亲缘关系判断的主要根据：

表型特征：形态结构、生理生化、行为习性，等等以及少量的化石资料。

原核生物的特点：形体微小、结构简单；
缺少有性繁殖过程；
化石资料凤毛麟角。

根据形态学特征推断微生物之间的亲缘关系的缺点：

由于微生物可利用的形态特征少，很难把所有生物

放在同一水平上进行比较；

形态特征在不同类群中进化速度差异很大，仅根据

形态推断进化关系往往不准确；

六、七十年代：

分析和比较生物大分子的结构特征，特别是蛋白质、RNA 和 DNA 这些反映生物基因组特征的分子序列，作为判断各类微生物乃至所有生物进化关系的主要指征。

1. 生物大分子作为进化标尺依据

(1) 在两群生物中，如果同一种分子的序列差异很大时，——进化距离远，进化过程中很早就分支了。

(2) 如果两群生物同一起来源的大分子的序列基本相同，——处在同一进化水平上。

2. 作为进化标尺的生物大分子的选择原则

(1) 在所需研究的种群范围内，它必须是普遍存在的。

(2) 在所有物种中该分子的功能是相同的。

(3) 为了鉴定大分子序列的同源位置或同源区，要求所选择的分子序列必须能严格线性排列，以便进行进一步的分析比较。

(4) 分子上序列的改变（突变）频率应与进化的测量尺度相适应。

二. RNA 作为进化的指征

16SrRNA 被普遍公认为是一把好的谱系分析的“分子尺”：

三. rRNA 和系统发育树

1. rRNA 的顺序和进化

2. 特征序列或序列印记 (signature sequence) : 通过对 rRNA 全序列资料的分析比较 (特别是采用计算机) 发现的在不同种群水平上的特异特征性寡核苷酸序列, 或在某些特定的序列位点上出现的单碱基印记。特征序列有助于迅速确定某种微生物的分类归属, 或建立新的分类单位。

3. 系统发育树 (phylogenetic tree) : 通过比较生物大分子序列差异的数值构建的系统树称为分子系统树, 其特点是用一种树状分枝的图型来概括各种 (类) 生物之间的亲缘关系。

(1) 生命的第三种形式——古生菌

(2) 建立 16S rRNA 系统发育树的意义

① 使生物进化的研究范围真正覆盖所有生物类群;

② 提出了一种全新的正确衡量生物间系统发育关系的方法;

③ 对探索生命起源及原始生命的发育进程提供了线索和理论依据;

④ 突破了细菌分类仅靠形态学和生理生化特性的限制, 建立了全新的分类理论;

⑤ 为微生物生物多样性和微生物生态学研究建立了全新的研究理论和研究方法, 特别是不经培养直接对生态环境中的微生物进行研究。

不可培养微生物 (uncultured microorganisms) : 从环境中直接分离并克隆 rRNA 并分析其序列和在分子进化树上的位置等方法而发现的目前尚不能在人工条件下获得培养的微生物。参见 P372: 不可培养的微生物与生物多样性

(3) 三 (界) 域生物的主要特征: 三界理论虽然是根据 16SrRNA 序列的比较提出的, 但其他特征的比较研究结果也在一定程度上支持了三界生物的划分。

Carl Woese 的 rRNA 进化树完美无缺？随着越来越多的微生物的全基因组序列的测定，人们发现生物在进化中存在着非常广泛的水平基因转移现象，很多科学家都认为不能仅靠对 16SrRNA 的序列比较来确定生物之间的亲缘关系，还必须借助各种信息对这个进化树进行改进。

人类基因组中的细菌基因？一项新的研究指出，在我们体内的每个细胞中有 40 个左右的细菌基因，而不是早先报告的 113 到 233 个。这个由细菌到人类寄主的所谓的“横向转移(lateral transfer)”给进化生物学带来了极大的问题，它可能意味着直到现在细菌可能一直在为其自身利益操纵着人类的基因组。

Steven L. Salzberg 和他的同事们与过去的研究人员一样，将人类基因组和已经测序的真核细菌基因组做比较，来识别同时在人类和细菌中出现的“细菌到脊椎动物转移”的基因 (bacteria to vertebrate transfers, 简称 BVTs)。Salzberg 的小组分析的数据包括了塞莱拉的基因组序列和过去没有被分析过的寄生物谱系的蛋白，但他们排除了在序列还没有完全测出的真核细菌中有变异的基因。他们的结果建议，许多共有的基因在其他真核细菌中丢失了，在进化率不同的生物体中有变化，采样大小的不同对结果也有影响。在一篇相关的研究评述中，Jan O. Andersson 和 Camilla L. Nesbo 进一步讨论了这些发现。

报告: Microbial Genes in the Human Genome: Lateral Transfer or Gene Loss?, by Steven L. Salzberg, et al. 研究评述: Are There Bugs in Our Genome?, by Jan O. Andersson and Camilla L. Nesbo.

第二节 细菌分类

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

分类(classification)：根据一定的原则（表型特征相似性或系统发育相关性）对微生物进行分群归类，根据相似性或相关性水平排列成系统，并对各个分类群的特征进行描述，以便查考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。（分类系统建立过程中的步骤之一）

鉴定(identification 或 determination)：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。（根据现有系统确定未知微生物分类归属的过程）

菌为例介绍微生物分类、命名和鉴定的有关知识。

一. 分类单元及其等级

界；门；纲；目；科；属；种

根据 Carl Woese 的理论，现在还在界之上使用域(domain)（把全部生物先分为古生菌域、细菌域和真核生物域，域下面再分界。）

常用的细菌分类学术语：

培养物(culture)

菌株(strain)：菌株是微生物分类和研究工作中最基础的操作实体。

型(form 或 type)：例如抗原特征的差异分为不同的血清型；对噬菌体裂解反应的不同分为不同的噬菌型等。

菌株与型的区别：菌株之间不存在鉴别性特征的差异，命名不同的菌株无需分类学依据；不同型的细菌之间存在鉴别性特征的差异，命名或鉴定不同的型必需有分类学依据。

种(species)：高等生物中，“生殖隔离”被看作是区分物种的标准。微生物的种

二. 微生物的命名

双名法：由二个拉丁字或希腊字或拉丁化了的其它文字组成，一般用斜体表示。

属名在前，一般用拉丁字名词表示，字首字母大写；种名在后，常用拉丁文形容词表示，全部小写。若所分离的菌株只鉴定到属，而未鉴定到种，可用 sp 来表示，例如 *Bacillus* sp. 由于细菌分类单元的划分缺乏一个易于操作的统一标准，为了减少因采用不同标准界定分类单元所造成的混乱，细菌系统分类也像其他生物分类一样采用“模式概念”。

种和亚种指定模式菌株(type strain)；亚属和属指定模式种(type species)；属以上至目级分类单元指定模式属(type genus)。模式菌株应送交菌种保藏机构保藏，以便备查考和索取。

第三节 细菌分类鉴定的特征和技术

生物分类的传统指标：形态学特征；生理学特征；生态学特征
在现代微生物分类中，任何能稳定地反映微生物种类特征的资料，

都有分类学意义，都可以作为分类鉴定的依据。

一. 形态学特征：培养特征、细胞形态及其染色特性、特殊的细胞结构、运动性、等等。（详见 P329，表 12-7）

微生物分类和鉴定的重要依据之一：

易于观察和比较，尤其是真核微生物和具有特殊形态结构的细菌；

许多形态学特征依赖于多基因的表达，具有相对的稳定性；

二. 生理生化特征

与微生物的酶和调节蛋白质的本质和活性直接相关；

酶及蛋白质都是基因产物；

对微生物生理生化特征的比较也是对微生物基因组的间接比较；

测定生理生化特征比直接分析基因组要容易得多；（详见 P330，表 12-8）

在以实用为主要目的表型分类中，生理生化特征往往是细菌分类鉴定的主要特征。肠道菌科细菌属和种的分类鉴定就是如此。

理生化特征是最常用的细菌分类、鉴定指标

三. 核酸的碱基组成和分子杂交

特点：与形态及生理生化特性的比较不同，对 DNA 的碱基组成的比较和进行核酸分子杂交是直接比较不同微生物之间基因组的差异，因此结果更加可信。

1. DNA 的碱基组成 (G+Cmol%) : NA 碱基因组成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。分类学上，用 G+C 占全部碱基的克分子百分数 (G+Cmol%) 来表示各类生物的 DNA 碱基因组成特征。有特定的 GC% 范围，因此后者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。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。

使用原则：G+C 含量的比较主要用于分类鉴定中的否定。但具有相似 G+C 含量的生物并不一定表明它们之间具有近的亲缘关系。同一个种内的不同菌株 G+C 含量差别应在 4~5% 以下；同属不同种的差别应低于 10~15%；G+C 含量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 G+C 含量的差别大于 5%，则肯

定不是同一个种，大于 15%则肯定不是同一个属。在疑难菌株鉴定、新种命名、建立一个新的分类单位时，G+C 含量是一项重要的，必不可少的鉴定指标。其分类学意义主要是作为建立新分类单元的一项基本特征和把那些 G+C 含量差别大的种类排除出某一分类单元。G+C 含量的比较主要用于分类鉴定中的否定

2. 核酸的分子杂交:同生物 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，碱基排列顺序差异越小，它们之间的亲缘关系就越近，反之亦然。直接分析比较 DNA 的碱基排列顺序核酸分子杂交 (hybridization) 间接比较不同微生物 DNA 碱基排列顺序的相似性: DNA-DNA 杂交; (亲缘关系相对近的微生物之间的亲缘关系比较) DNA-rRNA 杂交; (亲缘关系相对远的微生物之间的亲缘关系比较) 核酸探针; (利用特异性的探针, 用于细菌等的快速鉴定)

3. 电子杂交

四. 其它

清学试验、噬菌体分型、生态特性、氨基酸顺序和蛋白质分析、对细胞壁等细胞成分的分析比较、通过原核生物的转化、转导、接合来判断原核生物的亲缘关系等等。

第四节 伯杰氏手册

《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)。1957 年第七版后, 由于越来越广泛地吸收了国际上细菌分类学家参加编写 (如 1974 年第八版, 撰稿人多达 130 多位, 涉及 15 个国家; 现行版本撰稿人多达 300 多人, 涉及近 20 个国家), 所以它的近代版本反映了出版年代细菌分类学的最新成果, 因而逐渐确立了在国际上对细菌进行全面分类的权威地位。

伯杰氏手册: 是目前进行细菌分类、鉴定的最重要依据, 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。

第五节 微生物快速鉴定和自动化分析技术

