

細菌分類的 濫觴和演變

細菌的分類已經從形態上的分類，
逐漸演變成利用DNA、RNA等遺傳訊息為依據的分子生物學分類，
在絕大部分細菌尚未被發現的情形下，
細菌分類學仍有極大的發展空間。

■謝文陽

形態學時代

細菌是微生物學中的要角，有關其分類的探討可以從各種角度切入，但是最早期的細菌分類，純以形態特徵的區分為主。細菌分類經歷形態學、生理學及生化學、化學分類學、分子生物學等階段，目前已進展到一個嶄新的里程。

細菌不同於動植物，無法直接利用肉眼觀察其形態，因此研究方法有其獨特之處。研究細菌，首先須在無菌條件下操作，進行純化分離，藉此取得純菌株。除了無菌操作外，確立細菌純化分離方法的關鍵因素，包括培養皿的研製、利用洋菜配製培養基、滅菌釜的發明等。

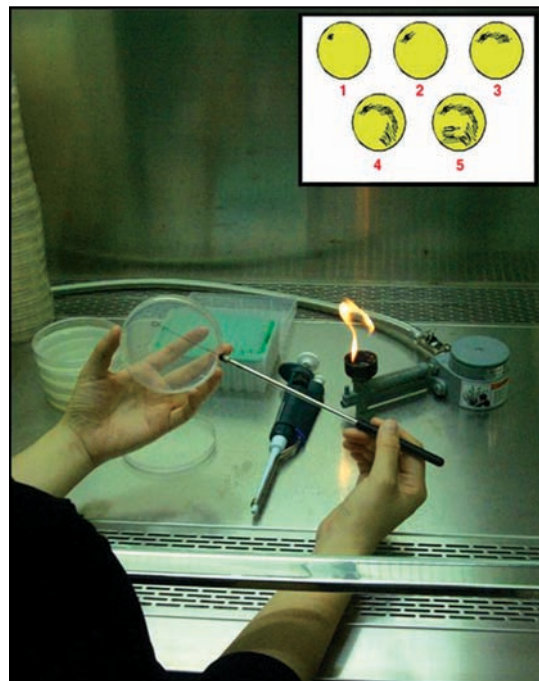
1882年，赫斯（W. Hesse）發現從紅藻萃取出來的多醣類物質，也就是俗稱的洋菜，適合做為培養基固化劑。他把這項發現告知柯霍（R. Koch）以後，不只促成柯霍分離出結核菌，也帶動此後微生物學研究的迅速發展。1887年，貝特力（R. J. Petri）研發啓用培養皿，使得處理微生物不再是難事。

1884年，革蘭（C. Gram）發明了革蘭氏染色法，進行組織內細菌分染。1890年，羅福樂

（F. Loeffler）研創細菌鞭毛染色法，藉此完成了一些細菌鞭毛著生狀態的報告。革蘭和羅福樂的報告顯示，19世紀晚期的攝影技術已經相當進步。細菌細胞的觀察辨認，也因顯微鏡的改良進步和染色法的開發應用而成為可能。類似上述觀察、培養和分離細菌的方法，也廣泛應用於研究其他的微生物。

德國植物學者柯恩（F. Cohn）原本從事植物生理，以及藻類和低等菌類的分類與形態研究，後來著手研究細菌。1872年，他把細菌分為球菌、短桿菌、長桿菌和螺旋菌4群，並且記載了微球菌、細菌、桿菌、弧菌、螺旋菌、螺旋體等6屬。當時，柯恩把細菌定義為：具有特定形態，不具葉綠體的細胞；利用分裂方式繁殖，以單細胞、絲狀細胞或集合體的方式生長。

在細菌分類系統不明確的年代，柯恩根據自身觀察並詳查當時文獻後指出，細菌的屬種與動植物的屬種不同，是以形態異同為依歸的形態



在無菌操作台內，利用在洋菜平板培養基上依1~5的順序連續塗劃的方式，就可分離出純菌株。



酒精、平板培養基、接種環、玻璃塗抹棒、本生燈和微量吸取器都是微生物實驗的常用器材。



直立型（左）和桌上型（右）滅菌釜能利用高溫和高壓進行各類微生物器材的滅菌處理。

細菌分類的濫觴和演變





繪圖者：張雅鈴

柯恩 在130年前，科恩就已對細菌有相當程度的理解，並且預知了當前的發展，實在不簡單。

屬、形態種。他認為日後釐清細菌細胞的形態和其他形質的關係以後，細菌屬種的概念才可望明確。他也察覺一般細菌和藍細菌類似之處，這對後來原核生物和真核生物的分類有指引的作用。

柯恩把細菌分為4群，並非只是把相同形態的集合在一起而已，而是根據廣泛研究與比對後歸納出來的結論。他認為以形態為基礎整理出的屬種與細菌的代謝、色素生成、病原性等等的關聯，須待日後更多的研究才能釐清。值得一提的是，柯恩是枯草桿菌的命名者，他指出這種桿菌可產生孢子，孢子萌發後成為活細胞。他證實枯草桿菌的孢子具耐熱性，這是支持巴斯德（L. Pasteur）所提倡非自然發生說的有利證據。

柯霍從死於炭疽病的動物分離出細菌，將其培養且接種至健康動物後，發現可使健康動物感染炭疽病，而且可從遭受感染的動物體內分離出原來接種的細菌。所謂柯霍準則

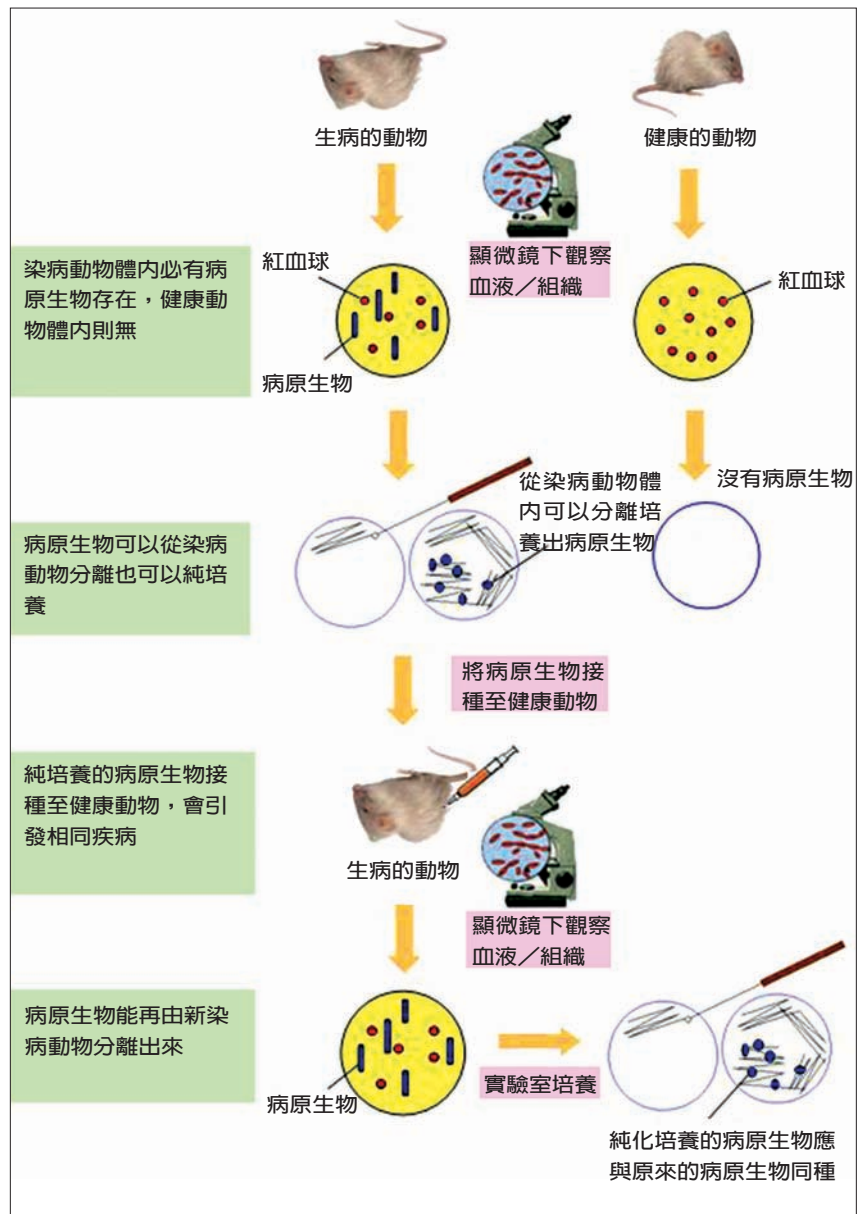
（Koch's postulates），亦即驗證細菌是病因的一系列步驟，乃由此而來。

柯恩相當肯定柯霍的炭疽病研究，他除了協助柯霍把病原菌命名為炭疽桿菌外，還發現炭疽桿菌與枯草桿菌具類似的形態，都會產生孢子，但是兩者當中只有炭疽桿菌是病原菌。因為有上述種種研究成果，杜錄思（G. Drews）在1999年撰文推崇柯恩是現代微生物學的始祖。

生理學與生化學時代

細菌形態簡單，不易藉之區分不同菌種，因此早在19世紀晚期，生理和生化性質已開始被採用為細菌分類的指標。

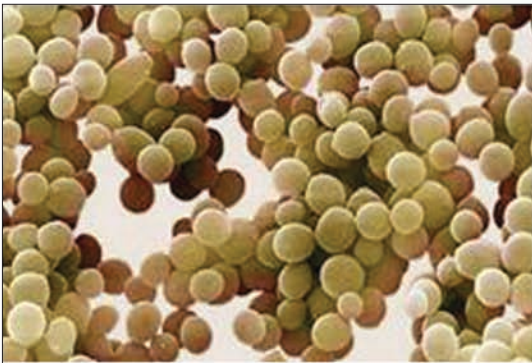
1889年，貝傑林克（M. W. Beijerinck）以磷光素生成為基礎，設立發光細菌屬，這是最早把生化性質導入細菌分類的實例。他利用選擇培



柯霍準則指出罹患傳染病的動物體內，必定有病原生物的存在。



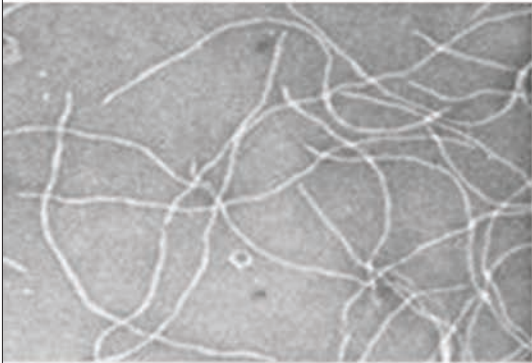
細菌分類的濫觴和演變



球 菌



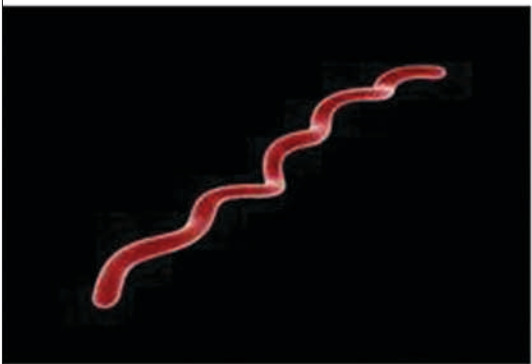
桿 菌



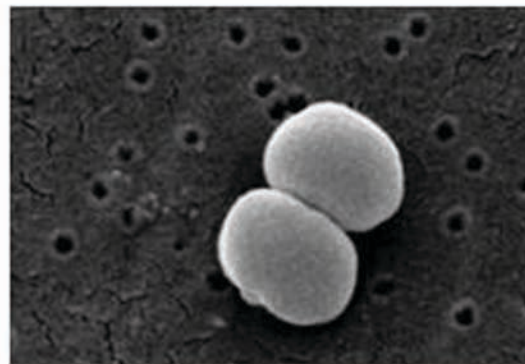
絲狀菌



弧 菌



螺旋菌



短桿菌

不同形態的細菌

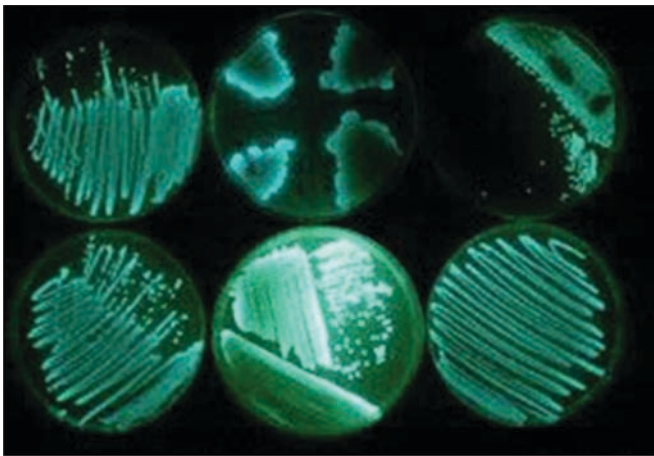
養基進行增菌培養，分離出定氮桿菌屬細菌，以及多種光合微生物和化合微生物。他也利用醱類發酵和硝酸還原進行當時名為產氣桿菌屬，如今已改名為腸內桿菌屬細菌的鑑定。1892年，維諾格拉斯基（S. Winogradsky）以自營能力為指標，設立了亞硝酸單胞菌屬及亞硝酸桿菌屬。

麥古拉（M. Migula）是柯恩的研究伙伴，他於1900年發表《細菌系統》一書，其中記載約1,300種細菌，並提及明膠液化。麥古拉在該書中依照細胞內含硫粒和光合色素，把細菌分為真細

菌及硫細菌。

1909年，歐拉詹森（S. Orla-Jensen）調查細菌鞭毛著生位置和代謝，藉此把細菌分為頭端鞭毛類和周鞭毛類兩亞目。頭端鞭毛類包含球狀、桿狀和螺旋狀細菌，其中有運動能力的具有極鞭毛。周鞭毛類也包含球狀和桿狀細菌，但不含螺旋狀細菌，其中有運動能力的具有周鞭毛。

克魯維爾（A. J. Kluyver）是貝傑林克的接班人，他的研究主題是「微生物是什麼樣的生物？」，並以一般的微生物學觀點，廣泛進行研



發光菌屬細菌包含具有發光能力的菌種，這類細菌群生於洋菜平板培養基上，會發出肉眼可見的螢光。

究。1924年，克魯維爾發表了〈微生物代謝的統整與分歧〉一文，他也曾根據酵母的醱類發酵特性，進行醱類區分及定量。1933年，他和帕坤（L. H. C. Perquin）共同發表了黴菌震盪培養，其實驗所用的克魯維爾三角瓶是通氣培養器材的始祖。

1936年，克魯維爾和范尼爾（C. B. van Niel）根據細胞形態、運動性和營養方式，做了「細菌屬」的分類。這是一個類似元素周期表的組合，推測日後會發現的屬，則空欄以待。他們論及細菌演化，認為球菌是最簡單的細菌，由此演化出其他類別的細菌。這種觀點並不正確，但是他們標榜以一般微生物學觀點，嘗試把細菌分類與形態學和生化學結合一起的努力，仍然值得肯定。

1957年，英國學者史尼斯（P. H. A. Sneath）把18世紀亞當森（M. Adanson）提倡的生物分類原理具體化，倡導數值分類學。亞當森對當時主流觀點，即林奈（C. von Linné）重視特定形質的觀點，抱持懷疑的看法。他主張應把所有形質視為等價（同等重要）。不過，數值分類開始風

行是電腦發達以後的事情了。

數值分類表示相似度，有納入或不納入負的相符二類算式，前者是單純相符，後者如傑卡德式。二類算式都有人使用，

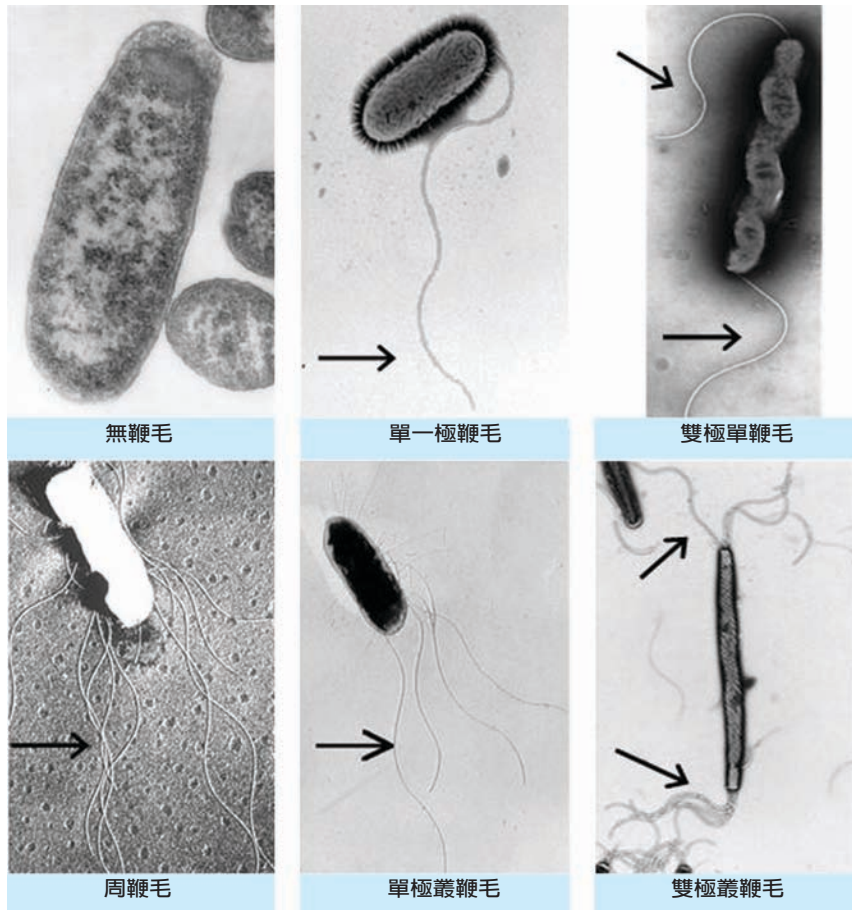
其計算方法各有多種。

曾經盛極一時的數值分類，不再風行的理由如下。一、史尼斯指出用於數值分類的形質，須是利用相同方法取得的數據資料。然而不少研究實

例，都是蒐集自不同文獻，利用不同方法獲得的數據資料來計算。二、如依據抗生素感受性之類的特定形質進行計算，悖離數值分類原理。三、依照數值分類建構的樹狀圖，大多無法以其他方法驗證其妥適性。

例如曾經有人根據119種性狀資料建構短桿菌的數值分類樹狀圖，發現與利用化學分類（DNA鹼基組成，DNA/DNA相關性等）為依據所得到的分析結果，二者完全不具任何相關性。經改為只取用其中57種研判適用於數值分類的形質，重行分析建構的樹狀圖，則與化學分類的分析結果具有高度相關性。

細菌分類今後勢必愈來愈倚重電腦，但這與電腦用於傳統的細菌數值



不同樣式的細菌鞭毛



常用於微生物觀察的位相差顯微鏡（左）和微分干涉顯微鏡（右）

分類，不能混為一談。正如光學顯微鏡的發達對細菌分類帶來巨大影響，電子顯微鏡的發明及超薄切片技術的開發，使得吾人得以觀察細菌細胞的基本構造。位相差顯微鏡、微分干涉顯微鏡、掃描式電子顯微鏡等的發明，也讓生物細胞變得更容易觀察，藉此可辨識原核和真核生物細胞的基本構造，並區分細菌和其他微生物的差別。

1957年，道夫提（E. C. Dougherty）經由鏡檢察覺，細菌細胞核比其他生物細胞核簡單，因而提議把細菌的細胞核稱為原核，其他生物的細胞核則稱為真核。

1962年，史丹尼（R. Y. Stanier）和范尼爾共同發表的〈細菌概念〉，可說是有關微生物多樣性研究的集大成論文。該文指出細菌細胞是原核細胞，具有如下特徵：一、不具區隔細胞核和細胞質的細胞核膜；二、不具含有光合作用或呼吸作用相關酵素的機械構造；三、細胞核分裂屬於無絲分裂而非有絲分裂。史丹尼和范尼爾兩人以細胞構造相同性，印證了柯恩所推測細菌和藍細菌的近緣關係。

化學分類學時代

化學分類著重於研究DNA、RNA、蛋白質等物質，以及其他維持生命所需細胞成分，藉此探討微生物的分類、鑑定和演化。最早的化學分類學研究，是藉由色素和精油的化學構造探討植物的類緣關係。1962年，馬莫（J. Marmur）和杜提（P. Doty）把DNA鹼基組成導入細菌分類學的

研究。後來DNA/DNA相關性、脂肪酸組成、磷脂質組成、醃型、酵素蛋白質電泳圖譜等，也陸續被採用為細菌分類的依據。

以下事例反映了化學分類學的發展：一、以探討DNA、RNA、蛋白質和其他細胞成分為基礎的生化、分生和遺傳的發展進步，開啓了建立微生物的系統和相互關係的門路；二、儀器的開發進步，使得眾多樣品所含微量成分的分析得以在短時間內完成；三、電腦功能不斷強化，因而得以利用數理統計處理眾多數據；四、微生物保存方法的研發充實，使得原本不易保存的微生物，不再難以保存；五、菌株保存機構的增加和國際化，使得標準株和參考株不再難以取得。

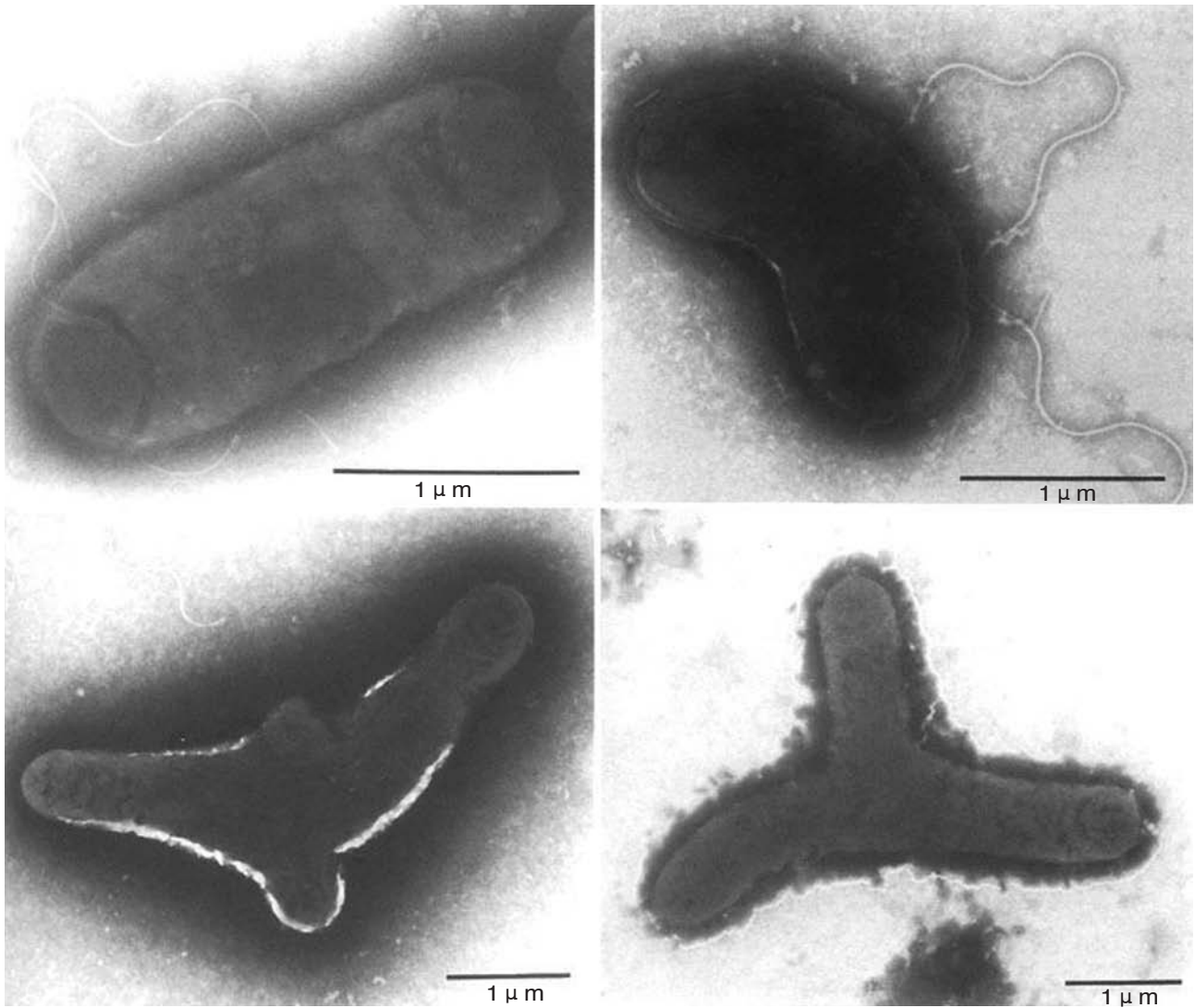
早期學者常有想把自己分離的菌株與其他已發表的菌株作比較，卻苦於無從取得的情形。也有根據記載資料比較，認為明顯不同，俟取得菌株實際檢核比對後，卻發現並無兩樣。因此，菌株收集的充實對細菌分類學的研究有相當大的助益。

化學分類最重要成果之一，在於根據DNA/DNA相關性定義的「細菌種」概念，廣為細菌分類學者支持。1987年，原名「國際系統細菌學委員會（International Committee on Systematic Bacteriology，簡稱ICSB）」的「國際原核生物分類系統委員會」（International Committee on Systematics of Prokaryotes，簡稱ICSP）轄下某一特別部會，對於「細菌種」發表過類似見解：一種細菌的親緣定義，在於所含菌株彼此間具70%或更高的DNA/DNA相關性，同時也具有攝氏5度或更低的 ΔT_m 值。

把含有DNA的薄鹽溶液緩慢加熱至一定溫度以上時，該溶液在紫外光波長區的吸光值會開始不斷增大，繼續升溫至一定溫度後，吸光值就達恆定不再改變。吸光值增大是因DNA雙股螺旋構造受熱融解，變成單股DNA之故。吸光值增大的溫度區間之點溫度稱為DNA的熱變性溫度或融點 T_m ， ΔT_m 意指兩菌株間的 T_m 差距。惟ICSP並未正式認可這一見解。



細菌分類的濫觴和演變



本圖是筆者實驗室於2004年發表，學名是脫氮假弧菌的新屬新種細菌的電子顯微鏡圖片。這種菌屬於普羅提歐門 α 群細菌，細胞外形不一，一般多為具有單一鞭毛（極生或側生）的筆直或彎曲桿菌，也有呈現V形或Y形的。

根據這一見解，不少以前被鑑定為同種的細菌株，陸續被指出其實並非同種。顯然，早期菌種中心收集的保存株，難免包含一些鑑定錯誤的。因此，種內菌株關係研究不夠充分的菌種，今後有必要以DNA/DNA相關性為依據進行檢討。

分子分類學時代

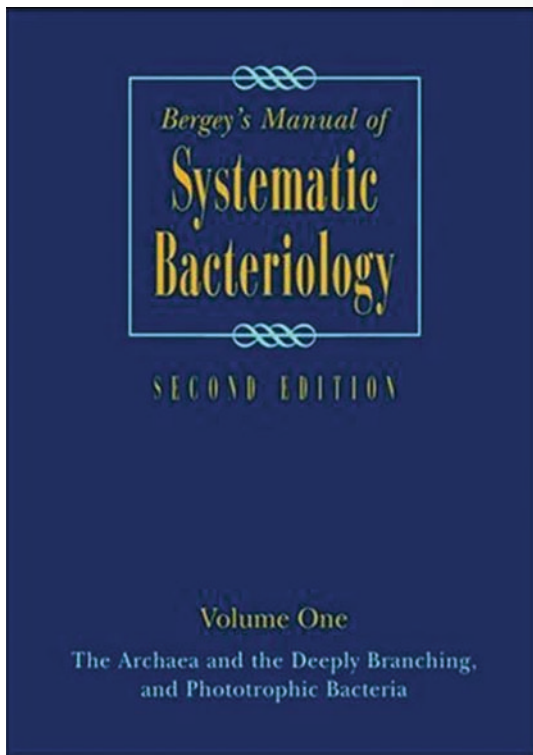
1965年，查克勒得（E. Zuckerkandl）和保凌（L. Pauling）在其合著〈演化歷史的分子紀錄〉一文

中，提出「資訊大分子」是生物演化的分子時鐘概念，由此開啓了分子分類學的序幕。資訊大分子是指負載遺傳訊息，或其轉譯訊息的大分子化合物，包括DNA、RNA和蛋白質。他們認為最合理、最普遍的演化系統，應完全根據資訊大分子提供的訊息來重建。

1968年，日本學者木村（M. Kimura）以群聚遺傳學為依據，發表了「分子演化的中立理論」，藉由導入核苷酸置換率（ K_{mut} ），標示生物演

化距離。這一學說使得沒有化石紀錄的微生物演化，成為可以探討論述的課題。

1987年，伍斯（C. R. Woese）的研究團隊利用16S rRNA目錄法，進行細菌演化系統的研究，由此建構出微生物的分子系統學。更早之前的1979年，堀（H. Hori）和小澤（S. Osawa）兩位日本學者，根據5S rRNA序列重建生物系統樹（包括細菌和人在內的形形色色生物），他們認為伍斯所指古細菌比真細菌出現



伯吉氏系統細菌學手冊是從事細菌分類鑑定時，不可或缺檢索書。

晚，而且比真細菌接近真核生物，因此稱為後生細菌。

這一見解後來受到伍斯的認同，因此古細菌被改稱為古生物。伍斯研究團隊原本使用 S_{AB} （不同菌株 16S rRNA 序列相似度）表示演化距離，後來改用木村所用的 K_{mut} 。

微生物系統關係透過上述先驅性研究，愈來愈清楚。分子分類學發展給生物分類學帶來的最大影響，在於確認以往被認為處於生物最高階層的動物界、植物界和細菌三者之間，動植物比較相近，兩者都與細菌相距甚遠，因而有比「界」更高階的「域」的提議。原被稱為古細菌的原核生物，在演化路徑上其實與真細菌迥異，因此改稱古生物，自成一域。有關細菌系統的研究，已經有很多相關報告。其中普羅提歐門細菌約略等同於革蘭氏陰性細菌，包括 α 、 β 、 γ 、 δ 和 ϵ 五群。

1968年在東京舉行的第1屆世界微生物株保存會議中，柯威兒（R. R. Colwell）以海洋弧菌為例，提倡多元分類，也就是多方探討，把可能取

得的實驗數據全部用於分類學研究。目前多元分類或多元探討，已經成為微生物分類學的廣泛用語。

其實早在1970年代，已經出現不少利用多元手法探討細菌分類的相關文獻，只是當時尚未使用多元分類之類的語彙而已。例如1972年，山形（K. Yamagata）和駒形（K. Komagata）兩位日本學者曾根據細胞分裂模式、DNA鹼基組成、細胞壁組成等研究數據，探討了棒狀桿菌中被歸類於不同屬群菌株的相互關係。

細菌分類學要素

柯宛（S. T. Cowan）是英國著名的細菌分類學者，他在1965年撰文指出，細菌分類包括分類（製作細菌分類體系，把各個細菌分類群擺置於能反映系統的階層）、鑑定（辨認分離株特徵，對照分類體系，決定分離株的分類位置）和命名（對分類群加以命名）3項要素。這3項要素其實有如雞尾酒般混合在一起，不易明確區分。1993年，駒形綜觀細菌學發展，進一步提出細菌分類學除了分類、命名和鑑定外，應再加上系統（細菌的系統演化）的見解。

細菌學研究初期，分類體系尚未建立，細菌命名不具統整性。隨著研究逐漸進展，系統研究和鑑定實務兩條路線開始出現觀念落差。細菌分類基本上具有哲學和實務兩個面相，前者是分類和系統的研究，後者則是鑑定實務，兩者似有矛盾，其實是構成細菌分類的共同要素。細菌分類的健全茁壯，有賴分類、命名、鑑定和系統4個構成要素的均衡發展。

伯吉氏系統細菌學手冊

《伯吉氏系統細菌學手冊》（*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*，簡稱BMSB）是從事細菌分類鑑定不可或缺的檢索書，惟不少微生物學者並未充分了解這本書的性質，因此特別把它的由來簡單說明如下。

1915年，美國細菌學家學會（已改名為美國



細菌分類的濫觴和演變



照片來源：張志銘

人類在1960年代發現嗜熱菌的存在，這些細菌大都生活在35°C以上的高溫中，譬如北投溫泉區的溪流中就有嗜熱菌的存在。

微生物學會)總會爲了做成科或屬層次的細菌分類綱要，通過成立以溫斯露(C. E. A. Winslow)爲委員長的細菌特性分析及分類委員會。因爲1900年以來，出現了溫斯露、周普(W. Zopf)、麥古拉、古陸斯(W. Kruse)、詹森(C. O. Jensen)等人建立的多套細菌分類系統，不知其中哪一套最適用。該會綜合檢討後，在1917年先發表了細菌分類建議綱要，繼而於1920年提出只及於科或屬層

次分類的最終報告。

美國細菌學家學會爲了進一步出版可以檢索至種的檢索書，於是成立了以伯吉(D. H. Bergey)爲委員長的委員會。經過廣泛文獻調查，《伯吉氏鑑定細菌學手冊》(*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*，簡稱BMDB)初版在1923年問世，其中包含13科94屬。後來2至8版陸續於1925、1930、1934、1939、1948、1957、1974等年度出版，因會計問

題，4版以後改由伯吉氏手冊信託(Bergey's Manual Trust)發行。

有鑒於細菌分類的蓬勃發展，伯吉氏手冊信託大幅更新內容，於1984年出版《伯吉氏系統細菌學手冊》第一卷。接著1986年出版第二卷，1989年出版第三、四卷。

第一卷收錄了在基礎、醫學、工業等範疇占有重要地位的革蘭氏陰性細菌。第二卷收錄放線菌以外的革蘭氏陽性細菌。第三卷包含藍細菌和其他光合細菌、第一卷未收錄的革蘭氏陰性細菌、以及當時稱爲古細菌如今已正名爲古生物的微生物。第四卷收錄放線菌。1994年，伯吉氏信託繼續出版以檢索爲主的BMDB第九版，其中包含一些後來增加的新屬。

BMSB第二版的第一、二卷已陸續於2001年與2005年出版，第一卷收錄古生物(甲烷生成者、高度好熱者、高度好鹽者等)、藍細菌等光合細菌，以及一些具特異性、大多棲息於極端環境中的細菌。第二卷收錄包含絕大多數種類革蘭氏陰性細菌的普羅提歐門細菌。

第二版BMSB內含許多細菌分類學相關用語，極具參考價值。因尚未全部出版，無法窺得全貌，惟知其與第一版不同處，在於以16S rRNA基因序列比對爲基礎建構系統，做成分類層級，並把原核生物分爲古生物域和細菌域，兩域分別包含2門和23門。

BMSB廣爲細菌分類學者和實務者使用，加上其執筆者有許多是ICSP所轄不同專門委員會的委員，因此這本書當然有它的權威性。然而必須認清的是，BMSB並非公定書，



細菌分類的濫觴和演變



圖片來源：張志玲

滷蛋經真空包裝後保存期限比茶葉蛋長很多，因為細菌在真空中無法存活。但時間一久，氣體仍會慢慢滲進去，所以真空包裝的食物仍有保存期限。

因其發行者是伯吉手冊信託，而非 ICSP。ICSP 是國際上細菌分類、命名的公定機構，《國際系統演化微生物學期刊》(*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*，簡稱 IJSEM；原名 *International Journal of Systematic Bacteriology*，簡稱 IJSB) 是這機構發行的唯一期刊，有關細菌分類和命名，悉以 IJSEM 所載為準。

今後的細菌分類學

細菌分類學逐步發展，目前已走到包含形態、生理、生化、細胞、生態、遺傳、分子生物等多元範疇分類的時代，這種發展態勢今後應不致改變。

最近隨機增幅多型 DNA (randomly amplified polymorphic DNA，簡稱 RAPD) 與增幅片段長度多型性 (amplified fragment length polymorphism，簡稱 AFLP) 分析法，以及其他基因體資訊解析法，被用於細菌分型、分類和演化的研究，也有報告論及這些方法所含問題。

以細菌分類學立場來看，這類方法的適用性，除了理論根據之外，尚須透過很多數據資料加以比對驗證。這些方法適合於什麼目的？適用於哪些分類層級？是否只適用於特定類別細菌？這些問題有待逐一加以探討。隨著微生物多樣性

的研究日趨發展，新種微生物不斷被分離發表，今後微生物所含新機能勢必不斷地被發掘出來，微生物生態學研究也勢必持續展現新的風貌。

微生物分離株的保存相當重要，以前有多少具研究價值的微生物曾經被分離出來，已經難以估算，但是可以確定的是，目前收集於世界各國菌株保存中心的菌株，仍不算多，加上生物多樣性條約生效，微生物株轉移變得困難。因此，有必要透過互信互惠的國際合作研究，增加微生物株的流通性。

自然界中究竟有多少能培養的微生物，近年來蔚為話題。有一說法認為，尚未培養出來的微生物，占全部微生物的 95%，甚至是 99% 以上。存活但未能培養的微生物，也成為討論的話題。對於經核酸鹼基序列確認，但還沒分離的細菌，ICSP 允許先將其設立為相當於屬層級的候選者，然而規定一旦這類細菌被分離時，命名優先權屬於分離人，而非核酸鹼基序列發表人。如何把候選者分離，帶入實驗室研究，是今後細菌學的一個課題。至於如何把候選者和已知細菌的分類體系做有效的整合，則又是另一個課題。

細菌分類研究的起步晚於其他生物分類研究，但是經由柯恩及其後諸多微生物學者的接棒努力，細菌分類學研究進展顯著。雖然柯恩的名氣不如巴斯德與柯霍兩位同時代的微生物學者，但是他能在 130 年前，就已對細菌有相當程度的理解，並且預知了當前的發展，實在不簡單。

細菌分類研究經過一個多世紀的發展演變，看似斷斷續續，其中自始不變的是，確認細菌為生物，並且能敏銳地掌握牠們的各項特質。細菌和其他各類微生物，自有人類以來就直接或間接地影響了人類的生存。因此，人類在善加利用微生物之餘，千萬不要忘了微生物也是生物，也需要妥為保育。 □

謝文陽

台灣大學海洋研究所