

产甲烷细菌的超微结构

郑 中 华

(中国科学院成都分析测试中心, 成都)

赵 一 章 张 辉

(农牧渔业部成都沼气科学研究所, 成都)

吴 唯 民

(清华大学, 北京)

用透射电子显微镜和扫描电子显微镜观察了 7 株产甲烷细菌的形态和细胞细微结构。这 7 株产甲烷细菌分别是嗜热自养甲烷杆菌 CB-12 菌株、布氏甲烷杆菌 CS 菌株、史氏甲烷短杆菌 H-13 菌株、索氏甲烷丝菌 CT 菌株、甲烷八叠球菌 TH 菌株、嗜热甲烷八叠球菌 CB-84 菌株、甲烷球菌。讨论了 7 株产甲烷细菌细胞壁结构的差异, 产甲烷杆菌的细胞质内膜结构与其产能代谢的关系。

关键词 产甲烷细菌; 超微结构

产甲烷细菌 (methanogen) 是微生物中一个十分特殊的类群, 它广泛分布在土壤、沼泽地、污泥、湖泊和海洋沉积物等厌氧生态系中。它具有特殊的产能代谢功能, 能促进 H_2 - CO_2 经氧化还原作用形成甲烷, 也能转化甲醇、甲酸和醋酸形成甲烷。从 1916 年 Omelianski 首先分离出一株产甲烷杆菌后, 很多国家对产甲烷细菌的研究做了大量工作。由于产甲烷细菌生长在严格厌氧环境中, 同时培养方法比较困难, 因而在分离培养、分类鉴定等方面, 近三十年才取得了较大进展。到目前为止, 已报道并得到公认的产甲烷细菌共有 9 属 14 种。尽管产甲烷细菌的种类较少, 但其形态却有着明显的差异, 具有独特的超微结构特征。Zeikus 和 Bowen^[1] 曾对产甲烷细菌的超微结构进行过比较, 但国内尚无这方面报道。作者对收集到的一些产甲烷细菌进行了电镜观察, 描述了它们的超微结构特征, 可为产甲烷细菌的分类

鉴定提供依据。

材 料 和 方 法

(一) 菌种来源和培养条件

菌种均为农牧渔业部成都沼气科学研究所微生物室提供的纯培养物。史氏甲烷短杆菌 H-13 菌株 (*Methanobrevibacter smithii* H-13) 从成都市污水厂污泥样品中分离^[2]。嗜热自养甲烷杆菌 CB-12 菌株 (*Methanobacterium thermoautotrophicum* CB-12) 自成都市郊区常温沼气池分离^[3]。嗜热甲烷八叠球菌 CB-84 菌株 (*Methanosarcina thermophilic* CB-84) 自成都市郊区常温沼气池分离, 分离方法、培养条件与嗜热甲烷八叠球菌 TM-1 菌株的相同^[4]。甲烷八叠球菌 TH 菌株 (*Methanosarcina* TH) 自清华大学环境工程教研室厌氧污泥床颗粒污泥样品中分离, 分离方法、培养条件与甲烷八叠球菌 C-44 菌株基本相同^[5]。甲烷球菌 (*Methanococcus* sp.) 自美国洛

本文于 1985 年 9 月 14 日收到。

中国科学院成都生物研究所刘光桦同志提供布氏甲烷杆菌样品, 特此致谢。

杉矶焦油洼地湖分离,分离方法和培养条件与 Balch^[6] 的方法相同。布氏甲烷杆菌 CS 菌株 (*Methanobacterium bryantii* CS) 自四川省泸州大曲酒厂窖泥样品中分离,分离方法与 Bryant^[7] 的方法基本相似。索氏甲烷丝菌 CT 菌株 (*Methanoxanthus soehngenii* CT) 从清华大学环境工程教研室颗粒污泥的乙酸连续富集中获得,富集的方法参照 Huser 等人^[8] 的方法。

(二) 电镜样品制备

1. 细菌培养液经 8,000 转/分离心沉淀,用 2.5% 戊二醛液 (0.1M 磷酸缓冲液配制, pH7.4) 固定 2—4 小时,经磷酸缓冲液充分清洗,离心使细菌成团,在 50℃ 使细菌悬浮在 2% 的琼脂中,冷却后切成 1mm³ 小块。小块固定在 1% 四氧化锇固定液 (0.1M 磷酸缓冲液配制, pH7.4) 中 2 小时,再用磷酸缓冲液清洗,然后用丙酮逐级脱水,环氧树脂 618 包埋, LKB-V 型切片机制作超薄切片,醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色, JEM-100CX 电子显微镜观察拍照。

2. 将菌液滴在具有支持膜的铜网上,静置片刻,用滤纸吸干。未干燥前,用 2% 磷钨酸钠 (pH6.8—7) 染色 1—2 分钟,用滤纸条吸去染液,自然干燥后,用 JEM-100CX 电镜观察拍照。

3. 将菌液离心沉淀后,经 2.5% 戊二醛固定,磷酸缓冲液清洗,乙醇梯度脱水,临界点干燥,真空喷金后,用 JSM-35C 扫描电镜观察拍照。

结果和讨论

(一) 产甲烷细菌的形态特征

经负染色和扫描电镜观察,产甲烷细菌的形态有明显差异。根据形态特征,分为四种类型:杆状菌、球状菌、螺旋状菌(因未得到纯培养物,本文暂略)和八叠球状菌。杆状产甲烷细菌又分为长杆状和短杆状,嗜热自养甲烷杆菌和布氏甲烷杆菌属于长杆状,两株菌均为不规则弯曲杆状,两端钝圆,前者菌体直径均匀,后者中部略细于两端。这两株菌的菌体单个存在或连在一起,形成长链状(图版 I-1, 3)。史氏

甲烷菌属于短杆状菌,菌体短而直,近似椭圆形,常成对(图版 II-7)。索氏甲烷丝菌也是一种杆状菌,其菌体直,两端平齐,很少单个存在,常连在一起形成很长的弯曲丝状体,丝状体内有隔膜,将丝分成多个子细胞,单个菌似一节节竹节(图版 I-4)。甲烷八叠球菌为不规则、大小不等的球形,通常为八个细胞堆积在一起的不规则团块,团块大小差异很大,长轴为 2.5—5μm。多个小团块又聚集在一起,形成较大的团块(图版 II-8, 10)。甲烷球菌为不规则球形,较少成对,多为单个存在(图版 II-12, 13)。

(二) 产甲烷细菌的超微结构特征

超薄切片电镜观察,产甲烷细菌各具独特的超微结构,特别是细胞壁结构差异较大。杆状产甲烷细菌中,嗜热自养甲烷杆菌和布氏甲烷杆菌细胞壁为均匀的单层,比典型的革兰氏阳性菌细胞壁薄,细胞壁厚度为 10—18nm,与 Zeikus 和 Wolfe^[10] 报道的平均厚度 (16.5nm) 基本一致。史氏甲烷短杆菌的细胞壁具有两个电子致密层和一个电子透明的中层,壁总厚度约 12—14nm。这与上述两株杆菌的细胞壁结构不同,也与瘤胃甲烷短杆菌 (*Methanobrevibacter ruminantium*) 的细胞壁结构有所不同^[1]。瘤胃甲烷短杆菌的细胞壁厚达 30—40nm,也分三层,内层为电子致密层,中层为较厚的电子透明层,外层为粗糙的不规则形状。史氏甲烷短杆菌的细胞壁外层是光滑的,而且较薄。索氏甲烷丝菌的细胞壁有两个电子密度不同的层次,内层与质膜相邻,电子密度较高;外层电子密度较低,厚度约 15—20nm。其细胞壁如同一种鞘状结构,构成丝状体中所有细胞共同的外层。在细胞分裂形成横壁时,细胞质膜和细胞壁的内层先横向生长,通过细胞,最后形成新的壁(图版 I-2, 4)。索氏甲烷丝

菌的细胞壁与产甲烷螺菌 (*Methanospirillum hungatii*) 的细胞壁较相似^[11], 具有两个电子致密层。但也有不同之处, 螺菌细胞壁分内壁和外壁, 外壁在菌丝体处连续成鞘状, 不重叠凹陷, 内壁仅围绕丝状体中的各个细胞, 细胞横隔处只见外壁。而索氏甲烷丝菌细胞壁的两个电子致密层都围在丝状体外面, 无内外壁之分。作者观察的索氏甲烷丝菌细胞壁的结构与 Colvin 等^[12]和 Alexander 等^[13]的观察相同。甲烷八叠球菌的细胞壁为单层, 比甲烷杆菌的细胞壁厚, 约 20—50nm。嗜热八叠球菌细胞壁外缘呈绒状, 而 TH 菌株细胞壁较光滑。不同菌株甲烷八叠球菌之间, 壁的厚度、结构有一定差别, 如作者观察的两株甲烷八叠球菌和巴氏八叠球菌 (*Methanosarcina barkeri*)^[1] 的细胞壁厚度和表面结构就有较大差别。甲烷球菌细胞质膜外是单层细胞壁, 细胞壁外边缘呈细绒毛状, 细胞壁约厚 10nm, 比上述几株菌的细胞壁薄, 它既不是革兰氏阴性结构, 也不是典型的革兰氏阳性结构, 而与 Jones^[9] 报道的范氏甲烷球菌 (*Methanococcus vannielii*) 的细胞壁结构相似。以上所述, 产甲烷细菌的不同细胞类型, 或同一种细胞类型, 细胞壁结构差别较大。

几株产甲烷细菌的细胞壁内紧接着细胞质膜, 细胞中是分散的颗粒核糖体区域和位于中央的电子透明的核物质。细胞中可见一些电子致密的内含物(图版 I-3, 5; II-9, 11)。图版 I-2 中, 索氏甲烷丝菌的细胞质膜较厚, 为 10—14nm, 细胞中存在许多类似动物细胞内糖原颗粒的电子致密物。甲烷球菌细胞中, 可见一种电子致密的粗沉积物和另一种低电子密度的细颗粒物质。这与在液体培养基中的范氏甲烷球菌一样, 细胞内存在两种类型的细胞内含物^[9]。这两种内含物常靠近细胞质膜, 内

含物区域的细胞壁常表现出形态改变, 向外突起, 类似酵母出芽繁殖(图版 II-13)。史氏甲烷杆菌和甲烷八叠球菌的细胞内出现中体类内膜结构。图版 II-7 中史氏甲烷杆菌的细胞正在进行分裂和形成隔膜。电镜下也可看到甲烷八叠球菌具有与其它产甲烷细菌明显不同的分裂方式, 细胞从不同平面形成横壁, 分裂成不对称的子细胞, 子细胞具有共同的外壁, 在成熟的聚集体中, 子细胞具有完整的细胞壁(图版 II-9, 11)。

在甲烷氧化菌、光合细菌、硝化细菌等见到的内膜系统, 在嗜热自养甲烷杆菌细胞中也能见到(图版 I-3, 5, 6)。嗜热自养甲烷杆菌的内膜一般是同心圆、环状结构。内膜由两个外层电子致密层和一个中间电子透明层构成, 形状和厚度与细胞质膜相似。成对的内膜紧紧平行排列, 不被细胞质分隔, 形成一种三层结构。甲烷氧化菌 (methane-utilizing bacteria) 的 I 型细胞质内膜也形成三层结构, 但在细胞质内膜的内部空间通常含有与周围细胞质相同的物质^[14]。嗜热自养甲烷杆菌的内膜结构与出现在史氏甲烷短杆菌、甲烷八叠球菌和其它细菌内的中体不同。中体可能与 DNA 丝的分离和细胞分裂有关, 一般是和细菌 DNA 或形成隔膜的位置相结合。而嗜热自养甲烷杆菌的细胞质内膜可以出现在细胞任何部位, 与细胞分裂无关, 而认为与其生长和产能反应有关。因为 Doddema 等^[15] 观察认为, 嗜热自养甲烷杆菌中氢化酶活性完全位于内膜结构上。氢化酶在甲烷生物合成中是一种关键的酶。Frank 等^[16] 发现从 H_2 和 CO_2 合成甲烷需要完整的膜囊。又因为嗜热自养甲烷杆菌的对数期细胞倍增时间, 比在相同条件下生长的史氏甲烷杆菌、甲烷八叠球菌的短得多。因此, 需要较大的膜表面积来保持快速生长, 同

时产甲烷细菌的产能反应也需要酶系统结合。内膜结构大大增加了细胞的有效表面积,这就使产甲烷杆菌的能量产生和迅速生长得到与膜相关的酶系统密切配合。总之,内膜结构对于利用在水里很少溶解的气体基质的细菌特别重要,它们有助于将这些反应部位维持在还原和厌氧的条件下。

参 考 文 献

- [1] Zeikus, J. G. and V. G. Bowen: *Can. J. Microbiol.*, 21: 121—129, 1975.
- [2] 赵一章、张辉: 微生物学报, 25(3): 187—193, 1985.
- [3] 张辉、赵一章: 中国沼气, (3): 7—12, 1985.
- [4] Zinder, S. H. and R. A. Mah: *Appl. Environ. Microbiol.*, 38: 996—1008, 1979.
- [5] 赵一章: 微生物学报, 24(2): 99—104, 1984.
- [6] Balch, W. E. et al.: *Microbiol. Revs.*, 43: 260—296, 1979.
- [7] Bryant, M. P. et al.: *Arch. Microbiol.*, 59: 20—31, 1967.
- [8] Huser, B. A. et al.: *Arch. Microbiol.*, 132: 1—9, 1982.
- [9] Jones, J. B. et al.: *J. Bacteriol.*, 130: 1357—1363, 1977.
- [10] Zeikus, J. G. and R. S. Wolfe: *J. Bacteriol.*, 113: 461—467, 1973.
- [11] Zeikus, J. G. and V. G. Bowen: *J. Bacteriol.*, 121: 373—380, 1975.
- [12] Colvin, J. R. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 25: 826—832, 1979.
- [13] Alexander, J. B. et al.: *Arch. Microbiol.*, 124: 1—11, 1980.
- [14] Davis, S. and R. Whittenbury: *J. Gen. Microbiol.*, 61: 227—232, 1970.
- [15] Doddema, H. J. et al.: *J. Bacteriol.*, 140: 1081—1089, 1979.
- [16] Frank, D. et al.: *J. Biochem.*, 19: 177—182, 1980.

OBSERVATION ON THE ULTRASTRUCTURE OF METHANOGENS

Zheng Zhonghua

(Analysis and Testing Center of Chengdu Branch of Chinese Academy of Sciences, Chengdu)

Zhao Yizhang Zhang Hui

(Chengdu Biogas Research Institute of Ministry of Agriculture, Animal Husbandry and Fishery China, Chengdu)

Wu Weimin

(Tsinghua University, Beijing)

The cellular ultrastructure and morphology of seven strains of methanogens, including *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanobacterium bryantii*, *Methanobrevibacter smithii*, *Methanotherix soehgenii*, *Methanosarcina*, *Methanosarcina thermophilic* and *Methanococcus* sp., were examined with transmission and scanning electron microscopy.

The difference between the structure of the cellular walls of methanogens were discussed. The intracytoplasmic membrans of methanogens, associated with the energy-yielding metabolism, were discussed also.

Key words

Methanogens; Ultrastructure

图 版 说 明

Explanation of plates

图 版 I

1. 布氏甲烷杆菌的扫描电镜照片 ($\times 9,000$)。2. 索氏甲烷丝菌的超薄切片照片, 表明双层细胞壁 (CW) 和双层细胞质膜 (CM) 结构, 致密颗粒 (DG) ($\times 117,600$)。3. 嗜热自养甲烷杆菌的超薄切片照片, 细胞质内膜 (IM), 核区 (NR), 核糖体 (RI) ($\times 54,000$)。4. 索氏甲烷丝菌的丝状体, 细胞正在形成隔膜 (S) ($\times 27,500$)。5、6. 嗜热自养甲烷杆菌的纵切面和横切面 ($\times 150,000$; $\times 110,000$)。

图 版 II

7. 史氏甲烷短杆菌的超薄切片。细胞正在形成隔膜 (S), 可见中体 (M), 细胞壁 (CW) ($\times 66,200$)。8. 甲烷八叠球菌 TH 菌株的扫描电镜照片 ($\times 6,700$)。9. 甲烷八叠球菌 TH 菌株的超薄切片, 可见细胞壁 (CW), 致密的细胞内含物 (I), 中体 (M) ($\times 26,000$)。10. 嗜热甲烷八叠球菌的扫描电镜照片 ($\times 6,000$)。11. 嗜热甲烷八叠球菌的超薄切片 ($\times 44,500$)。12. 甲烷球菌的超薄切片, 表明细胞形态不规则 ($\times 2,700$)。13. 甲烷球菌的超薄切片, 表明细胞壁 (CW), 核区 (NR), 电子致密的沉积物 (P) 和细颗粒物质 (G) ($\times 96,000$)。

Plate I

1. Scanning micrograph of *Methanobacterium bryantii* CS. 2. Ultrathin section of *Methanotherix soehngenii* CT, indicating two layers of cell wall (CW) and double layer cytoplasmic membrane (CM). 3. Ultrathin section of *Methanobacterium thermoautotrophicum* CB-12, illustrating intracytoplasmic membrane (IM), nucleic region (NR), ribosome (RI). 4. Filamentous cells of *Methanotherix soehngenii* CT. The cells are being divided by cross wall formation. There are dense cytoplasmic granules (DG) inside the cells. 5, 6. The thin longitudinal and cross section of *Methanobacterium thermoautotrophicum* CB-12.

Plate II

7. Ultrathin section of *Methanobrevibacter smithii* H-13, indicating cell wall (CW), septum formation (S) and two mesosomal structure (M). 8. Scanning micrograph of *Methanosarcina* TH. 9. Ultrathin section of *Methanosarcina* TH. 10. Scanning micrograph of *Methanosarcina thermophilic* CB-84. 11. Ultrathin section of *Methanosarcina thermophilic* CB-84. 12. Ultrathin section of *Methanococcus* sp. showing irregular shapes in morphology of cell. 13. Ultrathin section of *Methanococcus* sp. showing two inclusions, i. e. a very electron-dense precipitate (P) and a finely granular material (G), and cell wall (CW).