

# 甲烷氧化细菌的电子显微镜观察

郑 中 华

(中国科学院成都分院分析测试中心, 成都)

赵 树 杰

(中国科学院成都生物研究所, 成都)

采用冷冻蚀刻、超薄切片和负染色电镜技术, 对 *Methylobacter* sp. 761M 和 *Methylobacter* sp. 81Z 两株甲烷氧化细菌的细微结构进行了观察。在冷冻蚀刻中, 细胞从质膜和细胞壁外膜的中央劈开, 暴露出四个断裂面。各个断面的结构有所不同, 显示出颗粒、小杆、乳状突起、小坑和光滑区等结构。冷冻蚀刻揭示的多层结构, 与超薄切片和负染色观察结果一致。此外, 对甲烷氧化细菌细胞壁表面图案, 细胞内膜结构进行了观察。

关键词 甲烷氧化细菌; 超微结构

甲烷氧化细菌 (Methanotroph) 在生态环境中占有重要地位, 在生产生物多糖, 单细胞蛋白, 污水处理, 以及近年发现的甲烷单加氧酶对多种烃及其衍生物的生物转化等方面, 有着广泛的用途, 因而引起人们极大的关注。Davies<sup>[1]</sup>、Weaver<sup>[2]</sup>、Малашенко<sup>[3]</sup> 等曾对其细胞超微结构作过观察, 并将细胞内膜划分为 I 和 II 型。但未见对细胞包被 (envelope) 研究的报道。本文报告采用冷冻蚀刻方法, 以及负染色和超薄切片方法, 对甲烷氧化细菌的细微结构进行电镜观察, 特别对细胞包被结构进行较详细的研究。

## 材 料 和 方 法

### (一) 材料

实验选用了两株甲烷氧化细菌。 *Methylobacter* sp. 761M 是利用天然气的蛋白生产菌“761-2”混合培养中的一株 I 型专性的甲烷氧化细菌<sup>[4,5]</sup>。 *Methylobacter* sp. 81Z 系从沼气发生器中分离到的一株 II 型专性甲烷氧化细菌<sup>[6]</sup>。

细菌在含高 Cu 的 2 号无机盐培养基<sup>[7]</sup>和含甲烷的气圈中培养。

### (二) 电镜样品制备

实验采用了三种电镜制样方法。超薄切片和负染色方法与常规的制样方法相同<sup>[7]</sup>。冷冻蚀刻样品制备系先将细菌离心收集成团, 在 4℃ 下, 用 2.5% 的戊二醛固定液 (pH 7.4) 固定 2 小时, 一部分样品换入 30% 的甘油生理盐水中浸渍 2—12 小时, 另一部分样品不用甘油冷冻保护。然后将两种样品分次装入样品杯, 迅速放入液氮中, 冷冻到约 -196℃ 时, 用日本电子光学公司 (JEOL) 的 EE-FED. B 冷冻蚀刻装置, 在  $5 \times 10^{-6}$  Torr, -130℃ 下将样品“切”断, 暴露出细菌的内部结构。再使温度在 1 分钟内从 -130℃ 上升到 -110℃, 进行蚀刻, 然后在蚀刻后的细菌表面以 45° 角喷铂, 再垂直喷碳, 制成复型膜。最后用次氯酸钠腐蚀掉菌体, 将复型膜用蒸馏水清洗 3 次, 捞在 400 目的铜网上。

上述的冷冻蚀刻复型膜, 超薄切片和负染样品, 均于 JEM-100CX 电镜下观察拍照。

## 结 果

### (一) 负染色电镜观察

经磷钨酸染色后在电镜下观察, 可见

本文于 1987 年 1 月 24 日收到。

菌体边缘不整齐,包被由电子密度不同的几层构成(图版 I-4)。两株菌的细胞表面出现不同的图案,761M 表面呈现不规则排列的短棒状花纹(图版 I-1)。81 Z 表面为不规则的皱褶,皱褶与细胞纵轴平行,似指纹状(图版 I-2)。在裂解(lysing)的761M 细胞中,可见呈肋状排列的 I 型细胞内膜囊结构,分散在整个细胞质中(图版 I-3)。也可观察到 81 Z 菌体形成外生孢子时,细胞发生的变化。可见一些菌体变细、拉长,顶部出芽形成球形外生孢子。在拉长的菌体顶端,可见脑纹状和同心圆结构(图版 I-4, 7)。

### (二) 超薄切片电镜观察

与负染色观察相同,在超薄切片中,甲烷氧化细菌的细胞包被为多层结构,细胞壁为革兰氏阴性菌结构,由外膜和肽聚糖层构成(图版 I-6, 8)。外膜多数为波浪形,由两个电子致密层和中间的密度较低的区域组成,厚度约为 7—9nm。肽聚糖层厚约 2—3nm。在肽聚糖层的下面是细胞质膜。甲烷氧化细菌的细胞质内,含有复杂的膜结构,这种内膜结构与细胞质膜相似,由两个电子致密的外层和中间电子透明区所组成,厚约 7—9nm。内膜结构分为两种类型,在 761 M 细胞质中可见 I 型内膜结构(图版 I-5, 6),由一系列平行排列的盘状膜囊堆积而成,并分布在大部分细胞质中。在一些较老的细胞中,内膜结构排列疏松,可见一个个膜囊(图版 I-5)。在 81Z 细胞内可见 II 型管状膜囊结构,其排列通常沿细胞的边缘,或贯穿整个细胞,且常常成对出现(图版 I-9)。

### (三) 冷冻蚀刻电镜观察

由于细菌包被层次较多,冷冻蚀刻后形成的断面比真核细胞复杂,本文对各个断面的名称引用了 Schmid 等<sup>[10]</sup>的命名。两株甲烷氧化细菌冷冻蚀刻后,细胞从两

个平面劈开,形成四个断裂面,其中两个为凸面,两个为凹面。当从细胞外表向细胞质观察,看到的第一个凸面为 omEF 面,这一断面比较光滑,上面不规则地分布着一些颗粒,一些区域颗粒较密,一些区域稀疏,颗粒大都单个存在,少数几个聚成团。颗粒大小较均匀,直径约为 7—10nm(图版 II-10; III-14, 18)。第二个凸面为 pmEF 面,其表面布满突起的点状颗粒,颗粒直径为 8—12nm。一些区域颗粒类似网状排列(图版 II-12, III-15)。从细胞质向细胞外观察时,可见两个凹面,第一个为 pmPF 面,上面可见稀疏的点状颗粒和光滑区,光滑区一些微突起,一些凹陷(图版 II-10, 11, 13)。第二个凹面为 omPF 面,其大部分区域密布直径约为 7—10 nm 的球形颗粒,可见几个球形颗粒连接成小杆状,小杆长度不等,这些球形颗粒好像是嵌在 omPF 面中(图版 II-11, 13; III-17, 19)。在 pmPF 面(图版 II-13)和 omEF 面(图版 III-14, 15)上,可见一些乳状突起,在 pmEF 面(图版 II-12)和 omPF 面(图版 III-19)上,可见一些小坑和沟,在这些突起和小坑的中央可见一微孔。在冷冻蚀刻中,没有得到肽聚糖结构的任何资料,仅观察到它的侧面。在图版 II-12 和 III-15 中,偶尔可见外膜和质膜之间粗的结构间隙。在图版 II-10 和 III-18 中,可见在 omEF 面上出现不规则形状的补丁样结构(omES)。这些补丁的表面比较光滑,未见其它结构。在图版 II-11, 12 和 III-17 中,可见细胞壁表面为不规则的嵴和沟状,这与负染色中观察到菌体表面的皱褶,超薄切片中的波浪形外膜是一致的。另外,也可见甲烷氧化细菌的内膜结构(图版 II-10; III-16)。

## 讨 论

采用三种电镜制样方法, 对两株甲烷氧化细菌的细微结构进行了观察。细胞内膜结构与以前报道的甲烷氧化细菌的内膜结构相同<sup>[1-3]</sup>。细胞包被具有较多层次, 每一层的结构有所不同。运用冷冻蚀刻方法, 能显示出各个层次内部的微细结构, 给出甲烷氧化细菌包被的三维图像。图 1 表明了甲烷氧化细菌在冷冻蚀刻中各个断面

的位置, 以及与超薄切片中各层的关系。冷冻蚀刻中, 甲烷氧化细菌细胞从两个平面劈开, 内劈裂面沿超薄切片中质膜的两个致密层的中间劈开, 出现互补的 pmEF 面和 pmPF 面。这与 Branton<sup>[9]</sup>提出的冷冻断裂遇到生物膜时, 断裂面总是沿着生物膜的疏水部分发生, 暴露出生物膜层之间的内部形态相一致。这也与其它一些细菌冷冻蚀刻和互补复型的结果相同<sup>[10-13]</sup>。冷冻蚀刻中甲烷氧化细菌的 pmEF 面, 相当

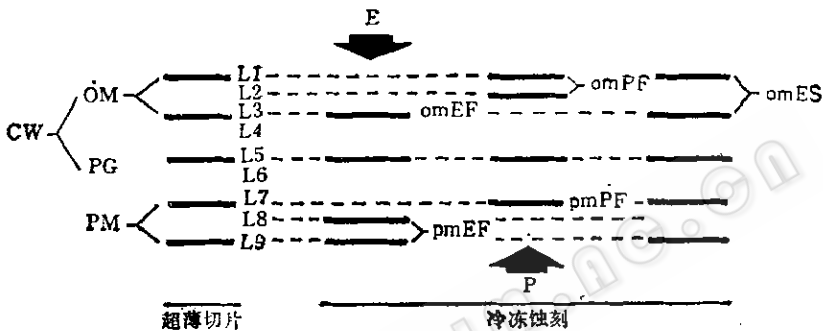


图 1 冷冻蚀刻中各个断面与超薄切片中各层的关系

Fig. 1 Relationships between the layers and the fracture surfaces of the cell envelope in thin-sectioning and freeze-etching

箭头表示观察方向; E: 细胞外表面; P: 细胞质; OM: 外膜; PG: 肽聚糖; PM: 质膜; CW: 细胞壁; omEF、omPF: 外膜断面; pmEF、pmPF: 质膜断面; omES: 完整外膜。

Direction of observation is indicated by the arrowhead. E: extracellular space; P: cell plasma; CW: cell wall; OM: outer membrane; PG: peptidoglycan; PM: plasma membrane; omEF, omPF: fracture faces in outer membrane; pmEF, pm : fracture faces in plasma membrane; omES: intact outer m mbrane.

于超薄切片中细胞质膜靠近细胞质的电子致密层, 为图 1 中的 L8 和下面的支持层 L9。这一断面颗粒较多, 颗粒排列与在大肠杆菌(*Escherichia coli*)<sup>[10]</sup>和绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)<sup>[12]</sup>中观察到的情况较相似。pmPF 面相当于超薄切片中细胞质膜靠近肽聚糖层的电子致密层, 为图 1 中的 L7, 其上面有对应于 pmEF 面的颗粒和光滑区。在质膜断面上的颗粒为镶嵌的膜内蛋白颗粒。在观察中可见, pmEF 面上颗粒丰富, 而 pmPF 面上较少, 这与在真核细胞中质膜的内片(PF 面)蛋

白颗粒较多, 外片(EF 面)颗粒较少相同。可以推测 L7 和 L9 为磷脂层, 膜蛋白嵌在这个磷脂双层之中, 蛋白颗粒在 L9 中比 L7 镶嵌的深, 当质膜从中间断开时, 颗粒保留在 L9 的磷脂层中, 所以在冷冻蚀刻中见到较多的蛋白颗粒。

甲烷氧化细菌的外劈裂面是从细胞壁外膜的中间劈开, 暴露出互补的 omEF 面和 omPF 面。omEF 面为 L3 (图 1), 相当于超薄切片中外膜靠近肽聚糖层的电子致密层, omPF 面为 L1 和 L2 (图 1), 相当于超薄切片中外膜靠近细胞外空间的电子

致密层。革兰氏阴性菌的外膜,表现为双线形,具有单位膜的宽度和微细构造。已知的主要化学成份是蛋白质、磷脂和脂多糖,大约 70% 的蛋白质是相同的(分子量 44,000),并且不是附在肽聚糖层上。磷脂与细胞质膜的磷脂类似<sup>[14]</sup>。因此,认为它可能也像质膜那样,是由一脂双层组成的,磷脂和脂多糖二者都结合在脂双层中,蛋白质嵌在磷脂双层中<sup>[15]</sup>。按生物膜断裂的假说<sup>[7]</sup>,脂质双分子层中间的疏水区与水不亲和,冷冻坚硬度弱,断裂时阻力小。所以在甲烷氧化细菌的冷冻蚀刻中观察到,细胞壁的断裂总是沿着外膜的中间劈裂开,显示出类似质膜的结构。在其它的研究中也得到同样的结果<sup>[10-13]</sup>。因此,甲烷氧化细菌的冷冻蚀刻,可以进一步证实外膜是脂质-蛋白质-脂质结构。但必须指出,外膜在蛋白质组成和功能上都和细胞质膜不一样。

在甲烷氧化菌 pmEF 面上见到的凹陷小坑,与 pmPF 面上的乳状突起相对应,而 omEF 面上的突起与 omPF 面上的小坑对应。这种结构是横贯于细胞壁和细胞质膜上的孔道。这些孔道使细胞内外相通,它与细胞的物质交换,毒素和酶排出到周围的培养基里,以及细胞的渗透性有关。在硫杆菌(*Thiobacillus*)<sup>[13]</sup>和大肠杆菌中可见类似结构;但在绿脓假单胞菌中未见此结构。甲烷氧化菌的 omPF 面上的球形颗粒直径为 7—10nm,在大肠杆菌中球形颗粒直径为 10nm,硫杆菌为 8nm,绿脓假单胞菌的为 6—7nm。Gillelland 等<sup>[12]</sup>经成份分析,发现这些球形小体主要含蛋白质,当用 EDTA-Tris 处理细菌时,omPF 面上的球形颗粒大大减少,当加入  $Mg^{++}$  时,球形颗粒又聚集于 omPF 面上。实验用的甲烷氧化细菌未经任何处理,但 omPF

面上也失去一些颗粒,出现一些光滑区。

一些革兰氏阴性细菌的细胞壁外还具有一附加层,使细胞壁表面为十分规则的微细结构。一些学者认为<sup>[10-13]</sup>,细菌不用甘油处理进行冷冻蚀刻,才能观察到表面规则排列的亚单位,经甘油处理后,仅显示四个断面,不能观察到附加层。在甲烷氧化细菌的冷冻蚀刻中,不论是否经甘油冷冻保护,除观察到四个断面外,还可观察到补丁状的光滑外层(omES)。我们认为光滑外层的出现,是由于某种原因,使外膜没有完全断开,出现完整的外膜。光滑层相当于图 1 中的 L1 和 L3 没断裂开。甲烷氧化细菌的外膜表面未观察到规则排列的亚单位,无附加层。

## 参考文献

- [1] Davies, S. C. and R. Whittenbury: *J. Gen. Microbiol.*, 61: 227—232, 1970.
- [2] Weaver, T. L. and P. R. Dugan: *J. Bacteriol.*, 121: 704—710, 1975.
- [3] Малащенко, Ю. Р. и др.: Метанокисляющие микроорганизмы, Изд. Наука, Москва, стр. 110—156, 1978.
- [4] 赵树杰等: 微生物学报, 21(3): 271—277, 1981.
- [5] Zhao, S. J. and R. S. Hanson: In "Microbial growth on Compounds", ed. by Crawford, R. L. and R. S. Hanson, American Society for Microbiology, Washington, D. C., pp. 263—268, 1984.
- [6] 赵树杰等: 中国沼气, 增刊(第四届国际厌氧消化讨论会墙报稿全文专集), pp. 130—137, 1986.
- [7] 郑中华等: 微生物学报, 27(1): 1—5, 1987.
- [8] Schmid, E. N. et al.: *J. Ultrastruct. Res.*, 71: 22—24, 1980.
- [9] Branton, D.: *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 20: 209—236, 1969.
- [10] VanGool, A. P. and N. Nanninga: *J. Bacteriol.*, 108: 474—481, 1971.
- [11] Nanning, N.: *ibid.*, 101: 297—303, 1971.
- [12] Gillelland, H. E. et al.: *ibid.*, 113: 417—432, 1973.
- [13] Holt, S. C. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 20: 1347—1351, 1974.
- [14] White, D. A. et al.: *J. Bacteriol.*, 109: 686—690, 1972.
- [15] R. Y. 斯塔尼尔等: 微生物世界, 科学出版社, 北京, pp. 258—261, 1983.

## OBSERVATION ON THE ULTRASTRUCTURE OF METHANOTROPH

Zheng Zhonghua

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

Zhao Shujie

(Chengdu Biology Institute of Chinese Academy of Sciences, Chengdu)

An electron-microscopic examination of cellular ultrastructure of *Methylobacter* sp. 761 M and *Methylosinus* sp. 81 Z was undertaken using the techniques of freeze-etching, ultrathin sectioning and negative staining. When cells were freeze-etched, four fracture surfaces, which resulted from splitting down the center of the outer wall membrane and of the plasma membrane, were exposed. Various fracture faces with particles, rodlets,

holes, nipples and smooth areas were revealed. The multilayered cell envelope of methanotroph in the freeze-etching was similar to observations of thin sections and negative stains. Irregular streak of cell wall, intracytoplasmic membranes were observed too.

### Key words

Ultrastructure; Methanotrophs

## 图 版 说 明

## Explanation of plates

## 图 版 I

1, 3. 761M 菌株的负染照片。IM: 细胞内膜。2, 4, 7. 81Z 菌株的负染照片。5, 6, 8. 761M 菌株的超薄切片照片。OM: 外膜; PG: 肽聚糖; PM: 质膜。9, 81Z 菌株的超薄切片照片。

## 图 版 II, III

10, 11, 14, 16—19. 761M 菌株的冷冻蚀刻照片。12, 13, 15, 81Z 菌株的冷冻蚀刻照片。C: 细胞质; H: 小坑; G: 沟; N: 乳状突起; omES: 外膜表面; omEF, omPF: 外膜断面; pmEF, pmPF: 质膜断面。

## Plate I

1, 3. Negative staining micrographs of 761M. IM: intracytoplasmic membrane. 2, 4, 7. Negative staining micrographs of 81Z. 5, 6, 8. Ultrathin section of 761M. OM: outer membrane; PG: peptidoglycan; PM plasma membrane. 9. Ultrathin section of 81Z

## Plate II, III

10, 11, 14, 16—19. Freeze-etching micrographs of 761M. 12, 13, 15. Freeze-etching micrographs of 81Z. C: cytoplasm; H: hole; G: groove; N: nipple; omES: outer membrane surface. omEF, omPF: fracture faces in outer membrane; pmEF, pmPF: fracture faces in plasma membrane.