微 生 物 学 报　32 (2): 124—126, 1992
Acta Microbiologica Sinica

一种甲烷氧化菌——球形多孢菌内膜的电镜观察

梁 家 骕
(中国科学院微生物研究所,北京 100080)

用透射电镜观察了一种甲烷氧化菌——球形多孢菌 (*Polysporobacterium globosum*) 细胞的内膜结构。看到有大小不等的圆盘状膜囊,管状膜囊,膜囊之间以球面相连通,在一个膜囊上可有几处同周围的膜囊相通,连接部位明显。

关键词　甲烷氧化菌;膜结构;球形多孢菌

自从 Procter 等人[1]在 1969 年首次发现并描述了甲烷氧化菌——荚膜甲基球菌 (*Methylococcus capsulatus*) 细胞内所具有的特殊内膜结构以来,继而 Smith 和 Ribbons[2] 研究了另一种甲烷氧化菌即氧化甲烷甲基单胞菌 (*Methanomonas methanooxidans*) 又一类型的内膜结构。Davies 和 Whittenbury[3] 把这两种不同类型内膜结构分别叫做 I 型和 II 型。I 型内膜结构是由许多圆盘状膜囊组成的,他们不仅用细胞切片而且还用细胞负染色方法观察了这种膜结构。Willemina 等人[4]在甲基单胞菌 (*Methylomonas* sp.) 的细胞内看到极膜的细胞器,老龄细胞内又有一种类似髓的膜状结构,而在 Hazeu[5] 的一株可用胨作氮源的甲烷氧化菌——运动甲基球菌 (*Methylococcus mobilis*) 的细胞内,存有若干管状的膜囊结构。本文报道球形多孢菌在无碳、氮源培养基上培养的细胞内的膜结构。

材料和方法

(一) 菌种

球形多孢菌 (*Polysporobacterium globosum*)[6] 系本实验室从北京一土样中分离得到。该菌株既能在无碳源和无氮源的无机盐培养基上生长,也能以 NH_4^+、NO_2^- 为氮源,以甲烷或甲醇作碳源和能源的培养基上生长。

(二) 细胞培养

挑取一环生长旺盛的斜面菌种的菌苔,接种到无碳、氮源的无机盐固体平板上,置干燥器中,并使其中的气相组分调成甲烷: 空气 = 1:1(V/V) 380mmHg 柱,然后放到 40℃ 温室中静止培养 10—15 天。

(三) 电镜观察

1. 制备切片[7]: 用离心法收集培养后的菌体,将它与 2% 水洗琼脂混合,待凝固后切成大小约 0.5—1mm 的小块,用 2.5% 戊二醛固定 3 小时。接着用 pH7.2 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液洗 3 次,用 0.1% 锇酸固定 2—3 小时,再用磷酸缓冲液洗,继而用乙醇溶液作梯度脱水,随即再用丙酮脱水。在用树脂包埋固定化后,用 LKB8800 型切片机切片,切片用 2% 醋酸氧铀和柠檬酸铅作双重染色,时间分别为 20—25 分钟和 20 分钟。最后,用日立 H-500 透射电镜观察。

2. 负染色: 染液配制: 染液 A: 用 0.1 mol/L 醋酸铵液配制 0.2%(W/V) 蔗糖溶液; 染液 B: 用磷钨酸和氢氧化钾配制成 2%(W/V) 磷钨酸钾溶液。

本文于 1990 年 3 月 6 日收到。

负染：取染液A和染液B作等量混合，挑取少许菌苔至染液中，待扩散后，沾到火棉胶铜网上风干，再用铂喷镀，最后用H-500 透射电镜观察。

结　　果

（一）用透射电镜观察细胞切片

从图版 I 可知球形多孢菌呈 I 型内膜结构。取自生长对数期的细胞，其内(图版 I-2) 圆盘状膜结构排列紧密整齐，占据细胞质大部位置。而处于静止期的细胞其内(图版 I-3) 大部分膜囊已溶解，少数残存膜囊排列零乱，只占据细胞质内很少位置。

（二）负染后细胞的透射电镜观察

在未溶解的细胞中，由于细胞壁的包围，因而看不到膜结构。当细胞壁溶解后，细胞中的膜结构才逐渐显露出来，在膜囊还没有散开时，许多膜囊紧密相连成一团(图版 I-4、5)，因此只能看到暴露在表面的一部分膜囊。这与 Davies 和 Whittenbury 所观察到的“圆盘状膜囊”的结构相似。这些圆盘状膜囊其大小是不等的，大的膜囊甚至是小的膜囊的几倍。另外我们还发现有管状膜囊(图版 I-8、9)，膜囊与膜囊之间以球面相连通(图版 II)，一个膜囊可能有好几处同相邻的膜囊连通（图版 II)，连接的部位明显，说明所有的膜囊都是互相连通的。

讨　　论

甲烷氧化菌具有独特的细胞内膜结构。许多研究证明，这种结构与它的代谢途径[8,9]和繁殖速度[3]有关；膜的排列和类型与菌龄和培养条件有密切关系[10]。我们用 Davies 和 Whittenbury[8,9] 的负染色方法，观察了球形多孢菌生长在无碳、氮源的无机盐平板上，以甲烷作碳源的溶解细胞，看到了其中大小不等的圆盘状膜囊、管状膜囊以及膜囊与膜囊之间的明显连通部位。这可能与我们所使用的菌种和培养条件有关，因为如将该菌放在含有氮源的培养基上培养时，就看不到这样的膜囊结构。该菌具有甲烷氧化菌的 I 型膜囊结构，但除了圆盘状膜囊外尚有管状膜囊，这些管状膜囊究竟有什么生理作用，还有待进一步研究。

参　考　文　献

[1] Proctor, H.: *J. Appl. Bacteriol.*, **32**: 118—121, 1969.

[2] Smith, U. and D. W. Ribbons: *Arch. Mikrobiol.*, **74**: 116—122, 1970.

[3] Davies. S. L. and R. Whittenbury: *J. Gen. Microbiol.*, **61**: 227—232, 1970.

[4] Willemina, E. de Boer and W. Hazeu: *Antonie Beeuwenhoek.*, **38**: 33—47, 1972.

[5] Hazew, W. et al.: *Ardh. Microbiol.*, **124**: 211—220, 1980.

[6] 梁家騄：微生物学论文集，第 21—23 页，科学出版社，北京，1985。

[7] 梁家騄等：微生物学通报，**10**(1)22—23，1983。

[8] Ribbons, D. W. and J. L. Michalover: *FEBS Letters.*, **11**: 41—44, 1970.

[9] Smith, U. et al.: *Tissue & Cell.*, **2**(4): 513—520, 1970.

[10] Hyder, S. L. et al.: ibid., **11**(4): 597—610, 1979.

OBSERVATION ON THE FINE STRUCTURE OF A METHANE-OXIDIZING BACTERIUM *POLYSPOROBACTERIUM GLOBOSUM* WITH ELECTRON MICROSCOPY

Liang Jiayuan

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Cells and lysized cells of a methane-oxidizing bacterium *Polysporobacterium globosum* were examined with electron microscopy and found possessing disc shaped, tube-shaped membrane vesicles with variety of size. The conjuncting position of membrane vesicles is clear.

Key words

Methane-oxidizing bacterium; Membrane fine structure; *Polysporobacterium globosum*

图 版 说 明

Explanation of plates

图 版 I

球形多孢菌(生长在无碳、氮源的无机盐琼脂上：1.生长 10 天的营养细胞负染色(10000×)； 2.生长 10 天细胞的超薄切片，栅状纹为 I 型内膜结构(42000×)； 3.生长 15 天细胞的超薄切片，栅状纹为 I 型内膜结构(30000×)； 4、5.负染溶解细胞，一团细胞膜囊结构(24000×)(12000×)； 6、7.负染溶解细胞，大小不等的圆盘状膜囊(15000×)(24000×)； 8、9.负染溶解细胞，圆盘状膜囊，管状膜囊(10000×)(42000×)。

图 版 II

球形多孢菌(生长在无碳、氮源的无机盐琼脂上：负染溶解细胞，圆盘状膜囊、管状膜囊，相连通的膜囊(72000×)。

Plate I

Polysporobacterium globosum grown on N and C free mineral agar: 1. Whole organism, ten days; 2. A section showing the I type membrane system, ten days; 3. A section showing the I type membrane system, fifteendays; 4,5. Negatively stained of a lysing cell showing closely packed, disc-shaped membrane vesicles; 8,9. Negatively stained tube-shaped and disc-shaped membrane vesicles.

Plate II

Polysporobacterium globosum grown on N and C free mineral agar: Negatively stained disc-shaped, tube-shaped membrane; conjointing membrane vesicles.