

# 厌氧原生动物的内共生甲烷菌 及其氢酶的细胞化学研究\*

蔺玉华

(黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150076)

## 提 要

阿米巴鞭毛虫 *Psalteriomonas lanterna* 生活史分为鞭毛虫和阿米巴阶段。其培养液 2% (V/V) 氧时, 细胞失去了内共生甲烷菌, 继续培养在 1% 氧中, 则鞭毛消失, 小阿米巴出现。在 1% 氧条件下, 阿米巴细胞生长较快, 密度约  $1.2 \times 10^4$  cells/ml, 氧含量 2.5% 生长被抑制, 超过 7.5% 细胞则死亡。无氧状态生长缓慢, 加入甲酸甲烷杆菌 (*Methanobacterium formicicum* Strain MSL) 后, 出现细胞密度增加的趋势。

外萤光显微镜和电镜观察以及水洗 *P. lanterna* 后, 培养液中生长的甲烷产物的事实证明, 其细胞内含的萤光菌是甲烷杆菌(种类待定)。

细胞化学染色法对细胞中氢酶的活性定位证实 *P. lanterna* 所含的类似微体的细胞器是氢体。染色结果: 低浓度的戊二醛固定细胞, 外加  $H_2$  和苯异噻唑酞肼苯乙烯四唑 (BspT) 化合物, 细胞的氢体膜周围有电子致密点生成。整个过程是在非常严格的厌氧条件下进行的。对照组以  $N_2$  代替  $H_2$  的细胞无上述反应。

**关键词** 原生动物, *Psalteriomonas lanterna*, 甲烷菌, 内共生物质, 氢酶

原生动物含内共生菌是普遍现象<sup>[1,2]</sup>, 但在厌氧原生动物中含有的内共生菌确定为甲烷菌仅最近才定论<sup>[3]</sup>。甲烷菌生活在非常严格的厌氧环境里, 其还原电位低于  $-330mV$ 。它仍生活在淡水和盐水的沉淀物, 污泥, 稻田地和沼泽地里, 昆虫的肠道(蟑螂、白蚁), 人类的大肠以及反皱动动的胃里。Van Bruggen 等指出目前所观察到的生活在淤泥中的原生动物所含的内共生甲烷菌均存在于其细胞质中<sup>[4]</sup>。

国内有关原生动物与甲烷菌内共生的生理研究未见报道。本文报道的是含内共生甲烷菌而自由生活的阿米巴鞭毛虫 *P. lanterna*<sup>[5]</sup>, 在加氧培养传代中失去了内共生菌后转变成阿米巴, 其在无氧或低氧环境中的生长状况, 以及采用细胞化学染色法对氢体的一种关键的定位研究。

## 材料和方法

阿米巴鞭毛虫 *P. lanterna* 取自荷兰奈梅根(Nijmegen)大学附近的废水污泥塘。泥样

\* 此文系作者在荷兰 Nijmegen 大学进修期间所做的实验。  
1991 年 3 月 3 日收到。

首先被移到体积为 1L 瓶内,而后加入 0.2g 蛋白胨促进繁殖。两周后用微吸管从该瓶中转移单个鞭毛虫,5mmol/L 磷酸缓冲液(pH 为 6.8)水洗数次后放入无菌的培养液,其含 5mmol/L  $\text{NaHPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  缓冲液(P-PB,pH 为 6.8),0.02%(W/V)豚蛋白胨 Proteose Pepton, 0.1mmol/L  $\text{Na}_2\text{S} \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ ,4mg/L 刃天青(Resazurine)。50ml 血清瓶装 20ml 培养液。瓶口用橡胶塞盖紧且外包铅帽密封。抽真空 4min,100%氮气充气。高压灭菌。接种后瓶置室温暗处。转移阿米巴是向培养瓶注入 1—2%氧气。

通过倒置显微镜(Labovet,Laity,100)观察原生动物,用 Leitz 荧光显微镜确定甲烷菌。并进行细胞的检查和照相(加固定液 1%甲醛,0.5%甘油醛,5mmol/L 磷酸缓冲液 pH6.8,以固定液 1:1 比例加 Citiflouz 溶液以加强细胞感荧光反应)<sup>[6]</sup>。

氢酶的细胞化学染色依据 Goosen 等方法<sup>[7]</sup>,其中略有改动。收集无氧条件下细胞生长指数( $\pm 2000$  cells/ml)的阿米巴培养液 10ml,2000r/min 速度离心 5min。0.5%戊二醛预固定 10min 于零度冰浴中。固定的细胞用 5mmol/L 磷酸缓冲液(PPB)漂洗两次之后,于 22℃ 暗处培养。其培养液含 5mmol/L PPB, 0.25mol/L 磷酸蔗糖缓冲液和 25mg/ml 苯并噻唑啉苯基四唑(BSPT),充满氢气(0.3 个大气压)。对照组以氮气代替氢气,其它因素不变。培养 2—3h 后,进行光镜检查。有氢气存在的细胞出现紫蓝色或褐色的染色颗粒,对照组细胞无染色。上述过程均在非常严格的无氧条件下进行。若进行电镜检查,细胞用 0.1mol/L PPB,0.25mol/L 蔗糖和 0.1mol/L Cacodylate 缓冲液(pH 为 7.0)漂洗两次来中止反应。漂洗的细胞被固定在 2%甘油醛和 0.1mol/L Cacodylate 缓冲液配制的 1%锇酸 25min(0℃)。水洗两次,用 2%(W/V)琼脂包裹细胞,离心后切成小块( $<1\text{mm}^3$ )于 1%醋酸铀染色,乙醇系列脱水,Epon812 或 Araldite 包埋。使用 LKB 超薄切片机,玻璃刀切片。飞利浦透射电镜观察并照相。

## 结 果

阿米巴鞭毛虫的生活史分为鞭毛虫和阿米巴阶段。显微镜下观察其细胞中央有一个发光的球体(图版 I:1)。(荧光显微镜下观察,细胞内共生细菌自身反射蓝紫色荧光(图版 I:2)这一特性近似甲酸甲烷杆菌。电镜观察内共生菌与其他腐生的原生动物相反,不是分散在细胞质中,而是与类似微体的细胞器紧紧相连(图版 I:3)。

氢酶的细胞化学染色结果表明, $\text{H}_2$  培养的大多数阿米巴细胞呈阳性反应。光镜下细胞内有紫蓝色颗粒出现(图版 I:4)。紫色染色是由甲臍(Formazan)引起的。 $\text{H}_2$  和 BSPT 在氢酶作用下,形成四唑盐。然而,对照组含  $\text{N}_2$  的培养细胞从 3—8h 始终无染色颗粒生成(图版 I:5)。在电镜下观察, $\text{H}_2$  培养的细胞超薄切片,电子致密点是因锇酸和四唑盐相互反应生成的螯合物(图版 I:6)。相反,对照细胞的氢体不含致密点(图版 I:7)。

鞭毛虫在室温无氧条件下,混合菌的培养液中含 0.1mmol/L 的硫化钠,0.02%蛋白胨,(pH6.8),细胞最大密度  $10^4$  cells/ml,增殖时间 18h。气相色谱仪测培养液有甲烷气体生成。在培养液内含 2%(V/V)氧时,鞭毛虫很快失去了内共生菌,若继续在 1—2%氧里培养,则鞭毛消失,小阿米巴出现。阿米巴在 1%氧中生长较快,细胞最大密度约为  $1.2 \times$

$10^4$  cells/ml。氧含量 2.5%, 细胞生长被抑制, 超过 7.5% 氧, 则死亡 (图 1)。

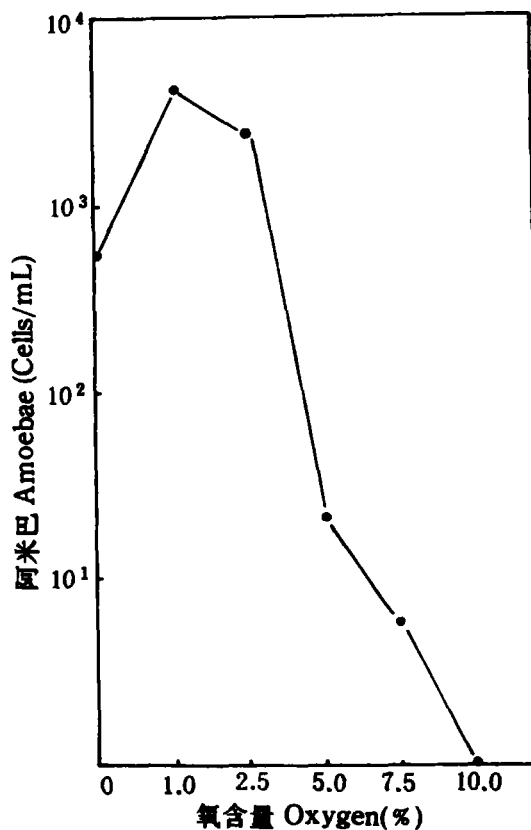


图 1 *P. lanterna* 阿米巴在不同氧含量的培养液中, 室温 24d 内细胞最大生长数

Fig. 1 Maximum culture density of the amoeba stage of *P. lanterna* in medium with different percentages of oxygen in the gas phase. Amoebae were incubated for 24 days at room temperature

诱导鞭毛虫转成阿米巴, 通过改变培养液中的 pH, 温度, 盐度及营养成份等方法均无效果。鞭毛虫生活的培养液加入 *Methanobacterium formicicum* Strain MsL, 试图使阿米巴重返鞭毛虫亦未获成功。然而, 无氧培养液内加入甲酸甲烷杆菌后, 能使失去了内共生菌的阿米巴与对照组 (未加甲酸甲烷杆菌) 的阿米巴相比, 获得较高细胞密度 (图 2)。继续培养可测出甲烷气体生成。在荧光镜波长 350—420nm 时, 发现阿米巴细胞内有紫蓝色荧光菌。电镜检查, 表明某些甲烷菌只是出现在不同消化阶段食物泡中而不是细胞质里。

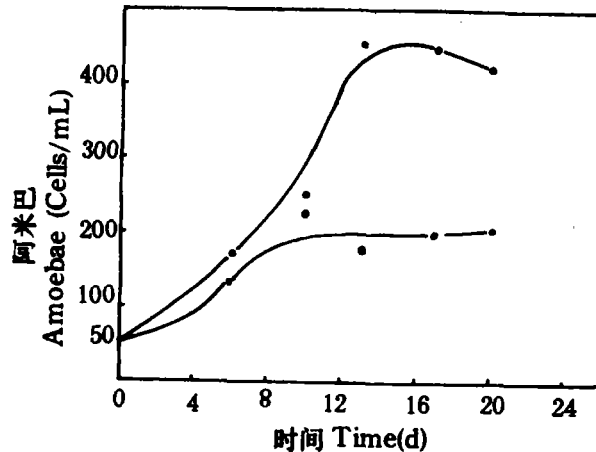


图2 培养液加入甲酸甲烷杆菌 *Methanobacterium formicum* Strain MsL, 阿米巴在室温 24d 内生长状况

○—○ 阿米巴; ●—● 阿米巴 + 甲酸甲烷杆菌 MsL

Fig. 2 Growth of amoebae in medium with *Methanobacterium formicum* Strain MsL at room temperature for 24 days.

○—○ Amoebae; ●—● Amoebae + *Methanobacterium formicum* Strain MsL.

## 讨 论

阿米巴鞭毛虫的代谢基本属于厌氧类。1—2.5%的氧气对其无伤害,且可获得较高浓度的细胞。这一结果与 Goosen 等的实验相类似<sup>[7]</sup>。加氧培养传代,鞭毛虫变成阿米巴,并失去了内共生菌。它仍可在无氧条件下生活,也许靠的是氢体。这种现象说明含有内共生物质并不是厌氧原生动物的专一性<sup>[8]</sup>。

从荧光显微镜观察,电镜切片和水洗原生动物细胞的甲烷产物等,说明与微体紧紧相连的细菌是甲烷菌。使用 Van Bruggen 等(1984)甲烷菌培养基重复多次,试图分离和鉴定菌种均未成功<sup>[9]</sup>。

*P. lanterna* 的细胞中含有线粒体,但无脊。高尔基体也缺少。内共生菌仅在鞭毛虫细胞的中央紧紧地与微体相连。这一特点在其他腐生原生动物中并未发现<sup>[5]</sup>。

据报道 *Trimyema compressum* 在连续培养多代后失去了内共生菌,然而其微体依然存在<sup>[8]</sup>。用化学染色法对阿米巴鞭毛虫细胞器的氢酶活性定位是阳性反应,而对照组细胞无染色点生成。本文的结果与上述提到的情况相似。氢酶的活性定位的问题在 *P. lanterna* 细胞的微体中再次证实。并支持了 Van Bruggen 等(1984)提出的寄主与内共生菌互利的假说<sup>[9]</sup>。腐生的原生动物为甲烷菌生长提供  $H_2$  和  $CO_2$ ,其甲烷菌产生的甲烷允许原生动物在很低压力条件下进行氧化还原反应。这种相互氢的转化机理提出了一个问题,是否是甲烷内共生菌紧紧相连的微体也许就是氢体。氢体是由膜相包的细胞器,大约 0.5—1.0  $\mu m$ 。它首先在毛滴虫(*Trichomonas* sp.)内发现,氢体被认为是厌氧原生动物的能量转

化器。在厌氧原生动物中它能使丙酮酸转成氢,二氧化碳和醋酸<sup>[10,11]</sup>。

### 参 考 文 献

- [1] Ball G H. Organism living on and in protozoa. In T T Chen (ed.), Research in Protozoology. New York; Pergamon Press, 1969;565—718.
- [2] Goosen N K. Hydrogenosomes and Methanogenic Endosymbionts in Sapropelic Ciliates Ph. D. thesis, University of Nijmegen, the Netherlands. 1990.
- [3] Van Bruggen J J A, Stumm C K, Vogels G D. Symbionts of Methanogenic bacteria and sapropelic protozoa *Archives of Microbiology (C)* Springer-verlage, 1983;136:89—95.
- [4] Van Bruggen J J A. Methanogenic bacteria as endosymbionts of Sapropelic protozoa. Ph. D. thesis, University of Nijmegen, the Netherlands, 1986.
- [5] Broers C A M, et al. *Psalteriomonas danterna* gen. nov. Sp nov, a free—living amoebaflagellate isolated from freshwater anaerobic sediments. *Europ. J. Protistoi*, 1990;25:369—380.
- [6] Doddema H J, Vogels G D. Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. and Eurin. Microbiol*, 1978;36:752—754.
- [7] Goosen N K, et al. Cultivation of the sapropelic ciliate *Plagiopyla nasuta* Stein and isolation of the endosymbionts *Methanobacterium formicicum*. *Archives of Microbiology (C)* Springer-verlag, 1988;150:165—170.
- [8] Wagners P N. Monoxenic culture of the anaerobic ciliate *Trimyema compressum* Lackey. *Archives of Microbiology (C)* Springer-verlas, 1987;149:4—11.
- [9] Van Pruggen J J A, et al. *Methanobacterium formicicum*, an endosymbionts of the anaerobic ciliate *Metopus stia-tus* McNurrich. *Arch. Microbiol (C)* Springer verlag, 1984;139:1—7.
- [10] Lindmark D G, Muller M, Shio H. Hydrogenosomes in *Trichomonas vaginalis*. *J. Parasitology*. 1975;63:552—554.
- [11] Muller M. Energy metabolism of protozoa without mitochondria. *Annu. Rev. Microbiol*. 1988;42:465—488.

## STUDIES ON METHANOGENIC ENDOSYMBIONTS IN ANAEROBIC PROTOZOA, WITH REFERENCE TO THE CYTOCHEMICAL ASPECTS OF HYDROGENASE

Lin Yuhua

(Heilongjiang River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, 150076, Harbin)

### Abstract

The life cycle of amoebaflagellate *Psalteriomonas lanterna* includes two stages: flagellate and amoeba. When 2% oxygen was added to the headspace of the culture, the flagellate lost its symbiont methanogenic bacteria. When flagellates without endosymbionts were cultured with 1% oxygen, small amoeba appeared. When cultured with 1% oxygen, amoeba cells grew quickly, the concentration of cells was about  $1.2 \times 10^6$  cells/ml, and inhibition occurred at oxygen concentrations over 2.5%. The cells died when the oxygen level exceeded 7.5%. Amoebae grew poorly in anaerobic culture. Addition of *Methanobacterium formicicum* Strain MsL to the amoebae resulted in higher concentrations of cells.

The fluorescent endosymbionts in the sapropelic amoebaflagellate were proved to be

methanogenic bacteria (species not identified). This was indicated by epifluorescence and electron microscopic observations, and the fact that methane was produced in the culture medium when the protozoa were washed in water. Cytochemical staining method revealed the presence of hydrogenase activity in the microbodies of *P. lanterna* without endosymbionts, suggesting that the microbody-like organelles are hydrogenosomes. After fixation of the cells in low concentrations of glutaraldehyde and incubation in the presence of hydrogen and the tetrazolium compound, 2-(2'-benzothiazolyl)-5-styryl-(3-4-phthalhydrazidyl)-tetrazolium chloride, an electron-dense deposit was produced in the hydrogenosomes. In the control cells exposed to nitrogen, no deposit was found.

**Key words** Protozoa, *Psalterimona lanterna*, Methanogenic bacteria, Endosymbionts, Hydrogenase