

临界点干燥的微生物标本的扫描电镜观察

乔宝义*

(中国科学院微生物研究所, 北京)

扫描电子显微镜术为微生物表面(或断面)的精细结构的研究提供了光学和透射式电子显微镜术所不能得到的大量信息, 然而不适宜的制备方法, 特别是干燥方法的不同对其影响很大, 甚至不能很好地显示出标本本身特有的结构特征。尤其是含水份高的生物标本(有的含水湿竟达85%以上)。如果采用简单的空气干燥方法, 水份在蒸发过程中, 其液面上呈现的表面张力必定接触并通过多孔的组织, 使组织造成萎缩和破坏。为克服或减少表面张力对组织的损伤, 人们多采用以下几种方法: 溶剂替代法; 替换液固化升华法; 冰冻干燥法和临界点干燥法等。这些方法虽然都比空气干燥效果好, 但各有利弊。比较起来, 临界点干燥法具有操作简单, 干燥时间短, 效果好, 重复性高等优点。自从 Anderson (1951) 为了透射式电镜生物标本制备提出了二氧化碳临界点干燥法后, 1969年才由 Horridge 和 Tamm 引用到扫描电镜标本制备上来, 经过不断改进和完善, 近几年才普遍使用。

本文以丝状真菌、酵母、链霉菌为材料比较临界点干燥和空气干燥(或溶剂替代干燥)对形态特征的影响。

材料和方法

(一) 菌株

球毛壳 (*Chaetomium globosum* Kunze ex Fr. AS 3.3785); 无花果曲霉 (*Aspergillus tacuum* AS 3.324); 解脂假丝酵母 (*Candida lipolytica* AS 2.1216); 金霉素链霉菌 (*Sireptomycetes aureofaciens* AS 4.184); 细黄放线菌 (*Actinomyces microflavus* AS 4.891) (5406)。

(二) 仪器

临界点干燥装置, 除高压槽, 水浴和标本架

需加工外, 其他部件如高压表和高压针阀分别用上海产的浮子式氧气吸入器和天津产高压针阀替代。倾斜旋转喷涂装置, 为陀螺式, 倾斜方向转速为 200 转/分, 自转速度为 100 转/分, 倾斜角度 5—45° 可任意调节, 以马达驱动; 或用水平旋转台不同角度 (90° 和 30°) 喷涂金。液体 CO₂ 由北京酿酒总厂生产。用 Stereoscan S4-10 扫描电镜观察, 20 KV, 45° 角。

(三) 方法

5% 戊二醛 0.2M 磷酸缓冲溶液 (pH 6.8—7.2) 固定 2 小时以上, 蒸馏水洗二次, 系列乙醇脱水 (30、50、75、85、95、100, 百分浓度), 以醋酸异戊酯作为中间液, 用 CO₂ 作为转移液进行临界点干燥。

结 果

图版 I、II-1—4 分别为试验组和对照组。样品用醋酸异戊酯替换后在空气中放置干燥为对照组; 当用上述中间液替换后用临界点干燥 (CPD) 为试验组。通过两组样品形态特征对比可看出霉菌各部位的表面结构, 在空气中干燥很易引起萎缩变形, 甚至精细结构受到严重破坏。图版 I-1、2 为无花果曲霉孢子球, 图版 I-3、4 分别为图版 I-1、2 的局部放大。不难看出两组有明显的不同, CPD 组孢子梗圆柱形, 笔直地支撑着孢子球, 孢子排列整齐, 孢子呈圆球状表面粗糙有疣状突起, 并清楚地看到孢子连丝。对照组孢子梗变成扁平状, 机械能力减弱, 孢子球下垂, 泡囊破裂, 泡

本文于 1978 年 10 月 4 日收到。

* 电镜观察和复印均由北大电镜室张存珪、朱宜、张惠珍同志参加; 仪器承本所工厂和北京天文台工厂制作; 试验菌株由本所保藏组提供, 并承刘如臻、沈舜杰、李钟庆、从兆海等同志帮助。

子排列杂乱无章,孢子表面明显凹陷。图版 I-5-8 为球毛壳接合孢子表面结构, 试验组接合孢子侧生附属丝直挺,基部较粗,末端尖细,表面粗糙,这与光学显微镜观察的结果是一致的。而对照组附属丝变成扁平并弯弯曲曲地塌陷在孢子表面。图版 I-7、8 分别为上两组样品放大照片,可看到试验组接合孢子表面是由鳞片状突起物相互覆盖而成,附属丝从鳞片突起物之间伸出并逐渐伸长,在基部有比附属丝直径大的“托”,从它的横断面可观察到“托”中的空腔,在幼小的附属丝和“托”上均有圆球状突起,随着附属丝的成熟,突起物凹陷,这就是光学显微镜所观察到的附属丝粗糙的原因;而对照组孢子表面萎缩,鳞片状突起物和附属丝干瘪变形,使其精细结构造成严重损伤,表现不出样品的正常结构特征。图版 II-1、2 为球毛壳子囊孢子,图版 II-1 孢子呈柠檬状(9.2×0.7 微米左右),孢子之间有连丝,表面有绒毛和纹饰,而对照组孢子严重凹陷,从不同方向可观察到不同侧面分别呈半月形,“红血球状”(凹陷正面)和椭圆状(凹陷背面)。图版 II-3、4 为解脂假丝酵母(烷烃类培养)形态比较,图版 II-3 所示,酵母表面有明显指状突起,而图版 II-4 可看到有轻度收缩,与前人见到的类似。

图版 II-5-8 为链霉菌,菌株未经任何处理直接于空气中干燥。图版 II-5、6 为金霉素链霉菌,对照组孢子呈椭圆形,这与文献报道的形态是一致的;然而临界点干燥得到的孢子形态是圆柱形,我们认为这种形态是它们所特有的。从照片中孢子表面的变形来看,孢子呈椭圆形是由于风干过程中收缩引起的。这种收缩造成的变形在图版 II-7、8 的细黄放线菌中也能观察到。试验组

孢子多呈方柱形,对照组孢子壁收缩所以多呈长椭圆形。

通过比较,使我们认识到,不适宜的干燥技术对于各类微生物样品均能造成不同程度的收缩和破坏。临界点干燥方法基本上能克服这些弊病,为得到客观的扫描电镜二次电子象提供了有利的手段。对于微生物分类工作,孢子的形态常常作为真菌划分属或划分种的重要依据。对链霉菌的种的描述也是很重要的特征。目前国内外以透射电子显微镜术描述链霉菌菌丝和孢子形态特征很普遍,现在又发展到用扫描电镜资料描述链霉菌的形态,但是对于菌丝和孢子在干燥过程中收缩、变形考虑甚少,一般人们只是采用简单的空气干燥方法。如果采取适宜的干燥方法予以配合,我们相信对今后的分类工作会更有益处。

参 考 文 献

- [1] Lewis, E. R. and K. N. Michael: *Critical Point Drying Techniques*, Proc. SEM/1973, p. 768—774.
- [2] 中国科学院微生物研究所《常见与常用真菌》编写组:《常见与常用真菌》,科学出版社,1973。
- [3] Г. Ф. 高泽:《拮抗性放线菌的分类问题》,戴冠群等译,科学出版社,1959。
- [4] S. A. 瓦克斯曼:《放线菌(第二卷)》,阎逊初译,科学出版社,1974。
- [5] The society for Actinomycetes: *Atlas of Electron-micrograms of the Actinomycetes*, No. 1 Spores, Japan, 1965.
- [6] 阮继生等:《微生物学报》,10(1):72—82,1964。
- [7] Kurylowicz et al.: *Atlas of Ultrastructure of Streptomyces in course of Biosynthesis of Antibiotics*, Polish Medical Publishers, 1975.
- [8] Masako, O. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 53(4): 244—248, 1975.