

应用电子显微镜观察微生物的简易标本制备

黄金生*

(中国科学院南京土壤研究所)

土壤微生物的形态观察有助于土壤微生物的生态调查和应用研究工作。细菌是土壤微生物中数量最多的一个类群，放线菌次之。细菌和放线菌孢子在光学显微镜下都不能显示外形的微细结构。例如细菌的鞭毛一般直径为0.02微米至0.05微米，这低于光学显微镜所能分辨的极限0.2微米。因此除非使用复杂的特殊染色技术是不能直接用光学显微镜观察到的。而这些微细结构常常是形态上的重要特征。在菌种分离和培养中还会出现噬菌体。对这些噬菌体的观察和研究也是有意义的工作。而噬菌体则更是用光学显微镜不能观察到的。

电子显微镜具有高分辨本领和高放大倍率，应用在微生物工作中可以得到比光学显微镜高得多的放大图象。细菌及放线菌孢子外形的微细结构，甚至噬菌体的微细结构都能清楚地展现出来。电子显微镜拍照方便，观察结果可以摄影纪录。因此电子显微镜在土壤微生物工作中的应用是很重要的。

制备供电子显微镜观察的微生物标本一般需要三个步骤，即制备有支持膜的载网；把待观察样品放到载网上；增加标本的反差。对于微生物这类颗粒样品放入载网，通常是先制成悬液再滴附到载网上〔1〕。而直接从培养基上收集样品制成的悬液常常带有较多的培养基，以至污染图像的背景，掩盖样品的细节。因此必要时用离心或透析法进行提纯和浓缩〔2〕。土壤微生物工作者经常需要对多量样品进行一般形态观察和比较，要求标本制备尽量简单易于掌握。本文将介绍制备供电子显微镜观察所用的微生物标本各步骤的简易方法，关于样品放到载网上将介绍作者所采用的直接扣压法。

一、支持膜的制备 一般使用的支持膜是火棉胶一碳膜或福尔蒙瓦尔(聚乙烯醇缩甲醛)膜。这里介绍一个制备火棉胶一碳膜的方法。

预先用粗金属丝弯成直径12厘米左右的圆，垂直圆面弯一个把柄。在圆面上蒙上铜丝网则制成一个大铜网(图1)。配制1.5%浓度的火棉胶醋酸成酯溶液。

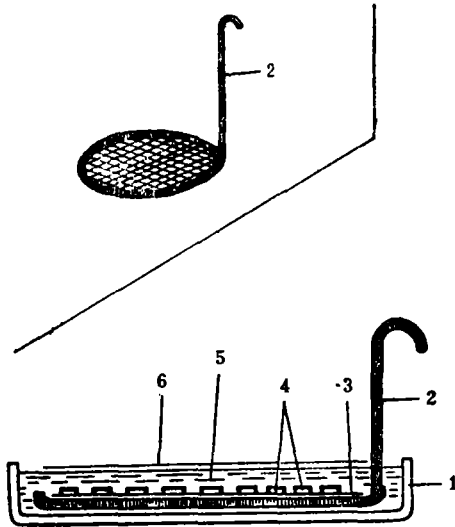


图1 支持膜的制备

- 1.大培养皿, 2.大铜网, 3.滤纸, 4.载网,
5.蒸馏水, 6.火棉胶膜。

制备支持膜时，在洗净的培养皿(直径15厘米左右)中，加入蒸馏水。把大铜网放在培养皿底，大铜网上平放干净滤纸，再把电子显微镜专用小载网(一般是铜质直径3毫米)均匀放在滤纸上(图1)。放小载网的量依需要而定，需要量多时一次可制几百个。待水面平静后，在水面上中心部位轻轻滴一滴1.5%火棉胶醋酸成酯溶液。溶液在水面上迅速铺开，溶剂很快挥发便形成一圆形的均匀火棉胶薄膜。所形成的膜不要碰培养皿壁及大铜网柄。通常第一次形成的薄膜会被漂浮在水面上的尘埃污染，可用镊子除去。第二次成膜后，将大铜网轻轻上提，火棉胶膜便覆盖到载网上。而后把大铜网连同上面的东西一起在红外灯下烘干。当滤纸干燥后，再把滤纸连同上面覆盖了膜的载网整个地放入真空喷镀仪中喷涂一薄层碳。这样在载网上便形成火棉胶一碳膜。制成的有膜载网可放在培养皿中防尘埃，再把培养皿放在干燥器中可以保存备用。

* 作者现在南京大学工作。

这个方法优点是一次可制备大量有膜载网,火棉胶膜均匀平展;制作方便可靠。实践证明所成支持膜很好地适用于对分辨本领不要求极高的各类样品。

二、放线菌孢子的标本制备 直接扣压法是用镊子夹紧有膜的载网,把有膜面向着放线菌气生菌丝体表面轻轻扣压一下,即有大量孢子附着到载网上。为防止附着不牢的孢子污染电子显微镜,必须用吹气球轻轻吹过有膜面。此后不需要其它任何处理,就可以直接放入电子显微镜观察。放线菌孢子表面的微细结构有足够的反差,因此不需要做增加反差的处理。

直接扣压法操作简便,没有使用液体,因而图象背景干净,可以得到清晰的照片(图2)。扣压有时还会带下一些菌丝,这可以观察到孢子在菌丝上的着生情况(图3)。

三、细菌的标本制备 与前相同。用镊子夹紧载网,把有膜面在固体培养基上增生的细菌菌落表面轻轻扣压。这样就有相当浓厚的一层细菌粘附在支持膜上。这时由于细菌量过多,又会带有培养基,不能直接使用。可以在干净的瓷盘上(或凹玻片、蜡盘等)滴上无菌水,把粘着大量细菌的载网扣到无菌水表面,放置一段时间。这可以使细菌量得到稀释,并漂洗去带下的少量培养基。而后取下载网用滤纸在载网边缘吸去液体,凉干后进行增加反差的处理。不同菌种漂洗时间不同。有些细菌分泌粘物很多,这可以用滴水轻轻冲洗,直至载网上无肉眼可见的浓密物为止,这样也可以得到分散的可供观察的细菌标本。细菌的一般形态观察时,标本经干燥固定就可以了。

由于细菌体,尤其是鞭毛电子散射能力弱,图象反

差很差难于直接观察。增加反差的方法可采用金属投影或负染色。金属投影可以得到富立体感的图象(图4、5)。一般观察使用金属铬(Cr)就可以,投影角度采用 30° 左右为宜。负染色法不需要真空镀膜装备,操作也简单,应用于病毒和噬菌体可以显示出微细结构,但用于细菌常常引起背景不干净、染色程度难掌握(图6)。

四、噬菌体的标本制备 使用直接扣压法,把有膜载网扣压在因噬菌体作用形成的无菌斑点表面,放置一段时间再取下,同样可以得到噬菌体标本。在载网粘附样品后进行负染色。最常用的负染色液是2%或4%的磷钨酸重蒸馏水溶液,用NaOH调到中性(pH 7—7.4)。负染色的方法很多,都是大同小异。简单的方法是在载网带有样品的面上滴一滴负染色液,而后用滤纸吸去,仅在膜面上留一薄层液体,经干燥后即可放入电子显微镜观察。载网吸附样品后不需漂洗,实际上在负染过程中已起到漂洗作用。

为获得好的噬菌体电子显微镜标本,常常要进行增殖、分离、纯化等复杂的操作。而直接扣压制成的标本也可以得到一定浓度分布的噬菌体,达到观察微细结构的目的(图7)。(图2—7见封三)

参 考 文 献

[1] G·A·米克著(中国科学院生物物理研究所电镜组部分同志译),生物学工作者实用电子显微术,444—457页,科学出版社,1976。

[2] B.И.比留佐娃等著(王大成译),生物材料的电子显微镜研究法,23—30页,科学出版社,1965。

土壤中挥发性氨的定量测定

蒋能慧 刘光松

(中国科学院南京土壤研究所)

碳酸氢铵、氨水和尿素施入土壤后往往有相当部分分解(尿素在尿酶作用下)成气态氨。氨的挥发损失直接影响到氮肥肥效。为了弄清氨气在土壤中扩散损失的变化规律,需要有适于田间测定氨气损失的方法。我们在研究氨气挥发损失的工作中,通过实践对Ventura(1)和Nommik(2)提出的田间测定氨气方法作了改进,使之适用于水田和旱地挥发性氨的定量测定。用经过改进的方法测氨灵敏度,操作较简便,特别是在通气条件下搜集从土壤中挥发损失的氨。

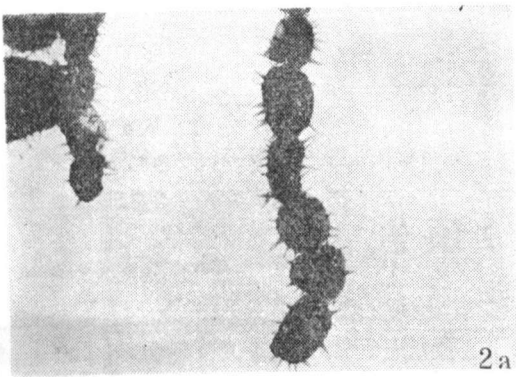
本文简要介绍方法的操作和应用实例。

一、测定方法

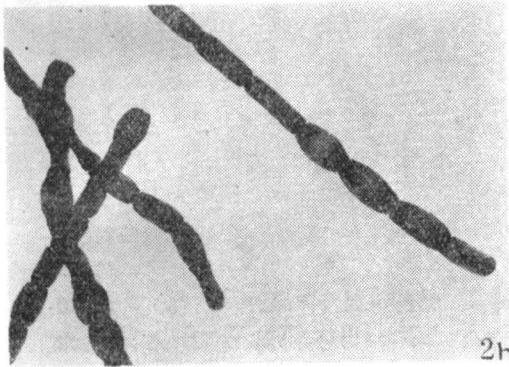
本方法以磷酸甘油溶液作氨的吸收剂,用开口型(气体可以通过的)泡沫塑料作吸收剂的载体,在通气条件下吸收自土体挥发的氨,然后蒸馏测定之。

(一)材料和装置

1. 泡沫塑料吸收载体 选用常见的市售白色聚

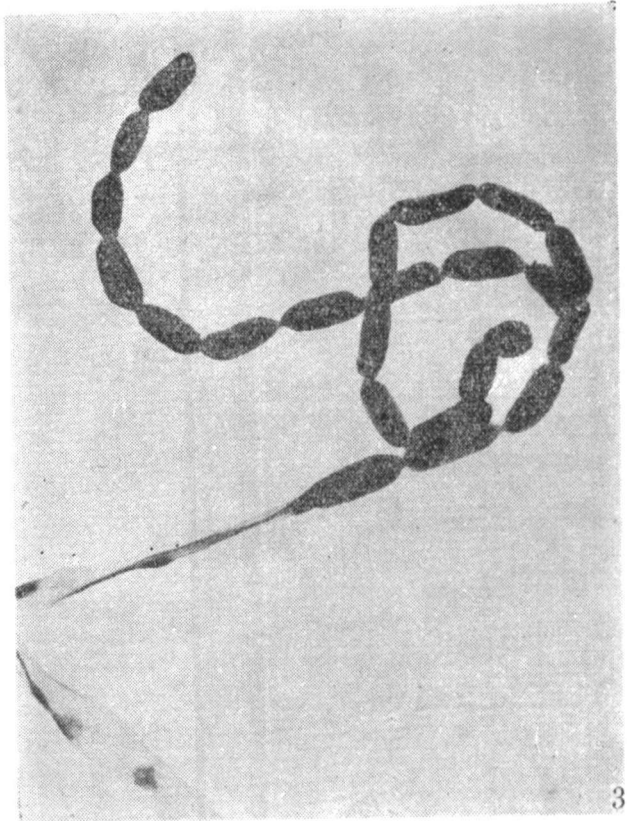


2a



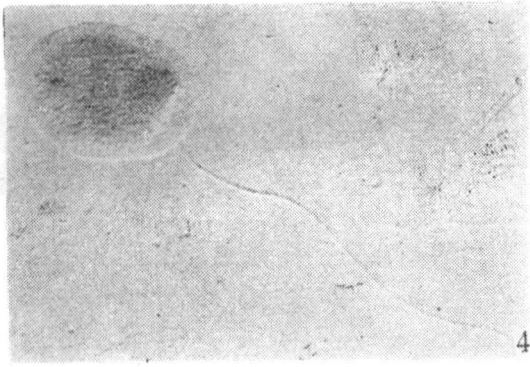
2b

图2. 从滨海盐土中分离出的两种放线菌,其孢子形态在电子显微镜下明显不同。直接扣压制样。a) $\times 10000$, b) $\times 5000$



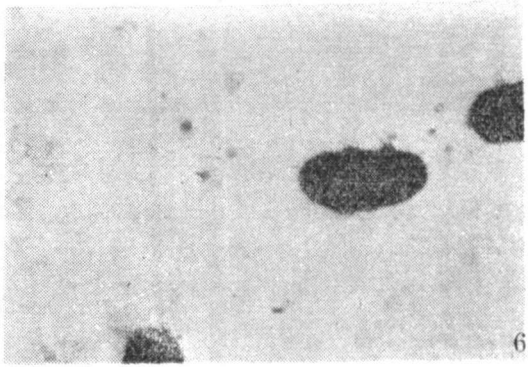
3

图3. 孢子在菌丝上着生情况。样品为抗菌菌肥“5406”。直接扣压制样。 $\times 8000$



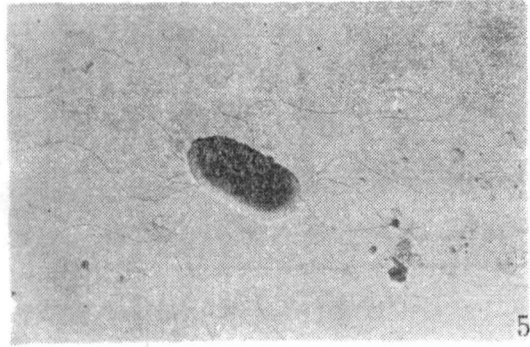
4

图4. 从土壤中分离出的磷细菌 (直接扣压制样, C_2 投影) $\times 20000$



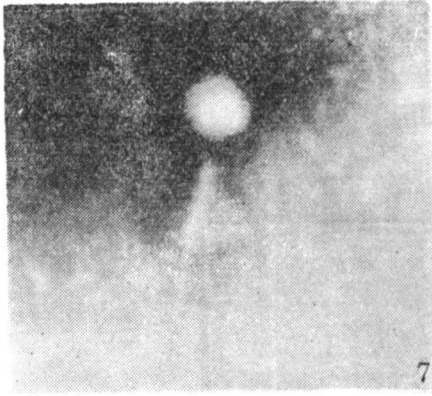
6

图6. 从太湖地区黄泥土中分离的细菌 直接扣压制样, 2%磷酸钨负染色。图像不清洁, 细菌体模糊。 $\times 10000$



5

图5. 从土壤中分离的枯草杆菌 (制样方法同图4) $\times 10000$



7

图7. 巨大芽孢杆菌在培养中出现的噬菌体 (从太湖地区黄泥土中分离) 直接扣压制样, 2%磷酸钨负染色。 $\times 120000$