



微生物显微技术的发展及应用*

丁 武

(福建省农科院土肥所, 福州 350013)

微生物显微技术主要包括标本的制作技术、显微镜技术、显微摄影技术以及摄影后的图像处理技术等四个方面。本文回顾了微生物显微技术的历史; 简述了微生物显微技术的发展现状, 从微结构测绘学角度对生物显微摄影测量技术的发展作了介绍; 最后就立体显微摄影测量技术结合计算机技术应用到微生物研究领域问题提出了几点设想。

(一) 微生物显微技术的历史回顾

1676年, 列文虎克^[1]利用自制的单式显微镜首次发现了细菌, 这标志着人类开始了微生物学领域的研究; 也标志着微生物显微技术的诞生。伽利略发明了望远镜后, 人们受到启发, 将它倒过来制成了第一台复式显微镜。1821年阿米西制造出第一台消色差显微镜, 不仅消除了色差, 而且放大600倍仍有很好的分辨率^[2]。1850年, 在显微摄影技术极低困难重重的情况下, 科赫拍摄了至今还能清晰辨认的细菌照片, 这一成果被视为显微摄影史上的奇迹之一; 他于1877年第一个制作了可以永久保存的、用美蓝染色的干细菌膜标本。1878年, 阿贝首先利用光学显微镜的油镜摸索出了观察物体的标准方法。1919年, 巴纳德研制了紫外光显微镜, 开始了探索细菌超微结构和病毒粒子的初始阶段。本世纪40年代末研制出了相差显微镜, 使人们能在放大1000倍情况下研究活细胞, 将它与慢速电影摄影术结合起来, 可以了解到一个培养体系中细胞间的差异^[2], 同时还能帮助搞清某些抗生作用机制^[2]。1963年凯恩斯利用放射自显影技术拍摄了第一批细菌染色体照片, 证明了细菌染色体是环状的, 观察到的细菌

染色体复制方式证实了遗传学家的预言^[2]。

1934年, 马顿制造了第一架电子显微镜; 1941年, 马德等发表了第一批细菌细胞的电镜照片。电镜的发明以及引入了计算机技术标志着显微技术进入了新的历史发展阶段, 它不仅使微生物研究进入了分子水平, 以至电子水平, 也促使微生物显微技术朝着快速、准确和自动化方向发展。

(二) 微生物显微技术的发展现状一瞥

新技术、新理论的不断引进逐步充实和完善了微生物显微技术, 其发展主要表现在以下四个方面:

1. 标本制作技术(即切片技术)及其设备: 近代物理学、化学和生物学等学科的发展为标本制作技术奠定了坚实的理论和技術基础, 使切片技术逐渐成熟形成了体系。生物种类(动物、植物和微生物)的切片技术主要包括整体标本制作、超薄切片制作和冷冻切片技术等^[3]。

切片技术改进的一个突出例子是X射线显微分析超薄冰冻切片上的可扩散元素。在元素浓度低(如100nm厚的切片中), X射线显微分析只能在直径为100nm范围内进行; 在元素浓度高(如在厚度为1—2 μm 的无机包含物切片中), X射线显微分析可在直径小至25nm范围内进行; 在元素浓度高, 具有良好的冰冻干燥设备, 并采用严格的冰冻切片技术, X射线显微分析可在直径小于25nm范围内进行, 从而在不同试验条件和不同超微结构水平上研究细胞化学

* 本文得到了武汉病毒所王子芳研究员, 本所学术委员会及武汉测绘科技大学丁寤桐教授审阅, 在此一并致谢。

物性^[4]。

2. 显微镜的研制: 把物理学、化学、数学和计算机等学科应用到显微技术的研究领域中, 使之出现了各式专用显微镜。如体视显微镜、荧光显微镜、倒置显微镜和万能显微镜以及标志着分子水平的电子显微镜。

电镜技术是显微镜研制中发展最快的技术之一。自第一台电镜问世至今已有50多年, 电镜技术取得了惊人的成就^[1,5,6]。扫描透射电子显微镜是透射电子显微镜的一种发展, 它兼有扫描电镜和透射电镜的优点, 也克服了二者的某些缺点(如降低了色差的干扰, 增加了仪器探测器的灵敏度, 提高了分辨率)。扫描透射电镜的主要特点是: 在透过厚生物样品时, 分辨率明显提高, 其分辨率(0.2nm)比透射电镜分辨率(0.5—1nm)和扫描电镜分辨率(5nm)分别高出几倍至几十倍; 在像的亮度、不受旋转影响, 亮场像易于解释, 以及仪器和样品的不稳定性对像记录影响较小等方面具有优越性; 扫描透射电镜有清洁的超高真空, 使污染大为减少, 并能缩小辐射损伤, 这对高分辨率下研究生物分子极为有利; 扫描透射电镜的暗场成像方式比透射电镜的暗场成像方式有效得多, 因此在不染色的生物分子成像时具有高反差; 容易采用像Z识别技术进行信号处理; 扫描透射电镜的一个突出特点是具有显微分析能力, 使得电子衍射、X射线能量分散显微分析和电子能量损失光谱学研究都能顺利在同一台仪器上进行。

3. 显微摄影及图片信息的解释和处理: 目前的显微照片通常只记录物体的两个变量(长和宽), 而缺少第三个量度(深度), 这样便损失了摄影对象的三分之一信息^[7]。现代科学的发展要求对得到的图像和信息进行快速、准确的处理和定量分析, 因此对显微摄影的方法必须作进一步改进。关于显微摄影及图片信息的解释和处理方面的发展见本文(三)。

4. 计算机和显微技术的结合: 计算机和显微技术的结合已显示了强大的生命力。人们正试用计算机处理常规透射电镜得到的图像, 对投影像进行三维重构, 去除电子光学假像和改

进图像的外貌; 并试图通过计算机实现图像识别和颗粒计数的自动化, 图像信息处理的自动化以及对X-射线微区的分析计算, 以迅速求得结果。人们还希望应利计算机提高电镜操作过程的自动化程度以得到可靠的结果^[6,8,9]。

(三) 生物摄影测量技术的发展与新境界的开拓

1974年在华盛顿召开了第一次“国际生物摄影测量专题讨论会”。国际摄影测量学会成立了“生物立体摄影测量工作组”, 专门从事摄影技术研究生物结构的工作。此后有关的专著相断问世。正如前国际摄影测量学会主席卡拉拉说过的: 显微镜的发明和X射线的应用, 极大地促进了微生物学和放射学的发展, 有助于更好地研究微生物形态及边缘学科的产生。立体摄影测量分析生物结构技术的不断发展代表了这一趋势^[7]。计算机和立体测量传感技术的广泛应用推动了生物立体摄影测量技术向前发展。

从数学观点看, 任何物体的表面都是由无数个点组成的, 每个点在一定三维坐标系中都有自己唯一的位置。只要在显微镜下, 从两个或两个以上的不同角度对摄影对象进行摄影(即立体摄影), 获取立体像片对, 在人为确定的精密控制网中用精密立体测量仪对立体像片对进行测量, 就能得到摄影对象的全部三维信息, 计算出样品的体积和表面积。按规定统一的操作步骤^[10,11], 进行连续三维显微摄影, 立体测量, 即可得出因物体移动或生长而引起的空间-时间变化的四维信息, 然后再结合计算机和现代图像处理技术, 则能实现准确、快速分析图像和处理有关信息^[8,12-14]。这就是微结构测绘学的基本思想。

李广文等^[15]采用立体显微镜从三维角度对蛙卵进行研究(图版I-1)。以蛙卵的11个标志点为试验依据, 描绘了蛙卵的等值线图(图版I-2), 定量描述了蛙卵的变化规律。童文陆等^[16]把扫描电镜技术、电子计算机技术和摄影测量学原理结合起来, 分析研究了龙眼(*Nephelium longana*)花粉形态, 由平面显微分析水平推进到立体显微分析水平(图版I-3,4)。丁

武等^[11]用扫描电子显微摄影测量的原理和方法对啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 进行了探讨,绘出了该酵母菌的等值线图,求得了它的表面积和体积(图版 1-5,6)。

由此看出,扫描电子显微摄影测量的基本方法是:根据摄影测量视差原理,改变样品同人射电子束的角度(即旋转样品台),对样品做两次扫描摄影(扫描与摄影同步),以获取立体像对,然后采用测绘仪器在立体像对的外表面上测定足够数量点的三维坐标,借助计算机对结果进行计算和分析,达到对研究对象进行局部和整体的研究目的^[3,7]。

(四) 几点设想

目前立体显微摄影测量技术和计算机技术共同应用到微生物学研究领域还处于探索阶段,在此仅能提出一些设想。

1. 微生物分类中的应用:在微生物分类中,需要在显微镜下对微生物进行形态学观察,并把形态学差异作为分类的基本依据之一。以链霉菌属分类为例,需要在光镜下观察孢子丝的形态和孢子的形状,在电镜下观察孢子外壁的结构,在综合分析链霉菌的形态特征、培养特征和生理生特征的基础上对链霉菌进行分类。目前对链霉菌的形态特征观察只是二维观察,形态特征的描述主要是定性描述,因此有必要采用立体显微摄影测量技术并结合计算机技术丰富链霉菌的形态学观察内容,即除进行常规平面显微观察外,还要进行立体显微观察,在现有的形态学描述中补充等值线图、表面积和体积等项目,由平面显微观察深入到立体显微观察,对所观察的链霉菌进行较全面的定性和定量分析,使得分类标准更加完善,得出的分类结果更客观和准确。上述的设想上升到微生物分类也是有意义的。^[7,16]

2. 研究微生物生长曲线:在生物学研究中,已证实数字分类法可以用空间点阵表示生物种,加进时间量则可得出生物形态变化的生长曲线^[17],在研究微生物生长过程中,可采用连续显微摄影的方法,测量试验对象上足够点的三维坐标和包括时间量在内的四维坐标,就能

得出微生物形态变化的生长曲线。借助于表述微生物形态变化的生长曲线的数学模型,把有关数据输入计算机,可描绘出微生物发展过程中可能存在的中间过渡形式,采用“外推法”^[11]能合乎逻辑地把未来微生物进化过程描绘出来。

3. 解释微生物结构和功能的相互关系:通过立体显微技术及相应的计算来解释微生物结构和功能的相互关系,并认识微生物在生存竞争中所达到的最适系统结构及其功能。

4. 显微图象分析的自动化和量化:在图象坐标测量和数据处理过程中,若借助全数字自动化测图系统和计算机技术,就可以快速、准确绘制出微生物表面的等值线图,迅速求得表面积和体积,使显微图象分析量化和自动化。

参 考 文 献

1. R Y Stanier et al.: *The Microbial World* 4th ed., Prentice-Hall, INC., Englewood Cliffs, New Jersey, p. 50—58, 1976.
2. P. 科勒德著,王龙华等译:微生物学的发展,P.9—25,科学出版社,北京,1985。
3. G A Meek: *practical Electron Microscope For Biologists* 2th ed., Wiley, London, p. 43—59, p. 376—384, p. 409—410, p. 413—472, 1976.
4. Baker J R J et al.: *J. Microscope*, **108**: 307—315, 1976.
5. A V Grimstone: *The Electron Microscope in Biology* 2th ed., Edward Arnold (Publishers) Ltd, 25 Hill Street, London W1×8LL, p. 1, p. 56—63, 1977.
6. G. A. 米克等,管汀鹭译:显微术中的分析与定量方法 P.101—108,P.174—199,科学出版社,北京,1983。
7. H M Karara: *The Handbook of Non-topographic Photogrammetry*, p. 59—64, 1978.
8. J P Agnard et al.: *Photogr. Engin. & Remote Sens.*, **54**(8): 1165—1167, 1988.
9. Ghosh S K: *ISPRS Archives*, Vol. 5, Hamburg Congress, p. 244—251, 1980.
10. 童文胜,邵小华: *中国科学(B卷)*,**9**: 944—953,1988。
11. 丁武等: *武测科技*,**2**: 11—16,1989。
12. J N Hatzopoulos: *Biostereometrics'82*, Robin E, Herron, Editor, Proc. SPIE361, p. 41—47, 1983.
13. Yasuo Yamashita et al.: *Biostereometrics'82*, Robin E, Herron, Editor, Proc. SPIE361, p. 67—73, 1983.
14. B A Boyde et al.: *Photogr. Record*, **8**(46): 408—457, 1975.
15. 李广文等: *测绘通报*,**3**: 23—26,1985。
16. H Ris: *J. Cell Biology*, **109**(4): 134a, 1989.
17. 罗兰德·格拉杰尔著,印佳翔等译:用物理学探索生命, P.8—30,32—52,吉林人民出版社,长春,1983。