

基于戊二醛-高锰酸钾双固定结合冷冻干燥的微生物SEM制样方法研究

朱晓南^{1,2,3}, 蒋芸^{1,3}, 王玲玲^{1,2,3}, 宋晓彤^{1,2,3}, 王晓丽^{1,2,3*}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 常规实验室在制备微生物扫描电镜(SEM)样品的过程中, 经常面临缺乏固定试剂与临界点干燥设备的困难。为了解决上述常规实验室困境, 选择高锰酸钾(KMnO_4)为细胞固定剂, 并针对SEM制备中的固定、干燥关键环节进行制备方法改进与分析, 旨在建立一种安全、经济、设备依赖性低的通用型微生物SEM制样方案。以大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、酿酒酵母菌为研究对象, 对菌体分别进行戊二醛单固定(GA固定)、戊二醛-四氧化锇(OsO_4)双固定(GA-OT固定)、戊二醛- KMnO_4 双固定(GA-PP固定), 并与冷冻干燥、自然干燥、低温烘干、中低温烘干、临界点干燥进行分类组合, 菌体干燥后进行SEM成像, 比较上述处理对菌体形态和细胞完整率的影响。结果发现, GA-OT固定与GA-PP固定对菌体形态的固定效果显著优于GA固定; 冷冻干燥与临界点干燥可较好地保存还原菌体形态。GA-PP固定-冷冻干燥方案可有效保存革兰氏阴性、革兰氏阳性与单细胞真核真菌3类微生物的形态结构, 可满足SEM成像要求, 具有经济便捷、通用性强、安全性高等优势, 具备较高的推广价值, 为常规实验室提供了一种可行的微生物SEM制样替代方案。

关键词: 微生物; SEM制样; 戊二醛- KMnO_4 双固定; 干燥

中图分类号: O615.4; S375 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2026)11-0001-09

Preparation of Microorganism Specimens for Scanning Electron Microscopy Using Glutaraldehyde-Potassium Permanganate Double Fixation Combined with Freeze-drying

ZHU Xiao-nan^{1,2,3}, JIANG Yun^{1,3}, WANG Ling-ling^{1,2,3}, SONG Xiao-tong^{1,2,3}, WANG Xiao-li^{1,2,3*}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In laboratories, the routine preparation of microbial samples for scanning electron microscopy (SEM) is often hampered by a lack of fixation reagents and critical point drying equipment. To address these challenges, potassium permanganate (KMnO_4) was selected for the fixation of microbial cells. This study focused on improving and analyzing SEM preparation methods, particularly the critical steps of fixation and drying, to establish a safe, economical, and equipment-independent universal protocol for preparing microbial samples for SEM. Cells of *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Saccharomyces cerevisiae* were subjected to glutaraldehyde single fixation (GA fixation), glutaraldehyde-osmium tetroxide (OsO_4) double fixation (GA-OT fixation), and glutaraldehyde- KMnO_4 double fixation (GA-PP fixation). These fixation techniques were combined with various drying methods, including freeze-drying, air drying, low-temperature drying, gentle heat drying, and critical point drying. After drying, SEM imaging was performed to compare the effects of these treatments on the bacterial morphology and cell integrity. GA-OT and GA-PP fixation significantly outperformed GA fixation in preserving the bacterial morphology, and freeze-drying and critical point drying were also effective in preserving the original bacterial morphology. The GA-PP fixation-freeze-drying protocol effectively preserved the morphological structures of three types of organisms (Gram-negative and

收稿日期: 2026-04-23; 修回日期: 2026-06-26

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32371430)

* 通讯作者: 王晓丽, 博士, 副教授, 研究方向: 功能性纳米材料, E-mail: xiaoliwang@jiangnan.edu.cn

Gram-positive bacteria, and unicellular eukaryotic fungi) and meets the requirements for SEM imaging. It offers advantages such as cost-effectiveness, convenience, versatility, and safety, making it highly valuable for widespread adoption. This method is a viable alternative to the routine laboratory preparation of microbial samples for SEM.

Key words: microorganisms; SEM sample preparation; glutaraldehyde-KMnO₄ double fixation; drying method

扫描电子显微镜(SEM)广泛应用于微生物学研究的各个领域^[1],如工业微生物发酵过程中微生物形态结构的动态监测^[2-4]、食品科学中的微生物检测与鉴定^[5-6]、环境微生物污水处理体系的菌群分析鉴定^[7-8]、微生物遗传工程技术^[4,9]等,SEM微生物成像可为这些科学研究提供直观的、有科学价值的形态学依据^[1]。优质的微生物SEM试样应为自然状态下化学和物理性能稳定的固体微生物样品,在真空及电子束轰击下不挥发、不变形、无放射性和腐蚀性,适合SEM在高、低真空条件下观察分析^[10];SEM成像中的微生物菌体应还原其真实生长状态,菌体表面结构清晰、无人为制备损伤,图像分辨率应达到纳米级^[11]。

制备SEM生物样品一般遵循戊二醛-四氧化锇(OsO₄)双固定(GA-OT固定)、漂洗、脱水、干燥等制样环节^[12],由于微生物单细胞体积较小(约为0.5~5 μm),操作难度高,因此需进行精细化操作从而保证菌体形态完整性。然而多数SEM制样的研究局限于单一菌种或单一制样环节,例如2025年Chakraborty等^[13]对大肠杆菌生物膜依次进行戊二醛固定、乙醇梯度脱水、风干等处理步骤,最后成功使用SEM拍摄生物膜形态;曾智等^[14]证实戊二醛单固定(GA固定)会导致须癣毛癣菌细胞壁表面结构大量收缩,自然干燥法则引起菌体表面严重褶皱、断裂等形态受损;Mayer等^[15]使用戊二醛-高锰酸钾(KMnO₄)双固定(GA-PP固定)酵母细胞,并成功使用透射电镜拍摄酵母细胞膜、核膜、内质网、线粒体等膜系统超微结构。尽管诸多研究对SEM制备的固定与干燥策略进行了探索,但现有方法仍普遍依赖于临界点干燥设备,或制备所得生物细胞形态SEM成像欠佳,如Ratnayake等^[16]采取赖氨酸-戊二醛预固定处理结合临界点干燥的方法较好地保存了植物花卉鲜切茎组织生物细菌膜的原始形态;Adiningrat等^[17]使用戊二醛单固定结合烘干干燥方法成像粪肠球菌形态,但菌体细胞结构保存效果欠佳;Leong等^[18]使用2.5%戊二醛固定结合干燥器过夜干燥方法对金黄色葡萄球菌、奇异变形杆菌、铜绿假单胞杆菌进行处理及SEM成像,但成像结果显示菌体细胞受损。传统微生物SEM制样方法多为GA-OT固定结合临界点干燥法,尽管该方法可较好地保存与还原生物细胞超微结构,且SEM成像可清晰呈现细胞形态及相关超微结构细节,但该方法需使用剧毒固定剂(OsO₄)和电镜专用干燥设备(临界点干燥仪),受限固定剂获取难度与专用干燥设备短缺,普通常规实验室往往难以完成整套实验操作。目前,面向普通常规实验室,兼具经济性、便捷性与通用性的标准化制样方案尚未有相关报道,同时现有研究也缺乏对不同微生物SEM制样方法的系统性总结与分析。

基于此,本研究依据微生物细胞壁结构差异^[19],选取革兰氏阴性大肠杆菌(*Escherichia coli*)、革兰氏阳性枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和单细胞真核真菌酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)3类典型微生物为研究对象,使用安全性高、易获取的KMnO₄作为替代固定剂,系统性比较分析固定和干燥制样环节差异对上述菌体SEM成像效果的影响,旨在建立一种经济便捷、安全性高、设备依赖性低的通用型微生物SEM制样方案,以解决常规实验室试剂与设备缺乏的困难。本研究是对现有生物样品SEM制备方法的重要拓展和有益补充。

1 实验部分

1.1 材料

大肠杆菌 MG1655 菌株购自江南大学工业微生物菌种保藏中心(菌株保藏编号 CICIM B0016);枯草芽孢杆菌 168 菌株为本实验室长期保藏(菌株保藏编号 ATCC 23857);酿酒酵母 CEN. PK2 菌株为本实验室长期保藏(菌株保藏编号 CEN. PK2-1C)。

1.2 仪器

SU8220 冷场发射扫描电子显微镜(日本 Hitachi 公司);ACE600 全自动离子溅射仪、CPD300 临界点

干燥仪(德国 Leica 公司); FreeZone 6 plus 真空冷冻干燥机(美国 Labconco 公司); ZXR D-A5055 鼓风干燥箱(上海智城分析仪器制造有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 微生物菌体的获取 将活化好的大肠杆菌、枯草芽孢杆菌单菌落分别接种至 LB 液体培养基(Luria-Bertani 肉汤培养基)中, 于 37 °C、200 r/min 培养过夜。将活化好的酿酒酵母挑取单菌落接种至 YPD 液体培养基(Yeast Extract Peptone Dextrose, 酵母膏蛋白胨葡萄糖培养基)中, 30 °C、200 r/min 培养 24 h。分别离心去上清后获得 3 种菌体沉淀以备后续使用。

1.3.2 不同固定方式的微生物 SEM 样品制备 对 3 种菌体沉淀样品进行如下处理:

GA 固定: 在菌体沉淀中分别加入适量 5% 戊二醛溶液, 重悬后于 4 °C 下固定 12 h(过夜), 使用 0.1 mol/L PBS 溶液(pH 7.2)重悬漂洗 3 次, 再对菌体进行乙醇梯度脱水, 最后放入 CO₂ 临界点干燥仪完成干燥。

GA-OT 固定(参照文献[10]修改): 在菌体沉淀中分别加入适量 5% 戊二醛溶液重悬后于 4 °C 下固定 12 h(过夜), 使用 0.1 mol/L PBS 溶液(pH 7.2)重悬漂洗 3 次, 加入 1% OsO₄ 溶液进行二次固定 3~5 h, 使用 0.1 mol/L PBS 溶液(pH 7.2)重悬漂洗 3 次, 再对菌体进行乙醇梯度脱水, 最后放入 CO₂ 临界点干燥仪完成干燥。

GA-PP 固定(参照文献[10, 20]修改): 在菌体沉淀中分别加入适量 5% 戊二醛溶液重悬后于 4 °C 下固定 12 h(过夜), 使用 0.1 mol/L PBS 溶液(pH 7.2)重悬漂洗 3 次, 再使用 0.9% NaCl 溶液重悬漂洗 3 次, 加入 1.2% KMnO₄ 溶液进行二次固定过夜, 使用 0.9% NaCl 溶液重悬漂洗 3 次, 再对菌体进行乙醇梯度脱水, 最后使用 CO₂ 临界点干燥仪对菌体进行干燥。

1.3.3 不同固定和干燥方法的微生物 SEM 样品制备 参照“1.3.2”中的固定方法, 待菌体完成乙醇梯度脱水后, 选择对应的干燥方法对 3 种菌体沉淀样品进行如下处理:

(1) 冷冻干燥法: 菌体经 4 000 r/min 离心 5 min, 去除乙醇后, 提前于 -20 °C 冷冻 4 h, 然后放入真空冷冻干燥机干燥处理 12 h(过夜)。(2) 自然干燥法: 菌体置于室温(25 °C)开启的通风橱内 12 h(过夜), 挥发掉剩余乙醇。(3) 低温烘干法: 菌体置于 37 °C 烘箱内干燥 5 h。(4) 中低温烘干法: 菌体置于 60 °C 烘箱内干燥 5 h。(5) 临界点干燥法: 菌体放入 CO₂ 临界点干燥仪中完成干燥。

1.3.4 SEM 成像与拍照 将上述获得的微生物菌体粉末轻撒至粘贴有导电胶的样品台上, 经全自动离子溅射仪进行铂金喷镀(时间为 360 s)。随后, 采用冷场发射扫描电镜在加速电压为 3.0 kV、工作距离为 8 mm 的条件下进行图像采集。

2 结果与讨论

2.1 不同细胞固定方法对 3 种微生物 SEM 形态的影响

将大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、酿酒酵母 3 种菌体分别进行 GA 固定、GA-OT 固定、GA-PP 固定处理, 菌体形态呈现差异。GA 固定处理的 3 种菌体均存在少量形态欠饱满的细胞(图 1A~C), 大肠杆菌细胞表面普遍出现明显褶皱(图 1A), 枯草芽孢杆菌表面有少量被破坏痕迹(图 1B), 酿酒酵母少量细胞表面出现明显沟壑(图 1C), 3 种菌体形态结构基本完整。而 GA-OT 固定和 GA-PP 固定后的 3 种菌体细胞形态则普遍饱满, 形态结构完整(图 1D~I)。可以看出, GA-PP 固定处理对 3 种菌体的菌体形态保存效果优于 GA 固定处理, 接近 GA-OT 固定处理效果。

固定环节中, 戊二醛只交联固定蛋白质^[21], 不交联脂质, 无法固定相关膜结构, 因此 GA 固定导致菌体细胞膜结构被破坏造成菌体表面褶皱、形态欠饱满; GA-OT 固定则通过 OsO₄ 二次固定交联了脂类、蛋白等^[22], 较好地固定了菌体的细胞壁、细胞膜、细胞质等结构, 因此完整保存和还原了菌体形态和表面结构。KMnO₄ 作为强氧化剂^[23], 同样能与脂类、蛋白交联产生细胞固定作用^[15], 能够有效保存还原菌体形态和表面结构, 固定效果等效于 OsO₄, 并可有效降低菌体团聚性, 可作为 OsO₄ 的高效替代固定剂。

值得注意的是, 在 GA-PP 固定组中(图 1G~I), 菌体表面可见少量团簇纳米颗粒。经分析认为, 这些小颗粒主要来源于 PBS 漂洗(“1.3.2”)后残留的磷酸根(PO₄³⁻)与 KMnO₄ 反应生成的不溶性磷酸锰或

其它锰盐沉淀。但这些纳米颗粒对菌体细胞整体形态判断影响较小, 虽可能干扰菌体表面精细结构观察, 但对本研究菌体形态观测未构成实质性障碍。后续可通过增加 0.9% NaCl 漂洗次数及延长漂洗时间(如 10 min)等方式来减少沉淀颗粒产生。

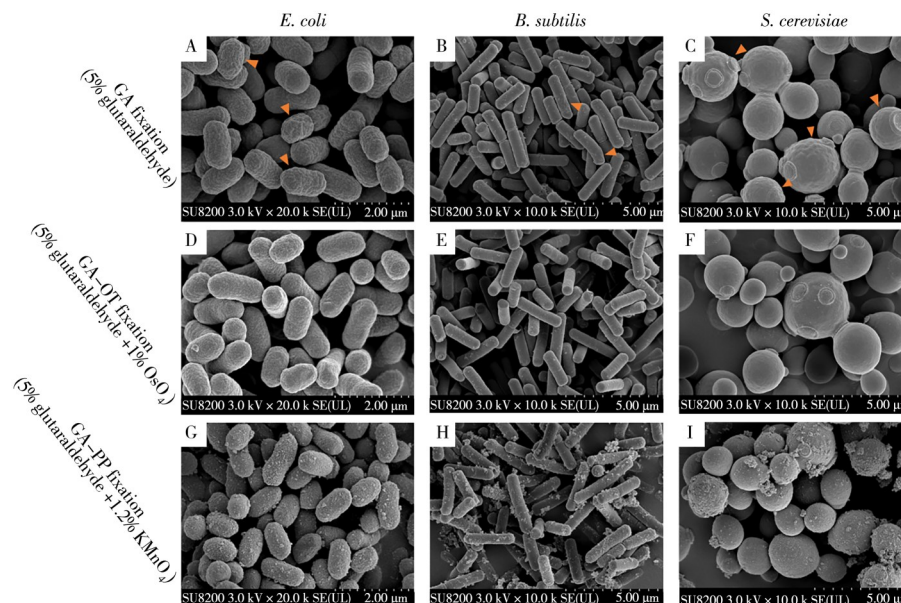


图 1 SEM 图像分析不同固定方案对 3 种微生物形态的影响

Fig. 1 SEM imaging analysis of the impact of different fixation protocols on the morphology of three microorganisms

A–C: *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae* cells fixed with GA; D–F: *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae* cells fixed with GA–OT; G–I: *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae* cells fixed with GA–PP. The scale is shown in the figure. The orange arrow indicates cells with an abnormal morphology or structural damage

2.2 不同固定-干燥方法对 3 种微生物 SEM 形态的影响与综合分析

将大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、酿酒酵母 3 种菌体分别进行 GA 固定、GA–OT 固定、GA–PP 固定和冷冻干燥、自然干燥、低温烘干、中低温烘干、临界点干燥的排列组合处理, 其不同固定-干燥方法下呈现出形态差异。

2.2.1 不同固定-干燥方法对大肠杆菌 SEM 形态的影响 SEM 成像发现大肠杆菌形态随固定-干燥方法的变化展现出差异, 如图 2 所示。大肠杆菌细胞整体呈短杆状, 其中经过 GA 固定-自然干燥、GA 固定-低温烘干、GA 固定-中低温烘干处理的大肠杆菌表现出细胞积聚凝结, 细胞形态差, 表面分布有明显褶皱, 少量细菌内容物丢失至细胞形态坍塌被破坏(图 2D、2G、2J), 并且 GA 固定-自然干燥获得的大肠杆菌形态最差, 菌体积聚凝结严重, 无法识别单个菌体, 且菌体形态模糊不清(图 2D); GA 固定-冷冻干燥和 GA 固定-临界点干燥获得的细胞形态相对较好, 仅少量细胞发生形态凹陷现象(图 2A、2M), 但 GA 固定-冷冻干燥获得的大肠杆菌细胞表面皱褶最为明显(图 2A)。GA–OT 固定-自然干燥、GA–OT 固定-低温烘干、GA–OT 固定-中低温烘干获得的大肠杆菌虽呈现细胞积聚凝结, 菌体表面皱褶, 但细胞形态基本完整(图 2E、2H、2K); GA–OT 固定-冷冻干燥和 GA–OT 固定-临界点干燥获得的细胞形态较好, 未发生形态凹陷现象, 但 GA–OT 固定-冷冻干燥获得的大肠杆菌细胞表面皱褶明显深于 GA–OT 固定-临界点干燥(图 2B、2N)。在 GA–PP 固定的 5 种组合处理中, 大肠杆菌细胞整体呈现形态完整饱满, 菌体表面未出现明显皱褶(图 2C、2F、2I、2L、2O), 其中 GA–PP 固定-自然干燥处理的菌体出现积聚凝结现象, 并且少量菌体欠饱满, 形态结构被破坏(图 2F), 此外, GA–PP 固定-冷冻干燥处理虽然出现少量菌体欠饱满, 形态结构被破坏(图 2C), 但图像中大肠杆菌细胞整体形态成像效果尚可。

从固定方式上看, GA–OT 固定和 GA–PP 固定获得的大肠杆菌细胞形态效果显著优于 GA 固定方式。从干燥方法上看, 自然干燥、低温烘干、中低温烘干更容易造成大肠杆菌细胞结构损坏, 冷冻干燥和临界点干燥则可更好地保存大肠杆菌形态结构。在众多处理组合中, GA–OT 固定-冷冻干燥、GA–OT 固定-临界点干燥、GA–PP 固定-冷冻干燥、GA–PP 固定-低温烘干、GA–PP 固定-中低温烘干、

GA-PP 固定-临界点干燥对大肠杆菌形态保存效果较好。

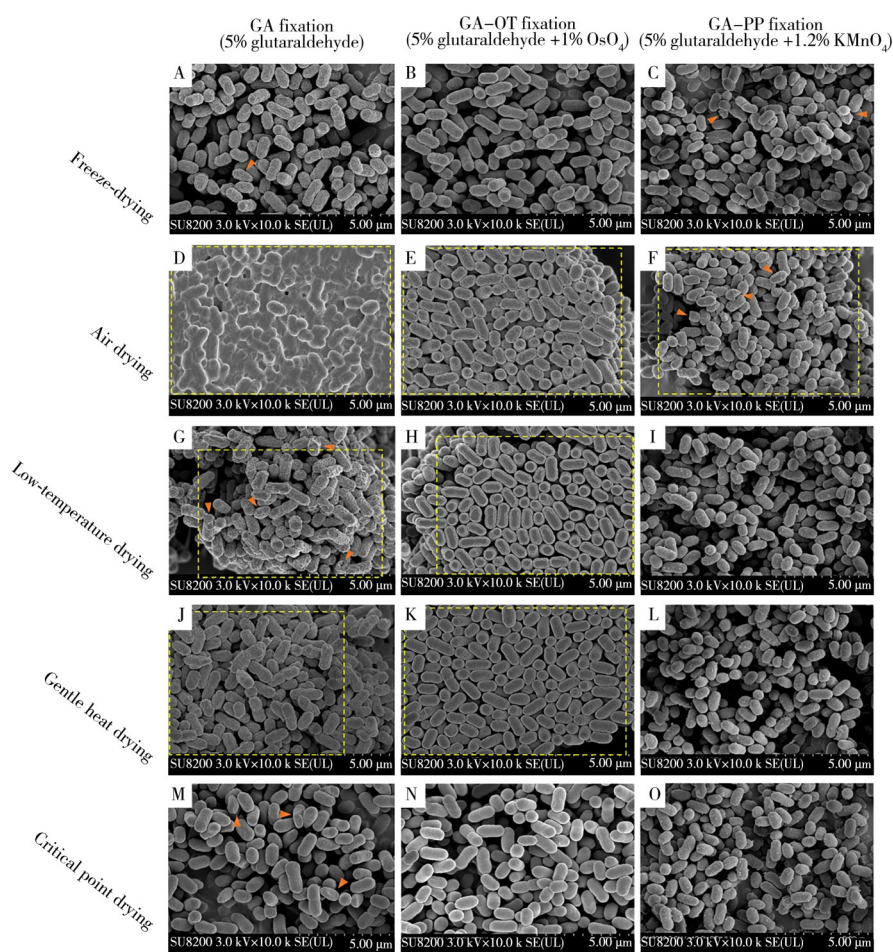


图 2 不同固定-干燥方法对大肠杆菌 SEM 形态的影响

Fig. 2 Impact of different fixation-drying methods on SEM morphology of *E. coli*

A-C: GA fixation, GA-OT fixation, GA-PP fixation with freeze-drying; D-F: GA fixation, GA-OT fixation, GA-PP fixation with air drying; G-I: GA fixation, GA-OT fixation, GA-PP fixation with low-temperature drying; J-L: GA fixation, GA-OT fixation, GA-PP fixation with gentle heat drying; M-O: GA fixation, GA-OT fixation, and GA-PP fixation with critical point drying. The scale is shown in the figure. The orange arrows indicate *E. coli* cells with abnormal morphology or structural damage. The yellow dashed area shows aggregated and coagulated *E. coli* cells

2.2.2 不同固定-干燥方法对枯草芽孢杆菌 SEM 形态的影响 SEM 成像发现枯草芽孢杆菌形态随着固定-干燥方法的变化展现出差异,如图 3 所示。枯草芽孢杆菌菌体呈杆状,GA 固定-自然干燥、GA-OT 固定-自然干燥处理中获得的菌体积聚凝结,细胞形态差(图 3D、3E);GA 固定-冷冻干燥、GA-OT 固定-冷冻干燥、GA 固定-低温干燥、GA-OT 固定-低温干燥、GA 固定-中低温干燥、GA-OT 固定-中低温干燥获得的枯草芽孢杆菌多数细胞形态较好,仅少量细胞发生形态凹陷或菌体形态被破坏现象(图 3A、3B、3G、3H、3J、3K),GA 固定-临界点干燥与 GA-OT 固定-临界点干燥获得的枯草芽孢杆菌细胞形态最好,图像中菌体细胞形态光滑饱满,菌体结构完整(图 3M、3N);在 5 种 GA-PP 固定系列组合中,虽然菌体经不同干燥方法处理,但菌体之间未表现明显差异性,菌体均呈现完整饱满状态(图 3C、3F、3I、3L、3O)。

从固定方式上看,GA-PP 固定对枯草芽孢杆菌菌体形态保存显著优于 GA 固定,与 GA-OT 固定大致相同;从干燥方法上看,自然干燥对菌体保存效果最差,低温烘干和中低温烘干可实现大多数菌体形态较好保存,但仍存在少量菌体出现菌体被破坏现象,冷冻干燥对菌体的破坏作用较轻,临界点干燥法则可完全保留枯草芽孢杆菌的真实形态,对菌体形态还原效果最好。其中 GA 固定-临界点干燥、GA-OT 固定-临界点干燥与 5 种 GA-PP 固定系列组合对枯草芽孢杆菌形态保存效果较好。

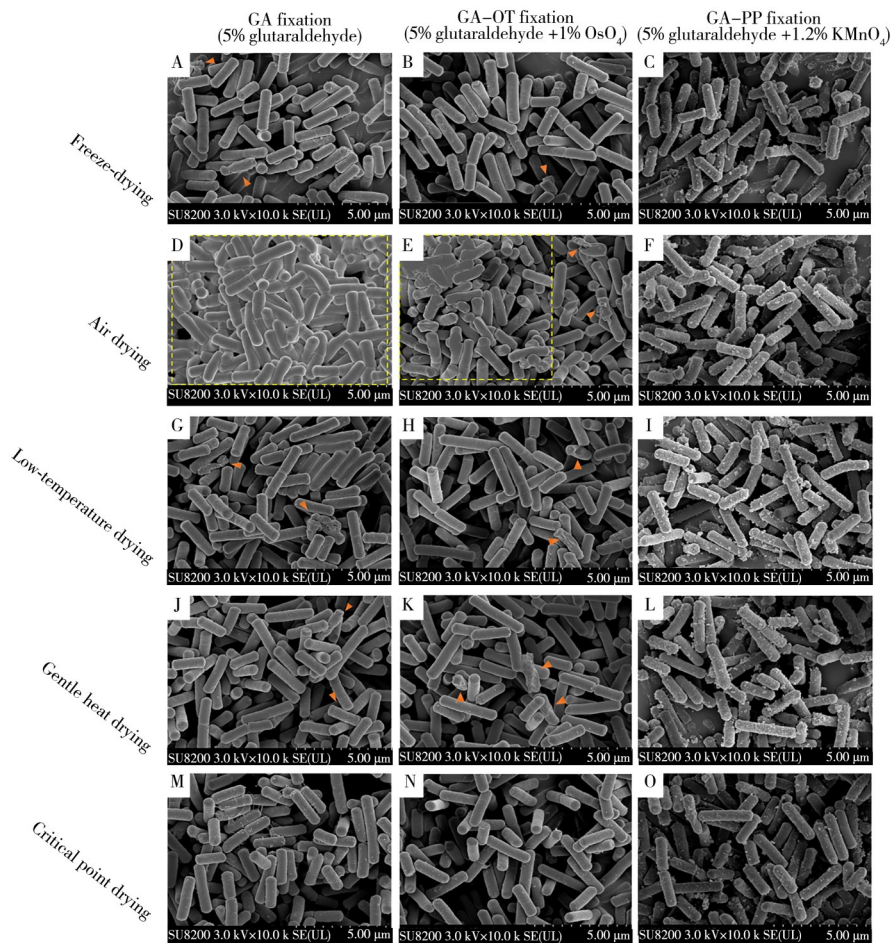


图3 不同固定-干燥方法对枯草芽孢杆菌SEM形态的影响

Fig. 3 Impact of different fixation-drying methods on the SEM morphology of *B. subtilis*

A-C: GA fixation, GA-OT fixation, GA-PP fixation with freeze-drying; D-F: GA fixation, GA-OT fixation, GA-PP fixation with air drying; G-I: GA fixation, GA-OT fixation, GA-PP fixation with low-temperature drying; J-L: GA fixation, GA-OT fixation, GA-PP fixation with gentle heat drying; M-O: GA fixation, GA-OT fixation, and GA-PP fixation with critical point drying. The scale is shown in the figure. Orange arrows indicate *B. subtilis* cells with abnormal morphology or structural damage. The yellow dashed area indicates aggregated and coagulated *B. subtilis* cells

2.2.3 不同固定-干燥方法对酿酒酵母SEM形态的影响 SEM成像发现酿酒酵母形态随着固定方式和干燥方法的变化展现出差异,如图4所示。酿酒酵母菌体整体呈球形,5种GA固定系列组合获得的菌体细胞均出现少量菌体破损,菌体表面出现显著沟壑皱褶,菌体形态欠饱满(图4A、4D、4G、4J、4M);GA-OT固定-自然干燥、GA-OT固定-低温烘干、GA-OT固定-中低温烘干获得的酿酒酵母菌体细胞中出现少量细胞破损,菌体表面出现凹陷,大部分细胞呈现饱满状态(图4E、4H、4K),GA-OT固定-冷冻干燥、GA-OT固定-临界点干燥获得的菌体细胞呈现整体细胞表面光滑饱满,结构完整状态(图4B、4N);5种GA-PP固定系列组合处理后,酿酒酵母细胞均形态饱满、结构完整(图4C、4F、4I、4L、4O)。

从固定方式上看,GA固定处理对酿酒酵母菌体保存效果普遍较差,GA-OT固定与GA-PP固定效果大致相同;从干燥方法上看,冷冻干燥法和临界点干燥法可较好地保存酿酒酵母细胞形态,自然干燥法、低温干燥法和中低温干燥法对酿酒酵母细胞形态保存效果略有不足。其中,GA-OT固定-冷冻干燥、GA-OT固定-临界点干燥与5种GA-PP固定系列组合对酿酒酵母形态保存效果较好。

2.2.4 不同固定-干燥方法对3种微生物SEM形态影响的综合分析 通过计数完好与受损细胞,统计上述3种菌株在不同处理下的细胞完整率,结果如图5所示。每组处理随机选取3个视野,每视野计数至少50个细胞,每组统计细胞总数不少于150个(大肠杆菌每组201~251个,枯草芽孢杆菌每组158~189个,酿酒酵母每组153~184个)。单因素方差分析(ANOVA)结果显示,固定方式对微生物细胞完整率影响极显著($p < 0.01$),GA-OT固定与GA-PP固定组细胞完整率显著高于GA固定组($**p < 0.01$),且

二者之间无显著差异($p>0.05$)；干燥方式同样影响显著，自然干燥、低温烘干、中低温烘干组完整率显著低于冷冻干燥与临界点干燥组($*p<0.05$)。GA-PP固定-冷冻干燥组细胞完整率达92.3%~96.7%，与GA-OT固定-临界点干燥(94.1%~98.2%)无显著差异($p>0.05$)，远高于GA固定组(61.5%~78.4%)。

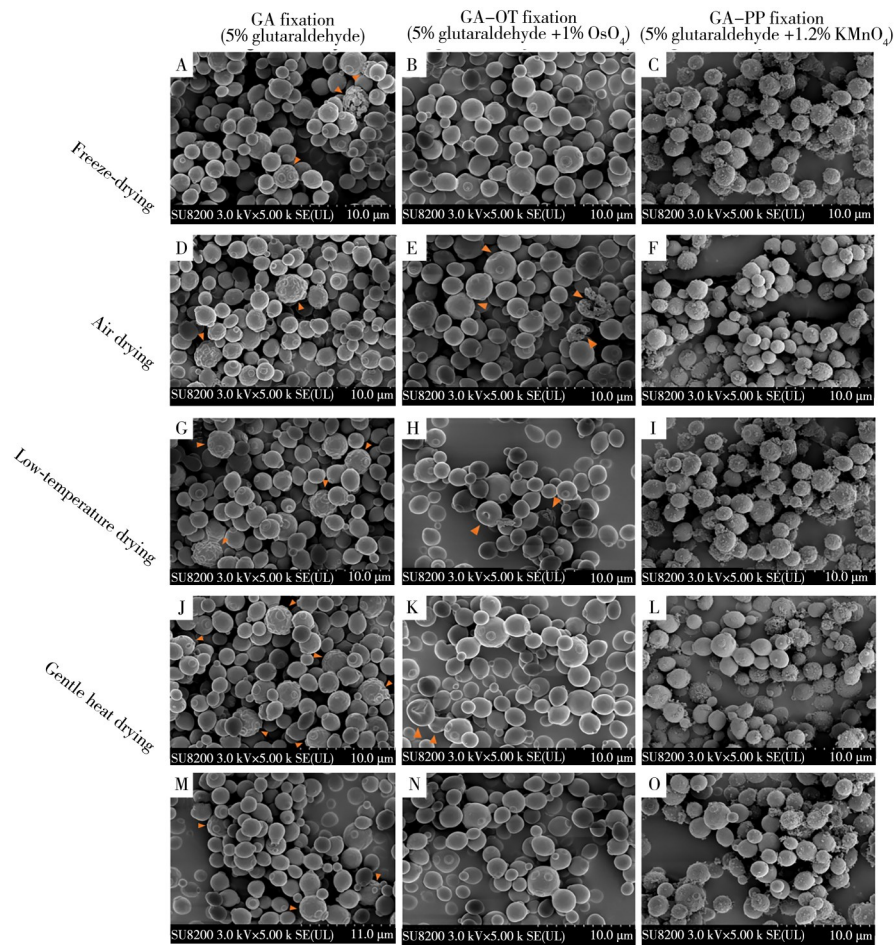


图4 不同固定-干燥方法对酿酒酵母SEM形态的影响

Fig. 4 Impact of different fixation-drying methods on SEM morphology of *S. cerevisiae*

A-C: freeze-drying; D-F: air drying; G-I: low-temperature drying; J-L: gentle heat drying; M-O: critical point drying methods. The scale is shown in the figure. Orange arrows show yeast cells with abnormal morphology or structural damage

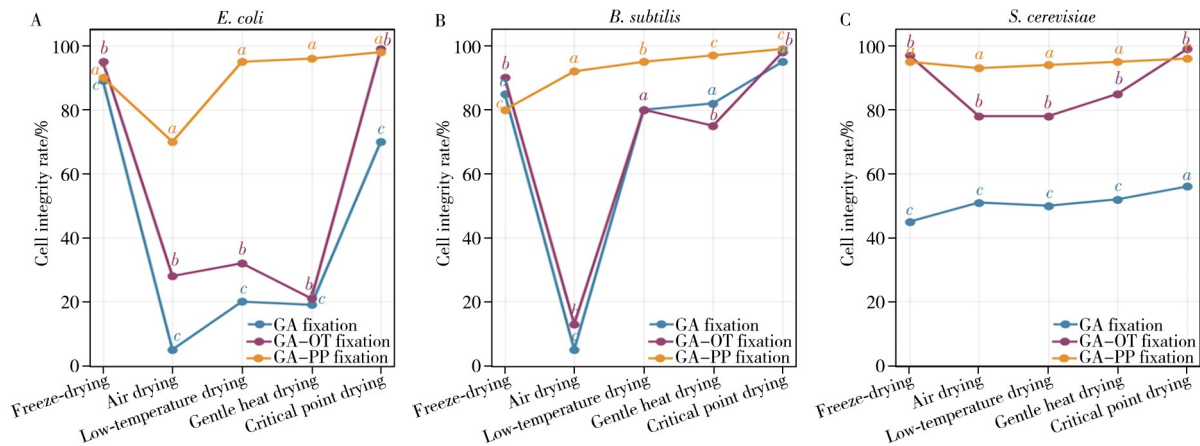


图5 不同固定-干燥方式对微生物细胞完整率的影响

Fig. 5 Effects of different fixation-drying methods on microbial cell integrity rate

A: *E. coli*; B: *B. subtilis*; C: *S. cerevisiae*; a, b, c indicate significant differences among the different fixation groups using the same drying method;

对GA-PP固定-冷冻干燥与GA-OT固定-临界点干燥两种SEM制样方法进行对比(表1)，GA-PP固定-冷冻干燥组细胞完整率(92.3%~96.7%)接近GA-OT固定-临界点干燥(94.1%~98.2%)；但由于无

需接触使用剧毒试剂, GA-PP固定-冷冻干燥仅使用低毒或无毒固定剂(戊二醛、 KMnO_4), 显著提升了实验操作安全性; 同时, GA-PP固定-冷冻干燥使用更常见的通用性设备真空冷冻干燥机, 显著提升了实验方案便利性。从以上比较可见, GA-PP固定-冷冻干燥方法更适用于常规实验室场景, 而GA-OT固定-临界点干燥则常用于专业电镜平台实验室。

表1 GA-PP固定-冷冻干燥与GA-OT固定-临界点干燥方法比较

Table 1 Comparison of GA-PP fixation-freeze-drying and GA-OT fixation-critical point drying methods

Comprehensive comparison index	GA-PP fixation-freeze-drying	GA-OT fixation-critical point drying
Microbial cell integrity rate	92.3%-96.7%	94.1%-98.2%
Cell fixative	Glutaraldehyde, KMnO_4	Glutaraldehyde, OsO_4
Fixative toxicity	Low toxicity, non-toxicity	Low toxicity, high toxicity
Experimental safety	High	Low
Drying equipment	Freeze dryer	Critical point dryer
General/specific equipment	General	Specific
Method applicable scenarios	Routine laboratory	Professional electron microscopy platform
Experimental economics	Low-cost	High-cost

本研究中GA-OT固定-临界点干燥和GA固定组结果与曾智等^[14]的研究结论一致, 再次验证了GA-OT固定对微生物形态保存的关键作用和GA固定的局限性。为了弥补现有研究单因素、单一菌种探究的不足, 本研究首次系统性综合分析了固定与干燥两个核心制样环节对革兰氏阴性、革兰氏阳性、单细胞真菌3类微生物SEM制样的协同规律, 即微生物细胞前期固定效果越好, 菌体对干燥损伤的耐受性则会越强。由于 KMnO_4 的强固定作用, 配合冷冻干燥避免液体表面张力优势, 可以良好地抵御干燥过程中的菌体结构坍塌, 与GA-OT固定-临界点干燥方案表现出结果一致性。微生物干燥损伤主要来自两方面: 一是乙醇挥发产生的表面张力带来的物理机械损伤; 二是升温干燥引发的蛋白质变性损伤^[24]。本研究发现自然干燥、烘干法对菌体损伤最大; 而冷冻干燥所致菌体损伤较轻, 仅因脱水后菌体细胞内残留的极微量乙醇在冻干过程中发生的汽化沸腾, 引发少量菌体产生轻微物理损伤; 临界点干燥因 CO_2 超临界流体工作原理几乎对细胞不产生任何损伤, 是当前最优干燥选择, 也是电镜制备中最常应用的方法^[25], 但该干燥方法需依赖专用干燥设备(临界点干燥仪), 普通实验室大多不配备该仪器, 因而该方法具有一定局限性。此外, 干燥方式对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌细胞完整率的影响显著, 而酵母菌细胞完整率受干燥方法影响较小(图5), 主要原因在于: 大肠杆菌仅具有单层的肽聚糖细胞壁结构^[26], 机械强度低, 因此受干燥方式影响最大; 枯草芽孢杆菌具有多层肽聚糖细胞壁^[27], 可一定程度上抵御干燥损伤, 细胞完整率略优于大肠杆菌; 酿酒酵母具有几丁质细胞壁^[28]且细胞壁最厚^[10], 对干燥损伤的耐受能力最强。

本研究证明了 KMnO_4 可作为微生物SEM制样的通用固定剂, 并提出了GA-PP固定-冷冻干燥方案, 可高效替代传统的GA-OT固定-临界点干燥, 使常规实验室摆脱电镜专用干燥设备(临界点干燥仪)依赖, 无需使用专用固定试剂(OsO_4), 并减少了有毒试剂接触, 具有试剂易获取、设备要求低、操作安全便捷、实验经济性高、通用性强、易推广的优势。本方案后续可拓展研究对象(如丝状真菌、放线菌等), 通过优化戊二醛、 KMnO_4 浓度与固定时间, 结合图像分析软件建立菌体尺寸偏差^[29]或菌体追踪等评价体系^[30], 并将该方法推广应用于医学、食品、农业、环境微生物、遗传工程等研究领域, 进一步提升方案的通用性与高效性。

综上所述, GA-PP固定-冷冻干燥方法对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、酿酒酵母的固定效果接近GA-OT固定-临界点干燥方法, 可作为传统GA-OT固定-临界点干燥制备方法的有效替代方案。使用GA-PP固定-冷冻干燥获得的上述3种微生物细胞形态饱满、结构完整、细胞壁表面结构清晰, 图像分辨率高, 满足高质量SEM的成像要求。

3 结 论

本研究首次系统分析了SEM制样中固定、干燥环节对微生物形态的影响, 明确了固定与干燥环节协同影响微生物菌体形态的保存效果。GA-OT固定与GA-PP固定对菌体形态的固定效果显著优于GA固定, 冷冻干燥和临界点干燥对菌体形态的损伤作用不显著, 是应优先选择的固定和干燥方式。本研

究提出的 GA-PP 固定-冷冻干燥方案是微生物 SEM 制样的重要替代方案, 可有效保存革兰氏阴性、革兰氏阳性与单细胞真核真菌 3 类微生物的形态结构, 满足 SEM 成像要求, 具有经济便捷、通用性强、安全性高等优点, 具备行业推广与技术普及价值。本研究为无专业电镜平台的实验室提供了一个标准化、低成本、高安全的微生物 SEM 制样解决方案。

参考文献:

- [1] Zmerli O, Boukili M, Bellali S, Khalil J B. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **2026**. DOI: 10.3389/fcimb.2025.1697696.
- [2] Liang G J, Xu X C, Chen X L, Wu J, Song W, Wei W Q, Liu J, Li X M, Liu L M, Gao C. *Chem. Eng. J.*, **2023**, 477: 147152.
- [3] Wang M, Wang H M, Gao C, Wei W Q, Liu J, Chen X L, Hu G P, Song W, Wu J, Zhang F, Liu L M. *Metab. Eng.*, **2024**, 82: 134-146.
- [4] Hu L T, Xiao S, Sun J Y, Wang F Y, Yin G B, Xu W J, Cheng J H, Du G C, Chen J, Kang Z. *Nat. Commun.*, **2025**, 16: 2076.
- [5] Zhao Z F, Cao Y L, Chen X D, Wang Z J, Xu T, Xiong D K, Hu L J. *Acta Microb. Sin.* (赵志峰, 曹雨澜, 陈晓蝶, 王佐军, 徐腾, 熊大可, 胡陆军. 微生物学报), **2024**, 64(7): 2352-2367.
- [6] Xi H J, Chen H Y, Luo Y, Qi M, Wang Y B, Zhu W T, Chen P, He H J. *Sci. Technol. Food Ind.* (郗慧娟, 陈晗玉, 骆莹, 祁蒙, 王叶博, 朱文婷, 陈平, 何鸿举. 食品工业科技), **2024**, 45(20): 124-132.
- [7] Liu Y X, Li Q, Liu J Q, Huang Y R, Xiao Y X, Yang Y X, Li Y H, Shen Y F, Wei R J, Xiu Y X, Wang B H. *Asian J. Ecotoxic.* (刘雨欣, 李琪, 刘家奇, 黄予睿, 肖云星, 杨镒霞, 李宇航, 沈逸凡, 魏人杰, 修宇鑫, 王冰鹤. 生态毒理学报), **2026**, 21(1): 455-467.
- [8] Yin L J, Wang W, Wang M, Dar O L, Wu H, Jia A Q. *World J. Tradit. Chin.*, **2025**, 11(4): 514-525.
- [9] Hu S, Zhou S Y, Wang Y, Chen W X, Yin G B, Chen J, Du G C, Kang Z. *Carbohydr. Polym.*, **2024**, 333: 121983.
- [10] Zhu X N, Wang L L, Zhang L, Song X T, Guo J L, Wang X L. *Acta Microb. Sin.* (朱晓南, 王玲玲, 张玲, 宋晓彤, 郭军玲, 王晓丽. 微生物学报), **2026**, 66(2): 915-925.
- [11] GB/T 33834-2017. Microbeam Analysis—Scanning Electron Microscopy—Analysis Method for Biological Specimens by Scanning Electron Microscope. National Standards of the People's Republic of China(微束分析-扫描电子显微术-生物试样扫描电子显微镜分析方法. 中华人民共和国国家标准).
- [12] de Andrade A N, de Silva J R, Santos L R, Camurça V H F, Branco-Junior J F, Oliveira M L, Machado G. *Quim. Nova.*, **2025**, DOI: 10.21577/0100-4042.20250241.
- [13] Chakraborty A, Dam B. *J. Microbiol. Methods*, **2025**, 239: 107315.
- [14] Zeng Z, Liu R J, Hu N, Suo Y R, Bai B. *Chin. J. Diag. Pathol.* (曾智, 刘瑞娟, 胡娜, 索有瑞, 白波. 诊断病理学杂志), **2017**, 24(5): 386-388.
- [15] Mayer M, Schug C, Geimer S, Klecker T, Westermann B. *Microb. Cell*, **2024**, 11: 378-386.
- [16] Ratnayake K, Joyce D C, Webb R I. *Sci. Hortic.*, **2012**, 140: 12-18.
- [17] Adiningrat A, Maulana I, Fadhlurrahman A G, Yumoto H. *Microb. Pathog.*, **2025**, 206: 107791.
- [18] Leong P Y, Tan W Q, Choo W S. *FEMS Microbiol. Lett.*, **2025**, DOI: 10.1093/femsle/fnaf020.
- [19] Majumdar G, Mandal S. *Digit. Chin. Med.*, **2025**, 8: 76-89.
- [20] Wang L L, Liu Z, Xiong F, Li D L, Zhou W D, Chen Y F, Wang Z. *Acta Agron. Sin.* (王玲玲, 刘智, 熊飞, 李栋梁, 周卫东, 陈义芳, 王忠. 作物学报), **2012**, 38(9): 1688-1697.
- [21] Tan L, Liu X D, Zhang Y F. *J. Hazard. Mater.*, **2023**, 446: 130696.
- [22] Gates L, Adler R R, Elangbam C S. *J. Histotechnol.*, **2016**, 39(1): 2-7.
- [23] Harte P T, Singletary M A, Landmeyer J E. *Hydrobiologia*, **2025**, 12(6): 155.
- [24] Xiong F K, Hu G Z, Liu Z B, Xiao H W, Huang B. *J. Agric. Food Chem.*, **2025**, 73(33): 21072-21081.
- [25] Ando M, Hata C, Nishizaki H, Togao M, Kawakami K. *Microbiol. Res.*, **2025**, 16(11): 234.
- [26] Alodaini D, Rocamora V H, Boelter G, Ma X Y, Alao M B, Doherty H M, Bryant J A, Moynihan P, Moradigara-vand D, Glinkowska M, Vollmer W, Banzhaf M. *mBio*, **2024**, 15(4): 00325-24.
- [27] Muchová K, Chromiková Z, Barák I. *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, 21: 4513.
- [28] Chuene L T, Ndlovu T, Rossouw D, Naidoo-Blassoples R K, Bauer F F. *FEMS Yeast Res.*, **2024**, DOI: 10.1093/femsyr/foae028.
- [29] Cao Q A D, Huang W Q, Zhang Z, Chu P, Wei T, Zheng H, Liu C L. *Life*, **2023**, 13: 1246.
- [30] Qin X A, Tu Z W, Liu H. *Software X*, **2023**, 22: 101377.

(责任编辑: 盛文彦)