

NILU: TR 8/2000
REFERANSE: E-99039
DATO: AUGUST 2000
ISBN: 82-425-1189-6

**Fluorescensmikroskopi
anvendt til kvalitative
partikkelstudier
En litteraturstudie**

Odd Anda

Innhold

	Side
Innhold	1
Sammendrag	2
1 Innledning	3
2 Generelt om fluorescensmikroskopi	3
3 Anvendt på bakterier	4
3.1 Prøvetaking	4
3.2 Innfarging av bakterier med acridine orange	5
4 Anvendt på sopp	6
5 Anvendt på diverse andre typer partikler	7
6 NILUs utstyr og muligheter	8
7 Litteraturreferanser	8

Sammendrag

Formålet med dette litteraturstudium var å utvide NILUs kompetanseområde innen mikroskopi generelt. Spesielt hadde man i tankene bruk av fluorescensmikroskopi til påvisning av biologiske støvpartikler som bakterier og sopp.

Rapporten gjennomgår muligheter og begrensninger innen dette fagfelt. Det er også tatt med en del prosedyrer for prøvetaking og prøvepreparering.

NILU har kjøpt inn utstyr for å kunne utføre fluorescensmikroskopi. Denne litteraturstudie er et første skritt på veien. Det kreves en del øvelse og ervervelse av erfaring før man kan ta de ulike teknikker i praktisk bruk. De må også tilpasses våre formål. Eksempelvis må vi kunne overføre teknikkene fra bruk på prøver av vann og jord til prøver av støv i løs masse og på filtre. Dette burde imidlertid være en enkel sak å løse.

Konklusjonen er at fluorescensmikroskopi vil kunne brukes til påvisning av vitale bakterier og sopp i støvprøver. Det vil være en rask og lite ressurskrevende "screening"-metode. Det vil selvsagt være problemer knyttet til tolkningen av eksempelvis bakteriefunn i støv; men dette var ikke tema i dette prosjekt.

Fluorescensmikroskopi er også nyttig i identifikasjonsarbeidet med andre uorganiske støvpartikler, og til kildebestemmelse av noen av disse. Eksempelvis vil kalkspat fluorescere med forskjellige bølgelengder alt etter uttakslokalitet.

Det er viktig å påpeke at fluorescensmikroskopi først og fremst er et nyttig supplement, og ikke noe alternativ til andre teknikker innen mikroskopi.

Fluorescensmikroskopi anvendt til kvalitative partikkelstudier

En litteraturstudie

1 Innledning

Foranledningen til denne litteraturstudie var primært ønske om å oppnå større ekspertise når det gjaldt påvisning av mikroorganismer i innemiljø slik de forekom på støvpartikler. En av metodene som brukes i slike undersøkelser er fluorescensmikroskopi. NILU anskaffet i 1999 utstyr til dette formål.

2 Generelt om fluorescensmikroskopi

Fluorescensmikroskopi (FM) baseres på at stråler (vanligvis UV=365 nm) som treffer objekter endres til lengre bølgelengder, og som i dette tilfelle går fra å være usynlig lys til å bli synlig.

Ved blåfiolett fluorescens brukes lys med bølgelengde 400 nm, og som altså er synlig lys. Til FM vil generelt glassoptikk kunne brukes.

Vi har primær (auto-) og sekundær fluorescens. Sistnevnte betyr at fluorescensen kommer fra et innfargingsstoff, og ikke fra stoffet selv slik som i første tilfellet ¹.

Filtre: Eksiteringsfilter er det filter som skal gi riktig bølgelengde ut, eksempelvis 365 nm. Sperrefilter skal ta hånd om spredt og rest-UV (alt under ca. 470 nm). Dette filteret, som vanligvis er blekt stråfarget, plasseres ovenfor okularet. For blåfiolett fluorescens er dette filteret orange. Ofte er også et varmeabsorberende filter nødvendig.

De fleste fluorescensfarger som observeres med 365 nm UV er blåhvite og er lite spesifikke, og således lite egnet til identifikasjonsformål. Ved bruk av 400 nm UV (blåfiolett) fås mest gule farger.

Som immersjonsvæske benyttes ren glyserol eller vann. Vanlige immersjonsoljer fluorescerer. Det samme gjør objekt- og dekkglass, men her er sjenansen mindre.

For å detektere svak fluorescens er det nødvendig med dempet rombelysning. Som identifikasjonsmetode for partikler har man det problemet at den primære fluorescensen ofte er mer avhengig av sporstoffer i en prøve enn av hovedkomponenten i prøven. Partikler av samme type kan derfor fluorescere forskjellig dersom kilden er forskjellig, da partiklene kan inneholde

¹ FM blir av og til forvekslet med ultrafiolett mikroskopi, hvor bildet av objektet dannes ved forskjeller i absorpsjon av UV-stråler (254 nm, kortbølget UV eller 275 nm, langbølget UV) hos objektet. For at et slikt bilde skal bli synlig for det menneskelige øye må det overføres til en fluorescerende skjerm. Siden glass absorberer stråling under 300 nm må man her bruke kvartsoptikk.

fluorescerende sporstoffer av ulik type og/eller i forskjellige mengdeforhold. Dette kan da brukes til kildebestemmelse.

Bakterier og cellelev mangler egenfluorescens. Ved innfarging med fluorescerende fargestoffer (fluorokromer) i meget fortennet form, kan man undersøke til dels levende celler ufiksert.

Ved mindre forstørrelser (10 og 20X objektiver) er gjennomfallende fluorescens å foretrekke.

Man må huske å fjerne eventuelle polarisasjonsfiltre før FM, da varme fra den sterke lyskilden kan skade dem (McCrone et al., 1973 og Motzfeldt et al., 1992).

3 Anvendt på bakterier

Bakteriene finnes i størrelsesområdet 0,06 til 0,7 μ m. Det er encellede organismer med aseksuell reproduksjon (f.eks. gjennom celledeling). Bakteriene kan produsere giftige stoffer (endotoxiner)².

Selv ved liten aktivitet frigjør mennesket millioner av bakterier hvert minutt. Bare ca 1% er levedyktige. I kontorer er det vanlig å finne ca 1000 cfu pr m³³.

Det hender at bakterier kan vokse og formere seg i bygningsmaterialer.

Av bakterier skal nevnes: "Gram-positive cocci" (*Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*) utgjør 85-90% av isolerte bakterier innendørs og de stammer hovedsakelig fra menneskehud.

"Gram negative rods" (*Pseudomonas*, *Aeromonas*) dominerer i vann, kloakk, og jord. Hertil hører tarmbakterier (*Escherichia coli*) som kan produsere endotoxiner, og *Legionella* som er nokså vanlig forekommende i ferskvann.

Konsentrasjonsnivåene av bakterier utendørs er normalt høyere enn innendørs, og mengden varierer lite med dager, årstider eller fra by til by. I en undersøkelse av Schmidt Etkin (1994) fant man at nivåene innendørs var høyere om sommeren enn ellers i året.

3.1 Prøvetaking

For luftprøver kan Nuclepore- eller polykarbonatfiltre brukes med porediametre 0,2 eller 0,4 μ m, og med diameter på 37mm. Pumpekapasitet: 1 l/min⁴.

² Virus er ikke-cellulære organismer sammensatt av proteinskall og nukleinsyrekjerner som behøver nukleinsyrer fra levende vertsceller for å reproducere seg. Virus kan kun dyrkes i levende organismer eller vevskulturer. Virus er i størrelse under 0,05 μ m, og således ikke synlige i vanlig lysmikroskop.

³ cfu, colony-forming unit: Et laboratoriemål for mengdeangivelse av levende organismer fremkommet fra en enhetsprøve lagt på et næringsmedium en viss tid.

⁴ Brukes odlingsmedier kan tryptonglykose ekstrakt agar anvendes for bakterier, og maltekstrakt agar og DG18 for muggsopp (Blomquist et al., 1998 og Palmgren et al., 1986).

3.2 Innfarging av bakterier med acridine orange

Russiske mikrobiologer har konsentrert bakterier på membranfiltre, og så innfarget og tallet dem på filter. Filtrene ble vanligvis gjort klare, og mikroskoperingen foregikk med gjennomfallende lys.

Strugger (1948) brukte acridine orange for å skille mellom levende og døde organismer. Aktive bakterier vil fluorescere i grønt ved innfarget acridine orange. Bakterier i dvaletilstand vil også registreres. Metoden skiller imidlertid ikke de ulike arter bakterier.

Bakterier i springvann

I den nedenfor angitte prosedyre ble det brukt sort Millipore membranfilter, 25 mm i diameter og med porestørrelse 0,45 μ m (Hobbie).

En prøve av springvann ble fortynnet 1:1 med en fortynnet løsning av acridine orange (0,1 eller 0,01%) i vann. Etter ca. 30 sek. ble blandingen filtrert gjennom et membranfilter (1 til 3 ml er nok). Når den siste ml går gjennom filteret skylles filteret med 5 til 10 ml med destillert vann eller springvann som er filtrert på forhånd. (Også acridine orange løsningen må filtreres kort tid før blandingen).

Etter skylling plasseres det våte filteret på en dråpe immersjonsvæske på et objektglass. Enda en dråpe immersjonsvæske plasseres så på filteret, og preparatet er klar for mikroskopering. Man har imidlertid bare ca 30 sek. å arbeide på da fluorescensen blekner fort. Den store fordelene med metoden er at bakteriene skiller seg tydelig ut fra bakgrunsmaterialet ved å vise grønn fluorescens.

Bakterier i jord

Oppsamling, konsentrering og dyrking har vært den tradisjonelle prosedyre i kvalitativ så vel som kvantitativ bestemmelser av bakterier i jord. Ved dyrking av disse autoktone (dvs som er dannet på stedet) bakterieformene på næringsstoffer oppnås mye større enheter.

Direkte observasjoner med innfargingsmetoder har til nå ikke vært særlig vellykkede da bakterier og andre partikler ofte fikk samme farge. Metodene var med andre ord ikke tilstrekkelig selektive.

Levende bakterier i jord kan nå undersøkes vha. FM med acridine orange som innfargingsmiddel. Aktive bakterier og humusstoffer gir da henholdsvis grønn og rødlig fluorescens. Bruk av meget tynne fargestoffløsninger gjør at celler kan fortsette å leve.

Acridine orange er et basisk fargestoff og er fullstendig dissosiert opp til pH 8,5. Acridine orange kationene viser variabel fluorescens avhengig av konsentrasjonen.

Lav konsentrasjon gir således grønn fluorescens, mens høyere konsentrasjoner viser kopperfarget fluorescens (under kvartslampe).

Levende planteceller gir grønn fluorescens, mens døde celler gir lys kopperfarge.

Protoplasma av gjærceller og alle former for levende bakterier kan bli innfarget ("stained") med acridine orange.

Metode for innfarging av jord (Strugger, 1948):

I hver av 5 testrør plasseres 1g siktet jord. 10 ml acridine orange løsning laget av springvann tilsettes hvert rør og rystes kraftig. Da ulik jord kan avvike i fargeadsorpsjon, må den samme jordtype bli innfarget med 5 ulike konsentrasjoner av acridine orange (1 : 1000 – 1 : 5000). Hvis konsentrasjonen er for lav, vil acridine orange løsningen bli totalt misfarget innen få minutter etter å ha blitt rystet, og jorden vil ikke bli tilstrekkelig rødfarget. Hvis konsentrasjonen er for høy vil mye "overskuddsfargestoff" vanskeliggjør observasjonen i mikroskopet. Når bare litt overskudd er tilbake er konsentrasjonen passelig. Mikroskoperingen kan skje etter 5 – 10 min.

Vi velger den ene av de to beskrevne måter å preparere prøven på: Man tar en liten dråpe med nål fra den innfargede og rystede suspensjonen av jord og legges på objektglass med dekkglass over. Oljeimmersjonsobjektiv med høy forstørrelse må brukes (parafinolje egner seg bra).

4 Anvendt på sopp

Sopp er encellede (som i gjær) eller flercellede (som i brødmugg) plantelignende organismer som mangler klorofyll. De lever på nedbrutt organisk materiale eller næringsstoffer fra levende vert, og reproducerer seg ved sporeproduksjon (3 – 200µm). Sopp kan produsere giftige stoffer (mycotoksiner). I luft og støv er det meget vanlig at sporer forekommer, og av og til kan man også påvise sopphyfer (trådlignende del av soppen) hvorfra sporer hos noen arter kan avsnøres.

FM egner seg utmerket for påvisning av sopphyfer. Vi kan bruke gjennomfallende lys, gjerne med mørkfeltkondensor. I tillegg trengs Jena filter BG12 (eksitasjonsfilter) og sperrefilter 530nm (gult).

Sopphyfer plasseres på objektglass. Drypp på en dråpe acridine orange løst i destillert vann eller springvann (pH bør være ca. 6,8)⁵.

Legg på dekkglass og vent i 3 til 5 minutter. Snu preparatet opp/ned mot et filterpapir, og press kraftig med begge tommelfingrene. Nå er det klart for mikroskopering (Motzfeldt Laane et al., 1992).

Noen sopphyfer har grønnlige til blågrønne fluorescensfarger, hvilket betyr at lite fargestoff har bundet seg til cellematerialet. Ved henstand endrer fargen seg til orangerød. Etter hvert kommer cellekjernene frem. DNA blir gulgrøn, den RNA-holdige delen orangerød. Hyfeveggene får varierende farger. Ved lengre bestråling med det blå lyset blekner fluorescensen. Den tar seg imidlertid opp igjen etter at lampen er slukket. Preparatene er ikke varige; men lar seg lett gjengi

⁵ Til en volumdel acridine orange (giftig, mutagent) brukes 10 000 deler vann slik at løsningen blir strågul.

på fargefilm (eksempelvis Fujichrome 100 eller 200 ASA, eksponeringstid et halvt til to minutter).

5 Anvendt på diverse andre typer partikler

Et problem man støter på ved karakterisering av partikler ved hjelp av fluorescens er at det ofte kan være inneslutninger eller kontamineringer i partiklene som gir den kraftigste fluorescensen.

De aller fleste fluorescensfarger med bruk av 365 nm UV er blåhvite. De er for uspesifikke til identifikasjonsformål. Med 400 nm blåfiolett oppnås for det meste gule farger (McCrone et al., 1973). Nedenfor er nevnt noen eksempler på primær fluorescens:

Biologisk materiale

Pollen fluorescerer (=fl) blåhvitt i UV. Sporer fl i forskjellige farger. Pigmenterte soppsporer fl ikke. Soppsporer for øvrig (andre enn conidia) fl bare når de er aktive ⁶.

Fibrer

Alle plante- og papirfibrer fl blåhvitt. Det samme gjør dyrehår (svak fl for kattehår). Syntetiske fibrer fl ikke eller svakt, forutsatt at de ikke er pigmentert med fargestoffer. Syntetiske mineralfibrer fl ikke, dog kan limstoffene gjøre det.

Polymerer

De fleste polymerer fl. Eksempler er: bakelitt, cellulose acetat og - nitrat, polykarbonat, polystyren, polyvinyl acetat, gummi og silikon gummi. Fluorescensen er svak til middels. Melamin formaldehyd og Teflon (fra "du Pont") fl. imidlertid ikke.

Forbrenningsprodukter

Det er ikke mulig å si noe generelt om hvilke typer som fl. eller ikke; men bileksos fl.

Mineraler

En god del mineraler fl. Man må imidlertid være varsom med tolkningene da variasjonene kan være store innen ett og samme mineral. Et eksempel er kalkspat som kan fl. i ulike farger; men dette mineral kan også mangle fluorescens. Dette kan anvendes i kildesøking.

Leire viser enten moderat til kraftig fluorescens i blått, gult og orange farger.

⁶ Conidia er aseksuelle soppsporer som etter hvert utvikler nye hyfer.

Eksempel på stoffer med noe spesielle fluorescensfarger:

<u>Stoff</u>	<u>365nm</u>	<u>400nm</u>
Viskose rayon	orange (kraftig)	orange (kraftig)
Nefelin	orange eller ingen	orange eller ingen
Karborundum	gult til orange-rødt	orange eller gyllen
Kalsinert leirstøv	kremgult	gulorange
Tobakk	blåhvit og kremgult	gult og orange

6 NILUs utstyr og muligheter

Det er nå vanligst å bruke reflektert lys eksitasjon. "Reflected light fluorescence illuminators" har opp til 4 filterkuber inneholdende eksiteringsfilter, dikromatiske speil (strålespaltere) og sperrefiltre ("suppression filters"). Det dikromatiske speil reflekterer det kortbølgede lyset (eksiteringslyset) til prøven; men er transparent for det langbølgede lyset. Sperrefilteret absorberer eksiteringslyset som reflekteres fra prøven og som treffer objektivet igjen; men er transparent for fluorescensbølgelengdene som sendes ut fra prøven.

NILU har anskaffet filterkubene A og I3. De har eksitasjon i henholdsvis bølglengdeområdene 340-380 nm (UV) og 450-490 nm (blått). Kubene er forsynt med egne dikromatiske speil og sperrefiltre.

Hvilke typer filterkuber som settes inn avhenger av hvilke fluorokrom som skal anvendes.

For bakterier brukes filter I3 når fluorokromene er acridine orange eller coryphosphine O. For sopp og alger brukes filter A når fluorokromene er Uvitex 2B eller blancophor BA.

For cellulose brukes filter A når fluorokromet er anilinblått.

Det er for NILU nødvendig med en begrenset innkjøringsperiode for å kunne tilby fluorescensmikroskopi som en "semi" kvalitativ metode.

Fluorescensmikroskopi kan brukes spesielt i forbindelse med påvisning av biologisk aktivitet (bakterier og sopp) i innemiljøer. Men også i andre sammenhenger kan fluorescensmikroskopi komme til nytte ved bestemmning av partikkeltyper generelt. Flere av disse anvendelsesområdene er nevnt ovenfor.

7 Litteraturreferanser

Blomquist, G. och Westermarck, S.-O. (1998) En snabb metod for att kontrollera exponering for mikroorganismer på reningsverk. I: *Resumeeer mm/15. 45. Nordisk Arbeidsmiljø Møde 1997*. København, Arbejdmiljøinstituttet, s.137.

Etkin, D.S (1994) Biocontaminants in indoor environments. Arlington, Cutter Information Corp.

- Hobbie, John E. (?) Instructions for counting total bacteria with acridine orange and the epi-fluorescence microscope. Norsk institutt for vannforskning, Oslo.
- Laane, M.M., Lie, T. (1992) Håndbok i mikroskopi og framstilling av preparater. Oslo, Universitetsforlaget.
- Leica Microscopy and Scientific Instruments (1996) Leica fluorescence microscopy. Brochure. Wetzlar.
- McCrone, W.C., Delly, J.G. (1973) The particle atlas.: an encyclopedia of techniques for small particle identification. 2nd edition. Vol. IV. Ann. Arbor, Ann Arbor Science publishers.
- Palmgren, U., Strøm, G., Malmberg, P. and Blomquist, G. (1986) The nuclepore filter method: A technique for enumeration of viable and nonviable airborne microorganisms. *Am. J. Ind. Med.*, 10, 325-327.
- Strugger, S. (1948) Fluorescence microscope examination of bacteria in soil. *Can. J. Chem.*, 26, 188-193.



Norsk institutt for luftforskning (NILU)

Postboks 100, N-2027 Kjeller

RAPPORTTYPE TEKNISK RAPPORT	RAPPORT NR. TR 8/2000	ISBN 82-425-1189-6 ISSN 0807-7185	
DATO	ANSV. SIGN.	ANT. SIDER 9	PRIS NOK 15,-
TITTEL Fluorescensmikroskopi anvendt til kvalitative partikkelstudier En litteraturstudie		PROSJEKTLEDER Odd Anda	
		NILU PROSJEKT NR. E-99039	
FORFATTER(E) Odd Anda		TILGJENGELIGHET * A	
		OPPDRAKSGIVERS REF.	
OPPDRAKSGIVER Norsk institutt for luftforskning			
STIKKORD Fluorescens	Partikkelidentifikasjon	Mikroskopi	
REFERAT Rapporten gjennomgår muligheter og begrensningen ved bruk av fluorescensmikroskopi til kvalitative partikkelstudier. Prosedyrer for prøvetaking og prøvepreparering er også omtalt.			
TITLE Fluorescencemicroscopy, a device in qualitative particle study. A literature study.			
ABSTRACT			

* Kategorier: A Åpen - kan bestilles fra NILU
 B Begrenset distribusjon
 C Kan ikke utleveres