

# VBNC 细菌荧光观察技术问题分析及对策

李影<sup>1</sup> 段锐<sup>2</sup> 钱爱东<sup>1\*</sup>

(1. 吉林农业大学 动物科学技术学院 吉林 长春 130118)

(2. 吉林省辽源市畜牧总站 吉林 辽源 136200)

**摘要:** 以 SYTO-9 和 PI 两种荧光染料对细菌进行核染, 以市售的黑色钢笔墨水替代伊拉克黑, 利用手动压片方式对标本进行固定, 自建一种“活的非可培养状态”(VBNC)细菌荧光显微镜观察技术。通过总结分析该项技术方法在应用过程中所出现的问题, 如存在背景荧光、菌体聚集、荧光图像模糊、滤膜吸附能力差、菌体形态不鲜明、菌体荧光减淡等, 并提出相应的解决策略, 旨在给予相关研究者以帮助和启迪。

**关键词:** VBNC 细菌, 荧光显微镜, 技术问题分析, 解决策略

## Problems Analysis and Solution Strategies for Fluorescence Observation in VBNC Bacteria

LI Ying<sup>1</sup> DUAN Rui<sup>2</sup> QIAN Ai-Dong<sup>1\*</sup>

(1. College of Animal Science, Jilin Agriculture University, Changchun, Jilin 130118, China)

(2. Liaoyuan Animal Husbandry Stationary, Liaoyuan, Jilin 136200, China)

**Abstract:** A detection method of viable but non-culturable bacteria by fluorescence microscopy was established with SYTO9 and PI staining cell nucleus, ink instead of Iraq black, specimens fixed by hand. Problems on background fluorescence, cell aggregation, blur fluorescence image, low micropore film absorbability, unclear bacterial form, and fluorescence quenching were analyzed. Some solution strategies were suggested in order to offer help for researchers.

**Keywords:** Viable but non-culturable in bacteria, Fluorescence microscopy, Problems analysis, Solution strategies

细菌活的非可培养状态 (Viable but non-culturable state, VBNC)是指细菌在不良环境中, 细胞发生萎缩, 用常规方法(平板法、最大可能近似值法)培养时, 不能生长繁殖, 但仍然是活的一种特殊存在形式<sup>[1]</sup>。细菌进入该状态后具备如下特点: (1) 菌体形态将发生变化。一般地, 可由弧形、杆状变

为球杆状, 甚至球形; (2) 丧失了普通培养基上生长繁殖能力, 但通过一些高灵敏度的检测手段仍可断定其存活; (3) 病原菌可保留毒力和致病性, 可以成为逃避检测的隐性传染源, 对周围环境及人类安全构成巨大威胁; (4) VBNC 状态下细菌可长久存活, 一般存活时间为 1-2 年; (5) VBNC 细菌遇到适宜条

件可以恢复可培养状态。正因为 VBNC 细菌有了这样与众不同的生物学特性,使得有关它的研究已经成为预防医学、流行病学、微生物生态学以及公共卫生、检验检疫研究的重要内容<sup>[2]</sup>。目前,用于 VBNC 细菌的检测方法有多种,如基于底物吸收能力的 Kogure 活菌直接计数法,基于氧化还原能力的呼吸检测法,基于细胞质膜结构完整性的活/死细菌试剂盒荧光染色法,以及基于 mRNA 分子的 RT-PCR 方法等<sup>[3]</sup>。相比之下,活/死细菌试剂盒荧光染色镜检法对于观察菌体形态、确定细菌活性状态则更具省时、简便、快捷、灵活等优点,因而被广泛应用。但在应用过程中,我们发现现行荧光显微镜观察技术<sup>[4]</sup>很难在 VBNC 细菌研究方面获得理想结果。因此,本文结合多年 VBNC 细菌研究经验,自建一套观察方法。同时针对国内来自华南农业大学、内蒙古农业大学、吉林大学等从事相关研究人员采取本法时所遇到的技术问题进行了汇总,并作以细致分析,旨在提出解决策略,为 VBNC 细菌研究工作的顺利开展提供帮助。

## 1 自建 VBNC 细菌荧光显微镜观察方法简介

本技术是一项以 SYTO-9 和 PI 对细菌进行核染,以市售的黑色钢笔墨水替代伊拉黑,利用手动压片方式对标本固定,并进行 VBNC 细菌荧光显微镜观察的方法。该项技术的最大优点在于可以客观地反映细菌的活、死状态,并能准确地确知细菌菌体形态,而且还能极大缩短操作时间。各类实验材料要求及具体操作方法如下。

### 1.1 实验材料

**1.1.1 载玻片与盖玻片:**两者均要求无自发荧光,并且表面光洁。盖玻片厚度应在 0.17 mm 左右,长宽最好都大于 25 mm。

**1.1.2 微孔滤膜:**直径为 25 mm,孔径为 0.2  $\mu\text{m}$ ,白色,表面光亮洁净,无明显自发荧光。为增加膜对细菌标本的吸附能力,应尽可能选用亲水性滤膜。

**1.1.3 墨水:**市售的墨水即可,但要求墨水不产生自发光,而且还能有效遮盖微孔滤膜的白色光亮。此外,墨水尚具备一定的黏稠度,以便加强滤膜对载玻片的吸附力。

**1.1.4 荧光染料:**最适合用于 VBNC 细菌观察的荧

光染料为 LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability (13152)试剂盒中的 SYTO-9 和 PI。可按使用说明书要求,将两种染料配制成工作浓度。SYTO-9 的吸收光波长为 480 nm,荧光波长为 610 nm;而 PI 的吸收光波长为 488 nm,荧光波长为 630 nm。

**1.1.5 荧光显微镜:**OLYMPUS BX-51 落射荧光显微镜,物镜为 100 $\times$ /1.25 的油镜头。同时,荧光显微镜配有绿色激发滤光片组块,其中激发滤光片波长为 510 nm–570 nm,吸收(遏止)滤光片波长为 490 nm。

**1.1.6 镜油:**VBNC 细菌需用油镜观察,因而最好使用无荧光的镜油,但也可用甘油或液体石蜡代替。

### 1.2 VBNC 细菌观察样本的前处理

取 VBNC 细菌液 1 mL 至无菌离心管中,8000 r/min 离心 2 min,弃上清。然后用灭菌生理盐水充分洗涤菌体沉淀 2 次,每次均 8000 r/min,离心 2 min,弃上清。

### 1.3 微孔滤膜染色与烘烤

将白色的微孔滤膜光面朝上平铺于平皿中,膜与膜之间不能重叠。而后吸取适量墨水,在滤膜圆心处滴 1 滴,使墨水从膜中心向四周自行浸染扩散,待墨水已全部浸透膜后,将平皿移至干热箱内,60 $^{\circ}\text{C}$  烤膜 20 min,其间需将滤膜翻动 2 次,而后冷却,室温存放备用。

### 1.4 VBNC 细菌样本荧光染色

将步骤 1.2 中的 VBNC 菌体沉淀溶于 50  $\mu\text{L}$  灭菌生理盐水中,贴壁加入工作浓度的 SYTO-9 和 PI 各 25  $\mu\text{L}$  至离心管中,瞬间离心,吹吸混匀,室温避光染色 15 min。

### 1.5 VBNC 细菌荧光标本的制备

将经墨水染黑的微孔滤膜置于无自发荧光的载玻片中心处,吸取 10  $\mu\text{L}$  染色完毕的 VBNC 菌液,滴在滤膜圆心上,待菌液刚好被滤膜吸干时,在其上盖上盖玻片,并用手用力压片,除尽空气夹层。最后在盖玻片上滴 1 滴镜油,用落射荧光显微镜于暗室中观察。

## 2 常见的技术问题分析

标准的荧光图像(图 1A、1B)应为:背景黑色且无荧光,细菌密度适中易于观察,菌体荧光自然且

形态清晰等。但在观察过程中, 自建的这套 VBNC 细菌荧光观察方法也会出现一些技术问题, 现归纳总结如下。

### 2.1 存在背景光

红色(图 1C)或绿色(图 1D)的背景光是 VBNC 细菌荧光观察时经常遇到的问题, 出现此类现象的主要原因在于所使用的荧光染料的荧光特性与选择的滤光片组块波长不对应所致。一般地, 每种荧光染料都有其特有的吸收光波长和荧光波长。染料的吸收光波长即为滤光片组块中的激发滤光片波长, 而荧光波长则为吸收滤光片的波长<sup>[5]</sup>。当荧光显微镜的滤光片组块不适合对荧光标本激发或吸收时, 由于通过滤光片的激发光低于或未达到细菌标本的吸收峰, 故而呈现一定的背景光<sup>[6]</sup>。另外, 在所选择的荧光滤光片组块正确的前提下, 白色的微孔滤膜以及具有较差遮盖能力的墨水也会产生背景光。因为, 激发光线经落射荧光装置中的二向分光镜的反射作

用可对细菌标本及滤膜一并激发照射, 而白色滤膜对激发光又存有强烈的反射能力, 故使遏止滤光片不能完全阻挡由滤膜所引发的反射光, 进而使荧光显微镜背景不能完全是黑暗的, 尚存一定的颜色<sup>[6]</sup>。

### 2.2 菌体聚集

与标准图像(图 1A)相比, 图 1E 出现了菌体明显聚集状态, 似乎被圈定起来, 而且周围的界限也比较分明。这可能是由于标本上样剂量较多, 而导致滤膜处于(过)饱和状态, 手动压片时, 盖玻片出现滑动, 从而在水溶液的作用下, 菌体被集中到一起。另外一个原因可能是因为手动压片力度不够, 在滤膜与盖玻片间形成空隙所致。

### 2.3 荧光图像模糊

模糊图像(图 1F)的产生除排除细调螺旋因素外, 最有可能的原因是油镜头或载物台安装有误, 致使镜头不能充分浸入油中, 此点最易被忽略。在观察时, 当油镜头调至最低点, 仍无法使油镜头与盖玻

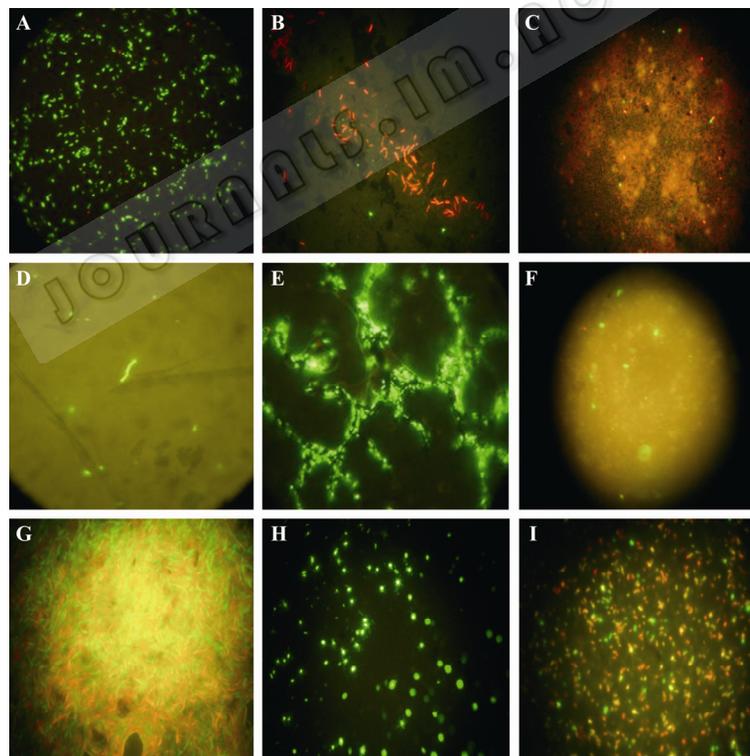


图 1 VBNC 细菌荧光显微镜观察图像

Fig. 1 Fluorescence image in VBNC bacteria

注: A: VBNC 细菌标准荧光图像; B: 死菌标准荧光图像; C: 存在红色背景; D: 存在绿色背景; E: VBNC 细菌菌体聚集; F: 图像模糊; G: 细菌密度过高; H: 菌体荧光过强; I: 菌体荧光淬灭。

Note: A: Standard fluorescence image in VBNC bacteria; B: Standard fluorescence image in dead bacteria; C: Red background; D: Green background; E: Cell aggregation in VBNC bacteria; F: Blur fluorescence image; G: High bacteria density; H: Strong fluorescence intensity; I: Cell fluorescence quenching.

片贴靠时,或者视野总会反射出荧光光亮,却无法呈现清晰图像时。如遇上述两种情况,均需要重新调整油镜头或载物台的安装位置。

#### 2.4 滤膜吸附能力差

由于本法主要采用手动压片方式对细菌固定,因而手的力度、墨水的黏稠度、以及上样标本的剂量将会直接影响滤膜与盖(载)玻片的吸附。例如,压片力度轻极易使盖玻片被油粘在镜头上而与滤膜分离;若上样标本剂量大,会使膜处于(过)饱和状态,同样也会使盖玻片发生移动,易被油粘在镜头上;若上样标本剂量小,往往更易使载玻片与滤膜分离。

#### 2.5 菌体形态不鲜明

研究 VBNC 细菌时,形态学观察是重要的一个部分。因为进入 VBNC 状态后菌体形态要发生显著变化,如由杆状变成球状、球杆菌或链杆菌,过度浓密的细菌可能会掩盖真实的个体形态和排列,如图 1G 所示。或者由于荧光染料使用剂量偏高而使菌体荧光亮度较强,反射的光芒也很容易使观察者误认为是形态发生显著变化。如图 1H 可知,荧光较强时,菌体形态易识别为球状,而荧光恢复为正常亮度时,菌体实为杆状,如图 1A。

#### 2.6 菌体荧光减退

如图 1I 所示。图片中出现了呈现橙红(黄)或黄绿色荧光菌体,表明该视野范围内菌体受紫外光激发时间较长,出现淬灭现象。因为紫外光源对荧光有极强的淬灭作用,故而观察时,每个视野应在 1 min 之内完成,最好还要及时调换视野或暂时关闭物镜进光通路<sup>[7]</sup>。

### 3 解决对策

针对上述在 VBNC 细菌荧光显微镜观察时所遇到的问题,下文将一一对此提出解决策略,仅供参考。

#### 3.1 去除背景光

最为行之有效和根本的解决方法便是依据荧光染料对激发光波长的要求去定制激发光滤片,而非选用滤光片组块。一般地,组块的选择原则是:滤光片的激发光波长应在荧光染料吸收波长范围之内,而滤光片的吸收光波长应小于荧光染料的荧光波长<sup>[8]</sup>。除此之外,针对背景光的产生原因,还可从以

下几方面着手解决。首先,滤膜最好直接选用亲水性滤膜,便于墨水的浸染。亲水性可通过滤膜的吸水情况而定,吸水则表示为亲水;其次,墨水应选择色泽较黑,品质较好并且能有效遮盖白色微孔滤膜的产品。否则墨水因色淡而不易掩盖滤膜自身所反射的亮光,而品质差的也易出现自发荧光或增加背景荧光等。通过比较国内市售的几个品牌墨水,如英雄、博士、鸵鸟、派克等,研究表明,由上海英雄金笔有限公司生产的钢笔墨水不但不产生自发光,而且还能去除滤膜的光亮;不但能加深视野背景深度,而且还能加强膜对玻片的吸附力,因而该牌墨水对 VBNC 细菌的荧光观察效果最好。最后,为保证荧光图像背景完全黑暗,不出现微弱荧光,载玻片、盖玻片、观察用油最好应无自发光,选用荧光专用产品。

#### 3.2 消除菌体聚集状态

滤膜处于过饱和状态时最易发生此种现象,因而点于滤膜上的细菌标本的剂量应控制好,既不要出现手动压片液体外溢情况,同时还要兼顾滤膜与盖(载)玻片的吸附情况。一般点样剂量为 10–15  $\mu\text{L}$  为宜。

#### 3.3 提高图像清晰度

经荧光显微镜细调螺旋进行调整是最基本的方法,但由于油镜头或载物台高度安装有误,无法使镜头充分浸入油中,致使镜头与盖玻片无法贴靠,即使调整细调螺旋也无济于事。因此,在进行荧光观察时,首先要扭动粗调螺旋,检查油镜头是否能与载玻片靠紧。若留有空隙,始终接触不上时,应立即调整镜头或载物台的安装位置。

#### 3.4 提高滤膜吸附能力

墨水的黏稠度是提升滤膜对盖(载)玻片吸附能力的关键因素。稠度过低墨水极易造成膜与载(盖)玻片的分离;而稠度过高的墨水却易使滤膜在烘烤时周围边缘上翘,同时也不利于对载(盖)玻片的吸附。另外,点于滤膜上的细菌标本剂量应为 10–15  $\mu\text{L}$ ,而手动压片力度以菌液压片后不外溢流出盖玻片,并且固定后滤膜能牢牢吸附载玻片和盖玻片为宜。

#### 3.5 降低细菌浓度与菌体荧光强度

细菌浓度越高,相应的荧光强度也会越强,故而适合的细菌浓度是正确识别菌体形态和活性状态

的保证<sup>[9]</sup>。一般情况下,细菌在诱导进入 VBNC 状态前,其细菌总数不应超过  $1 \times 10^7$  个/mL。若细菌浓度过低,诱导进入 VBNC 状态所需时间也会较长。另外,在对标本观察或摄影时,降低细菌浓度,做适量稀释也是一种较好的办法,以荧光显微镜视野下 200 个菌为宜<sup>[10]</sup>。如果视野内细菌数量相当,菌体荧光亮度还是较强,此时应及时降低染料浓度,将染料做适当稀释。

### 3.6 防止荧光减弱或消失

在 1 min 内及时更换观察视野可有效防止菌体荧光淬灭。为使标本可较长时间存放且荧光不消失,细菌受紫外光照射的时间应尽量减少。同时,在观察完毕后应及时用 LIVE/DEAD 试剂盒自带的荧光封片油涂在滤膜与盖玻片之间,连同载玻片一并放在避光处存放。一般标本可在室温中存放 2-3 d,其荧光不会消失。但随着存放时间地延长,VBNC 活菌因未采取永久性固定方式(如化学固定),故其所呈现的绿色荧光也将会发生显著改变,可由绿色变为黄绿色。

## 4 结语

从 2003 年起作者一直从事细菌 VBNC 状态的研究工作。在进行 VBNC 细菌荧光显微镜观察时,通过不断地改良与简化、大量的重复验证,以及与国内相关研究者的交流与探讨,才自建这种稳定、简便、快捷、可靠的检测技术,但其中所涉及的技术问题也较多,望此文提出的技术问题分析及解决

办法能给予相关研究者以帮助和启迪。

## 参考文献

- [1] Xu HS, Robert N, Singleton FL, *et al.* Survival and viability of non-culturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial Ecology*, 1982, **8**(4): 313-323.
- [2] 李影. 大肠杆菌、乳酸杆菌“活的非可培养状态”研究. 吉林农业大学博士学位论文, 2007.
- [3] 李影, 赵云蛟, 钱爱东. 病原菌“活的非可培养状态”检测技术研究进展. 吉林农业大学学报, 2005, **27**(6): 687-690.
- [4] Hobbie JE, Daley RJ, Jasper S. Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 1977, **33**(5): 1225-1228.
- [5] 张森丽. 关于荧光显微镜使用中各种滤色镜波长的书写问题. 神经解剖学杂志, 2000, **16**(1): 78.
- [6] 杨广烈. 荧光与荧光显微镜. 镜光学仪器, 2001, **23**(2): 18-29.
- [7] 杨弘远. 荧光显微镜技术的基本原理与方法. 植物学通报, 1984, **2**(6): 45-48.
- [8] 崔泽实, 郭德伦. 荧光显微镜的功能配置及应用要点. 医疗装备, 2004, **17**(9): 4-6.
- [9] Dunn KW, Mayor S, Myers JN, *et al.* Applications of ratio fluorescence microscopy in the study of cell physiology. *FASEB Journal*, 1994, **8**(6): 573-578.
- [10] 张森丽, 李继硕. 荧光显微镜摄影技术. 神经解剖学杂志, 2000, **16**(3): 125-128.

稿件书写规范

## 论文中有关正、斜体的约定

物种的学名: 菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写, 其余小写, 属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶: 前 3 个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如: *Bam*H I、*Msp* I、*Sau*3A I 等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用 3 个字母表示时, 仅第一个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体, 蛋白质符号首字母大写, 用正体。