

OPTIMALIZACE POSTUPU ANALÝZY FISH PRO IDENTIFIKACI A KVANTIFIKACI BAKTERIÍ V AKTIVOVANÉM KALU

Ing. Lucie Chovancová

Ing. Iveta Růžičková, Ph.D.

VODÁRENSKÁ BIOLOGIE 2017

Cíle práce

- **Optimalizace fixace vzorků pro FISH**
- **Optimalizace kvantifikace bakterií**
- **Vliv použité koncentrace aktivovaného kalu na výsledky kvantifikace bakterií**

Fluorescenční *in situ* hybridizace

5' 3'

GATCCGAATGCATTGTACGATGAGCTCTAGTCA

A horizontal black line represents a DNA strand. Below it, the sequence GATCCGAATGCATTGTACGATGAGCTCTAGTCA is written in multi-colored letters. The 'GATCC' and 'GAGCT' parts are green, while 'GAATGCATTGTAC' and 'CTAGTCA' are red.

AACATGCTACT

3' 5'

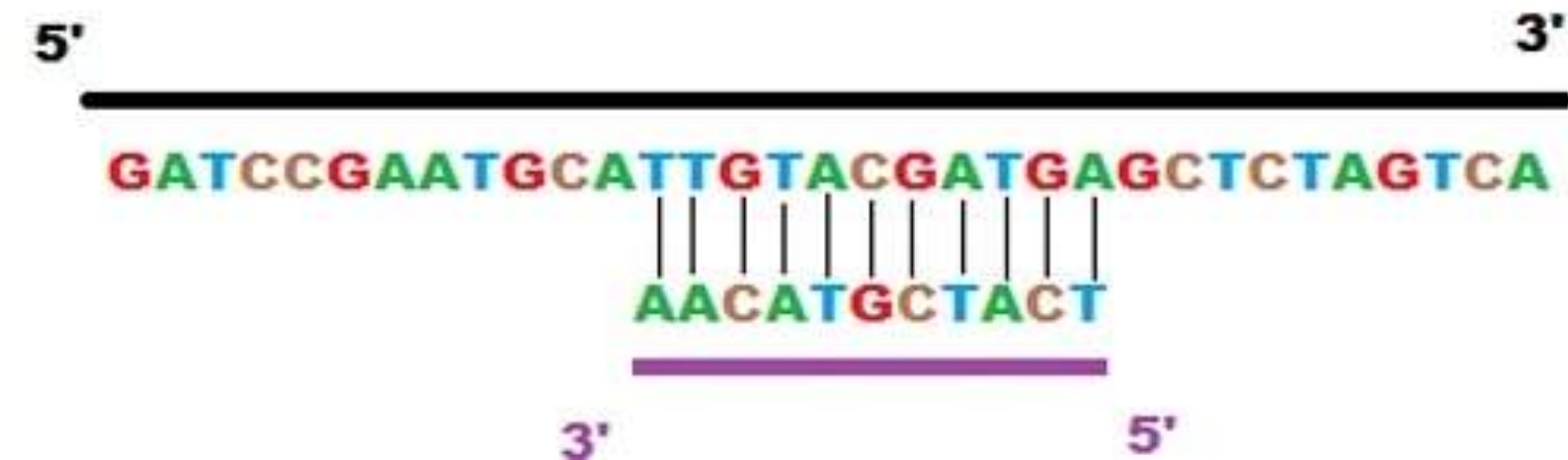
A purple horizontal line represents a probe. Above it, the sequence AACATGCTACT is written in multi-colored letters. The 'AACAT' part is green and 'GCTACT' is red. Below the line, '3'' is on the left and '5'' is on the right.

5' 3'

GATCCGAATGCATTGTACGATGAGCTCTAGTCA

AACATGCTACT

3' 5'

The diagram shows the same DNA strand as above. The probe AACATGCTACT is now hybridized to the target sequence. Vertical lines connect the probe to the target sequence. The probe is written in multi-colored letters (AACAT in green, GCTACT in red) and is positioned below the target sequence. A purple horizontal line is below the probe. The orientation '3' and '5'' is indicated at the bottom.

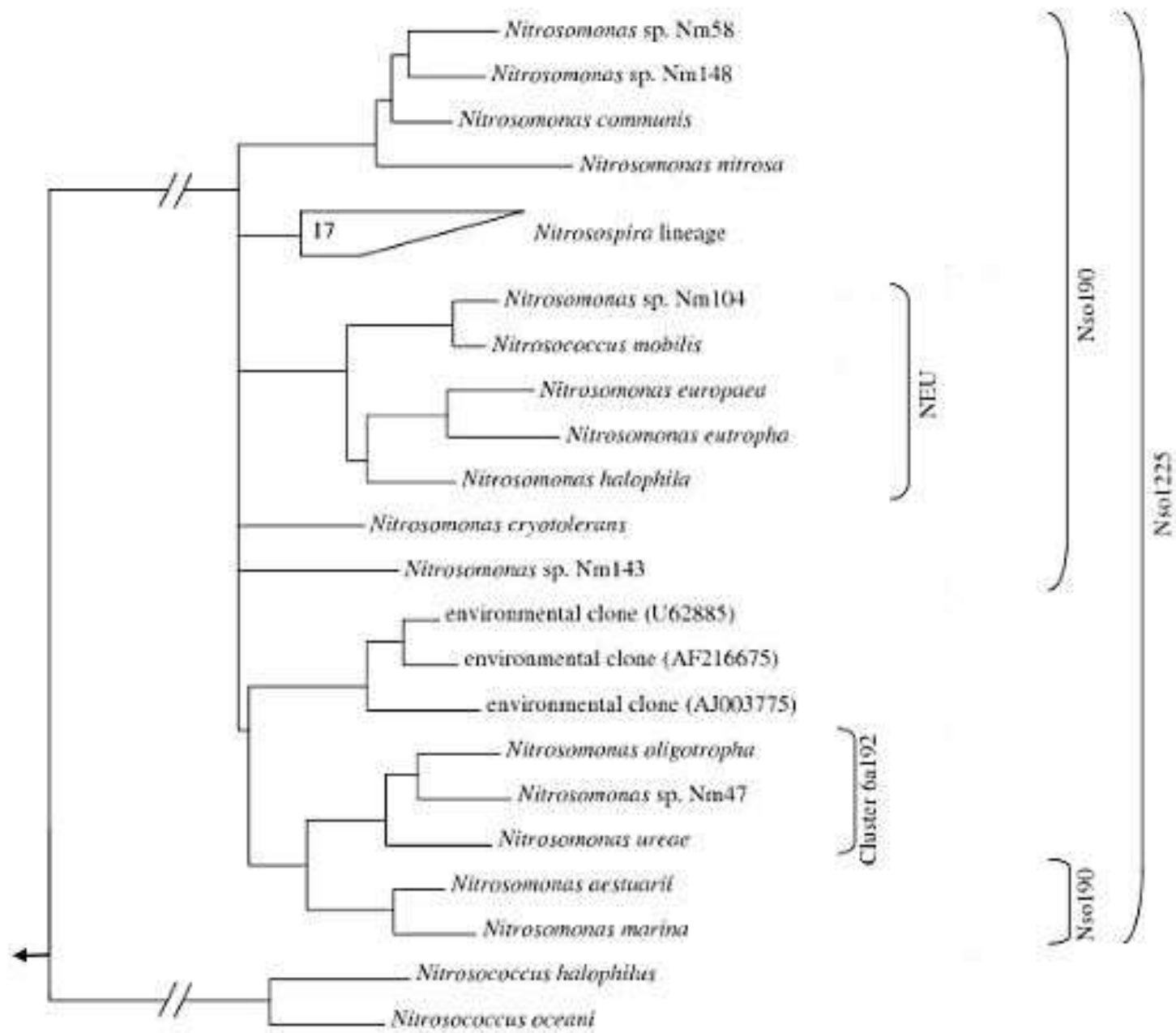
FISH analýza

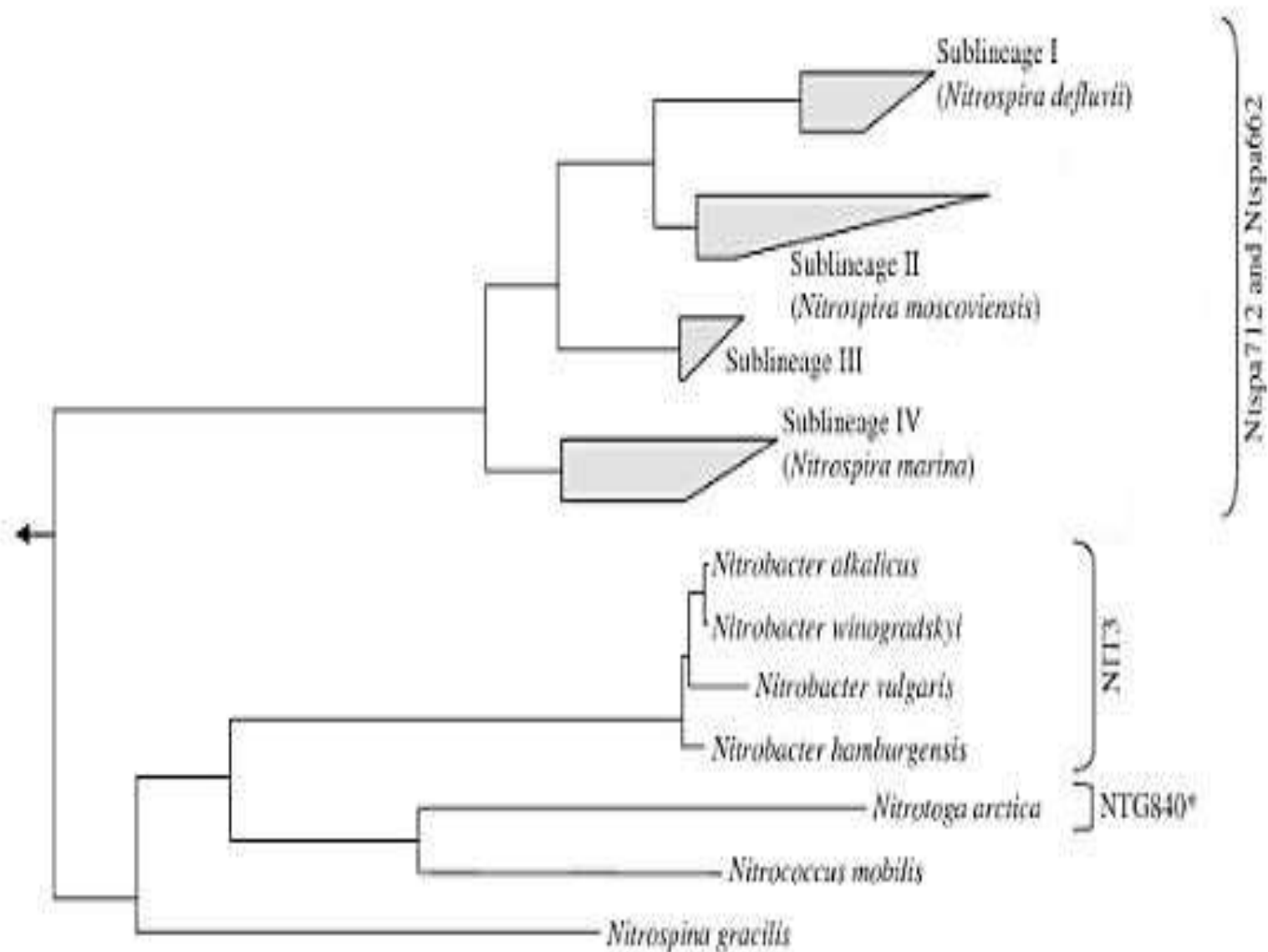
The background of the slide is a fluorescence microscopy image. It shows several clusters of cells. The nuclei of the cells are stained with a blue dye, likely DAPI, which highlights the DNA. Superimposed on these are bright red signals, which represent the localization of specific DNA sequences as detected by Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). The red signals appear as distinct, bright spots or clusters within the blue-stained nuclei.

- **Fixace vzorků aktivovaného kalu (PFA)**
- **Fluorescenční *in situ* hybridizace**
- **Identifikace – mikroskopická analýza**
- **Kvantifikace – obrazová analýza**

Identifikace – mikroskopická analýza

- Detekce signálu
- Použitá fluorescenční barviva
 - Nitrifikační bakterie – barvivo Cy3
 - Veškerá biocenóza – barvivo DAPI
- Použité sondy
 - NSO_mix
 - Clu6a192
 - Ntspa_mix
 - NIT3

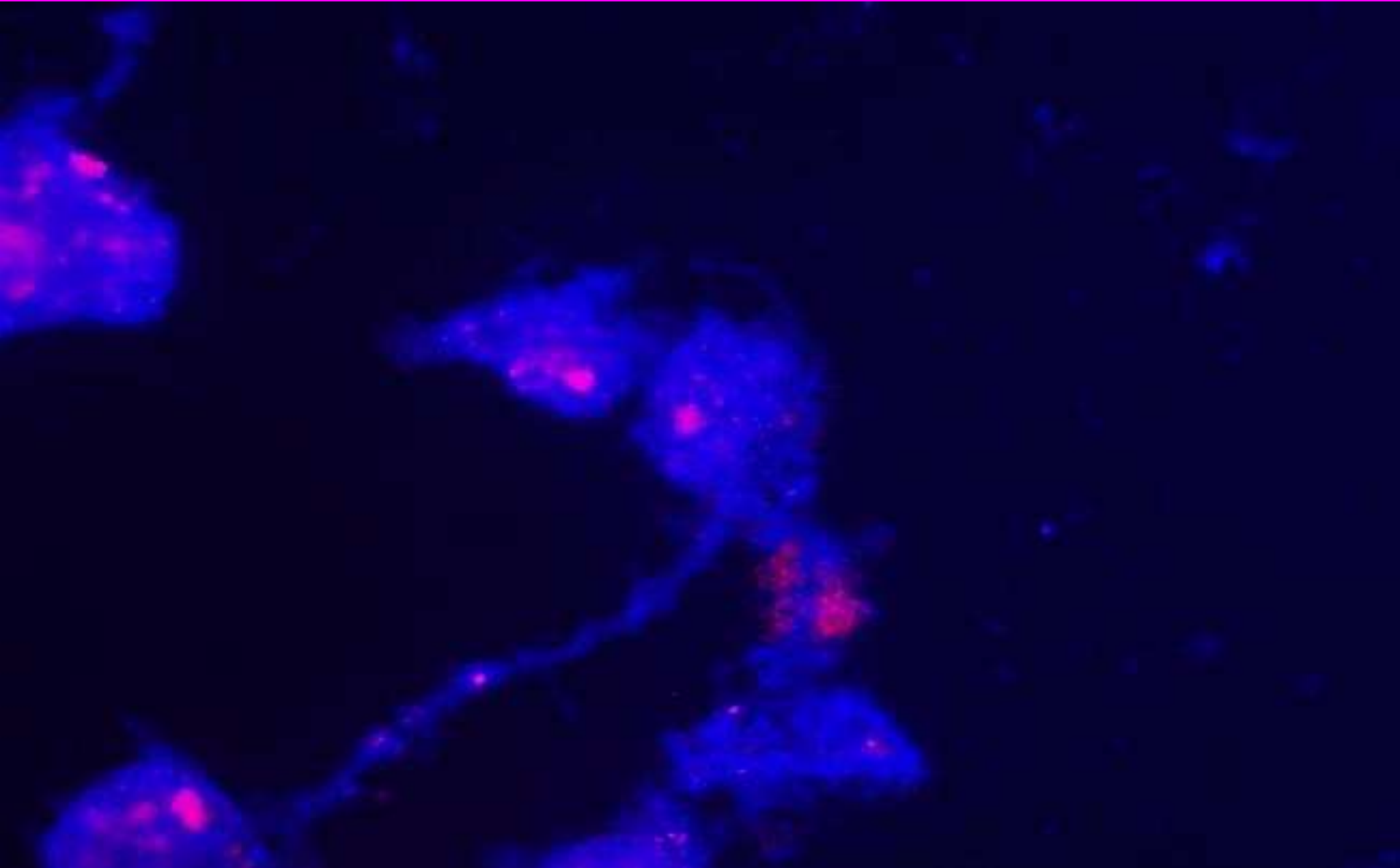




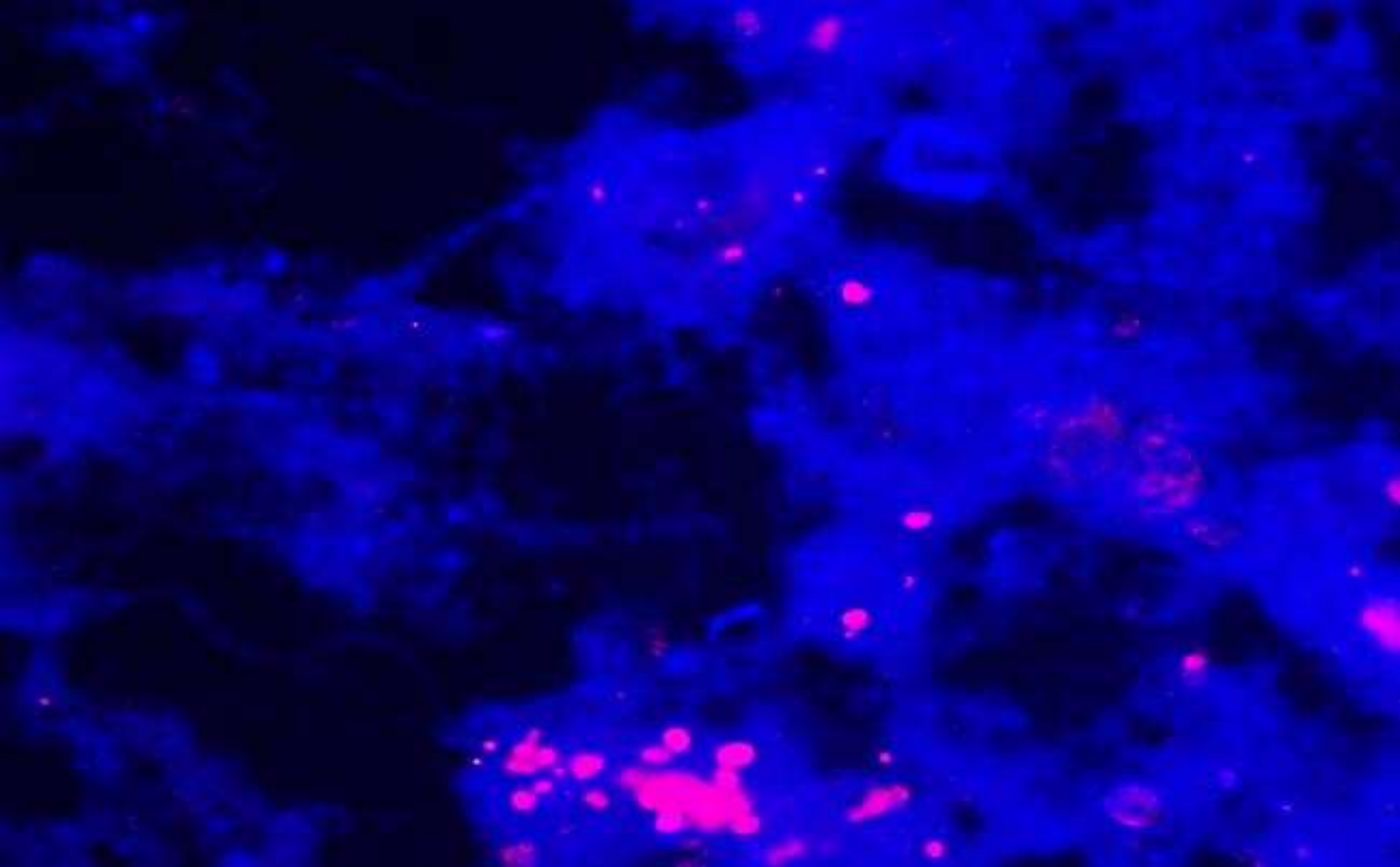
Identifikace – mikroskopická analýzy

- **Tvar a velikost klastrů**
 - malé (pod 15 μm)
 - střední (15 – 30 μm)
 - velké (nad 30 μm)
 - kompaktní
 - řídké
- **Množství volných bakterií**
 - 0 – nepřítomnost
 - 1 – ojedinělý výskyt
 - 2 – hojný výskyt
 - 3 – nadměrný výskyt

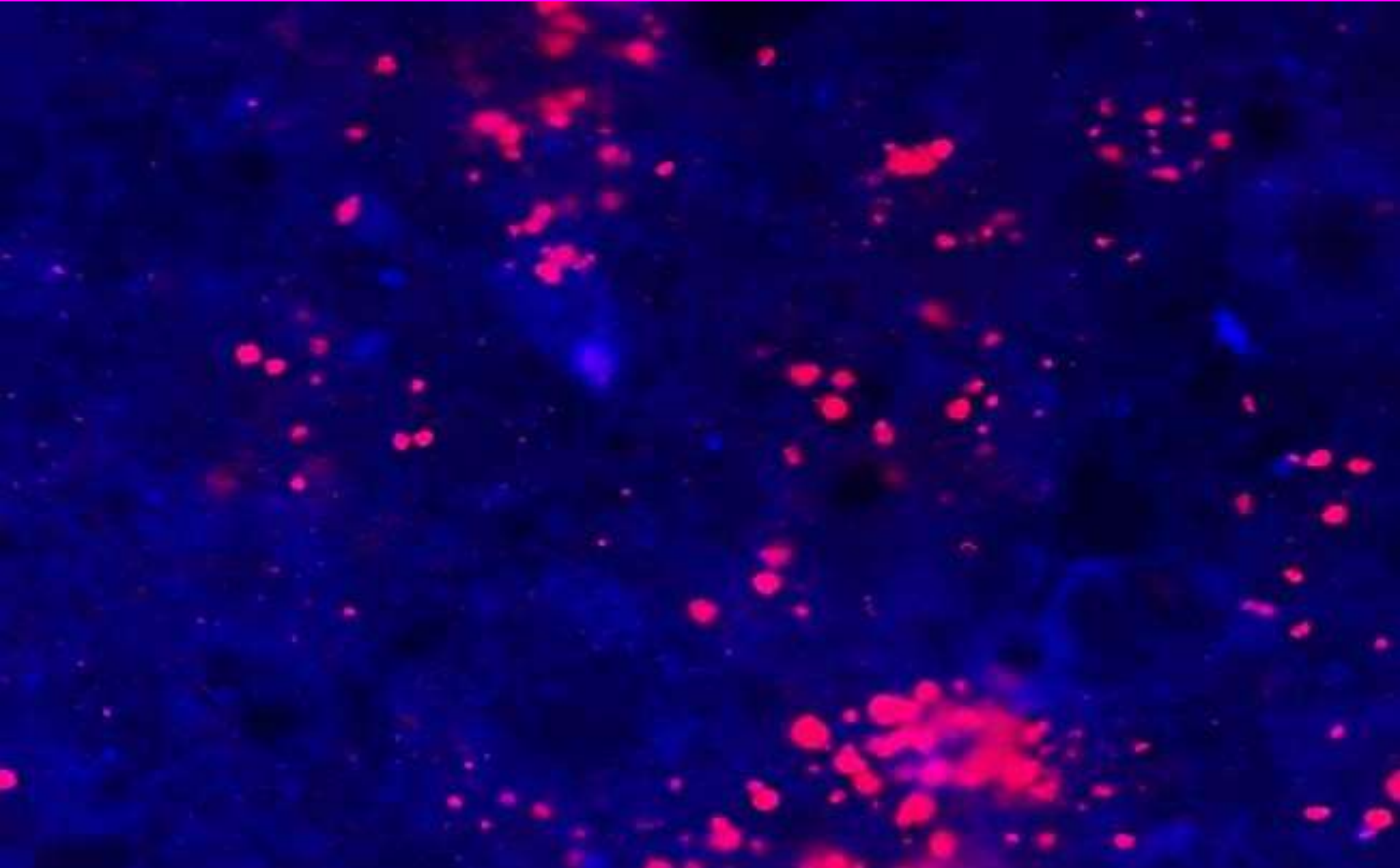
Klastry nitritačních bakterií detekovaných sondou NSO_mix (růžové, barvivo Cy3) a celková biomasa (modrá, barvivo DAPI), vzorek z 08. 11. 2016, pozorovaný při 320x zvětšení.



Klastry nitritačních bakterií detekovaných sondou Clu6a192 (růžové, barvivo Cy3) a celková biomasa (modrá, barvivo DAPI), vzorek z 18. 01. 2015, pozorovaný při 320x zvětšení.



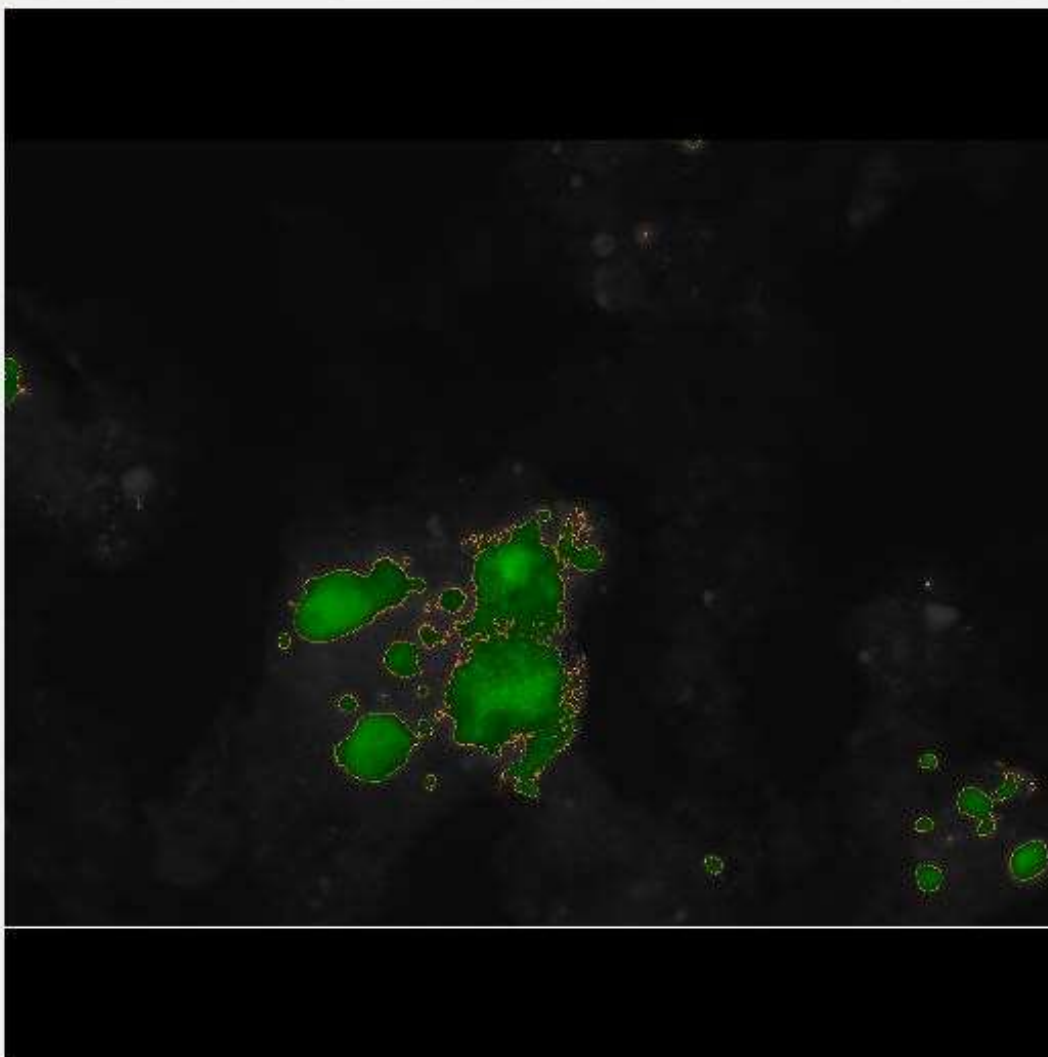
Klastry nitratačních bakterií detekovaných sondou Ntspa_mix (růžové, barvivo Cy3) a celková biomasa (modrá, barvivo DAPI), vzorek z 22. 01. 2015, pozorovaný při 320x zvětšení.



Kvantifikace – obrazová analýza

- Program Daime
- Segmentace objektů
 - Odlišné zabarvení (Cy3 + DAPI)
- Procentuální vyjádření plochy, kterou zaujmají nitrifikační bakterie z plochy celkové biomasy

Segmentace jednotlivých klastrů




Objects Classes

Object counts

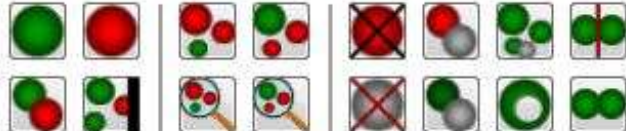
Objects in image:	63
Selected:	63
Rejected:	0
Object size (pixels):	0

Object appearance

Show custom colors 


Show object borders

Object tools



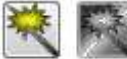
In all images

Region of interest



None


Magic wand



Tolerance: 70%

In whole image(s)

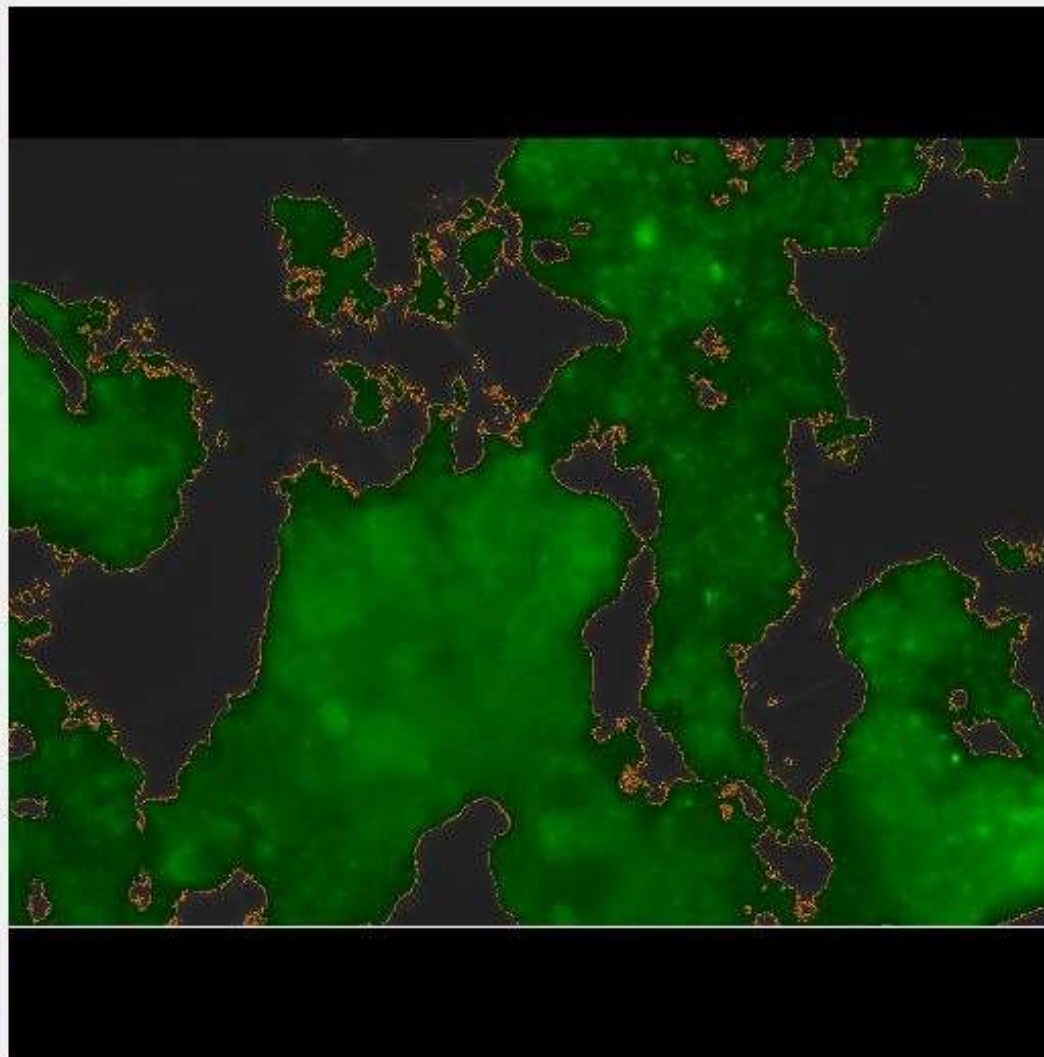
Save / Load



OK

Cancel

Segmentace celkové biomasy




25

Objects Classes

Object counts

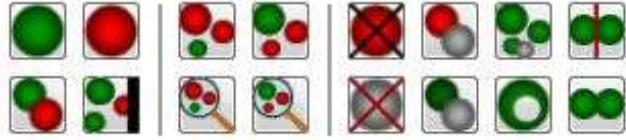
Objects in image:	87
Selected:	87
Rejected:	0
Object size (pixels):	0

Object appearance

Show custom colors 


Show object borders

Object tools





In all images

Region of interest



None



Magic wand



Tolerance: 70%

In whole image(s)

Save / Load



OK Cancel

OPTIMALIZACE FIXACE VZORKŮ

	Nielsen	Amann I	Amann II	Benáková I	Benáková II
Vzorek + 4% PFA	poměr 1:3	poměr 1:3	poměr 1:3	poměr 1:3	poměr 1:3
Inkubace	3 hodiny při 4 °C	3 hodiny při 4 °C	3 hodiny při 4 °C	3 hodiny při RT	do dalšího dne při 4 °C
Centrifugace I	3500 g 8 min	5000 g 5 min	5000 g 5 min	14000 g 5 min	14000 g 5 min
Promýt peletu	PBS/EtOH 1:1		1xPBS	1xPBS	1xPBS
Centrifugace II	3500 g 8 min		5000 g 5 min	14000 g 2 min	14000 g 2 min
Resuspendovat peletu	PBS/EtOH 1:1	1xPBS	1xPBS	PBS/EtOH 1:1	PBS/EtOH 1:1
Ethanol		1 obj. podíl EtOH	1 obj. podíl EtOH		
Skladovat	při - 20 °C	při - 20 °C	při - 20 °C	při - 20 °C	při - 20 °C

OPTIMALIZACE FIXACE VZORKŮ

	NSO_mix [%]	Clu6a192 [%]
Nielsen	5,7	4,0
Benáková I	4,5	3,5
Amann II	4,4	3,2
Benáková II	4,2	3,2
Amann I	3,6	2,4

OPTIMALIZACE FIXACE VZORKŮ

	Nielsen	Amann I	Amann II	Benáková I	Benáková II
Vzorek + 4% PFA	poměr 1:3	poměr 1:3	poměr 1:3	poměr 1:3	poměr 1:3
Inkubace	3 hodiny při 4 °C	3 hodiny při 4 °C	3 hodiny při 4 °C	3 hodiny při RT	do dalšího dne při 4 °C
Centrifugace I	3500 g 8 min	5000 g 5 min	5000 g 5 min	14000 g 5 min	14000 g 5 min
Promýt peletu	PBS/EtOH 1:1		1xPBS	1xPBS	1xPBS
Centrifugace II	3500 g 8 min		5000 g 5 min	14000 g 2 min	14000 g 2 min
Resuspendovat peletu	PBS/EtOH 1:1	1xPBS	1xPBS	PBS/EtOH 1:1	PBS/EtOH 1:1
Ethanol		1 obj. podíl EtOH	1 obj. podíl EtOH		
Skladovat	při - 20 °C	při - 20 °C	při - 20 °C	při - 20 °C	při - 20 °C

Optimalizace kvantifikace nitrifikačních bakterií

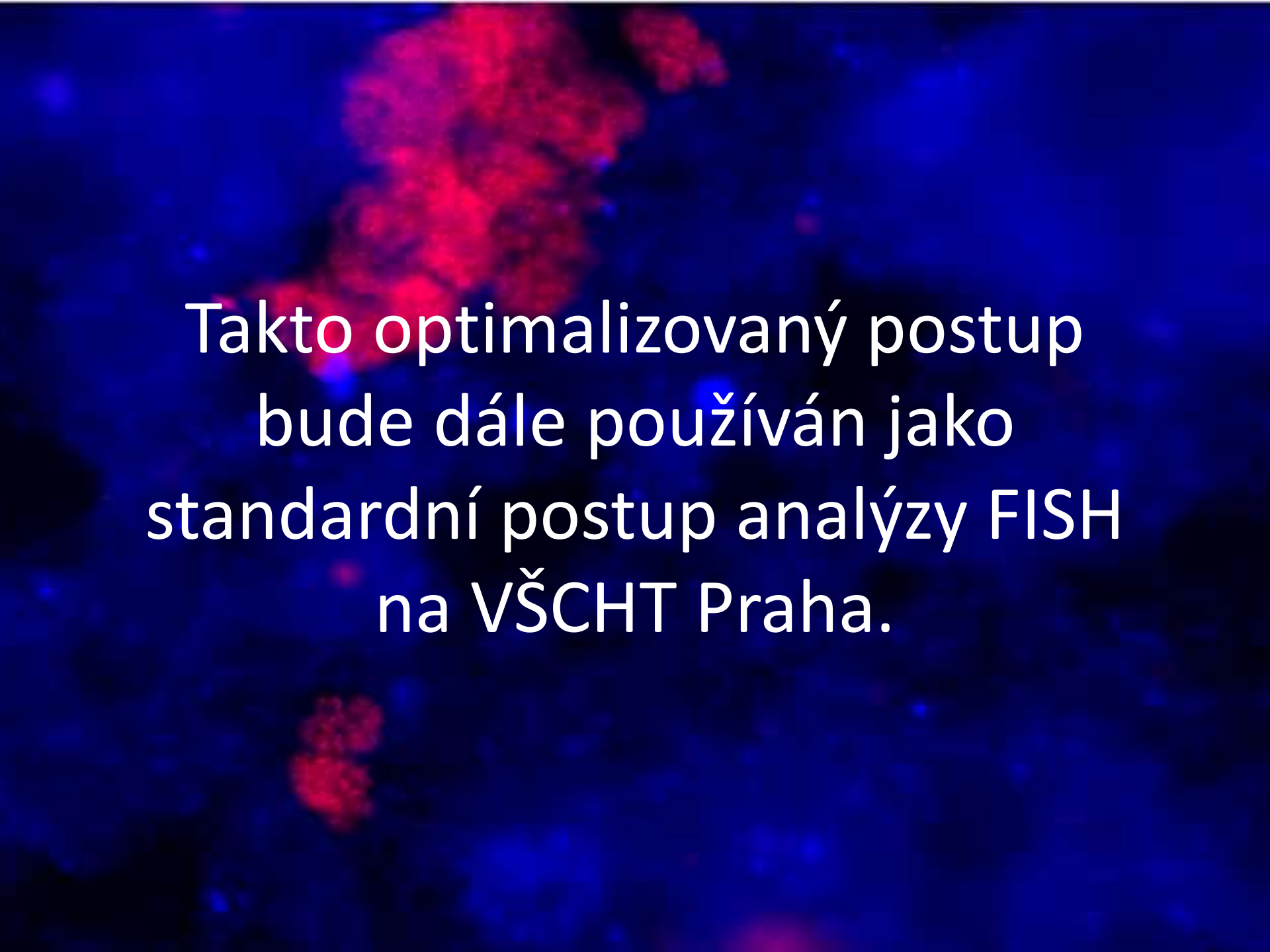
	čOV A	čOV B	čOV C	čOV D
Série	NSO_mix [%]			
50	7,9	8,5	12,6	26,2
40	7,8	8,5	12,2	25,6
30	7,7	8,5	12,9	26,5
Série	Ntspa_mix [%]			
50	3,7	6,3	10,0	14,7
40	3,7	6,3	10,2	15,1
30	3,6	6,3	9,9	14,6

Vliv použité sušiny na výsledky kvantifikace

Sušina [g/l]	NSO_mix [%]	Clu6a192 [%]
0,5	-	-
3,5	3,8	2,5
4,5	3,9	2,5
5,5	3,5	2,4
6,5	4,0	2,4
7,5	4,1	2,3
10,5	3,9	2,5

Závěr z optimalizace

- **Vzorky aktivovaného kalu budou pro další analýzy fixovány podle Nielsena**
- **Pro spolehlivé výsledky z kvantifikace jsou postačující série 30 fotografií**
- **Sušina vzorků nemusí být před analýzou nijak upravována, sušina neovlivňuje výsledky kvantifikace**

The background of the slide is a fluorescence microscopy image. It shows several clusters of cells. Some cells are brightly stained in red, while others are stained in blue. The overall background is dark, making the red and blue signals stand out. The text is overlaid on this image.

Takto optimalizovaný postup
bude dále používán jako
standardní postup analýzy FISH
na VŠCHT Praha.



DĚKUJI ZA POZORNOST!