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

Ing. Lucie Chovancová

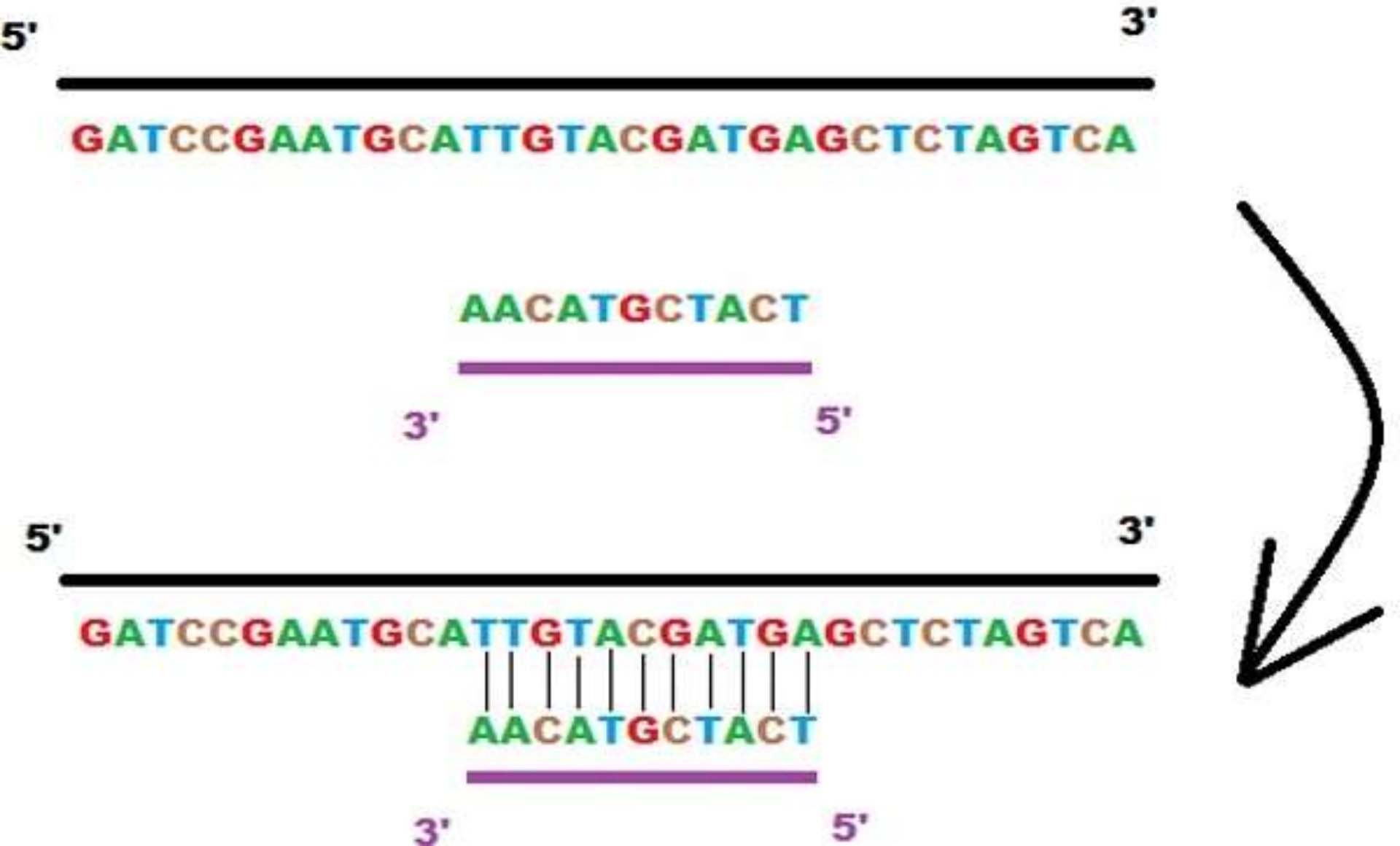
Ing. Iveta Růžičková, Ph.D.

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

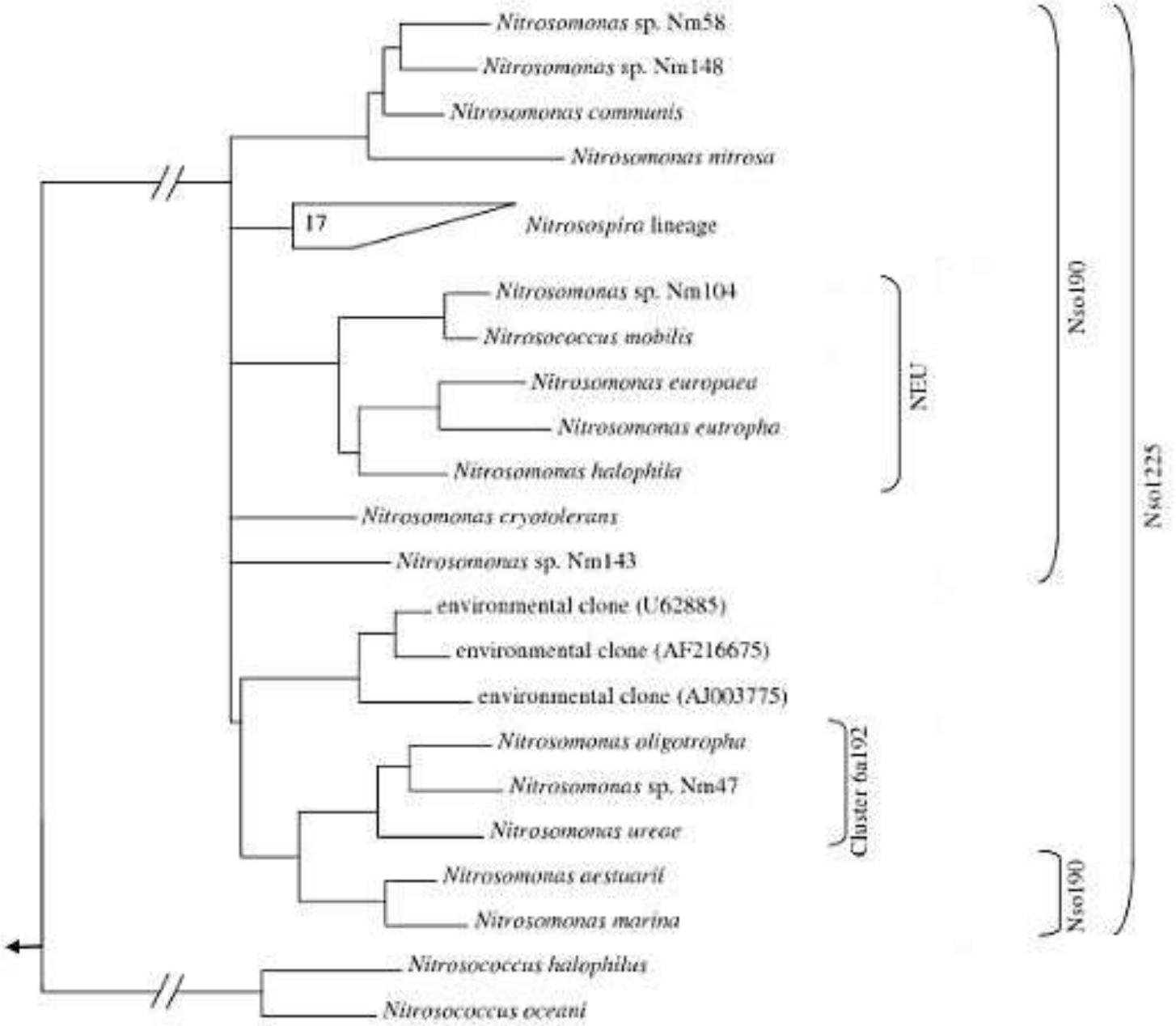


FISH analýza

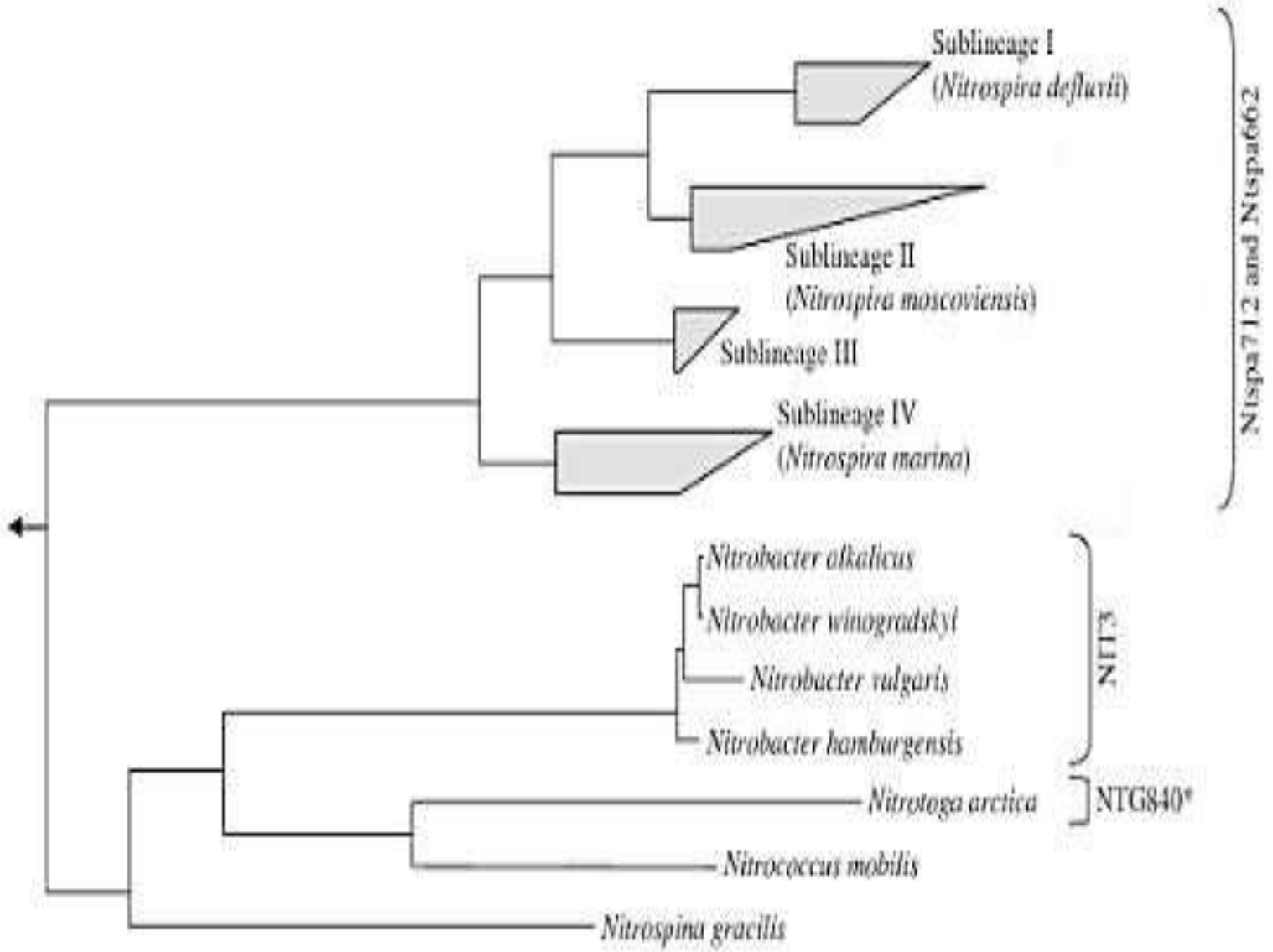
- Fixace vzorků aktivovaného kalu (PFA)
- Fluorescenční *in situ* hybridizace
- Identifikace – mikroskopická analýza
- Kvantifikace – obrazová analýza

Identifikace – mikroskopická analýza

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



P. H. Nielsen, H. Daims a H. Lemmer, FISH Handbook for Biological Wastewater Treatment, London: IWA Publishing, 2009.

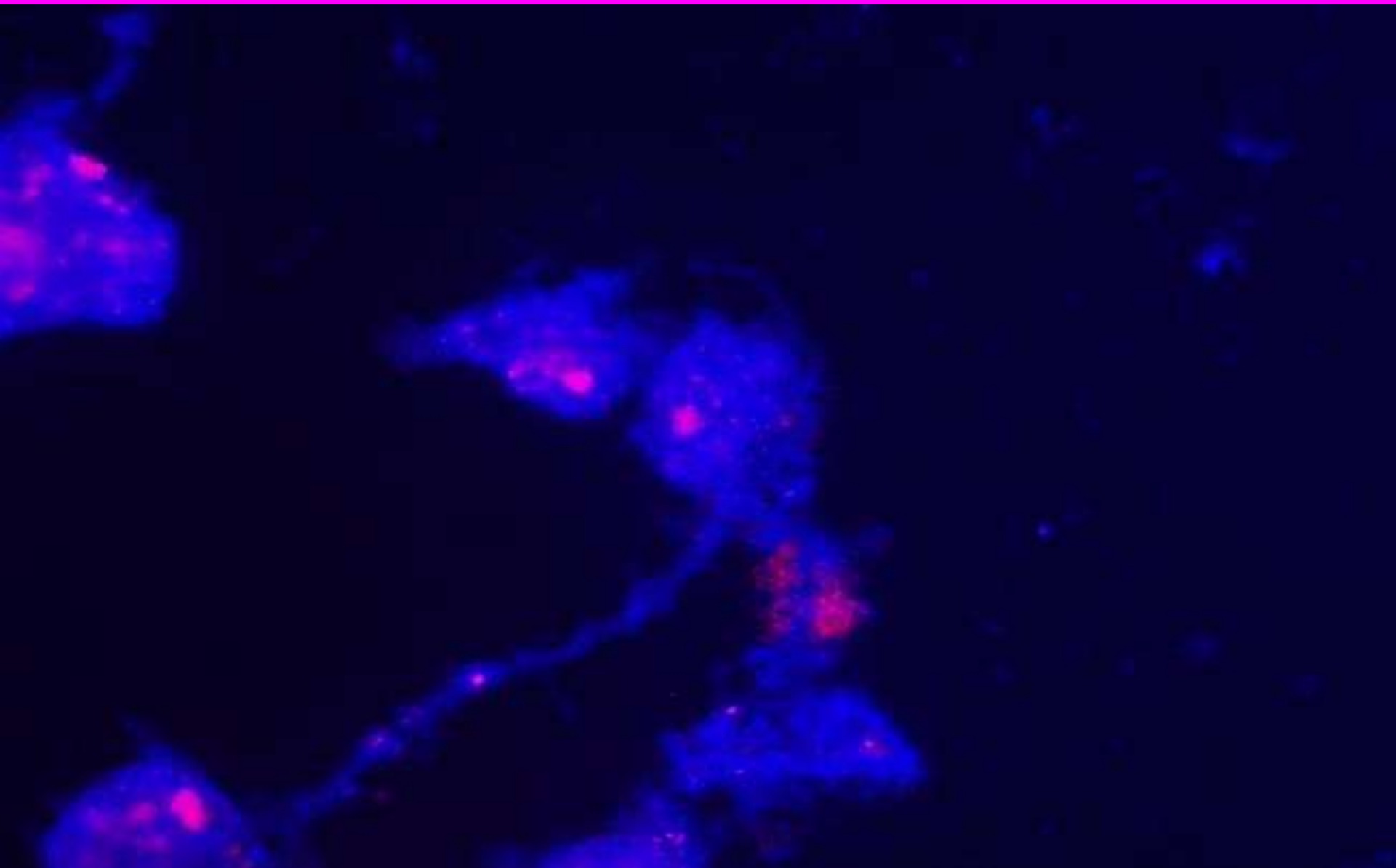


P. H. Nielsen, H. Daims a H. Lemmer, FISH Handbook for Biological Wastewater Treatment, London: IWA Publishing, 2009.

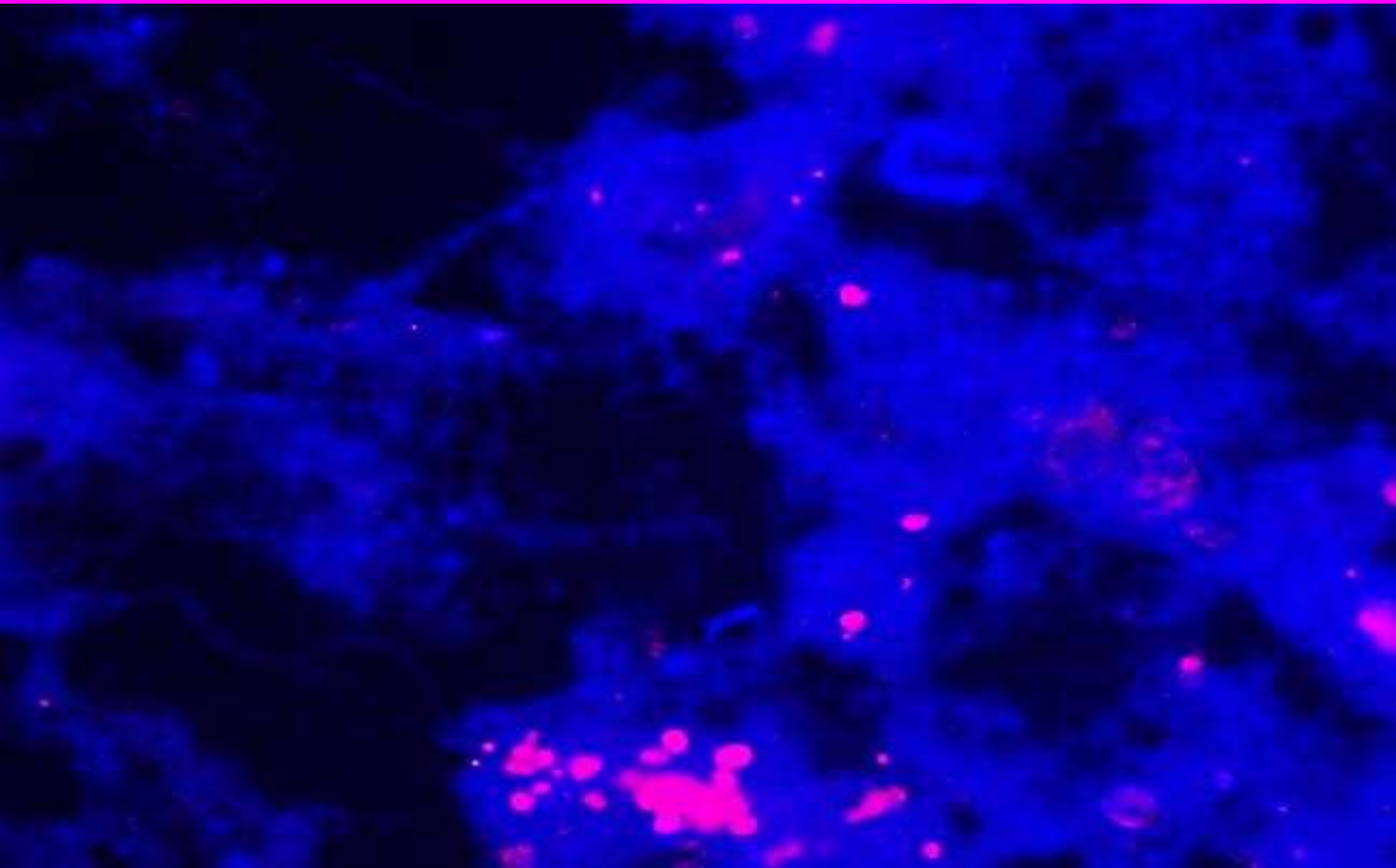
Identifikace – mikroskopická analýzy

- 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

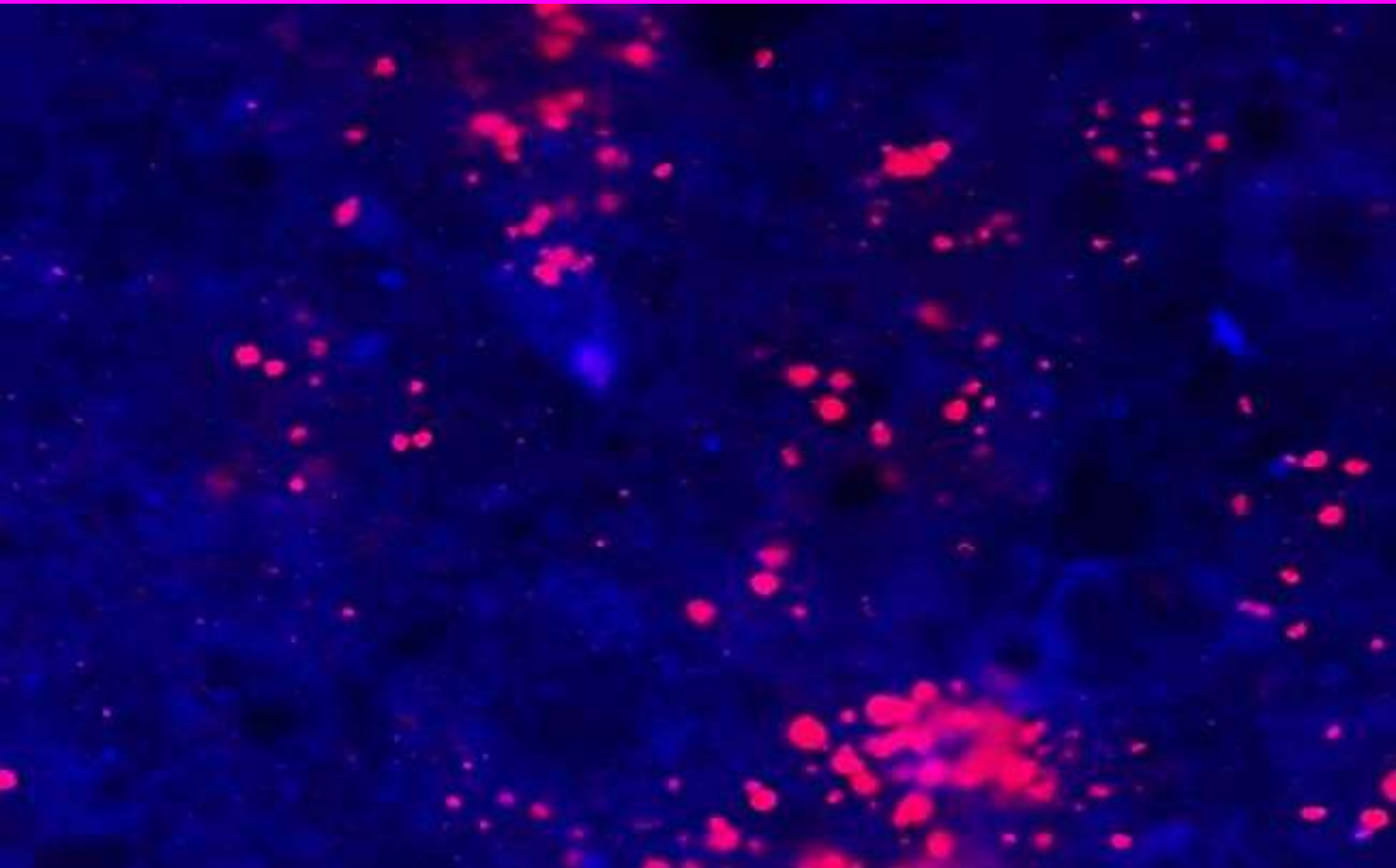
Klastry nitritačních bakterií detekovaných sondou NSO_mix (růžové, barvivo Cy3) a celková biomasa (modrá, barvivo DAPI), vzorek z 08. 11. 2016, pozorovaný při 320x zvětšení.



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

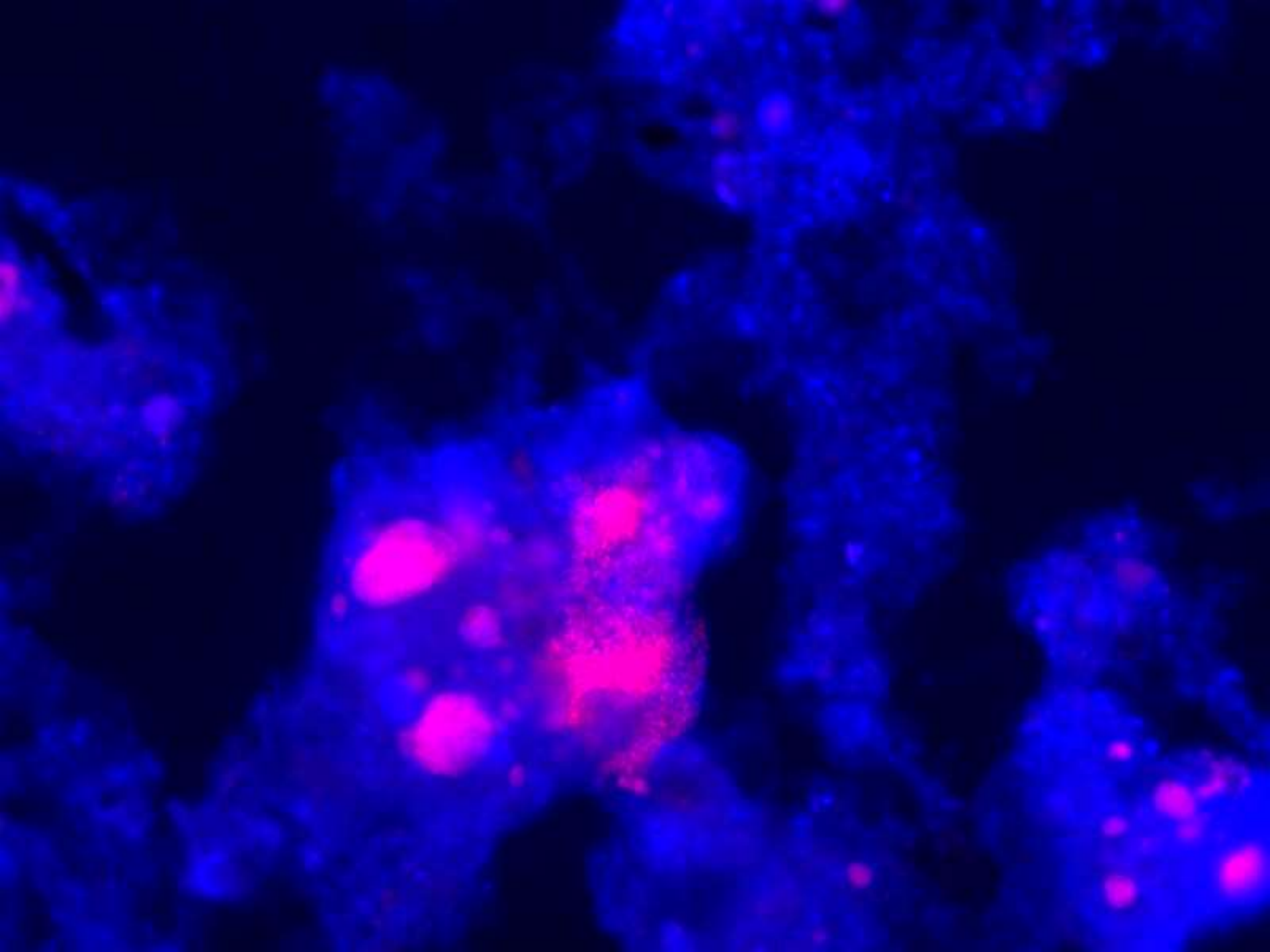


Klastry nitratačních bakterií detekovaných sondou Ntspa_mix (růžové, barvivo Cy3) a celková biomasa (modrá, barvivo DAPI), vzorek z 22. 01. 2015, pozorovaný při 320x zvětšení.

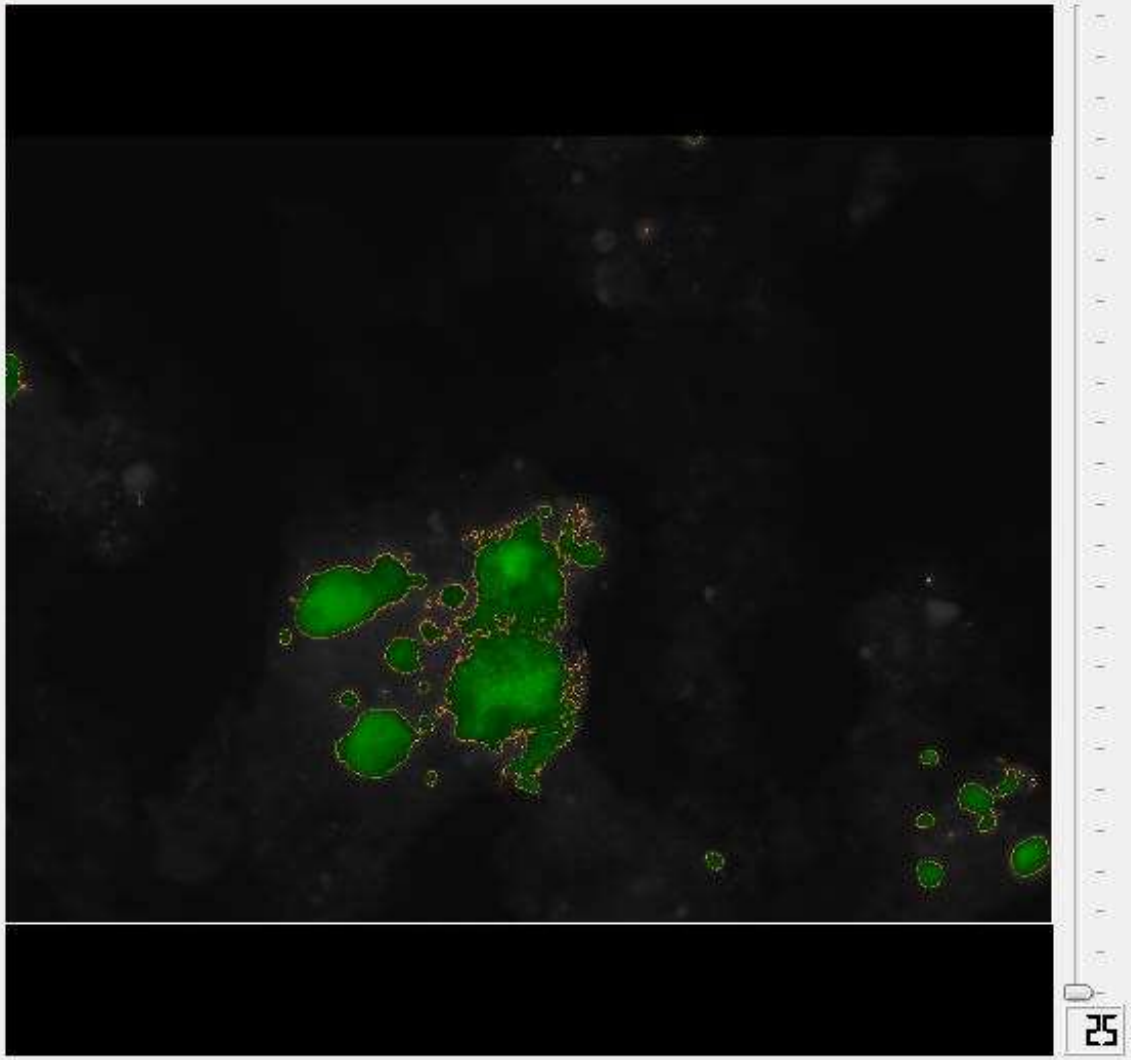


Kvantifikace – obrazová analýza

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



Segmentace jednotlivých klastrů



25

Objects | Classes

Object counts

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

Object appearance

- [ ] Show custom colors
- [x] Show object borders

Object tools

- [ ] In all images

Region of interest

None

Magic wand

Tolerance: 70%

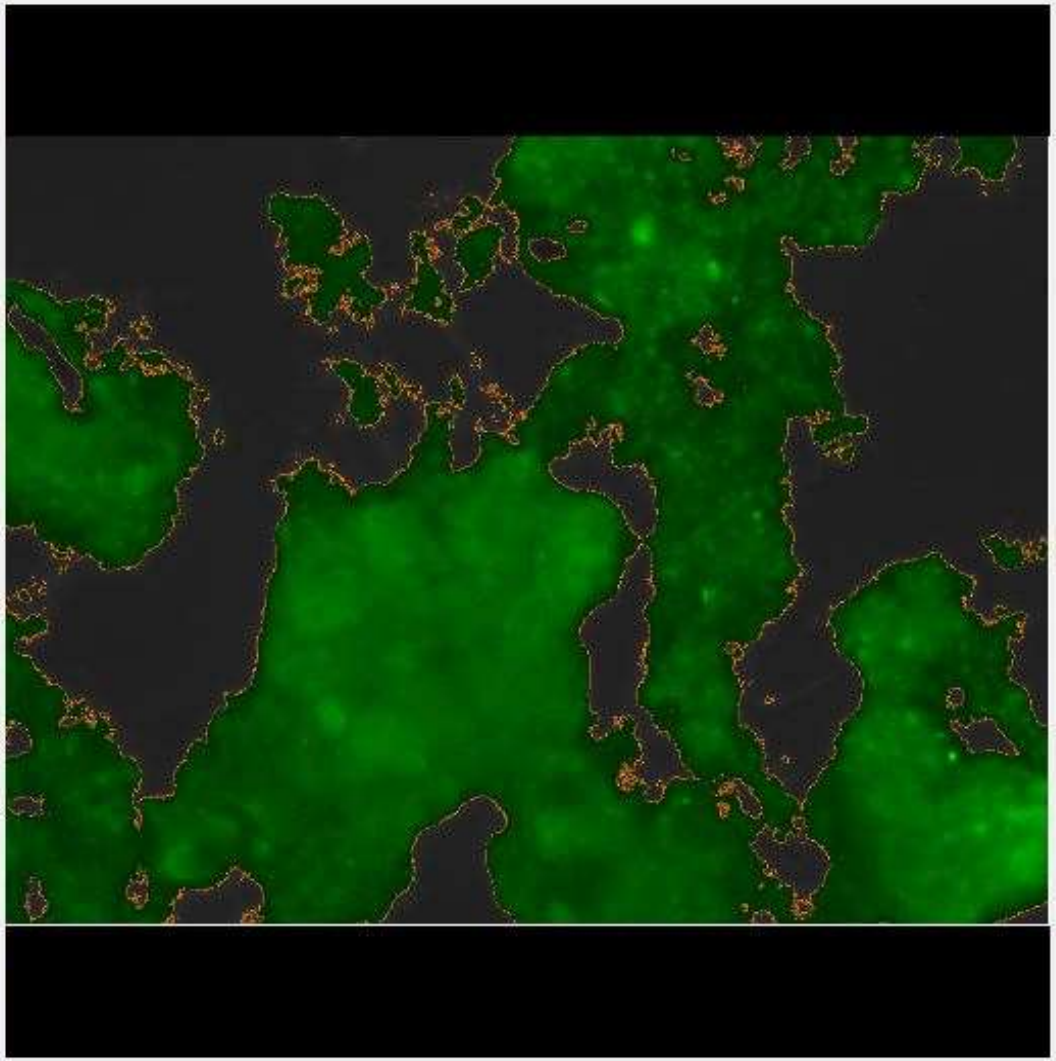
- [ ] In whole image(s)

Save / Load

TEMP TEMP

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
- [x] Show object borders

Object tools

- [ ] In all images

Region of interest

None

Magic wand

Tolerance: 70%

- [ ] In whole image(s)

Save / Load

TEMP TEMP

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

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

DĚKUJI ZA POZORNOST!