




DETEKCE POLY-P BAKTERIÍ V AKTIVOVANÉM KALU

Ing. Lucie Chovancová
Ing. Iveta Růžičková, Ph.D.
VODÁRENSKÁ BIOLOGIE 15

Cíle práce

- Optimalizace identifikace poly-P bakterií v aktivovaném kalu
- Optimalizace kvantifikace poly-P bakterií v aktivovaném kalu
 - Neisserovo barvení
 - Fluorescenční *in situ* hybridizace

Neisserovo barvení

- **Methylénová modř**
 - **Krystalová violet'**
 - **Důkaz polyfosfátů v buňce**
 - **Bismarkova hněd'**
 - **Neisser (+) – poly-P bakterie**
 - **Neisser (-)**
- 

Neisserovo barvení



- **Identifikace**

- **Obarvené preparáty sledovány v přímém světle pod mikroskopem při 750x zvětšení**
- **Poly-P bakterie – typické hroznovité shluky tmavomodré barvy**

Neisserovo barvení

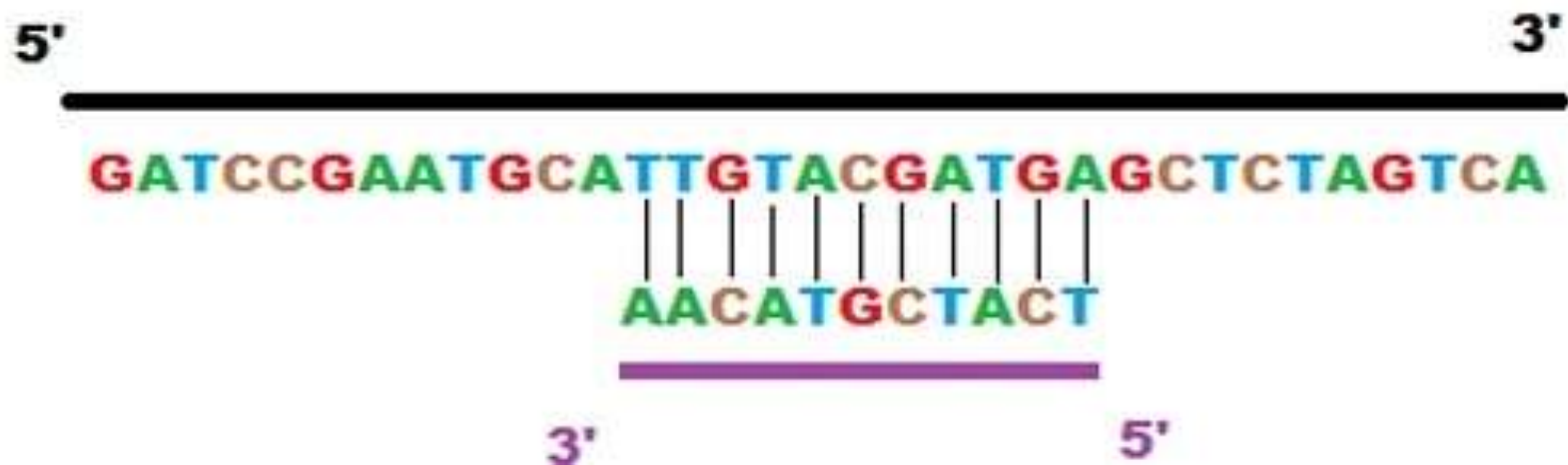
A microscopic image showing Gram-stained Neisseria meningitidis. The bacteria appear as purple-stained pairs of cocci (diplococci) with a thin layer of pink-stained capsule. The background is a light pinkish-purple color.

- **Kvantifikace**

- 20 náhodných polí
- malé (do 10 μm) klastry X 1
- střední (10 – 20 μm) X 3
- velké (nad 20 μm) klastry X 5

ČOV A	VZOREK 1	VZOREK 2
Malé klastry	34	40
X 1	34	40
Střední klastry	45	32
X 3	135	96
Velké klastry	1	5
X 5	5	25
Součet	174	161
Průměr	167,5	

Fluorescenční *in situ* hybridizace

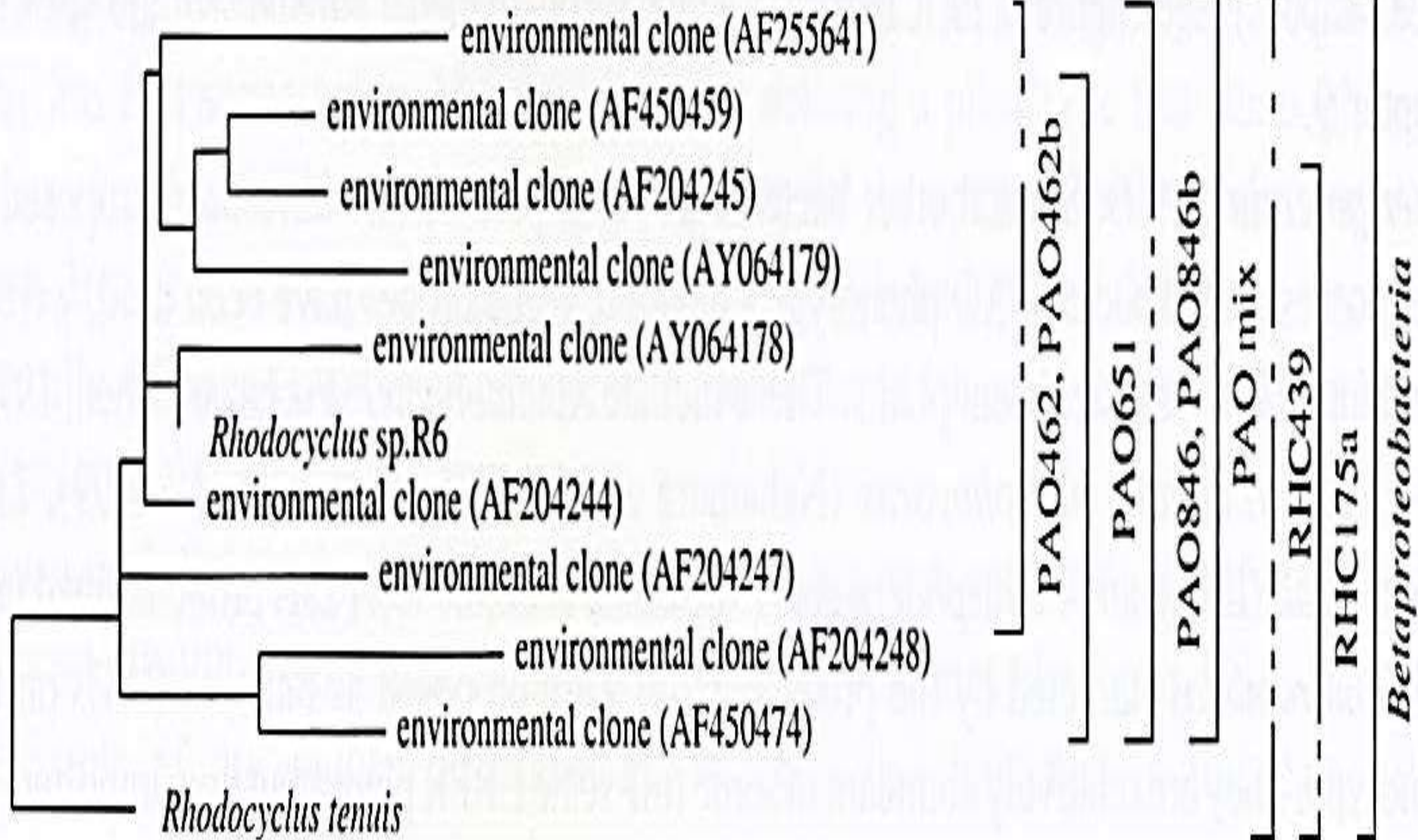


Fluorescenční *in situ* hybridizace

- **Identifikace**
 - Detekce signálu v epifluorescenčním mikroskopu při 320x zvětšení
 - Použitá fluorescenční barviva
 - Poly-P bakterie – barvivo Cy3
 - Veškerá biocenóza – barvivo DAPI

	Genové sondy	Cílová bakterie	Specifická sekvence (5'-3')
PAO-mix	PAO462	Většina <i>Accumulibacter</i>	CCGTCATCTACWCAGGGGTATTAAC
	PAO651	Většina <i>Accumulibacter</i>	CCCTCTGCCAAACTCCAG
	PAO846	Většina <i>Accumulibacter</i>	GTTAGCTACGGCACTAAAAGG
PAOb-mix	PAO462b	Většina <i>Accumulibacter</i>	CCGTCATCTRCWCAGGGGTATTAAC
	PAO846b	Většina <i>Accumulibacter</i>	GTTAGCTACGGYACTAAAAGG
RHC-mix	RHC439	<i>Rhodocyclus/</i> <i>Accumulibacter</i>	CNATTTCTTCCCCGCCGA
	RHC175a	<i>Rhodocyclaceae</i>	TGCTCACAGAATATGCGG

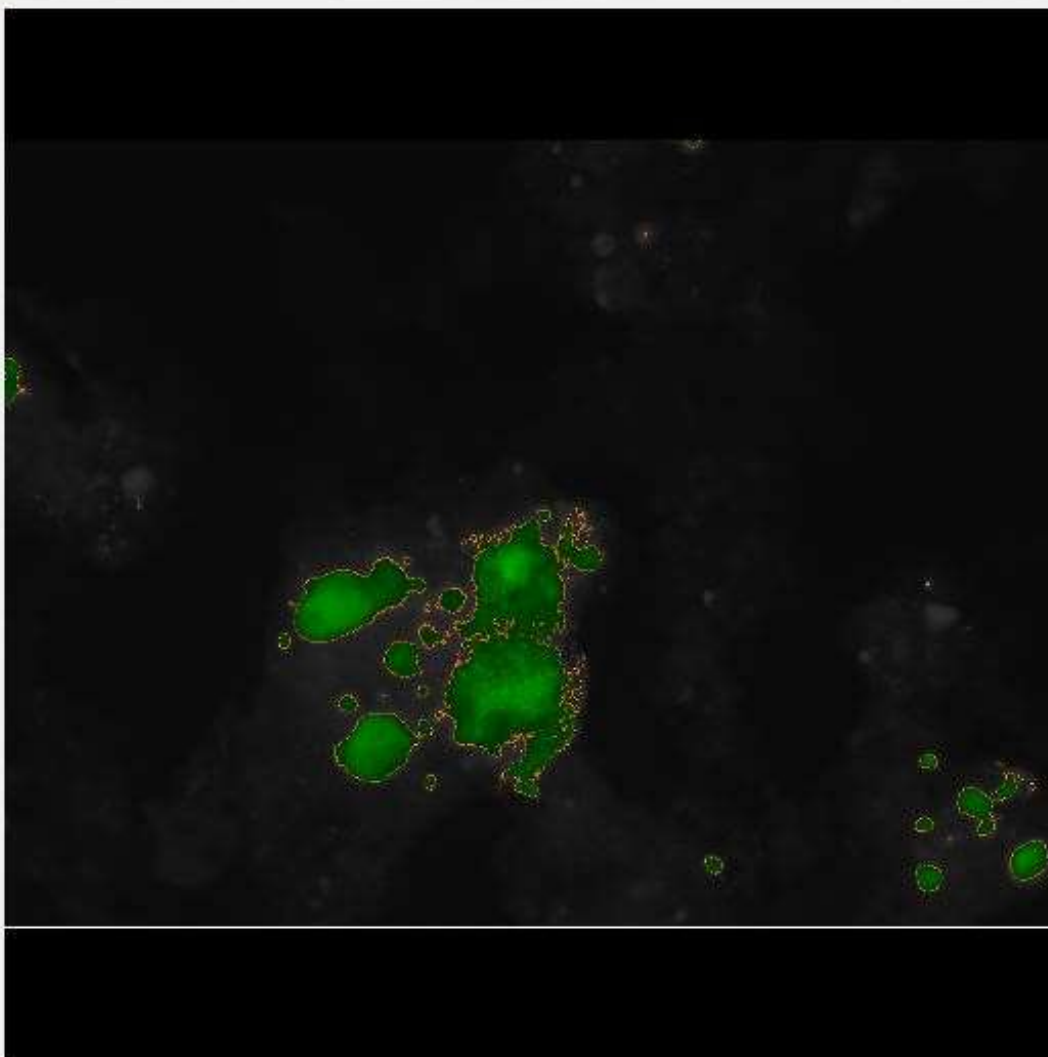
Fluorescenční *in situ* hybridizace



Kvantifikace – obrazová analýza

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

Segmentace jednotlivých klastrů




Objects Classes

Object counts

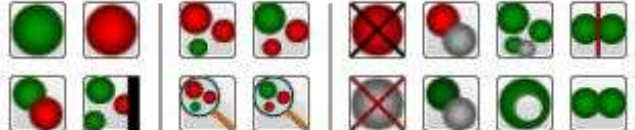
Objects in image:	63
Selected:	63
Rejected:	0
Object size (pixels):	0

Object appearance

Show custom colors 


Show object borders

Object tools




In all images

Region of interest


 None

Magic wand

 Tolerance: 70%

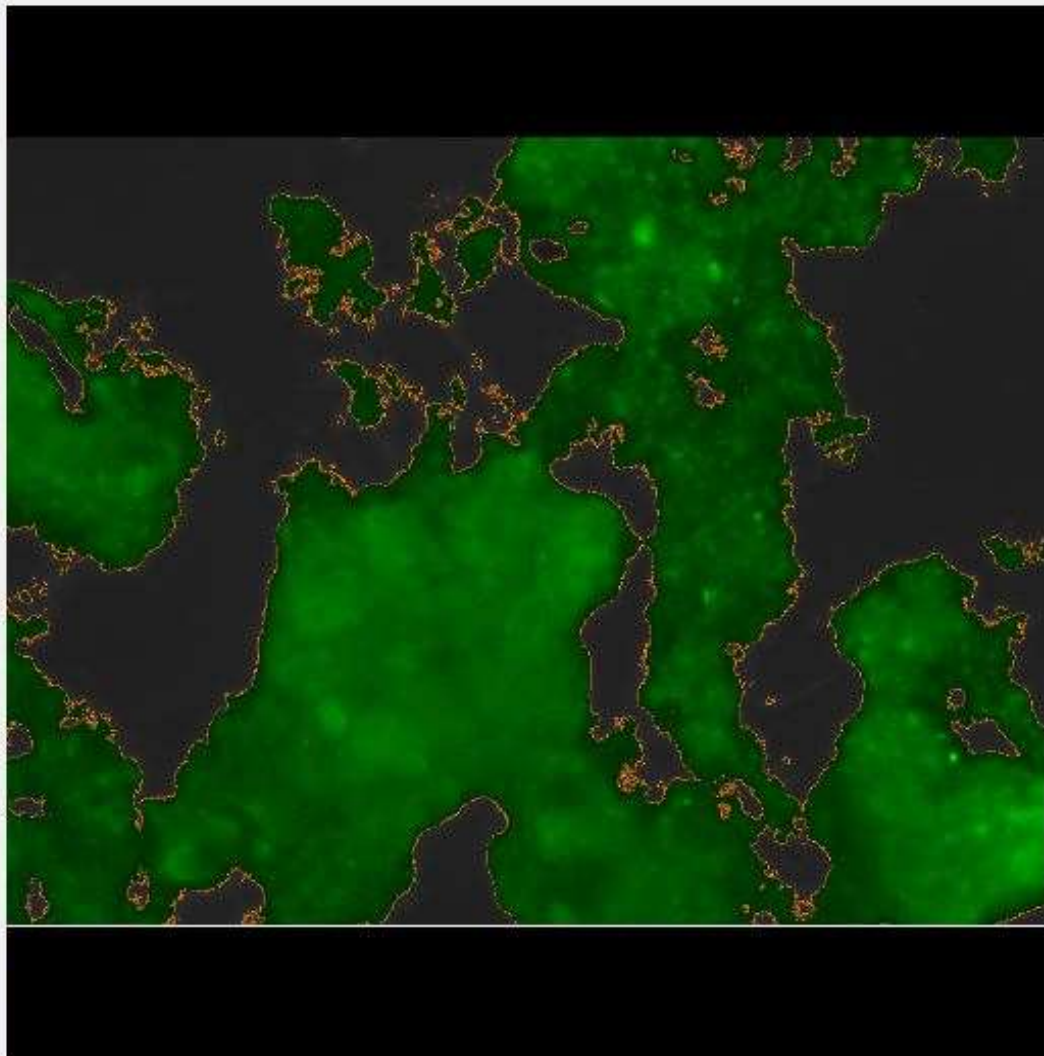
In whole image(s)

Save / Load



OK Cancel

Segmentace celkové biomasy




25

Objects Classes

Object counts

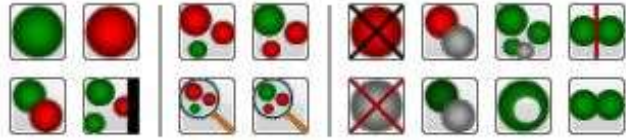
Objects in image:	87
Selected:	87
Rejected:	0
Object size (pixels):	0

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

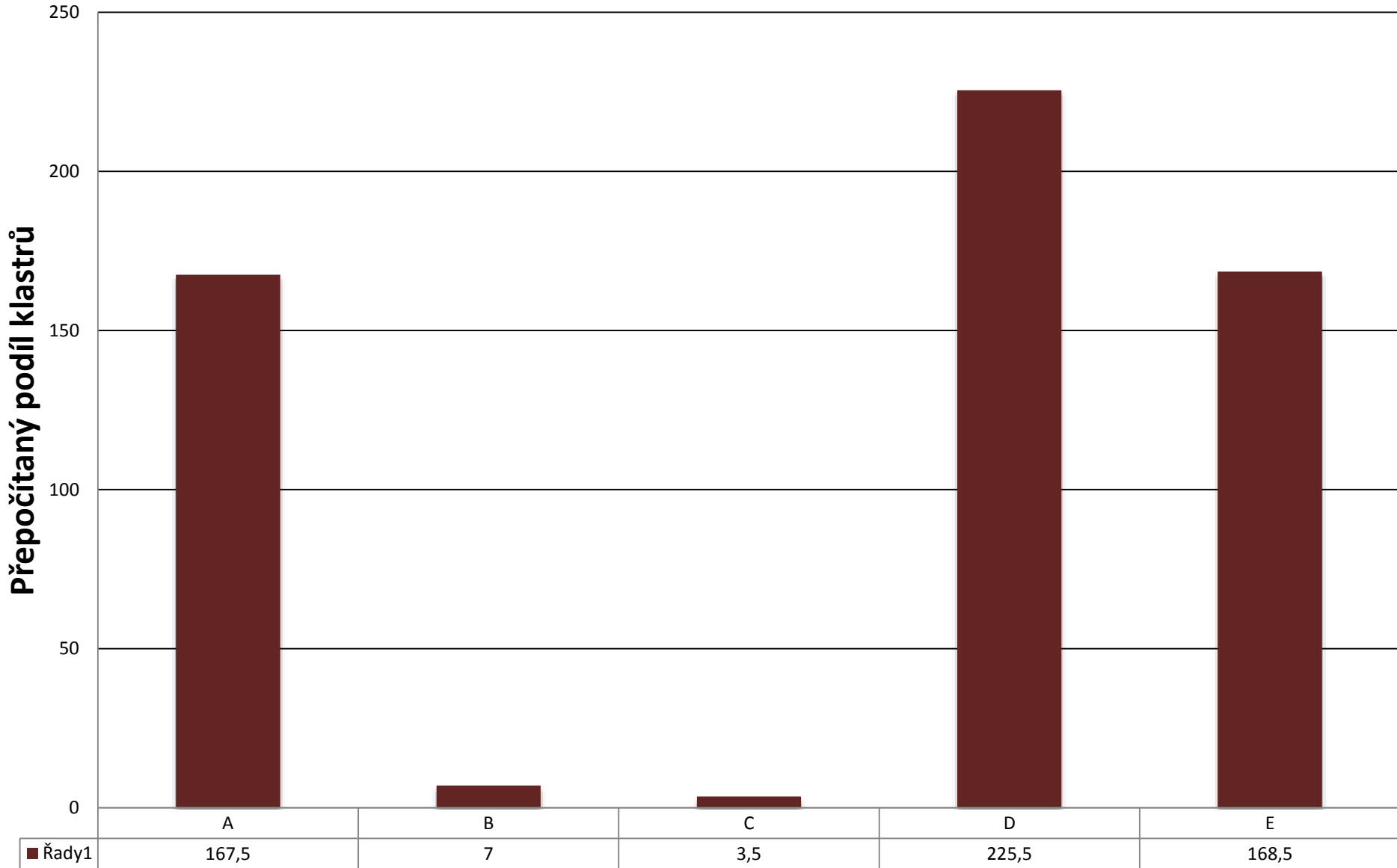


OK Cancel

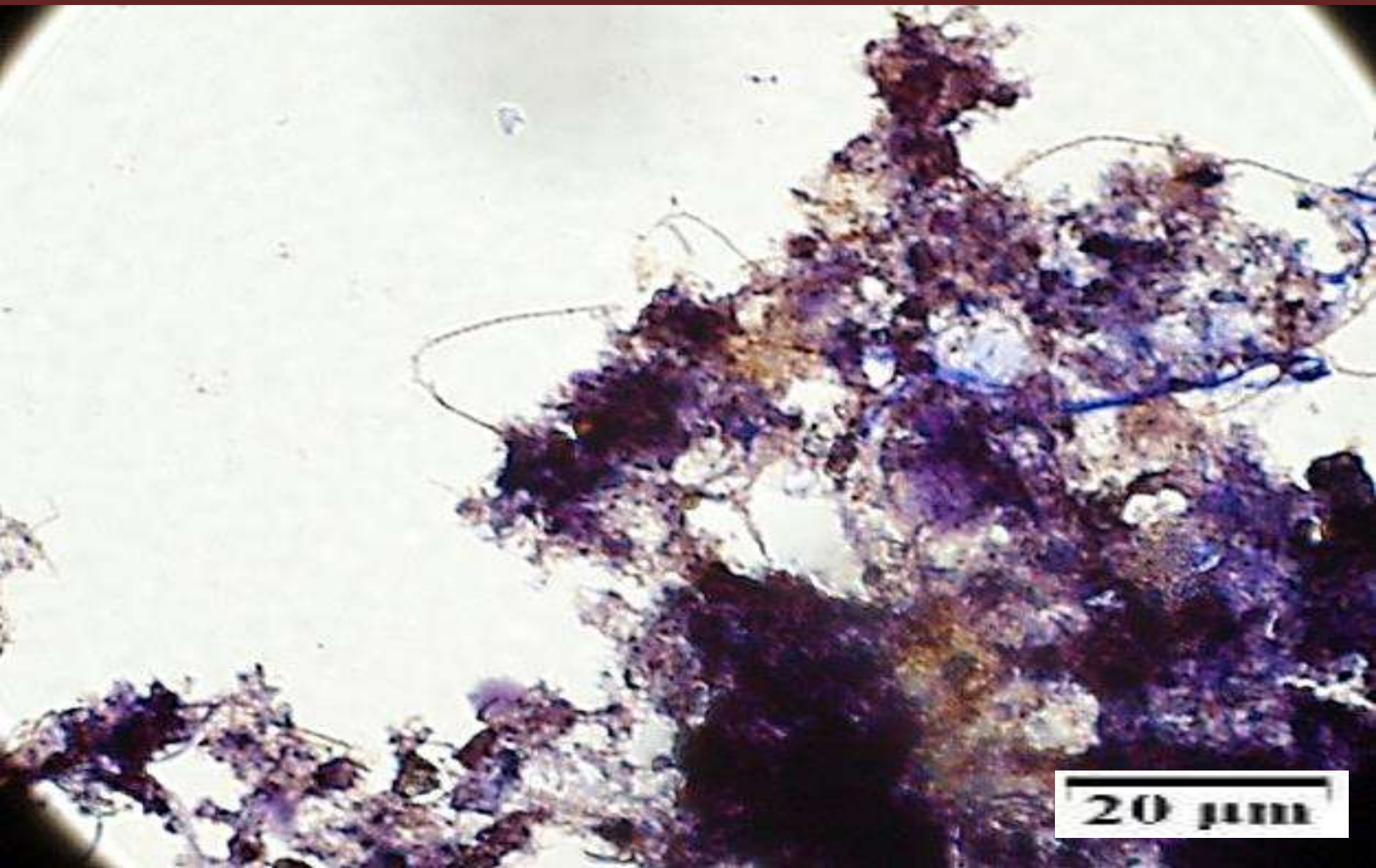
Sledované ČOV

- **ČOV A**
 - R-AN-D-N, v případě potřeby fosfor sráží
 - V době odběru vzorku fosfor srážen
- **ČOV B**
 - R-D-N, fosfor odstraňován pouze srážením
- **ČOV C**
 - R-AN-D-N, zároveň se fosfor sráží
- **ČOV D**
 - R-AN-D-N, v případě potřeby fosfor sráží
 - V době odběru vzorku fosfor odstraňován jen biologicky
- **ČOV E**
 - R-AN-D-N, v případě potřeby fosfor sráží
 - V době odběru byl fosfor odstraňován biologicky

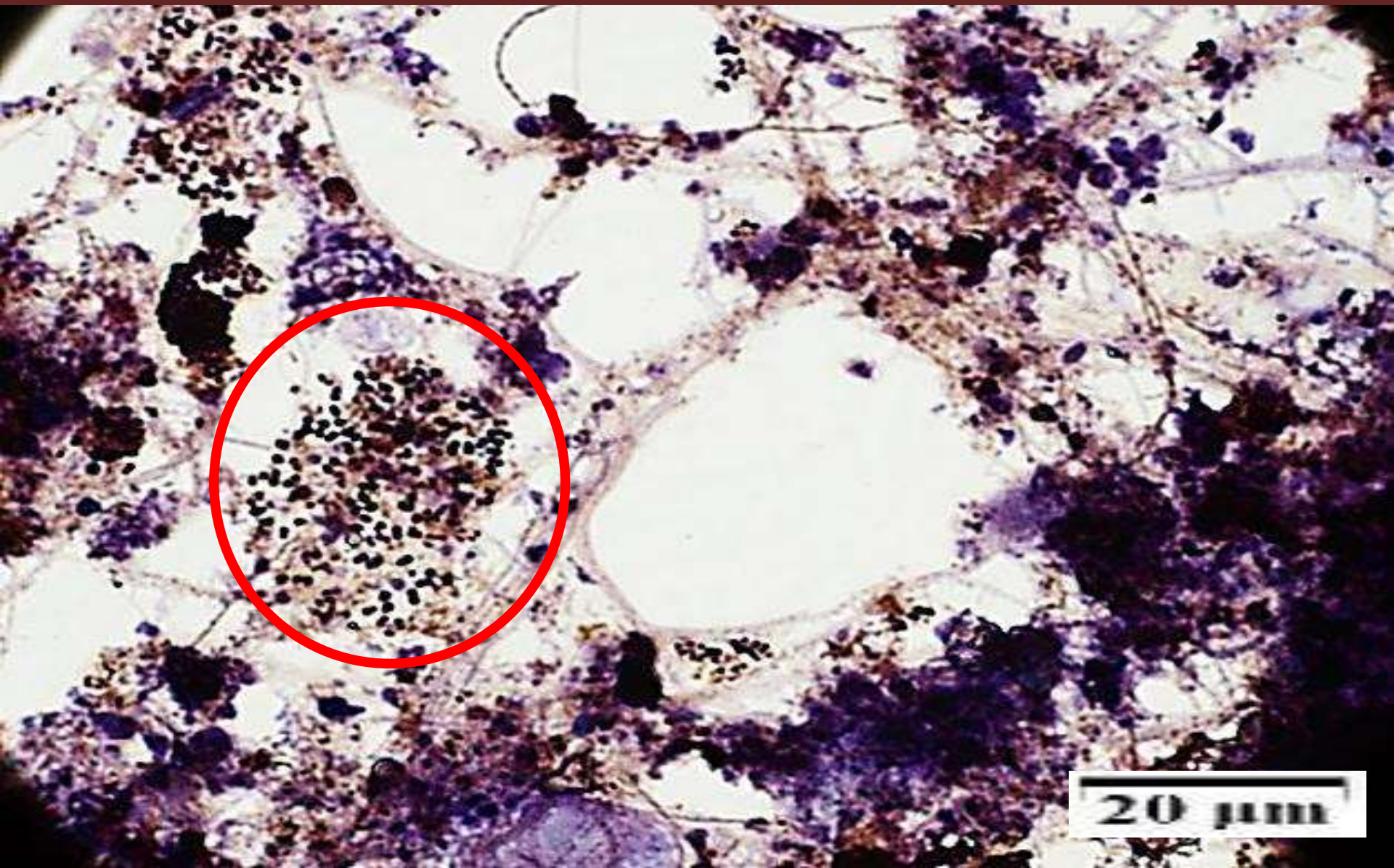
Neisserovo barvení



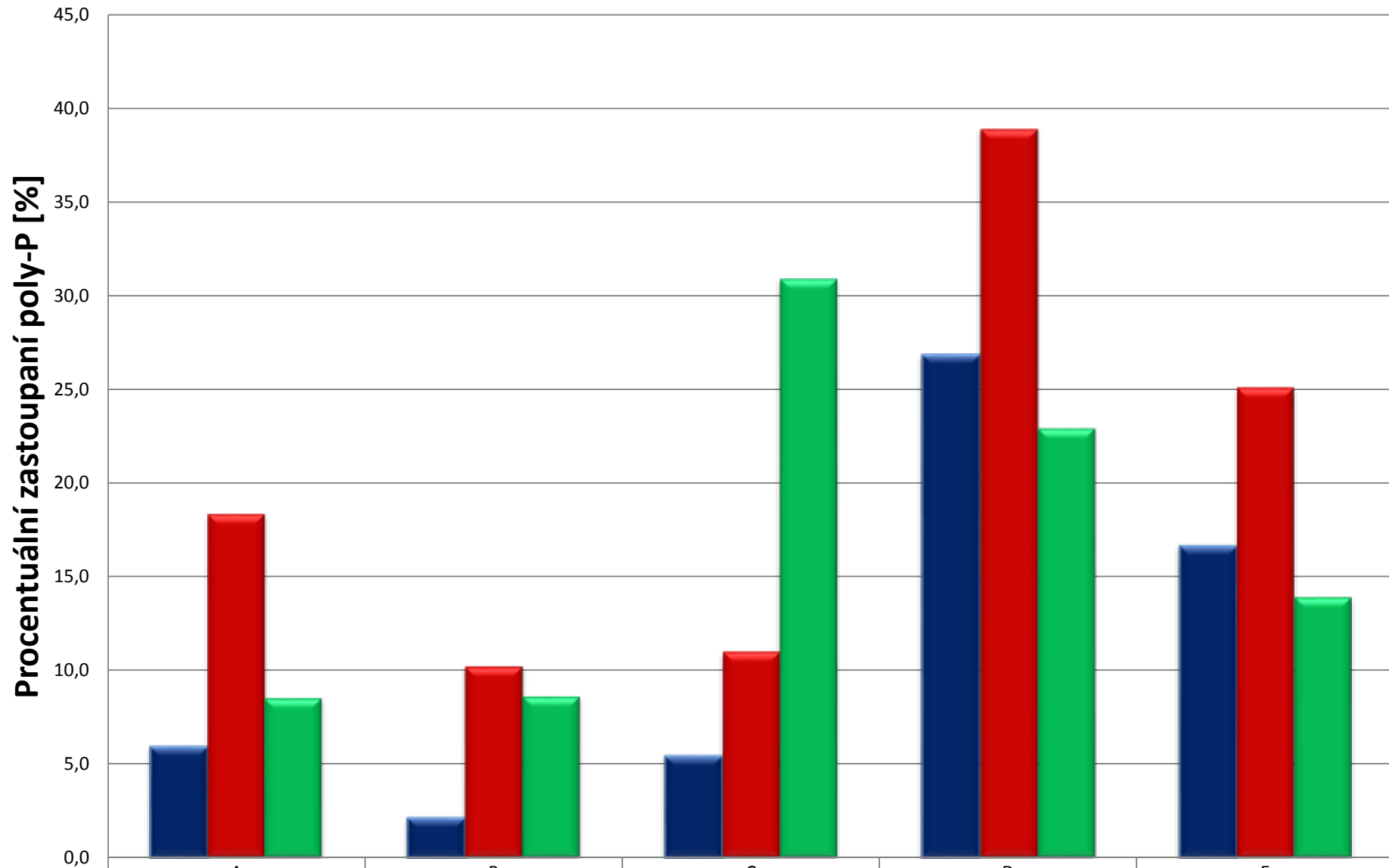
**ČOV C, klastry poly-P bakterií detekované Neisserovým
barvením, zvětšení 750x.**



**ČOV D, klastry poly-P bakterií detekované Neisserovým
barvením, zvětšení 750x.**

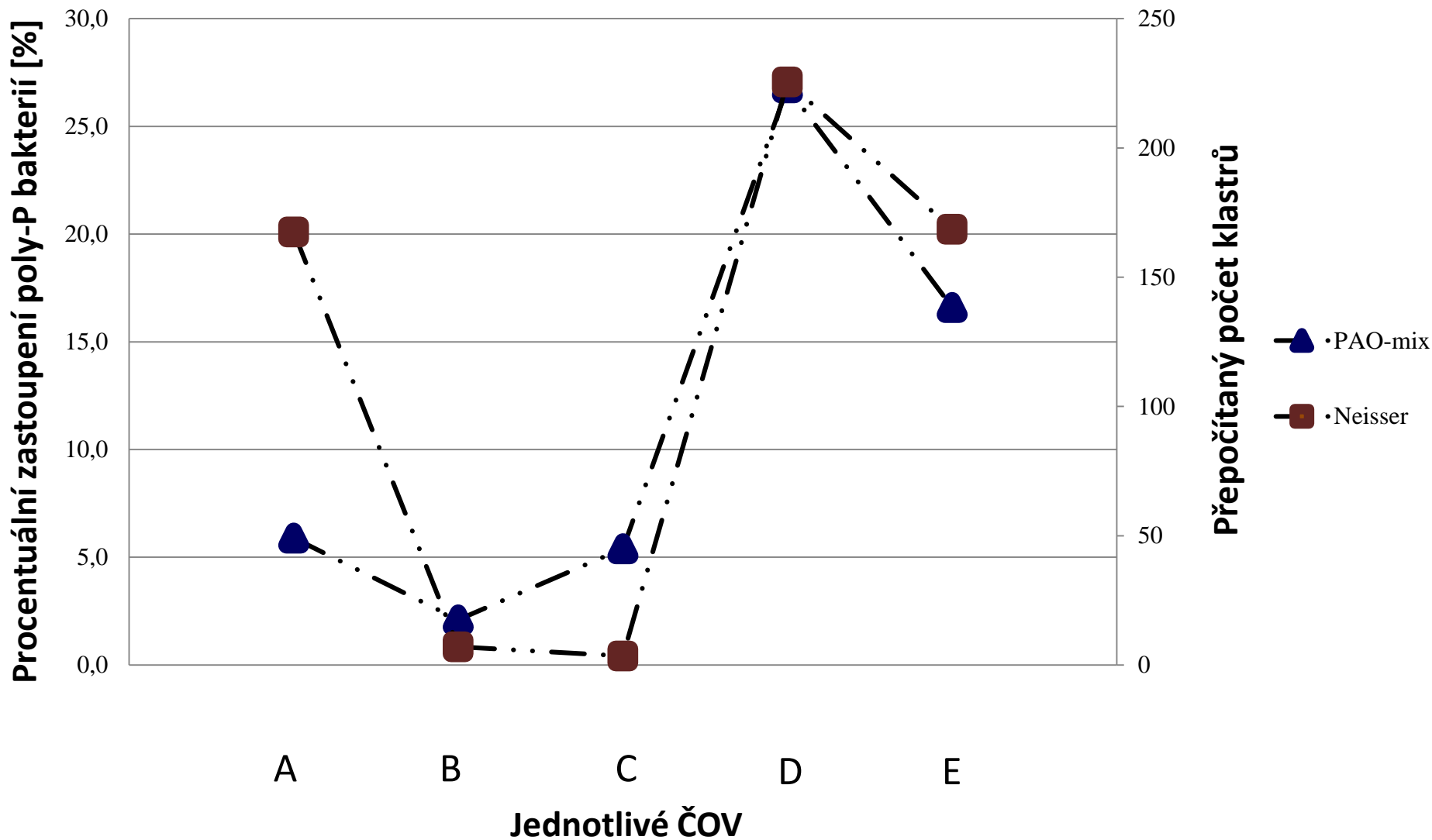


Sondy využité při FISH

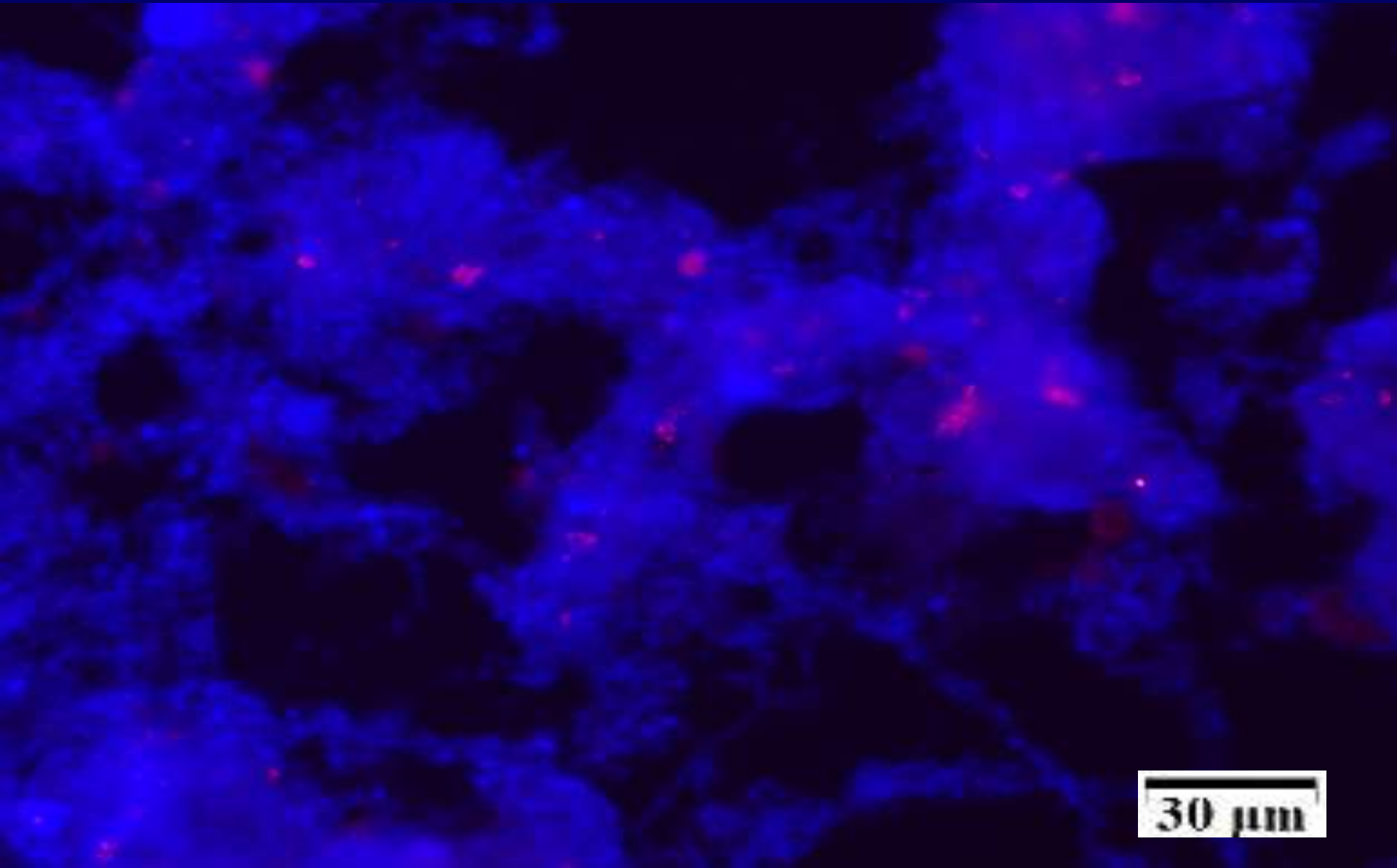


	A	B	C	D	E
PAO-mix	5,9	2,1	5,4	26,8	16,6
PAOb-mix	18,3	10,2	11,0	38,9	25,1
RHC	8,5	8,6	30,9	22,9	13,9

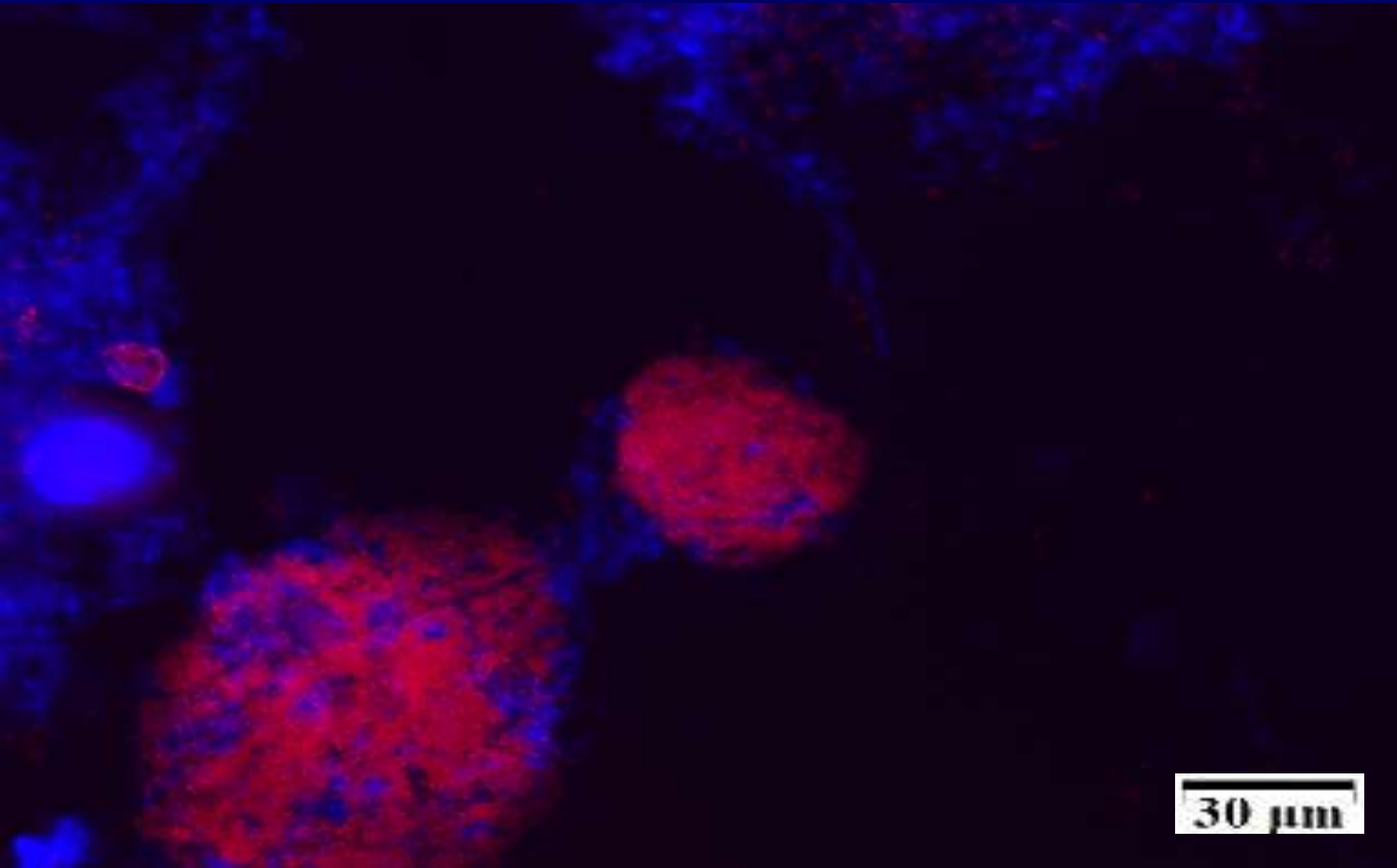
Porovnání sondy PAO-mix a Neisserova barvení



ČOV B, klastry poly-P bakterií detekované sondou PAO-mix (Cy3, červená) a celková DNA (DAPI, modrá), zvětšení 320x

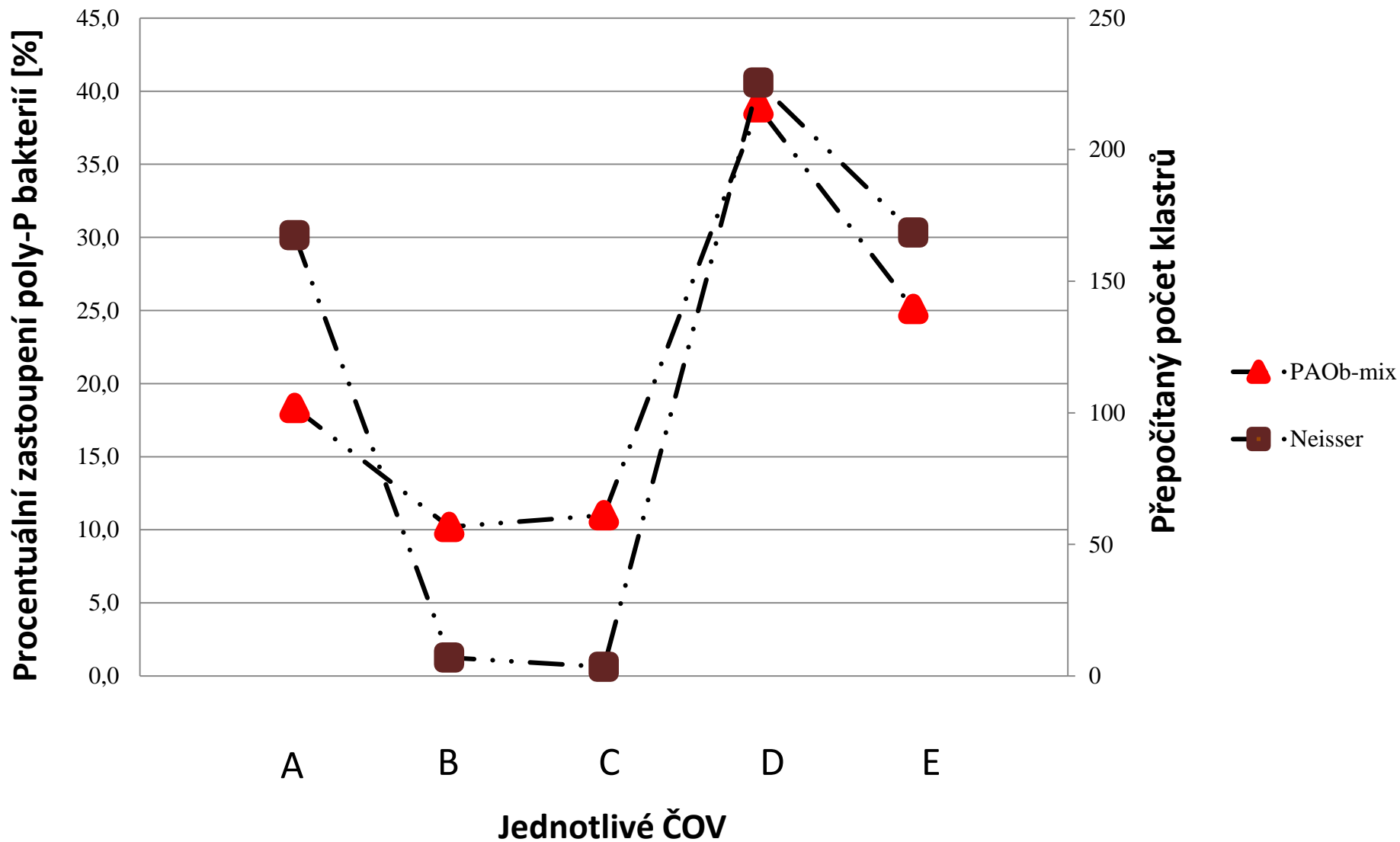


ČOV D, klastry poly-P bakterií detekované sondou PAO-mix (Cy3, červená) a celková DNA (DAPI, modrá), zvětšení 320x

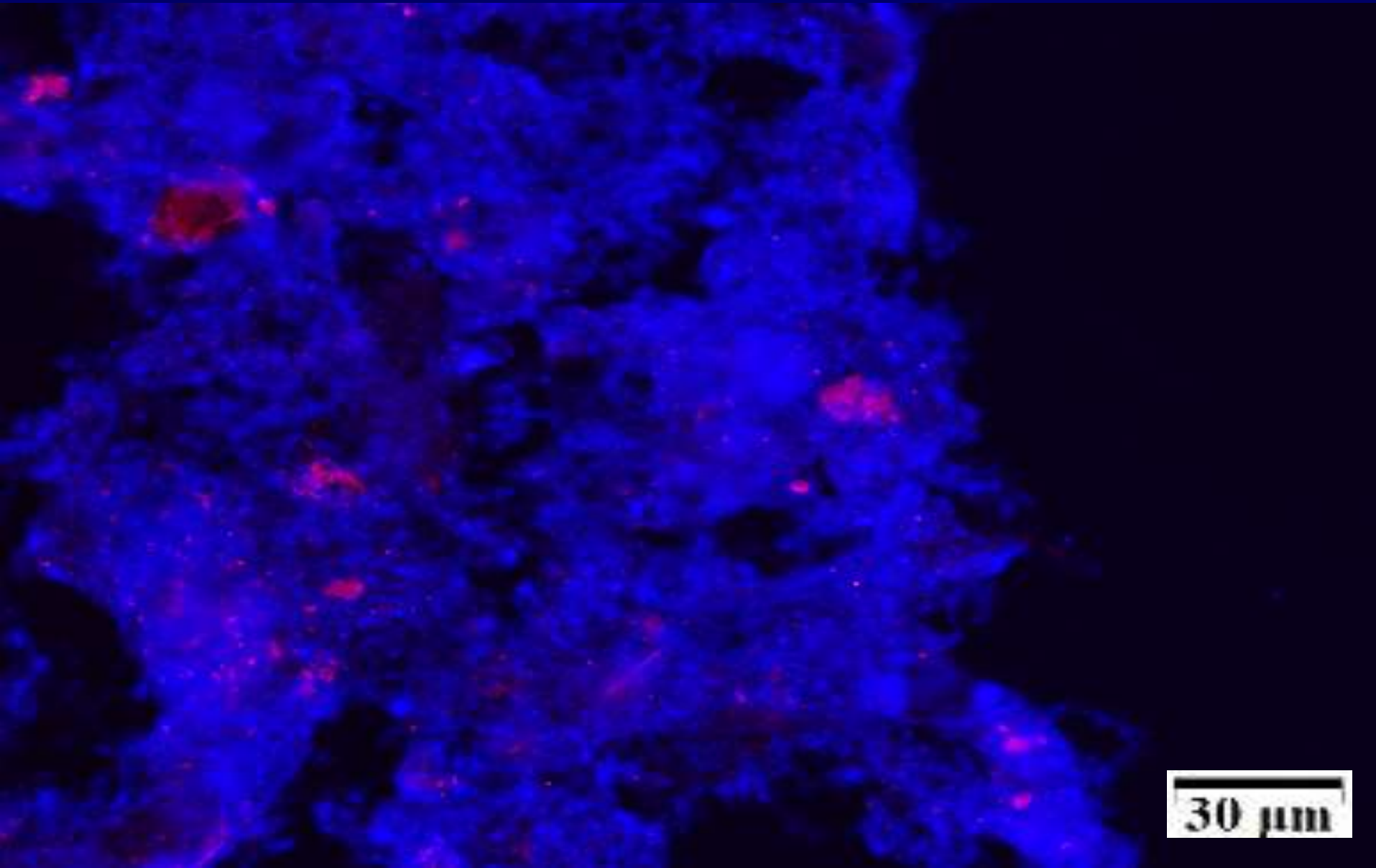


30 μm

Porovnání sondy PAOb-mix a Neisserova barvení

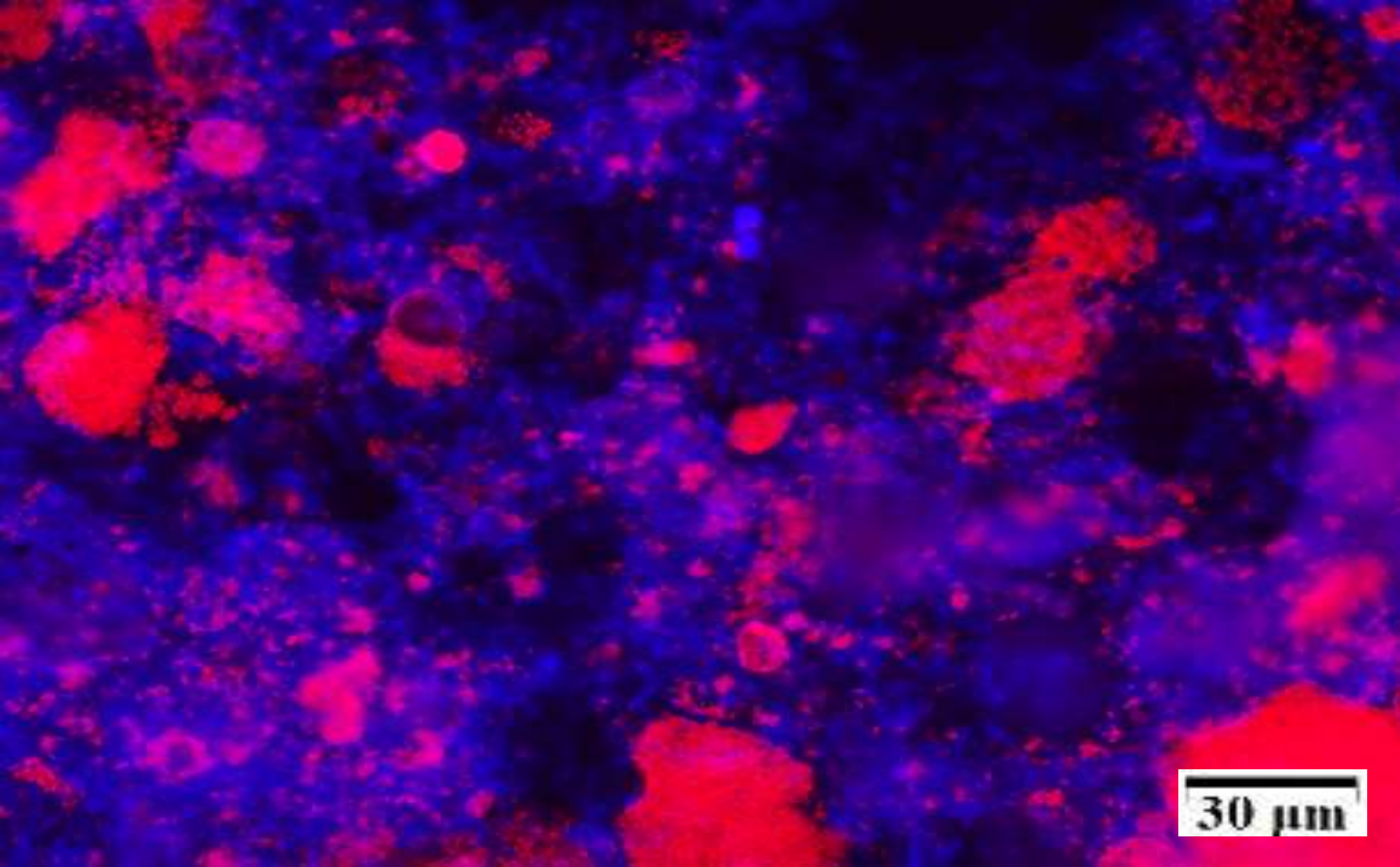


ČOV B, klastry poly-P bakterií detekované sondou PAOb-mix (Cy3, červená) a celková DNA (DAPI, modrá), zvětšení 320x.



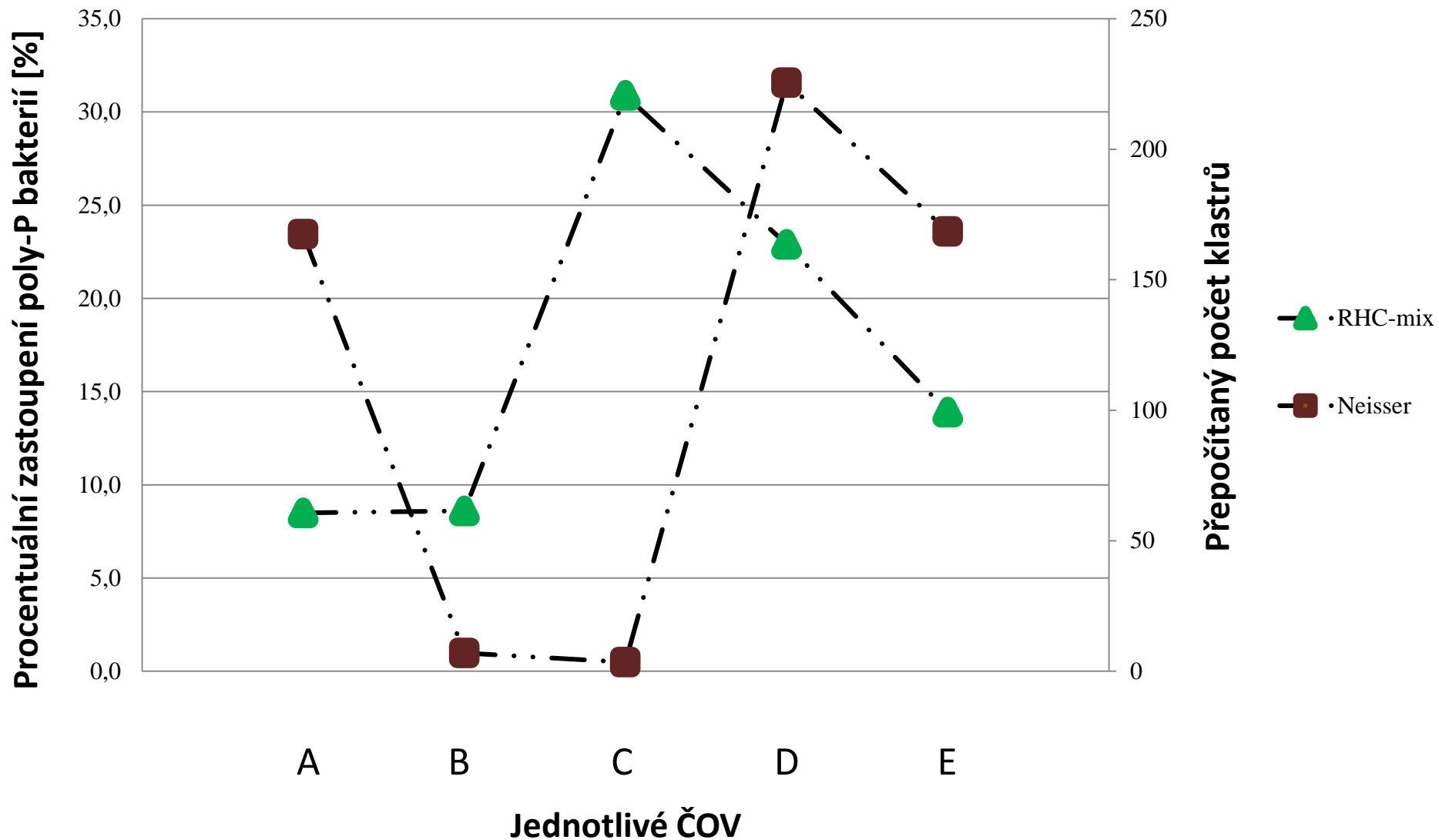
30 μm

ČOV D, klastry poly-P bakterií detekované sondou PAOb-mix (Cy3, červená) a celková DNA (DAPI, modrá), zvětšení 320x.

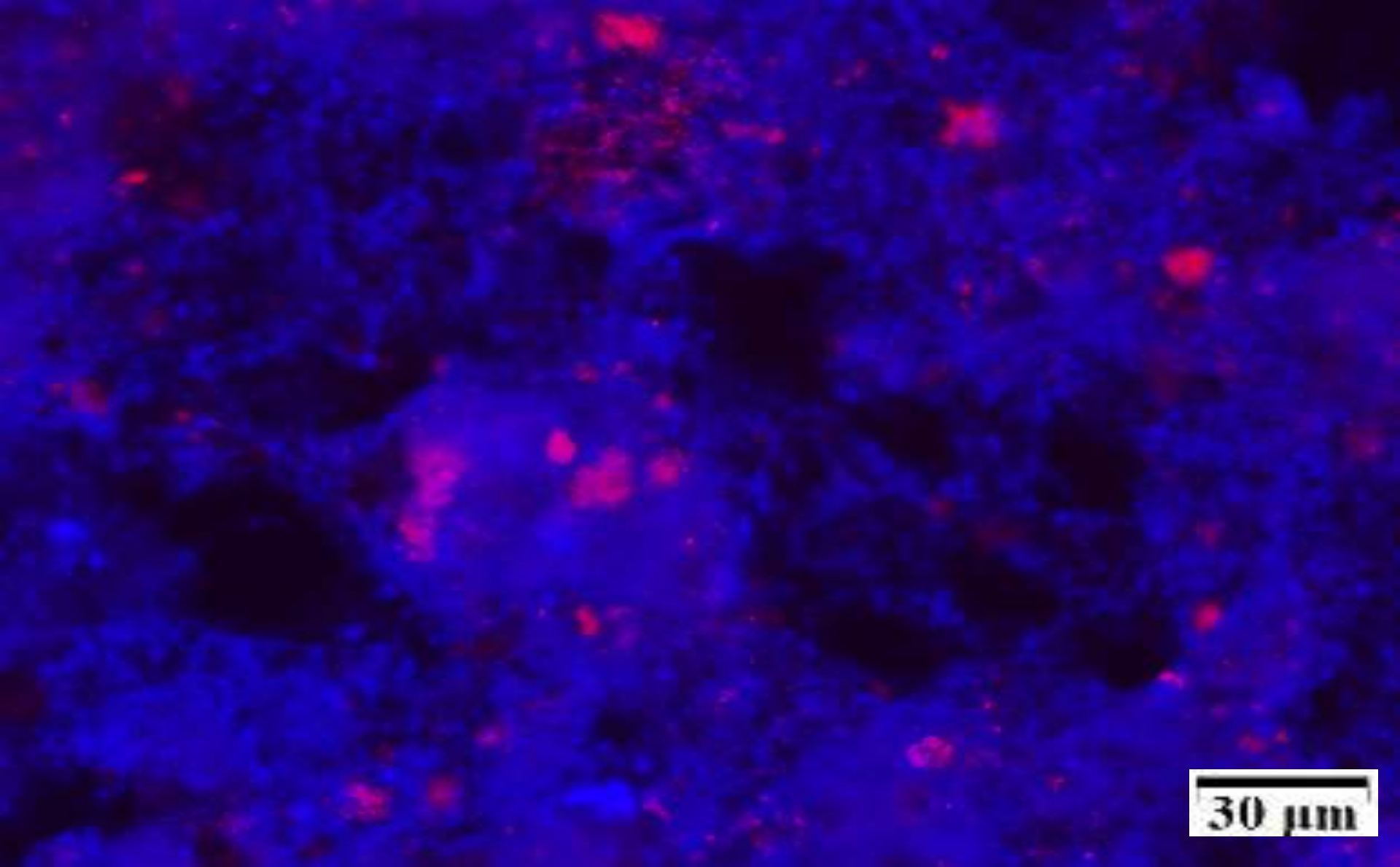


30 μm

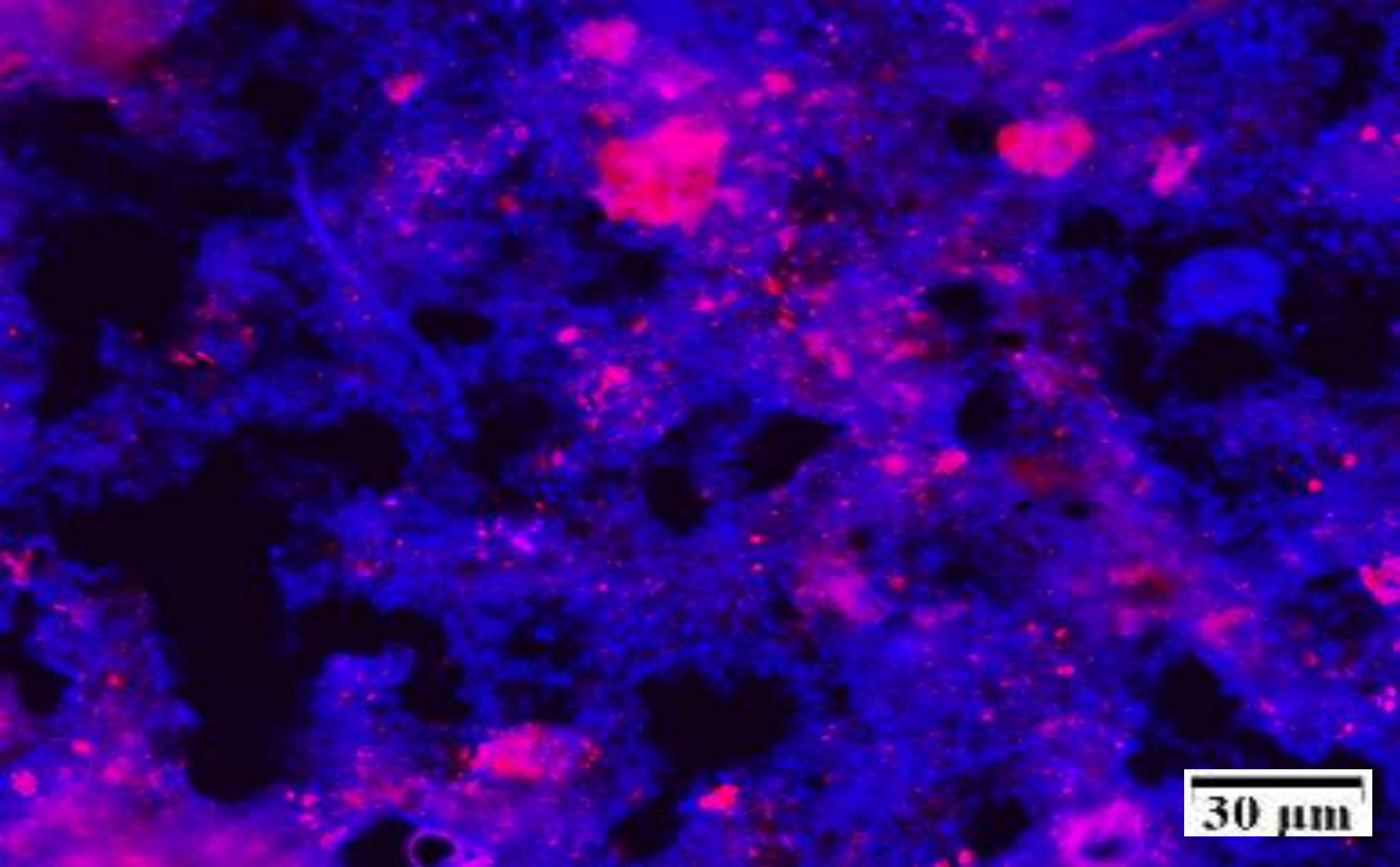
Porovnání sondy RHC-mix a Neisserova barvení



ČOV A, klastry poly-P bakterií detekované sondou RHC-mix (Cy3, červená) a celková DNA (DAPI, modrá), zvětšení 320x.



ČOV C, klastry poly-P bakterií detekované sondou RHC-mix (Cy3, červená) a celková DNA (DAPI, modrá), zvětšení 320x.



30 μm

Závěr

- **FISH**
 - **Specifičnost, přesnost**
 - **Možnost stanovení konkrétního rodu, druhu**
 - **Kvantifikace**

- **PAOb-mix**



DĚKUJI ZA POZORNOST!