

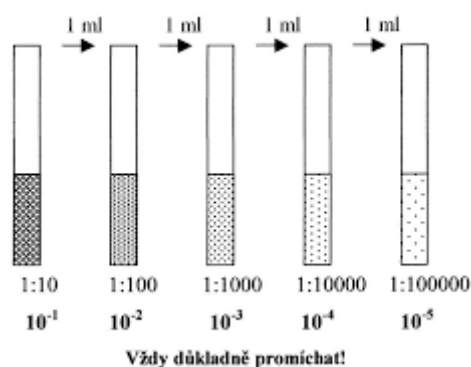
## 2. CVIČENÍ

### NÁPLŇ CVIČENÍ

Kvalitativní a kvantitativní metody kultivace bakterií

#### Úkol č. 1 Stanovení počtu bakterií – metoda zalití

- vzorek: bakteriální suspenze
- ze vzorku předpřipravené bakteriální suspenze se odebere 1 ml automatickou pipetou do zkumavky s 9 ml ředícího roztoku (ředění  $10^{-1}$ ) a připraví se ředící řada až do ředění  $10^{-6}$



#### Stanovení celkového počtu mikroorganismů (CPM)

CPM = mezofilní aerobní a fakultativně anaerobní mikroorganismy (bakterie, kvasinky, plísně) rostoucí na obohacených médiích při teplotě 30 °C po dobu 72 hodin.

Kultivace na agaru s glukosou, tryptonem a kvasničním extraktem (GTK).

Počítají se všechny narostlé kolonie bez ohledu na jejich tvar, velikost či barvu.

- z ředění  $10^{-2}$  a  $10^{-3}$  se odebere 1 ml automatickou pipetou a přenese na předem popsanou Petriho misku – na víčko (od každého ředění 2 misky)
- vzorek v Petriho misce se zalije médiem GTK, promíchá krouživým pohybem, nechá zatuhnout
- po utužení misek následuje kultivace v termostatu při 30 °C 72 hod. za aerobních podmínek
- misky se v termostatu kultivují dnem vzhůru

#### Stanovení koliformních bakterií

Koliformní bakterie = gramnegativní střevní tyčinky patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*, společným znakem je fermentace laktosy s tvorbou kyseliny a plynu (např. *Escherichia coli*).

Počítají se kolonie purpurově červené barvy (fermentace laktosy) o průměru nejméně 0,5 mm, mohou být obklopeny načervenalou zónou precipitované žluče.

- z ředění  $10^{-2}$  a  $10^{-3}$  se odebere 1 ml automatickou pipetou a přenese na předem popsanou Petriho misku – na víčko (od každého ředění 2 misky)

- vzorek v Petriho misce se **zalije médiem VČŽL** (agar s krystalovou violetí, neutrální červení a žlučovými solemi), promíchá kruživým pohybem, nechá zatuhnout
- po utužení misek následuje kultivace v termostatu při 37 °C 24 hod. za aerobních podmínek
- misky se v termostatu kultivují dnem vzhůru

## Úkol č. 2 Stanovení počtu bakterií – metoda rozetřru

### Stanovení počtu *E. coli*

*E. coli* gramnegativní pohyblivá střevní tyčinka z čeledi *Enterobacteriaceae*, nejvýznamnější zástupce koliformních bakterií, indol pozitivní, fermentuje sorbitol, většina β -D-glukuronidasa pozitivní. Počítají se kolonie modré nebo modrozelené barvy (aktivita β-D-glukuronidasy) o průměru 0,5 – 2 mm.

- z ředění **10<sup>-2</sup> a 10<sup>-3</sup>** připraveného v úkolu č. 1 se odebere **200 μl** automatickou pipetou a přenesse na povrch **média TBX - agar s tryptonem, žlučovými solemi a glukuronidem** - (od každého ředění 2 misky) – misky předem popsát na víčko
- bakteriální suspenze se **rozetře po celém povrchu agaru sterilní hokejkou** (ve třech směrech), nechá se zaschnout
- poté následuje kultivace v termostatu při 37 °C 24 hod. za aerobních podmínek
- misky se v termostatu kultivují dnem vzhůru

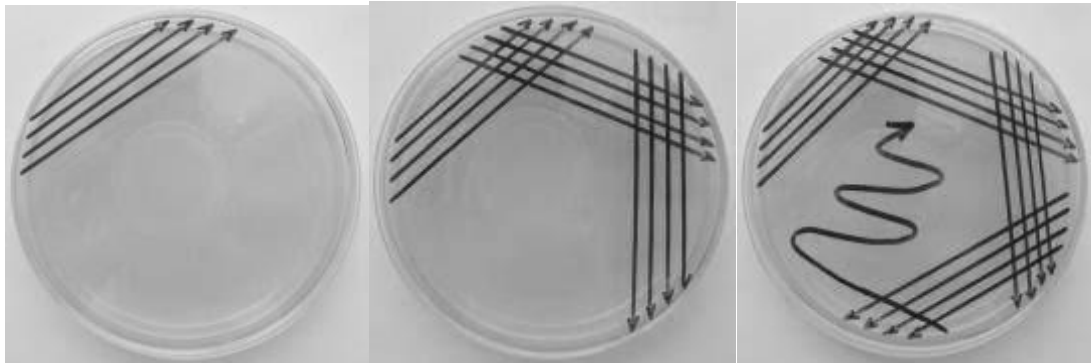
### Vzorec pro výpočet k úkolu č. 1 a 2

$$N = \frac{\sum C}{V (n_1 + 0,1n_2) d}$$

N	počet mikroorganismů ve vzorku
∑ C	součet kolonií ze všech Petriho misek vybraných pro výpočet ze dvou po sobě následujících ředěních (nejméně jedna z misek obsahuje 10 kolonií)
V	objem inokula v ml očkovaného na každou z misek
n <sub>1</sub>	počet misek vybraných k výpočtu z prvního zvoleného ředění
n <sub>2</sub>	počet misek vybraných k výpočtu z druhého zvoleného ředění
d	faktor ředění odpovídající prvnímu pro výpočet zvolenému ředění (např. 10 <sup>-2</sup> )

### Úkol č. 3 Kvalitativní metoda – provedení rozočkování

- z ředění  $10^{-1}$  připraveného v úkolu č. 1 se provede **křížový roztěr na povrch média CSBD** (Casein Soya Bean Digest Agar) – misku předem popsat na dno
  - o sterilní bakteriologická klička se namočí do zkumavky s ředěním  $10^{-1}$  a provedou se první vodorovné čáry
  - o vezme se nová klička (**NEnamáčí se opět do suspenze!**) a provede se druhá sada vodorovných čar tak, že se vždy překříží čáry původní
  - o celý postup se opakuje ještě 2x, na každou sérii čar se použije nová sterilní klička
  - o na závěr se novou sterilní kličkou udělá hadovitá čára směrem ke středu misky



- následuje kultivace v termostatu při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  24 hod. za aerobních podmínek
- misky se v termostatu kultivují dnem vzhůru