

Kvantitativní hodnocení mikrobiálních kultur

Nepřímé stanovení počtu životaschopných buněk plotnovou metodou

Cíl práce:

Jaký je rozdíl mezi přímým a nepřímým stanovením počtu buněk? Proč je v našem případě nutno promíchat zásobní vzorek? Jak poznáme kontaminaci ředícího roztoku? Proč se neroztírá kupříkladu mililitr ředění? Jaký typ media a v jakém laboratorním skle s pro plotnovou metodu používá?

Teoretická část:

Zjišťování počtu mikroorganismů je nutné při některých biochemických a genetických experimentech. Pro stanovení množství buněk mikroorganismů v různých prostředích byla vypracována řada metod, pro daný účel se volí metoda nejlépe vyhovující. Stanovení počtu mikroorganismů se provádí v daném objemu a přepočítává obvykle na 1 ml původního vzorku. Těmito výsledky jsou pak korigovány získané výsledky experimentů.

Počet mikrobiálních buněk (CFU) se stanovuje v daném **objemu (1 ml původního vzorku)**. K čemu se využívá:

- sledování přírůstku buněk, pokud během kultivace v tekutém mediu odebíráme reprezentativní vzorek
- při hodnocení podílu jednotlivých skupin bakterií v celkovém zastoupení
- k poskytnutí obrazu o fyziologickém stavu buněk, prospívání

Používané metody:

- **přímé mikroskopické** (počítání samotných buněk v preparátu ze vzorku, **bez kultivace**.) Výhodou je **rychlost**, získáme však počet **živých i mrtvých buněk**.
- **nepřímé kultivační** - kultivační části vzorku zjistíme počet **životaschopných buněk** (těch, co vyrostou) počítáním kolonií na agarových plotnách, dále pak stanovení počtu buněk nefelometricky na základě intenzity světla odraženého od buněk (stanovení optické denzity - kalibrační křivka a počet buněk pak z lineární části); nákladnější, časově náročnější

Přímé stanovení počtu buněk:

- počítání v preparátu: potřeba suspenze o vhodné hustotě buněk
- preparáty: nezbarvené (pozorování fázovým kontrastem) nebo barvené
- **počítací komůrky**: Thomova, Bürkerova; je to silné podložní sklíčko s vyrytou sítí čtverečků a krycího skla. Krycí sklo se pokládá na lišty, takže vzniká mezi sklíčky prostor se známým objemem. Buňky se po napipetování usadí na dně.
- Počítáme z asi 80ti políček



komůrka

- Nemáme - li komůrku, počítáme **na podložním skle** počet buněk z urč. objemu (Př: program Lucia) a přepočítáme na celkový
- K odlišení živých a mrtvých buněk: **vitální test** (barvivo nabarví jen mrtvé buňky)
 - stanoví se pak procento mrtvých buněk v suspenzi
- Nebo počítání buněk v **barveném preparátu** (známe objem preparátu, fixujeme jej, barvíme, počítáme např. v deseti polích, vynásobíme počtem polí celého preparátu)
- Využití filtrů

Nepřímé stanovení počtu buněk - kultivace životaschopných

- proč se vyředňuje postupně? Aby se zabránilo rozbití buněk osmotickým šokem
- hustota suspenze, ze kterého se pipetuje prvních 0,1 ml: $0-10^3$ buněk/ml je bez opalescence, 10^5 buněk/ml lehce opaleskuje, 10^7 až 10^9 tvoří mléčný zákal dle velikosti a tvaru buněk

Stanovení buněčné hmoty:

- přímé metody: váha sušiny: **i mrtvé buňky!**
 - stanovení obsahu N, bílkovin v buněčné hmotě
- nepřímé: turbidimetrické stanovení buněčné hmoty (zákal)

Materiál:

- Sterilní bakteriologické plotny s MPA (medium M2)
- Sterilní zkumavky
- Sterilní pipety
- Sterilní hokejky
- Sterilní fosfátový pufr (roztok R16) nebo fyziologický roztok (R1)

Bakteriální kmen: ?????????????

Postup:

1) ředění kultury:

- do sady sterilních zkumavek rozpipetujeme po 0,9 ml sterilního roztoku (R1 nebo R16)
- z **DOBŘE PROMÍCHANÉHO** vzorku s kulturou (kultura v tekutém mediu v Erlenmayerově baňce) odebereme 0,1ml suspenze a přeneseme do 1. zkumavky
- dobře mícháme a to vždy čistou špičkou; nejprve obsah první zkumavky s výsledným objemem 1 ml (pufr + 0,1 ml bakt.vzorku)
- z rozmíchaného roztoku v první zkumavce odebereme 0,1 ml a přeneseme do další zkumavky

- další sterilní špičkou se promíchá obsah druhé zkumavky a 0,1 ml se opět přeneso do 3. zkumavky. Takto se pokračuje až do konečného ředění
- **VŠECHNY KROKY ŘEDĚNÍ SE PROVÁDÍ STERILNÍMI POMŮCKAMI**

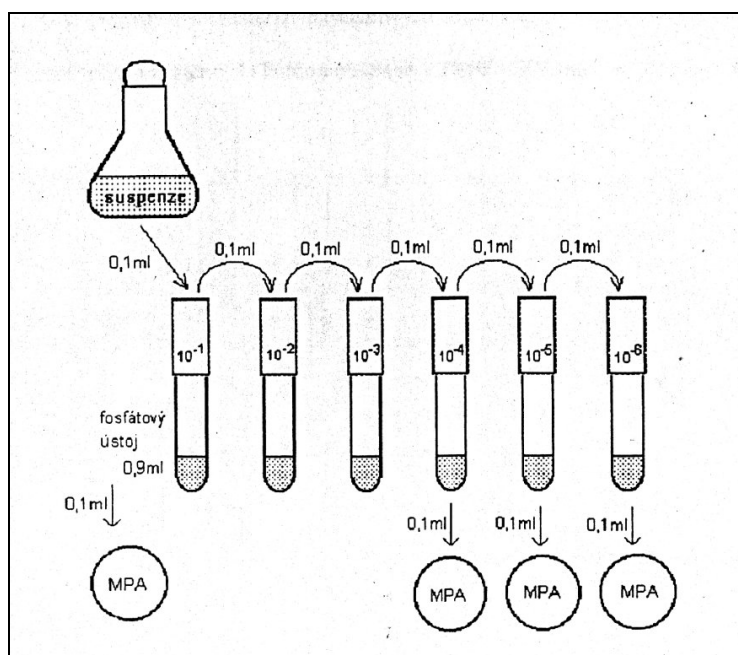
2) očkování

- popíšeme Petriho misky s MPA, tentokrát na víčko (kolonie se počítají ze dna)
- z každé zkumavky s ředěním 10^{-5} až 10^{-6} očkujeme objem 0,1 ml suspenze na 1 misku, vždy alespoň dvě nebo tři misky od každého ředění
- napipetovaný objem se roztírá sterilní hokejkou krouživým pohybem po celém povrchu agaru; dnem misky se otáčí proti pohybu roztírání a na hokejku se netlačí
- při pipetování a roztírání otevíráme misky co nejméně
- kultivujeme dnem vzhůru 2-3 dny (pro cvičení 7 dní)/30°C

3) Kontrola sterility ředícího roztoku:

- ze zásobního R1 nebo R16 odebereme dvakrát 0,1 ml na dvě misky a rozetřeme hokejkou, kultivujeme současně s miskami pro plotnovou metodu

Nákres:



Hodnocení:

K hodnocení vybereme nejvhodnější ředění (použijeme to ředění, kde se vyskytuje 20-200 kolonií na misce) a spočítáme počet kolonií na obou miskách tohoto ředění. Kolonie počítáme **ze dna misky**, kde jdou také vidět, a to proto, že si je můžeme označit fixou na sklo tečkou.

Ze tří získaných hodnot vypočítáme průměr, číslo vynásobíme ředěním a hodnotou 10 (= desetina pipetovaného mililitru, abychom získali hodnotu pro mililitr celý).

Získaný údaj je hodnota **CFU** (colony forming units, což je počet bakterií schopných tvořit jednu kolonii, tedy počet buněk v objemu 1 ml).

$$\text{Průměrný počet buněk} \times \text{hodnota ředění (kladný index)} \times 10 = \text{CFU}$$

Uvádí se jako hodnota 1 až 9,9 krat 10^x .

Př:

Průměrný počet kolonií ze tří misek je 75. Použité ředění, ze kterého se nejlépe počítalo, bylo 10^5 .

$$\text{CFU} = 75 \cdot 10^5 \cdot 10 = \underline{7,5 \cdot 10^7}$$

Tabulka počtu kolonií ze tří ředění:

| Ředění | Počet kolonií | |
|----------------|---------------|---------|
| | Miska 1 | Miska 2 |
| 10^5 | | |
| 10^6 | | |
| 10^7 | | |
| Průměr: | | |

CFU =

Závěr:

Bylo naočkováno x misek s ředěním: , od každého ředění tedy x misek. Misky byly kultivovány 7 dní při 30 °C. Při odečítání výsledků (počtu kolonií) sejevilo nejvýhodnější ředění x, kterým se po zprůměrování počtu zjistilo CFU ve vzorku a to s hodnotou:

Co napovídá o chybné práci?

- příliš velký rozdíl v počtu kolonií mezi oběma miskami jednoho ředění = nesprávně promíchaný a nerovnoměrný vzorek
- kontaminovaný ředící roztok