Plotnová metoda

Cíl: zisk řady ředění a vysetí na misky
→ nezkreslená informace o počtu životaschopných MO

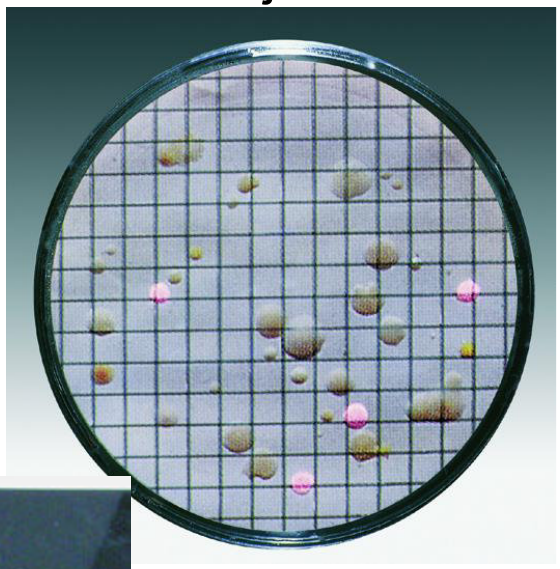
Přímé stanovení (preparát, komůrka)
X
nepřímé stanovení (kultivace)

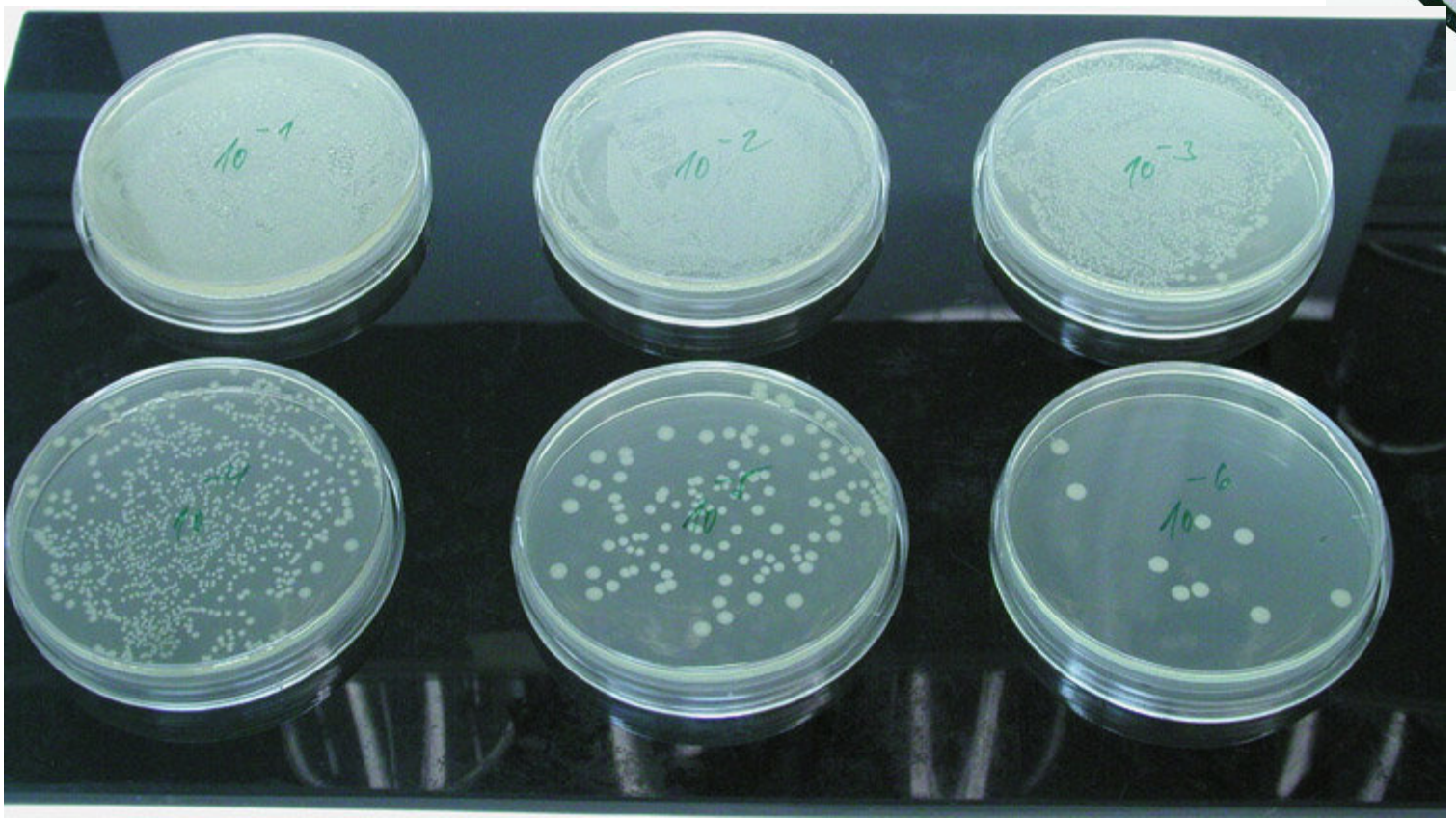
- Počet buněk je důležitý pro srovnání, pro opakování experimentu atd., nefelometrické stanovení.

- **CFU / ml** = počet buněk tvořících kolonii = **ŽIVÝCH, KULTIVOVATELNÝCH** není to celkový počet buněk v 1 ml (v suspenzi mohou být i mrtvé buňky)
  → kolonie rozizolovat, aby šly spočítat (rozetřením hokejkou)

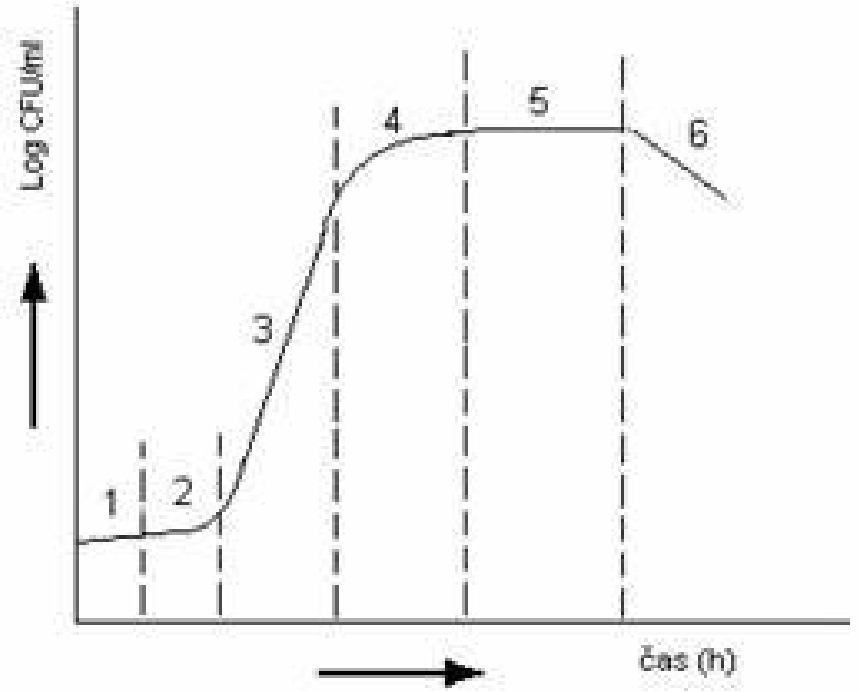
- rozlišení mrtvých a živých buněk – vitální test

- Kultivace – 1 médium – známý vzorek, selektivní médium – zajímá nás jen něco
- Více médií – neznámý vzorek
- Lze i smíšená kultura (vzorek vody)





- Odběry po cca 20-40 min → **<u>růstová křivka</u>**
- Grafickým vynesením logaritmu počtu živých buněk stanovených ve vzorcích odebraných v časových intervalech vzniká růstová křivka.

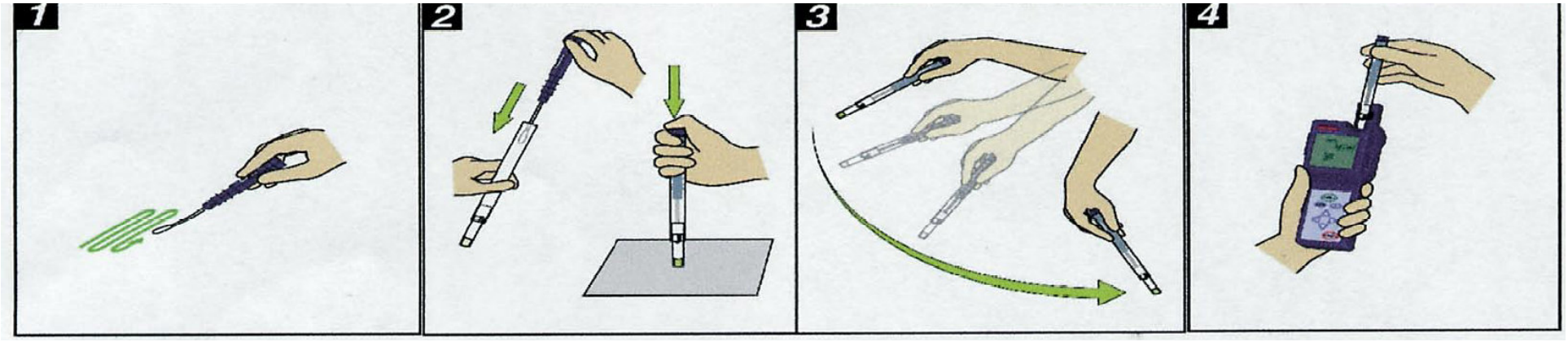


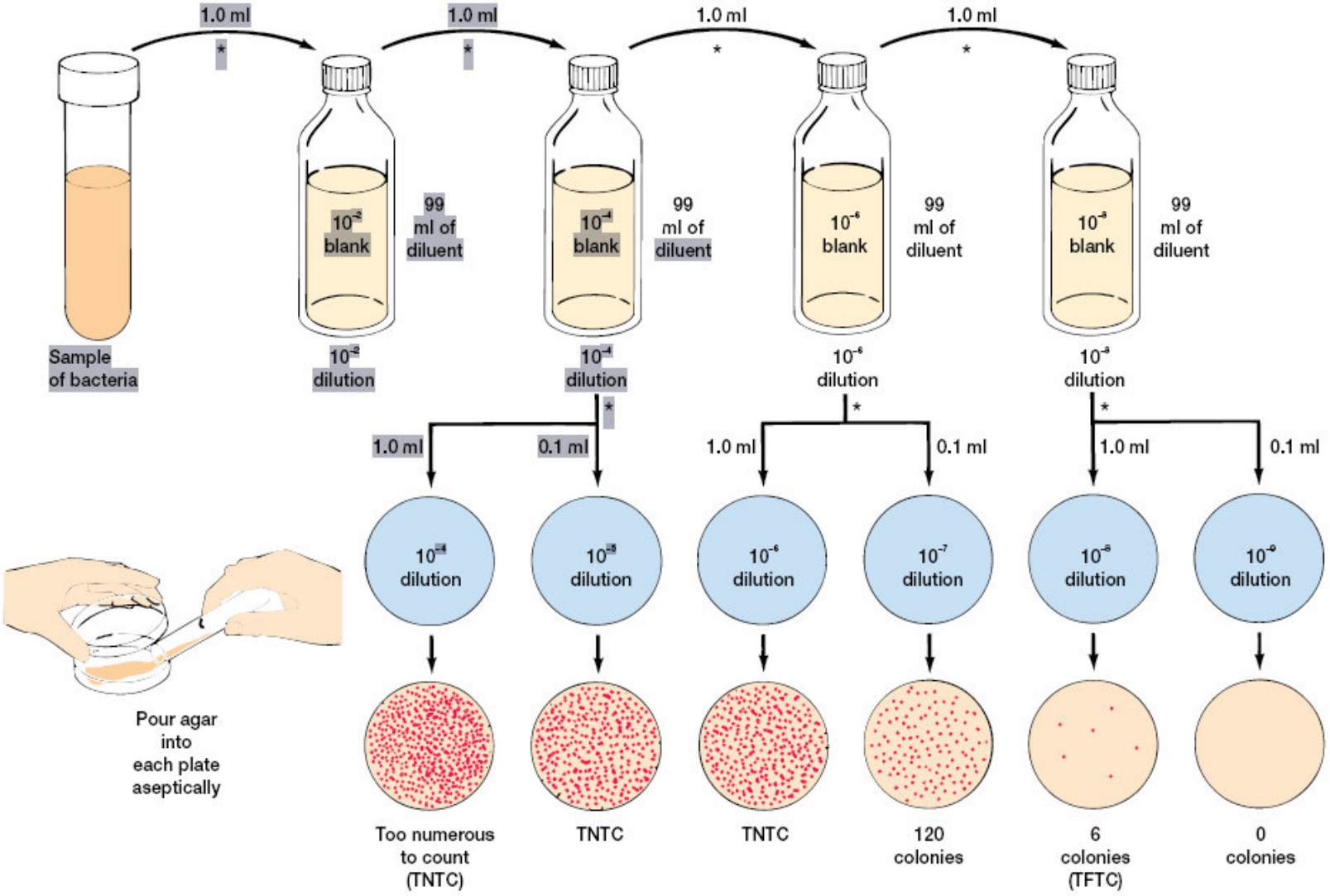
- 1 – lag fáze; 2 – fáze zrychlujícího se růstu; 3 – exponenciální fáze růstu; 4 – fáze zpomaleného růstu; 5 – stacionární fáze růstu; 6 – fáze odumírání

- Automatické počítání kolonií:

- **Stěrová a výplachová metoda**
- Rychlé určení kontaminace - luminiscenční měření pomocí přístroje Lumitester PD 10 (jednotky RLU)
- Celkový stupeň kontaminace

  bez rozlišení druhů MO




1.0 ml
1.0 ml
1.0 ml
1.0 ml
Sample of bacteria
10⁻² blank
99 ml of diluent
10⁻⁴ blank
99 ml of diluent
10⁻⁶ blank
99 ml of diluent
10⁻⁸ blank
99 ml of diluent
10⁻² dilution
10⁻⁴ dilution
10⁻⁶ dilution
10⁻⁸ dilution
1.0 ml
0.1 ml
1.0 ml
0.1 ml
1.0 ml
0.1 ml
10⁻⁴ dilution
10⁻⁵ dilution
10⁻⁶ dilution
10⁻⁷ dilution
10⁻⁸ dilution
10⁻⁹ dilution
Pour agar into each plate aseptically
Too numerous to count (TNTC)
TNTC
TNTC
120 colonies
6 colonies (TFTC)
0 colonies

Postup

PRACUJEME ASEPTICKY, POPSAT SKLO NA VÍČKO

- Kontrola sterility – vysetí 100 µl fyziologického roztoku
- Do zkumavek pipetovat 0,9 ml fosfátového pufru
- Z narostlé a promíchané kultury odebrat 100 µl, dát do zkumavky, **promíchat** → až na konec ředící řady
- Ze tří nejnižších ředění vyset na misky 100 µl, na misce rozetřít hokejkou

- Hodnocení – příští týden (kultivace v termostatu cca 2 dny, do cvičení misky zůstanou při pokojové teplotě)