

# MIKROSKOPICKÉ HOUBY – CVIČENÍ II.

## 1. Izolace kvasinek – stanovení počtu živých buněk v 1 g vzorku - kapkovou metodou

**Materiál:** pekařské droždí (čerstvé nebo sušené)

**Pomůcky:** sterilní fyziologický roztok, špičky, automatické pipety, kultivační médium (GYPA – Glukose-Pepton Yeast Extract)

### Pracovní postup:

1. Připravíme výchozí suspenzi pekařského droždí ve fyziologického roztoku (desetinásobné ředění). Homogenizujeme na magnetickém míchadle 3 minuty. Poté se necháme roztok 30 minut stát a opět promícháme 2 minuty na míchadle.
2. Pomocí pipety z výchozí suspenze ( $10^{-1}$ ) přeneseme 1 ml do 9 ml fyziologického roztoku. Dobře promícháme! Tento postup opakujeme až k dosažení ředění  $10^{-8}$  (obr. 1).
3. Z ředění  $10^{-3}$  až  $10^{-8}$  vykápneme pomocí pipety 20  $\mu$ l na povrch média (obr. 1).
4. Kultivujeme při teplotě 30 °C po dobu 2 dnů.
5. Spočítání kolonií na Petriho misce.
6. Výpočet hodnoty CFU (Colony forming unit) v 1 g vzorku.

Celkový počet mikroorganismů  $N$  na g vzorku se vypočte podle vztahu

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

$\sum C$  součet všech kolonií spočítaných na vybraných plotnách,

$V$  objem inokula aplikovaného na misku v ml,

$n_1$  počet ploten použitých pro výpočet z prvního ředění,

$n_2$  počet ploten použitých pro výpočet z druhého ředění,

$d$  faktor prvního pro výpočet použitého ředění,

## 2. Izolace kvasinek – stanovení počtu živých buněk v 1 g vzorku - metodou roztěrem

### Pracovní postup:

1. viz. kapková metoda
2. viz. kapková metoda
3. Z ředění  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  a  $10^{-8}$  vykápneme pomocí pipety 100  $\mu$ l na povrch pevného média (obr. 2) a L-kličkou rozetřeme rovnoměrně po celém povrchu pevného média.
4. - 6. viz. kapková metoda

## 2. Izolace kvasinek stěrem z dutiny ústní

**Materiál:** stěr z dutiny ústní

**Pomůcky:** sterilní vatový tampon, tekuté médium (GPYA - Glucose Peptone Yeast Extract Agar), termostat na 30 °C

**Pracovní postup:**

1. Sterilním vatovým tamponem provedeme krouživým pohybem stěry z dutiny ústní.
2. Malíkem pravé ruky otevřeme zkumavku, vsuneme dovnitř vatový tampón a vymyjeme v tekutém médiu (v případě šikmého agaru tampón vymyjeme v kondenzované vodě na dně zkumavky a tampónem "kreslíme" hádka odspodu nahoru na plochu média).
3. Kultivujeme ve tmě, při teplotě 30 °C po dobu 24 - 48 hodin.
4. V případě zákalu v tekutém médiu zhotovíme preparát barvený podle Grama (úloha č.3).

## 3. Izolace mikroskopických hub stěrem z prostředí

**Materiál:** stěr z prostředí (např. okenní rám, žaluzie, odpadkový koš, klávesnice počítače, aj.)

**Pomůcky:** sterilní vatový tampon, Petriho miska s MEA (agar s kvasničním extraktem) + chloramfenikol, termostat na 25 °C

**Pracovní postup:**

1. Sterilní vatový tampón zvlhčíme přetřením povrchu agaru.
2. Sterilním vatovým tampónem přetřeme odběrové místo.
3. Sterilním vatovým tampónem přetřeme celou plochu Petriho misky s MEA.
4. Kultivujeme 7 dnů při teplotě 25 °C.

## 4. Příprava čisté kultury

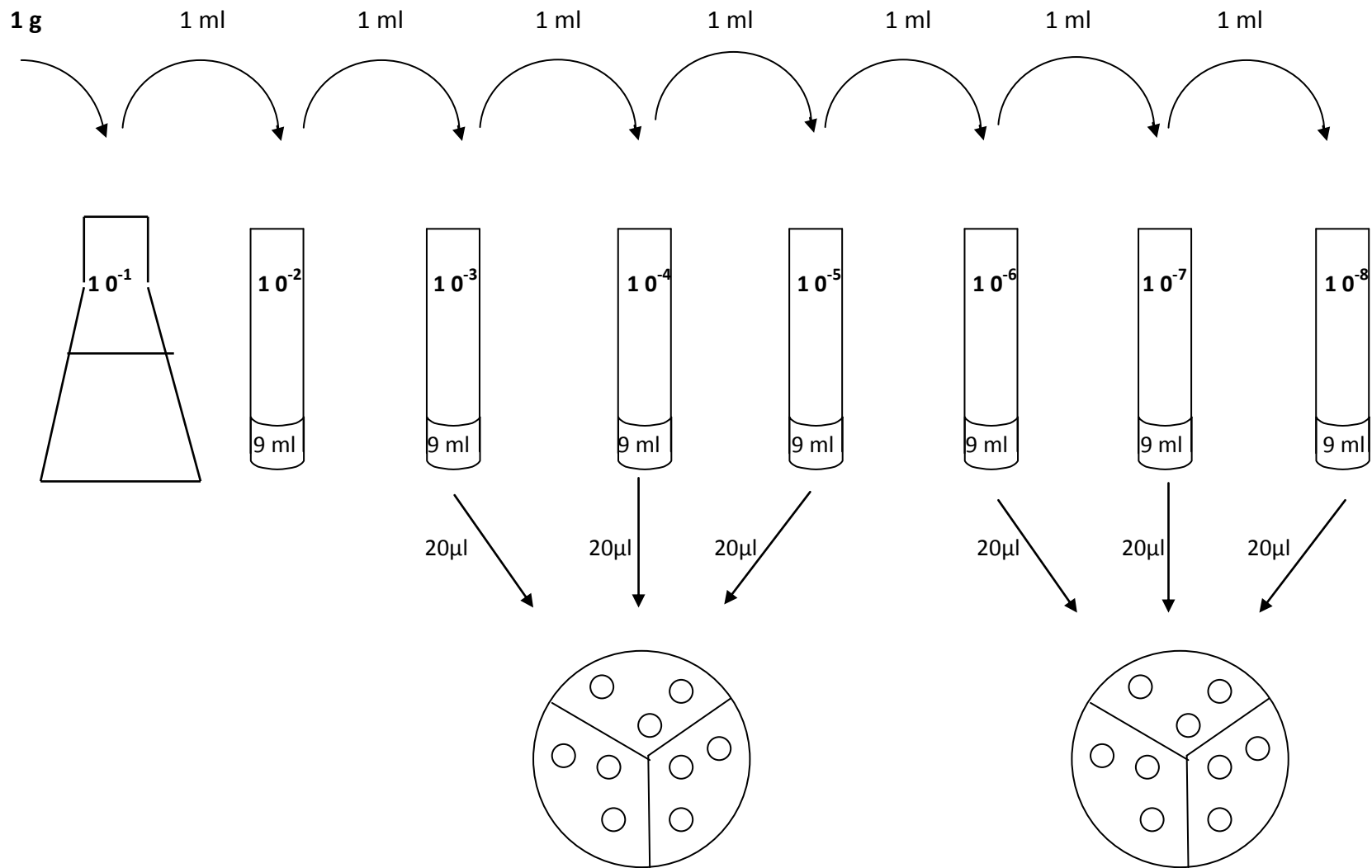
**Materiál:** Petriho misky z izolací

**Pomůcky:** preparační jehla, Petriho miska s MEA, termostat na 25 °C

**Pracovní postup:**

7. Preparační jehlou přeneseme část mycelia do středu nové Petriho misky s MEA.
8. Kultivujeme 7 dnů při teplotě 25 °C.

Obr. 1 Stanovení počtu živých buněk v 1 g vzorku - METODA KAPKOVÁ



Obr. 2 Stanovení počtu živých buněk v 1 g vzorku - METODA ROZTĚREM

