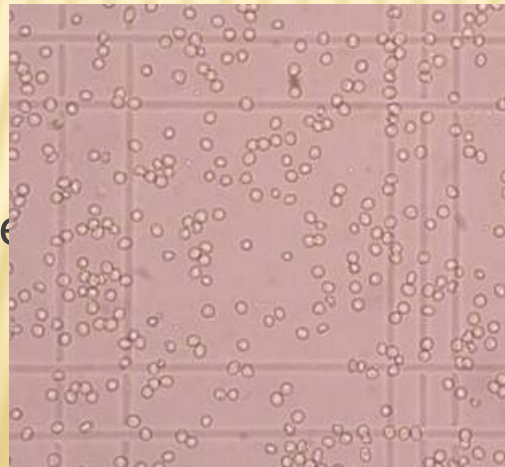


PLOTNOVÁ METODA

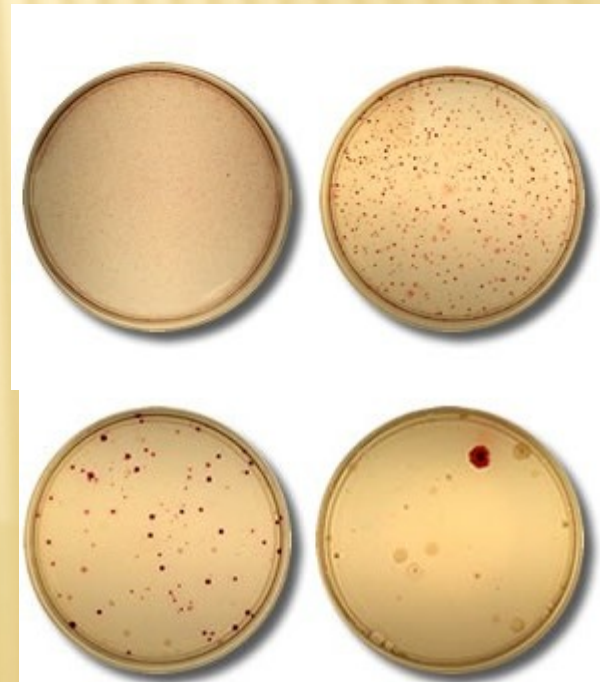
METODY STANOVENÍ POČTU BUNĚK

- ▶ **Přímé** – mikroskopické
- ▶ Počítáme buňky ze vzorku v preparátu, **bez kultivace**
- ▶ Je to rychlé, získáme počet a poměr **živých a mrtvých buněk**

- ▶ Vitální test,
počítací komůrky,
počítání buněk v kapce
na podložním skle,
počítání buněk ve
fixovaném barveném
preparátu

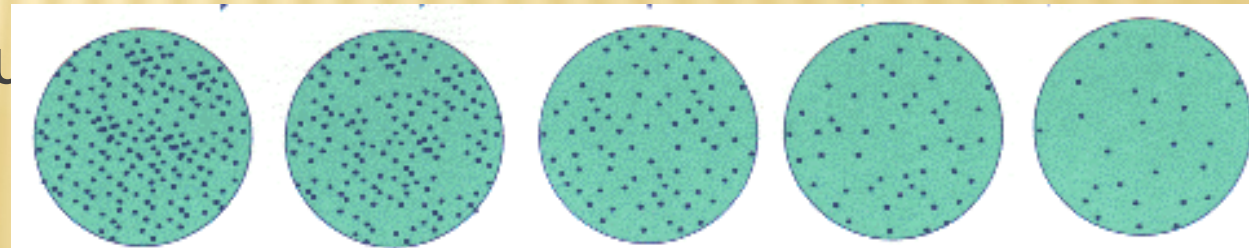


- ▶ **Nepřímé** – kultivační
- ▶ **Kultivujeme** část vzorku a zjistíme počet **životaschopných buněk**



POČTY BUNĚK

- ▶ Zjišťování počtu buněk slouží v experimentech jako standart **při porovnávání výsledků**
- ▶ Stanovíme **počty narostlých kolonií** – předpokládá se že **1 buňka vytvoří 1 kolonii**
- ▶ Jednotka = **CFU/ml**
 - ▶ Colony forming units
 - ▶ **Počet životaschopných buněk v 1 ml média = počet buněk v 1ml schopných vytvořit kolonii**
 - ▶ Určuje živé, kultivovatelné bakterie, není to celkový počet
- ▶ Stanovení počtu buněk se provádí v daném objemu a přepočítává se na 1 ml původního vzorku
- ▶ Zákal – méně přesné - živé i mrtvé buňky
- ▶ Médium – podle typu kultury
 - Základní/selektivní/selektivně diagnostické



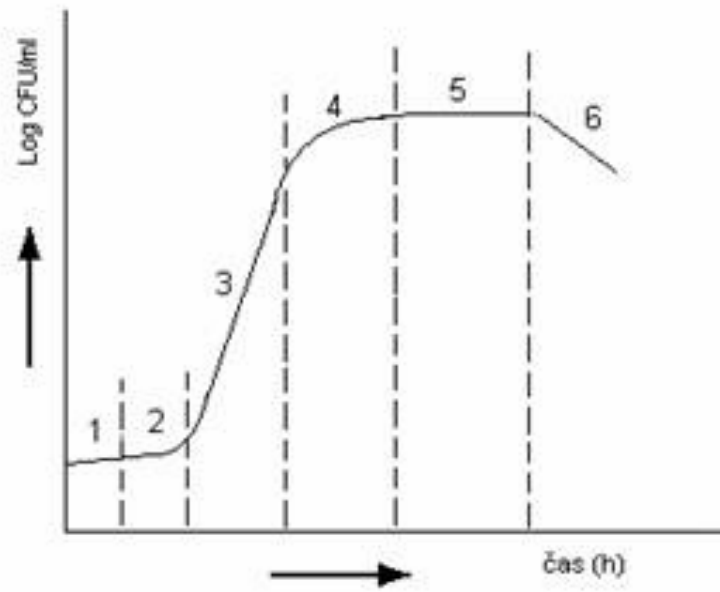
POČÍTANÍ BUNĚK - VYUŽITÍ

- ▶ **Srovnávání, opakování experimentů**
- ▶ **Sledování přírůstku buněk**
 - ▶ porovnáním počtu buněk v různých intervalech získáme obraz o fyziologickém stavu kultury, jejím prospívání či odumírání
- ▶ **Hodnocení podílu jednotlivých skupin bakterií kultuře**
 - ▶ Lze porovnávat makroskopické znaky jednotlivých zástupců
 - ▶ Lze pracovat na selektivních nebo diagnostických médiích – tedy získáme jen vybrané skupiny mikroorganismů.
Např. rozbor vody – sledujeme a počítáme koliformní bakterie



RŮSTOVÁ KŘIVKA

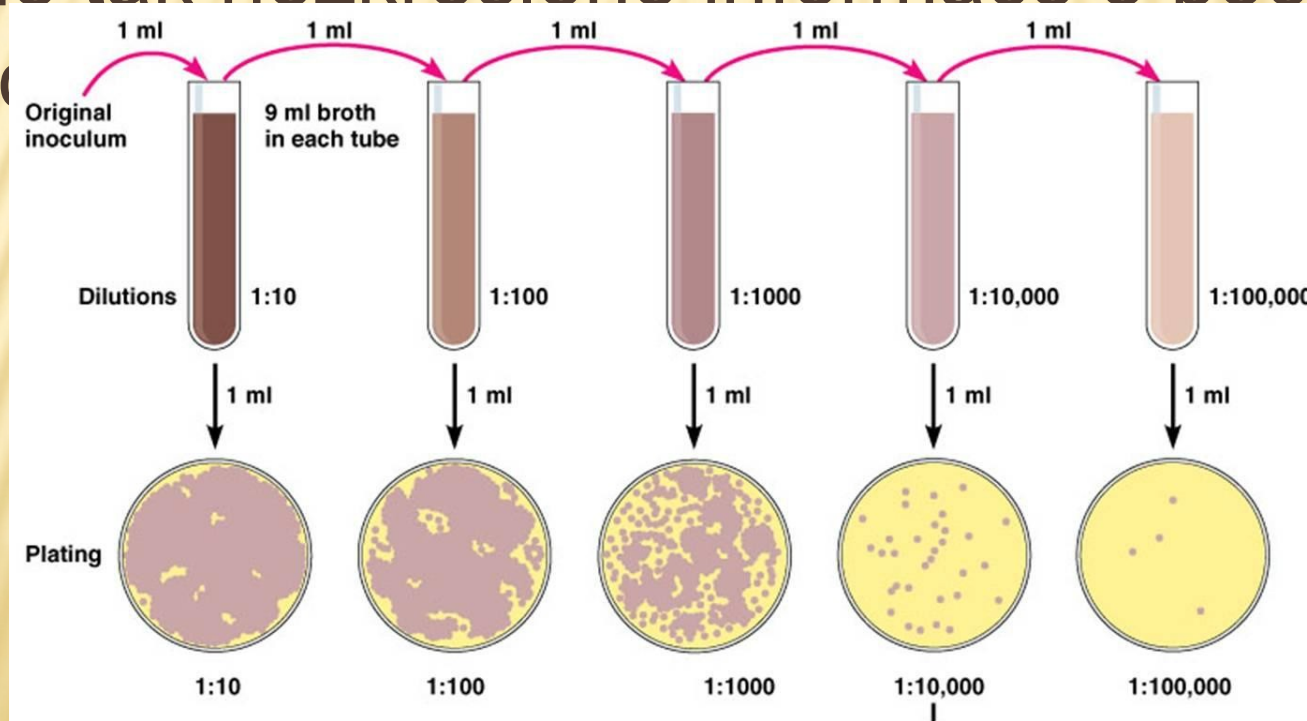
- ✘ V pravidelných časových intervalech (po cca 20 – 40 minutách) se z kultivovaného média s kulturou odebírají vzorky. Grafickým vynesemím logaritmu závislosti na čase vzniká růstová



- (1) Lag fáze
- (2) Fáze zrychleného růstu – fáze fyziologického mládí
- (3) Log fáze – logaritmická – exponenciální
- (4) Fáze zpomaleného růstu
- (5) Fáze stacionární
- (6) Fáze odumírání

PLOTNOVÁ METODA

- ✘ Cíl – vytvoření ředící řady a vysetí daných ředění na misky
- ✘ Získáme tak nezkrácené informace o počtu životaschopných mikroorganismů



POČÍTÁNÍ KOLONIÍ

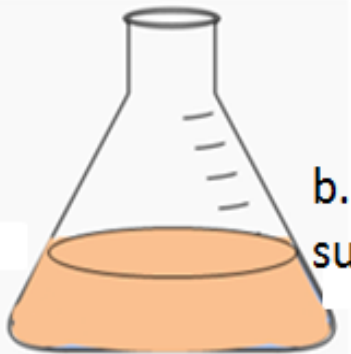


POSTUP V CVIČENÍ

- ▶ Popsat sterilní zkumavky, od 10^{-1} po 10^{-6}
- ▶ Do každé napipetovat **900 μ l** destilované vody
- ▶ Dobře promíchat kulturu, odebrat **100 μ l** a přenést do první zkumavky (10^{-1})
- ▶ Promíchat čistou špičkou a přenést **100 μ l** do druhé zkumavky (10^{-2})
- ▶ Vždy čistou špičkou promíchat suspenzi a přenést **100 μ l** do další zkumavky (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6})

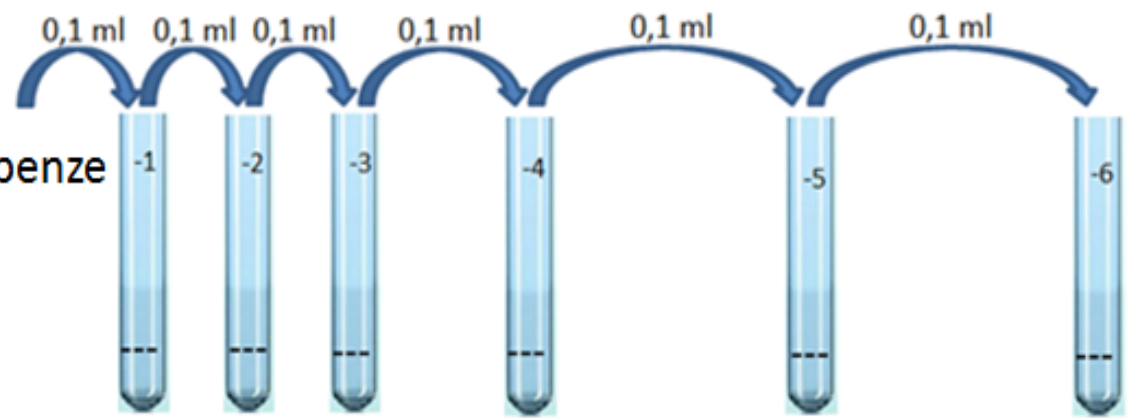
- ▶ Popsat misky na víčko
- ▶ Ze zkumavky s ředěním **10^{-4}** nanést **100 μ l** na dvě/tři misky a rozhojekovat (dlouho)
- ▶ Ze zkumavky s ředěním **10^{-5}** nanést **100 μ l** na dvě/tři misky a rozhojekovat (dlouho)
- ▶ Ze zkumavky s ředěním **10^{-6}** nanést **100 μ l** na dvě/tři misky a rozhojekovat (dlouho)
- ▶ Z **destilované vody** odebrat **100 μ l** a rozhojekovat po misce – kontrola sterility

- ▶ Kultivujeme 2-3 dny při 30°C

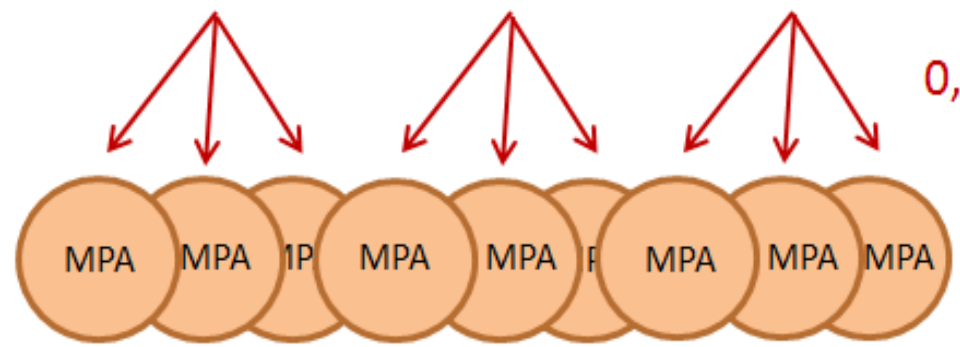


b.

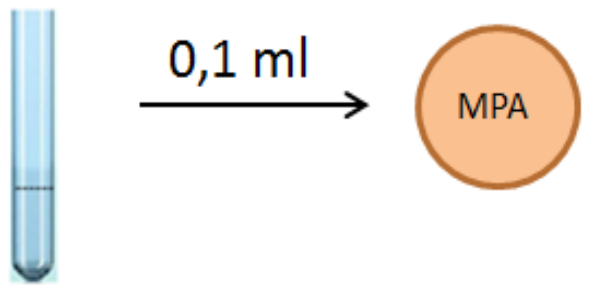
suspenze



6 x 0,9 ml fosfátového pufru



Kontrola:



fosfátový pufr

HODNOCENÍ

- ✘ Vybrat misky nejvhodnějšího ředění (kde vyrostlo 20 – 200 kolonií) a spočítat na každé misce počet kolonií.
 - ✘ Vypočítat průměr
 - ✘ Vynásobit ho kladnou hodnotou ředění (ředění 10^{-4} = průměr $\times 10^4$)
 - ✘ Vynásobit hodnotou 10 (chceme hodnotu pro celý mililitr, ale pipetovali jsme jen 0,1 ml, proto $\times 10$)
 - ✘ Získáme CFU/ml
-
- ✘ **Průměrný počet buněk \times hodnota ředění (kladný exponent) $\times 10 = \text{CFU/ml}$**
 - ✘ Výsledek uvést jak: CFU = číslo . 10^x (CFU = 7,5 . 10^7)