

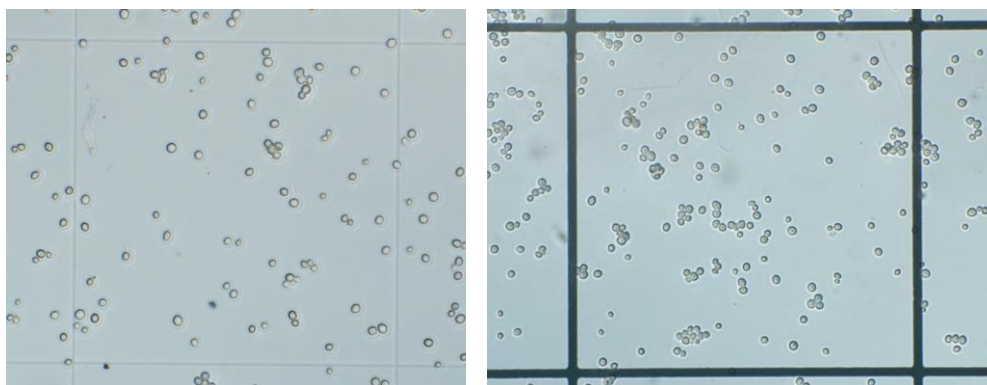
## **Přímé stanovení počtu buněk v počítací komůrce v mikroskopu**

### **Cíl, teorie:**

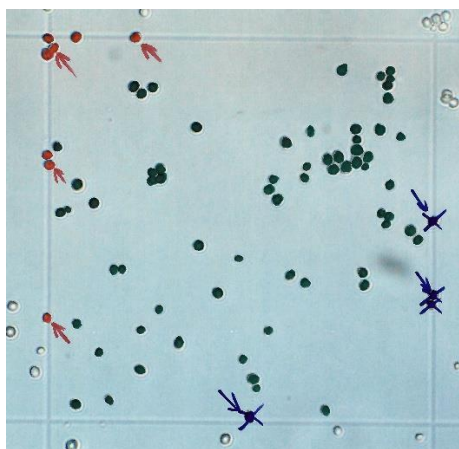
a) stanovit počet mikroorganismů ve vzorku pomocí mikroskopu a počítací komůrky

Pokud v laboratoři potřebujeme stanovit počet buněk ve vzorku můžeme použít ke stanovení buď přímé nebo nepřímé metody. Přímé stanovení se provádí pomocí ručních počítacích komůrek v mikroskopu. Přímé stanovení nevyžaduje kultivaci. Nepřímé stanovení u mikroorganismů se provádí plotnovou metodou neboli stanovením CFU/1 ml (colony forming unit), tj. výpočtem životaschopných buněk v 1 ml média.

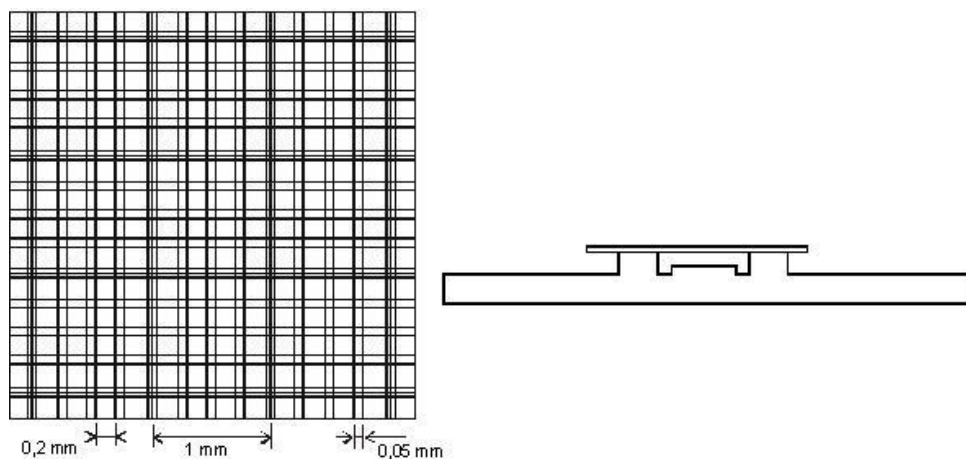
Počítací komůrka je speciálně upravené silné podložní sklíčko se speciálním tlustším krycím sklíčkem pro ruční počítání buněk. Známe celou řadu typů, nejznámější je Bürkerova komůrka. Počítací komůrka se používá k počítání buněk ve fyziologickém roztoku či pufru, např. krvinek, buněk či válců při vyšetření močového sedimentu, buněk v buněčných kulturách. Počítání se provádí v políčkách, která jsou patrná pod mikroskopem a mají definovanou velikost. Mezi další typy počítacích komůrek s různým uspořádáním políček patří Neubauerova, Malasseizova, Thomova-Zeissova



Obr. 1: Mikrofotografie pole s kvasinkovou kulturou v počítacích komůrkách v Bürkerově počítací komůrce a v počítací komůrce Cyrus. [Vymětalová]



Obr. 2: Počítání buněk, pokud buňky leží na ohraničení čtverce, počítejte jen ty, které leží jen na levé straně a horní straně čtverce.



Obr. 2: Schéma počítací Bürkerovy komůrky

V Bürkerově počítací komůrce je vytvořena počítací síť viz obr. 2. Je tvořena devíti velkými čtverci se stranou 1 mm. Každý tento velký čtverec je rozdělen dvojitými čarami na šestnáct malých čtverců s plochou 0,04 mm<sup>2</sup>. V rozích těchto čtverců jsou malé čtverce s plochou 0,0025 mm<sup>2</sup>.

### **Materiál a přístrojové vybavení:**

Materiál: kultura kvasinek rodu *Saccharomyces cerevisiae*.

Laboratorní vybavení: mikroskopická počítací komůrka, mikroskop, Pasteurovy pipety, pipetman, buničitá vata, pinzeta, destilované voda.

### **Vlastní pracovní postup**

- 1) Připravte si ředěnou kvasinkovou kulturu dle pokynů vedoucího praktika.
- 2) Počítací komůrku překryjte silnostěnným krycím sklíčkem, do střední části napipetujte pomocí pipetmana sterilní špičkou kvasinkovou kulturu.
- 3) Velmi opatrně vložte počítací komůrku do mikroskopu a pokuste se zaostřit čtverečky.
- 4) Při mikroskopování použijte 40x zvětšující objektiv.
- 5) Spočítejte počet buněk/objektů ve čtverci a to tak, že pokud buňky leží na ohraničení čtverce, počítejte jen ty, které leží jen na levé straně a horní straně. Nebo můžete použít pravou stranu a spodní stranu. Nikdy ne všechny strany!
- 6) Uvedeným způsobem spočítejte alespoň 10 čtverců/10 polí.

Počet buněk v 1 mm<sup>3</sup> spočítejte následně:

Vytvořeno s podporou projektu Inovace biologických a mikrobiologických předmětů

$$X = (\text{celkový počet buněk} / \text{počet počítaných polí}) \times (1 / (\text{plocha čtverce} \times 0,1)) \times \text{ředění kultury kvasinek} (10^x)$$

### **Získané výsledky a vyhodnocení**

Do protokolu popište podle pokynů vedoucího praktika výpočet. Spočítejte pro jednotlivé skupiny či celou paralelu počet buněk v 1 ml kvasinkové kultury.

### **Závěr a diskuse**

Porovnejte výsledky získané přímou a nepřímou metodou a proved'te diskusi.