

Nepřímé stanovení počtu životaschopných buněk, plotnová metoda

Cíl, teorie:

- a) seznámit se metodou nepřímého stanovení počtu životaschopných buněk
- b) porovnat metodu přímého a nepřímého stanovení

Nepřímé stanovení můžeme provádět buď metodou roztírání na agarové plotně hokejkou nebo metodou nalévání ploten. V laboratorním cvičení budeme provádět první metodu a k počítání buněk si zvolíme Petriho misky s nárůstem do 300 kolonií na miskou. Před zaočkováním je nutné narostlou bakteriální kulturu v exponenciální fázi růstu vyředit, viz vlastní pracovní postup.

Výpočet CFU = počet kolonií/ředění vzorku (10^{-x}) x (1/objem vzorku ml)



Obr. 1: Ukázka nárůstu bakteriálních kolonií na agarové plotně po roztěru bakteriální kultury hokejkou. [Vymětalová]

Materiál, laboratorní sklo a plast, použité chemikálie, přístroje:

Bakteriální kultura v exponenciální fázi růstu v tekutém médiu (student dostane vzorek), sterilní roztok kultivačního média, sterilní roztok destilované vody, sterilní fyziologický roztok nebo sterilní roztok pufru na ředění, sterilní zkumavky nebo sterilní plast, sterilní nové Petriho misky s agarovou půdou, plastové sterilní bakteriologické hokejky, pipetman 1 ml, pipetman 200 µl, sterilní špičky na pipetmany, kahan, vortex, popisovač, laminární box, inkubátor

Vlastní pracovní postup

- a) V laminárním boxu si připravíme ředící řadu sterilních zkumavek (6 nebo 7) nebo sterilního plastu dle pokynů vedoucího praktika. V laminárním boxu si připravíme stranou nové čisté agarové plotny.
- b) Do všech sterilních zkumavek si předem sterilně napipetujeme nastaveným pipetmanem o objemu 1 ml (používat jen sterilní špičky!) 0,9 ml sterilního ředícího roztoku.

- c) Do sterilní zkumavky označené číslem 1 napipetujeme nastaveným pipetmanem o objemu 1 ml (používat jen sterilní špičky!) 0,9 ml sterilního ředícího roztoku.
- d) Do zkumavky č. 1 připipetujeme 100 μ l narostlé bakteriální kultury, sterilně uzavřeme. Obsah zkumavky opatrně protřepeme.
- e) Do zkumavky označené jako č. 2 asepticky přeneseme ze zkumavky č. 1 s ředícím roztokem 100 μ l. Obsah opět protřepeme.
- f) Stejný postup opakujeme, až se dostaneme k poslední zkumavce, ve které máme kulturu ředěnou 10^{-6} nebo 10^{-7} podle počtu zvolených zkumavek.
- g) Z poslední zkumavky odebereme v laminárním boxu opět 100 μ l a napipetujeme na sterilní novou agarovou plotnu v Petriho misce přímo doprostřed nalitého agaru.
- h) Pomocí sterilní hokejky provedeme roztěr po celé ploše agarové plotny.
- i) Z posledních 3 ředění vytvoříme 3 Petriho misky s ředěnou kulturou.
- j) Misky přeneseme z laminárního boxu do inkubátoru a necháme kultivovat nejméně 24 hod, většinou 48 hod až 72 hod (doba kultivace závisí na použité bakteriální kultuře) při teplotě 30 – 37°C.
- k) Po kultivaci kontrolujeme nárůst jednotlivých bakteriálních kolonií na Petriho miskách.
- l) Narostlé kolonie počítáme ručně nebo pomocí počítacího zařízení.

Získané výsledky a vyhodnocení

Do protokolu popíšeme výsledky, vytvoříme tabulku s počtem narostlých kolonií jednotlivě nebo pro celou skupinu podle pokynů vedoucího cvičení. Z nejméně 3 misek stejného ředění provedeme výpočet CFU v 1 ml.