

6.2. Metódy počítania mikroorganizmov

Jednou z najčastejších úloh v mikrobiológii je stanoviť počet mikroorganizmov alebo mikrobiálnych buniek (ich kolónií) v určitom prostredí. Používame k tomu ako **priame**, tak aj **nepriame** metódy stanovenia počtov mikroorganizmov.

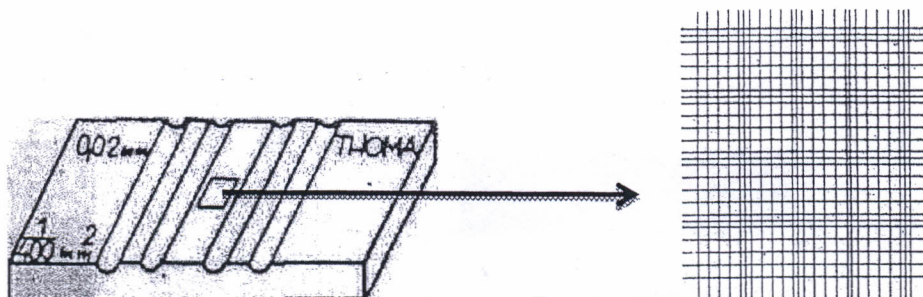
6.2.1 Priame mikroskopické metódy

Priamymi metódami počítame bunky mikroorganizmov priamo v základnej alebo zriedenej suspenzii skúmaného substrátu v **počítacích komôrkach** rôzneho typu, vo **sfarbených preparátoch** pomocou sieťového okulára alebo **fluorescenčným** mikroskopom. Priame metódy sú rýchlejšie a menej náročné na materiál. Ich nevýhodou je to, že nimi môžeme stanoviť iba celkový počet mikroorganizmov, pričom získané hodnoty sú relatívne vyššie, nakoľko do celkového počtu sú zahrnuté aj mŕtve bunky. Rozlíšenie živých a mŕtvych buniek umožňuje použitie fluorescenčnej mikroskopie.

a/ Stanovenie počtu mikroorganizmov v počítacích komôrkach (Thomova – Obr. 9, Bürkerova komôrka)

Pri tejto metóde počítame bunky v známom objeme, ktorý je vymedzený priestorom komôrky. Tento spôsob používame najmä pri počítaní kvasiniek, prípadne iných mikroorganizmov väčších rozmerov, pretože pre veľkú hrúbku komôrky môžeme použiť iba malé zväčšenie.

Thomova počítacia komôrka je hrubé podložné sklíčko s vybrúseným políčkom v strednej časti. Na dne komôrky je sieť tvorená štvorčkami rovnakej veľkosti o strane 0,05 mm. Po prikrytí krycím sklíčkom sa vytvorí komôrka o hĺbke 0,02 mm, takže objem tekutiny nad štvorčekom pri uvedenej hĺbke je $0,000050 \text{ mm}^3$. Pomocou mikropipety naplníme komôrku suspenziou kultúry a počítame bunky v malých a veľkých štvorcoch.



Obr. 9 Thomova počítacia komôrka (Števlíková *et al.*, 2007)

Materiál a pomôcky:

Thomova komôrka, mikropipety, kultúra *Saccharomyces cerevisiae*.

Pracovný postup:

1. Na vyčistenú počítaciu komôrku prenesieme očistené krycie sklíčko, ktoré položíme na postranné vyvýšené plochy. Pomocou mikropipety prenesieme určité množstvo zriedenej kultúry kvasiniek do pripravenej komôrky. Postupujeme tak, že ústie pipety priložíme zo strany k okraju krycieho skla nad počítacou plochou. Obsah pipety vypúšťame opatrne, aby povrch krycieho skla ostal suchý a nevznikli bubliny.
2. Takto pripravenú komôrku necháme v klude asi 3 minúty, aby bunky sedimentovali ku dnu. Potom pozorujeme pri väčšom zaočnení slabozväčšujúcim objektívom (20 x) a orientačne zistíme, či počet buniek v 1 štvorčeku nie je vyšší ako 25 - 30 buniek. V prípade vyššieho počtu pripravíme vyššie zriedenie.
3. Postupne počítame bunky v 5 - 6 veľkých štvorcoch, ktoré vyberáme náhodne. Bunky, ktoré ležia na čiarach, počítame len na dvoch zvolených stranách. V praktických cvičeniach počítame z časových dôvodov bunky v 3 veľkých štvorcoch.
4. Celkový počet buniek (P) v 1 mm^3 vypočítame podľa vzorca:

$$P = \frac{p \cdot v \cdot h \cdot z}{y}$$

v = prevrátená hodnota plochy 1 malého štvorčka

p = počet spočítaných buniek v dohodnutom počte veľkých štvorcov

h = prevrátená hodnota hĺbky komôrky

z = stupeň zriedenia (napr. ak je riedenie 10^{-2} z=100)

y = počet malých štvorčekov, v ktorých sme bunky počítali