

DATUM:

JMÉNO:

TÉMA: **Testování bakteriální a houbové kontaminace kultur explantátů**

MATERIÁL: Nodální segmenty kultur prýtů brambor, tabáku, karafiátů a maliníku, apod.

Přítomnost latentních mikroorganismů v kultuře *in vitro* ovlivňuje její růst a vývoj, množitelý koeficient i aklimatizaci. Při kultivaci na klasických médiích používaných pro explantáty se kontaminace nemusí vždy projevit. Segmenty nebo prýty kultivovaných kultur se proto testují na různých selekčních médiích, které jsou pro rozvoj mikroorganismů příhodnější. Kultivací nodálních segmentů a prýtových disků kultur na širokospektrém médiu Leifert and Waites Sterility Test Medium (Leifert *et al.* 1989) nebo na médiu B523 (Viss *et al.* 1991) zjišťujeme bakteriální kontaminaci kultur.

MÉDIA:

pevné agarové medium B523 (kaseinhydrolyzát 8 g.l<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0,15 g.l<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g.l<sup>-1</sup>, kvasničný extrakt 4 g.l<sup>-1</sup>, sacharosa 10 g.l<sup>-1</sup>, agar 10 g.l<sup>-1</sup>)

kontrola: udržovací M-S medium

POSTUP:

1. Vyjmi prýty sterilní pinzetou z kultivační lahve a polož je na sterilní Petriho misku v aseptických podmínkách laminárního boxu.
2. Odděl apikální segmenty prýtů a inokuluj je do udržovacího média pro další kultivaci.
3. Rozřež zbylé prýty na jednotlivé nodální segmenty a tenké řezy.
4. Do agarového B523 média zanoř segment (řez), pomalu jej vytáhni, polož na povrch média a misku uzavři. Tímto postupem se inokulují spodní vrstvy média s nízkou koncentrací O<sub>2</sub>, která podporuje růst některých mikroorganismů.
5. Stejným způsobem inokuluj kontrolní misku s udržovacím M-S médiem.
6. Popiš misky s odpovídajícími segmenty, disky a apikálními segmenty prýtů.
7. Inkubuj inokulované Petriho misky ve tmě při 22-30°C po 3 týdny.

HODNOCENÍ

V následujících týdnech kontrolujte čistotu kultur.

Kolonie na povrchu pevného média nebo halo v médiu indikují přítomnost kultivovatelných mikroorganismů v kultuře.

Porovnejte kontaminaci odpovídajících testovaných kultur na testovacím a MS médiu.

Zapište výsledky.

LITERATURA:

Leifert *et al.* (1989): J. Appl. Bacter. 67: 351 – 361.

Viss *et al.* (1991): In Vitro Cell Dev. Biol.-Pl. 27P,42.