

Însămânțarea ciupercilor pe mediul de cultură

Deși par simple, inocularea și transferul sunt efectuate de multe ori greșit, ceea ce duce la contaminări nedorite ale culturilor, la infestarea laboratorului și chiar a operatorului (Constantinescu, 1974). Prin însămânțare se înțelege trecerea pe medii de cultură a microorganismelor din diferite surse (apă, sol etc.), în vederea cultivării și izolării lor în culturi pure. Însămânțarea ciupercilor se poate executa cu ansa sau cu pipeta Pasteur.

Însămânțarea cu ansa

Pentru inoculare, trebuie folosit un ac de însămânțat, confecționat din platină sau un aliaj care nu vibrează. În timpul inoculării, acul de însămânțat nu se introduce fierbinte în cultură. După inoculare, se recomandă ca acul de însămânțat să fie imersat în alcool etilic 70% și după aceea trebuie trecut în flacăra becului de gaz. Această ordine a operațiilor trebuie respectată, deoarece prin încălzire bruscă fragmente de inocul sunt dispersate în aer. În timpul inoculării mediilor de cultură, trebuie să se lucreze sub hotă, în condiții sterile.

Tehnica transferului inoculului fungic în eprubetă, vas Petri sau alt vas de cultură este prezentată detaliat în diferite manuale de laborator (Botton și colab., 1985; Kreisel și Schauer, 1987).

Materialul de însămânțat se introduce în mediul de cultură din diferite vase (eprubete, vase Petri etc.), cu ajutorul ansei. Dacă nu dispunem de o cultură pură a unei anumite ciuperci, este necesar să o izolăm și să o purificăm. Pentru aceasta, se însămânțează ciuperca în vase Petri direct de pe substratul pe care se dezvoltă. Astfel, vom obține culturi în care ciuperca este amestecată cu alte microorganisme. Aceste culturi se examinează la stereomicroscop.

Din zonele în care ciuperca apare mai puțin amestecată și cu alte microorganisme, se ia o mică porțiune care se însămânțează din nou. Se repetă această operație, până când se purifică cultura pe care dorim să o studiem, de microorganisme străine. După ce s-a obținut cultura pură în vase Petri, ciuperca se însămânțează din nou în eprubete, pentru a putea păstra izolatul mai multă vreme (2-3 luni), la temperatură scăzută (2-4°C). După această perioadă, culturile trebuie însămânțate din nou, pentru a le înmprospăta.

Pentru purificarea culturilor de ciuperci, se folosesc o serie de factori chimici care inhibă creșterea bacteriilor, precum penicilina, streptomycina, cloramfenicolul etc. Penicilina (20-40 unități/ml mediu de cultură) și streptomycina (40-100 unități/ml mediu de cultură) se adaugă după sterilizare, când mediul s-a răcit la 45°C. Cloramfenicolul (0,05 mg/ml mediu de cultură) poate fi inclus, înainte de sterilizare (Constantinescu, 1974).

După efectuarea însămânțării, pe vasele cu mediul de cultură se notează specia cultivată, data efectuării operației, mediul de cultură folosit etc. Mediile de cultură însămânțate cu ciuperci, se pun în termostat, la temperatura optimă (20-22°C) de creștere și dezvoltare, timp de 10-15 zile. Periodic, la intervale egale de timp, se fac observații și se notează caracterele morfologice ale coloniilor obținute.