

mush mush - przygotowanie szalek z agarem

by mush mush

Praca z agarem

Co to jest agar?

Agar jest wielocukrem występującym w komórkach niektórych czerwonych alg, pozyskuje się go przez ich gotowanie, a następnie oczyszcza.

Agar rozpuszczony w gotującej wodzie i pozostawiony stygnięciu zamienia się w żel (bardzo podobny do żelatyny).

Można go kupić pod różnymi postaciami, od postaci spożywczych do gotowych oczyszczonych kultur. Stosowany jest głównie w mikrobiologii oraz w przemyśle spożywczym jako wegetariański odpowiednik żelatyny.

Dlaczego agar jest ważny?

Agar wykorzystywany jest jako środek żelujący pożywkę. Dodając składniki odżywcze (agar sam w sobie nie zawiera składników odżywczych) przygotowujemy podkład, na którym będzie można wyhodować grzybnię. Nie można go zastąpić żelatyną ponieważ po sterylizacji w autoklawie żelatyna traci właściwości żelujące.

Przygotowanie odżywki na podkład

Istnieje wiele dobrych sposobów, ale ten jest najprostszy.

MEA (Malt Extract Agar) słodowy ekstrakt agaru

składniki:

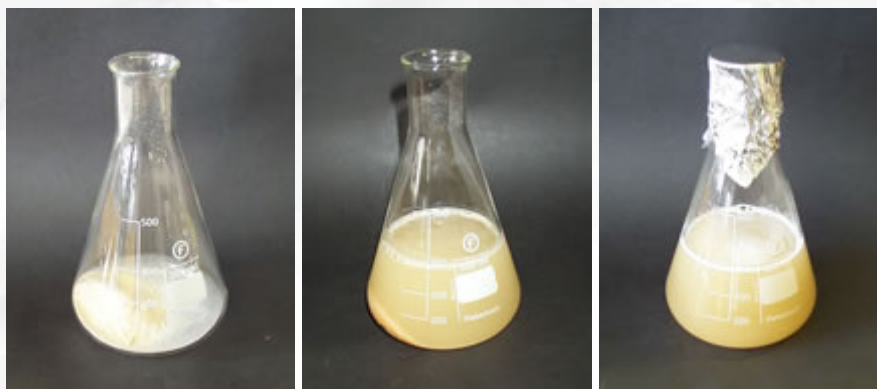
- 20 gram jasnego słodowego ekstraktu
- 2 gramy drożdży
- 15-20 gram agaru
- 1 litr wody

(można przygotować mniejszą ilość stosując proporcjonalnie mniejsze ilości składników)

Suche składniki umieszcza się w kolbie i zalewa wodą. Ich ilość nie powinna przekraczać 2/3 objętości kolby, w przeciwnym wypadku część składników wykipi.

Kolbę należy zatkać kawałkiem nienasiąkliwej bawełny, lub owinąć folią aluminiową.

Następnie kolby sterylizuje się w szybkowarze w temperaturze 120°C przez 40 minut.



Tak przygotowane podłoże pozwoli wyhodować grzybnię większości grzybów saprofitycznych.

Inne często wykorzystywane formuły na przygotowanie odżywki to PDA (potato dextrose agar) i DFA

(dog food agar).

Przygotowując własne recepty miej na uwadze że więcej nie zawsze oznacza lepiej. Jeśli w podkładzie jest zbyt dużo składników odżywczych grzybnia nie urośnie lub będzie rosnąć bardzo kiepsko wydzielając przy tym żółtawe metabolity.

Napełnianie szalek

Po wyjęciu kolb z szybkowaru lub z autoklawu temperatura agaru wynosi około 100°C. Podłoże będzie płynne dopóki temperatura nie spadnie poniżej 40°C. Agar należy pozostawić aby ostygł prawie do tej temperatury. Mała wskazówka: Jeśli przez dziesięć sekund możesz utrzymać w dłoni kolbę bez wyraźnego dyskomfortu to znaczy że temperatura jest właściwa. Nie pozwól by ostygł za bardzo ponieważ zgęstnieje w kolbie. Lepiej napełniać masą gorętszą niż pozwolić jej zgęstnieć.

Ponieważ szalki będą odkryte przez kilka sekund ważne jest by pracować w czystym pomieszczeniu.

Powierzchnia stołu, na którym pracujesz powinna być przemyta alkoholem lub lizolem (**OSTROŻNIE! SUBSTANCJE ŁATWOPALNE!**). Szalki wyjmujemy z tuby w którą są zapakowane i układamy je w stosy po dziesięć sztuk. Jeśli pracujesz w pomieszczeniu, które nie jest w 100% sterylne to musisz działać najszybciej jak to możliwe, chodzi o to aby ograniczyć wpływ zanieczyszczonego powietrza na agar.

Wstrząśnij kolbą by wymieszać zawartość i zdejmij z niej folię aluminiową.

Zdejmij pokrywkę ze spodniej szalki (faktycznie zdjęć trzeba pokrywkę i dziewięć ustawionych na niej w stos szalek). Szybko wlej warstwę (3-5 mm) agaru i zakryj szalkę pokrywką. Następnie szybko unieś pokrywkę kolejnej szalki (wraz z ośmioma stojącymi na niej szalkami) i napełnij ją agarem. Czynność tę należy powtórzyć dziesięć razy, czyli tyle ile szalek znajduje się w stosie.

Poprzez odczekanie na ostygnięcie agaru przed napełnianiem i poprzez ustawienie szalek w stos minimalizuje się skraplanie wody na pokrywkach. Można je zmniejszyć jeszcze bardziej stawiając na górnej szalce stosu kubek lub słoik z wodą w temperaturze bliskiej wrzenia.

Jak tylko agar zgęstnieje szalki są gotowe do użycia.



Przygotowanie probówek z agarem

Kultury grzybni przechowywane są zazwyczaj w probówkach. W czasie stygnięcia agaru umieszcza się je pod skosem, robi się to w celu zwiększenia powierzchni na której będzie rosła grzybnia.

Probówki przygotowuje się trochę inaczej niż szalki petriego, ponieważ od razu sterylizuje się je z agarem, w przeciwieństwie do szalek, które najpierw są sterylizowane a dopiero potem napełniane płynnym agarem.

Najpierw odpowiednią ilość wody należy doprowadzić prawie do wrzenia, następnie dodaje się do niej składniki i wstrząsa w celu dokładnego ich rozpuszczenia. Zanim agar zostanie wrzucony do gorącej wody trzeba wymieszać go z odrobiną wody zimnej, w przeciwnym wypadku się skwali.

Ostrożnie, dodanie agaru do wrzącej wody spowoduje jej intensywne pienienie i kipienie. Wrzący agar może spowodować poważne oparzenia!

Agar powinien pogotować się przez kilka minut.

Tak przygotowanym płynem napełniamy probówki po 5-6 ml do każdej. Probówki należy luźno zakorkować. Bardzo przydatny jest w tym momencie mały lejek i duża strzykawka. Probówki sterylizujemy przez 25 minut w temperaturze 120°C.

Po wysterylizowaniu należy odstawić je do ostygnięcia. W czasie stygnięcia probówki trzeba postawić pod skosem tak aby agar utworzył jak największą powierzchnię czynną. Po zakrzepnięciu agaru probówki są gotowe do użycia.



Zakładanie kultury z zarodników.

Aby założyć kulturę grzybni potrzebujesz odcisk z zarodnikami i narzędzie które można wysterylizować - posłuży ono do przeniesienia zarodników (skalpel lub coś podobnego).

Przy pomocy skalpela zeskrobujemy zarodniki z odcisku i strząchujemy je na powierzchnię agaru. Zanim wykorzystamy skalpel do kolejnego zaszczepienia należy go przesterylizować.

Przeważnie w ciągu kilku dni na powierzchni agaru pojawią się widoczne ślady rozwoju zarodników, ale czasem może to zająć nawet cztery tygodnie. Jeśli zarodniki nie kiełkują może okazać się koniecznym namoczenie ich w sterylnej wodzie przez 24 godziny, a dopiero potem naniesienie ich na agar.



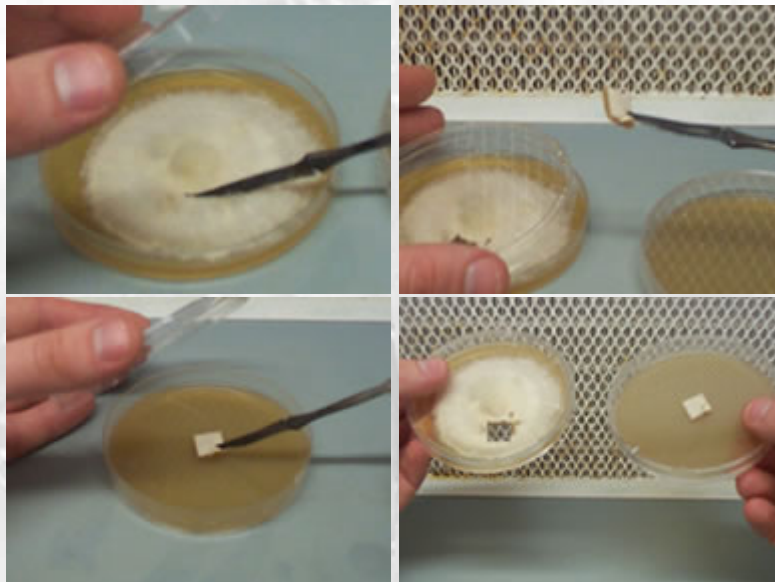
Jeśli pojawi się jakieś zanieczyszczenie (pleśń) można albo wyrzucić całą szalkę albo przenieść część zdrowej grzybni do nowej szalki. Aby uniknąć rozprzestrzenienia zarodników pleśni przenosiny takie należy wykonać w pomieszczeniu, w którym powietrze jest prawie nieruchome.

Kiełkujący zarodnik formuje grzybnię zwaną monokaryon, grzybnia ta sama w sobie nie jest zdolna do owocowania. Kiedy grzybnie dwóch zarodników połączą się tworzy się nowy rodzaj grzybni, zdolnej do owocowania, dikaryon. Proces ten zachodzi automatycznie i jedna szalka z kiełkującymi zarodnikami często zawiera dziesiątki takich połączeń. Szalka z kiełkującymi zarodnikami często wygląda trochę brudnawo, z monokaryonami i dikaryonami rywalizującymi o składniki odżywcze.

Teraz mamy dwie możliwości: działać z tą mieszaniną pododmian (kultura wielozarodnikowa) lub wyodrębnić czystą pododmianę. Każda pododmiana danego gatunku posiada własne cechy, ale

generalnie, podobna jest do swoich rodziców. Krótko mówiąc, owocowanie z czystej pododmiany jest bardziej ujednolicone i obfitsze niż z mieszaniny pododmian.

Aby wyodrębnić czystą pododmianę należy przenieść małe skrawki wycięte z agaru z wielozarodnikową kulturą na świeże podłoże. Przyrost z tych skrawków nadal będzie wyglądał brudnawo ale niektóre sektory ładnie się rozwiną i będą wyglądały zdrowo. Te zdrowo wyglądające sektory jeszcze raz przenosimy na nową pożywkę. Czynność tę powtarzamy dopóki nowy przyrost nie będzie jednolity i nie podzielony na sektory. To właśnie jest czysta pododmiana.



Kulturę wielozarodnikową można oczywiście wykorzystać do bezpośredniego zaszczepienia substratu. Czyste odmiany można wyizolować z grzybów, które wyrosną z kultury wielozarodnikowej, jako że grzyb powstaje z włókien grzybni tylko jednej pododmiany (nie mieszaniny).

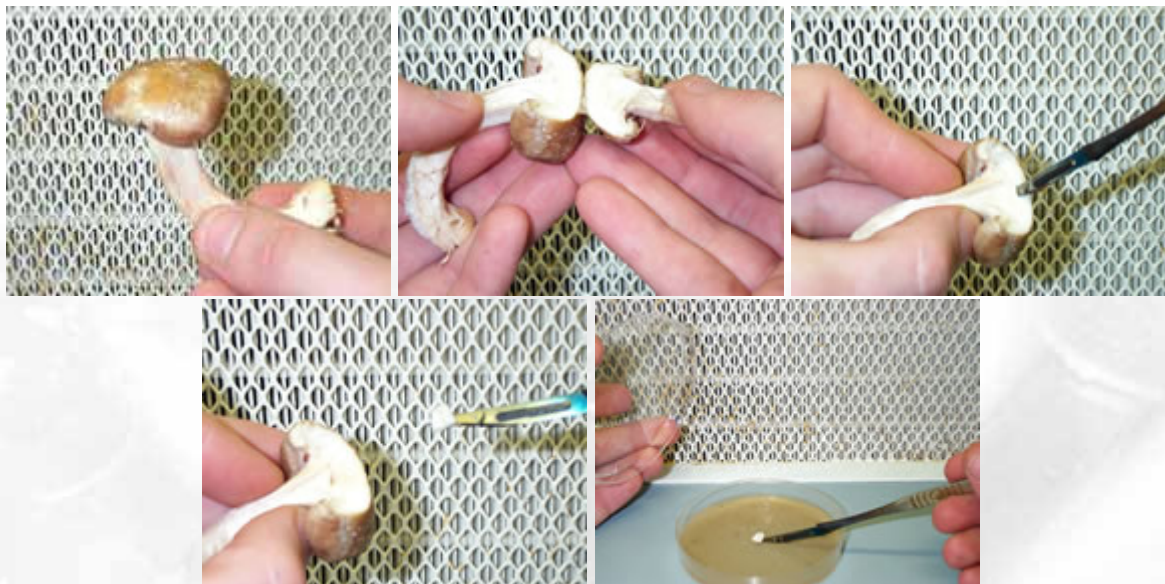
Zakładanie kultury z owocu

Jak wcześniej wspomniano grzyb wyrasta z włókien grzybni jednej pododmiany dlatego jego tkankę można wykorzystać do założenia nowej kultury. Klonowanie grzyba, który wyrósł z czystej odmiany właściwie nie przynosi korzyści. Klonowanie grzybów jest przydatne gdy zaczynamy z kulturą wielozarodnikową lub gdy klonujemy dzikie odmiany.

Chcemy wyizolować czystą linię poprzez konsekwentne izolowanie grzybni z najzdrowiej wyglądających grzybów. Oszczędza to czas i daje pewność że uzyskana odmiana rzeczywiście jest tą, która wykazuje tendencje do owocowania na wybranym substracie i w określonych warunkach otoczenia.

Grzyby produkowane przez większość odmian są wewnątrz sterylne. Praktyczny sposób na wyizolowanie kawałka tkanki to rozcięcie grzyba i wycięcie jej z jego środka. Wycięty kawałek grzyba kładziemy na agar. Należy zwrócić uwagę aby ani skalpel ani wycięty kawałek nie dotknęły zewnętrznej części grzyba. Z pewnością wywoła to zakażenie przenoszonej części.

Aby zwiększyć szansę na powodzenie trzeba tak zaszczepić co najmniej dziesięć szalek, uważając przy tym aby nie przenieść zakażenia (przesterylizować skalpel pomiędzy zabiegami).



Przeważnie w ciągu kilku dni fragment obudzi się do życia. Stanie się puszysty i zacznie zarastać powierzchnię agaru. Jeśli widoczne są zanieczyszczenia można spróbować odizolować od nich grzybnę.



Mimo że to czysta (pod)odmiana to mogą pojawić się sektory, często zdrowe rejony mieszają się z wyglądającymi jak bawełna puszystymi częściami. Powód tego nie jest znany. Niektóre odmiany mają większą od innych tendencję to występowania takiego zjawiska. W takim wypadku właściwa grzybnia musi być przenoszona na nowe szalki dopóki nie ustabilizuje się w czystą kulturę.

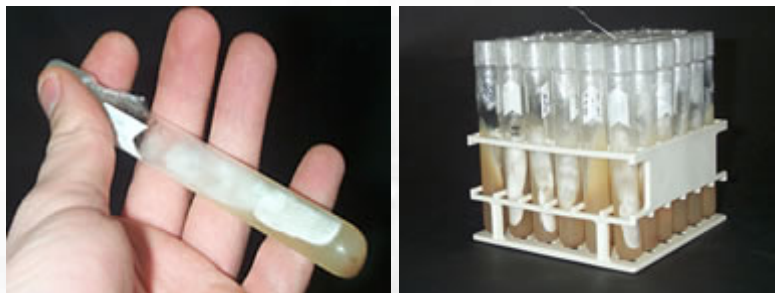
Owijanie szalek i próbek taśmą

Aby uniknąć utraty wilgoci i możliwości zakażenia, szalki i próbki owijają się taśmą klejącą. Owijając taśmę rozciągamy ją trochę, aby lepiej skleić przykrywkę z szalką. Taśma polietylenowa pozwala na powolną wymianę gazu.



Przechowywanie kultur

Aby magazynować kultury próbki zaszczepiane są małymi kawałkami agaru. Zatyczka próbki zatkana jest luźno i owinięta taśmą klejącą. Jak tylko agar zostanie w pełni skolonizowany próbki umieszcza się w lodówce gdzie mogą być przechowywane przez co najmniej rok. Mądrze jest raz w roku sprawdzać żywotność kultur zaszczepiając nimi kilku szalek.



Inkubacja kultur

Rozwój kultur powinien odbywać się we właściwej temperaturze. Jeśli temperatura będzie za wysoka grzybnia zacznie się pocić i mieć obrzydliwy wygląd. Jeśli temperatura będzie za niska grzybnia będzie rosła wolno. Ogólnie niższa temperatura jest lepsza niż za wysoka.

Bardzo ważne jest także żeby temperatura się nie wahała, ponieważ powoduje to skraplanie wody na pokrywkach szalek. Temperaturę należy utrzymywać na tym samym poziomie. Szalki inkubuje się do góry nogami, więc nawet jeśli skondensuje się jakaś woda to i tak nie zaszkodzi rozwojowi grzybni.

tłumaczenie: **cjuchu**

PSILOSOPHY.info