

Kültür Koruma¹

A. Kadir HALKMAN, Hilal B. DOĞAN
Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

01. Genel Bilgiler
02. Koruma Yönteminin Seçimi
03. Kültür Koruma Yöntemleri
 - 03.01. Transfer
 - 03.02. Kurutma
 - 03.03. Dondurarak Kurutma (=Liyofilizasyon)
 - 03.04. Dondurma
04. Küçük Ölçekli Kültür Koleksiyonu Organizasyonu
 - 04.01. Basit Dondurma
 - 04.02. Derin Dondurma
 - 04.03. Cam Boncuk ile Dondurma
 - 04.04. Kâğıt Disk ile Kurutma
 - 04.05. L - Kurutma
 - 04.06. Anaerobların Korunması
 - 04.08. Mayaların Korunması
05. Koleksiyon Bilgileri
06. Aktifleştirme

01. Genel Bilgiler

Mikrobiyolojik çalışmalar yapan her laboratuvarında bir kültür koleksiyonu olmak zorundadır. Bu koleksiyon, laboratuvarın amacı ve işlevi, teçhizat ve ekipman ile personel durumu, koleksiyona alınacak mikroorganizmaların özellikleri, koleksiyonun hedeflenen süresi vb. gibi bir çok faktöre bağlı olarak değişik şekillerde ve kapasitelerde düzenlenir. Koleksiyonda en azından o laboratuvara özgü mikroorganizmaların bulunması gerekir.

Kültür korumanın temel prensibi varyasyon veya mutasyona uğratmadan mikroorganizmayı saf halde ve uzun süre canlı tutmaktır. Bu çerçevede kültür koruma işlemine laboratuvardaki ekipmanın ve analiz yöntemlerinin standardizasyonunda olduğu kadar ve kimyasal madde stoklarına gösterildiği kadar özen göstermek gerekir. Bununla beraber, sadece kültür koleksiyonu oluşturmak amacıyla kurulmuş olanların dışında, en gelişmiş laboratuvarlarda dahi kültür koleksiyonuna yeterli önem verilmemektedir.

Mikrobiyolojinin gelişme sürecinde kültür korumaya yönelik daha kolay, daha pratik, daha ucuz ve en önemlisi daha etkin yöntemler gelişmiştir. Bu süreç içinde en eski çalışmanın çiçek aşısı ile yapıldığı sanılmaktadır. 1799 yılında Dr. Carro ipliklere emdirilmiş çiçek aşısını 1 yıl süre ile saklamış ve bu süre sonunda aşının etkinliğini koruduğunu görmüştür.

Gelişen bilim ve teknoloji süreci içinde kültür korumaya yönelik pek çok yöntem bugün başarı ile uygulanmaktadır. Ancak, tüm mikroorganizmalar için aynı yüksek başarı düzeyi ile kullanılacak tek bir yöntem yoktur. Bu nedenle farklı mikroorganizma grupları için farklı

¹ Kaynak : **Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, 2000. Genişletilmiş 2. Baskı; Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını. Sim Matbaası, Ankara 522 s 08. Bölüm**

yöntemler ve/veya aynı yöntemin çeşitli modifikasyonları önerilmektedir. Bununla beraber özel mikroorganizma gruplarının da yer aldığı büyük koleksiyonlar hariç tutulur ise bir gıda mikrobiyolojisi laboratuvarı için tek bir yöntem ile tatmin edici bir koleksiyon oluşturabilir.

02. Koruma Yönteminin Seçimi

Yukarıda da belirtildiği gibi koleksiyonun oluşturulmasında pek çok faktör tarafından etkilenen farklı yöntemler uygulanmaktadır. Uygulanan her yöntemin bu faktörlere bağlı olarak çeşitli avantaj ve dezavantajları vardır. Aşağıda bu faktörlere kısaca değinilmiştir.

-Canlılığın korunması: Kültür koleksiyonunun temel amacı mikroorganizma canlılığının korunmasıdır. Canlılık, gerek koruma işlemi (dondurma, kurutma) sırasında, gerek depolama sırasında azalır. Kültürün tümüyle kaybının önlenmesi için belirli sürelerde kültür aktifleştirilip yeniden korumaya alınmalıdır. Kuşkusuz, canlılıkta en az kayıpların sağlandığı yöntemler tercih edilmelidir.

-Popülasyonun değişimi: Özellikle dondurma ve kurutma uygulanan yöntemlerde koruma işlemi sırasında canlılık kayıpları oluşur. Başlangıç hücre konsantrasyonunun yüksek tutulması ile bu sorun önemli ölçüde giderilir. Bunun yanında işlem sırasındaki ölümler ile uygulanan işleme dirençli olanların lehine popülasyonda bir değişme meydana gelir ve bir anlamda kültürün ilk durumuna göre orijinalliğinde değişme olur. Bu değişiklik bazı endüstriyel üretimler için avantaj olmakla beraber genel olarak kültür koruma amacına uygun değildir. Kültürün başlangıç konsantrasyonunun yüksek olması ile bu sakınca en aza indirilir.

-Genetik değişim: Özellikle endüstriyel ve bilimsel önemi olan kültürler genetik değişimlere uğramayacak şekilde korunmalıdır. Genetik değişimler koruma işlemi ve/veya depolama sürecinde meydana gelebilir. Mutasyon ve plazmidlerin yitirilmesinin en az olduğu yöntemler seçilerek temel karakterlerin kaybedilmemesi ve yeni karakterler kazanılmaması bu tip özel mikroorganizmalar için önemlidir.

-Saflığın korunması: Genel olarak koruma işlemi ve aktifleştirme sırasında ne kadar fazla işlem basamağı var ise kültür, kontaminasyona o denli açıktır. Saflığın yitirilmesi kültür koleksiyonunda kabul edilemez.

-Maliyet: Personel giderleri, alet ve ekipman giderleri, sarf malzemesi giderleri kültür koleksiyonunda kullanılacak yöntemi en yüksek derecede etkileyen faktörler arasındadır. Bu etkileme özellikle küçük laboratuvarlar için daha belirleyicidir. Liyofilizasyon ve ultra dondurma gibi uzun süreli koruma yöntemlerinde ekipman giderleri çok yüksektir ancak bu yöntemler ile uzun ve etkili koruma sağlanır.

-Koleksiyona alınacak kültür sayısı: Kültür koleksiyonunda korunacak mikroorganizma sayısı koruma yöntemini belirleyen temel faktörlerden birisidir. İlk koruma ve koleksiyonun aktifleştirilmesi için gereken iş gücü bir anlamda koleksiyondaki sayıyı ve dolaylı olarak yöntemi belirler. Bir diğer deyiş ile koleksiyondaki mikroorganizma sayısı ile seçilecek koruma yöntemi doğrudan ilişkilidir. Küçük bir koleksiyon için uygun bulunan yöntem, zamanla koleksiyonun büyümesi durumunda elverişsiz kalabilir. Bu nedenle yöntem seçiminde ilerideki kapasite büyümeleri de dikkate alınmalıdır.

-Kültürün değeri: Endüstriyel ve bilimsel önemi olan kültürlerde maliyet kuşkusuz önemli bir faktör değildir. Bu tip kültürler için en etkin yöntem seçilmek zorundadır. Koleksiyonda değerli olan kültürler de bulunuyor ise önemlerine göre 1'den fazla yöntem ile koruma yapılmalıdır. Benzer şekilde maliyetler dikkate alınarak önemli ve daha az önemli kültürler farklı yöntemlerle koleksiyona alınabilir.

-Kültürün kullanım sıklığı: Rutin gıda analizlerinde şahit mikroorganizma ve/veya eğitim gibi koleksiyondaki mikroorganizma sıklıkla kullanılıyor ise orijinal koleksiyona ilaveten bu amaçla kullanılacak yan koleksiyonların da bulunması gerekir.

-Kültürün dağıtımı: Eğer koleksiyondaki mikroorganizmalar çeşitli nedenlerle diğer laboratuvarlara da iletilecek ise yine ana koleksiyon yanında bu amaca uygun bir koruma yöntemi de uygulanmalıdır. Örneğin sıvı azotta korunan kültürün bir başka laboratuvara iletilmesi çok yüksek maliyetler gerektirir. Buna karşın kurutulmuş kültürler mektupla dahi başka laboratuvarlara gönderilebilir.

-Mikroorganizma türü: Korunacak mikroorganizmanın cins, tür hatta suşu koruma yöntemi üzerinde doğrudan etkilidir. Bazı bakteriler (örneğin koliform grup bakteriler, stafilokok, basiller vb.) basit ve ucuz yöntemler ile yıllarca korunabilir iken bazı türler (örneğin *Leptospira*) modifiye yöntemlerle ancak kısa süreler ile korunabilmektedir.

03. Kültür Koruma Yöntemleri

Mikroorganizma kültürlerinin korunmasına yönelik olarak uygulanan yöntemler çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir. Sınıflandırma genel olarak ya koruma süresine göre ya da yöntemlerin benzerliğine göre yapılmaktadır. Aşağıda transfer, kurutma, liyofilizasyon ve dondurma şeklindeki gruplandırma yöntemlerin kavram benzerliğine göredir.

03.01. Transfer

Kültürün sıvı kültürde ardışık transferler (= pasaj = subkültür) ile korunması çok eski tarihlerden beri süre gelen bir uygulamadır. Aktif kültürün yatık agar üzerinde korunması bu yöntemin bir modifikasyonudur. Pasajlar arası süre, mikroorganizmanın cinsi ve türü, kullanılan besiyeri ve dış koşullara (depolama sıcaklığı) bağlıdır. Bazı bakterilerin her gün transfer edilmesi gerekirken, bazılarının 2 transferi arasında birkaç ay hatta birkaç yıl gerekebilir.

Genel olarak besin maddelerini en az düzeyde içeren minimal besiyerleri bu amaçla kullanılmaktadır. Bu şekilde mikroorganizmaların metabolik faaliyeti en aza iner, dolayısıyla transferler arasındaki süre uzar. Benzer şekilde besiyerinde fazla miktarda karbohidrat bulunması aşırı asit oluşumuna ve dolayısıyla kültürün ölmesine yol açabilir. Bununla birlikte bazı bakteriler gelişmeleri için çok kompleks besiyerlerine ihtiyaç duyarlar. Bu gibi besiyerleri kullanıldığında ise transferler arasındaki süre azalır.

Sıvı ya da katı kültürde sürekli transferler ile kültür korunması sırasında canlılık ve fizyolojik özelliklerin en iyi bir şekilde tutulması için inokülasyondan sonra kültürü bir miktar inkübe etmek, logaritmik gelişme fazının ortasında inkübasyona son vermek ve kültürü soğutmak, yeniden transfer yapılacağına önce kültürü yeniden inkübasyona bırakarak logaritmik gelişme fazını tamamlamak, sonra aktif kültürü transferde kullanmak bazı araştırmacılar tarafından

önerilen bir yöntemdir. Ancak burada kültürün en fazla buzdolabı sıcaklığına kadar soğutulması gerekmektedir, daha düşük sıcaklıklardaki depolamalarda bu yöntem, tersine, olumsuz etki yapmaktadır.

Depolama sırasında besiyerinden nem kaybı kültürün canlılık ve fizyolojik özelliklerinin korunmasında önemli bir sakınca oluşturur. Bu nedenle kültürlerin vidalı kapaklı tüplerde korunması, normal laboratuvar tüpleri kullanılıyorsa ağzlarının parafilm ile sarılması ve/veya sıvı parafin ile kültürün örtülmesi basit ancak etkili uygulamalardır.

Katı besiyerinde yapılacak transferler ile sıvı besiyerine göre bir miktar daha uzun ve stabil koruma sağlanır. Özellikle yatık veya dik agar tüpünün dibine öze ile daldırma yapılarak koruma daha etkili hale getirilebilir. Ancak öze ile daldırılmış kültürlerin aktifleştirilmesi için o tüpten inokulum alınması deneyim ve emek isteyen, dolayısıyla kontaminasyona daha açık bir uygulamadır.

Transfer yöntemi en az ekipmana gerek duyan, basit ve ucuz bir yöntem olmakla beraber, genel olarak sistemli bir kültür koleksiyonuna elverişli değildir. Özellikle koleksiyondaki kültürlerin farklı sürelerde aktifleştirme zamanının gelmesi ilave emek gerektirir. Bakterilerin büyük çoğunluğu bu yöntemle buzdolabı sıcaklığında 3-5 ay kadar rahatlıkla depolanabilir. Koliform grup bakteriler ve stafilokoklar için bu süre birkaç yıl olarak verilmektedir.

Genel olarak transfer yöntemi ile korunan mikroorganizmalar buzdolabı sıcaklığında tutulurlar. Ancak *Neisseria* gibi bazı bakteriler için depolama sıcaklığının 37 °C olması buzdolabı sıcaklığına göre daha iyi bir koruma sağlar.

03.02. Kurutma

Başta küfler olmak üzere pek çok mikroorganizma kurutularak korunabilir. Dondurarak kurutma (=liyofilizasyon) aşağıda 3.3. başlık altında verilmiştir. Basit kurutma çeşitli şekillerde yapılır.

-Kumda kurutma: Spor oluşturan bakteriler ve fungi bu yöntemle yıllarca korunabilir. Bu amaçla yıkanmış ve etüvde sterilize edilmiş kum üzerine spor süspansiyonundan ilave edilir, aseptik koşullarda havada ya da fosforpentaoksit içeren vakum desikatörde kurumaya bırakılır. Yeterli kuruma gözlendiğinde tüpün ağzı lastik bir tıkaçla kapatılır ve buzdolabına alınır.

-Kâğıt disk üzerinde kurutma: Özellikle depolama bakımından çok az yere gereksinme göstermesi gibi büyük bir üstünlüğe sahiptir. *Enterobacteriaceae* familyası üyeleri bu yöntemle yıllarca korunabilir. Bu yöntemde steril filtre kâğıtları 10⁸/ml olacak şekilde bakteri süspansiyonu ile doyurulur. Bu diskler havada ya da vakum desikatörde kurutulur, steril iki plastik levha arasına yerleştirilir. Aynı kültürü içeren çok sayıda disk aynı tüp içinde buzdolabında korunur. Kültürlerin transferi gerektiğinde steril bir pens ile bir disk alınarak sıvı besiyerine aktarılır. Bu yöntem kültürlerin bir başka laboratuvara iletilmesinde en kolay ulaştırma imkanı sağlayan yöntemdir. Steril bir naylon ya da kâğıt zarf içine alınan bu diskler mektupla dahi bir başka yere gönderilebilir. Kâğıt disklerdeki kültürlerin daha uzun süreli korunmalarını sağlamak amacıyla disklerin bulunduğu tüpler vakum desikatöre konular ve bunun içinde buzdolabına yerleştirilir.

-Jelatinde kurutma: Bu yöntemde önce bakteriler uygun bir besiyerinde üretilirler, besiyerinden ayrıldıktan sonra yoğun bir bakteri süspansiyonu elde edilir. Bu süspansiyondan 30 °C 'da tutulan Nutrient Jelatin besiyerine ekim yapılır ve yaklaşık 10¹⁰ adet/ml bakteri elde edilinceye kadar 30 °C 'da inkübasyona bırakılır. Bu şekilde elde edilen kültür Petri kutularındaki steril mumlu kâğıt üzerine Pastör pipeti ile damlatılır. Mumlu kâğıt disk yoksa Petri kutuları silikon ile sıvanır. Nutrient Jelatin kültürleri daha sonra vakum desikatöre alınır ve burada kurutulur. Vida kapaklı tüplere alınan diskler yine vakum desikatör içinde buzdolabına yerleştirilir. Nutrient Jelatin besiyeri (Nutrient Broth + %10 w/v jelatin) hazırlanırken %0,25 w/v askorbik asit ilavesi önerilmektedir. Ancak bu şekilde hazırlanan besiyerinin derhal kullanılması zorunludur.

-Silikajelde kurutma: Tüp içinde indikatörsüz silikajel sterilize edilir. Bunun üzerine bakterinin skim milk kültüründen damla damla ilave edilir. Havada veya nem indikatörlü silikajel ya da fosforpentaoksit bulunan vakum desikatörde kurutulur ve buzdolabında saklanır. Normal silikajel kobalt klorür nem indikatörü içerir. Bu madde mikroorganizmalar için toksik etki yapar. Dolayısıyla kültürün emdirildiği silikajelin bu indikatörü içermemesi gerekir. Silikajelde kurutmanın bir diğer önemli sakıncası, kuru silikajel üzerine bakterinin skim milk kültüründen ilave edildiğinde sıcaklık önemli derecede artarak bakteriye zarar verir. Bu sakıncanın giderilmesi için kuru silikajel içeren tüpler önce buz banyosunda soğutulur, sonra skim milk kültürü ilave edilir. Silikajel yerine sentetik zeolitler de benzer şekilde kullanılabilir.

03.03. Dondurarak Kurutma (=Liyofilizasyon)

Bugün gerek kültür koleksiyonlarında, gerek kültür kullanan endüstrilerde dondurarak kurutulmuş kültürler yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Mikroorganizmaların dışında başta çeşitli aşılarda, sperma, eritrosit, plazma, serum, organ naklinde kullanılacak çeşitli dokular, enzimler, proteinler gibi pek çok biyolojik materyal bu yöntemle korunabildiği gibi gıda sanayiinde pek çok ürün bu yöntem ile elde edilmektedir. Bunların dışında çeşitli biyolojik çalışmalarda özellikle hastalıklı dokuların demonstrasyon amacıyla saklanması, küçük bitki ve hayvanların müzelerde sergilenmesi gibi uygulamalarda da dondurarak kurutma yönteminden yararlanılmaktadır. Bu geniş kullanım alanı yöntemin başarısını kanıtlamaktadır.

Liyofilizasyon basit olarak materyali önce dondurmak, sonra süblimasyon ile su buharını dışarı çekerek materyali kurutmak olarak tanımlanabilir. Uygulanan yöntemlere bağlı olarak dondurma işlemi önceden yapılabileceği gibi doğrudan vakum altında tutarak materyalin donması da sağlanabilir. Donma işleminden zarar gören mikroorganizmalar için bu sistemin bir modifikasyonu olan "L-drying" yöntemi kullanılır.

Dondurarak kurutma işleminde canlılık ve aktiviteyi etkileyen pek çok faktör vardır. Bunlar kısaca bakterinin cinsi, türü ve hatta suşu, yaşı, üretme ortamı, işlem öncesi hücre yoğunluğu, kullanılan koruyucu ortamın (kriyoprotektant) bileşimi, işlem sonrası kültürün korunduğu atmosfer (vakum, inert gazlar vb.), kültürde kalan nem miktarı, depolama koşulları (sıcaklık, süre, ışık), sulandırmada kullanılan çözeltilerin bileşimi ve sıcaklığıdır. Bunların dışında kullanılan sistem, başlangıç dondurma sıcaklığı vb. faktörlerin de canlılık ve aktivite üzerinde etkili olduğu bilinmektedir.

Liyofilizasyon işlemi gerek ilk yatırım maliyeti gerek uygulamada özel deneyim gereksinmesi gibi dezavantajlara karşın bugün bilinen en etkili 2 koruma yönteminden biridir. Liyofilizasyon

genellikle en azından orta ölçekli araştırma laboratuvarlarında kullanılır. Rutin analizler yapan laboratuvarlar için uygun bir yöntem değildir.

03.04. Dondurma

Uygulanan sıcaklığa göre basit dondurma, derin dondurma, ultra dondurma olarak adlandırılan dondurma yöntemleri basit laboratuvarlardan en gelişmiş kültür koleksiyonlarına kadar uygulanabilen bir kültür koruma yöntemidir. Sıcaklık ne denli düşük olursa o denli etkili koruma sağlanmakta, buna karşın ilk yatırım maliyeti ile sistemin uygulanma maliyeti ve özel deneyim gereksinimi artmaktadır.

Basit dondurma uygulanması doğrudan sıvı ya da katı bir ortamda geliştirilmiş mikroorganizmaların basit bir buzdolabının buzlukunda (yaklaşık -10 °C ile -20 °C arası) dondurulmasıdır. Bu uygulama bir anlamda transfer yönteminin bir modifikasyonu olup genel olarak 2 transfer arasında daha uzun bir süre sağlar. Bununla beraber dondurma işleminin *Neisseria* gibi bazı bakterilere aşırı zarar verdiği ve bu şekilde korunmaması gerekliliği gözden uzak tutulmalıdır. Dondurulacak kültürlerle %15 (v/v) son konsantrasyon olacak şekilde steril gliserol ilavesi ile dondurma zararları azaltılabilir.

Derin dondurma kültürün derin dondurucularda (-40 °C ile -80 °C arası) korunmasıdır. Benzer şekilde derin dondurulacak kültüre uygun bir kriyoprotektant ilavesi gerekir. Kültürün cam boncuklara emdirilerek korunması son yıllarda yaygın bir uygulama alanı bulmuştur.

Ultra dondurma sıvı azotun buhar fazında (-140 °C) veya sıvı azotun sıvı fazında (-196 °C) kültürün korunmasıdır. -196 °C 'da koruma bugün için bilinen en etkili koruma yöntemidir. Liyofilizasyon yönteminde olduğu gibi basit laboratuvarlar için değil, ancak özel araştırma laboratuvarları için uygun bir yöntemdir. Kültürler özel şişeler içinde ve kriyoprotektant ilavesi ile kayda değer bir canlılık ve aktivite kaybı olmadan yıllarca (cins ve türe göre değişmek üzere 30-40 yıl kadar) korunabilir.

04. Küçük Ölçekli Kültür Koleksiyonu Organizasyonu

Yukarıda kısaca değinildiği gibi kültür korumaya yönelik pek çok yöntem vardır. Küçük ve orta ölçekli araştırma ve kontrol laboratuvarları için pratik ve uygulanabilir yöntemler aşağıda detaylı olarak verilmiştir.

04.01. Basit Dondurma

Nutrient Broth gibi basit bir sıvı besiyerinde geliştirilen kültür üzerine son konsantrasyon %15 (v/v) olacak şekilde steril gliserol ilave edilip buzdolabının buzlukunda dondurulması işlemidir. Tercihen sterilize edilebilir vida kapaklı cam tüplerin bu amaçla kullanılması gerekir. Ancak gerek buzlukta yer işgali gerek vida kapaklı tüp maliyeti açısından bu yöntem sadece 10-15 gibi az sayıda bakteri koleksiyonu için uygulanabilir. Daha yüksek sayıdaki koleksiyonlarda ise otoklavlanabilir 3 ml plastik (polipropilen) tüplerin kullanılması özellikle maliyet açısından önerilebilir. Ancak otoklavlanabilir plastik ya da kauçuk kapak maliyeti çok yüksektir. Bunun yerine polietilen materyalden yapılmış kapaklar çok ucuza satın alınabilir. Bu kapakların otoklavlanması mümkün değildir ancak %70 (v/v) etil alkolde 30 dakika veya %10 (v/v) H₂O₂

çözeltilisinde 10 dakika veya benzeri bir Okimyasal uygulaması ile sterilize edilip sonra steril su ile çalkalanır ve yine steril koşullarda kurutulur. Yer ve maliyet açısından eppendorf tüplerinin kullanılması iyi bir alternatif olarak görülse de kapakların kapatılması ve açılması sırasında kontaminasyon büyük risktir. Bu gün için en makul çözüm piyasadan kolaylıkla ve oldukça ucuza sağlanabilen 2 ml 'lik vida kapaklı, steril cryo tip tüplerdir. Aşağıda bu konuya değinilmiştir.

Bu yöntemde 2,0 ml olarak tüplere dağıtılan ve normal pamuk ile kapatılarak 121 °C 'da 15 dakika sterilize edilen besiyerlerine aktif bakteri kültüründen ilave edildikten sonra logaritmik gelişme fazının sonu veya durma fazının başına kadar inkübasyon yapılır. Dondurulacak kültürler asla yarım bırakılmış inkübasyon uygulanmaz. İnkübasyon sonunda tüplere 0,5 ml steril gliserol ilave edilir ve tüp karıştırıcıda karıştırılır. Tüpün pamuğu çıkarılarak yerine kimyasal ile sterilize edilmiş kapak aseptik koşullara uyularak takılır ve spor tüpe yerleştirilerek buzluğa konulur. Gliserol inokülasyon öncesi doğrudan besiyerine ilave edilip beraberce sterilize edilebilir. Ancak eğer koleksiyona alınan bakteri gliserolü kullanabiliyor ise bu kez gliserol beklenen etkinliği gösteremez. Bu nedenle gliserolün kültür üzerine ilavesi daha doğrudur.

Sıvı besiyerinde geliştirip doğrudan dondurma yerine yatık agar besiyerinde geliştirilip %20 gliserol çözeltisi ile kültürün yıkanması ve bu konsantre kültürün dondurulması ile daha etkili sonuçlar alınır ancak işlem aşaması arttıkça kontaminasyon riski de artar. Bu yöntemde standart 16 X 160 mm tüplerdeki yine Nutrient Agar gibi basit bir besiyerinde geliştirilen kültürler 1 ml steril gliserol (%20 v/v) çözeltisi ile yıkanır, bu konsantrat yukarıda açıklandığı şekilde hazırlanan plastik (polipropilen) tüpe konulur ve steril kapak kapatılarak dondurulur.

Yatık agar besiyerinde gelişen kültür yıkanmadan da dondurulabilir. Yine plastik (polipropilen) tüplere bu kez 1,5 ml eritilmiş agarlı besiyeri dağıtılıp sterilize edilir ve otoklav çıkışında yatık agar elde edilecek şekilde tüpler bir çubuğa yatırılarak besiyerinin katılaşması beklenir. Yüzeğe sürme ve inkübasyondan sonra dik durumdaki tüplerin üzerini örtecek kadar steril %20 (v/v) gliserol çözeltisi ilave edilir ve tüpler bu şekilde (dik konumda) buzluğa yerleştirilir. Bu yöntemde dar çaplı tüplerde yatık agar hazırlanması ve buraya inokülasyon deneyim gerektiren bir uygulamadır.

Dondurma işlemi için vida kapaklı donmaya dirençli (cryo) tip steril 2 ml 'lik plastik tüpler ve bunlara uygun kapaklı kutular (rack) piyasadan sağlanabilmektedir. Bu tüplerde uygun bir sıvı besiyerinde geliştirilen kültürler %20 v/v son konsantrasyon olacak şekilde steril gliserol ilavesi ve bu şekilde dondurma oldukça pratik bir uygulamadır. Burada tek dezavantaj kültürleri metabolitleri ile birlikte korumak ve dolayısı ile canlılıkta en yüksek verimi alamamaktır. Yukarıda da ilgili bölümlerde belirtildiği gibi en etkili canlılık mikroorganizmayı gelişme ortamından (katı besiyerinde yıkayıp santrifüjlemek, sıvı besiyerinde doğrudan santrifüjlemek) ayırmak, serum fizyolojik gibi uygun bir steril çözelti ile yıkamak, sonra tekrar santrifüjleyip peleti gliserol gibi uygun bir kriyoprotektant ile çözmek ve bu şekilde dondurmaktır. Bununla beraber bu uygulama ancak gelişmiş kültür koleksiyonlarında söz konusudur. İşletme bazında küçük ölçekli koleksiyon için bu tip uygulamalar gereksizdir. Bu durumda yapılması gereken uygulama yukarıda belirtildiği gibi belirli bir metabolit birikmesine razı olmaktır. Bununla birlikte;

-Eğer koleksiyona alınacak bakteri sütte gelişebiliyor ise %10 skim milk + % 10 CaCO₃ besiyerinde bakterinin geliştirilmesi ile en azından asitlik nötralize edilmiş olur. Burada dikkate alınması gereken 2 husus ; (a) besiyeri sterilizasyonun 110 °C 'da 15 dakika yapılması, (b)

yağsız sütün tozu olarak asla sütün fabrikası ürünlerini değil, antibiyotik içermediği sertifikalı edilmiş ticari yağsız sütün tozu kullanılmaktadır.

-Bakteri logaritmik gelişme fazının sonu ile durma fazı başlangıcı arasında iken dondurulmalıdır. Bu şekilde metabolit birikmesi en aza indirilmiştir olur. Bununla birlikte logaritmik gelişme fazını tamamlamamış bakterilerin donma zararlarına daha duyarlı oldukları unutulmamalıdır. Standart bir gıda işletmesini ilgilendiren ve dolayısı ile koleksiyonda bulunması gereken tüm bakteriler (tüm koliformlar, *Salmonella* ve diğer *Enterobacteriaceae* familyası üyeleri, *Staphylococcus aureus*, *Listeria* spp., *Clostridium perfringens* vb.) yukarıda belirtilen sütün ortamında 1 gece (12 - 16 saat) inkübasyon ile logaritmik gelişme fazını tamamlayıp durma fazının başı ile ortası arasında bir aşamada olur.

04.02. Derin Dondurma

Yukarıda 4.1. başlık altında anlatılan şekilde hazırlanan kültürler buzdolabının buzu yerine derin dondurucuda depolanabilir. Kuşkusuz bu şekilde daha etkili bir koruma sağlanır. Bu yöntemde dikkat edilmesi gereken bir husus plastik (polipropilen) tüplerin derin dondurucuda kırılabilirliğinin artmasıdır. Bu tüpler derin dondurucuda kendiliğinden kırılmaz ancak basit bir çarpma ile dahi kırılabilir. Bu durum özellikle, patojenler ile çalışıldığında önemli olur. Yine yukarıda 4.1. başlık altına verilen vida kapaklı steril cryo tüpler için herhangi bir donma zararı yoktur. Bu şekilde hazırlanan kültürler derin dondurucuda kayda değer ölçüde yüksek bir canlılık ile korunabilir.

04.03. Cam Boncuk ile Dondurma

Yöntemin esası uygun bir koruyucu ile konsantre edilmiş bakteri kültürünü 1-2 mm çapında steril cam boncuklarla karıştırılması ve bir anlamda cam boncukların bakteri ile kaplanması ve bu şekilde kültürün dondurulmasıdır. Dondurma sıcaklığı olarak -70 °C önerilmekle beraber daha az canlılık ve aktivite elde edileceği kabul edilerek basit buzdolaplarının buzu da bu amaçla kullanılabilir. Yöntemin en büyük avantajı bir tüp içinde 10-15 cam boncuğun dondurulması ve gerektiğinde sadece bir boncuğun tüpten çıkartılarak uygun bir sıvı ya da katı besiyerine aktarılmasıdır. Dolayısı ile stok kültürden sık sık örnek alınması gereken uygulamalarda bu yöntem tatmin edici şekilde kullanılır.

Cam boncuklar deterjanla yıkayıp musluk suyu ile iyice çalkalandıktan sonra seyreltik HCl ile çalkalanır ve daha sonra çalkalama suyu pH'sı musluk suyu pH'sı ile aynı oluncaya kadar musluk suyu ile çalkalanır, en son olarak deiyonize sudan geçirilip 45 °C 'da kurutulur. Bu boncuklar 3 mm çaplı 3 ml plastik (polipropilen) tüplere 20-30 adet konular ve yine pamukla kapatılan tüpler otoklavda sterilize edilir.

Kültür uygun bir katı besiyerinde (Petri veya tüpte yatık agar) geliştirilir. 1 ml kriyoprotektant çözeltisi ile süspand edilir ve bu 1 ml bakteri konsantratu tüpe ilave edilip tüp içindeki cam boncuklar arasında kalabilecek hava kabarcıklarının tümüyle çıkması ve boncukların süspansiyon ile iyice temas etmesi amacıyla hafifçe karıştırılır. Bu amaçla tüp karıştırıcı kullanılmaz, elle hafifçe karıştırılır. Daha sonra tüpte kalan sıvının fazlası plastik bir steril Pastör pipeti ile alınır ve tüp steril kapak ile kapatılıp dondurulur. Tüp içinde boncuklar arasında sıvı kalması dondurma sonrasında boncukların birbirine yapışmasına yol açar ve amaca uygun olarak tek boncuğun alınmasını önler.

Alternatif olarak boncukları ıslatacak kadar az miktarda kriyoprotektant çözeltisi ilave edilir ve katı besiyerinde gelişmiş koloniler öze ile alınarak tüpe aktarılır ve boncukların bakterilerle bulaşması sağlanır. Bu yöntem özellikle zayıf gelişen kültürler için önerilir. Öze ile koloni alınırken özeye besiyeri parçalarının gelmesi önlenmelidir.

Kriyoprotektant olarak aerobik bakteriler için %15 gliserol ilave edilmiş Nutrient Broth kullanılabilir. Halofil ve alkalofiller için %15 gliserol ilave edilmiş uygun geliştirme sıvı besiyeri yeterlidir. Anaeroblar için ise %15 gliserollü agarsız BGP besiyeri önerilir.

Cam boncuk ile dondurma amacıyla ticari olarak hazırlanmış ve içinde kriyoprotektant ve cam boncuk içeren steril tüpler de kullanılabilir.

04.04. Kâğıt Disk ile Kurutma

Laboratuvarda kullanılan basit filitre kâğıtları kırtasiye tip delgi makinası ile delinerek konfet haline getirilir ve otoklavda sterilize edilir.

Sıvı besiyerinde geliştirilen bakteri kültürüne steril bir pens ile daldırılan kâğıt diskler steril koşullar altında desikatörde kurutulur ve ağızları sıkıca kapatılabilen steril tüplere yerleştirilir. Bu yöntemin en büyük avantajları 1 tüp içine 10-15 disk konularak cam boncuk ile dondurmada olduğu gibi tek bir disk alınarak bundan aktifleştirme yapılabilmesi, disklerin oda sıcaklığında dahi depolanabilmesi, çok ucuza mal edilebilmesi, yukarıda da belirtildiği gibi mektupla dahi başka yerlere gönderilebilmesidir.

04.05. L - Kurutma

Liyofilizasyon yönteminin bir modifikasyon olup kâğıt disklerin daha etkili bir şekilde kurutulması için kullanılabilir. Yukarıda 3.2. başlık altında verildiği şekilde hazırlanan kâğıt diskler tüplere yerleştirilir, tüplerin ağızları delikli lastik tıplar ile kapatılır. Tıpların deliklerine cam boru geçirilir, bu cam borular lastik hortumlar ile vakum pompasına bağlanır. Vakum pompası ile tüpler arasında fosfor pentaoksit (P_2O_5) bulunan bir erlen nem tutucu olarak kullanılır. Vakum pompası çalıştırılırken bir vana çok az açılarak diskler üzerinde hava kabarcıklarının çıkışı gözlenir. Kâğıt disklerin bulunduğu tüpler 30 °C 'da tutulan bir su banyosuna yerleştirilebilir. Bu yöntem ile liyofilizasyondan daha geç ancak kendi halinde kurutmadan çok daha çabuk bir kurutma sağlanır.

04.06. Anaerobların Korunması

Klinik izolatlardan elde edilen zorunlu (strict) anaeroblar için özel besiyerleri ve özel inokülasyon teknikleri kullanılmakta, koruma liyofilizasyon ile yapılmaktadır. Gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren anaeroblar ve özellikle aerotolerantların korunması daha kolaydır.

Anaerobların kültür koleksiyonu için en basit yöntem "Cooked meat" besiyerinde transferdir. Bu ortamda gelişen kültürler yukarıda açıklandığı şekilde gliserol ilavesi ile dondurularak da korunabilirler. Cam boncuklar ile dondurmada kriyoprotektant olarak %15 gliserollü BGP besiyeri kullanılması önerilir. BGB besiyeri ; Tripton 10,0 g ; NaCl 5,0 g ; Beef extract (Lab-Lemco Powder) 3,0 g ; Yeast extract 5,0 g ; Cystein Hydrochloride 0,4 g ; Glucose 1,0 g ;

Na₂HPO₄ 4,0 g ; Glycerol 150 ml; su 1000 ml şeklindedir. Sterilizasyon 121 °C 'da 15 dakika olarak yapılır.

Küflerin korunması için pek çok yöntem bulunmaktadır. Bazı küflerin korunması için özel ortamlara gerek duyulur. Örneğin bitki patojeni küfler en iyi olarak patojenite gösterdiği bitkiler üzerinde korunur.

Gıda mikrobiyolojisi açısından önemli olan küfler basit ancak etkin bir yöntem olarak sıvı parafin (özgül ağırlığı 0,830-0,890 olan tıbbi saflıkta sıvı parafin) altında korunur. Bu amaçla yatık agar kültürü üzerine yatık agarın üst ucundan 1 cm daha yukarı gelecek şekilde otoklavda (121 °C 'da 15 dakika) sterilize edilmiş sıvı parafin ilave edilir ve oda sıcaklığında korunur. Bu şekilde cins ve türlere göre değişmek üzere 6 ay ile 25 yıl arasında koruma sağlanabilir.

Yatık agarda geliştirilmiş kültürlerin doğrudan -20 °C 'da depolanması ile pek çok tür 4-5 yıl canlı olarak korunabilir.

04.08. Mayaların Korunması

Küflerde olduğu gibi sıvı parafin altında yatık agar kültürleri genel olarak 2-3 yıl kadar korunabilir.

05. Koleksiyon Bilgileri

Koleksiyon amacıyla depolamaya alınan kültürler ile ilgili tüm bilgilerin tüp üzerine yazılması söz konusu olamaz. Özellikle küçük tüpler üzerine gereken asgari bilgilerin dahi yazılması sorun çıkarabilir.

Tüplerin üzerine yazımda bir diğer önemli sorun özellikle dondurulacak tüplere cam yazar kalemle bilgi yazılması ve zamanla bu yazıların okunamayacak kadar silik hale gelmesidir.

Prensip olarak plastik veya cam tüplerin üzerine cam yazar kalem ile yazılmaz. Bunun yerine kendiliğinden yapışan etiketlere tercihen daktilo ile bu olanak yoksa kalem ile kültüre ait bilgiler yazılmalı, etiket tüpe yapıştırıldıktan sonra üzeri kırtasiye tipi selofan bant ile sarılmalıdır. Bu sarım işlemi etiketin hava ve dolayısıyla su buharı ile temasını keserek zamanla yazıların silinmesini önler. Yazımda kalem kullanılıyor ise susuz mürekkep ile doldurulmuş mürekkepli kalem veya ince uçlu bir cam yazar kalem kullanılmalıdır.

Tüp sporu ile depolama yapılacak ise sporun hangi deliğinde hangi bakterinin olduğunun yazılması basit ancak etkili bir uygulamadır.

Etiket üzerine gereken en az bilgiler yazılmalı, ancak ayrıntılı bilgiler bir dosyada bulunmalıdır. Koleksiyona alınacak kültürün cins ve türü ile izolat numarası, koleksiyona alınan tarih etiket üzerinde mutlaka yazılması gereken bilgilerdir. Koleksiyon ile ilgili dosyada ise izolatın kaynağı, temel, kültürel ve genetik özellikleri, geliştirme ortamı, varsa kriyoprotektant çözeltisi, koleksiyon öncesi ml' deki sayı ve gereken diğer bilgiler yazılmalıdır.

Kültürler farklı renkteki spor tüplere konularak ve/veya farklı renkli tıpalara ile kapatılarak ve/veya etiketleri farklı renklerle yazılarak gruplandırılabilir. Farklı renk kullanılacak ise prensip olarak insan patojenleri için kırmızı renk önerilir.

06. Aktifleştirme

Bir kültür koleksiyonunda depolama süresi sonunda kültürün aktifleştirilmesi en önemli aşamalardan birisidir. Aktifleştirme, koruma yöntemine göre farklı şekillerde yapılır.

Buzdolabında basit transfer ile yapılan korumalarda aktifleştirme zamanı geldiğinde bir öze kültür uygun bir besiyerine alınır ve inkübe edilir. Eğer kültür yarım bırakılmış inkübasyon ile korunuyor ise önce inkübasyon tamamlanır, sonra aktifleştirme yapılır. Aslında bu yöntemde inkübasyonun tamamlanması bir anlamda aktifleştirme değildir. Basit transfer ile yapılan korumalarda mikroorganizma gelişmesi sağlanamıyor ise yapılacak son kurtarma uygulaması tüpün üzerine triptik soy broth gibi bir besiyerinden 3-4 ml kadar ilave edip, tüp karıştırıcıda karıştırılması ve bu şekilde inkübasyona bırakılmasıdır.

Dondurulmuş kültürlerden aktifleştirme yapılması için önce kültürün eritilmesi gerekir. Eritme işleminin su banyosunda çabuk olarak yapılması ile daha yüksek canlılık ve aktivite elde edilir. Cam boncuklar ile dondurulmuş kültürler ise tersine olarak eritilmeden ve ivedilikle açılmalı, steril bir pens ile 1 boncuk alındıktan sonra tüp yine ivedilikle dondurucuya konulmalıdır. Cam boncuk sıvı bir besiyerine aktarılabileceği gibi Petri kutusundaki katı besiyerinde de yavaşça gezdirilerek bakterilerin besiyerine transferi sağlanır.

Kâğıt disk ile kurutulmuş kültürlerin aktivasyonu için steril bir pens ile alınan 1 diskin uygun bir sıvı besiyerine aktarılması yeterlidir.

Sıvı parafin altında korunan kültürler aktifleştirilecekleri zaman sıvı parafinin boşaltılmasına gerek yoktur, ayrıca bu uygulama özellikle patojenler ile çalışıldığında tehlikeli olur. Bir öze ile parafinin altından örnek alınması ile aktifleştirme yapılır.

Liyofilize kültürlerin aktifleştirilmesinde camın kırılması aşamasında vakum ile içeri hava girmesi kontaminasyon açısından potansiyel tehlikedir. Cam tüpün cam testeresi ile çizilmesinden sonra %70 (v/v) alkol ile silinir, hafifçe alevden geçirilip alkol uzaklaştırıldıktan sonra kızgın bir cam baget çiziğe yaklaştırılarak camın çatlaması sağlanır. Eğer tüp pamuk ile liyofilize edildi ise çizme işleminin pamuğu üzerinden yapılması havadan gelebilecek kontaminasyonu önlemeye yeterlidir. Pamuk yoksa kırma işleminin steril kabin içinde yapılması, kabin yoksa bunzen beki alevine yakın olarak yapılması gerekir. Tüp kırıldıktan sonra tüp içine uygun bir besiyeri aktarılır ve bu şekilde inkübasyona bırakılır.