

MİKROORGANİZMA KÜLTÜRLERİNİ MUHAFAZA YÖNTEMLERİ

Mikroorganizma kültürlerinin özelliklerinin aynı kalması koşuluyla muhafazaları çok önemli bir konudur. Kültür korumanın temel prensibi, varyasyona ve mutasyona uğratmadan mikroorganizmayı saf halde, uzun süre canlı tutmaktır.

Kültür muhafazası amacıyla çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden herhangi biri tüm mikroorganizmalar için aynı etkinliği göstermediğinden yöntem seçiminde en önemli faktör mikroorganizmanın özelliğidir. Bunun yanında laboratuvardaki cihaz ve ekipman, teknik bilgi, depolama alanı, korunacak kültür sayısı gibi faktörler de yöntem seçiminde etkili olmaktadır.

Kültür muhafazasında kullanılan yöntemleri genel olarak iki gruba ayırabiliriz.

1. Kısa süreli muhafaza yöntemleri (Basit Yöntemler)
2. Uzun süreli muhafaza yöntemleri (Modern Yöntemler)

1. Kısa Süreli Muhafaza Yöntemleri

1.1. Transfer (Pasaj, Subkültür)

Bilinen en eski uygulamadır. Aktif kültür sıvı veya agarla karıştırılmış besiyeri üzerine aktarılır. Pasajlar arasındaki süre mikroorganizmanın cins ve türüne, kullanılan besiyeri ve dış koşullara (örneğin depolama sıcaklığına) bağlıdır. Bazı mikroorganizmaların hergün transfer edilmeleri gerekirken, bazıları için transfer süresi 4-5 aya hatta birkaç yıla kadar çıkabilir.

Genel olarak bu amaçla kullanılacak besiyeri en az düzeyde besin maddeleri içermelidir. Böylece mikroorganizmaların metabolik faaliyetleri yavaşlar, dolayısıyla transferler arasındaki süre uzar.

Transfer yönteminin sakıncaları ve alınacak önlemler şunlardır:

- **Yanlış Etiketleme:** Transfer sırasında dalgınlıkla kültürü tanıtan etiketler değişebilir. Transfer edilecek kültür sayısını 100 ile sınırlamak suretiyle dikkatin dağılması sağlanmalıdır.
- **Bulaşma:** Çok dikkatli olunsa bile, kısa aralıklarla yapılan transferlerde, özellikle *Bacillus* türleriyle kontaminasyon riski söz konusudur.
- **Varyantların Ortaya Çıkması:** Üzerinden uzun süre geçmiş kültürlerden transfer yapılıyorsa, mikroorganizmanın karakterinde bir değişme söz konusu olabilir.
- **Kuruma:** Tüplerin ağzı sıkı bir şekilde kapatılmalı, bu amaçla vidalı kapaklı tüpler veya lastik tıplar kullanılmalıdır.

1.2. Sıvı Parafin Altında Muhafaza

Maya, küf mantarı ve bazı bakteriler için çok uygun ve kolay bir yöntemdir. Uygun bir besiyerinde veya yatık agarda geliştirilmiş kültürün üzerine steril sıvı parafin, besiyerini tamamen örtecek ve 1,5-2,0 cm kalınlıkta olacak şekilde ilave edilirler.

Kültür yeniden transfer edileceğinde bir aşı iğnesi ile parafin altındaki kültüre ulaşılabilir.

1.3. Damıtık Su İçinde Muhafaza

Mikroorganizma uygun besiyerinde üredikten sonra veya spor yaptıktan sonra steril damıtık su içinde süspansiyonu yapılır. Saf su içinde metabolizma faaliyetleri yavaşladığından, ağız iyice kapanabilen şişe veya tüplerde hücreler 1-5 yıl canlı kalabilirler.

1.4. Kurutma Yöntemi

Özellikle spor oluşturan bakteriler kurumaya karşı dayanıklı olduklarından, bu teknik birçok mikroorganizma için kullanışlı bir yöntemdir. Çeşitli şekillerde yapılabilir.

1.4.1. **Toprak veya Kum İçinde Kurutma:** Özellikle spor oluşturan mikroorganizmalar bu yöntemle yıllarca korunabilir. Mikroorganizma süspansiyonları doğrudan sterilize edilmiş toprak veya kuma aktarılır. Aseptik koşullarda havada veya desikatör içinde kurutulur. Tüpün ağız kapatılıp , buzdolabına alınır.

1.4.2. **Kağıt Diskler Üzerinde Kurutma:** Kültürler steril filtre kağıtları üzerinde kurutulduktan sonra steril plastik tabaklar arasında kapatılır. Aynı kültürü içeren çok sayıda disk aynı tüp içinde buzdolabında korunabilir. Bu özelliği nedeniyle depolama yönünden çok az yere gereksinim gösterir.

Bu şekilde muhafaza edilen kültürlerin posta ile ucuz ve kolay bir şekilde taşınması mümkündür. Kültürlerin transferi gerektiğinde steril bir pens ile bir disk alınarak sıvı besiyerine aktarılır.

Kağıt diskler yerine jelatin diskler de kullanılabilir.

1.4.3. **Destek Maddeleri Üzerinde Kurutma:** Destek materyali olarak jelatin, nişasta veya silikajel kullanılabilir. Steril destek materyali üzerine damlatılan mikroorganizma süspansiyonu aseptik koşullarda kurutularak saklanır.

1.4.4. **Sıvı fazla kurutma (L-drying Yöntemi) :** Özellikle liyofilizasyona (dondurarak kurutma) dayanamayan mikroorganizmalar için uygundur. Hücre süspansiyonu tüpü, su banyosu içine daldırılarak, vakum pompası yardımıyla kurutulur.

2. Uzun Süreli Muhafaza Yöntemleri (Modern Yöntemler)

2.1. Liyofilizasyon (Dondurarak kurutma)

Çeşitli tipteki mikroorganizmalar bu yöntemle uzun yıllar canlı kalabilmektedir. Bazı bakterilerin 30 yıldan fazla canlı kaldığı görülmüştür.

Dondurarak kurutma işlemi basit olarak, donmuş materyalden suyun süblimasyon ile uçurulması şeklindedir. Süspansiyon katı hale getirilip, su buhar halinde alındığından, mikroorganizmalar yapıları bozulmadan muhafaza edilmiş olur.

Bu yöntem şöyle uygulanır: Mikroorganizma uygun bir besiyerinde geliştirildikten sonra kültürün koruyucu içeren bir sıvıda süspansiyonu yapılır. Bu süspansiyondan 0,1-0,2 ml aseptik koşullarda ve köpük oluşturmadan liyofilizasyon tüplerine aktarılır. Liyofilizasyon cihazına yerleştirilerek vakum altında birinci kurutma yapıldıktan sonra pamuklar içeriye

itilip ampullerin boyun kısmı inceltir. İkinci kurutma uygulandıktan sonra ampuller çapraz alev yardımıyla vakum altında kapatılır.

Muhafaza edilecek kültürler dondurma ve kurutmanın zararlı etkilerini önleyecek koruyucu özellikteki maddeler (kriyoprotektan) içeren sıvılarda süspansiyon haline getirilmelidir.

Hücrelerin logaritmik gelişme dönemlerinin sonunda veya durma devresinin başında liyofilize edilmeleri gerekmektedir. Bu dönemde kültürler aktif ve işlem zararlarına karşı dayanıklıdır.

2.2. Düşük Sıcaklık Derecelerinde Muhafaza

2.2.1. Derin Dondurucularda Muhafaza

Düşük sıcaklıklarda hücredeki metabolizma hızı, buna bağlı olarak biyokimyasal reaksiyonlar çok yavaşlar. Mikroorganizma kültürlerinin muhafazasında bu özellikten yararlanır.

Hücrelerin düşük sıcaklıklarda dondurulması işlemi olanaklar ölçüsünde çabuk yapılmalıdır. Ani dondurma ile hücre içinde büyük buz kristalleri oluşmaz, dolayısıyla hücre daha az zarar görür.

Muhafaza sıcaklıkları $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ veya $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ler olabilir. Hücreler $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ arasındaki dondurucularda ya da CO_2 buzunda muhafaza edilebilirler. Fakat bu sıcaklık derecelerinde bile canlılıkta bir kayıp söz konusudur.

Hücrelerin donma zararlarından etkilenmesini en aza indirmek amacıyla hücre süspansiyon sıvılarına "kriyoprotektan" denen koruyucu maddeler ilave edilmelidir.

Koruyucu maddeler hücre içine girebilmelerine göre 2 ayrı grupta toplanabilir.

- a- Gliserol, dimetilsülfoksit (DMSO) gibi maddeler hücre içine girerek donma zararlarına karşı mikroorganizmayı hem içerden hem dışardan korurlar.
- b- Sakkaroz, laktoz, glikoz sorbitol, mannitol, dekstran, nişasta gibi maddeler koruyucu etkilerini sadece hücre membranı dışında gösterirler.
Ayrıca yağı alınmış süt, malt ekstraktı gibi kompleks besiyerleri de koruyucu özelliktedirler.

2.2.2. Sıvı Azot İçinde Muhafaza

$-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ deki sıvı azot altında muhafaza metabolizmayı tamamen durdurur. Bu sıcaklıkta muhafaza bilinen en iyi kültür koruma yöntemidir. Bu yöntemin uygulama alanı geniş olup, çeşitli mikroorganizmaların muhafazası için özellikle tercih edilir.