



İletişim adresleri : "Güven Külekçi" gkulekci@istanbul.edu.tr, "Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti" tmc@tmc-online.org

Anaerop Haber Ekim 2017 sayısının konu başlığı : Anaerop bakterileri saklama

ANAEROP BAKTERİLERİ SAKLAMA YÖNTEMLERİ

Doç. Dr. Lütfiye ÖKSÜZ

İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

e-posta : oksuzl@istanbul.edu.tr

Mikroorganizmalarda hücre ölümünün temel nedeni metabolik olayların devam etmesi sonucu ortaya çıkan toksik maddeler ve çevresel etkilerdir. Organizmanın yaşamını sürdürebilmesi için gerekli metabolik olaylar yavaşlatılır veya önlenbilirse bakteri uzun süre saklanabilir. Kültürdeki toksik metabolizmanın yavaşlatılması ya ortam ısısı düşürülerek (dondurma) ya da ortamdaki su uzaklaştırılarak (kurutma) yapılır. Zira su, kristalize olduğunda bakteri hücre duvarının delinmesine ve ölümüne yol açabilmektedir (1).

Mikroorganizmaların saklanması, “fenotipik ve genotipik özellikleri değişmeksizin ve kontaminasyon olmadan, organizmanın yaşamını sürdürme yeteneğinin devam ettirilmesi” olarak tanımlanır. Ancak organizma saklanmadan önceki şartlarına kolayca dönebilmelidir. Mikroorganizmaları saklama yöntemleri son 60 yıldan beri değerlendirilmektedir ve sıklıkla saklama için optimal yöntemler mikroorganizmanın taksonomik sınıflamasına bağlıdır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında, organizmaların kısa ve uzun süreli olarak saklanması için basit ve geniş çaplı uygulanabilen yöntemler bulunmaktadır (2).

Birçok anaerobik mikroorganizmanın düşük üreme oranı göstermesinden dolayı, zorunlu anaerop bakterilerin saklanması, taze hazırlanmış besiyerine belli aralıklarla yeniden inoküle edilmesi ve metabolizma hızını azaltmak için kültürlerin 4-6°C’de korunması şeklindeki bir konvansiyonel yöntemle gerçekleştirilir. Ancak bu yöntemin ciddi sakıncaları vardır. Bu yöntemin zayıf noktası, spontan mutasyona maruz kalma nedeniyle mikroorganizmanın morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal

özelliklerini kaybetme olasılığının bulunmasıdır. Zorunlu anaerop bakterilerle yapılan çalışmalar, periyodik yeniden inokülasyon yöntemiyle yapılmıştır. Bu yöntemin uygulanması zordur, çünkü oksijen girişine karşı maksimum korumalı hava geçirmez kaplarda yeniden inokülasyon için gerekli anaerobik sıvı besiyerinin hazırlama prosedürü zahmetlidir. Bunlara rağmen, çeşitli zorunlu anaeroplara üremesi, kompleks bileşimli sentetik besiyerinde gerçekleştirilebilir (3).

Mikroorganizmaların saklanması için kullanılan yöntemler mikroorganizma grubuna göre sınıflandırıldığında, Gram pozitif bakteriler, streptokoklar, mikobakteriler, Gram negatif bakteriler, filamentöz bakteriler, mayalar, protozoonlar, virüsler ve sporlu bakteriler olarak gruplandırma yapılmış, anaerop bakteriler için özel bir grup oluşturulmamıştır (2). Spor oluşturan bakterilerin pasaj, mineral yağa daldırma, kurutma, dondurma gibi yöntemlerle 0,2-2 yıl arası sürelerle; çok düşük ısıda (-70°C veya -196°C) dondurma (yağsız süt ve gliserol içinde) ve liyofilizasyon (yağsız süt ve laktoz içinde) ile 2-30 yıl süreyle saklanabileceği belirtilmiştir (2).

Uzun süreli saklama için en etkili yöntemlerden biri, liyofilize hücrelerin korunmasıdır. Ancak bu yöntem, pahalı malzemelerin (yüksek vakumlu pompa, kondensatör, saklama ampulleri) kullanımını gerektirir. Ayrıca anaerobik kültürlerle yapılan deneyler, steril bir inert gaz atmosferindeki ampulden hücrelerin örneklenmesini kapsar. Ancak zorunlu anaeroplara, kurutulduktan sonra dondurulduğunda yaşamını kaybettiği bilgisi, üzerinde durulması gereken önemli bir noktadır (3).

Birçok anaerop bakteri yağsız süt (skim milk) veya gliserolde uzun süre saklanabilmektedir. Anaerop bakterilerin saklanması için sıklıkla kullanılan % 10 yağsız süt saklama besiyerini hazırlamak için 1 g toz yağsız süt 10 ml distile su içinde eritilir. 110°C'de 10 dk otoklavlanır. Alternatif olarak 100°C'deki su banyosunda 1 saat bekletilir, bu işlem üst üste üç gün tekrarlanır (tindalizasyon), kanlı agarda sterilite kontrolü yapıldıktan sonra 4-8°C'de altı ay süreyle saklanabilir (1,4). Bir kez dondurulduktan sonra, donmuş kaldığı sürece, oksijene maruziyetin bakteriler üzerine çok fazla bir etkisi bulunmamaktadır. Ancak çözerken anaerop koşulların sağlanmasına özen gösterilmelidir (6). Saklanan izolata yeniden canlandırılması için -70°C'den çıkarılan saklama tüpünün, erimesi beklenmeden, üst kısmından steril özeyle hafif kazıyarak alınıp uygun besiyerine ekilerek anaerop şartlarda inkübe edilmesi gereklidir (1). American Type Culture Collections (ATCC)'nin "Bakteriyel Kültür Rehberi"nde birçok anaerop bakterinin % 10 gliserolde dondurulabileceği bildirilmiştir (6).

Sporlu ve sporsuz anaerop bakteriler için farklı yöntemler kullanılması önerilmiştir. Spor oluşturmayan anaerop bakteriler; uygun eğri besiyerinde anaerop koşullarda inkübe edildikten sonra üzerine 0,35 ml steril defibrine tavşan kanı ilave edilerek süspanse edilir, bu kanlı bakteri

süspansiyonu ağzı pamuklu bir tüpe aktarılır, ağzı alevden geçirilir, % 95 alkol ve kuru buz içeren su banyosunda hızlı dondurma sağlandıktan sonra da -42°C'deki dondurucuda saklanır. Spor oluşturan anaerop bakteriler için, üreyen sporlu bakterinin Gram boyama ile günlük olarak spor kontrolü yapılır. Spor oluşur oluşmaz -20°C'de veya -42°C'de dondurulur. Spor oluşmamışsa beş günlük inkübasyondan sonra dondurulur (7).

Mikroorganizmaların saklanması için subkültür yönteminin uygulanması hem zahmetlidir, hem de bakterinin genetik kararsızlığı ile sonuçlanabilir. Bu yüzden mikroorganizmaların -196°C'de sıvı nitrojende kriyoprezervasyonu güvenilir bir yöntemdir. Bu amaçla vida kapaklı polipropilen kriyotüpler ve mini-vida kapaklı cam tüpler kullanılmaktadır. Mini-vida kapaklı cam tüpler anaerop bakteriler için de uygundur. Bu yöntem depolama alanı ve maliyetleri açısından basit, etkili ve ekonomiktir. Anaerop bakterilerin saklanmasında genellikle sürekli bir azot gazı akışı veya anaerobik kabin gerektirmediği gibi hassas bakterilerin saklanması için de uygun bir yöntemdir. Anaerop bakteriler için kriyoprotektif ajan olarak kullanılan gliserol, distile su içinde % 20 (ağırlık/hacim) oranında hazırlanır, 15 dk otoklavlanarak steril edilir, vida kapaklı tüplerde karanlıkta saklanır. Dimetil sülfoksit (DMSO) ise, distile su içinde % 20 (ağırlık/hacim) oranında hazırlanır, filtre edilerek steril edilir veya dilüe edilmeden 114°C'de 10 dk otoklavlanarak steril edilir (8).

Anaerop bakteriler saf kültür olarak izole edilir edilmez, stok kültürlerin sıvı veya katı besiyerinde hazırlanabileceği belirtilmiştir. Sıvı veya katı kültürlerde genç ve aktif olarak üreyen kültürlerin kullanılması gerektiği bildirilmiştir. Sıvı besiyeri kullanıldığında (ekleri ilave edilmiş tiyoglikolatlı buyyon veya kıymalı buyyonda 24-48 saat inkübe edildikten sonra) 0,5 ml sıvı kültürün eşit miktarda % 20 yağsız süt ile karıştırılıp dondurularak -70°C'de saklanabileceği, katı besiyeri kullanıldığında ise bakteri kolonilerinin yağsız süt içinde süspanse edilmesi gerektiği bildirilmiştir. İlave olarak stok kültürlerin liyofilize edilebileceği, bunun mümkün olmadığı durumda ultra dondurmanın tercih edilebileceği belirtilmiştir. Ultra dondurma için 0,5-1,0 ml steril defibrine koyun kanı içinde bir öze log fazındaki bakteri kolonisi süspanse edilir. Takiben bu süspansiyonun, kuru buz etanol banyosu, sıvı nitrojen veya ultra dondurucuda hızla dondurulduktan sonra -40°C veya daha düşük ısıda saklanması gerektiği üzerinde durulmuştur. Alternatif olarak anaerop bakterilerin kıymalı buyyonda 4-8°C'de 2-3 ay süreyle saklanabileceği bildirilmiştir. Toksin üreten mikroorganizmalar için -70°C'de anaerop şartlarda stoklama önemlidir (9,10).

Bryukhanov ve ark (3) zorunlu anaerop mikroorganizma kültürlerinin -70°C'de % 25 gliserolde uzun süre saklanma olasılığını değerlendirmek için bir çalışma gerçekleştirmişler ve sonuçta şu bilgileri elde etmişlerdir: Farklı türlerdeki zorunlu anaeroplara sıvı besiyerine inokülasyon sayıları ile saklanma

ısıları ve süreleri farklılıklar gösterir. Spor oluşturan bakteriler (örn, *Clostridium spp*) yılda iki kez sıvı besiyerine inoküle edilebilir ve inokülasyonlar arasındaki süre boyunca 4-6°C'de saklanabilir. Oda ısısında saklanan *Clostridium* cinsi bakteriler her üç ayda bir yeniden inoküle edilmelidir. Düşük üreme oranına sahip asetonik bakteriler, inokülasyonlar arasındaki sürede 4-6°C'de buzdolabında saklanmalıdır. Yeniden inokülasyon yılda 6-8 kez olmalıdır. İnokülasyonlar arasındaki sürede kültürler 4-6°C'de saklanmalıdır. Düşük ısıda (-70°C'de) kriyoprezervatif ajan olarak % 25 gliserolün kullanımı, zorunlu anaerob mikroorganizmaların saklanma süresini anlamlı bir şekilde arttırmıştır. Gliserol hücre membranını hızla geçer ve hücre içinde ve dışında donmadan korunmayı sağlar. Bu şartlar altında üç yıllık saklamadan sonra zorunlu anaerobların hayatta kalma oranları tahmin edildiğinde şu sonuçlar ortaya çıkar: *Clostridium* cinsi bakteriler başlangıçtaki üreme oranına ulaşmak için taze hazırlanmış nutrient besiyerine sadece iki veya üç kez yeniden inokülasyona ihtiyaç duyarlar. Bazı bakteriler biyokimyasal aktivitenin tam olarak iyileşmesi için 4-6 kez yeniden inoküle edilmelidir. Bazı bakterileri ise uzun süre saklamak zordur, bu kültürler sekizden fazla inokülasyona ihtiyaç duyarlar. Bu yöntemi kullanarak vejetatif hücrelerin saklanmasından üç yıl sonra zorunlu anaerobların tüm suşlarının hayatta kalamayacağı üzerinde durulmuştur. Örneğin spor oluşturan sülfat indirgeyen bakteri olan *Desulfatocaulum nigrificans* ve termofilik anaerob bakteriler yaşamını kaybeder (3).

Bu yazıda, anaerob bakterilerin ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere saklanması yöntemleri tartışılmıştır. Bu yöntemler içinde sıvı nitrojen gazı ile -196°C'de saklama ve liofilizasyon yöntemleri uygulaması zor ve pahalı olduğu için genellikle tercih edilmemektedir. Laboratuvar çalışmalarımızda bizim de kullandığımız gliserol (% 20, sporlu bakteriler için % 25) veya yağsız süt (% 10) içinde -70°C'de saklama yöntemlerinin basit, ekonomik ve kullanışlı yöntemler olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları. Sürüm 1.1., Cilt II, Suş saklama prosedürleri, s.1-9. http://mikrobiyoloji.thsk.saglik.gov.tr/Dosya/tani-rehberi/UMS-Cilt_2.pdf (10.08.2017 tarihinde alınmıştır).
2. Petti CA, Carroll KC. Procedures for the storage of microorganisms. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds). Manual of Clinical Microbiology. 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 124-31.
3. Bryukhanov AL, Netrusov AI. Long-Term Storage of Obligate Anaerobic Microorganisms in Glycerol. Applied Biochemistry and Microbiology 2006, 42 (2): 200-3.
4. UAMDS Standart Uygulama Prosedürü. Bakteri ve Klinik Örnek seçimi, s.1-3 http://uamds.thsk.gov.tr/index.php?option=com_content&view=article&id=16:sup&catid=2:duyurul ar(10.08.2017 tarihinde alınmıştır).
5. Prescott, Harley, and Klein's Microbiology. Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ (eds), Seventh edition, 2008. Mc Graw Hil Companies. Chapter 41.3, Microorganisms used in Industrial Microbiology, p.1060.
6. Protocol for freezing anaerobic bacteria . https://www.lgcstandards-atcc.org/Global/FAQs/F/5/Protocol%20for%20freezing%20anaerobic%20bacteria594.aspx?geo_country=tr

7. Dowel WR, Hawkins TM. Laboratory methods in anaerobic bacteriology. CDC Laboratory Manual 1987. U.S. Dept. of Health, Education, and Welfare, National Communicable Disease Center, Atlanta, Georgia 30333. https://stacks.cdc.gov/view/cdc/7666/cdc_7666_DS1.pdf
8. Malik KA. World Federation of Culture Collections Technical Information Sheet No:4. Published by: UNESCO/WFCC - Education Committee 1989.
9. Engelkirk PG, Engelkirk JD, Dowell VR (Eds): Principles and Practice of Clinical Anaerobic Bacteriology. Star Publishing Company, California, 1992. Appendix D. Laboratory Procedures. p.331-57.
10. Jousimies –Somer HR, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler HM, Tenover FC (Eds), Wadsworth-KTL Anaerobic Bacteriology Manual. Star Publishing Company, California, 2002, Sixth edition. Appendix E, p.235.