



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

Merhaba,

Bu sayıda Ocak 2016'da Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde gerçekleştirdiğimiz "Anaeroplara Kültür ve Modern Tekniklerle Tanımlama Kursu"na katılan ardından çalışma grubumuzun da üyesi olan Doç Dr Esra ERSOY ÖMEROĞLU, çalışmakta olduğu Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yürütücülüğünü yaptığı "Van Gölü'nden Anaerobik Olarak Arsenat Redükleyen ve Arsenit Oksitleyen Bakterilerin İzolasyonu, Fenotipik ve Moleküler Karakterizasyonu ve Arsenik Metabolizmasının Belirlenmesi" başlıklı bir TÜBİTAK Projesi ile kurduğu Anaerop Bakteriyoloji Laboratuvarını anlatıyor. Doç Dr Esra ERSOY ÖMEROĞLU, bu laboratuvarın optimize edilmiş anaerop sistem ve anaerop kabini ile düzenli çalışılan bir anaerop laboratuvar olması nedeniyle multisipliner çalışmalar yapılmasını da hedefliyor.

ANAEROBİK BAKTERİYOLOJİ LABORATUVARI ve ARSENİK DİRENÇLİ ANAEROBİK BAKTERİ İZOLASYONU

Doç. Dr. Esra ERSOY ÖMEROĞLU

Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
e-posta : esraerso@gmail.com

Bakteriler oksijen gereksinimlerine ya da oksijen ile olan ilişkilerine bağlı olarak sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırma sonucunda; mikroorganizmalar aerobik ve anaerobik olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Aeroplara tam oksijen derişimi dediğimiz %21 O₂ varlığında üreyip metabolizmalarında O₂ kullanırken; anaeroplara ise oksijenli solunum yapamamaktadırlar. Bu iki ana grup kendi içerisinde de gruplara ayrılmaktadır. Aerobik mikroorganizmalar zorunlu, fakültatif ve mikroaerofillerden oluşmaktadır. Zorunlu aerofiller metabolik olarak aktif olabilmek için atmosferik seviyede oksijene ihtiyaç duymaktadır. Mikroaerofiller de metabolizmaları için oksijene gereksinim duymaktadır fakat zorunlu aerobiklerden farklı olarak atmosferik seviyeden daha az seviyede oksijene gereksinim duymaktadır. Fakültatif aeroplara ise hem oksijenli hem de oksijensiz koşullarda üreme göstermekle beraber oksijenli koşullarda daha iyi bir mikrobiyal üreme sergilemektedirler (1).

Anaerobik bakteriler oksijen varlığında canlı kalamayan veya üreyemeyen bakterilerdir. Eğer oksijenin varlığı mikroorganizma için zararlı veya ölümcül ise zorunlu anaerop olduğu söylenebilir. Oksijenin varlığı, metabolik olarak aktif mikroorganizmaya gerekli değilse fakat var olduğu koşullarda ölmeyip bir diğer ifade ile oksijeni tolere ederek zayıf bir üreme gösterebiliyorsa oksijen gereksinimi bakımından aerotolerant bir mikroorganizma olarak sınıflandırılabilir (1).

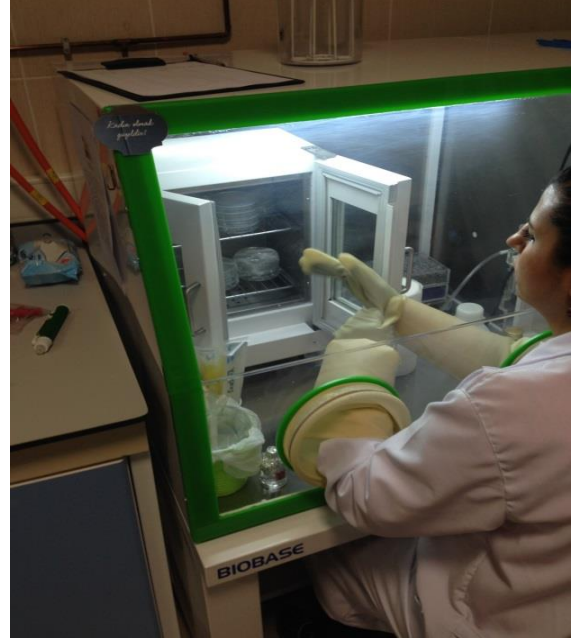
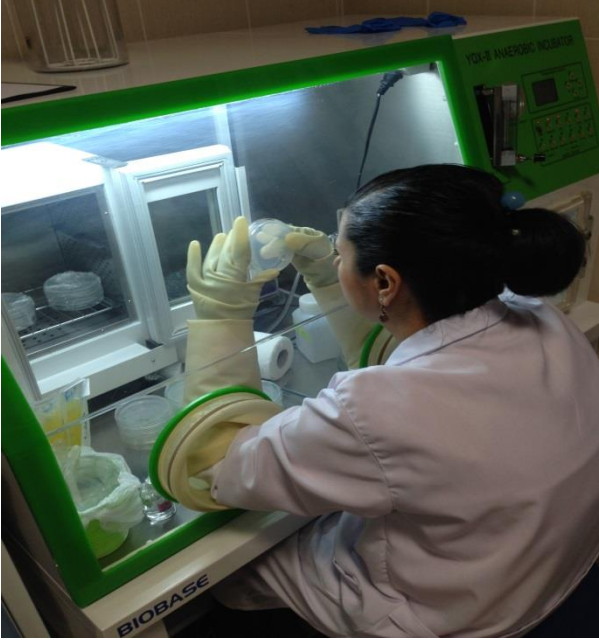
Mikroorganizmaların oksijen gereksinimlerindeki farklılık, kültür tekniklerinin de farklılaşmasına neden olmaktadır. Aerobik organizmalarda; tüketilen oksijenin havadan basit difüzyon ile yeteri kadar hızlı bir şekilde yerine konamamasından dolayı yoğun havalandırma gerekirken, anaeroplarda ise oksijenin kültür ortamından uzaklaştırılması gerekmektedir. Anaeroplara kültürasyonu için farklı teknikler kullanılmakta ve hangi tekniğin tercih edileceğini ise türün oksijene karşı olan duyarlılığı belirlemektedir. Çünkü zorunlu anaeroplarda oksijene karşı duyarlılık büyük ölçüde değişiklik göstermektedir. Örneğin Clostridia'ların çoğu üremek için metabolik olarak aktif olabilmek için anoksik koşullara gereksinim duysa da oksijenli koşulları tolere edebilmekte, metanojenler ise oksijene maruz kaldıklarında hızlı bir şekilde ölmektedirler (1). Bundan dolayı, anaerob bakterilerin kültürasyonu için ortamdan oksijeni uzaklaştıracak özel yöntemler uygulanmalıdır.

Az miktarda oksijene tolerans gösterebilen bakteriler için ağzına kadar kültür ortamı ile doldurulmuş şişe veya tüpün ağzının sızdırmaz bir tıpa ile sıkıca kapatılması yeterli olabilmektedir. Bu tür bakterilerin üretilmesi ve hatta sayımı için genel olarak üç teknik tercih edilmektedir (2):

1. *İndirgeyici Maddeler Varlığında Kültür*: Besiyerlerine katılan çeşitli indirgeyici maddelerle ortamın redüksiyon şiddetinin artırılmasına dayalı bir tekniktir. Redükleyici maddeler olarak; askorbik asit, tiyoglikolat, sistein, glikoz, Na_2S , Na_2SO_3 , karaciğer ve pişirilmiş et gibi organ ve doku parçaları, metalik demir, v.b. kullanılabilir (2).
2. *Çift Tabaka Yöntemi*: Dökme plaka yönteminin modifiye edilmiş bir şeklidir ve petri kutularına öncelikle 1. tabaka olarak %1,5 agarlı besiyerinin yaklaşık 4 mm kalınlıkta dökülmesinden sonra üzerine %0,7 agarlı besiyerinden 3 – 5 mL kadar 45°C'de iken 0,1 mL inceleme materyali ile karıştırılıp 2. tabaka olarak dökülmektedir. 2. tabakanın katılaşmasının ardından %0,7 agarlı besiyerinden 3 mL en üst tabaka olarak plaklanır ve anaerob kültürler sandviç misali iki agar tabakası arasında kalır (2).
3. *Derin Agarda Kültür*: Tüplerin hazırlanan katı besiyeri ile tüpün kapağına kadar doldurulup, üzerinin steril sıvı vazelin veya parafin ile kaplanması ile yapılan kültür tekniğidir (2).
4. *Biyolojik Yöntem*: Katı besiyerinin yarısına test edilecek anaerob organizma inokule edilirken, diğer yarısına ise aerobik bir bakteri olan *Serratia marcescens* inokule edilerek bu türün ortamdaki O_2 'i tüketerek anaerobik koşulların oluşması sağlanabilmektedir (3).

Çalışılan bakterinin zorunlu anaerob olması durumunda ise ortamdan oksijenin uzaklaştırılması için en yoğun olarak vakum ve gaz uygulamaları kullanılmaktadır. Bu amaçla anaerobik chamber'lar kullanılmakta, olmadığı durumlarda ise anaerobik kavanozlar kültürasyonu için kullanılabilir. Anaerobik kavanozda sistem, hava geçirmez saydam plastik bir kavanozdan oluşmaktadır. Sisteme ilave edilen palladium katalizörü ile anaerobik koşullar sağlanmakta ve kit içerisindeki bikarbonat ve asit içeren kısmın CO_2 , sodyum borhidrat içeren kısmın ise H_2 oluşturmaları ile; palladium katalizörlüğünde ortamda var olabilecek O_2 kit tarafından oluşturulan H_2 ile birleşerek H_2O oluşmakta, yine kit tarafından oluşturulan CO_2 ile de ortamın anaerobik olması sağlanmaktadır (2).

Yürütücülüğünü yaptığım TÜBİTAK 114Y036 no'lu 'Van Gölü'nden Anaerobik Olarak Arsenat Redükleyen ve Arsenit Oksitleyen Bakterilerin İzolasyonu, Fenotipik ve Moleküler Karakterizasyonu ve Arsenik Metabolizmasının Belirlenmesi' isimli projenin çalışmaları kapsamında TÜBİTAK desteği ile Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı bünyesinde 2015 yılında anaerobik chamber ve çeşitli düzeneklerin olduğu Anaerobik Bakteriyoloji Laboratuvarı kurulmuştur (Şekil 1). Laboratuvar bünyesinde anaerob bakterilerin tüm ortam hazırlıkları, inokulasyonları ve kültürasyonları yapılabilmektedir. Hungate tekniğine dayalı olarak tüm besiyeri hazırlıkları ve inokulasyonları yapılmaktadır (4, 5, 6).



Şekil 1: Anaerobik Bakteriyoloji Laboratuvarında kurulum ve optimizasyonunu gerçekleştirdiğim Biobase marka anaerobik chamber.

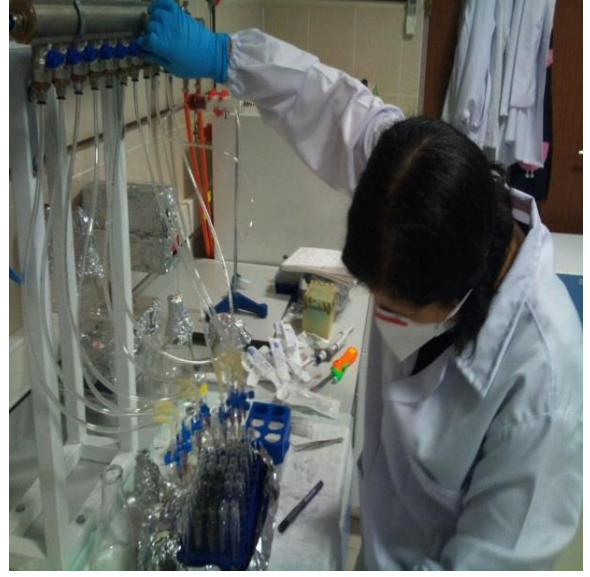
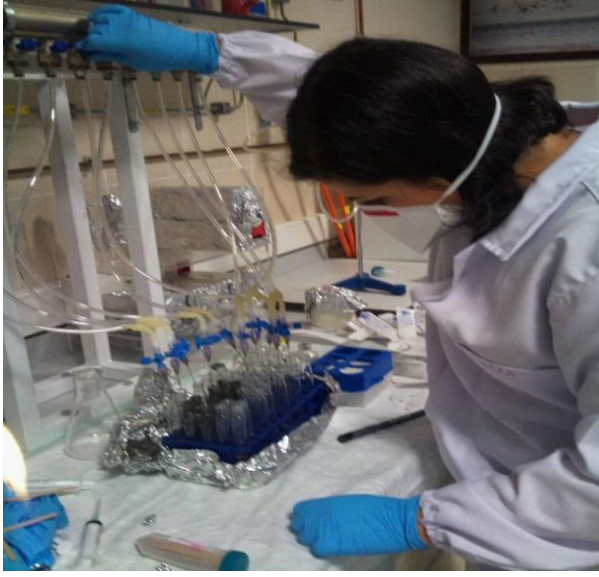
Anaerobik bakterilerin izolasyonlarının yapılabilmesi için ilk aşama olarak kültüvasyon besiyerlerinden oksijenin uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu nedenle anaerobik bakteriyoloji laboratuvarında dizaynını yapmış olduğum 11 kanallı sistem vasıtası ile tüplerin içerisine minimum 15 dakika süre ile saf N_2 gazı verilmektedir (Şekil 2).



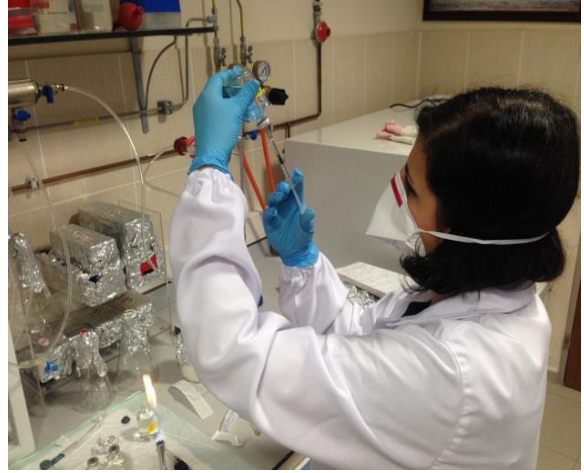
Şekil 2: Onbir kanallı gaz dağıtıcı düzenek.

Özel iğneler aracılığı ile, hacim oranlarına göre belirlenmiş olan sürelerde besiyerleri aseptik koşullarda N_2 gazı muamele edilerek besiyerleri inokulasyona hazır hale gelmektedir (Şekil 3).

Bu aşamayı takiben incelenecek örnek materyali, hazırlanan hungate tüplere anaerobik koşulları bozmayacak şekilde özel enjektörler vasıtası ile inokule edilmektedir. Bu aşamada enjektör ile örnek alımı ve hungate tüplere aktarımı esnasında oksijen kontaminasyonunu engellemek amacı ile enjektör içi birkaç kez N_2 gazı ile doldurulup boşaltılmaktadır (Şekil 4).

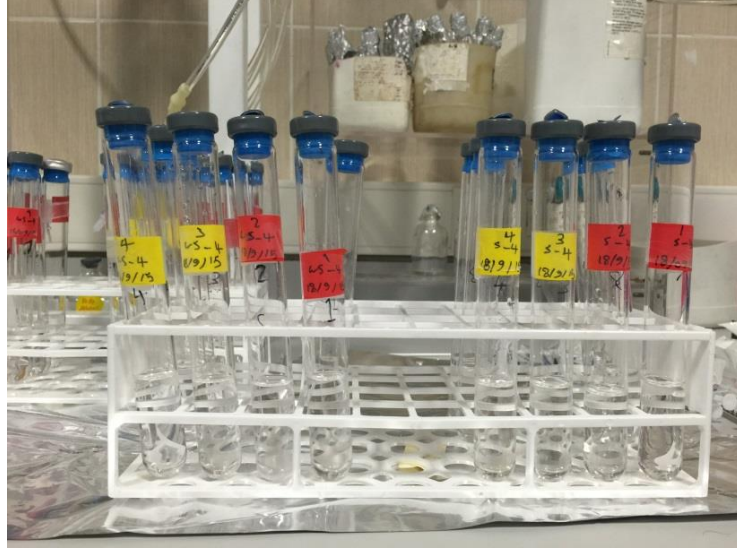


Şekil 3. Hungate tüplerde anaerobik olarak besiyerlerinin hazırlanması.



Şekil 4. Hungate tüplerin inceleme materyali ile inokulasyonu.

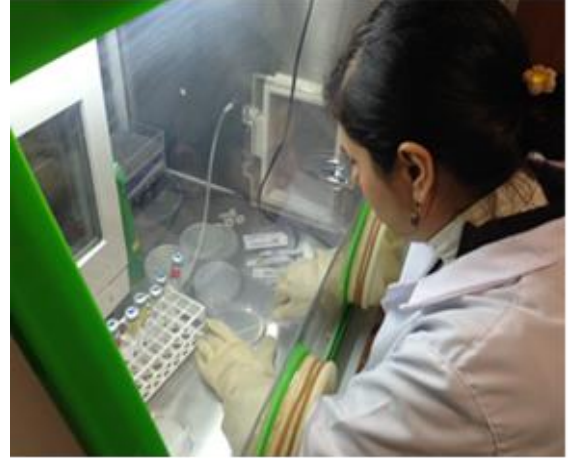
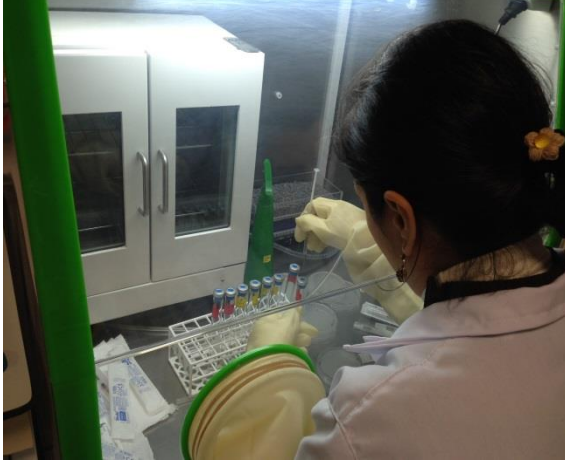
Yeterli mikrobiyal aktivitenin gözlenmesini takiben aseptik ve anaerobik koşullar korunarak hungate tüplerden inokulum alınarak balç tüplere inokulasyon yapılmaktadır (Şekil 5).



Şekil 5. İnokulasyonu gerçekleştirilmiş olan balch tüpler.

Balch tüplerde birkaç aşama pasajlamadan sonra saf kolonilerin elde edilmesi için agarlı besiyerine inokulasyon gerçekleştirilmektedir (Şekil 6). Bu aşamada öncelikle anaerobik chamber içerisinde oksijensiz koşulları sağladığının kontrol edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla chamber içerisinde metilen mavisi bazlı indikatör kullanılmaktadır. Cihazın kurulum aşamasında; kabin içerisine ortamda var olabilecek O_2 'nin uzaklaştırılması amacıyla, reaksiyonu katalizleyecek sıcaklık ile aktive edilmiş palladium katalizörü ve ortamda var olabilecek O_2 ile chamber içerisine verilen H_2 nin reaksiyona girmesi sonucunda oluşacak nemin (H_2O) emilmesi amacı ile de silika jel yerleştirilmektedir. İki katlı olan bu düzeneğin altında çalışan fan vasıtası ile chamber içerisinde var olabilecek O_2 uzaklaştırılmaktadır. Silika jellerin nem emme kapasitelerinin dolması ile renkleri değişmekte ve bu durumda silika jel belirli aralılarla değiştirilmektedir. Silika jel sıcaklık ile aktive edilerek tekrar tekrar kullanılabilir.

Sistem manuel prensipte çalıştığı için chamber içerisine girebilecek olan O_2 'nin varlığını ancak indikatörün renginin değişmesi ile anlaşılmaktadır. Oksijenli koşullarda mavi renk olan indikatör, kademe kademe O_2 'nin ortamdan uzaklaşması ile yavaş yavaş beyazlaşmakta ve ortam O_2 'siz hale geldiğinde renk tamamen indirgenerek beyazlaşmaktadır. İndikatörün renginin maviye dönmesi cihazda O_2 kaçağının olduğunu göstermektedir. Belirli zaman aralıkları ile bu indikatör değiştirilmekte ve her yeni strip'e geçişte indikatörün aktivasyonu için chamber içerisinde sürekli olarak bulundurulmuş steril sudan birkaç damla strip'e damlatılmaktadır. Chamber içerisinde var olabilecek her hangi bir O_2 kaçağının tespit edilmesi durumunda, cihaz içi birkaç kez vakumlanıp saf N_2 ile doldurulmakta ve bu işlem yeterli görülene kadar tekrarlanmakta ve indikatörün renk değişiminin oluşması beklenmektedir (Şekil 7).



Şekil 6. Üremenin gerçekleştiği balch tüplerden agarlı basiyerine yayma plaka tekniği ile inokulasyon yapılması.



Şekil 7. Anaerobik chamber içerisindeki palladium katalizörü, silika jel ve oksijen indikatörü.

Tüm koşulların optimize olması ile chamber içerisinde inokulasyon ve inkübasyon işlemleri başlamaktadır. 'Sample room' bölümüne yerleştirilen balch tüpler ve petriler chamber içerisine alınmaktadır. Bu işlem ile bu bölümün anoksik koşulları korunmadığı için; iç kapının açılması ve örneklerin 'operating room' dediğimiz kısma alınmasından önce, kapağın açılması ile içeri giren O_2 'nin uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla, sample room en az 3 kez vakumlanıp ardından saf N_2 ile doldurulmaktadır. Ardından iç kapı açılarak numuneler iç kısma alınmaktadır. Bu aşamada gergin olan eldivenlerin kullanılabilmesi için ortam vakumlanır ve eldivenlerin içeriye girebilir hale gelmesi ile gerekli inokulasyonlar yapılır ve chamber içerisinde bulunan ve sıcaklığı önceden ayarlanmış olan etüv içerisinde petriler inkübasyona bırakılır. İşlemlerin bitmesi ile gerekli olmayan malzemeler chamber içerisinden anaerobik koşulları bozmayacak şekilde çıkarıldıktan sonra, operating room mix gaz ($\%90 N_2 + \%5 H_2 + \%5 CO_2$) ile doldurulur ve bu aşamada chamber eldivenleri dış kısımda gergin olana kadar gaz verilir.

Daha sonra cihazda var olan flow metre ayarlaması yapılarak 10 mL/dakika oranında gaz beslemesinin sürekli olması sağlanır.

Birkaç aşama çizgi ekimden sonra elde edilen anaerobik izolatların uzun süreli stoklanması için gliserol stokları hazırlanmaktadır. İzolatların izole edildikleri ortamların sıvı formları hungate tüplere hazırlanır ve chamber içerisinde inokulasyondan sonra mid-log fazına ulaşana kadar inkübasyon işlemi gerçekleştirilir. Üremiş olan kültürlerin 1'er mL'si alınarak 9000 X g'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra üremiş olan kültürden 500 µL alınarak pellet çözülür ve içerisinde önceden hazırlanmış olan %50 konsantrasyonda 500 µL gliserol içeren cryo tüplere bu karışım ilave edilir ve hızlı bir şekilde -80°C'ye kaldırılır. Devam eden çalışmalar için her defasında gliserol stoklar kullanılarak bakteriler aktive edilir.

Bu yazıda, üniversitemiz bünyesinde bulunmayan ve 114Y036 no'lu TÜBİTAK projesi desteği ile üniversitemizde ilk kez kurulmuş olan Anaerobik Bakteriyoloji Laboratuvarı'ndan ve çalışma prensiplerinden bahsedilmiştir. Bu kapsamda anaerobik ve/veya aerobik arsenik metabolizması konulu bir TÜBİTAK, bir EBİLTEM ve iki BAP projesi tamamlanmıştır. Laboratuvarın kurulumunda ilk hedef anaerobik arsenik bakterilerinin izolasyonu olmasından dolayı anaerobik kültürasyon çalışmaları ilk olarak arsenik metabolizması üzerine yoğunlaşmıştır. Anaerobik sistemin ve anaerobik chamber'ın optimizasyonlarının yapılmış olması ve düzenli olarak çalışabilen bir anaerobik laboratuvar olmasından dolayı, oluşturulabilecek çalışma grupları ile anaerobik mikroorganizmalar ile gerçekleştirilebilecek multidisipliner çalışmaların yapılması hedeflenmektedir.

KAYNAKLAR

1. Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Stahl DA. Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi 14. Baskı, Çeviri Editörü Çökmüş C. Palme Yayıncılık, Bölüm 5, Ankara – 2017, 168-170.
2. Karaboz İ, Ateş M. vd. Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri Teori ve Uygulamaları. Ebiltem2002, 05 – 07 Şubat.
3. https://www.jfmed.uniba.sk/fileadmin/jlf/Pracoviska/ustav-mikrobiologie-a-imunologie/ANAEROBIC_BACTERIA.pdf
4. Widdel F, Pfennig N. Studies On Dissimilatory Sulfate-Reducing Bacteria That Decompose Fatty Acids I. Isolation Of New Sulfate-Reducing Bacteria Enriched With Acetate From Saline Environments. Description Of *Desulfobacter postgatei* Gen. Nov., sp., Nov. Archives of Microbiology 1981, 129:395-400.
5. Saltikov CW, Wildman RA vd. Expression Dynamics Of Arsenic Respiration And Detoxification In *Shewanella* sp. Strain ANA-3. J. Bacteriology 2005, 187:7390-7396.
6. Zargar K, Hoeft S. vd. Identification Of A Novel Oxidase Gene, *arxA*, In The Haloalkaliphilic, Arsenite-Oxidizing Bacterium *Alkalilimnicola ehrlichii* Strain MLHE-1. J. Bacteriology 2010, 192:3755-3762.