

1.6 Referans Mikroorganizma Kùltürleri

Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarlarında besiyerlerinin kalite kontrollerinin yanında iç kalite kontrol çalışmaları ve eğitim amacı ile referans mikroorganizma kùltürlerine ihtiyaç vardır. Referans kùltür terimi referans suşlar, referans stok kùltürler ve çalışma kùltürleri için ortak olarak kullanılmaktadır.

Referans kùltürler ait oldukları türlerin karakteristik özelliklerini temsil etmelidirler. Laboratuvarı doğruıdan gıda örneklerinden izole edilen suşların biyokimyasal profilleri ve serolojik özellikleri bakımından atipik olabileceğı veya alt kùltürleme (pasajlama) ile kùltür koleksiyonundan temin edilen kùltürlere nazaran kolaylıkla atipik duruma gelebilecekleri unutulmamalıdır. Bu nedenle ideal olarak referans kùltürler kùltür koleksiyonlarından temin edilmelidirler. Kùltür koleksiyonundan temin edilen kùltürlerin genetik değışim riskini minimize etmek için laboratuvarı en fazla **beş** kez pasajlanması tavsiye edilmektedir.

1.6.1 Referans Suşlar

Referans suşlar doğruıdan kùltür koleksiyonlarından temin edilen ve en azından cins ve tür düzeyinde tanımlanmış, karakteristik özellikleri ortaya konmuş ve bir katalog numarasına sahip mikroorganizmalardır. Referans suşların temin edilebileceğı kùltür koleksiyonlarına American Type Culture Collection (ATCC, ABD), National Collection of Type Cultures (NCTC, İngiltere), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Almanya) ve Japan Collection of Microorganisms (JCM, Japonya) örnek verilebilir.

Referans suşlar genellikle liyofilize halde temin edilebilirler. Liyofilizasyon tekniğı kullanılarak oluşturulan mikroorganizma kùltürleri uzun süre canlılığını muhafaza edebilirler. Liyofilizasyon (Dondurarak kurutma) yüksek vakum altında sublinleşme ile suyun uzaklaştırılarak dondurulmuş materyalin kurutulması prensibine dayalıdır.

Maya referans suşları için aşağıda verilen referans stok ve çalışma kùltürleri hazırlama yöntemleri kullanılabilir. Küf kùltürleri bakteri kùltürlerinden farklı olarak katı besiyeri üzerinde canlılıklarını çok uzun süre muhafaza edebilmektedirler. Birçok küf türü 4°C' de canlılığını 1-2 yıl koruyabilmektedir. Bu nedenle küf kùltürleri doğruıdan yatık katı besiyerleri üzerinde buzdolabında muhafaza edilebilirler.



LIOFILCHEM

Sertifikalı Referans Mikroorganizma Kùltürleri

ATCC Kùltür Koleksiyonlarından

- ✓ Liyofilizasyon teknolojisi ile uzun raf ömrü
- ✓ Bir vialde 5 pelet ile ekonomik

1.6.2 Referans Stok Kùltürler

Liyofilize referans suşlar laboratuvara kabul edildikten sonra tedarikçiden sağlanan talimatlar doğrultusunda yeniden sulandırılmalıdır ve referans stok kùltürleri oluşturmak amacı ile pasajlanmalıdır. Bu amaçla **kanlı agar** ve Tryptic Soy Agar (**TSA**) kullanılabilir. Mikroorganizma için uygun sıcaklık ve sürede inkübasyon sonunda katı besiyerinde oluşan koloniler saflık ve biyokimyasal karakteristikleri yönünden kontrol edilmelidirler. Kontrol sonuçları uygun olmayan kùltürler elden çıkartılmalıdır. Kontrol sonuçları uygun olduğı takdirde

mikroorganizma süspansiyonu hazırlamak için bir öze ile yeterli sayıda koloni selektif olmayan bir sıvı besiyeri (Ör., Tryptic Soy Broth, **TSB**) içine alınmalı ve homojenize edilmelidir.

Hazırlanan süspansiyon düşük sıcaklıklarda muhafaza edileceğinden dolayı kullanılan sıvı besiyeri koruyucu içermelidir. Mikroorganizmalar sıvı besiyeri içinde dondurulduğunda, hücre dışındaki su donmaya başladığı zaman serbest su miktarının azalmasına bağlı olarak hücre dışı çözünmüş madde konsantrasyonu artacaktır. Hücre dışındaki bu konsantrasyon ozmotik dengesizliğe ve hücreden su kaybına neden olacaktır. Ayrıca oluşan buz kristalleri hücre membranlarına fiziksel olarak zarar verebilir. Suyun donmasına bağlı bu istenmeyen etkiler suyun donma noktasını düşüren koruyucular ile azaltılabilir. Bu amaçla en yaygın kullanılan koruyucu mikroorganizmalar üzerine toksik olmaması nedeni ile **gliseroldür**. Gliserol su molekülleri ile hidrojen bağları oluşturur. Böylece su molekülleri arasında hidrojen bağlarının oluşumunu engelleyerek suyun donma noktasını düşürmektedir. Gliserolün sıvı besiyerine **%15** oranında ilavesi yeterli olacaktır.

Hazırlanan süspansiyon Eppendorf tüpleri veya mikro santrifüj tüplerine taksim edilir ve dondurulur. İdeal dondurma sıcaklığı **≤70°C** dir. Ancak daha yüksek dondurma sıcaklıkları da (**≤20°C**) kullanılabilir. Bu durumda referans stok kültürlerin muhafaza süresinin daha kısıtlı olacağı unutulmamalıdır.

1.6.3 Çalışma Kültürleri

Çalışma kültürleri referans stok kültürden selektif olmayan katı besiyerine (Ör., **TSA**) inokülasyon ile hazırlanır. Mikroorganizma için uygun sıcaklıkta ve 24 saat inkübasyon sonunda katı besiyerinde oluşan koloniler saflık yönünden kontrol edilmelidirler. Kontamine olduğu tespit edilen kültürler elden çıkartılmalıdır.

Çalışma kültürlerinin hazırlanmasında petrideki katı besiyerlerine alternatif olarak su kaybının daha az olması nedeni ile tüp içinde hazırlanan yatık katı besiyerleri kullanılabilir. Ancak yatık besiyerlerinde koloni morfolojilerinin gözlenmesinin zor olacağı unutulmamalıdır. Çalışma kültürleri **2°C - 8°C** arasında **4** haftaya kadar muhafaza edilebilirler.

1.6.4 Standardize Edilmiş İnokulum

Besiyerlerinin kalite kontrolü veya farklı amaçlarla içindeki hücre sayısı ayarlanmış mikroorganizma süspansiyonlarının hazırlanmasına ihtiyaç vardır. Bir süspansiyondaki bakteri ve maya hücre sayısı kültürel tekniklerin dışında McFarland standartları veya doğrudan mikroskopik sayım ile belirlenebilir. Bu yöntemlerin kültürel yöntemlere kıyasla ortak avantajı inkübasyon süresi gerektirmemeleridir. Ortak dezavantajları ise canlı ve ölü hücreleri ayırt edememeleridir. Bu nedenle kültürel sayım yöntemleri aynı zamanda **canlı sayımları** (**viable count**) olarak da isimlendirilmektedir.

1.6.4.1 McFarland Standartları

Bakteri ve maya süspansiyonlarının standardizasyonu için McFarland bulanıklık standartları kullanılabilir. McFarland standartları Baryum Klorür ve Sülfirik Asit' in **%1**' lik solüsyonlarının farklı oranlarda karıştırılması ile hazırlanmaktadır. Oluşan Baryum Sülfat' ın miktarı bulanıklığın yoğunluğunu belirlemektedir. McFarland standartları içerdikleri BaCl₂ oranına göre isimlendirilmektedirler. Tüp içinde hazırlanan standartlar kapakları sıkıca kapatılarak karanlıkta ve oda sıcaklığında muhafaza edildiği takdirde 6 ay boyunca kullanılabilirler. Günümüzde lateks partiküller ile hazırlanmış ve daha uzun raf ömrüne sahip ticari McFarland standartları mevcuttur.

En düşük McFarland standardı olan **0,5** numaralı McFarland standardı %0,5 oranında BaCl₂ içermektedir ve yaklaşık olarak **1,5 x 10⁸** cfu/mL bakteri yoğunluğuna karşılık gelmektedir. McFarland standartlarına karşılık gelen bakteri yoğunlukları Tablo ' de verilmiştir. Tablo da verilen değerlerin *Escherichia coli* için geçerli olduğunu ve bakterilerin hücre büyüklüklerine göre değişkenlik göstereceği unutulmamalıdır. Maya türleri için 0,5 numaralı McFarland standardı **1-5 x 10⁶** cfu/mL yoğunluğu karşılık gelmektedir.

Tablo 1.4 McFarland Standartlarına karşılık gelen bakteri yoğunluğu

McFarland Standardı	cfu (x 10 ⁸ /mL)	1% BaCl ₂ /1% H ₂ SO ₄ (mL)
0,5	1,5	0,05/9,95
1	3	0,1/9,9
2	6	0,2/9,8
3	9	0,3/9,7
4	12	0,4/9,6
5	15	0,5/9,5

Uygulamada öncelikle selektif olmayan katı besiyerinde gelişen kolonilerden öze ile birkaç tanesi tüp içindeki steril fizyolojik tuzlu su içine alınır ve homojenize edilir. Bu süspansiyonun bulanıklığı seçilen McFarland standardı ile görsel olarak karşılaştırılır. Karşılaştırma McFarland standardının ve bakteri süspansiyonunun olduğu tüplerin yatay siyah çizgiler ile kontrast oluşturan beyaz bir arka plana karşı tutulması ile yapılmalıdır. Mikroorganizma süspansiyonunun McFarland standardından bulanık olması durumunda süspansiyona steril fizyolojik tuzlu su ilave edilmelidir. McFarland standardının mikroorganizma süspansiyonunun bulanık olması durumunda ise süspansiyona öze ile koloni ilave edilmelidir. Alternatif olarak 0,5 numaralı McFarland standardı ile doğrudan sıvı besiyerindeki kültürün bulanıklığı karşılaştırılabilir. Bu durumda sıvı besiyerindeki kültür logaritmik fazda olmalıdır.

1.6.4.2 Doğrudan Mikroskopik Sayım

Bir süspansiyondaki bakteri veya maya sayısı Breed yöntemi kullanılarak doğrudan mikroskopik yöntemle belirlenebilir. Breed yönteminde öncelikle preparatın boyalı alanının (100 mm^2), ışık mikroskopunda immersiyon objektifi ile elde edilen bir görüş sahası alanına oranı olan **Mikroskop Faktörü (MF)** hesaplanmalıdır.

Mikroskop Faktörünün Hesaplanması

Öncelikle immersiyon objektifi (100 X) ile elde edilen bir görüş sahasının alanı hesaplanmalıdır. Görüş sahasının bir daire olması nedeni ile alanı daire alan formülü (πr^2) ile hesaplanabilir. Görüş sahasının yarıçapı (r) ise Kontrol Mikrometresi (Stage micrometer, $1 \text{ mm}/100$) ile yaklaşık olarak belirlenebilir. Örneğin bir görüş sahasının yarıçapı yaklaşık $0,08 \text{ mm}$ ise, bu durumda bir görüş sahasının alanı $0,02 \text{ mm}^2$ ($3,14 \times 0,08 \text{ mm}^2$) ve MF ise 5000 ($0,02 \text{ mm}^2/100 \text{ mm}^2$) olacaktır.

Preparatın Hazırlanması

Mikroorganizma süspansiyondan $0,01 \text{ mL}$ alınarak temiz bir lam üzerinde 100 mm^2 lik alana yayılır ve 55°C ' de etüvde kurutulur. Kurutulan preparat basit boyama (Metilen mavisi ile) veya Gram boyama ile boyanır.

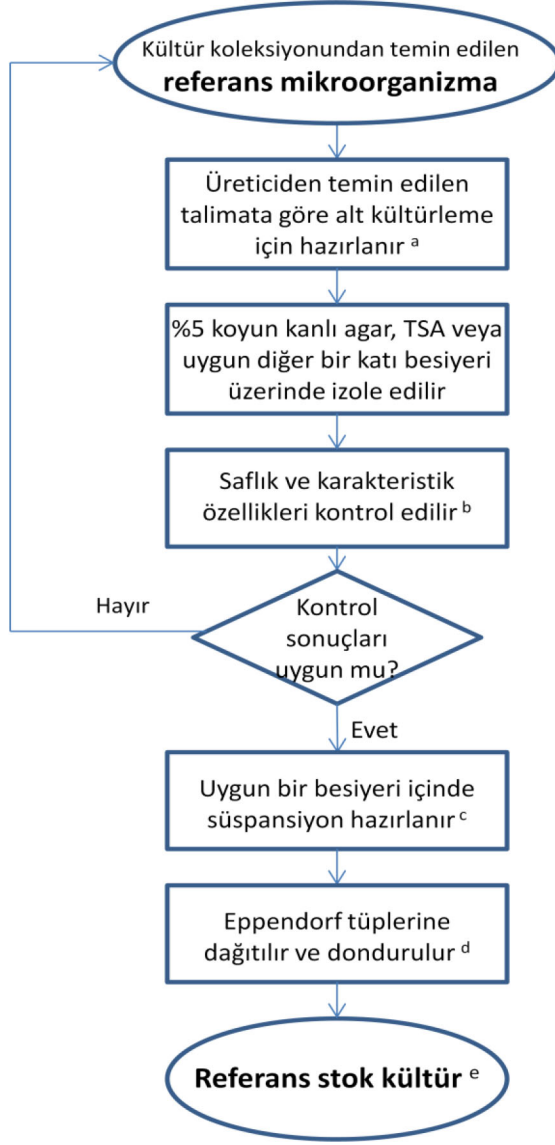
Sayım ve Hesaplama

Zincir veya yığın halindeki bakteri hücreleri bir hücre olarak sayılmalıdır. Bu hücreler koloni sayım tekniğinde muhtemelen bir koloni oluşturacaklarından dolayı bu şekilde elde edilen sayım sonucunun koloni sayım tekniği ile daha uyumlu olması sağlanacaktır.

Görüş sahalarından elde edilen ortalama hücre sayısı MF ile çarpılarak $0,01 \text{ mL}$ süspansiyonda bulunan hücre sayısı saptanabilir. Elde edilen değer 100 ile çarpılarak 1 mL süspansiyondaki mikroorganizma sayısı elde edilir. Örneğin, 30 görüş sahasında toplam 88 hücre sayıldı ise ortalama hücre sayısı $2,93$ ($88/30$) olarak hesaplanır. Bu durumda süspansiyonun 1 mL ' sindeki hücre sayısı $1.465.000$ ($2,93 \times 5000 \times 100$) olarak hesaplanır.

1.6.4.3 Küf Spor Süspansiyonu

Küf spor süspansiyonu hazırlamak için yatık katı besiyerinde gelişen taze kültürler (3-5 gün inkübasyon sonrası) kullanılmalıdır. Küf kolonilerinin üzerini örtecek kadar %1 oranında **Tween 20** içeren steril distile su ilave edilir. Steril bir swab ile konidyaların su içinde serbest kalmaları sağlanabilir. Daha sonra ilave edilen su steril bir tüpe aktarılır ve vorteks yardımı ile homojenize edilir. Bu süspansiyon hiflerden arındırmak için steril cam yününden süzülür. Süspansiyondaki spor sayısı Neubauer lamı kullanılarak doğrudan mikroskopik sayımla (10×40 büyütme gücü) belirlenebilir ve spor sayısı steril distile su ile seyreltilerek istenilen düzeye ayarlanabilir.



^a Liyofilize kültürler genellikle nutrient broth içinde süspanse edilir

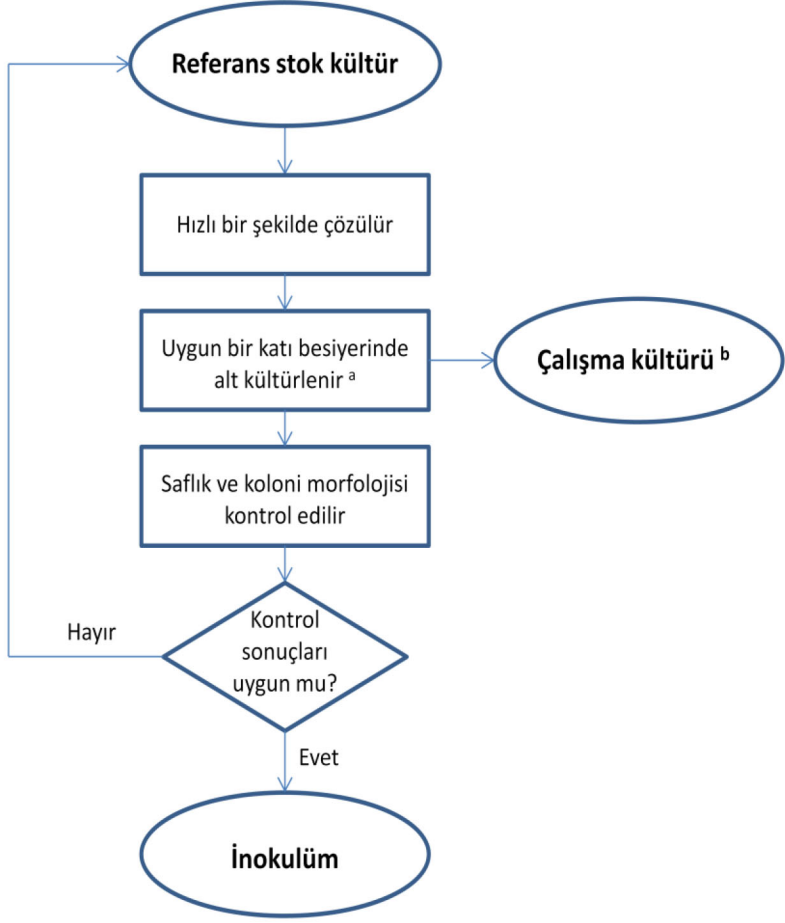
^b Kolonilerin morfolojileri kontrol edilir ve Gram boyama yapılır veya biyokimyasal testler ile doğrulanır

^c Örneğin %15 oranında gliserol içeren Nutrient Broth

^d Dondurma amacı ile -18C veya -70C sıcaklıkları kullanılabilir

^e Çalışma kültürü olarak kullanılabilir

Şekil 1.3 Referans stok kültürlerinin hazırlanması



^a Örneğin TSA

^b 2-8°C arasında 4 haftaya kadar muhafaza edilebilir

Şekil 1.4 Çalışma kültürlerinin hazırlanması