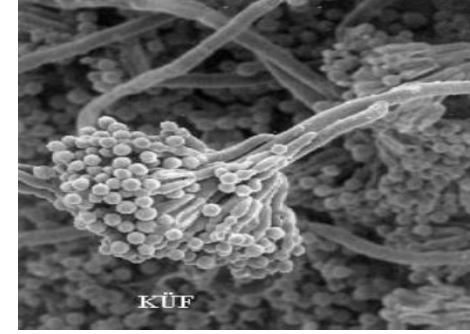


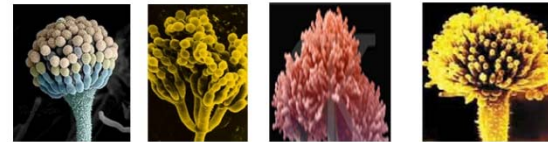
# ENDÜSTRİYEL MİKROBİYOLOJİ

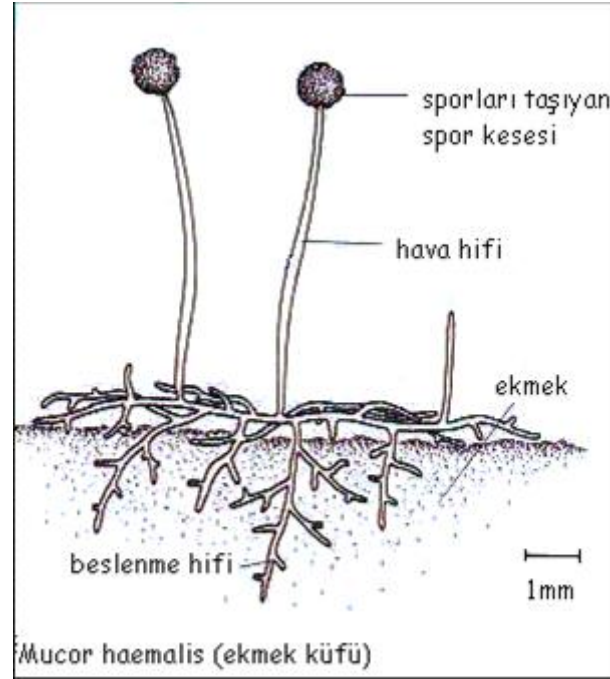
# KÜFLER



- ◉ Küfler; hifli mantarlardır.
- ◉ Mayalara benzerdirler, ancak hücre duvarlarındaki kitin ile mayalardan ayrılırlar, çok çekirdekli bir yapıya sahiptirler.
- ◉ Birçok organizma ve gıda maddesi (ekmek, meyve, sebze..vb) üzerinde oluşturdukları pamuk görüntüsündeki doku nedeniyle mayalardan çok önce keşfedilmişlerdir.
- ◉ Thallophyta olup vücutları farklılaşma göstermeyen, klorofil içermeyen ve doğada, toprakta yaygın olarak bulunan organizmalardır.
- ◉ Endüstriyel mikrobiyoloji açısından önemli olanlar, mikroskobik küflerdir.

- Endüstride birçok ürünün eldesinde, atıklardan değerli ürünlerin oluşturulmasında kullanılan farklılaşma göstermeyen m.o.lardır.
- Küflerin üredikleri ortama proteaz, lipaz, karbonanhidrazlar gibi litik enzimleri salgılamaları ve küflerin ürettikleri çeşitli metabolitlerin birçok alanda kullanılabilir olması bu organizmaların endüstrideki önemini oldukça artırmaktadır.
- Ayrıca insan, hayvan ve bitkiler için patojen olan türleri de bulunmaktadır.





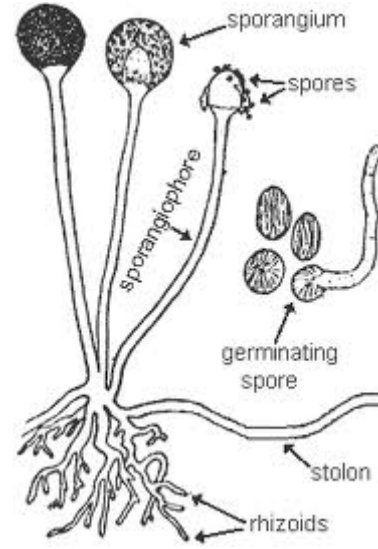
- Bir küf, protoplazma iplikleri veya uzantıları olan hiflerden ve sporelerden oluşur.
- Küf hücreleri ardarda dizilerek hifleri, hifler de çeşitli şekillerde dallanma yaparak “misel” adı verilen yumakları oluşturur.
- Hifler, bölmeli hifler ve bölmesiz hifler olarak ikiye ayrılır.

- Bölmeli hif (septalı), bölmeler ile hücrelere ayrılmıştır ve her hücrede bir veya iki hücre çekirdeği bulunur.
- Bölmesiz hif (septasız) bölme içermez ve çok çekirdeklidir; böyle hife sönositik hif de denir.
- Beslenme hifleri ise besiyeri içinde uzanan ve koloniye besin sağlayan hiflerdir.



- ◉ Üreme hifleri genellikle koloninin yüzeyinde bulunan ve üreyen hücreleri veya sporları taşıyan hiflerdir.
- ◉ Hifler, uç hücrelerin gelişmesi olan apikal büyüme ile veya-bölmeli hiflerde olduğu gibi- apikal büyüme ve hifin herhangi bir bölümündeki hücrelerin bölünmesi ile gelişirler, uzarlar.

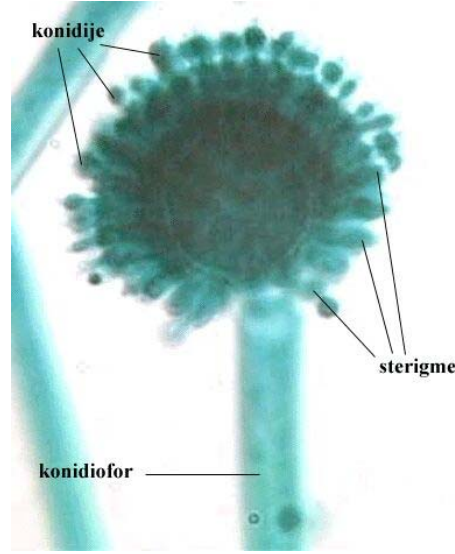




- Küfler eşeysiz ve eşeyli sporları ile üretirler. Bazı eşeysiz sporlar, sporangiyofor adı verilen özel bir hif uzantısının ucunda bulunan sporangiyum denilen kapalı bir spor kesesi içinde oluşurlar.

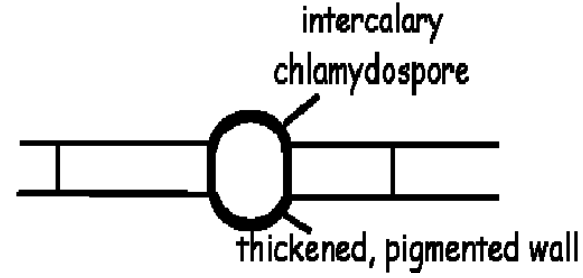






- Bazılarını ise konidyofor adı verilen özel hüflerden oluşarak konidyum adını alırlar.
- Eşeysiz üremede rüzgarla dağılan ve açıkta oluşan sporlar olan konidialar, miselyumun oluşturduğu konidioforların uçlarında meydana gelir.
- Konidiaların çimlenmesiyle vejetatif üreme devam eder.





- ◉ Diğer bir eşeysiz spor biçimi de klamidospordur; bu spor genellikle vegetatif hücreden gelişir, kalın duvarlıdır ve uygunsuz koşullara dayanıklıdır.



- Küflerin hücre duvarı gluklan, kitosan ve kitin gibi farklı glukoz polimerlerinden yapılabilir.
- Birkaç örnekte hücre duvarının sadece kitinden oluştuğu bilinmektedir.
- Aynı zamanda hücre duvarı %80-90 polisakkarit polimerleri de içerir. Geri kalan büyük bir kısmı ise protein ve lipidlerden oluşur.



# ENDÜSTRİYEL ÖNEMİ OLAN KÜFLER

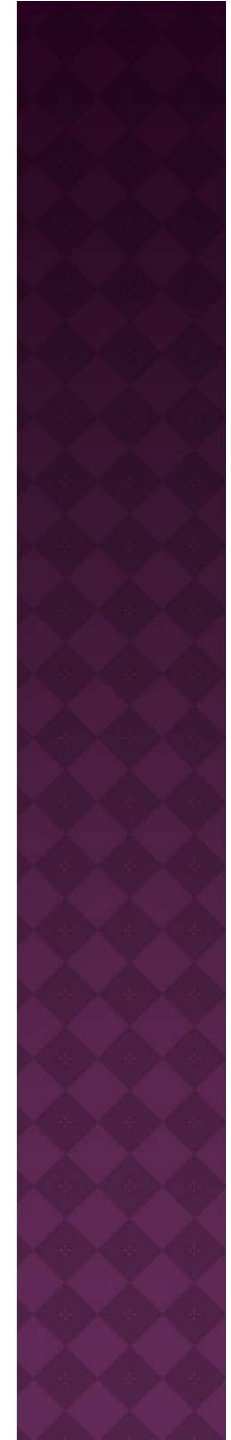
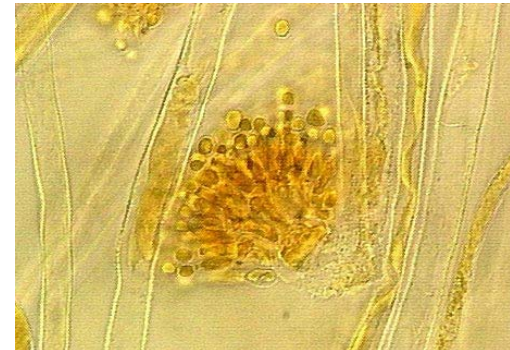
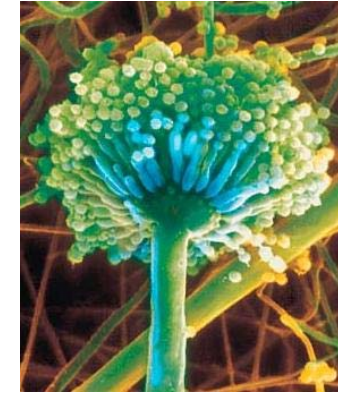
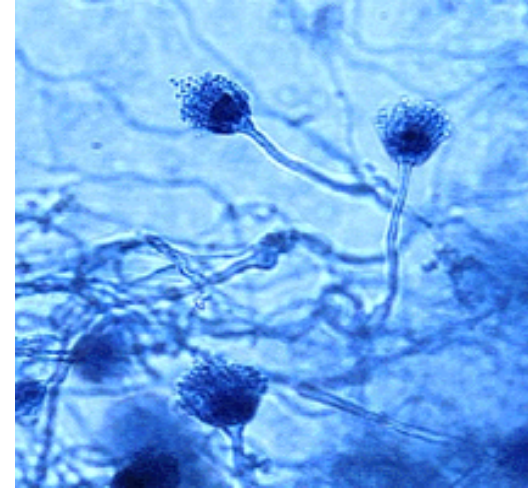
- ◉ Ascomycetes: Mayalarda olduğu gibi sporlarını askus keseleri içinde oluştururlar. Bununla beraber filamentli mantarlarda askuslar kompleks bir yapı olan ascocarp içinde oluşurlar.



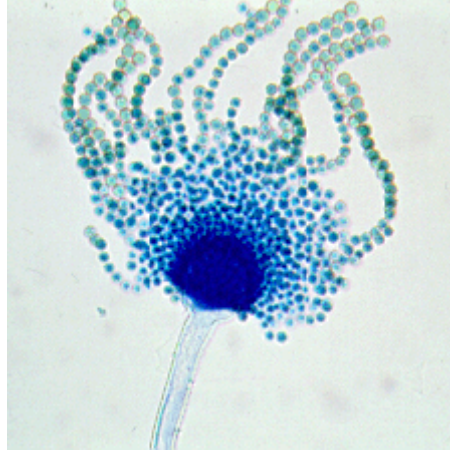
- ◉ Basidiomycetes grubu küfleri eşeyli sporları basidia, basidiocarp içinde geliştirirler. Hücre çeperleri gluklan ve kitinden oluşur. Agaricus türleri insanlar için endüstriyel mantar tüketimine cevap vermek üzere üretilir.



- Deutromycotina: Bu gruptaki küflerde eşeyli üreme yoktur. Sadece konidia olarak bilinen eşeysiz üreme yapılarıyla ürerler. Hücre çeperleri glukan ve kitinden oluşur. Bu gruba giren en önemli endüstriyel küfler *Aspergillus* ve *Penicillium*'dur.
- *A.niger* sitrik ve glukonik asit üretiminde kullanılır.
- *A.oryzae* pirinç ve soya ürünlerinin fermentasyonunda (besin endüstrisinde), proteolitik ve amilolitik enzimlerin üretilmesinde kullanılır.







- Bazı türleri ise bitkilere örneğin pamuğa patojen etkiye sahiptir. Fındık veya fıstık üzerinde üreyen *A.flavus* insan ve kümes hayvanlarında karaciğer kanserini indükleyen etkiye sahip B1-mikotoksin'ini üretirler.
- Mitotoksinler genelde küçük molekül ağırlıklı, insan ve hayvanlara karşı toksik küflere ait metabolitlerdir.

- Endüstriyel küflerden en çok üzerinde çalışılan *Penicillium* türleridir.
- Herçşit organik materyal üzerinde üreyebilen sporları havada sporofit olarak bulunur.



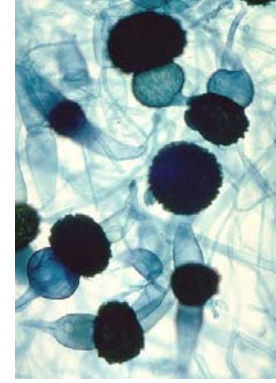
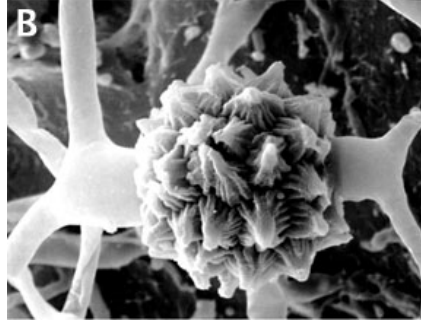
- *P.griseofulvum* griseofulvin üretiminde kullanılır. Bu madde deri ve tırnaktaki mantar tedavisinde kullanılır.

- Griseofulvine duyarlı mantarlarda antibiyotik, mikrotubulerdeki tubulinin oluşumuyla ilgili proteine bağlanarak mitozda kromozomların ayrılmasını ve hifsel üremeyi durdurur.

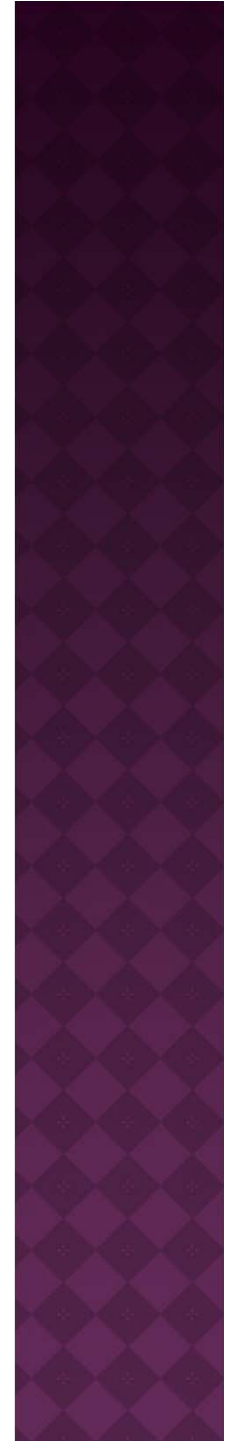


- Penicillium'un diğer türlerinin birçoğu besin endüstrisinde önemlidir. Örneğin P. camemberti, P.roqueforti isimleriyle anılan peynirlerin yapılmasında kullanılır.





- ◉ Zygomycetes: Sporocarp içerisinde eşeysiz, hareketsiz spora sahiptir. Hücre duvarı kitosan (glukozaminin çok az ya da hiç asetillenmemiş polimeridir) ve kitinden oluşur.
- ◉ Bu grubun endüstriyel küfleri Mucor ve Rhizopus'tur. Rhizopus migricans sitrik asit üretiminde kullanılır. Mucor ise peynir yapımında kullanılan rennin üretiminde kullanılmaktadır.
- ◉ Mucor pussillus ve mucor miehei'den izole edilen asit proteazlar süt proteini kazeindeki peptid bağını parçalayarak kazinin çökmesine neden olur.



- ◉ Normal doğal koşullar altında mantarlar eşeysiz olarak çoğalırlar.
- ◉ Eşeyli üreme ise sadece uygun şartlar altında nadiren olabilir.
- ◉ Küflerin endüstriyel üretimi ise özel olarak tasarımı yapılmış sadece misel oluşumuna izin veren yatay tanklarda yapılır.



# KÜFLERİN ÜRETİLMESİNDE KULLANILAN BESİYERLERİ

- Küfler üreme için azot, karbon, hidrojen, oksijen, potasyum, fosfor, magnezyum başta olmak üzere demir, çinko, bakır, manganez, molibden gibi maddelere gereksinim gösterirler.
- Bunun yanında bazı küfler de ortamda tiyaain gibi bazı organik maddeler olmazsa üreyemezler.

- Küflerin çoğu genellikle uygun bir Şeker veya nişasta, azot ve esansiyel mineral element tuzlarını içeren ve pH'ı asit olan besiyerlerinde kolaylıkla ürerler.
- Kullanılan besiyeri yapay, yarı yapay ve doğal olabilir.



- Küflerin üretilmesinde kullanılan besiyerleri şunlardır:

1. **Raulin besiyeri:**

- En eski yapay besiyeridir.
- Sakaroz, tartarik asit ve çeşitli tuzları içerir.

## 2- Czapek besiyeri:

- ◉ Küf üretmede ve izolasyonunda en yaygın
- ◉ olarak kullanılan besiyeridir.
- ◉ Sakaroz, sodyum nitrat, potasyum fosfat, magnezyum sülfat, potasyum klorür ve demir sülfat içerir.
- ◉ pH'sı nötr veya hafif asidiktir.
- ◉ Mucor türleri sakarozu kullanmadıklarından bu türleri üretmek için besiyerine sakaroz yerine glikoz veya başka bir şeker katılmalıdır.

### 3. Malt besiyeri:

- ⦿ Malt özütü içeren ve pH'sı 5.5 olan bir besiyeridir.
- ⦿ Özellikle tereyağından küf ve mayaların izolasyonu ve tanısı için kullanılır.





#### 4- Sabouraud besiyeri:

- Yaygın olarak kullanılan besiyeridir.
- Karbon kaynağı olarak glikoz ve azot kaynağı olarak da pepton içerir.
- pH sı ortalama 5.6 dır.
- Bazı küfler maltozlu Sabouraud besiyerinde daha iyi üreme gösterirler.

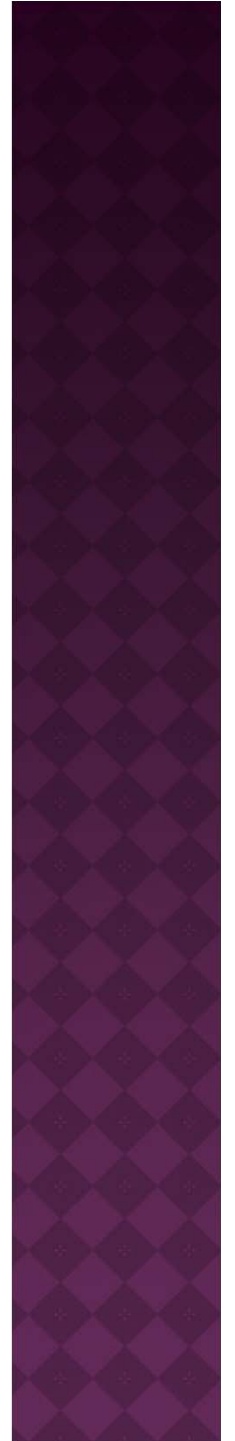
## 5- Doğal besiyeri:

- Armut, patates, havuç, fasülye gibi meyve ve sebzelerin özüt sıvıları
- Şeker katılarak veya Őekersiz olarak bazen kullanılabilir.



## 6- Diğer besiyerleri:

- Karbonhidratlarla zenginleştirilmiş ve
- pH sı aside ayarlanmış agar ve jelatin de kullanılabilir.



# KÜFLERİN LABORATUVAR TANISI

- Küflerin tanısındaki ölçüt küf morfolojisidir.
- Küf morfolojisi, çıplak gözle büyüteç ve mikroskop yardımıyla incelenip saptanır.
- Küf tanısı için kullanılacak en iyi besiyeri Czapek besiyeridir.



◉ Küf kolonisinin;

- üreme hızı,
- biçimi,
- rengi,
- değişik bölümlerinin yüksekliği ve örgüsü,
- koloni taban rengi,
- besiyerine yayılan pigment yapıp yapmadığı v
- pigment yapıyorsa rengi saptanır.

◉ Mikroskobik yapısının incelenmesinde lam ekininden yararlanır.



◉ Lam ekininde sporların;

- biçim ve büyüklükleri,
- renkleri ve dizilimleri;
- spor taşıyan hiflerin dallanma durumları,
- bölmeli veya bölmesiz olmaları,
- enleri,
- renkleri ve
- duvarlarının özellikleri incelenir.

◉ Ayrıca küfün salgıladığı kimyasal madde kristalleri veya sıvıları da not edilir.



# MİKROORGANİZMA KÜLTÜRLERİNİN MUHAFAZA YÖNTEMLERİ

- Mikroorganizma kültürlerinin, özelliklerinin aynı kalması koşulu ile muhafazası mikrobiyolojinin birçok alanını ilgilendiren çok önemli bir konudur.
- Muhafaza yönteminde esas; canlının genotip ve fenotipinin aynı kalmasıdır.



○ Mikroorganizmalar başlıca şu yöntemlerle muhafaza edilirler:

A-Basit yöntemler

1. Besiyerinde pasaj
2. Sıvı parafin altında muhafaza
3. Damıtık su içinde muhafaza
4. Kurutma

B- Modern yöntemler

1. Liyofilizasyon
2. Düşük ısı derecelerinde muhafaza



# BASİT YÖNTEMLER

## 1. Besiyerinde pasaj:

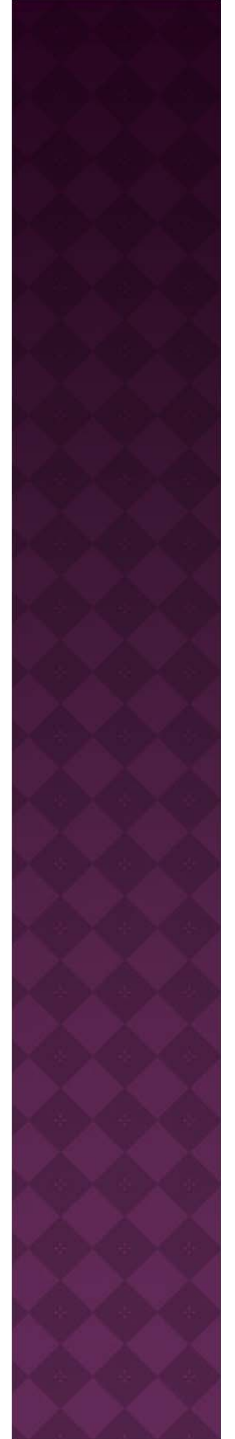
- Bilinen en eski bir yöntemdir.
- Eğri jeloza ekim veya batırma kültür şeklinde uygulanır.
- Pasaj araları m.o. nın cinsine bağlıdır.
- Bazı türler, günler veya haftalar, bazıları aylar veya yıllar sonra pasaj yapılır.
- Bu yöntemin,
  - yanlış etiketleme,
  - kontaminasyon,
  - farklı m.o. ile pasaj,
  - suşun ölümü gibi büyük mahzurları vardır.

- Etüvün sıcaklık dercesinde önemli bir değişiklik veya herhangi bir laboratuvar kazası fazla sayıda kültür kaybına neden olur.
- Azotsuz katı besiyerinde oda sıcaklığında sıkı kapatılmak koşulu ile muhafaza edilen 12 Rhizobium suşunun 11 yıl canlı kaldığı bildirilmiştir.



- 1966 da Kauffman, enterobakterilerin devamı için et özeti kullanmış, suşları batırma kültür şeklinde ektikten ve kabın ağzını sıkıca kapattıktan sonra +4° C de uzun yıllar canlı kaldığını göstermiştir.
- Maya ve küf şeklindeki mantarların ağzı sıkıca kapatılmış tüpteki agar besiyerinde, oda sıcaklığında 3-10 yıl canlı kaldığı gösterilmiştir.

- ◉ Ekim yapılan besiyerleri, m.o. ürettiğinde, pH sında önemli değişiklik oluşturan maddeler içermeyecek bileşimde hazırlanmalıdır.
- ◉ Canlı kalma süresi, üremeden sonra tüplerin vakit geçirmeden steril lastik tıpa ile kapatılmasına bağlıdır.

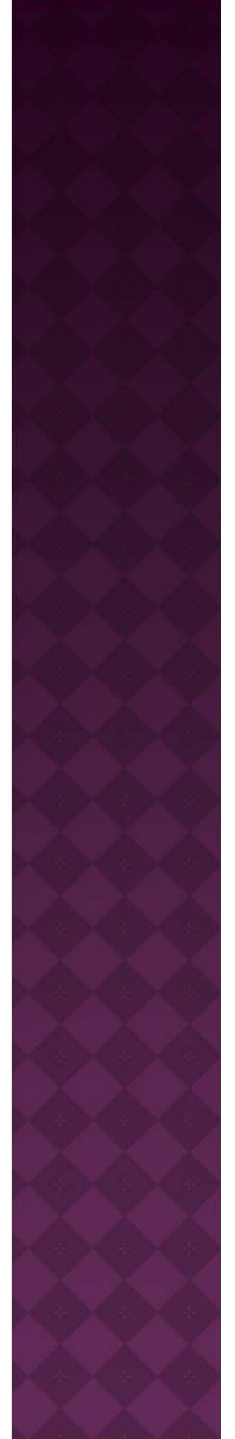


- Uzun süreli muhafazalarda pamuk tıkaçlar çıkarılmalıdır. Çünkü nemlenen pamuk içinde mantar üreyerek kültürü kontamine edebilir.
- Aynı nedenle kültürler parafinli pamuk ile kapatılmalıdır.



## 2- Sıvı parafin altında muhafaza:

- Bu teknik maya ve küf şeklindeki mantarların, aerob bakterilerin uzun süre canlı kalmasını sağlayan kolay bir yöntemdir.
- Kültürün yüzeyi steril sıvı parafin ile tamamen örtülür.



- Yağ, gazların yavaş difüze olmasını sağlar.
- Böylece büyüme yavaşlamış hızda devam eder.
- Liyofilizasyonda canlı kalamayan bazı suşlar bu yöntemle muhafaza edilebilir.





- Özellikle k f Şeklindeki mantarların muhafazası için geniŐ ölçüde kullanılır ve suŐların çoğu 5-10 hatta 20 yıl sonra canlı olarak elde edilebilir.
- Uygun besiyerinde, örneğin eğri besiyerinde, bakteri üretildikten sonra steril sıvı parafin besiyerini tamamıyla kaplayacak Şekilde ilave edilir.



- Parafin besiyerinin üst ucundan en az 1.5 cm yüksekte olmalıdır.
- Kùltürler oda sıcaklığında tercihen 0-5°C de muhafaza edilir.
- Fazla miktarda parafin sarf edilmesi yöntemin sakıncalı yönüdür.



### 3- Damıtık su içinde muhafaza:

- Maya ve küf şeklindeki mantarlar, bitkiler için patojen bakteriler ve aerob *Actinomyces*ler için uygun, *Enterobacter*ler için uygun olmayan bir yöntemdir.
- Bakteri uygun besiyerinde üredikten veya sporlu şekle geçtikten sonra 5-7 cm<sup>3</sup> steril damıtık su içinde süspansiyonu yapılır, bir tüpe veya şişeye aktarılır.

- Selofan veya parafin ile sıkıca kapatılan şişeler, tüpler veya burgulu kapaklı şişelerde, m.olar 1-5 yıl canlı kalır.
- İkinci uygulama şeklinde, üreme olan katı besiyeri yaklaşık 0,5x0,5 cm büyüklüğünde kesilerek yarısına kadar damıtık su konmuş burgulu kapaklı şişeye aktarılır, şişenin kapağı sıkıca kapatılarak oda sıcaklığında muhafaza edilir.



4- **Kurutma**: Neisseria, Vibrio, Pseudomonas cisleri hariç m.oların çoğu için uygun bir yöntemdir. Vakumlu veya vakumsuz ortamda desiktör içinde çeşitli şekillerde yapılır.

- a) Toprak, kum, sünger taşı üzerinde kurutma
- b) Silika jel veya sentetik zeolitler üzerinde kurutma
- c) Cam veya porselen boncuklar üzerinde kurutma
- d) Kağıt diskler üzerinde kurutma
- e) Jelatin diskler içinde kurutma (stamp yöntemi)
- f) At serumu içinde muhafaza (sordelli yöntemi)
- g) “L-drying” yöntemi

○ Kurutma esnasında Şu hususlar dikkate alınmalıdır:

1. Süspansiyon, süt, et suyu, serum gibi koruyucu bir madde içinde yapılmalı
2. Az miktarda madde kurutulmalı
3. Kurutma işlemi çabuk uygulanmalı
4. Kurutulmuş kültürler düşük sıcaklık derecesinde veya vakum altında muhafaza edilmeli



# KURUTMA YÖNTEMLERİ

## a-Toprak veya kum içinde kurutma:

- Sporlu Bacillus cinsi bakteriler, küf şeklindeki mantarlar, aerob aktinomiçetler, hatta spor oluşturmayan m.olar için uygundur.
- Spor oluşturanlar 10-15 yıl, diğerleri 1-5 yıl canlı kalabilir.



- Buyyon veya süt içinde yapılan mo süspansiyonu, oda sıcaklığındaki desikatör içinde bulunan fosforpentaoksit ile kurutulmuş bir tp içindeki steril toprağa ilave edilir.
- Tp sıkıca kapatılır, oda sıcaklığında veya 0-5 °C de muhafaza edilir



**b- Silika jel veya sentetik zeolitler (sünger taşı) üzerinde kurutma:**

- Küf şeklindeki mantarlar, bakteriler ve m.o.lar için uygundur.
- Silika jel içeren pamuklu burgulu kapaklı tübün içine, bakterinin %10 oranında yağı alınmış süt içeren steril sıvıdaki süspansiyonu, damla damla ilave edilir.

- Kuru silika jele sıvı ilavesi ısının artmasına neden olacağından, bakteri süspansiyonu ilave edilmeden evvel tüpler buzdolabında soğutulmalıdır.
- Eğer soğutulmazsa bakteriler ölebilir.
- Tüpler fosforpentaoksit veya silika jel içeren desikatörde bir hafta süre ile kurutulduktan sonra pamuk tıkaç alınarak yalnız burgulu kapak ile sıkıca kapatılır ve 4°C-20°C de muhafaza edilir.

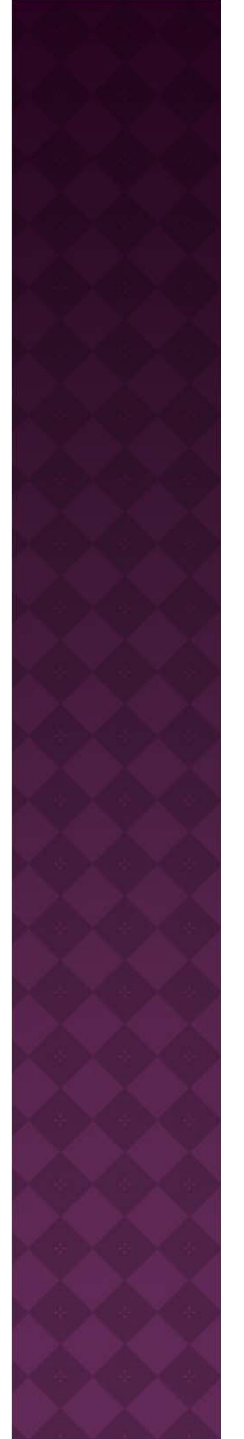
**c- Cam veya porselen boncuklar üzerinde kurutma:**

- ⦿ Bu yöntem m.o.ların silika jel üzerinde kurutulmasına benzer şekilde uygulanır.
- ⦿ Isı artması nedeni ile bakteriler zarar görmediğinden tercih edilebilir.



### d- Kağıt diskler üzerinde kurutma:

- Kùltürlerin posta ile ucuz ve kolay naklini sağlar.
- Bu yöntem ile *S aureus* standart suşlarının yaklaşık 6 ay canlı kaldığı gösterilmiştir.



e- Jelatin disklerde kurutma (Stamp yöntemi):

- Her laboratuvar tarafından uygulanabilecek bir yöntemdir.
- Petri kutusu kapağına parafin eritilerek döküldükten sonra kontaminasyonu önlemek için diğer bir kapakla kapatılır.



- Muhafaza edilecek m.o. Kùltürü uygun besiyerinde üretilerek buyyon içinde yoğun şekilde süspansiyon yapılır.
- %0.3 askorbik asit içeren jelatin besiyeri içinde hücre konsantrasyonu  $10^9$  -  $10^{10}$  veya daha fazla olacak şekilde sulandırıldıktan sonra Pasteur pipeti ile hazırlanan parafinin yüzeyine damlatılır.





- Süspansiyon damlalarını içeren parafin tabakasının bulunduğu Petri kutusu kapağı fosforpentaoksit içeren cam Petri kutusuna kapatılır ve etrafı pamuklanır.
- Sonra kap fosforpentaoksit içeren bir desikatöre konarak vakum pompası çalıştırılır.



- ◉ Diskler kuruyunca steril pensle bir tübe alınarak  $P_2O_3$  üzerinde yaklaşık 4 °C de muhafaza edilir.
- ◉ Tekrar kültür elde edilmek istendiğinde bir disk alınarak uygun sıvı veya katı besiyerine ekilir.
- ◉ Askorbik asit canlılığı koruyan çok önemli bir maddedir.



f- Sordelli yöntemi:

- 1934 de Sordelli tarafından tarif edilmiştir.
- Bakteri, maya ve küf şeklindeki mantarlar için uygundur.
- M.o.lar cinslerine göre 5-10 yıl canlı kalırlar.
- Küçük tübe bir damla at serumu konarak, içinde muhafaza edilecek m.o. nın süspansiyonu yapılır.

- Küçük tüp büyük bir tübün içine yerleştirilir.
- Büyük tübün alt kısmına fosforpentaoksit, üzerine pamuk konmuştur.
- Burada dikkat edilecek husus süspansiyon damlasının fosforpentaoksit üzerine gelmemesidir.
- Büyük tüp 5-10 dk vakumda tutularak kapatılır.



g- “L-drying” yöntemi:

- ◉ Özellikle liyofilizasyona dayanamayan m.o.lar için uygundur.
- ◉ %10 oranında kaymağı alınmış süt veya herhangi koruyucu madde içeren sıvı içinde yapılan bakteri süspansiyonu tüpü, su banyosu içine daldırılarak vakum pompası ile kurutulur.



- Tüplerin sıcaklığı, süspansiyonun süratle kurumaması fakat donmaması için su banyosu ile kontrol edilir.
- Bakteri, mantar ve virüsler için başarılı olan bir tekniktir.



# MODERN YÖNTEMLER

## 1-Liyofilizasyon:

- Birçok bakteri, cins ve tür özellikleri değişmeden, bu yöntem ile muhafaza edilebilir.
- Bazı bakterilerin 30 yıldan fazla canlı kaldığı bildirilmiştir.
- Bakteriyofajlar ve virüsler bir dereceye kadar bu yöntem ile muhafaza edilebilir.

- Kf Şeklindeki mantarlar, algler, protozoalar ve memeli hücreleri ile belirli Azobacter, Cytophaga, Saprospira cinsleri ile Spirillum ve Vbrio cinsleri için uygun olmadığı bildirilmiştir.
- Kısa sürede, hafif, nakli kolay, çok sayıda ampul kolaylıkla hazırlandığından kültür koleksiyonları için tercih edilir.





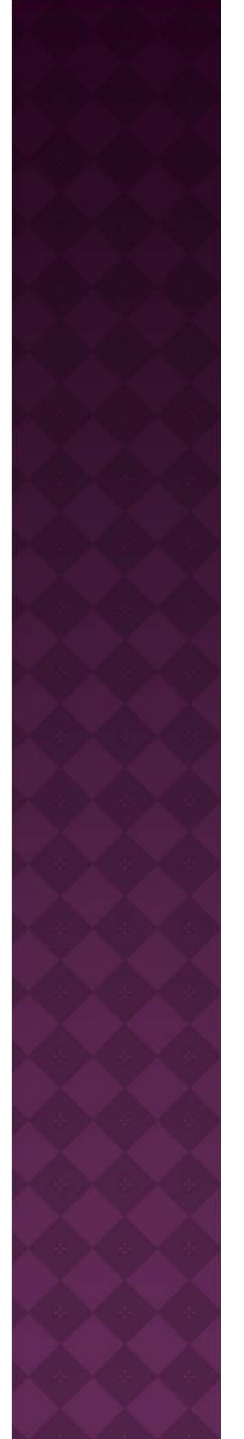
- ⦿ Bu yöntem Şu kademelerde uygulanır:
  1. Bakteri uygun eğri besiyerine ekilir
  2. Kültürün serumlu besiyeri veya kaymağı alınmış süt gibi muhafaza sıvısından süspansiyonu yapılır.
  3. Liyofilizasyon tüplerine süspansiyonu kontamine etmeden ve köpük oluŐturmadan 0,1-0,2 cm<sup>3</sup> konur.



4. Tablaya yerleştirilerek vakumda birinci kurutma yapılır.
5. Pamuk başlıklar içeri itilerek ampuller ince bir boyun kısmı olacak şekilde çekilir.
6. İkinci kurutma uygulanır.
7. Ampuller vakum altında kapatılır.



- Liyofilizasyonun prensibi basittir.
- M.o.lar dondurulduktan sonra buzdaki su vakumda buhar olarak çıkarılır.
- Süspansiyon donduktan sonra kesinlikle sıvı duruma geçmemelidir.
- Bunun yanında muhafaza edilecek hücreler dondurma ve kurutmanın zararlarını önleyecek koruyucu özellikteki sıvılarda süspanse edilmelidir.



- M.o.lar fazla sayıda üremiş olmalı ve koruyucu süspansiyon sıvısında kolayca süspansiyon yapılabilmelidir.
- Genellikle birkaç agar kültürü yeterlidir.
- Bakterinin üreme dönemi canlılık üzerine etkilidir.
- Logaritmik üreme dönemine geçmiş olan kültürler, aktif üreme dönemindeki kültürlerden daha uygundur. Bu durum bakterinin cinsine de bağlıdır.



- ◉ Genel olarak gram pozitif bakteriler, gram negatif bakterilere karşı liyofilizasyona daha dirençlidir.
- ◉ Fakat uygun süspansiyon sıvısı kullanılırsa gram negatif bakterilerde de canlı kalma oranı yüksek olur.



- *Yersinia pestis*, *Franciscella tularensis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas mallei* ve *Bacillus anthracis* gibi patojen bakterilerin liyofilizasyonunda santrifüj işlemi tehlikelidir.
- Çünkü santrifüj sırasında ampuller kırılabilir ve çevreyi kontamine edebilir.
- Bu nedenle m.o.lar kuru buz içinde eğik durumda kondurulduktan sonra kurutulacağı yere nakledilir.
- Kurutmanın yapıldığı bölmenin sıcaklığı  $-30^{\circ}\text{C}$  den düşük olmalıdır.

## 2. Düşük sıcaklık derecelerinde muhafaza:

- Düşük sıcaklıklarda hücrede metabolizma hızı ve buna bağlı olarak biyokimyasal reaksiyonlar için gerekli enerji ihtiyacı çok azalır.
- Bu durum hücrelerin muhafazasında faydalanılan bir özelliktir.
- Fakat deneyle, korunmamış hücrelerin düşük sıcaklıkta muhafaza ve yeniden ısıtmaya son derece duyarlı olduğunu göstermiştir.
- Bu konuda dikkate değer ilerlemeler donma-erime işleminin mekanizmasına bağlı olarak son 10 yıl içinde yapılmıştır. Muhafaza ısıları  $-70^{\circ}\text{C}$ ,  $-90^{\circ}\text{C}$ ,  $-196^{\circ}\text{C}$  ler olabilir.

- M.o.lar -70 °C ve -90 °C arasında derin dondurucu (deep-freezer) ya da CO<sub>2</sub> karında muhafaza edilebileceği gibi -196 °C de sıvı azot içinde de muhafaza edilebilirler.
- Azot yanmaz ve toksik değildir.
- Bu sıcaklıkta, bakteriler, küf şeklindeki mantarlar, bakteriyofjlar, protozoonlar, algler, bitki, hayvan ve insan hücre ve dokuları uzun süre muhafaza olurlar.





- Bakteriler soğuğa dirençli ve duyarlı olmak üzere ikiye ayrılabilir.
- Büyük çoğunluğu dirençli olmakla beraber Neisseria, Haemophilus gibi cinsler duyarlıdır.
- Bu bakteriler de faz değişikliği olmaksızın süratle düşük sıcaklığa getirildiğinde muhafaza edilebilirler.



- Dondurularak muhafazada hücreler önce 0 °C ye soğutulur.
- Bu safhada bazı bakteriler ölür. Buna soğuk şoku denir.
- Özellikle bazı gram negatif bakterilerde görülmekle beraber gram pozitif bakterilerde de görülür.
- Koruyucu madde (Cryoprotectan) adı verilen maddelerin süspansiyon sıvısına ilave edilmesi ile hücrelerin donup-erimenin oluşturduğu zarara karşı korunduğu gösterilmiştir.

- Canlı hücre hacminin önemli miktarı sudur.
- Düşük sıcaklıkta su sıvı halden katı şekle geçerek buz kristallerine dönüşür.
- Koruyucu madde ilave edilen kültürler yavaş, çabuk ve çok çabuk soğutularak dondurulabilir.
- Yavaş soğutmada buz kristalleri hücrenin içinde değil, yalnız dışında oluşur ve sitoplazma su kaybederek büzülür.
- Oluşan buz kristallerinin büyüklüğü soğuma süresine bağlıdır.



- ◉ çabuk donmada durum farklıdır.
- ◉ Hücresinin su kaybı çok azdır veya hiç yoktur.
- ◉ Bu nedenle de büzülmemiştir.
- ◉ Ayrıca sitoplazma içinde de buz kristalleri oluşur.



- Koruyucu maddeler hücre içine geçebilmelerine göre üç grupta toplanabilir.

geçemeyenler	geçebilenler	belirlenemeyenler
Polivinilpirrolidon (PVP)	Gliserin	Malt özeti
Dekstran, Nişasta	Dimetilsulfoksit (DMSO)	Kaynamış bakteri hücrelerinin özeti
Hidroksietil nişasta (HES)	Etilen glikol	Kan, proteinleri ve serum
Polietilenglikol	Trimetilamonium asetat	Süt, kaymağı alınmış süt
Sukroz, laktoz	Metanol	
Sorbitol, mannitol		
Albumin, jelatin		

- Çeşitli yöntemler:M.o.lar canlılıklarını hücrelerde veya deney hayvanlarında da sürdürebilirler.