

## Liyofilizasyonda Kullanılan Farklı Kriyoprotektantların *Salmonella typhimurium* Üzerine Etkisi

Ahmet Koluman, Sibel Özkök, Zeynep T. Burkan

Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı, Mikrobiyoloji Bölümü, Fatih Sultan Mehmet Bulvarı No:70, 06170, Yenimahalle, Ankara

Geliş Tarihi (Received): 09.11.2012, Kabul Tarihi (Accepted): 10.12.2012

M Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): [ahmetkoluman@hotmail.com](mailto:ahmetkoluman@hotmail.com) (A. Koluman)

☎ 0 312 327 41 81 📠 0 312 327 41 56

### ÖZET

Liyofilizasyon uzun süreli saklamada uygulanan bir yöntemdir. Farklı kimyasal ve çözeltiler liyofilizasyon sonrası suşların maksimum canlandırılması amacıyla kullanılmaktadır. Sakkaroz ve yağsız süt tozu en yaygın kullanılan ajanlardır. Reagent 18 genellikle farklı kültür koleksiyonlarında kullanılmaktadır. Bu çalışmada farklı kriyoprotektanlar (hücre çekirdeğini soğuktan koruyan maddeler) kullanılarak *S. typhimurium* liyofilize edilmiş ve suşun stabilitesi değerlendirilmiştir. Sonuçlar Reagent 18'in *S. typhimurium* suşlarının saklanması için etkili olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Salmonella, Liyofilizasyon, Kriyoprotektant, Reagent 18

### Effect of Different Cryoprotectants on *Salmonella typhimurium* during Freeze Drying

#### ABSTRACT

Freeze drying is a sophisticated way for long term storage of bacteria. Different chemicals and solutions are used to reach maximum recovery of strains after freeze-drying. Sucrose and skim milk are popular reagents that are massively used. Reagent 18 is widely used in different culture collections. In this study, different combinations of cryoprotectants are used for freeze-drying *S. typhimurium*, and stability of the strain was evaluated. The results showed that Reagent 18 is effective during the storage of freeze-dried *S. typhimurium* strains.

**Key Words:** Salmonella, Freeze drying, Cryoprotectant, Reagent 18

#### GİRİŞ

Biyçeşitlilik ve genetik varyasyonların farkındalığı ile bilim insanları kültür koleksiyonları yapmaktadır. Bu kapsamda yapılan bakteri kültür koleksiyonlarının sayısı günden güne artmaktadır [1]. *Salmonella* kültürleri birçok amaçla saklanabilmektedir; epidemiyolojik sürveyans verisi, antimikrobiyal dirençlilik, genotiplendirme ve diğer farklı amaçlar gözetilmektedir [2, 7].

Kültür koleksiyonları yaygınlaştıkça bakterilerin uzun süreli saklanması konusu çalışmalarda yer almaya başlamıştır. Buna bağlı olarak birçok farklı

kriyoprotektan kullanımı denenmiş ancak her bakteri için aynı kriyoprotektan aynı şekilde cevap vermediği gözlemlenmiştir [1-7]. Genotipik ve morfolojik değişimleri minimize ederek sürekli ilk pasajı ile aynı kalitede üreyebilen mikroorganizmaların saklanması için iki yol vardır: dondurarak saklama veya liyofilizasyon [3, 6].

Farklı kültür koleksiyonlarında farklı kriyoprotektanlar kullanılmasına rağmen liyofilizasyonda bu farklı ajanların kullanımına ait sınırlı veri vardır. Bu çalışma farklı kriyoprotektanların *Salmonella typhimurium* liyofilizasyonu ve sonrasında etkilerini göstermeyi amaçlamıştır.

**GEREÇ ve YÖNTEM**

On farklı *S. typhimurium* kültürü (Tablo 1) ayrı ayrı 500 mL brain heart infusion broth (BHI) içerisine aktararak 37°C 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Zenginleştirme sıvısı santrifüj tüplerine aktararak 5 dakika 3500 rpm santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak pelet 5 mL phosphate buffer saline (PBS) ile homojenize edilmiştir.

Homojenizat yeniden 3500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjü takiben pelet 5000 µL PBS içerisinde sulandırılarak seri dilüsyonlar hazırlanmış ve yayma plak yöntemi ile plate count agarda (PCA) sayım için ekim yapılırken, kontaminasyon varlığı için xylose lysine deoxycholate (XLD) agara çizme plak yöntemi ile paralel ekimler yapılmıştır.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan *Salmonella typhimurium* suşları

ATCC 25241	ATCC 26629	ATCC 51812	ATCC 13311	ATCC 49416
NCIMB 13284	NCTC 74	Tavuk eti izolatı saha suşu	Hindi eti izolatı saha suşu	Alabalık izolatı saha suşu

Beş ayrı kriyoprotektan hazırlanmıştır. Bu amaçla Sakkaroz, Bovine Serum Albumin Fraction V (BSA V) ve Skim Milk steril distile su içerisinde hazırlanarak 0.20 µm por çaplı filtrelerden geçirilerek steril şişelere aktarılmıştır. Reagent 18 hazırlanırken 100 mL

içerisinde 1.5 g trypticase soya broth (TSB), 5 g BSA V ve 1.5 g sakkaroz tartılmış 100 mL içerisinde çözündürülerek 0.20 µm por çaplı filtrelerden geçirilerek steril şişelere aktarılmıştır. Gruplar ve kriyoprotektanlar Tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2. Çalışma gruplarının dizaynı

Grup No	Kriyoprotektan	Grup kodu	Hazırlanan Tüp Sayısı
1	20% Sakkaroz	SC	50
2	20% Sakkaroz + 5% BSA V	SCBSA	50
3	Reagent 18	R18	50
4	20% Skim Milk	SM	50
5	20% Skim Milk + 5% BSA V	SMBSA	50

Tüm gruplarda hazırlanan kriyoprotektanlardan 500 µL liyofilizasyon tüpüne aktararak üzerine 50 µL *S. typhimurium* süspansiyonu eklenmiştir. Tüm tüpler -18°C'de dondurulmuş ve liyofilizatöre aktarılmıştır. Liyofilizasyon ana kurutma işlemi -38°C, 0.028 atm basınç altında gerçekleşmiştir. Kurumayı takiben örneklerin ağız tıpalanarak oda sıcaklığında depolanmıştır.

için 15 tüp alınarak 1000 µL "maximum recovery diluent" (MRD) içerisinde sulandırılarak seri dilüsyonlar hazırlanmış ve PCA'da sayım, XLD'de kontaminasyon bakılmıştır. Sayımlar 3 tüpün ortalaması alınarak kayıt edilmiştir. Suşlar arası farklılıklar Student t testi ile incelenmiştir.

**BULGULAR ve TARTIŞMA**

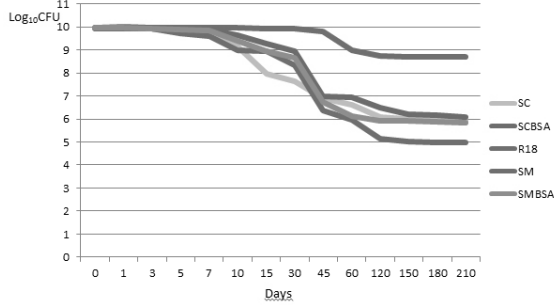
Liyofilizasyonun yapıldığı gün sıfırinci gün kabul edilerek, 1, 3, 5, 7, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 150, 180 ve 210. günlerde her suş için 3 adet olmak üzere, 5 grup

Çalışmanın sonuçları Tablo 3'te özetlenmiştir. Suşlar arası herhangi bir fark tespit edilmemiştir.

Tablo 3. Liyofilizasyonda kullanılan farklı kriyoprotekta nların *Salmonella typhimurium* üzerine etkisi (kob/mL)

Günler	Sakkaroz (20 %)	Sakkaroz (20 %) + BSA V (5 %)	Reagent 18	Skim Milk (20 %)	Skim Milk (20 %) + BSA V (5 %)
Stok kültür	9.99±0.0010	9.99±0.0010	9.99±0.0010	9.99±0.0010	9.99±0.0010
0	9.96±0.0015	9.98±0.0018	9.98±0.0015	9.94±0.0012	9.96±0.0016
1	9.96±0.0018	9.98±0.0015	9.99±0.0013	9.91±0.0011	9.95±0.0014
3	9.93±0.0015	9.97±0.0019	9.98±0.0012	9.91±0.0015	9.92±0.0015
5	9.81±0.0017	9.91±0.0018	9.98±0.0017	9.72±0.0014	9.89±0.0015
7	9.62±0.0014	9.90±0.0014	9.97±0.0012	9.61±0.0014	9.83±0.0017
10	9.15±0.0018	9.65±0.0013	9.97±0.0013	9.00±0.0011	9.38±0.0018
15	7.95±0.0020	9.26±0.0018	9.94±0.0013	8.94±0.0013	8.96±0.0016
30	7.63±0.0021	8.95±0.0017	9.91±0.0011	8.34±0.0012	8.65±0.0013
45	6.89±0.0015	6.99±0.0015	9.81±0.0012	6.38±0.0012	6.72±0.0011
60	6.63±0.0011	6.94±0.0015	9.00±0.0013	5.95±0.0011	6.11±0.0018
120	6.08±0.0013	6.50±0.0013	8.72±0.0014	5.12±0.0018	5.92±0.0011
150	5.98±0.0010	6.20±0.0011	8.71±0.0012	5.03±0.0011	5.90±0.0016
180	5.95±0.0015	6.15±0.0010	8.71±0.0013	5.00±0.0012	5.90±0.0013
210	5.91±0.0013	6.08±0.0010	8.71±0.0012	5.00±0.0010	5.85±0.0014

Yapılan analizlerde Reagent 18'in en yüksek koruma sağladığı ve 1.28 kob/mL azalma ile en az azalmayı gösterdiği tespit edilmiştir. BSA V eklendiğinde sakkarozun etkisi artarken benzer etki SM ve SMBSA'da gözlemlenmemiştir. Bakterilerin liyofilizasyon sonrası stabilizasyonu Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Farklı kriyoprotektanlarla hazırlanan *S.typhimurium* stabilizasyonunun zamana bağlı değişimi

Ray ve ark. [7] skim milk içerisinde dondurma işlemi takiben *Salmonella anatum* suşlarının %70-90'ının zarar gördüğünü bildirmişlerdir. Sulandırmayı takiben yaralı hücrelerin deoxycholate içeren besiyerlerinde üreme zorluğu gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışma verileri bizim çalışmamızla uyum içerisindedir. Mackey and Derrick [8] BSA V ile yapılan liyofilizasyonun *S. typhimurium* için daha koruyucu olduğunu bildirmiştir. Simon ve ark. [9] farklı *S. typhimurium* üzerine farklı kriyoprotektanların bir etkisi olmadığını ve bakterilerin izolasyon sırasında gıdadaki adaptasyonlarını kaybedebileceklerini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da suşlar arasında bir farklılık gözlemlenmemiştir. Aynı çalışmada uzun süreli saklama amacıyla BSAV sakkaroz ikilisinin sakarozla göre daha uygun olduğu bildirilmiştir.

Sonuç olarak *S. typhimurium* kültürlerinin liyofilizasyonunda kullanılan farklı kriyoprotektanların canlılıkları üzerine etkisi olduğu ve Reagent 18'in güvenilir bir kriyoprotektan olduğu belirlenmiştir.

## KAYNAKLAR

- [1] Hawksworth, D.L. and Schipper, M.A.A., 1990. Criteria for consideration in the accreditation of culture collections participating in MINE, The Microbial Information Network Europe. *Mircen* 5: 277-281.
- [2] Gams, W., Hennebert, G.L., Stalpers, J.A., Janssens, D., Schipper, M.A.A., Smith, J., Yarrow, D., Hawksworth, D.L., 1988. Structuring strain data for storage and retrieval of information on fungi and yeasts in MINE, the Microbial Information Network Europe. *J. Gen. Microbiol.* 134: 1667-1689.
- [3] Stalpers, J.A., 1990. Structuring strain data for storage and retrieval of information on bacteria in MINE, the Microbial Information Network Europe. *Syst. Appl. Microbiol.* 13: 92-103.
- [4] Anonymous, 1996. European Standard 1619: Biotechnology - large scale process and production -General requirements for management and organization for strain conservation procedures.
- [5] Anonymous, 1996. European Standard EN 829 - Transport packages for medical and biological specimens - requirements, tests. CEN European Committee for Standardization, Brussels.
- [6] Anonymous, 1999. Guidelines for the Establishment and Operation of Collections of Cultures of Microorganisms. 2<sup>nd</sup> Edition. ISBN 92 9109 043 3, Nova Publishers, NY.
- [7] Ray, B., Jezeski, J.J., Busta, F.F., 1971. Repair of injury in freeze-dried *Salmonella anatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 22: 184-189.
- [8] Mackey, B.M., Derrick, C.M., 1982. The effect of sublethal injury by heating, freezing, drying and gamma-radiation on the duration of the lag phase of *Salmonella typhimurium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 243-251.
- [9] Simon, E.M., Stahl, K.L., Wilson, J.B., 1963. Preservation by freeze-drying and the stability of virulence of *Salmonella typhimurium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 11: 371-376.