

MANTAR STOK KÜLTÜRLERİNİN ÜÇ FARKLI YÖNTEMLE SAKLANMASININ KARŞILAŞTIRILMASI*

Ayhan YÜCEL, A. Serda KANTARCIOĞLU

▼	Giriş
▼	Yöntem-Gereç
▼	Bulgular
▼	Tartışma
▼	Özet
▼	Kaynaklar

Background and Design.- The storage and maintenance of stock-culture collection of fungi serves to research and educational functions of specialized mycology laboratories. Several methods have been proposed for maintaining culture collections of fungi. In this study a general collection of stock cultures consisting of several hyaline, dematiaceous molds, dermatophytes and dimorphic primary pathogens and yeasts and yeast-like fungi has been stored at room temperatures and in a refrigerator and in a deep freezer for three years by frequent subculturing.

Results.- 170 of 216 strains maintained at +4°C, 18 of 212 strains maintained at +20°C and 105 of 154 strains kept in -20°C survived the entire three year period. Both of the two methods maintain the original characters of the strains and require approximately equal time, equipment, material and space. The room temperatures storage method has been eliminated due to the risk of mit contamination.

Conclusion.- Keeping stock cultures at +4°C appears to be the most convenient method for our laboratory conditions and also the composition of our actual collection.

Yücel A, Kantarcıoğlu AS. Comparison of three conservation method for stock fungus cultures. *Cerrahpaşa J Med* 2000; 31 (1): 7-15.

GİRİŞ ▲

Mantar kültür koleksiyonlarının, mikoloji, mikrobiyoloji, epidemiyoloji, biyoloji.. ve diğer doğa ve sağlık bilimleri alanlarındaki araştırmada önemli bir rolü bulunmaktadır.¹ Mikoloji araştırma laboratuvarlarında çeşitli mantarların tipik ve atipik kökenleri hem araştırma hem de eğitim amacıyla saklanmaktadır.² Çeşitli laboratuvarlar da yapacakları çalışmalar için yeterli sayıda standart ve çalışma kökenlerini saklamak zorundadırlar.

Mantarların saklanması için genelde bakterilerin saklanması yöntemleri uygulanırsa da bunlar için göz önünde bulundurulması gereken özel noktalar da vardır. Söz gelimi bir çok mantar liyofilleyerek saklamaya elverişli değildir, yine mantarlarda yozlaşma sık rastlanılan bir olaydır.

Mantarların saklanması için çeşitli yöntemler önerilmiştir; bunlar arasında steril distile suda, toprakta, madeni yağla kaplanmış eğri agar besiyerlerinde, -20°C ve -70°C'lerde, eğri agara düzenli aktarım ile, sıvı nitrojende ve liyofilleyerek saklama yöntemleri sayılabilir.²⁻¹⁰

Laboratuvarımızda 1996 yılından beri çeşitli standart mantar kökenleri ve doğadan ve hasta materyalinden ayırarak tanımladığımız değişik cinslerden mantarlar canlı olarak saklanarak bir koleksiyon yapılmaktadır. Bilindiği gibi bu kökenlerin saklanması kolay olmamaktadır. İşte bu bakımdan harcanan zaman ve enerji, besiyeri, saklama koşulları ve malzeme gibi düşünülüp hesaplanacak etmenlerle her laboratuvarca uygun olan saklama şeklini belirlemek amacıyla yöntemler arasında karşılaştırmalı deneylerin yapılması gerekmektedir. Bu düşünceyle koleksiyonumuzda bulunan mantarlardan bir kısmı farklı 3 saklama koşulunda 3 yıl boyunca bekletilmiş ve bulgular yazılıp değerlendirilerek bildirilmiştir.

YÖNTEM VE GEREÇLER ▲

Koleksiyonumuzun yapısına ve laboratuvarımız koşullarına uygun saklama yönteminin belirlenebilmesi amacıyla 3 yıl süre ile (1996-1999) izlenmek üzere bir çalışma planlanarak yürütülmüştür. Çalışmamızda çeşitli doğal ve klinik materyalden ayırarak laboratuvarımızda tanımladığımız toplam 216 köken $+4^{\circ}\text{C}$ 'de ayrıca 212 köken $+20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmış, bunlardan seçilen 154 köken -20°C 'de tutulmuştur. Bu deney grubu içindeki patojen mantarlardan *Pseudallecheria boydii*, *Moniliella acetoabutens*, *Aspergillus fumigatus* ve *A. flavus* kökenleri arasında bir kısmı hasta materyalinden; iki *Histoplasma capsulatum*, bir *Sporotrix schenckii*, iki *Madurella grisea*, bir *Wangiella (Exophiala) dermatitidis* ve bir *Trichophyton verrucosum* kökeni ise çeşitli doğal kaynaklardan ayrılmıştır.

Küf mantarlarını saklama deneyleri: Çalışmamızda küf mantarları üç değişik besiyerinde Czapek Dox Agar (CDA), malt özütü agar (MEA) ve Sabouraud dekstroz agar (SDA) olmak üzere $+4^{\circ}\text{C}$ 'de, SDA besiyerine ekilerek -20°C 'de derin dondurucuda ve ayrıca steril distile suda oda sıcaklığında da saklanmıştır.

$+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklama yöntemi: Saklanan küf mantarları CDA, MEA ve SDA olmak üzere üç farklı eğri besiyerine ekildikten sonra uygun gelişme gösterinceye kadar (genellikle 8 gün, dermatofitler için 20 gün) etüvde uygun gelişme sıcaklıklarında ($25-27^{\circ}\text{C}$) bekletilip kurumayı önlemek için tüplerin ağızları parafilm ile yalıtılmış, etiketlenmiş ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında saklanmışlardır (Şekil 1). Bu kökenler, yozlaşmanın önlenmesi için gelişme faktörlerinin yeknesak sürdürülmesinden kaçınılarak, belirli ve düzenli aralıklarla (yaklaşık altı ayda bir kez) yukarıdaki besiyerlerine sırasıyla ekilerek sürdürülmüşlerdir.

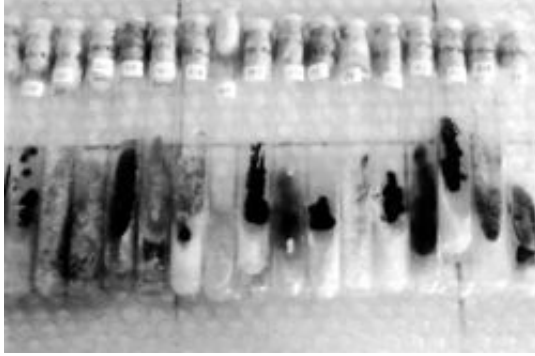


Şekil 1. $+4^{\circ}\text{C}$ 'de canlı olarak sakladığımız mantar kültürlerinden bir grup

Canlılığın ve heterotallik teleomorf cinslerde eşeyli şeklin sürdürülmesinin, saflık ve yapı değişimini olup olmadığının kontrolü amacıyla kökenlerimizin belirli aralıklarla eğri SDA besiyerine pasajları alınmış, pamuk mavili laktofenol ile preparat yapılarak mikroskopta incelenmiştir.

-20°C 'de saklama yöntemi: Ağız burgulu tüplerin dip kısmında bolca besiyeri bulunacak şekilde eğri olarak katılaştırılmış SDA besiyeri kullanılmıştır. Saklanan küf mantarlarının 6

ayda bir kontrol yapmak üzere, üç yıllık izleme süresi dikkate alınarak 6'şar pasajı yapılmış, etiketlenmiş, uygun gelişme gösterinceye kadar (genellikle 8 gün, dermatofitler için 20 gün) etüvde uygun gelişme sıcaklıklarında bekletildikten sonra kurumayı önlemek için tüplerin ağız kısımları parafilm ile yalıtılmış ve -20°C 'de dondurulmuştur (Şekil 2). Dondurma işlemi için Philco derindondurucudan (-20°C) yararlanılmış, zaman zaman kabin içi sıcaklığı bir cıvalı termometre yardımıyla da kontrol edilmiştir. Belirli ve düzenli aralıklarla (yaklaşık 6 ayda bir) tüplerden biri alınarak oda ısısında bekletilmiş, çözüldükten sonra tüpteki eğri SDA besiyerine pasaj yapılarak etüvde uygun gelişme sıcaklığında bekletilmiş ve canlılığı ve heterotallik teleomorf cinslerde eşeyli şeklin sürdürülmesi kontrol edilmiştir.



Şekil 2. -20°C 'de canlı olarak sakladığımız mantar kültürlerinden bir grup (SDA besiyeri)

Steril distile suda saklama yöntemi: 16 mm'lik steril deney tüplerinde bulunan Ph 7'ye ayarlanmış 5 ml steril distile suda yararlanılmıştır.³ Eğri SDA besiyerinde uygun gelişme göstermiş olan küf kolonilerinden steril mantar iğnesi ile yaklaşık 2x2 mm kadar madde alınmış, aseptik şartlarda distile suya geçirilmiştir. Tüplerin ağızları pamuklandıktan sonra buharlaşmayı engellemek üzere parafilm ile yalıtılmıştır. Özel ısı dolapları kullanılmaksızın ekimler yaz kış aynı odada oda sıcaklığında ($+20^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$) tutulmuştur.

Maya ve mayamsı mantarları saklama deneyleri: Mayalar SDA besiyerinde $+4^{\circ}\text{C}$ 'de ve ayrıca steril distile suda oda sıcaklığında ($20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) belirli ve düzenli aralıklarla eğri SDA besiyerine pasaj alınarak saklanmıştır.

Dimorfik mantarları saklama deneyleri: Koleksiyonumuzda bulunan iki adet *Histoplasma capsulatum* ve bir adet *Sporotrix schenckii* kökenlerinin miselli şekilleri diğer küflerde olduğu gibi ve maya şekilleri de eğri SDA ve kanlı sistenli (BGC) besiyerinde sürdürülmektedir (Şekil 3 ve 4). *H. capsulatum* kökenlerinin sporlanmayı sürdürmeleri için ayrıca gliserol laktöz agardaki kolonileri de saklanmaktadır.



Şekil 3. $+4^{\circ}\text{C}$ 'de canlı olarak sakladığımız *Histoplasma capsulatum* miselli (saprofit faz) kolonileri (GLA besiyerinde)



Şekil 4. +4°C'de canlı olarak sakladığımız *Histoplasma capsulatum* maya (patojen faz) kolonileri (BCG besiyerinde)

BULGULAR ▲

Cinslere ve saklama yöntemine göre ayrı sütunlar halinde, deneye alınan köken sayısı/canlılığını sürdüren köken sayısı verilerek sonuçlar Tablo I'de sunulmuştur. Mantar cinsleri alfabe sırasına göre yazılmış, ilgili teleomorf cinsler bu sıraya uymamakla beraber anamorfunun arkasından verilmiştir.

Tablo I. Mantar Kökenlerinin Saklama Deneyi (1996-1999 arası) Sonuçları

Cins/tür	4°C	-20°C	+20°C	Cins/tür	4°C	-20°C	+20°C
<i>Acremonium charticola</i>	2/1	2/0	2/--	<i>Memmoniella echinata</i>	2/1	2/1	2/--
<i>Acremonium sp</i>	3/3	3/2	3/--	<i>Microsporum canis</i>	5/4	4/3	4/--
<i>Alternaria alternata</i>	5/3	5/2	5/--	<i>Monascus ruber</i>	1/0	--	1/--
<i>Alternaria sp</i>	1/1	1/1	1/--	<i>Monilia sitophila</i>	2/1	--	2/--
<i>Pleospora sp</i>	1/1	--	1/--	<i>Moniliella acetoabutens</i>	1/1	1/1	1/1
<i>Aureobasidium pullulans</i>	4/3	4/1	4/--	<i>Mucor sp</i>	3/2	3/0	3/--
<i>Aspergillus citrisporus</i>	1/1	1/1	1/--	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	18/12	--	18/--
<i>A. conjunctus</i>	1/1	1/1	1/--	<i>P. brevicatum</i>	3/3	3/2	3/--
<i>A. flavus</i>	2/2	2/2	2/--	<i>P. citrinum</i>	3/2	3/3	3/--
<i>A. fumigatus</i>	2/2	2/2	2/--	<i>P. corylophilum</i>	6/6	6/5	6/--
<i>A. glaucus</i>	1/1	1/1	1/--	<i>P. decumbens</i>	1/1	1/1	1/--
<i>A. janus</i>	3/3	3/2	3/--	<i>P. digitatum</i>	1/1	1/1	1/--
<i>A. niger</i>	5/5	5/5	5/--	<i>P. fellutanum</i>	2/1	2/1	2/--
<i>A. ochraceus</i>	1/1	1/1	1/--	<i>P. glabrum</i>	1/1	1/1	1/--
<i>A. oryzae</i>	2/1	--	2/--	<i>P. hirsutum</i>	4/1	4/3	4/--
<i>A. parasiticus</i>	2/2	2/2	2/--	<i>P. notatum</i>	3/2	3/1	3/--
<i>A. ustus</i>	3/3	3/3	3/--	<i>P. restrictum</i>	2/2	2/1	2/--
<i>A. versicolor</i>	4/3	4/2	4/--	<i>P. simplicissimum</i>	1/1	1/0	1/--
<i>A. wentii</i>	2/2	2/2	2/--	<i>Eupenicillium alutaceum</i>	3/2	2/2	3/--
<i>Emericella nidulans</i>	1/1	1/1	1/--	<i>Eupenicillium sp</i>	6/5	1/1	6/--
<i>Neosartoria fischeri</i>	2/2	2/2	2/--	<i>Talaromyces wortmannii</i>	2/0	2/0	2/--
<i>Aspergillus sp</i>	10/8	10/7	10/--	<i>Rhizoctonia sp</i>	1/0	--	1/--
<i>Botrytis adada</i>	1/0	--	1/--	<i>Rhizopus stolonifer</i>	3/1	--	3/--
<i>Byssochlamis fulva</i>	1/1	--	1/--	<i>Scedosporium apiospermum</i>	1/1	--	1/--
<i>Candida albicans</i>	8/8	--	8/8	<i>S. inflatum</i>	1/1	1/1	1/--
<i>C. guilliermondii</i>	1/0	--	1/0	<i>Scopulariopsis fusca</i>	1/0	1/1	1/--
<i>C. kefir</i>	1/1	--	1/1	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1/1	--	1/1
<i>Cladosporium macrocarpum</i>	1/0	1/0	1/--	<i>Sepedonium sp</i>	1/1	--	1/--
<i>C. sphaerospermum</i>	1/1	1/0	1/--	<i>Sporotrix schenckii</i>	1/1	1/0	1/--
<i>C. barberum</i>	2/1	2/0	2/--	<i>Stemphylium sp</i>	1/1	1/0	1/--
<i>Cladosporium sp</i>	4/4	4/4	4/--	<i>Trichosporon cutaneum</i>	1/1	--	1/1
<i>Micosphaerella sp</i>	1/1	1/1	1/--	<i>Tricophyton mentagrophytes</i>	10/9	7/5	7/--
<i>Chaetomium sp</i>	1/0	1/0	1/--	<i>T. mentagrophytes var. ment.</i>	2/2	2/2	2/--
<i>Cryptococcus neoformans</i>	6/4	--	6/4	<i>T. mentagrophytes var. interdig.</i>	1/1	1/1	1/--
<i>Curvularia sp</i>	1/0	1/0	1/--	<i>T. erinacea</i>	1/1	1/0	1/--
<i>Epidermophyton floccosum</i>	1/1	1/1	1/--	<i>T. rubrum</i>	8/8	8/6	8/--
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	2/2	2/2	2/--	<i>T. tonsurans</i>	2/2	2/1	2/--
<i>Fusarium oxysporum</i>	1/0	1/1	1/--	<i>T. verrucosum</i>	2/2	2/2	2/--
<i>Fusarium poae</i>	1/1	1/1	1/--	<i>T. violaceum</i>	2/2	2/1	2/--
<i>Fusarium sp</i>	1/1	1/1	1/--	<i>Ulocladium chartarum</i>	1/1	1/1	1/--
<i>Geotrichum candidum</i>	3/2	3/1	3/--	<i>Ulocladium sp</i>	1/1	1/0	1/--
<i>Galactomyces candidum</i>	1/1	--	1/--	<i>Wangiella dermatitidis</i>	1/1	1/0	1/--
<i>Histoplasma capsulatum</i>	2/2	2/2	2/--				
<i>Humicola grisea</i>	1/1	1/1	1/--				
<i>Madurella grisea</i>	2/1	2/2	2/--				
<i>Malassezia furfur</i>	1/0	--	1/0				
				Toplam köken sayısı	216/170	154/105	212/18

Sütunlardaki taksimli rakamlardan ilki deneyin başlangıcında saklamaya alınan toplam köken sayısını, ikincisi üç yıl sonunda canlılığını sürdüren köken sayısını ve (-) işareti kökenlerin deney dışı bırakıldığını göstermektedir.

Tablo I'in incelenmesinden görüleceği gibi +4°C'de saklanan toplam 216 kökenin 170'i (%78.7) üç yıllık deney sonucunda canlılığını sürdürebilmiş, eksilenlerin birçoğu (%21.3) zaman içinde pamuklarının *Aspergillus* türleri ile kontamine olması sebebiyle atılmıştır. Metabolizmaları yavaşlatılmış durumda sakladığımız bu kökenler esas besin maddeleri gereksinimlerinin karşılanabilmesi amacıyla ardaşık olarak çapraz ekim yapılarak sürdürülmüş olduğundan bu besiyerlerindeki durumun karşılaştırılması amaçlanmamış ve yapılmamıştır.

Metabolizmaları durgun olarak SDA besiyerinde -20°C'de saklanan toplam 154 kökenin ise 105'i (%68.2) üç yıllık deney sonucunda canlılığını sürdürebilmiş, diğerleri ise pasaj alındığında ürememiştir. Bu durumda cins ve türlere göre değişen belirli bir özellik gözlemlenememiştir. +4°C ve -20°C'de saklanan kültürlerin hiç birinde bakteri kontaminasyonu ile karşılaşmamıştır.

Uzun süre oda sıcaklığında distile suda bekletilmiş olan kökenlerimiz, buldukları tüplerin pamuklarının ilk yılın mayıs ayından sonra akarların

istilasına uğradıkları görüldüğünden değerlendirme dışı bırakılmıştır. Bu deney grubundaki toplam 212 kökenden sadece 18'i (%8.5) üç yıl boyunca sürdürülebilmiştir.

TARTIŞMA ▲

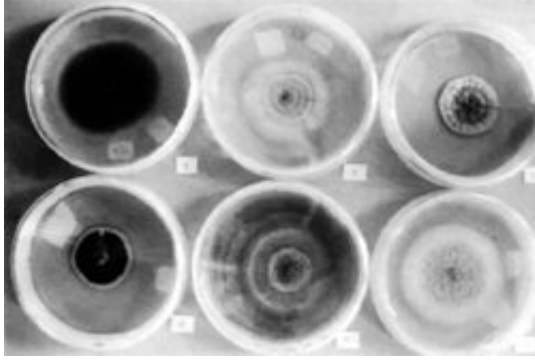
Üç yıllık deneyimizin sonuçlarına göre düzenli aralıklarla pasajı alınmak koşuluyla küf mantarlarının +4°C'de saklanması daha yoğun emekli bir teknik olmakla birlikte daha iyi sonuç verdiği; buna karşın -20°C'de olasılıkla bir kısmının ısı şokuna uğradığı ve dolayısıyla pasajlarının gelişmediği gözlemlenmiştir. Bilindiği gibi mayaların dondurulması durumunda ilk anlarda çok sayıda hücrenin ısı şokuna uğrayarak öldükleri, çok azının canlı kalabildiği, bunların uygun eğri agar besiyerlerinde ve sık sık pasaj yapılmak suretiyle oda sıcaklığında saklanması daha uygun olduğu bildirilmiştir.¹³ Diğer yandan yakın zamanlarda maya mantarlarının, özellikle *Candida*'ların -20°C'de dondurularak saklanması için içi boncuklu tüpler ticarete bulunmakta ve halen laboratuvarımızda da denenmektedir. Lodder'in besiyeri ortamındaki dondurma yöntemine karşılık boncuklu tüplerde maya inokulumu karıştırıldıktan sonra içindeki atılmakta ve maya kuru ortamda dondurulmaktadır. Kuru ortamda dondurulmanın mayaların donmaya karşı direncine olumlu etkisi olup olmadığı henüz laboratuvarımızda çeşitli patojen ve saprofit maya kökenleri kullanılarak araştırılmaktadır. Bu noktada, deneylerimizde maya cinslerinin de önem taşıdığı gözlemlenmiştir. Söz gelimi *Candida*'ların ve özellikle *C. albicans*'ın saklanması daha sorunsuzken, *Cryptococcus*'lar daha fazla özen gerektirmekte, bunlar içinde doğadan ayırılmış olduklarımızın canlı tutulmaları çok zor olmaktadır. Cinsler içinde türler de kendi fizyoloji gereksinimlerine göre özellikler gösterebilmektedir.

Günümüzde mantar kültürleri için saklama yöntemleri üç genel tipte toplanabilir:

- (i) Metabolik aktivitenin normal hızda sürmesine olanak veren koşullarda saklama biçiminde kültürler besleyici bir besiyerinde optimum gelişme sıcaklıklarına yakın ortamlarda ve sık aralıklarla pasaj yapılarak saklanmaktadır.
- (ii) Metabolik aktivitenin kısıtlandığı koşullarda saklama biçiminde ya klasik usulde kültürler eğri agar besiyerlerinde 4-10°C'de gerekirse maden yağlarla örtterek veya sporları steril toprağa dağıtarak saklanmaktadır.
- (iii) Metabolik aktivitenin hiç olmadığı koşullarda saklama biçiminde liyofilizasyon, kurutarak dondurma vb teknikler kullanılmaktadır.

Bu yöntemlerin hepsi canlılığı sürdürmeye hizmet ederler ancak ilk yöntemin büyük koleksiyonlar için zaman alıcı olduğu; ikincinin pasajların daha uzun aralıklarla yapılmasına olanak verdiği, ancak kökenlerde varyasyona yol açıp açmadığının kuşkulu olduğu; üçüncünün ise çekirdek bölünmesini olanaksız kıldığı için teorik olarak en iyi yöntem olabileceği öne sürülmüştür.^{4,7,14} Çalışmamızda saklanan küf mantarlarının tanıma hizmet eden fenotipik özelliklerini korudukları ve koleksiyonumuzdaki teleomorf cinslere dahil

olanların da bu özelliklerini sürdürdükleri gözlemlenmiştir.



Şekil 5. Ölü kültür koleksiyonumuzdan bir grup *Aspergillus sp.* kültürleri (SDA besiyeri)

Daha önceki bir çalışmamızda ayırdığımız çok sayıdaki çeşitli saprofit mantarların makroskopik ve mikroskopik özelliklerini koruyarak daha sonraki çalışmalarımızda kullanılacak bir seri karşılaştırma materyali oluşturmak amacıyla, Yücel tarafından geliştirilmiş olan bir yöntemle¹¹ ve timol yardımıyla¹⁵ ölü kültür koleksiyonu (Şekil 5) ve daimi preparat koleksiyonu ile arşiv fişleri oluşturulmuştur. Bir Türk-Japon ortak çalışması kapsamında 1998 ve 1999 yıllarında mikrobiyoloji kısmını üstlenerek yürüttüğümüz Gordion MM Tümülsü'ndeki çalışmamızda ayırdığımız kökenlerin tanımında da bu birikimden yararlanılmıştır.¹² Canlı saklanan kültürlerin de geriye dönük araştırma yapma olanağı vermesi önemlidir ve referans laboratuvarları ile büyük mikoloji laboratuvarlarında kendi ilgi alanlarına yönelik kökenler saklanmaktadır. Söz gelimi filogenetik olarak *C. albicans* ile yakından ilgili olduğu, ancak genom organizasyonunun belirgin olarak farklı olduğu ve *Candida* cinsi içerisinde ayrı bir taksonomik grup oluşturduğu 1995'de bildirilen *Candida dubliniensis* ile ilgili olarak geriye dönük olarak yapılan çalışmalarda bu kökenlerin kültür koleksiyonlarında yanlış tanımlanmış kökenler halinde bulunduğu ilişkin çalışmalar yayınlanmaktadır.¹⁶⁻¹⁹

Bazı mantarlar liyofilleme işlemi sırasında öldüklerinden 1970'lerde American Type Culture Collection (ATCC)'da daha uzun süre yüksek canlı kalma oranı sağlayan sıvı nitrojenden yararlanılmaya geçilmiştir. Mantarları dondurmak için de çeşitli yöntemler tarif edilmiş, koruyucu olarak gliserolden yararlanma önerilmiştir; hızlı bir şok ile dondurmanın yavaş dondurmaya göre daha uygun olduğu bildirilmiştir.² Kaynağında belirtildiği üzere⁴ Barnhart ve Terry *Neurospora crassa* konidileri ile yaptıkları çalışmada dondurma ve eritme hızlarının önemli olmadığını yazmışlardır.

İlk kez Castellani tarafından önerilmiş olan distile suda saklama yönteminin *Candida albicans* kültürlerinin saklanmasıdaki yararı kürsümüzde incelenmiş, pH 7'deki distile suya ekilen 23 kökenin 16 ay sonra yapılan kontrollarda canlı kaldıkları saptanmıştır.¹⁰

Castellani'nin su kültürlerine karşılık Benedek mikroskopik mantarlarla çalışanlar için klorallaktofenol ile geliştirdiği alternatif bir yöntem önermiştir.⁹

Odds, çoğu *Candida albicans* olmak üzere 1583 maya kökenini steril distile suda 1-18 yıl saklayabildiğini, bu mayaların 5 yıl sonraki canlılık oranının, 10 yıl sonra %96 olduğunu bildirmiştir. *C. guilliermondii* ve *C. parapsilosis* kökenlerinin tümünün suda saklandığında canlı kaldığını da belirtmiştir.⁶

Diğer taraftan, 64 ektomikorhiza ve bitki patojeni simbiyotik mantar kökenini steril distile suda soğuk ortamda (+5°C) saklamayı deneyen Marx ve Daniel bir-üç yıl gibi değişik sonuçlar elde etmişler, aynı sıcaklıkta eğri agarda dört-altı ay saklayabilmişlerdir.⁴

McGinnis, Padhye ve Ajello hifli mantarlar, mayalar ve bazı aerop aktinomisetlerden oluşan 66 cinse dahil 147 türü steril distile suda oda sıcaklığında saklamayı denemişler; çoğunun 12-60 ay canlı kalabildiğini, bu yöntemin basit, ucuz ve güvenilir olduğunu bildirmişlerdir.²⁰

Dermatofitlerin uzun süre tekrarlayan pasajlarla saklanması halinde sporlanmayı azalttıkları, yozlaşma şekillerinin ortaya çıktığı; liyofillemeye dayanmadıkları, bu gibi sakıncaları önlemek için insan plasmasında, sütte saklama yöntemlerinin denendiği bilinmektedir. Burgulu tüplerde eğri patates dekstroza agarda 18°C'de yılda bir kez pasaj olarak saklamayı deneyen Kramer ve Mix 451 kökenin 351'ini bir yıl, 65'ini iki yıl saklayabilmişler, ancak birkaçının üç yıl yaşadığını bildirmişlerdir.⁷ Ayrıca esasen zayıf sporlanan mantarlar olan ve SDA ve PDA gibi rutin besiyerlerinde düzenli olarak sporlanmadıkları bilinen *Trichophyton concentricum*, *T. gallinae*, *T. megninii*, *T. verrucosum*, *T. violaceum*, *T. schoenleini*, *T. yaoundii*, *Microsporum ferrugineum*, *Madurella mycetomi* ve *Paracoccidioides brasiliensis*'in suda saklama yöntemiyle canlı kalamadıkları ancak dondurularak daha iyi sonuç alındığı bildirilmiştir.²⁰ Bu durum çalışmamızda -20°C'de elde ettiğimiz sonuçlarla da uyumludur.

Mikroorganizma kültür koleksiyonlarının doğal kaynaklardan ayrılmış kökenler içermesinin bilimsel araştırmalara karşılaştırmalı boyutlar kazandıracağı ve bu koleksiyonların temelini sistematığın oluşturduğu, modern sınıflandırma sistemlerine göre açık tanımlarının yapıldıktan sonra etiketlenerek koleksiyona katılmaları gerektiği öne sürülmüştür.²³ Koleksiyonumuzu oluşturan mantar kökenleri de bu esaslara uygun olarak tanımlandıktan sonra numaralandırılarak etiketlenmekte ve kayıt edilmektedir.¹¹

Dematiaceous mantarların, dermatofitlerin ve *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis* ve *Sporotrix schenckii*'den oluşan sistemik patojen mantarların düzenli aralıklarla eğri agarda geliştirilerek saklanması çeşitli sporlanma güçlükleri bulunduğu bildirilmiştir.² 1996 yılında elde ederek halen laboratuvarımızda patojen ve saprofit şekillerini canlı olarak sakladığımız iki *H. capsulatum* ve 1998'de elde ettiğimiz bir *S. schenckii* kökenlerimizin bu olasılıktan korunması için belirli zaman aralıklarıyla gliserol laktöz agar besiyerine pasajları alınmaktadır. Benzer şekilde çeşitli cinslere dahil dematiaceous mantar kökenlerimizin varlığı da halen SDA, CD ve MEA besiyerlerine çapraz

ekimlerle sürdürülmektedir. Bunlardan teleomorf olanların da teleomorf özelliklerini korudukları gözlemlenmiştir.

Pasarell ve McGinnis, çeşitli küf, maya, aerop aktinomisetler ve alglerden oluşan bir koleksiyonu -70°C'de "metabolik olarak inaktif durumda" saklamayı denemişler, organizma cinslerine göre 6 ay ile 13 yıl arasında değişen canlı kalma süreleri saptamışlardır. Bu sıcaklıkta saklayamadıkları mantarların *Alternaria alternata*, *Apophysomyces elegans*, *Bipolaris specifera*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cokeromyces recurvatus*, *Coremiella cubispora*, *Cryptococcus ater*, *Curvularia sp*, *Exerohilum türleri*, *Filobasidium floriforme*, *Madurella mycetomatis*, *Mycelia Sterilia*, *Penicillium marneffeii*, *Pseudomicrodochium sp*, *Saksanea vasiformis* ve *Sporotrix sp* olduklarını bildirmişlerdir.²¹

Kendi amaçlarına uygun çeşitli projelerde kullanılmak üzere 1940'larda başlatılan Pfizer mikrop kültür koleksiyonu da bugün farklı kaynaklardan toplanmış olan yaklaşık 60.000 mantar, aktinomiset ve gerçek bakteri kökenini kapsamaktadır. Bunların yarısının kuru buz (freeze-drying) metoduyla, yarısının da -80°C ve -140°C'lerde dondurularak korunduğu bildirilmiştir.²²

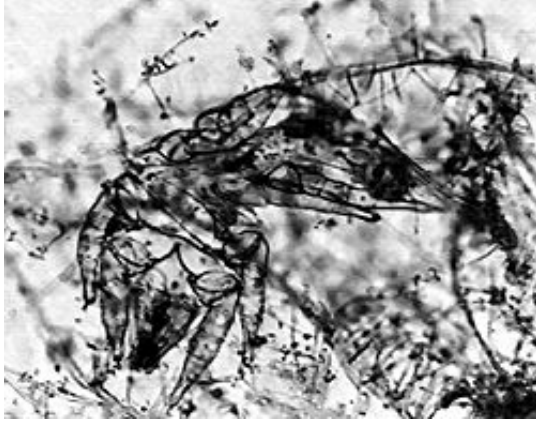
Mikroorganizma kültür koleksiyonlarının doğal kaynaklardan ayrılmış kökenler içermesinin bilimsel araştırmalara karşılaştırmalı boyutlar kazandıracağı ve bu koleksiyonların temelini sistematığın oluşturduğu, modern sınıflama sistemlerine göre açık tanımlarının yapıldıktan sonra etiketlenerek koleksiyona katılmaları gerektiği öne sürülmüştür.²³ Koleksiyonumuzu oluşturan mantar kökenleri de bu esaslara uygun olarak tanımlandıktan sonra numaralandırılarak etiketlenmekte ve kayıt edilmektedir.¹¹

Sonuç olarak çalışmamızda stok mantar kültürlerinin -20°C'de dondurulmuş olarak saklanması, kökenlerin fenotip ve eşey özelliklerini kaybetmeden uzun süreli olarak canlılıklarını sürdürmelerini sağladığı görülmüştür.

Laboratuvarımızda bu çalışma aşama aşama gittikçe gelişen bir plan halinde sürdürülmektedir. Geçen zaman içerisinde koleksiyonumuza birçok başka küf ve maya kökenleri daha eklenmiştir ve hatta bu saklama ihtiyacının büyüklüğü bizi pratik ve hesaplı ticari yöntem arayışlarına da sevk etmiştir. Öncelikle bakteriler ve ayrıca bir kısım mayalar için de önerilen yeni bir ticari saklama yöntemi laboratuvarımızda halen deneme aşamasındadır. Boncuklu tüplere yapılan koyuca bir inokulum -20°C'de dondurularak saklanmaktadır. Bu yöntem üretici firma tarafından bir kısım *Candida* türleri için önerilmiştir. Koleksiyonumuzda bulunan *Candida* türleri ile diğer çeşitli cinslere dahil maya ve mayamsı mantarların bu yöntemle canlı olarak saklanabilirliği de araştırılmaktadır.

Koleksiyona alınan kültürler için mantarlar ve bakteriler kirlenici olabildikleri gibi, oda sıcaklığında saklanan küflere akarlar da dadanabilmektedir (Şekil 6). Özellikle mantarlarla kirlenmenin gözle farkedilebilmesi, söz gelimi *Aureobasidium pullulans*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, bazı kara mayalar ile bir kısım dermatofit kültürlerinde bir mantar bulaşması

olunca bunun dimorfizmden ve pleomorfizmden ve yozlaşmadan ayırdelebilmesi genellikle deneyim ve birikime bağlı kalmaktadır. Koleksiyonların hava kaynaklı kirlenmelerden korunabilmesi için mikoloji laboratuvarlarında hava ceryanından kaçınılmalı, ekimler temiz ve standart koşullarda yapılmalı, subkültürlerdeki gelişmeler mutlaka deneyimli mikologlar tarafından izlenmelidir.²



Şekil 6. Mantar kültürü preparatlarında karşılaşılan bir akarcık (x 1700)
(Mikrofotografi: A. Yücel & S. Kantarcıoğlu)

Küçük araknidler olan akarların laboratuvarları istila ederek tüplerin pamuklarını aşip kültürlerle bulaştıkları, yumurtalarını buraya bıraktıkları, koleksiyonları bozdukları, hatta bu sebeple laboratuvarların taşındığı nadir değildir.² Laboratuvarımızda subkültürler stoklara kaldırılmadan önce binoküler mikroskop altında incelenmektedir. Akarlar her zaman günlük temizleme malzemeleriyle yok edilmesi mümkün olmayan canlılardır ve tüplerin pamukları içerisinde bile yuvalanarak uygun nem ve sıcaklıkdaki ortamlarda sürekli üreyebilirler. Gelişme sınırları 8°C-32°C arasında olup optimal sıcaklık 22°C-25°C'dir. Genellikle 7°C-9°C'nin altındaki ortamlarda evrimleri kesilir ancak -1°C-0.5°C arasında da canlılıklarını korurlar. Bunlarla mücadele için ise önerilmiş cıva klorür veya dichlorvos (DDVP) gibi başka zehirli maddeler içeren karışımlar bulunmaktadır ancak bunların insan sağlığına da zararlı olduğu bilinmektedir. Zaman zaman etüvlere ve buzdolaplarına pyrethrin püskürtülmesi de önerilmektedir. Ancak bu kimya maddeleri akarları kontrol etmekle beraber yumurtalara etkisizdirler.^{2,24}

Mantar kültürlerinin saklanması koleksiyonu oluşturan cinsler ile kökenlerin korunması düşünülen özellikleri (morfoloji, virülens..) ayrıca laboratuvar ve eğitimli eleman olanakları göz önünde bulundurulmalı, koşullar elverdiği ölçüde birden çok yöntemle stoklar yedeklenmelidir.

ÖZET ▲

Çeşitli araştırmalar sırasında ayrı ayrı tanımladığımız hava ve toprak kaynaklı 37 cins dahil 230'un üzerinde farklı tür fırsatçı küf mantarı ile ayrıca çeşitli doğal ve klinik örneklerden ayrılmış olup laboratuvarımızda tanımlanan 208 maya ve 37 dermatofit kökeni 1996-1999 yılları arasında canlı olarak saklanmaktadır. Koleksiyonumuzun yapısına ve laboratuvarımız koşullarına uygun saklama yönteminin belirlenebilmesi amacıyla bir çalışma planlanmış ve

yürütülmüş olup üç yıllık sonuçları sunulmaktadır. Bu çalışmada toplam 216 köken deneye alınmış üç ayrı saklama yöntemi uygulanmıştır. Üç yıl sonunda +4°C'de saklanan 216 kökenin 170'i, +20°C'de saklanan 212 kökenin 18'i ve -20°C'de saklanan 154 kökenin 105'i amaca uygun şekilde korunmuştur. Bizim laboratuvar koşullarımıza ve koleksiyonumuzun yapısına en uygun +4°C'de saklama yöntemi olduğu görülmüştür.

KAYNAKLAR ▲

1. deLEY J. Role of culture collections in fundamental research and diseases control. *Kökem Derg* 1982; 5:1.
2. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. *Medical Mycology*. Philadelphia, Lea and Febinger, 1992; 65-69.
3. Ajello L. Use of mineral oil in the maintenance of cultures of fungi pathogenic for humans. *Arch Dermat Syph* 1951; 63: 747-749.
4. Marx DH, Daniel WJ. Maintaining cultures of ectomycorrhizal and plant pathogenic fungi in sterile water cold storage. *Can J Microbiol* 1976; 22: 338-341.
5. McGinnis MR, Padhye A, Ajello L. Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeasts and some aerobic actinomycetes in sterile distilled water. *Applied Microbiology* 1974; 28: 218-222.
6. Odds FC. Long-term preservation of pathogenic yeasts in water. *J Med Vet Mycol* 1991; 29: 413-415.
7. Kramer CL, Mix AJ. Deep freeze storage of fungus cultures. *Transactions of the Kansas Academy of Science*, 1957; 60: 54-64.
8. Carmichael JW. Frozen storage for stock cultures of fungi. *Mycologia* 1956; 48: 378-381.
9. Benedek T. Fragmenta mycologica on Castellani's "Water cultures" and Benedek's "Mycotheca" in chlorallactophenol. *Mycopathol Mycol Appl* 1962; 17: 255-260.
10. Yücel A, Bilgin S. *Candida albicans* kültürlerinin distile suda saklanması. *Cerrahpaşa Tıp Fak Derg* 1978; 4: 344-346.
11. Yücel A, Kantarcıoğlu S. Müzelerdeki eserlerin bozulmasında mikropların rolü. *Kültür Bakanlığı Yayınları*; 2004. Yayınlar Dairesi Başkanlığı başvuru eserleri dizisi; 47. Ankara, Türk Tarih Kurumu Basımevi, 1997.
12. Yücel A, Kantarcıoğlu AS. Fungal flora of Gordion Tumulus "MM",. First Balkan Conference on Microbiology, (October 5-9, 1999; Plovdiv, Bulgaria) Abstracts, 1999. (Baskıda)
13. Lodder J. *The Yeasts, a taxonomic study*. Amsterdam, North Holland Publ. Co., 1979.
14. Shuh Wei Hwang. Effects of ultra-low temperatures on the viability of selected fungus strains. *Mycologia* 1960; 52: 527-529.
15. Morris GE. Use of thymol as a preservative for fungi. *Arch Dermat Syph* 1943; 67: 514.
16. Odds F, van Nuffel L, Dams G. Prevalence of *Candida dubliniensis* isolates in a yeast stock collection. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2869-2873.
17. Kirkpatrick WR, Sanjay GR, McAtee RK et al. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from Human Immunodeficiency Virus-infected patients in north America by primary CHROMagar candida screening and susceptibility testing of isolates. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3007-3012.
18. Jabra-Rizk MA, Baqui AAMA, Kelley JI, Falkler WA, Merz WG, Meiller TF. Identification of *Candida dubliniensis* in a prospective study of patients in the United States. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 321-26.
19. Yücel A, Kantarcıoğlu AS. *Candida dubliniensis*'in *C.albicans*'dan ayırılması ve antifungal duyarlılık deneyleri. *İnfeksiyon Derg*. 1999. (Baskıda)
20. McGinnis MR, Padhye AA, Ajello L. Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeasts and some aerobic Actinomycetes in sterile distilled water. *Appl Microbiol* 1974; 2: 218-222.
21. Pasarell L, McGinnis MR. Viability of fungal cultures maintained at -70°C. *J Clin*

- Microbiol 1992; 30: 1000-1004.
22. McGinnis MR. Laboratory Handbook of Medical Mycology. San Diego, Academic Press Inc, 1980: 337-410.
 23. Huang LH. Culture collections: Maintaining genetic diversity for the scientific community industrial applications. Sixth International Mycological Congress (IMC-6), Jerusalem, Israel, August 23-28, 1998, [Abstracts]:94.
 24. Hesseltine CW, Bradle J. Further investigations on the preservation of molds. Mycologia 1960; 52: 762-774.
-

- *Anahtar Kelimeler:* Kültür koleksiyonları, Mantarların saklanması; *Key Words:* Culture collections, Storage of fungus cultures; *Alındığı Tarih:* 04 Kasım 1999; Prof. Dr. Ayhan Yücel, A. Serda Kantarcıoğlu: İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; *Yazışma Adresi (Address):* Dr. A. Yücel. İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 34303 Cerrahpaşa, İstanbul.

