

## Küf Koleksiyonlarının Oluşturulması ve Korunumu

Doç. Dr. Şeminur TOPAL

TÜBİTAK - Marmara Bilimsel ve Endü. Araş. Merkezi Gebze/KOCAELİ

### ÖZET

Çeşitli amaçlarla saf küf kültürlerinin uygun koşullarda ve özgün karakterlerini değiştirmeden korunmasını esas alan küf koleksiyonunun varlığı pek çok durum ve kuruluşun çalışmalarına destek sağlayabilir. Bu gerçekten hareketle NATO destekli ve 8 yıl süren Türkiye'de çeşitli tarımsal ürün ve gıdaların tarladan-tüketime kadarki küf floralarının taranmasına yönelik proje çalışmasında izole ve tanımlanmış küflerin bir koleksiyon bünyesinde değerlendirilmesi planlanmıştır. Pek çoğu, önemli dış koleksiyon merkezleri olan CBS-Hollanda ve CMI-İngiltere'deki uzmanların teyidini alan ve identifikasyonları tarafımızdan yapılan 10.000 civarındaki küf izolatından duplikasyon yaratılabilecekleri elemine edilmiş, diğerleri korunuma alınmıştır. Yatık ve liofilize kültürler olarak koleksiyonda bulunan küf suşlarının büyük bir kısmı için sistematik arşivleme çalışması tamamlanmış ve bilgisayar yardımı ile sınıflandırılmıştır. Bu sınıflama mevcut küflerin, izole edildiği örnek cinsi ve kayıt numaralarına, sağlandığı bölgelerin il trafik kod numaralarına, küf kültürlerinin cins ve tür isimlerine, liofilize numaralarına ve koleksiyon odasındaki konumunun yer numaralarına göre olmak üzere 6 ayrı parametre için tek tek yapılarak arşivleme gerçekleştirilmiştir. Ayrıca tanımlanmış küflerin cins ve türlerine göre de kartotekleme işlemi yapılmıştır. Bu çalışmada koleksiyon ve korunumuna ilişkin ayrıntılı bilgiler verilmiştir.

### SUMMARY :

#### ESTABLISHMENT and PRESERVATION of MOULD CULTURE COLLECTION

The presence of an efficient mould culture collection preserved at optimal conditions and at the original characteristics of each mould is of vital importance for research studies of many related institutions. For this purpose, the moulds that were isolated and identified from samples of surveys conducted under the scope of an 8-year NATO-supported project, are being planned for preservation in a standard

culture collection. Around 10.000 mould isolates, after respective required confirmations from CBS-Netherlands and CMI-United Kingdom, have been screened for duplicates and are now taken under preservation. Using slant and lyophilized cultures, these moulds have been systematically archived and classified by the aid of a computer. The archives contain information on the source of moulds, region and city it was collected from, the genus and species, order numbers and location of the mould in the culture collection room. A cross-reference has also been prepared for the genus and species of each mould. More detailed information on these subjects, as well as on the precautionary measures for efficient preservation of the collection, will be presented in this study.

### KÜLTÜR KOLEKSİYONLARI VE ÖNEMLERİ

Sağlıklı ve saf kültürlerin uygun koşullarda, değişikliğe uğramadan ve bozulmadan uzun süreli saklanması önemli bir teknik avantajdır. Bu avantaj özellikle küflerle çalışan laboratuvarlarda ileriki etkinliklere de ışık tutacak doneler özelliği taşıması bakımından iyi değerlendirilmelidir. Ayrıca kurum ve kuruluşlar arası çalışmalarda da işbirliği anlayışı içinde yine kültür koleksiyonlarının önemli hizmetleri söz konusudur. Kültür koleksiyonlarında korumaya alınan kültürlerin özgün karakterleri, seçilen koruma tekniği, amaç ve uygulanan koşullar kültürlerin dayanma sürelerini etkiler. Kültür koleksiyonlarının boyutu ve fonksiyonu değişiktir. Örneğin küçük bir eğitim koleksiyonu, ulusal merkez niteliğinde olandan veya morfolojik ve fizyolojik özelliklerin stabilizasyonun önem taşıdığı taksonomik koleksiyon, genetik stabilitesinin ön planda olduğu endüstriyel koleksiyonlardan ayrı özelliklerin dikkate alınmasını gerektirir. Kültür koleksiyonuna duyulan gereksinime göre, bu hususlar seçilecek koruma tekniğinin belirlenmesi için anahtar faktörler olarak bildirilmektedir (SMITH 1984). Ayrıca ayrılan zaman, para v.b. olanaklar basit ve ucuz yöntem seçimini zorlayabilir. Bu bakımdan söz konusu olanaklar yararlılık ve stabilite ile orantılı ilişkiindedir.

Bir kültür koleksiyonunun temel başarısı aşağıdaki noktalarda özetlenmektedir.

1) Bütün kültürler arzu edildiği sürece canlılıklarını koruyabilmelidir.

2) Her suş saflığını yitirmeden saklanabilmelidir.

3) Kültürlerin koleksiyona ilave edildiği günkü bütün özelliklerini mümkün olduğunca uzun süre koruması sağlanabilmelidir. Diğer bir deyişle mutasyon veya modifikasyona uğramamış olmaları esastır.

Bütün bu koşulların sağlanabilmesi için koleksiyona hangi yöntemle alınacak olursa olsun, kültürlerin optimum gelişmelerini tamamlamış olmaları gerekmektedir. Küfler için optimal gelişmeyi sağlayan faktörler ise, sıcaklık, ışık, su aktivitesi, ortamın besin elementleri, pH ve kullanılabilir oksijen olarak bildirilmekte ve türlere göre bu faktörlerin önemli değişimler gösterdiği ifade edilmektedir. (ONIONS ve ark. 1981).

#### KÜF KOLLEKSİYONUNDA SAKLAMA YÖNTEMLERİ :

Kuruluşların çalışma alan ve amaçları, kültürlerin cins-tür ve suşlarının özellikleri ve eldeki olanaklara göre çeşitli yöntemler kullanılarak küf koleksiyonları oluşturulabilmektedir. Bu yöntemler aşağıdaki gibi özetlenmiştir (SMITH 1984, SMITH ve ONIONS 1983, GAMS ve ark. 1980).

##### 1 — Periyodik transferler yoluyla saklama:

a) Oda sıcaklığında (saklama süresi 1-2 haftadan, 2-6 aya kadar değişebilmektedir)

b) Serin veya soğukta

b<sub>1</sub>) 15-17°C de % 60 bağıl nemdeki odada, 6 aylık transferlerle,

b<sub>2</sub>) 4-7°C deki soğuk odada, 4-8 aylık transferlerle,

b<sub>3</sub>) Deep freezde —17°C, —24°C de, 4-5 yıl süresince özgün yatık ortamlarında saklanabilmektedir.

##### 2 — Mineral yağ altında saklama :

Yatık agar ortamında, sağlıklı üremiş kültürün üzeri 1 cm. yükseklikte sıvı parafin veya 0,830-0,890 gr/cm<sup>3</sup> özgül ağırlıktaki medikal parafin ile kaplanmaktadır. Bu parafin 121°C de 15 dakika otoklav sterilizasyonu ile 2 kez

sterilize edilmiş olmalıdır. 15-20°C de havalandırılmalı odalarda uzun sürelerde (2 yılda bir transferlerle 30 yıl boyunca) saklanabilmektedir.

##### 3 — Toprak veya kumda saklama :

Steril kum ve bahçe toprağına 1 ml. spor suspansiyonu ilave edilip, birkaç gün gelişmeyi takiben soğutucuda (4-7°C de) uzun süreli (10 yıla kadar) muhafaza edilebilmektedir. Özel şişelerdeki kum veya toprak, % 20 oranında nemlendirilmiş ve şişenin 1/3'ü kadar seviyede olmalı, 121°C de 24 saat aralarla 2 kez, 15'er dakika sterilize edilmelidir. *Fusarium* spp. için en uygun yöntem olarak önerilmektedir.

##### 4 — Suda saklama :

Selektif agar ortamında üretilmiş olan küf kültürü 6 mm<sup>3</sup> lük agar kesiti ile birlikte Mc Cartney şişesindeki steril suya atılıp, vidalı kapakla kapatılmaktadır. Bitki patojenleri olan küfler için elverişli bir yöntem olup, oda sıcaklığında 2-3 yıl (bazı sınıflarda 7 yıla kadar) canlılıklarını koruyabildikleri ifade edilmektedir.

##### 5 — Kuru silika - jelde saklama :

Standart (~25 ml.lik) sığağa dayanıklı vidalı kapaklı şişeler 6-22 mesh'lik indikatör olmayan silika jel ile kısmen doldurulup, 180°C de 3 saat süreyle sterilize edilmektedir. Steril silika-jel şişeleri nem çekmemesi için 37°C de desikatörde tutulmakta veya derin dondurucuda özel tepsilerde dondurularak saklanmaktadır. % 5 lik sulandırılmış ve 4°C ye soğutmuş yağsız sütle hazırlanan spor suspansiyonları bu jelle 3/4 oranında ıslatacak şekilde ilave edilmektedir. Karıştırınca kristaller ayrılan kadar (25°C de 10-14 gün) tutulup, kristallerdeki canlılık uygun ortamlarda kontrol edildikten sonra, iyi kapatılmış özel kutularda 4°C de korunmaktadır. Liyofilize halde saklanmaya uygun olmayan küfler dahil, pek çok küf türü için uygun bir yöntem olarak bildirilmekte, bu halde 1-2 yıl (bazı türlerde 7 yıla kadar) canlılığını koruyabilmektedir.

##### 6 — Dondurarak kurutma (liyofilizasyon) yöntemi ile saklama :

Küflerin korunmasında, spor suspansiyonunun donma fazından buzun sublimasyonu

ile vakum altında kurutulması esasına dayanan yöntem «Liyofilizasyon» olarak bildirilmektedir. Çok uzun sürelerde oda sıcaklığında saklanabilir kültürler sağlama bakımından önemli olmakla birlikte, pahalı bir yöntemdir. Liyofize edilecek kültürler özgün ortamlarında optimum üremeyi gösterdikten sonra işlem uygulanmaktadır. Spor süspansiyonun hazırlanması için yağsız süt, serum, pepton, çeşitli şekerler veya bunların karışımları kullanılabilir. Ancak köpürme, geciken kuruma v.b. riskli durumlar kültürlerin canlılıklarını azaltabilmektedir. Küfler için 1°C/dak. lik donma hızı uygun değer olarak verilmiştir. Fazla kurumunun ölüm veya DNA'nın hasar görmesi gibi riskleri taşıdığı, % 1-2 arasındaki nemin ideal olduğu bildirilmektedir. Liyofilize materyalin, H<sub>2</sub>O buharı ve oksijen ile temas etmemesi de çabuk bozulmayı önleyecek bir husustur. Ampul veya şişelerin doğrudan azot veya argon gibi inert gazlar altında doldurulup, vakumla iyi kapamanın sağlanması önerilmektedir. Bu yöntemle 4°C lik muhafazalarda maksimum süre sağlanabilirken, 15-20°C de küflerin 15 yılın üzerinde canlılıklarını koruyabildikleri bildirilmektedir.

Yöntemin kullanılan alet tipine göre çeşitli modifikasyonları olduğunun bildirilmesine rağmen, temel uygulama aşağıdaki gibi özetlenmektedir :

Özgün ortamlarında optimum gelişme gösteren küflerden spor süspansiyonu hazırlanmaktadır. Bu amaçla, % 10'luk (w/v) rekonstitutede yağsız süt ve % 5 lik inositol (veya % 0,2 Tween 80) içeren çözelti 115°C de 10 dak. sterilize edilerek kullanılmaktadır. Hazırlanan spor süspansiyonu, 180°C de 3 saat kuru sterilize edilmiş özel 0,5 ml. lik cam ampuller veya penisilin şişelerine (ampulde 0,1-0,2 ml, şişe ise 1-2 ml. olarak) aseptik koşullarda pipetlenir. Bu işlem tercihan hava filtrasyonlu özel kabinlerde yapılmaktadır. Cam kaplar özel aletlerine yerleştirilerek -25°C civarında dondurulması sağlanmaktadır. Donmayı takiben sublimasyon ile (su fazına geçmeden) vakum altında evaporasyonla kurultulmakta ve ağızları kapatılmaktadır.

Liyofilize yoluyla saklamada *Mastigomycotina* bölümünden *Chytridiomycetes* ve

*Oomycetes* sınıfında % 0 olan canlılık, *Zygomycotina*'da % 92, *Deutromycotina*'da % 95 olarak saptanmıştır. Canlılık süreleri ise, CMI tarafından 8-14 yıl arasında belirlenmiştir (SMITH ve ONIONS, 1983).

#### 7 — Sıvı azotta saklama :

Sporlu ve sporsuz küflerin, fenotipik ve genotipik özelliklerini değiştirmeden, -196°C gibi çok düşük derecelerde uzun yıllar saklanabilmelerini mümkün kılan bir tekniktir. CMI tarafından yapılan çalışmalarda, 3000'in üzerinde farklı cins ve türdeki küflere uygulanan bu yöntemle, 14 yılda kültürlerde morfolojik ve fizyolojik olarak hiç bir değişiklik gözlenmemiştir.

Bu yöntem için, 1 ml. lik boroksilikat yapıdaki özel cam kaplar 180°C de 3 saat sterilize edilerek kullanılmaktadır. % 10 luk gliserol çözeltisi 121°C de 15 dakika sterilize edilerek 7°C ye soğutulmakta ve yine soğutulmuş kültürlerle hazırlanan spor veya mineral çözeltisinde 0,5 ml. özel ampullerine pipetlenmektedir. Bunlar özel hava-gaz alevi düzeneği ile kapatılıp, 4-8°C de ön soğutmaya alınmaktadır. Ön soğutmayı takiben önce 1°C/dak. lik dondurma hızıyla -35°C ye dondurulmakta ve özel alüminyum kutularına yerleştirilmektedir. Özel kutularındaki ampuller 250-320 lt. kapasiteli tanklarda -196°C deki sıvı azotta esas korunmaya alınmaktadır. Kültürlerin canlılık ve saflık kontrolleri, sıvı azottan çıkarılan ampuller, 37°C deki su banyosunda hızla çözündürüldükten sonra teknığe uygun olarak, özgün ortamlarına alınıp yapılmaktadır.

Öze bazı küflerde gliserol, kryoprotektan etkisine karşın organizmaya penetre olmaktadır. Bu ise sakıncalı durumlar yaratabilmektedir. Söz konusu sorunu önlemek için % 10 luk dimetil sulfoksit (DMSO) veya % 5 lik DMSO ile, % 8 lik glikoz karışımı kullanılabilir. Ayrıca bazı türler için çeşitli özel plastik ampuller ve hatta özel plastik içki karışımları önerilmektedir. Ampullerin saklanması poliyester film kutularının da bu amaçla kullanılabilirliği bildirilmektedir (SMITH 1984). Yöntem çok kolay uygulanabilir olup ve rutinde çok iyi sonuç verdiği ifade edilmektedir. Pahalı oluşu ve sürekli yoğun azot tamamlama ihtiyacı en büyük dezavantajdır. Halen CBS'de

periyodik transfer - aktif kolleksiyon, liyofilize kültür, mineral yağ altında ve azot atmosferinde saklama yöntemleri kullanılırken, CMI'da bütün yöntemlerle koruma yapılmaktadır.

### KULLANILAN KORUMA YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Kültür kolleksiyonlarında kullanılacak yöntemler, gereksinimlerin fonksiyonu olarak belirlenmektedir. Bu durum Çizelge 1'de açıklanmış olarak verilmiştir (SMITH ve ONIONS 1983). Söz konusu seçenekler çeşitli parametrelere göre yöntemler arası kıyaslamalar ışığında değerlendirilmelidir ki, bu karşılaştırma Çizelge 7 de verilmiştir (SMITH ve ONIONS 1983).

Kültür kolleksiyonunda yöntem seçimi için bu parametreler yanında küf kültürüne uygunluğu da çok önemli bir faktördür. Küflere uygunluk durumlarına göre yöntemlerin değerlendirilmesi Çizelge 3'de verilmiştir (SMITH ve ONIONS 1983).

Yapılan çalışmalara göre, hiç bir yöntem bütün küfler için tümüyle başarılı sonuç vermemiştir. Ancak dondurularak sıvı azotta saklamanın küfler için çok uygun olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte eksilen sıvı azotun sürekli tamamlanması zorunluğu olduğu, bunun olumsuz sonucu bitmesi halinde bütün kolleksiyonun elden çıkacağı bildirilmiştir (SMITH ve ONIONS 1983).

Bütün bunlara ilaveten korumaya alınacak küflerin, optimum gelişme ve sporulasyonunun sağlanması gerekmektedir. Bunun için de tür- lere göre en uygun gelişme ortamı ve koşulları seçilmelidir. Örneğin *Fusarium*, *Trichoderma*, *Epicoccum* spp. gibi bazı küflerin, sporlanma için 320-380 nm (3100-4000°A) dalga boyundaki siyah ışığa gereksinimi vardır. Oysaki hemen yakınında 200-300 nm civarındaki dalga boyunda tanımlanan ultraviyole ışık ölümcül veya mutajenik etkiler yapmaktadır (SMITH ve ONIONS 1983, SMITH 1984). Bu konu ile ilgili ayrıntılı bilgi başka bir çalışmada verilmiştir (TOPAL 1985).

Çizelge 1. Kültür kolleksiyonu yöntemlerinin seçiminde dikkate alınacak noktalar.

### G E R E K S İ N İ M L E R

Kolleksiyonun Amaçlanan Hizmetleri	Karşılanabilirlik	İzolat sayısı	Stabilite	Dayanma Ömrü	Fiyat	Emek-Ekipman Kullanımı	Önerilen Yöntemler (*)
Özel - Eğitim (Üniversite)	Kolay	Az.	Düşük	Kısa	Ucuz	Az	Yağ, Su, Toprak, SG, DD.
Araştırma (Küçük grup izolat için)	Kolay	Az	Yüksek	Orta	Orta	Nispeten Fazla	FD, LN (Mümkünse) SG, DD.
Araştırma (Çok sayıda benzer izolat)	Kolay	Çok	Orta/ Yüksek	Orta	Ucuz	Az	DD, Yağ SG.
Özgün çalışma : — Endüstriyel	Çabuk ve Kolay	Çok/Az	Çok yüksek	Orta/ Uzun	Pahalı	Fazla	FD, LN, SG, DD.
— Kurumsal	Kolay	Çok (Olabilir)	Değişken	Orta	Ucuz	Az	FD, LN, SG, DD.
Ulusal merkez servisi	Kolay	Çok	Yüksek	Uzun	Pahalı	Az (Özellikle fazla)	Bütün Teknikler.

(\*) SG = Silika -jel; FD = Dondurarak kurutma, LN = Sıvı azotta muhafaza, DD = Derin dondurma

Çizelge 2. Koruma yöntemlerinin karşılaştırması

Koruma Yöntemleri	Yatırım --- Fiyat		Uzun Ömürlülük	Genetik Stabilite	Genel Görüşler
	Ekipman	El Emegi (işçilik)			
<b>AGARA PERİYODİK TRANSFER</b>					
1 — Oda sıcaklığında saklama	Düşük	Yüksek	1-6 ay	Koşullara bağlı değişken	Kontaminasyonu önlemek için
2 — Buzdolabında saklama	Orta*	Yüksek	6-12 ay	Değişken	stok kültürleri, çalışma kültür- lerinden uzak tutmak gerekir.
3 — Mineral yağda saklama	Düşük	Düşük/Orta	1-32 yıl	Zayıf	
4 — Suda saklama	Düşük	Düşük/Orta	2-5 yıl	Orta	
5 — Derin dondurucuda saklama (Deep - freeze)	Orta*	Düşük/Orta	4-5 yıl	Orta	Yenileme sıra- sında gözünme- lerine izin veril- memelidir.
<b>KURUTMA</b>					
Toprakta	Düşük	Orta	5-20 yıl	Zayıf - Orta	Çalışmalar, fazla kurumunun DNA'da zararlanmalara neden olduğunu göster- miştir.
Silika - jelde	Düşük	Orta	5-11 yıl	İyi	
Derin dondurarak (Liyofilize)	Yüksek	Orta	4-40 yıl	İyi	
<b>DONDURARAK</b>					
Sıvı nitrojende saklama	Yüksek	Düşük	Sınırlanmamış (OMI da 14 yıl- dir sürmekte)	İyi	

(\*) : Soğutucu ve deep - freeze masrafları içindedir.

Çizelge 3. Koruma yöntemlerinin küflerin sınıflanmalarına göre değerlendirilmeleri

Küflerin Sınıflamaları (Alt bölüm - sınıf - Takım)	Ağara transferler							Derin don- durarak kurutmada (liyofilize)	Sıvı Azotta
	Oda sıcaklığında	Buz dolabında	Mineral Yağda	Suda	Derin don- durucuda	Toprakta	Silika- jelde		
Mastigomycotina (Oomycetes hariç)	Uygun	Jygun*	Uygun	Zayıf	Zayıf	Uygun	Kötü	Uygun	
Oomycetes	Kötü	Kötü	Uygun/iyi	iyi	Zayıf	Uygun	Kötü	iyi	
Zygomycotina (Entomophthorales hariç)	iyi	Uygun	Uygun	iyi	Uygun	iyi	iyi	Çok iyi	
Entomophthorales	Zayıf	Zayıf	iyi	Uygun	Zayıf	Uygun	Kötü	iyi	
Ascomycotina (Laboulbeniales hariç)	iyi	iyi	Uygun	iyi	iyi	iyi	Çok iyi	Çok iyi	
Laboulbeniales	Zayıf	Zayıf	Zayıf	Zayıf	Zayıf	Zayıf	Kötü	iyi	
Basidiomycotina									
a) Mycelial kültür	Uygun	iyi	iyi	iyi	iyi	iyi	Kötü	iyi	
b) Sporlanmış kültür	Uygun	Uygun	iyi	iyi	iyi	iyi	iyi	Çok iyi	
Uredinales (pas)	Kötü	Kötü	Kötü	Kötü	Zayıf	Zayıf	Kötü	iyi	
Ustilaginales (sürme)	Uygun	Uygun	Uygun	Kötü	Zayıf	Zayıf	Kötü	iyi	
Deuteromycotina	Uygun	iyi	Zayıf/iyi (değişken)	iyi	iyi	iyi	Çok iyi	Çok iyi	

(\*\*) Bazılar kötü.

(\*\*\*) Bazı Pythium ve Phytophthora türleri için uygun.

### TÜBİTAK - MAM'deki KÜF KOLLEKSİYONU ve ÖZELLİKLERİ :

TÜBİTAK - Marmara Araştırma Merkezi, Beslenme ve Gıda Teknolojisi Bölümünde 1980 yılından beri NATO tarafından ve İstikrar İçin Bilim (Science for Stability) programı ile desteklenmekte olan proje çalışmaları sürdürülmektedir. «Türk Gıdalarında Küfler ve Mikotoksinler» üzerindeki bu çalışmada 9 tarımsal bölgeden pek çok tarım ürününün küf florası incelenmiş ve buradan sağlanan izolatlar identifiye edilmiştir. İlgili araştırmacılar tarafından ürünlere özgü mikoflora belirleme çalışmaları ve buna bağlı pek çok bilimsel yayınlar (tahıllar, baklagiller, yağlı tohumlar, mamul gıdalar konusunda) yapılmış ve çeşitli tebliğler sunulmuştur. Bunun yanında izole edilen ve tür seviyesinde identifikasyonları tamamlanan küfler bir kolleksiyon çerçevesinde toplanmış ve klasifiye edilmiştir. Ancak bu çalışmada 10.000'in üzerindeki küf izolatından duplikasyona yol açan bazı tür ve suşlar elemine edilmiş ve 1579 adedinin arşivlenmesi ve bilgisayarla klasifikasyonu tamamlanmıştır.

Kolleksiyondaki küfler Czapeck Agar (Cz pA) ve Malt Agar'da (MA) ikişer paralelli olarak pyreks cam tüplerde yatık ortamlarda «periyodik transfer» yöntemi ile  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  de saklanmaktadır. Söz konusu kültürlerin 6 ayda bir çapraz transferleri yapılmakta, MA'daki kültür

Czp A'a, Czp A'daki MA'a aseptik şartlarda nokule edilerek yenilenmektedir (SAMSON, 1982). Ayrıca mevcut küflerin büyük bir kısmı liyofize edilmiş, bu amaçla Bölümümüzde «Leybold-Heraus Lyovac GT-2» liyofilize cihazı kullanılmıştır. Halen devam etmekte olan liyofilize kültür çalışmalarında ard-arda 3 gün  $110^\circ\text{C}$  de otoklavda sterilize edilen % 20 lik yağsız sütte ve Tween 80 ile yukarıdaki gibi hazırlanan spor süspansiyonu, alette  $-25^\circ\text{C}$  de bir gece boyunca dondurulmakta ve buz kristalleri su fazına geçmeden (sublimasyonla) vakum altında evapore edilmektedir. Evaporasyon süresi de 8 saat civarındadır. Kapama alet tarafından otomatik tabla sistemi ile yapılmakta ve silika jelden geçirilerek kurutulmuş hava verilip vakumla uzaklaştırılmaktadır. Kültür kolleksiyon numaralarının işlendiği şişeler 5'li seriler halinde hazırlandıktan sonra, 4 gün oda sıcaklığında tutulmaktadır. İçlerinden bir serisine steril saf su ile 15-20 dakikalık açılım uygulayıp, özel ortamında ve koşullarında tutularak canlılık ve kontaminasyon kontrolü yapılmaktadır. Denetimden geçen liyofize kültürler Bölümümüzde  $+4^\circ\text{C}$  deki özel dolaplarında muhafaza edilmektedir.

Yatık ve liyofize kültürler halinde arşiv sistematiğine uygun olarak kartotekslenmiş ve aşağıda Şekil 1'de örnekleri verilen kartlarına işlenmiştir.

MAE	:	TBK	:
Kod No.	:	İzolatin ismi	:
Küf No.	:	İzolatin alındığı örnek	:
İzolasyon tarihi	:	Örneğin alındığı bölge	:
Lyophilize tarihi	:	İzolatin alındığı tarih	:
İzole eden	:	İzolatin alındığı aw değeri	:
Özellikler	:	İzolatin alındığı dilisyon	:
		İzolatin alınış şekli	:
		Ürettiği mikotoksin	:
		Mikotoksin cinsi	:
		İzole eden	:

Şekil 1. Küf kolleksiyonundaki periyodik transfer ve liyofilize kültürlerin sistematik değerlendirilmedeki kartoteks çalışma örnekleri.

Yatık kültürlerin isimleri arşiv kartlarına *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* spp. ve «Diğer Grup» adı altında (*Zygomycetes* ve diğer *Deutromycetes* cins ve türlerine göre) alfabetik olarak işlenmiş ve koleksiyondaki yer aldığı konuma bağlı tüp-sporu numaralarına göre düzenlenmiştir. Ayrıca Micro VAX II bilgisayarı kullanılarak veri kütükleri hazırlanmış ve aşağıdaki 6 parametreye göre sınıflaması yapılmıştır. Bu sınıflamada kullanılan parametreler şunlardır.

- 1) Liyolize No,
- 2) Örnek cinsi,
- 3) Örneklerin sağlandığı il trafik No,
- 4) Örnek kayıt No,
- 5) Tüp spor No,
- 6) Küf izolat türü.

Küf izolat türünde cins ve tür isimlerinin ilk harflerinden oluşan 4 harfli bir kısaltmaya gidilmiş, örneğin *Penicillium expansum*, «PEXP» olarak, diğer gruptan *Alternaria alternata* «OAAAL» olarak kullanılmıştır. Bu durumda diğer grupta farklı cins küfler yer aldığı için, ilk harf «O» olarak alınmış sonra spesifik isimlerin ilk harfleri kullanılmıştır.

Söz konusu koleksiyonda tarımsal ürünlerimiz ve özellikle gıdalarımız için dominant olan ve sistematik arşivlemesi yapılan toplam 1579 adet saf küf kültürü vardır. Bunların sayısal dağılımları Çizelge 4 de verilmiştir. Ayrıca bu değerlendirmede yer almamış ancak identifikasyonları diğer araştırmacılarca tamamlanmış küf kültürleri de aynı koleksiyon odasında korunmaktadır. Toplam sayıları 5000 civarındadır.

**Çizelge 4. Koleksiyonumuzda yer alan ve sistematik değerlendirmesi yapılan küf kültürlerinin cinslerine göre dağılımları.**

Küflerin Cins ve Grupları	Toplam Sayıları (adet)	% Dağılımları	Farklı tür Sayıları Toplamı (adet)
<i>Penicillium</i> sp.	1022	64.72	46
<i>Aspergillus</i> sp.	303	19.19	21
<i>Fusarium</i> sp.	38	2.41	10
Diğer grup(*)	216	13.68	27 tür (19 cins)
Genel Toplam	1579	100	104

(\*) *Alternaria*, *Cladosporium*, *Scopulariopsis*, *Mucor* spp. v.b. diğer *Deutromycetes* *Zygomycetes*'in farklı cins ve türleri yer almaktadır.

İleriki çalışmalarla, koleksiyonda sistematik değerlendirmeye alınan küfler için yapılan sınıflandırmalara göre ayrıntılı bir dökümler katologlamaya gidilecektir. İdentifikasyon çalışmaları tamamlanmış ve koleksiyonumuzda yer alan küf kültürlerinin çoğunluğunun teyidi, CBS veya CMI gibi konunun önemli merkezlerince yapılmıştır. Koleksiyon oluşturulmasında bu konunun çok önemli isimlerinden bizzat yararlanılmıştır (SAMSON 1982, 1983, 1984, PITT 1985, BOCTH 1985, CNIONS 1985).

#### KÜF KOLLEKSİYONLARININ KORUNUMU :

Saklamak üzere koleksiyona alınan küf kültürlerinin; optimum gelişmesinin sağlanması yanında, herhangi bir bakteri-yabancı küf kültürü ve parazit kontaminasyonundan uzak tutulması, kurumalarına meydan verilmeden uygun transferlerinin yapılması gerekmektedir. *Penicillium* spp. leri en hızlı üreyen ve yaygın küfler olduğu için hızla bulaşmalara neden olmaktadır. Yine aerial misel yapısı nedeniyle *Rhizopus* spp. leri, sporlarının yüksekte taşın-



ması ve sporangiumlarının kolay açılarak sporların dağılımı nedeniyle de kontaminasyonu teşvik edebilmektedirler. Ayrıca hızlı laboratuvar kontaminasyonu yaratabilen *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma* spp. ve *Chrysonillia (Monilia) sitophila* ile çalışılırken ciddi önlemler gerekmektedir. Zincirleme bulaşmaları önlemek üzere bu kültürlerle çalışılırken tezgahların sık sık % 70 lik alkolle dezenfeksiyonu, petriyelerinin bantla sarılarak korumaya alınmaları zorunlu olabilir (TOPAL, 1985). Fungal sporların laboratuvar havasını kirletmelerini önlemek üzere, havaya sıkılacak herhangi bir deodorant tipi aerosol kendi ağırlıklarıyla havadaki küf sporlarını da aşağı çekmesi bakımından önerilmektedir (PITT 1989, PITT ve HOCKING 1985). Daha kesin önlemler olarak da % 2 lik timol içeren etanol veya % 4 lük formalin püskürtülüp hafta sonu laboratuvarın kapalı tutulması önerilmiştir. Bunu takiben % 70 lik alkolle silmek gerekmektedir. Ayrıca olası bir kontaminasyonun önlenmesi bakımından kolleksiyona alınacak yatık agar tüplerindeki kültür gelişimi tamamlandıktan sonra, pamuk çevresine aşağıda bileşimi verilen dezenfektan sürülmektedir. Ancak civa nedeniyle toksik olan bu preparat mutlak ehlilikle kullanılmalıdır (SAMSON 1982, RAPER and THOM 1949). Tüp ağzına uygulanacak dezenfektan bileşimi :

500 ml etil alkol (% 96'lık)  
450 ml su  
50 ml gliserin  
10 gr. civa klorit  
İz miktarda boya (Eosin, anilin v.b.)

Gliserin, kurumaya bağlı kristalleşmeyi önlemesi bakımından önemlidir. Ayrıca bu karışım bazı durumlarda petrinin tersinden kenarlarına doğru da sürülebilir, ancak koloniye damlamamalıdır. Ayrıca küf çalışmaları ve özellikle kültür kolleksiyonları için en önemli sorunlardan birisi de «mite» (Akar) dir. Mite, genellikle *Tyroglyphus* and *Tarsonemus* cinslerinden, yaygın küçük hayvancıklar olarak bildirilmiştir (ONIONS ve ark. 1981). Örümcekgillerden (arachnoids) olup, hemafrodit karakteri nedeniyle hızla çoğalabilme yeteneği gösterdiği belirlenmiştir. Yürüdüğü hat boyunca bıraktığı yumurtalarının 24 saatte açıldığı ve 2-3 gün-

de de ergin hale geldiği bildirilmiştir. Toprak, taze bitkisel materyel ve küflü gıda ürünler, v.b. bütün organik materyelden kaynaklanabilen mite; dondurulma ile öldüğü ve 8°C nin altında aktivitesini kaybettiği halde, yumurtaları -20°C de 48-72 saat canlılığını koruyabilmektedir. Kültür kontamine olduğunda 48 saat dondurma ile geri kazanılabileceği, ayrıca gıda ürünlerinin 1 gece soğutucuda tutulduktan sonra analize alınması önerilmektedir (PITT ve HOCKING 1985).

Mite'in zararı, hem kültürü yemesi, hem de yabancı küf ve bakteri taşınması ve bulaştırması nedeniyle iki kat olarak bildirilmiştir. Çapraz kontaminasyonlara da yol açan bu organizma; 0,25 mm büyüklüğünde, yüksek nem ve sıcaklıkta süratle yayılabilir ve bütün laboratuvar için sorun yaratabilir karakterli olarak tanımlanmıştır. Bu hayvanların kontrolü ve eliminasyonu için aşağıdaki 4 önlemin tek veya kombineli olarak kullanılması önerilmiştir (SMITH ve ONIONS 1983, SMITH 1984).

1 — Hijyenik koşulların sağlanması; en iyi koruma yöntemi olarak verilmiştir. Bunun için temizliğin sağlanması, kültürlerin inkubator ve laboratorlarda hava ile temasından kaçınılması, çalışma masalarının akarisitlerle silinmesi önerilmiştir. Kethane (Murhy Chemical Co.), Tedion V-18 (Mi-Dox Ltd.), Chlorocide (Boots Pure Drug Co. Ltd.) ve paradichlorobenzene (BDH Chemicals Ltd.) en uygun akarisitler olarak verilmiştir. Akarisitlere bağımsızlık sağlamaması için dönüşümlü olarak kullanılması, bundan sonra da % 70 lik alkolle silinmesi önerilmiştir. Eğer mite'li kültür varsa mümkünse sterilize edilerek yok edilmeli, değilse bir miktar sıvı parafin ilavesiyle soğukta tutup, daha sonra ara pasajları yapılmalıdır.

2 — Fumigasyon; Bu amaçla camphor veya paradichlorobenzene (PDB-British Drug House Ltd.) kullanılmaktadır. Ancak PDB'nin küf kültürlerinde normal gelişmelere neden olarak istenmeyen etkiler yaptığı bildirilmektedir. Fumigantlar da inkubator dezenfeksiyonu için önerilmektedir.

3 — Mekanik veya Kimyasal Engeller; kültürlerin durduğu zeminde plakların etrafına su, yağ, petrol veya yapışkan bir madde gibi en-

geller konulması mite enfeksiyonunu önlemek açısından önerilmektedir. Ayrıca tüplerin ağız kısmına 20 g. jelatin ve 2 g. bakır sülfatın 100 ml destile suda karışımı ile hazırlanan özel preparat (bakır sülfat-jelatin tutkalı) emdirilmiş sigara kağıdı sarılması bir başka önlem olarak verilmektedir. Bütün bunlara ilaveten ağız vidalı kapaklı plastik özel atılabilir şişelerin kolleksiyon için kullanılması da tercih edilmektedir.

4 — Korunarak (Soğukta) saklama, 4-8°C deki soğukta saklama, akarları hareketsiz hale

getirdiğinde yayılımlarını azaltmaktadır. Ancak normal koşullarda yeniden aktive oldukları bilinmektedir. —18°C nin altındaki derin dondurucularda 48 saatte yumurtaların da öldüğü bildirilmektedir. Sıvı azot, liyofilize ve silika-jel yöntemlerinde kesin olarak mite enfeksiyonu olamadığı da ilave edilmektedir.

Bu bilgilerin yardımıyla korumaya ve geliştirmeye çalıştığımız kültür kolleksiyonumuz bütün kurum ve kuruluşlara gerekli saf kül kültürlerini sağlayabilmek üzere destek vermeye hazırdır.

#### KAYNAKÇA

- BOOTH, C. 1985, Kişisel görüşme. Commonwealth Mycological Institute (CMI), Kew-Surrey London.
- GAMS, W., H.A. Vander Aa, vander Plaats Niterink A.J. SAMSON, R.A., STALPERS, J.A. 1980. CBS - Course of Mycology. 2nd Ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Baarn The Netherlands. p. 109.
- ONIONS, A.H.S., ALLSOPP, D., EGGINS, H.O. W. 1981. Smith's Introduction to Industrial Mycology. 7th. Ed. Edward Arnold Pub Ltd. London. P. 362 - 371.
- ONIONS A.H.S. 1985. Kişisel görüşme. Commonwealth Mycological Institute (CMI) Kew Surrey. London.
- PITT, J.I. ve HOCKING, A.D. 1985. Fungi and Fungi Spoilage. Academic Press. Australia, 413 P.
- PITT J.I. 1985, 1989 Kişisel görüşme (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Research Sydney, Avusturalia) TÜBİTAK - MAM. Gebze/Kocaeli.
- RAPER, K.B. and THOM, C. 1949. A manual of the Penicillia. The Williams and Wilkins Comp. 875 p.
- SAMSON, R.A., 1982, 1983, 1984 (Kişisel görüşme) TÜBİTAK - MAM Gebze/Kocaeli ve Centraalbureau voor Schimmelcultures(CBS) Baarn, The Netherlands.
- SMITH, D. and ONIONS A.H.S. 1983. The Preservation and Maintenance of Living Fungi. Commonwealth Mycological Institute. Richmond, London. 51 p.
- SMITH, D. 1984. Maintenance of Fungi. (in Maintenance of Microorganisms. A manual of Laboratory Methods. Ed. by KIRSOP, B.E. and SNELL J.J.S.) Academic Press. p. 83 - 107.
- TOPAL, Ş. 1985. Mikoloji Laboratuvarı İçin Genel Kurallar, Küflerin Gıda ve Yem Maddelerinden İzolasyonu. (Alınmıştır. Gıdalarda Küfler Mikotoksinler Araştırma Projesi, Çalışmalar III. TÜBİTAK - MAM Beslenme ve Gıda Teknolojisi Bölüm Yayını No: 106. MAM Matbaası Gebe - s. 32 - 46.