

Sterilizasyon ¹

Velittin GÜRGÜN, A. Kadir HALKMAN

- 01. Genel Bilgiler
- 02. Isı Uygulaması
 - 02.01. Otoklavda Sterilizasyon
 - 02.02. Tindalizasyon (Tyndallisation)
 - 02.03. Kuru Hava Sterilizasyonu
- 03. Kimyasal Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon
- 04. Filtre ile Sterilizasyon
- 05. Radyasyon ile Sterilizasyon
- 06. Sterilizasyon (Sterillğin) Kontrolü
 - 06.01. Bakteriyolojik indikatörler
 - 06.02. Kimyasal test materyalleri (indikatörler)
 - 06.03. Elektrikli indikatörler

01. Genel Bilgiler

Sterilizasyon, tüm mikrobiyolojik çalışmalarda olduğu gibi sayımda da en önemli hususlardan birisidir. Bir gıda örneğinde toplam bakteri sayısının kontrol edileceğini düşünelim. Kullanılan besiyerlerinin, dilüsyon çözeltilerinin, pipetlerin ve Petri kutularının steril olması zorunludur. Aksi halde bunlardan gelecek mikroorganizma yükü de gıdadaki sayıya katılacağından yanlış sonuç alınmasına neden olacaktır.

Sterilizasyon şekilleri; a) ısı uygulaması, b) kimyasal sterilizasyon ve dezenfeksiyon, c) filtrasyon ve d) radyasyon olmak üzere 4 ana başlık altında toplanabilir. Bunların dışında dondurma, kurutma ve ultrasonik teknikler de mikroorganizma sayısında önemli azalmalara neden olabilmekle beraber, mikrobiyolojik anlamda sterilizasyon sağlayamazlar.

Filtrasyonla mikroorganizmalar ortamdan ayrılırken, diğer yöntemler farklı mekanizmalarla mikroorganizmaları öldürürler ya da gelişemeyecekleri kadar hasar verirler. Mikroorganizmalar, hayati enzimlerinin ve proteinlerinin inaktive ya da immobilize olması ve bunun sonunda metabolik faaliyetlerinin durması dolayısı ile gelişme ve çoğalma yeteneklerini kaybettikleri için ölürler. Bununla beraber, sterilizasyonun nasıl sağlandığı, bir diğer deyiş ile mikroorganizmaların nasıl ve hangi etki ile öldüğü tüm ayrıntıları ile açıklanabilmiş değildir.

Aşağıda, uygulamada en yaygın olarak kullanılan sterilizasyon teknikleri ile sterilizasyon sonunda yapılması gereken testler kısaca açıklanmıştır.

02. Isı Uygulaması

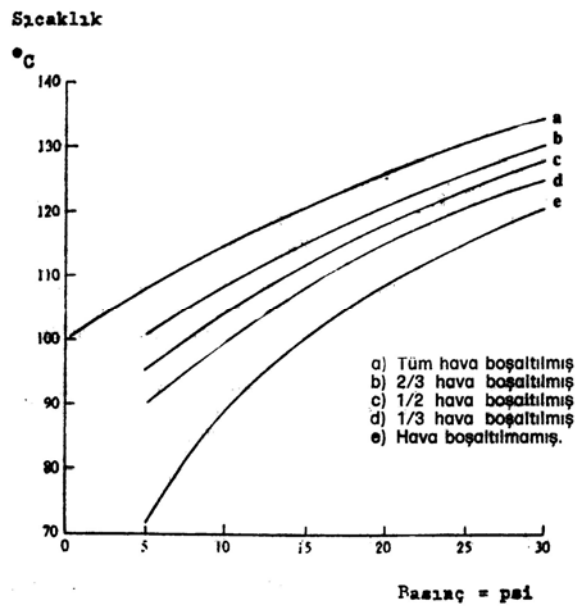
Otoklavda sterilizasyon, kaynatma, pastörizasyon ve tindalizasyon gibi nemli ısı uygulamaları ile kuru hava sterilizasyonu en yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir.

¹ "Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri; 2. Baskı. Prof. Dr. Velittin Gürgün, Doç. Dr. Kadir Halkman. 1990. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın no 7. Ankara" adlı kitabın bölümüdür.

Nemli sıcaklığın, kuru sıcaklığa oranla mikroorganizmalar üzerine daha fazla öldürücü etkiye sahip olduğu Robert KOCH döneminden beri bilinmektedir. Proteinler, kuru ortamda sıcaklığa daha fazla direnç gösterirler. Kuru sıcaklık uygulaması ile hücreler daha ziyade oksidasyon işlemi sonunda ölürken, nemli sıcak uygulamasında proteinlerin yapısal değişimi söz konusudur.

02.01. Otoklavda Sterilizasyon

Vejetatif bakteri hücreleri 75-80 °C'da ölmekle beraber *Bacillus* ve *Clostridium* cinslerine ait sporlar 100 °C'ın üzerinde ölmektedirler. Suyun sıcaklığı ancak basınç altında 100 °C üzerine çıkabilir. Kapalı bir kap içinde basınç arttıkça su, sıvı fazını koruyabilir. Belirli bir basınç altında sıcaklığı daha da artarsa bu kez buhar fazına geçer. Suyun sıcaklık - basınç ilişkisine göre sıvı - buhar fazı şeklinde gösterilmiştir.



Şekilde görüldüğü gibi sıcaklık ile basınç arasında lineer olmayan bir ilişki vardır. Otoklavdaki havanın tam olarak çıkarılamaması halinde basınç - sıcaklık eğrilerinin değiştiği yine şekilden görülmektedir.

Otoklav sıcaklığı °C veya °F, otoklav basıncı ise kg/cm² veya psi (pound square inch= pound/inch²) ile gösterilir. Çizelgede çeşitli sıcaklık dereceleri için otoklav basınçları verilmiştir. Basınç deyimi ile manometrede okunan değer anlaşılmaktadır. Bu değerlere normal atmosfer basıncının ilavesi ile mutlak (absolüt) basınç değerleri bulunur. Normal atmosfer basıncı; 1 kg/cm² = 14.7 psi'dir.

Otoklavda sterilizasyon genellikle 121 °C'da (15 psi basınçta) yapılır. Bu sıcaklık derecesinde otoklavlama süresi başta sterilize edilecek materyalin hacmi ve otoklavın dolduruluş şekli olmak üzere pek çok faktör tarafından etkilenir.

Çizelge Basınç - sıcaklık ilişkisi

Sıcaklık		Basınç	
°C	°F	kg/cm ²	psi
100	212	0,00	0,0
105	221	0,19	2,8
110	230	0,41	6,0
115	239	0,67	9,8
121	250	1,02	15,0
125	257	1,29	19,0
130	266	1,67	24,5
134	273	2,00	29,4

Otoklavlar, çoğu kere otoklav içindeki havanın çıkışını zorlaştıracak şekilde hatalı olarak doldurulurlar. Örneğin tüpler, yaygın olarak boş konserve kutularına konulup otoklava yerleştirilir. Bu şekilde kutu içinde hava paketleri kalabileceği için otoklav sıcaklığı 121 °C'ı gösterse dahi kutu ve dolayısıyla tüplerin sıcaklığı otoklavlama süresi boyunca 121 °C'a çıkmayabilir. Oysa boş konserve kutusu yerine delikli tel sepetlerin kullanılması, ya da konserve kutusunda deliklerin açılmasıyla, bu sorun ortadan kaldırılabilir.

Çoğu mikrobiyoloji kitabında otoklavlama derece ve süresi olarak 121 °C ve 15 dakika verilir. Oysa sterilize edilecek malzemenin hacmi süre üzerine çok etkilidir. Çizelgede sterilize edilecek hacimlere göre otoklavlama süreleri verilmiştir.

Sterilize edilecek hacme göre 121 °C 'daki otoklavlama süresi

Kap cinsi	Sıvı hacmi	Süre (dakika)
Test tüpleri	5 - 15 ml	15
500 ml erlen	250 - 350 ml	20
1 litre erlen	500 - 750 ml	25
2 litre erlen	1 - 1,5 litre	30
5 litre erlen	2 - 3 litre	45

Katı materyalde ise (toprak vs), otoklavlama süresi daha da uzundur.

Bazı hallerde, besiyerlerinin özel yöntemlerle sterilize edilmeleri gerekir. Örneğin besiyerinin bileşiminde dekstroz (glikoz) ve fosfatlar varsa, bunlar beraberce sterilize edilemez. Bunların ayrı ayrı sterilize edilip soğutulduktan sonra karıştırılmaları gerekir. Besiyeri bileşimine giren vitaminler ve keto grubu bulunan şekerler de filtrasyonla sterilize edilip besiyerine, sterilizasyondan sonra ilave edilmelidir. Bu gibi uygulamalarda, besiyeri bileşimine giren maddelerin miktarları doğru bir şekilde hesaplanmalıdır.

Bazı besiyerlerinin bünyesinde ise kan bulunur. Kanın hayvan vücudunda iken steril olduğu kabul edilir. Dolayısı ile hayvandan kan alınacağında derisi alkol ile silindikten sonra, steril enjektör ile kan alınıp steril kaba aktarılır. Kanın ilave edileceği besiyeri sterilize edilip soğutulduktan sonra kan ilave edilir.

Sterilizasyonda dikkat edilmesi gereken bir diğer önemli husus da, besiyerinin, hazırlandıktan sonra derhal sterilize edilmesi gerekliliğidir. Uzun süre sterilize edilmeden bekletilen besiyerinde mikrobiyel gelişme görülebilir.

Eğer besiyeri 121 °C 'da 20 dakika süreyle sterilize edilemeyecek ise (örneğin süt 110 °C 'da 15 dakika sterilize edilecekse), kullanılan cam malzemenin önceden etüvde sterilize edilmesi ve böylece cam malzeme üzerinde bulunabilecek olası bakteri sporlarının önceden öldürülmesi gerekir.

02.02. Tindalizasyon (Tyndallisation)

Bazı besiyerleri, bileşimlerine giren bazı maddeler nedeni ile yüksek sıcaklıkta sterilize edilemezler. Örneğin süt, 121 °C 'da 20 dakika süre ile sterilize edilecek olursa yapısı bozulur. Bu nedenle süt, 110 °C 'da 15 dakika süre ile sterilize edilir. Bazı besiyerlerinde ise 110 °C 'a dahi çıkılamaz. Bu tip besiyerleri Tindalizasyon yöntemi ile sterilize edilirler.

Tindalizasyonda besiyeri önce 100 °C 'da 30 dakika süre ile tutularak tüm vejetatif hücreler öldürülür. Ancak sporlar halen canlıdır. Ertesi gün besiyeri 85 °C 'da 1 dakika tutularak sporların germinasyonu (vejetatif hale dönüşmesi) teşvik edilir. 2 saat sonra yine 100 °C 'da 30 dakika tutulur. 3. gün aynı işlem tekrarlanır, böylece besiyeri aşamalı olarak sterilize edilmiş olur. Tindalizasyon 12 saat aralıklarla da yapılabilir.

02.03. Kuru Hava Sterilizasyonu

Pipet, Petri kutuları gibi cam malzeme otoklavlama sırasında hava paketleri oluşturabilecekleri ve dolayısı ile yeterince sterilize edilememesi riski de dahil olmak üzere pek çok nedenle kuru hava sterilizatörlerinde sterilize edilir. Bu amaçla yapılmış pek çok cihaz bulunmakla beraber, en yaygın kullanılanı elektrikle ısınan etüvlerdir.

Sterilize edilecek malzemenin etüve doldurulmasında aşağıda belirtilen hususlara dikkat edilmesi gerekir.

- Etüvün en sıcak yerleri alt ve üst duvarları, en soğuk yeri ise kapıya yakın olan bölgedir. Etüvün ortasında elde edilen sıcaklık ile alt ve üst duvarlarda elde edilen sıcaklık farkı 10 °C 'dan daha fazla olmamalıdır. Bu durum bir anlamda etüv dizaynı ile ilgilidir.
- Sterilize edilecek malzeme, hava sirkülasyonunu sağlayacak şekilde yerleştirilmelidir.
- Paketlenmiş malzeme boyutları 10X10X30 cm 'den daha büyük olmamalıdır.
- Bazı gıda maddeleri kum içinde ezilerek parçalanır, sonra dilüsyonları yapılır. Bu gibi durumlarda havan ve kum etüvde sterilize edilir. Kum, kalınlığı 1 cm'den fazla olmayacak şekilde havan veya diğer kaplara konularak sterilize edilir. Kumun daha kalın bir tabaka halinde etüvde sterilize edilmesi zorunlu ise, ilave her 1 cm için sterilizasyon süresi 30 dakika artırılmalıdır.

Normal olarak doldurulmuş (aşırı yüklenmemiş) kuru hava sterilizatörlerinde sterilizasyon süresi 160 °C 'da 2 saat veya 170 °C 'da 1 saattir. Etüv çok dolu ise ve/veya kum gibi sıcaklığı geç ileten bir materyal sterilize ediliyorsa süre uzatılmalıdır.

03. Kimyasal Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon

Bazı kimyasal çözeltiler ile bunların gaz ya da buharları, sterilizasyon ve dezenfeksiyon amacıyla kullanılabilir. Dezenfeksiyon, kelime anlamı olarak patojen mikroorganizmaların yüzeylerden arındırılması olup, bu tarif altında sterilizasyon yerine kullanılamaz.

Çeşitli kimyasal maddeler farklı etki şekilleri ile mikroorganizmaları öldürürler. Aynı kimyasal madde, yüksek konsantrasyonlarda sterilizasyon etkisi gösterirken, düşük konsantrasyonlarda bu etki azalır. Sterilizasyon ve dezenfeksiyon amacıyla kullanılan kimyasal maddelerin kullanılma alanları; ortamdaki mikroorganizmaların cins ve türü, mikroorganizma yükü, istenilen sterilizasyon gücü, materyalin özellikleri, ortam sıcaklığı, temas süresi vb faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Genel olarak, bir kimyasal maddenin dezenfeksiyon etkinliği arttıkça, buna paralel olarak toksiklik ve korozivlik gibi kullanımında istenmeyen özellikleri de artar. Hiç bir dezenfektan her koşulda aynı etkiyi sağlamaz. Dezenfektan etki, aktif bileşiğin konsantrasyonu, temas süresi, pH, sıcaklık, nem ve organik maddelerin varlığına göre değişiklik gösterir.

Kimyasal maddelerin sterilizasyon ve dezenfeksiyon etkileri çeşitli şekillerde birbirleri ile kıyaslanabilir. Bunlar arasında en çok kullanılan fenol katsayısı (Riedel-Walker testi = phenol coefficient = RW coefficient) testidir. Bu kıyaslama yönteminde, fenol katsayısı hesaplanacak dezenfektan maddenin sudaki çözeltisi hazırlanır. Bu çözeltinin konsantrasyonu *Salmonella typhi* bakterisini 7,5 dakikada öldürecek ancak 5 dakikada öldüremeyecek şekilde hazırlanır. Örneğin, (A) maddesinin 1/400'lük konsantrasyonu ile fenolün 1/100'lük konsantrasyonu aynı öldürücü etkiyi gösteriyorsa, (A) çözeltisinin fenol katsayısı 400/100 ya da doğrudan doğruya 4 olarak verilir.

Dezenfeksiyonda kullanılan başlıca kimyasal maddeler; asitler, alkaliler, halojenler, ağır metaller, kuarter amonyum bileşikler, fenolik bileşikler, aldehytler, ketonlar, alkoller, aminler ve peroksitlerdir. Aşağıda, kimyasal sterilizasyon ve dezenfeksiyon amacıyla yaygın olarak kullanılan kimyasal maddeler hakkında kısaca bilgi verilmiştir.

Alkoller: % 70 konsantrasyonlu etil alkol veya izopropil alkol genellikle yüzeylerin sterilizasyonu için kullanılır. Bunlar germisidal etkileri yavaş olan bileşiklerdir, bir diğer deyiş ile germisidal etkilerini göstermek için 4 - 5 dakika gibi süreye ihtiyaç gösterirler. Alkollerin sporlara etkisi yoktur. Alkol mutlaka su ile karıştırılarak % 70-% 80 (v/v) konsantrasyonda kullanılmalıdır. Saf alkol, % 70 (v/v) konsantrasyondaki alkole göre daha zayıf etki gösterir. Bunun nedeni saf alkolün hücre duvarındaki proteinleri bloke ederek hücre içine nüfuz edememesidir.

Formaldehit: Dezenfektan olarak, genellikle % 37-40'lık konsantrasyonu ile (formol) sıvı halde; ya da keti polimerize bileşik (paraformaldehit) halinde kullanılır. % 5 konsantrasyonlu formaldehit çözeltisi, bina veya odalarda yüzey sterilizasyonunda etkin bir şekilde kullanılır. Formaldehit, zehirli buharları nedeni ile kullanımına özen gösterilmesi gereken bir bileşiktir.

Fenol: Kokusu rahatsız edici olduğu gibi, kullanıldıktan sonra yüzeyde yapışkan bir iz bırakır. Bununla beraber 0- phenylphenol gibi bileşikler kokusuz ve vegetatif hücrelere karşı oldukça etkilidir. Bakteri sporları fenol bileşiklerinden etkilenmezler.

Kuarter amonyum bileşikler: Kuvvetli yüzey aktif maddelerdir. Proteinlerle birleştikleri için, seyreltik çözeltilerinin etkinliği protein varlığında zayıflar. Sabun gibi anyonik deterjanlar ile nötralize olurlar. % 0,1-2 gibi konsantrasyonlarda bakterisidal etkileri olmakla beraber yüksek konsantrasyonlarda dahi sporisit etkileri yoktur. Kuarter amonyum bileşiklerinin kokusuz olmak, yüzeyleri boyamamak, metallere korozif etki yapmamak, stabil olmak, ucuz olmak ve nispeten toksik olmamak gibi avantajları vardır.

Klor: Tüm bakterilere, bakteri sporlarına karşı çok geniş sıcaklık sınırlarında dahi etkili olabilen ve dolayısı ile en yaygın kullanım alanı olan dezenfektan maddedir. Klor, proteinler ile birleşir. Gereğinden yüksek konsantrasyonda çözelti hazırlanırsa proteinlerle birleşmeden kalan artık kısım metaller üzerine kuvvetli korozif etki yapar. Klor çözeltileri zamanla etkilerini kaybederler. Bu nedenle taze hazırlanmış çözeltileri kullanılmalıdır. 525 ppm klor çözeltisine % 0,7 düzeyinde iyonik olmayan bir deterjan ilave edilirse çok iyi bir dezenfektan etki elde edilir.

İyot bileşikler: Laboratuvarlarda en yaygın olarak kullanılan dezenfektanlardan birisidir. 75 - 150 ppm iyot konsantrasyonu, temiz yüzeyler ya da temiz suyun dezenfeksiyonunda etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Konsantrasyon, klorda olduğu gibi dezenfekte edilecek

materyaldeki kirlilik ile yakın ilişkilidir. % 50'lik alkol içinde 1600 ppm konsantrasyonlu iyot çözeltisi pek çok bakteri ve bakteri sporları için hızlı bir inaktivasyon etki gösterir.

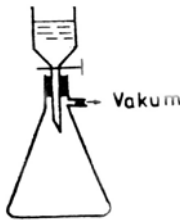
Ağır metaller: Cıva gibi ağır metaller toksik olmaları ve etkilerinin bakterisit değil daha ziyade bakteriostatik olmaları nedenleri ile geniş kullanım alanlarına sahip değildirler. Ancak tohum yüzeylerinin sterilizasyonunda eşitlendirilmiş % 1'lik $HgCl_2$ çözeltisi yaygın olarak kullanılmaktadır.

Peroksitler: Hidrojen peroksitin zayıf konsantrasyonu ellerin temizlenmesi amacı ile kullanılabilir. Ancak bunun önemsenmeyecek kadar zayıf bir antimikrobiyal etkisi vardır. Buna karşın düşük pH'da, yüksek konsantrasyondaki hidrojen peroksit etkin bir dezenfektandır.

04. Filtre ile Sterilizasyon

Vitaminler ve keto grubu bulunan karbohidratlar besiyerinin bileşimine gireceklerse, bunların termal sterilizasyonu söz konusu olamaz. Vitaminler gibi sıcaklık uygulanamayacak maddeler, filtrasyon tekniği ile sterilize edilip, ana (bazal) besiyeri bileşimine sonradan ilave edilirler. Filtrasyonda bakterilerin geçemeyeceği kadar küçük gözenekleri olan (<0,45 m) özel filtreler kullanılır. Bu amaçla porselen, diyatome toprağı veya kiselgur, asbest-sellüloz, nitrosellüloz ve sinterlenmiş camdan yapılmış filtreler ticari olarak piyasada bulunabilir. Membran filtreler, asbest-sellüloz Seitz filtreler ve sinterlenmiş cam filtreler en çok kullanılanlardır.

Filtrasyon tekniği ile sadece sıvılar değil, hava da sterilize edilebilir. Bu amaçla geliştirilmiş ekipmanlar mevcut olup bunların içine mikroorganizma tutucu olarak özel imal edilmiş kartuş şeklinde filtreler konulabileceği gibi pamuk veya cam yünü de yerleştirilebilir.



Filtre ve filtrenin yerleştirildiği gövde, otoklavda sterilize edildikten sonra sterilize edilecek sıvı, filtreden geçirilerek steril bir kaptan toplanır. Bu işlem sırasında genellikle vakum veya basınç uygulanarak filtrasyonun hızlı olması sağlanır. Şekilde filtre ile sterilizasyon gösterilmektedir.

05. Radyasyon ile Sterilizasyon

Çeşitli sterilizasyon yöntemleri arasında etki mekanizması en az bilineni radyasyon uygulamasıdır. Radyasyon uygulaması; a) iyonize radyasyon ve b) iyonize olmayan radyasyon olmak üzere 2 grupta toplanabilir.

İyonize radyasyonları; dalga boyu 100 Å'dan daha kısa olan X ışınları ve dalga boyu 1 Å'dan daha kısa olan gamma ışınları oluşturur. Bunların kullanımlarında, yüksek orandaki öldürücü etkileri nedeniyle, özel güvenlik önlemlerine gereksinim duyulur. Bu ışınların

penetrasyon (nüfuz) etkileri yüksektir. Genel olarak radyasyon sterilizasyonu denildiğinde iyonize ışınlar kastedilir.

İyonize olmayan radyasyon uygulaması ise ultraviyole (UV) ışını ile yapılır. UV, uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır.

Ultraviyole Radyasyonu

UV'nin antimikrobiyel etkisi yaklaşık 100 yıldan beri bilinmektedir. Parlak güneş ışığının bakterisidal etkisi, spektrumundaki UV'den kaynaklanır. Işın intensitesi ve etki süresi başta olmak üzere sıcaklık, pH, bağıl nem ve mikroorganizma sayısı gibi faktörler UV ışınının öldürücü gücünü etkiler.

İyonize radyasyon ile kıyaslandığında UV'nin enerjisi çok az ve bu nedenle, penetrasyon gücü çok düşüktür. Dolayısı ile mutlak bir sterilizasyon sağlayamaz, ancak, dezenfektan maddeler gibi popülasyondaki mikroorganizma sayısını önemli ölçüde indirir.

UV radyasyonu, bazı istisnalar dışında mayalar ile G+ ve G — bakterilere aynı etkiyi yapar. *Micrococcus radiodurans* gibi bazı türler UV'ye yüksek direnç gösterir. Benzer şekilde *Streptococcus lactis* diğer streptokoklara oranla daha dirençlidir. Bakteri sporları, vejetatif hücrelere göre, UV'ye daha fazla direnç gösterirler. Çoğu küf sporu, bakteri sporları kadar dirençli iken, bazıları bakteri sporlarından 10 kat daha yüksek dirençlidirler. Virüslerin direnci ise değişkendir. Bazıları bakteri hücreleri kadar, bazıları ise onlardan 100 kat daha fazla direnç gösterirler. Bazı küfler yağ ve mum benzeri salgıları ile, bazı bakteriler ise pigment oluşturmaları ile UV'den korunurlar.

Işınlar, sadece hücre tarafından absorbe edildiklerinde, kimyasal değişimler ve biyolojik hasarlar yaparlar. Hücreden geçen bir ışığın etkisi yoktur. 210-300 nm dalga boyundaki ışınlar yüksek absorpsiyonlarına bağlı olarak kuvvetli öldürücü etki yaparlar. 2537 Å° (253,7 nm) dalga boyundaki ışın, UV spektrumu içinde en etkili olanıdır. Bununla beraber optimum etkin dalga boyu mikroorganizma cinsine göre değişir.

UV; havanın, suyun ve ambalaj kâğıtları gibi düzgün yüzeylerin dezenfeksiyonunda kullanılmaktadır. Kullanım alanı, penetrasyon gücünün zayıflığı nedeniyle mutlak sterilize sağlayamaması dolayısıyla oldukça sınırlıdır. Havadaki ve/veya UV lambası üzerindeki tozlar dahi mikroorganizmaları UV'den koruyabilirler. Benzer şekilde bir mikroorganizma kolonisinde yüzeyin altındaki hücreler UV'den fazlaca etkilenmezler, merkezdekiler ise önemli ölçüde korunur.

UV radyasyonu, UV lambaları ile sağlanır. UV etkisi, lamba ile sterilize edilecek materyal arasındaki uzaklığın karesi ile ters orantılıdır. Bu nedenle kapalı bir odadaki UV uygulaması sırasında, eğer lamba tavanda ise, tabana yakın yerlerdeki mikroorganizmalar UV nin etkisinden önemli ölçüde korunurlar. Bu gibi uygulamalarda havanın sirkülasyonu ile bu sakınca bir ölçüde giderilebilir. Hastane odaları ve peynirhaneler gibi bazı gıda sanayii tesislerinde hava, UV uygulaması ile dezenfekte edilebilir.

UV radyasyonu ile suların dezenfeksiyonunda su, UV lambasının etrafından geçirilir. Suyun temizliği, UV'nin penetrasyon gücünü önemli ölçüde etkiler. Temiz sularda 5 cm derinlikte yüzeydeki % 40 kadarı UV etkisi elde edilirken, kirli nehir sularında 1 cm derinlikte % 30 etki kalır. Bu durumda 44 W gücündeki bir lamba; temiz sularda 60 cm, kirli sularda 2 - 3 cm derinliğe kadar etkin bir şekilde kullanılabilir.

06. Sterilizasyon (Sterilliğin) Kontrolü

Hangi yöntemle sterilize edilmiş olursa olsun malzemenin gerçekten sterilize olup olmadığının kontrolü yapılmalıdır. Bu kontrol bir anlamda sterilizasyon uygulamasının kontrolü demektir. Kontrollerde, sterilizasyon uygulaması sonrası kontaminasyon olmamasına özen gösterilmelidir. Sterilizasyonun kontrolü; bakteriyolojik, kimyasal ve elektrikli indikatörler ile yapılır.

06.01. Bakteriyolojik indikatörler

Ürünlerin sterilite testi ile ilgili engel olunamayan hatalara karşın, rezistanslığı bilinen belli sayıda canlı sporları içeren test materyalleri önemli avantajlar sağlar. Sterilizasyon sırasında bunların devreye sokulması ve sterilizasyon sonunda da kontrol edilmeleri, tesadüfi örnekleme, kaza ile olan kontaminasyonlar, uygun olmayan kültürel yöntemlerin uygulanması ve test edilen madde içindeki antimikrobiyel maddelerin inaktivasyonundaki hata ve eksikliklerden kaynaklanan aksaklıkları büyük ölçüde ortadan kaldırır. Üzerinde 10^5 adet spor içeren 2 adet test materyali, her biri sterilizasyon öncesi 100 mikroorganizma içeren 2.000 ürünün ayrı ayrı yapılan sterilite testi ile elde edilebilecek bilginin aynısını verir. Test materyallerinden beklenen avantajları sağlayabilmek için, bunların hazırlanması ve standardizasyonuna büyük özen gösterilmelidir. Bir test materyalinde kullanılan test kültüründeki sporların rezistanslık farklılıkları, hazırlama sırasında LD_{50} değerlerinin belirlenmesi suretiyle kontrol edilmelidir. Bu iş genellikle 20 adet test materyalindeki sporların % 50 oranında öldürülmesi için gereken zaman veya dozun uygulanması suretiyle yapılır. Bundan ayrı olarak, test için kullanılan materyalin, genelde sterilize edilecek olan malzemenin doğası ile uyumlu olması gerekir. Örneğin; kâğıtla hazırlanmış test materyallerinin, herhangi bir plastik maddeden yapılan bir ürünün, etilen oksit ile sterilizasyonu sırasında kullanılmaları çok hatalıdır. Çünkü kâğıt üzerinde kurutulmuş mikroorganizmalar, etilen okside, plastik üzerindikilerden çok daha hassastırlar. Dolayısıyla, etilen okside belli bir süre maruz bırakılan kâğıt üzerindeki sporların kültürel kontrol sonucunda öldüklerinin saptanmasıyla, aynı tür mikroorganizmaların plastik üzerinde de bulunması halinde onların da öldüğü sonucu çıkarılamaz. Aynı şekilde polivinilklorid şeritlerle yapılmış olan test materyallerinin, radyasyon etkinliğini belirlemede kullanılmaları, radyasyon, bu maddeden bakterisit özellikteki kloru açığa çıkardığı için istenmez.

Bir sterilizasyon işleminde kullanılacak olan test materyallerinin sayısını, bunların içerdiği spor sayısı ve sterilize edilecek maddenin bakteri yükü etkiler.

Sterilize edilecek maddenin bakteriyel yükü çok ender olarak başlangıçta bilinebildiği için, gerekli test materyali sayısını da önceden kesin olarak saptamak son derece güçtür. Bu nedenle test materyali sayısını belirlemede mantıklı bir yol, bunların içerdiği spor sayısını 10^6 dan daha az olmayan bir inaktivasyon faktörü ile eşlemektir. Standart bir otoklavlama sırasında 10^6 adet spor içeren 2 adet test materyali genellikle yeterli olmaktadır. Eğer sonuçta test materyalleri sterilize edilebilmişse bu, 2×10^6 'dan daha büyük bir inaktivasyon faktörüne eşdeğerdir ki, bu işlem çoğu kez yeterli kabul edilebilir. İnaktivasyon faktörü: Belli bir sterilizasyon işlemi ile mikrobiyel popülasyonun azaltılma veya öldürülme oranıdır. Bu faktör seçilen bir sterilizasyon işlemine yüksek rezistanslık gösteren herhangi bir test mikroorganizmasının sterilizasyon öncesi sayısının işlem sonunda bulunan canlı sayıya bölünmesi ile bulunur.

Çizelgede farklı sterilizasyon teknikleri için kullanılması önerilen mikroorganizmalar, test materyalleri ve bunların kontrol şekli gösterilmektedir.

Bakteriyolojik İndikatörler

İşlem	Spor (10^6 adet)	Test Materyali	İnkübasyon
Otoklav	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Kâğıt şerit ya da diskler	55 °C 5 gün aerobik
Kuru Hava	<i>Clostridium tetani</i> (toksik olmayan)	Steril kum	37 °C 5 gün anaerobik
Etilen Oksit	<i>Bacillus globigii</i>	Alüminyum folyo	37 °C 5 gün aerobik
Gamma Rady.	<i>Bacillus pumilis</i>	Kâğıt şerit ya da diskler	37 °C 5 gün aerobik

Test materyalleri ile aşağıdaki nedenlerden bir veya birkaçından dolayı başarı sağlanamayabilir.

- Otoklavda yanlış yerleştirme: Test materyalleri, otoklav içindeki en az efektif bölgeye yerleştirilmelidir. Örneğin; büyük bir otoklavın en ortasına veya sıcak hava sterilizatörünün kapıya yakın en alt rafına konmalıdır.
- Test materyalindeki başlangıç spor sayısının düşük olması: Bu sayı her bir materyal için 10^5 'i den daha az olmamalıdır.
- Sporların rezistanslık düzeyleri: Rezistanslık toprak termofillerindeki gibi olağanüstü yüksek veya tehlikeli bir şekilde düşük olmamalıdır. Rezistanslıktaki düşüklük bazen test materyalinin 6 aydan daha yaşlı olması durumunda görülür.
- Kullanılan test materyalinin, seçilen sterilizasyon yöntemine uygun olması gerekir. Bu konu hakkında bu kısmın başında bilgi verilmiştir.

Test materyalleri deneyimli mikrobiyologlar tarafından kullanılmalı ve rutin sterilizasyon işlemlerinden ziyade, işlemde yapılan herhangi bir değişiklikte bunlardan yararlanılmalıdır. Diğer yandan bakteriyolojik test materyalleri kimyasal test materyalleri ile takviye edilmelidir.

06.02. Kimyasal test materyalleri (indikatörler)

Kimyasal indikatörler, sterilizasyon işlemlerinin rutin kontrolünde uygun bir yöntem olup, süratli sonuç almada büyük avantaj sağlarlar. Bunlar, ya ürüne sterilizasyon işlemi uygulandığını göstermek üzere paket dışına, ya da işlemde uygulanan sterilizasyon sıcaklığına ulaşıldığını göstermek amacıyla paketin içine yerleştirirler. Bunlar genellikle ısı ve radyasyon ile yapılan sterilizasyon işleminde kullanılmakla beraber bazen etilen oksit sterilizasyonunda da kullanılmaktadır. Bir kimyasal indikatörün ısı ile sterilizasyon sırasında renginin değişme derecesi, test sporlarının Z değeri olarak letal (ölüm) etkileri ile kıyaslanabilir. Bu kıyaslama, renk değişimine neden olan sıcaklık derecesinin geçen süreye karşı grafik halinde gösterilmesi ile yapılabilir. Bir kimyasal indikatör için arzulanan Z değeri, otoklav kullanılması halinde 10-15 arasında değişmektedir ki, bu değer bakteri sporları için verilen Z değerine uygundur.

Uygulamada yaygın olarak kullanılan kimyasal indikatörler Diack tüpleri ve otoklav şeritleridir. Diack tüpleri kapalı cam tüpler içine yerleştirilmiş ve sıcaklık 121 °C'a erişince 5-

8 dakikada eriyen veya buharlaşan; soğuduktan sonra renkleri bejden kırmızıya dönüşen tabletlerdir. Bunlar pratikte kullanılmakla beraber buhar penetrasyonunu ölçmeye yaramazlar.

Otoklav şeridi ise, basit olarak paket halindeki eşyaların otoklavlardaki sterilizasyonlarının olup olmadığını anlamada kullanılır. Bu testin olumlu sonuç vermesi, süratli buhar penetrasyonunu ve otoklav içindeki havanın mutlak bir şekilde uzaklaştırılmış olduğunu gösterir. Şeridin otoklavlama işlemi sonucunda renginin uniform olarak değişmesi, emin bir sterilizasyonun göstergesi olarak kabul edilir.

Aşağıda sterilizasyonda kullanılan kimyasal indikatörler verilmiştir.

Sterilizasyonda kullanılan kimyasal indikatörler

İndikatörler	Değişim	Sterilizasyon işlemi
Browne Tüpleri	Kırmızıdan yeşile dönüşür	Basınç altında buhar veya kuru sıcaklıkta kullanılır
Steam – Clox kâğıtları	Mordan yeşile dönüşür	Basınç altında buharda kullanılır
Diack Tüpleri	Erir ve bej renk kırmızıya dönüşür	Basınç altında buharda kullanılır
Otoklav şeridi	Açık renkten koyuya dönüşür	Basınç altında buharda kullanılır
Bowie – Dick şeritleri	Açık renkten koyuya dönüşür	Basınç altında buharda kullanılır
Azo boyalı klorid şeritler	Sarıdan kırmızıya dönüşür	Gamma radyasyonunda kullanılır.
Royce keseciği	Sarıdan mora dönüşür	Etilen oksit sterilizasyonunda kullanılır.

06.03. Elektrikli indikatörler

Otoklavdaki malzemelerin içine veya otoklav ve fırınların çeşitli yerlerine yerleştirilen termokopullar bulundukları yerdeki sıcaklığı doğrudan doğruya ölçmektedirler. Bunların elektrotlarının uçları sıcaklığa hassas kurşundan ibaret olup sterilizatör dışındaki bir kaydedici alete bağlıdır. Kontrol için seçilen paketlerin içine uçların yerleştirilmesi halinde buharın kurşun boyunca paket içine yoğunlaşmasını önlemek amacıyla gerekli önlemler alınmalıdır. Aksi takdirde buharın paket içine kurşun taşınması sonucunda kurşun zehirlenmesi görülebilir.

Geniş çapta, şişelenmiş sıvıların sterilizasyonunda kullanılan tek cidarlı otoklavlarda malzemeye ısı penetrasyon süresini güvenilir bir şekilde ölçmek amacıyla, her zaman bu termokopullar kullanılmaktadır. Kurşun uçlar otoklavın çeşitli seviyelerindeki şişeler içine daldırılarak istenen sıcaklığa ulaşma ve bu sıcaklıkta tutulma süreleri tespit edilir. Ancak bu yapılırken uçların şişe duvarına veya tabanına değmemesine özen gösterilir.