

MİKROBİYOLOJİ LABORATUVAR (ÖZET)

I.DÖNEM TAMAMI

(2010-2011)

ÖZGÜN FOTOKOPİ

TEL : (0216) 450 13 58

MİKROBİYOLJİ LABORATUVARINDA ÇALIŞMA KURALLARI

Mikroskopların objektiflerinin temizliği için ksilol veya alkol batırılmış ve iyice sıkılmış yumuşak bir bez kullanılmalıdır. Çünkü :

Objektiflerin temizliği için bol miktarda alkol ve ksilol kullanılması objektiflerdeki balsamın erimesine ve dolayısıyla objektiflerin bozulmasına neden olur

STERİLİZASYON

Sterilizasyon mikroorganizmaların vejetatif ve spor şekillerinin öldürülmesi işlemidir.

→ Farmasötik ürünlerin imalatında, (kozmetikler) (steril olması gereken ürünler intravenöz kullanılan ilaçlar, göze uygulanan preparatlar vb)

→ Gıda endüstrisinde,

→ Tıbbi aletlerin temizliğinde,

→ Laboratuvar çalışmalarında kontamine olan materyalin mikroorganizmalardan arındırılmasında

ve bir çok alanda kullanılmaktadır

STERİLİZASYON YÖNTEMLERİ

1- Fiziksel Yöntemler :

A) Sıcaklık ile sterilizasyon

A.1) Kuru sıcaklık ile sterilizasyon

→ Kızıl dereceye kadar ısıtma ve yakma

→ Alevden geçirme

→ Yüksek sıcaklıklardaki fırınlarda bekletme (Pastör Fırını)

B) Işıklar ile sterilizasyon

A.2) Nemli sıcaklık ile sterilizasyon

→ Kaynatma ve Tindalizasyon

→ Buharla sterilizasyon

→ Akım halinde Buhar (Basing Buhar) - Sız

→ Koagulatör

→ Koch kazanı

→ Basıncılı Buhar

→ Otoklav

A) SICAKLIK İLE STERİLİZASYON :

* Steril edilecek malzemenin ısıya dayanıklı olması gerekir.

* Yüksek sıcaklık etkisiyle mikroorganizmaların proteinleri denatüre olur, mikroorganizma canlılığını kaybeder.

* Isı ile sterilizasyonda, mikroorganizmaların vejetatif şekilleri spor şekillerinden daha duyarlıdır. Spor şekilleri az su içerdiklerinden dayanıklıdır, kolay öldürülemezler.

A.1) KURU SICAKLIK İLE STERİLİZASYON :

a) Kızıl dereceye kadar ısıtma

Aleve tutulduğunda bozulmayan iğne ve öze gibi sık kullanılan aletler bu şekilde steril edilebilir.

b) Alevden geçirme

- * Tek başına bir sterilizasyon yöntemi değildir.
- * Sterilizasyonu korumak amaçlı yapılır.
- * Tüp, lam gibi mabemeler

Alev başında geliştiğinde gelişilen bölgedeki mikroorganizmalar hava akımı ile birlikte yukarı yönde hareket ederler. Alevin alt kısmında mikroorganizmaların bulunmadığı aseptik bir saha oluşur.

- * Lamların örnek hazırlanacak yüzeyleri 3 kez ekmek keser gibi alevden geçirilerek steril edilebilir.

c) Yüksek Sıcaklıklardaki Fırınlarda Bekletme

PASTÖR FIRINI

Sıcaklık sürekli olarak aynı seviyede kalır.

Pastör Fırınında Steril Edilebilecek Malzemeler:

- Cam malzemeler: Tüp, balon gibi malzemelerin ağzı pamukla kapalı, petriler ambalaj kağıdı ile sarılı, pipetler madeni kaplar içinde steril edilir.
- Metal malzemeler: Penset, makas, bistüri (kesici aletlerin keskin yüzeyleri yüksek sıcaklıkta köşleştirebilir.)
- Yağlar ve tozlar: Talk, parafin, vazelin
- Süzgeç kağıtları

Pastör Fırınında sterilizasyon süresi: **170°C 'de 1 saat**

Pastör Fırınında sterilizasyonda Dikkat Edilmesi Gerekenler:

- Gevşek olarak yerleştirilmeli
- Alet istenilen sıcaklığa ulaştıktan sonra süre tutulmalı
- Süre bitiminde fırının kapağı aniden açılmamalı
- Islak ve nemli malzemeler pastör fırınına konulmamalı (Cam malzemeler çatlayabilir)

Pastörizasyon: Bir sterilizasyon yöntemi değildir.

DEZENFEKSİYON YÖNTEMİDİR.

Süt ve süt ürünleri ile meyve sularında bulunan patojenlerin öldürülmesi amacıyla kullanılır.

! Bakterilerin spor şekilleri ölmez, sadece vejetatif şekilleri ölür.

Bu nedenle pastörize edilmiş ürünler açıldıktan sonra kısa süre içinde tüketilmelidirler.

70°C 'de bekletilip birden 10°C 'ye düşürülerek

UHT yöntemi (ultra high temperature):

Sütün ve sıvı maddelerin steril edilmesi amacıyla kullanılır.

! Isıya çok dayanıklı sporeler ölmeyebilir de vejetatif şekile dönüşme özelliklerini kaybettiklerinden sterilizasyon sağlanmış olur.

**Sıvılar 140°C 'ye kadar ısıtılmış sıcak yüzeylere püskürtülür
11 saniye tutulup aniden soğutulur**

A-2) Nemli Sıcaklık ile Sterilizasyon :

a) Kaynatma ve Tindalizasyon

a.1) Kaynatma ile Sterilizasyon :

Kapalı bir kaptaki 100°C'de 30 dakika kaynatmakla bakterilerin vejetatif şekilleri ile bazı bakterilerin spor şekilleri ölür.

Kaynatma ile steril edilebilecek malzemeler :

- Isıtılmakla bozulmayan gıdalar, cam eşya, pens, makas, bistürlü gibi madeni eşyalar (lam-lamel)

Kaynatmada sterilizasyon süresi : 100°C'de 30 dakika

Kaynatmada sterilizasyonda dikkat edilmesi gerekenler :

- Steril edilecek malzemeler suyun içine tamamen batırılmalı
- Damıtık su kullanılmalı (metal aletlerin bozulmaması için)
- Süre kaynama başladıktan sonra tutulmalı

a-2) Tindalizasyon ile Sterilizasyon (parçalı ısıtma) :

- Sıcaklık derecesi ayarlanabilen su banyosu (Benmari) kullanılır.

- 60°C'de 1 saat bekletildikten sonra çıkarılarak oda sıcaklığında 1 gece bekletilir. İlk ısıtma ile mikroorganizmaların vejetatif şekilleri ölür.

Spor şekilleri ölmez. Oda derecesinde bekletildiğinde sporlar açılır. Aynı işlem arka arkaya üç gün tekrarlanır. 3. günde sterilizasyon sağlanmış olur.

Tindalizasyon ile steril edilebilecek malzemeler :

- Yüksek sıcaklıklarda bekletilmekle bozulan besiyerleri (şekerli, jelatinli)

Tindalizasyon ile sterilizasyonda dikkat edilmesi gerekenler :

- Sadece BESİYERLERİ için uygulanmalıdır. (sporların açılmayacağı, besiyer değeri olmayan gıdalar bu şekilde steril edilmemelidir.)

- Besiyeri benmarideki suyun içine tamamen daldırılmalıdır. Tindalizasyonun sterilizasyon süresi : 60°C 1 saat

b) Buharla Sterilizasyon

BESİYERLERİ ve GİDALAR için uygundur.

Ortam buharlı olduğu için ısıtma sırasında gıdalarından su kaybı olmaz

b1) Akım halinde buharla sterilizasyon (Basınsız buhar)

KOCH KAZANI

AH haznede ısıtılan su 100°C sıcaklığa ulaştığında kaynamaya başlar. Oluşan buhar üst kapaktaki deliklerden dışarı çıktığı için kazanın içinde basınç oluşmaz.

Otoklavlar kapağı açık geliştirilerek Koch kazanı işlevini görürler.

• Jelözelli besiyerlerinin eritilmesi, yüksek sıcaklıkta bozulan besiyerlerinin sterilizasyonu için kullanılır.

Koch kazanında sterilizasyonun süresi : 100°C 60 dk

Koch kazanında dikkat edilmesi gerekenler:

- Su haznesindeki su kontrol edilmelidir.
- Fazla buharlaşmadan dolayı su eksilirse tamamlanmalıdır.
- Distile su konulmalı (sert sular kireç oluşumuna neden olur.)
- Kaynama başladıktan sonra süre tutulmalıdır.

KOAGÜLATÖR : Proteinli besiyerlerinin pıhtılaştırılması ve sterilizasyonunda kullanılır. 85°C 1 saat

b-2) Basıncalı buhar ile sterilizasyon:

DOYMUS ve BASINÇ ALTINDA SU BUHARINDA 100°C 'nin ÜZERİNDEKİ SICAKLIKLARDA sterilizasyon.

OTOKLAV

Su dış kazanda bulunur, iç kazan steril edilecek malzemenin bulunduğu kısımdır. Dış kazandaki su  ısınmaya başlar 100°C 'ye geldiğinde dış kazandaki oluşan su buharı iç kazana dolmaya başlar, buhar tahliye vanası açık bırakılır, buradan kesintisiz buhar çıkıncaya kadar beklenir. (Böylelikle içeride hava kalmaz, otoklavın içinde kalan hava çıkartılmazsa sıcaklığın her yerde eşit dağılması sağlanmaz çünkü hava kötü bir iletkenidir.) Buhar tahliye vanası kapatıldıktan sonra iğnerinin basıncının 1 atm'ye gelmesi beklenir.

Otoklavda sterilizasyon süresi: 121°C 1 atm 15 dakika

Otoklavda Dikkat Edilmesi Gerekenler:

Balonda hazırlanan besiyerleri hemen otoklavdan çıkarılmamalı, 5-10 dk sonra çıkarılmalıdır. (sıvıların kaynama yapıp pamukları dışarı atmaması için)

Otoklavda Sterilizasyonun Kontrolü:

1- Maximal Termometre: Otoklavın iğnerinin sıcaklığının ölçülmesi için geliştirilmeden önce iğne yerleştirilir. Sıcaklık yükseldiği noktada kalır. Otoklav açıldıktan sonra değer okunur.

2- Browne Tüpleri: Belirli sıcaklıkta gerekli süre tutulduğunda iğnerindeki kırmızı renkli sıvı yeşile dönüşen ayıracıklı tüplerdir. 121°C 15 dk bekletilince olur. Otoklavda ambalaj kağıdına sarılarak buharın en zor ulaşabileceği yere konur.

3- Otoklav bandı: Üzerinde beyaz çizgiler bulunan yapışkan bantlardır. Otoklav sonrasında banttaki çizginin siyaha dönmesi sterilizasyonun tam olduğunu gösterir.

4- Bazı maddelerin erimesinin gözlemlenmesi: Ergime dereceleri bilinen maddeler tüplere konularak otoklavlanmadan sonra eriyip erimedikleri gözlemlenir.

5- Bakteri sporları: *Bacillus stearothermophilus* veya *Bacillus subtilis* sporları 121°C 'de 12 dk 'da ölürler. Bu sporları içeren zarf otoklava konur, sterilizasyon sonrasında bu sporlar aerob ve anaerob üremeye bırakılır. Üremenin görülmesi durumunda sterilizasyonun tam olduğu sonucuna varılır. Eğer üreme görülürse üreyen bakterinin sporlu bir bakteriyi yoksa bir kontaminasyon mu olduğunun araştırılması gereklidir.

- Otoklarda steril edilecek malzemeler :
- Cerrahi malzemeler (pens makas bistüri)
 - Boş şişeler
 - Sargı bezleri, örtük, çarşaf gibi malzemeler
 - Besiyerleri (121°C dayanıklı olan) , gözeltiiler
 - Laboratuvar atıkları

Sıvı sterilizasyonunda çok kullanılır.

STERİLİZASYON YÖNTEMLERİ

2. Kimyasal yöntemler :

DEZENFEKSİYON

Ortamdaki patojen mikroorganizmaların öldürülmesi işlemidir.

Cansız eşyalara uygulanır.

Dezenfektan maddenin çok fazla sulandırılarak insan ve hayvan vücuduna uygulanması işlemine antisepsi bu amaçla kullanılan maddelere antiseptik madde denir.

Dezenfeksiyon sonrasında ortamdaki mikroorganizmaların sayısı azalır, çoğalmaları durur.

Dezenfeksiyonu etkileyen faktörler :

- Kullanılan maddelerin yapısı
- Mikroorganizmalarla temas süresi
- Dezenfektanın yoğunluğu
- Sıcaklık
- pH
- Ortamda bulunan diğer maddeler (protein artıkları olumsuz yönde etkiler)

Sterilizasyon amacıyla kullanılan kimyasal maddeler :

Etilen oksit : Bütün mikroorganizmalar üzerinde toksik etkili bir maddedir.

sıvı halde $\xrightarrow{108^{\circ}\text{C}}$ gaz halde ÇOK TOKSİK , İRRİTAN , PATLAYICI , PENETRAN

Etilen oksit ile steril edilebilen malzemeler :

- Isıya dayanıksız plastik maddeler (tüp, pipet, petri kutusu, örnek alma kapları, enjektörler)
- Petrilerde hazır besi yerleri
- Laboratuvar gereçlerinin sterilizasyonu
- Battaniler
- Deri ve kauçuktan yapılmış malzemeler
- Solunum aygıtları
- Tıbbi malzeme (katgüt, katater, yapay organ parçaları)

Formaldehit : Oda dezenfeksiyonu için gaz halinde kullanılır. Oda 24 kapalı tutulduktan sonra açılır.

Sporlar dahil bütün mikroorganizmalar üzerinde öldürücü etkisi vardır.

Gaz ortamdan uzaklaştırmak için suda hazırlanmış NH_3 kullanılır.

Formaldehit ile steril edilebilen malzemeler : Kumaş, deri, tahta, lastik ,

sıcaklığa dayanıksız olan plastik materyaller