
Süzme ile Sterilizasyon Sağlanabilir mi? Süzgeç Çeşitleri Nelerdir? Etkinliği Nasıl Ölçülür? Hangi Amaçlarla Nasıl Kullanılırlar?

Yrd. Doç. Dr. Neşe DEMİRTÜRK

Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, AFYON

Süzme (filtrasyon) ile sterilizasyon, fiziksel sterilizasyon yöntemlerinden biridir. Hava, serum ve diğer kan ürünleri, aşular, ilaçlar, damar içi sıvılar, enzimler, vitaminler, laboratuvar çözeltileri gibi ısıya dayanıksız sıvıların sterilizasyonunda süzme yöntemi tercih edilir. Diğer sterilizasyon yöntemlerinden farklı olarak süzme yönteminde, mikroorganizmalar öldürülmez ancak ortamdan uzaklaştırılır.

Süzme ile sterilizasyon özel süzgeçler kullanılarak yapılır. Süzgeçler süzme mekanizmalarına göre iki tiptir:

1. Mikroorganizmaları Adsorbsiyon Mekanizması ile Tutan Süzgeçler

Bu süzgeçlerle süzme sırasında bakteriler süzgeç elektriğine göre daha negatif elektrik taşımaları nedeni ile süzgeç aralıklarının duvarlarına adsorbe olurlar. Süzüntüye geçemezler. Ancak süzgeç aralıkları yani porlar düzensiz ve birbirinden farklı büyüklüklerde. Bakterilerin boyutlarından daha büyük olabilirler. Virüsleri ve bakteri ürünlerini süzemezler. Ayrıca bu süzgeçler süzülen madde içerisindeki bazı aktif elemanları tutarak süzülen maddenin niteliğini etkileyebilir. Bu mekanizma ile çalışan başlıca süzgeçler; diatom toprağından yapılan **Berkefeld** süzgeçleri, sırsız porselenden yapılan **Pastuer** ve **Chamberland** süzgeçleri, sıkıştırılmış asbestten yapılan **Seitz** süzgeçleri ve sıkıştırılmış cam tozundan yapılan süzgeçlerdir. **Berkefeld**, **Pastuer** ve **Chamberland** süzgeçleri buji şeklindedir. **Seitz** süzgeçleri ve cam tozundan yapılan süzgeçler ise disk şeklindedir.

Seitz süzgeçleri: Komple olarak etrafı gümüşle kaplı veya paslanmaz çelikten yapılmış özel metal parçadan ve bir de metal elekten oluşur. Otoklavda sterilize

edildikten sonra kullanılır. Asbest filtre de bu metal parçalardaki elek üzerine monte edilir. Alkali özelliktedirler ve süzütünün pH'sını alkaliye kaydırabilirler. Her süzmeden sonra yenilenmeleri gerekir. Seitz süzgeçlerinin delik çaplarına göre birçok türleri vardır. Bakterileri tutan EK (entkeimung) ve sıvıları berraklaştıran K gibi süzgeçlerden mikrobiyoloji laboratuvarında, gereğine göre, önce K sonra da EK tipleri kullanılabilir. Seitz süzgeçlerinin sıvıları absorbe özelliği yanı sıra bazı toksik maddeleri de sıvıya verme durumları da vardır. Bu nedenle, süzme işleminden önce, süzgeçten steril distile su geçirilerek yıkanır ve olumsuz etkileri giderilir. Sonra, bu süzüntü çekilerek alınır ve süzülmek istenen sıvı süzülür. Kullanıldıktan sonra asbest diskler atılır. Seitz süzgeçlerinin çok eski bir tarihi olmasına karşın bugün de hala kullanıldığı yerler vardır.

Berkefeld süzgeçleri: Fosil diatome toprağından yapılmıştır. Sıvıları emme kabiliyeti fazladır. Delik çapları çok değişik olarak imal edilir. Por çapına göre başlıca üç türü vardır; kaba (V), normal (N) ve ince (W). En ince olması nedeni ile, en çok (W) tipi kullanılır ve bu tür mikroorganizmaları geçirmez. Bu tür süzgeçler kullanmadan önce, aralıklarında biriken bakteri artıklarından temizlenmeleri için ısı ile kızıl dereceye kadar ısıtılarak sterilize edilirler. Kullanılan süzgeçler, kurutulur ve tekrar sterilize edilerek kullanılırlar. Kullanım sonrasında çok ince fırça ile temizlenir ve suda kaynatılırlar. Daha sonra, dıştan içeri su geçirmek suretiyle temizlenirler. Eğer organik madde ile tıkanıklık meydana gelmişse süzgeç fırında yakılarak bu tıkanıklık giderilir. Tarihsel değeri vardır. Bugün kullanılmamaktadır.

Cam tozu süzgeçleri: Cam tozlarının bir araya getirilip birleştirilmesinden oluşur. Cam süzgeçler de por çaplarına göre E (çok kaba), C (kaba), M (orta), F (ince), UF (çok ince) olarak yapılmıştır. Laboratuvarlarda çeşitli amaçlar için kullanılır. Cam hunilere monte edilerek kullanılır. Özel bir filtrasyon aparatı ile beraber otoklavda sterilize edilirler. Kullanıldıktan sonra akan su ile ters yönde yıkanır. Lüzum halinde, KNO_3 ihtiva eden sıcak H_2SO_4 solüsyonu, filtreyi temizlemek için kullanılır. Sülfirik asit + bikromat karışımı temizlemek için kullanılmaz. Bugün çok nadiren kullanılmaktadır.

Chamberland süzgeçleri: Çeşitli por çaplarına sahiptir. Bu özelliğine göre L_1a , L_2 ve L_3 tipleri, Berkefeld süzgeçlerinin (V) (N) ve (W) bujilerinin eşdeğerindedir. Kullanıldıktan sonra temizlenir, kurutulur ve otoklavda sterilize edilir. Tarihsel değeri vardır.

2. Mikroorganizmaları Mekanik Tutma Mekanizması ile Tutan Süzgeçler

0.005-1 μm 'ye kadar değişen belirli çaplarda porlar içeren membran ve ultra-filtrelerdir (Şekil 1). Disk şeklindedirler ve özel süzgeç tutarlara monte edilerek kullanılırlar. Tek kullanımlıdır. Bu süzgeçler inert selüloz asetat, polikarbonat veya teflon, naylon gibi çeşitli plastik maddelerden yapılırlar. En çok kullanılanlar selüloz membran filtrelerdir. Başlıca iki tür selüloz membran filtre vardır. Biri eski tip olan selüloz nitrat (gradokol membran) diğeri de yeni veya modern tip olan selüloz asetat filtreleridir. Gradokol membranlar, çeşitli por çaplarında (3 nm-10 nm) yapılabilir. Genellikle virüslerin büyüklüğünü ölçmede kullanılırlar.



Şekil 1. Selüloz asetatından yapılmış 0.20 µm por çaplı 13 mm'lik membran filtreler.

Milipor filtreler de aynı şekilde delik çapları değişik büyüklükte (8 µm-0.01 µm) hazırlanmaktadır. Selüloz asetat filtrelerde iki tabaka vardır. Basal tabakada 3-5 µm ve üst tabakada 0.1-1.0 µm çapında porlar bulunur. Bu nedenle bakteriler üst tabakada tutulurlar. Otoklava (121°C) 35-45 dakika dayanabilirler. Filtre disklerinin çapları 1.7-14 cm kadar olabilir. Özel metal veya cam tutucularda muhafaza edilirler. Selüloz filtreler, adsorbsiyon kapasiteleri daha az olduğu için Seitz filtrelerine tercih edilirler. Ayrıca süzme kapasiteleri daha hızlıdır. Modern membran süzgeçlerin çevresinde 3 mm eninde ıslanmaz nitelikte bir çember bölümü vardır ve bu bölüm süzgeç tutarın kapattığı bölgeyi oluşturur, süzme işlemi sırasında ıslanmaz. Süzgeç tutarlar ise paslanmaz çelik, pyrex cam, oksitlenmeyen metal (gümüş) kaplamalı veya otoklavlanabilir plastik maddelerden (sterifil) yapılırlar, iki parçalıdır ve içine disk şeklindeki süzgeç konduktan sonra sıkıca kapatılırlar. Süzüntü genellikle süzgeç tutarın alt tarafında bulunan kapta toplanır. Bu tür bölmesi olmayanlarda ise alt çıkış delikli lastik mantardır ve buradan akan süzüntü emzikli erlenmayerlerde toplanır.

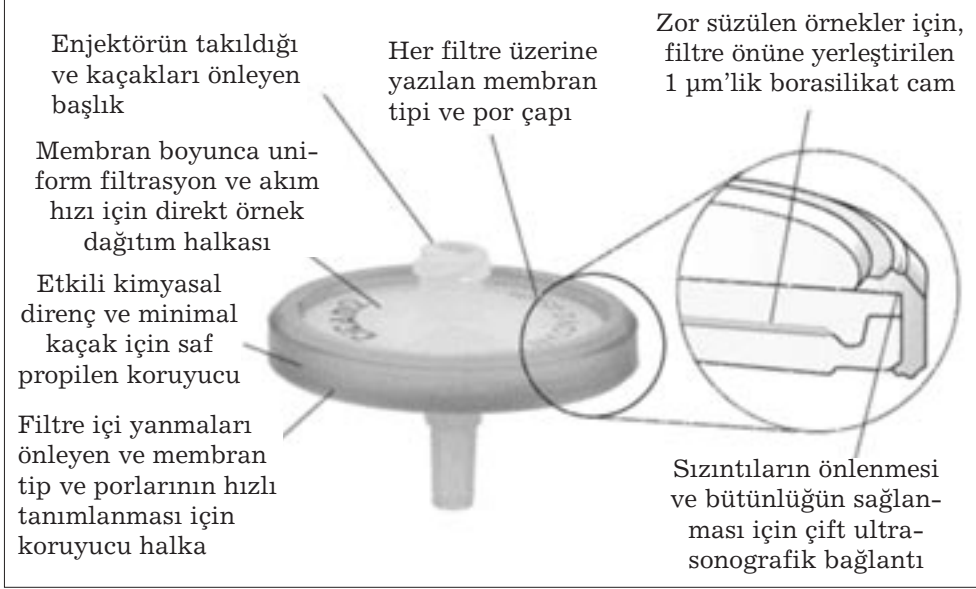
Günümüzde adsorbsiyon mekanizması ile çalışan süzgeçler artık pek kullanılmamaktadır. Bunların yerine membran filtreler tercih edilmektedir. Membran filtreler standardize edilebilme, istenilen gözenek çapında üretilebilme, filtre edilen sıvının çok azını adsorbe etme, süzmeyi daha hızlı yapma ve tek kullanımlık olma gibi özellikleri nedeni ile diğer süzgeçlere üstünlük göstermektedir. Bu filtrelerden gözenek çapları 0.22 µm ve 0.45 µm olanlar bakterileri, ≤ 10 nm olanlar ise virüsleri tutar. Mikrobiyolojide önem taşıyan membran filtre tipleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Mikrobiyolojide önem taşıyan membran filtre tipleri.		
Filtre tipi	Por (gözenek) çapı	Süzme değeri (su için mL/dakika/cm²)
RA	1.2 µm ± 0.3 µm	300
AA	0.8 µm ± 0.05 µm	220
DA	0.65 µm ± 0.03 µm	175
HA	0.45 µm ± 0.02 µm	65
PH	0.30 µm ± 0.02 µm	40
GS	0.22 µm ± 0.02 µm	22
VC	100 nm ± 8 nm	3
VM	50 nm ± 3 nm	1.5
VF	25 nm ± 2 nm	0.5

Membran Filtreler ile Süzme İşlemi

Öncelikle süzgeç, süzgeç tutar, süzme işlemi sırasında sıvının konulacağı ve süzütünün toplanacağı kaplar ayrı ayrı ambalajlanarak otoklavda sterilize edilmelidir. Süzgeç diskleri süzgeç tutarlardan ayrı olarak, petri kutularında her süzgecin arasına bir kurutma kağıdı konularak sterillemelidir. Daha sonra steril bir pensetle tutularak steril hale getirilen süzgeç tutarların içine konur. Süzme işlemi sırasında süzülecek sıvı tarafına pozitif ya da süzüntü tarafına negatif basınç uygulanır. Genellikle çok az miktardaki sıvılar süzülürken süzülecek tarafa enjektör yerleştirilerek pozitif basınç verilirken fazla miktardaki sıvıların süzülmesinde süzüntü tarafına negatif basınç uygulanır. Negatif basınç uygulamak için süzütünün toplanacağı kabın emziğine vakum pompaları yerleştirilir. Pompalar çalıştırılırken aniden yüksek basınç verilmesinden, süzgeçlerin yırtılmasına neden olacağı için, kaçınılmalıdır. Birçok ticari firma tarafından üretilen değişik membran filtre sistemleri mevcuttur (Şekil 2).

Süzülecek sıvılar, niteliklerine göre gerekirse, daha büyük gözenekli süzgeçler kullanılarak bir ön süzmeden geçirilirler. Saf su, suda erimiş eriyikler, serumsuz ya da en çok %2'lik serumlu yoğun olmayan sıvılar ön süzme gerektirmez. 0.45 µm ya da 0.22 µm'lik por içeren süzgeçlerden 12 P.S.İ negatif basınç ile emilerek süzülürler. İçinde %0.5 ve daha fazla serum bulunan sıvıların süzme ile uygun şekilde steril edilmesi için öncelikle serumun ayrı bir işleme tabi tutulması daha sonra sıvı ortama katılması gerekir. Örneğin, serumlu bir besiyeri süzme ile steril edilirken, serum önce 2500 devirde 25 dakika santrifüjlenir, sonra üstte kalan kısım 1.2 µm porlu bir süzgeçten geçirilir. Daha sonra 0.45 µm porlu süzgeçten süzülür ve sonra besiyerine katılarak besiyeri 0.22 µm porlu süzgeçten süzülürken uygun sterilizasyon sağlanmış olur.



Şekil 2. Bir ticari firmanın ürettiği membran filtrelerin kullanıldığı filtrasyon sistemi görülmektedir.

Membran filtreler sterilizasyon dışında karışımlardaki mikroorganizma tiplerini ayırmak için, suların bakteriyolojik incelenmesi için, çeşitli mikrop ürünlerini elde etmek ve bakteriyofaj çalışmaları için kullanılmaktadır.

Süzgeçler Nerelerde Kullanılır?

Süzme ile sterilizasyon, tıp dışında (gıda ve tekstil endüstrileri gibi) daha çok kullanılan, özellikle suyun sterilizasyonunda tercih edilen bir yöntemdir. Tıpta yüksek sıcaklık ve kimyasal maddeler ile yapısı bozulan sıvıların sterilizasyonu ve toksin ve diğer mikrop ürünlerini elde etmek için kullanılır. Bunun dışında son kaplarında sterilize edilemeyen çözelti ve sıvı şeklindeki farmasötik ilaçlar bu yolla sterilize edilirler. İlaçlar önceden sterilize edilmiş bir kaba, por çapı 0.22 µm veya daha az olan veya en azından buna eşdeğer mikroorganizma tutma özelliği olan steril filtreden süzülebilir. Bu tip filtreler, bakterileri ve mantarları uzaklaştırabilir, fakat tüm virüsleri ve mikroorganizmaları tutamaz. Filtrasyon işleminin belirli derecede ısı uygulanması ile desteklenmesi yararlı olabilir. Bu amaçla kullanılan filtrelerin ortama lif vermemesi ve ürünü oluşturan maddeleri ortamdan ayırarak veya ürüne madde vererek, ürünü etkilememesi gerekir.

Süzgeçlerin Denetimi

Süzgeçler dokularında oluşabilen çatlak ve yırtıklar nedeni ile yeterince görev yapamayabilirler. Bu nedenle sterilizasyon gücünün kontrol edilmesi gereklidir. Sterilizasyon işleminin tam yapılıp yapılmadığının denetlenmesi için kullanılan yöntemler şu şekilde sıralanabilir:

1. Filtreler üzerinde gözle görülür çatlak ve yarık olup olmadığının kontrolü.
2. Süzüntünün incelenmesi: Süzme işlemi tamamlandıktan sonra süzüntüden alınan örnekler üç adet aerop ve üç adet anaerop besiyerine ekilir ve inkübasyona bırakılır. Yirmiyedi günlük bekleme süresi sonunda üreme olmazsa süzme yeterli ve süzgeçler sağlam demektir.
3. Süzüntünün yeniden süzülmesi: İlk süzme işleminden sonra süzüntü ikinci bir kez yeni bir süzgeçten süzülür. Bu ikinci işlemden sonra kullanılan yeni süzgeç steril bir pensetle tutularak steril bir makas ile ikiye bölünür. Yarısı anaerop diğer yarısı aerop bir besiyerine ekilerek inkübasyona bırakılır. İki-beş günlük bekleme süresi sonunda üreme olursa ilk işlemde kullanılan süzgeç sağlam değil demektir.
4. Köpürme noktasının saptanması: Membran filtreler için kullanılan bir yöntemdir. Denetleme işleminin süzme işleminden önce ve sonra yapılabilmesi ve dolayısı ile kullanılan süzgecin sağlamlığının başta ve sonda kontrol edilmesi nedeni ile en kullanışlı denetleme yöntemidir. Ayrıca en hızlı sonuç veren yöntemdir. İşlem şu şekilde uygulanır: Süzgeçten önce steril saf su süzülür. Süzme bittikten sonra süzgecin porlarında bir miktar su takılı kalmıştır. Süzgecin üzerinden yavaşça pozitif ya da altından negatif basınç uygulandığında, kılcallık olayı nedeni ile süzgeç porlarına takılmış olan su, basınca rağmen bir noktaya kadar yerinden atılamaz. Basınç biraz daha arttırılırsa su yerinden ayrılırken köpürme görülür. Bu köpürme noktasında uygulanan basıncın miktarı süzgeç porlarının çapı ile ters orantılıdır. Örneğin; 0.2 µm por çaplı süzgeçler için 3.7 kg/cm² iken, 0.45 µm por çaplı süzgeçler için 2.3 kg/cm² olduğu gibi. Yırtık ve bozuk süzgeçlerde bu direnç kaybolur ya da azalır ve köpürme noktası görülmez.

KAYNAKLAR

1. Arda M. Bakterilerin üremelerine etkili faktörler. <http://www.mikrobiyoloji.org/docgoster.asp?dosya=110010900#05.02>
2. Bilgehan H. Süzme (filtrasyon) ile sterilleme. Bilgehan H (editör). Klinik Mikrobiyolojik Tani. 2. baskı. İzmir: Fakülteler Kitabevi, 1995:44-6.
3. Bilgehan H. Süzme (filtrasyon) ile sterilleme. Bilgehan H (editör). Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. 8. baskı. İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, 1996:195-8.
4. <http://www.labhut.com/products/filters/titan.php>
5. Johansson CB. Filtrasyon (süzme) ile sterilleme. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (editörler). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 1. baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002:336-7.
6. Yenipazar N. Steril farmasötik ilaçların imalatı. <http://www.geocities.com/SiliconValley/Campus/4400/steril.htm>