

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2011

Neija Metsäranta

# *VIBRIO FISCHERIN* KASVATUS BIOREAKTORISSA JA KYLMÄ- KUIVAUS



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Neija Metsäranta

## VIBRIO FISCHERIN KASVATUS BIOREAKTORIS- SA JA KYLMÄKUIVAUS

Työn tarkoituksena oli selvittää, onnistuuko *Vibrio fischeri* – bakteerien kasvatusta bioreaktorissa, ja mitä parametreja kasvatuksessa tulisi käyttää. Toinen tarkoitus oli kehittää kylmäkuivausvaihetta siten, että lopputuotteesta saataisiin esim. kakkumainen tabletti, joka voitaisiin pakata muihin kuin aikaisemmin käytettyihin ampulleihin.

Kasvatuksessa edettiin vaiheittain maljakasvatuksesta esikasvatukseen ja siitä edelleen pääkasvatukseen bioreaktorissa. Ennen kuin esikasvatuksesta ja pääkasvatuksesta voitiin siirtyä seuraaviin vaiheisiin, valontuotto ja sameus täytyi mitata, ja niiden tuli ylittää ohjeissa annetut arvot.

Kylmäkuivausta ennen solut kerättiin ja ne suspensoitiin kylmäkuivausmediumiin. Tästä suspensiosta säädettiin valotaso halutuksi. Kylmäkuivaus suoritettiin ampulleissa ja 96-kuoppalevyillä. Myös pakastamista kasvatuksen ja kylmäkuivauksen välillä kokeiltiin, jotta nähtiin, toimivatko reagenssit pakastuksen jälkeen. Jos reagenssia valmistettaisiin suurempi erä, pakastaminen olisi välttämätöntä, mikäli kaikki reagenssit eivät mahtuisi kuivuriin yhtä aikaa.

Valmiit reagenssit testattiin referenssikemikaaleilla niiden toimivuuden varmistamiseksi. Testejä toistettiin muutaman viikon välein, jotta nähtiin, miten valotaso säilyy lyhyen säilytyksen aikana.

Kuivaus onnistui sekä ampulleissa, että 96-kuoppalevyillä. Kuoppalevyillä kuivatusta reagensseista tuli kakkumaisia tabletteja, kuten oli tavoitekin. Testien tulokset osoittivat, että valotaso oli alusta asti alhaisempi kuin oli tarkoitus, mutta säilytyksessä valotaso ei kadonnut. Pakastukseen ei näyttänyt vaikuttavan suuresti valotasoon. Kuoppalevyillä kuivatessa ongelmaksi muodostui kosteuden kerääntyminen reagensseihin kuivauksen jälkeen.

Tulevaisuudessa kuivausta 96-kuoppalevyillä tulisi kehittää siten, että reagenssit saataisiin pakkautua tiiviiksi mahdollisesti jo kylmäkuivurissa, jolloin kosteus ei pääsisi kerääntymään reagensseihin. Lisäksi reagenssien valotaso tulisi testata pidemmän säilytyksen jälkeen ja eri lämpötiloissa säilyttämisen jälkeen.

### ASIASANAT:

bioluminesenssi, bioreaktori, kylmäkuivaus, *Vibrio fischeri*

Neija Metsäranta

## CULTIVATION OF *VIBRIO FISCHERI* IN A BIOREACTOR AND FREEZE DRYING

The aim of the study was to find out if it is possible to grow the *Vibrio fischeri* bacterium in a bioreactor and what parameters should be used in the process. Another aim was to develop the freeze drying phase to obtain a cake or pill-type final product which could be packed into something other than the previously used vials.

The cultivation proceeded phase by phase from a petri dish culture to precultivation in tubes and finally to the main cultivation in a bioreactor. Before proceeding to the next step from the precultivation and the main cultivation, luminescence and turbidity were measured and had to exceed values given in the instructions.

Before freeze drying the cells were collected and resuspended with freeze drying medium. Luminescence was adjusted in the suspension. Freeze drying was performed in vials and on 96-well plates. Also freezing between the cultivation and freeze drying phases was tested to know how freezing affects the luminescence of the reagents. If reagents are produced as a bigger batch, freezing is necessary because all the reagents might not fit inside the dryer at the same time.

The dried reagents were tested with reference chemicals to verify that they work. The tests were repeated at intervals of a few weeks to see if the luminescence decreased during storage.

The drying succeeded in both the vials and on the 96-well plates. The reagents dried on the 96-well plates became like pills as was desired. The test results showed that luminescence was lower than wanted already from the beginning but it did not decrease much during storage. Freezing did not affect the luminescence much, either. The problem when drying on the 96-well plates was that the reagents absorbed moisture.

In the future, freeze drying on the 96-well plates should be developed by tightly packing the reagents already inside the freeze dryer to prevent the accumulation of moisture. Also the luminescence of the reagents should be tested after longer storage periods and after storage in different temperatures.

### KEYWORDS:

bioluminescence, bioreactor, freeze drying, *Vibrio fischeri*

# SISÄLTÖ

<b>1 JOHDANTO</b>	<b>7</b>
<b>2 <i>VIBRIO FISCHERI</i></b>	<b>8</b>
2.1 Bioluminesenssi	8
<b>3 KASVATUS BIOREAKTORISSA</b>	<b>11</b>
3.1 Bioreaktorin rakenne	11
3.2 Panostoimiset ja jatkuvatoimiset bioreaktorit	12
3.3 Bioreaktioiden kontrollointi bioreaktoreissa	13
3.4 Panosreaktorin ainetase	13
<b>4 KYLMÄKUIVAUS</b>	<b>15</b>
<b>5 TYÖN SUORITUS JA HAVAINNOT</b>	<b>18</b>
5.1 Ensimmäinen kasvatus	18
5.2 Toinen kasvatus ja kylmäkuivaus	23
5.2.1 Reagenssien testaaminen	30
5.3 Kolmas kasvatus ja kylmäkuivaus	35
<b>6 TULOKSET</b>	<b>41</b>
<b>7 PÄÄTELMÄT</b>	<b>47</b>
<b>LÄHTEET</b>	<b>50</b>

## LIITTEET

- Liite 1. Ensimmäinen kasvatus bioreaktorissa
- Liite 2. Toinen kasvatus bioreaktorissa
- Liite 3. Ensimmäinen kuivaus
- Liite 4. Toinen kuivaus
- Liite 5. Kolmas kuivaus

## KUVAT

Kuva 1. Tyypillisen bioreaktorin esimerkkikuva <sup>11</sup>	12
Kuva 2. Kuoppalevyllä kylmäkuivattu reagenssi	46

## KUVIOT

Kuvio 1. Veden faasidiagrammi <sup>14</sup>	16
---	----

Kuvio 2. Formatsiinistandardisuora 1	19
Kuvio 3. Formatsiinistandardisuora 2	22
Kuvio 4. Formatsiinistandardisuora 3	24
Kuvio 5. Formatsiinistandardisuora 4	27
Kuvio 6. Formatsiinistandardisuora 5	36
Kuvio 7. Formatsiinistandardisuora 6	38

## TAULUKOT

Taulukko 1. Formatsiinistandardien absorbanssit esikasvatuksen jälkeen	19
Taulukko 2. Näytteiden absorbanssit ja sameudet esikasvatuksen jälkeen	20
Taulukko 3. Näytteiden valontuotto esikasvatuksen jälkeen	20
Taulukko 4. Yhdistetyn esikasvatussuspension absorbanssi ja sameus	21
Taulukko 5. Pääkasvatuksen parametrit	21
Taulukko 6. Formatsiinistandardisuoran ja näytteiden absorbanssi- ja sameusarvot	22
Taulukko 7. Formatsiinistandardien absorbanssit esikasvatuksen jälkeen	24
Taulukko 8. Näytteistä mitatut absorbanssit 860 nm:ssä ja 600 nm:ssä ja sameudet	24
Taulukko 9. Näytteistä mitatut valontuotot	25
Taulukko 10. Esikasvatussuspension absorbanssi ja sameus	25
Taulukko 11. Formatsiinistandardien absorbanssiarvot esikasvatuksen jälkeen	26
Taulukko 12. Näytteiden absorbanssit 860 nm:ssä ja sameudet pääkasvatuksessa.	27
Taulukko 13. Näytteiden absorbanssit 600 nm:ssä.	28
Taulukko 14. Valontuotto pääkasvatuksen jälkeen	28
Taulukko 15. Valotason säätö ennen kylmäkuivausta	29
Taulukko 16. Lopullisen valotason mittaukset ja keskiarvo	29
Taulukko 17. Bakteerisuspension absorbanssi ja sameus ennen kylmäkuivausta	29
Taulukko 18. Testin raakadata heti kuivauksen jälkeen 1	31
Taulukko 19. Testin raakadata heti kuivauksen jälkeen 2	32
Taulukko 20. Testitulokset 2 viikon säilytyksen jälkeen referenssikemikaalille: Kromi	32
Taulukko 21. Testitulokset 2 viikon säilytyksen jälkeen referenssikemikaalille: Sinkki	33
Taulukko 22. Testitulokset 2 viikon säilytyksen jälkeen referenssikemikaalille: Dikloorifenoli (DCP)	33
Taulukko 23. Testitulokset 5 viikon säilytyksen jälkeen referenssikemikaalille: Kromi	34
Taulukko 24. Testitulokset 5 viikon säilytyksen jälkeen referenssikemikaalille: Sinkki	34
Taulukko 25. Testitulokset 5 viikon säilytyksen jälkeen referenssikemikaalille: Dikloorifenoli (DCP)	34
Taulukko 26. Formatsiinistandardien absorbanssiarvot esikasvatuksen jälkeen	35
Taulukko 27. Näytteistä mitatut absorbanssit 860 nm:ssä ja 600 nm:ssä ja sameudet	36
Taulukko 28. Näytteistä mitatut valontuotot	37
Taulukko 29. Formatsiinistandardien absorbanssiarvot	37
Taulukko 30. Näytteiden absorbanssit 860 nm:ssä ja sameudet	38
Taulukko 31. Näytteiden valontuotto pääkasvatuksen jälkeen	38
Taulukko 32. Valotaso ennen kylmäkuivausta	39
Taulukko 33. Lopullisen valotason mittaukset ja keskiarvo	39
Taulukko 34. Bioreaktorikasvatuksen parametrit	41
Taulukko 35. Reagenssien korjauskertoimet ja EC50-arvot 1. testauksessa	42
Taulukko 36. Reagenssien inhibitoarvot 1. testauksessa	42
Taulukko 37. Reagenssien korjauskertoimet ja EC50-arvot 2. testauksessa	42
Taulukko 38. Reagenssien inhibitoarvot 2. testauksessa	42
Taulukko 39. Korjauskertoimet reagensseille eri referenssikemikaaleilla	43

Taulukko 40. Inhibitioarvot reagensseille 2 viikon pakastussäilytyksen jälkeen (kromi)	43
Taulukko 41. Inhibitioarvot reagensseille 2 viikon pakastussäilytyksen jälkeen (sinkki)	43
Taulukko 42. Inhibitioarvot reagensseille 2 viikon pakastussäilytyksen jälkeen (DCP)	44
Taulukko 43. Korjauskertoimet reagensseille eri referenssikemikaaleilla	44
Taulukko 44. Inhibitioarvot reagensseille 5 viikon pakastussäilytyksen jälkeen (kromi)	44
Taulukko 45. Inhibitioarvot reagensseille 5 viikon pakastussäilytyksen jälkeen (sinkki)	45
Taulukko 46. Inhibitioarvot reagensseille 5 viikon pakastussäilytyksen jälkeen (DCP)	45

# 1 JOHDANTO

Työn tarkoituksena oli kehittää jo olemassa olevan reagenssin valmistusprosessia. Kyseinen reagenssi koostuu kylmäkuivatuista *Vibrio fischereistä* ja sitä käytetään vesiliukoisten näytteiden toksisuusmäärittelyyn altistamalla kylmäkuivattuja soluja näytteelle ja mittaamalla bakteerin valontuotossa tapahtuvia muutoksia kontaktiajan kuluttua.<sup>1,2</sup>

Työssä testattiin, onko mahdollista kasvattaa reagenssissa käytettäviä bakteereita, *V. fischereitä*, bioreaktorissa. Näin ollen olisi mahdollista kasvattaa suurempi määrä kerralla, jolloin myös reagenssia saataisiin valmistettua enemmän.

Kasvatuksissa määriteltiin sameus formasiinistandardisuoran avulla. Tämä tapa on kuitenkin melko työläs ja vaatii kasvatuksen eri vaiheissa aina uuden standardisuoran tekemisen. Tarkoituksena oli miettiä, olisiko mahdollista jättää formasiinistandardisuora tekemättä, ja mitata kasvatuksen absorbanssi 600 nm:ssä.

Toinen työn päätavoitteista oli testata bakteerien kylmäkuivausta erilaisilla kuivausalustoilla. Käytössä oli ampulleja ja 96-kuoppalevyjä, joissa on pyöreä pohja. Toiveena oli saada kuivaus onnistumaan kuoppalevyillä, jolloin valmis reagenssi olisi kakkumainen, ja se voitaisiin pakata tiiviiseen pakettiin.

Valmistettujen reagenssien valontuottoa tutkittiin SFS-EN ISO 11348-3 standardin mukaan käyttäen referenssikemikaaleja<sup>3</sup>. Jotta reagenssin säilyvyydestä saatiin edes jonkinlaista kuvaa, testejä tehtiin muutaman kerran mm. heti kuivauksen jälkeen ja muutaman viikon säilytyksen jälkeen.

## 2 VIBRIO FISCHERI

*Vibrio fischeri* on merissä elävä bakteeri, jolla on luminoiva ominaisuus. Tämä ominaisuus on tehdyn työn kannalta sen tärkein ominaisuus. Se elää yleensä symbioosissa kalmarien kanssa <sup>4</sup>, mutta voi esiintyä yksinkin. *V. fischeri* ei ole patogeeninen, joten sen parissa on turvallista työskennellä.

*V. fischeri* kuuluu *Vibrioiden* sukuun. Se on gramnegatiivinen <sup>5</sup> eli sen solukalvon ympärillä on lisäksi ulkokalvo. Tämän vuoksi nämä gramnegatiiviset bakteerit värjäytyvät gramvärjäyksessä punertaviksi <sup>6</sup>.

Yleensä *V. fischeri* ovat muodoiltaan taipuneita tai suoria sauvoja. Niiden koko voi vaihdella  $0,5\text{--}0,8 \times 1,4\text{--}2,6 \mu\text{m}$ :n välillä. Se on liikkumiskykyinen flagellojensa vuoksi. <sup>5</sup>

*V. fischeri* on fakultatiivinen anaerobi <sup>5</sup> eli se voi lisääntyä sekä hapellisissa että hapettomissa olosuhteissa <sup>7</sup>. Lisäksi se on kemo-organoheterotrofi <sup>5</sup> eli sen glukoosi tuotetaan orgaanisista yhdisteistä <sup>8</sup>.

Yleisesti *Vibriot* kasvavat 20 °C:n lämpötilassa. Suurin osa niistä kestää lisäksi 30–35 °C:n lämpötiloja ja jotkut jopa 40 °C:n lämpötilaa. Osa *Vibrioista* kestää myös korkeaa pH:ta. Kaikenlaisia *Vibrioita* löytyy useista vesielinympäristöistä. <sup>5</sup>

*V. fischeri* tuottaa 1000 kertaa enemmän valoa, kun se elää symbioosissa kalmarin kanssa kuin, että se eläisi yksinään <sup>4</sup>. Kyseisen bakteerin valontuottoa voidaan käyttää hyväksi toksikologisissa testauksissa.

### 2.1 Bioluminesenssi

Luminometri määrittää valon säteily määrän kemiallisista reaktioista ja bioluminesenssireaktioista. Yksinkertaisesti luminometri on fotometri ilman lamppua. Valonlähteenä toimii entsyymaattinen tai kemiallinen reaktio kyvetissä, joka on asetettu mittauskammioon. Valo kerätään erityisellä optiikalla ja ohjataan moninkertaistajavalokennoon. Signaali erotetaan ja vahvistetaan ja tulos rekisteröidään. <sup>9</sup>



*V. fischeri* avulla tehtävät reaktiot ovat seuraavanlaisia:

#### lusiferaasi



Entsyymi on nimeltään lusiferaasi, aivan kuten käytettäessä tulikärpäsiä, mutta se ei ole sama entsyymi kuin hyönteisissä. Substraatti on pitkäketjuinen aldehydi ja energialähteenä toimii flaviinimononukleotidi. Reaktiossa FMNH<sub>2</sub> on pelkistynyt flaviinimononukleotidi ja se muuttuu hapetetuksi flaviinimononukleotidiksi, FMN. Pitkäketjuinen aldehydi, RCHO, reagoi ja muuttuu pitkäketjuiseksi rasvahapoksi, RCOOH.<sup>9</sup>

Kun kokonaistoksisuutta mitataan, valontuotto vähenee, kun näytekonsentraatio kasvaa. Näytelaimennokset sekoitetaan testiorganismien kanssa ja valontuotto mitataan luminometrillä. Näytekonsentraatiota, joka tuottaa 50 % vähenemisen valontuotossa verrattuna puhtaaseen referenssinäytteeseen, kutsutaan EC50-arvoksi.<sup>9</sup>

*V. fischeriä* on käytetty laajalti toksisuusmäärittämissä. Menetelmä on standardoitu vesinäytteille.<sup>9</sup> Menetelmä on kehitelty ensin käyttäen tuoreita bakteereita<sup>10</sup> ja sen jälkeen se on kehitelty toimimaan myös kylmäkuivatuille bakteereille<sup>3</sup>, jotta reagenssikittien kehittäminen oli mahdollista<sup>9</sup>.

Häiriötekijät tehtäessä toksisuusmäärittämissä *V. fischeriä* käyttäen voivat vaikuttaa tuloksiin merkittävästi. Liukenemattomat ja haihtuvat aineet tai aineet, jotka reagoivat laimennosveden tai testisuspension kanssa vaikuttavat tuloksiin ja testin toistettavuuteen. Valoabsorptio tai valon sironta saattavat vaikeuttaa tulosten saantia, jos käytetään voimakkaan värisiä tai sameita näytteitä.<sup>3</sup>

Happipitoisuuden täytyy olla >0,5 mg/l, jolloin näytteistä, joissa on korkea happipitoisuusvaatimus, saattaa ilmetä hapenpuutetta ja happipitoisuus saattaa olla inhiboiva tekijä.<sup>3</sup>

Näytteen orgaaninen kontaminaatio hetihajoavien ravintoaineiden kanssa aiheuttaa näytteelle bioluminesenssin vähentymistä ilman, että näyte on joutunut kosketuksiin toksisen aineen kanssa.<sup>3</sup>

Hyperosmoottisia vaikutuksia saattaa ilmetä, jos suolakonsentraatio alkuperäisessä näytteessä ylittää 30 g/l tai, jos muut yhdisteet johtavat tasavertaiseen osmoottisuuteen.<sup>3</sup>

Mikäli häiriötekijöitä ei testeissä ilmene, voidaan tulosten kelpoisuus tutkia. Kriteerit kelpoisuuteen on annettu standardeissa referenssinäytteille. Tuloksia lasettaessa korjauskertoimen arvon täytyy olla välillä 0,6–1,8. Lisäksi rinnakkaismääritykset eivät saa erota keskiarvosta enempää kuin 3 %. Kolme referenssinäytettä aiheuttavat 20–80% inhibition 30 minuutin kontaktiajan jälkeen seuraavilla konsentraatioilla:

3,4 mg/l 3,5-dikloorifenoli

2,2 mg/l Zn<sup>2+</sup> (sinkkisulfaattiheptahydraattina)

18,7 mg/l Cr<sup>6+</sup> (kaliumdikromaattina)<sup>3</sup>.

Käytettäessä tuoreita bakteereita määrityksissä, referenssinäytteiden konsentraatiot poikkeavat suuresti verrattuna käytettäessä kylmäkuivattuja bakteereita<sup>10</sup>.

### 3 KASVATUS BIOREAKTORISSA

Bioreaktorit tai fermentorit ovat pohja monille biotekniikkaan pohjautuville tuotantoprosesseille. Bioreaktoreita voi olla hyvin monenkokoisia niiden tarkoituksesta riippuen. Pieniä bioreaktoreita voidaan käyttää laboratoriomittakaavassa ja suuria tuotantomittakaavassa.<sup>11</sup>

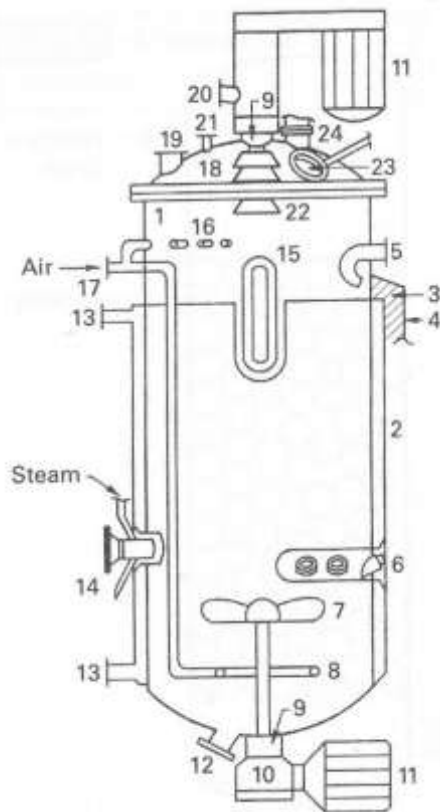
*Vibrio fischereiden* kasvatus tehtiin panostoismissa sekoitusreaktorissa, joten seuraavat bioreaktoreihin liittyvät teoria-asiat on esitetty kyseisen reaktorin kannalta.

#### 3.1 Bioreaktorin rakenne

Tyypillinen bioreaktori koostuu säiliöstä, jonka ympärillä on vaippa. Vaipan avulla voidaan säädellä bioreaktorin lämpötilaa. Säiliötä suunniteltaessa on otettava huomioon erityisesti materiaalin valinta. Materiaalin on kestävä happoja ja emäksiä ja korkeaa sterilointilämpötilaa. Säiliöstä löytyy aukot, joihin voidaan lisätä lämpötila-, pH- ja liuennoksen hapen sensorit. Lisäksi säiliöön on liitetty kanavat, joista happo, emäs ja vaahdonestoaineet voidaan lisätä tarvittaessa pumppujen avulla kasvatussuspensioon. Kaasuille on myös omat sisään- ja ulostuloliittymät. Jotta esim. kasvatuksen konsentraatiota voidaan seurata, on reaktoriin usein liitetty näytteenottoventtiili.<sup>11</sup>

Ilmastus ja sekoitus tuottavat usein vaahtoa bioreaktorissa. Sitä kontrolloidaan vaahdonestoaineilla ja mekaanisilla vaahdonrikkajilla.<sup>11</sup> Vaahdonestoaineita haluttaisiin kuitenkin usein välttää, sillä ne saattavat haitata solujen kasvua.

Suunniteltaessa bioreaktoreita täytyy myös maksimipaineet ottaa huomioon. Steriloinnissa lämpötilan lisäksi paineet nousevat ja materiaalin ja liitosten on kestävä paine. Yleensä reaktorit suunnitellaan kestäväksi hieman kovempia lämpötiloja ja paineita kuin mitä ne käytännössä joutuvat kestäväksi. Suunnittelussa toinen tärkeä osa on bioreaktorin puhdistaminen ja sterilointi. Kuvassa 1 on nähtävillä tyypillinen bioreaktori.



Tärkeimmät kuvassa merkityt osat:

1. säiliö
2. vaippa
3. eristys
5. siirrostuskanava
6. kanavat pH:n, lämpötilan ja DO:n sensoreita varten
7. sekoituslapa
8. kaasun sisääntulo
11. moottori
12. tyhjennysventtiili
14. näytteenottoventtiili
16. liitännät hapolle, emäkselle ja vaahdonestoaineille
17. ilman sisääntulo
18. mediumin syöttöaukko

Kuva 1. Tyypillisen bioreaktorin esimerkkikuva <sup>11</sup>

Sekoitusreaktorin lieriömäinen säiliö on liitetty moottoritoimiseen varteen, jossa on yksi tai useampi sekoitin kiinnitettynä. Yleensä sekoitin yltää reaktorin yläosasta alaosaan asti. Säiliön seinämään on usein kiinnitetty sekoituksen estolevyjä parantamaan sekoitusta. Bakteerisolulla sekoitus on tärkeää, jotta ne ovat tasaisesti suspensiossa, eivätkä ne ole kovinkaan herkkiä kunnon sekoitukselle toisin kuin eläinsolut. Erilaisilla sekoittimilla saadaan aikaan erilaisia virtauksia reaktorin sisällä. Erilaisia sekoittimia ovat lapasekoittimet, potkurisekoittimet ja turbiinisekoittimet <sup>11</sup>. *V. fischereiden* kasvatuksessa käytössä oli lapasekoitin.

### 3.2 Panostoimiset ja jatkuvatoimiset bioreaktorit

Bioreaktoreita voidaan käyttää panostoimisesti tai jatkuvatoimisesti. Molemmilla on omat etunsa ja haittansa. Panosreaktori toimii nimensä mukaisesti panoksittain eli lähtöaineet lisätään bioreaktoriin ja reaktiot tapahtuvat reaktorin sisällä.

Lopuksi reaktori tyhjenetään ja syntynyt, haluttu tuote otetaan talteen. Yleensä panosreaktoreita käytetään pienemmän mittakaavan tuotannossa, mutta myös ison mittakaavan tuotannossa ne ovat käytössä. Panosreaktorissa tuotteen vaihtelu ja tuotteen ominaisuuksien säätäminen on helpompaa. Tällöin on myös helpompi valmistaa monia eri tuotteita pienemmässä mittakaavassa. Panosreaktorit sopivat hyvin tutkimus- ja kehitystyöhön. Jatkuvatoimisessa reaktorissa etuina taas on se, ettei putsaamista tarvitse tehdä niin usein, sillä sama aines kulkee reaktorissa jatkuvasti. Jatkuvatoimisessa reaktorissa pystytään helposti valmistamaan suuria määriä tuotetta. Myös tuotteen laatu on tällöin tasainen. Jatkuvatoiminen reaktori voi usein olla halvempi kuin panosreaktori, sillä se ei vaadi niin paljon työvoimaa, kun täyttöö ja tyhjennystä ei prosessi tarvita erikseen.<sup>12</sup>

### 3.3 Bioreaktioiden kontrollointi bioreaktoreissa

Jokainen bioreaktorissa tehtävä prosessi yleensä optimoidaan, jotta saadaan tuotettua mahdollisimman paljon ja tuote on hyvälaatuista. Bioreaktorissa kontrolloitavia parametreja ovat lämpötila, pH, happipitoisuus ja sekoitusnopeus. Ennen kasvatuksen aloitusta parametrit määritellään ja ohjelmoidaan bioreaktoriin. Bioreaktori on yleensä kytketty tietokoneeseen, jolla voidaan tallentaa erillisen ohjelman avulla bioreaktorin elektrodeilta tuleva tieto. Kontrollonin avulla voidaan säätää esimerkiksi pH:ta, jolloin asetettu pH-arvo säilyy samana koko kasvatuksen ajan.

Tallennettujen tietojen avulla voidaan seurata ja tarkistaa, että kasvatuksessa olosuhteet ovat pysyneet oikeanlaisina koko ajan. Tällöin voidaan varmistua tuotteen laadusta.

### 3.4 Panosreaktorin ainetase

*V. fischereitä* kasvatettaessa bioreaktorissa kyseessä on kolmifaasireaktio. Kolme eri faasia ovat nestefaasi, kiinteäfaasi ja kaasufaasi<sup>13</sup>. Nestefaasina on kasvatusmedium, kiinteänä faasina bakteerisolut ja kaasufaasina ilma, jolla hoidetaan reaktorin ilmastus.

Kyseiselle reaktiolle voidaan kirjoittaa seuraavanlainen ainetase:

$$m_{in} + m_{gen} = dm/dt + m_{out},$$

jossa  $m_{in}$  on bioreaktoriin sisäänmenevän aineksen osuus,  $m_{gen}$  bioreaktorissa muodostuvan aineksen osuus,  $dm/dt$  akkumuloituvan aineksen osuus ja  $m_{out}$  ulos tulevan aineksen osuus.<sup>12, 13</sup>

## 4 KYLMÄKUIVAUS

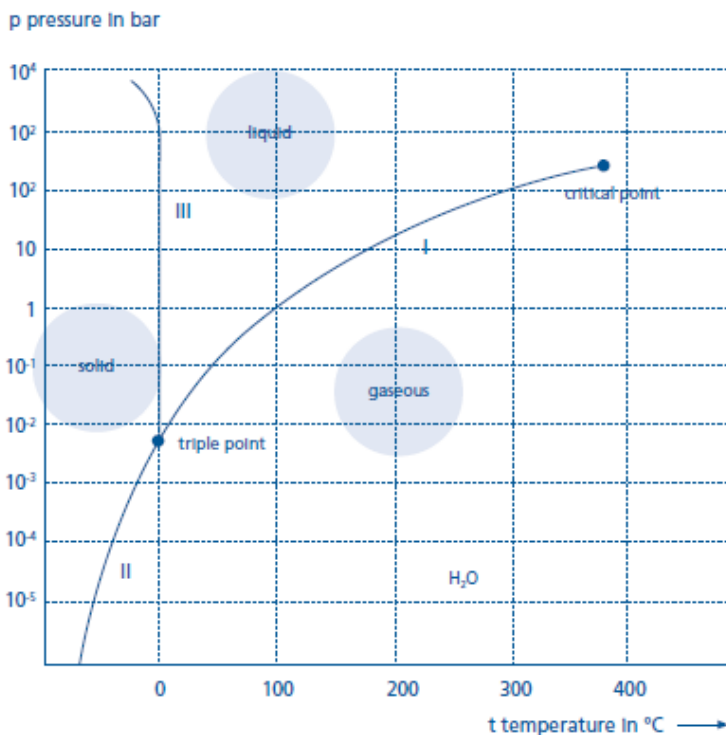
Kylmäkuivaus on osa prosessien jälkikäsitteilyä. Se toimii tuotteen muodonantoprosessina. Kaupallisen bioteknisen tuotteen viabiliteetti riippuu tuotteen aktiivisuudesta ja stabiilisuudesta kuljetuksen ja varastoinnin aikana <sup>11</sup>. Näihin voidaan vaikuttaa oikeanlaisilla olosuhteilla. Monissa muodonantoprosesseissa käytetään apuna stabiloivia aineita, jotka edistävät aktiivisuuden ja stabiilisuuden säilymistä. Ne suojaavat esim. proteiineja kuivausprosessin aikana, estävät tuotetta tulemasta ulos ampullista ja tehostavat tuotteen liukoisuutta <sup>11</sup>.

Biotekniset tuotteet vaativat usein hellän kuivausmenetelmän. Lämmönsiirrosta riippuen kuivaaja voi olla kontakti-, konvektio- ja säteilykuivaaja. Kylmäkuivaaja toimii kontakti- tai säteilyperiaatteella, eikä sen sisällä tapahdu tuotteen liikkuamista muutoin kuin mekaanisesti. <sup>11</sup>

Kylmäkuivureita on erikokoisia. Yleisesti kuivureita löytyy laboratoriokäyttöön, pilotikäyttöön ja tuotantoon. Kylmäkuivuri koostuu vakuumikuivauskammista, vakuumpumpusta, jääkondensaattorista, lämpötilasäädeltävistä hyllyistä, hyllyistä, joissa on korkitusmekanismi, kumiventtiileistä ja putkistoista. <sup>14</sup>

Kylmäkuivaus, toiselta nimeltä lyofilisaatio on yksi vähiten ankara menetelmä kuivausmenetelmistä. Kylmäkuivausta voidaan käyttää esim. farmaseuttisten ja diagnostisten tuotteiden, elintarvikkeiden, virusten ja bakteerien kuivaukseen. <sup>11</sup>

Periaate perustuu nesteen sublimoitumiseen jäätyneestä materiaalista <sup>14</sup>. Neste, joka sisältää tuotteen, on jäässä ideaalisessa lämpötilassa eli alempana kuin sen lasipiste ja kuivaajaan asetetaan vakuumi. Lasipisteen arvo riippuu esim. kaikista stabilointiaineista <sup>11</sup>. Sublimaation periaatetta on kuvattu lisää kuviossa 1, jossa aineen faasimuutos nähdään paineesta ja lämpötilasta koostuvasta kuvaajasta.



Kuvio 1. Veden faasidiagrammi <sup>14</sup>

Varsinaisessa kuivauksessa on monta vaihetta, jäädytysvaihe, primaarivaihe ja sekundaarivaihe. Kun sisäistä lämpötilaa esim. ampullissa pidetään alle lasipiste-  
tearvon, hyllylämpötila nostetaan nollan yläpuolelle tehokkaan kristallisoidun  
veden sublimaation edistämiseksi. Primaarikuivauksen jälkeen, kuivattava kak-  
ku sisältää edelleen merkittävän määrän vettä. Tämä poistetaan sublimoimalla  
sekundaarivaiheessa. Sekundaarivaiheessa sisäistä ampullin lämpötilaa noste-  
taan. Seuraavaksi vakuumi poistetaan ja ampullit suljetaan mekaanisesti kyl-  
mäkuivurin sisällä. <sup>11</sup>

Korkealla vakuumilla lämmönsiirto tapahtuu ainoastaan kontaktiperiaatteella,  
eikä konvektiolla. Sen vuoksi alhaisella paineella saavutetaan tehokas kuivaus-  
prosessi. <sup>11</sup>

Bakteereiden kannalta kylmäkuivaus on kannattavaa pitkäaikaisen säilytyksen  
takia <sup>15</sup>. Kylmäkuivatut bakteerit voivat säilyä hyvinkin pitkiä aikoja oikeanlaisis-  
sa olosuhteissa säilytettyinä.



Bakteereiden kylmäkuivaus on monivaiheinen prosessi. Siihen voidaan liittää bakteereiden kasvatuksesta asti kaikki vaiheet<sup>14</sup>. Tärkeimmät lähinnä kylmäkuivaukseen liittyvät vaiheet ovat bakteerien uudelleen suspensointi kylmäkuivausmediumiin, varsinainen kuivaus ja kuivauksen jälkeinen varastointi<sup>14</sup>.

On tärkeä muistaa, että yksikään kylmäkuivausmenetelmä ei toimi kaikille mikro-organismeille. Lisäksi yhdelle kylmäkuivurille kehitelty menetelmä ei välttämättä toimi tismalleen samalla tavalla toisella kylmäkuivurilla. Myöskään kaikkia mikro-organismeja ei välttämättä voida kuivata. Kaikki menetelmät on testattava huolellisesti ennen suureen tuotantoon siirtymistä.<sup>14</sup> Sen vuoksi tutkimus- ja kehitystyö on kylmäkuivauksenkin osalta tärkeää.

Kylmäkuivausmedium on huolellisesti valittava, sillä sen vaikutus voi olla hyvin suuri kylmäkuivattujen mikro-organismien selviytymiseen. Myös kylmäkuivauksen jälkeen neste, johon kuivatut solut rehydrataan, on valittava huolella. Huono valinta vaikuttaa solujen elävyyteen.<sup>14</sup>

## 5 TYÖN SUORITUS JA HAVAINNOT

Työ suoritettiin noudattamalla reagenssin valmistukseen olevia ohjeita sovelta-  
vasti. Ennen varsinaisen työn aloittamista valmistettiin kaikki tarvittavat liuokset  
kasvatuksi ja kuivauksia varten jo olemassa olevan reagenssin valmistusoh-  
jeen mukaisesti. Maljakasvatusalustojen<sup>2</sup>, esi- ja pääkasvatusmediumien<sup>2</sup>, kyl-  
mäkuivausmediumin<sup>2</sup>, formatsiiniliuoksen<sup>16</sup> sekä testauksiin tarvittavien liuos-  
ten<sup>17, 18</sup> koostumukset halutaan pitää salaisina.

### 5.1 Ensimmäinen kasvatus

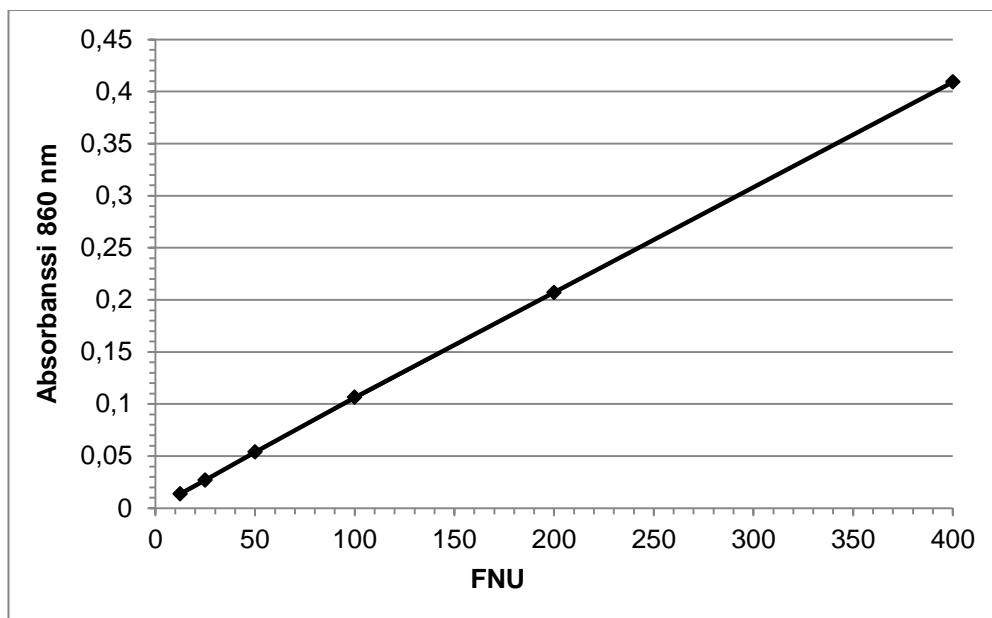
Kasvatus aloitettiin kasvattamalla *Vibrio fischeriä* maljakasvatusalustoilla. Yksi  
ampulli aikaisemmin valmistettua *V. fischeri* reagenssia liuotettiin 1 ml:aan kas-  
vatusmediumia. Seoksen annettiin stabiloitua 10 min, jonka jälkeen siitä valmis-  
tettiin  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  ja  $10^{-6}$  laimennokset käyttämällä kasvatusmediumia. Jokaista  
laimennosta levitettiin 500  $\mu$ l kahdelle rinnakkaiselle maljakasvatusalustalle.  
Maljat merkattiin huolellisesti, ja niitä inkuboitiin ylösalaisin 25 °C:ssa 3 vuoro-  
kauden ajan. Inkuboinnin jälkeen maljoilta merkittiin pimeässä 20 kpl valoatuot-  
tavia pesäkkeitä.

Esikasvatusta varten valmisteltiin 6 kpl steriilejä kasvatusputkia, joihin pipetoitiin  
5 ml kasvatusmediumia. Yksi putkista toimi steriiliyskontrollina ja muihin 5 put-  
keen siirrostettiin maljoilta yksi valoa tuottava bakteeripesäke. Putkia inkuboitiin  
ravistelijassa 24 h 25 °C:ssa ravistelunopeuden ollessa 260 rpm.

Formatsiinistandardisuuraa varten formatsiinistokista, jonka tunnettu sameus on  
400 FNU (formazin nephelometric unit), valmistettiin laimennokset 0 FNU,  
12,5 FNU, 25 FNU, 50 FNU, 100 FNU, 200 FNU ja 400 FNU käänteisos-  
moosiveteen. Standardipitoisuuksien absorbanssit mitattiin 860 nm:ssä. Mitta-  
ustulokset on esitetty taulukossa 1. Tuloksista koottiin standardisuora, jossa x-  
akselilla on standardin sameus (FNU) ja y-akselilla absorbanssi (860 nm).  
Standardisuora on kuvattu kuviossa 2.

Taulukko 1. Formasiinistandardien absorbanssit esikasvatuksen jälkeen

STANDARDI	
FNU	Absorbanssi 860 nm
12,5	0,0137
25	0,0269
50	0,0538
100	0,1064
200	0,2070
400	0,4091



Kuvio 2. Formasiinistandardisuora 1

Inkuboiduista esikasvatusputkista otettiin näytteet ja ne laimennettiin 1:10 kasvatusmediumilla. Laimennoksista mitattiin absorbanssi 860 nm:ssä ja näin standardisuoraan vertaamalla näytteille saatiin sameuden arvo FNU-yksikössä. Absorbanssi mitattiin myös 600 nm:ssä, jolloin sameutta FNU-yksikössä ei saada selvitettyä. Taulukossa 2 on esitetty näytelaimennosten mitatut absorbanssit mitattuna 860 nm:ssä ja 600 nm:ssä ja näytteiden sameus standardisuoran avulla tulkittuna.

Taulukko 2. Näytteiden absorbanssit ja sameudet esikasvatuksen jälkeen

NÄYTTEET	Laimennos	Absorbanssi 860 nm	Laimennoksen FNU	Putken FNU	Absorbanssi 600 nm
steriiliyskontrolli	1:1	0	0	0	0,0019
esikasvatusputki 1	1:10	0,1139	110	1100	0,2413
esikasvatusputki 2	1:10	0,1107	110	1100	0,2351
esikasvatusputki 3	1:10	0,1161	120	1200	0,2424
esikasvatusputki 4	1:10	0,1136	110	1100	0,2357
esikasvatusputki 5	1:10	0,1146	120	1200	0,2362

Steriiliyskontrollin sameus ei saanut olla yli 5 FNU. Jos näin olisi käynyt, kasvatusta olisi jouduttu aloittamaan alusta. Tässä vaiheessa esikasvatusputkien sameuden tuli ylittää tietty arvo, jotta kasvatusta voitiin jatkaa seuraavaan vaiheeseen. Kyseiset arvot, myös valontuoton arvo, halutaan pitää salaisina. Putket, joiden sameus olisi ollut alle tämän, olisi pitänyt hylätä. Tällä kertaa kaikkia putkia voitiin kuitenkin käyttää.

Esikasvatusputkista mitattiin myös niiden valontuotto rinnakkaisilla 0,5 ml:n näytteillä. Myös nämä näytteet laimennettiin 1:10. Taulukkoon 3 on kirjattu näytteiden valontuotot.

Taulukko 3. Näytteiden valontuotto esikasvatuksen jälkeen

NÄYTTEET	Laimennos	RLU / 0,5 ml 1. rinnakkainen	RLU / 0,5 ml 2. rinnakkainen	Keskiarvo	Lopullinen
steriiliyskontrolli	1:1	0,008	0,003	0,0055	0,055
esikasvatusputki 1	1:10	2321	2376	2348,5	23485
esikasvatusputki 2	1:10	2576	2496	2536	25360
esikasvatusputki 3	1:10	2373	2431	2402	24020
esikasvatusputki 4	1:10	2431	2495	2463	24630
esikasvatusputki 5	1:10	2603	2662	2632,5	26325

Jotta kasvatusta voitiin jatkaa, täytyi kasvatusputkien valontuotto ottaa myös huomioon sameuden lisäksi. Valontuoton täytyi ylittää tietty arvo. RLU on mitauksissa käytetty yksikkö ja tulee sanoista relative light unit.

Pääkasvatus tehtiin ohjeista poiketen bioreaktorissa, eikä pullokasvatuksena. Bioreaktori valmisteltiin kasvatusta varten kokoamalla se ohjeen mukaan. Kas-

vatusliuos lisättiin reaktorin sisään ja sen pH säädettiin natriumhydroksidin avulla arvoon 7,2. Reaktori steriloidtiin kasvatusliuoksen kanssa 121 °C:ssa 30 min ajan ennen siirrosteen lisäystä. Samalla aloitettiin myös tiedonkeruu kasvatuksesta. Liitteessä 1 on nähtävillä kasvatuksesta kerätty tieto kuvaajien muodossa.

Esikasvatusliuokset yhdistettiin yhdeksi bakteerisuspensioksi ja niiden sameus mitattiin vielä kerran 1:10 laimennoksena. Taulukossa 4 on kerrottu bakteerisuspension absorbanssi ja sameus.

Taulukko 4. Yhdistetyn esikasvatussuspension absorbanssi ja sameus

Laimennos	Absorbanssi 860 nm	Absorbanssi 600 nm	Laimennoksen sameus, FNU	Esikasvatuksen sameus, FNU
1:10	0,1127	0,2375	110	1100

Pääkasvatukseen täytyi siirrostaa bakteerisuspensiota siten, että pääkasvatuksen laskennallinen sameus on 10 FNU kasvatusta aloitettaessa. Tähän oli olemassa suora laskukaava <sup>2</sup>:

$10 \text{ FNU} / 1100 \text{ FNU} \times 7000 \text{ ml} = 63,64 \text{ ml}$ , jossa 7000 ml on pääkasvatuksen tilavuus.

Kun esikasvatukset yhdistettiin, huomattiin, että siirrostetta on liian vähän, vain 20 ml. Kasvatus kuitenkin aloitettiin ja sitä jatkettiin 22 h, jotta nähtiin kasvavivatko bakteerit kyseisissä olosuhteissa. Taulukossa 5 on lueteltu kasvatukseen käytetyt parametrit.

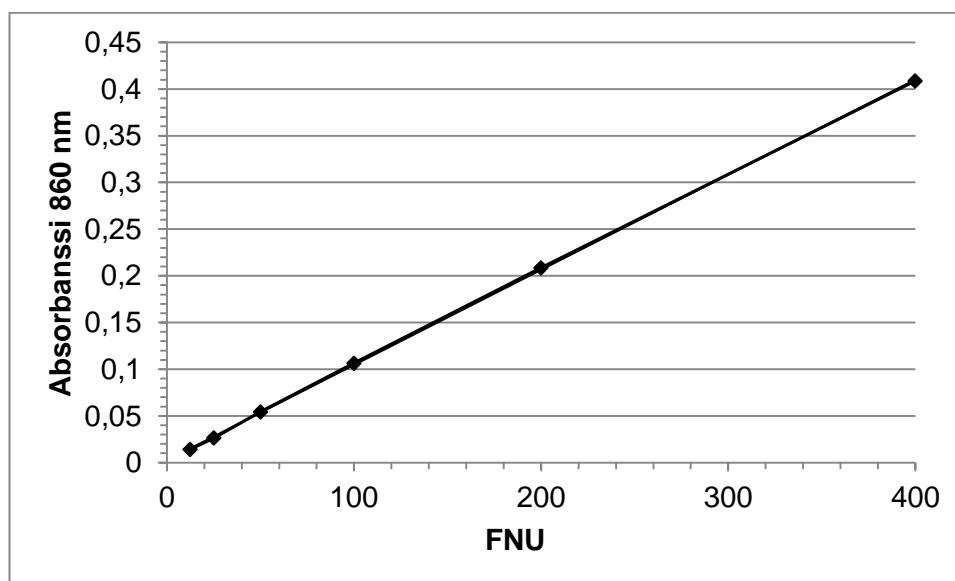
Taulukko 5. Pääkasvatuksen parametrit

Parametri	
Lämpötila	25°C
pH	7,2
Sekoitusnopeus	260 rpm
Ilmastus	3,5 l/min

Seuraavana päivänä kasvatuksesta mitattiin sameus kahdella rinnakkaisella 1:10 laimennosnäytteellä käyttämällä formasiinistandardisuoraa apuna. Taulukossa 6 on nähtävissä standardisuoran mitatut absorbanssit sekä näytteiden absorbanssit ja sameudet. Kuviossa 3 on nähtävillä standardisuora.

Taulukko 6. Formasiinistandardisuoran ja näytteiden absorbanssi- ja sameusarvot

FNU	Absorbanssi		Laimennos	Absorbanssi 860 nm	Absorbanssi 600 nm	Laimennoksen FNU	Putken FNU
12,5	0,0141	Näyte 1	0,10	0,0672	0,0019	70	700
25	0,0263	Näyte 2	0,10	0,0689	0,2413	70	700
50	0,0542						
100	0,1063						
200	0,2086						
400	0,4088						



Kuvio 3. Formasiinistandardisuora 2

Tulosten perusteella kasvatuksesta ei kannattanut jatkaa kylmäkuivaukseen, sillä kasvatusaika saa olla korkeintaan 26 h. Sameuden olisi kuulunut saavuttaa tietty arvo, ja sitä tuskin olisi vielä saavutettu seuraavan 4 h:n sisällä.

Valontuoton kuuluisi tässä vaiheessa olla suurempi kuin esikasvatuksen jälkeen, mutta sitä ei enää mitattu, kun todettiin, että kasvatus täytyi aloittaa alusta.

Bioreaktori tyhjennettiin, steriloitiin ja pestiin ohjeen mukaisesti. Kasvatusliuos autoklavoitiin ja heitettiin sen jälkeen viemäriin.

## 5.2 Toinen kasvatus ja kylmäkuivaus

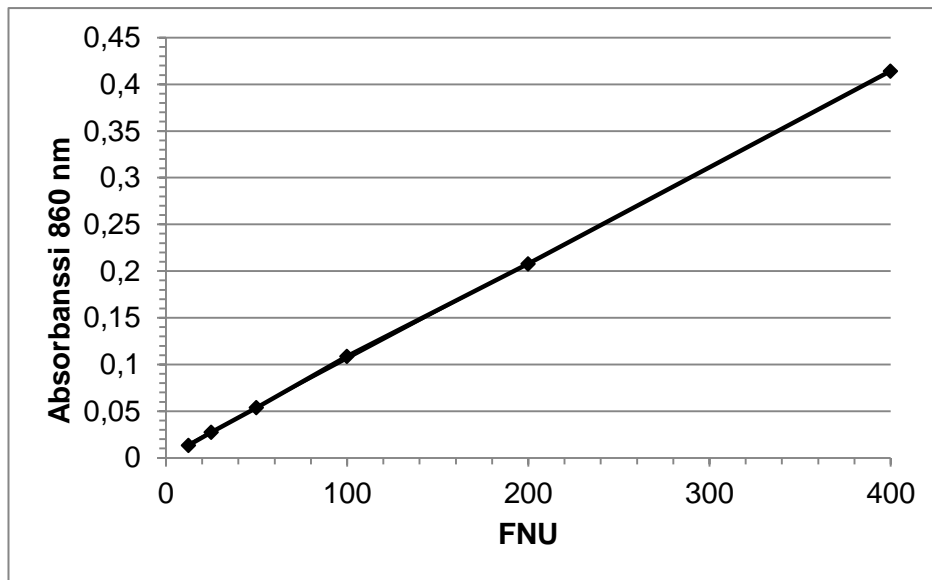
Toinen kasvatus aloitettiin samalla tavalla kuin ensimmäinen eli kasvattamalla *V. fischereitä* maljakasvatuksena. Kasvatukset tehtiin jälleen  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  ja  $10^{-6}$  laimennoksina. Maljoja inkuboitiin 3 vuorokautta 25 °C:ssa.

Esikasvatusvaihe poikkesi ensimmäisestä kasvatuksesta. Jotta pääkasvatukseen saataisiin riittävästi siirrostetta, esikasvatuksen tilavuutta nostettiin. Kasvatusmediumia lisättiin jokaiseen putkeen 30 ml. Putkia oli yhteensä 7, yksi steriiliyskontrolli ja 6 varsinaista esikasvatusputkea. Maljakasvatusmaljoilta siirrostettiin 6 valoatuottavaa pesäkettä yhtä esikasvatusputkea kohden. Esikasvatusputkia ja steriiliyskontrolliputkea inkuboitiin ravistelijassa 24 h 25 °C:ssa ravistelunopeuden ollessa 260rpm.

Esikasvatusvaiheen jälkeen kasvatuksista ja kontrollista otettiin näytteet ja niistä mitattiin sameus samalla tavalla kuin ensimmäisessäkin kasvatuksessa käyttäen apuna formasiinistandardisuoraa. Taulukossa 7 on esitetty mittaustulokset formasiinistandardiliuosten absorbanssimittauksista. Varsinainen kuvaaja on esitetty kuviossa 4. Ennen näytteiden mittausta, näytteet laimennettiin 1:10 kasvatusmediumilla. Laimennoksista mitattiin absorbanssi 860 nm:ssä ja 600 nm:ssä. Näytteistä mitatut absorbanssit on koottu taulukkoon 8. Laimennetuista näytteistä mitattiin myös valontuotto esikasvatuksen jälkeen. Tulokset on esitetty taulukossa 9.

Taulukko 7. Formatsiinistandardien absorbanssit esikasvatuksen jälkeen

FNU	Absorbanssi 860 nm
12,5	0,0135
25	0,0273
50	0,0538
100	0,1087
200	0,2078
400	0,4142



Kuvio 4. Formatsiinistandardisuora 3

Taulukko 8. Näytteistä mitatut absorbanssit 860 nm:ssä ja 600 nm:ssä ja sa-  
meudet

NÄYTTEET	Laimennos	Absorbanssi 860 nm	Absorbanssi 600 nm	Laimennoksen FNU	Putken FNU
steriiliyskontrolli	1:1	0,0005	0,0009	0	0
esikasvatusputki 1	1:10	0,1194	0,2414	100	1000
esikasvatusputki 2	1:10	0,1273	0,2497	100	1000
esikasvatusputki 3	1:10	0,1083	0,2173	90	900
esikasvatusputki 4	1:10	0,1288	0,2598	120	1200
esikasvatusputki 5	1:10	0,1259	0,2560	110	1100
esikasvatusputki 6	1:10	0,1123	0,2269	100	1000



Taulukko 9. Näytteistä mitatut valontuotot

NÄYTTEET	Laimennos	RLU / 0,5 ml 1.rinnakkainen	RLU / 0,5 ml 2.rinnakkainen	KA	Lopullinen
steriiliyskontrolli	1:1	0,007	0,003	0,005	0,05
esikasvatusputki 1	1:10	3197	3184	3190,5	31905
esikasvatusputki 2	1:10	3223	3221	3222	32220
esikasvatusputki 3	1:10	3125	3105	3115	31150
esikasvatusputki 4	1:10	3235	3236	3235,5	32355
esikasvatusputki 5	1:10	3234	3232	3233	32330
esikasvatusputki 6	1:10	3168	3170	3169	31690

Steriiliyskontrollin sameus ei saanut olla yli 5 FNU. Muutoin kasvatus olisi täyty-  
nyt aloittaa alusta. Esikasvatusputkien sameuden tuli ylittää tietty arvo, jotta  
kasvatusta voitiin jatkaa seuraavaan vaiheeseen. Putket, joiden sameus olisi  
ollut alle tämän, olisi pitänyt hylätä. Kaikkia putkia voitiin kuitenkin käyttää.

Jotta kasvatusta voitiin jatkaa, täytyi myös kasvatusputkien valontuotto ottaa  
huomioon sameuden lisäksi.

Esikasvatussuspensiot yhdistettiin ja niistä mitattiin vielä kerran absorbanssi ja  
määriteltiin sameus, jotta voitiin laskea pääkasvatukseen tarvittava siirrosteen  
määrä. Mittaustulokset on taulukoituna taulukossa 10.

Taulukko 10. Esikasvatussuspension absorbanssi ja sameus

Laimennos	Absorbanssi 860 nm	Absorbanssi 600 nm	Laimennoksen sameus, FNU	Esikasvatuksen sameus, FNU
1:10	0,1224	0,2437	110	1100

Koska edellinen pääkasvatus epäonnistui, bakteereita kasvatettiin bioreaktorin  
lisäksi pullokasvatuksena, joka on todettu aikaisemmin toimivaksi tavaksi rea-  
genssin valmistuksessa. Reaktorikasvatuksessa käytetty tilavuus oli 7 l ja pullo-  
kasvatuksessa 500 ml. Reaktorikasvatukseen ja pullokasvatukseen käytettävät  
siirrosteiden määrät on laskettu seuraavassa:

Reaktorikasvatus 10 FNU/ 1100 FNU x7000 ml = 63,64 ml

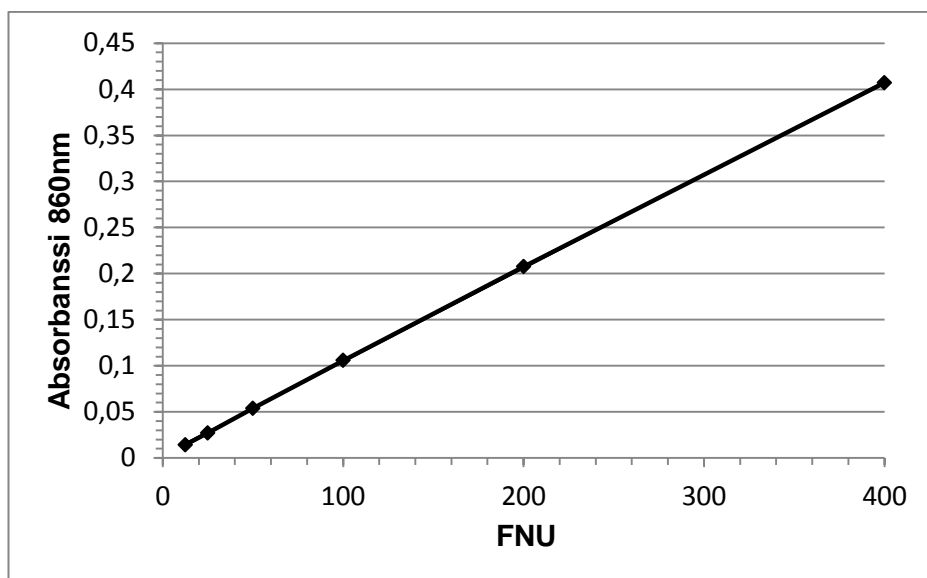
Pullokasvatus 10 FNU/ 1100 FNU x500 ml = 4,55 ml

Reaktorikasvatusta varten bioreaktori koottiin ja valmisteltiin samalla tavalla kuin ensimmäiseen kasvatukseen ohjeen mukaan. Kasvatusmediumin pH säädettiin bioreaktorissa ja laite steriloidtiin paikallaan 121 °C:ssa 30 min ajan kasvatusmediumin ollessa sen sisällä. Tiedonkeruu kasvatusprosessista aloitettiin aloitettaessa sterilointi. Liitteessä 2 on kasvatuksesta kerätty tieto kuvaajien muodossa. Pullokasvatusta varten 500 ml kasvatusmediumia valmistettiin 2 l:n erlenmayeriin. Mediumin pH säädettiin ja steriloidtiin autoklaavissa 121 °C:ssa 20 min ajan.

Steriloinnin jälkeen bioreaktoriin lisättiin 70 ml siirrostetta ja kasvatus aloitettiin. Parametreina käytettiin samoja kuin ensimmäisessä kasvatuksessa. Ne on lueteltu taulukossa 5. Pullokasvatusta varten siirrostetta lisättiin 5 ml ja kasvatus siirrettiin ravistelijaan, jossa lämpötila oli 25 °C ja ravistelunopeus 260 rpm. Molempia kasvatuksia jatkettiin 22 h, jonka jälkeen kasvatuksista otettiin näytteet. Näytteistä tehtiin 1:10 laimennokset rinnakkaisina ja laimennoksista mitattiin absorbanssi ja määriteltiin sameus. Taulukossa 11 on esitetty formasiinistandardisuoran muodostamista varten mitatut absorbanssit 860 nm:ssä ja kuviossa 5 on kuvattu formasiinistandardisuora.

Taulukko 11. Formasiinistandardien absorbanssiarvot esikasvatuksen jälkeen

<b>FNU</b>	<b>Absorbanssi 860 nm</b>
12,5	0,0142
25	0,0271
50	0,0539
100	0,1058
200	0,2076
400	0,4071



Kuvio 5. Formatsiinistandardisuora 4

Näytteistä mitatut absorbanssit 860 nm:ssä ja määritellyt sameudet on kirjattu taulukkoon 12. Koska ensimmäisillä mittauksilla ei saavutettu tarpeeksi korkeaa sameutta, kasvatusta jatkettiin 1 h, jonka jälkeen otettiin uudet näytteet. Näytteet laimennettiin 1:10 ja absorbanssi mitattiin uudelleen 860 nm:ssä. Tässä vaiheessa sameus oli riittävä ja kasvatusta lopetettiin. Molemmilla mittauskerroilla absorbanssi mitattiin myös 600 nm:ssä. Näistä saadut tulokset on taulukoita taulukkoon 13.

Taulukko 12. Näytteiden absorbanssit 860 nm:ssä ja sameudet pääkasvatuksessa.

NÄYTTEET	Laimennos	Absorbanssi 860 nm			Laimennoksen FNU	Putken FNU
		1. rinnakkainen	2. rinnakkainen	Keskiarvo		
PKB, 1. mitta	1:10	0,0973	0,0969	0,0971	100	1000
PKP, 1. mitta	1:10	0,1186	0,1178	0,1182	120	1200
PKB, 2. mitta	1:10	0,1693	0,1674	0,1684	160	1600
PKP, 2. mitta	1:10	0,1877	0,1839	0,1858	170	1700

(PKB= pääkasvatusta bioreaktorissa, PKP= pääkasvatusta pullossa)

Taulukko 13. Näytteiden absorbanssit 600 nm:ssä.

		600 nm		
NÄYTTEET	Laimennos	1. rinnakkainen	2. rinnakkainen	Keskiarvo
PKF, 1. mitta	1:10	0,1976	0,1984	0,1980
PKP, 1. mitta	1:10	0,2461	0,2413	0,2437
PKF, 2. mitta	1:10	0,2698	0,2762	0,2730
PKP, 2. mitta	1:10	0,2797	0,2837	0,2817

(PKB= pääkasvatus bioreaktorissa, PKP= pääkasvatus pullossa)

Myös valontuotto täytyi mitata. Mittaukset tehtiin kolmella rinnakkaisella ja näytteet laimennettiin 1:100. Tulokset on esitetty taulukossa 14.

Taulukko 14. Valontuotto pääkasvatuksen jälkeen

		RLU / 0,5 ml				
Näytteet	Laimennos	1.rinnakkainen	2.rinnakkainen	3.rinnakkainen	Keskiarvo	Lopullinen
PKB	0,01	650,1	695,7	672,7	672,83	67283
PKP	0,01	526,8	541,9	534,9	534,53	53453

(PKB= pääkasvatus bioreaktorissa, PKP= pääkasvatus pullossa)

Kylmäkuivausta varten kasvatuksesta saatu bakteerisuspensio jaettiin 0,5 l:n sentrifugipulloihin. Pulloihin tuli n. 400 ml bakteerisuspensiota. Ensin pulloja jäähdytettiin jäähäuteella 30 min. Tämän jälkeen pullot sentrifugoitiin 5000 g 4 °C:ssa 8 minuuttia. Supernatantti kaadettiin pois ja bakteeripelletti suspensioitiin 150 ml:aan 4 °C:sta kylmäkuivausmediumia. Bakteerisuspensiota sekoitettiin magneettisekoittajalla jäähäuteella 20 min, jotta seoksesta saatiin homogeeninen.

Seuraavaksi bakteerisuspensiosta täytyi säätää sen valotaso. Sitä varten useaan luminometriputkiin pipetoitiin 0,5 ml Reagent Diluent-puskuria. Putkia temperoitiin huoneenlämmössä 10 min.

Bakteerisuspensiota lisättiin 10 µl luminometriputkiin ja putkia temperoitiin vielä 5 min huoneenlämmössä. Sen jälkeen putkista mitattiin suspension valotaso. Valotason tuli olla  $750 \pm 250$  RLU / 10 µl. Taulukosta 15 on luettavissa saatu valotaso. Valotaso oli heti sopiva, joten kylmäkuivausmediumia ei tarvinnut lisätä enempää säätöä varten.

Taulukko 15. Valotason säätö ennen kylmäkuivausta

Suspension tilavuus	Valotaso 1. rinnakkainen RLU / 10 µl	Valotaso 2. rinnakkainen RLU / 10 µl	Keskiarvo RL / 10 µl
150 ml	763,4	810,2	786,8

Valotason säädön jälkeen lopullinen valotaso mitattiin vielä 10 rinnakkaisella näytteellä. Mittauksista saadut arvot on esitetty taulukossa 16.

Taulukko 16. Lopullisen valotason mittaukset ja keskiarvo

Näyte	Valotaso RLU / 10 µl	Näyte	Valotaso RLU / 10 µl
1	778,5	6	811,4
2	762,8	7	803,9
3	783,1	8	788,1
4	807,7	9	775,8
5	794,2	10	802,6
<b>Keskiarvo</b>		<b>788,9 RLU/10µl</b>	

Bakteerisuspensiosta otettiin vielä 2 rinnakkaista näytettä, jotka laimennettiin 1:10 kylmäkuivausmediumilla ja niistä mitattiin absorbanssi ja määriteltiin sameus formasiinistandardisuoran (kuvio 4) avulla. Taulukossa 17 on kirjattu mitausarvot.

Taulukko 17. Bakteerisuspension absorbanssi ja sameus ennen kylmäkuivausta

Laimennos	Absorbanssi 860 nm			Laimennoksen sameus, FNU	Bakteerisuspension sameus, FNU
	1. rinnakkainen	2. rinnakkainen	Keskiarvo		
1:10	0,3400	0,4138	0,3769	380	3800

Kuivausta varten kylmäkuivauspullost ja 96-kuoppalevy esijäähdytettiin 4 °C:ssa 30 min. Kylmäkuivauspulloihin ja kuoppiin pipetoitiin 250 µl bakteerisuspensiota. Puolet pulloista sekä 96-kuoppalevy siirrettiin kylmäkuivuriin ja puolet pulloista siirrettiin pakastimeen -70 °C:een odottamaan seuraavaa päivää ja toista kuivausta.

Kylmäkuivurissa pullost ja 96-kuoppalevy jäädytettiin välittömästi -40 °C:een. Kun lämpötila oli saavutettu, kuivattavien annettiin olla kyseisessä lämpötilassa 2 tunnin ajan. Tämän jälkeen paine säädettiin 0,280 mbar:iin ja lämpötilaksi muutettiin -25 °C. Kuivausta jatkettiin 20 h näillä parametreilla. Seuraavana päivänä 20 h kuluttua lämpötila muutettiin 20 °C:een ja paineeksi asetettiin 0,050 mbar. Lopullista kuivausta jatkettiin vielä 2 h. Koko kuivausprosessista kerätty tieto on nähtävillä liitteessä 3 kuvaajan muodossa. Kuivauksen jälkeen pullost korkitettiin. Testejä varten otettiin 2 pulloa ja 96-kuoppalevyltä otettiin kaksi näyttettä kuivatuista kakuista. 96-kuoppalevy pakattiin ja pakastettiin loppujen pullojen kanssa -20 °C:een.

Toinen kuivaus tehtiin heti perään bakteerisuspensioille, jotka pakastettiin -70 °C:ssa. Se tehtiin täysin samalla tavalla kuin edellinenkin kuivaus käyttäen samoja parametreja ja aikoja. Tästä kuivauksesta on kerätty tieto liitteessä 4. Kuivauksen jälkeen 2 pulloa otettiin testauksia varten erilleen ja loput pullost pakastettiin -20 °C:een.

### 5.2.1 Reagenssien testaaminen

Valmistettu reagenssi täytyi testata, jotta sen toimivuudesta voitiin varmistua. Testauksessa käytettiin referenssinäytteitä, jotta tulokset olisivat vertailukelpoisia. Ohjeet testaamiseen löytyvät Suomen standardisoimisliiton standardista SFS-EN ISO 11348-3 ”Veden laatu. Vesinäytteiden inhiboivan vaikutuksen määrittäminen *V. fischerin* valon tuottoon (valobakteeritesti). Osa 3: Menetelmä, jossa käytetään kylmäkuivattuja bakteereita”.

Ensimmäinen testaus tehtiin heti kuivauksen jälkeen kuoppalevyllä ja ampulleissa kuivatuista näytteistä. Referenssinäytteenä toimi  $\text{Cr}^{6+}$ , joka oli kaliumdikromaatin muodossa. Pitoisuutena oli 52,9 mg/l. Taulukossa 18 on nähtävillä mittauksissa saatu raakadata. Kontaktiaikana oli 30 min.

Taulukko 18. Testin raakadata heti kuivauksen jälkeen 1

<b>Kromi</b>	<b>52,9 mg/l</b>	<b>laimennos</b>	<b>1:1</b>	<b>1:2</b>	<b>1:4</b>	<b>1:8</b>	<b>1:16</b>	<b>1:32</b>	<b>1:64</b>	<b>1:128</b>
		<b>kontrolli</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>Alussa</b>										
Ampulli 1	1	103	100	102	102	99	98	101	97	99
	2	102	100	100	102	99	99	99	98	99
Ampulli 2	1	110	109	110	111	110	111	109	110	109
	2	110	110	109	110	110	111	109	110	109
Kuoppalevy1	1	35	35	35	35	36	34	34	34	35
	2	35	34	35	35	35	34	34	35	35
Kuoppalevy2	1	36	35	36	36	35	36	35	35	36
	2	35	36	36	36	35	36	36	35	36
<b>Kontaktiajan jälkeen</b>										
Ampulli 1	1	76	32,1	47,3	55,6	58,4	61,3	64,5	65,4	64,1
	2	75	31,0	46,7	55,5	58,6	61,5	64,1	65,1	64,2
Ampulli 2	1	83	39,6	51,8	58,6	62,1	66,1	69,8	70,0	71,0
	2	82	40,0	50,3	58,4	62,0	65,9	69,9	70,2	71,2
Kuoppalevy 1	1	30	9,9	19,3	21,9	23,2	23,5	23,7	24,2	24,5
	2	31	10,1	19,1	21,9	23,4	23,6	24,3	24,0	24,7
Kuoppalevy 2	1	31	11,1	20,7	22,1	24,7	24,9	25,1	25,5	25,8
	2	32	11,2	20,5	22,3	24,3	24,9	25,2	25,6	25,9

Ampullit, jotka pakastettiin  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ :ssa ja kuivattiin seuraavana päivänä, testattiin samalla tavalla kuin ensimmäisen kuivauksenkin näytteet. Raakadata on esitetty taulukossa 19.

Taulukko 19. Testin raakadata heti kuivauksen jälkeen 2

Kromi		52,9 mg/l	laimennos	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
			kontrolli	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Alussa</b>											
Ampulli 1	1	39	40	39	39	40	40	39	40	40	
	2	39	40	39	39	40	40	39	40	40	
Ampulli 2	1	38	38	37	37	38	38	37	37	37	
	2	37	38	37	37	37	38	37	37	37	
<b>Kontaktiajan jälkeen</b>											
Ampulli 1	1	33	9,2	20,5	25,6	28,8	30,9	30,2	31,4	32,9	
	2	33	9,3	20,9	26,3	29,0	30,0	30,1	31,5	32,6	
Ampulli 2	1	32	9,3	18,4	23,4	26,0	27,4	28,1	27,8	29,2	
	2	31	9,2	19,2	23,4	26,5	27,8	28,5	28,4	28,5	

Seuraava testaus tehtiin 2 viikon kuluttua kuivauksesta ja kolmas testaus 5 viikon kuluttua kuivauksesta. Näissä testeissä käytettiin kaikkia kolmea referenssikemikaalia Cr<sup>6+</sup>:a, Zn<sup>2+</sup>:ä ja dikloorifenolia. Testauksista saatu raakadata on taulukoita taulukoihin 20, 21 ja 22.

Taulukko 20. Testitulokset 2 viikon säilytyksen jälkeen referenssikemikaalille: Kromi

Kromi		0,1058 g/l	laimennos	1:1	1: 2	1: 4	1: 8	1:16
			kontrolli	1	2	3	4	5
<b>Alussa</b>								
Kuoppalevy1	1	101,8	103,8	102,1	99,38	102,7	102,8	
	2	100,5	101,9	102	100,4	99,42	101,7	
Ampulli3.2.	1	42,63	41,4	40,85	41,17	39,97	41,42	
	2	41,68	40,55	39,95	40,91	41,02	41,56	
Ampulli 4.2.	1	66,55	65,54	64,71	64,66	64,31	63,64	
	2	65,49	64,97	65,32	63,88	65,41	64,59	
<b>Kontaktiajan jälkeen</b>								
Kuoppalevy1	1	79,5	17,13	45,72	57,5	62,7	65,54	
	2	78,46	16,97	45,59	57,77	61,39	64,82	
Ampulli 3.2.	1	37,34	5,796	19,01	27,68	33,48	35,91	
	2	36,87	5,669	18,62	27,03	33,74	35,99	
Ampulli 4.2.	1	57,33	5,553	22,42	38,25	48,36	53,86	
	2	56,76	5,421	22,68	37,74	49,12	54,26	



Taulukko 21. Testitulokset 2 viikon säilytyksen jälkeen referenssikemikaalille: Sinkki

Sinkki	0,0193 g/l	laimennos	1:1	1:02	1:04	1:08	1:16	1:32
		kontrolli	1	2	3	4	5	6
<b>Alussa</b>								
Kuoppalevy1	1	100,8	103,1	100,5	102,9	102,5	102,2	99,51
	2	102,1	100,4	101,5	102,5	102,4	100,6	101,1
Ampulli 3.2.	1	42,3	43,06	42,09	43,6	42,34	43,15	43,79
	2	42,85	41,97	43,05	42,96	41,88	43,53	43,91
Ampulli 4.2.	1	60,06	60,15	60,51	59,89	60,07	62,09	
	2	60,53	61,02	59,87	60,24	61,05	61,96	
<b>Kontaktiajan jälkeen</b>								
Kuoppalevy1	1	78,06	32,71	54	60,61	63,82	64,57	63,04
	2	79,21	29,99	53,26	60,44	63,71	63,23	64,25
Ampulli 3.2.	1	37,07	2,91	26,97	27,68	34,22	34,56	35,84
	2	37,34	2,865	27,32	32,64	33,95	34,58	35,93
Ampulli 4.2.	1	53,54	12,18	40,91	48,1	54,31	56,66	
	2	53,64	12,57	40,77	48,36	55,12	56,31	

Taulukko 22. Testitulokset 2 viikon säilytyksen jälkeen referenssikemikaalille: Dikloorifenoli (DCP)

DCP	0,0068 g/l	laimennos	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
		kontrolli	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Alussa</b>										
Kuoppalevy1	1	97,19	99,57	96,81	97,84	98,62	98,05	98,95	98,24	99,34
	2	99,89	98,97	97,69	99,2	98,54	98,28	99,13	99,02	98,66
Ampulli 3.2.	1	41,6	41,05	41,5	41,23	41,46	40,94	41,02	41,3	42,72
	2	41,56	41,32	41,98	41,54	42,01	40,79	41,49	42,47	41,36
Ampulli 4.2.	1	63,1	60,08	59,11	58,16	60,01	59,06	60,17	60,21	60,14
	2	62,77	60,24	60,31	59,46	58,97	60,52	60,15	60,03	59,68
<b>Kontaktiajan jälkeen</b>										
Kuoppalevy1	1	70,31	19,9	62,94	68,22	66,97	67,24	63,55	64,04	61,44
	2	71,64	19,45	63,48	68,97	66,83	67,32	64,19	65,07	61,11
Ampulli 3.2.	1	35,59	6,955	31,52	35,94	35,72	34,71	33,43	34,2	33,56
	2	36,02	6,984	31,89	35,97	36,15	34,56	33,72	34,66	33,21
Ampulli 4.2.	1	57,66	8,296	42,77	53,17	54,57	56,61	56,64	56,96	56,68
	2	56,84	8,429	42,83	53,79	53,64	57,19	56,61	56,26	56,42

Kolmas testauskerta tehtiin hieman eritavalla käyttäen valmiita referenssinäyt-  
teiden stokkiliuoksia, jotka laimennettiin vain muutamaan kertaan. Kolmannen  
testauksen tulokset on esitetty taulukoissa 23, 24 ja 25.

Taulukko 23. Testitulokset 5 viikon säilytyksen jälkeen referenssikemikaalille:  
Kromi

Kromi stokkiliuos 2,116 g/l	kuoppa- levy				Ampulli 3.2.				Ampulli 4.2.			
	RT		kontaktiajan jälkeen		RT		kontaktiajan jälkeen		RT		kontaktiajan jälkeen	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
kontrolli	69	69	54	54	70	70	49	48	60	60	49	49
laimennos1:5	70	70	0,1	0,1	70	70	0,1	0,1	58	58	0,1	0,1
laimennos1:10	68	68	4,3	4,3	69	70	3,3	3,3	58	59	3,0	3,0
laimennos1:20	70	69	13,0	13,2	69	69	10,1	10,0	57	58	8,5	8,6
laimennos1:40	69	68	27,3	27,0	70	70	20,2	20,6	58	58	18,3	18,1

Taulukko 24. Testitulokset 5 viikon säilytyksen jälkeen referenssikemikaalille:  
Sinkki

Sinkki stokkiliuos 1,934 g/l	kuoppa- levy				Ampulli 3.2.				Ampulli 4.2.			
	RT		kontaktiajan jälkeen		RT		kontaktiajan jälkeen		RT		kontaktiajan jälkeen	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
kontrolli	67	67	49	49	65	64	45	44	55	56	46	46
laimennos1:5	67	66	35	35	64	65	28	28	57	57	21	21
laimennos1:10	67	66	42	41	64	63	33	34	57	57	34	33
laimennos1:20	66	66	43	44	63	63	37	36	57	57	38	38
laimennos1:40	68	69	45	44	63	64	39	38	57	58	40	40

Taulukko 25. Testitulokset 5 viikon säilytyksen jälkeen referenssikemikaalille:  
Dikloorifenoli (DCP)

DCP stokkiliuos 1,36 g/l	kuoppa- levy				Ampulli 3.2.				Ampulli 4.2.			
	RT		kontaktiajan jälkeen		RT		kontaktiajan jälkeen		RT		kontaktiajan jälkeen	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
kontrolli	65	65	45	45	59	59	40	39	55	56	43	43
laimennos1:5	65	65	0,09	0,08	59	58	0,1	0,1	54	55	0,1	0,1
laimennos1:10	63	63	0,9	0,6	59	60	0,4	0,4	54	54	0,4	0,4
laimennos1:20	65	65	26	26	60	59	21	20	53	53	19	19
laimennos1:40	64	64	47	47	59	58	39	39	55	55	41	41

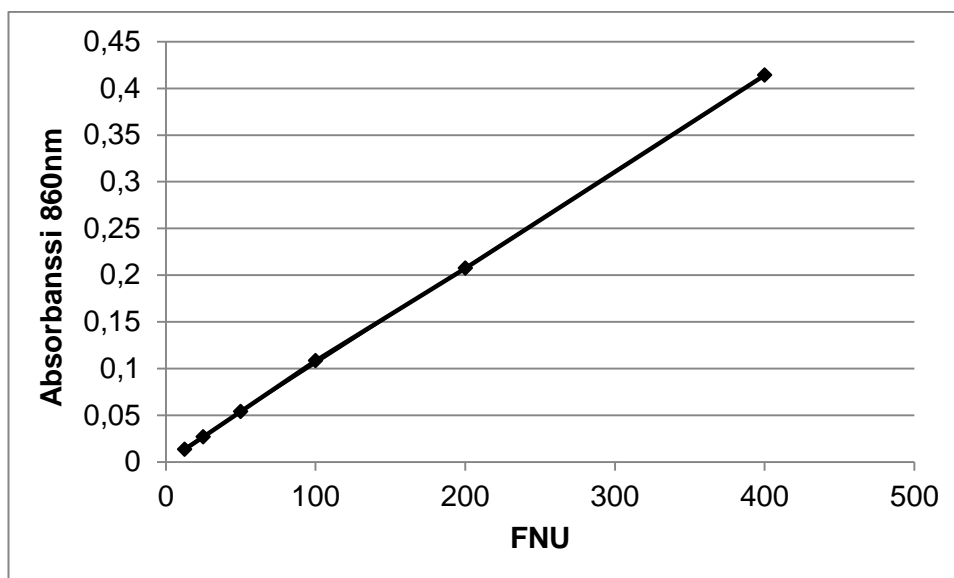
### 5.3 Kolmas kasvatus ja kylmäkuivaus

Kasvatus eteni jälleen lähes samalla tavalla kuin aikaisemminkin. Ensin tehtiin maljakasvatukset. Niitä kasvatettiin 3 vuorokautta 25 °C:ssa. Esikasvatusputkiin, joita oli 7 kpl varsinaista kasvatusta varten ja 1 kpl steriiliyskontrollia varten, pipetoitiin 5 ml kasvatusmediumia. Maljoilta siirrostettiin esikasvatusputkiin 1 pesäke valoa tuottavaa *V. fischeriä*. Putkia kasvatettiin ravistelijassa 24 h 25 °C:ssa ravistelunopeudessa 260 rpm.

Esikasvatuksen päättyessä, esikasvatusputkista otettiin näytteet, jotka laimennettiin 1:10 kasvatusmediumilla. Laimennoksista mitattiin absorbanssi ja valonotto ja määriteltiin sameus formatsiinistandardisuoran avulla. Standardisuora tehtiin kuten aikaisemmissakin kasvatuksissa ja siihen tarvittavat arvot on esitetty taulukossa 26 ja varsinainen kuvaaja kuviossa 6.

Taulukko 26. Formatsiinistandardien absorbanssiarvot esikasvatuksen jälkeen

<b>FNU</b>	<b>Absorbanssi 860 nm</b>
12,5	0,0133
25	0,0268
50	0,0539
100	0,1082
200	0,2074
400	0,4140



Kuvio 6. Formatsiinistandardisuora 5

Koska esikasvatus oli saavuttanut tarvittavan sameuden ja valontuoton, kasvatusta lopetettiin, kasvatukset yhdistettiin ja suspensiosta mitattiin jälleen valontuotto ja absorbanssi ja määritettiin sameus. Absorbanssi- ja sameusarvot on esitetty taulukossa 27 ja valontuotto taulukossa 28.

Taulukko 27. Näytteistä mitatut absorbanssit 860 nm:ssä ja 600 nm:ssä ja sameudet

NÄYTTEET	Laimennos	Absorbanssi 860 nm	Absorbanssi 600 nm	Laimennoksen FNU	Putken FNU
steriiliyskontrolli	1:1	0,0005	0,0008	0	0
esikasvatusputki 1	1:10	0,1769	0,2764	180	1800
esikasvatusputki 2	1:10	0,1777	0,2810	180	1800
esikasvatusputki 3	1:10	0,1863	0,2951	190	1900
esikasvatusputki 4	1:10	0,1867	0,2935	190	1900
esikasvatusputki 5	1:10	0,1841	0,2875	180	1800
esikasvatusputki 6	1:10	0,1835	0,2881	180	1800
esikasvatusputki 7	1:10	0,1866	0,2909	190	1900

Taulukko 28. Näytteistä mitatut valontuotot

NÄYTTEET	Laimennos	RLU / 0,5 ml 1.rinnakkainen	2.rinnakkainen	Keskiarvo	Lopullinen
steriiliyskontrolli	1:1	0,005	0,004	0,0045	0,045
esikasvatusputki 1	1:10	3235	3236	3235,5	32355
esikasvatusputki 2	1:10	3240	3234	3237	32370
esikasvatusputki 3	1:10	3237	3240	3238,5	32385
esikasvatusputki 4	1:10	3243	3239	3241	32410
esikasvatusputki 5	1:10	3236	3235	3235,5	32355
esikasvatusputki 6	1:10	3234	3233	3233,5	32335
esikasvatusputki 7	1:10	3233	3232	3232,5	32325

Pääkasvatukseen lisättävä siirrosteen määrä laskettiin tutulla kaavalla. Tällä kertaa pääkasvatus tehtiin ainoastaan pullokasvatuksena, jolloin kasvatustilavuus oli 500 ml.

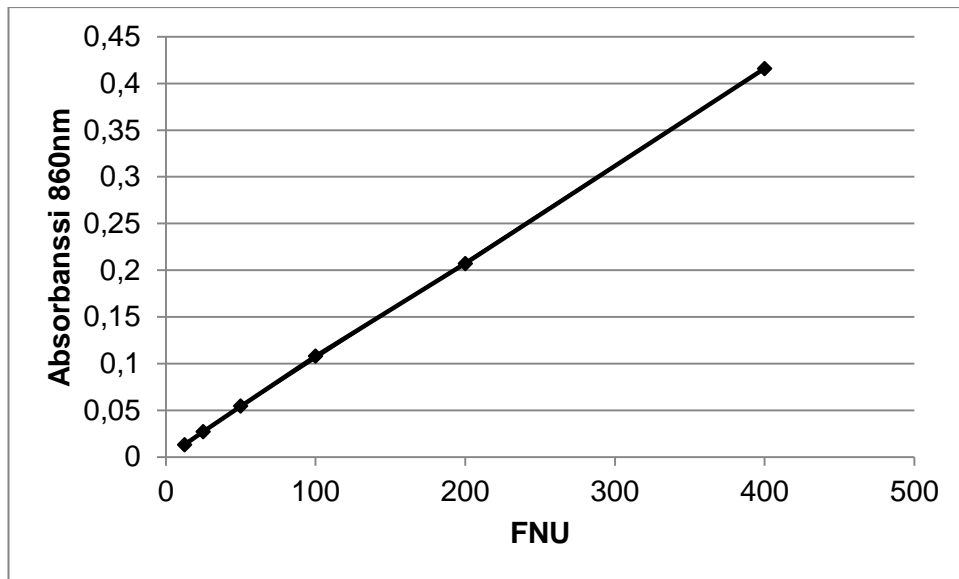
Pullokasvatus 10 FNU/ 1800 FNU x500 ml = 2,78 ml

Pääkasvatuksia tehtiin 3 rinnakkaista, ja jokaiseen pulloon lisättiin 3 ml siirrosta. Kasvatus tehtiin jälleen ravistelijassa samoilla parametreille kuin aikaisemminkin. Kasvatusta jatkettiin 22 h.

Kasvatuksen päättyessä mitattiin jälleen absorbanssi ja valontuotto ja määriteltiin sameus. Sameuden määrittämiseen käytettiin formasiinistandardisuoraa, jonka arvot löytyvät taulukosta 29 ja kuvaaja kuviosta 7. Absorbanssin ja sameuden määrittämisä varten 2 rinnakkaisnäytettä laimennettiin 1:10 kasvatusmediumilla ja valontuoton mittausta varten 3 rinnakkaisnäytettä laimennettiin 1:100 kasvatusmediumilla. Mittausarvot on taulukoita taulukkoihin 30 ja 31. Koska sameus ja valontuotto olivat riittävät, kasvatus lopetettiin.

Taulukko 29. Formasiinistandardien absorbanssiarvot

FNU	Absorbanssi 860 nm
12,5	0,0131
25	0,0272
50	0,0544
100	0,1080
200	0,2072
400	0,4160



Kuvio 7. Formatsiinistandardisuora 6

Taulukko 30. Näytteiden absorbanssit 860 nm:ssä ja sameudet

NÄYTTEET	laimennos	Absorbanssi 860 nm			Näytteen FNU	Lopullinen FNU
		1.rinnakkainen	2.rinnakkainen	Keskiarvo		
Pääkasvatus 1	1:10	0,1853	0,1847	0,185	190	1900
Pääkasvatus 2	1:10	0,1827	0,1831	0,1829	185	1850
Pääkasvatus 3	1:10	0,1871	0,1876	0,18735	190	1900

Taulukko 31. Näytteiden valontuotto pääkasvatuksen jälkeen

NÄYTTEET	laimennos	RLU / 0,5 ml				Keskiarvo	lopullinen RLU/0,5ml
		1. rinnakkainen	2. rinnakkainen	3. rinnakkainen			
Pääkasvatus 1	1:100	511,2	502,8	492,4	502,133	50213	
Pääkasvatus 2	1:100	542,4	512,7	517	524,033	52403	
Pääkasvatus 3	1:100	540,5	528,2	522,5	530,4	53040	

Kasvatuksen jälkeen bakteerisuspensiota pidettiin jäähauteella 30 min, jonka jälkeen suspensio sentrifugoitiin 4 °C:ssa 5000 g 8 min ajan. Fuugauksen jäl-

keen supernatantti kaadettiin pois ja solupelletti suspensoitiin uudelleen n. 50 ml:aan kylmäkuivausmediumia. Pulloja oli yhteensä 6 ja jokaiselle tehtiin samat toimenpiteet ja lopulta kaikki suspensiot yhdistettiin. Suspension annettiin sekoittua magneettisekoittajassa jäähäuteella 20 min, jonka jälkeen suspension valotasoa alettiin säätää.

Säätö tehtiin samoin kuin aikaisemminkin. Ainoastaan valotaso haluttiin jättää korkeammaksi kuin  $750 \pm 250$  RLU / 10  $\mu$ l. Valotaso säädettiin tuplasti korkeammaksi. Säätöä ei tosin juuri tarvittu, sillä haluttu valotaso oli heti kohdillaan. Taulukosta 32 näkee lopullisen valotason ennen kylmäkuivausta.

Taulukko 32. Valotaso ennen kylmäkuivausta

Suspension tilavuus	Valotaso 1. rinnakkainen RLU / 10 $\mu$ l	Valotaso 2. rinnakkainen RLU / 10 $\mu$ l	Keskiarvo RLU / 10 $\mu$ l
250 ml	1624	1601	1612,5

Valotason säädön jälkeen lopullinen valotaso mitattiin vielä 10 rinnakkaisella näytteellä. Mittauksista saadut arvot on esitetty taulukossa 33.

Taulukko 33. Lopullisen valotason mittaukset ja keskiarvo

Näyte	Valotaso RLU / 10 $\mu$ l	Näyte	Valotaso RLU / 10 $\mu$ l
1	1622	6	1608
2	1613	7	1611
3	1618	8	1617
4	1625	9	1625
5	1623	10	1609
<b>Keskiarvo</b>		<b>1617,1 RLU / 10 <math>\mu</math>l</b>	

Esijäähdytettyihin 96-kuoppalevyihin pipetoitiin jälleen 250  $\mu$ l bakteerisuspensiota. 3 levyä ja 4 ampullia pakastettiin -70 °C:seen odottamaan seuraavaa päi-

vää ja kuivausta. Muut levyt (8kpl) ja 5 ampullia siirrettiin kylmäkuivuriin ja kuivaus aloitettiin samalla tavalla kuin viimeksikin.

Jostain syystä laite ei toiminut odotetulla tavalla, eikä kuivumista ollut tapahtunut. Bakteerit olivat olleet lämpötilakäyrän mukaan kuitenkin jäätyneinä laitteen sisällä, joten laitetta korjattiin ja kuivaamista jatkettiin 22 h. Tämän jälkeen suoritettiin lopullinen kuivaus 2 h. Koko kuivausprosessista kerätty data on kuvaajan muodossa liitteessä 5.

Bakteerit siirrettiin heti kuivauksen jälkeen pakastimeen, ja muutamille näytteille oli tarkoitus tehdä heti testit, jotta nähtiin oliko laitteen toimimattomuus vaikuttanut kuivattaviin reagensseihin.

Testejä ei kuitenkaan tehty, koska kuoppalevyillä kuivatuista bakteereista näki heti, että kuivumista ei ollut tapahtunut. Kuopissa olleita reagensseja ei saatu irti kuopista kuten viimeksi, ja hetken kuluttua reagenssit olivat muuttuneet takaisin nestemäisiksi.



## 6 TULOKSET

*Vibrio fischeri* kasvatus bioreaktorissa on mahdollista. Kasvatukseen soveltuvat parametrit on esitetty taulukossa 34.

Taulukko 34. Bioreaktorikasvatuksen parametrit

Parametri	
Lämpötila	25°C
pH	7,2
Sekoitusnopeus	260 rpm
Ilmastus	3,5 l/min

Kasvatuksen jälkeen tarkasteltavana oli kylmäkuivattujen reagenssien toimivuus. Testaus tehtiin SFS-EN ISO 11348-3 standardin mukaan.

Ensimmäisellä testauksella testattiin välittömästi kasvatuksen jälkeen kylmäkuivatut reagenssit. Testauksessa oli mukana 2 ampullia ja 2 kuoppalevyllä kuivattua reagenssia. Stokkiliuoksena käytettiin kromiliuosta, jonka pitoisuus oli 52,9 mg/l.

Kaikkiin laskuihin on käytetty seuraavia kaavoja:

korjauskerroin  $KF = IC_{30}/IC_0$

inhibitioarvo  $INH\% = 100 - 100 \times (IT_{30} / KF \times IT_0)$ ,

joissa  $IC_{30}$  on kontrollin luminesenssi (RLU) kontaktiajan (30min) jälkeen,  $IC_0$  kontrollin alkuperäinen luminesenssiarvo (RLU),  $IT_{30}$  näytteen luminesenssi (RLU) kontaktiajan (30min) jälkeen ja  $IT_0$  näytteen alkuperäinen luminesenssi (RLU).<sup>1</sup>

Taulukossa 35 on esitetty reagenssien korjauskertoimet sekä EC50-arvo (%). Lisäksi taulukossa 36 on esitetty inhibitioarvot laimennoksille. Laskuihin käytetyt raakadata-arvot löytyvät aiemmasta taulukosta 18.

Taulukko 35. Reagenssien korjauskertoimet ja EC50-arvot 1. testauksessa

	korjauskerroin	EC50 %
Ampulli 1	0,74	69,7
Ampulli 2	0,75	83,6
Kuoppalevy 1	0,88	57,5
Kuoppalevy 2	0,89	67,9

Taulukko 36. Reagenssien inhibiatioarvot 1. testauksessa

Laimennos	Inhibiatioarvo INH%			
	Ampulli 1	Ampulli 2	Kuoppalevy 1	Kuoppalevy 2
kontrolli	0	0	0	0
1:2	57,7	51,4	67,2	64,6
1:4	37,1	37,5	37,8	35,5
1:8	26,7	29,4	28,8	30,2
1:16	20,4	24,4	24,5	21,5
1:32	15,9	20,5	21,3	22,1
1:64	13,3	14,3	20,4	20,4
1:128	9,8	14,9	20,2	17,9
1:256	12,5	12,8	20,4	18,9

Ennen kuivausta pakastetuille reagensseille tehtiin vastaavat testit heti kuivauksen jälkeen. Tulokset on esitetty taulukoissa 37 ja 38.

Taulukko 37. Reagenssien korjauskertoimet ja EC50-arvot 2. testauksessa

	korjauskerroin	EC50 %
Ampulli 1	0,83	35,2
Ampulli 2	0,84	40,2

Taulukko 38. Reagenssien inhibiatioarvot 2. testauksessa

Laimennos	Inhibiatioarvo INH%	
	Ampulli 1	Ampulli 2
kontrolli	0	0
1:2	71,9	70,9
1:4	36,7	40,2
1:8	19,9	25,9
1:16	12,3	15,9
1:32	8,0	13,2
1:64	6,9	10,4
1:128	5,4	10,4

Seuraavat testit tehtiin kahden viikon kuluttua kuivauksesta pakastussäilytyksen jälkeen. Tällä kertaa testeissä käytettiin kolmea eri referenssikemikaalia tekemällä stokkiliuoksista laimennokset. Laskuihin käytetty raakadata on jälleen taulukoita aikaisemmin havaintoina taulukoihin 20, 21 ja 22. Laskut laskettiin käyttäen samoja aiemmin esitettyjä kaavoja. Tulokset on esitetty erikseen jokaiselle referenssikemikaalille kromille, sinkille ja dikloorifenolille taulukoissa 39, 40, 41 ja 42.

Taulukko 39. Korjauskertoimet reagensseille eri referenssikemikaaleilla

	korjauskerroin		
	kuoppalevy	Ampulli 3.2.	Ampulli 4.2.
Kromi	0,78	0,88	0,86
Sinkki	0,78	0,87	0,89
DCP	0,72	0,86	0,91

Taulukko 40. Inhibitioarvot reagensseille 2 viikon pakastussäilytyksen jälkeen (kromi)

Kromi	kuoppalevy	Ampulli 3.2.	Ampulli 4.2.
<b>stokkiliuos 2,116 g/l</b>	<b>INH %</b>	<b>INH %</b>	<b>INH %</b>
kontrolli	0	0	0
1:20	78,8	84,1	90,3
1:40	42,7	47,1	59,9
1:80	26,1	24,3	31,6
1:160	21,4	5,7	13,0
1:320	18,4	1,6	2,4

Taulukko 41. Inhibitioarvot reagensseille 2 viikon pakastussäilytyksen jälkeen (sinkki)

Sinkki	kuoppalevy	Ampulli 3.2.	Ampulli 4.2.
<b>stokkiliuos 1,934 g/l</b>	<b>INH %</b>	<b>INH %</b>	<b>INH %</b>
kontrolli	0	0	0
1:100	60,3	92,2	77,0
1:200	31,5	27,0	23,7
1:400	23,9	13,5	9,7
1:800	19,7	7,4	-1,7
1:1600	18,7	8,7	-2,5
1:3200	18,1	6,4	

Taulukko 42. Inhibitioarvot reagensseille 2 viikon pakastussäilytyksen jälkeen (DCP)

DCP	kuoppalevy	Ampulli 3.2.	Ampulli 4.2.
stokkiliuos 1,36 g/l	INH %	INH %	INH %
kontrolli	0	0	0
1:200	72,5	80,3	84,7
1:40	9,8	11,8	21,2
1:800	3,3	-0,9	0,1
1:1600	5,8	0,0	0,1
1:3200	4,9	1,6	-4,6
1:6400	10,5	5,5	-3,5
1:12800	9,1	4,5	-3,5
1:25600	14,1	7,8	-3,8
1:51200	11,0	5,5	0,7
1:102400	10,3		

Kromilla laimennoksen 1:20 kuuluisi aiheuttaa 20–80 %:n inhibitio ja sinkillä vastaava laimennos on 1:100 ja dikloorifenolilla 1:200.

Samat testit toistettiin vielä 5 viikon kuluttua kuivauksesta. Tällöin käytettiin jälleen kaikkia kolmea eri referenssikemikaalia, mutta hieman eri laimennoksia. Tulokset on esitetty taulukoissa 43, 44, 45 ja 46.

Taulukko 43. Korjauskertoimet reagensseille eri referenssikemikaaleilla

	korjauskerroin		
	kuoppalevy	Ampulli 3.2.	Ampulli 4.2.
Kromi	0,78	0,69	0,82
Sinkki	0,73	0,69	0,81
DCP	0,70	0,67	0,77

Taulukko 44. Inhibitioarvot reagensseille 5 viikon pakastussäilytyksen jälkeen (kromi)

Kromi	kuoppalevy	Ampulli 3.2.	Ampulli 4.2.
stokkiliuos 2,116 g/l	INH %	INH %	INH %
kontrolli	0	0	0
laimennos 1:5	99,8	99,8	99,8
laimennos 1:10	91,9	93,1	93,9
laimennos 1:20	75,7	78,9	82,0
laimennos 1:40	48,8	57,9	62,0

Taulukko 45. Inhibitioarvot reagensseille 5 viikon pakastussäilytyksen jälkeen (sinkki)

Sinkki	kuoppalevy	Ampulli 3.2.	Ampulli 4.2.
stokkiliuos 1,934 g/l	INH %	INH %	INH %
kontrolli	0	0	0
laimennos 1:25	28,0	37,5	54,8
laimennos 1:50	14,2	22,8	27,7
laimennos 1:100	9,9	15,6	17,0
laimennos 1:200	12,4	10,3	12,3

Taulukko 46. Inhibitioarvot reagensseille 5 viikon pakastussäilytyksen jälkeen (DCP)

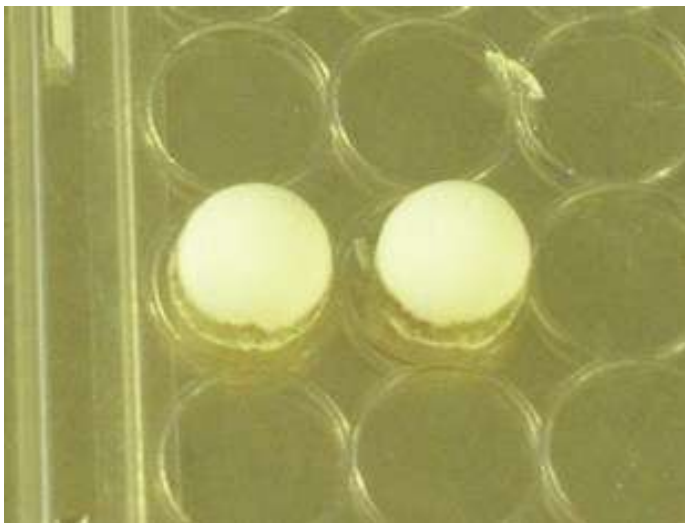
DCP	kuoppalevy	Ampulli 3.2.	Ampulli 4.2.
stokkiliuos 1,36 g/l	INH %	INH %	INH %
kontrolli	0	0	0
laimennos 1:50	99,8	99,7	99,8
laimennos 1:100	98,3	99,0	99,1
laimennos 1:200	43,2	48,7	53,1
laimennos 1:400	-4,5	1,1	3,4

Seuraavan eli kolmannen kasvatuksen kylmäkuivatuille reagensseille ei pystytty tekemään testejä niiden toimivuudesta. Kuivausprosessin jälkeen reagensseista näki heti, että laitteessa tapahtunut vakuumpumpun vuoto oli häirinnyt kuivausprosessia, eikä kuivausta ollut tapahtunut ollenkaan. Kun reagenssit otettiin kylmäkuivurista ulos, ne eivät olleet kuivuneita kakkuja, kuten ensimmäisellä kerralla, vaan kuopissa ollut aines muuttui heti nesteeksi ja näin ollen reagenssit olivat käyttökeltottomia.

Kylmäkuivurissa oli tällöin kuivattavana samaa reagenssia myös muutamassa ampullissa. Ampulleissa reagenssi ei muuttunut nesteeksi, mutta mitattaessa niiden valontuottoa, tulokset olivat todella alhaiset, lähellä nollaa. Voitiin siis todeta, että bakteerit olivat tuhoutuneet kuivauksessa.

Kuoppalevyllä kuivattaessa reagenssista oli tarkoitus saada kakku, joka voitaisiin siirtää kuoppalevyltä esim. putkeen, jossa se voitaisiin säilyttää kosteudelta

suojattuna. Kuvasta 2 nähdään, että ensimmäisellä kuivauksella saatiin aikaan halutunlainen kakku.



Kuva 2. Kuoppalevyllä kylmäkuivattu reagenssi

## 7 PÄÄTELMÄT

Yleisesti ottaen työssä määritellyt tavoitteet täyttyivät hyvin. Jotta muutamasta kuivaukseen liittyvästä ongelmasta päästään eroon, täytyy kylmäkuivauksia suorittaa lisää, ja kuivatuille tuotteille suorittaa testejä erilaisissa olosuhteissa.

*Vibrio fischereiden* kasvatus bioreaktorissa onnistui. Suurin osa siihen tarvittavista parametreista saatiin pullokasvatuksessa käytetyistä parametreista. Kuitenkin pH:n säätö täytyi miettiä. Aluksi mietittiin riittäisikö, että pH säädetään alussa ja kasvatuksen aikana pH:ta ei säädettäisi, vai täytyisikö pH:n säätö olla koko ajan päällä. Päädyttiin kuitenkin kokeilemaan helpompaa vaihtoehtoa, että pH säädetään alussa ja oletetaan pH:n pysyvän rajoissa kasvatuksen edetessä. Kasvatuksia seurattaessa huomattiin, että kyseinen vaihtoehto riittää, eikä jatkuvaa pH:n säätöä tarvita.

Kasvatuksia suunniteltaessa myös ilmastus täytyi suunnitella. Päädyttiin arvoon 3,5 l/min, koska tutkittiin, että bakteeri elää usein merissä ja on fakultatiivinen anaerobi. Näiden tietojen perusteella päätettiin kasvatukseen lisätä ilmastus, mutta melko vähäisenä, sillä merissäkin happipitoisuus on vähäinen.

Kyseinen kasvatus on helppo skaalata suuremmaksikin. Tällöin vain on otettava huomioon myös esikasvatusten koot, jotta pääkasvatukseen saadaan lisättyä tarpeeksi siirrostetta.

Kylmäkuivaus käytetyllä laitteella näytti toimivan. Muutamia säätöjä tekemällä suspensioitaessa bakteereita kylmäkuivausmediumiin saadaan prosessi vieläkin toimivammaksi. Valotaso kannattaa säätää korkeammaksi kuin alkuperäisessä työohjeessa kerrotaan. Tällöin kuivauksen jälkeen valotaso on riittävän korkea luotettavien tulosten saavuttamiseksi.

Testejä suoritettaessa huomattiin, että erityisesti kuoppalevyillä kuivatut reagenssit liukenevat ajan myötä heikommin käytettyyn liuokseen. Tämä johtuu mitä luultavimmin siitä, että kylmäkuivausmediumissa käytetty D-laktoosi imee kosteutta herkästi, jolloin liukeneminen heikkenee. Osa kuoppalevyillä kuivatuista reagensseista saatiin kuitenkin liukenemaan ja valotaso voitiin määrittää.

Muutaman viikon sisällä tehdyt testit osoittavat, että reagensseissa säilyy valotasoa säilytettäessä niitä pakasteessa  $-20\text{ °C}$ :ssa. Lisäksi huomattiin, että valotasoa mitattaessa paremmat tulokset saadaan, kun reagenssi liuotetaan ensin pieneen määrään käytettyä Reagent Diluent – liuosta ja lopuksi lisätään loput liuoksesta oikean tilavuuden saamiseksi.

Alusta alkaen valotasoa on ollut alhainen sekä kuoppalevyillä kuivatuissa reagensseissa, että ampulleissa. Lisäksi valotasoa on vaihdellut eri testikertojen välillä. Siihen ovat vaikuttaneet mm. rehydraus vaiheittain, kuten edellä kerrottiin.

Verrattaessa heti kylmäkuivattujen reagenssien ja kasvatuksen jälkeen ensin pakastettujen ja sitten kylmäkuivattujen reagenssien valontuottoa, huomataan, että ajan kuluessa reagenssien alussa eroavat valontuotot tasaantuvat. Aluksi heti kuivatuissa reagensseissa näyttäisi olevan parempi valontuotto kuin pakastuksen jälkeen kylmäkuivatuilla. Pakastuksen jälkeen kylmäkuivatuissa reagensseissa on ajan kuluessa kuitenkin saman verran valontuottoa kuin heti kylmäkuivatuissakin. Täten voidaan päätellä, että pakastus ennen kylmäkuivausta ei vaikuta dramaattisesti reagenssien valontuottoon.

Testattaessa eri referenssikemikaaleilla huomataan, että reagenssi näyttää olevan liian herkkä tai epäherkkä toisille referenssikemikaaleista. Korjauskertoimet ovat testauksissa rajoissa eli välillä 0,6–1,8. Inhibitioarvot eivät kuitenkaan anna haluttuja tuloksia. Käytettäessä kromia, laimennoksen 1:20 pitäisi aiheuttaa 20–80% inhibitio. Näin ei kuitenkaan käy kaikissa testeissä. Lisäksi tuloksissa on eroa samassa testissä eri kuivattujen reagenssien välillä. Sinkille vastaavan inhibition aiheuttava laimennos on 1:100 ja dikloorifenolille (DCP) 1:200. Suoraa syytä tuloksille on vaikea sanoa ilman jatkotestejä, mutta yksi varmasti vaikuttava tekijä on se, etteivät varsinkaan kuoppalevyillä kuivatut reagenssit ole kuivauksen jälkeen olleet tiiviiksi pakattuina, jolloin kuljetus huoneenlämmössä vaikuttaa tuloksiin.

Yhteenvedon voidaan todeta, että reagensseissa kuitenkin on valotasoa ja se nähtävästi säilyy ajan kuluessa, joten kuivausmenetelmät näyttäisivät toimivan. Tulevaisuudessa pakkaustapaan tulisi kiinnittää huomiota ja sitä on kehitettävä.



Yksi potentiaalinen idea on käyttää kylmäkuivaukseen kehiteltyjä alumiiniblokkeja, jotka ovat 96-kuoppalevyn tapaisia, joiden kuoppiin asetetaan pystyyn lasiampulleja<sup>19</sup>. Kyseisen systeemin saa korkitettua kylmäkuivurin sisällä, sillä siihen kuuluu myös korkit. Tällöin kosteus ei pääse imeytymään D-laktoosiin ja reagenssit luultavasti säilyisivät paremmin. Tämän systeemin etuna, kuten tavallisessakin 96-kuoppalevyssä on se, että kuivuriin mahtuisi kerralla enemmän kuivattavia reagensseja, jolloin prosessista saataisiin kannattavampi.

Kasvatusvaiheessa tehtäessä sameusmäärittämiä formasiinistandardisuoran avulla mitattiin absorbanssi myös 600 nm:ssä. Näitä tuloksia ei kuitenkaan analysoitu, eikä pohdittu olisiko prosessia mahdollista yksinkertaistaa jättämällä formasiinistandardisuora tekemättä ja mittaamalla kasvatusten absorbanssi 600 nm:ssä. Mitattuja arvoja voi käyttää myöhemmin, jos haluaa miettiä prosessin yksinkertaistamista. Lisäksi tulevista kasvatuksista kannattaa mitata lisää absorbanssi-arvoja 600 nm:ssä, jotta tuloksista saisi luotettavimmat. Voi kuitenkin olla, että yksinkertaistaminen ei onnistu, sillä absorbanssi 600 nm:ssä ei välttämättä kerro kasvatuksen oikeaa etenemistä. Absorbanssi saattaa kasvaa, vaikkei haluttuja soluja olisikaan kasvanut. Formasiinistandardisuoran käyttäminen on toistaiseksi luotettavampi menetelmä sameuden ja kasvatuksen etenemisen määrittämiseen.

Kylmäkuivattuja reagensseja täytyisi säilyttää pidempiä aikoja ja tutkia säilytyksen jälkeen valotaso. Näihin pitkäaikaisiin säilytyksiin eivät tässä työssä tehdyt 5 viikkoa vielä riitä. Reagenssien käyttöaika on tärkeä tietää, ja se saadaan kyseisillä säilytystutkimuksilla tehtyä.

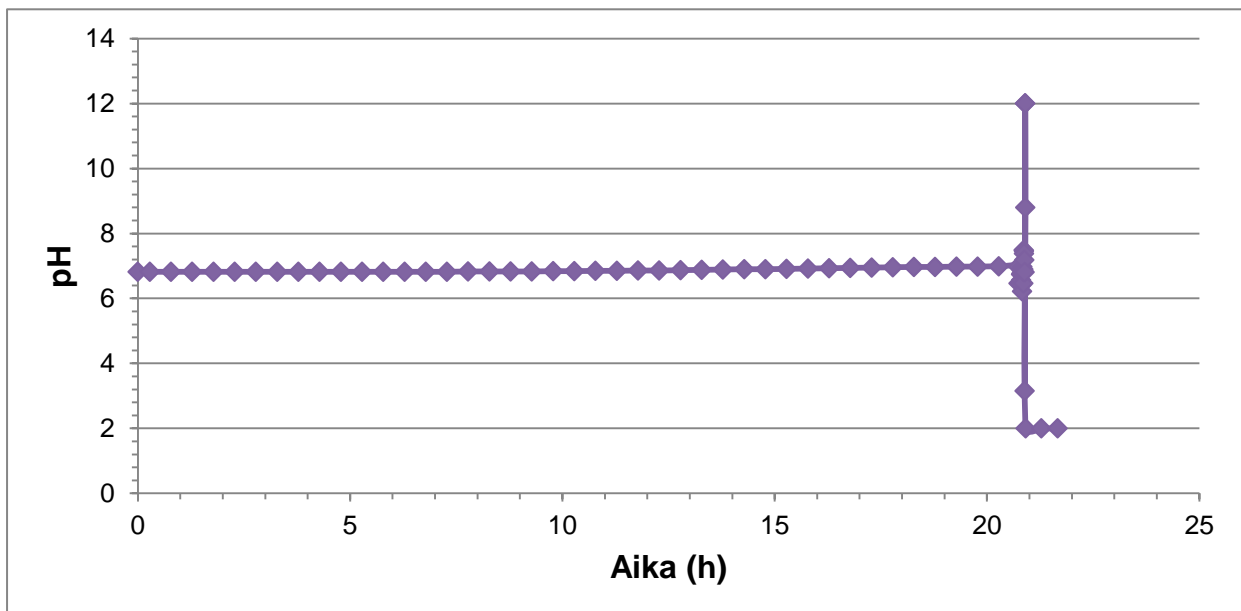
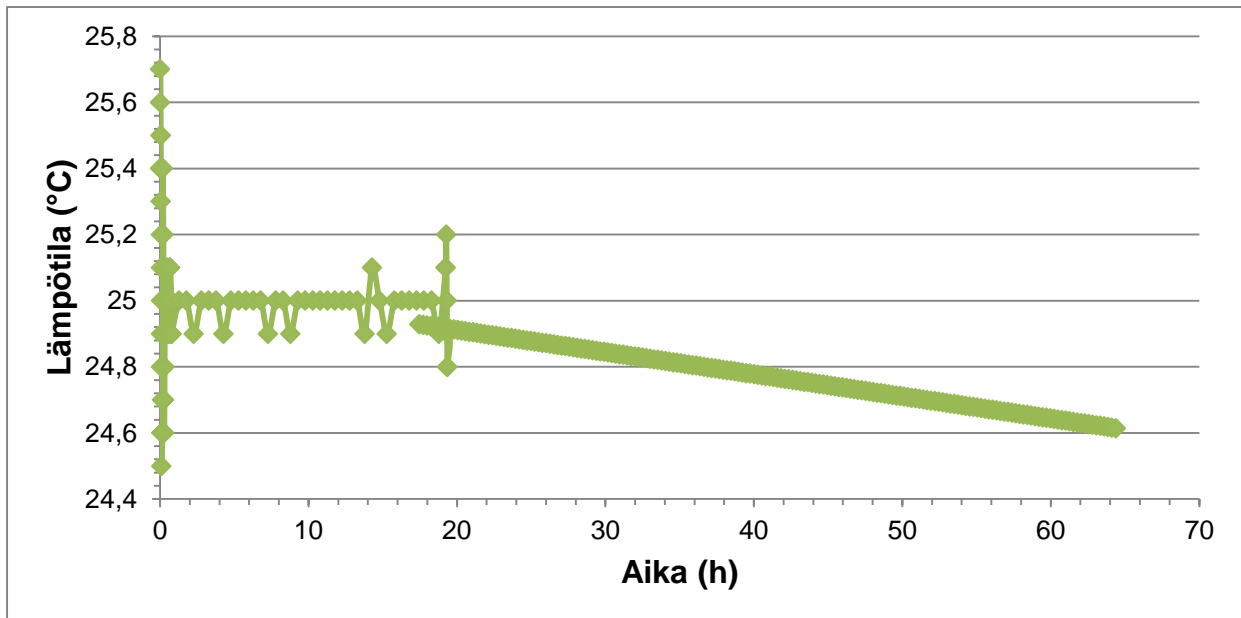
Koska reagensseja myydään ja toimitetaan ympäri maailmaa, täytyisi vielä testata, kuinka reagenssissa säilyy valotaso, kun sitä säilytetään huoneenlämmössä esim. viikko. Jos valotaso säilyy hyvänä, olisi kuljetukset mahdollista tehdä ilman kylmäpakastusta.

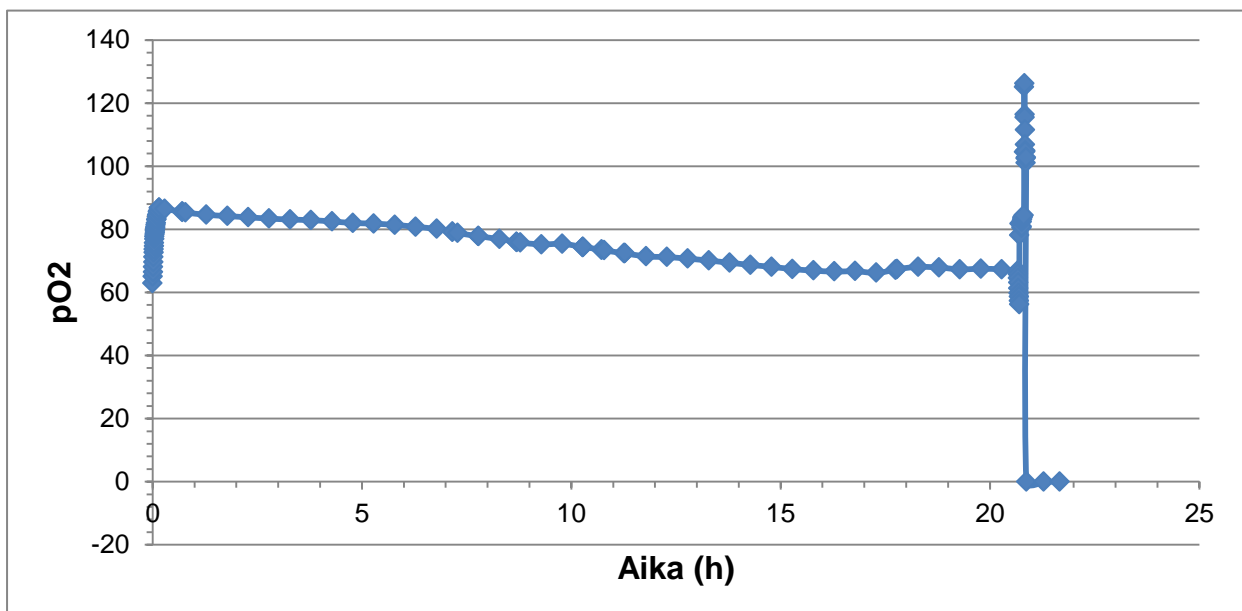
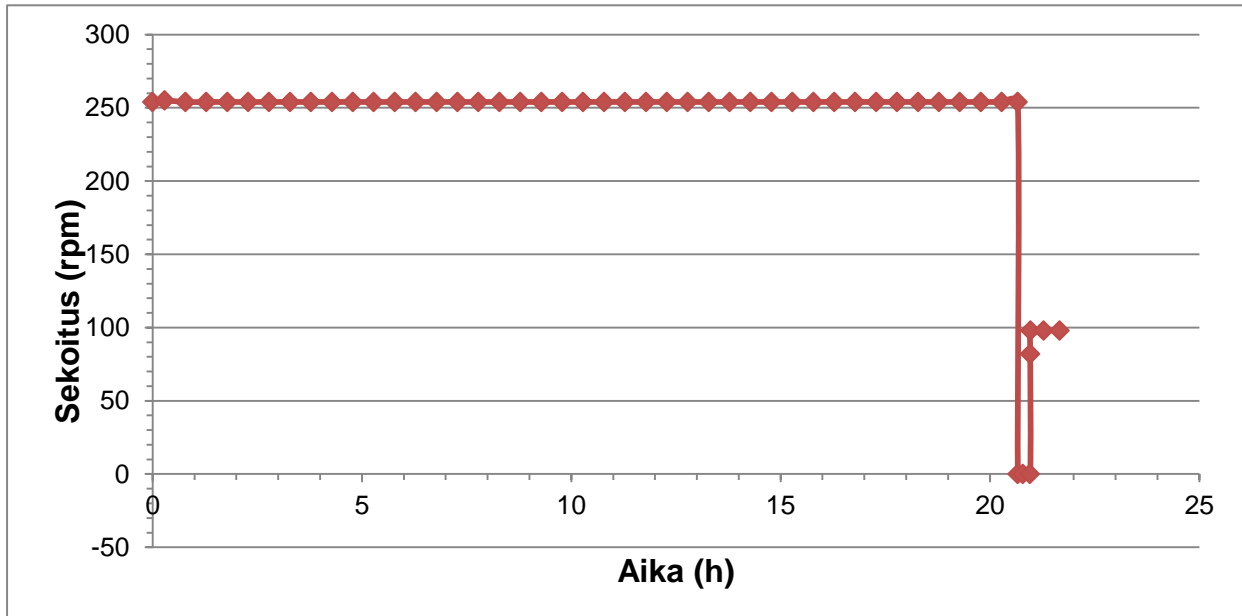
## LÄHTEET

1. Aboatox Oy. 2011. BO1243-500 BioTox™ Kit. Instructions for use. Masku.
2. Lappalainen, J. 1996. Valmistusohje: Vibrio fischeri reagent.
3. SFS-EN ISO 11348-3. Water quality. Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of Vibrio fischeri (Luminescent bacteria test). Part 3: Method using freeze-dried bacteria. 30.6.1999.
4. Marine Organisms Database [online, viitattu 24.3.2011]  
Saatavilla www-muodossa:  
[http://www.mbl.edu/marine\\_org/marine\\_org.php?func=detail&myID=Cep-140](http://www.mbl.edu/marine_org/marine_org.php?func=detail&myID=Cep-140)
5. Singleton, P. 1997. Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine. 4. painos. New York. Wiley.
6. Gram-värjäykset [online, viitattu 24.3.2011] Saatavilla www-muodossa:  
<http://labquality-fi-bin.directo.fi/@Bin/82b1ebe89ee1ba687cd84e34cc7df624/1300712853/application/pdf/2028802/Meurman%20Gram%20nettiin.pdf>
7. Yleistä mikrobeista [online, viitattu 24.3.2011] Saatavilla www-muodossa:  
[http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/hygieniaosaaminen/tietopaketti/ruokamyrkytykset/yleista\\_mikrobeista/](http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/hygieniaosaaminen/tietopaketti/ruokamyrkytykset/yleista_mikrobeista/)
8. Solunetti sanasto [online, viitattu 24.3.2011] Saatavilla www-muodossa:  
<http://www.solunetti.fi/fi/sanasto/k/>
9. Lappalainen, J. 2001. Improved use and new applications of luminescent bacteria. Turku. Turun yliopisto. Gillot.
10. SFS-EN ISO 11348-1. Water quality. Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of Vibrio fischeri (Luminescent bacteria test). Part 13: Method using freshly prepared bacteria. 30.6.1999.

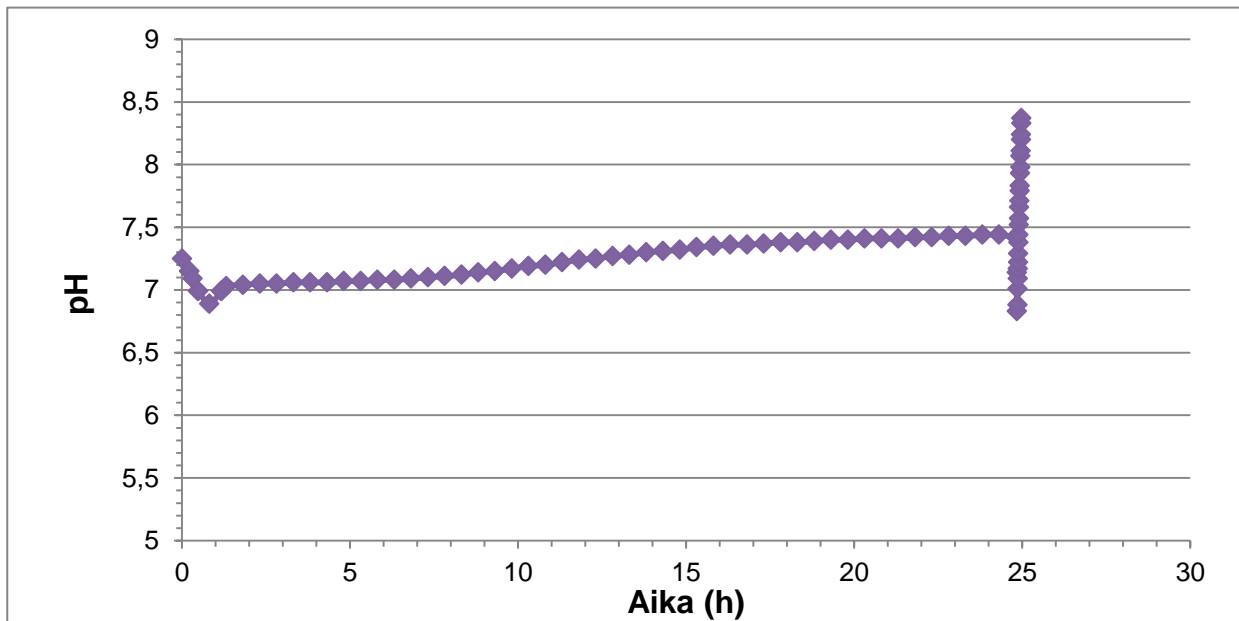
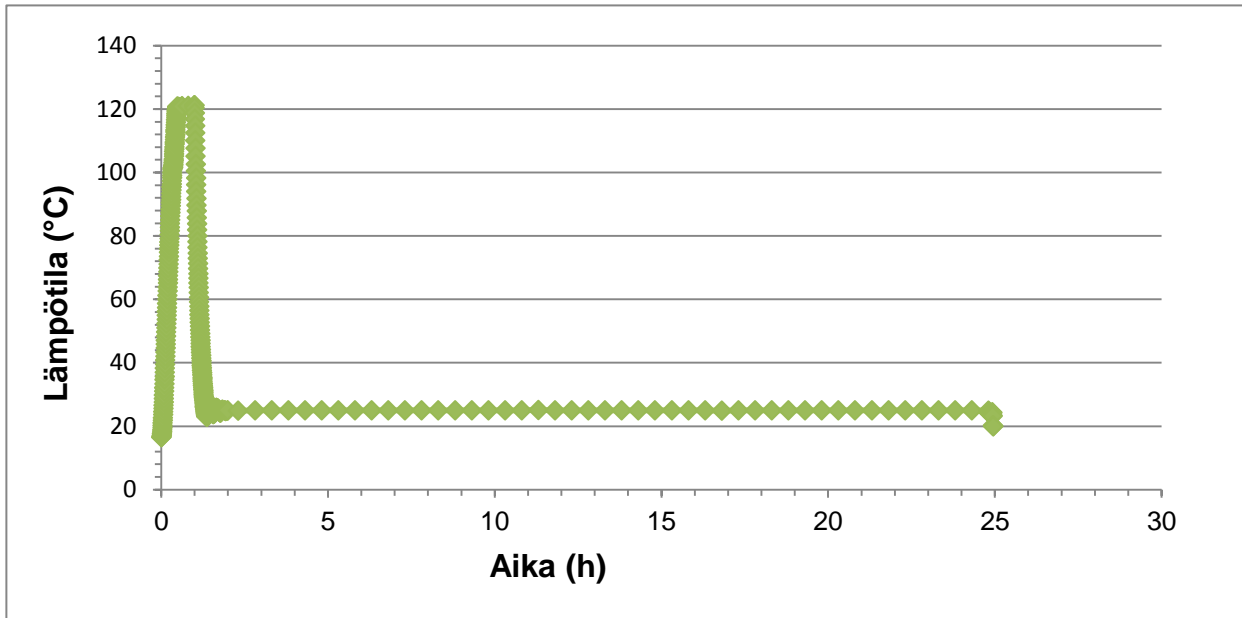
11. Ratledge, C.; Kristiansen, B. 2002. Basic biotechnology. 2. painos. Cambridge. Cambridge University.
12. Jokinen, M. 2011. Prosessitekniikka 1. Turun ammattikorkeakoulu. Turku.
13. Salmi, T. O.; Mikkola, J.-P.; Wärnå, J. P. 2010. Chemical Reaction Engineering and Reactor Technology. Boca Raton, Florida. CRC.
14. Christ, M. 2010. Smart Freeze Drying: Basic principles, optimum procedures and applications. Kääntänyt Richard Holmes. Osterode am Harz.
15. Bacteria Freeze Drying Protocol. [online, viitattu 24.3.2011] Saatavilla www-muodossa:  
<http://www.opsdiagnostics.com/notes/ranpri/rpbacteriafdprotocol.htm>
16. Lappalainen, J. 2011. Työohje: Sameuden määrittäminen vesiliuoksesta.
17. Båtsman, A. 2006. Reagent Diluent – liuoksen valmistus (12,2 ml/pullo). Turku.
18. Båtsman, A. 2005. Sample Diluent – liuoksen valmistus (50,5–51 ml/pullo). Turku.
19. VirTis SP Industries. 2004. VirTis® 96 Well Freeze Drying Systems. New York.

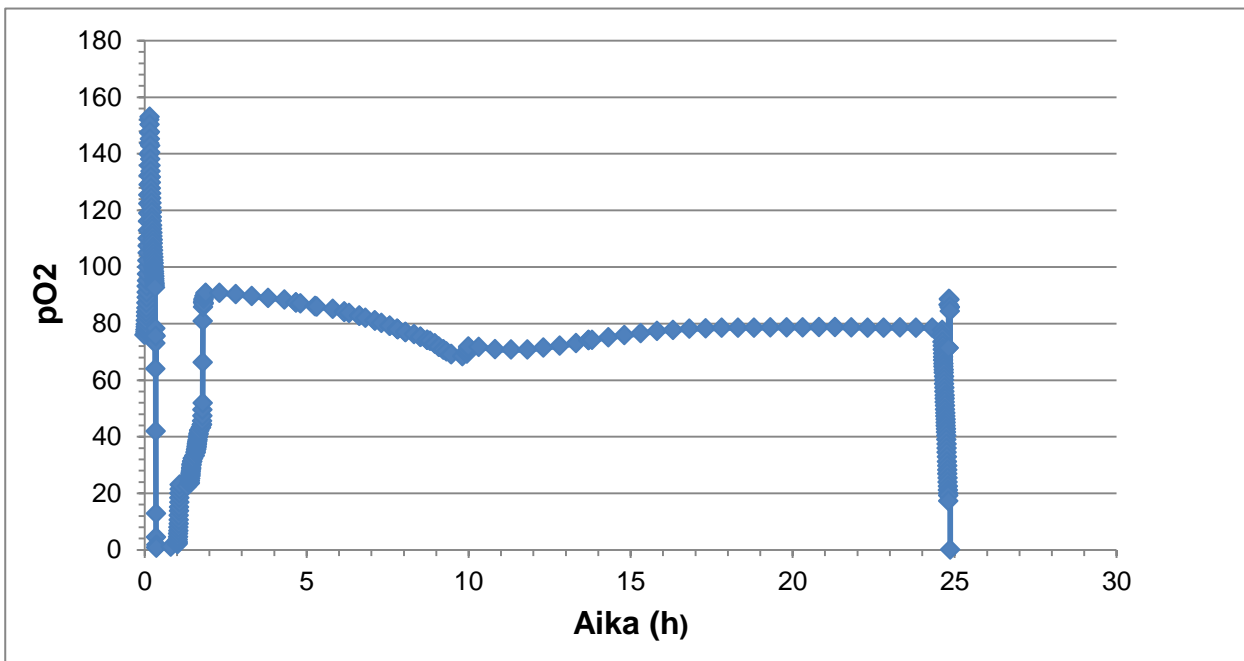
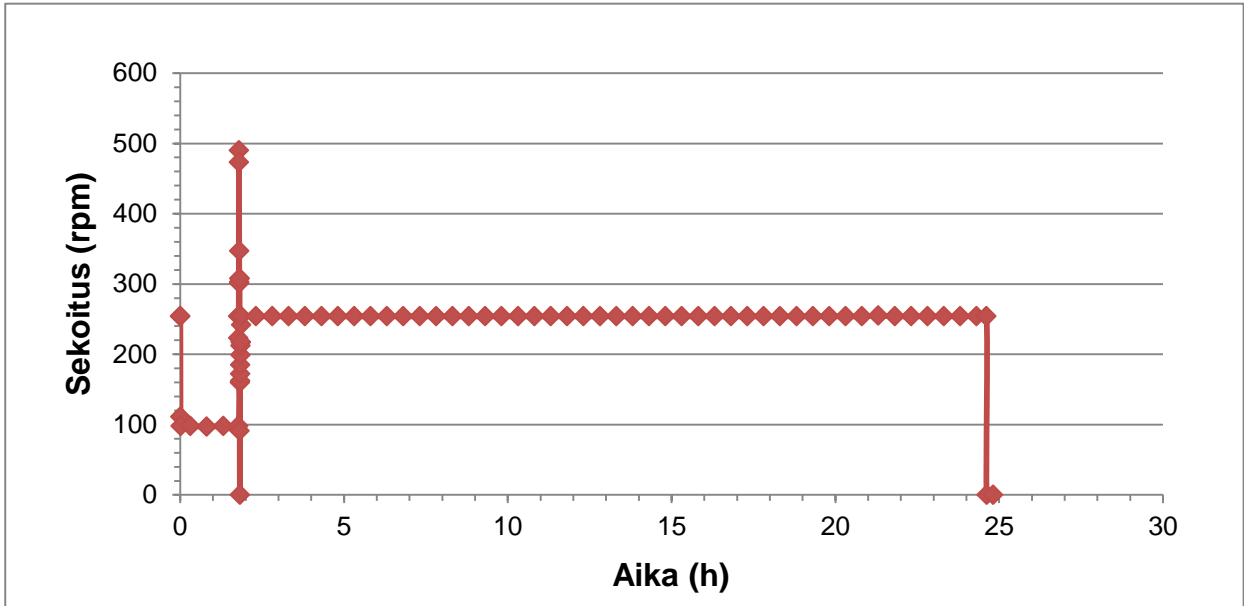
## Ensimmäinen kasvatus bioreaktorissa



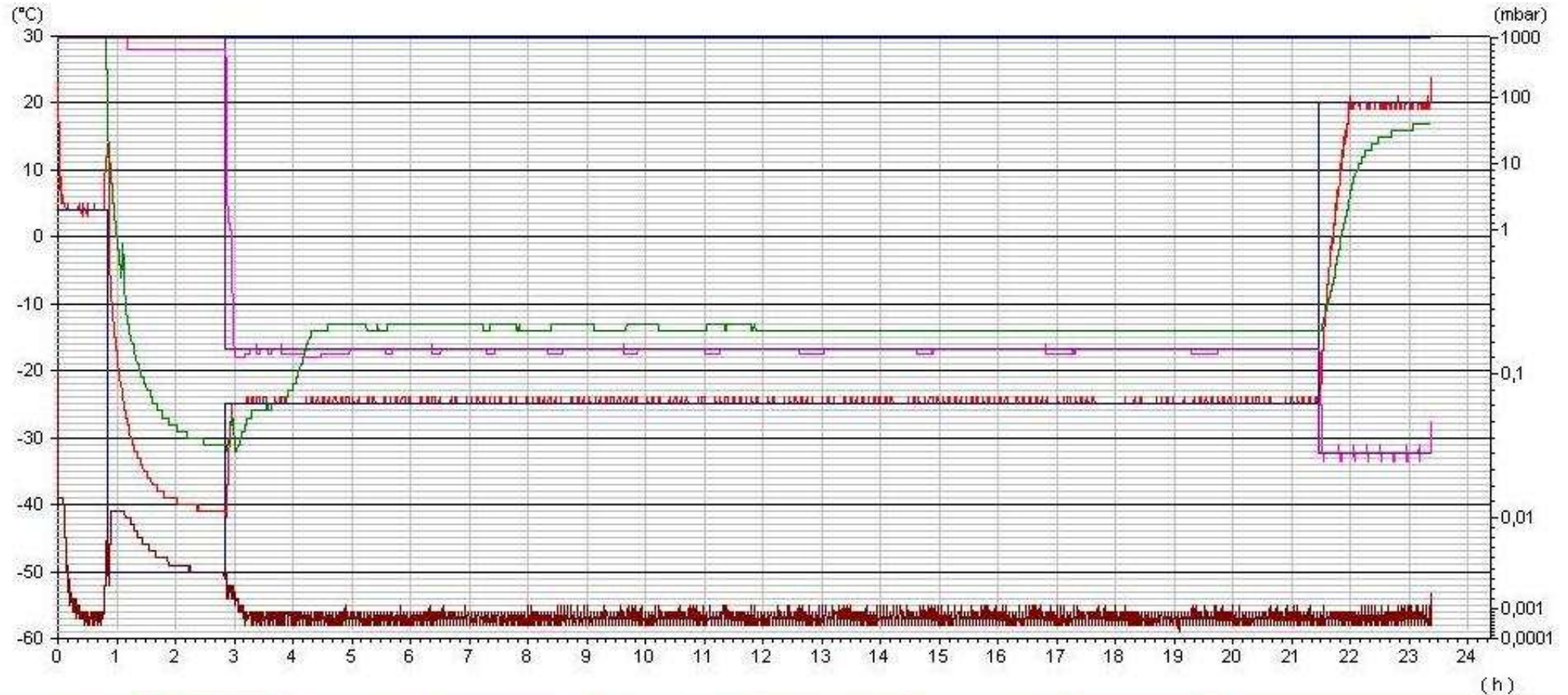


## Toinen kasvatus bioreaktorissa





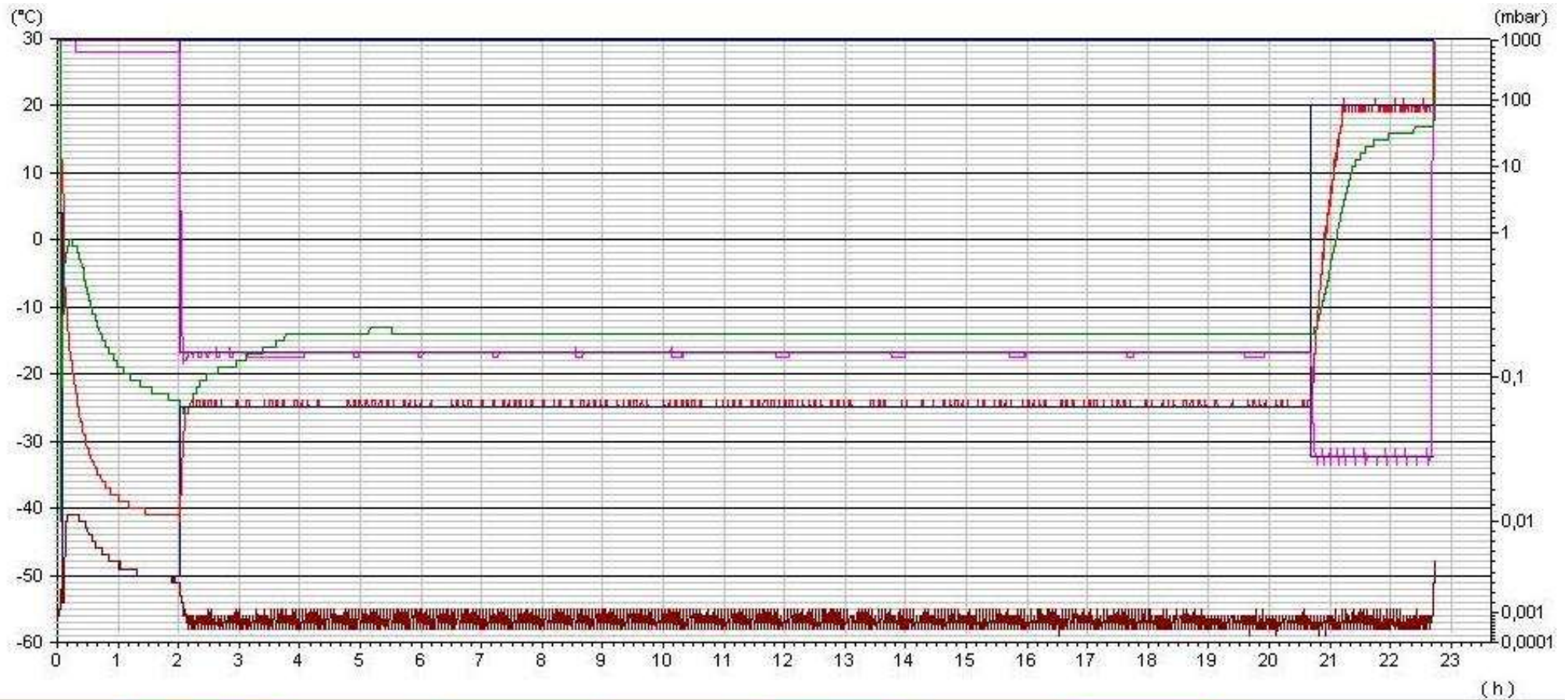
Ensimmäinen kuivaus



Vacuum	0,07 mbar	Product1	17 °C	Set.Vacuum	0,05 mbar	NotUsed	-----
Shelf	24 °C	Product3	-----	Set.Shelf.	20 °C	NotUsed	-----
NotUsed	-----	Icecond.	-53 °C	NotUsed	-----	NotUsed	-----

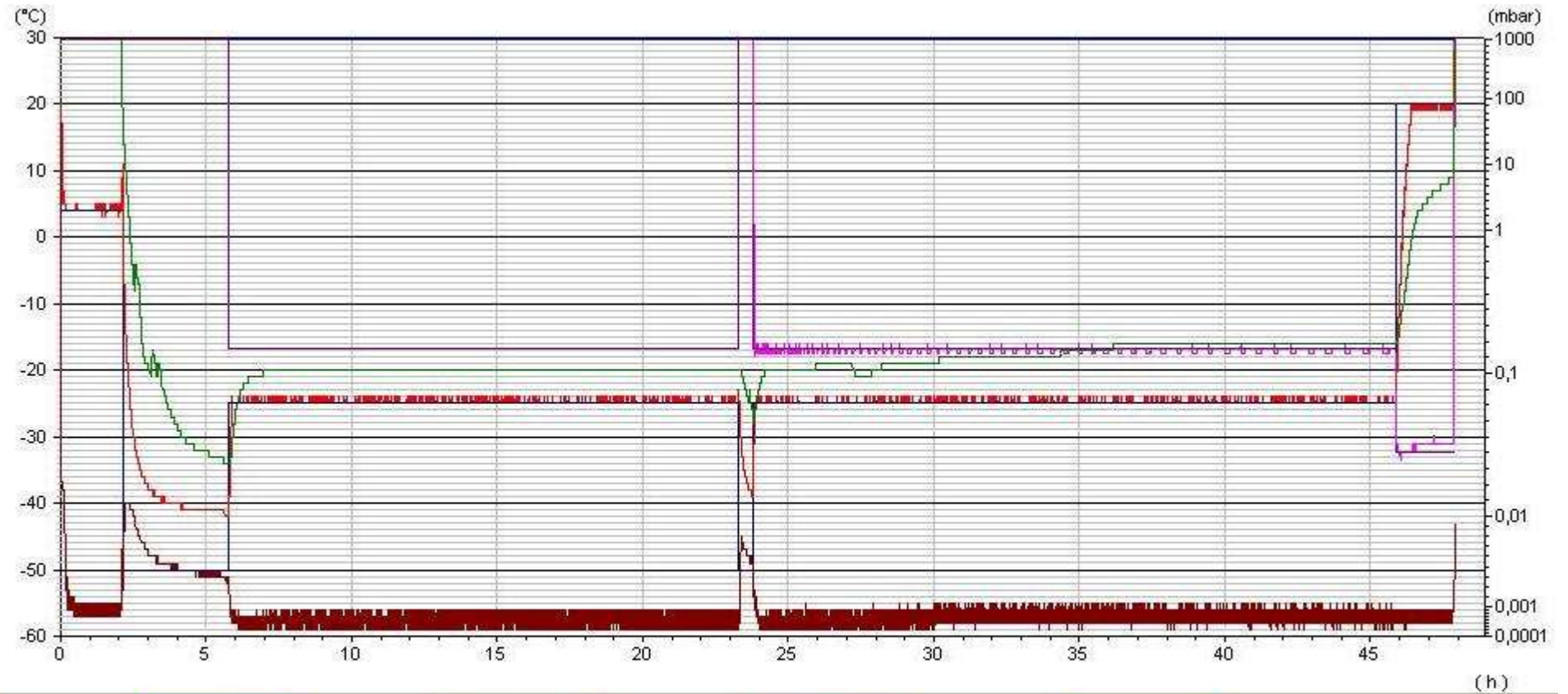


Toinen kuivaus



Vacuum	1000 mbar	Product1	-----	Set.Vacuum	0,05 mbar	NotUsed	-----
Shelf	26 °C	Product3	-----	Set.Shelf.	20 °C	NotUsed	-----
NotUsed	-----	Icecond.	-49 °C	NotUsed	-----	NotUsed	-----

Kolmas kuivaus



Vacuum	1000 mbar	Product1	-----	Set.Vacuum	0,05 mbar	NotUsed	-----
Shelf	30 °C	Product3	-----	Set.Shelf.	20 °C	NotUsed	-----
NotUsed	-----	Icecond.	-43 °C	NotUsed	-----	NotUsed	-----