



Jarell Aro

# Jäähdytysvesikierron mikrobiologinen hallinta

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja kemiantekniikka

Insinöörityö

19.1.2022

## Tiivistelmä

Tekijä: Jarel Aro  
Otsikko: Jäähdytysvesikierron mikrobiologinen hallinta  
Sivumäärä: 45 sivua + 5 liitettä  
Aika: 19.1.2022

Tutkinto: Insinööri (AMK)  
Tutkinto-ohjelma: Bio- ja kemiantekniikka  
Ammatillinen pääaine: Bio- ja elintarviketekniikka  
Ohjaaja: Lehtori Carola Fortelius-Sarén

---

Tämä insinöörityö tehtiin kartonkiteollisuuden alalla toimivalle yritykselle. Työn tarkoituksena oli tutkia jäähdytysvesikierron mikrobeja ja tutkimuksien tuloksien perusteella tehdä yritykselle ehdotuksia menetelmistä, joilla mikrobeja pystyttäisiin hallitsemaan.

Jäähdytysvesijärjestelmän mikrobeja tutkittiin neljällä eri menetelmällä. Jäähdytysvesikierrosta otettuja vesinäytteitä suodatettiin viljelyä ja DNA-analyysyä varten. Näillä menetelmillä tutkittiin jäähdytysvedessä olevien mikrobien määrä sekä luokitusta. Jäähdytysvesisäiliön pesun tehokkuutta tutkittiin kontaktimaljanäytteillä ja näytteenotopisteiden puhtautta tutkittiin pyyhkäisynäytteillä.

Määrittämien tulokset olivat vaihtelevia. Näihin tuloksiin vaikutti huomattavasti jäähdytysvesisäiliön täyttäminen oletettavasti epäpuhtaalla vedellä sen pesun jälkeen. Jäähdytysvesikierrossa käytetyn veden laadun tulisi olla talousveden kaltaista. Säiliön täyttämiseen käytetyn veden ja aikataulullisten haasteiden vuoksi tässä työssä ei ehditty tehdä kaikkia suunniteltuja tutkimuksia tai suunniteltua biosidin testausta ja sen tehokkuuden varmistamista.

Tehtyjen tutkimuksien perusteella yritykselle tehtiin ehdotuksia hallintamenetelmistä, joilla havaittua mikrobiologista ongelmaa pystyttäisiin tulevaisuudessa hallita. Näihin kuuluvat näytteenotto-ohjeen noudattaminen, huollon yhteydessä järjestelmän puhdistamista varten toimintatavat, joita noudattamalla voidaan varmistua järjestelmän ja jäähdytysveden puhtaudesta. Ehdotuksia annettiin myös suositellusta desinfiointiaineesta ja sen annostelusta, kierrossa olevan UV-suodatuslaitteen käytöstä ja huollosta prosessin aikana sekä sen mahdollisesta tehon parantamisesta uudella putkistolla ja ultraäänilaitteistolla.

Avainsanat: jäähdytysvesikierto, mikrobiologia, bakteeriviljely, DNA-analyysi, talousvesi

## Abstract

Author: Jarel Aro  
Title: Microbiological Control of a Cooling Water Circuit  
Number of Pages: 45 pages + 5 appendices  
Date: 19 January 2022

Degree: Bachelor of Engineering  
Degree Programme: Biotechnology and Chemical Engineering  
Professional Major: Biotechnology and Food Engineering  
Supervisor: Carola Fortelius-Sarén, Senior Lecturer

---

This thesis was made for a company in the cardboard industry. The aim was to study microbes in a cooling water circuit and based on the findings make proposals for methods, which can be used to control the microbes.

Microbes in the cooling water system were studied with four different techniques. Water samples, that were taken from the cooling water circuit, were filtered for cultivation and DNA analyses. These techniques were used to study the quantity and classification of the microbes found in the cooling water. The effectiveness of the cooling tank's washing was studied with contact agar plates and the cleanliness of the sampling places were studied with a swab test.

The results of the assays were fluctuating. These results were significantly impacted by the presumably unclean water used for the filling the cooling tank after its wash. The quality of the water used in the cooling water circuit should be similar to domestic water. Due to water used to fill the tank and scheduling challenges, there was not enough time to conduct all the planned studies or conduct the planned testing of a biocide and its effectiveness.

On the basis of the results of conducted studies, the company was given proposals of methods of control, which could be used in the future to control the observed microbiological problem. These include adherence to sampling instructions, produces, which should be adhered to during the system maintenance to ensure the cleanliness of the system and the cooling water. Suggestions were also made for the recommended disinfectant, and its dosing, for the use and maintenance of a UV filtration device in the system during the process and for the possible improvement of this device's efficiency with new piping and ultrasonic equipment.

Keywords: cooling water circuit, microbiology, bacteria culture, DNA analysis, domestic water

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Työn tausta	1
2.1	Kartonkiteollisuus	1
2.2	Kartonki	2
2.3	Tutkimuskohde	4
2.3.1	Prosessin jäähdytysvesikierto	4
2.3.2	Jäähdytysveden laatu	7
2.3.3	Talousveden mikrobiologiset laatuvaatimukset	7
2.3.4	Suljetun vesikierron mikrobiologiset ongelmat	9
2.3.5	Biofilmiä muodostavat mikrobit	9
2.4	Työn aikana tehdyt toimenpiteet	10
3	Kokeelliset tutkimukset	11
3.1	Työn toteutus	11
3.2	Materiaalit ja menetelmät	12
3.3	Jäähdytysveden mikrobit	12
3.3.1	Vesinäytteiden mikrobiologiset analyysit	14
3.3.2	DNA-analyysit	17
3.4	Pintanäytteet	18
3.4.1	Pyyhkäisynäytteet	18
3.4.2	Kontaktimaljanäytteet	19
4	Tulokset	22
4.1	Vesinäytteiden mikrobiologiset analyysit	22
4.2	DNA-analyysit	23
4.3	Pyyhkäisynäytteet	24
4.4	Kontaktimaljanäytteet	25
5	Tulosten tarkastelu	26
5.1	Työn aikana tehtyjen toimenpiteiden vaikutukset	26
5.2	Vesinäytteiden mikrobiologiset analyysit	27
5.3	DNA-analyysit	29

5.4	Pyyhkäisynäytteet	32
5.5	Kontaktimaljanäytteet	33
6	Johtopäätökset	36
7	Yhteenveto	41
	Lähteet	42
	Liitteet	
	Liite 1: Vesianalyysi	
	Liite 2: Viljelyiden tulokset	
	Liite 3: Kontaktimaljanäytteiden tulokset	
	Liite 4: Näytteenotto-ohje	

## Lyhenteet

- BART: *Biological Activity Reaction Test*. Testi sulfaatteja pelkistävien bakteerien tunnistamiseksi.
- EAL: *Endo Agar LES (Lawrence Experimental Station)*. Koliformisia bakteereja suosiva kasvatusalusta.
- mFC: *Membrane Fecal Coliform*. Suolistoperäisiä koliformisia bakteereja suosiva kasvatusalusta.
- MIP: *Major intrinsic protein*. Proteiini, jonka perimän koodaavaa aluetta käytetään tunnistamiseen DNA-analyysissä.
- PCA: *Plate Count Agar*. Yleiskasvatusalusta mikrobien lukumäärän tunnistamiseen.
- PCR: *Polymerase Chain Reaction*. DNA:n monistustekniikka.
- PMY: Pesäkkeen muodostava yksikkö.
- qPCR: *Quantitative Polymerase Chain Reaction*. Menetelmä, jossa tutkitaan DNA:n monistumista reaaliajassa.
- rRNA: Ribosomaalinen RNA
- RODAC: *Replicate organism direct agar contact method*. Menetelmä, jolla tutkitaan tasapintojen mikrobeita.
- SAS: *Surface Air System*. Laite, jolla tutkitaan mikrobeja ilmassa.
- SDA: *Sabourad Dextrose Agar*. Homeita ja hiivoja suosiva kasvatusalusta.

S&B: *Slanetz and Bartley*. Suolistoperäisiä enterokokkeja suosiva kasvatusalusta.

VRBGA: *Violet Red Bile Glucose Agar*. Suosiva kasvatusalusta *Enterobacteriaceae*-heimoon kuuluville bakteereille.

# 1 Johdanto

Tämän työn tarkoituksena oli tutkia kartongin päällystyslaitteiston jäähdytysvesikierrossa ilmenevää mikrobiologista ongelmaa sekä tehtyjen tutkimusten perusteella antaa yritykselle ehdotuksia toimenpiteistä mikrobitalason saattamisesta halutun rajan alapuolelle. Työn arkaluonteisuuden takia yritys tahtoi pysyä anonyyminä.

Jäähdytysjärjestelmän vedessä olevia mikrobeita tutkittiin erilaisilla mikrobiologisilla määrittämisillä. Määrittämisen tavoitteena oli kartoittaa nykytilanne ja tutkia mikrobitalason muuttumista prosessin aikana. Näillä tutkimuksilla tahdottiin saada mahdollisimman paljon tietoa systeemissä ilmenevistä mikrobeista. Työn tavoitteena oli näiden tutkimusten perusteella ehdottaa erilaisia menetelmiä mikrobien hallintaan, jotta saavutettaisiin yrityksen sisäisestä auditoinnista tulevat mikrobiologiset vaatimukset. Jäähdytysvesikierrossa käytettävää veden laatua voidaan verrata talousveden laatukriteereihin.

## 2 Työn tausta

Tämä työ tehtiin kartonkiteollisuusalan yritykselle ja koska tutkimuskohteena olivat jäähdytysveden mikrobit, tässä työssä käsitellään vain lyhyesti kartonkiteollisuutta, kartonkia, sen valmistusta sekä laitteistoa.

### 2.1 Kartonkiteollisuus

Kartonkiteollisuus kuuluu kemialliseen metsäteollisuuteen, johon kuuluvat myös paperi- ja massateollisuus. Massateollisuus voidaan edelleen jaotella sellun ja mekaanisen massan valmistukseen, joita molempia käytetään valmistettaessa paperia tai kartonkia. Kemiallisella metsäteollisuudella tarkoitetaan teollisuutta, joka prosessoi puuainesta muiksi tuotteiksi käyttäen hyväksi kemikaaleja. [1.]

Paperin ja kartongin teollisen tuotannon nykymuodossaan voidaan katsoa alkaneen 1800-luvulla. Ensimmäiset paperikoneet käyttivät raaka-aineinaan vielä

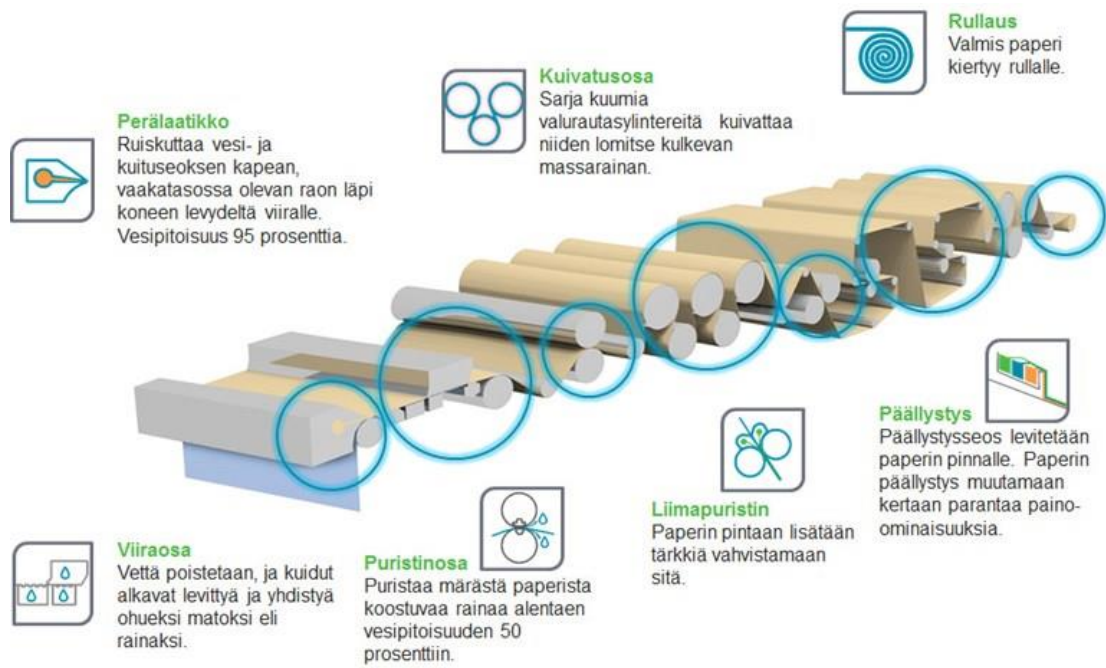
samoja raaka-aineita, joita käytettiin perinteisen paperin valmistuksessa. Paperia valmistettiin muun muassa hampusta tai puuvillasta. Puukuidun käyttäminen paperin valmistuksessa yleistyi vasta 1800-luvun puolivälin jälkeen. Historiallisesti kartonki on ollut vain paksua paperia ja nyky muodossaan sen teollinen valmistus voidaan katsoa alkaneen vuonna 1817 Englannissa. Kartonkia on yleensä käytetty lähinnä pakkausmateriaalina ja sen teollisen tuotannon alkamisen jälkeen se on alkanut korvata muita käytettyjä pakkausmateriaaleja. [2; 3.]

## 2.2 Kartonki

Kartongin ja paperin ero on niiden neliömassoissa sekä niiden kerroksissa; paperi on joitakin poikkeuksia lukuun ottamatta yksikerroksista ja neliöpainoltaan yleensä huomattavasti vähemmän kuin kartongin neliömassa. Molempien valmistusmenetelmät ovat samankaltaiset ja lyhyesti sanottuna prosessit voidaan katsoa olevan vain raaka-ainemassan kuivattamista. Tyypillinen laitteisto on esitelty kuvassa 1. Halutuista raaka-aineista muodostetaan vesipitoinen massa, joka suihkutetaan tasaisesti koneen perälaatikosta viiralle. Viirakankaalla massasta poistuu suurin osa vedestä suotautumalla eli vesi poistuu painovoiman vaikutuksen avulla ja siitä muodostuu ohut matto, jota kutsutaan rainaksi. Tämän jälkeen rainaa puristetaan, jolloin siinä olevat kuidut painautuvat toisiinsa. Tällä puristuksella on suurin vaikutus valmistettavan tuotteen ominaisuuksiin ja siihen voidaan vaikuttaa puristustelojen määrällä, rakenteella ja sijainnilla. Puristuksen jälkeen tuote kuivataan. [4; 5.]

Kuivauksen jälkeen voidaan tehdä erilaisia jälkikäsittelyjä. Näihin lukeutuu muun muassa pintaliimaus, päällystys ja kalanterointi. Kalanteroinnissa raina puristetaan kahden tai useamman telan lävitse, jolloin voidaan vaikuttaa tuotteen kiiltoon, sileyteen, tiheyteen ja paksuuteen. Pintaliimauksessa rainan pintaan puristetaan liimaa, jolla pyritään parantamaan tuotteen lujuusominaisuuksia. Päällystys voidaan karkeasti ottaen jakaa kahteen eri luokkaan: pigmenttipäällystykseen ja kalvopäällystykseen. Pigmenttipäällystyksellä tahdotaan vaikuttaa tuotteen ulkonäköön ja painatusominaisuuksiin. Kalvopäällystyksellä voi-

daan myös vaikuttaa tuotteen painettavuuteen, mutta yleensä se tehdään barriääri-ominaisuuksien takia eli sillä pyritään parantamaan tuotteen läpäisemättömyyttä. Tällä menetelmällä voidaan valmistaa esimerkiksi nestekartonkia. [6; 7, s.13.]

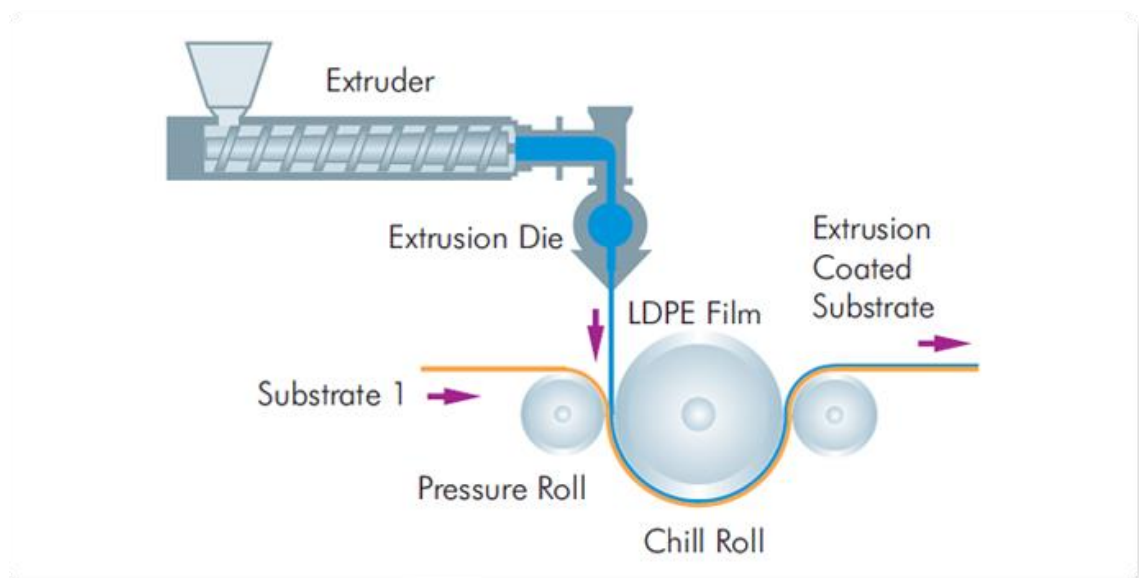


Kuva 1. Paperin valmistuslaitteisto. Kuvassa esiteltynä paperin valmistuslaitteiston eri osat. [5]

Kartonkia käytetään pääasiallisesti erilaisten pakkauksien valmistuksessa riippuen niiden käyttökohteesta. Kartonki on pakkausmateriaalina erittäin monipuolinen, ja sitä voidaan käyttää tertiääri-, sekundaari- tai primaaripakkauksiin. Lyhyesti tiivistettynä itse pakattava tuote voidaan pakata kartonkiin (primaaripakkaus), esimerkkinä nestekartongista valmistettu maitotölkki. Sekundaaripakkauksiin kuuluvat esimerkiksi myyntipakkaukset, joihin on pakattu monta yksittäistä tuotetta helpottaen tuotteen esillepanoa kaupoissa, esimerkiksi suklaapattukalaatikko. Sekundaaripakkauksia voidaan edelleen pakata tertiääripakkauksiin, jolloin suurien tuote-erien logistiikka on helpompaa.

## 2.3 Tutkimuskohde

Tämän työn tutkimuskohteena ollut jäähdytysvesikierto on osa kartongin päällystysprosessia. Kartonkia päällystetään muovilla ekstruusiomenetelmällä. Tässä menetelmässä muovigranulaatteja sulatetaan suulakepuristimessa eli ekstruuderissa. Ekstruuderin ruuvi painaa muovipellettejä sen seinämiin, ja ruuvien aikaan saama paine sekä ekstruuderissa olevat lämmityselementit saavat muovin sulamaan [7, s. 125–128, 140–141]. Tämä sula massa valutetaan muotista kartongin ja jäähdytystelan väliin ohuena nauhana [7, s. 141–145]. Puristustela painaa muovin kartongin pinnalle, ja jäähdytystela saa muovin jähmetty-mään siihen kiinni [7, s. 146–147]. Tämä osa prosessista on esitelty kuvassa 2.

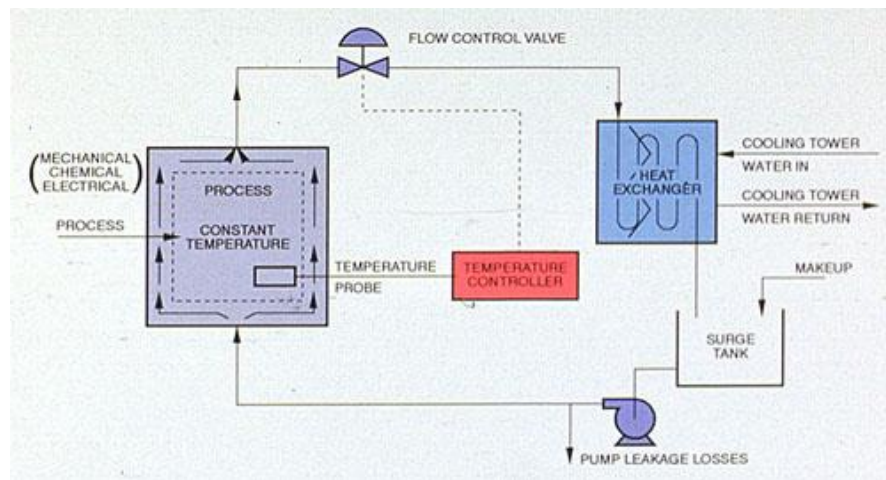


Kuva 2. Kartongin laminointilaitteisto. Laitteiston poikkileikkaus, josta nähdään sulan muovin valutus kartongin pinnalle. [8]

### 2.3.1 Prosessin jäähdytysvesikierto

Prosessin jäähdytysvesi kulkee suljetussa kierrossa. Suljetussa vesikierrossa prosessin jäähdytysvettä kierrätetään järjestelmässä ilman, että vettä poistuu kierrosta. Jäähdytysvettä voi poistua hieman kierrosta haihtumisen kautta,

mutta tämä on vähäistä, sillä suljetussa kierrossa vesi on eristetty ympäristöstään. Tällaisessa systeemissä jäähdytysvesi kiertää prosessin lämmönvaihtimien ja veden jäähdyttimien välillä. Prosessin lämpöä tuottavat osat jäähdytetään vedellä, joka jäähdytetään takaisin kylmäksi jäähdyttimillä. Koska suljetussa kierrossa oleva vesi ei vaihdu, sen laatu ja lämpötila ovat helpommin hallittavissa kuin avoimessa jäähdytysvesikierrossa. Orgaanisen lian kasaantumista pinnoille eli biologista foulaantumista tapahtuu vähemmän, ja prosessin läpi kulkevan veden lämpötila on stabiilimpi kuin avoimessa jäähdytysvesikierrossa, jossa uutta vettä kierrätetään koko ajan systeemin lävitse. Tämä auttaa myös systeemissä mahdollisesti tapahtuvaan korroosioon, sillä veteen ei juuri ollenkaan sekoitu happea. Koska happi yleensä sekoittuu ilmasta veteen, sitä pääsee sekoittumaan kiertoon vain lisätyn veden mukana tai esimerkiksi jäähdytysvesisäiliössä veden ja ilman rajapinnan kautta. Hapen sekoittumista veteen voi tapahtua myös lämmönvaihtimissa ja pumpuissa. Tyypillinen suljettu vesikierto on esitelty kuvassa 3. [9.]



Kuva 3. Suljettu jäähdytysvesikierto. Tyypillisen suljetun vesikierron vuokaavio. [9]

Luottamuksellisesta syistä prosessista ei ole esitetty vuokaaviota. Veden viipymistä laitteistossa on vaikea arvioida eikä tiedetä tarkkaan, kuinka kauan vedellä kestää kulkea laitteiston lävitse. Jäähdytysvesisäiliöstä vesi on johdettu kahden eri linjaston koneille, joissa se jäähdyttää prosessin eri osia. Suurin osa

lämmönvaihdosta tapahtuu jäähdysteloilla. Vesi virtaa myös kumipäällysteisten puristustelosten lävitse, jotka tarvitsevat vähemmän jäähdystystä kuin sulan muovin kanssa kosketuksissa olevat jäähdystelot, jotka ovat vaippajäähdysteisiä. Vaipan sisäpuolella vesi virtaa 10–15 mm:n kokoisessa tilassa kierukan muotoista rataa telan ympäri. Laminaattorilta ulostuleva vesi on noin 16 °C ja sisään tuleva vesi on likimain saman lämpöistä kuin säiliössä oleva vesi, joka jäähdystetään erillisellä kierrolla noin 10-asteiseksi. Kesällä säiliön vettä jäähdystetään ammoniakkipressureilla ja talvella se jäähdystetään järvivedellä lämmönvaihtimien avulla. Jäähdystysvesisäiliön tilavuus on noin 70 m<sup>3</sup> ja kierron tilavuus noin 10 m<sup>3</sup>. Jäähdystysvesisäiliö on rakenteeltaan kaksiosainen. Säiliössä on väliseinä kuuman ja kylmän puolen välissä, jotka ovat kuitenkin yhteydessä toisiinsa, sillä väliseinä ei ulota säiliön pohjaan asti. Kuumalle puolelle saapuu kierrosta tuleva lämmin vesi sekä sieltä lähtee putkisto lämmönvaihtimille. Lämmönvaihtimilta vesi palaa takaisin säiliön kuumalle puolelle ja säiliön pohjalle oleva kylmä vesi virtaa kylmälle puolelle, josta se pumpataan takaisin kierto. [10.]

Prosessin läpikäynyt vesi kulkee UV-suodatinlaitteiston kautta takaisin jäähdystysvesisäiliöön. Laitteiston suodatuskapasiteetti on noin 29 m<sup>3</sup>/h, ja teoreettisesti sen pitäisi pystyä suodattamaan koko prosessin vesi noin joka kolmas tunti. Yrityksen tekemien mittausten perusteella laitteiston kohdalla paine kuitenkin pienenee noin 2,5-kertaisesti, joten suodatettavaa kokonaismäärää on syytä epäillä. Laitteisto koostuu esi- ja jälkisuodattimesta sekä UV-valokammioista. Esisuodattimessa vesi suodatetaan 25 µm suodatinpussin lävitse ja sen yhteydessä on myös magneettisauva, jonka on tarkoitus poistaa vedestä metalleja. Magneettisauvaan tarttuu huomattavasti ainesta, ja tämän epäiltiin johtuvan ainakin osittain mikrobien aiheuttamasta pistekorroosiosta. Aineista, joihin tarttuu magneettisauvaan, ei ole tutkittu. Kiertoön syötetään korroosionestoainetta, mutta tämän tehosta ei ole varmuutta ja voidaan epäillä, että UV-valo vie osan aineen tehosta [11]. UV-valokammiossa on kolme lamppua, jotka tuottavat 400 J/m<sup>2</sup> UV-annoksen. Jälkisuodattimessa on 5 µm:n suodatinpussi. Veden on usein todettu olevan sameaa ja likaantuvan nopeasti, jolloin UV-valon teho on

huomattavasti teoreettista arvoa pienempi; UV-valo ei pysty läpäisemään samaa vettä hyvin, ja lika kertyy lamppujen pinnoilla estäen sen säteilyn [11; 12, s. 126]. Tällainen UV-suodatinlaitteisto pitäisi olla yksin riittävä pitämään mikrobitason hallinnassa vastaavassa systeemissä [11], mutta koska vesi likaantuu nopeasti, sen teho on huono.

### 2.3.2 Jäähdytysveden laatu

Jäähdytysvesikierrossa käytetty vesi puhdistetaan järvivedestä yrityksen sisäisellä vedenpuhdistamolla. Vesi puhdistetaan talousvesikelpoiseksi. Vedenpuhdistamolta tulevaa vettä käytetään kierron lisäksi myös yrityksen talousvesijärjestelmässä, eli jäähdytysvesisäiliöön haarautuu putki yrityksen talousvesijärjestelmästä. Jäähdytysvesisäiliöön pystytään lisäämään vettä noin kaksi litraa minuutissa. Tämän hitauden epäiltiin johtuvan putken haaroituksesta talousvesijärjestelmästä. Tämän putken haaran tilavuus on noin 200 litraa. Jotta vesi ei seisoi putkessa kauaa, jäähdytysvesisäiliöön lisätään noin 200 litraa joka toinen päivä. Tähän kuluu aikaa noin kaksi tuntia, ja sen yhteydessä kiertoon lisätään myös korroosionestoainetta. Koska vesi virtaa niin hitaasti säiliöön, kierrossa oleva ylimääräinen vesi valuu ylivuotoventtiilistä pois. Tästä voidaan arvioida koko prosessiveden vaihtuvan kerran noin kahden vuoden välein. [10; 13.]

Puhdistettavan järviveden laatua tutkitaan jatkuvatoimisilla johtokyky- sekä pH-mittareilla. Veden laatua tutkitaan myös viikoittain otettavilla näytteillä yrityksen laboratoriossa. Tästä sekä kierrossa olevasta vedestä tehdään myös kerran kuussa mikrobiologiset analyysit sekä yhteistyökumppanin kautta tehdään tarkempi veden kemiallinen analyysi. [13.]

### 2.3.3 Talousveden mikrobiologiset laatuvaatimukset

Koska jäähdytysvesikierrossa käytetty vesi puhdistetaan talousvesikelpoiseksi, voidaan sitä suoraan verrata talousveden laatuvaatimukseen. Tässä on kuitenkin huomioitava, että pullotetulla tai säiliössä toimitetulla vedellä on tiukemmat laa-

tuvaatimukset [14, s. 6–10]. Ainoa merkittävä ero talousveden ja käytetyn jäähdytysveden välillä on yrityksen sisäisestä auditoinnista tuleva raja heterotrofisten mikrobien esiintymiselle. Heterotrofisilla mikrobeilla tarkoitetaan toisenvaraisia mikrobeja eli mikrobeja, jotka käyttävät suorasti tai epäsuorasti muita eliöitä ravinnon- ja energianlähteinään [15; 16, s. 86–87]. Heterotrofit voidaan jakaa kahteen luokkaan: fotoheterotrofeihin ja kemoheterotrofeihin [15; 16, s. 87]. Fotoheterotrofit pystyvät käyttämään valoa ja hiilidioksidia energian lähteenä, mutta eivät pysty käyttämään pelkästään hiilidioksidia hiilen lähteenään [15; 16, s. 87]. Näistä esimerkkinä voidaan mainita tiettyjen proteobakteerien olevan fotoheterotrofeja [15]. Kemoheterotrofit käyttävät vain orgaanisia aineita ravinnon ja energian lähteinään eli muita eliöitä tai niiden aineenvaihduntatuotteita [15; 16, s. 87]. Heterotrofisiin mikrobeihin lukeutuvat aerobiset heterotrofiset bakteerit, homeet, hiivat ja alkueläimet [14, s. 11; 16, s. 86]. Valviran laatutavoitteen mukaan heterotrofisten mikrobien esiintymisessä ei saisi olla epätavallisia muutoksia [14, s. 11]. Näiden mikrobien esiintymiselle on vaikeata asettaa tiettyä rajaa, sillä veden mikrobisto vaihtelee sen alkuperän mukaan [14, s. 11]. Tästä huolimatta yrityksen sisäisestä auditoinnista tulevaa rajaa näiden suhteen voidaan pitää maltillisena.

Vaikka talousveden kokonaismikrobiston esiintymiselle ei löydy tarkkaa rajaa, siinä ei saa esiintyä enterokokkeja tai koliformisia bakteereja [14, s. 6–8]. Näillä pyritään osoittamaan veden suolistoperäistä saastumista, mutta on huomattava, että kaikki koliformit eivät viittaa suolistoperäiseen saastumiseen [14, s. 8]. Tämän vuoksi koliformeja tutkitaan kahdella eri menetelmällä, joista toisessa tutkitaan suolistoperäisiä koliformeja ja erityisesti *Escherichia coli* -bakteerin esiintymistä. Näitä lueteltuja bakteereja saa esiintyä talousvedessä vähemmän kuin 1 pmy/100 ml (pesäkkeen muodostava yksikkö) eli käytännössä katsoen ei yhtään [14, s. 6–10].

### 2.3.4 Suljetun vesikierron mikrobiologiset ongelmat

Suljetussa vesikierrossa mikrobien hallinta on hankalaa, sillä sinne päätynyt aines kumuloituu kiertoon. Ravinteita ja uusia mikrobeja pääsee kiertoon, ja näiden poistaminen kierrosta on hankalaa. Jos mikrobeja yritetään tappaa esimerkiksi biosideilla tai UV-valolla, kuolleet mikrobit jäävät ravinnoksi seuraavalle sukupolvelle. Suljetussa kierrossa voidaan kuitenkin helpommin hallita mikrobeita kuin avoimessa kierrossa, sillä avoimessa kierrossa prosessivesi vaihtuu koko ajan. Kun prosessivettä puhdistetaan joko mekaanisin tai kemiallisin keinoin, suljetussa kierrossa puhdistettu vesi jää prosessiin. [12, s. 17–18.]

Suurimmat ongelmat, mitä mikrobit aiheuttavat suljetussa vesikierrossa, ovat biofilmin muodostaminen sekä mikrobiologinen korroosio. Mikrobien aiheuttama korroosio johtuu yleensä biofilmin muodostumisesta, mutta korroosiota voi tapahtua myös epäsuorasti mikrobien aineenvaihdunnan kautta. Korroosiossa metalli syöpyy, mikä voi aiheuttaa huomattavia materiaalisia tappioita. Tämä ilmiö kirjaimellisesti tuhoaa putkistoa ja sen osia. Lämmönvaihtimien pinnan syöpyessä se heikentää niiden tehoa. Syöpyminen putkistossa tuhoaa putken pintaa tehden sen karheammaksi. Putken pinnan karheus tekee virtauksesta turbulenttisempaa. Turbulenttinen virtaus kasvattaa virtausvastusta, joka johtaa virtausnopeuden pientymiseen vähentäen tehokkuutta. Pintojen korroosio johtaa myös otollisiin elintiloihin mikrobeille, sillä mikrobit pääsevät kiinnittymään helpommin sellaisiin kohtiin, missä ne ovat paremmin suojassa virtaukselta. [12, s. 13–18.]

### 2.3.5 Biofilmiä muodostavat mikrobit

Mikrobien tapaa muodostaa biofilmiä voidaan pitää niiden pyrkimyksenä sopeutua hankaliin elinolosuhteisiin. Biofilmi on yhden tai useamman mikrobilajin muodostamaa kolonnia, jossa mikrobit erittävät ympärillensä suojaavan kerroksen, joka voi esimerkiksi koostua polysakkarideista ja glykoproteiineista. Biofilmissä olevat bakteerit lisääntyvät ja levittäytyvät tuottamalla itiöitä ja dispersoi-

malla joko yksittäisiä mikrobisoluja tai monia mikrobeja sisältäviä palasia biofilimikolonian ollessa kypsä. Niukkaravinteisissa olosuhteissa mikrobeille on edullisempaa kiinnittyä ja kasvaa kiinni pinnoilla, sillä vapaana vedessä elävänä soluna mikrobin täytyy käyttää aktiivisesti energiaa ravinteiden hankintaan. Mikrobit yleensä kiinnittyvät epätasaisille pinnoille ja tällaiset olosuhteet voivat esimerkiksi syntyä korroosion vaikutuksesta tai foulaantumisesta. Epätasaiset pinnat kasvattavat mikrobeille suotuisaa elintilaa. Mikrobin kiinnittyminen pinnalle nopeuttaa foulaantumista ja muiden mikrobin kiinnittymistä pinnoille, sillä niiden kiinnittyessä pinnoille virtauksessa ne aiheuttavat virtaukseen pyörteitä, jotka edistävät edellä mainittuja tapahtumia pahentamalla ongelmaa entisestään. [12, s. 13–17; 17, s. 157–168.]

Biofilmiä muodostavat mikrobit ovat todellinen ongelma vesijärjestelmissä. Niiden kiinnittyessä pinnoilla ne heikentävät virtausnopeuksia, ja niistä irtoava aine tukkii putkistoa edelleen heikentäen virtausnopeuksia. Näiden yhdysvaikutuksesta virtausnopeus voi jopa puolittua. Mikrobit voivat myös kasvaa esimerkiksi lämmönvaihtimien pinnalla, mikä silloin heikentää niiden tehoa. Mikrobin kasvaessa pinnoilla ne yleensä myös aiheuttavat mikrobiologista korroosiota, joka vain pahentaa ongelmaa. Mikrobit suojautuvat ympäristöltään muodostamalla biofilmiä, ja juuri tästä syystä niiden tappaminen on hankalaa. Tästä syystä on järkevämpää tehdä ennalta ehkäiseviä toimenpiteitä kuin korjata jälkeinpäin hankalaa ongelmaa. [12, s. 13–17.]

## 2.4 Työn aikana tehdyt toimenpiteet

Työn aikana tehtiin ennalta sovittuja huoltotoimenpiteitä, jotka vaikuttivat työn aikataulutukseen sekä tuloksiin. Kausihuollon aikana 13.9.2021 jäähdytysvesisäiliö pestiin. Alkuperäisesti pesu oli suunniteltu tehtävän säiliön miesluukun kautta paloletkulla. Tätä ei kuitenkaan tehty, sillä säiliö pyydettiin pestäväksi säiliöpesurilla. Ulkopuolinen yritys suoritti säiliön pesun.

Jäähdytysvesikierron puhdistus oli sovittu tehtävän säiliön pesun jälkeen. Toisen ulkopuolinen yritys suoritti puhdistuksen viikolla 42 18.10.–21.10.2021.

Tässä puhdistuksessa kiertoon kytkettiin rinnalle ultrasuodatinyksikkö, jonka tarkoituksena oli poistaa kiintoaineista vedestä. Ennen kierron puhdistusta systeemiin tehtiin biosidisokkaus 15.10.2021. Biosidisokkauksessa biosidista ainetta eli eliöitä tuhoavaa ainetta annostellaan suuri määrä kertaluontoisesti, minkä tarkoituksena on haitallisten eliöiden torjuminen. Sokkaus tehtiin isotiatsolinonipohjaisella biosidillä, joka oli ollut yrityksellä testikäytössä ennen työn aloitusta, ja sitä annosteltiin toimittajan ohjeistuksen mukaan. Koska jäähdytysvesikierto on suljettu systeemi, biosidikäsittelyn seurauksena kuolleet mikrobit jäävät kiertoon ravinnoksi eloon jääneille mikrobeille. Tällä sokkauksella ennen kierron puhdistusta pyrittiin tappamaan jäähdytysvedessä olevia mikrobeja mahdollisimman paljon, jotta niistä syntynyt kiintoaines voitaisiin suodattaa pois.

### **3 Kokeelliset tutkimukset**

#### **3.1 Työn toteutus**

Työ toteutettiin empiirisenä tutkimuksena. Työssä tehtiin erilaisia mikrobiologisia määrytyksiä, joilla kartoitettiin mikrobien määrää sekä niiden luokitusta. Näiden tarkoituksena oli saada mahdollisimman paljon tietoa jäähdytysvesijärjestelmässä esiintyvistä mikrobeista.

Ensimmäiseksi työssä kartoitettiin nykytilanne. Tämän jälkeen tehtiin lisätutkimuksia yrityksen aikataulun mukaisesti. Näillä tutkittiin mikrobitalon muuttamista prosessin aikana sekä työn aikana tehtyjen toimenpiteiden tehokkuutta. Tämän lisäksi tutkittiin myös näytteenottovirheen mahdollisuutta.

Aikataulullisten haasteiden vuoksi tutkimuksia ei tehty säännöllisin väliajoin. Tutkimukset tehtiin kahden kuukauden tarkastelujakson sisällä. Vesinäytteet otettiin kolmesta eri pisteestä: jäähdytysvesisäiliöstä sekä kahdelta eri laminaattorilta. Vesinäytteistä tehtiin viljelyt sekä DNA-analyysit. Näitä varten otettiin näytteitä kolme eri kertaa. Näiden lisäksi tehtiin myös kertaluontoiset testit jääh-

dytysvesisäiliön sisäpinnan ja näytteenottopisteiden puhtaudelle sekä jäähdytysveden kemialliselle kompositiolle. Veden kemiallisen analyysin yhteydessä tutkittiin myös mikrobien esiintymistä.

### 3.2 Materiaalit ja menetelmät

Työssä käytetyt materiaalit saatiin yritykseltä, lukuun ottamatta pyyhkäisynäytteitä, jotka saatiin koululta. Yrityksen laboratorio valmisti itse kasvatusalustat viljelyä varten. Kontaktimaljanäytteet olivat valmiita kaupallisia tuotteita, jotka ovat yrityksellä käytössä.

Työssä käytettyjen menetelmien määritykset tehtiin yrityksen omassa laboratoriossa. Nämä menetelmät ovat osa yrityksen rutiinia sisäistä auditointia varten. Työssä jäähdytysvesisäiliön pesun tehokkuutta tutkittiin kontaktimaljanäytteillä, joilla muutoin tutkitaan kartongin pinnalta havaittavia mikrobeja yrityksen rutiinin mukaan. Tämän määrityksen menetelmäkuvaus on tarkemmin selostettu osiossa 3.4.2. Pyyhkäisynäytteiden tekeminen ei kuulu yrityksen omaan rutiiniin, ja se tehtiin vain tätä työtä varten. Tämän määrittäminen sovellettiin viljelyä, ja menetelmä on tarkemmin kuvattu osiossa 3.4.1. Veden kemiallinen analyysi sekä sen yhteydessä olevat maljaviljelyt teetettiin yrityksen yhteistyökumppanilla.

### 3.3 Jäähdytysveden mikrobit

Mikrobeja voidaan eristää vesinäytteestä kalvosuodatusmenetelmällä. Menetelmä perustuu näytteen suodattamiseen kalvon lävitse, jonka huokoskoko on niin pieni, että näytteessä olevat mikrobit jäävät kalvon pinnalle. Tässä työssä menetelmää käytettiin keräämään mikrobeja viljelyä sekä DNA-analyysijä varten.

Suodatuksia tehtiin kahdella eri laitteistolla. Viljelyä varten käytetty suodatinlaitteisto on muutoin samantyyppinen kuin kuvassa 4 näkyvä laitteisto, jolla suodatettiin kalvot DNA-analyysijä varten, mutta molemmissa laitteissa käytettiin erikokoisia sekä eri materiaalista valmistettuja suodatinkalvoja.



Kuva 4. Vesinäytteen suodatuslaitteisto. Oikealla haaroitetun putken päällä näkyy mittasuppilo, johon kaadetaan suodatettava vesi.

Viljelyyn menevien kalvojen suodatuksiin käytettiin Merck Milliporen valmistamia selluloosanitaattikalvoja, joiden huokoskoko oli  $0,45 \mu\text{m}$ . Nämä kalvot on suunniteltu viljelyä varten ja ne on optimoitu pesäkkeiden kasvuun sekä tehokkaaseen suodatukseseen [18]. Kalvoissa on kuvioituna laskentaruudukko, ja niitä on saatavilla eri värisinä. Laskentaruudukko helpottaa pesäkkeiden laskemista, ja käytetyn kalvon väri voidaan valita kasvatusalustan värin mukaan, mikä helpottaa pesäkkeiden erottamista maljalta [18]. Työssä käytettiin 47 mm halkaisijaltaan olevia kalvoja, jotka olivat mitoitettu 90 mm:n kokoisille petrialjoille.

Kokonaisbakteerien määrittystä varten suodatettavasta näytteestä tehtiin laimennokset  $10^{-1}$ – $10^{-4}$  ml. Laimennukset tehtiin puskuriliuosta sisältävään ioni-vaihdettuun veteen. Laimennusvedessä oli 0,125 % kaliumdivetyfosfaattia ja liuoksen pH oli 7,2. Laimennuksia suodatettiin 10 ml kalvoa kohden. Itiöitä muodostavien bakteerien määrittystä varten tehtiin vain  $10^{-1}$  laimennos ja tämän lisäksi suodatettiin myös 0-laimennos. Näiden määritysten tulos ilmoitetaan pmy/1 ml. Selektiivialustoja varten laimentamatonta näytettä suodatettiin 100

ml, 10 ml sekä 1 ml. Näiden määritysten tulokset ilmoitetaan pmy/100 ml. Suodatuksien jälkeen kalvot siirrettiin kasvatusalustoille.

DNA-analyysejä varten käytettiin GE Healthcaren valmistamia polykarbonaattikalvoja, joiden huokoskoko oli 0,4  $\mu\text{m}$ . Näitä kalvoja suositellaan käytettävän solubiologia-analyyseihin [18]. Kalvoja voitaisiin todennäköisesti käyttää myös viljelyitä varten, mutta niiden ollessa valkoisia ja kuviottomia sekä kalliimpia kuin aikaisemmin mainitut kalvot olisi niiden käyttö siihen tarkoitukseen perustetonta [18]. Työssä käytetyt kalvot olivat halkaisijaltaan 50 mm. Näytettä suodatettiin maksimissaan 200 ml, mutta suodatettava kokonaismäärä huomioitiin tuloksien laskennassa. Yhdestä näytteestä tehtiin kuusi rinnakkaista suodatusta. Suodatuksista saadut kalvot siirrettiin niille varattuihin näyteputkiloihin.

Näytteet viljelyä ja DNA-analyysejä varten otettiin kolmesta eri paikasta: jäähdytysvesisäiliöltä ja kahden eri koneen linjastoilta. Viljelyä varten otettiin yksi litra per näytteenottopiste ja DNA-analyysejä varten otettiin kaksi litraa per näytteenottopiste steriloituihin näytteenottopulloihin. Näytteenotossa näytteenottopiste puhdistettiin ensin 70-prosenttisella etanoliliuoksella, ja vesihana avattiin ja suljettiin muutaman kerran nopeasti näytteenottopisteen hanan huuhtelua varten. Tämän jälkeen vettä juoksutettiin noin yksi minuutti ennen näytteenottoa.

### 3.3.1 Vesinäytteiden mikrobiologiset analyysit

Mikrobien määrää jäähdytysvedessä tutkittiin viljelemällä vesinäytteitä. Suodatusten yhteydessä kalvot oli siirretty kasvatusmaljoille. Maljat inkuboitiin lämpökaapissa agarin kasvuolosuhteiden mukaan. Määrityksissä käytetyt kasvatusalustat on listattu taulukkoon 1. Selektiivisiä kasvatusalustoja käytettiin tunnistamaan bakteereja, joita ei saa esiintyä jäähdytysvedessä yrityksen sisäisen auditoinnin mukaan. Homeiden ja hiivojen esiintymiseen ei käytetty viljelyssä selektiivistä alustaa.

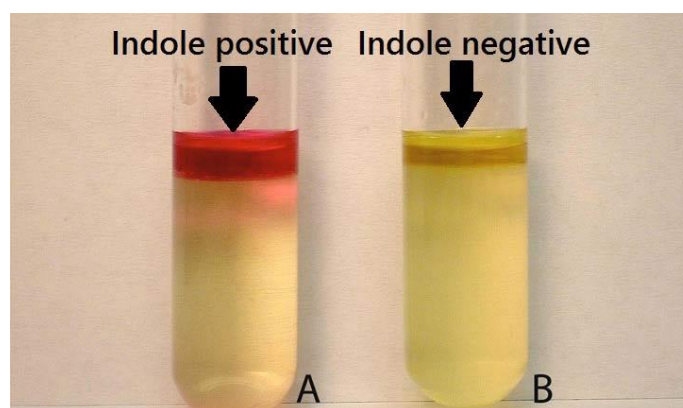
Taulukko 1. Kasvatusalustat määryksien mukaan. Taulukossa on eriteltyä kasvatusalustojen määryksiin tarvittavat inkubointiajat ja -lämpötilat.

Kasvatusalusta	Määrytys	Lämpötila (°C)	Aika (h)
PCA	Kokonaisbakteerit ja itiöt	32±1	48±3
EAL	Kokonaiskoliformit	36±2	21±3
mFC	Lämpökestoiset koliformit	44,5±0,5	21±3
Hiivauuteagar	Koliformien varmistustesti	36±2	21±2
S&B	Suolistoperäiset enterokokit	36±2	44±4

PCA (*Plate Count Agar*) -alustaa käytettiin näytteen kokonaisbakteerien sekä itiöiden määrykseen. Yleisalustana se ei inhiboi muiden mikrobien kasvua, ja maljalta pystytään laskentavaiheessa tunnistamaan myös homeet ja hiivat. Itiöitä muodostavien bakteerien viljelyä varten tehdyt laimennokset lämpökäsiteltiin ennen suodatusta 80 °C:ssa 10 minuutin ajan ottaen huomioon näytteen kuumenemiseen kuluvan ajan.

Koliformien tunnistamiseen käytettiin kahta eri alustaa. Näytteistä määritettiin kokonaiskoliformit sekä lämpökestoiset koliformit. Kokonaiskoliformien tunnistamiseen käytettiin EAL (*Endo Agar LES*) -alustaa. Inhibiittoreina alustassa on natriumlauryylisulfaatti sekä deoksikoolihappo [19; 20, s. 278]. Väri-indikaattorina toimiva fuksiini inhiboi myös kasvua [19; 20, s. 278]. Koliformit pelkistävät laktoosia hapoiksi ja aldehydeiksi, joista jälkimmäinen reagoi alustassa fuksiinin ja natriumsulfiitin kanssa värjäten pesäkkeet punaisiksi, ja ne voivat näyttää metallikiiltoisilta [19; 20, s. 278; 21, s. 2]. Värjäytymättömät pesäkkeet maljalla eivät pysty fermentoimaan laktoosia [19; 20, s. 278]. Värjäytyneillä pesäkkeille voidaan vielä tehdä oksidaasireaktiotesti. Värjäytyneistä pesäkkeistä tehdään puhdasviljelmä siirrostamalla maljalta tarpeeksi aineista hiivauuteagarille. Inkuboinnin jälkeen viljelmän kasvusto tarkistetaan tetrametyyli-p-fenyleenidiamiinihydrokloridilla [21, s. 2]. Värin muuttuessa pesäke lasketaan koliformiksi [21, s. 2].

Lämpökestoisia koliformeja tutkittiin mFC (*membrane Fecal Coliform*) -alustalla. Tällä alustalla voidaan tunnistaa erityisesti suolistoperäisiä koliformeja [22, s. 1; 23]. Alustan väri-indikaattorina toimii koliformien fermentointituotteena laktoosista syntyvät hapot, jotka reagoivat metyleenisinisen ja auriinin kanssa värjäten pesäkkeet sinisiksi. [22, s. 2; 23]. Metyleenisininen, sappisuolat sekä alustan korkea inkubointilämpötila inhiboivat muiden mikrobien kasvua [22, s. 2; 23]. Värjäytyneet pesäkkeet voidaan varmistaa koliformeiksi aiemmin kuvatulla oksidaasioreaktiotestillä sekä indolitestillä, jossa määritetään koliformien kykyä muodostaa indolia tryptofaanista [22, s. 2; 24]. Indolitesti tehdään koeputkessa nestemäisessä tryptofaanimeediumissa viljelyissä näytteistä. Koeputkeen lisätään Kovacin reagenssia, joka värjäytyy positiivisessa tapauksessa pinkiksi, josta on esitetty esimerkki kuvassa 5 [24].



Kuva 5. Indolitesti. Kuvassa positiivinen ja negatiivinen tulos indolitestistä. [24]

S&B (Slanetz Bartley) -agarilla määritettiin suolistoperäisiä enterokokkeja. Alusta sisältää hyvin myrkyllistä natriumatsidia, jota enterokokit sietävät suhteellisen korkeina pitoisuuksina [25, s. 3]. Muiden mikrobien kasvu on inhiboitu tällä yhdisteellä [26, s. 1]. Enterokokkibakteerit värjäytyvät sisältä punaisiksi niiden pelkistäessä 2,3,5-trifenyylitetrasoliumkloridia formatsaaniksi [26, s. 1].

Veden kemiallisen analyysin yhteydessä tutkittiin aerobisia, anaerobisia sekä sulfaatteja ja sulfiitteja pelkistäviä bakteereja. Sulfaatteja pelkistävien bakteerien

tunnistamiseen käytettiin BART-testiä (*Biological Activity Reaction Test*). Muiden esiintyminen todettiin maljaviljelyllä. Nämä määritykset tehtiin kolmannen osapuolen laboratoriossa.

### 3.3.2 DNA-analyysit

Selektiivisillä kasvatusalustoilla pystytään osoittamaan vain niille tarkoitettujen mikrobien esiintymistä eli tällaisella alustalla pystytään todentamaan vain yhden mikrobiluokan esiintyminen. Analysoimalla näytteessä esiintyvää DNA:ta voidaan tutkia useampaa mikrobiluokkaa. Tässä työssä käytettiin qPCR-menetelmää (*quantitative Polymerase Chain Reaction*) mikrobien tarkempaan tunnistamiseen. Menetelmän tunnistus perustuu näytteessä esiintyvän DNA:n monistamiseen ja monistetusta DNA-ketjuista eri geenien esiintymisen tunnistamiseen [27]. Bakteerien tunnistamiseen käytettiin 16S rRNA (ribosomaalinen RNA) -geenin esiintymistä. Menetelmällä tutkittiin myös homeiden ja hiivojen esiintymistä. Näytteistä tehtiin 21 erilaista spesifistä qPCR-analyysiä.

Suodatuksista saadut kalvot siirrettiin näyteputkiin. Niihin näyteputkiin, joista tahdottiin määrittää vain elävien mikrobien DNA, lisättiin propidium-monoatsidia. Yhdiste sitoutuu DNA:han, mutta koska se ei pysty läpäisemään solukalvoa, se pääsee tunkeutumaan vain sellaisiin soluihin, joiden solukalvo on rikki [28]. Soluja, joiden solukalvo on rikki, voidaan pitää kuolleina [28]. Yhdisteen ollessa sitoutunut DNA:han se estää DNA:n monistamisen PCR-menetelmällä (*Polymerase Chain Reaction*) [28].

Yhdestä näytteestä tehtiin yhteensä kuusi suodatusta: kolme rinnakkaista elävien mikrobien DNA:ta varten ja kolme rinnakkaista elävien sekä kuolleiden mikrobien DNA:ta varten. Nesteensiirtoautomaatteja käytettiin perimäaineksen eristykseen sekä reaktion valmistamista qPCR-analyysiä varten.

### 3.4 Pintanäytteet

Tässä työssä käytettiin kahta eri menetelmää pintojen mikrobiologisen puhtauden tutkimiseen: pyyhkäisy- ja kontaktimaljanäytteitä. Pyyhkäisynäytteillä tutkittiin näytteenottopisteiden puhtautta ja kontaktimaljanäytteillä jäähdytysvesisäiliön pesun tehokkuutta.

#### 3.4.1 Pyyhkäisynäytteet

Pyyhkäisynäytteillä tahdottiin sulkea pois näytteenottovirheet. Tässä työssä ensimmäiseksi otettujen suodatusnäytteiden viljelytulokset olivat hyvin ristiriidassa aikaisempien tulosten kanssa. Koska ensimmäisen suodatusnäytteidenoton yhteydessä näytteenottopisteet puhdistettiin 70-prosenttisella etanoliliuoksella, tahdottiin selvittää pyyhkäisynäytteillä, voiko havaittu mikrobiologinen ongelma järjestelmässä johtua vain virheellisestä näytteenotosta.

Pyyhkäisynäytteet otettiin Deltalabin valmistamilla pintanäytepaketeilla. Pakettissa, joka nähdään kuvassa 6, on näytteenottotikku ja näyteputkilo steriilisti pakattuna. Näytetikussa on viskoosikuidusta valmistettu näytepää ja sen toisessa päässä on näyteputkilon soveltuva korkki kiinnitettynä tikkuun. Näyteputkilon sisällä on 10 ml neutraloivaa bufferinestettä, jonka on tarkoitus pysäyttää mikrobin lisääntyminen tappamatta niitä. Tämä paketti soveltuu noin 20 cm<sup>2</sup>:n alueen tutkimiseen.



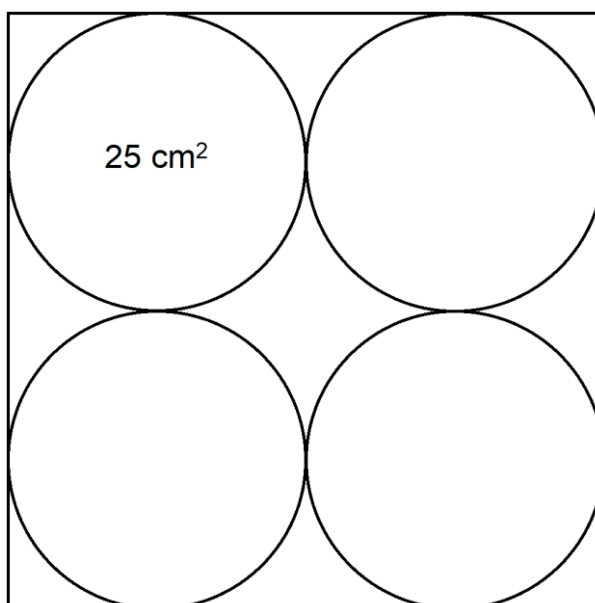
Kuva 6. Pintanäytepaketti. Kuvassa työssä käytetty pyyhkäisynäytepaketti.

Pyyhkäisynäytteet otettiin näytteenottopisteiden hanoista. Näytetikkua pyöriteltiin hanan suun lähetyvillä sekä sisä- että ulkopuolelta, minkä jälkeen näytteenottotikku suljettiin näyteputkilon sisään. Näytteenottopistettä kohden otettiin kaksi näytettä niin, että ensimmäisen näytteenoton jälkeen hana pyyhittiin sisä- ja ulkopuolelta 70-prosenttisella etanoliliuoksella, minkä jälkeen otettiin toinen näyte. Tällä toisella näytteellä puhdistuksen jälkeen tahdottiin selvittää, vaikuttaako hanan puhdistaminen määrittämisen tulokseen. Sinetöidyt näyteputkilot toimitettiin yrityksen laboratorioon analyysia varten. Näyteputkilon sisältämästä nesteestä määritettiin kokonaisbakteerit agarviljelyllä.

### 3.4.2 Kontaktimaljanäytteet

RODAC (replicate organism direct agar contact method) -menetelmän tarkoitus on kopioida tutkittavan pinnan mikrobit maljan agariin. Määrittämisen tulos riippuu kontaktimaljan koosta sekä käytettyjen maljojen määrästä, ja sen tulos ilmoitetaan pesäkettä pinta-alaa kohden. Useampaa maljaa käytettäessä saadaan dataa suuremmalta alalta, jolloin saadaan tarkempi tulos. Kuvassa 7 on esimerkki useamman näytteen peittämästä alasta. Maljojen meediumina voidaan tavallisen agarviljelyn tapaan käyttää joko selektiivistä tai yleisalustaa. Menetelmää

voidaan käyttää läpäisemättömille tasapinnoille kuten työpöydille tai kartongille. Tässä työssä menetelmällä tutkittiin jäähdytysvesisäiliön sisäpintaa.



Kuva 7. Pinta-alan tutkiminen kontaktimaljoilla. Neljän kontaktimaljan muodostama 100 cm<sup>2</sup>:n tutkittava pinta-ala.

Huollon yhteydessä jäähdytysvesisäiliö tyhjennettiin ja pestiin. Pesun tehokkuutta tutkittiin kontaktimaljanäytteillä. Vesinäytteiden suodatuksesta tehtävät viljelyiden tulokset kertovat ainoastaan vedessä vapaana olevista mikrobeista. Koska järjestelmässä epäiltiin esiintyvän biofilmiä, koettiin kontaktimaljanäytteiden mahdollisesti antavan tietoa biofilmeissä olevista bakteereista. Menetelmällä ei pystytä varsinaisesti tunnistamaan biofilmeissä olevia bakteereja, sillä bakteerit ovat suojassa niiden muodostamassa polysakkaridimatriisissa [12, s. 14; 29, s. 692]. Tämä on yksi syy, miksi biofilmeissä olevia bakteereja on vaikeata havaita.

Näytteenotossa kontaktimaljan agar painetaan kevyesti tutkittavalle pinnalle noin 10 sekunnin ajaksi. Maljat inkuboidaan lämpökaapissa ylösalaisin agarin kasvuolosuhteiden mukaan. Tyypilliset lämpötilat ja kasvatusajat on listattu taulukkoon 2 [30, s. 4].

Taulukko 2. Kontaktimaljanäytteet määrytyksien mukaan. Kontaktimaljoiden agarit eriteltyinä inkubointilämpötilan ja -ajan mukaan.

Kasvatusalusta	Lämpötila (°C)	Aika (h)
PCA (Kokonaisbakteerit)	32±1 tai 30±1	48±3 tai 72±3
VRBGA (Enterobakteerit)	32±1	24±3
SDA (Hiivat)	25±1	≈72
SDA (Homeet)	25±1	120–168

Kontaktimaljoja on saatavilla valmiina kaupallisina tuotteina tai ne voidaan valmistaa itse. Tässä työssä käytetyt kontaktimaljat olivat Merck Life Science Oy:n valmistamia valmiita 25 cm<sup>2</sup>:n kokoisia maljoja. Käytetyt alustat olivat PCA, VRBGA (*Violet Red Bile Glucose Agar*) ja SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*).

Violetti-puna-sappi-glukoosi-agaria käytetään *Enterobacteriaceae*-heimon tunnistamiseen. Tässä työssä jatkossa viitataan *Enterobacteriaceae*-heimon kuuluvia bakteereja enterobakteereiksi. Alusta inhiboi muiden mikrobien kasvua sisältämällään kideviolettilla ja sappisuoloilla. Enterobakteerien pelkistäessä glukosia hapoiksi alustan pH alenee ja väri-indikaattorit värjäävät bakteerit punaisen tai pinkin värisiksi ja sen ympärillä voi olla havaittavissa sappisuolojen saostumisesta johtuva rengas. Menetelmä ei ole täysin tarkka, sillä esimerkiksi *Aeromonas*-suvun bakteerien pesäkkeet tällä alustalla näyttävät samalta kuin enterobakteerien pesäkkeet. [31, s. 1.]

Sabouraud dekstroosi -agarilla tunnistetaan homeita ja hiivoja. Yleisalustaan (PCA) verrattuna tässä agarissa on 40-kertainen määrä glukosia ja hiivan uutteen sijasta siinä on lihan peptonia sekä alustan pH on noin 5,6. Bakteerien kasvu on inhiboitu antibiooteilla. Käytetty antibiootti vaihtelee käyttötarkoituksen mukaan. Työssä käytetyssä alustassa antibioottina oli kloramfenikoli. [32, s. 1.]

Näytteet otettiin ennen pesua ja sen jälkeen säiliön kylmältä ja kuumalta puolelta säiliön keskipisteestä katsoen miesluukusta noin 45° oikealle. Aikaisemmin lueteltuja kolmea agaria käytettiin näytteiden ottamisessa ja säiliön molemmilta

puolilta näytteet otettiin kahdesta eri kohdasta. Näytteet otettiin säiliön pohjasta noin 20 cm:n päästä seinästä sekä säiliön seinämästä noin 170 cm:n korkeudelta. Pesun jälkeen näytteenotto toistettiin kuten edellä. Maljat toimitettiin laboratorioon inkubointia sekä tulosten analysointia varten.

## 4 Tulokset

Tutkimuksien tuloksiin viitattaessa käytetään taulukon 3 mukaisia näyte-eriä. Näyte-erät on numeroitu kronologisessa järjestyksessä näytteenottokerran mukaan.

Taulukko 3. Näyte-erä taulukko. Näyte-erät numeroituna näytteenottokerran mukaan.

Näytteenottokerran tunniste	Päivämäärä	Tutkimus
Näyte-erä 1	8.9.2021	Veden mikrobiologinen analyysi.
Näyte-erä 2	13.9.2021	Jäähdytysvesisäiliön pesun tehokkuus.
Näyte-erä 3	21.9.2021	Näytteenottopisteiden puhtaus.
Näyte-erä 4	22.9.2021	Veden mikrobiologinen analyysi.
Näyte-erä 5	26.10.2021	Veden mikrobiologinen analyysi.
Näyte-erä 6	23.11.2021	Veden kemiallinen ja mikrobiologinen analyysi.

### 4.1 Vesinäytteiden mikrobiologiset analyysit

Taulukossa 4 on esitelty kokonaisbakteerien määritysten tulokset näytteenottokerran näytteenottopisteiden keskiarvoina. Taulukossa on esitelty ainoastaan kokonaisbakteerien määritysten tulokset, sillä ainoastaan näyte-erä 4:n selektiivisillä kasvatusalustoilla havaittiin kasvua ja kasvua havaittiin vain mFC-kasvatusalustoilla, mutta niistä ei havaittu positiivisia tuloksia. Myös näyte-erä 4:n vesikierto 2:sta saatiin ainoa tulos itiöitä muodostavien bakteerien esiintymisestä ja näitä havaittiin 23 pmy/ml. Eritellyt tulokset löytyvät liitteestä 2.

Taulukko 4. Kokonaisbakteerien määrityksien tulokset. Määrityksien tulokset on esitetty näyte-erän keskiarvoina.

Näytteenottokerran tunnistus	Kokonaisbakteerit (pmy/ml)
Näyte-erä 1	210
Näyte-erä 4	130 000
Näyte-erä 5	740
Näyte-erä 6	10 000

## 4.2 DNA-analyysit

DNA-analyysien tuloksista on tässä osiossa raportoitu ne tulokset, jotka ovat olleet selkeästi detektorajan yläpuolella. Näitä tuloksia kutsutaan vastaisuudessa selkeiksi tuloksiksi. Tuloksia tarkastellessa tulee huomioida, että monistetut geenit ovat erikokoisia ja siten määrityksien tulokset eivät ole suoraan verrannollisia keskenään ja sitä, että näyte-erien 1, 4 ja 5 analyysissä on ollut jokaiselle näyte-erälle oma detektorajansa, joka oli määritetty jokaiselle analyysikerälle erikseen. Näyte-erien detektorajat on suhteutettu havaitun kokonaisperimän määrästä, ja detektorajan lähetyvillä olevia tuloksia voidaan pitää suuntaa antavina.

Näyte-erä 1:n DNA-analyysistä saatiin kolme selvää tulosta. Vesikierto 1:n elävien ja kuolleiden kokonais- 16S rRNA -geenikopioita havaittiin yhdessä rinnakkaisessa näytteessä noin 28 000 geenikopiota/g. Samasta näytteenottopisteestä havaittiin vain elävien kokonais- 16S rRNA -geenikopioita kahdesta näytteestä keskiarvolta noin 21 000 geenikopiota/g.

Näyte-erä 4:n DNA-analyysien tuloksista saatiin kahdesta määrityksestä kaikista rinnakkaisista näytteistä selkeät tulokset yhtä poikkeavaa rinnakkaista näytettä lukuun ottamatta. Elävien ja kuolleiden kokonais- 16S rRNA -geenikopioita havaittiin kaikista näytteenottopisteistä keskiarvolta noin 520 000 geenikopiota/g ja vain elävien keskiarvolta noin 240 000 geenikopiota/g. Elävien ja kuolleiden betaproteobakteerien 16S rRNA -geenikopioita havaittiin keskiarvolta

noin 630 000 geenikopiota/g ja vain elävien keskiarvolta noin 350 000 geenikopiota/g. Tämän lisäksi saatiin myös yksi selvä tulos elävien ja kuolleiden homeiden ja hiivojen geenikopioista, joita havaittiin noin 22 000 geenikopiota/g.

Näyte-erässä 5 DNA-analyysit tehtiin vain jäähdytysvesisäiliöstä otetuista näytteistä. Elävien ja kuolleiden kokonais- 16S rRNA -geenikopioita havaittiin keskiarvolta noin 200 geenikopiota/g ja vain elävien geenikopioita havaittiin yhdestä näytteestä noin 60 geenikopiota/g. Elävien ja kuolleiden aktinobakteerien 16S rRNA -geenikopioita havaittiin keskiarvolta noin 1000 geenikopiota/g ja vain elävien keskiarvolta noin 400 geenikopiota/g.

### 4.3 Pyyhkäisynäytteet

Näyte-erän 2 näytteiden määrittämisestä saatiin kaksi poikkeavaa tulosta. Vesikierron 1 10<sup>-1</sup>-laimennuksissa havaittiin yhdet pesäkkeet. Laimentamattomissa näytteissä ei havaittu yhtään kasvua. SAS-ilmakontrollinäytteessä (*Surface Air System*) havaittiin 7 pesäkettä. Tulokset on esitelty taulukossa 5.

Taulukko 5. Pyyhkäisynäytteiden tulokset. Pyyhkäisynäytteistä tehdyt kokonaisbakteerien määrityksien tulokset.

Näytteenottopiste	pmy/1 ml	pmy/0,1 ml
Jäähdytysvesisäiliö	0	0
Vesikierto 1	0	1
Vesikierto 2	0	0
Näytteenottopisteen desinfiointi		
Näytteenottopiste	pmy/1 ml	pmy/0,1 ml
Jäähdytysvesisäiliö	0	0
Vesikierto 1	0	1
Vesikierto 2	0	0
SAS-ilmakontrolli		
SAS-ilmakontrolli	7 pmy	-

#### 4.4 Kontaktimaljanäytteet

Näyte-erä 3:n näytteet otettiin kahdessa erässä: ennen pesua ja sen jälkeen. Suurimmassa osassa ennen pesua otetuissa näytteissä kasvu on ollut niin runsasta, ettei niistä saatu selvää lukuarvoa. Ainoat selvät tulokset ennen pesua saatiin SDA-alustalta säiliön kylmältä puolelta, jossa havaittiin 20 homepesäkettä/25 cm<sup>2</sup> ja paljon pieniä pesäkkeitä, joiden arveltiin olevan hiivoja sekä kolmelta VRBGA-alustalta, joilla havaittiin säiliön kylmän ja kuuman puolen pohjasta molemmilta maljoilta yhdet enterobakteeripesäkkeet per 25 cm<sup>2</sup> sekä paljon muuta kasvua ja säiliön kuuman puolen seinästä kaksi enterobakteeripesäkettä per 25 cm<sup>2</sup> sekä paljon muuta kasvua. Pesun jälkeen havaittiin taulukon 6 mukaiset tulokset.

Taulukko 6. Kontaktimaljanäytteiden tulokset. Taulukossa esitelty kontaktimaljanäytteiden tulokset pesun jälkeen.

Näytteenottoaika	PCA pmy/25 cm <sup>2</sup>	Huomautuksia
Kylmä puoli, seinä	53	1 homepesäke.
Kylmä puoli, pohja	≈13	Pesäkkeet levinneet.
Kuuma puoli, seinä	≈146	
Kuuma puoli, pohja	46	Reunakasvustoa.
Näytteenottoaika	SDA pmy/25 cm <sup>2</sup>	Huomautuksia
Kylmä puoli, seinä	4	Hiivapesäkkeitä.
Kylmä puoli, pohja	50	Homepesäkkeitä.
Kuuma puoli, seinä	2	Hiivapesäkkeitä.
Kuuma puoli, pohja	4	Hiivapesäkkeitä.
Näytteenottoaika	VRBGA pmy/25 cm <sup>2</sup>	Huomautuksia
Kylmä puoli, seinä	20	7 positiivista tulosta.
Kylmä puoli, pohja	2	2 positiivista tulosta.
Kuuma puoli, seinä	21	8 positiivista tulosta.
Kuuma puoli, pohja	1	1 positiivinen tulos.

## 5 Tulosten tarkastelu

Tuloksia tarkastellessa tulee huomioida, että koska kokeita pystyttiin tekemään yrityksen laboratorion kapasiteetin takia niin vähän, tuloksista ei ole tehty tilastollisia analyysejä. Määrityksien tulokset on esitetty graafisesti ja niitä on verrattu yrityksen aikaisempaan dataan. Eritellyt tulokset löytyvät liitteistä 1–3.

### 5.1 Työn aikana tehtyjen toimenpiteiden vaikutukset

Tässä kohdassa selitetään, miten työn aikana tehdyt toimenpiteet vaikuttivat tuloksiin. Varsinaisia tuloksia tarkastellaan luvuissa 5.2–5.5.

Säiliön pesu tehtiin 13.9.2021 ja sillä oli positiivinen vaikutus säiliön sisäpinnan puhtauteen. Säiliön pesu tehtiin kuitenkin turhaan; säiliö täytettiin oletettavasti epäpuhtaalla vedellä. Koska säiliöön saadaan kiinteästä putkistosta vettä vain noin 2 litraa minuutissa, olisi säiliön täyttämiseen kulunut noin 24 päivää. Tämän vuoksi yrityksessä päätettiin käyttää paloautoa säiliön täyttämiseen. Paloauton tankin puhtaudesta ei ole tietoa, eikä veden alkuperää pystytty selvittämään. Tämän jälkeen jäähdytysvedessä huomattiin olevan hiekkaa ja se myös varmasti selittää, miksi mikrobien määrä vedessä kasvoi räjähdysmäisesti. Hiekka jäähdytysvedessä huomattiin UV-suodatuslaitteen suodattimien vaihdon yhteydessä.

Säiliön täyttämiseen käytetyllä oletettavasti epäpuhtaalla vedellä oli suuri vaikutus tähän työhön. Systemeihin tehtiin biosidisokkaus vain tämän takia. Suunniteltu kierron puhdistus tehtiin ultrasuodatinlaitteistolla viikolla 42 ja tämä laitteisto oli kytkettynä jäähdytysvesikiertoon neljän päivän ajan (18.10. – 21.10.2021). Tämän takia biosidisokkaus tehtiin edeltävällä viikolla 15.10.2021. Tällä sokkauksella ennen kierron puhdistusta pyrittiin korjaamaan aikaan saatu vahinko. Sokkauksella ja puhdistuksella oli positiivinen vaikutus, mutta alkutilaa ei saavutettu.

Veden kemiallisesta analyysistä (liite 1), jonka näytteet analyysiä varten otettiin 23.11.2021, selviää tehtyjen määritysten arvojen olevan normaalin jäähdytysveden kaltaisia [11]. Veden kovuusarvoa sekä raudan määrää vedessä voidaan pitää kohtuullisina ja kloridien ja sulfaattien määrää voidaan pitää normaalina [11]. Vedessä havaittavan kuparin esiintyminen voidaan selittää systeemissä olevilla kuparisilla jäähdytysvaipoilla. Näitä tuloksia verrattaessa yrityksen vedenpuhdistamon tekemiin sekä yrityksen teettämiin tuloksiin ainoa huomattava ero on piidioksidin määrässä, jota oli vedenpuhdistamon teettämään analyysiin verrattaessa noin kahdeksankertainen määrä [13]. Piidioksidin suuren määrän systeemissä epäiltiin johtuvan säiliöön joutuneesta hiekasta. Analyysin tulokset löytyvät liitteestä 1.

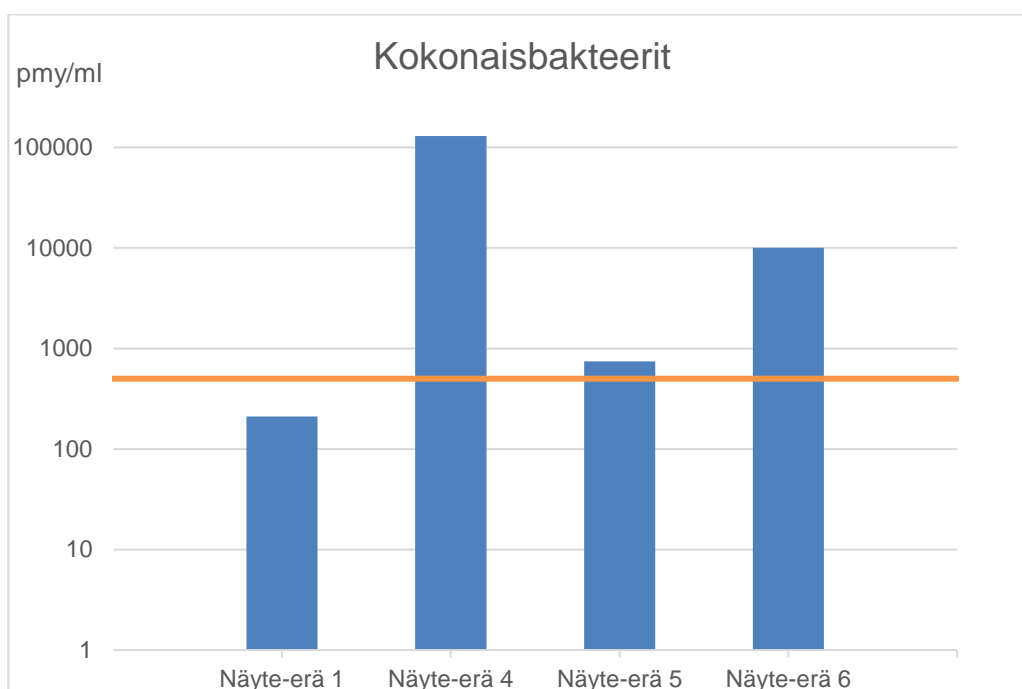
## 5.2 Vesinäytteiden mikrobiologiset analyysit

Näyte-erän 1 määritysten tulokset olivat huomattavasti pienempiä kuin ne tulokset, joita yritys oli saanut aikaisemmin samoista näytteenottopisteistä tehdyistä määrityksistä. Tulokset olivat tavoitellun rajan alapuolella. Koska työn tarkoituksena oli saada mikrobien määrä juuri tälle tasolle, epäiltiin, että yritys oli aikaisemmin ottanut näytteet virheellisesti, koska näiden näytteiden näytteenotossa näytteenottopisteiden hanat desinfioitiin. Näytteenottopisteiden hanojen desinfiointi ennen näytteenottoa ei ole kuulunut yrityksen näytteenottorutiiniin. Tämän takia näytteenottopisteistä päätettiin tehdä pyyhkäisyinäytteet. Näiden pyyhkäisyinäytteiden tuloksia tarkastellaan luvussa 5.4.

Näyte-erän 4 näytteet otettiin jäähdytysvesisäiliön pesun jälkeen 22.9.2021. Kuten aikaisemmin jo mainittiin luvussa 5.1, näistä saadut tulokset olivat erittäin korkeat. Tuloksien räjähdysmäisen kasvun epäiltiin johtuvan vedestä, jolla säiliö täytettiin. Näiden korkeiden tulosten takia seuraavat näytteet suunniteltiin otettavan vasta biosidisoituksen ja kierron puhdistuksen jälkeen. Näyte-erän 5 näytteet otettiin 26.10.2021 eli noin viikon päästä kierron puhdistuksen loputtua. Tällä näytteenottokerralla otettiin näytteet viljelyitä varten vain jäähdytysvesisäiliöstä sekä vesikierrosta 1, josta otettiin myös yksi rinnakkainen näyte määri-

siä varten. Sokkaus ja ultrasuodatinpuhdistus vaikuttivat selvästi näiden otettujen näytteiden tuloksiin, ja näyte-erän 5 määrityksien tulokset olivat huomattavasti pienempiä kuin näyte-erän 4 määrityksien tulokset, mutta siitä huolimatta korkeampia kuin näyte-erän 1 määrityksien tulokset. Näyte-erän 6 näytteet vesianalyysiä varten otettiin 23.11.2021 ja näytteitä otettiin vain jäähdytysvesisäiliöstä. Näyte-erää 6 varten otetuista näytteistä tehtiin veden kemiallisen analyysin lisäksi mikrobiologisia määrityksiä ja näiden määrityksien tuloksista voidaan huomata mikrobien kokonaismäärän lisääntyneen huomattavasti verrattaessa näyte-erän 5 määritysten tuloksiin.

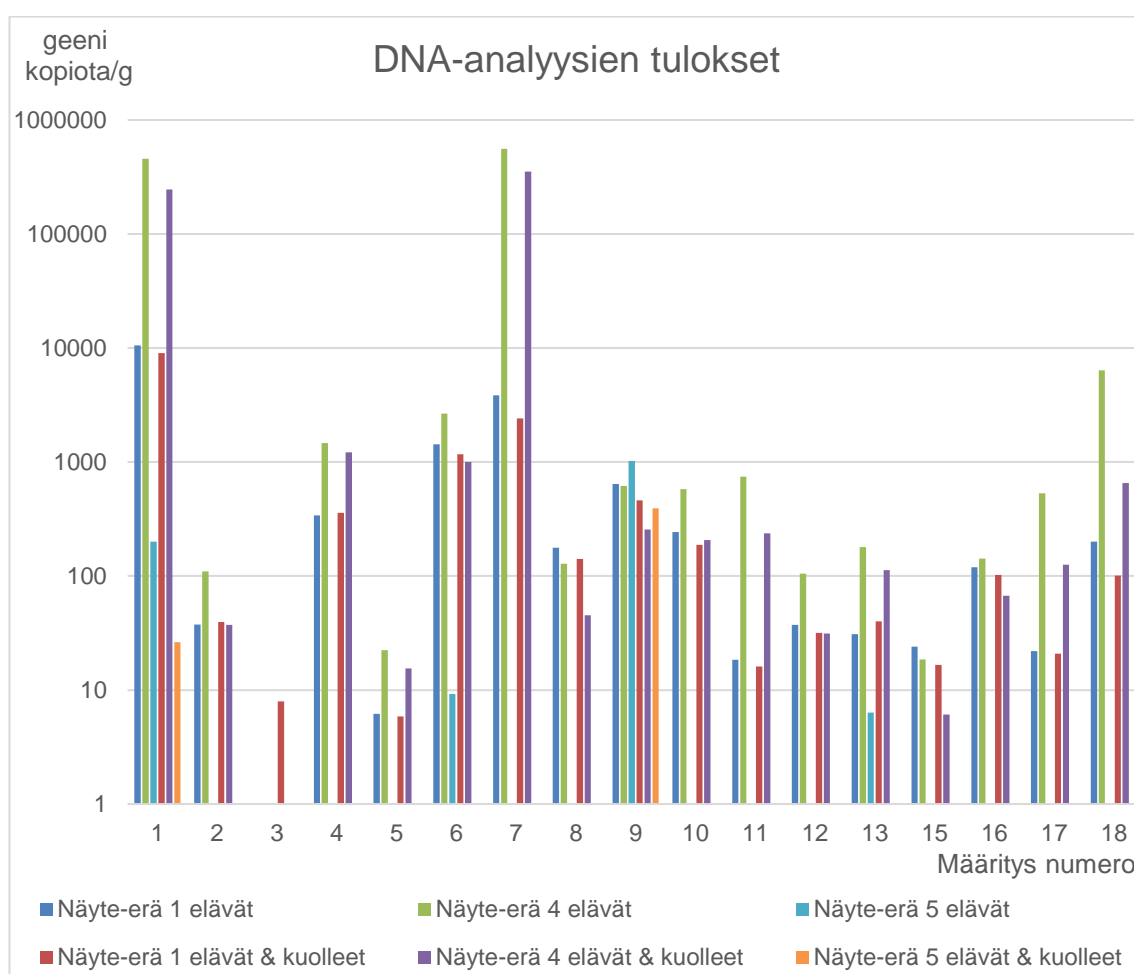
Kuvassa 8 on esitelty viljelyiden kokonaisbakteerien määritysten tulokset. Eri näytteenottopisteiden välillä määritysten tuloksissa ei ollut huomattavaa eroa, joten tulokset on esitelty näyte-erän keskiarvoina. Itiöitä muodostavia bakteereja havaittiin vain kerran yhdessä näytteessä ja sen lisäksi selektiivialustoilla tai vesianalyysin yhteydessä tehdyistä testeistä ei saatu positiivisia tuloksia, joten niitä ei ole esitetty erikseen. Eritellyt tulokset löytyvät liitteestä 2.



Kuva 8. Kokonaisbakteerien määrityksien tulokset. Oranssi viiva kuvaa tavoitetta ja pylvääät kuvaavat näyte-erän keskiarvoa. Y-akselin asteikko on logaritminen.

### 5.3 DNA-analyysit

DNA-analyyseilla pyrittiin selvittämään, johtuuko jäähdytysvesikierrossa havaittu mikrobiologinen ongelma pääasiallisesti vain yhden tai muutaman mikrobin esiintymisen takia. Jos tutkimuksien avulla olisi pystytty osoittamaan ongelman johtuvan vain tietyistä mikrobeista, hallintamenetelmiä olisi voitu kohdentaa tätä tiettyä ryhmää varten esimerkiksi muuttamalla prosessin parametrejä havaituille mikrobeille epäsuotuisammaksi tai valikoimalla sopiva biosidi näitä mikrobeita varten. Analyysien tuloksia on esitelty graafisesti kuvassa 9.



Kuva 9. DNA-analyysien tulokset. Taulukossa ei ole esitelty niitä tuloksia, joista ei ole saatu selvää lukuarvoa. Pylväät kuvaavat näytteenottokerran keskiarvoa ja y-asteikko on logaritminen.

Näytteet DNA-analyysijä varten otettiin samoilla näytteenottokerroilla kuin viljelyä varten otetut näytteet. Ainoana erona otetuissa näytteissä oli näyte-erän 5 näytteet, jossa näytteet DNA-analyysiä varten otettiin vain jäähdytysvesisäiliöstä. Muista näytteenottopisteistä ei otettu näytteitä, koska DNA-analyysien tekeminen on aikaintensiivinen prosessi ja yrityksen laboratorion aikataulullisten haasteiden vuoksi sekä säiliön pesun jälkeen tehtyjen viljelyiden tulosten räjähdysmäisen kasvun takia koettiin, että muista näytteenottopisteistä tehtävät DNA-analyysit olisivat redundanteja.

Näyte-erän 1 näytteiden analyyseistä voidaan huomata, että järjestelmässä oleva lajisto on ollut laaja. Tällä analyysikerralla havaittiin kaikkia geenikopioita, joita määritettiin. Kuitenkin näyte-erän 1 tulokset olivat kolmea tulosta lukuun ottamatta detektorajan tuntumassa, joten ei voida olla varmoja näiden tuloksien pätevydestä. Ainoat selvästi detektorajan yläpuolella olleet tulokset saatiin vesikierto 1:n näytteenottopisteestä. Tulokset näkyvät selkeänä piikkinä kuvassa 9 määrittelyn 1 kohdalla. Nämä tulokset saatiin yhdestä elävien ja kuolleiden kokonais- 16S rRNA -geenikopioiden määrästä per gramma sekä kahdesta vain elävien mikrobien kokonais- 16S rRNA -geenikopioiden määrästä per gramma. Nämä tulokset eivät itsessään kerro kovin paljoa ja koska on vaikea lähteä arvioimaan, minkä mikrobin geenejä on onnistettu kopioimaan varsinkin silloin, kun kaikkia muita spesifimpiä geenikopioita havaittiin. Jos oletetaan tuloksien koostuneen suurimmaksi osaksi näiden näytteiden kauimpana detektorajasta olleesta spesifisemmästä tuloksesta, voidaan spekuloida näiden olleen peräisin betaproteobakteerien luokkaan kuuluvista bakteereista. Tämä tulos näkyy piikkinä kuvassa 9 määrittelyn 7 kohdalla. On syytä huomata, että samasta näytteenottopisteestä tehdyn viljelyn tulos oli kaikkein pienin verrattaessa muihin näytteenottopisteistä tehtyihin viljelyiden tuloksiin tällä näytteenottokerralla, ja betaproteobakteerien esiintymisestä ei voida olla varmoja.

Näyte-erän 4 näytteiden analyyseistä saatiin selvät tulokset. Tässä on huomattava, että näyte-erän 4 viljelyiden tulokset olivat todella korkeat. Näyte-erän 1 näytteiden analyyseissä oli huomattavissa detektorajan tuntumassa ollut betaproteobakteerien esiintyminen. Tällä analyysikerralla voidaan arvella tuloksen

olleen eksakti, sillä kaikista otetuista näytteistä tämän bakteerin esiintyminen oli selvästi detektorajan yläpuolella yhtä poikkeavaa tulosta lukuun ottamatta. Tämä tulos voidaan myös todeta selvästi kuvasta 9 määrittymisen 7 kohdalta. Tämä tulos voi johtua joko siitä, että säiliön täyttämiseen käytetyssä vedessä on ollut runsaasti ravinteita, joita nämä bakteerit ovat voineet hyödyntää tai siitä, että betaproteobakteerit kuuluvat paikalliseen luonnolliseen mikrobiflooraan ja ovat joutuneet veden mukana säiliöön lukematta pois näiden yhteisvaikutusta. Yksi syy, joka tukee tätä spekulatiota, on se, että tähän luokkaan kuuluvien bakteerien on todettu käyttävän hiilen lähteenään bikarbonaattia [33], jota todettiin löytyvän huomattavasti jäähdytysvedestä tehdyn vesianalyysin mukaan (liite 1). Näiden lisäksi saatiin myös yksi selvästi detektorajan yläpuolella oleva tulos homeiden ja hiivojen geenikopioiden esiintymisestä. Tämä tulos kuitenkin sisälsi elävien ja kuolleiden homeiden ja hiivojen geenikopiot, ja se oli ainoa selvä tulos homeiden ja hiivojen geenikopioista verrattaessa muihin näytteisiin, joten sen keskiarvoinen esiintyminen ei erotu kuvasta 9 määrittymisen 18 kohdalta. Verrattaessa kokonais- 16S rRNA -geenikopioiden määrän esiintymistä betaproteobakteerien 16S rRNA -geenikopioiden esiintymiseen voidaan suhteellisen yksiselitteisesti spekuloida valtaosan mikrobeista kuuluvan juuri tähän bakteeriluokkaan, mikä voidaan myös havaita kuvasta 9.

Näyte-erän 5 näytteiden analyysien tuloksista ei havaittu enää betaproteobakteereja. Tällä analyysikerralla näytteet otettiin vain jäähdytysvesisäiliöstä ja ainoana selvästi detektorajan yläpuolella näistä näytteistä havaittiin aktinobakteerien esiintyminen. Tämä voidaan havaita kuvasta 9 määrittymisen 9 kohdalla näyte-erän 5 elävien mikrobien tuloksesta. Näiden bakteerien esiintymistä sokkauksen ja suodatuksen jälkeen voidaan spekuloida johtuvan siitä, että näiden bakteerien on todettu tuottavan aineenvaihduntansa sivutuotteina antimikrobiologysaineita [34; 35]. Tämän takia voidaan spekuloida näiden bakteerien olevan luonnollisesti resistenttejä käytettyä biosidia kohtaan. Lisäksi tiedetään, että akvaattiset aktinobakteerit ovat kooltansa erittäin pieniä [36]. Akvaattisten aktinobakteerien luokasta on löydetty pienimmät tunnetut yksisoluiset prokaryootit [36]. Näiden solujen halkaisija on keskimäärin 0,3 µm ja solujen tilavuus on noin

0,013  $\mu\text{m}^3$  [36], mikä voi selittää sitä, miksi näitä mikrobeja ei ole saatu suodattua kierrosta. Vastaavat pallomaiset bakteerit ovat keskimäärin 0,5–2,0  $\mu\text{m}$  halkaisijaltaan [37] ja tällaisten solujen keskimääräiseksi tilavuudeksi voidaan arvioida pallon tilavuuden laskukaavalla 0,065–4,2  $\mu\text{m}^3$ .

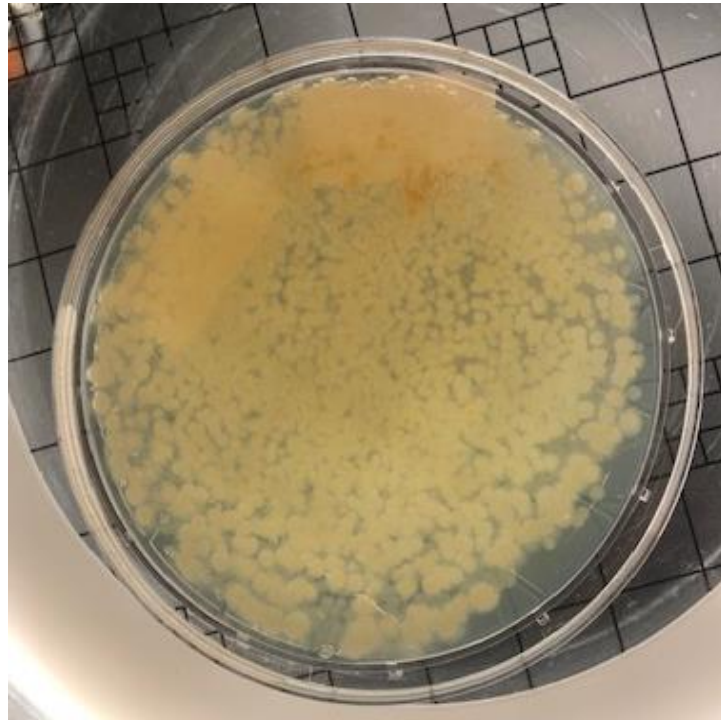
#### 5.4 Pyyhkäisynäytteet

Pyyhkäisynäytteiden määrityksiä tuloksissa havaittiin kaksi poikkeavaa tulosta. Näitä kahta tulosta voidaan olettaa sattumaksi ja niiden oletetaan joutuneen maljalle ilmasta näytteen siirrostamisen yhteydessä, sillä SAS-ilmakontrollinäytteessä havaittiin 7 pesäkettä.

Tämän määrityksen tuloksia ei voida pitää pätevinä, sillä jälkeinpäin huomattiin ainakin osan näytteenottoon käytettyjen pintanäytepakettien käyttöään umpeutuneen. Koska jälkeinpäin ei voida olla varmoja siitä, minkä valmistuserän pintanäytepaketteja käytettiin näytteenotossa, tehtyjen määritysten tuloksista ei voida olla varmoja.

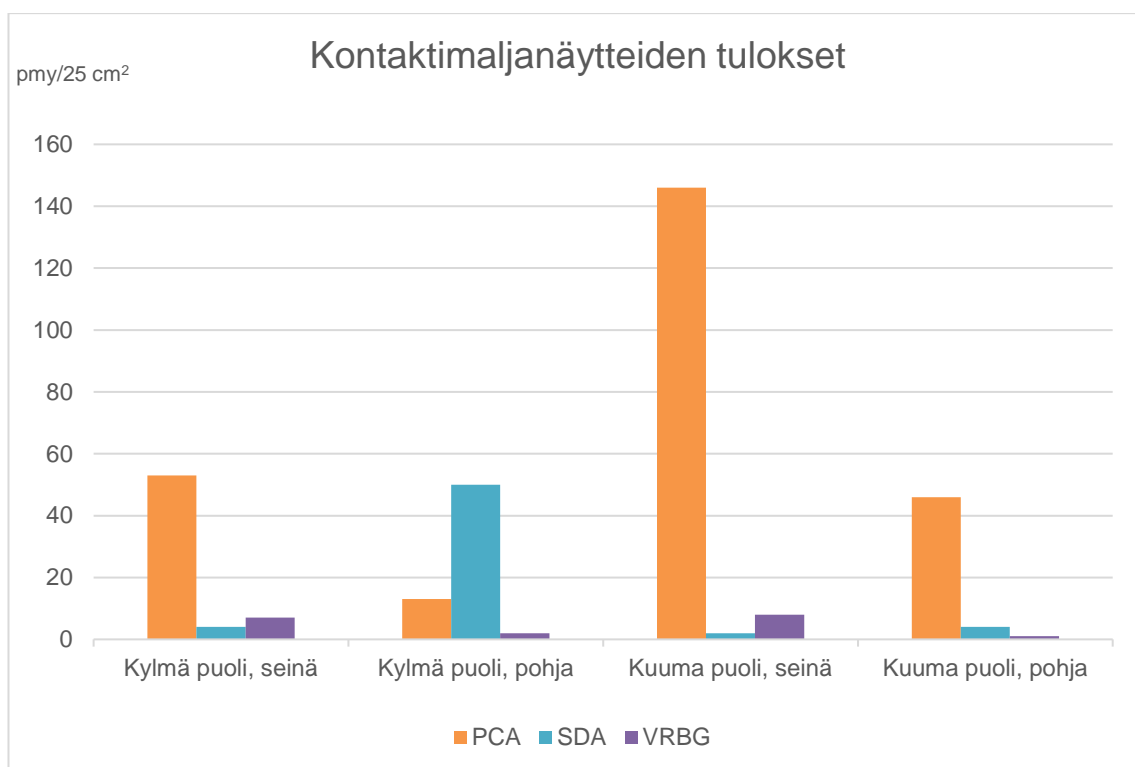
## 5.5 Kontaktimaljanäytteet

Näyte-erän 3 näytteiden tuloksista huomattiin selvästi, että säiliön pesu vähensi sen pinnalta havaittavia mikrobeita. Ennen pesua otetuista näytteistä ei saatu tarkkoja tuloksia kasvun ollessa niin runsasta, mikä voidaan huomata kuvasta 10.



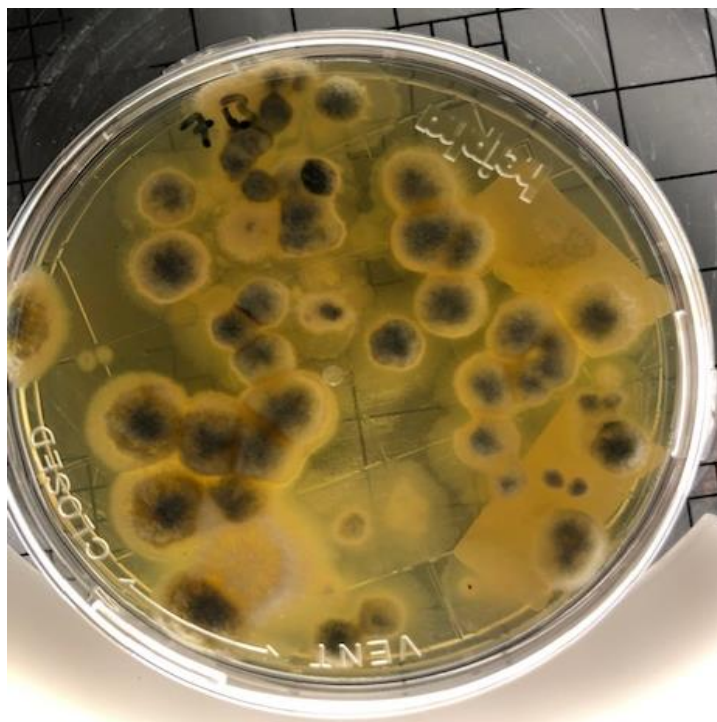
Kuva 10. Kontaktimaljanäyte PCA-alustalla. Maljalta huomataan runsas kasvu, joka saatiin säiliön seinämästä.

Pesun jälkeen pesäkkeiden määrät olivat kasvatusalustoilla helposti luettavissa. Koska säiliö täytettiin pesun jälkeen oletettavasti epäpuhtaalla vedellä, tämän tutkimuksen tuloksia ei voida käyttää johtopäätöksiä tekemiseen ja näillä tuloksilla voidaan ainoastaan osoittaa tehdyn pesun tehokkuus. Näytteenoton yhteydessä säiliön kuumalta puolelta löydettiin laminointia varten käytettyjä muovigranulaatteja. Syytä, miten nämä ovat päätyneet jäähdytysvesisäiliöön, ei tiedetä. Näytteiden pesun jälkeiset tulokset on esitelty kuvassa 11 ja kontaktimaljojen kuvat sekä tarkat tulokset löytyvät liitteestä 3.



Kuva 11. Kontaktimaljanäytteiden tulokset. Säiliön pesun jälkeen havaitut mikrobit alustan mukaan.

Mielenkiintoisimpana voidaan pitää tulosta, joka saatiin pesun jälkeen säiliön kuumalta puolelta seinästä otetusta näytteestä. SDA-kasvatusalustalla huomattiin 48 homepesäkettä, joista 46 pesäkkeen voidaan arvella kuuluvan samaan lajiin ulkonäön perusteella, mutta on myös mahdollista, että homepesäkkeet ovat levinneet kasvatusalustalla. Kuvasta 12 voidaan havaita, että näiden pesäkkeiden kasvu on keskeltä tummaa ja pesäkkeet ovat keskenään samannäköisiä ja siten niiden voidaan arvella edustavan samaa lajia. Samankaltaisia pesäkkeitä ei havaittu muilla maljoilla. Tämän takia voidaan arvella, että pesuveiden mukana kyseiseen näytteenottokohtaan on valunut vettä, joka on sisältänyt näitä homeita. Pesun jälkeen muilla SDA-kasvatusalustoilla ei havaittu homeita ja niissä havaittiin vain muutamia hiivapesäkkeitä. Pesun jälkeen havaittiin myös yksi homepesäke PCA-alustalla. Näiden tulosten perusteella voidaan arvella, että jäähdytysvesisäiliössä ei esiintynyt suuria määriä homeita.



Kuva 12. SDA-Kontaktimaljanäyte. Kuvasta voidaan nähdä homepesäkkeet, joiden kasvu on keskeltä tummaa.

PCA-kontaktimaljanäytteiden tulosten perusteella voidaan huomata, että säiliön seinämissä havaittavien mikrobien lukumäärä on suurempi kuin sen pohjassa. Säiliön kuumalta puolelta seinästä otetusta näytteestä havaittiin kaikista pesun jälkeisistä tuloksista suurin pesäkemäärä. Kylmän puolen seinämästä otetusta näytteestä havaittiin myös huomattava määrä mikrobeja, mutta kuitenkin noin kolme kertaa vähemmän kuin kuuman puolen seinämästä. Kuuman puolen pohjasta havaittiin hieman vähemmän mikrobeita kuin kylmän puolen seinämästä ja kylmän puolen pohjasta havaittiin huomattavasti vähemmän pesäkkeitä kuin muista otetuista näytteistä. Näytteiden vähyyden takia näillä ei kuitenkaan pystytä osoittamaan, että säiliön seinämissä yleensä kasvaisi enemmän mikrobeja kuin sen pohjassa.

VRBGA-kontaktimaljanäytteiden mukaan säiliön pinnoilta oli havaittavissa enterobakteereja. Varsinkin pesun jälkeen maljoilta oli havaittavissa positiivisia tuloksia. Tämän arveltiin johtuvan elintilan vapautumisesta enterobakteereille,

mutta kuten aikaisemmin jo todettiin kohdassa 3.4.2, menetelmällä ei kuitenkaan voida varmasti osoittaa enterobakteerien esiintymistä. Päivää myöhemmin tehdyistä viljelyistä mFC-kasvatusalustoilla huomattiin kasvua. Näillä mFC-kasvatusalustoilla kuitenkin tutkittiin lämpökestoisten koliformisten bakteerien esiintymistä. Koliformiset bakteerit kuuluvat *Enterobacteriaceae*-heimoon, ja tästä syystä voidaan arvella kasvun mFC-alustoilla johtuvan näistä VRBGA-alustoilla havaituista mikrobeista. VRBGA-kontaktimaljanäytteiden ja mFC-alustojen määrityksien tuloksien perusteella arvellaan sitä, että säiliön pinnalla on kasvanut enterobakteereja ja mahdollisesti kyseiset bakteerit ovat olleet biofilmissä, mutta havaitut bakteerit eivät ole olleet suolistoperäisiä koliformeja.

## 6 Johtopäätökset

Näyte-erän 1 tutkimuksien tuloksista havaittua pientä mikrobien kokonaismäärän esiintymistä on haastava spekuloida. Yrityksen aikaisempien tutkimuksien tuloksiin verrattaessa näyte-erän 1 tulokset poikkeavat huomattavasti näistä aikaisemmin tehdyistä tutkimuksista. Näyte-erän 1 tuloksien paikkansapitävyyttä pyrittiin varmistamaan tutkimalla näytteenottopisteiden puhtautta, mutta ainakin osan näyte-erä 3:n näytteenottoon käytettyjen näytteenottopakettien käyttöä huomattiin jälkeinpäin umpeutuneen ja tästä syystä ei saatu varmuutta siitä, että vaikuttaako näytteenottopisteiden epäpuhtaus tuloksiin. Näyte-erän 1 DNA-analyysien perusteella voidaan spekuloida suurimman osan havaituista mikrobeista olleen betaproteobakteereja. Betaproteobakteerien esiintyminen voi johtua siitä, että kyseiset bakteerit kuuluvat paikalliseen luonnolliseen mikrobiflooraan.

Näyte-erän 2 tutkimuksien tuloksien perusteella voidaan todeta, että tehty säiliön pesu vähensi säiliön sisäpinnalta havaittavien mikrobien lukumäärää. Säiliön pinnoilta ei ole havaittavissa suuria määriä homeita. Tämän lisäksi säiliön pinnoilta oli havaittavissa enterobakteereja, mutta näyte-erä 4:n tuloksien perusteella havaitut enterobakteerit eivät olleet suolistoperäisiä koliformisia bakteereja.

Näyte-erä 3:n näytteenottoon käytettiin vanhentuneita näytteenottovälineitä. Tästä syystä ei voida olla varmoja siitä, vaikuttaako näytteenottopisteiden puhkaus tai ennen näytteenottoja tehty näytteenottopisteiden desinfiointi tehtyjen tutkimuksien tuloksiin.

Näyte-erä 4:n tutkimuksien tuloksista voidaan huomata, että jäähdytysvedessä oli havaittavissa huomattava määrä betaproteobakteeraja sekä mahdollisesti myös homeita ja hiivoja. Betaproteobakteerien huomattavan määrän voidaan arvella johtuvan joko siitä, että näitä bakteereja on joutunut järjestelmään sen täyttämiseen käytetyn veden mukana tai siitä, että säiliön täyttämiseen käytetyssä vedessä on ollut runsaasti sellaisia ravinteita, joita nämä bakteerit pystyvät käyttämään. Näiden bakteerien huomattava määrä voi kuitenkin johtua näiden molempien yhdysvaikutuksesta, eli säiliön täyttämiseen käytetyssä vedessä on ollut runsaasti ravinteita sekä betaproteobakteereja, ja ne ovat päässeet lisääntymään helposti.

Näyte-erän 5 tutkimuksien tuloksista voidaan huomata, että järjestelmään tehty biosidisokkaus ja tehty ultrasuodatus vähensi huomattavasti havaittavia mikrobeja. Näiden toimenpiteiden jälkeen havaittu aktinobakteerien esiintyminen voi johtua näiden bakteerien koosta sekä niiden mahdollisesta resistanssista käytettyä biosidia kohtaan.

Näyte-erän 6 tutkimuksien tuloksien perusteella havaittiin jäähdytysvedestä mahdollisia ravinteita, joita mikrobit ovat voineet käyttää hyväkseen. Tämän lisäksi huomattiin mikrobien lisääntyneen huomattavasti näyte-erän 5 tuloksiin verrattaessa.

Tässä työssä tehtyjen tutkimuksien perusteella yritykselle voidaan antaa ehdotuksia ja toimintamenetelmiä, kuinka mikrobeja jäähdytysvesikierrossa voitaisiin hallita tulevaisuudessa. Erilaisten haasteiden vuoksi tässä työssä ei kuitenkaan päästy toteuttamaan alkuperäisen suunnitelman mukaisia tutkimuksia. Alkuperäisen suunnitelman mukaan työssä oli suunniteltu tehtävän biosiditesti, jossa

käytetty biosidi olisi valikoitu DNA-analyysien sekä biosiditappotestien perusteella. Tappotestit oli määrä suorittaa sen jälkeen, kun veden kemiallisen analyysin tulokset saatiin. Kuitenkin näiden tuloksien saamisessa kesti sen verran aikaa, että tappotestejä varten olisi jouduttu ottamaan uudet näytteet sekä määrittää näistä uudestaan mikrobisto.

Biosidin testauksen jälkeen oli vielä suunniteltu tehtävän jäähdytysveden mikrobistolle intensiiviseuranta, jossa olisi seurattu viljelyllä mikrobiston muuttumista yhden viikon ajan joka päivä. Tällä intensiiviseurannalla oli tarkoitus varmistaa valikoidun biosidin tehokkuus. Intensiiviseurannan jälkeen oli myös suunniteltu tehtävän vielä muutaman viikon päästä yksi viljely, jolla olisi varmistettu, että mikrobit eivät ole päässeet lisääntymään jäähdytysvesikierrossa. Aikataulullisten haasteiden vuoksi näitä ei kuitenkaan päästy toteuttamaan.

Veden kemiallista analyysia ja sen yhteydessä tehtyjä mikrobiologisia määrittämiä lukuun ottamatta kaikki tutkimuksien määrittäykset tehtiin yrityksen omassa laboratoriossa. Yrityksen laboratoriollla oli koko tämän työn ajan omat rutiininsa tehtävänä ja tätä työtä varten tehdyt tutkimukset aiheuttivat lisätyötä laboratorion omien työtehtävien päälle. Tästä syystä tehtyjen tutkimuksien tuloksien saamiseen kului aikaa. Opinnäytetyösopimuksen luonteen sekä tämän työn aikana vallinneen SARS-CoV-2 -viruksen aiheuttaman pandemian takia yrityksen laboratoriota ei voitu auttaa näiden määrittäyksien tekemisessä, mikä olisi voinut helpottaa ja nopeuttaa tuloksien saamista. Aikatauluhaasteiden lisäksi tässä työssä täytyy ottaa myös huomioon jäähdytysvesisäiliön täyttäminen oletettavasti epäpuhtaalla vedellä. Tämä on ehkä suurin syy, joka aiheutti haasteita työssä, sillä jos verrataan viljelyiden tuloksia ennen säiliön täyttöä ja tämän jälkeen, voidaan huomata mikrobien räjähdysmäinen kasvu. Alkukartoituksessa havaittu tilanne oli tavoitellun rajan alapuolella ja säiliön täytön jälkeen tilanne oli erittäin huono. Tätä pyrittiin korjaamaan jälkeinpäin sellaisella biosidilla, joka oli ollut yrityksellä testikäytössä ennen tämän työn aloitusta. Biosidisokkaus ja kierron ultrasuodatus vähensi huomattavasti havaittavia mikrobeja, mutta alkuperäiseen lähtötilanteeseen ei päästy. Työn aikataulun vuoksi lisätutkimuksia ei ehditty enää tehdä.

Järjestelmään perehtymisen ja tehtyjen tutkimuksien perusteella yritykselle voidaan tehdä seuraavaksi esiteltyt parannusehdotukset.

1. Suodatettavien vesinäytteiden näytteenotossa tulisi noudattaa liitteen 4 mukaista näytteenotto-ohjetta. Näytteenottopisteen hana suositellaan desinfioitavaksi 70-prosenttisella etanoliliuoksella sisä- ja ulkopuolelta ennen näytteenottoa ja odottaa noin minuutti, että alkoholi haihtuisi hanan pinnoilta ennen sen sykäyksistä avaamista. Tämä saattaa yrityksen laboratorion edustajan mukaan vääristää tulosta. Hanan desinfiointi nähdään tarpeelliseksi siitä syystä, että jos hanan pinnoilla on mikrobeita, ne voivat päätyä veden mukana näytepulloon ja siten vääristää tulosta. Tämä voi tosin myös vääristää tulosta toiseen suuntaan, jolloin hanan pinnoille jäävä etanoli saattaa tappaa vedessä olevia mikrobeita. Tämän lisäksi suositellaan tutkittavan uudestaan näytteenottopisteiden puhautta, jotta voidaan varmistua siitä, ettei niiden likaisuus vääristä tuloksia.
2. Säiliö suositellaan pestäväksi huoltojen yhteydessä ainakin silloin, kun jäähdytysvedessä on havaittu huomattava määrä mikrobeita. Mahdollisuuksien mukaan säiliön pesun yhteydessä tai sen heti täyttämisen jälkeen suositellaan tehtävän myös kierron puhdistus. Jos nämä toimenpiteet tehdään erillään toisistaan, voi jompaankumpaan järjestelmän osaan jäädä mikrobeita, jotka pääsevät lisääntymään järjestelmässä. Koska säiliöön saadaan vettä kiinteästä putkistosta niin hitaasti, säiliön tyhjentämisen jälkeen sen täyttämiseen kuuluu käyttää vain sellaista vettä, jonka alkuperä ja laatu on tiedossa. Veden siirtämiseen tulisi käyttää talousveden kuljetukseen soveltuvaa säiliöautoa. Myös säiliöauton puhtaudesta täytyy varmistua.
3. Kun säiliöön lisätään vettä joka toinen päivä kiinteästä putkistosta 200 litraa ja sen yhteydessä säiliöön annostellaan korroosionestoainetta, suositellaan, että UV-suodatuslaitteiston UV-lamput kytketään veden lisäyksen

ajaksi pois päältä. UV-valo saattaa vaikuttaa annosteltavan korroosionestoaineen tehoon, ja tämän takia suositellaan UV-lamppujen sammuttamista ennen korroosionestoaineen lisäystä. UV-valo saattaa myös vaikuttaa annosteltavien biosidien tehoon ja tästä syystä ei suositella orgaanisten biosidien käyttöä. Systeemin arvellaan parhaiten soveltuvan vetyperoksidin käyttämistä jäähdytysvesikierron desinfiointiin. Vetyperoksidi hajoaa nopeasti vedyksi ja hapeksi, minkä takia sen käyttämisestä kiertoon ei kerry muita haitallisia yhdisteitä [11]. UV-valo voi tehostaa vetyperoksidista muodostuvan hydroksyyliiradikaalien syntymistä [38, s. 53], ja ne ovat erittäin haitallisia soluille [39]. Vetyperoksidia tulisi annostella sokkiannoksina säännöllisesti ja koetaan, että paras mahdollinen annostelu kohta olisi ennen UV-suodatinlaitteistoa. Annosteluväli tulisi selvittää tutkimuksilla. Lisäksi suositellaan UV-suodatuslaitteiston suodattimien vaihtamista kerran viikossa. Systeemiin voitaisiin tämän lisäksi liittää ultraäänilaitteisto ennen UV-suodatinlaitteistoa. Ultraäänilaitteisto toimii myös sameassa vedessä, jossa UV-laitteen teho on alentunut. Tällainen laitteisto häiritsee solujen lisääntymistä ja ehkäisee biofilmin muodostumista, joten hyöty tällaisesta laitteesta saadaan pitkällä aikatahtimella [11]. UV-suodatuslaitteen kapasiteetin ollessa niin suuri se pystyisi teoreettisesti puhdistamaan koko kierrossa olevan veden noin kolmessa tunnissa. Tällä hetkellä ei ole tietoa siitä, kuinka nopeasti vesi kiertää järjestelmässä. Tästä syystä voidaan suositella, että jäähdytysvesisäiliöstä johdettaisiin putkisto UV-laitteelle, jolloin se käsittelisi koko ajan säiliössä olevaa vettä. Tämä voi myös mahdollisesti auttaa siihen, että mikrobeja ei pääsisi kerääntymään lämmönvaihtimille, joiden teho saattaa alentua mikrobien kasvaessa niissä.

## 7 Yhteenveto

Tämän työn tarkoituksena oli tutkia jäähdytysvesikierrossa havaittavaa mikrobiologista ongelmaa ja tutkimuksien tuloksien perusteella tehdä ehdotuksia menetelmistä, joilla yritys pystyisi hallitsemaan näitä mikrobeita.

Tehdyillä tutkimuksilla saatiin paljon tietoa jäähdytysvesikierrossa havaittavista mikrobeista. Kaikkien määrityksiä tuloksia ei kuitenkaan voitu käyttää johtopäätöksiä tekemiseen. Määrityksiä tehtiin vähemmän kuin oli alun perin suunniteltu, ja osaa määrityksiä tuloksista ei voida pitää pätevinä erinäisistä syistä. Työtä häiritsi suuresti säiliön täyttäminen oletettavasti epäpuhtaalla vedellä, ja tämän jälkeen työssä pyrittiin pääsemään takaisin alkutilaan, jota ei enää saavutettu.

Tutkimuksien tuloksien perusteella yritykselle annettiin parannusehdotuksia. Näihin kuuluvat näytteenotto-ohjeen noudattaminen, huollon yhteydessä järjestelmän puhdistamista varten toimintatavat, joita noudattamalla voidaan varmistua järjestelmän ja jäähdytysveden puhtaudesta. Ehdotuksia annettiin myös suositellusta desinfiointiaineesta ja sen annostelusta, kierrossa olevan UV-suodatuslaitteen käytöstä ja huollosta prosessin aikana sekä sen mahdollisesta tehon parantamisesta uudella putkistolla ja ultraäänilaitteistolla.

## Lähteet

- 1 Kemiallinen metsäteollisuus. 2018. Verkkoaineisto. KEHA-keskus. <https://kokeile.tyomarkkinatori.fi/ammattialat/Teollinen-ty%C3%B6/Kemiallinen-mets%C3%A4teollisuus>. 16.8.2018. Luettu 29.11.2021.
- 2 Suomen metsäteollisuuden historia tiivistetysti. 2012. Verkkoaineisto. Metsäalan Ammattilehti. <https://www.ammattilehti.fi/uutiset.html?4056>. 1.4.2012. Luettu 28.12.2021.
- 3 History of Cardboard. Verkkoaineisto. Commercial Cutting & Graphics, LLC. <https://commercialcutting.com/history-of-cardboard/> Luettu 28.12.2021.
- 4 Paperin ja kartongin valmistusprosessi – tiivistelmä. 2021. Verkkoaineisto. KnowPap. [https://www.knowpap.com/www\\_demo\\_version/suomi/paper\\_technology/general/5\\_papermaking/frame.htm](https://www.knowpap.com/www_demo_version/suomi/paper_technology/general/5_papermaking/frame.htm). 13.11.2021. Luettu 1.12.2021.
- 5 Paperin valmistusprosessi. 2019. Verkkoaineisto. Valmet Oyj. <https://www.valmet.com/fi/sijoittajat/valmet-sijoituskohteena/liiketoimintalinjat/paperit/paperin-valmistusprosessi/>. 11.3.2019. Luettu 28.12.2021.
- 6 Jälkikäsittely – tiivistelmä. 2021. Verkkoaineisto. KnowPap. [https://www.knowpap.com/www\\_demo\\_version/suomi/paper\\_technology/general/6\\_finishing/frame.htm](https://www.knowpap.com/www_demo_version/suomi/paper_technology/general/6_finishing/frame.htm). 7.12.2021. Luettu 28.12.2021.
- 7 Savolainen, Antti. 1998. Papermaking science and technology. Book 12, Paper and paperboard converting. Helsinki: Fapet Oy.
- 8 Flexible and Fibre-Based Packaging Europe. 2018. Verkkoaineisto. European Plastic Company. <https://europas.com.vn/flexible-fibre-based-packaging-europe/>. 6.4.2018. Luettu 28.12.2021.
- 9 Handbook of Industrial Water Treatment. 2022. Verkkoaineisto. Suez. <https://www.suezwatertechnologies.com/handbook/chapter-32-closed-recirculating-cooling-systems>. Luettu 19.1.2022.
- 10 Yrityksen sisäisen toimihenkilön haastattelu 23.11.2021.
- 11 Yrityksen yhteistyöhenkilöiden kanssa käyty sähköpostikeskustelu 15.12.2021.

- 12 Wirtanen, Gun. 2002. Laitehygieniä elintarviketeollisuudessa. Verkkoaineisto. Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy. <https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/publications/2002/P480.pdf>. 11/2002. Luettu 30.12.2021.
- 13 Yrityksen työntekijän kanssa käyty sähköpostikeskustelu 24.11.2021.
- 14 Talousvesiasetuksen soveltamisohje osa III. 2020. Verkkoaineisto. Valvira. [https://www.valvira.fi/documents/14444/6739502/Talousvesiasetuksen\\_soveltamisohje\\_osa\\_3.pdf/b9faedd0-cd83-fd94-09e2-452e7e7ee123](https://www.valvira.fi/documents/14444/6739502/Talousvesiasetuksen_soveltamisohje_osa_3.pdf/b9faedd0-cd83-fd94-09e2-452e7e7ee123). 6.10.2020. Luettu 29.12.2021.
- 15 Heterotroph. 2017. Verkkoaineisto. Biology Dictionary. <https://biologydictionary.net/heterotroph/>. 28.4.2017. Luettu 7.1.2022.
- 16 Hogg, Stuart. 2013. Essential Microbiology, toinen painos. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- 17 Vlamakis, Hera & Chai, Yunrong & Beaugard, Pascale & Losick Richard & Kolter, Roberto. 2013. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. Nature Reviews Microbiology 11, s. 157–168. Artikkel. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2960>. 28.1.2013. Luettu 7.12.2021.
- 18 Yrityksen ylemmän toimihenkilön kanssa käyty Teams-keskustelu 9.12.2021.
- 19 M-Endo Agar LES - Technical Data. 2020. Tuoteseloste. HiMedia Laboratories. <https://himedialabs.com/TD/M1106.pdf>. 4/2020. Luettu 6.12.2021.
- 20 Microbiology Manual 12th Edition. 2010. Verkkoaineisto. Merck. [http://www.laboquimia.es/pdf\\_catalogo/MERCK\\_Manual\\_de\\_microbiologia\\_12a\\_edicion.pdf](http://www.laboquimia.es/pdf_catalogo/MERCK_Manual_de_microbiologia_12a_edicion.pdf). 1.1.2010. Luettu 6.12.2021.
- 21 Yrityksen sisäinen dokumentti. 2018.
- 22 Yrityksen sisäinen dokumentti. 2018.
- 23 mFC Agar. 2018. Tuoteseloste. Merck Millipore. <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/655/105/96961dat.pdf>. Luettu 6.12.2021.
- 24 Aryal, Sagar. 2019. Indole Test- Principle, Reagents, Procedure, Result Interpretation and Limitations. Verkkoaineisto. <https://microbiologyinfo.com/indole-test-principle-reagents-procedure-result-interpretation-and-limitations/>. 26.04.2019. Luettu 6.12.2021.

- 25 Yrityksen sisäinen dokumentti. 2018.
- 26 SLANETZ and BARTLEY Agar incl. TTC acc. ISO 7899-2. Tuoteseloste. 2019. Merck Millipore. [https://www.merckmillipore.com/FI/en/product/SLANETZ-and-BARTLEY-agar-base,MDA\\_CHEM-105289?referrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F#anchor\\_DS](https://www.merckmillipore.com/FI/en/product/SLANETZ-and-BARTLEY-agar-base,MDA_CHEM-105289?referrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F#anchor_DS). Luettu 6.12.2021.
- 27 Kukkonen, Esko & Berezhnykh. 2013. qPCR mikrobien DNA-analyysiin. Artikkel. <https://www.sisailmautiset.fi/tutkimus/qpcr-mikrobien-dna-analyysiin/>. 11.11.2013. Luettu 16.12.2021.
- 28 Nocker, Andreas & Sossa-Fernandez, Priscilla & Burr, Mark D. & Camper, Anne K. 2020. Use of Propidium Monoazide for Live/Dead Distinction in Microbial Ecology. Verkkoaineisto. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.02987-06>. 17.12.2020. Luettu 7.12.2021.
- 29 Ben-Ari, Elia T. 1999. Not just slime. *BioScience*, nidos 49, s. 689 – 695. Artikkel. <https://academic.oup.com/bioscience/article/49/9/689/246823?login=true>. 9/1999. Luettu 7.12.2021.
- 30 Yrityksen sisäinen dokumentti. 2018.
- 31 ReadyPlate™ CT VRBG (Violet Red Bile Glucose) Agar acc. ISO 21528. 2021. Tuoteseloste. Merck Millipore. Luettu 7.12.2021.
- 32 Sabourad Dextrose Contact Agar + Chloramphenicol – RT +. 2019. Tuoteseloste. 2021. Merck Millipore. Luettu 7.12.2021.
- 33 Alonso-Sáez, Laura & Galand, Pierre E. & Casamayor, Emilio O. & Pedrós-Alió, Carlos & Bertilsson, Stefan. 2010. High bicarbonate assimilation in the dark by Arctic bacteria. Verkkoaineisto. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20555365/>. 17.6.2010. Luettu 31.12.2021.
- 34 Puttaswamygowda, Gurushankara h. & Olakkaran, Shilpa & Antony, Anet & Purayil, Anupama K. 2019. Chapter 22 – Present Status and Future Perspectives of Marine Actinobacterial Metabolites s. 307–319. Verkkoaineisto. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128163283000222>. Luettu 3.1.2022.
- 35 Nawani, Neelu & Aigle, Bertrand & Mandal, Abul & Bodas, Manish & Ghorbel, Sofiane & Prakash, Divya. 2013. Actinomycetes: Role in Biotechnology and Medicine. Verkkoaineisto. <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/687190/>. 30.4.2013. Luettu 3.1.2022.

- 36 Ghai, Rohit & Mizuni, Carolina M. & Picazo, Antonio & Camacho, Antonio & Rodriguez-Valera, Francisco. 2013. Metagenomics uncovers a new group of low GC and ultra-small marine Actinobacteria. Artikkele. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3747508/>. 20.08.2013. Luettu 3.1.2022.
- 37 Aryal, Sagar. 2018. Different size, Shape and Arrangement of Bacterial Cells. Verkkoaineisto. <https://microbiologyinfo.com/different-size-shape-and-arrangement-of-bacterial-cells/>. 12.06.2018. Luettu 3.1.2022
- 38 Sallanko, Jarmo. 2003. Otsoni ja vetyperoksidi pohjaveden puhdistuksessa. Tutkimus. <http://jultika.oulu.fi/files/isbn9514270487.pdf>. 8.8.2003. Luettu 4.1.2022.
- 39 Preedy, Victor. 2020. Pathology. Lontoo: Elsevier Inc.

## Vesianalyysi

Taulukko 1. Vesianalyysi. Vedenanalyysin ja sen yhteydessä tehtyjen mikrobiologisten määritysten tulokset 23.11.2021.

Määrittäminen	Arvo	Yksikkö
pH	7,70	-
Kokonaiskovuus	2,4	dH
Sähkönjohtavuus (25 °C)	203	uS/cm
Alkaliteetti M (HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	70	ppm
Alkaliteetti P (CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> )	0	ppm
Fosfaatit (PO <sub>4</sub> )	2,40	ppm
Kalium (K)	12,10	ppm
Kalsium (CaCO <sub>3</sub> )	25,20	ppm
Kloori (Cl)	10,4	ppm
Kupari (Cu)	0,19	ppm
Magnesium (Mg)	17,10	ppm
Mangaani (Mn)	0,07	ppm
Natrium (Na)	17,40	ppm
Piidioksidi (SiO <sub>2</sub> )	24,00	ppm
Rauta (Fe)	0,85	ppm
Sinkki (Zn)	<0,01	ppm
Sulfaatit (SO <sub>4</sub> )	2,40	ppm
Sulfaatteja pelkistävät bakteerit (BART-testi)	negatiivinen	
Sulfiitteja pelkistävät bakteerit	0	pmy/ml
Anaerobiset bakteerit	0	pmy/ml
Kokonaisbakteerit	10 000	pmy/ml

## Viljelyiden tulokset

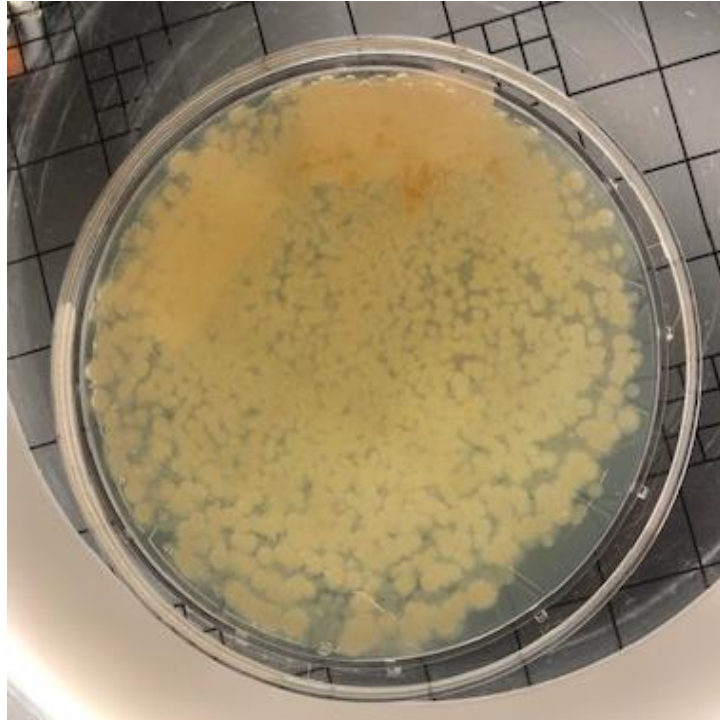
Taulukko 1. Vesinäytteiden mikrobiologisten analyysien tulokset. Tähdellä merkityt luvut mFC sarakkeen alla ilmaisevat kasvun havaitsemista ilman positiivista tulosta.

Näytteenottopiste	Päivämäärä	Kokonaisbakteerit	Itiöitä muodostavat bakteerit	Selektiiviset kasvatusalustat		
		PCA pmy/ml	PCA pmy/ml	EAL pmy/100 ml	mFC pmy/100 ml	S&B pmy/100 ml
Vesikierto 1	8.9.2021	1,71E+02	<1	<1	<1	<1
Vesikierto 2	8.9.2021	1,89E+02	<1	<1	<1	<1
Jäähdytysvesisäiliö	8.9.2021	2,70E+02	<1	<1	<1	<1
Vesikierto 1	22.9.2021	1,50E+05	<1	<1	<1*	<1
Vesikierto 2	22.9.2021	1,60E+05	23	<1	<1*	<1
Jäähdytysvesisäiliö	22.9.2021	7,80E+04	<1	<1	<1*	<1
Vesikierto 1	26.10.2021	6,60E+02	<1	<1	<1	<1
Vesikierto 1, rinnakkainen näyte	26.10.2021	7,50E+02	<1	<1	<1	<1
Jäähdytysvesisäiliö	26.10.2021	8,20E+02	<1	<1	<1	<1
Jäähdytysvesisäiliö	23.11.2021	1,00E+04	-	-	-	-

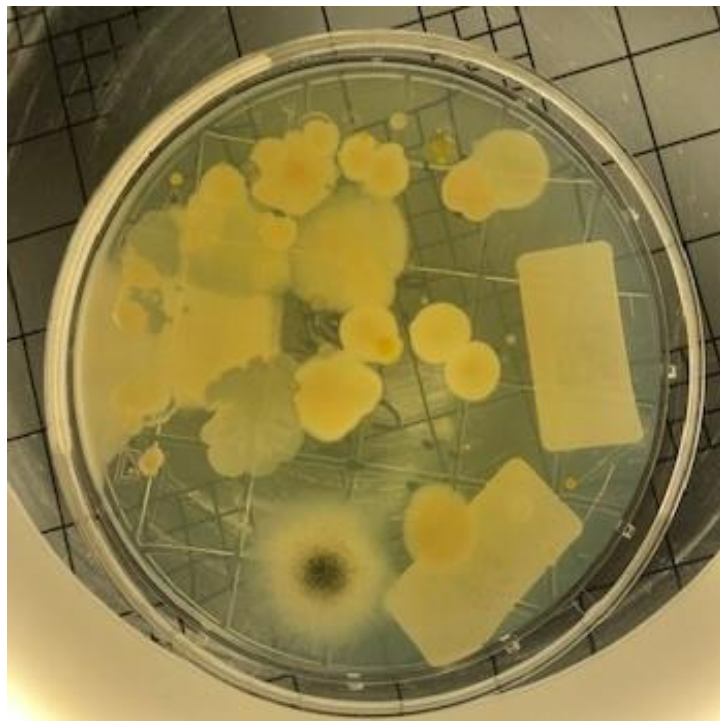
## Kontaktimaljanäytteiden tulokset

Taulukko 1. Kontaktimaljanäytteiden tulokset 13.9.2021. Näytteiden tulokset on esitetty kuvina taulukon jälkeen.

Näytetunniste	Näytteenottoaika	PCA pmy/25 cm <sup>2</sup>	Huomautuksia
1A	Kylmä puoli, seinä	>100	
2A	Kylmä puoli, pohja	>100	
3A	Kuuma puoli, seinä	>100	
4A	Kuuma puoli, pohja	>100	
Säiliön pesu			
5A	Kylmä puoli, seinä	53	1 homepesäke.
6A	Kylmä puoli, pohja	≈13	Pesäkkeet levinneet.
7A	Kuuma puoli, seinä	≈146	Reunakasvustoa.
8A	Kuuma puoli, pohja	46	Reunakasvustoa.
Säiliön pesu			
	Näytteenottoaika	SDA pmy/25 cm <sup>2</sup>	Huomautuksia
1B	Kylmä puoli, seinä	20	Homepesäkkeitä + paljon pieniä pesäkkeitä.
2B	Kylmä puoli, pohja	>100	Malja täynnä kasvustoa.
3B	Kuuma puoli, seinä	>100	Malja täynnä kasvustoa.
4B	Kuuma puoli, pohja	>100	Malja täynnä kasvustoa.
Säiliön pesu			
5B	Kylmä puoli, seinä	4	Hiivapesäkkeitä.
6B	Kylmä puoli, pohja	50	Homepesäkkeitä.
7B	Kuuma puoli, seinä	2	Hiivapesäkkeitä.
8B	Kuuma puoli, pohja	4	Hiivapesäkkeitä.
Säiliön pesu			
	Näytteenottoaika	VRBGA pmy/25 cm <sup>2</sup>	Huomautuksia
1C	Kylmä puoli, seinä	>100	
2C	Kylmä puoli, pohja	>100	1 positiivinen tulos.
3C	Kuuma puoli, seinä	>100	2 positiivista tulosta.
4C	Kuuma puoli, pohja	>100	1 positiivinen tulos.
Säiliön pesu			
5C	Kylmä puoli, seinä	20	7 positiivista tulosta.
6C	Kylmä puoli, pohja	2	2 positiivista tulosta.
7C	Kuuma puoli, seinä	21	8 positiivista tulosta.
8C	Kuuma puoli, pohja	1	1 positiivinen tulos.



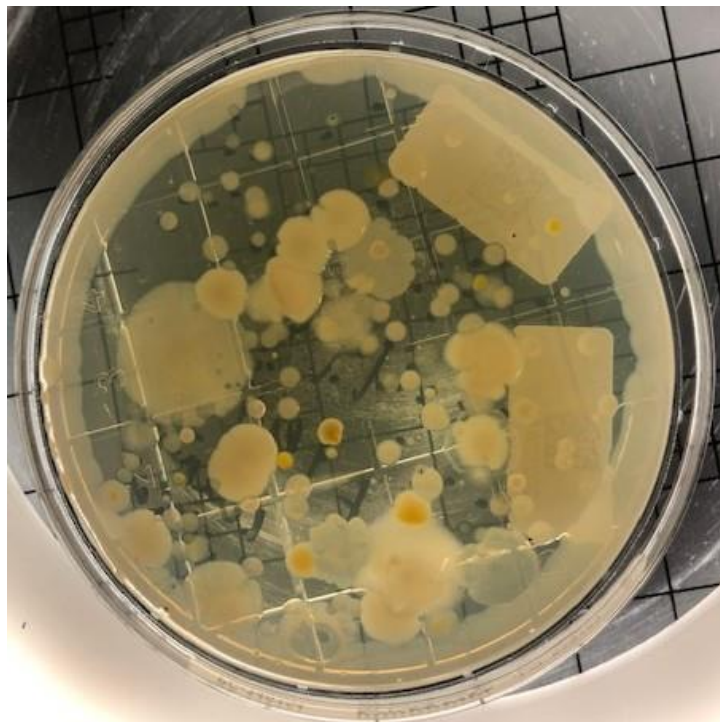
Kuva 1. Näyte 1A. PCA-alustalla paljon kasvua. Näytteissä 2A-4A kasvu on yhtä lukuisaa, joten niistä ei ole esitetty kuvia erikseen.



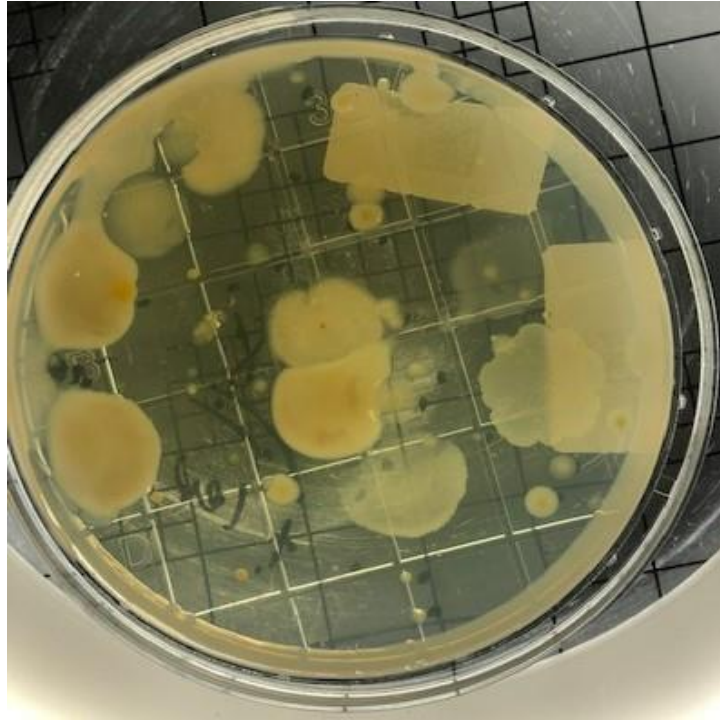
Kuva 2. Näyte 5A. PCA-alustalla 53 pesäkettä, joista yksi on homepesäke.



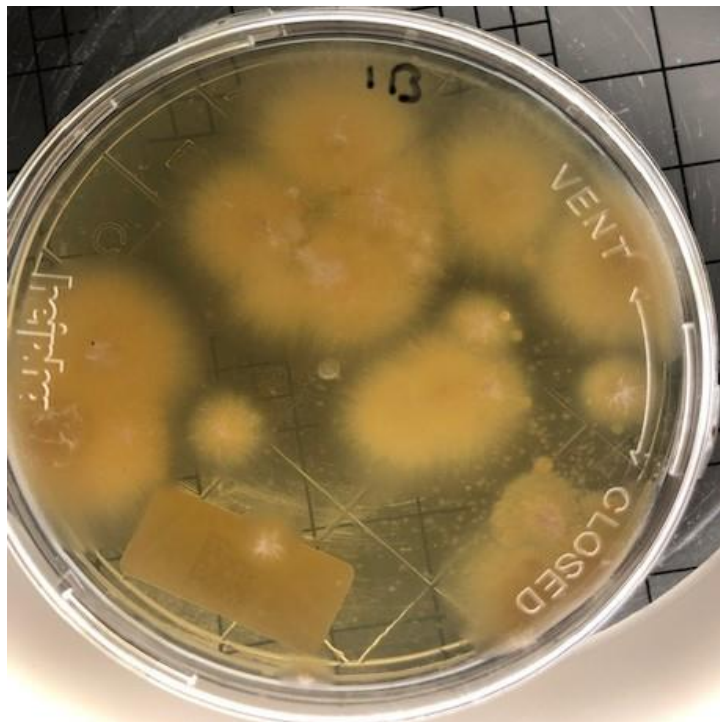
Kuva 3. Näyte 6A. PCA-alustalla 13 levinnyttä pesäkettä.



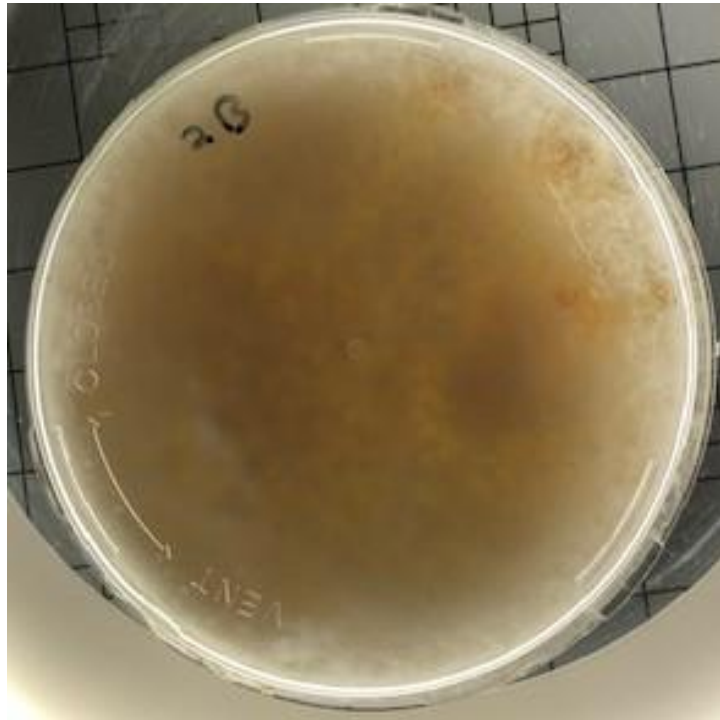
Kuva 4. Näyte 7A. PCA-alustalla 146 pesäkettä ja reunakasvustoa.



Kuva 5. Näyte 8A. PCA-alustalla 48 pesäkettä ja reunakasvustoa.



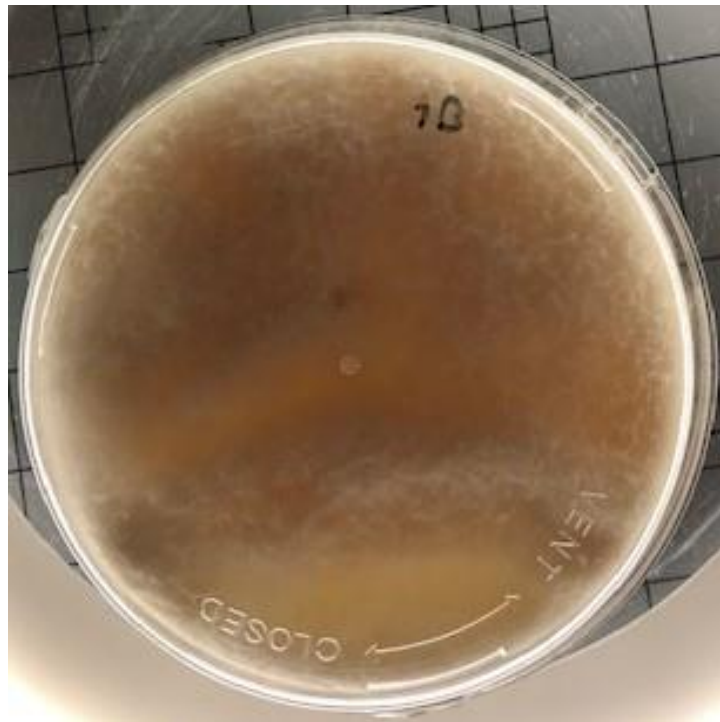
Kuva 6. Näyte 1B. SDA-alustalla 20 homepesäkettä ja paljon pieniä pesäkkeitä, joiden arvellaan olleen hiivoja.



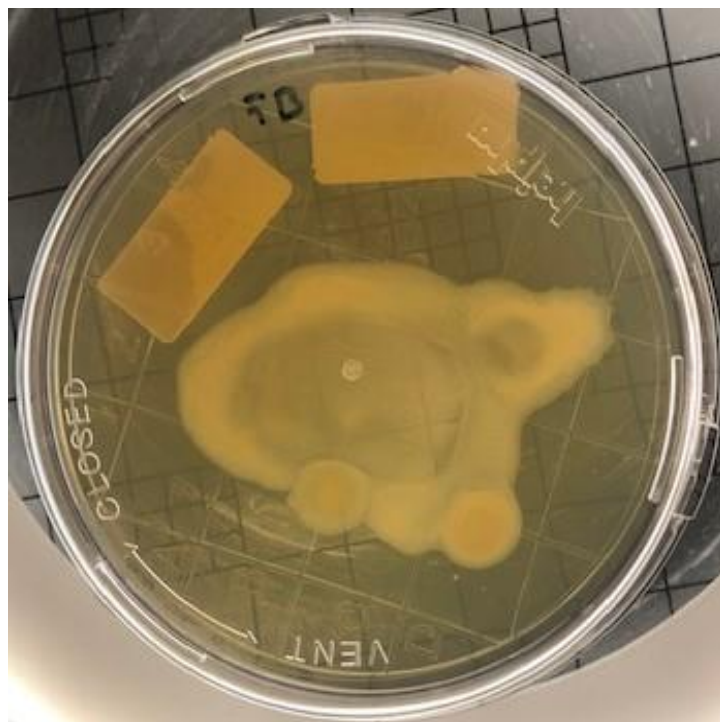
Kuva 7. Näyte 2B. SDA-alustalla vaaleaa levinyttä kasvustoa.



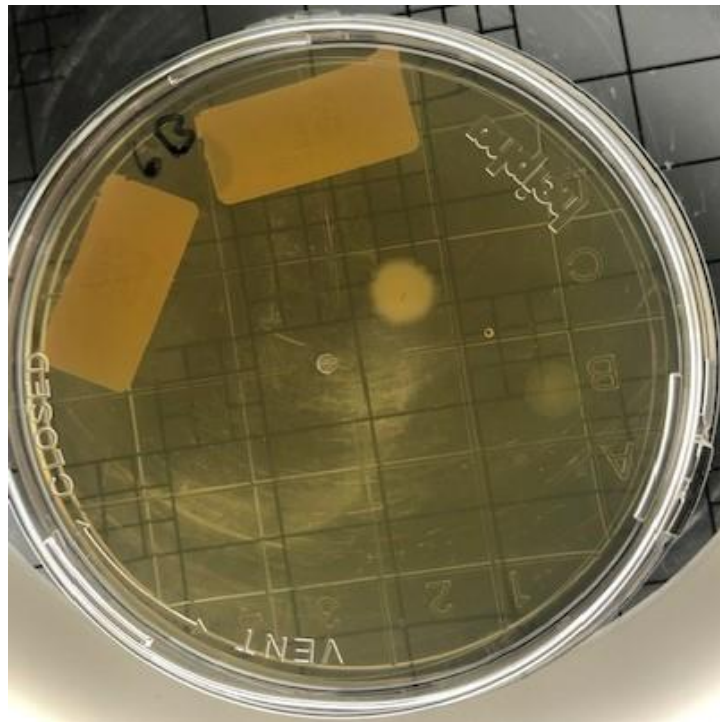
Kuva 8. Näyte 3B. SDA-alustalla vaaleaa levinyttä kasvustoa.



Kuva 9. Näyte 4B. SDA-alustalla vaaleaa levinnyttä kasvustoa.



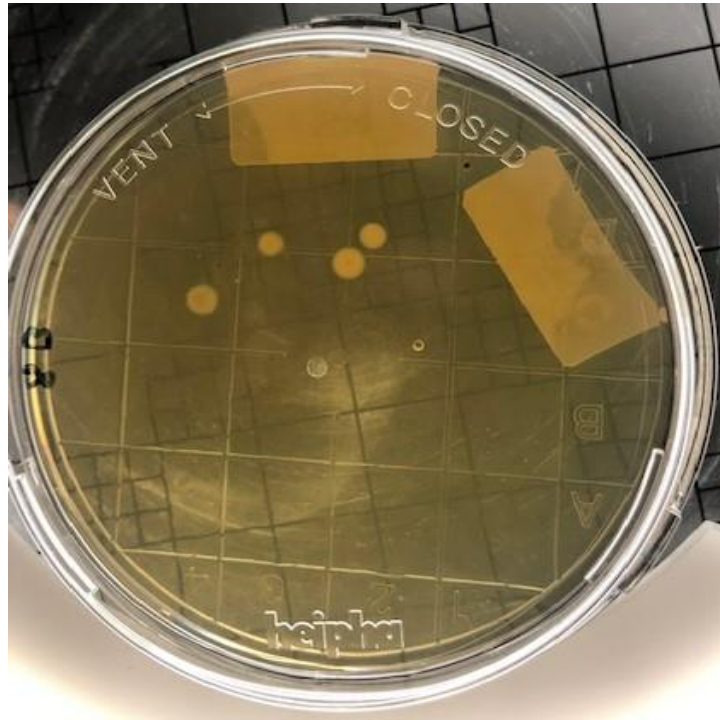
Kuva 10. Näyte 5B. SDA-alustalla neljä hiivapesäkettä.



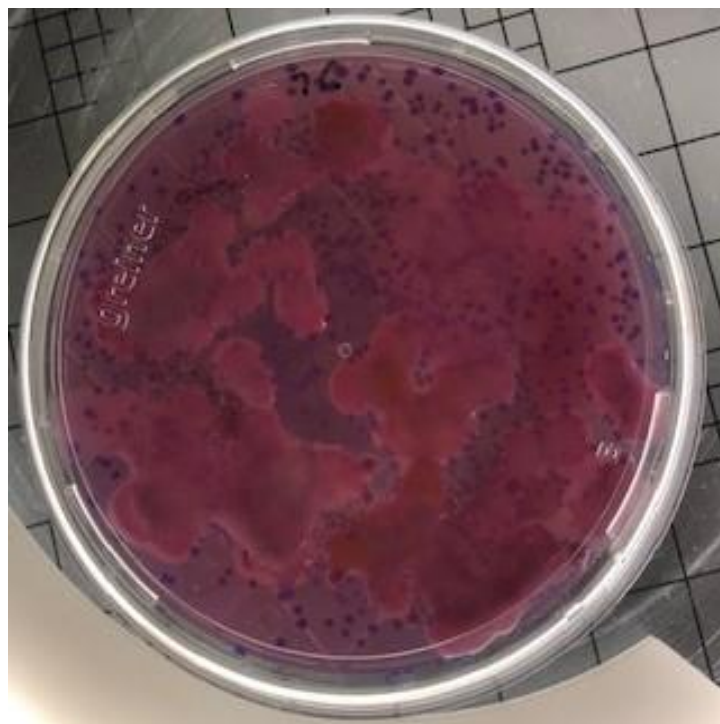
Kuva 11. Näyte 6B. SDA-alustalla kaksi hiivapesäkettä.



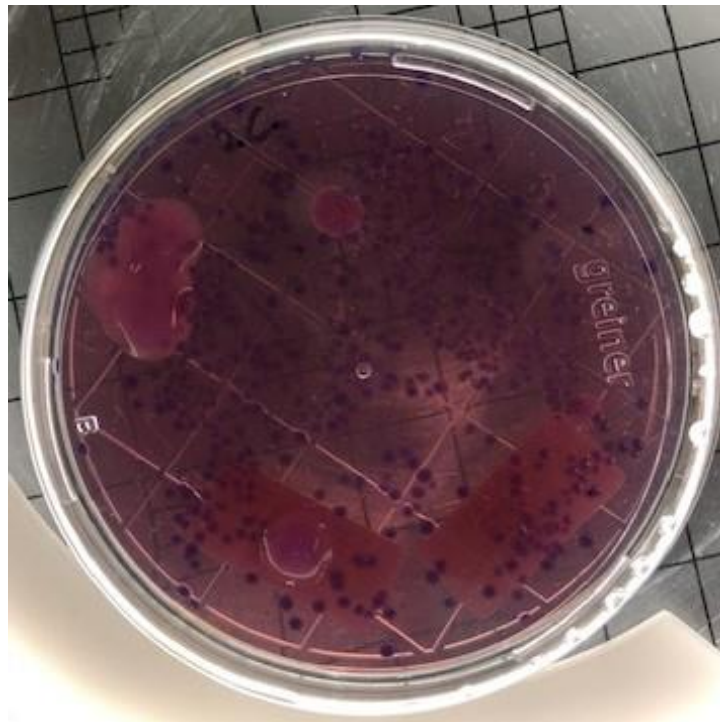
Kuva 12. Näyte 7B. SDA-alustalla 48 homepesäkettä.



Kuva 13. Näyte 8B. SDA-alustalla neljä hiivapesäkettä.



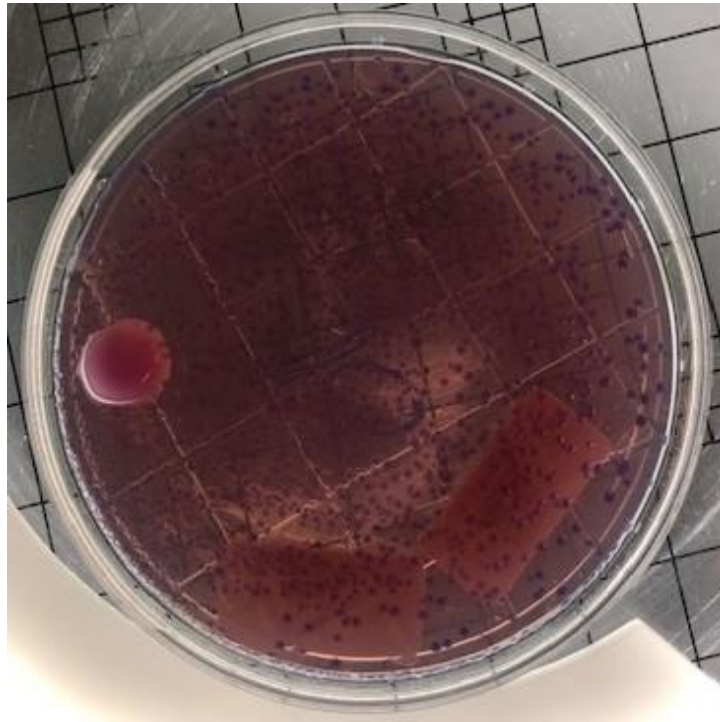
Kuva 14. Näyte 1C. VRBGA-alustalla paljon kasvua. Ei positiivisia tuloksia.



Kuva 15. Näyte 2C. VRBGA-alustalla yksi positiivinen tulos ja paljon muuta kasvua.



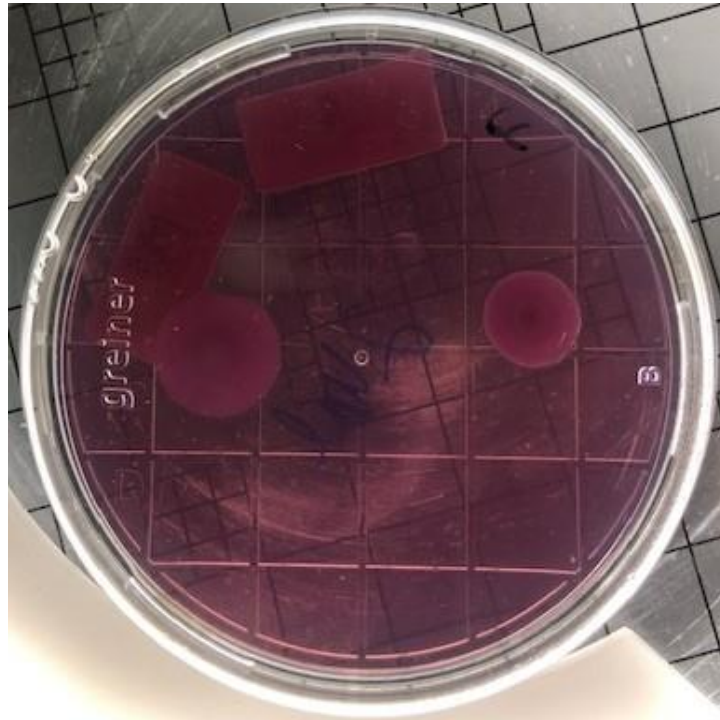
Kuva 16. Näyte 3C. VRBGA-alustalla kaksi positiivista tulosta ja paljon muuta kasvua.



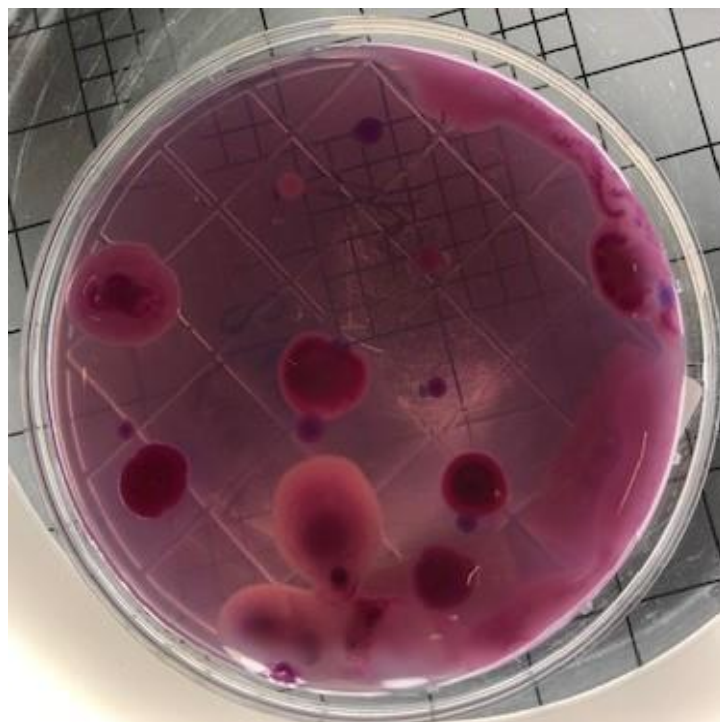
Kuva 17. Näyte 4C. VRBGA-alustalla yksi positiivinen tulos ja paljon muuta kasvua.



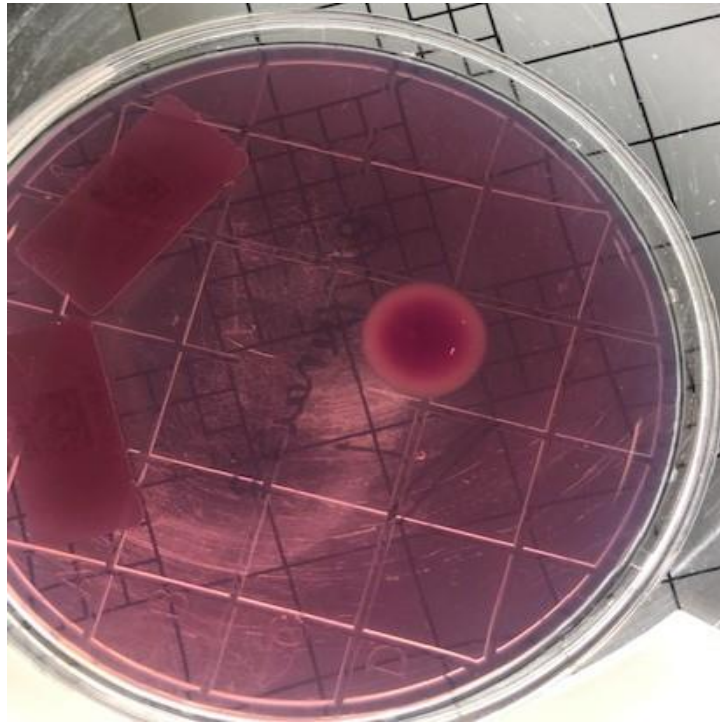
Kuva 18. Näyte 5C. VRBGA-alustalla seitsemän positiivista tulosta ja 13 pesäkettä muuta kasvua.



Kuva 19. Näyte 6C. VRBGA-alustalla kaksi positiivista tulosta.



Kuva 20. Näyte 7C. VRBGA-alustalla kahdeksan positiivista tulosta ja 13 pesäkettä muuta kasvua.



Kuva 21. Näyte 8C. VRBGA-alustalla yksi positiivinen tulos.

## Näytteenotto-ohje

Vesinäytteiden näytteenotossa viljelyä ja DNA-analyysejä varten näytteenotopisteen hana tulisi avata ja sulkea muutaman kerran nopeasti peräkkäin täysin auki niin, että vettä tulee hanan suuaukosta voimakkaasti, jolloin voidaan olettaa, että veden tulessa sykäyksittäin paineella ulos hanasta, se huuhtelisi tehokkaasti putkea sisäpuolelta. Tämän jälkeen vettä tulee vielä valuttaa hanasta noin yhden minuutin ajan ennen näytteenottoa, jotta näytettä ei oteta putkistossa mahdollisesti seisoneesta vedestä. Näytteenotossa käytettävät näyteastiat tulee olla autoklaavissa steriloituja näytepulloja. Näytepullo tulisi avata mahdollisimman lähellä näytteenotopistettä. Avatessa näytteenotopulloa tulee olla koskematta pullon kierteisiin ja pullon korkkiin sisäpuolelta välttämättä kosketusta korkin alareunaan eikä pullon suu saa koskea näytteenotopisteen hanaan tai sen ympärille. Pullon korkkia ei tulisi kääntää ylösalaisin eikä liikutella turhaan ilmassa ja pulloa tulisi pitää mahdollisimman vähän aikaa auki. Näytteenotossa voidaan käyttää myös kertakäyttöhansikkaita. Parhaaksi mahdollisimaksi menetelmäksi koetaan, että pullo avataan niin, että korkista pidetään kiinni ja pullo ruuvataan korkista irti. Korkkia tulisi pitää näytteenotonajan paikoillaan ilmassa ja näytteenoton jälkeen ruuvata korkki kiinni pulloon. Merkitse näytteenottotiedot pulloon ja lomakkeeseen: näytteenotopiste, päivämäärä, kelonaika ja näytteenottajan nimi.