

Laura Hakkarainen

Mikrobijätteen kemiallinen inaktivointi – soveltuvan desinfiointiaineen valinta

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinööryö

14.5.2014

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Laura Hakkarainen Mikrobijätteen kemiallinen inaktivointi – soveltuvan desinfiointiaineen valinta 59 sivua + 3 liitettä 14.5.2014
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Biolääketiede
Ohjaajat	Erikoistutkija Marja Paloheimo Koulutusvastaava Carola Fortelius
<p>Tämän insinööriyön tavoitteena oli löytää Roal Oy:n T&K-osastolla syntyvän mikrobijätteen inaktivointiin soveltuva desinfiointiaine. Tarve inaktivointiin tulee viranomaisilta.</p> <p>Valituksi tulleen aineen tuli olla tehokas, mahdollisimman turvallinen ja helppo käyttää. Aineiden käytöstä laadittiin riskinarviointi ennen niiden testaamista. Lisäksi valituksi tulleen aineen käytöstä laadittiin menetelmäohje yrityksen käyttöön.</p> <p>Aluksi saatavilla olevia desinfiointiaineita seulottiin kirjallisuuden ja valmistajien antamien tietojen avulla. Käytännön kokeisiin valittiin viisi eri desinfiointiainetta: peretikkahappo, etanoli, glutaraldehydivalmiste Erihyd Forte, vetyperoksidivalmiste Diversey Oxivir sekä Virkon S. Näiden lisäksi kokeisiin otettiin mukaan Deconex 20 NS sekä natriumbentsoaatti, joita käytetään mikrobien inaktivointiin muun muassa siirrostusvälineistä Roal Oy:n T&K-osastolla.</p> <p>Tutkimusmenetelminä käytettiin kiekko- sekä suspensiotestejä, jotka suunniteltiin työtä varten. Kiekkotestien avulla etsittiin sopivat desinfiointiainepitoisuudet suspensiotesteihin. Menetelmässä suodatinpaperiekko kastettiin desinfiointiaineeseen ja asetettiin kasvatusaljalle. Kasvatuksen jälkeen mitattiin mahdollisesti muodostuneen estorenkain haluaisija. Suspensiotesteissä analysoitiin aineiden tehoa liemessä eri desinfiointiainepitoisuuksilla ja vaikutusajoilla. Kasvua analysoitiin joko Klett-mittarilla tai maljakasvatuksilla. Testiorganismeina oli kolme <i>Escherichia coli</i> -laboratoriokantaa, <i>Bacillus subtilis</i> sekä kaksi <i>Trichoderma reesei</i> -homekantaa. Aineiden tehoa testattiin sekä vegetatiivisilla soluilla että itiöillä.</p> <p>Tuloksien perusteella löydettiin neljä vaihtoehtoa, jotka inaktivoivat testiorganismit: peretikkahappo, Diversey Oxivir, Erihyd Forte sekä Virkon S. Muut testatut aineet hylättiin tehottomuuden vuoksi. Peretikkahappo todettiin tehokkaimmaksi, mutta myös haitallisimmaksi. Käyttäjälle ja ympäristölle turvallisimmat olivat Diversey Oxivir ja Virkon S. Näistä toinen otetaan T&K-osaston rutiinikäyttöön. Lopullinen valinta tehdään käyttömukavuuden perusteella.</p>	
Avainsanat	Desinfiointi, desinfektointi, sterilointi, peretikkahappo, glutaraldehydi, vetyperoksidi, Virkon S

Author Title Number of Pages Date	Laura Hakkarainen Chemical Inactivation of Microbe Waste – Finding an Appropriate Disinfectant 59 pages + 3 appendices 14 May 2014
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Specialisation option	Biomedicine
Instructors	Marja Paloheimo, Senior Research Scientist Carola Fortelius, Head of Biotech. and Food Eng. Dept.
<p>The aim of this study was to find an appropriate disinfectant for inactivating microbe waste within Roal Oy's R&D department. The requirement for the inactivation comes from public authorities. Effectiveness, safety factors and being user-friendly were the necessary features for the chosen disinfectant. Before testing the substances a risk assessment had to be composed. In addition, a methodology instruction of using the disinfectant was composed for the company.</p> <p>First, commercially available disinfectants were screened with help of literature and manufacturers' information. Five disinfectants were chosen for practical testing: peracetic acid, ethanol, glutaraldehyde product Erihyd Forte, hydrogen peroxide product Diversey Oxivir and Virkon S. In addition to these Deconex 20 NS and sodium benzoate were included in testing. The substances are inter alia used for inactivating microbes from cultivation instruments in Roal Oy's R&D department.</p> <p>Used research methods were disc and suspension tests. Suitable disinfectant concentrations for suspension tests were screened with disc tests. In disc tests a filter paper disc was dipped in disinfectant and placed on an agar plate. After incubation the diameter of potentially formed zone of inhibition was measured. In suspension tests the effectiveness of the substances was analysed in broth with different concentrations and incubation times. The growth was analysed either with a Klett-meter or agar plates. The used test organisms were three <i>Escherichia coli</i> laboratory strains, <i>Bacillus subtilis</i> and two <i>Trichoderma reesei</i> strains. The effectiveness of the substances was tested with vegetative cells as well as fungi spores.</p> <p>Based on the results, four alternatives were effective enough: peracetic acid, Diversey Oxivir, Erihyd Forte and Virkon S. The other substances were ruled out due to their inefficiency. Peracetic acid was the most effective, but also the most harmful one. Diversey Oxivir and Virkon S were the most user and environmental friendly. Either of these will be chosen to be used in routine work in the R&D department. The final choice will be made based on their ease of operation.</p>	
Keywords	Disinfection, sterilization, peracetic acid, glutaraldehyde, hydrogen peroxide, Virkon S

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
KIRJALLINEN OSA		2
2	Lainsäädäntö	2
2.1	Mikrobiturvallisuus	2
2.2	Kemikaaliturvallisuus	4
3	Mikrobien rakenne	6
3.1	Prokaryoottisolun rakenne	6
3.2	Eukaryoottisolun rakenne	10
4	Mikrobien tuhoamismenetelmät	13
4.1	Sterilointi	13
4.2	Desinfiointi ja desinfiointiaineet	18
4.2.1	Desinfiointi	18
4.2.2	Desinfiointiaineita	19
4.2.3	Desinfektioaineiden tehoon vaikuttavia tekijöitä	23
4.3	Muut mikrobien tuhoamiseen sopivat menetelmät	25
5	Mikrobeilla työskentely ja niiden lukumäärän määrittäminen	27
5.1	Suojakaapit	27
5.2	Työskentelytekniikoita	29
5.2.1	Mikrobien lukumäärän määrittäminen	29
5.2.2	Desinfektioaineen tehon tutkiminen suspensiossa ja maljalla	32
KOKEELLINEN OSA		33
6	Materiaalit ja menetelmät	33
6.1	Desinfiointiaineiden valintaprosessi	33
6.2	Työssä testattavat desinfiointiaineet	35
6.3	Testiorganismit	38
6.4	Menetelmät	40
6.4.1	Kiekkotestit	40
6.4.2	Suspensiotestit	42

7	Tulokset	45
7.1	Kiekkotestit	45
7.2	Suspensiotestit	46
8	Tulosten tarkastelu	50
9	Yhteenveto	56
	Lähteet	57
	Liitteet	
	Liite 1. Desinfointiaineita ryhmittäin	
	Liite 2. Desinfointiaineiden käytön riskiarviointi	
	Liite 3. Suspensiotestien primaaritulokset	

Lyhenteet

ATP	Adenosiinitrifosfaatti; runsasenerginen yhdiste soluissa
Cfu	Colony forming unit, pesäkkeitä muodostava yksikkö
DNA	Deoksiribonukleinihappo; elion perintöaines
ER	Endoplasminen kalvosto
GM	Geneettisesti muokattu
GMO	Geneettisesti muokattu organismi
LA	Luria agar -kasvatusalusta
LB	Luria broth -liuosalusta
PD	Potato dextrose -kasvatusalusta
Pmy	Pesäkettä muodostava yksikkö
o/n	Yön yli
T&K	Tutkimus & tuotekehitys

1 Johdanto

Mikrobien käsittelyä koskevat lait edellyttävät, että yrityksessä syntyvä mikrobijäte tulee inaktivoida ennen sen lopullista hävittämistä laitoksen ulkopuolelle, esimerkiksi kaato paikalle tai viemäriverkkoon. Määräysten tavoitteena on estää mikrobien leviäminen luontoon ja geneettisesti muokattujen eli GM-mikrobien perimän siirtyminen luonnon mikrobeihin. Jätteen inaktivointi voidaan suorittaa toimijan parhaaksi näkemällä tavalla. Yleisimmät käytössä olevat menetelmät laboratoriomittakaavassa ovat autoklavointi ja jätteen kemiallinen käsittely.

Tämä insinööri työ tehtiin Roal Oy:n tutkimus- ja tuotekehitysosastolla. Roal Oy on biotekniikan alan yritys, joka valmistaa entsyymejä Nurmijärven Rajamäellä. Yritys on perustettu vuonna 1991. Roal Oy tunnetaan *Trichoderma*, *Aspergillus* ja *Bacillus* -fermentoinneilla valmistetuista entsyymituotteista. T&K-osastoon kuuluvat Suomessa geenitekniikan laboratorio, koe- ja pilotmittakaavan fermentointiyksikkö sekä formulointiyksikkö. (Roal Oy 2014.)

Insinööri työni tavoitteena oli löytää tehokas ja mahdollisimman turvallinen desinfiointiaine Roal Oy:n tutkimus- ja tuotekehitysosastolla syntyvän nestemäisen mikrobijätteen inaktivointiin. Tällä hetkellä suurin osa syntyvästä mikrobijätteestä inaktivoidaan autoklavaimalla. Menetelmä on kuitenkin kallis ja aikaa vievä. Pyrkimyksenä oli löytää desinfiointiaine, joka on helppokäyttöinen eikä lisää merkittävästi laboratoriohenkilöstön työkuormaa. Desinfiointiaineen valinta aloitettiin seulomalla kaupallisia desinfiointiaineita ja valitsemalla soveltuvimmat desinfiointiaineet tarkempaan tarkasteluun sekä käytännön kokeisiin. Kriteereinä valinnassa olivat aineen turvallisuus ja laajaspektrisyys.

Työn kirjallisessa osassa käsitellään desinfiointiaineiden teoriaa sekä muita mikrobien tuhoamiseen käytettyjä menetelmiä ja niiden soveltuvuutta jätteen hävittämiseen. Käytännön osuudessa testattiin valittujen desinfiointiaineiden tehoa osastolla eniten käytettyihin mikrobeihin. Käytettävät testausmenetelmät suunniteltiin työn alkaessa. Työhön sisältyi lisäksi riskiarvioinnin laatiminen testattavien desinfiointiaineiden käytölle sekä menetelmäohjeen laatiminen yrityksen käyttöön. Menetelmäohjetta ei ole liitetty tähän työhön.

KIRJALLINEN OSA

2 Lainsäädäntö

2.1 Mikrobiturvallisuus

Mikrobiturvallisuuden lainsäädäntö sisältää sääntöjä ja ohjeita biologisten tekijöiden käytölle, koska niille altistuminen voi aiheuttaa terveydellistä haittaa. Biologisia tekijöitä ovat mikrobisolut ja rihmastot, itiöt, entsyymit, solukomponentit sekä toksiniit. Näistä mikro-organismeja ovat mikrobisolut, rihmastot ja itiöt. Mikrobilainsäädäntöä valvoo ja asettaa Valtioneuvosto, Sosiaali- ja terveysalan lupa- ja valvontavirasto Valvira ja Geenitekniikan lautakunta. Näiden lisäksi Euroopan Unioni on asettanut omia direktiivejään. (Sosiaali- ja terveysministeriön asetus 1155/1993.)

Mikro-organismeille voi altistua ihokosketuksella, naarmujen kautta sekä pisaratartuntana. Seurauksena voi aiheutua terveydellisiä haittoja, kuten tulehduksia, ärsytysoireita ja allergiaa. Altistumisia pyritään torjumaan biologisten tekijöiden korvaamisella vähemmän vaarallisilla vaihtoehdoilla. Aina pyritään panostamaan myös mahdollisimman turvallisiin työmenetelmiin sekä hyvään suojaukseen. Työturvallisuuslain 738/2002, 40 § mukaan altistuminen biologisille tekijöille on mieluiten estettävä kokonaan ja mikäli se ei ole teknisesti täysin mahdollista, on altistumisen oltava niin pieni, että työntekijä ei siitä saa terveydellistä haittaa. Työnantajan velvollisuus on huolehtia vaarojen määrittelystä ja selvittämisestä, riskiarvioinnin tekemisestä, altistumisen torjumisesta, työntekijöiden koulutuksesta sekä ennakoilmoituksen tekemisestä viranomaisille. Riskinarvioinnin tulee sisältää tiedot biologisten tekijöiden luokittelusta, altistumisen luonteesta, määrästä sekä kestosta. (Sosiaali- ja terveysministeriön asetus 1155/1993; Työsuojelulaki 738/2002, 40 §.)

Ammattitautiasetuksessa 1347/1988 on mainittu ammattitauteja aiheuttavia biologiategijöitä, jotka tulee ottaa huomioon mikrobiturvallisuudessa. Asetuksessa ammattitauteja aiheuttavia biologisia tekijöitä ovat bakteerien ja homeiden itiöt, entsyymit sekä erilaiset solukomponentit ja toksiniit. Nämä voivat aiheuttaa muun muassa homepölynsairauksia, astmaa, nuhaa ja ilmankostuttajakuumetta. (Ammattitautiasetus 1347/1988.)

Biologiset tekijät, lähinnä mikrobit, jaetaan neljään vaaraluokkiin I-IV sen mukaan mikä on niiden kyky aiheuttaa ihmiselle sairautta, niiden leviämisen todennäköisyyden sekä niiden aiheuttaman sairauden ehkäisy- ja hoitokeinojen mukaan. Luokat on esitetty Valtioneuvoston päätöksessä 1155/1993 sekä Valviran päätöksessä 229/1998. Roal Oy:n T&K:n laboratorioissa voidaan käsitellä luokkaan I ja II kuuluvia mikrobeja. Luokan I mikrobit eivät todennäköisesti aiheuta ihmisille sairauksia. Niiden käsittelyyn riittää, että noudattaa hyvän työsuojelun ja työhygienian periaatteita. Luokkaan I kuuluu muun muassa GM-mikrobit, joissa isäntä on ryhmään I kuuluva mikrobi ja siirretyt geenit eivät tee siitä haitallista terveydelle tai ympäristölle. Luokkaan II kuuluvat mikrobit voivat aiheuttaa ihmisille sairauden ja työntekijälle tätä kautta vakavan vaaran. Mikrobi ei kuitenkaan todennäköisesti leviä muuhun väestöön. Luokan II mikrobien aiheuttamiin infektioihin on olemassa tehokas ehkäisykeino tai hoito. Tyypillisiä luokan II mikrobeja ovat ruokamyrkytysbakteerit. Laissa ja säädöksissä on ohjeita näiden mikrobien käsittelyyn. Ohjeet koskevat lähinnä työtiloja ja välineitä. (Biologisten tekijöiden luokittelusta 921/2010; Sosiaali- ja terveysministeriön asetus 1155/1993.)

Luokan III mikrobit aiheuttavat ihmiselle vakavan sairauden ja työntekijälle tätä kautta vakavan vaaran. Mikrobi voi aiheuttaa epidemiaa ja sen aiheuttamaan infektiin on yleensä olemassa tehokas ehkäisykeino tai hoito. Luokan IV mikrobit aiheuttavat myös ihmisille sairauden ja työntekijälle vakavan vaaran. Mikrobi voi levitä muuhun väestöön. Luokan IV mikrobien aiheuttamiin infektioihin ei yleensä ole olemassa tehokasta ehkäisykeinoa tai hoitoa. (Biologisten tekijöiden luokittelusta 921/2010; Sosiaali- ja terveysministeriön asetus 1155/1993.)

Roal Oy:n T&K:n laboratorioissa käsitellään suljetusti geenimuunneltuja sekä muuntelemattomia mikro-organismeja. Suljetulla käytöllä tarkoitetaan sisätiloissa esimerkiksi laboratorioissa tapahtuvaa tuotekehitykseen, tutkimukseen tai teolliseen tuotantoon liittyvää muuntogeenisten organismien käyttöä. Niiden käyttöä säätelee geenitekniikkalaki (377/1995), jonka on asettanut Geenitekniikan lautakunta. Lain tarkoitus on edistää geenitekniikan turvallista käyttöä ja kehittymistä sekä suojella ihmisten ja eläinten terveyttä ja ympäristöä muuntogeenisiltä eliöiltä. GM-mikrobien aiheuttamia riskejä ovat ympäristöön leviäminen ja vakiintuminen, perintöaineen tahaton siirtyminen sekä patogeeniset, toksiset ja allergiaa aiheuttavat ominaisuudet. GM-mikrobien riskiarvioinnin periaatteista on oma asetus 1053/2005, jonka on asettanut Sosiaali- ja terveysmi-

nisteriö. (Geenitekniikkalaki 377/1995; Sosiaali- ja terveysministeriön asetus 1053/2005.)

Osa mikrobiturvallisuutta on jätteiden asianmukainen kerääminen, varastointi ja hävittäminen. Nämä on pyrittävä suorittamaan parhaalla mahdollisella tavalla. Asetuksissa on myös ohjeita syntyvän biologisenjätteen hävitykseen. Mikrobien käyttö ja jätteiden hävitys eivät saa aiheuttaa haittaa ihmisille eivätkä ympäristölle. Käytännössä tämä tarkoittaa, että laboratorioissa tulee olla soveltuvat tilat ja laitteet niiden käsittelyyn. Mikrobijätteen käsittelyyn tulee kiinnittää erityistä huomiota jo riskiarviointia tehdessä. Mikrobijätteen hävitystapa on valittava tapauskohtaisesti. Ehtoja asettaa toiminnan laajuus eli syntyvän jätteen määrä, käytettävä organismi sekä siirretyn perintöaineksen ominaisuudet. Pääsääntö on, että suljetun käytön ulkopuolelle joutuvassa jätteessä ei saa olla lisääntymiskykyisiä muuntogeenisiä mikro-organismeja eikä se saa sisältää geenitekniikan avulla tuotettuja haitallisia geenituotteita. (Ohje muuntogeenisen kasvimateriaalin jätehuoltoon suljetussa käytössä 2009; Sosiaali- ja terveysministeriön asetus 1155/1993; Suljetun käytön valvonta 2014.)

Säännöt eivät koske pelkästään itse organismeja vaan myös sen kanssa kosketuksissa olleita materiaaleja, käytettyjä välineitä ja jättevettä. Materiaaleja ovat tässä tapauksessa muun muassa kasvatusalustat. Kun lisääntymiskykyiset mikro-organismit ja haitalliset aineet on inaktivoitu, jätteet voidaan hävittää kansallisten säädösten mukaan samalla tavalla kuin muu vastaava materiaali. Nestemäiset kasvatusalustat voidaan laskea yleiseen viemäriverkkoon, jos se ei sisällä lisääntymiskykyisiä mikro-organismeja eivätkä muita aineita, jotka voivat olla vaaraksi ympäristölle. Kiinteä jäte tulee yleensä autoklavoida, jonka jälkeen se voidaan hävittää sekajätteen mukana. (Ohje muuntogeenisen kasvimateriaalin jätehuoltoon suljetussa käytössä 2009; Sosiaali- ja terveysministeriön asetus 1155/1993.)

2.2 Kemikaaliturvallisuus

Kemikaalilainsäädännön ylin elin Suomessa on Valtioneuvosto. Ympäristölle vaarallisia kemikaaleja valvoo Ympäristöministeriö. Kemikaalien teollista käsittelyä ja varastointia valvoo Kauppa- ja teollisuusministeriö. Sosiaali- ja Terveysministeriö valvoo taas terveydelle vaarallisia ja palo- ja räjähdeterkkiä kemikaaleja sekä on vastuussa työsuoje-

lusta. Kemikaalilainsäädäntö kattaa kemikaalien terveystriskit, palo- ja räjähdysvaaran sekä niiden aiheuttamat riskit ympäristölle. Näistä informoidaan käyttäjää kemikaalien luokituksella, merkitsemisellä ja soveltuvalla päällyksellä. Päällyserkintöjen tavoitteena on varoittaa käyttäjiä aineiden vaarallisista ominaisuuksista sekä neuvoa käyttäjää aineen turvallisesta käytöstä. Kemikaalien päällyksien tulee olla kestäviä ja turvallisia. Kemikaalien luokituksella tarkoitetaan esimerkiksi kemikaalin luokitusta vaaralliseksi tai ympäristölle haitalliseksi. (Kemikaalineuvottelukunta 2000.)

Kemikaalilainsäädäntö sisältää useita kemikaaliturvallisuuteen liittyviä lakeja. Kemikaalilain 599/2013 tarkoituksena on terveyden ja ympäristön suojeleminen kemikaalien aiheuttamilta vaaroilta ja haitoilta. Ympäristönsuojelulain 2000/86 pyrkimyksenä on ehkäistä ympäristön pilaantumista sekä poistaa ja vähentää pilaantumisesta aiheutuvia vahinkoja sekä turvata terveellinen ja viihtyisä sekä luonnontaloudellisesti kestävä ja monimuotoinen ympäristö. Tärkeää on myös ehkäistä jätteiden syntyä ja haitallisia vaikutuksia. Jätelaissa 2011/646 on kerrottu jätteiden ehkäisyn ja jätehuollon vaatimuksista. Lain tarkoituksena on ehkäistä ja vähentää jätehuollosta aiheutuvaa vaaraa ja haittaa terveydelle ja ympäristölle. Pyrkimyksenä tulisi myös olla jätteen määrään ja haitallisuuden vähentäminen. (Jätelaki 2011/646; Kemikaalilaki 599/2013; Ympäristönsuojelulaki 2000/86.)

Kemikaaliturvallisuuteen liittyvät oleellisesti myös käyttöturvallisuustiedotteet ja riskiarviointien teko. Käyttöturvallisuustiedotteen tekemisestä on vastuussa valmistaja ja maahantuoja. Käyttöturvallisuustiedote tulee laatia kemikaaleille, jotka ovat luokiteltu vaarallisiksi, terveydelle tai ympäristölle haitallisiksi tai palo- ja räjähdysriskiksi. Käyttöturvallisuustiedote antaa käyttäjälle tarkempaa tietoa kemikaalin haitallisista ominaisuuksista kuin mitä sen etiketissä lukee. Sen tulee sisältää tieto valmisteen koostumuksesta, vaarallisuudesta ihmisille ja ympäristölle, palo- ja räjähdysriskistä sekä tietoa valmisteen oikeasta käytöstä, ensiaputoimista ja aineen hävittämisestä. (Kemikaalineuvottelukunta 2000; Käyttöturvallisuustiedote 2014.)

Riskiarviointi tulee tehdä ennen aineiden tilaamista. Riskiarvioinnilla pyritään kemikaalien osalta miettimään oikeita työtapoja sekä aineiden sisältämiä riskejä. Riskinarvion tulee sisältää työstä aiheutuvat riskit, onnettomuuden todennäköisyyden ja sen seuraukset, vaadittavat suojavälineet, toimintatavat riskin toteutuessa sekä riskin hyväksyt-

tävyys. Kemikaaliturvallisuuden riskiarvioinnissa keskitytään kemiallisiin vaaratekijöihin. (Kemikaalineuvottelukunta 2000.)

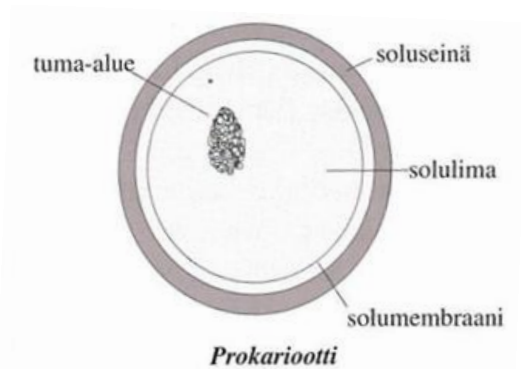
Desinfiointiaineet ovat usein myrkyllisiä ja aina vähintäänkin haitallisia tai ärsyttäviä. Desinfiointiaineiden käytöstä on asetettu Euroopan parlamentissa asetus 528/2012 eli biosidivalmisteiden asettamisesta saataville markkinoilla ja niiden käytöstä. Asetuksen mukaan biosidivalmisteet voivat luontaisten ominaisuuksiensa ja käyttötapojensa vuoksi aiheuttaa riskejä ihmisille, eläimille ja ympäristölle. Näiden suojelun varmistamiseksi haitallisimpia tehoaineita ei hyväksytä käytettäväksi biosidivalmisteissa muuta kuin erityistilanteissa, joissa hyväksymättä jättämisestä aiheutuu suhteetonta haittaa. Hyväksytyjä aineita tarkastellaan säännöllisesti tieteen kehityksen huomioon ottamiseksi. Kun vertaillaan erilaisia tehoaineita sisältäviä biosidivalmisteita, kielletään aineet, joista aiheutuu huomattavasti korkeampi kokonaisriski ihmisten terveydelle ja eläinten terveydelle sekä ympäristölle. (Euroopan Parlamentin asetus 528/2012.)

3 Mikrobien rakenne

3.1 Prokaryoottisolun rakenne

Prokaryoottisoluihin kuuluvat bakteerit ja arkeonit. Ne ovat kooltaan 0,1 - 50 µm. Pienen kokonsa ansiosta prokaryoottisolut pystyvät kasvamaan nopeasti; ravinteet pääsevät nopeasti soluun ja jätteet solusta ulos. Tämän ansiosta ne sopeutuvat myös nopeasti muuttuvaan ympäristöön. (Bakteerisolun sisäiset rakenteet 2006; Salkinoja-Salonen 2002: 97.)

Prokaryoottisolut koostuvat pääasiassa soluseinästä, solukalvosta, solulimasta, tumal alueesta, ribosomeista sekä plasmideista. Jollain prokaryooteilla saattaa myös olla soluseinää suojaava kapseli tai limakerros sekä liikkumista helpottavia flagelloja. Harvinaisempia solurakenteita ovat kaasurakkulat ja inkluusiot eli sulkeumat. Prokaryootin solurakenne on kuvassa 1.



Kuva 1. Prokaryoottisolun rakennetta. Kyseessä on yksinkertainen bakteeri, jolla on vain välttämättömät soluelimet. (Salkinoja-Salonen 2002: 92)

Solulima eli sytoplasma täyttää prokaryoottisolujen sisätilan. Se koostuu pääasiassa vedestä ja siihen liuenneista sokereista, ioneista, rasvahapoista ja aminohapoista. Iso osa solun toiminnosta tapahtuu juuri solulimassa. (Bakteerisolun sisäiset rakenteet 2006; Salkinoja-Salonen 2002: 92 – 98.)

Tuma-alue eli solun kromosomi ja plasmidit sisältävät prokaryoottisolujen perintöaineksen. Bakteerisolulla voi olla monta tuma-aluetta ja näin ollen useita kromosomeja, jotka kuitenkin ovat usein täysin identtisiä keskenään. Kromosomi on muodoltaan renkaanmuotoinen jättiläismolekyylä, joka koostuu pelkästään DNA:sta. Kromosomin sisältyy 0,5 - 8 miljoonaa emäsparia. Plasmidit koostuvat myös pelkästään DNA:sta. Ne sisältävät kuitenkin vain 0,01 - 0,8 miljoonaa emäsparia. Ne antavat prokaryooteille lisäominaisuuksia, eivätkä ne näin ollen ole välttämättömiä soluille. Ribosomien avulla solu muodostaa proteiineja DNA:n ohjeen mukaisesti. Ribosomit koostuvat pääasiassa RNA:sta sekä proteiineista. Prokaryoottien ribosomien koko on 70S ja ne voidaan jakaa 50S ja 30S -alayksiköihin. Ribosomien määrä solussa vaihtelee muutamasta tuhannesta sataan tuhanteen riippuen solunkasvuvaiheesta. (Bakteerisolun sisäiset rakenteet 2006; Salkinoja-Salonen 2002: 154 - 163.)

Prokaryoottisolujen ulkorakenteisiin kuuluvat soluseinät ja -kalvot, flagellat sekä kapselit. Vain osalla mikrobeista on flagelloja tai kapseleita. Flagellojen avulla solut liikkuvat. Liikkeet ovat usein sykäyksiä, jolloin solu pääsee eteenpäin tai pyörähtää ympäri. Joillakin bakteereilla on uloimmaisena kerroksena kapseli tai limakerros. Ne koostuvat erilaisista polysakkarideista ja niiden tehtävänä on auttaa solua kiinnittymään isäntäsoluun tai muuhun pintaan sekä suojata solua ympäristön stressitekijöiltä kuten desinfiointiaineilta. (Salkinoja-Salonen 2002: 119, 131 - 133.)

Soluseinän tehtävänä on antaa solulle muoto sekä mekaanista lujuutta. Bakteerit voidaan jakaa kahteen ryhmään soluseinän koostumuksen mukaan: gram-positiivisiin ja gram-negatiivisiin kuten kuvassa 2. Gram-positiivinen soluseinä koostuu 20 - 80 nm paksuisesta peptidoglykaanista eli mureiinista, joka on heti solukalvon ulkopuolella. Peptidoglykaani koostuu N-asetyyli-glukosamiini ja N-asetyyli-muramiinihappoketjuista, jotka ovat kiinni toisissaan peptidipoikittaissidoksilla. Peptidoglykaanin ulkopuolella voi joillakin gram-positiivisilla bakteereilla olla erilaisia suokerroksia: teikohappoja ja lipoarabinomannaania. Gram-positiivisiin verrattuna gram-negatiivisen bakteerin soluseinä on monimutkaisempi. Gram-negatiivisilla bakteereilla on uloimpana ulkokalvo, joka koostuu lipopolysakkarideista. Ulkokalvoa seuraa 2 - 7 nm paksu peptidoglykaanikerros. Solukalvon ja peptidoglykaanikerroksen välissä on periplasmisen tila. Periplasmisen tilan uskotaan koostuvan löyhästä peptidoglykaani-verkosta. Gram-positiivisten bakteerien seinät ovat vahvempia kuin gram-negatiivisten paksunnan peptidoglykaani kerroksen ansiosta. (Prescott et al. 2002: 55 - 58; Salkinoja-Salonen 2002: 99 - 103.)



Kuva 2. Gram-positiivisen ja gram-negatiivisen bakteerin soluseinän rakennetta. (Salkinoja-Salonen 2002: 101)

Gram-negatiivisilla bakteereilla oleva hyvin poimuuntunut ulkokalvo koostuu lipidikaksikerroksesta, jonka sisällä on fosfolipidejä sekä proteiineja. Ulkokalvon sisäpinnalla on myös lipoproteiineja, jotka kiinnittävät sen peptidoglykaanikerrokseen. Ulkokalvon ulkopinnalla sen sijaan on lipopolysakkaridejä eli LPS:ää. LPS on todettu myrkylliseksi. Gram-negatiivisten bakteerien patogeenisuus johtuukin usein juuri LPS:stä. Ulkokalvon ja soluseinän sisäpuolella on kaikilla prokaryooteilla solukalvo eli plasmamembraani. Se koostuu niin gram-negatiivisilla kuin gram-positiivisillakin bakteereilla fosfolipidikaksikerroksesta, johon on kiinnittyneenä erilaisia proteiineja ja sokereita sekä ioneita. Solukalvon tehtävä on osallistua solun replikaatioon, soluhengitykseen, aineiden kuljetukseen ja soluseinän rakennusosien valmistukseen. (Prescott et al. 2002: 58 - 60; Salkinoja-Salonen 2002: 99 - 110.)

Bakteerien gram-luokka voidaan määrittää gram-värijäyksen avulla. Värijäys perustuu siihen, että värijäyksessä muodostuva kristalliviolettijodi-kompleksi vuotaa gram-negatiivisista soluista ulos, kun solujen seinät on kutistettu alkoholikäsitteilyllä. Siten gram-positiiviset solut jäävät violeteiksi. Gram-negatiiviset solut saavat jälkivärijäyksessä punaisen värin. (Salkinoja-Salonen 2002: 100 - 101.)

Inklusioissa eli sulkeumissa solu varastoi energiaa tai materiaaleja jyväsinä. Inklusio erottuu solulimasta ohuella proteiinerakenteella. Inklusiot voivat myös koostua täysin glykogeenistä, joka on glukoosista muodostuva pitkä polymeeri. Monille prokaryooteille on ominaista, että ne elävät kelluen, joko veden pinnalla tai tietyssä vesikerroksessa. Syvyyttään ne voivat säädellä kaasurakkuloiden avulla. Kaasurakkulat ovat yleisiä muun muassa syanobakteereilla. Kaasurakkuloiden kuori koostuu proteiiniverkosta, jonka läpäisevät ainoastaan erilaiset kaasut. (Salkinoja-Salonen 2002: 119, 144.)

Joillakin bakteereilla on myös itiömuoto eli ne muodostavat niin kutsutun bakteerin kestomuodon. Kuvassa 3 on esitelty *Ammoniphilus oxalaticus* itiön rakennetta. Itiöiviä bakteerisukuja ovat muun muassa *Bacillukset* ja *Clostridiumit*. Itiöt kestävät hyvin kuumuutta, kemikaaleja, happamuutta ja säteilyä määrinä, jolla solun vegetatiivinen muoto kuolisi. Näin ollen itiöiden sterilointi ja desinfiointi vaatii erityismenetelmiä. Itiön rakenne poikkeaa vegetatiivisen solun rakenteesta. Itiön ulointa kerrosta kutsutaan eksosporiumiksi. Tämän alla on itiön varsinainen kuori, jonka alla on korteksi. Itiöiden vesipitoisuus on vain 15 %, kun se on vegetatiivisessa solussa noin 80 %. Tämä johtuu kalsiumdipikolinaatista, jota on vain itiöissä. Kalsiumdipikolinaatti on ristisilloitettu kalsiumin avulla peptidoglykaaniin. Tämä kutistaa peptidoglykaanin ja vesi puristuu ulos solusta. Itiöt saavat energiansa ATP:n sijaan 3-fosfo-glyseraattista, koska se säilyy ATP:tä paremmin. Itiössä on näiden lisäksi yksi kopio genomista, vähän RNA:ta ja ribosomeja, joitakin toiminnallisia entsyymejä sekä paljon proteiinia, joka on ristisilloitettu. Ristisilloitetut proteiinit hankaloittavat kemikaalien ja desinfiointiaineiden pääsemistä itiösolun sisään. (Salkinoja-Salonen 2002: 147 - 152.)

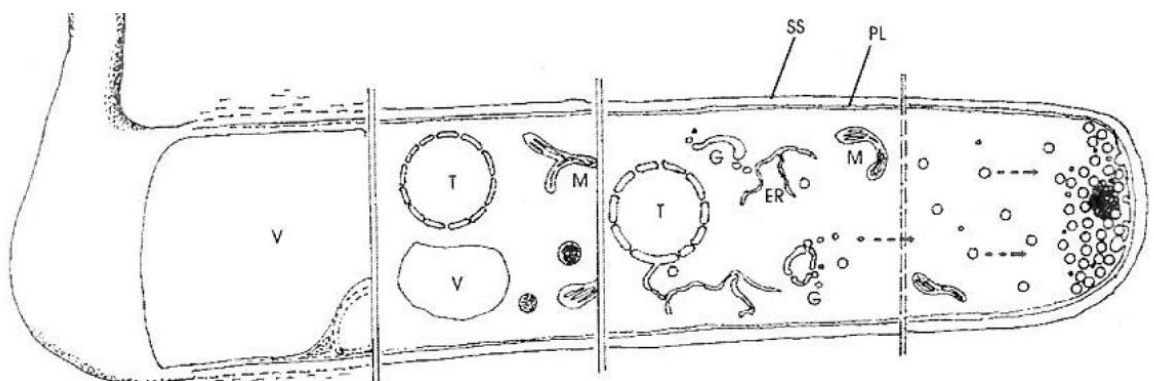


Kuva 3. *A. oxalaticus* -itiön elektronimikroskoopi kuvasta erottuu hyvin itiön seinämän kerroksellisuus. (Salkinoja-Salonen 2002: 150)

3.2 Eukaryoottisolun rakenne

Eukaryoottisoluihin kuuluvat sienet, nisäkäs- ja kasvisolut sekä alkueliöt. Näillä on monia yhteisiä piirteitä, mutta paljon myös eroavaisuuksia muun muassa soluseinässä. Sieniin kuuluvat homeet, hiivat sekä metsäsienet, jotka eroavat toisistaan sekä rakenteellisesti että lisääntymisen osalta. (Salkinoja-Salonen 2002: 167.) Tässä kappaleessa keskitytään lähinnä sienisolujen, ja varsinkin rihmaisten sienten eli homeiden rakentamiseen.

Eukaryoottisolut ovat kooltaan 2 - 200 μm eli ne ovat paljon suurempia kuin prokaryoottisolut. Niillä on paljon erilaisia soluorganelleja, jotka ovat kooltaan yhtä isoja kuin prokaryoottisolut. Eukaryoottisolujen tärkeimpiin sisäisiin rakenteisiin kuuluvat mitokondriot, viherhiukkaset, erilaiset kalvostot, vakuolit, sytosoli sekä tuma (kuva 4.).



Kuva 4. Eukaryoottisolun (sienisolun) rakennetta. V=vakuoli, T=tuma, M=mitokondrio, G=Golgin laite, ER=Endoplasminen kalvosto, SS=soluseinä, PL=solukalvo. (Salkinoja-Salonen 2002: 171.)

Eukaryoottien genomi on pakattu kaksoiskalvon ympäröimään tumaan. Tumia voi olla yksi tai useampi, yleensä enintään kymmenen. Sienten tuman koko on 2 - 3 µm. Tumassa DNA on superkierteisessä muodossa pakattuna histoni-proteiinien ympärille. Eukaryooteilla voi olla useita kromosomeja sekä useita kopioita samasta kromosomista. Sienistä useimmat ovat haploideja eli niillä on vain yksi kopio kutakin kromosomia. Jos kutakin kromosomia on kaksi kappaletta, organismia kutsutaan diploidiseksi. On myös löydetty sieniä, joilla on sekä haploisidia että diploisidia tumia. (Prescott et al. 2002: 86 - 88; Salkinoja-Salonen 2002: 175 - 176.)

Vakuoleihin solut varastoivat jätettä sekä siellä hajotetaan turhia aineita. Vakuoli osallistuu myös solun vesitasapainon säätelyyn. Aineet voivat olla siellä pysyvästi tai väliaikaisesti. Vanhoilla soluilla vakuoli voi olla huomattava osa koko solun tilavuudesta. (Prescott et al. 2002: 77.)

Eukaryoottien kalvostoihin kuuluvat endoplasminen kalvosto ja Golgin laite. Endoplasminen kalvosto karkeasta endoplasmisesta kalvostosta rER:stä sekä sileästä endoplasmisesta kalvostosta eli sER:stä. rER on lähellä tumaa ja sER lähempänä solukalvoa. ER:t muodostuvat erilaisista onteloista, putkista ja rakkuloista. Ribosomit sijaitsevat rER:n pinnalla. Endoplasmiset kalvostot kuljettavat aineita solun sisällä, lipidit ja proteiinit syntetisoidaan niiden pinnalla sekä niissä rakennetaan solukalvoa. Golgin laite sijaitsee heti endoplasmisen kalvoston kyljessä. Golgin laitteen tehtäviin kuuluvat solun omien rakennusaineiden sekä eritettävien aineiden tuotanto, sokereiden liittäminen lipideihin ja proteiineihin sekä se osallistuu valmiiden aineiden kuljetukseen. Joiltakin sieniltä sekä alkueläimiltä puuttuu Golgin laite. Sen korvaa kalvomainen rakenne, joka muistuttaa Golgin laitetta. (Prescott et al. 2002: 79 - 80; Salkinoja-Salonen 2002: 170 - 171.)

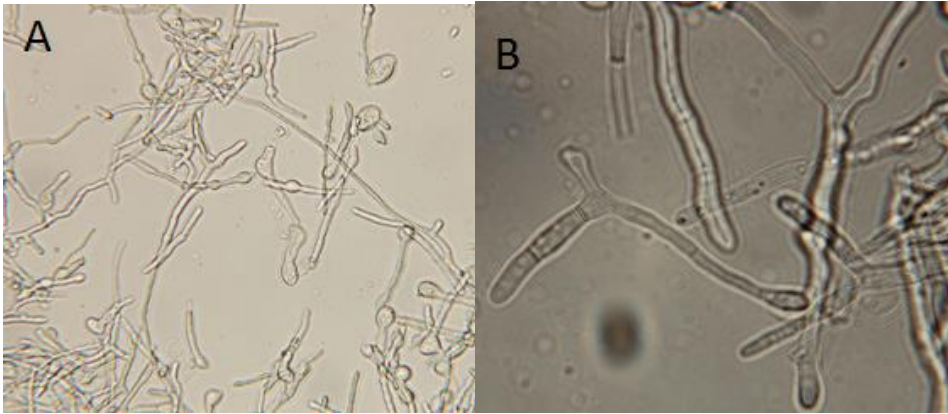
Solukalvo koostuu myös eukaryoottisoluissa kaksoiskerroksisista lipideistä, joista suurin osa on fosfolipidejä. Sienisoluissa on lisäksi ergosterolia. Fosfolipidien seassa on proteiineja, joiden tehtävä on toimia reseptoreina, auttaa solua kiinnittämään solun sisäinen ja ulkoinen tukirankaan. Proteiineihin voi olla kiinnittyneenä erilaisia sokereita. Solukalvo on puoliläpäisevä eli monet pienet molekyylit pääsevät kulkeutumaan solun sisälle osmoottisesti, mutta suuremmat molekyylit tarvitsevat aktiivista tai passiivista kuljetusta. Kuljetusmekanismien avulla solu säätelee olosuhteita itselleen mahdollisimman edulliseksi esimerkiksi ravinteiden suhteen. Solukalvo antaa solulle myös

muotoa soluseinän kanssa. (Prescott et al. 2002: 88 - 89; Salkinoja-Salonen 2002: 174; Soluseinä 2006.)

Suurin rakenteellinen ero eukaryoottisolujen välillä on soluseinän koostumuksessa. Suurimmalla osalla eukaryooteista on jäykkä soluseinä, mutta eläinsoluilla ei ole soluseinää vaan pelkkä solukalvo erottaa sytoplasman ympäristöstään. Sienten soluseinä koostuu kitiinistä tai selluloosasta, kasveilla ja levillä selluloosasta, hemiselluloosasta tai ligniinistä. Kitiini on polymeeri, joka koostuu N-asetyyli-glukosamiinista. Kitiini on sitoutunut kovalenttisesti glukaaneihin, mikä tekee kitiinistä kovan ja kestävä. Sienten soluseinät ovat hydrofobisia eli vettä hylkiviä. Tämä johtuu seinän hydrofobiini-proteiineista. Ilman kanssa nämä muodostavat rakenteita, jotka auttavat sienisoluja sitoutumaan toisiinsa ja muodostamaan rihmoja eli myseeliä. Monet sienisolut kestävät kuivumista, UV-valon haittoja ja soluseinän entsyymaattista hajoamista tuottamalla soluseinän pinnalle melaniineja. (Fortelius & Ojamo 2010; Salkinoja-Salonen 2002: 169 - 171.)

Rihmasienet ovat monisoluisia. Ne kasvavat apitaalisesti eli rihmojen kärjistä. Kasvutavan ansiosta eri rakennusaineita kuljetetaan tehokkaasti rihmastojen kärkiin, jolloin homemyseelien päädyt ovat täynnä pieniä rakkuloita. Rakkulakertymää kutsutaan Spitzenkörper-rakenteeksi. (Fortelius & Ojamo 2010; Salkinoja-Salonen 2002: 169 - 171)

Sienillä on olemassa kaksi eri muotoa: vegetatiivinen rakenne eli myseeli sekä itiöt. Itiöistä muodostuu hyyfejä ja monta hyyfiä muodostaa myseelin. Kuvasta 5. nähdään hyyfin ja myseelin morfologiaa. Solu kasvaa myseelin pään apikaalisesta kasvuvyöhykkeestä ja siellä sijaitsee Spitzenkörper-rakkularakenne. Absorptiovyöhykkeellä sijaitsevat solun tärkeimmät toiminnot kuten kalvostot ja tuma. Varastointivyöhykkeellä sijaitsee vakuoleja sekä muita soluelimiä. Vanhentumisvyöhykkeellä on ainoastaan vakuoleja eli sinne varastoidaan jätteet. Vanhentumisvyöhykkeen takana olevat rihmastot ovat tyhjiä. (Salkinoja-Salonen 2002: 170 - 171, 177.)



Kuva 5. *T. reesei* myseeliä kuvattuna mikroskoopin suurennoksella 400 (A) ja suurennoksella 1000 (B).

Itiöt ovat homeilla lähinnä lisääntymis- ja leviämistapa, mutta joskus myös lepomuoto. Kun ravinteet alkavat loppua tai lämpötila, valo ja kosteus muuttuvat, homeet aloittavat itiöiden muodostamisen. Rikkailla kasvatusalustoilla homeet eivät välttämättä muodosta ollenkaan itiöitä. Bakteeri-itiöt ovat yleensä kestävämpiä lämmön suhteen kuin homeitiöt. (Fortelius & Ojamo 2010; Salkinoja-Salonen 2002: 177.)

4 Mikrobien tuhoamismenetelmät

4.1 Sterilointi

Steriloinnin tarkoituksena on poistaa kaikki mikro-organismit ja itiöt. Steriili tarkoittaa, että pinnassa, esineessä tai nesteessä ei ole likaa, mikrobeja, itiöitä eikä entsyymejä. Steriilin tuotteen tulee siis olla puhdas mikrobiologisesti, kemiallisesti sekä fysikaalisesti. Huolellisella pesemisellä saadaan poistetuksi jo 90 % pinnalla olevista mikrobeista, joten perusteellinen peseminen tehostaa sterilointia. (Sojakka & Välimäki 2011: 30 - 31.)

Steriloinnin tehokkuuteen vaikuttavat lämpötila, aika, mikrobilaji, mikrobin kasvuvaihe ja mikrobin ympäristö. Sterilointimenetelmä tulee valita edellä mainittujen vaikuttavien tekijöiden perusteella. Sileiltä pinnoilta on helpompi poistaa mikrobit kuin huokoiselta. Huokoisen pinnan epätasaisuus mahdollistaa mikrobien kasvun suuremmalla pinta-alalla sekä se suojaa soluja. Nesteiden sterilointi on työläämpää kuin kuivien aineiden, sillä neste suojaa mikrobeja lämmöltä ja kemikaaleilta. Mikrobien itiöt ovat erityisen lämmönkestäviä. Onnistuneessa steriloinnissa kontaminaation todennäköisyyden on

1:10⁶ eli harvemmassa kuin yhdessä miljoonasta tuotteesta on kontaminaatio. (Kivisalmi et al. 2013; Sojakka & Välimäki 2011: 31.)

Fysikaalisia sterilointimenetelmiä ovat lämpösterilointi, suodattaminen sekä säteilysterilointi. Eniten näistä käytetään lämpösterilointia, joko kuivana tai kosteana. Lämpösteriloinnin teho perustuu proteiinien denaturoimiseen ja solukalvon lipidien liuottamiseen. Sterilointia kosteuden avulla kutsutaan höyrysteriloinniksi. Höyry on tehokas lämmönjohdin ja sopii tämän takia erittäin hyvin sterilointiin. Yleisin höyrysteriloinnin muoto on autoklavointi. Autoklaavissa voi steriloida monipuolisesti eri tuotteita kuten metalliesineitä, lämmönkestävää muovia, lasia, kumia, kankaita sekä vesiliuoksia. (Kivisalmi et al. 2013; Sojakka & Välimäki 2011: 32 - 33.)

Autoklaavi on paineistettu astia, johon on mahdollista muodostaa kyllästetty 140 asteen vesihöyry. Sterilointi suoritetaan noin yhden baarin ylipaineessa, jonka avulla kylästetty höyry saadaan aikaiseksi. Autoklaavien sisäkammion tilavuus vaihtelee muutamasta litrasta useisiin satoihin litroihin. Yleisin sterilointilämpötila on 121 °C ja sterilointiaika 15 minuuttia. Steriloinnin parametreja muutetaan steriloitavan tuotteen mukaan. Mitä suurempi steriloitava neste- ja tavaramäärä on, sitä pidempi sterilointiaika ja korkeampi lämpötila vaaditaan. Eri mikrobit vaativat myös eri aikoja ja lämpötiloja inaktivoitukseen. Taulukossa 1. on esimerkkejä eri mikrobin vaatimista sterilointilämpötiloista ja -ajoista.

Taulukko 1. Esimerkkejä eri mikrobin vaatimista sterilointiajoista ja -lämpötiloista. (Sojakka & Välimäki 2011: 36)

Organismi	Vegetatiiviset solut	Itiöt
Bakteerit	10 min / 70 °C	2 - 800 min / 100 °C 0,5 - 12 min / 121 °C
Homeet	30 min / 62 °C	30 min / 80 °C
Hiivat	5 min / 60 °C	5 min / 80 °C
Virukset	30 min / 60 °C	-

Höyrysteriloinnin tehon varmistamiseksi käytetään kemiallisia ja biologisia indikaattoreita. Yleisin käytetty indikaattori on autoklavointiteippi, joka muuttaa väriä tietyssä lämpö-

tilassa. Väriin muutos johtuu teipissä olevasta suolasta, jonka kidevedetön muoto on erivärinen kuin kidevedellinen. Autoklaavin toiminnan tarkastamiseen on tarjolla kaupallisia biologisia indikaattoreita. Ne sisältävät yleensä erittäin lämmönsietokykyisiä bakteeri-itiöitä. Yleisimmät käytössä olevat ovat *Bacillus* ja *Clostridium* -sukujen itiöt. Itiöt voivat olla ampullissa tai kiinnitettynä johonkin pintaan, esimerkiksi liuskaan. Indikaattori steriloidaan tavaroiden ja liuosten joukossa. Steriloinnin jälkeen itiöt siirrostetaan sopivaan kasvatusalustaa ja kasvatetaan optimiolosuhteissa. (Sojakka & Välimäki 2011: 35 - 38; Sterility Indicator (Steam Sterilization).)

Lämpösterilointi kuivana eli kuumailmasterilointi vaatii höyrysterilointiin verrattuna enemmän aikaa ja korkeamman lämpötilan. Kuivasterilointia varten on olemassa erillisiä lämpökaappeja. Lämpötila nostetaan yleisesti 160 - 170 asteeseen ja se pidetään korkeana vähintään kahden tunnin ajan. Kuumailmasterilointi sopii lasille, metallille, öljyille, rasvalle ja jauheille. Kuumailmasterilointi sopii erityisesti esineille, joihin ei haluta jäävän ollenkaan kondenssivettä. Nesteille lämpösterilointi on erittäin hidasta eikä näin ollen ole vaihtoehto mikrobijätteen inaktivoimiseen. (Sojakka & Välimäki 2011: 32 - 33.)

Jos steriloitava aine ei kestä kuumennusta, täytyy se steriilisuodattaa. Steriilisuodatettavia liuoksia ovat muun muassa antibiootteja ja vitamiineja sisältävät liuokset. Suurin osa mikrobeista on läpimitaltaan suurempia kuin 0,2 µm. Tämän takia 0,2 µm on yleisin suodattimien reikien halkaisija. Pienimmillään steriilisuodattimien huokoskoko on 0,1 µm. Steriilisuodattamalla saadaan liuoksista poistetuksi monisoluiset mikrobit, homeet, hiivat ja iso osa bakteereista. Virukset ja pienimmät bakteerit pääsevät suodattimien läpi. Suodattimet valmistetaan eri polymeereistä ja niitä on kahta tyyppiä: ruiskusuodattimia ja kalvosuodattimia. (Sojakka & Välimäki 2011: 42 - 43.)

Ruiskusuodattimet sopivat kertakäyttöisten ruiskujen kärkiin ja niillä voidaan suodattaa enintään muutamia kymmeniä millilitroja. Kalvosuodattimet käyvät jopa usean litran suodattamiseen. Kalvosuodattimen voidaan asettaa astian päälle tai erilliseen sille tarkoitettuun suppiloon. Ruiskusuodattimen halkaisija on yleensä 26 - 90 mm ja kalvosuodattimen 50 mm. Kalvosuodattamisen tehostamiseen voidaan käyttää alipainetta. Itse mikrobit eivät inaktivoidu suodattamalla vaan ne poistetaan halutusta liuoksesta kalvolle. Se ei siis sovellu mikrobijätteen tuhoamiseen. (Sojakka & Välimäki 2011: 43 - 44.)

Kolmas fysikaalinen sterilointimenetelmä on mikrobien käsittely sähkömagneettisella säteilyllä. Yleisin käytetty säteilylaji on ultraviolettisäteily eli UV-valo, joka saadaan aikaiseksi elohopeapolttimoilla. UV-valon aallonpituus on 100 - 400 nm. UV-valo voidaan jakaa kolmeen luokkaan aallonpituuden mukaan: UV-A, UV-B ja UV-C. UV-C:llä on näistä lyhyin aallonpituus 240 - 280 nm ja näin ollen eniten energiaa. Paras mikrobisidinen teho on aallonpituuksilla 250 - 260 nm. UV-C häiritsee molekyyliä, jolloin syntyy muutoksia mikrobien DNA:ssa ja proteiineissa. Proteiinien aminohappoihin syntyy säteilyn takia ylimääräisiä hiili-hiili ristsidoksia, jolloin proteiini denaturoituu. Muutokset aiheuttavat mikrobien normaalin toiminnan ja kasvun estymisen ja lopulta solu kuolee. Mikrobeilla on korjausmekanismeja DNA-vaurioiden korjaamiseksi. Tarpeeksi intensiivisellä käsittelyllä saadaan kuitenkin aikaan niin paljon vaurioita, että mekanismit eivät pysty niitä korjaamaan. (Salkinoja-Salonen 2002: 31; Wirtanen 2002: 126 - 131.)

Herkimpiä UV-valolle ovat bakteerit, joista gram-negatiiviset sietävät UV-valoa gram-positiivisia huomattavasti paremmin. Itiöt ovat suhteellisen kestäviä UV-valolle. UV-säteilyn heikkouksia on, että se pystyy läpäisemään vain muutaman solukerroksen eikä se läpäise nesteitä. Näin ollen se ei sovellu sterilointitavaksi nesteille, mikrobijätteelle eikä likaisille pinoille ja astioille. Jo ilmankosteuden lisääntyminen vähentää mikrobien tuhoutumista. Jotta saavutetaan steriiliys, täytyy altistusajan olla pitkä, useita tunteja, ja etäisyys kohteeseen mahdollisimman lyhyt. UV-valoa käytetään laboratoriossa mikrobien tappamiseen pinoilta. (Salkinoja-Salonen 2002: 31; Sojakka & Välimäki 2011: 45; Wirtanen 2002: 126 - 131.)

Toinen käytetty säteilylaji on gammasäteily. Sen aallonpituus on vain 0,001 nm ja se on erittäin radioaktiivista. Gammasäteilyllä on erinomainen tunkeutumiskyky, mutta se on hengenvaarallista ihmisille. Gammasäteily aiheuttaa soluissa hydroksyyli- ja peroksidiradikaalien synnyn vedestä, jonka seurauksena solun muut yhdisteet hapettuvat. Itiöissä, joissa on vähän vettä, ionisoituu myös muita yhdisteitä. Mitä enemmän soluissa on vettä, sitä tehokkaammin gammasäteily toimii. Säteily saadaan yleensä aikaiseksi radioaktiivisesta koboltti-isotoopista. Sitä käytetään pääasiassa lääkkeiden, sairaalatarvikkeiden, kertakäyttöisten laboratoriovälineiden ja heikosti lämpöä kestävien tuotteiden sterilointiin. Gammasäteilyä ei voida käyttää laboratorio-olosuhteissa. (Salkinoja-Salonen 2002: 31; Sojakka & Välimäki 2011: 46.)

Sterilointi voidaan suorittaa myös kemiallisesti eli kaasusteriloimalla. Kaasusterilointi perustuu mikrobeille myrkyllisten kaasujen käyttöön. Yleisimpiä käytettäviä kaasuja ovat etyleenioksidi, formaldehydi ja vetyperoksidihöyry. Kaasusterilointi ei vaadi vettä eikä korkeaa lämpötilaa. Se tappaa kaikki mikrobit, myös itiöt. Se sopii erityisesti lämpöherkille muoveille, sidetarpeille ja museoesineille. Kaasusterilointeja varten on olemassa omat kaasautoklaavinsa. Kaasut ja höyryt ovat myrkyllisiä myös ihmisille, joten niiden käyttö on työturvallisuuden kannalta haastavaa ja ne vaativat oman laitteiston. Kaasusterilointia käyttävät lähinnä sairaalat ja isot erikoistuneet laitokset. (Kivisalmi et al. 2013; Sojakka & Välimäki 2011: 47.)

Etyleenioksidi C_2H_4O on väritön, nesteytetty ja räjähtävä kaasu. Sen on todistettu aiheuttavan allergiaa sekä todennäköisesti syöpää. Se tunkeutuu hyvin huokosiin aineisiin ja erilaisiin onteloihin. Etyleenioksidi on sekoitettuna kaasusteriloinnissa freoniin tai hiilidioksidiin. Käsittelylämpötilaksi riittää 40 - 50 astetta, mutta käsittelyaika on useita tunteja. Etyleenioksidilla steriloidut tuotteet tulee tuulettaa käsittelyn jälkeen vähintään muutaman päivän ajan myrkykaasujäämien poistamiseksi. (Salkinoja-Salonen 2002: 27; Sojakka & Välimäki 2011: 47.)

Formaldehydi reagoi mikrobien nukleiinihappojen kanssa, jolloin mikrobit kuolevat. Sillä on myös hyvä tunkeutumiskyky huokosiin materiaaleihin. Formaldehydikäsittely tulee suorittaa 50 - 80 asteessa. Formaldehydin etu etyleenioksidiin nähden on, että sitä ei tarvitse tuulettaa pois tuotteista steriloinnin jälkeen. (Salkinoja-Salonen 2002: 27; Sojakka & Välimäki 2011: 47, 50.)

Vetyperoksidihöyryllä steriloinnista kutsutaan plasmasteriloinniksi. Tämä sterilointitapa on yleisesti käytössä sairaaloissa. Plasmasterilointi suoritetaan myös alhaisessa lämpötilassa verrattuna höyry- ja kuumailmasterilointiin siihen suunnitelluissa plasmaautoklaaveissa. Sterilointiajaksi riittää 30 - 45 minuuttia. Plasmasteriloinnissa vetyperoksidi on yhdistettynä plasmaan, joka johtaa sähköä. Tämä saa aikaan vetyperoksidin hajoamisen happi- ja hydroksyyli-radikaaleiksi. Radikaalit tappavat mikrobit hapettamalla niiden eri yhdisteit. Plasmasteriloinnin jälkeen tuotteita ei tarvitse tuulettaa. (Sojakka & Välimäki 2011: 47.)

4.2 Desinfiointi ja desinfiointiaineet

4.2.1 Desinfiointi

Desinfioinnilla tarkoitetaan mikrobien tappamista kemiallisesti. Desinfiointi ei ole yhtä absoluuttista kuin sterilointi, vaan usein sen tavoitteena on päästä eroon patogeeneistä siten, että eloon jäänyt mikrobimäärä ei pysty aiheuttamaan sairautta. Monessa tapauksessa desinfioinnilla saadaan kuitenkin tapetuksi kaikki aineen, esineen tai pinnan mikrobit. Patogeenien desinfiointia ihmisen tai eläimen iholta kutsutaan antiseptiseksi toimenpiteeksi. Antiseptiset aineet ovat siis desinfiointiaineita, mutta kaikki desinfiointiaineet eivät ole antisepteja. Muun muassa lasitavaraa, kirurgisia välineitä, putkistoja, pintoja, laitteita, jätteitä ja talousvettä voidaan desinfioida. (Salkinoja-Salonen 2002: 31 - 32; Sojakka & Välimäki 2011: 49 - 50.)

Desinfioinnilla korvataan usein sellaisten tavaroiden sterilointi, jotka eivät kestä kuumennusta ja joiden käsittelyyn ei haluta käyttää kaasusterilointia. Laboratorioissa on tärkeää desinfioida pinnat sekä käytettävät välineet ja laitteet. Kiinteäaines heikentää myös desinfiointiaineiden tehoa. Kiinteäaines voi sisältää aineita, jotka reagoivat desinfiointiaineiden kanssa ja näin ollen pienentävät sen tehokasta pitoisuutta. Proteiinit ovat erityisen tehokkaita inaktivoimaan desinfiointiaineita. Desinfiointiaineiden on päästävä kontaktiin mikrobien kanssa, joten biofilmejä ja sakkoja on vaikea inaktivoida desinfiointiaineilla. Siten esimerkiksi prosessilaitteet ja –putkistot pestään aina ennen desinfiointikäsittelyä, jolloin saadaan paras lopputulos. (Salkinoja-Salonen 2002: 31 - 33; Sojakka & Välimäki 2011: 49 - 50.)

Desinfiointiaine voi olla mikrobistaattinen tai mikrobisidinen. Mikrobistaattiset aineet pysäyttävät ja estävät mikrobien kasvua. Mikrobisidiset desinfiointiaineet tappavat mikrobeja. Bakteriosidit ja -staatit toimivat bakteereihin, fungisidit ja -staatit sieniin. Desinfiointiaineita on kaupallisesti saatavana satoja erilaisia. Aineen valinnassa on huomioitava käyttökohde. Hyvä desinfiointiaine on nopeatehoinen, laaja-alainen, mielellään stabiili, turvallinen ja hyvän tunkeutumiskyvyn omaava. Usein myös toivotaan aineen olevan mahdollisimman edullinen. Käyttökohde, materiaali, rakenne, mikrobien määrä ja laatu on huomioitava aineen valinnassa. Lämpötila, pH ja kosteus voivat myös vaikuttaa desinfiointiaineiden tehoon. Parhaiten tehoavat desinfiointiaineet ovat yleensä hyvin myrkyllisiä myös ihmisille ja ympäristölle. Tämä rajoittaa niiden käyttöä. Suurin

osa desinfiointiaineista ärsyttää ihoa, silmiä ja limakalvoja. (Salkinoja-Salonen 2002: 31 -32; Sojakka & Välimäki 2011: 49 - 50.)

Desinfiointiaineet luokitellaan ryhmiin niiden vaikuttavan aineen mukaan. Kaupalliset valmisteet ovat usein monen aineen seoksia, jolloin aine saadaan paremmin tehoamaan laajemmalla joukolla mikrobeja. Seoksissa on yleensä jokin pääkomponentti, jonka mukaan se luokitellaan. Desinfiointiaineryhmiä ovat kationiset tensidit, aldehydit, alkoholit, fenolit, aktiiviseen happeen perustuvat, halogeenit sekä muut. (Salkinoja-Salonen 2002: 33 - 47.)

4.2.2 Desinfiointiaineita

Kationisia tensidejä ovat kvatit eli kvaternaariset ammoniumyhdisteet sekä tertiäariset ammoniumyhdisteet. Molekyylin keskellä olevaan aminotyypeen on siis sitoutunut kolme tai neljä substituenttia. Substituentit voivat olla tyydyttyneitä, tyydyttämättömiä, alifaattisia tai aromaattisia sivuketjuja. Yleensä sivuketjun pituus on 12 - 16 hiiltä. Kationiset tensidit tehoavat bakteereihin, viruksiin ja sieniin, mutteivat bakteerien ja homeiden itiöihin. Myös monet gram-negatiiviset bakteerit ovat resistenttejä kationisille tensideille. (Salkinoja-Salonen 2002: 33 - 36.)

Desinfiioivia aldehydejä ovat formaldehydi, orto-ftaalialdehydi sekä glutaraldehydi. Aldehydi funktionaalisenä ryhmänä reagoi nukleofiilisten aineiden kanssa. Tämä tekee niistä myös hyviä desinfiointiaineita, koska soluissa on paljon nukleofiilisiä aineita. Formaldehydi on kaasu, jota käytetään paljon kaasuautoklaaveissa. Sitä saa kaupallisesti myös nesteytettynä ja kiinteänä. Formaldehydi tappaa lähes kaikki mikrobit. Formaldehydi on yksi vanhimmista desinfiointiaineista, mutta sen on huomattu aiheuttavan syöpää ja herkistymistä. Orto-ftaalialdehydi on suhteellisen uusi desinfiointiaine. Se tehoaa lämmitettäessä lähes kaikkiin mikrobeihin. Orto-ftaalialdehydi on lipofiilinen, jolloin se pystyy hyvin tukeutumaan mikrobien soluseinien ja -kalvojen läpi. (Rutala & Weber 2008: 48 - 49; Salkinoja-Salonen 2002: 40 - 43.)

Glutaraldehydissä on kaksi reagoivaa aldehydi-ryhmää, mikä tekee siitä tehokkaan desinfiointiaineen. Glutaraldehydin teho perustuu rikkivetysiltojen, hydroksyyli-, karboksyyli-, ja amino-ryhmien alkylaatioon. Alkylaatio muuttaa proteiinien, DNA:n ja RNA:n synteesejä. Glutaraldehydi reagoi myös solun pintakerroksen kanssa estäen aineiden

kuljetuksen solun sisälle, jolloin solu nälkiintyy. Se reagoi solun pinnalla olevien primaaristen -NH_2 ja sekundaaristen -NH -amiinien kanssa niin, että se ristisilloittaa näitä muihin molekyyliin, jolloin solun pinnasta tulee läpäisemätön. Glutaraldehydi on liuoksena hapan, mutta sen teho on parhaimmillaan pH:n 7 yläpuolella. pH:n ylittäessä 7,5 se alkaa inaktivoita myös itiöitä. Glutaraldehydi inaktivoi niin bakteereita, viruksia, homeita, hiivoja kuin itiöitäkin. Itiöt vaativat konsentroidumman (2 %) liuoksen. Glutaraldehydin pH:n nostoa kutsutaan sen aktivoimiseksi. Aktivoidun glutaraldehydin säilyvyys on huonompi kuin aktivoimattoman, koska aktivoitu glutaraldehydi polymerisoituu alkaalisessa ympäristössä. Glutaraldehydiä on yleisesti käytetty terveydenhuollon instrumenttien desinfiointiin sekä vesien, jäähdytysjärjestelmien ja paperikonekemikaalien säilöntään. Glutaraldehydillä on huono tunkeutumiskyky orgaanisen aineen läpi. Kaupallisissa liuoksissa glutaraldehydiin on usein lisätty jokin muu nopeavaikutteinen desinfiointiaine. (OVA-ohje: Glutaraldehydi 2013; Rutala & Weber 2008: 43 - 46; Salkinoja-Salonen 2002: 41 - 43.)

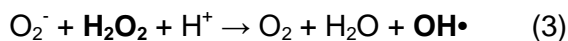
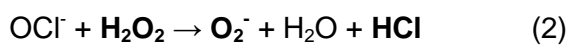
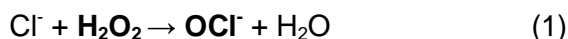
Alkoholeja käytetään desinfiointiaineissa korkeina pitoisuuksina. Yleisimmät käytetyt alkoholit ovat propanolit sekä etanoli. Ennen alkoholikäsittelyä kohdetta ei tarvitse puhdistaa orgaanisesta liasta. Etanoli tappaa vain vegetatiivisia bakteereja ja vaipallisia viruksia. Se ei myöskään desinfioi proteiinipitoisia materiaaleja. Etanolin desinfektoiva vaikutus perustuu proteiinien denaturoimiseen ja lipidien liuottamiseen. Etanolia, kuten muitakin alkoholeja käytetään 60 - 90 tilavuusprosenttisina vesiliuoksina pintojen, välineiden ja ihon desinfiointiin. Kun pitoisuus on alle 50 %, etanolin desinfioiva vaikutus lakkaa. Etanolilla yleisin käytetty pitoisuus on 70 %, koska sen teho desinfektioimiseen on paras. Proteiinien denaturoituminen vaatii myös vettä, jota esimerkiksi lähes 100 prosenttisessa etanolissa ei ole. (Rutala & Weber 2008: 38 - 39; Salkinoja-Salonen 2002: 45; Sojakka & Välimäki 2011: 54 - 55.)

Fenoli oli ensimmäinen käytetty desinfiointiaine. Nykyään siitä on monia johdannaisia, jotka ovat vähemmän myrkyllisiä kuin fenoli, mutta monet niistä ovat silti kiellettyjä Suomessa. Fenoli reagoi myös solujen proteiinien kanssa. (Salkinoja-Salonen 2002: 43 - 44.)

Kaupallisia Aktiiviseen happeen perustuvia desinfiointiaineita on monia. Paljon käytettyjä ovat vetyperoksidi, peretikkahappo ja otsoni. Kaupallisen Virkon S:n teho perustuu kaliumperoksymonosulfaattiin, joka on myös hapettava aine. Se hapettaa solukalvon

proteiinien ja entsyymien rikkisidoksia. Tuloksena solukalvon toiminta häiriintyy ja se repeää. (Salkinoja-Salonen 2002: 36 - 37; Virkon S Disinfectant and Virucide 2009.)

Vetyperoksidi on huoneenlämmössä väritön, pistävänhajuinen neste. Vetyperoksidi on paljon käytetty sen laajaspektrisyiden ansiosta. Se tehoaa viruksiin, bakteereihin, hii-voihin ja bakteeri- ja homeitiöihin. Yleisesti käytetty pitoisuus on 3 %. Itiöiden tuhoamiseen tarvitaan korkeampi pitoisuus, 10 - 30 %, sekä pidempi vaikutusaika. Vetyperoksidi toimii parhaiten 50 - 70 asteessa. Vetyperoksidin desinfioiva vaikutus johtuu sytoksisten, happea sisältävien radikaalien muodostumisesta soluihin. Radikaalit tuhoavat membraaneja, DNA:ta sekä muita tärkeitä solun osia. Mikrobien solulimassa on kloridi-ioneita Cl^- , joiden kanssa vetyperoksidi tuottaa hypokloriittia OCl^- (reaktio 1). Reaktiossa 2 hypokloriitti reagoi vetyperoksidin kanssa muodostaen superoksidianioneja O_2^- . Nämä reagoivat vetyperoksidin kanssa reaktiossa 3 muodostaen edelleen hydroksyyliiradikaaleja OH^\bullet :

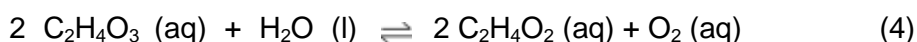


Jokainen reaktiotuotteista on mikrobisidinen vettä ja happea lukuun ottamatta. Superoksidianioni ja hydroksyyli vaikuttavat solujen lipideihin. (OVA-ohje: Vetyperoksidi 2013; Rutala & Weber 2008: 46 - 47; Salkinoja-Salonen 2002: 36 - 37.)

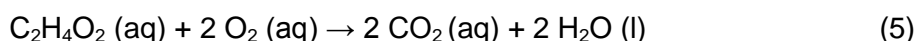
Vetyperoksidin puoliintumisaika vesiliuoksessa on noin seitsemän vuorokautta. Kaupallisissa vetyperoksidi-valmisteissa käytetään säilöntäaineena yleisesti fosfori-, rikki- tai sitruunahappoa hajoamisen estämiseksi. Vetyperoksidin hajoamisessa syntyy happea ja vettä. Myrkyttömien hajoamistuotteiden ansiosta vesiliuokset, jotka sisältävät vetyperoksidia, voi turvallisesti hävittää jäteveden mukana. Auringonvalo ja lämpö nopeuttavat vetyperoksidin hajoamista. Osa fakultatiivisista ja aerobisista mikrobeista tuottaa katalaasi-entsyymiä, joka hajottaa vetyperoksidia ja heikentää sen tehoa. Korkeilla vetyperoksidipitoisuuksilla tai pitkällä vaikutusajolla voidaan kuitenkin kumota katalaasin vaikutus. (OVA-ohje: Vetyperoksidi 2013; Rutala & Weber 2008: 46 - 47; Salkinoja-Salonen 2002: 36 - 37.)

Peretikkahappo on olomuodoltaan pistävänhajuinen, väritön neste. Peretikkahapon tappava vaikutus perustuu proteiinien ja entsyymien inaktivoitumiseen. Hapettamalla näiden rikkisiltoja se muuttaa proteiinien kvaternaarakennetta. Sidoksien muuttuessa proteiini menettää funktionaaliset ominaisuutensa ja solu kuolee. Peretikkahappo hapettaa proteiinien lisäksi myös joitakin lipidejä ja näin vaikuttaa muun muassa solun soluseinään. Peretikkahappo tehoaa bakteereihin, sieniin, viruksiin ja itiöihin. Yleinen käytetty pitoisuus on 0,3 %. Peretikkahappoa käytetään eniten desinfiointiin elintarviketeollisuudessa sekä terveydenhuollossa. Peretikkahappo myydään nesteenä. Kaupallisissa valmisteissa se on yleensä sekoitettuna rikki- tai typpihappoon. Rikki- ja typpihappo toimivat säilöntäaineena seoksessa. (OVA-ohje: Peretikkahappo 2013; Rutala & Weber 2008: 50; Salkinoja-Salonen 2002: 37.)

Peretikkahappo on tehokkaimmillaan huoneenlämmössä eikä sen teho riipu pH:sta. Kun peretikkahappoa laimennetaan vedellä, se alkaa hiljalleen hajota etikkahapoksi ja hapeksi reaktiossa 4:



Nämä hajoavat edelleen hiilidioksidiksi ja vedeksi reaktiossa 5:



Suhteellisen nopea hajoaminen hankaloittaa hieman peretikkahapon käyttöä; käyttöliuoksen tulee olla muutaman vuorokauden sisällä laimennettua. Myrkyttömien hajoamistuotteiden ansiosta peretikkahapon käyttöliuokset on helppo hävittää jäteveden mukana eivätkä ne häiritse jäteveden biologista ja kemiallista puhdistamista. (Peretikkahappo 2013; Rutala & Weber 2008: 50; Salkinoja-Salonen 2002: 37.)

Otsoni on kaasu, jota käytetään lähinnä ilman, talousveden ja uimaveden desinfiointiin. Sillä on hyvä ja laajakirjoinen teho mikrobeihin. (Salkinoja-Salonen 2002: 37.)

Desinfiointiaineissa käytettyjä halogeenejä ovat kloori, bromi ja jodi. Näistä on olemassa lukuisia erilaisia yhdisteitä, joilla on desinfiointivaikutuksia. Paljon käytetty on kloorikaasu, jolla puhdistetaan vesiä otsonin tavoin. Kaikki klooriin pohjautuvat desinfiointiaineet ovat voimakkaita hapettimia. Myös hypokloriitteja käytetään vesien desinfiointiin.

Muita halogeenipitoisia desinfiointiaineita on mainittu useita liitteessä 1. (Salkinoja-Salonen 2002: 37 - 40.)

Desinfiointiin voidaan käyttää edellä mainittujen aineiden lisäksi muun muassa hopea- ja elohopeayhdisteitä, etyleenidioksidia, isotiatsolonieita sekä syanaatteja. (Salkinoja-Salonen 2002: 45 - 46.)

4.2.3 Desinfektioaineiden tehoon vaikuttavia tekijöitä

Monet tekijät vaikuttavat desinfiointiaineiden tehoon. Osa tekijöistä on riippuvaisia mikrobin lajista, osa ympäristön kemiallisista ja fysikaalisista ominaisuuksista ja osa desinfiointiaineen ominaisuuksista. Mikrobista riippuvaisia ovat lajin lisäksi kasvuston kiinnittyminen pinnalle, kannan resistenttisyys desinfiointiaineille, mikrobien määrä sekä sijainti (Rutala & Weber 2008: 33 - 35; Wirtanen 2002: 95 - 97, 134 - 135.).

Desinfiointiaineiden teho eri mikrobiryhmin vaihtelee suuresti. Yleisesti mikrobien resistenssi desinfiointiaineille on seuraava: prionit > *Cryptosporidium* > *Bacillus*- ja *Clostridium*-itiöt > kystat > mykobakteerit > pienet vaipattomat virukset > gram-negatiiviset bakteerit > sienet > isot vaipattomat virukset > gram-positiiviset bakteerit > lipidivaipattomat virukset. Prionit ovat ainoastaan proteiineista koostuvia hiukkasia, jotka ovat erittäin infektiivisiä. Ne aiheuttavat muun muassa BSE:tä eli hullunlehmän tautia. Toistaiseksi ei tunneta yhtään desinfiointiainetta, joka inaktivoisi prioneita. *Cryptosporidiumit* ovat infektiivisiä alkueläimiä. (Salkinoja-Salonen 2002: 48 - 49.)

Osa kannoista on luontaisesti resistenssejä tietyille desinfiointiaineille. Itiöillä on luonnostaan hyvä resistenssi desinfiointiaineita kohtaan. Niiden eksosporium ja korteksi estävät tehokkaasti desinfiointiaineita pääsemästä solun sisälle. Myös mykobakteerien ja gram-negatiivisten bakteerien uloimmat kerrokset estävät tehokkaasti desinfiointiaineiden pääsyn soluun. Jotkin gram-negatiiviset bakteerisuvut ovatkin erittäin hyvin desinfiointiaineita kestäviä. Gram-positiivisten bakteerien itiöt, jotka kestävät hyvin lämpöä kestävät myös hyvin monia desinfiointiaineita. Näitä ovat muun muassa *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Proteus* ja *Providencia*. (Salkinoja-Salonen 2002: 48 - 49.)

Biofilmien tappaminen on aina hankalampaa kuin suspensiossa olevien solujen. Desinfiointiaine ei välttämättä läpäise jokaista solukerrosta ja solujen tuottama orgaaninen

aines inhiboi desinfiointiaineiden tehoa. Desinfiointiaineiden käytössä on lisäksi sama ongelma kuin antibioottien käytössä: eri bakteerikannat voivat muuntua niille resistentiksi. Joillain *Staphylococcus aureus* -kannoilla on havaittu olevan 5000-kertainen sietokyky jodille verrattuna villityypin *S. aureus* -kannan. Hyppivien plasmidien välityksellä on havaittu siirtyvän resistenssi-geenejä ainakin elohopealle, formaldehydille ja kationisille tensideille. Joillekin enterokokeille, esimerkiksi *E. coli* -kannoille on lisäksi muodostunut resistenssi muun muassa klooriheksidiinille, etidymbromidille sekä kvateille. Näissä tapauksissa plasmidit ovat sisältäneet koodin kationisten aineiden pumppaamiseen solusta ulos tehostetusti. (Rutala & Weber 2008: 35; Wirtanen 2012: 133 - 135.)

Muiden tekijöiden pysyessä vakiona, suuri solujen määrän vaatii enemmän aikaa inaktivaatioon. Inaktivaatiota voidaan tehostaa esipesuilla. Desinfioitaessa erilaisia välineitä ongelmaksi voi nousta niiden hankala muoto, joka luo suojaa mikrobeille. Tehokkaassa desinfioinnissa aine pääsee kosketuksiin jokaisen esineen osan kanssa. (Rutala & Weber 2008: 33 - 34; Wirtanen 2012: 133 - 135.)

Ympäristöstä riippuvia tekijöitä ovat lämpötila, ympäröivä orgaaninen ja epäorgaaninen aines, pH, kosteus sekä veden laatu. Se, edistääkö vai haittaako jokin tekijä desinfiointiaineen vaikutusta, riippuu käytettävästä aineesta. Yleisesti korkeampi lämpötila edistää desinfiointiaineiden vaikutusta, mutta liian korkea lämpötila kuitenkin hajottaa itse aineen. Lämmittäessä voi myös syntyä myrkyllisiä kaasuja, mikä on työturvallisuushaitta. (Rutala & Weber 2008: 34; Wirtanen 2012: 133 - 135.)

Orgaaninen aines inhiboi aina desinfiointiaineiden vaikutusta. Vaikutustapoja on kaksi. Desinfiointiaine voi reagoida materiaalin kanssa muodostaen tehottomampaa tai kokonaan tehotonta ainetta. Orgaaninen materiaali voi myös toimia fysikaalisena suojana soluille. Reagoidessaan epäorgaanisten aineiden kanssa voi muodostua kiteitä ja desinfiointiaine voi menettää tehoa reagoidessaan näiden kanssa. Joidenkin desinfiointiaineiden vaikutus tehostuu korkeammassa pH:ssa, toisten taas laskee. pH:n vaikutus perustuu desinfiointiaineen molekyyli- tai ionimuodon tai solun pinnan muuttumiseen. Kosteus vaikuttaa lähinnä kaasujen tehoon. Kovassa vedessä on enemmän magnesium- ja kalsium-kationeja. Niiden vaikutuksesta osa desinfiointiaineista voi kiteytyä ja näin menettää tehonsa. (Rutala & Weber 2008: 34; Wirtanen 2012: 133 - 135.)

Desinfiointiaineesta riippuvia tekijöitä ovat sen pitoisuus, vaikutusaika ja lämpötila. Desinfiointiaineen pitoisuuden nosto tehostaa sen vaikutusta ja vähentää myös tarvittavaa vaikutusaikaa. Jokaisella aineella on kuitenkin sille tyypillinen käyttäytyminen pitoisuuden nostoon. Osalla tehon nousu on lineaarinen, osalla logaritminen. Esimerkiksi fenolin pitoisuuden puolittaminen vaatii 64-kertaisen vaikutusajan, kun taas kvaternääristen ammoniumyhdisteiden kohdalla pitoisuuden puolittaminen vain kaksinkertaistaa vaikutusajan. Vaikutusaikakin on täysin riippuvainen desinfiointiaineesta. Se vaihtelee sekuntien ja tuntien välillä, mutta pidempi vaikutusaika on aina tehokkaampi kuin lyhyt. Lämmitettynä osa desinfiointiaineista toimii tehostetusti. Yleensä lämmittäminen on kuitenkin hankala toteuttaa ja se lisää työtä sekä vapautuvien kaasujen määrää. (Rutala & Weber 2008: 33 - 34.)

4.3 Muut mikrobien tuhoamiseen sopivat menetelmät

Muita mikrobien tuhoamiseen sopivia menetelmiä on muuan muassa ultraäänipuhdistustekniikka ja mikroaaltojen käyttö. Ultraäänipuhdistustekniikka on ollut pitkään käytössä sovelluksissa, joissa vaaditaan korkeaa puhtausastetta. Ultraäänipuhdistuksella saadaan irrotettua myös mekaaninen lika mikrobien tuhoamisen lisäksi. Yleisin sovelusalue on meijeriteollisuus. Ultraäänit ovat ääniaaltoja, joita ihminen ei pysty kuulemaan eli niiden taajuus on yli 20 kHz. Käytetyt taajuudet puhdistuksessa ovat välillä 20 - 100 kHz. Ultraääni saadaan aikaiseksi nopeasti muuttuvan sähkökentän, mekaanisten lähettimien, sähköpurkauksien, lämpölähettimien tai magneettikentän muutoksien avulla. Muodostuvat ultraääniaallot saavat aikaan nesteessä tiivistysaalloja tai leikkaavia aaltoja riippuen materiaalin ja aallon kohtauskulmasta. (Wirtanen 2002: 113 – 114, 119 - 125.)

Ultraäänipuhdistustekniikassa käsittelyajaksi riittää 2 - 10 min ja lämpötilaksi alle 70 astetta. Käsittelyaika on siis lyhyt verrattuna muihin menetelmiin. Ultraäänitekniikalla saadaan aikaiseksi tasainen puhdistustulos, koska se läpäisee monet materiaalit ja on tehokas. Tehoa voidaan edelleen parantaa kohottamalla käsittelylämpötilaa ja -painetta. Mikrobien tuhoamisessa suurin vaikutus on paineella. Paineen nosto edistää mikrobien tuhoutumista 600 kPa:n asti. Myös ultraäänien amplitudin eli värähdyslaajuuden nosto parantaa mikrobien tuhoutumista. Käsittelylämpötilan on hyvä olla yli 50 astetta. Nestepatsaan syvyydellä on myös vaikutus mikrobien tuhoutumiseen. Matalassa

vesipatsaassa ääniaallot karkaavat ympäristöön, joten mitä korkeampi vesipatsas sen parempi tulos. Korkea vesipatsas absorboi ääniaaltojen kuljettaman energian tehokkaasti. Erikoislaitteistojen takia ultraäänipuhdistustekniikka on kallis pienten mikrobimäärien inaktivointiin. (Wirtanen 2002: 119 - 121.)

Ultraäänikäsittely vaurioittaa mikrobisoluja monella tavalla. Nesteeseen muodostuvat yli- ja alipaineaallot vaurioittavat mikrobien soluseiniä. Paineaallot ja ilmakuplien luhistuminen nesteessä hajottaa myös mikrobirykelmät. Nämä altistavat mikrobit paremmin ultraäänien ja lämpötilan yhteisvaikutukselle. Ultraäänit aiheuttavat mikrobien DNA:n kaksoissidosten katkeamisia ja DNA pilkkoutuu pienempiin pätkiin. Hajoamisen seurauksena soluun syntyy fosforylaatteja ja alkoholeja, joista alkoholit toimivat solun sisäisinä desinfiointiaineina. Ultraäänikäsittelyn seurauksen soluun syntyy myös vapaita radikaaleja, jotka edelleen vaurioittavat DNA:ta, alentavat solun entsyymaattista aktiivisuutta, tuhoavat liposomeja ja membraaneja sekä denaturoivat proteiineja. Mikrobilaji, solun koko sekä ympäröivä neste vaikuttavat solujen tuhoutumiseen. Suuret solut ovat herkempiä tuhoutumiselle kuin pienet. Itiöt kestävät paremmin ultraäänikäsittelyä kuin vegetatiiviset solut. (Wirtanen 2002: 123 - 125.)

Mikrobeja voidaan inaktivoida myös mikroaalloilla. Mikroaallot ovat sähkömagneettista värähtelyä taajuudella 2450 MHz. Nykyään mikroaaltoja käytetään lähinnä elintarviketeollisuudessa pidentämään elintarvikkeiden säilyvyysaikaa. Mikroaalloilla voidaan myös kuivata ja kypsentää elintarvikkeita samanaikaisesti mikrobien inaktivoimisen kanssa. Mikroaaltojen tiedetään tuhoavan ainakin homeita, homeitiöitä, bakteeri-itiöitä sekä monia gram-positiivisia ja -negatiivisia bakteereja kuten *E. coli* ja *Salmonellaa* ja *Listeriaa*. Gram-negatiiviset bakteerit ovat herkempiä mikroaalloille kuin gram-positiiviset. Mikroaaltojen tappotehoa kaikkiin mikrobeihin ei ole vielä tutkittu. Mikroaaltojen tiedetään kuumentavan soluja ja tätä kautta tappavan niitä. Lämmön takia proteiineja denaturoituu ja kerääntyy solun sisälle. On myös osoitettu, että nukleiinihappoja ja proteiineja vuotaa käsittelyn aikana solun ulkopuolelle. (Woo et al. 2000: 1 - 3.)

5 Mikrobeilla työskentely ja niiden lukumäärän määrittäminen

5.1 Suojakaapit

Mikrobiologisesta suojakaapista on olemassa standardi SFS-EN 12469, joka määrittelee suojakaapin käsitteen ja vaatimukset. Vaatimukset koskevat turvallisuutta ja hygieniää ja asettavat minimivaatimukset suojakaapeille. Standardien mukaan mikrobiologinen suojakaappi on tuuletettu tila, joka suojaa käyttäjää ja ympäristöä haitallisten aineiden tai mikrobien käsittelystä syntyviltä yhdisteiltä ja josta poistuva ilma on suodatettu. Suojakaapit jaetaan kolmeen luokkaan I-III niiden turvatason mukaan. Luokan I biologinen suojakaappi on tavallisemmin tunnettu vetokaappina. Standardi määrittelee luokan I suojakaapin seuraavasti:

Suojakaappi, jonka työskentelyaukosta voidaan käsitellä näytteitä kaapin sisällä ja joka on valmistettu niin, että työntekijä on suojattu haitallisilta ilmassa liikkuvilta partikkeleilta. Suojaus tapahtuu työaukosta sisäänpäin kulkevalle ilmavirralla ja poistoilman suodatukselle (Kivisalmi et al. 2013).

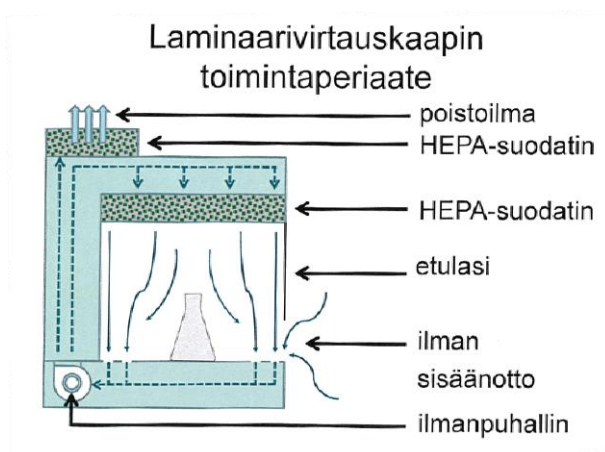
Luokan I suojakaappi siis suojaa ihmistä, mutta ei käsiteltäviä mikrobeja. Luokan I suojakaappi ei siis sovellu aseptiseen työskentelyyn, koska se ei suojaa näytteitä ilman epäpuhtauksilta, mutta se soveltuu hyvin haitallisten aineiden käsittelyyn. Vetokaapit on aina liitetty omiin poistoilmakanaviinsa. Kaapin sisälle muodostetaan imevällä puhaltimella alipaine, jolloin ilma virtaa työskentelyaukon kautta kaapin sisälle. Käytännön syistä vetokaapit on varustettu usein vesi-, sähkö- ja ilmaliitännöillä, jotka mahdollistavat kaapin monipuolisemman käytön. (Kivisalmi et al. 2013.)

Luokan II suojakaappi on vertikaalinen laminaari-ilmavirtauskaappi eli lyhyesti laminaarikaappi. Sen standardin asettama määritelmä on:

Suojakaappi, jonka työskentelyaukosta voidaan käsitellä näytteitä kaapin sisällä ja joka on valmistettu niin, että työntekijä on suojattu, tuote- ja ristikontaminaation riski on pieni ja kaapissa syntyneiden ilman mukana liikkuvien haitallisten partikkelien ulospääsy on kontrolloitu suodattamalla kierto- ja poistoilma (Kivisalmi et al. 2013).

Laminaarikaapin tarkoitus on pitää työskentelytila steriilinä ja samalla suojata työntekijää. Tämän tyyppinen kaappi on yleisin mikrobiologisessa työskentelyssä. Laminaarikaappi toimii kiertoilmalla, jonka nopeus on 0,25 - 0,5 m/s. Ilma virtaa tasaisesti pysty-

suunnassa ylhäältä alaspäin. Näytteen suojaamiseksi tarvitaan nopeampi virtaus ja ihmisen suojaamiseen riittää hieman hitaampi nopeus. Yleensä kaapit on kuitenkin säädetty vakionopeudelle. Laminaarikaapin suojaava vaikutus saadaan aikaiseksi suodattamalla neljännes ilmasta pois kaapista HEPA-suodattimella. Korvausilma otetaan työskentelyaukon kautta. Korvausilma kulkeutuu työtason etureunan reikien kautta pohja-altaaseen ja ilmakiertoon. Kierrossa ilma suodatetaan kahdesti. Ilmakierron ansiosta työaukkoon muodostuu suojaava ilmaverho. Toimintaperiaate on havainnollistettu kuvassa 6.



Kuva 6. Laminaarivirtauskaapin toimintaperiaate. (Kivisalmi et al. 2013)

Laminaarikaapin ilmavirtaus on herkkä häiriöille. Kun työskennellään laminaarikaapissa, tulee työskennellä rauhallisesti ja välttää turhia liikkeitä. (Kivisalmi et al. 2013; Sojakka & Välimäki 2011: 64 - 66.)

Luokan III suojakaappia kutsutaan myös vertikaaliseksi laminaari-ilmavirtauskaapiksi. Standardi määrittelee sen seuraavasti:

Työtilaltaan täysin suljettu suojakaappi, jossa työntekijä ja työtila ovat fyysisesti täysin toisistaan eristettyjä. Suojakaapissa on kiinteästi asennetut suojakäsineet, kaappiin pääsee vain suodatettua ilmaa ja poistoilma on suodatettu (Kivisalmi et al. 2013).

Luokan III suojakaapissa voidaan työskennellä patogeenisillä sekä kontaminaatioille herkällä mikrobeilla. Luokan III suojakaappien etuseiniin on hitsattu kiinni hanskat, joiden avulla voidaan mikrobeilla työskennellä ilman suoraa kontaktia. Rakenteeltaan luokan III suojakaappi muistuttaa anaerobisten mikrobien käsittelyyn tarkoitettuja suo-

jakaappeja, joissa ilma on korvattu muilla kaasuilla. Tavarat viedään luokan III ja anaerobisiin suojakaappeihin ilmasulun kautta. (Kivisalmi et al. 2013.)

5.2 Työskentelytekniikoita

5.2.1 Mikrobien lukumäärän määrittäminen

Mikrobien lukumäärän määrittämiseen on olemassa monta erilaista tekniikkaa. Tekniikoita ovat muun muassa viable cell count eli elävien solujen määrän määrittäminen maljalta, solujen laskeminen Bürker-kammiolla, sameuden mittaaminen, solumassan muutoksen määrittäminen, biokemiallisen ominaisuuden mittaaminen sekä jonkin aineenvaihduntatuotteen syntyminen seuraaminen. Yleisin tekniikoista on pesäkkeiden laskeminen maljalta. Harvinaisempia määrittämenetelmiä ovat sähkömagneettisen säteilyn käyttäminen muutoksien havainnoimiseksi, kun se läpäisee soluja ja infrapunasäteilyn absorptio mittaaminen. Solumassan muutoksen määrittäminen on helpointa vain punnitsemalla. Määrittämenetelmän valinta riippuu käyttökohteesta. Jos halutaan reaaliaikaista tietoa solumäärästä, käsin laskeminen on usein liian työlästä. (Fortelius & Ojamo 2010; Sojakka & Välimäki 2011: 137, 150 - 156.)

Elävien solujen määrittäminen maljalta eli pesäkelaskenta on yksinkertainen tekniikka. Siinä tehdään laimennossarja, josta jokaisesta laimennoksesta siirrostetaan haluttu tilavuus kolmelle rinnakkaismaljalle. Maljojen säästämiseksi voidaan painottaa todennäköisiä laimennoksia ja jättää pienimmät laimennokset pois. Maljoja kasvatetaan mikrobien vaatimalla tavalla mikrobille sopivassa lämpötilassa tarpeeksi monta päivää. Kasvatuksen jälkeen pesäkkeet lasketaan maljoilta ja lasketaan keskiarvo jokaiselle laimennokselle rinnakkaisilta näytemaljoilta. Yleensä lasketaan maljat, joilla on 10 - 200 pesäkettä. Laimennoksien avulla lasketaan painotettu keskiarvo tilavuuden suhteen. Tulokseksi saadaan pesäkettä per tilavuus, joka on yleensä ml, eli pmy/ml tai cfu/ml. Tulos voidaan ilmoittaa myös massan suhteen. (Fortelius & Ojamo 2010; Sojakka & Välimäki 2011: 151.)

Pesäkelaskutekniikka on herkkä menetelmä. Jos näytteessä on yksikin solu, se näkyy maljalla selvänä pesäkkeenä. Se ei myöskään tuhoa näytettä eli pesäkkeitä voidaan jatkossa hyödyntää edelleen. Rajoituksena on, että tutkittavan mikrobien tulee muodos-

taa selviä pesäkkeitä kasvaessaan maljalla. (Fortelius & Ojamo 2010; Sojakka & Välimäki 2011: 151.)

Liemiviljelmästä voidaan solumäärä määrittää solulaskentakammiossa eli Bürker-kammiossa mikroskoopin avulla. Näyte tulee aina laimentaa ennen laskemista, jotta saadaan selvästi erottuvia soluja. Laimennossuhde voi vaihdella 10^{-1} ja 10^{-7} välillä. Bürker-kammio on paksu lasilevy, jossa on kaksi koholla olevaa tasannetta. Levyn päälle asetetaan siihen kuuluva peitinlasi, jolloin muodostuu kammio levyjen väliin. Näyte pipetoidaan lasilevyjen väliin kuten kuvassa 7. mukaan. Kammiossa on mikroskooppisen pieniä ruutuja, jotka näkyvät myös kuvassa 7. Ruutujen koko on 0,2 mm x 0,2 mm x 0,1 mm. Yksittäisen ruudun tilavuus on tällöin 0,004 mm³. Solujen määrä lasketaan useasta ruudusta, jonka jälkeen lasketaan tuloksien keskiarvo. Tilavuuden avulla saadaan laskettua solujen tiheys.



Kuva 7. Bürker-kammio ja mikroskooppinäkymä ruuduista. A=laskentaruutu. (Sojakka & Välimäki 2011: 152)

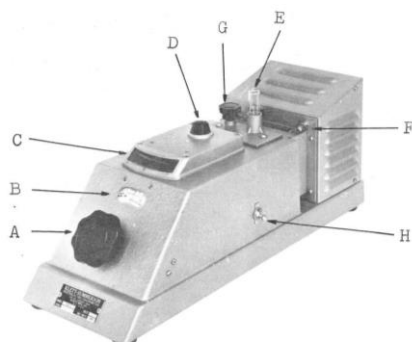
Laskukammio menetelmä rajoittuu yksisoluisiin mikrobeihin, joten se ei sovellu muun muassa homeiden laskentaan. Homeitiöt ovat sen sijaan laskettavia. Se ei käy myöskään pienille eikä aktiivisesti liikkuville soluille. Solulaskennan ohessa voidaan arvioida solujen elävyyttä. Laskentaa helpottaa solujen värjäys. (Fortelius & Ojamo 2010; Sojakka & Välimäki 2011: 151 - 154.)

Liemiviljelmissä voidaan havaita kirkkaan alustan samentumista kasvun edetessä. Paljaalla silmällä muutos näkyy, kun solutiheys on noin 10^7 cfu/ml. Silmämääräinen arvio on kvalitatiivinen havainto. Kvantitatiivisia tuloksia saadaan mittaamalla sameus siihen tarkoitetuilla laitteilla. Näitä laitteita ovat turbidometrit ja spektrofotometrit. Näiden toiminta perustuu valon läpäisyn, absorboitumisen, sironnan ja heijastumisen muutoksen mittaamiseen. Transmittanssi kuvaa näytteen läpäisseen valon määrää ja absorbanssi näytteeseen imeytyneen valon määrää. Kun absorbanssi kasvaa, transmittanssi piene-

nee logaritmisesti. Valon sirontaa mitataan turbidometreillä. Sironta ja solutiheys eivät ole turbidometrillä mitattaessa lineaarisia, joten ennen määrittystä tulee tehdä standardikuvaaja. Mikrobinäytteen absorbanssi tai transmittanssi mitataan spektrofotometrillä yleensä aallonpituudella 600 - 660 nm. Tulokseksi saadaan paljas luku esimerkiksi $A_{600} = 1$. Solutiheys saadaan tästä selville vertaamalla sitä tunnetun näytteen absorbanssiin. Tuloksen perusteella ei voida arvioida solujen elävyydestä. (Fortelius & Ojamo 2010; Sojakka & Välimäki 2011: 154 - 156.)

Spektrofotometrin kaltainen laite on myös Klett-mittari. Klett-mittarilla voidaan mitata väriä, eri aineiden konsentraatioita ja sameutta. Mitattavan liuoksen tulee olla homogeenista. Mikrobiologiassa sitä on tavallisimmin sovellettu mikrobien kasvun seuraamiseen. Klett-mittari eroaa spektrofotometrissä tekniikaltaan. Mittarin etuna mikrobiologiassa työskentelyssä on, että sillä on mahdollista mitata kasvatuksen sameutta aseptisesti ilman erillistä näytteenottoa. Klett-mittareihin tarkoitetuissa Klett-pulloissa on mahdollista kasvattaa mikrobeja normaaliin tapaan ja ottaa välimittauksia ilman erillistä näytteenottoa. Näin vältetään turhia kontaminaatioita. Klett-mittari käyttää yksikkönä vain sille ominaisia klett-arvoja, jotka vaihtelevat nollan ja tuhannen välillä. Arvo nolla tarkoittaa täysin kirkasta, väritöntä liuosta ja tuhat liuosta, joka ei läpäise valoa. On kuitenkin suositeltavaa, että saadut arvo ovat nollan ja 300 välillä. Arvot yli 300 ovat lineaarisen alueen ulkopuolella. (Klett Manufacturing Co., Inc 1973: 2 - 10.)

Kuvassa 8. on esitelty Klett-mittarin eri osat. laitteen sisällä on valoherkkiä soluja, joiden asento muuttuu liuoksen sameuden tai värin mukaan, kun osa valosta läpäisee suodattimen ja näytteen. Solujen asento ohjaa osoitinta. Kääntämällä säätönupista A osoitin palautuu nollalinjaan. Lukema luetaan näyttöikkunasta B.



Kuva 8. Klett-mittari. A=säätönuppi, B=lukema, C=osoitin, E=näyte. D ja G liittyvät laitteen nollaukseen sekä E ja H laitteen käynnistämiseen. (Klett-Summerson Photoelectric Colorimeter Clinical Manual 1973: 3)

Näytteen takana sijaitsee lasinen suodatin (F). Se on valittava käyttökohteen mukaan, sillä jokaisella suodattimella on oma spektrialue. Mikrobikasvatusten sameutta mitattaessa tulee käyttää punaista suodatinta, jonka spektrialue on 580–640 nm. (Klett-Summerson photoelectric Colorimeter 1973: 2 - 10.)

5.2.2 Desinfektioaineen tehon tutkiminen suspensiossa ja maljalla

Desinfiointiaineiden tehon tutkimiseen on olemassa erilaisia malja- ja liuosmenetelmiä. Alla on kuvattu muutamia esimerkkejä kummastakin tavasta.

VTT käyttää desinfiointiaineen tehon tutkimiseen VTT:llä kehitettyä kehittämäänsä 555-suspensiotestiä. Siinä käytetään viittä mikrobikantaa, joiden nesteviljelmiin lisätään valmistajan pienin ilmoittama ohjeellinen pitoisuus desinfiointiainetta. Aineen annetaan vaikuttaa viisi minuuttia, jonka jälkeen nesteviljelmiin lisätään inaktivointiliuosta. Tämän jälkeen viljelmää siirrostetaan kiinteille kasvatusalustoille. Mikrobisidinen teho saadaan määritetyksi vertaamalla inkuboituja maljoja kontrolliviljelmiin. Desinfiointiaine on tehokas, jos mikrobipopulaatio on pienentynyt viidellä logaritmiyksiköllä käsittelyn jälkeen. (Wirtanen 2002: 135 - 136.)

Eurooppalainen suspensiotesti on menetelmä desinfiointiaineen testaamiseksi liemiviljelmässä. Testin protokolla on kuvattu eurooppalaisissa standardeissa EN 1276 ja EN 1650. Standardeissa on esitelty sekä menetelmä aineen tehon testaamiseksi että vähimmäisvaatimukset aineiden teholle. Standardissa käytetään viittä bakteeria ja kahta sientä testiorganismeina. Desinfiointiaineen annetaan vaikuttaa 20 asteessa bakteereihin viisi minuuttia ja sieniin 15 minuuttia. Desinfiointiainetta voidaan testata joko puhtaissa tai likaisissa olosuhteissa. Puhtaissa olosuhteissa suspensioon on lisätty 0,03 % naudan albumiinia ja likaisissa 0,3 %. Inkuboinnin jälkeen suspensio joko laimennetaan, inaktivoidaan tai suodatetaan ja määritetään elävien mikrobien määrä. Standardi sisältää ohjeet testiolosuhteiden, inaktivoinnin ja suodatuksen validointiin. (Wirtanen 2002: 136 - 137.)

Desinfiointiaineiden tehoa voidaan tutkia myös kasvatusmaljalla. Kiekkotestiä käytetään yleisesti antibioottien ja muiden antimikrobisten aineiden tehon tutkimiseen. Antibiooteilla tutkittaessa puhutaan lääkaineen herkkyydestä. Kiekkotestissä sulaan agariin, joka kaadetaan petrimaljalle, sekoitetaan silmukallinen haluttua kasvustoa.

Suodatinpaperikiekko kastetaan tutkittavaan aineeseen ja asetetaan jähmettyneen agarin pinnalle. Inkuboinnin jälkeen kiekon ympärillä nähdään estorengas, jossa ei ole kasvustoa, mikäli aine on mikrobisidinen kyseiselle organismille. Kiekkomenetelmällä on myös mahdollista tutkia eri aineiden vaikutusta desinfiointiaineen tehoon. (Salkinoja-Salonen 2002: 53.)

KOKEELLINEN OSA

6 Materiaalit ja menetelmät

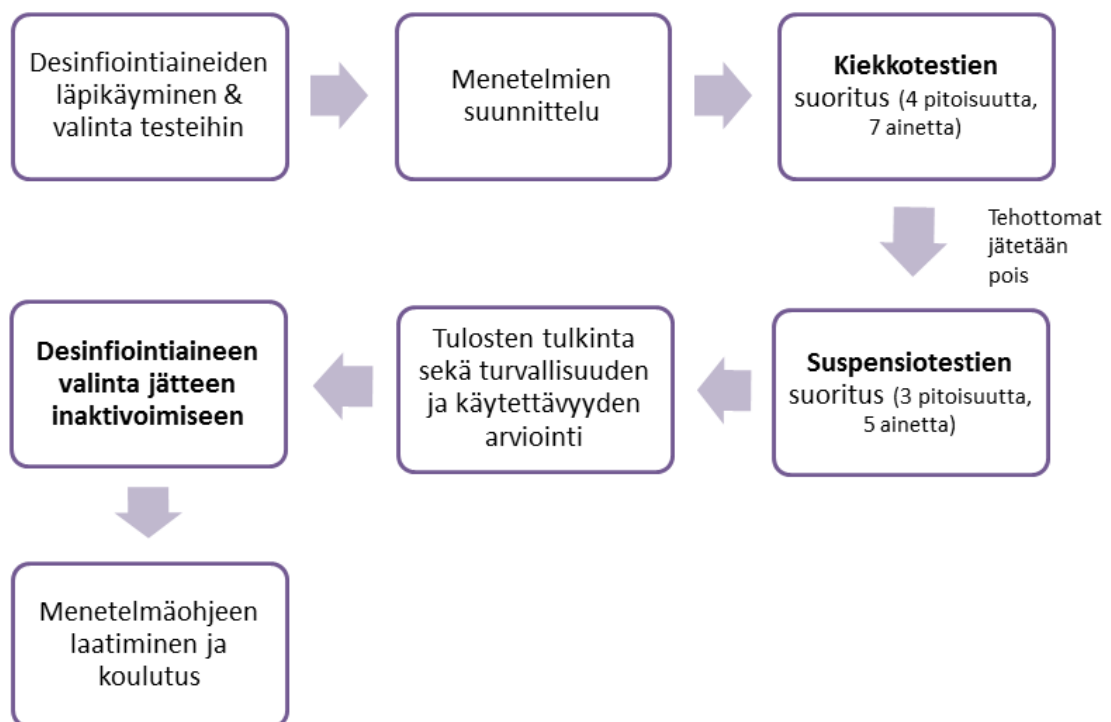
6.1 Desinfiointiaineiden valintaprosessi

Osa Roal Oy:n T&K:n mikrobijätteestä inaktivoidaan tällä hetkellä höyrysteriloimalla. Suurten määrien autoklavointi on kuitenkin kallista ja työlästä, sillä se vie useita autoklavointikertoja viikossa. Kuumien nesteastioiden käsittely on myös vaarallista palovamman riskin takia. Höyrysterilointi ei siis ole järkevä vaihtoehto, kun valitaan sopivaa menetelmää mikrobijätteen inaktivointiin.

Kuviossa 1 on desinfiointiaineen valintaprosessi kaaviokuvana. Työ aloitettiin selvittämällä erilaisten desinfiointiaineiden ominaisuudet ja mahdollinen soveltuvuus Roal Oy:n T&K:n mikrobijätteen käsittelyyn. Liitteessä 1 on joukko ei-kaupallisia desinfiointiaineita ryhmittäin vaikuttavan aineen mukaan (Salkinoja-Salonen 2002: 33 - 47; Sojakka & Välimäki 2011: 50 - 55). Näiden aineiden ominaisuuksien perusteella aine joko valittiin testeihin tai se hylättiin eikä sillä jatkettu käytännön töihin. Desinfiointiaineet ovat aina vähintäänkin haitallisia tai ärsyttäviä. Laboratoriotestauksiin ei otettu mukaan aineita, jotka ovat välittömästi myrkyllisiä tai syöpää aiheuttavia, vaan valittiin vähemmän vaarallisia vaihtoehtoja. Valituksi tuleva desinfiointiaine ei myöskään saa olla ongelmajätettä, sillä sen hävittäminen on hankalaa ja kallista.

Työssä testattiin viiden valitun desinfiointiaineen ja kahden muun aineen tehoa. Valituiksi tulivat peretikkahappo, vetyperoksidi, glutaraldehydi, etanoli, Virkon S ja Deconex 20 NS. Näiden lisäksi testattiin natriumbentsoaatin teho. Natriumbentsoaattia käytetään lähinnä säilöntäaineena muun muassa elintarvikkeissa. Peretikkahappo, Virkon S ja

glutaraldehydi valikoituivat testattaviksi ulkopuolisten suositusten perusteella. Etanoli on Roal Oy:n laboratorioissa käytössä pintojen puhdistamisessa. Deconex 20 NS:ää käytetään T&K:n laboratorioissa muovisten siirrostusvälineiden mikrobien inaktivointiin ennen välineiden autoklavointia. Sen tehoa mikrobien inaktivoimiseen ei ole kuitenkaan aikaisemmin tutkittu Roal Oy:ssä eikä sen desinfiointivaikutuksesta löydy kirjallisuudesta tietoa. Vetyperoksidia valittiin mukaan kirjallisuuden ja artikkeleissa esitettyjen lupaavien tulosten perusteella. Sillä on hyvä teho ja vain vähän haittavaikutuksia verrattuna moneen muuhun desinfiointiaineeseen (Salkinoja-Salonen 2002). Natriumbentsoaatilla on aikaisemmin inaktivoitu *T. reesei*-kasvustoja, mutta vertaileva tutkimus muiden kemikaalien tuloksiin puuttuu.



Kuvio 1. Soveltuvan desinfiointiaineen valinta prosessina. Työ aloitettiin käymällä läpi olemassa olevia desinfiointiaineita ja menetelmien suunnittelulla.

Ennen käytännöntyön aloittamista tehtiin riskiarvioinnit kemikaalien käytön riskeistä. Vetyperoksidin, glutaraldehydin ja Virkon S:n riskiarvioinnit ovat liitteessä 2. Muiden valittujen aineiden riskinarvioinnit on tehty aikaisemmin Roal Oy:ssä, koska niitä on aiemmin käytetty muihin tarkoituksiin. Niiden riskiarviointeja ei liitetty tähän työhön.

Menetelmiksi valikoituivat kiekko- ja suspensiotestit, jotka suunniteltiin kirjallisuutta hyväksi käyttäen sopiviksi. Testien tuloksien ja aineiden turvallisuuden sekä käytettävyy-

den perusteella valittiin soveltuva desinfiointiaine. Valinnan jälkeen laadittiin menettämöhje.

6.2 Työssä testattavat desinfiointiaineet

Valittujen aineiden testatut pitoisuudet ovat taulukossa 2.

Taulukko 2. Desinfiointiaineiden testatut pitoisuudet kokeellisessa osuudessa.

desinfiointiaine	testattavat pitoisuudet [%]			
peretikkahappo	0,05	0,1	0,2	0,3
Diversey Oxivir (vetyperoksidi)	3	10	20	30
Erihyd Forte (glutaraldehydi)	0,5	1	2	2,5
Virkon S	0,5	1	2	
etanoli	70			
Deconex 20 NS	2,5	5	7,5	10
natriumbentsoaatti	0,1	0,25	0,5	1

Pitoisuudet valittiin kirjallisuuden, valmistajien ja nykyisten käytäntöjen perusteella. Peretikkahappo on Sigma-Aldrichin valmistama liuos (Peracetic acid solution, tuotenumero 77240). Valmiste koostuu:

- peretikkahaposta (40 %)
- etikkahaposta (50 %)
- vetyperoksidista (20 %).

Valmiste on helposti syttyvää, syövyttävää, haitallista hengitettynä, iholla ja nieltynä sekä myrkyllistä vesieliöille. Näiden syiden takia sitä tulee käsitellä aina vähintään luokan I suojakaapissa. Valmiste on testattavista aineista haitallisinta. Kirjallisuuden perusteella tiedetään 0,3 % liuoksen tappavan bakteerit, homeet ja itiöt. Laimeat liuokset ovat epästabieleja, joten aineesta on tehtävä aina ennen käyttöä uusi laimennos. (Sagripanti *et al.* 2011: 7289 - 7294; Salkinoja-Salonen 2002: 37; Peracetic acid solution 2012; Influenssaviruksiin tehoavia desinfektointiaineita ja niiden ominaisuuksia 2010.)

Vetyperoksidivalmiste on Johnson Diverseyn Oxivir (tuotenumero 7513451). Aine sisältää:

- vetyperoksidia (6,9 %)
- alkyylibentseenisulfonihappoa (4,9 %)
- fosfonihappoa (4,2 %)
- fosforihappoa (2,5 %)
- alkyylialkoholietoksylaattia (1,5 %).

Valmiste on terveydelle haitallista nieltynä, se on ihoa ärsyttävää ja se voi aiheuttaa vakavan silmävaurion. Oxivir on kuitenkin valituista aineista yksi turvallisimmista käyttää. Sitä käsitellään kuitenkin vähintään luokan I suojakaapissa tai kohdepoiston alla. Valmistaja ohjeistaa käyttämään 3 % liuosta likaisten välineiden sterilointiin eli oletettavasti tällä pitoisuudelle tulisi jo olla vaikutusta testiorganismien kasvuun. Muut pitoisuudet valittiin Sagriparti et al. (2011) artikkelin perusteella. (Diversey Oxivir E2m 2012)

Glutaraldehydi-valmiste on Kiilto Cleanin valmistama Erihyd Forte (tuotenumero 8129). Erihyd Fortessa on glutaraldehydiä 2,5 %. Tämä pitoisuus sopii valmistajan mukaan useisiin tarkoituksiin. Liuos on terveydelle haitallista hengitettynä ja nieltynä, se voi aiheuttaa herkistymistä ja sen käytössä on vakavan silmävaurion vaara. Sitä tulee käsitellä vähintään luokan I suojakaapissa. Pitoisuus 2,5 % on laimentamatonta valmistetta, jota valmistaja suosittelee käyttämään desinfiointissa. Sagriparti *et al.* (2011) sekä Rutala & Weber (2008) suosittelevat pitoisuutta 2 %. Edellä mainittujen suositeltujen pitoisuuksien lisäksi testattiin kahta matalampaa (taulukko 2), koska työssä pyritään valitsemaan mahdollisimman laimea liuos. Valmiste on muihin testattaviin verrattuna stabiili, koska sitä ei tulla erikseen aktivoimaan. (Erihyd Forte 2013; Sagriparti et al. 2011: 7289 - 7294; 2010)

Virkon S (tuotenumero 320064-0003) eroaa siten muista testatuista desinfiointiaineista, että se on tablettimuodossa. Virkon S:ää valmistaa DuPont Ltd. Sen vaikutus perustuu aktiiviseen happeen. Virkon S:n koostuu:

- kaliumperoksomonosulfaatista (50 %)
- sulfamiinihaposta (5 %)
- omenahaposta (10 %)
- anionisista tensideistä (15)
- natriumheksanofosfaatista (20 %).

Virkon S on testatuista aineista käyttäjäystävällisin. Se kuitenkin ärsyttää ihoa ja voi aiheuttaa vakavan silmävaurion vaaran. Aine on myrkyllistä vesieliöille. Sitäkin tulee käsitellä luokan I suojakaapissa. Valmistaja lupaa yksiprosenttisen liuoksen omaavan laajan mikrobisidisen tehon. On kuitenkin havaittu, että yksiprosenttinen liuos ei tehoa itiöihin eikä homeisiin. Liuoksien tulee olla vasta tehtyjä, koska aine hajoaa nopeasti. (Virkon S 2004; Herndes et al. 2000: 203 - 209.)

Etanoli ja Deconex 20 NS sisällytettiin työhön, koska ne ovat yleisesti käytössä Roal Oy:n T&K:n laboratoriossa. Työssä tehtävien kokeiden avulla saatiin tarkempaa tietoa näiden tappotehosta verrattuna muihin testattuihin kemikaaleihin. Etanolia käytetään pintojen puhdistamiseen sekä vetokaappien ja laminaarivirtauskaappien tasojen puhdistamiseen ja desinfioimiseen. Etanolista käytetään 70 % käyttöliuosta, koska sillä on tutkitusti paras tappoteho verrattuna muihin pitoisuuksiin (Salkinoja-Salonen 2002: 45). Tuote laimennettiin Altia Oy:n 96 %:sta Etax A:sta (tuotenumero 12210143).

Deconex 20 NS:llä puhdistetaan laboratoriovälineet ennen varsinaista pesua tai autoklavointia. Deconex 20 NS on varsinaisesti puhdistusaine, jota valmistaa Borer Chemie. Sen vaikuttava aine on nitriloetikkahappo. Näiden lisäksi se sisältää trinatriumnitri-
lotriasetaattia, trikaliumfosfaattia ja kaliumhydroksidia. Sitä käytetään T&K:n laboratoriossa 5 prosenttisena käyttöliuoksena. Aine on tiivisteinä syövyttävä. (Deconex 20 NS 2006.)

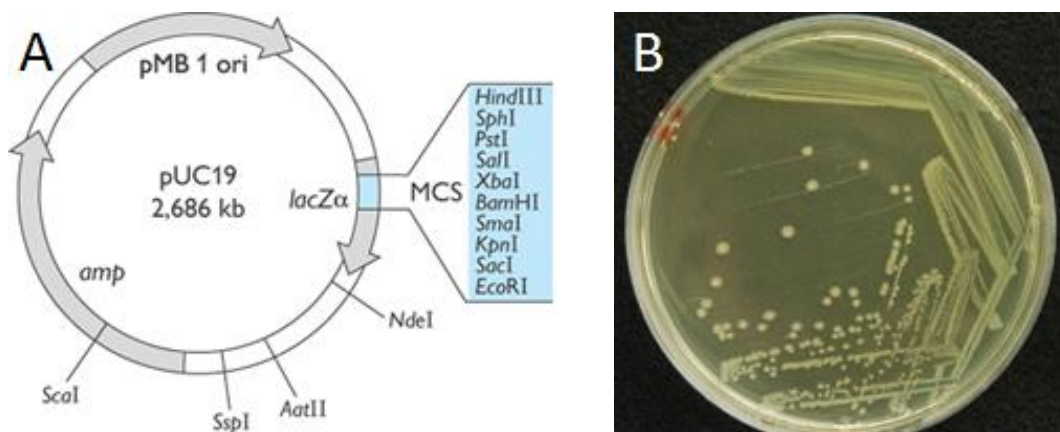
Natriumbentsoaatti on kiteinen suola (tuotenumero 71300 Fluka). Työssä se liuotettiin steriiliin veteen, jotta saatiin halutut pitoisuudet (taulukko 3). Pitoisuudet valittiin Roal Oy:ssa aiemmin saatujen tulosten perusteella. Natriumbentsoaatti on säilöntäaine, jota

lisätään pieniä määriä ruokaan sekä eläinten rehuun. Aineella on vähintään mikrobien kasvua estäviä ominaisuuksia. Natriumbentsoaatti on mahdollista lisätä mikrobien sekaan kiteinä, jolloin jätteen tilavuus ei kasvaisi. Se on myös desinfiointiaineisiin verrattuna turvallinen käyttää vaikkakin sen haittavaikutuksista kiistellään. (Scientific Opinion on the safety and efficacy of sodium benzoate as a silage additive for pigs, poultry, bovines, goats, rabbits and horses 2012)

6.3 Testiorganismit

Desinfiointiaineen tappotehokkuutta testattiin kuudella eri mikrobilla: kolmella *Escherichia coli* -laboratoriokannalla, *Bacillus subtilis* sekä kahdella *Trichoderma reesei* -homeella. Kannat valittiin testiorganismeiksi, koska niitä käytetään päivittäin T&K-osastolla.

*E. coli*stä käytettiin kolmea eri kaupallista laboratoriokantaa: Life Technologiesin One-Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* –soluja, Stratagenen XL10-Gold Ultra-competent Cells –soluja sekä XL1-Blue Competent Cells –soluja. Työtä varten kompetenttisolut transformoitiin pUC19-plasmidilla, joka esitellään kuvassa 9A. Kuvassa 9B on *E. coli* kasvustoa maljalla.



Kuva 9. pUC19-plasmidikartta (A) (Suominen, Ilari; 2010; Geenitekniikka; Turun Ammattikorkeakoulu) ja *E. coli* -kasvustoa Luria Agarilla (B) (<http://lib.jiangnan.edu>).

pUC19-plasmidi sisältää ampicilliiniresistenssigeenin, replikaation aloituskohdan pMB 1 sekä lacZα-geenin sini-valkoseulontaa varten. Plasmidi sisältää myös linkkerialueen,

jossa on lukuisia restriktioentsyymien leikkauskohtia. Transformaation tarkoituksena oli muodostaa *E. coli*, joissa on toimivia plasmideja, sillä tulevaisuudessa tapettavat kannat sisältävät aina plasmideja. Plasmideilla saattaa kirjallisuuden perusteella olla vaikutusta desinfiointiaineiden tehoon esimerkiksi tehostamalla bakteerin kasvua. (Salkinoja-Salonen 2002: 49)

E. coli on fakultatiivi aerobi, joka kasvaa parhaiten + 37 °C:ssa. *E. coli* -kantojen kasvatusaika on 16-18 tuntia. *E. coli* on gram-negatiivinen bakteeri ja muodoltaan sauva. Työssä kolibakteerit kasvatetaan Luria Broth -liuoksessa ja Luria Agar -maljoilla. Alustat ovat yleisiä monien enterobakteerien kasvatuksessa. Useimmat *E. coli* -laboratoriokannat kuuluvat vaaraluokkaan I. (MacWilliams & Liao 2013; Palo; Salkinoja-Salonen 2002: 619)

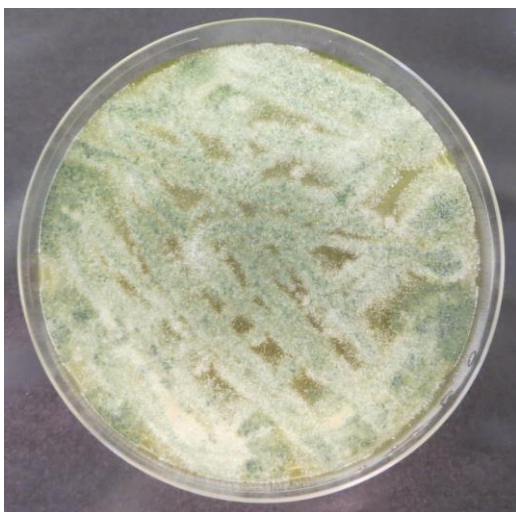
B. subtilis on gram-positiivinen bakteeri, joka on muodoltaan leveä, pitkä sauva. Se kasvaa useiden solujen jonoissa. *B. subtilis* kasvatettiin päivän ajan +37 °C:ssa. Työssä käytetty *B. subtilis* on geneettisesti muokattu kanta. Kasvatusalustana käytettiin Luria Brothia eli LB:tä ja Luria Agar -maljoja eli LA:ta. Kuvassa 10. on päivän kasvanut *B. subtilis* LA-maljalla.



Kuva 10. *B. subtilis* kasvustoa LA-maljalla.

B. subtilis on itiöivä bakteeri. Sen itiöt ovat erittäin kestäviä monille desinfiointiaineille. Ne kestävät hyvin muun muassa liuottimia, fenolia ja formaldehydiä, jotka ovat erittäin tehokkaita muille mikrobeille. *B. subtilis* käytetään laajasti bioteknisesti muun muassa entsyymien tuotannossa. Suurin osa *B. subtilis* -kannoista kuuluu vaaraluokkaan I. (Bozic *et al.* 2010: 965 - 972; Salkinoja-Salonen 2002: 136)

Homeille testiorganismeina käytettiin kahta *T. reesei* –kantaa. Toinen kanta on julkinen Rut-C30 -mutantti ja toinen on Roal Oy:n tuottokanta. *T. reesei* –kannat kasvatettiin Difcon potato dextrose –agarilla eli PD:llä (tuotenumero 213400) neljä päivää +30 °C:ssa. Ravistelukasvatuksissa alustana käytettiin kompleksista minimal media (MM) –alustaa, jossa hiilenlähteenä on laktoosi. Se sisälsi lisäksi orgaanista hiilenlähdeä ja useita suoloja. *T. reesei*in optimikasvatustemperatuurina on +28 - 30 °C, jossa se kasvaa 4-7 päivää. Kuvassa 11. on kuva PD-maljasta, jossa neljä päivää kasvanut Rut-C30 –mutantti.



Kuva 11. *T. reesei* (Rut-C30) kasvustoa PD-maljalla.

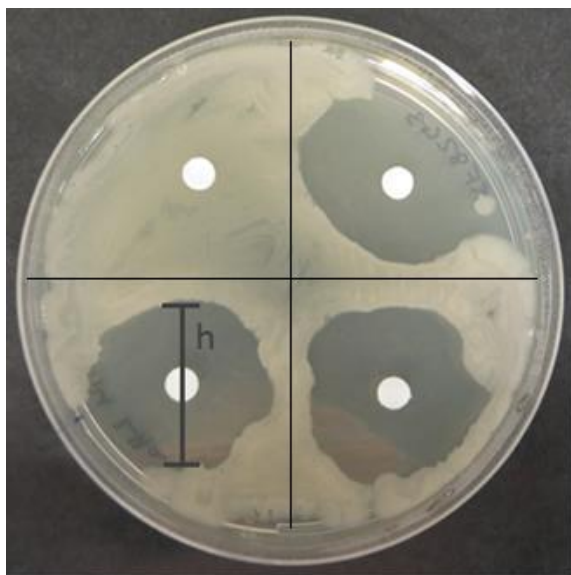
T. reesei on filamenttihome. *Trichoderma* käytetään laajasti teollisten entsyymien ja rekombinantti proteiinien tuotannossa. Ensimmäinen *T. reesei* –kanta, QM6a, eristettiin Salomonin saarilta toisen maailmasodan aikaan. *T. reesei* –kannat ovat hyviä sellulaasien tuottajia. Testeissä käytetyt *T. reesei*t kuuluvat vaaraluokkaan I. (Nakari-Setälä & Penttilä 1995: 3650 - 3651; Peterson & Nevalainen 2012: 58 - 60; Salkinoja-Salonen 2002: 484 - 485)

6.4 Menetelmät

6.4.1 Kiekkotestit

Kiekkotestien tarkoituksena oli seuloa sopivat desinfiointiainepitoisuudet suspensiotesteihin, joiden perusteella sopiva desinfiointiaine valittiin. Sopivat pitoisuudet kiekkotes-

teihin valittiin kirjallisuuden ja valmistajien ohjeiden perusteella. Kiekkotestimaljat jaettiin neljään sektoriin kuvan 12. mukaan.



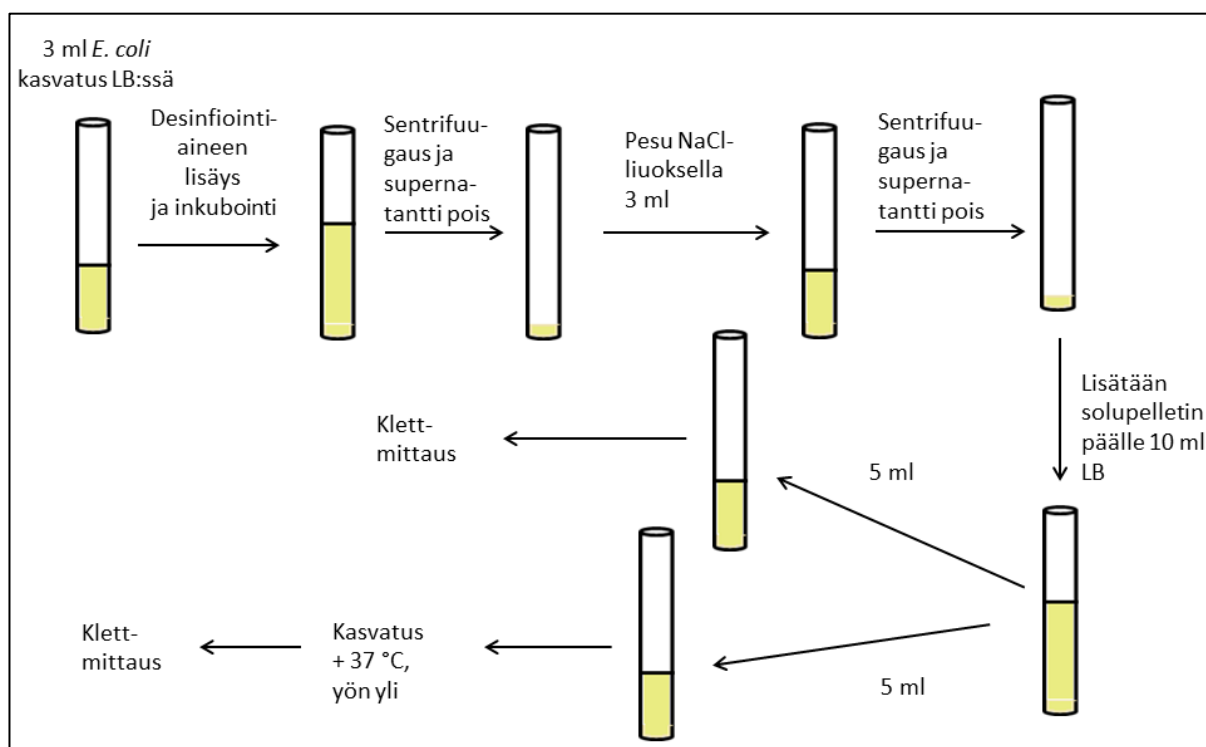
Kuva 12. *B. subtilis* -kiekkotesti o/n kasvatuksen jälkeen. Kiekko oli kastettu 20 % Oxiviriin. Maljalla vasemmalla ylhäällä kiekko on positiivinen kontrolli. Kuvassa h = estorenkään halkaisija.

Jokaisen maljan sektoriin asetettiin suodatinpaperiekko kuten kuvassa 12. Kolmessa näistä on rinnakkaiset yhdestä desinfiointiainepitoisuudesta ja yhdessä kasvun suhteen positiivinen kontrolli, jonka kiekko kastettiin steriiliin veteen. Tällä varmistettiin kasvuston elävyys.

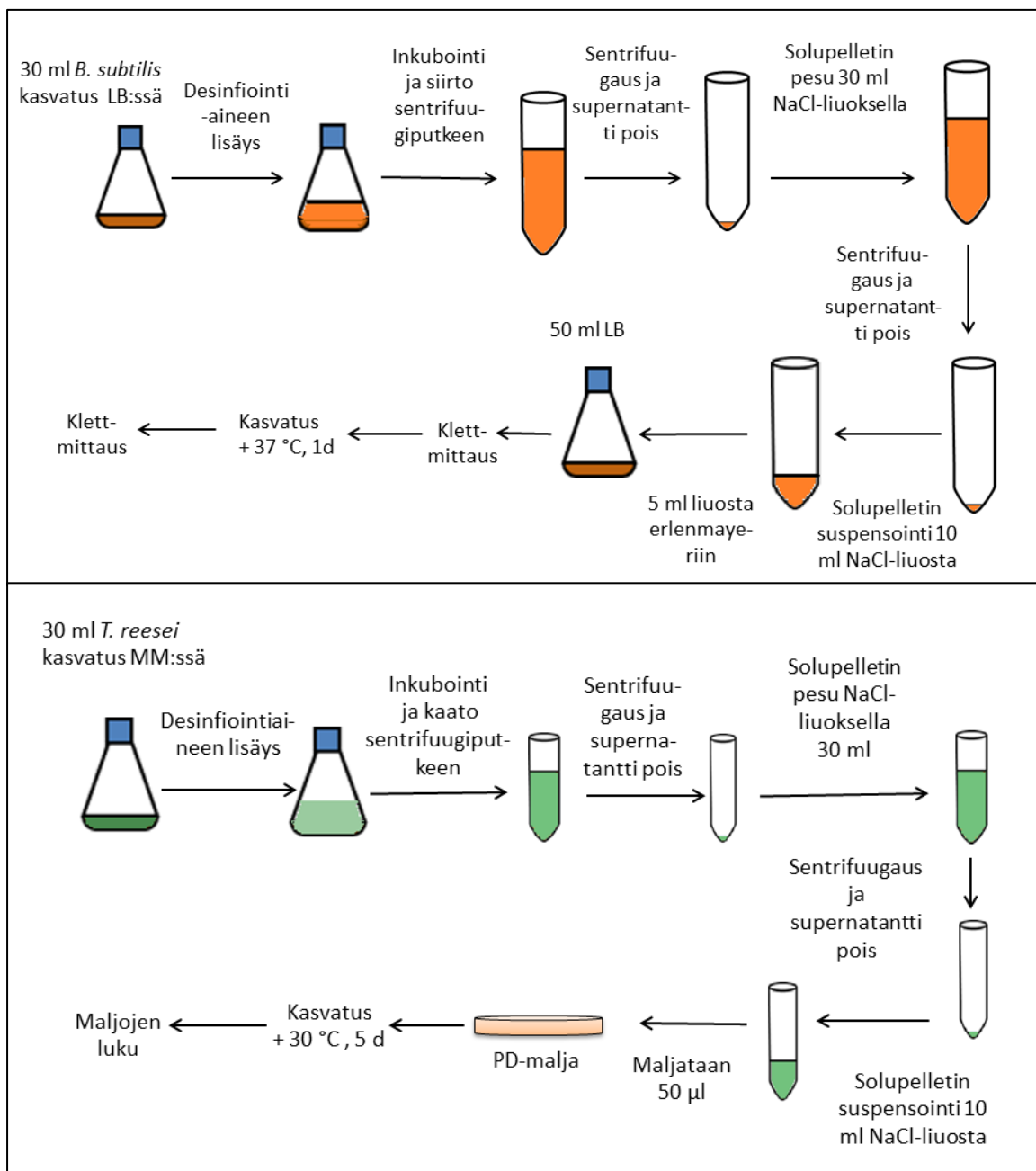
Kiekkotestit tehtiin mukailien Salkinoja-Salosen (2002: 53) kuvailemaa kiekkotestiä. Aluksi silmukallinen mikrobia siirrostettiin maljalle, *E. coli* -kasvusto agarin joukkoon ja muut mikrobit levitettiin jähmettyneen agarin pintaan. Halkaisijaltaan 5 mm suodatinpaperiekko kastettiin 2/3 pinta-alalta desinfiointiaineeseen ja asetettiin jähmettyneen agarin pintaan. Kiekko kasteltiin siten, että siinä ei ole ylimääräistä desinfiointiainetta, joka olisi päässyt leviämään agarin pinnalla. Maljoja kasvatettiin mikrobien vaatima aika optimilämpötilassa. Kasvatuksen jälkeen mitattiin mahdollisesti muodostuneiden estorenkaiden halkaisijat. Kuvassa 12. on muodostunut selvät estorenkäät *B. subtilis* viljelmään.

6.4.2 Suspensiotestit

Suspensiotestissä käytettiin jokaiselle mikrobille kolmea eri desinfiointiainepitoisuutta, jotka valitaan kiekkotestien perusteella ja kolmea vaikutusaikaa. Vaikutusajoiksi valittiin 5, 15 ja 30 minuuttia. Kaikille aineille käytettiin aluksi samoja aikoja, jolloin aineiden tehoa voidaan vertailla. Tuloksien perusteella päätettiin lisäkokeiden tarve. Suspensiotestien protokollat on esitelty kuvissa 13. ja 14.



Kuva 13. *E. coli*en suspensiotesti-menetelmä kaaviona. Testissä valmiiksi kasvatettuun neste-
viljelmään lisätään desinfiointiaine, jonka annettiin vaikuttaa haluttu aika. Desinfiointiaine
pestiin pois fysiologisella suolaliuoksella, jonka jälkeen solupelletti suspensoitiin Luria brot-
hiin. Suspensio jaettiin kahteen putkeen, joista toinen kasvatettiin normaaliin tapaan ja toi-
sesta mitataan klett-arvo. Kasvatuksen jälkeen mitattiin myös klett-arvo.



Kuva 14. *B. subtilis*in ja *T. reesei*in suspensiotesti-menetelmät kaaviona. Aluksi kumpaakin mikrobia kasvatettiin liemessä normaaliin tapaan. Liemeen lisättiin desinfiointiaine, jonka annettiin vaikuttaa haluttu aika. Aine pestiin pois fysiologisella suolaliuoksella. Pesun jälkeen *B. subtilis* –solupelletin päälle lisättiin 10 ml fysiologista suolaliuosta, josta siirrettiin puolet kasvatusalustaan. Kasvatuksen klett-arvo mitattiin ennen ja jälkeen kasvatuksen. *T. reesei* –solupelletin päälle lisättiin pesun jälkeen myös fysiologista suolaliuosta. Tästä liuoksesta maljattiin 50 µl ja annettiin sen kasvaa normaaliin tapaan. Viiden päivän jälkeen kasvu arvioitiin.

Aluksi mikrobia kasvatettiin liemessä. *E. coli* -kannat kasvatettiin 3 ml:n tilavuudessa putkissa ja muut 30 ml:n tilavuudessa erlenmayer-pulloissa sopivissa ravistelualustoissa. *B. subtilis* ja *T. reesei* ovat obligaatteja aerobeja ja putkissa kasvatettaessa ilma-
tus olisi jäänyt liian matalaksi. Kasvatuksen jälkeen suoritettiin desinfiointiainekäsittelyt huoneenlämmössä. Desinfiointiainetta lisättiin kaksi kertaa vahvempana konsentraationa kuin haluttu konsentraatio oli kasvatuksen tilavuuden verran. Esimerkiksi, kun haluttiin Diversey Oxivirin pitoisuudeksi 10 %, lisättiin 3 ml:n kasvatukseen 3 ml:ä 20 %:sta Diversey Oxiviria. Desinfiointiaineen annettiin vaikuttaa välillä sekoittaen rauhallisesti. Vaikutusajan jälkeen suspensio sentrifugoitiin, jolloin saatiin solut pelletiksi putken pohjalle ja desinfiointiaine jäi liuososaan. Tämän jälkeen supernatantti kaadettiin varovasti pois ja solut pestiin kahdesti fysiologisella suolaliuoksella desinfiointiaineen poistamiseksi.

Pestyn *E. coli* -solupelletin päälle lisättiin 10 ml LB:tä ja pelletti sekoitettiin tasaiseksi suspensioksi. Solu-elatusainesuspension sameus mitattiin 5 ml:sta Klett-mittarilla. Saatuaan arvoon verrattiin kasvatuksen lopussa. Loput 5 ml:ä *E. coli* -kasvatusta kasvatettiin optimiolosuhteissa, jonka jälkeen mitattiin uudelleen klett-arvo. Jos klett-arvo oli suurentunut kasvatuksen jälkeen, desinfiointiaine ei ollut inaktivoitunut soluja.

B. subtilis -solupelletin päälle lisättiin 10 ml:ä fysiologista suolaliuosta. Solususpensiota pipetoitiin 5 ml:aa Klett-pulloon, jossa oli 50 ml:aa Lurian brothia. Tästä viljelmän lähtötilanteesta mitattiin klett-arvo. *Bacilluksen* osalta koko solupellettiä ei voitu lisätä kasvatusalustan sekaan, koska suspension sameus olisi ollut liian suuri, lähellä Klett-asteikon toimintarajaa. *B. subtilis* kasvatettiin optimiolosuhteissa, jonka jälkeen mitataan kasvatuksen jälkeinen sameus Klett-mittarilla.

T. reesei pellettien päälle pipetoitiin 10 ml:ä fysiologista suolaliuosta. Kun solut ja muu aines olivat täysin sekoittuneet, pipetoitiin siitä 50 µl PD-maljalle. Homeista ei pystytty mittaamaan klett-arvoa, koska myseeli sekä alustan sisältämä orgaaninen aines häiritsevät mittausta. Maljoilta arvioitiin kasvatuksen jälkeen kasvuston runsautta.

Suspensiotestillä testattiin myös Erihyd Forten, Diversey Oxivirin, Peracetic acid Solutionin ja Virkon S:n teho *Trichoderma*-kantojen itiöihin. Vaikutusaikoina käytettiin kaikille muille kuin Virkon S:lle 15 ja 30 minuuttia, koska oletettavasti itiöille ei riittänyt 5 minuutin inkubaatio. Valmistetun itiösuspension solutiheys määritettiin ennen käsittelyä

Bürker-kammiolla. Saadun lukeman avulla voitiin arvioida tarvittava laimennos ennen maljausta. Suspension ja desinfiointiaineen tilavuutena käytettiin 200 µl:aa.

7 Tulokset

7.1 Kiekkotestit

Kiekkotestien tulokset on esitetty taulukossa 3. Taulukoissa numeroarvot ovat kolmen rinnakkaisen estorenkään keskiarvoja millimetreissä.

Taulukko 3. Kiekkotestien tulokset. Taulukossa on estorenkaiden keskiarvot millimetreissä.

desinfiointiaine	pitoisuus	<i>E. coli</i> TOP10	<i>E. coli</i> XL10- Gold	<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>B. subtilis</i>	<i>T. reesei</i> Rut-C30	<i>T. reesei</i> Roal
Deconex 20 NS	2,5 %	0	0	0	0	0	0
	5 %	0	0	0	0	0	0
	7,5 %	0	0	6	0	0	0
	10 %	6	0	8	0	0	0
Etanoli	70 %	0	0	0	0	0	0
Natriumbent- soaatti	0,1 %	0	0	0	0	0	0
	0,25 %	0	0	0	0	0	0
	0,5 %	0	0	0	0	0	0
	1 %	0	0	0	0	0	0
Peretikkahappo	0,05 %	0	0	0	0	0	0
	0,1 %	0	7	7	0	0	0
	0,2 %	0	8	7	9	0	6
	0,3 %	10	10	13	9	7	7
Erihyd Forte	0,5 %	6	7	6	6	0	0
	1 %	7	7	6	9	0	0
	2 %	10	8	8	12	10	7
	2,5 %	16	10	9	12	15	9
Diversey Oxivir	3 %	21	21	20	15	0	0
	10 %	26	25	28	27	0	0
	20 %	36	26	31	28	10	0
	30 %	43	30	35	30	22	6

Taulukossa 4 on kiekkotestien tulokset Virkon S:n osalta.

Taulukko 4. Virkon S –kiekkotestien tulokset. Numeroarvot ovat rinnakkaisten keskiarvoja millimetreinä.

desinfiointiaine	pitoisuus	<i>E. coli</i> TOP10	<i>E. coli</i> XL10- Gold	<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>B. subtilis</i>	<i>T. reesei</i> Rut-C30	<i>T. reesei</i> Roal
Virkon S	0,5 %	7	0	0	7	0	0
	1 %	7	0	6	8	0	0
	2 %	8	9	6	13	0	0

7.2 Suspensiotestit

Suspensiotestien tuloksista on yhteenveto taulukossa 5. ja 6. Primääritulokset löytyvät liitteestä 3. Liitteessä on Klett-mittarilla mitatut sameudet klett-arvoissa.

Taulukko 5. Yhteenveto suspensiotesteistä. Vaikuttavana aineena Deconex 20 NS. Plus-merkki (+) tarkoittaa, että aine esti testiorganismien kasvun ja miinus-merkki (-), että testiorganismi lähti kasvuun käsittelyn jälkeen.

aine	pitoisuus	vaikutusaika [min]	TOP10	XL10- Gold	XL1- Blue	<i>B. sub- tilis</i>	Rut- C30	Roal
Deconex 20 NS	5 %	5	-	-	-	-	-	-
		15	-	-	-	-	-	-
		30	-	-	-	-	-	-
	7,5 %	5	-	-	-	-	-	-
		15	-	-	-	-	-	-
		30	-	-	-	-	-	-
	10 %	5	-	-	-	-	-	-
		15	-	-	-	-	-	-
		30	-	-	-	-	-	-

Taulukko 6. Yhteenveto peretikkahapon, vetyperoksidi-valmisteiden, glutaraldehydivalmisteiden ja Virkon S:n suspensiotesteistä.

aine	pitoisuus	vaikutusaika	TOP10	XL10-Gold	XL1-Blue	B. subtilis	Rut-C30	Roal
Peracetic acid Solution	0,1 %	5	+	-	+	+	-	-
		15	+	+	+	+	-	+
		30	+	+	+	+	+	+
	0,2 %	5	+	+	+	+	+	+
		15	+	+	+	+	+	+
		30	+	+	+	+	+	+
	0,3 %	5	+	+	+	-	+	+
		15	+	+	+	+	+	+
		30	+	+	+	+	+	+
Diversey Oxivir	3 %	5	-	-	-	+	-	-
		15	-	+	-	+	-	-
		30	-	+	+	+	-	-
	10 %	5	-	+	+	+	-	-
		15	+	+	+	+	-	-
		30	+	+	+	+	-	-
	20 %	5	+	+	+	+	-	+
		15	+	+	+	+	-	+
		30	+	+	+	+	+	+
Erihyd Forte	0,5 %	5	-	-	-	-	+	+
		15	-	-	-	-	+	+
		30	-	-	+	-	+	+
	1 %	5	-	+	+	-	+	+
		15	-	+	+	-	+	+
		30	-	+	+	-	+	+
	2 %	5	+	+	+	-	+	+
		15	+	+	+	-	+	+
		30	+	+	+	-	+	+
Virkon S	0,5 %	5	-	+	+	+	-	-
		15	-	+	+	+	-	-
		30	+	+	+	+	-	-
	1 %	5	+	+	+	+	-	-
		15	+	+	+	+	-	-
		30	+	+	+	+	-	-
	2 %	5	+	+	+	+	-	-
		15	+	+	+	+	-	-
		30	+	+	+	+	-	-

Suspensiotestien tuloksien perusteella tehtiin lisäkokeita pitoisuuksien ja aikojen tarkentamiseksi. Tarkoituksena oli myös löytää toimivat pitoisuus ja vaikutusaika Erihyd Fortelle, joka tehoaisi *B. subtilis* sekä Virkon S:lle, *T. reesei* inaktivointiin. Deconex 20 NS jätettiin tehottomuutensa takia lisäkokeiden ulkopuolelle. Lisäkokeiden tulokset sekä käytetyt pitoisuudet ja ajat on esitelty taulukossa 7.

Taulukko 7. Suspensiotestien lisäkokeiden tulokset.

aine	pitoisuus	vaikutusaika	TOP10	XL10-Gold	XL1-Blue	B. subtilis	Rut-C30	Roal
Peracetic acid Solution	0,10 %	o/n	+	+	+	+	+	+
Diversey Oxivir	1 %	o/n	-	-	+	+	-	-
	3 %		+	+	+	+	-	-
	10 %						+	+
Erihyd Forte	0,20 %	o/n	+	+	+	-	+	+
	0,50 %	1 h				-		
		2 h				-		
		3 h				-		
		o/n						
	1 %	1 h				-		
		2 h				-		
		3 h				-		
		o/n						
	2 %	1 h				-		
		2 h				+		
		3 h				+		
o/n					+			
Virkon S	2 %	1 h					-	-
		2 h					-	-
		3 h					-	-
		6h						
		o/n					+	+

- ei tehoa

+

tehoa

ei tehdä

Taulukon 7. tuloksista nähdään, että Erihyd Forte tehoisi *B. subtilis*seen, kun vaikutusaika on kaksi tuntia ja pitoisuus 2 %. Kaksi prosenttinen Virkon S:n täytyi antaa vaikuttaa yön yli, jotta homeet saadaan inaktivoitua. Peretikkahappo inaktivoi kaikki testior-

ganismit o/n käsitellyssä jo 0,1 %:n pitoisuutena. Diversey Oxivir tehoi homeisiin 10 prosenttisena o/n käsittelyssä ja muihin testiorganismeihin jo 3 prosenttisena liuoksena. Peretikkahapon, Diversey Oxivirin, Erihyd Forten ja Virkon S:n teho varmistettiin lisäkokein homeitiöllä. Kokeiden tulokset on esitelty taulukossa 12.

Taulukko 8. Homeitiöiden suspensiotestien tulokset.

aine	pitoisuus	vaikutusaika	Rut-C30	Roal
Peracetic acid	0,1	15 min	+	-
		30 min	+	+
	0,2	15 min	+	+
		30 min	+	+
	0,3	15 min	+	+
		30 min	+	+
Diversey Oxivir	3	15 min	-	-
		30 min	-	-
	10	15 min	+	-
		30 min	+	+
	20	15 min	+	+
		30 min	+	+
Erihyd Forte	0,5	15 min	-	+
		30 min	+	+
	1	15 min	+	+
		30 min	+	+
	2	15 min	+	+
		30 min	+	+
Virkon S	2	30 min	-	-
		2 h	+	+
		6 h	+	+
		o/n	+	+

- ei tehoa

+ tehoa

Kokeissa käytetyt desinfointiaineiden pitoisuudet ja käsittelyajat tehosivat hyvin *T. reesei* itiöihin. Osa aineista tappoi itiöt jopa nopeammin kuin vegetatiiviset solut.

8 Tulosten tarkastelu

Valittavan desinfiointiaineen tuli täyttää kolmea kriteeriä: sen tuli olla tehokas, suhteellisen turvallinen ihmisille ja ympäristölle sekä sen lisäys ja inkubointi tuli olla helposti toteutettavissa. Se ei siis saanut lisätä merkittävästi työmäärää osastolla.

Työssä tehtyjen kiekkotestien ja suspensiotestien tulosten perusteella löydettiin neljä vaihtoehtoa käytettäväksi mikrobien inaktivointiin Roal Oy:n T&K-osastolla: peretikkahappo, Erihyd Forte eli glutaraldehydivalmiste, Diversey Oxivir eli vetyperoksidivalmiste sekä Viron S. Aineet inaktivoivat testeissä testimikrobit. Peretikkahappo oli käytetyillä pitoisuuksilla ja ajoilla tehokkain. Muiden aineiden teho vaihteli testiorganismista riippuen.

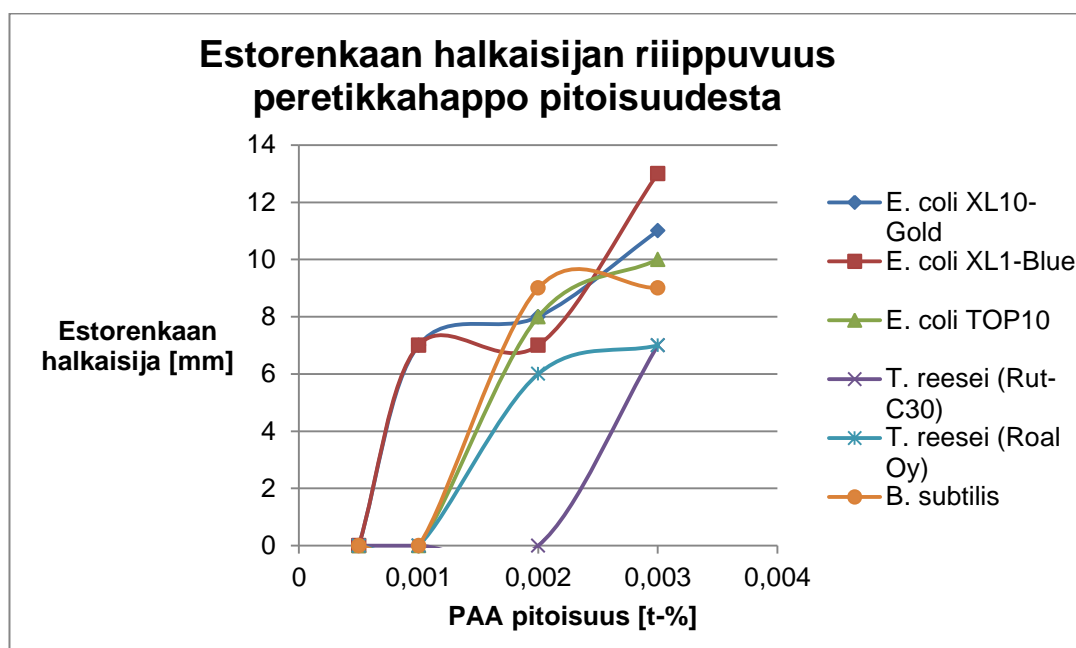
Etanoli ei vaikuttanut testiorganismien kasvuun kiekkotesteissä. Etanolilla testattiin vain 70 % pitoisuutta, koska kirjallisuuden perusteella sillä oli tutkitusti paras tappotehokkuus. Maljalla oli todennäköisesti liikaa proteiineja etanolin denaturoitavaksi. Etanolilla ei tehty suspensiotestejä. Etanoli on kuitenkin hyvä desinfiointiaine pinnoille. (Salakinoja-Salonen 2002: 45)

Deconex 20 NS:llä oli kiekkotesteissä mikrobistaattinen vaikutus vain kahteen *E. coli*-kannoista: TOP10:iin ja XL1-Blue:hun. Aineella jatkettiin suspensiotesteihin kolmella suurimmalla pitoisuudella, koska kahdella pienimmällä pitoisuudella ei ollut vaikutusta yhteenkään testiorganismiin. Suspensiotesteissä jokainen testiorganismi lähti kasvuun käsittelyn jälkeen.

Natriumbentsoaatilla ei ollut mikrobistaattista tai mikrobisidistä vaikutusta testiorganismeihin. Natriumbentsoaatin teho olisi parantunut lämmittämällä seosta ja säätämällä pH:ta, mutta testeissä ei haluttu käyttää lämmittämistä tai pH:n säätöä sillä se ei olisi käytännössä mahdollista jätteen inaktivoinnissa. Tuloksia tukee Roal Oy:n aikaisemmat tutkimukset natriumbentsoaatin käytöstä *T. reesei*n inaktivoimisessa. Natriumbentsoaatilla ei tehty suspensiotestejä.

Deonex 20 NS:n, etanolin ja natriumbentsoaatin kiekkotestit ja suspensiotestit korreloivat selvästi toistensa kanssa. Mitään näistä ei niiden tehottomuuden takia tulla valitsemaan käytettäväksi desinfiointiaineeksi mikrobijätteen inaktivoinnissa.

Peretikkahappo tehoi hyvin kaikkiin testiorganismeihin. Kiekkotesteissä peretikkahappo tehoi 0,3 %:n pitoisuutena jokaiseen testiorganismiin ja jo 0,1 %:n pitoisuutena suspensiotesteissä. Kiekkotesteissä pitoisuus 0,1 % vaikutti kasvua estävästi kahteen koli-kantaan. Pitoisuus 0,2 % esti *B. subtilis* sekä toisen *T. reesei*-kannan kasvun. 0,3 % esti kaikkien testiorganismien kasvun. Estorenkkaan halkaisijan koon riippuvuus peretikkahapon pitoisuudesta on esitetty kuviossa 2. Suspensiotesteihin valittiin kiekkotestien tulosten perusteella pitoisuudet 0,1 % - 0,3 %.



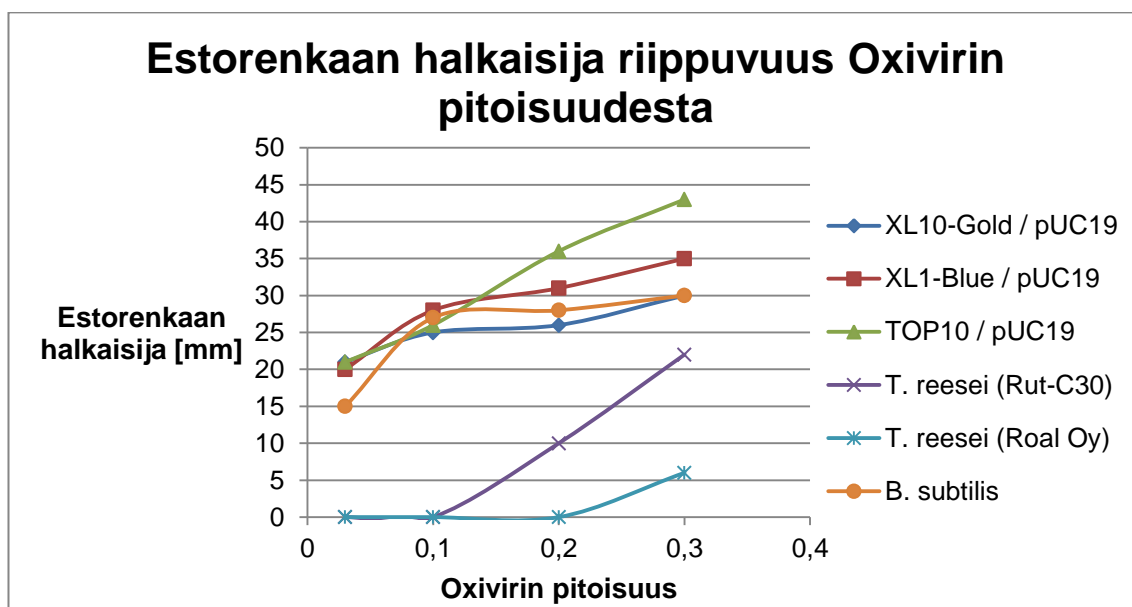
Kuvio 2. Estorenkkaan halkaisijan riippuvuus peretikkahapon (PAA) pitoisuudesta kiekkotesteissä. Peretikkahappo esti jokaisen kannan kasvun.

Suspensiotesteissä 0,1 % liuos tehoi jo viidessä minuutissa kolmeen bakteeriin ja 30 minuutissa loppuihin testiorganismeista. Kirjallisuus tukee tuloksia: Salkinoja-Salosen (2002: 37) mukaan 0,3 %:n pitoisuus tuhoaa suurimman osan vegetatiivisista soluista ja itiöistä. Ero kiekkotestien ja suspensiotestien välillä voi johtua maljoissa olevan agar-agarin inhiboivasta vaikutuksesta. Osa aineesta imeytyy agar-agarisiin. Kiekkotestit ja suspensiotestit eivät siis täysin tue toisiaan.

Itiöt ovat kestävämpiä desinfiointiaineille kuin vegetatiiviset solut. Homeitiöiden suspensiotesteissä peretikkahappo kuitenkin inaktivoi solut yhtä helposti kuin varsinaisissa suspensiotesteissä. Ero johtui suspension koostumuksesta. Itiöt olivat fysiologisessa suolaliuoksessa, kun vegetatiiviset solut taas kasvoivat kompleksisissa kasvatusalus-

toissa. Kasvatusalustoissa oli paljon orgaanista ja epäorgaanista ainesta, jotka kirjallisuuden perusteella tehokkaasti inhihoivat desinfiointiaineiden tehoa. (Salkinoja-Salonen 2002: 48 - 49; Wirtanen 2002: 133 - 135)

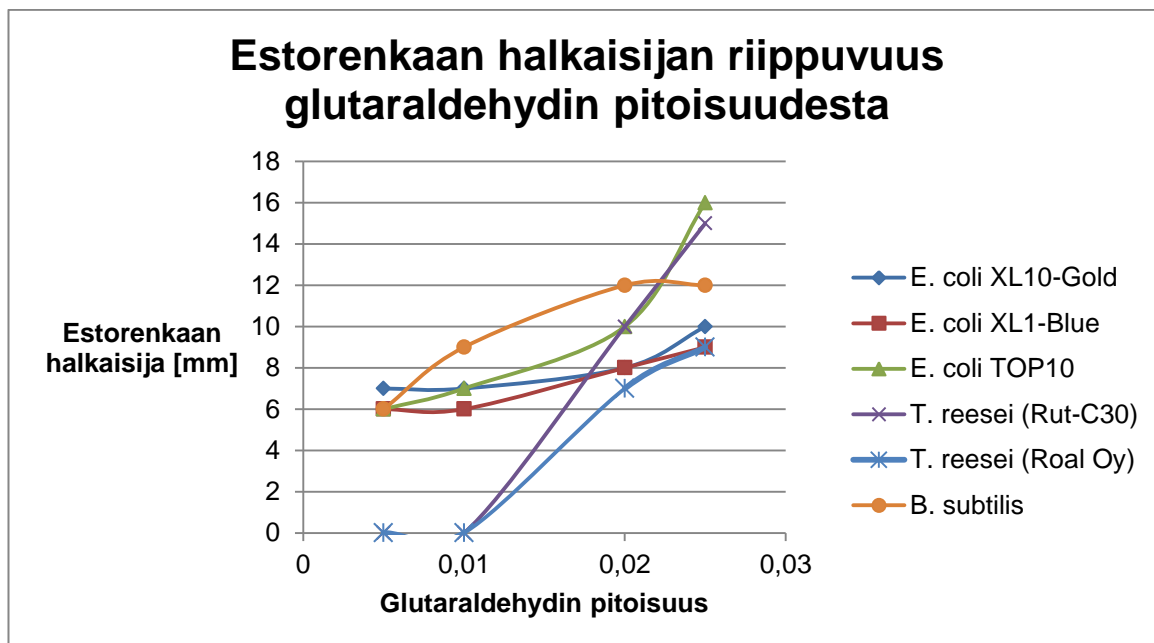
Diversey Oxivir tehoi kiekkotesteissä ja suspensiotesteissä hyvin bakteereihin ja hie-man huonommin homeisiin. Bakteereihin tehoi kiekkotesteissä kaikki käytetyt pitoisuudet. Rut-C30 -kantaan tehoi 20- ja 30-prosenttinen liuos. Roal Oy:n kantaan tehoi kunnolla vain pitoisuus 30 %. Estorenkkaan halkaisijan riippuvuus Diversey Oxivirin pitoisuudesta on esitelty kuviossa 3. Suspensiotesteihin valittiin pitoisuudet 3 % - 20 %, koska matalamman pitoisuuden liuos on turvallisempi käsitellä jatkossa.



Kuvio 3. Estorenkkaan halkaisijan riippuvuus Diversey Oxivirin pitoisuudesta kiekkotesteissä. Vetyperoksidi esti jokaisen kannan kasvun.

Suspensiotesteissä *B. subtilis* inaktivoitui nopeasti matalimmalla, 3 % pitoisuudella. *E. coli*en inaktivointiin riitti jo 10 %:n pitoisuus lyhyellä vaikutusajalla tai 3 %:n pitoisuus vaikutusajalla *o/n*. *T. reesei* -kantoihin Diversey Oxivir ei tehonnut yhtä hyvin. Niiden inaktivointi vaati 20 %:n pitoisuuden. Rut-C30 inaktivoitui vasta 30 minuutin käsittelyajan jälkeen ja Roal Oy:n kanta nopeammin viidessä minuutissa. Eri menetelmät tukevat hyvin toisiaan vetyperoksidin osalta. Bakteerien ja homeiden rakenteelliset erot ovat todennäköisesti syynä tehon vaihtelulle.

Erihyd Forte eli glutaraldehydi tehoi hyvin kiekkotesteissä jokaiseen testiorganismiin. Bakteereihin tehoi jokainen testatuista pitoisuuksista ja homeisiin kaksi väkevintä, 2 % ja 2,5 %. Suspensiotesteihin valittiin pitoisuudet 0,5 % - 2 %. Suspensiotesteissä ei ollut mahdollista saada liuoksen glutaraldehydipitoisuudeksi 2,5 %:a, koska se olisi vaatinut vahvemman valmisteen. Kiekkotestien tulokset on piirretty kuvaajaksi kuvioon 4.

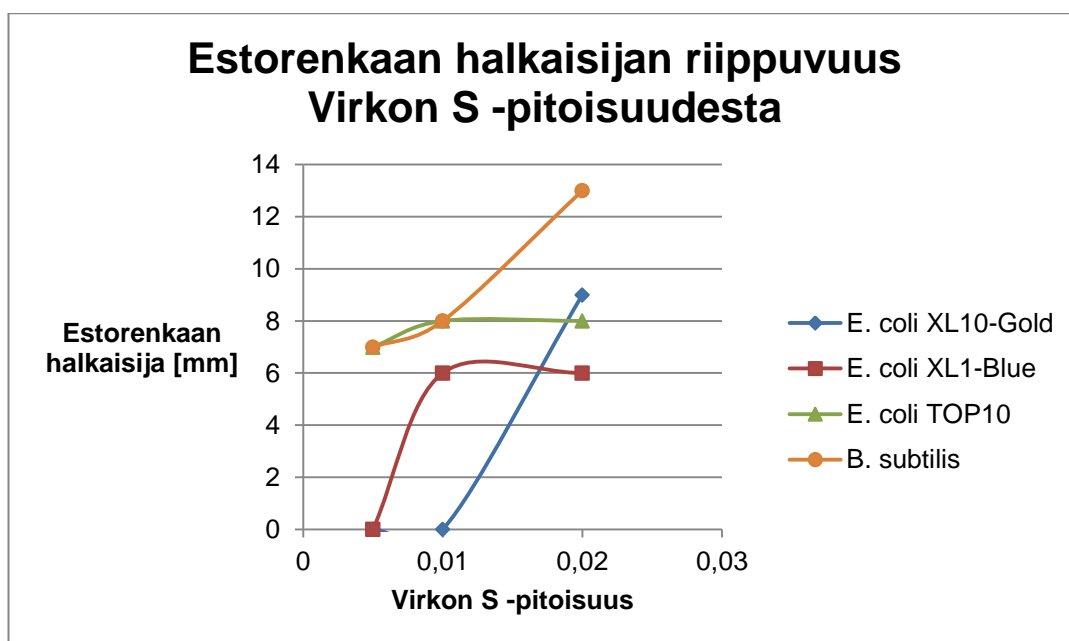


Kuvio 4. Estorenkään halkaisijan riippuvuus glutaraldehydin pitoisuudesta kiekkotesteissä. Aine esti jokaisen kannan kasvun.

Suspensiotesteissä hometestiorganismeihin glutaraldehydi oli erittäin tehokas ja nopeavaikutteinen. Jokainen pitoisuus tappoi homesolut kaikilla vaikutusajoilla. *E. coli* -kantoihin Erihyd Forten teho vaihteli suuresti. Kaikki *E. coli* inaktivoituivat viimeistään 2 %:n pitoisuutena jo 5 minuutilla. Erihyd Forte ei tehonnut lainkaan kyseisillä pitoisuuksilla ja ajoilla *B. subtilikseen* suspensiotesteissä. Salkinoja-Salosen (2002: 42) mukaan bakteeri-itiöiden inaktivointi glutaraldehydillä vaatii pidemmän vaikutusajan muihin mikrobeihin verrattuna. Lisäkokeiden perusteella glutaraldehydi tehosikin muutaman tunnin käsittelyn jälkeen. Kiekkotesteissä se tehoi, koska sen mikrobistaattinen vaikutus on suurempi kuin mikrobisidinen. (Salkinoja-Salonen 2002: 41 - 43)

Virkon S tehoi kiekko- ja suspensiotesteissä hyvin bakteereihin, mutta ei ollenkaan *T. reesei*-homeisiin. Kiekkotesteissä Virkon S esti hyvin *B. subtiliksen* ja melko hyvin *E.*

colien kasvun. *T. reeseiden* kasvua se ei estänyt. Käytettävää pitoisuutta ei voitu nostaa, koska suspensiotesteissä tarvitaan kaksinkertainen pitoisuus eivätkä Virkon S tabletit liukene testattua suurempina pitoisuuksina. Kuviossa 5 on estorenkään halkaisijan riippuvuus Virkon S:n pitoisuudesta bakteereiden osalta. Suspensioiteihin valittiin samat pitoisuudet kuin kiekkotesteihin.



Kuvio 5. Estorenkään halkaisijan riippuvuus Virkon S:n pitoisuudesta kiekkotesteissä. Aine esti vain bakteerien kasvun maljalla.

Valmistaja, DuPont Ltd., lupaa 1 %:n liuoksen inaktivoivan bakteereita, viruksia sekä joitain fungeja ja itiöitä. Tätä tukee Herrández *et al.* tutkimus, jossa todettiin, että 1 % liuos ei inaktivoinut yhtäkään hometta valmistajan lupauksista huolimatta. Lisäkokeilla Virkon S saatiin tehoamaan myös testihomeisiin pitoisuudella 2 % ja vaikutusajalla o/n. Bakteereihin tehosi luvattu 1 %:n liuos. (Herrández *et a.* 2000: 203 - 209)

Diversey Oxivir ja Virkon S ovat neljästä potentiaalisesta aineesta turvallisimpia käyttää (liite 2). Peretikkahappo sekä Erihyd Forte ovat lisäksi erittäin pahanhajuisia. Koska desinfiointiaineen valinnassa halutaan painottaa työturvallisuutta tehon lisäksi, tullaan joko Virkon S tai Diversey Oxivir valitsemaan. Haitallisempia aineita oli työssä mukana, koska pääasia oli kuitenkin löytää aine joka toimii. Tarpeeksi korkeilla pitoisuuksilla ja pitkillä vaikutusajoilla saatiin myös Virkon S ja Diversey Oxivir tehoamaan jokaiselle testiorganismille. Päätös näiden kahden aineen välillä tullaan tekemään sen perusteella

kuinka aineen käyttö tulee toimimaan käytännössä. Diversey Oxivirista käytettäisiin pitoisuutta 20 % ja vaikutusaikana 30 minuuttia. Virkon S:stä käytettäisiin pitoisuutta 2 % ja vaikutusaikana o/n. Bakteereille käytettäisiin mahdollisesti lyhyempää vaikutusaikaa, mutta käytettävyyden kannalta olisi helpompaa, jos vaikutusaika ja pitoisuus olisivat samat joka mikrobille. Vaikeus kummassakin on aineen lisäys laboratoriomittakaavan fermentointeihin ilman merkittävää lisätyötä sekä ergonomisesti kuormittavan vaikutuksen lisäystä.

9 Yhteenveto

Työn tarkoituksena oli löytää soveltuva desinfiointiaine käytettäväksi Roal Oy:n T&K-osastolle mikrobijätteen inaktivointiin. Valituksi tulleen aineen tuli olla turvallinen, tehokas sekä helppo käyttää.

Työssä tehdyissä kokeissa, kiekkotesteissä ja suspensiotesteissä, testattiin seitsemän eri aineen tehoa: Deconex 20 NS:n, etanoli, peretikkahapon, Diversey Oxivrin, Erihyd Forten, Virkon S:n sekä natriumbentsoaatin. Testiorganismeina käytettiin kolmea *E. coli* -laboratoriokantaa, *B. subtilista* sekä kahta *T. reesei* -homekantaa. Testiorganismista *E. coli*t olivat helpoimpia inaktivoita. *T. reesei*t olivat sietokykyisimpiä desinfiointiaineille.

Etanoli ja natriumbentsoaatti hylättiin jo kiekkotesti vaiheessa, koska niillä ei ollut kasvua estävää vaikutusta yhteenkään testiorganismiin. Deconex 20 NS hylättiin suspensiotestien jälkeen. Lopuilla neljällä eli peretikkahapolla, Diversey Oxivirilla, Erihyd Fortella ja Virkon S:llä tehtiin lisäkokeita sekä testattiin niiden teho homeitiöihin. Tuloksien, käyttöturvallisuustiedotteiden ja riskiarvion perusteella päätettiin, että joko Virkon S tai Diversey Oxivir tullaan valitsemaan käytettäväksi desinfiointiaineeksi. Virkon S ja Diversey Oxivir olivat aineista turvallisimpia. Lopullinen päätös tullaan tekemään sen perusteella, kumman käyttö on helpompi toteuttaa käytännössä.

Valittava desinfiointiaine tullaan ottamaan ruutini käyttöön Roal Oy:n T&K-osastolla, sillä työn tavoite täyttyi ja löydettiin kaksi kriteerit täyttävää desinfiointiainetta. Päätös ei ole välttämättä lopullinen, sillä desinfiointiaine on helposti korvattavissa toisella. Uusia vaihtoehtoisia desinfiointiaineita, jotka ovat turvallisempia tai muuten parempia kuin valituksi tullut, voidaan jatkossa testata työtä varten kehitetyillä menetelmillä. Desinfiointiaineiden tehoa voidaan testata myös muilla menetelmillä, mutta työtä varten kehitetyt menetelmät osoittautuivat toimiviksi. Menetelmillä saadut tulokset korreloivat toisensa kanssa sekä kirjallisuudesta löytyy paljon tietoa, joka tukee saatuja tuloksia.

Lähteet

Aittomäki, Esa - Eerikäinen, Tero - Leisola, Matti - Ojamo, Heikki - Suominen, Ilari - von Weymarn, Niklas. 2002. Bioprosessitekniikka. Porvoo. WSOY

Ammattitautiasetus. 1347/1988.

Bakteerisolun sisäiset rakenteet. 2006. Solunetti. Verkkodokumentti.
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/bakteerisolun_sisaiset_rakenteet/>
Luettu 26.1.2014

Bozic, Natasa - Ruiz, Jordi - Lopez-Santin, Josep - Vujcic, Zoran. 2010. Optimization of the growth and α -amylase production of *Bacillus subtilis* IP 5832 in shake flask and laboratory fermenter batch cultures. Journal of the Serbian Chemical Society. Vol 76: 965 - 972.

Deconex 20 NS. 2006. Käyttöturvallisuustiedote. Borer Chemie.

Diversey Oxivir E2m. 2012. Käyttöturvallisuustiedote. Diversey Suomi Oy.

Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus biosidivalmisteiden asettamisesta saataville markkinoilla ja niiden käytöstä ETA:n kannalta merkityksellinen teksti. EU 528/2012.

Fortelius, Carola - Ojamo, Heikki. 2010. Fungit. Opetusmoniste. Metropolia Ammatti-
korkeakoulu.

Geenitekniikkalaki. 377/1995.

Herández A - Martró E - Matas L - Martín M - Ausina V. 2000. Assessment of in-vitro efficacy of 1% Virkon against bacteria, fungi, viruses and spores by means of AFNOR guidelines. The Journal of Hospital Infection. Vol 46: 203 - 209.

Kemikaalineuvottelukunta. 2000. Kemikaalilainsäädäntö ja -valvonta Suomessa. Esite. Sosiaali- ja Terveysministeriö.

KiiltoClean Oy. 2013. Erihyd Forte. Käyttöturvallisuustiedote. Turku.

Kivisalmi, Ville - Manninen, Titta - Paul, Michael. 2013. Aseptiset työtavat mikrobiologi-
sessa laboratoriossa. Opetusmoniste. AEL.

Klett-Summerson photoelectric Colorimeter. 1973. Clinical Manual. Klett Manufacturing Co., Inc.

Käyttöturvallisuustiedote (KTT). 2014. Tukes. Verkkodokumentti <<http://www.tukes.fi/fi/Toimialat/Kemikaalit-biosidit-ja-kasvinsuojeluaineet/Kayttoturvallisuustiedote/>>. 7.1.2014. Luettu 25.3.2014.

MacWilliams, Maria - Liao, Min-Ken. 2013. Luria Broth (LB) and Luria Agar (LA) Media and Their Uses Protocol. Verkkodokumentti <<http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3031-luria-broth-lb-and-luria-agar-la-media-and-their-uses-protocol>>. 22.7.2013. Luettu 20.2.2014

Nakari-Setälä, Tiina - Penttilä, Merja. 1995. Production of *Trichoderma reesei* Cellulases on Glucose-Containing Media. Applied and Environmental Microbiology. Vol 61: 3650 - 3655.

Ohje muuntogeenisen kasvimateriaalin jätehuoltoon suljetussa käytössä. 2009. Geeni-tekniikan lautakunta ja Sosiaali- ja terveystieteiden lautakunta. Esite.

OVA-ohje: Glutaraldehydi. Työterveyslaitos. 2013. Verkkodokumentti. <<http://www.ttl.fi/ova/glutaraldehydi.html>>. 28.8.2013. Luettu 27.12.2013.

OVA-ohje: Peretikkahappo. Työterveyslaitos. 2013. Verkkodokumentti. <<http://www.ttl.fi/ova/peretikkah.html>>. 28.8.2013. Luettu 27.12.2013.

OVA-ohje: Vetyperoksidi. 2013. Työterveyslaitos. Verkkodokumentti. <<http://www.ttl.fi/ova/vetypero.html>>. 28.8.2013. Luettu 27.12.2013.

Peracetic acid Solution. 2012. Käyttöturvallisuustiedote. Sigma-Aldrich.

Peterson, Robyn - Nevalainen, Helena. 2012. *Trichoderma reesei* RUT-C30 – thirty years of strain improvement. Microbiology. Vol 158: 58 - 68.

Prescott, Lansing - Harley, John - Klein, Donald. 2002. Microbiology 5th edition. McGraw-Hill.

Roal Oy. 2014. Yrityksen kotisivut. Verkkodokumentti. <<http://www.roal.fi/?page=101&lang=1>> Luettu 1.3.2014.

Rutala William – Weber, David. 2008. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities. Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Chapel Hill.

Sagripanti, Jose-Luis - Hülseweh, Birgit - Grote, Gudrun - Voß, Luzie - Böhling, Katrin - Marschall, Hans-Jürgen. 2011. Microbial Inactivation for Safe and Rapid Diagnostics of Infectious Samples. Applied and Environmental Microbiology. Vol 77: 7289 - 7295.

Salkinoja-Salonen, Mirja. 2002. Mikrobiologian perusteita. Jyväskylä. Gummerus Kirjapaino Oy.

Scientific Opinion on the safety and efficacy of sodium benzoate as a silage additive for pigs, poultry, bovines, goats, rabbits and horses . 2012. European Food Safety Authority. Artikkel. EFSA Journal.

Sojakka, Kirsi - Välimäki, Maija-Liisa. 2011. Ammatillinen mikrobiologia. Tampere. Juvenes Print.

Solunetti. 2006. Solukalvo. Verkkodokumentti.
<<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/solukalvo/>>. Luettu 9.2.2014

Sosiaali- ja terveysministeriön asetus biologisten tekijöiden luokituksista. 921/2010.

Sosiaali- ja terveysministeriön asetus muuntogeenisten mikro-organismien suljetun käytön riskinarvioinnin periaatteista, suljetun käytön luokituksista sekä eristämisen ja muista suojatoimenpiteistä. 1053/2005.

Sterility Indicator (Steam Sterilization). 2012. Esite. Fluka Analytical.

Suljetun käytön valvonta. 2014. Valvira. Verkkodokumentti.
<http://www.valvira.fi/ohjaus_ja_valvonta/geenitekniikka/suljetun_kayton_valvonta>
Luettu 19.3.2014.

Työn ja hyvinvoinnin laitos THL. 2010. Influenssaviruksiin tehoavia desinfektointiaineita ja niiden ominaisuuksia. Verkkodokumentti. <
http://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/90762/07102010_desinfektioainetaulukko_influenssaviruksille.pdf?sequence=1>. 2.8.2010. Luettu 21.2.2014

Valtioneuvoston päätöstyöntekijöiden suojelemisesta työhön liittyvältä biologisten tekijöiden aiheuttamalta vaaralta. 1155/1993.

Virkon S. 2004. Käyttöturvallisuustiedote. Pfizer Oy Animal Health

Virkon S Disinfectant and Virucide. 2009. Esite. DuPont Ltd. Lexington.

Wirtanen, Gun. 2002. Laitehygieniä elintarviketeollisuudessa – hygieniangelmien ja Listeria monocytogenesin hallintakeinot. VTT Publications.

Woo, Im-Sun - Rhee, In-Koo - Park, Heui-Dong. 2000. Differential Damage in Bacterial Cells by Microwave Radiation on the Basis of Cell Wall Structure. Applied and Environmental Microbiology. Vol 66: 2243 - 2247.

Desinfointiaineita ryhmittäin

ryhmä	aine	hylkäävä syy	
kationiset tensidit	alkyyliipyridiiniibromidit alkyyliipyridiiniikloridit alkyyli trimetyyli ammonium kloridit alkyyli-dimetyyli-bentsammonium kloridit imidatsolium (kväternäärinen) ammonium-metyylisulfaatti	eivät tuhoa gram-negatiivisia bakteereja	
aktiiviseen happeen perustuvat	vetyperoksidi kaliumperoksoomonosulfaatti peretikkahappo	VALITTU	
	nitriilotrietikkahappo permuurahaishapo otsoni	KÄYTÖSSÄ valittu happo jo tästä ryhmästä kaasu huoneenlämpötilassa	
	halogeenipitoiset aineet	kloroformi kloorikaasu klooridioksidi monoklooriamiini hypokloriitit di- ja trikloori isosyanuraatti setyylipyridiumkloridi diklooridimeetylihydantoiinit jodoforit lugolin liuos betadiini kloramiini T dikloramiini T klooriheksiidiini bronopol metyylibromidi povidoni	karsinogeeninen kaasu huoneenlämpötilassa ei tuhoa bakteeri-itiöitä värjäävä syövyttävä ei tuhoa itiöitä huono teho homeisiin käyttö kielletty Suomessa ongelmajäte
		aldehydit	formaldehydi orto-ftaalialehydi
glutaraldehydi			VALITTU

fenoliset aineet	fenoli	myrkyllinen
	2-fenyylifenoli	ongelmajäte
	heksaklooridifenyylimetaani	kemikaalin sisältämät epäpuhtaudet myrkyllisiä
	heksaklorofeeni	
2-fenyyl-4-kloorifenoli	käyttö kielletty Suomessa	
4-kloori-3-metyylifenoli		
triklosaani		
2,,4,6-Trikloorifenoli		
2,3,4,6-tetrakloorifenoli		
	pentakloorifenoli	
alkoholit	etanoli	KÄYTTÖSSÄ
	isopropanoli	ei tuhoa itiöitä
<i>n</i> -propanoli		
muut	elohopeayhdisteet	myrkyllisiä
	hopeayhdisteet	osa syövyttäviä
	isotiatsolonit	erittäin herkistäviä
	etyleenioksidi	kaasu huoneenlämpötilassa toimii vain hyvin happamassa pH:ssa
	metyleenibistiosyanaatti	

Lähteet:

Rutala & Weber 2008

Salkinoja-Salonen

2002

Sojakka & Välimäki

2011

Desinfointiaineiden käytön riskiarviointi

Riskitekijä	Kuvaus	Toimenpiteet	Seuraukset	Todennäk.	Riski
1, 2, 3	Kohde: Liuosten valmistus, kroonisen terveyshaitan aiheuttavan aineen mittaaminen (Erihyd Forte, peretikkahappo) Vaara: Altistuminen ihon/silmien kautta. Altistuminen hengitysteitse, jos vetokaapissa on tilapäinen toimintahäiriö Vahinko: Pysyvä haitta, herkistyminen	suojalasit, nitrilikäsineet, <u>hengityssuojain</u> , työskentely vetokaapissa, toimintahäiriötilanteessa työskentelykielto, työ ohjeistettu, ohjeessa varoitukset	3	1	3
4, 2, 3	Kohde: Liuosten valmistus, syövyttävän aineenmittaaminen/käsittely (Deconex 20 NS, peretikkahappo) Vaara: Altistuminen ihon/silmien kautta. Altistuminen hengitysteitse, jos vetokaapissa on tilapäinen toimintahäiriö Vahinko: Syöpymävauriot, vakava silmävamma, hengityselinten ärsytys	suojalasit, nitrilikäsineet, <u>hengityssuojain</u> , työskentely vetokaapissa, toimintahäiriötilanteessa työskentelykielto, työ ohjeistettu, ohjeessa varoitukset	3	1	3
4, 2, 3	Kohde: Liuosten valmistus, ärsyttävän aineen mittaaminen (peretikkahappo, Erihyd Forte, Diversey Oxivir, Virkon S) Vaara: Altistuminen ihon/silmien kautta tai hengitysteitse Vahinko: Lievät ärsytysoireet	suojalasit, nitrilikäsineet, työohjeessa varoitukset	1	2	2
4, 1, 5	Kohde: Laimennetun desinfektioaineen lisäys (kaikki) Vaara: Kemikaalipullon putoaminen kuljettaessa, altistuminen hengitysteitse tai ihon kautta Vahinko: Syöpymisvammat	Suojakäsineet (neopreeni) Pullon kanto pohjasta tukien Ohjeissa asianmukaiset varoitukset Suojalasit	2	1	2
4, 1, 6	Kohde: Laimennetun desinfektioaineen lisäys. Vaara: Roiskevaara iholle, pullon kaatumisvaara Vahinko: Syöpymisvammat, tulipalon vaara	Suojakäsineet (neopreeni) Työskentely vetokaapissa Suojalasit	2	1	2
4, 1, 7	Kohde: Laimennettua desinfektioainetta sisältävän suspension sekoitus Vaara: Roiskevaara iholle Vahinko: Syöpymisvammat	Suojakäsineet (neopreeni) Suojalasit Työskentely vetokaapissa	2	1	2

Riskitekijöiden selitykset

- 1 = allergiaa aiheuttava kemikaali
- 2 = Yleisilmanvaihto
- 3 = Poikkeavat tilanteet ja häiriöt
- 4 = Vaaralliset tai haitalliset kemikaalit
- 5 = Esineiden putoaminen
- 6 = Esineiden kaatuminen
- 7 = Sienet/homeet

Riskien selitykset:

2 = vähäinen

3 = kohtalainen

Desinfiointiaineden vaaralausekkeet ja niiden selitykset**Deconex 20 NS**

H314-302-290: Voimakkaasti ihoa syövyttävää ja silmiä vaurioittavaa. Haitallista nieltynä.

Voi syövyttää metalleja.

Peretikkahppo

H226-314-335-400: Syttyvä. Voimaakkaasti ihoa syövyttävä ja silmiä vaurioittava.

Voi aiheuttaa hengitysteiden ärsytystä. Erittäin murkyllistä vesieliöille.

Pidettävä erillään helposti hapettuvista materiaaleista**Erihyd Forte**

H332-302-315-335-318: Haitallista hengitettynä ja nieltynä. Ärsyttää hengityselimiä ja ihoa. Vakavan silmävaurion vaara. Voi aiheuttaa herkistymistä.

Diversey Oxivir E2m

H302-315-318: Haitallista nieltynä. Ärsyttää ihoa. Vakavan silmävaurion vaara.

Virkon S

H315-332-318: Ärsyttää hengityselimiä ja ihoa. Vakavan silmävaurion vaara.

Suspensiotestien primaaritulokset

E. coli TOP10:

Taulukon **yliviivatuissa arvoissa** näyte oli kasautunut, mutta selvästi kasvanut.

desinfiointiaine	pitoisuus	käsittelyaika [min]	ennen kasvatusta [klett]	kasvatuksen jälkeen [klett]
Peracetic acid Solution	0,1 %	5	180	180
		15		160
		30		160
		pos.		240
		neg.		5
	0,2 %	5	180	160
		15		175
		30		165
		pos.		240
neg.		10		
0,3 %	5	180	180	
	15		160	
	30		160	
	pos.		260	
	neg.		15	
Deconex 20 NS	5 %	5	180	200
		15		200
		30		200
		pos.		225
		neg.		15
	7,5 %	5	180	165
		15		130
		30		120
		pos.		225
		neg.		10
	10 %	5	180	120
		15		110
30		110		
pos.		240		
neg.		10		

Erihyd Forte	0,5 %	5	125	270
		15	125	270
		30	125	270
		pos.	115	185
		neg.	10	10
	1 %	5	100	140
		15	125	220
		30	120	195
		pos.	115	185
neg.		10	10	
2 %	5	110	110	
	15	90	95	
	30	100	105	
	pos.	115	185	
	neg.	10	10	
Diversey Oxivir	3 %	5	120	260
		15	115	170
		30	120	230
		pos.	115	185
		neg.	10	10
	10 %	5	120	240
		15	75	85
		30	60	70
		pos.	115	185
neg.		10	10	
20 %	5	85	85	
	15	100	95	
	30	90	85	
	pos.	115	185	
	neg.	10	10	
Virkon S	0,5 %	5	80	215
		15	40	80
		30	90	75
		pos.	70	210
		neg.	5	5
	1 %	5	75	70
		15	80	70
		30	75	65
		pos.	70	210
		neg.	5	5
	2 %	5	90	60

		15	70	50
		30	100	70
Virkon S		pos.	70	210
		neg.	5	5

LISÄKOKEET

aine	pitoisuus	käsittelyaika	ennen kasvatusta [klett]	kasvatuksen jälkeen [klett]
Erihyd Forte	0,20 %	o/n	75	85
Peracetic acid s.	0,10 %	o/n	60	95
Diversey Oxivir	1 %	o/n	65	200
	3 %	o/n	100	80
pos.	-	-	65	180

E. coli XL10-Gold:

Taulukon **yliviivatuissa arvoissa** näyte oli kasautunut, mutta selvästi kasvanut.

desinfiointiaine	pitoisuus	käsittelyaika [min]	ennen kasvatusta [klett]	kasvatuksen jälkeen [klett]
Peracetic acid Solution	0,1 %	5	115	130
		15		120
		30		110
		pos.		150
		neg.		10
		0,2 %		5
	15	100		
	30	100		
	pos.	210		
	neg.	10		
	0,3 %	5	115	100
	15	100		
30	95			
pos.	200			
neg.	10			
Deconex 20 NS	5 %	5		115
		15	180	
		30	160	
		pos.	180	
		neg.	55	
		7,5 %	5	

Deconex 20 NS		15		160
		30		60
Deconex 20 NS	10 %	pos.	115	200
		neg.		5
Deconex 20 NS	10 %	5	115	50
		15		100
Deconex 20 NS	10 %	30	115	30
		pos.		150
Deconex 20 NS	10 %	neg.	115	20
Erihyd Forte	0,5 %	5	100	230
		15	90	220
		30	90	210
		pos.	85	125
		neg.	10	5
	1 %	5	90	90
		15	95	125
		30	95	105
		pos.	85	125
		neg.	10	5
2 %	5	85	95	
	15	90	90	
	30	95	80	
	pos.	85	125	
	neg.	10	5	
Diversey Oxivir	3 %	5	115	250
		15	125	110
		30	135	125
		pos.	85	125
		neg.	10	5
	10 %	5	65	65
		15	75	60
		30	60	50
		pos.	85	125
		neg.	10	5
20 %	5	100	80	
	15	90	70	
	30	80	75	
	pos.	85	125	
	neg.	10	5	
Virkon S	0,5 %	5	65	60
		15	60	65
		30	60	65

Virkon S	1 %	pos.	35	120
		neg.	5	5
		5	65	55
		15	65	60
		30	90	70
	2 %	pos.	35	120
		neg.	5	5
		5	55	65
		15	65	70
		30	85	60
		pos.	35	120
		neg.	5	5

LISÄKOKEET

aine	pitoisuus	käsittelyaika	ennen kasvatusta [klett]	kasvatuksen jälkeä [klett]
Erihyd Forte	0,20 %	o/n	65	75
Peracetic acid s.	0,10 %	o/n	40	45
Diversey Oxivir	1 %	o/n	55	115
	3 %	o/n	75	60
pos.	-	-	55	115

***E. coli* XL1-Blue:**

Taulukon **yliviivatuissa arvoissa** näyte oli kasautunut, mutta selvästi kasvanut.

desinfointiaine	pitoisuus	käsittelyaika [min]	ennen kasvatusta [klett]	kasvatuksen jälkeä [klett]
Peracetic acid Solution	0,1 %	5	95	65
		15		65
		30		65
		pos.		125
		neg.		5
	0,2 %	5	95	70
		15		70
		30		65
		pos.		190
		neg.		5
	0,3 %	5	95	65
		15		65
		30		65

Peracetic acid Solution		pos.		160
		neg.		10
Deconex 20 NS	5 %	5	95	140
		15		125
		30		155
		pos.		160
	7,5 %	neg.		20
		5	95	145
		15		130
		30		30
	pos.	130		
	10 %	neg.		25
		5	95	130
		15		130
30		120		
pos.	120			
Erihyd Forte	0,5 %	neg.		30
		5	40	100
		15	60	160
		30	55	40
	1 %	pos.	30	90
		neg.	5	5
		5	55	60
		15	60	70
	2 %	30	55	65
		pos.	30	90
		neg.	5	5
		5	50	65
Diversey Oxivir	3 %	15	50	220
		30	50	55
		pos.	30	90
		neg.	5	5
	10 %	5	25	30
		15	20	35
		30	30	35
		pos.	30	90

Diversey Oxivir	20 %	neg.	5	5
		5	20	45
		15	20	40
		30	40	40
		pos.	30	80
Virkon S	0,5 %	neg.	5	5
		5	30	35
		15	40	30
		30	30	40
		pos.	35	105
	1 %	neg.	5	5
		5	55	45
		15	40	40
		30	45	40
		pos.	35	105
	2 %	neg.	5	5
		5	55	45
		15	55	45
		30	60	40
		pos.	35	105
		neg.	5	5
		5	55	45
		15	55	45
		30	60	40
		pos.	35	105

LISÄKOKEET

aine	pitoisuus	käsittelyaika	ennen kasvatusta [klett]	kasvatuksen jäl-keen [klett]
Erihyd Forte	0,20 %	o/n	35	50
Peracetic acid s.	0,10 %	o/n	25	30
Diversey Oxivir	1 %	o/n	35	30
	3 %	o/n	50	40
pos.	-	-	35	145

Bacillus subtilis:

desinfiointiaine	pitoisuus	käsittelyaika [min]	ennen kasvatusta [klett]	kasvatuksen jäl-keen [klett]
Peracetic acid Solution	0,10 %	5	230	180
		15	155	100
		30	290	275
		pos.	220	415
		neg.	15	15

Peracetic acid solution	0,20 %	5	220	180
		15	300	280
		30	220	185
		pos.	200	450
		neg.	15	15
	0,30 %	5	250	305
		15	300	295
		30	310	300
		pos.	180	425
		neg.	20	15
Deconex 20 NS	5 %	5	330	490
		15	325	520
		30	220	475
		pos.	210	470
		neg.	5	15
	7,5 %	5	290	450
		15	290	415
		30	260	365
		pos.	170	425
		neg.	5	10
	10 %	5	200	255
		15	130	200
30		90	110	
pos.		190	375	
neg.		10	10	
Erihyd Forte	0,5 %	5	160	500
		15	250	600
		30	260	590
		pos.	175	510
		neg.	10	10
	1 %	5	235	560
		15	140	555
		30	305	620
		pos.	175	510
		neg.	10	10
	2 %	5	115	475
		15	75	375
30		155	405	
pos.		175	510	
neg.		10	10	
Diversey Oxivir	3 %	5	280	285

Diversey Oxivir		15	265	260
		30	280	280
		pos.	200	400
		neg.	20	15
	10 %	5	270	270
		15	270	270
		30	265	260
		pos.	200	400
	20 %	neg.	20	15
		5	270	275
		15	280	280
		30	270	275
Virkon S	0,50 %	pos.	200	400
		neg.	20	15
		5	140	115
		15	155	125
	1 %	30	140	120
		pos.	120	425
		neg.	10	15
		5	175	140
	2 %	15	175	165
		30	180	155
		pos.	125	425
		neg.	10	15
	5	195	155	
	15	185	155	
	30	220	180	
	pos.	125	425	
	neg.	10	15	

LISÄKOKEET

aine	pitoisuus	käsittelyaika	ennen kasvatusta [klett]	kasvatuksen jälkeen [klett]
Erihyd Forte	0,20 %	o/n	160	500
		1	135	500
	0,50 %	2	180	550
		3	95	470
		o/n	185	520
		1	140	520
	1 %	2	80	475
		3	125	455
		o/n	120	140

Erihyd Forte	2 %	1	160	400
		2	80	90
		3	155	170
		o/n	150	155
Peracetic acid s.	0,10 %	o/n	150	140
Diversey Oxivir	1 %	o/n	180	160
	3 %	o/n	240	235
pos.	-	-	60	425
neg.	-	-	10	10

***T. reesei* Rut-C30:**

desinfiointiaine	pitoisuus	käsittelyaika [min]	kasvu maljalla
Peracetic acid Solution	0,1 %	5	+++
		15	++
		30	-
		pos.	OK
		neg.	OK
		neg.	OK
	0,2 %	5	-
		15	-
		30	-
		pos.	OK
		neg.	OK
		neg.	OK
0,3 %	5	-	
	15	-	
	30	-	
	pos.	OK	
	neg.	OK	
	neg.	OK	
Deconex 20 NS	5 %	5	+++
		15	+++
		30	+++
		pos.	OK
		neg.	OK
		neg.	OK
	7,5 %	5	+++
		15	+++
		30	+++
		pos.	OK
		neg.	OK
		neg.	OK

Deconex 20 NS	10 %	5	++
		15	++
		30	+
		pos.	OK
		neg.	OK
Erihyd Forte	0,5 %	5	-
		15	-
		30	-
		pos.	OK
		neg.	OK
	1 %	5	-
		15	-
		30	-
		pos.	OK
		neg.	OK
	2 %	5	-
		15	-
30		-	
pos.		OK	
neg.		OK	
Diversey Oxivir	3 %	5	+++
		15	+++
		30	+++
		pos.	OK
		neg.	OK
	10 %	5	++
		15	++
		30	++
		pos.	OK
		neg.	OK
	20 %	5	+
		15	+
30		-	
pos.		OK	
neg.		OK	
Virkon S	0,5 %	5	+++
		15	+++
		30	++
		pos.	OK
		neg.	OK
	1 %	5	+++

Virkon S		15	+++
		30	+++
		pos.	OK
		neg.	OK
	2 %	5	+++
		15	+++
		30	+++
		pos.	OK
	neg.	OK	

LISÄKOKEET

aine	pitoisuus	käsittelyaika	kasvu maljalla
Peracetic acid s.	0,10 %	o/n	-
Diversey Oxivir	1 %	o/n	+++
	3 %	o/n	++
	10 %	o/n	-
Erihyd Forte	0,20 %	o/n	-
Virkon S	2 %	1 h	+++
		2h	+++
		3 h	+++
		6 h	+++
		o/n	-
pos.	-	-	OK

***T. reesei* Roal Oy:**

desinfiointiaine	pitoisuus	käsittelyaika [min]	kasvu maljalla
Peracetic acid Solution	0,1 %	5	+++
		15	-
		30	-
		pos.	OK
		neg.	OK
	0,2 %	5	-
		15	-
		30	-
		pos.	OK
		neg.	OK

Peracetic acid Solution	0,3 %	5	-
		15	-
		30	-
		pos.	OK
		neg.	OK
Deconex 20 NS	5 %	5	++
		15	++
		30	++
		pos.	OK
		neg.	OK
	7,5 %	5	+
		15	+
		30	+
		pos.	OK
		neg.	OK
	10 %	5	+
		15	+
30		+	
pos.		OK	
neg.		OK	
Erihyd Forte	0,5 %	5	-
		15	-
		30	-
		pos.	OK
		neg.	OK
	1 %	5	-
		15	-
		30	-
		pos.	OK
		neg.	OK
	2 %	5	-
		15	-
30		-	
pos.		OK	
neg.		OK	
Diversey Oxivir	3 %	5	+++
		15	+++
		30	+++
		pos.	OK
		neg.	OK
	10 %	5	++

Diversey Oxivir		15 30 pos. neg.	++ + OK OK
	20 %	5 15 30 pos. neg.	- - - OK OK
Virkon S	0,5 %	5 15 30 pos. neg.	+++ +++ +++ OK OK
		5 15 30 pos. neg.	+++ +++ +++ OK OK
	2 %	5 15 30 pos. neg.	+++ +++ +++ OK OK

LISÄKOKEET

aine	pitoisuus	käsittelyaika	kasvu maljalla
Peracetic acid s.	0,10 %	o/n	-
Diversey Oxivir	1 %	o/n	+++
	3 %	o/n	++
	10 %	o/n	-
Erihyd Forte	0,20 %	o/n	-
Virkon S	2 %	1 h	+++
		2h	++
		3 h	+
		6 h	++
		o/n	-
pos.	-	-	OK