

Anna Männistö

PSEUDOMONAS AERUGINOSAN JA KLOORIN
PIKAMENETELMIEN SOVELTUVUUS UIMA-ALLASVESIEN
VALVONTATUTKIMUKSIIN

Kemiantekniikan koulutusohjelma

2012

PSEUDOMONAS AERUGINOSAN JA KLOORIN PIKAMENETELMIEN SOVELTUVUUS UIMA-ALLASVESIEN VALVONTATUTKIMUKSIIN

Männistö, Anna
Satakunnan ammattikorkeakoulu
Kemiantekniikan koulutusohjelma
Helmikuu 2012
Ohjaaja: Vanha-aho, Tuula
Sivumäärä: 34
Liitteitä: 17

Asiasanat: bakteerit, kloori, uimavesi, analyysi

Opinnäytetyön tavoitteena on selvittää mahdollista validointia varten uima-allasvesien pikamenetelmien analyysiluotettavuutta verrattuna SFS-standardeihin. Lisäksi opinnäytetyössä perehdytään kahteen eri analysointikohteeseen, joita tutkitaan uima-allasvesistä: *Pseudomonas aeruginosa* -bakteeriin ja allasveden klooripitoisuuteen sekä näiden standardin mukaisesti analyysimenetelmiin ja pika-analyysimenetelmiin. Työssä selvitetään myös allasveden laatuvaatimuksia näiden kahden analyysin osalta. Nykyisellä analyysimenetelmällä bakteerin todentaminen vesinäytteestä kestää kahdesta vuorokaudesta jopa neljään vuorokauteen. Pikamenetelmällä positiivinen tulos pystytään antamaan jo 24 tunnin jälkeen. Kloorin määrittystä koskeva laki tulee muuttumaan, joka vaatii klooripitoisuuden analysoinnin mahdollisimman pian näytteenoton jälkeen. Tämä tarkoittaa kloorin tutkimista jo paikanpäällä, jolloin tulokset pystytään raportoimaan nopeasti eteenpäin.

Pseudomonas aeruginosa -bakteeri määritettiin Pseudalert-pikamenetelmällä. Menetelmän toimivuutta arvioitiin t-testillä ja erilaisilla laimennossarjoilla, joiden pitoisuudet arviolta tiedettiin. Klooripitoisuutta testattiin Merckin fotometrillä, jota on mahdollista kuljettaa mukana näytteenotossa. Laitteella pystyttiin mittaamaan vapaa kloori ja kokonaiskloori. Sekä Pseudalert-menetelmää että fotometrillä menetelmää verrattiin SFS-standardin mukaisesti menetelmiin.

Pseudalert-menetelmä osoitettiin t-testin mukaan toimivaksi analyysimenetelmäksi, mutta häiriötekijöiden huomattiin väärentävän analyysiluotettavuutta. Tilastollisesti pikamenetelmä antaa samanlaisia tuloksia, kuin tämän hetkinen standardin mukainen menetelmä. Jotta pikamenetelmä voitaisiin ottaa käyttöön, tarvitaan lisätutkimuksia häiriötekijöiden poistamiseksi. T-testillä vertailtiin myös fotometrin ja spektrofotometrin välisiä analyysituloksia. Testin mukaan vapaan kloorin tulokset eivät juuriakaan eroa toisistaan, mutta kokonaiskloori eroaa 5 %:n merkitsevyydellä. Syy tulosten erilaisuuteen ei selvinnyt. Kokeilla pystyttiin osoittamaan laite toimivaksi, mutta tilastollisesti hieman epävarmaksi analyysilaitteeksi.

APPLICABILITY OF RAPID METHODS FOR CONTROLLING PSEUDONOMAS AERUGINOSA AND CHLORINE IN SWIMMING POOL WATER

Männistö, Anna

Satakunnan ammattikorkeakoulu, Satakunta University of Applied Sciences

Degree Programme in Chemical Engineering

February 2012

Supervisor: Vanha-aho, Tuula

Number of pages: 34

Appendices: 17

Keywords: bacteria, chlorine, swimming water, analysis

The aim was to compare rapid methods of swimming pool water against the standard methods in order to get background information for further validation. Two different analysis parameters were as well studied that are researched in swimming pool water: a bacterium called *Pseudomonas aeruginosa* and chlorine concentration. SFS-standards and rapid methods are also clarified. Furthermore, quality requirements of swimming pool water are presented. The principal aim is to explore the reliability of rapid analysis compared to SFS-standards. It takes two to four days to analyse *Pseudomonas aeruginosa* with the current analysis. A positive bacterium result can be discovered after 24 hours with the rapid test. The law of measuring chlorine concentration is going to change in the future. It will demand measuring the chlorine as quickly as possible after sampling, which leads to measuring the concentration already on site so the results can be reported faster to the customer.

Pseudomonas aeruginosa was defined by a rapid test called Pseudalert. The usability of the method was estimated by utilizing a t-test and different kinds of dilution chains. The concentration of chlorine was analyzed with a photometer made by Merck. Free chlorine and total chlorine could be measured by a photometer. The most significant selection criterion was the portability of the device. The results of the rapid test were compared to the results of SFS-standards.

The t-tests proved Pseudalert workable but distractions caused doubt to reliability of the results. Statistically the test results of the rapid test were similar to SFS-standards. More analyses are needed for removal of the distractions if Pseudalert is wanted to be adopted. The relation between the results of the photometer and the spectrophotometer were also analyzed by a t-test. According to the test results, the results of free chlorine do not differ from each other when measured with the two devices. However, total chlorine differs at a significance level of 5 %. The reason for the difference of the results was not found. It can be concluded that for analysing chlorine SFS-standard is more reliable than the tested photometer.

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	KAUHAJOEN ELINTARVIKELABORATORIO.....	6
3	UIMA-ALLASVESIEN LAATUVAATIMUKSET.....	7
3.1	Mikrobiologiset laatuvaatimukset.....	7
3.1.1	Pseudomonas aeruginosa.....	8
3.2	Fysikaalis-kemialliset laatuvaatimukset.....	9
3.2.1	Uima-allasvesien kloori.....	9
4	UIMA-ALLASVESIEN SFS-STANDARDIN MUKAISET ANALYYSIMENETELMÄT.....	10
4.1	Pseudomonas aeruginosan havaitseminen ja lukumäärän määrittäminen kalvosuodatustekniikalla.....	10
4.1.1	Analyysin suoritus.....	11
4.1.2	Tulosten varmentaminen ja niiden ilmoittaminen.....	11
4.2	Vapaan kloorin ja kokonaiskloorin määrittäminen vesinäytteistä.....	11
4.2.1	SFS-EN ISO 7393-2:2000 menetelmän periaate.....	11
4.2.2	Reagenssien valmistus.....	12
4.2.3	Kalibrointi.....	13
4.2.4	Vapaan kloorin määrittäminen.....	13
4.2.5	Kokonaiskloorin määrittäminen.....	14
4.2.6	Klooripitoisuus yli 0,6 mg/l.....	14
4.2.7	Tulosten laskeminen.....	14
4.2.8	Häiriötekijöitä ja analyysituloksen laadunvarmistus.....	15
5	UIMA-ALLASVESIEN PIKA-ANALYYSIMENETELMÄT.....	15
5.1	Pseudalartin periaate ja käyttö.....	15
5.2	Fotometrin mittausperiaate.....	17
5.2.1	Nova 60 -fotometri.....	18
5.2.2	Laitteen esivalmistelut.....	18
5.2.3	Mittaaminen.....	19
6	TYÖN SUORITUS.....	20
6.1	Mikrobiologisten menetelmien validointi.....	20
6.1.1	Pseudomonas aeruginosan tutkimusmenetelmät.....	20
6.1.2	T-testin teoria ja esimerkkilasku.....	21
6.2	Kemiallisten menetelmien validointi.....	23
6.2.1	Kloorin määrittäminen.....	24
6.2.2	Fotometrin ja spektrofotometrin tilastollinen vertailu t-testillä.....	24
6.2.3	Kloorin määrittämissrajan laskeminen.....	25
7	TULOKSET.....	28
7.1	Pseudalartin tulokset.....	28

7.2	Fotometrin tulokset.....	29
8	PÄÄTELMÄT.....	30
8.1	Pseudalertin käyttöluotettavuus ja häiriötekijät.....	30
8.2	Fotometrin virhearviointi ja analysointiluotettavuus.....	31
	LÄHTEET.....	33
	LIITTEET	

1 JOHDANTO

Uima-allasveden lakisääteiseen laadunvalvontaan kuuluu sekä mikrobiologisia että fysikaalis-kemiallisia tutkimuksia. Opinnäytetyössä perehdytään kahteen eri osaluueeseen: *Pseudomonas aeruginosa* -bakteeriin ja allasveden klooripitoisuuteen sekä näiden standardin mukaisiin analyysimenetelmiin ja pika-analyysimenetelmiin. *Pseudomonas aeruginosa* on ainut mikrobiologinen patogeeni, jota tutkitaan virallisista vesinäytteistä. Tällä hetkellä tutkimustulosten valmistuminen kestää kahdesta vuorokaudesta neljään vuorokauteen. Pikamenetelmällä tulokset saadaan varmistetuksi jo 24 tunnin jälkeen. Klooripitoisuuden määrittämisen asetus tulee muuttumaan, jolloin tulosten analysointi tullaan tekemään mahdollisimman pian näytteenoton jälkeen. Tämä takaa nopean raportoinnin veden puhtaustasosta heti paikan päällä.

Opinnäytetyössä selvitetään IDEXX Laboratories -yrityksen kehittämää Pseudalert-pika-analyysin käyttöä ja luotettavuutta *Pseudomonas aeruginosan* määrittämiseen verrattuna standardiin SFS-EN ISO 16266:2008 ”Veden laatu. *Pseudomonas aeruginosan* havaitseminen ja lukumäärän määrittäminen. Kalvosuodatustekniikka.” Opinnäytetyössä selvitetään myös pikamenetelmän käyttöä kloorin määrittämiseen. Testaukseen käytettiin Merckin fotometria. Tuloksia verrattiin standardiin SFS-EN ISO 7363-2:2000 ”Vapaa ja kokonaiskloorin määrittäminen vesinäytteistä.” Tämän standardin mukaisesti näytteet tutkitaan UV/Vis-laitteella. Analyysituloksilla on tarkoitus saada taustatietoa mahdollista validointia varten.

2 KAUAHOEN ELINTARVIKELABORATORIO

Kauhajoen elintarvikelaboratorio on Etelä-Pohjanmaalla Kauhajoen kaupungissa sijaitseva virallinen elintarvike-, hygienia-, terveydensuojelu- ja eläintautilain nojalla hyväksytty tutkimuslaitos (EL 210) ja FINAS akkreditoitu testauslaboratorio nro T091. Se palvelee Kauhajoen kaupungin hallintokuntia ja laitoksia, Suupohjan perus-

palveluliikelaitoskuntayhtymää ja muita lähikuntia. Näiden lisäksi näytteitä saapuu tutkittavaksi myös muualta Suomesta. Tärkeimpiä asiakkaita ovat lähi-alueiden elintarvikeyritykset, vesilaitokset ja -yhtymät sekä maatalousyrittäjät. Elintarvikelaboratorion toiminta-ajatuksena on edistää laadukkaiden ja turvallisten elintarvikkeiden tuottamista sekä puhtaan elin- ja asuinympäristön ylläpitämistä tarjoamalla niihin innovatiivisia työkaluja ja ratkaisuja. Laboratorio toimii kiinteästi yhteistyössä Seinäjoen ammattikorkeakoulun Liiketalouden, yrittäjyyden ja ravitsemisalanyksikön Kauhajoen toimipisteen kanssa. Lisäksi laboratorio on osa Food Park -osaamiskeskittymää, jonka tavoitteena on mm. edistää paikallisten elintarvikeyritysten kilpailukykyä. /1./, /2./, /3./

3 UIMA-ALLASVESIEN LAATUVAATIMUKSET

Erilaiset mikrobit viihtyvät hyvin kosteissa tiloissa ja puutteellisen hygienian seurauksena ne saattavat aiheuttaa tilojen käyttäjille terveyshaittoja. Haittojen ehkäisemiseksi kosteiden tilojen allasveden, ilman ja pintojen laatu ja hygienia on oltava moitteetonta. Hygieniaa tulee siis tarkkailla usealla eri tasolla. /8./, /9./

Allasveden laatuvaatimukset edellyttävät, että allasvesi ei aiheuta vaaraa ihmisen terveydelle. Asetuksessa (315/2002) on annettu vaatimukset yleisimmille haittatekijöille. Tämän lisäksi asetus edellyttää, ettei allasvedessä ole muitakaan pieneliöitä, loisia tai aineita sellaisina määrinä tai pitoisuuksina, joista voisi olla vaaraa ihmisen terveydelle. /6./

3.1 Mikrobiologiset laatuvaatimukset

Uimaveden mikrobiologista laatua voidaan arvioida määrittämällä vedestä heterotrofiset pesäkeluvut (22 °C ja 36 °C) ja *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin esiintyminen. Vanhassa SFS-standardissa käytössä olleet ulostesaastumista kuvaavat lämpökestoiset koliformiset bakteerit on jätetty pois uudistetusta SFS-standardista. Koliformiset bakteerit ovat herkkiä kloorille ja niiden ulosteperäistä kontaminaatiota kuvaava merkitys on pieni sellaisessa vedessä, joka sisältää klooria suhteellisen

runsaasti. Tällöin niiden analysoiminen klooripitoisesta allasvedestä ei ole tarpeellista. /6./

Heterotrofinen pesäkeluku kertoo uima-allasveden yleisestä hygieniastasosta. 22 °C:n pesäkeluku kertoo erityisesti ympäristön aiheuttamasta likaantumisesta, kun 36 °C:n pesäkeluku taas kertoo liasta, joka on peräisin ihmisestä. *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin esiintyminen indikoi yleisesti vedessä olevista taudinaiheuttajabakteereista. Allasveden numeeriset laatuvaatimukset ovat esitettyinä liitteessä 1. /6./

3.1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa on mikro-organismi, joka kasvaa valikoivilla, setrimidiä (heksadekyylitrimetyyliammoniumbromidia) sisältävillä kasvualustoilla. 90 % kannoista tuottaa sinivihreää pyosyaniinia. Bakteeri on itiöitä muodostamaton, gram-negatiivinen sauvabakteeri sekä oksidaasi- ja katalaasiposiitivinen. Noin 98 % kannasta fluoresoi UV-valossa (360±20) nm. Suurin osa *Pseudomonas aeruginosa* kannoista pystyy kasvamaan 37-42 °C:ssa. /4./, /16./

Uima-allasveden välityksellä tarttuvista bakteereista *Pseudomonas aeruginosa* aiheuttaa eniten sairastumisia. Vaikka tätä patogeeniä löydetäänkin vain harvoin vesinäytteistä, se pystyy esiintyessään kasvamaan hyvin alhaisilla ravinnepitoisuuksilla ja kestämään hyvin klooria. Tästä johtuen sen poistaminen allasvedestä on vaikeaa. Patogeenin löydyttyä allasvedestä hallimestari tai terveysviranomaisen tekee päätöksen shokkiklooraamisesta. Shokkikloorauksen aikana uimavettä ei voida käyttää, koska klooripitoisuus nostetaan sallittuja pitoisuuksia korkeammalle tasolle. Shokkikloorausta jatketaan siihen asti, kunnes voidaan todeta bakteerin hävinneen allasvedestä. /6./

Pseudomonas aeruginosa toimii indikaattoribakteerina, joka kertoo yleisesti vedessä olevista taudinaiheuttajista. Bakteerista voi saada suolisto-, silmä-, korva- tai hengityselininfektion. Se voi myös aiheuttaa virtsatietulehduksia ja ihottumaa. /6./

3.2 Fysikaalis-kemialliset laatuvaatimukset

Allasvesien fysikaalis-kemialliset laatuvaatimukset on pyritty asettamaan siten, että klooridesinfiointi on riittävän tehokas ja sille on riittävät edellytykset. Lisäksi asetuksessa on säädetty laatuvaatimukset terveyshaittoja aiheuttaville nitraateille ja trihalometaaneille. /6/

Uima-allasvesistä tutkitaan sameus, pH, kloori-, nitraatti-, urea- ja trihalometaanipitoisuudet sekä KMnO_4 -luku. Allasveden numeeriset laatuvaatimukset ovat esitettyinä liitteessä 1. /5/

3.2.1 Uima-allasvesien kloori

Klooriyhdisteiden mikrobeja tuhoava ominaisuus perustuu sen muodostamaan alikloorihapokkeeseen, joka pienenä molekyylinä pääsee tunkeutumaan mikrobin soluseinämään. Alikloorihapoke hajoaa edelleen vetykloridiksi (suolahapoksi) ja reaktiiviseksi happiatomiksi, joka hapettaa mikrobin. Pieneliöt eivät muodosta kloorille helposti uusia, resistenttejä kantoja, mikä takaa kloorin käyttöluotettavuuden. /8./

Vapaa kloori on kokonaiskloorin aktiivinen osa, joka desinfioi allasvettä. Vapaaseen klooriin vaikuttaa pitoisuuden lisäksi merkittävästi myös sen esiintymismuoto vedessä. Se voi esiintyä hapettavana klooriyhdisteenä, kuten kloorina (Cl_2), hypokloorihapokkeena (HClO) ja hypokloriitti-ionina (ClO^-). Näistä hypokloorihapoke on desinfiointikyvyltään kymmeniä kertoja tehokkaampi verrattuna muihin esiintymismuotoihin. Kloorin esiintymismuoto vedessä on riippuvainen veden pH:sta siten, että pH:n laskiessa tehokkaamman hypokloorihapokkeen määrä kasvaa. Hypokloorihapokkeen määrän osuus vapaasta kloorista kasvaa pH:n laskiessa suunnilleen taulukon 1 mukaisesti.

Taulukko 1: Hypokloorihapokkeen ja pH:n vaikutus toisiinsa

pH	Hypokloorihapokkeen osuus %
8,5	10
8,0	30
7,5	55
7,0	80
6,5	93

Jos allasveden pH laskee liian alas (alle 6,5), kloori alkaa muodostaa typpiyhdisteiden kanssa voimakkaasti limakalvoja ärsyttäviä yhdisteitä. Alhaisessa pH:ssa ongelmana on myös kloorin korroosiovaikutus. /6./

Kloorilla on desinfioinnin lisäksi vedessä toinenkin tärkeä tehtävä. Se reagoi monien veteen joutuvien lika-aineiden kanssa, kuten hiestä ja virtsasta tulevan urean ja ammoniumin kanssa. Näistä muodostuu ajan myötä haitallisia välituotteita, joita kutsutaan sidotuksi klooriksi. Näitä ovat epäorgaaniset klooriamiinit (monoklooriamiini NH_2Cl , diklooriamiini NHCl_2 ja typpitrikloridi NCl_3) sekä orgaaniset mono- ja diklooriamiinit. Sidottu kloori kuvaa hyvin desinfioinnin puhdistustulosta. Mitä pienempi sidotun kloorin osuus on, sitä pidemmälle puhdistusprosessi on edennyt ja sitä puhtaampaa vesi on. Sitoutuneen ja vapaan kloorin summasta saadaan kokonaiskloorin pitoisuus. /5./, /6./

4 UIMA-ALLASVESIEN SFS-STANDARDIN MUKAISET ANALYYSIMENETELMÄT

4.1 *Pseudomonas aeruginosa* havaitseminen ja lukumäärän määrittäminen kalvosuodatustekniikalla

Kauhajoen elintarvikelaboratoriossa *Pseudomonas aeruginosa* määrittäminen kalvosuodatustekniikalla perustuu standardiin SFS-EN 16266:2008, joka on muunneltu varmistustestien osalta. Suodatukseen käytetään steriiliä 0,45 μm :n vahvuista kalvoa sekä elatusaineena *Pseudomonas*-agarina. /4./

4.1.1 Analyysin suoritus

Työ suoritetaan suodattamalla 100 ml uima-allasvettä suodatinlaitteiston avulla. Suodatinkalvo siirretään steriileillä pinseteillä kasvatusalustalleen sama puoli ylöspäin, kuin suodatuksen aikana. Maljoja inkuboidaan $+36 \pm 2$ °C:ssa 44 ± 4 tuntia. Maljoilta tarkistetaan kasvu jo 22 ± 2 tunnin jälkeen ja luetaan jo tällöin, jos pesäkkeiden liikakasvu tai yhteensulautumat ovat mahdollisia. Tyypillisiksi pesäkkeiksi lasketaan sinivihreää pyosyaniinia tuottavat pesäkkeet. /4./

4.1.2 Tulosten varmentaminen ja niiden ilmoittaminen

Pesäkkeiden tulee fluoresoida UV-valossa, jotta tulos on positiivinen. Varmistus tehdään siirrostamalla pesäkkeistä puhdasviljelmä erillisille ravintoagarille. Agaria inkuboidaan $+36 \pm 2$ °C:ssa 22 ± 2 tuntia. Puhdasviljelmästä tehdään tehdasvalmisteinen pyo-testi. Pyo-testi perustuu entsymaattiseen toimintaan, jossa sytokromioksidaasi -entsyymi muuttaa testiliuskan väriä syvän siniseksi. *Pseudomonas aeruginosa* on oksidaasipositiivinen bakteeri. Analyysimenetelmä on muunneltu, joten lopuksi tehdään vielä varmistus tehdasvalmisteisella API 20 E -testillä sen oman ohjeen mukaisesti. Tulokset ilmoitetaan pmy (pesäkettä muodostavaa yksikköä)/100 ml kohti. /4./

4.2 Vapaan kloorin ja kokonaiskloorin määrittäminen vesinäytteistä

Vapaan kloorin ja kokonaiskloorin määrittäminen perustuu standardiin SFS-EN ISO 7393–2:2000. Laitteena käytetään fotometriä, jolla absorbanssi voidaan mitata 510 nm aallonpituudella ja johon kuuluvat 10 mm tai pidemmät kyvetit. Laboratorio käyttää analyysilaitteena UV-Vis spektrofotometriä, jossa on läpivirtauskyvetti. Menetelmää voidaan käyttää aktiivisen kloorin määrittämiseen vedestä, jota on käsitelty kloorilla tai hypokloriitilla. Standardin avulla voidaan määrittää klooripitoisuuksia, jotka ovat suurempia kuin 0,03 mg/l. Jos pitoisuus on yli 0,6 mg/l, määrittäminen tehdään laimennetusta näytteestä. /5./

4.2.1 SFS-EN ISO 7393–2:2000 menetelmän periaate

Standardin mukaisessa menetelmässä vapaa kloori reagoi N,N-dietyyli-p-fenyleeni-diamiinin eli DPD:n kanssa pH-alueella 6,2–6,5 muodostaen punaisen yhdisteen,

jonka pitoisuus määritetään fotometrisesti. Kokonaiskloori reagoi DPD:n kanssa jodidi-ionien läsnä ollessa samalla tavalla kuten vapaa kloori. Sitoutunut kloori saadaan kokonaiskloorin ja vapaan kloorin erotuksesta. /5./

4.2.2 Reagenssien valmistus

Reagenssiliuosten valmistukseen ja laimennoksiin käytetään klooritonta tislattua ja ionitonta vettä. Vesi ei saa sisältää aineita, jotka reagoivat kloorin kanssa. /5./

Fosfaattipuskuriliuos, jonka pH on noin 6,5, valmistetaan liuottamalla 24 g dinatriumvetyfosfaattia (Na_2HPO_4) tai vastaavasti 60,5 g dinatriumvetyfosfaattidodekahydraattia ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) ja 46 g kaliumdivetyfosfaattia (KH_2PO_4) veteen. Liuokseen lisätään 0,80 g etyleenidiamiinitetraetikkahapon eli EDTA:n dinatriumsuolaa (TITRIPLEX III $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{N}_2\text{O}_8 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$). Liuos laimennetaan vedellä 1000 millilitraksi ja sekoitetaan. /5./

Rikkihappo, jonka pitoisuus on 1,0 mol/l, valmistetaan sekoittamalla varovasti 56 ml väkevää rikkihappoa (H_2SO_4 , tiheys 1,84 g/ml) noin 500 millilitraan vettä ja laimennetaan 1000 millilitraksi. /5./

DPD-liuos valmistetaan liuottamalla 36 ml 1,0 mol/l rikkihappoa ja 0,20 g EDTA:n dinatriumsuolaa (TITRIPLEX III) 800 ml:n vettä 1000 ml:n mittapullossa. Liuokseen lisätään 1,1 g N,N-dietyyli-p-fenyleenidiamiinisulfaattia eli DPD:tä ($((\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{NH}_2)\text{H}_2\text{SO}_4$). Liuos laimennetaan vedellä 1000 millilitraksi ja sekoitetaan. /5./

Kaliumjodaatin perusliuos, jonka pitoisuus on 4,7 mmol/l, valmistetaan liuottamalla 1,006 g kaliumjodaattia (KIO_3) noin 250 millilitraan vettä 1000 ml:n mittapullossa. Liuos laimennetaan vedellä ja sekoitetaan. /5./

Kaliumjodaatin työliuos, jonka pitoisuus on 0,047 mmol/l, valmistetaan pipetoimalla 5 ml kaliumjodaatin perusliuosta 500 ml:n mittapulloon. Mittapulloon lisätään 0,5 g kaliumjodidia (KI) ja laimennetaan vedellä merkkiin. Työliuos valmistetaan joka työkerralla uudestaan. Kaliumjodaatin ja kloorin suhde:

1 mmol $\text{KIO}_3 \sim 3 \text{ mmol Cl}_2$ eli

1 mmol $\text{KIO}_3 \sim 212,7 \text{ mg Cl}_2$

Natriumhydroksidiliuos, jonka pitoisuus on 2 mol/l, valmistetaan liuottamalla 80 g natriumhydroksidia (NaOH) noin 800 millilitraan vettä dekantterilasissa. Liuosta sekoitetaan, kunnes kaikki natriumhydroksidi on liennut. Tämän jälkeen liuoksen annetaan jäähtyä huoneenlämpöiseksi. Lopuksi liuos siirretään 1000 millilitran mittapulloon, laimennetaan vedellä ja sekoitetaan. Kaikkien reagenssien on oltava laadultaan analyysipuhdasta. /5./

4.2.3 Kalibrointi

Laitteen kalibrointi tehdään pipetoimalla 0,3; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0 ja 6,0 kaliumjodaatin työliuosta 100 ml mittapulloihin. Pulloihin lisätään vettä noin 30 ml ja 1,0 ml 1,0 mol/l rikkihappoa. Odotetaan 1 minuutti ja sen jälkeen lisätään 1,0 ml 2,0 mol/l natriumhydroksidiliuosta. Liuoksen laimennetaan vedellä merkkiin ja sekoitetaan. Täten valmistetut liuokset ovat pitoisuudeltaan 0,03; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5 ja 0,6 mg/l. /5./

Sekoitetaan 250 ml erlenmeyerpullossa 5,0 ml fosfaattipuskuriliuosta ja 5,0 ml DPD-liuosta. Välittömästi minuutin kuluessa kaadetaan vertailuliuokset erlenmeyer-pulloihin ja sekoitetaan. Seoksen absorbanssi mitataan 2 minuutin kuluessa aallonpituudella 510 nm vesi referenssinä. /5./

Vertailukäyrä piirretään siten, että se esittää vertailuliuoksen absorbanssit klooripitoisuuden (mg/l Cl_2) funktiona. Vertailukäyrä tarkistetaan vähintään yhden vertailuliuoksen avulla jokaisen määrittäykerran yhteydessä. /5./

4.2.4 Vapaan kloorin määrittäminen

Vapaa kloori määritetään pipetoimalla 5,0 ml fosfaattipuskuriliuosta ja 5,0 ml DPD-liuosta erlenmeyerpulloon ja sekoitetaan. Lisätään välittömästi 100 ml näytettä ja sekoitetaan uudelleen. Liuoksen absorbanssi mitataan 2 minuutin kuluessa. Mitattua absorbanssia vastaava klooripitoisuus (ρ_a) luetaan vertailukäyrältä. /5./

4.2.5 Kokonaiskloorin määrittäminen

Kokonaiskloori määritetään sekoittamalla 5,0 ml fosfaattipuskuriliuosta, 5,0 ml DPD-liuosta ja 1 g kaliumjodidikiteitä erlenmeyerpullossa. Lisätään välittömästi 100 ml näytettä ja sekoitetaan uudelleen. Odotetaan 2 minuuttia ja mitataan liuoksen absorbanssi. Mitattua absorbanssia vastaava klooripitoisuus (ρ_b) luetaan vertailukäyrältä. /5./

Jos näyte on hyvin hapan tai emäksinen, tarkistetaan lisätyn puskuriliuosmäärän riittävyys, jotta näytteen pH-arvo pysyy alueella 6,2–6,5. Jos pH-alue ei pysy annetulla alueella, täytyy puskuriliuosta lisätä enemmän. Mahdollinen lisäys tulee ottaa huomioon kloorin lopputulosta laskettaessa. /5./

4.2.6 Klooripitoisuus yli 0,6 mg/l

Jos näytteen klooripitoisuus on suurempi kuin 0,6 mg/l, määrittäminen suoritetaan seuraavasti: Määrittämiseen valittava näytetilavuus (V_x ml) valitaan sellaiseksi, että se kloorimäärä, joka tulee olemaan reagenssiseoksessa laimennuksen jälkeen, on pienempi kuin 0,6 mg/l. Reagenssiseokseen lisätään $(100-V_x)$ ml vettä sekä V_x ml näytettä ja sekoitetaan. Tämän jälkeen määritetään vapaan kloorin ja kokonaiskloorin pitoisuus, kuten kohdassa 4.2.4 ja 4.2.5. /5./

4.2.7 Tulosten laskeminen

Tulokset ilmoitetaan seuraavien kaavojen avulla:

$$\text{vapaa kloori} = \rho_a \text{ mg/l Cl}_2$$

$$\text{sitoutunut kloori} = \rho_b - \rho_a \text{ mg/l Cl}_2$$

$$\text{kokonaiskloori} = \rho_b \text{ mg/l Cl}_2$$

, joissa ρ_a on kohdassa 4.2.4. saatu klooripitoisuus, mg/l Cl_2

ρ_b on kohdassa 4.2.5. saatu klooripitoisuus, mg/l Cl_2

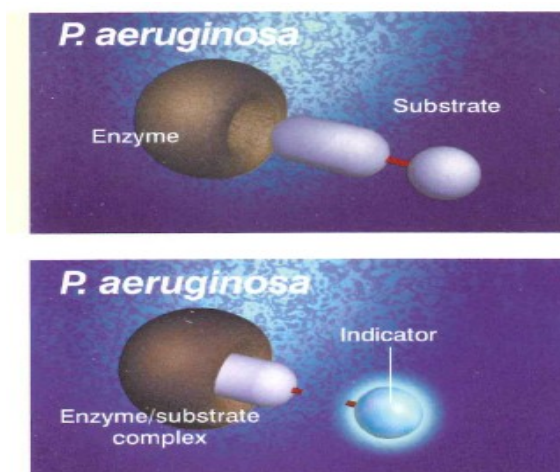
Laimennettujen näytteiden lopputulosta laskettaessa määrittämisessä saatu tulos kerrotaan laimennuskertoimella $f = 100/V_x$, jossa V_x on määrittämiseen otettu näytetilavuus. /5./

4.2.8 Häiriötekijöitä ja analyysituloksen laadunvarmistus

DPD:n kanssa reagoivat myös monet muut hapettavat aineet, kuten bromi, jodi, otsoni, vetyperoksidi, jodaatti, mangaani(IV)- ja mangaani(VII)-yhdisteet, kromaatti, rauta(III)- ja kupari(II)-ionit, jotka aiheuttavat häiriötä analysoinnissa. Raudan ja kuparin aiheuttama häiriö estetään etyleenidiamiinitetraetikkahapolla eli EDTA:lla. / 5./

Laadunvarmistukseksi vertailuliuoksesta ja näytteistä tehdään joka kerta kaksi rinnakkaista näytettä. Kun pitoisuus on >1 mg/l rinnakkaisten näytteiden ero saa kokonaiskloorissa olla enintään 0,08 mg/l ja vapaalla kloorilla 0,07 mg/l. Kun pitoisuus on <1 mg/l rinnakkaisten näytteiden ero saa kokonaiskloorissa olla enintään 0,02 mg/l ja vapaalla kloorilla 0,03 mg/l. Kalibroinnin tarkistus tehdään standardilla 0,500 mg/l. /5./

5 UIMA-ALLASVESIEN PIKA-ANALYYSIMENETELMÄT



Kuva 1: *Pseudomonas aeruginosan* entsyymireaktio /11./

5.1 Pseudalartin periaate ja käyttö

Pseudalert-testillä havaitaan *Pseudomonas aeruginosan* läsnäolo pullotetussa vedessä sekä kylpylä- ja uimahallivedessä. Testi perustuu entsyymitekniikkaan, joka

viestii bakteerin olemassaolosta. *Pseudomonas aeruginosa* solut kasvavat nopeasti ja lisääntyvät käyttäen Pseudalert-reagenssissa olevia aminohappoja, vitamiineja ja muita ravinteita hyödykseen. Aktiivisesti kasvavalla *Pseudomonas aeruginosa* kannalla on entsyymi, joka tarttuu substraattiin tuottaen sinistä fluoresenssia UV-valon alla (kuva 1). /12./



Kuva 2: Näytepullo, reagenssi ja Quanti Tray-liuska

Pseudalert-menetelmää on helppo ja yksinkertaista käyttää. Näytettä mitataan 100 ml steriiliin, läpinäkymättömään, fluoresoimattomaan pulloon. Pulloon lisätään Pseudalert-reagenssi ja annetaan tämän liueta varovasti välillä ravistaen. Näyte kaadetaan Quanti-Tray -liuskaan (kuva 2) ja suljetaan sulkijalaitteen avulla. Liuskaa inkuboidaan $38\pm 0,5$ °C:ssa 24 tuntia. /12./

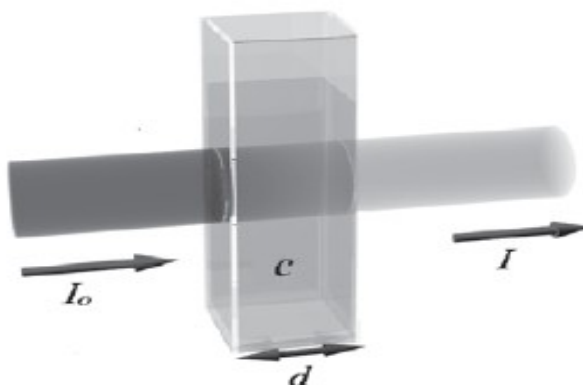


Kuva 3: UV-valossa sininen fluoresenssi

Tulos on positiivinen *Pseudomonas aeruginosalle*, jos UV-valossa havaitaan sininen fluoresenssi (kuva 3). Tällöin lasketaan positiiviset kuplat ja katsotaan lopullinen

bakteeripitoisuus MPN-taulukosta. Tulos on negatiivinen, jos fluoresointia ei havaita. Tulokset ovat päteviä 28 tuntiin asti. /12./

5.2 Fotometrin mittausperiaate



Kuva 4: Valonsäteen kulku kyvetissä

Kun valonsäde kohtaa värillisen näyteliuoksen, se menettää intensiteettiään. Toisin sanoen näyte absorboi osan valosta. Riippuen määritettävästä aineesta, absorptio tapahtuu tietyssä aallonpituudessa. Transmittanssi määritetään intensiteettien avulla (kaava 1, kuva 4). /13./

$$T = \frac{I}{I_0} \quad 1.$$

,jossa T = transmittanssi

I = valon alkuperäinen intensiteetti

I_0 = läpäisseen valon intensiteetti.

Absorbanssin ja transmittanssin välillä on kaavan 2 mukainen yhteys.

$$A = -\log T \quad 2.$$

Lambert-Beerin laki osoittaa kaavan 3 mukaisesti eri muuttujien riippuvuuden toisistaan.

$$A = \epsilon_\lambda \cdot c \cdot d \quad 3.$$

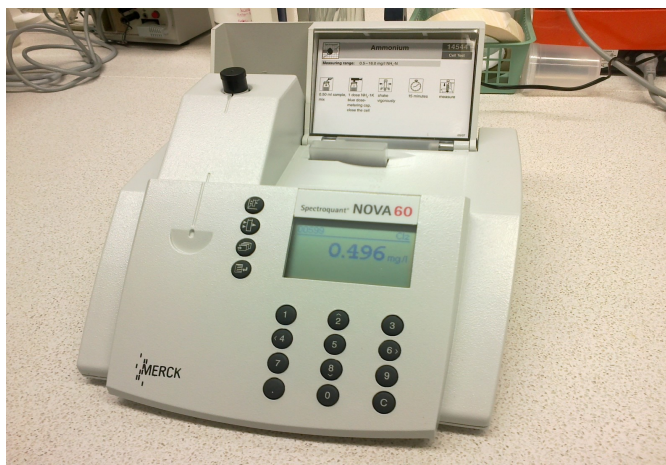
,jossa A = absorbanssi

ϵ_λ = molaarinen absorptiokerroin

c = näytteen konsentraatio, mol/l

d = kyvetin paksuus, cm.

5.2.1 Nova 60 -fotometri



Kuva 5: Nova 60 -fotometri

Nova 60 -fotometri (kuva 5) eroaa muista fotometreista monella eri tapaa. Laitteeseen on tallennettu valmiiksi kalibrointisuora, joka nopeuttaa mittaamista. Tulos pystytään lukemaan joko konsentraationa (mg/l) tai absorbanssina nopeasti vaihtamalla tulostenlukutapaa. Laite valikoi automaattisesti kymmenistä siihen tallennetuista vaihtoehdoista mittaamismetodin Auto Selector -kyvetin avulla. Samalla laitteella voidaan mitata välillä esim. ammoniumia vaihtamalla Auto Selector -kyvetiä ja palata takaisin alkuperäisen yhdisteen mittaamiseen. Laite tunnistaa kolme eri kyvettikokoa ja valitsee sille tarkoitetun määritysrajan automaattisesti. / 13./

5.2.2 Laitteen esivalmistelut

Laite kytkeytyy päälle kannen avautuessa. Fotometriin tehdään jokaisella käyttökerralla sen nollaus. Nollaus tapahtuu painamalla laitteen alimmaista valikko-näppäintä ja valitaan nuolinäppäimillä valikosta Meter Setup ja edelleen valitaan adjust zero enter-painikkeella. Näyttöön tulee teksti: insert cell or start measurement, jolloin kyvetiin laitetaan tislattua vettä ja asetetaan se laitteeseen. Mittaus käynnistyy automaattisesti ja muutaman sekunnin kuluttua näyttöön ilmestyy teksti: round ok. Nollaus on täten onnistunut. /13./

Ennen mittausta laitteeseen asetetaan AutoSelector -kyvetti pyöreään kyvetiaukkoon ja kohdistetaan se. Fotometri tunnistaa AutoSelector -kyvetin ja valitsee automaattisesti oikean menetelmän. Lopuksi painetaan ylimmäistä pitoisuuden mittaus -painiketta ja näyttöön ilmestyy teksti insert cell or start measurement. Mittaus voidaan aloittaa ohjeiden mukaisesti. /13./

5.2.3 Mittaaminen



Kuva 6: Fotometrin reagenssit

Vapaa kloori mitataan fotometrillä pipetoimalla 10 ml näytettä koeputkeen ja lisäämällä yksi mittalusikallinen pulverimaista $\text{Cl}_2\text{-1}$ reagenssia (kuva 6). Koeputkea sekoitetaan voimakkaasti, jotta reagenssi liukenee ja värireaktio syntyy. Odotetaan yksi minuutti, ja siirretään koeputken sisältö 50 mm:n lasikyvettiin. Kyvetti asetetaan laitteeseen ja mittaus alkaa automaattisesti. Mittaaminen kestää noin 3 sekuntia. /13./

Kokonaiskloori mitataan pipetoimalla 10 ml näytettä koeputkeen ja lisäämällä yksi mittalusikallinen $\text{Cl}_2\text{-1}$ reagenssia sekä kaksi tippaa $\text{Cl}_2\text{-2}$ reagenssia (kuva 6). Koeputkea sekoitetaan voimakkaasti, jotta reagenssi liukenee. Odotetaan yksi minuutti, siirretään koeputken sisältö 50 mm:n kyvettiin ja asetetaan kyvetti laitteeseen. Mittaus alkaa automaattisesti. /13./

Kyvetin, jonka koko on 50 mm, mittausalue on 0,010-1,000 mg Cl_2 / l. Jos näytteen pitoisuus on yli 1,000 mg Cl_2 / l, näytettä laimennetaan sopivasti kohdan 4.2.6 mukaisesti, ja suoritetaan uusintamittaus. /13./

6 TYÖN SUORITUS

6.1 Mikrobiologisten menetelmien validointi

Validointi tarkoittaa prosessia, joka antaa todisteita menetelmän toimivuudesta. Sen tarkoituksena on tuottaa vertailuarvoja suureille, jotka kuvaavat menetelmän luotettavuutta. Mikrobiologiassa tällaisia suureita ovat muun muassa suhteellinen oikeellisuus, toistettavuus, uusittavuus, spesifisyys, herkkyys, virhepositiivisuus ja -negatiivisuus. /1./, /17./

Suhteellinen oikeellisuus tarkoittaa käyttöön hyväksytyyn menetelmän ja validoitavan menetelmän antamien tulosten vastaavuutta tai lähekkäisyyttä. Toistettavuudella tarkoitetaan peräkkäisten toistojen antamien tulosten lähekkäisyyttä, kun analyysi on suoritettu samalla menetelmällä, samoissa olosuhteissa ja samojen henkilöiden toimesta lyhyellä aikavälillä. Uusittavuus tarkoittaa yksittäisten analyysitulosten lähekkäisyyttä, joita on tutkittu eri henkilöiden toimesta. Spesifisyydellä tarkoitetaan kvantitatiivisten ja kvalitatiivisten menetelmien kykyä löytää tutkittava mikrobi näytteessä olevista häiriötekijöistä huolimatta. Herkkyys on menetelmän kyky todeta vähäiset vaihtelut määritettävien mikrobien pitoisuuksissa. Tämä on tärkeä ominaisuus verrattaessa menetelmiä toisiinsa. Virhepositiivisuus tarkoittaa menetelmän antamaa virheellistä positiivista tulosta, jolloin siirrostettu näyte ei todellisuudessa sisällä tutkittavaa mikrobia. Vastaavasti virhenegatiivisuus tarkoittaa virheellistä negatiivista tulosta. /18./

Validointi suoritetaan tutkimalla tunnetun mikrobipitoisuuden omaavia referenssimateriaaleja sekä siirrostettuja näytteitä. Kvalitatiivisten menetelmien validoinnissa tutkitaan yksi mikrobipitoisuus, joka on yleensä noin 10 pmy/tutkittava näyte. Validointituloksista tulee ilmetä menetelmien osalta toteamisraja sekä virhepositiiviset ja -negatiiviset tulokset. /1./, /18./

6.1.1 *Pseudomonas aeruginosa* tutkimusmenetelmät

Pseudomonas aeruginosa bakteerimassaa siirrostettiin veriagarilta BHI-liemeen (Brain Heart Infusion Broth, valmistaja Labema Oy), jota rikastettiin +37 °C:ssa 24

h. Liemestä pipetoitiin 0,3 ml koeputkeen, jossa oli 10 ml tislattua vettä. Laimennosta jatkettiin liitteessä 2 tai 8 olevien ohjeiden mukaisesti. Liitteessä 2 esitetyn työohjeen mukaisia analyysieja tehtiin kolme kappaletta ja liitteessä 8 esitetyn työohjeen mukaista analyysia yksi kappale.

Näytteitä suodatettiin 100 ml:n erissä viidelle eri suodatinpaperille työohjeen mukaisesti. Suodatinpaperit siirrettiin Pseudomonas-agarille (CN Selective Agar Base for Pseudomonas, valmistaja Scharlau), joita inkuboitiin +36 °C:ssa 44 h, jonka jälkeen tulokset luettiin.

Näytteet jaettiin 100 ml:n eriin viiteen eri pulloon työohjeen mukaisesti, joihin liuotettiin Pseudalert-reagenssi. Reagenssin annettiin liueta ja näytteet siirrettiin liuskoille jotka suljettiin erillisellä laitteella. Liuskojen annettiin inkuboitua +38 °C:ssa 24 h, jonka jälkeen tulokset luettiin.

6.1.2 T-testin teoria ja esimerkkilasku

T-testi perustuu Studentin jakaumaan, jotka ovat välineitä tilastollisten päätelmien tekemiseen. T-testillä mitataan tilastollisten jakaumien odotusarvojen eroja. T-testin yhteydessä käytetään Studentin t-jakauman nimellä tunnettua, monilta osin normaalijakaumaa muistattavaa jatkuvaa tilastollista jakaumaa. /7./

Pseudomonas aeruginosan tutkimusmenetelmien tuloksien avulla laskettiin t-testin mukainen t-arvo. Testiin tarvittiin viisi rinnakkaista analyysitulosta, jotka toimivat tilastollisen laskennan muuttujina. Esimerkiksi 3.5.2011 tehdystä analyysistä saatiin taulukon 2 mukaiset tulokset.

Taulukko 2: Pseudomonas-agarin ja Pseudalertin tulokset

Näyte nro	Ps-agar 22 h, pmy	Ps-agar 44 h, pmy	Pseudalert, MPN
1	51	51	38,4 → 38
2	43	43	50,4 → 50
3	44	44	40,6 → 41
4	42	42	27,1 → 27
5	33	37	32,4 → 32

Tulokset muutetaan neliöjuuriksi taulukon 3 mukaisesti.

Tulos, Ps-agar	Neliöjuuri, Ps-agar	Tulos, Pseudalert	Neliöjuuri, Pseudalert
51	7,141	38	6,164
43	6,557	50	7,071
44	6,633	41	6,403
42	6,481	27	5,196
37	6,083	32	5,657

Lasketaan tuloksista rinnakkaisnäytteiden erotus d kaavalla 4, josta saadaan taulukon 4 mukaiset tulokset.

$$d = \sqrt{Ps\text{agar}} - \sqrt{Pseudalert} \quad 4.$$

$$d = 7,141 - 6,164 = 0,977$$

Näyte nro	Tuloksien erotus, d
1	0,977
2	-0,514
3	0,230
4	1,285
5	0,426

Lasketaan erotusten keskiarvo d_{ka} kaavalla 5, jolloin keskiarvoksi saadaan 0,481.

$$d_{ka} = \frac{\sum d}{n} \quad 5.$$

jossa n =erotusten lkm

$$d_{ka} = \frac{0,977 + (-0,514) + 0,230 + 1,285 + 0,426}{5} = 0,481$$

Lasketaan erotusten keskihajonta S_d kaavalla 6, jolloin hajonnaksi saadaan 0,698.

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum (d - d_{ka})^2}{n - 1}} \quad 6.$$

$$(d - d_{ka})^2 = (0,977 - 0,481)^2 + (-0,514 - 0,481)^2 + (0,230 - 0,481)^2 + (1,285 - 0,481)^2 \\ + (0,426 - 0,481)^2 = 1,947$$

$$S_d = \sqrt{\frac{1,947}{5 - 1}} = 0,698'$$

Lopuksi lasketaan Studentin t-arvo kaavalla 7.

$$t = \frac{d_{ka}}{S_d / \sqrt{n}} \quad 7.$$

$$t = \frac{0,481}{0,698 / \sqrt{5}} = 1,54$$

Jos t-arvon itseisarvo on $>2,78$ (liite 17), eroavat viiden levyn sarjat toisistaan merkitsevästi 5 %:n merkitsevyystasolla eli silloin menetelmät poikkeavat toisistaan merkittävästi. /10./

Tässä tapauksessa t-arvoksi saadaan 1,54, joka on pienempi kuin 2,78. Voidaan todeta, että uusi menetelmä toimii yhtä hyvin, kuin SFS-standardin mukainen menetelmä.

6.2 Kemiallisten menetelmien validointi

Validoinnin tarkoituksena on osoittaa, että laboratorion käyttämä menetelmä toimii hyväksyttävästi sille tarkoitettuun tehtävään. Menetelmän toimivuutta tarkastellaan analysoimalla vertailu- tai standardinlisäysnäytteitä. Tarvittaessa tarkistetaan lisäksi esimerkiksi selektiivisyys, lineaarisuus, tarkkuus, toistotarkkuus, mittausalue sekä toteamis- ja määrittämissrajat. /1./, /14./

Menetelmän määrittämissraja on pienin analysoitavan aineen pitoisuus, joka voidaan määrittää hyväksyttävällä tarkkuudella. Tällöin tietyllä tilastollisella todennäköisyy-

dellä (yleensä 95 %) voidaan todeta, että näytteessä oleva pitoisuus poikkeaa merkittävästi nolasta. Määritysrajan laskenta on esitettyinä kohdassa 6.2.3. Toteamisrajalla tarkoitetaan pienintä pitoisuutta, joka voidaan luotettavasti todeta, sisältääkö näyte tutkittavaa yhdistettä vai ei. /14./, /15./

6.2.1 Kloorin määrittäminen

Kloori määritettiin fotometrillä ja spektrofotometrillä samanaikaisesti, jotta tulokset olisivat verrattavissa toisiinsa. Spektrofotometrillä määritettiin kokonaiskloorista ja vapaasta kloorista kaksi rinnakkaista näytettä. Fotometrillä määritettiin kokonaiskloorista ja vapaasta kloorista neljä rinnakkaista näytettä, jotta saatiin riittävästi vertailumateriaalia. Tulokset ovat esitettyinä liitteissä 10-14.

6.2.2 Fotometrin ja spektrofotometrin tilastollinen vertailu t-testillä

Kahden eri menetelmän vertailua voidaan arvioida tilastollisesti monella eri tapaa. Seuraavassa on esitettyä laskuesimerkki työssä käytettyyn vertailuun. Esimerkkiin on käytetty vapaan kloorin analyysituloksia. Lasketaan kaikkien analyysituloksien välinen keskiarvo kaavalla 8.

$$Ka = \frac{Näyte\ 1_{fotometri} + Näyte\ 1_{spekt.fotom.}}{2} \quad 8.$$

$$Ka = \frac{0,7615 + 0,7558}{2} = 0,7587$$

Lasketaan analyysien välinen erotus ja nostetaan se toiseen potenssiin kaavan 9 ja 10 mukaisesti.

$$d_i = Näyte\ 1_{fotometri} - Näyte\ 1_{spekt.fotom.} \quad 9.$$

$$d_i = 0,7615 - 0,7558 = 0,0057$$

$$d_i^2 = 0,0057^2 = 0,00003 \quad 10.$$

Lasketaan analyysien keskiarvojen, erotusten ja erotusten neliöiden summat.

Saadaan:

$$\Sigma (ka) = -0,0109$$

$$\Sigma (d_i) = -0,3711$$

$$\Sigma (d_i^2) = 0,058$$

Varianssi lasketaan kaavalla 11.

$$S_d^2 = \frac{\sum d_i^2 - \frac{(\sum d_i)^2}{n}}{n-1} \quad 11.$$

$$S_d^2 = \frac{0,058 - \frac{-0,3711^2}{34}}{34-1} = 0,0016$$

Lopullinen t-arvo lasketaan kaavalla 12.

$$t = \frac{|ka|}{S_d^2/n} \quad 12.$$

$$t = \frac{|-0,0109|}{0,0016/34} = 1,577$$

Taulukosta saadaan teoreettinen $t_{0,05(33)} = 2,035$ (liite 17). Koska laskettu t-arvo on teoreettista arvoa pienempi, menetelmällä ei ole eroa 5 %:n merkitsevyystasolla. Liitteeseen 15 on taulukoitu vapaan kloorin ja kokonaiskloorin t-arvo.

6.2.3 Kloorin määrittämissuorituksen laskeminen

Määrittämissuoritus laskettiin analysoimalla fotometrillä kaksi viiden näytteen sarjaa. Näytteenä käytettiin 2.9.2011 analysoitua uimahallivettä näytenumeroa 1 sekä 20.9.2011 analysoitua uimahallivettä näytenumeroa V 205. Näytteitä laimennettiin suhteessa 1:10, jolloin uuden näytteen pitoisuudeksi arvioitiin olevan noin 0,06 mg/l. Tämä pitoisuus on SFS-standardin alarajoilla oleva määrä. Määrittämissuorituksessa saatiin taulukon 5 mukaiset tulokset.

Taulukko 5. Fotometrin tulokset vapaalle kloorille näytteestä nro 1, laimennos 1:10

	mg/l	mg/l
1	0,070	0,067
2	0,072	0,070
3	0,072	0,071
4	0,075	0,063
5	0,061	0,066
6	0,082	0,062
7	0,069	0,061
8	0,069	0,066
9	0,069	0,054
10	0,078	0,058

Lasketaan tuloksista näytteiden välinen erotus d kaavalla 8, jolloin saadaan taulukon 6 mukaiset tulokset.

$$d = \text{Sarja 1} - \text{Sarja 2} \quad 8.$$

$$d_1 = 0,070 - 0,067 = -0,003$$

Taulukko 6. Tulosten erotus d

	d
1	0,003
2	0,002
3	0,001
4	0,012
5	-0,005
6	0,020
7	0,008
8	0,003
9	0,015
10	0,020

Erotus d nostetaan toiseen potenssiin kaavan 9 mukaisesti, minkä tulokset on koostettu taulukkoon 7.

$$d^2 = (0,003)^2 = 0,000009 \quad 9.$$

Taulukko 7. Erotuksen d toinen potenssi	
	d^2
1	0,000009
2	0,000004
3	0,000001
4	0,000144
5	0,000025
6	0,000400
7	0,000064
8	0,000009
9	0,000225
10	0,000400
$\sum d^2$	0,001281

Keskihajonta s lasketaan kaavalla 10.

$$s = \sqrt{\frac{\sum d^2}{2n}} \quad 10.$$

$$s = \sqrt{\frac{0,001281}{2 * 10}} = 0,0080$$

Lopullinen määrittäysraja lasketaan kaavalla 11. Kaavassa käytetään taulukoituja vakioita, joka tässä tapauksessa on $t_{0,05(9)} = 1,833$.

$$M = 2\sqrt{2} t_{0,05(9)} s \quad 11.$$

$$M = 2\sqrt{2} \times 1,833 \times 0,0080 = 0,0414 \text{ mg/l}$$

$$M \approx 0,04 \text{ mg/l}$$

7 TULOKSET

7.1 Pseudalartin tulokset

T-testejä tehtiin neljä kappaletta kahdella eri työohjeella (liitteet 2 ja 8). Taulukossa 8 on esitetty Pseudalartin ja Ps-agarin välisestä t-testistä saadut t-arvot.

Pvm	Arvo
03.05.11	1,54
11.05.11	2,63
17.08.11	-0,25
19.06.11	-0,54

Pika-analyysimenetelmästä ja SFS-standardin mukaisesta analyysimenetelmästä suoritettiin viisi rinnakkaisanalyysiä, joiden t-arvo laskettiin kohdan 6.1.2. mukaisesti. Liitteissä 3-5 sekä 9 on taulukoitu rinnakkaisanalyysien tarkat tulokset. Tuloksien mukaan t-arvo pysyi kaikissa testeissä alle arvon 2,78.

Pseudalartin luotettavuutta arvioitiin myös analysoimalla laimennossarja liitteen 6 työohjeen mukaisesti. Taulukossa 9 on esitettynä saadut tulokset sekä laskettu teoreettinen tulos.

Laimennos	Ps-agar, pmy	Pseudalart, MPN	Teoreettinen tulos, pmy
0,1 ml/100 ml	2	0	2,5-3,6
1,0 ml/100 ml	22	19	25-36
2,0 ml/100 ml	50	56	50-72
3,0 ml/100 ml	30	59	75-108
4,0 ml/100 ml	60	70	100-144

Taulukosta nähdään, että pienillä bakteeripitoisuuksilla tulokset pysyvät lähellä teoreettista arvoa. 3,0 ml/100 ml sekä 4,0 ml/100 ml olevien analyysien tulokset jäivät hieman haluttua pienemmiksi, mutta ottaen huomioon mittausepävarmuustekijät tulokset ovat hyviä.

7.2 Fotometrin tulokset

Taulukkoon 10 on koostettu kaikki tulokset fotometristä ja spektrofotometristä.

Taulukko 10. Yhteenveto tuloksista						
	Vapaa kloori		Kokonaiskloori		Sitoutunut kloori	
	F	S	F	S	F	S
17.08.11						
V 301 1.	0,76	0,76	0,84	0,89	0,08	0,13
V 301 2.	0,76	0,76	0,84	0,89	0,08	0,13
V 302 1.	0,36	0,38	0,51	0,58	0,15	0,20
V 302 2.	0,36	0,38	0,50	0,59	0,14	0,20
V 303 1.	0,74	0,82	-	1,05	-	-
V 303 2.	0,75	0,80	-	1,03	-	-
V 304 1.	0,61	0,67	0,71	0,73	0,10	0,06
V 304 2.	0,62	0,68	0,69	0,74	0,08	0,07
18.08.11						
1,1	0,38	0,32	0,61	0,70	0,24	0,38
1,2	0,38	0,33	0,60	0,69	0,22	0,37
2,1	0,81	0,80	0,94	0,87	0,12	0,07
2,2	0,80	0,80	0,92	0,93	0,11	0,13
3,1	0,72	0,74	0,83	0,87	0,11	0,13
3,2	0,70	0,70	0,83	0,87	0,12	0,16
4,1	0,66	0,67	0,69	0,73	0,03	0,06
4,2	0,65	0,64	0,70	0,73	0,05	0,09
02.09.11						
1,1	0,59	0,56	0,64	0,69	0,05	0,13
1,2	0,58	0,56	0,61	0,69	0,03	0,13
2,1	0,47	0,47	0,61	0,69	0,14	0,22
2,2	0,48	0,46	0,62	0,70	0,14	0,24
3,1	0,43	0,43	0,57	0,58	0,14	0,15
3,2	0,43	0,43	0,56	0,58	0,13	0,15
20.09.11						
V 201 1.	0,57	0,56	0,69	0,80	0,13	0,23
V 201 2.	0,58	0,56	0,69	0,80	0,11	0,23
V 202 1.	0,62	0,68	0,88	0,97	0,26	0,29
V 202 2.	0,63	0,67	0,88	0,97	0,25	0,30
V 203 1.	0,55	0,57	0,69	0,80	0,14	0,22
V 203 2.	0,55	0,55	0,68	0,80	0,13	0,25
V 204 1.	1,26	1,35	1,43	1,60	0,17	0,25
V 204 2.	1,23	1,36	1,44	1,63	0,21	0,27

F = fotometri
S = spektrofotometri

Yhteenvedosta nähdään, että vapaan kloorin analyysitulokset pysyvät pääasiassa lähellä toisiaan. Kokonaiskloorin tuloksissa on lähes jokaisessa näytteessä eroa fotometrin ja spektrofotometrin välillä.

Tilastollisesti spektrofotometrin ja fotometrin välistä luotettavuutta arvioitiin t-testillä. T-arvo laskettiin kohdan 6.2.2 mukaisesti. Vapaan kloorin t-arvoksi saatiin 1,577 ja kokonaiskloorin t-arvoksi 7,101. Liitteessä 15 on taulukoitu tarkemmat tiedot t-arvon laskentaan. Lasketun vapaan kloorin t-arvo on pienempi kuin teoreettinen t-arvo $t_{0,05(33)}=2,035$. Kuitenkin lasketun kokonaiskloorin t-arvo on suurempi kuin teoreettinen t-arvo $t_{0,05(27)}=2,052$. Tällöin kokonaiskloori eroaa 5 %:n merkitsevyys tasolla. Teoreettinen t-arvotaulukko löytyy liitteestä 17.

Vapaalle kloorille ja kokonaiskloorille laskettiin määrittämissä kohdan 6.2.3. mukaan 0,04 mg/l. SFS-standardissa on määritetty kloorin alarajaksi 0,03 mg/l, joka on pienempi kuin fotometrille laskettu määrittämissä raja. Liitteessä 16 on taulukoitu käytetyt arvot määrittämissä rajan laskentaan.

8 PÄÄTELMÄT

8.1 Pseudalartin käyttöluotettavuus ja häiriötekijät

Mikrobiologisissa tutkimuksissa mittausepävarmuutta esiintyy aina tuloksissa. Tulosten oikeellisuuden eli täsmällisesti oikean tuloksen määrittäminen on vaikeaa. Mikrobit ovat elävää materiaalia, jolloin valmisteiden, joiden todellinen pitoisuus olisi tiedossa ja pysyisi muuttumattomana, on mahdotonta. Mikrobiologiassa oikeana tuloksena pidetään yleensä menetelmän antaman keskiarvotuloksen, jolloin tarvitaan useita toistoja, ja hyväksytyyn arvon lähekkäisyyttä. /18./ Tämän vuoksi validoinnissa suoritetaan viisi rinnakkaisanalyysia, joista voidaan arvioida bakteerin keskimääräistä lukumäärää. Aluksi t-testi suoritettiin laboratorion oman sisäisen laadunvalvontaohjeen mukaisesti (liite 2). Huomattiin, että 500 ml on vaikea annostella tasaisesti, koska annosteleminen suoritettiin vapaalla kädellä suodatinlaitteiston tilavuusmittojen mukaisesti. Tästä johtuen viimeiseen näytteeseen

saattoi jäädä alle 100 ml näytettä. Analysointia jatkettiin mittaamalla näytepulloihin 200 ml laimennosliuosta (liite 8) ja haluttu määrä BHI-lientä. Samasta pullosta jaettiin 100 ml suodatukseen sekä 100 ml Pseudalertia varten. Tämän ajateltiin tuottavan varmempia vertailutuloksia SFS-standardin mukaisen analyysin ja pika-analyysin välille. Tuloksiin ei kuitenkaan tullut merkittävää eroa, joten palattiin takaisin analysoimalla näytettä laadunvalvontaohjeen mukaisesti.

Negatiivisia uimavesinäytteitä tutkittaessa Quanti Tray -liuska fluoresoi kokonaan heikosti, joka tuotevalmistajan ohjeen mukaan tulkitaan positiiviseksi *Pseudomonas aeruginosaksi*. Positiiviset itse valmistetut näytteet (liitteet 2,6 ja 8) fluoresoivat aina voimakkaasti eikä heikkoa fluoresointia esiintynyt. Huomattiin, että Pseudalert-reagenssi reagoi fluoresoivasti myös *E. coli* kanssa, jolloin pikamenetelmä antaa ristiriitaisia tuloksia indikaattoribakteerista. *E. coli* ei ole merkityksellinen uima-allasveden laatuvaatimuksen kannalta, koska se on herkkä kloorille eikä yleisesti ottaen esiinny uima-allasvesissä.

Tehtyjen tulosten perusteella pika-analyysimenetelmä on tilastollisesti hyvä, koska jokainen tehty tutkimustulos pysyi annetun t-arvon alapuolella. Kuitenkin luotettavuudesta ei ole tietoa, koska *E. coli* esiintyminen näytteessä aiheuttaa häiriötekijöitä tulosten luvussa. Jotta pikamenetelmä voisi ottaa käyttöön, tulee sillä tehdä vielä lisätutkimuksia häiriötekijöiden poistamiseksi.

8.2 Fotometrin virhearviointi ja analysointiluotettavuus

Kloori hajoaa nopeasti ollessaan kosketuksissa hapen kanssa, joten mittausvirheen minimoimiseksi näytteet käsiteltiin samanlaisissa mittausolosuhteissa. Näytteiden pitoisuudet pyrittiin mittaamaan fotometrillä ja spektrofotometrillä tulosten verrattavuuden vuoksi aina samanaikaisesti. Mittausvirhettä saattaa tulla myös reagenssien annostelemisessa. Cl-1 -reagenssin määrä saattoi vaihdella, koska annostelu tehtiin punnitsemisen sijasta mittalusikalla. Samoin nestemäisen Cl-2 -reagenssin määrä annosteltiin pipetoimisen sijasta tippapullolla, joka on epätarkempi mittaustapa. Laitetoimittajan mukaan reagenssien virhe on hyvin minimaalinen. Näytteiden analysoinnin yhteydessä muutama otteeseen reagenssit eivät tuottaneet punaista värireaktiota. Tästä johtuen liitteessä 10 on analysoimattomia rinnakkaisnäytteitä.

Sama toistui mitattaessa kalibrointiliuosta. Kloorin häviäminen siinä ajassa ei teoriassa pitäisi olla mahdollista.

Laitevalmistaja ilmoittaa fotometrin olevan SFS-standardin kanssa analoginen. Vapaan kloorin pitoisuudet olivat yleensä lähellä toisiaan ja myös t-testi osoitti pitoisuuksien eron vähäiseksi. Kuitenkin kokonaiskloorin osalta eroavaisuutta laitteiden välillä todettiin t-testin perusteella olevan huomattavasti (liite 15). Laboratorio ilmoittaa vapaan kloorin ja kokonaiskloorin mittausepävarmuudeksi $\pm 20\%$. Suurimmat erot laitteiden välillä saatiin 20.9.11 analysoiduista tuloksista (liite 14). Ottaen huomioon annetun mittausepävarmuuden, tulokset pysyivät tässäkin tapauksessa rajoissa kokonaisklooripitoisuuden eron ollessa jopa 0,19 mg/l. Fotometrille ei analysoitu sen omaa mittausepävarmuutta.

Laitevalmistaja ilmoittaa fotometrin mittausalueen olevan 50 mm:n kyvetillä 0,01-1,000 mg/l Cl₂. Tehtyjen mittausten perusteella laskettiin määritysrajaksi 0,04 mg/l. Spektrofotometrin määritysrajaksi on laskettu 0,03 mg/l. Liitteessä 1 esitettyjen laatuvaatimuksen perusteella pH:n ollessa $\leq 7,3$, tulee vapaan kloorin olla $\geq 0,3$ mg/l. Laitteiden välisten erojen vuoksi laitetoimittaja suositteli tekemään laitteelle korjauskalibroinnin, jolloin kyvetin tuottama absorbanssi mitataan ja se huomioidaan automaattisesti mittauksissa. Tämä ei kuitenkin tuottanut eroa klooripitoisuuksiin.

Tehtyjen mittausten perusteella voidaan todeta, että laite ei tilastollisesti anna tyydyttäviä tuloksia. Laite pystyy kuitenkin antamaan luotettavia tuloksia ottaen huomioon mittausepävarmuuden. Kokeella on pystytty osoittamaan laite toimivaksi, mutta hieman epävarmaksi analyysilaitteeksi.

LÄHTEET

1. Laurila, R. Kauhajoen elintarvikelaboratorion laatukäsikirja. Kauhajoki, 2011.
2. Kauhajoen elintarvikelaboratorion www-sivut. [verkkodokumentti]. [Viitattu 4.11.2011]. Saatavissa: <http://www.kauhajoki.fi/elabra>.
3. FP Foodpark Oy:n www-sivut. [verkkodokumentti]. [Viitattu 4.11.2011]. Saatavissa: <http://www.foodpark.fi/>
4. SFS-EN ISO 16266:2008. Veden laatu. Pseudomonas Aeruginosan havaitseminen ja lukumäärän määrittäminen. Kalvasuodatusmekaniikka. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto SFS Ry, 2008.
5. SFS-EN ISO 7393-2:2000. Water quality. Determination of free chlorine and total chlorine. Part 2: Colorimetric method using N, N-diethyl-1, 4-phenylenediamine, for routine control purposes (ISO 7393-2:1985). Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto SFS Ry, 2000.
6. Soveltamisopas Allasvesiasetukseen 315/2002. Helsinki: Sosiaali- ja terveysministeriö, Opetusministeriö, Suomen Uimaopetus- ja Hengenväläliitto ry, 2002.
7. Hendolin, I. Studentin t-jakauma ja t-testi. Tiivistelmä. [verkkodokumentti]. [Viitattu 20.7.2011]. Saatavissa: <http://mathstat.helsinki.fi/kurssit/ope/kesa2006/tiiv/hendolin.PDF>.
8. Keinänen J., Kivikallio, J., Suontamo, T., Houhala, K. & Aurola, R. Uimahallien ja sivutilojen hygieniaopas. Pori: Ympäristö ja Terveys -lehti, 2002.
9. Keinänen J., Kivikallio, J., Suontamo, T., Kärnä, K. & Aalto, P. Uimahallien ja kosteiden tilojen hygieniaopas. Pori: Suomen Ympäristö- ja Terveysalan Kustannus Oy, 2010.
10. Takkinen, J. 1995, FAO:n menetelmä ei-selektiivisille, valettaville elatusaineille. Luento Lahdessa laboranttien täydennyskoulutuksessa 1.-3.2.1995.
11. IDEXX Laboratories -yrityksen sivut [verkkodokumentti]. [Viitattu: 15.9.2011]. Saatavissa: <http://www.idexx.com/water/>.

12. IDEXX Laboratories. Pseudalert käyttöohje. 2010.
13. Operating Manual: Spectroquant NOVA 60. 2004, 4. painos. Merck.
14. Kemiaallisten analyysimenetelmien validointiohje. 1997. Elintarvikevirasto.
15. Mäkinen, I., Suortti, A-M., Saares, R. & Niemi, R. Ohjeita ympäristönäytteiden kemiallisten analyysimenetelmien validointiin. 1998, 2. painos. Suomen Ympäristökeskus.
16. Todar's Online Textbook of Bacteriology [verkkodokumentti]. [Viitattu 29.12.2011]. Saatavissa: <http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>
17. SFS-ENV ISO 13843:2001. Veden laatu. Opas mikrobiologisten menetelmien validoinnista. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto SFS Ry, 2001.
18. Mikrobiologisten menetelmien validointiohje. 1997. Elintarvikevirasto.

SOSIAALI- JA TERVEYSMINISTERIN ASETUKSEN 315/2002 MUKAISET UIMA-
ALLASVEDEN LAATUVAATIMUKSET

ALLASVEDEN LAATUVAATIMUKSET

	Allasveden laatuvaatimukset	Yksikkö
Mikrobiologiset muuttujat ¹⁾		
Heterotrofinen pesäkeluku 22 ± 2 °C	< 100	pmy/ml
Heterotrofinen pesäkeluku 36 ± 2 °C	< 100	pmy/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ei osoitettavissa	/100ml
Fysikaalis-kemiolliset muuttujat		
Sameus	≤ 0,4	FTU
pH-arvo ²⁾	6,5-7,6	
Sidottu kloori	≤ 0,4	mg/l
Vapaa kloori ³⁾		
Kun pH ≤ 7,3	≥ 0,3	mg/l
Kun pH > 7,3	≥ 0,4	mg/l
Lämminvesialtaat ⁴⁾⁵⁾	≥ 0,6	mg/l
Kaikki altaat ⁵⁾	≤ 1,2	mg/l
Nitraatti	≤ 50	mg/l
KMnO ₄ -luku	≤ 10	mg/l
Urea	≤ 0,8	mg/l
Trihalometaanit (THM) kloroformina	≤ 50	mg/l
⁶⁾⁷⁾		

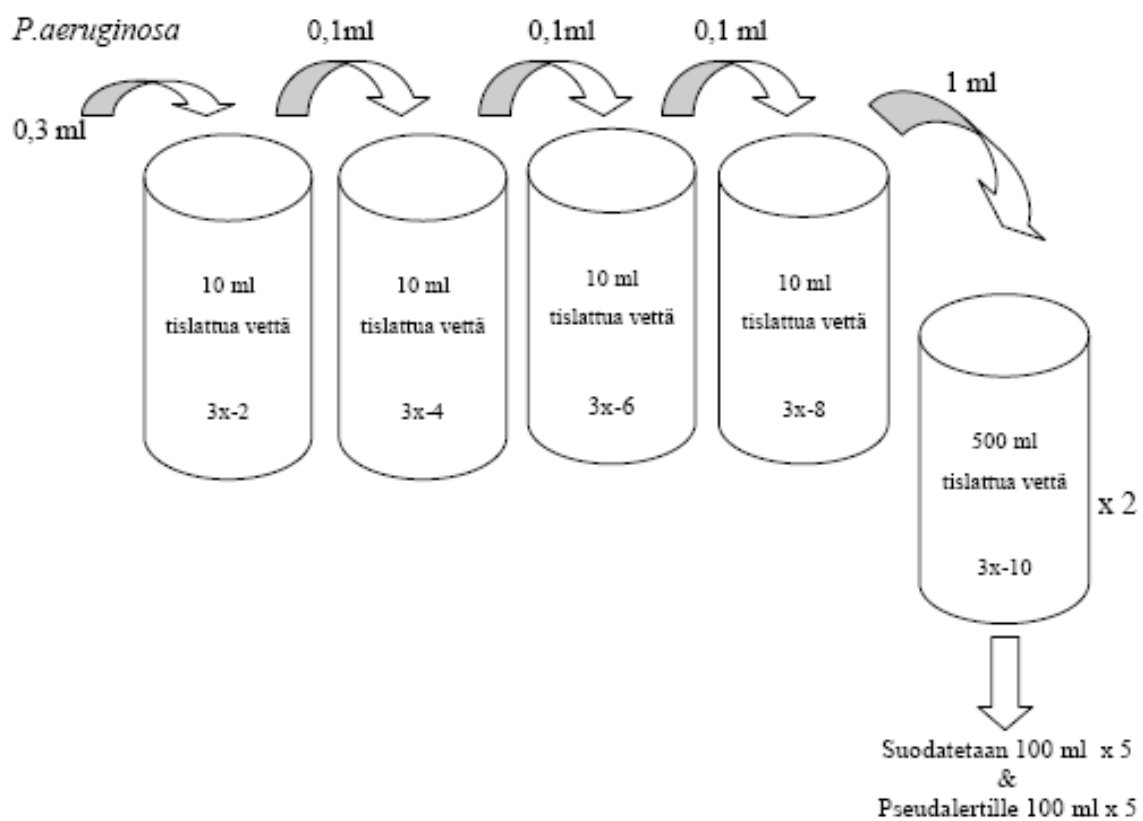
Huomautukset:

- 1) Jos laatuvaatimusten raja-arvot ylittyvät, otetaan uusintanäyte välittömästi.
- 2) Jos altaaseen johdetaan jatkuvasti talousveden laatuvaatimukset täyttävää lisävettä niin, että sen keskimääräinen viipymä altaassa on alle neljä tuntia, veden pH-arvon vaatimustaso on < 8,0. Tällöin allasveden vapaan kloorin pitoisuus tulee olla vähintään 0,6 mg/l.
- 3) Vapaan kloorin pitoisuuden on aina oltava vähintään 1,5-kertainen sidottuun klooriin verrattuna.
- 4) Kunnan terveydensuojeluviranomainen voi sallia alhaisemmankin klooripitoisuuden arvon, jos lämminvesialtaan veden klooripitoisuudelle on jatkuvatoiminen mittauslaitteisto, veden klooripitoisuudelle on asetettu alarajahälytys ja veden mikrobiologinen laatu on ollut jatkuvasti hyvä.
- 5) Kunnan terveydensuojeluviranomainen voi määrätä käytettäväksi annettuja korkeampia vapaan kloorin pitoisuuksia allasvedessä. Terveydensuojeluviranomainen voi antaa vapaan kloorin ylärajan

1,2 mg/l ylitystä koskevan määräyksen korkeintaan 2 kuukaudeksi kerrallaan. Ylärajan ylityksestä on ilmoitettava altaan käyttäjille. Käytettäessä allasvedessä ylärajaa korkeampia vapaan kloorin pitoisuuksia kunnan terveydensuojeluviranomaisen tulee määrätä tutkittavaksi myös allasveden trihalometaanipitoisuus sekä KMnO_4 -luku ja sidotun kloorin pitoisuus.

- 6) Ei sovelleta ulkoaltaisiin
- 7) Allasveden KMnO_4 -luvun tilapäinen lievä ylitys on sallittu, jos samalla todetaan, että allasveden trihalometaanin (THM) pitoisuus ei ylitä laatuvaatimuksen raja-arvoa.

ANALYYSIOHJE P.AERUGINOSALLE: NORMAALI TARKASTUS



PSEUDOMONAS AERUGINOSAN MÄÄRITYS
TULOKSET NORMAALISTA TARKASTUKSESTA

MITTAUSPÖYTÄKIRJA 3.5.2011

Taulukko 1. Pseudomonas-agarin ja Pseudalertin tulokset

Näyte nro	Ps-agar 22 h, pmy	Ps-agar 44 h, pmy	Pseudalert, MPN
1	51	51	38,4 → 38
2	43	43	50,4 → 50
3	44	44	40,6 → 41
4	42	42	27,1 → 27
5	33	37	32,4 → 32

pmy = pesäkettä muodostavaa yksikköä

MPN = Most Probably Number

T-testi

Ei saa ylittää arvoa 2,78

Nro	Vanha A	Uusi a	Erotus d	(d-kad)	(d-kad) ²	
1	7,14	6,16	0,98	0,50	0,25	
2	6,56	7,07	-0,51	-0,99	0,99	
3	6,63	6,40	0,23	-0,25	0,06	
4	6,48	5,20	1,28	0,80	0,65	
5	6,08	5,66	0,43	-0,05	0,00	
			0,48		1,95	summa (d-kad) ²

sd = 0,70

t= 1,54

Tuloksien t-arvo pysyi alle 2,78 .

PSEUDOMONAS AERUGINOSAN MÄÄRITYS
TULOKSET NORMAALISTA TARKASTUKSESTA

MITTAUSPÖYTÄKIRJA 11.5.2011

Taulukko 1. Pseudomonas-agarin ja Pseudalartin tulokset

Näyte nro	Ps-agar 22 h, pmy	Ps-agar 44 h, pmy	Pseudalert, MPN
1	-	34	25,4 → 25
2	-	42	36,4 → 36
3	-	38	23,8 → 24
4	-	44	23,8 → 24
5	-	46	42,9 → 43

pmy = pesäettä muodostavaa yksikköä
MPN = Most Probably Number

Tulokset nelöjuurina

T-testi **Ei saa ylittää arvoa 2,78**

Nro	Vanha A	Uusi a	Erotus d	(d-kad)	(d-kad) ²
1	5,83	5,00	0,83	0,35	0,12
2	6,48	6,00	0,48	0,00	0,00
3	6,16	4,90	1,27	0,78	0,62
4	6,63	4,90	1,73	1,25	1,57
5	6,78	6,56	0,22	-0,26	0,07
			0,91	2,37 summa (d-kad) ²	

$$sd = 0,77$$

$$t = \underline{2,63}$$

Tuloksien t-arvo pysyi alle 2,78

PSEUDOMONAS AERUGINOSAN MÄÄRITYS
TULOKSET NORMAALISTA TARKASTUKSESTA

MITTAUSPÖYTÄKIRJA 17.8.2011

Taulukko 1. Pseudomonas-agarin ja Pseudalertin tulokset

Näyte nro	Ps-agar 22 h, pmy	Ps-agar 44 h, pmy	Pseudalert, MPN
1	-	37	34,4 → 34
2	-	35	45,3 → 45
3	-	16	40,6 → 41
4	-	15	27,1 → 27
5	-	32	25,4 → 25

pmy = pesäkettä muodostavaa yksikköä

MPN = Most Probably Number

Tulokset neliöjuurina

T-testi **Ei saa ylittää arvoa 2,78**

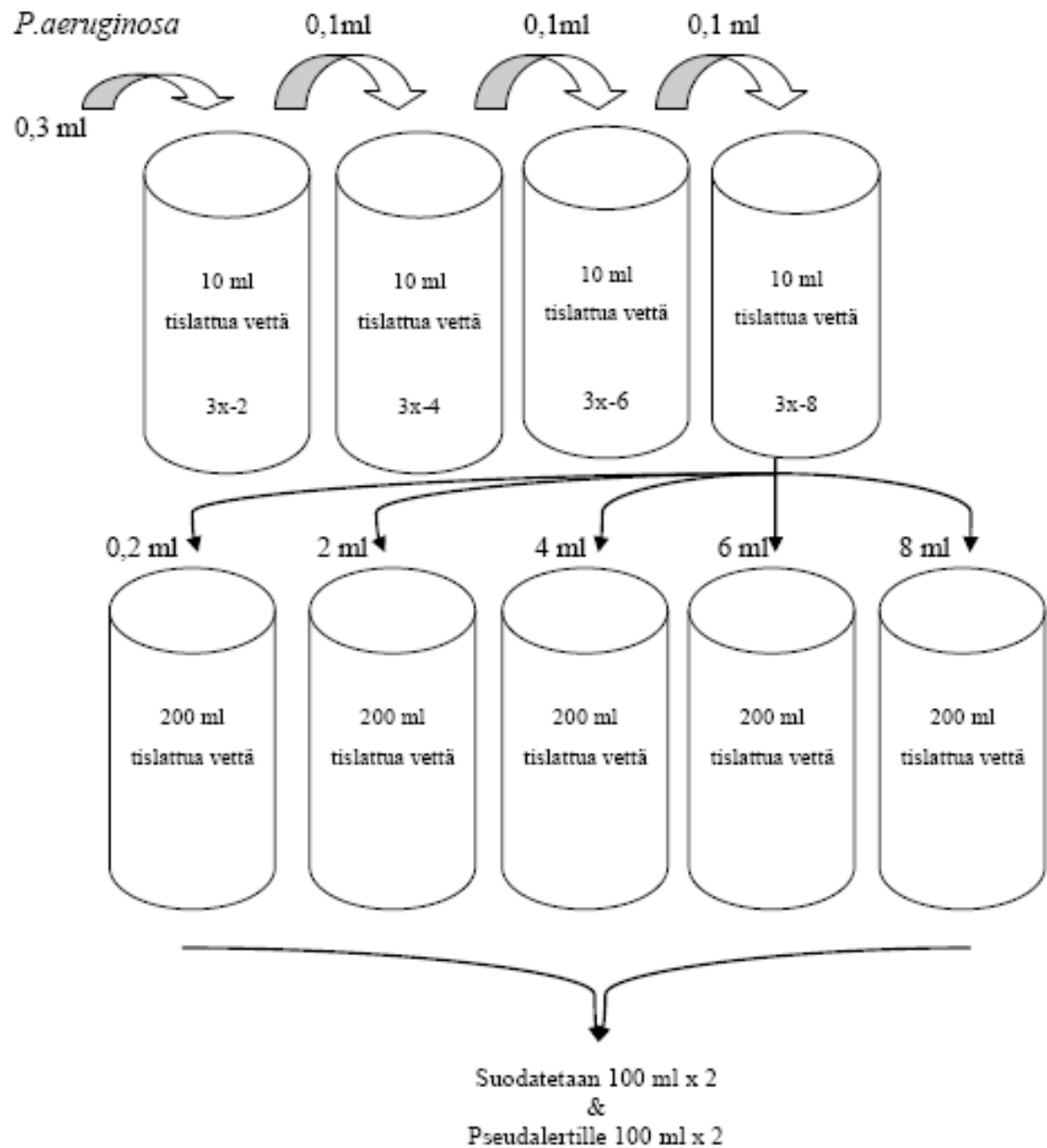
Nro	Vanha A	Uusi a	Erotus d	(d-kad)	(d-kad) ²	
1	6,08	5,83	0,25	-4,75	22,55	
2	5,92	6,71	-0,79	-5,79	33,55	
3	4,00	6,40	-2,40	-7,40	54,81	
4	3,87	5,20	-1,32	-6,32	39,98	
5	5,66	5,00	0,66	-4,34	18,86	
			-0,72		169,75	summa (d-kad) ²

sd = 6,51

t = -0,25

Tuloksien t-arvo pysyi alle 2,78 .

ANALYYSIOHJE P.AERUGINOSALLE: LAIMENUSSARJA



PSEUDOMONAS AERUGINOSAN MÄÄRITYS
TULOKSET LAIMENNOSSARJAA KÄYTTÄEN

MITTAUSPÖYTÄKIRJA 12.6.2011

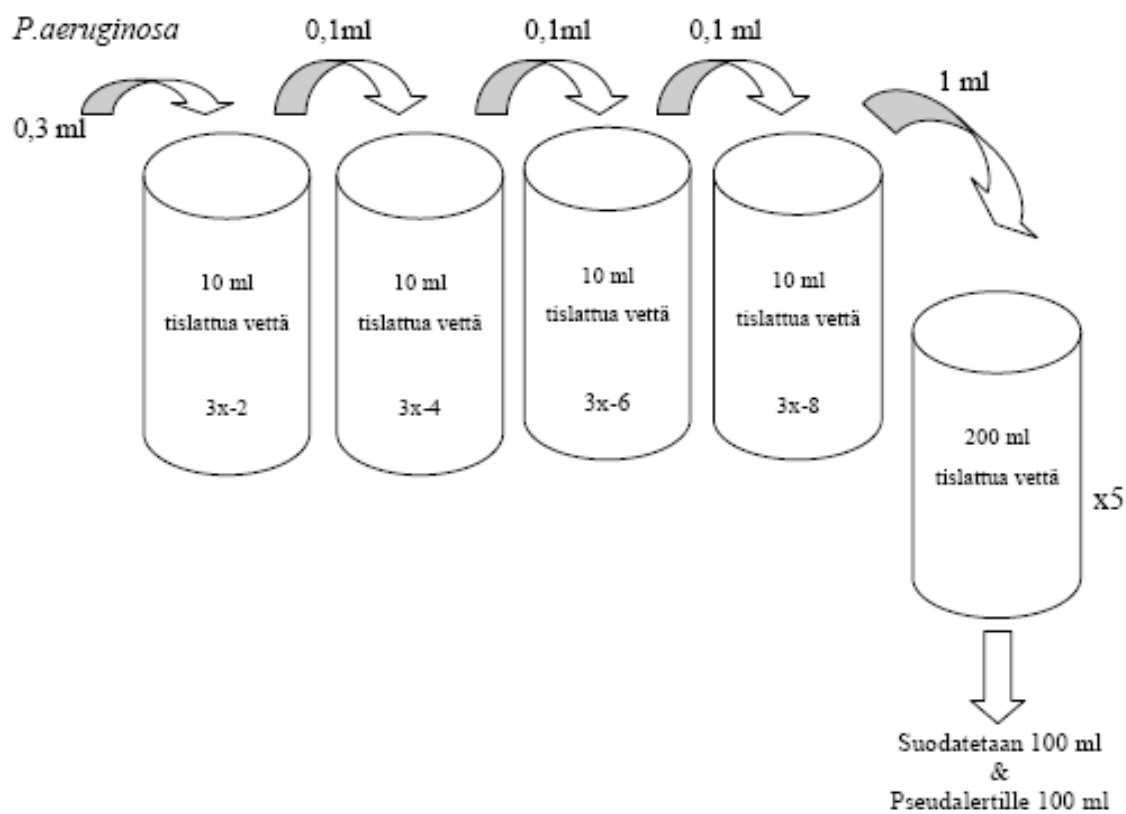
Taulukko 1. Toteutuneet Pseudomonas Aeruginosan tulokset laimennussarjassa

Laimennos	Ps-agar, pmy	Pseudalert, MPN
0,1 ml/100 ml	2	0
1,0 ml/100 ml	22	19
2,0 ml/100 ml	50	56
3,0 ml/100 ml	30	59
4,0 ml/100 ml	60	70

Taulukko 2. Teoreettiset Pseudomonas Aeruginosan tulokset laimennossarjassa
Raja-arvo 25-36 pmy

Laimennos	25 pmy, min	36 pmy, max
0,1 ml/100 ml	2,5	3,6
1,0 ml/100 ml	25	36
2,0 ml/100 ml	50	72
3,0 ml/100 ml	75	108
4,0 ml/100 ml	100	144

ANALYYSIOHJE P.AERUGINOSALLE: PIENET PITOISUUDET



PSEUDOMONAS AERUGINOSAN MÄÄRITYS
TULOKSET KÄYTETTÄESSÄ PIENIÄ PITOISUUKSIA

MITTAUSPÖYTÄKIRJA 19.6.2011

Taulukko 1. Pseudomonas-agarin ja Pseudalartin tulokset

Näyte nro	Ps-agar 22 h, pmy	Ps-agar 44 h, pmy	Pseudalert, MPN
1	-	11	8
2	-	16	12
3	-	15	21
4	-	6	11
5	-	12	14

pmy = pesäkettä muodostavaa yksikköä
MPN = Most Probably Number

Tulokset neliojuurina

T-testi **Ei saa ylittää arvoa 2,78**

Nro	Vanha A	Uusi a	Erotus d	(d-kad)	(d-kad) ²	
1	3,32	2,83	0,49	0,49	0,24	
2	4,00	3,46	0,54	0,54	0,29	
3	3,87	4,58	-0,71	-0,71	0,50	
4	2,45	3,32	-0,87	-0,87	0,75	
5	3,46	3,74	-0,28	-0,28	0,08	
			-0,17		1,86	summa (d-kad) ²

sd = 0,68

t = -0,54

Tuloksien t-arvo pysyi alle 2,78 .

KLOORIN MÄÄRITYS

MITTAUSPÖYTÄKIRJA 17.8.2011

Taulukko 1. Fotometrimittaukset virallisista näytteistä		
	Vapaa kloori, mg/l	Kokonaiskloori, mg/l
V 301		
	0,764	0,844
	0,759	0,842
keskiarvo	0,762	0,843
	0,757	0,835
	0,754	0,845
keskiarvo	0,756	0,840
V 302		
	0,369	0,508
	0,356	0,501
keskiarvo	0,363	0,508
	0,361	0,498
	0,355	0,501
keskiarvo	0,358	0,500
V 303		
	0,738	-
	0,745	-
keskiarvo	0,742	-
	0,748	-
	-	-
keskiarvo	0,748	-
V 304		
		laimennos 1:2
	0,617	0,351
	0,602	0,354
keskiarvo	0,610	$0,3525 \times 2 = \mathbf{0,705}$
	0,613	0,348
	0,617	0,345
keskiarvo	0,615	$0,3465 \times 2 = \mathbf{0,693}$

Taulukko 2. Spektrofotometriset mittaukset virallisista näytteistä		
	Vapaa kloori, mg/l	Kokonaiskloori, mg/l
V 301	laimennos 1:2	laimennos 1:2
	0,3779 x 2 = 0,7558	0,445 x 2 = 0,8900
	0,3817 x 2 = 0,7634	0,4468 x 2 = 0,8936
V 302		
	0,3848	0,5843
	0,3825	0,5871
V 303	laimennos 1:2	laimennos 1:4
	0,4080 x 2 = 0,8160	0,2614 x 4 = 1,046
	0,3982 x 2 = 0,7964	0,2576 x 4 = 1,030
V 304	laimennos 1:2	laimennos 1:2
	0,3351 x 2 = 0,6702	0,3674 x 2 = 0,7348
	0,3378 x 2 = 0,6756	0,3711 x 2 = 0,7422

Taulukko 3. Yhteenveto tuloksista						
	Vapaa kloori		Kokonaiskloori		Sitoutunut kloori	
	F	S	F	S	F	S
V 301 1.	0,76	0,76	0,84	0,89	0,08	0,13
V 301 2.	0,76	0,76	0,84	0,89	0,08	0,13
V 302 1.	0,36	0,38	0,51	0,58	0,15	0,20
V 302 2.	0,36	0,38	0,50	0,59	0,14	0,20
V 303 1.	0,74	0,82	-	1,05	-	-
V 303 2.	0,75	0,80	-	1,03	-	-
V 304 1.	0,61	0,67	0,71	0,73	0,10	0,06
V 304 2.	0,62	0,68	0,69	0,74	0,08	0,07

F = fotometri
S = spektrofotometri

KLOORIN MÄÄRITYS

MITTAUSPÖYTÄKIRJA 18.8.2011

Taulukko 1. Fotometrimittaukset epävirallisista näytteistä		
Näyte nro	Vapaa kloori, mg/l	Kokonaiskloori, mg/l
1		
	0,378	0,611
	0,375	0,617
keskiarvo	0,377	0,614
	0,388	0,604
	0,363	0,596
keskiarvo	0,376	0,600
2		
		laimennos 1:2
	0,825	0,469
	0,802	0,469
keskiarvo	0,814	0,469 x 2 = 0,938
	0,804	0,455
	0,804	0,465
keskiarvo	0,804	0,4675 x 2 = 0,915
3		
	0,731	0,837
	0,711	0,824
keskiarvo	0,721	0,831
	0,698	0,829
	0,708	0,824
keskiarvo	0,703	0,827
4		
	0,661	0,685
	0,654	0,699
keskiarvo	0,658	0,692
	0,645	0,696
	0,645	0,695
keskiarvo	0,645	0,696

Taulukko 2. Spektrofotometriset mittaukset epävirallisista näytteistä

Näyte nro	Vapaa kloori, mg/l	Kokonaiskloori, mg/l
1		laimennos 1:2
	0,3248	0,3507 x 2 = 0,7014
	0,3287	0,3470 x 2 = 0,6940
2	laimennos 1:2	laimennos 1:2
	0,3984 x 2 = 0,7968	0,4619 x 2 = 0,8690
	0,3993 x 2 = 0,7986	0,4627 x 2 = 0,9254
3	laimennos 1:2	laimennos 1:2
	0,3707 x 2 = 0,7414	0,4345 x 2 = 0,8690
	0,3513 x 2 = 0,7026	0,4337 x 2 = 0,8674
4	laimennos 1:2	laimennos 1:2
	0,3353 x 2 = 0,6706	0,3633 x 2 = 0,7266
	0,3195 x 2 = 0,6390	0,3647 x 2 = 0,7294

Taulukko 3. Yhteenveto tuloksista

	Vapaa kloori, mg/l		Kokonaiskloori, mg/l		Sitoutunut kloori, mg/l	
	F	S	F	S	F	S
1,1	0,38	0,32	0,61	0,70	0,24	0,38
1,2	0,38	0,33	0,60	0,69	0,22	0,37
2,1	0,81	0,80	0,94	0,87	0,12	0,07
2,2	0,80	0,80	0,92	0,93	0,11	0,13
3,1	0,72	0,74	0,83	0,87	0,11	0,13
3,2	0,70	0,70	0,83	0,87	0,12	0,16
4,1	0,66	0,67	0,69	0,73	0,03	0,06
4,2	0,65	0,64	0,70	0,73	0,05	0,09

F = fotometri
S = spektrofotometri

KLOORIN MÄÄRITYS
KONTROLLIEN MITTAUS

MITTAUSPÖYTÄKIRJA 18.8.2011

Taulukko 1. Kontrollien mittaustulokset				
Pitoisuus, mg/l	Vapaa kloori, mg/l		Kokonaiskloori mg/l	
	F	S	F	S
0,5	0,514	0,4942	0,528	-
	0,529	0,4964	0,517	-
ka.	0,52	0,50	0,52	-
0,03	0,047	0,0263	0,046	-
	0,040	0,0295	0,042	-
ka.	0,04	0,03	0,04	-

Taulukko 2. Nollakontrollien mittaustulokset		
0-kontrolli, mg/l	0-kontrolli reagenssilla, mg/l	
	Vapaa kloori	Kokonaiskloori
< 0,01	0,029	0,016
< 0,01	0,022	0,014
< 0,01	0,023	0,013
< 0,01	0,014	0,014
< 0,01	0,014	0,017

KLOORIN MÄÄRITYS

MITTAUSPÖYTÄKIRJA 2.9.2011

Taulukko 1. Fotometrimitaukset epävirallisista näytteistä		
Näyte nro	Vapaa kloori, mg/l	Kokonaiskloori, mg/l
1		
	0,598	0,637
	0,586	0,644
keskiarvo	0,592	0,641
	0,576	0,614
	0,588	0,605
keskiarvo	0,582	0,610
2		
	0,479	0,607
	0,470	0,617
keskiarvo	0,475	0,612
	0,480	0,621
	0,483	0,614
keskiarvo	0,482	0,618
3		
	0,447	0,561
	0,420	0,588
keskiarvo	0,434	0,575
	0,434	0,565
	0,432	0,563
keskiarvo	0,433	0,564

Näyte nro	Vapaa kloori, mg/l	Kokonaiskloori, mg/l
1		laimennos 1:2
	0,5611	0,3458 x 2 = 0,6916
	0,5622	0,3452 x 2 = 0,6904
2		laimennos 1:2
	0,4744	0,3452 x 2 = 0,6904
	0,4630	0,3494 x 2 = 0,6988
3		
	0,4284	0,5822
	0,4277	0,5809

Näyte nro	Vapaa kloori, mg/l		Kokonaiskloori, mg/l		Sitoutunut kloori, mg/l	
	F	S	F	S	F	S
1,1	0,59	0,56	0,64	0,69	0,05	0,13
1,2	0,58	0,56	0,61	0,69	0,03	0,13
2,1	0,47	0,47	0,61	0,69	0,14	0,22
2,2	0,48	0,46	0,62	0,70	0,14	0,24
3,1	0,43	0,43	0,57	0,58	0,14	0,15
3,2	0,43	0,43	0,56	0,58	0,13	0,15

F = fotometri
S = spektrofotometri

KLOORIN MÄÄRITYS

MITTAUSPÖYTÄKIRJA 20.9.2011

Taulukko 1. Fotometrimittaukset virallisista näytteistä		
Näyte nro	Vapaa kloori, mg/l	Kokonaiskloori, mg/l
V 201		
	0,569	0,688
	0,562	0,693
keskiarvo	0,566	0,691
	0,585	0,687
	0,570	0,691
keskiarvo	0,578	0,689
V 203		
	0,619	0,881
	0,621	0,879
keskiarvo	0,620	0,880
	0,627	0,880
	0,623	0,879
keskiarvo	0,625	0,880
V 205		
	0,560	0,690
	0,545	0,688
keskiarvo	0,553	0,689
	0,550	0,685
	0,558	0,682
keskiarvo	0,554	0,684
V 206		
	laimennos 1:2	laimennos 1:2
	0,626	0,715
	0,631	0,714
keskiarvo	$0,6285 \times 2 = \mathbf{1,26}$	$0,715 \times 2 = \mathbf{1,43}$
	0,629	0,715
	0,601	0,722
keskiarvo	$0,615 \times 2 = \mathbf{1,23}$	$0,7185 \times 2 = \mathbf{1,44}$

	Vapaa kloori, mg/l	Kokonaiskloori, mg/l
V 201		laimennos 1:2
	0,5644	0,3980 x 2 = 0,7960
	0,5648	0,3980 x 2 = 0,7960
V 203	laimennos 1:2	laimennos 1:2
	0,3419 x 2 = 0,6838	0,4847 x 2 = 0,9694
	0,3360 x 2 = 0,6720	0,4837 x 2 = 0,9674
V 205		laimennos 1:2
	0,5720	0,3980 x 2 = 0,7960
	0,5522	0,3989 x 2 = 0,7978
V 206	laimennos 1:4	laimennos 1:4
	0,3399 x 4 = 1,36	0,3989 x 4 = 1,596
	0,3367 x 4 = 1,35	0,4075 x 4 = 1,630

	Vapaa kloori, mg/l		Kokonaiskloori, mg/l		Sitoutunut kloori, mg/l	
	F	S	F	S	F	S
V 201 1.	0,57	0,56	0,69	0,80	0,13	0,23
V 201 2.	0,58	0,56	0,69	0,80	0,11	0,23
V 202 1.	0,62	0,68	0,88	0,97	0,26	0,29
V 202 2.	0,63	0,67	0,88	0,97	0,25	0,30
V 203 1.	0,55	0,57	0,69	0,80	0,14	0,22
V 203 2.	0,55	0,55	0,68	0,80	0,13	0,25
V 204 1.	1,26	1,35	1,43	1,60	0,17	0,25
V 204 2.	1,23	1,36	1,44	1,63	0,21	0,27

F = fotometri
S = spektrofotometri

FOTOMETRIN JA SPEKTROFOTOMETRIN T-TESTI

Taulukko 1. Vapaan kloorin tilastollinen vertailu

N:o		Fotometri	Spektrofotometri	keskiarvo	di erotus	(di) ² erotuksen neliö
1	17.08.2011	0,76	0,76	0,7587	0,0057	0,0000
2	17.08.2011	0,76	0,76	0,7595	-0,0079	0,0001
3	17.08.2011	0,36	0,38	0,3737	-0,0223	0,0005
4	17.08.2011	0,36	0,38	0,3703	-0,0245	0,0006
5	17.08.2011	0,74	0,82	0,7788	-0,0745	0,0056
6	17.08.2011	0,75	0,80	0,7722	-0,0484	0,0023
7	17.08.2011	0,61	0,67	0,6399	-0,0607	0,0037
8	17.08.2011	0,62	0,68	0,6453	-0,0606	0,0037
9	18.08.2011	0,38	0,32	0,3507	0,0517	0,0027
10	18.08.2011	0,38	0,33	0,3521	0,0468	0,0022
11	18.08.2011	0,81	0,80	0,8052	0,0167	0,0003
12	18.08.2011	0,80	0,80	0,8013	0,0054	0,0000
13	18.08.2011	0,72	0,74	0,7312	-0,0204	0,0004
14	18.08.2011	0,70	0,70	0,7028	0,0004	0,0000
15	18.08.2011	0,66	0,67	0,6641	-0,0131	0,0002
16	18.08.2011	0,65	0,64	0,6420	0,0060	0,0000
17	18.08.2011	0,51	0,49	0,5041	0,0198	0,0004
18	18.08.2011	0,53	0,50	0,5127	0,0326	0,0011
19	18.08.2011	0,05	0,03	0,0367	0,0207	0,0004
20	18.08.2011	0,04	0,03	0,0348	0,0105	0,0001
21	02.09.2011	0,59	0,56	0,5766	0,0309	0,0010
22	02.09.2011	0,58	0,56	0,5721	0,0198	0,0004
23	02.09.2011	0,47	0,47	0,4745	0,0001	0,0000
24	02.09.2011	0,48	0,46	0,4723	0,0185	0,0003
25	02.09.2011	0,43	0,43	0,4310	0,0051	0,0000
26	02.09.2011	0,43	0,43	0,4304	0,0053	0,0000
27	20.09.2011	0,57	0,56	0,5650	0,0011	0,0000
28	20.09.2011	0,58	0,56	0,5712	0,0127	0,0002
29	20.09.2011	0,62	0,68	0,6519	-0,0638	0,0041
30	20.09.2011	0,63	0,67	0,6485	-0,0470	0,0022

31	20.09.2011	0,55	0,57	0,5623	-0,0195	0,0004
32	20.09.2011	0,55	0,55	0,5531	0,0018	0,0000
33	20.09.2011	1,26	1,35	1,3050	-0,0900	0,0081
34	20.09.2011	1,23	1,36	1,2950	-0,1300	0,0169
				summa	-0,3711	0,058
				keskiarvo	-0,0109	
				(Sd) ²	0,0016	
				Sd	0,040	
				t-arvo	1,577	

Koska laskettu t-arvo on pienempi kuin teoreettinen arvo $t_{0,05(33)} = 2,035$, menetelmillä ei voida katsoa olevan eroa 5 %:n merkitsevyydellä.

Taulukko 2. Kokonaiskloorin tilastollinen vertailu

N:o		Fotometri	Spektrofotometri	keskiarvo	di erotus	(di) ² erotuksen neliö
1	17.08.2011	0,84	0,89	0,8665	-0,0470	0,0022
2	17.08.2011	0,84	0,89	0,8668	-0,0536	0,0029
3	17.08.2011	0,51	0,58	0,5462	-0,0763	0,0058
4	17.08.2011	0,50	0,59	0,5433	-0,0876	0,0077
5	17.08.2011	0,71	0,73	0,7199	-0,0298	0,0009
6	17.08.2011	0,69	0,74	0,7176	-0,0492	0,0024
7	18.08.2011	0,61	0,70	0,6577	-0,0874	0,0076
8	18.08.2011	0,60	0,69	0,6470	-0,0940	0,0088
9	18.08.2011	0,94	0,87	0,9035	0,0690	0,0048
10	18.08.2011	0,92	0,93	0,9202	-0,0104	0,0001
11	18.08.2011	0,83	0,87	0,8498	-0,0385	0,0015
12	18.08.2011	0,83	0,87	0,8470	-0,0409	0,0017
13	18.08.2011	0,69	0,73	0,7093	-0,0346	0,0012
14	18.08.2011	0,70	0,73	0,7125	-0,0339	0,0011
15	02.09.2011	0,64	0,69	0,6661	-0,0511	0,0026
16	02.09.2011	0,61	0,69	0,6500	-0,0809	0,0065
17	02.09.2011	0,61	0,69	0,6512	-0,0784	0,0061
18	02.09.2011	0,62	0,70	0,6582	-0,0813	0,0066
19	02.09.2011	0,57	0,58	0,5784	-0,0077	0,0001
20	02.09.2011	0,56	0,58	0,5725	-0,0169	0,0003

LIITE 15 (3/3)

21	20.09.2011	0,69	0,80	0,7433	-0,1055	0,0111
22	20.09.2011	0,69	0,80	0,7425	-0,1070	0,0114
23	20.09.2011	0,88	0,97	0,9247	-0,0894	0,0080
24	20.09.2011	0,88	0,97	0,9235	-0,0879	0,0077
25	20.09.2011	0,69	0,80	0,7425	-0,1070	0,0114
26	20.09.2011	0,68	0,80	0,7407	-0,1143	0,0131
27	20.09.2011	1,43	1,60	1,5130	-0,1660	0,0276
28	20.09.2011	1,44	1,63	1,5350	-0,1900	0,0361

summa	-1,8976	0,197
keskiarvo	-0,0678	

(Sd)2	0,0026
-------	--------

Sd	0,050
----	-------

t-arvo	7,101
--------	-------

Koska laskettu t-arvo on pienempi kuin teoreettinen arvo $t_{0,05(27)} = 2,052$, eri laitteilla mitatut tulokset eroavat toisistaan 5 %:n merkitsevyystasolla.

MÄÄRITYSRAJAN TULOKSET

Taulukko 1. Määritysrajan laskeminen vapaalle kloorille				
Näytteestä nro 1, 2.9.2011 ja näytteestä nro V 205,20.9.2011, laimennos 1:10				
	vapaa Cl ₂ , mg/l	vapaa Cl ₂ , mg/l	Erotus, d	d ²
1	0,070	0,067	0,003	0,000009
2	0,072	0,070	0,002	0,000004
3	0,072	0,071	0,001	0,000001
4	0,075	0,063	0,012	0,000144
5	0,061	0,066	-0,005	0,000025
6	0,082	0,062	0,020	0,000400
7	0,069	0,061	0,008	0,000064
8	0,069	0,066	0,003	0,000009
9	0,069	0,054	0,015	0,000225
10	0,078	0,058	0,020	0,000400
$\sum d^2$				0,001281

$$s = 0,008003124$$

$$\rightarrow \text{Määr.raja} = 0,041492254$$

$$\approx \mathbf{0,04 \text{ mg/l}}$$

Taulukko 2. Määritysrajan laskeminen kokonaiskloorille				
Näytteestä nro 1, 2.9.2011 ja näytteestä nro V 205,20.9.2011, laimennos 1:10				
	mg/l	mg/l	Erotus, d	d ²
1	0,085	0,067	0,018	0,000324
2	0,082	0,068	0,014	0,000196
3	0,081	0,069	0,012	0,000144
4	0,087	0,072	0,015	0,000225
5	0,073	0,067	0,006	0,000036
6	0,078	0,073	0,005	0,000025
7	0,082	0,081	0,001	0,000001
8	0,079	0,080	-0,001	0,000001
9	0,067	0,078	-0,011	0,000121
10	0,076	0,080	-0,004	0,000016
$\sum d^2$				0,001089

$$s = 0,00737902$$

$$\rightarrow \text{Määr.raja} = 0,0382566$$

$$\approx \mathbf{0,04 \text{ mg/l}}$$

T-TESTIN KRIITTISET ARVOT

Vapaus- asteet	1-suuntainen testi merkitsevyytasolla			2-suuntainen testi merkitsevyytasolla		
	5%	1%	0.1%	5%	1%	0.1%
1	6.314	31.82	318.3	12.71	63.66	636.6
2	2.920	6.965	22.33	4.303	9.925	31.60
3	2.353	4.541	10.21	3.182	5.841	12.92
4	2.132	3.747	7.173	2.776	4.604	8.610
5	2.015	3.365	5.894	2.571	4.032	6.869
6	1.943	3.143	5.208	2.447	3.707	5.959
7	1.895	2.998	4.785	2.365	3.499	5.408
8	1.860	2.896	4.501	2.306	3.355	5.041
9	1.833	2.821	4.297	2.262	3.250	4.781
10	1.812	2.764	4.144	2.228	3.169	4.587
11	1.796	2.718	4.025	2.201	3.106	4.437
12	1.782	2.681	3.930	2.179	3.055	4.318
13	1.771	2.650	3.852	2.160	3.012	4.221
14	1.761	2.624	3.787	2.145	2.977	4.140
15	1.753	2.602	3.733	2.131	2.947	4.073
16	1.746	2.583	3.686	2.120	2.921	4.015
17	1.740	2.567	3.646	2.110	2.898	3.965
18	1.734	2.552	3.610	2.101	2.878	3.922
19	1.729	2.539	3.579	2.093	2.861	3.883
20	1.725	2.528	3.552	2.086	2.845	3.850
21	1.721	2.518	3.527	2.080	2.831	3.819
22	1.717	2.508	3.505	2.074	2.819	3.792
23	1.714	2.500	3.485	2.069	2.807	3.768
24	1.711	2.492	3.467	2.064	2.797	3.745
25	1.708	2.485	3.450	2.060	2.787	3.725
26	1.706	2.479	3.435	2.056	2.779	3.707
27	1.703	2.473	3.421	2.052	2.771	3.689
28	1.701	2.467	3.408	2.048	2.763	3.674
29	1.699	2.462	3.396	2.045	2.756	3.660
30	1.697	2.457	3.385	2.042	2.750	3.646
31	1.696	2.453	3.375	2.040	2.744	3.633
32	1.694	2.449	3.365	2.037	2.738	3.622
33	1.692	2.445	3.356	2.035	2.733	3.611
34	1.691	2.441	3.348	2.032	2.728	3.601
35	1.690	2.438	3.340	2.030	2.724	3.591
36	1.688	2.434	3.333	2.028	2.719	3.582
37	1.687	2.431	3.326	2.026	2.715	3.574
38	1.686	2.429	3.319	2.024	2.712	3.566
39	1.685	2.426	3.313	2.023	2.708	3.558
40	1.684	2.423	3.307	2.021	2.704	3.551
41	1.683	2.421	3.301	2.020	2.701	3.544
42	1.682	2.418	3.296	2.018	2.698	3.538
43	1.681	2.416	3.291	2.017	2.695	3.532
44	1.680	2.414	3.286	2.015	2.692	3.526
45	1.679	2.412	3.281	2.014	2.690	3.520
46	1.679	2.410	3.277	2.013	2.687	3.515
47	1.678	2.408	3.273	2.012	2.685	3.510
48	1.677	2.407	3.269	2.011	2.682	3.505
49	1.677	2.405	3.265	2.010	2.680	3.500
50	1.676	2.403	3.261	2.009	2.678	3.496
51	1.675	2.402	3.258	2.008	2.676	3.492
52	1.675	2.400	3.255	2.007	2.674	3.488
53	1.674	2.399	3.251	2.006	2.672	3.484
54	1.674	2.397	3.248	2.005	2.670	3.480
55	1.673	2.396	3.245	2.004	2.668	3.476
56	1.673	2.395	3.242	2.003	2.667	3.473
57	1.672	2.394	3.239	2.002	2.665	3.469
58	1.672	2.392	3.237	2.002	2.663	3.466
59	1.671	2.391	3.234	2.001	2.662	3.463
60	1.671	2.390	3.232	2.000	2.660	3.460