

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja kemiantekniikka

2023

Alisa Koliseva

# Symphony-elatusaineen verifiointi hiivojen ja homeiden määrittämiseen



Opinnäytetyö (AMK) | Tiivistelmä

Turun ammattikorkeakoulu

Bio- ja kemiantekniikka

2023 | 53+9 sivua

Alisa Koliseva

## Symphony-elatusaineen verifiointi hiivojen ja homeiden määritykseen

Hiivoja ja homeita hyödynnetään monien elintarvikkeiden valmistuksessa, mutta ne ovat myös yleisiä elintarvikkeiden pilaajamikrobeja. Eurofins Scientific Finland Oy:n Rasion mikrobiologian laboratoriossa haluttiin verifioida käyttöön Symphony-elatusaine, jolla hiivat ja homeet voidaan määrittää elintarvike- ja rehunäytteistä jo kolmen vuorokauden inkuboinnin jälkeen nykyisen menetelmän vaatiman viiden vuorokauden sijaan. Symphony-menetelmää voidaan käyttää kaikille näytteille riippumatta niiden veden aktiivisuudesta.

Verifiointi suoritettiin standardin SFS-EN ISO 16140-3:2021 ohjeiden mukaisesti. Verifiointin suoritusvaihe tehtiin kahdessa osassa: käyttöönottoverifiointi ja tuoteverifiointi. Käyttöönottoverifiointissa määritettiin menetelmän teknistä epävarmuutta ja tuoteverifiointissa matriisin vaikutusta menetelmään. Lisäksi osallistuttiin Eurofins Food & Feed Testing Norway AS:n järjestämään vertailututkimukseen.

Verifiointin tavoitteena oli osoittaa laboratorion pätevyys suoritua verifioitavasta menetelmästä. Verifiointi saatiin suoritettua hyväksytysti ja vertailututkimuksessa pärjättiin hyvin, joten Symphony-elatusaine on mahdollista akkreditoida ja ottaa käyttöön laboratoriossa.

Asiasanat:

hiivat, homeet, verifiointi, Symphony-elatusaine, elintarvikemikrobiologia

Bachelor's Thesis | Abstract

Turku University of Applied Sciences

Biotechnology and Chemical Engineering

2023 | 53+9 pages

Alisa Koliseva

## Verification of Symphony culture medium for enumerating yeasts and molds

Yeasts and molds are often used in the manufacture of food but they are also common spoilage microbes of food products. Eurofins Scientific Finland Oy Raisio microbiological laboratory had a need for verification of Symphony culture medium for enumerating yeasts and molds. By using the Symphony culture medium it is possible to enumerate yeasts and molds from food and animal feed samples just after three days of incubation instead of the five days of incubation used in the present method. The method can be used for all samples independent of their water activity.

Verification was performed in compliance with the standard SFS-EN ISO 16140-3:2021. The performance of the verification was divided in two sections: implementation verification and item verification. In the implementation verification, the technical uncertainty of the method was determined and in the item verification, the effect of the matrix was determined. In addition, the laboratory took part in a comparative study organized by Eurofins Food & Feed Testing Norway AS.

The objective of the verification was to demonstrate that the laboratory has the competence to manage the method to be verified. The verification was performed successfully and the comparative study went well, so it is possible to accredit the Symphony culture medium and introduce it in the laboratory.

Keywords:

yeasts, molds, verification, Symphony culture medium, food microbiology

# Sisältö

<b>Käytetyt lyhenteet ja sanasto</b>	<b>8</b>
<b>1 Johdanto</b>	<b>9</b>
<b>2 Hiivat ja homeet</b>	<b>11</b>
2.1 Hiivat	11
2.2 Homeet	12
<b>3 Verifiointi</b>	<b>14</b>
3.1 Symphony-elatusaine	14
3.2 SFS-EN ISO 16140-3:2021	16
3.3 Käyttöönottoverifiointi	16
3.4 Tuoteverifiointi	17
3.5 Verifiointi ja akkreditointi	18
<b>4 Verifioinnin suoritus</b>	<b>19</b>
4.1 Mikrobuspensioiden valmistus	19
4.1.1 Hiivasuspensioiden valmistus	19
4.1.2 Homesuspensioiden valmistus	20
4.2 Käyttöönottoverifiointi	21
4.2.1 Käyttöönottoverifioinnin matriisit	21
4.2.2 Käyttöönottoverifioinnin suoritus	21
4.3 Tuoteverifiointi	23
4.3.1 Tuoteverifioinnin matriisit	23
4.3.2 Tuoteverifioinnin suoritus	24
4.4 Vertailututkimus	26
<b>5 Tulokset</b>	<b>28</b>
5.1 Käyttöönottoverifiointi	28
5.2 Tuoteverifiointi	31
5.2.1 Margariinin arvioidut harha-arvot	32
5.2.2 Jogurtin arvioidut harha-arvot	34

5.2.3 Savukalan arvioidut harha-arvot	37
5.2.4 Einesruoan arvioidut harha-arvot	39
5.2.5 Munapohjaisen välipalatuotteen arvioidut harha-arvot	42
5.2.6 Siementen arvioidut harha-arvot	44
5.2.7 Soijarouheen arvioidut harha-arvot	47
5.3 Vertailutkimuksen tulokset	49
<b>6 Yhteenveto</b>	<b>51</b>
<b>Lähteet</b>	<b>52</b>

## **Liitteet**

Liite 1. Mikrobisuspensioiden pitoisuudet

Liite 2. Käyttöönottoverifiointin suoritus

Liite 3. Tuoteverifiointin suoritus

## **Kaavat**

Kaava 1. Sisäisen uusittavuuden keskihajonnan  $S_{IR}$  laskukaava (SFS-EN ISO 16140-3:2021, 22).

28

Kaava 2. Laskukaava z-arvolle

49

## **Kuvat**

Kuva 1. Hiiva- ja homepesäkkeitä Symphony-elatusaineella (BIOKAR Diagnostics n.d., 5).

15

## Taulukot

Taulukko 1. Koostumus yhdelle litralle Symphony-elatusainetta (BIOKAR Diagnostics n.d., 1).	15
Taulukko 2. Tuoteverifiointiin valitut kategoriat ja matriisit	24
Taulukko 3. Tuoteverifioinnin matriiseille valitut pitoisuustasot	24
Taulukko 4. Sisäisen uusinnan keskihajonnan $S_{IR}$ laskeminen hiivoille	29
Taulukko 5. Sisäisen uusinnan keskihajonnan $S_{IR}$ laskeminen homeille	30
Taulukko 6. Margariiniin ympätyn <i>S. cerevisiae</i> -suspensiomäärän pitoisuus	32
Taulukko 7. Margariinin eBias-arvot hiivoille	33
Taulukko 8. Margariiniin ympätyn <i>F. oxysporum</i> -suspensiomäärän pitoisuus	33
Taulukko 9. Margariinin eBias-arvot homeille	34
Taulukko 10. Jogurttiin ympätyn <i>C. albicans</i> -suspensiomäärän pitoisuus	35
Taulukko 11. Jogurtin eBias-arvot hiivoille	35
Taulukko 12. Jogurttiin ympätyn <i>F. oxysporum</i> -suspensiomäärän pitoisuus	36
Taulukko 13. Jogurtin eBias-arvot homeille	36
Taulukko 14. Savukalaan ympätyn <i>C. albicans</i> -suspensiomäärän pitoisuus	37
Taulukko 15. Savukalan eBias-arvot hiivoille	38
Taulukko 16. Savukalaan ympätyn <i>F. oxysporum</i> -suspensiomäärän pitoisuus	38
Taulukko 17. Savukalan eBias-arvot homeille	39
Taulukko 18. Einesruokaan ympätyn <i>C. albicans</i> -suspensiomäärän pitoisuus	40
Taulukko 19. Einesruoan eBias-arvot hiivoille	40
Taulukko 20. Einesruokaan ympätyn <i>F. oxysporum</i> -suspensiomäärän pitoisuus	41
Taulukko 21. Einesruoan eBias-arvot homeille	41
Taulukko 22. Munapohjaiseen välipalatuotteeseen ympätyn <i>S. cerevisiae</i> -suspensiomäärän pitoisuus	42
Taulukko 23. Munapohjaisen välipalatuotteen eBias-arvot hiivoille	43
Taulukko 24. Munapohjaiseen välipalatuotteeseen ympätyn <i>F. oxysporum</i> -suspensiomäärän pitoisuus	43
Taulukko 25. Munapohjaisen välipalatuotteen eBias-arvot homeille	44

Taulukko 26. Siemeniin ympätyn <i>S. cerevisiae</i> -suspensiomäärän pitoisuus	45
Taulukko 27. Siementen eBias-arvot hiivoille	45
Taulukko 28. Siemeniin ympätyn <i>F. oxysporum</i> -suspensiomäärän pitoisuus	46
Taulukko 29. Siementen eBias-arvot homeille	46
Taulukko 30. Soijarouheeseen ympätyn <i>S. cerevisiae</i> -suspensiomäärän pitoisuus	47
Taulukko 31. Soijarouheen eBias-arvot hiivoille	48
Taulukko 32. Soijarouheeseen ympätyn <i>F. oxysporum</i> -suspensiomäärän pitoisuus	48
Taulukko 33. Soijarouheen eBias-arvot homeille	49
Taulukko 34. Mikrobisuspensioiden pitoisuudet	54
Taulukko 35. Hiiva- ja homesolujen ymppäys näytteisiin	55
Taulukko 36. Käyttöönottoverifioinnin vaihteluiden toteutus	56
Taulukko 37. Käyttöönottoverifioinnin pipetointimäärät	58
Taulukko 40. Tuoteverifioinnin näytteiden analysointi	59
Taulukko 41. Tuoteverifioinnin ymppiputkista tehdyt analyysit	61

## Käytetyt lyhenteet ja sanasto

AFNOR	Association Française de Normalisation (French Standardization Association)
BHI	Brain Heart Infusion
DG18	Dichloran-Glyserol
DRBC	Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol
FINAS	Finnish Accreditation Service
MAX	Maximum Recovery Diluent
PC	Plate Count
pmy	pesäkkeen muodostava yksikkö
sp.	Species eli laji, lyhennettä sp. käytetään sukunimen jälkeen, kun viitataan kyseiseen sukuun kuuluvaan tarkemmin määrittelemättömään lajiin (Tieteen termipankki 2023).
tallus	Sienen erilaistumaton kasvullinen osa (Tieteen termipankki 2023).
veden aktiivisuus	Veden aktiivisuudella ( $a_w$ ) tarkoitetaan käytettävissä olevan eli vapaan veden määrää. Veden aktiivisuus on sitä pienempi, mitä enemmän veteen on liennut kemiallisia aineita, kuten suoloja ja sokereita. Puhtaan veden aktiivisuus on 1,0 ja esimerkiksi kuivattujen elintarvikkeiden alle 0,70. (Ruokavirasto 2023.)

# 1 Johdanto

Tämä opinnäytetyö tehtiin Eurofins Scientific Finland Oy:n Rasion mikrobiologian laboratoriolle, jossa oli tarpeen verifioida käyttöön Symphony-elatusaine hiivojen ja homeiden määrittämiseen. Tällä hetkellä käytössä oleva NMKL 98:2005 -standardimenetelmä vaatii hiiva- ja homemaljoilta viiden vuorokauden inkuboinnin, mutta Symphony-elatusaineella hiivat ja homeet voidaan määrittää näytteistä jo kolmen vuorokauden inkuboinnin jälkeen. Symphony-elatusaineella voidaan määrittää hiivat ja homeet kaikista elintarvikkeista ja rehuista, riippumatta niiden veden aktiivisuudesta. (BIOKAR Diagnostics n.d., 1.) Nykyisessä NMKL 98:2005 -menetelmässä käytetään näytteen veden aktiivisuudesta riippuen joko DG18- tai DRBC-elatusainetta.

Verifioimalla menetelmän laboratorio osoittaa suoriutuvansa menetelmästä ja sen olevan sopiva aiottuun käyttötarkoitukseensa. (SFS-EN ISO 16140-3:2021, 5). Symphony-elatusaineen verifiointi tapahtui kolmessa osassa: verifiointisuunnitelman teko, verifiointin suorittaminen ja tulosten käsittely ja raportointi. Verifiointi suoritettiin standardin SFS-EN ISO 16140-3:2021 ohjeiden mukaisesti. Verifioitava Symphony-menetelmä oli kvantitatiivinen ja standardin mukaisesti verifiointin suoritusvaihe tehtiin kahdessa osassa: käyttöönottoverifiointi ja tuoteverifiointi. Käyttöönottoverifiointissa määritettiin menetelmän teknistä epävarmuutta ja tuoteverifiointissa matriisin vaikutusta menetelmään. Lisäksi osallistuttiin Eurofins Food & Feed Testing Norway AS:n järjestämään vertailututkimukseen, jotta verifioitu menetelmä voitaisiin akkreditoida.

Hiivoja ja homeita hyödynnetään useiden elintarvikkeiden valmistuksessa, mutta ne ovat myös yksiä yleisimmistä elintarvikkeiden pilaajamikrobeista (Häikiö 2003,11; Riesute ym. 2021). Hiivojen pilaamassa elintarvikkeessa voi esiintyä esimerkiksi virhemakuja, värinmuutoksia sekä limanmuodostusta, ja jotkut hiivalajit voivat aiheuttaa infektoita heikentyneen immuunijärjestelmän omaavalle henkilölle (Fleet 2007; Hernández ym. 2018; Riesute ym. 2021). Homeet tuottavat mykotoksiineja eli homemyrkyjä, jotka ovat haitallisia ihmisille

ja homelajista riippuen voivat olla jopa karsinogeenisia. (Häikiö 2003, 14-15, 112-113.)

Eurofins Scientific Finland Oy on osa kansainvälistä Eurofins Groupia, joka toimii 50 eri maassa tarjoten erilaisia analyysi-, testaus-, sertifiointi- ja asiantuntijapalveluita. Suomessa Eurofins toimii 23 paikkakunnalla. (Eurofins 2022.) Eurofins Scientific Finland Oy:n Rasion toimipisteellä toimivat FINAS-akkreditoidut elintarvikemikrobiologian ja -kemian laboratoriot, jotka tarjoavat laajan valikoiman mikrobiologisia ja kemiallisia analyyssejä elintarvike- ja rehunäytteille (Eurofins 2019).

## 2 Hiivat ja homeet

Useat elintarvikkeiden valmistusprosessit perustuvat mikrobien käyttöön, mutta toisaalta mikrobit voivat myös pilata elintarvikkeet ja tehdä niistä ihmiselle myrkyllisiä. Tämän takia elintarviketeollisuudessa on tärkeää huolehtia, että elintarvikkeiden mikrobitoiminta pysyy turvallisella tasolla. (Häikiö 2003, 11.) Sienet, kuten hiivat ja homeet, ovat yksi tärkeimmistä mikro-organismiryhmistä, jotka aiheuttavat elintarvikkeiden pilaantumista (Riesute ym. 2021).

### 2.1 Hiivat

Hiivat ovat yksisoluisia mikrobeja, jotka lisääntyvät kuroutumalla. Hiivasolujen koko vaihtelee yhdestä sataan mikrometriin. Hiivojen väri vaihtelee lajista riippuen, *Saccharomyces cereviseae* eli tutummin leivinhiiva on väriltään vaaleaa, mutta lajista riippuen hiivat voivat kehittää myös kirkasvärisiä tai tummia pigmenttejä. (Häikiö 2003, 15.)

Hiivat kasvavat melko vaatimattomissa olosuhteissa (Häikiö 2003, 15). Ne sietävät happamuutta ja väkeviä sokeriliuoksia ja kasvavatkin parhaiten happamissa olosuhteissa, pH-alueella 4–6 (Häikiö 2003, 15; Riesute ym. 2021). Hiivat kasvavat usein 20–30 °C:n lämpötilassa, mutta jotkut lajit kestävät kuumempiakin olosuhteita (Riesute ym. 2021). Happi ei ole hiivoille välttämätöntä, mutta se tehostaa niiden kasvua. Ravintonaan hiivat hyödyntävät pääasiassa sokereita. (Häikiö 2003,15.) Esimerkiksi hedelmät ovat ideaali kasvuympäristö hiivoille, sillä niiden sokeripitoisuus ja veden aktiivisuus ovat korkeat ja pH matala (Riesute ym. 2021).

Leivonnassa ja juomien valmistuksessa hyödynnetään hiivojen alkoholikäymistä. Käymisessä hiiva käyttää ravinnokseen sokereita ja tuottaa samalla ympäristöönsä alkoholia ja hiilidioksidia. (Häikiö 2003, 15.) Leipien, oluen ja viinin käymisprosessit käyttäen *S. cerevisiae*-hiivaa ovat keskeisimpiä elintarvikkeiden valmistusmenetelmiä, jotka hyödyntävät hiivoja. Lisäksi muita hiivakantoja

hyödynnetään esimerkiksi juuston kypsyttämisessä ja kaakao- ja kahvipapujen käsittelyssä. (Riesute ym. 2021.)

Hiivojen aiheuttaman elintarvikkeen pilaantumisen tärkeimpiä merkkejä ovat sameus, turpoaminen, limanmuodostus, värinmuutokset ja virhemaut (Hernández ym. 2018). Hiivoja ei yleensä luokitella aggressiivisiksi taudinaiheuttajiksi, mutta jotkut hiivalajit, kuten *Candida*-suvun hiivat luokitellaan niin sanotuiksi opportunistisiksi patogeeneiksi (Fleet 2007; Riesute ym. 2021). Tämä tarkoittaa, että nämä hiivat eivät normaalisti ole taudinaiheuttajia, mutta ne muuttuvat sellaisiksi, jos isäntäelimestön puolustuskyky on heikentynyt esimerkiksi syövän, AIDS:in tai muun sairaalahoitoa vaativan taudin takia (Fleet 2007; Duodecim Terveyskirjasto 2016; Riesute ym. 2021). Heikentyneen immuunijärjestelmän omaava henkilö voi saada hiivojen pilaaman elintarvikkeen takia infektioita esimerkiksi iholle, limakalvoille, hengitysteihin ja keskushermostoon. On myös osoitettu, että monet elintarvikkeissa yleisemmätkin hiivalajit, kuten *S. cerevisiae*, *Candida krusei*, *Candida famata* ja *Pichia anomala* ovat aiheuttaneet infektioita. (Fleet 2007; Riesute ym. 2021.)

## 2.2 Homeet

Homeet ovat monisoluisia, rihmastoja muodostavia mikrobeja, jotka leviävät itiöiden avulla. Sopivan kasvualustan löydettyään homeitiöt alkavat muodostamaan rihmastoa, joka voi jo muutamassa päivässä kasvaa useiden senttimetrien kokoiseksi. Nuori homerihmasto on väriltään vaaleaa, mutta siihen syntyvät itiöt voivat värjätä sen homelajista riippuen esimerkiksi mustaksi, vihreäksi tai keltaiseksi. (Häikiö 2003, 12–14.)

Kuten hiivatkin, myös homeet ovat vaatimattomia kasvuolosuhteistaan. Ne eivät vaadi kosteita olosuhteita ja viihtyvät myös happamassa ympäristössä. Jotkut homeet kasvavat jopa jääkaappikylmässä eli myöskään korkea lämpötila ei ole niille ehdotonta. Homeet käyttävät ravinnokseen lähestulkoon mitä tahansa orgaanista ainetta. Happi on kuitenkin homeille välttämätöntä niiden kasvun kannalta. (Häikiö 2003, 14.)

Homeet ovat yksi yleisimmistä elintarvikkeiden pilaantumisen syistä. Ne aiheuttavat ongelmia erityisesti leipomovalmisteita, einesruokia, hilloja sekä marjoja käsitellessä. Homeiden haittoja lisäävät homemyrkyt eli mykotoksiinit, joita useat homelajit tuottavat. Homemyrkyjä päätyy ihmisten ravintoon paitsi suoraan homehtuneesta elintarvikkeesta, myös elintarvikkeena nautitun maidon tai lihan välityksellä homehtuneesta eläinten rehusta. Eri homelajit synnyttävät eri määrän myrkyjä ja myös homeiden kasvuolosuhteet vaikuttavat tuotetun myrkyt määrään. Tämän takia ei ole mahdollista suoraan sanoa, kuinka suuri määrä homeetta tekee elintarvikkeen vaaralliseksi. (Häikiö 2003, 14, 112-113.)

Suurin osa tunnetuista mykotoksiineista ovat *Aspergillus*-, *Penicillium*- ja *Fusarium*-sukuisten homeiden tuottamia (Labbé & García 2013, 284). *Aspergillus*-suvun homeet tuottavat aflatoksiini-nimistä homemyrkyä. Aflatoksiineja on useita eri tyyppisiä ja niitä esiintyy monissa homehtuneissa elintarvikkeissa, kuten viljoissa, maitotuotteissa, pähkinöissä ja kaakaossa. Aflatoksiinit ovat karsinogeneja eli ne ovat syöpää aiheuttavia aineita. Patuliini on mykotoksiini, jota tuottavat *Penicillium*-suvun homeet. Patuliinia esiintyy muun muassa hedelmissä, leivissä ja makkaroissa. Myös patuliini on karsinogeeni, minkä lisäksi se voi aiheuttaa kromosomimuutoksia. (Häikiö 2003, 112–113.) Deoksinivalenoli eli DON on *Fusarium*-suvun homeiden tuottama mykotoksiini. DON:ia esiintyy erityisesti viljoissa, kuten vehnässä, maississa, ohrassa, kaurassa ja rukiissa. DON aiheuttaa ihmisille myrkytysoireita, kuten vatsakipua, oksentelua, ripulia ja päänsärkyä. (Labbé & García 2013, 295–299.)

Toisaalta joitakin homelajeja myös hyödynnetään elintarvikkeiden valmistuksessa. Näistä tunnetuimpia ovat homejuustot, joita valmistetaan lisäämällä esimerkiksi *Penicillium*-suvun homeita juustomassaan tai juuston pintaan. Homekasvusto antaa juustoille niiden tyyppillisen ulkonäön ja aromit. (Häikiö 2003, 14–15.)

### 3 Verifiointi

Validoinnilla arvioidaan menetelmän soveltuvuutta tiettyyn käyttötarkoitukseen. Verifiointi on validointia suppeampi menettelytapa, joka voidaan suorittaa, jos menetelmä on validoitu jo jossain muualla. (Hägg 2016, 7–8.) Verifiointilla laboratorio osoittaa, että se suoriutuu validoidusta menetelmästä ja menetelmä on sopiva aiottuun käyttötarkoitukseensa (SFS-EN ISO 16140-3:2021, 5). Symphony-elatusaineen käyttö on jo validoitu Ranskan standardointijärjestö AFNOR:n hyväksymästi, joten Symphony-elatusaineen käyttöönotto Eurofinsillä vaati vain menetelmän verifiointin.

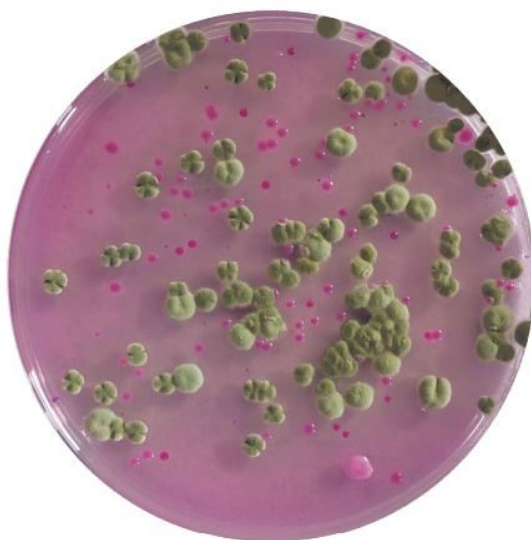
Verifiointi kokonaisuudessaan tapahtuu kolmessa osassa: verifiointisuunnitelman teko, verifiointin suorittaminen ja tulosten käsittely ja raportointi. Verifiointisuunnitelmaan kirjataan verifiointin tarkoitus, laajuus, toteutus ja aikataulu. Verifiointi suoritetaan standardin SFS-EN ISO 16140-3:2021 ohjeiden mukaisesti. Verifioitava Symphony-menetelmä on kvantitatiivinen ja standardin mukaan verifiointin suoritusvaihe tapahtuu kahdessa osassa: käyttöönottoverifiointi ja tuoteverifiointi.

#### 3.1 Symphony-elatusaine

Symphony-elatusaineella hiivat ja homeet voidaan määrittää näytteistä jo kolmen vuorokauden inkuboinnin jälkeen standardimenetelmien mukaisen viiden vuorokauden sijaan. Inkubointi tapahtuu 25 °C:n lämpötilassa. Lisäksi Symphony-elatusaineella voidaan määrittää hiivat ja homeet kaikista elintarvikkeista ja rehuista, riippumatta niiden veden aktiivisuudesta. (BIOKAR Diagnostics n.d., 1–2.)

Symphony-elatusaine on selektiivinen hiivoille ja homeille. Elatusaineeseen valitut peptonit, hiilihydraatit ja kasvunedistäjät mahdollistavat hiivojen ja homeiden nopean kasvun. Elatusaine on suunniteltu rajoittamaan homeiden talluksen lisääntymistä, mikä helpottaa homepesäkkeiden laskemista. Rose Bengal -väri helpottaa hiivojen laskemista värjäämällä hiivapesäkkeet

vaaleanpunaisiksi. (BIOKAR Diagnostics n.d., 1–2.) Kuvassa 1 näkyy, millaisina pesäkkeinä hiivat ja homeet kasvavat Symphony-elatusaineella.



Kuva 1. Hiiva- ja homepesäkkeitä Symphony-elatusaineella (BIOKAR Diagnostics n.d., 5).

Taulukossa 1 on esitetty Symphony-elatusaineen koostumus, elatusaineen valmistaja ei ole eritellyt valmistuksessa käytettäviä selektiivisiä aineita.

Taulukko 1. Koostumus yhdelle litralle Symphony-elatusainetta (BIOKAR Diagnostics n.d., 1).

Ainesosa	Määrä (g)
Peptonit	10,0
Glukoosi	18,0
Kasvunedistäjät	1,0
Selektiiviset aineet	1,0
Bakteriologinen agar	15,5

### 3.2 SFS-EN ISO 16140-3:2021

Standardilla tarkoitetaan kirjallista julkaisua, joka määrittää esimerkiksi tuotteille, palveluille ja järjestelmille ominaisuuksia, vaatimuksia, suosituksia ja ohjeita. Standardien avulla voidaan laatia yhtenäisiä toimintatapoja. Kukin standardi saa oman tunnuksen, joka kertoo siitä monia asioita. SFS tarkoittaa, että standardi on vahvistettu Suomessa. EN tarkoittaa, että standardi on vahvistettu Eurooppalaiseksi standardiksi. ISO tarkoittaa, että standardi on myös maailmanlaajuisesti vahvistettu. Näiden jälkeen ilmoitetaan standardin numero sekä sen vahvistamisvuosi. (SFS, 2023.)

Standardi SFS-EN ISO 16140-3:2021 Microbiology of the food chain. Method validation. Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory sisältää ohjeistuksen sellaisten menetelmien verifiointiin, joissa määritetään bakteereita ja sieniä elintarvikkeista, rehuista, elintarvikkeiden ja rehujen tuontantilojen ympäristönäytteistä ja alkutuotannon näytteistä. Standardissa on ohjeistettu muun muassa näytematriisien valinta sekä verifiointitestien suorittaminen riippuen siitä, onko verifioitava menetelmä kvalitatiivinen vai kvantitatiivinen. (SFS-EN ISO 16140-3:2021, 1–28.)

### 3.3 Käyttöönottoverifiointi

Käyttöönottoverifiointilla osoitetaan, että laboratorio suoriutuu verifioitavasta menetelmästä hyväksytysti (SFS-EN ISO 16140-3:2021, 5). Käyttöönottoverifiointilla määritetään menetelmän teknistä epävarmuutta, jonka lähteitä ovat muun muassa testiannoksen otto näytteestä, laimennossarjan teko ja pesäkkeiden laskutapa (SFS-EN ISO 19036:2019, 11; SFS-EN ISO 16140-3:2021, 19). Käyttöönottoverifiointin tuloksista lasketaan laboratorion sisäisen uusittavuuden keskihajonta ( $S_R$ ), jota verrataan menetelmän validoinnissa saatuun laboratorioden välisen uusittavuuden keskihajonnan ( $S_R$ ) arvoon (SFS-EN ISO 16140-3:2021, 19, 22–23).

Käyttöönottoverifiointiin valitaan vähintään 10 näytettä, jotka ovat samaa tuotetta, mutta ovat eri erää tai eri valmistajan tekemiä. Jokaisesta näytteestä analysoidaan kaksi testiannosta A ja B, jotka eroavat toisistaan olosuhteiltaan mahdollisimman paljon: eri tekijät, eri erää olevat kasvatusalustat ja reagenssit sekä eri laitteet. Valittujen olosuhteiden tulee kuitenkin vastata niitä, missä laboratorio menetelmää normaalistikin suorittaa. (SFS-EN ISO 16140-3:2021, 19–20.)

### 3.4 Tuoteverifiointi

Tuoteverifioinnilla laboratorio osoittaa, että se suoriutuu verifioitavasta menetelmästä niillä näytteillä, jotka kuuluvat sen tarjoamien analyysien laajuuteen. Verifiointistandardissa elintarvikkeet on jaettu 15 eri kategoriaan, joiden lisäksi menetelmä voidaan verifioida myös kategorioille rehut, ympäristönäytteet ja alkutuotannon näytteet. Verifiointi voidaan tehdä yksittäisille elintarvikekategorioille, tai vaihtoehtoisesti tehdä laaja verifiointi kaikille elintarvikkeille. Kun verifioidaan laajuudella ”elintarvikkeet” yksittäisten kategorioiden sijaan, valitaan tuoteverifiointiin vähintään 5 näytettä, jotka ovat kaikki eri kategorioista. Jos laboratorio haluaa verifioida lisäksi ”muita kategorioita”, kuten rehu- tai ympäristönäytteitä, tulee myös nämä kategoriat ottaa mukaan tuoteverifiointiin. Koska kaikkia mahdollisia näytteitä ei tuoteverifioinnissa voida testata, tulee testeihin valita mahdollisuuksien mukaan hankalia näytteitä. Hankalilla näytteillä tarkoitetaan näytteitä, joiden koostumus, taustamikrobisto ja muut epäpuhtaudet voivat vaikuttaa testitulokseen mitätöiden sen. Esimerkiksi korkea taustamikrobisto, pilaajamikrobit, korkea rasvapitoisuus, alhainen pH, antimikrobiset ainesosat, alhainen veden aktiivisuus, viskositeetti ja väriaineet voivat vaikuttaa testitulokseen. (SFS-EN ISO 16140-3:2021, 7–8, 45.)

Jokaiseen näytteeseen ympätään menetelmän vaatimaa mikrobia kolmelle eri pitoisuudelle. Näiden pitoisuuksien tulee vastata niitä, mitä laboratorio kyseisestä tuotteesta yleensä löytää. Lisäksi määritetään ympäykseen käytetyn mikrobisuspensiomäärän pitoisuus. Tuoteverifioinnin tuloksista lasketaan arvioitu harha-arvo (eBias) vertaamalla ympättyjen näytteiden ja käytetyn

mikrobisuspensiomäärän pitoisuuksia keskenään. (SFS-EN ISO 16140-3:2021, 25–27.)

### 3.5 Verifiointi ja akkreditointi

Akkreditoinnilla tarkoitetaan pätevyyden toteamista kolmannen osapuolen toimesta. Se on kansainvälinen menettelytapa, joka mahdollistaa toimijan pätevyyden osoittamisen puolueettomasti. EU-lainsäädännön mukaan jokaisessa EU-maassa tulee olla yksi kansallinen akkreditointiorganisaatio. Suomen akkreditointiorganisaatio on FINAS, joka on osa Turvallisuus- ja kemikaalivirastoa eli Tukes:ia. Toimija, joka hakee akkreditointia, saa itse päättää pätevyysalueen, jolle akkreditointi suoritetaan, eli kaikki toimijan toiminta ei automaattisesti ole akkreditoitua. Akkreditointia haetaan, koska se kertoo asiakkaille toiminnan luotettavuudesta ja voi helpottaa markkinoille pääsyä. (Tukes 2019.)

Kun akkreditoidaan testaus-, tarkastus- ja kalibrointitoimintaa, tulee akkreditoitavien menetelmien olla validoituja ja tarkoituksenmukaisia. Tämä määritelmä koskee myös verifiointia. Menetelmän validointi tai verifiointi on siis yksi hyväksytyn akkreditoinnin ehdoista. (FINAS 2016.)

## 4 Verifioinnin suoritus

Verifiointitestit suoritettiin kahdessa osassa: käyttöönottoverifiointi ja tuoteverifiointi. Käyttöönottoverifioinnin tuli olla hyväksytysti suoritettu, ennen kuin voitiin siirtyä tuoteverifiointivaiheeseen. Ennen verifiointitestejä valmistettiin hiiva- ja homekannoista mikrobisuspensiot, joita käytettiin verifiointinäytteiden ympäykseen. Liitteessä 1 on esitetty mikrobisuspensioiden määritetyt pitoisuudet.

### 4.1 Mikrobisuspensioiden valmistus

Suspensiot valmistettiin yhteensä neljästä hiiva- ja homekannasta: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Candida albicans* ATCC 10231, *Cladosporium* sp. ja *Fusarium oxysporum*. *Cladosporium* sp. aikaisemmin laboratoriossa laadunvarmistuskäyttöön eristetty kanta ja *F. oxysporum* on tätä verifiointia varten asiakasnäytteestä eristetty ja tunnistettu kanta.

#### 4.1.1 Hiivasuspensioiden valmistus

Aluksi kasvatettiin tuoreet puhtasviljelmämaljat *S. cerevisie*- ja *C. albicans*-hiivoista siirrostamalla kantamaljalta hiivapesäke silmukalla PC-maljalle. Inkuboitiiin maljoja kolme vuorokautta 25 °C:ssa. Tämän jälkeen siirrostettiin hiivapesäke silmukalla 10 ml:aan BHI-rikastuslientä ja inkuboitiiin BHI-putkia neljä vuorokautta 25 °C:ssa.

BHI-putkista valmistettiin laimennossarja  $10^{-1}$ – $10^{-7}$  peptonisuolaliemeen eli MAX:iin. Viljeltiin sekä *S. cerevisiae* että *C. albicans* laimennokset  $10^{-4}$ – $10^{-7}$  pintalevityksenä PC-, DRBC- ja Symphony-maljoille. Inkuboitiiin kaikki maljat 25 °C:ssa, PC- ja Symphony-maljat kolme vuorokautta ja DRBC-maljat viisi vuorokautta. Maljoilla kasvavien pesäkemäärien perusteella määritettiin valmistettujen suspensioiden eli ympärien pitoisuudet. Valmistettiin myöhemmin

edellä mainitulla tavalla myös toiset laimennosarjat molemmista hiivakannoista. Näiden ymppien pitoisuudet määritettiin käyttäen vain Symphony-maljoja.

#### 4.1.2 Homesuspensioiden valmistus

Aluksi kasvatettiin tuoreet puhtasviljelmämaljat *Cladosporium* sp.- ja *F. oxysporum*-homeista siirrostamalla kantamaljalta homepesäkettä piikillä PC-maljalle. Inkuboitiin maljoja kolme vuorokautta 25 °C:ssa. Tämän jälkeen siirrostettiin hometta MAX-putkiin ja steriileihin vesiputkiin kaapimalla homepesäkkeen pintaa silmukalla ja sekoittamalla tätä MAX:iin tai veteen.

Vesi- ja MAX-putkia ei inkuboitu, vaan valmistettiin suoraan laimennosarjat  $10^{-1}$ – $10^{-4}$ , vesiputkesta laimennettiin veteen ja MAX-putkesta MAX:iin. Viljeltiin sekä *Cladosporium* sp. että *F. oxysporum* laimennokset  $10^{-1}$ – $10^{-4}$  pintalevityksenä PC-, DRBC-, DG18- ja Symphony-maljoille. Inkuboitiin kaikki maljat 25 °C:ssa, PC- ja Symphony-maljat kolme vuorokautta ja DRBC- ja DG18-maljat viisi vuorokautta. Maljoilla kasvavien pesäkemäärien perusteella määritettiin valmistettujen suspensioiden eli ymppien pitoisuudet. Steriilin veden ja MAX:in käytön välillä ei huomattu eroa, joten käytettiin jatkossa MAX:ia homeymppien valmistukseen.

Myöhemmin valmistettiin lisää homesuspensioita, joihin yritettiin saada korkeampi mikrobiitiheys. Valmistettiin *Cladosporium* sp. laimennosarjat 1–4 ja *F. oxysporum* laimennosarjat 1–2 ja 5–7 samaan tapaan kuin edellä, mutta kaavittiin homeen pintaa useammasta pesäkkeestä, jotta saavutettaisiin korkeampi mikrobiitiheys. Lisäksi valmistettiin *Cladosporium* sp. laimennosarja 5 ja *F. oxysporum* laimennosarjat 3–4 seuraavasti: leikattiin PC-maljalta kasvavasta homepesäkkeestä steriilillä veitsellä pala niin, että myös agar tuli palan mukana ja siirrettiin pala MAX-putkeen. Lisättiin paloja yksi tai useampi ja valmistettiin tämän jälkeen laimennosarja normaalisti. Myöhemmässä vaiheessa määritettiin valmistettujen ymppien pitoisuudet käyttäen vain Symphony-maljoja.

## 4.2 Käyttöönottoverifiointi

Varsinainen verifiointin suoritusvaihe aloitettiin käyttöönottoverifiointilla, joka tuli suorittaa hyväksytysti ennen tuoteverifiointia. Käyttöönottoverifiointissa tutkittiin menetelmän teknistä epävarmuutta, jota voi aiheutua muun muassa työskentelytavoista ja käytetyistä välineistä.

### 4.2.1 Käyttöönottoverifiointin matriisit

Käyttöönottoverifiointiin tuli valita matriisiksi mikä tahansa elintarvike, joka kuuluu laboratorion toiminnan laajuuteen. Käyttöönottoverifiointiin valittiin matriisiksi jauhot, koska niistä tehdään laboratoriossa hiiva- ja homeäärityksiä, ne on helppo homogenisoida ja niistä löytyy usein luonnollista hiiva- ja homekontaminaatiota. Kaikki jauhönäytteet olivat eri erää tai eri valmistajan tekemiä, ja mukana analyyseissa oli useita eri jauhoja, kuten vehnä jauhoja, ruisjauhoja ja kaurajauhoja.

### 4.2.2 Käyttöönottoverifiointin suoritus

Käyttöönottoverifiointi suoritettiin kahtena eri päivänä: ensimmäisenä päivänä analysoitiin näytteet 1–6 ja toisena päivänä näytteet 7–12. Käyttöönottoverifiointia oli suorittamassa yhteensä viisi laboranttia ja kaikista näytteistä analysoitiin kaksi testiannosta A ja B. Näytteitä punnittiin 10 g stomacher-pussiin ja laimennettiin 1:10 peptonisuolaliemellä (MAX) käyttäen Dilumat-laimenninta. Kaikki maljat inkuboitettiin  $25 \pm 1$  °C:n lämpötilassa  $68 \pm 2$  tunnin ajan.

Tavallisesti asiakkaiden hiiva- ja home näytteet punnitaan ja laimennetaan viljelypisteellä ja pipetoidaan käyttäen sähköpipettiä. Viljelypisteellä MAX:ia valmistetaan päivittäin uusi erä autoklaavissa, minkä lisäksi käytetään tarpeen mukaan pulloitettua MAX:ia tai valmiita MAX-pusseja. Viljelypisteen lisäksi käyttöönottoverifiointia suoritettiin listeriapisteellä, jota käytetään kiireisimpinä

aikoina viljelypisteen lisäksi. Varapipetteinä laboratorioissa käytetään Finnpiipette-automaattipipettejä, jotka otettiin myös mukaan käyttöönottoverifiointiin.

Jokainen verifiointinäyte analysoitiin ilman ympäystä sekä home- ja hiivaymppien kanssa, eli jokaisesta näytteestä tehtiin yhteensä kolme punnitusta per määrittäminen. Sama laborantti ympäysi kaikki näytteet, jotta siihen ei tulisi vaihtelua, ja ympäys tehtiin aina ennen näytteen homogenisointia, näytteen punnitsemisen ja laimentamisen jälkeen. Näytteisiin 1–6 ympäyttiin *S. cerevisiae* ja *Cladosporium* sp. ja näytteisiin 7–12 ympäyttiin *C. albicans* ja *F. oxysporum*. Liitteessä 2 on esitetty solujen ympäysmäärät näytteisiin.

Rinnakkaisiin määrittäksiin A ja B pyrittiin samaan mahdollisimman paljon vaihtelua vaihtelemalla analyysin tekeviä henkilöitä, laimentimia, homogenisaattoreita, MAX-erää, Symphony-erää ja pipettejä. Vaihteluissa otettiin kuitenkin huomioon, miten analyysit tavallisesti suoritetaan eri pisteillä eikä siten esimerkiksi vaihdeltu eri pisteiden välineitä keskenään. Tämän takia viljelypisteellä näytteitä punnittaessa käytettiin aina autoklaavissa valmistettua MAX:ia, viljelypisteen Dilumat-laimenninta ja viljelypisteen homogenisaattoria ja listeriapisteellä punnittaessa MAX-pulloa tai -pussia, listeriapisteen Dilumat-laimenninta ja listeriapisteen homogenisaattoria. Liitteessä 2 on esitetty, miten vaihtelu on toteutettu jokaisen näytteen kohdalla.

Maljoille pipetoitavat määrät valittiin sen mukaan, minkä verran niissä odotettiin kasvavan hiiva- tai homepesäkkeitä. Standardin mukaan pesäkkeitä laskiessa rinnakkaisilta maljoilta tulisi laskea yhteensä vähintään 30 pesäkettä ja yhdeltä maljalta enintään 150 pesäkettä, joten pyrittiin maljojen kasvun olevan näiden ohjeiden mukaista. Maljoille pipetoitiin kolmella eri tapaa: -1 laimennoksesta 1 ml kolmelle maljalle (0,33 ml per malja), -1 laimennoksesta kahdelle maljalle 0,1 ml per malja sekä -1 laimennoksesta ja -2 laimennoksesta molemmista 0,1 ml maljalle. Sähköpipetissä oli omat ohjelmat 1 ml, 1 ml kolmelle maljalle ja 0,1 ml pipetointiin. Kun pipetoitiin 1 ml kolmelle maljalle Finnpiipetillä, otettiin pipettiin 1 ml ja jaettiin se silmämääräisesti tasan kolmelle maljalle. Pipetoinnit on esitetty tarkemmin liitteessä 2.

Ensimmäisellä suorituskerralla osassa maljoista kasvoi joko alle 30 tai yli 150 pesäkettä, minkä seurauksena kuuden näytteen homemääritykset ja viiden näytteen hiivamääritykset tuli uusiksi. Uusintoja suoritettaessa lisättiin ympättävien mikrobisuspensioiden määriä, näytteiden laimennoksia sekä rinnakkaisia maljoja. Lisäksi edellisissä määrityksissä käytetty Finnpiipette vaihdettiin sellaiseen, jolla saatiin pipetoitua 333 µl per malja sen sijaan, että jaettiin 1 ml silmämääräisesti kolmelle maljalle. Näytesarjojen A ja B vaihtelut tehtiin muuten samalla tavalla, mutta uusintoja oli suorittamassa vain kaksi laboranttia. Kaikkiin uusittaviin hiivanäytteisiin ei enää ympätty hiivaa, koska näytteen luonnollinen kontaminaatio oli riittävää.

### 4.3 Tuoteverifiointi

Verifiointin suoritusvaihe jatkui käyttöönottoverifiointin jälkeen tuoteverifiointiin. Tuoteverifiointilla selvitettiin matriisin vaikutusta menetelmään.

#### 4.3.1 Tuoteverifiointin matriisit

Symphony-menetelmälle haluttiin pätevyysalueeksi ”elintarvikkeet”, jolloin sitä voidaan käyttää kaikkien elintarvikenäytteiden analysointiin. Standardin mukaan tällöin verifiointiin tuli valita näytteiksi viisi elintarviketta, jotka olivat kaikki eri kategorioista. Koska tuoteverifiointissa ei testata kaikkia mahdollisia tuotteita, tuli verifiointiin valita mahdollisuuksien mukaan hankalia näytteitä. Näytevalinnoissa otettiin myös huomioon se, että valitut näytteet edustaisivat mahdollisimman hyvin niitä näytteitä, mitä laboratoriossa yleensä analysoidaan.

Symphony-menetelmälle haluttiin myös FINAS-akkreditointi, joten kategoriavalinnoissa otettiin huomioon FINAS:in ja Ruokaviraston tekemä elintarvikematriisien kategoriajako, joka on esitetty taulukossa 2, lukuun ottamatta taulukossa mainittuja kategorioita ”margariini” ja ”rehut”. Yhdeksi verifioitavaksi matriisiksi haluttiin margariini, koska laboratoriossa analysoidaan paljon hiivoja ja homeita margariininäytteistä. Margariini ei kuitenkaan kuulu

valmiisiin kategorioihin, joten verifioitiin se kuudentena kategoriana. Lisäksi laboratoriossa analysoidaan rehuja, joten verifioitiin menetelmä myös rehuille omana kategorianaan. Tuoteverifiointiin valitut matriisit on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2. Tuoteverifiointiin valitut kategoriat ja matriisit

<b>FINAS elintarvikekategoria</b>	<b>Kategoriasta valittu matriisi</b>
Yhdistelmäelintarvikkeet	Einesruoka
Kasvikset, hedelmät, marjat ja viljat ja niistä tehdyt valmisteet	Siemenet
Maito ja niistä tehdyt valmisteet	Jogurtti
Kala ja äyriäiset ja niistä tehdyt valmisteet	Savukala
Lihat ja munat ja niistä tehdyt valmisteet	Munapohjainen välipalatuote
Margariinit	Margariini
Rehut	Soijarouhe

#### 4.3.2 Tuoteverifioinnin suoritus

Tuoteverifioinnissa näytteisiin ympättiin hiivoja ja homeita kolmelle eri pitoisuustasolle, jotka vastasivat niitä pitoisuuksia, mitä kyseisistä tuotteista yleensä tulokseksi saadaan. Näytteille valitut pitoisuustasot on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Tuoteverifioinnin matriiseille valitut pitoisuustasot

<b>Matriisi</b>	<b>Pitoisuustasot (pmy/g)</b>
Einesruoka	100, 1000 ja 10 000
Siemenet	1000, 10 000 ja 100 000
Jogurtti	100, 1000 ja 10 000

(jatkuu)

Taulukko 3 (jatkuu).

Savukala	100, 1000 ja 10 000
Munapohjainen välipalatuote	100, 1000 ja 10 000
Margariini	100, 1000 ja 10 000
Soijarouhe	100, 1000 ja 10 000

Valittujen kolmen pitoisuustason lisäksi analysoitiin ylimääräiset kaksi pitoisuustasoa, jotka olivat 10 kertaa pienemmät ja suuremmat kuin pienin ja suurin valittu pitoisuustaso. Jos näytteestä analysoitiin esimerkiksi pitoisuustasot 100, 1000 ja 10 000 pmy/g, analysoitiin lisäksi pitoisuustasot 10 ja 100 000 pmy/g. Ylimääräiset pitoisuustasot analysoitiin, sillä jos ympäyksessä käytetyn mikrobisuspension pitoisuus olisi ollut eri kuin odotettiin, olisi ylimääräinen pitoisuustaso voinut kattaa jonkun valituista pitoisuustasoista. Homeiden kohdalla valittua pitoisuustasoa suurempaa ylimääräistä pitoisuustasoa ei voitu analysoida, koska homesuspensioiden pitoisuuksia ei saatu riittävän korkeiksi.

Jokaisen näytteen jokaisesta eri pitoisuudesta tehtiin rinnakkaiset määritykset A ja B sekä jokaisesta näytteestä negatiivikontrollit eli tehtiin analyysi ilman hiivojen tai homeiden ympäystä. Hiivat ja homeet analysoitiin erikseen eli niitä ei ympätty samaan testiannokseen. Eri pitoisuuksille valittiin mahdollisuuksien mukaan eri näyte, eli matriisi oli sama, mutta näyte oli eri erää, eri valmistajan tekemä, eri makuinen tai muuta vastaavaa.

Lisäksi määritettiin ympäyksessä käytettyjen mikrobisuspensioiden pitoisuudet. Pitoisuudet laskettiin määrityksen jälkeen siten, että tulokseksi saatiin ympäysmäärän pitoisuus. Jos näytteeseen ympätettiin esimerkiksi kaksi millilitraa homesuspensiota, laskettiin tulokseksi pesäkkeitä muodostavien yksiköiden määrä kahdessa millilitrassa kyseistä homesuspensiota.

Tuoteverifiointin suoritti kokonaisuudessaan yksi laborantti. Näytteitä punnittiin 10 g stomacher-pussiin ja laimennettiin 1:10 peptonisuolaliemellä (MAX) käyttäen Dilumat-laimenninta. Kaikki maljat inkuboitiin  $25 \pm 1$  °C:n lämpötilassa

68±2 tunnin ajan. Tuoteverifiointin tarkemmat ymppäysmäärät ja maljoille pipetoinnit on esitetty liitteessä 3.

Ensimmäisellä tuoteverifiointin kerralla hyväksytyt tulokset saatiin määritettyä vain margariinin ja munapohjaisen välipalatuotteen homeista. Muissa homemäärityksissä maljoilla kasvoi liikaa pesäkkeitä tai näytteiden pitoisuudet jäivät liian alhaisiksi. Siementen kohdalla liialliset pesäkemäärät johtuivat näytteiden luonnollisesta kontaminaatiosta. Osa maljoista oli myös kuivunut inkubointikaapissa, minkä takia niitä ei voitu laskea luotettavasti. Hiivamäärityksissä näytteiden pitoisuuksien välillä oli epäloogisia harppauksia, mikä saattoi johtua esimerkiksi laimennossarjan epäonnistumisesta. Kasvatettiin myös lisättävän ympin määrää vähintään yhteen millilitraan tarkkuuden lisäämiseksi. Lisäksi jätettiin määrityksistä pois pienempi ylimääräinen pitoisuustaso, sillä maljat olivat usein tyhjiä tämän pitoisuustason kohdalla.

Epäonnistuneet näytteet uusittiin, jonka jälkeen hyväksytyt tulokset saatiin määritettyä kaikista muista näytteistä paitsi soijarouheen ja jogurtin homeista ja siementen hiivoista. Soijarouheen ja jogurtin homeiden määrityksessä oli käytetty *Cladosporium* sp. -hometta, jonka pitoisuudet jäivät näytteissä liian alhaisiksi, kuten ensimmäiselläkin kerralla. Todettiin, että *Cladosporium* sp.:n mikrobiitiheys laimennossarjoissa väheni liikaa kylmäsäilytyksen aikana, eivätkä aiemmin määritetyt pitoisuudet olleet luotettavia. Tämän takia päätettiin tehdä toiset uusinnat käyttäen *F. oxysporumia*. Siementen hiivamäärityksissä oli jälleen liikaa luonnollista kontaminaatiota osassa näytteistä, jonka seurauksena maljat olivat ylikasvaneita. Toiseen uusintaan pyrittiin etsimään puhtaammat näytteet, jonka lisäksi tehtiin varulta määritykset myös käyttäen vain sellaista näytettä, joka aiemmin todettiin lähes puhtaaksi.

#### 4.4 Vertailututkimus

Laboratorio osallistui Eurofins Laboratory Proficiency Testing -vertailututkimukseen, jonka järjestäjänä oli Eurofins Food & Feed Testing Norway AS. Vertailututkimuksessa laboratorio määrittä kolmesta elintarvikenäytteestä A,

B ja C usean eri mikrobin pitoisuuden. Näytteistä ei etukäteen tiedetty, minkä verran ne sisältävät eri mikrobeja. Hiivat ja homeet analysoitiin standardimenetelmän mukaisesti, minkä lisäksi näytteet analysoitiin myös Symphony-menetelmällä. Näin voitiin arvioida Symphony-menetelmän luotettavuutta. Näytteet analysoi yksi laborantti. Vertailututkimusraportin mukaan näytteet A ja B sisälsivät hiivakantaa *Saccharomyces cerevisiae* ja näyte C sisälsi homekantaa *Aspergillus brasiliensis*. Tuloksista laskettiin z-arvo, joka kertoo, kuinka monen keskihajonnan päässä saatu tulos on kaikkien osallistujien keskiarvosta.

## 5 Tulokset

Verifiointin suoritusvaiheen jälkeen laskettiin tulokset ja koostettiin niistä verifiointiraportti. Sekä käyttöönottoverifiointilla että tuoteverifiointilla oli omat rajansa hyväksytyille tuloksille. Hiivoille ja homeille laskettiin molemmissa osioissa omat tuloksensa.

### 5.1 Käyttöönottoverifiointi

Käyttöönottoverifiointissa kaikki kaksitoista jauhonäytettä analysoitiin sekä ilman ympäystä että hiiva- ja homeympin kanssa. Osa näytteistä tuli uusia, koska maljat olivat ylikasvaneet tai rinnakkaisilla maljoilla kasvoi alle 30 pesäkettä. Uusintoja varten lisättiin ympin määrää, näytteiden laimennoksia ja rinnakkaisia maljoja. Käyttöönottoverifiointissa jouduttiin uusimaan homeet näytteistä 2–7 ja hiivat näytteistä 7–8 ja 10–12.

Standardin SFS-EN ISO 16140-3:2021 mukaisesti käyttöönottoverifiointin näytteistä laskettiin sisäisen uusittavuuden keskihajonta  $S_{IR}$ . Standardin mukaan  $S_{IR}$  lasketaan seuraavalla kaavalla:

$$S_{IR} = \sqrt{\frac{1}{2n} \sum_{i=1}^n (y_{iA} - y_{iB})^2}$$

Kaava 1. Sisäisen uusittavuuden keskihajonnan  $S_{IR}$  laskukaava (SFS-EN ISO 16140-3:2021, 22).

Kaavassa 1  $S_{IR}$  tarkoittaa sisäisen uusittavuuden keskihajontaa,  $i$  tarkoittaa näytteen indeksiä ( $i=1-n$ ),  $n$  tarkoittaa näytteiden määrää sekä  $y_{iA}$  ja  $y_{iB}$  tarkoittavat logaritmiseen muotoon tuotuja pitoisuuksia näytesarjoista A ja B (SFS-EN ISO 16140-3:2021, 22–23.)

Standardin SFS-EN ISO 16140-3:2021 mukaan  $S_{IR}$ -arvoa verrataan  $S_R$ -arvoon, joka tarkoittaa laboratorioden välisen uusittavuuden keskiarvoa.  $S_R$ -arvot on

määritetty menetelmän validoinnissa ja vertailuun oli valittava pienin  $S_R$ -arvo, joka validoinnissa on saatu. AFNOR:in validointiraportissa pienin  $S_R$ -arvo oli 0,139 (ADRIA 2022, 49).  $S_{IR}$ -arvon tuli olla  $\leq 2 \cdot S_R$  eli  $\leq 0,278$ .

Hiivojen sisäisen uusinnan keskihajonnan määrittämisessä voitiin käyttää näytteiden 3, 7, 11 ja 12 luonnollista kontaminaatiota. Näytteiden 8 ja 10 hiivamäärät olivat uusinnoissakin liian alhaiset eli alle 30 pesäkettä rinnakkaisilla maljoilla, joten ne jätettiin tulosten laskennasta kokonaan pois. Taulukossa 4 on esitetty sisäisen uusinnan keskihajonnan  $S_{IR}$  laskeminen hiivoille.

Taulukko 4. Sisäisen uusinnan keskihajonnan  $S_{IR}$  laskeminen hiivoille

Näyte	Pitoisuus A ( $x_{iA}$ ) (pmy/g)	Pitoisuus A $\log_{10}$ ( $y_{iA}$ ) (pmy/g)	Pitoisuus B ( $x_{iB}$ ) (pmy/g)	Pitoisuus B $\log_{10}$ ( $y_{iB}$ ) (pmy/g)	Erotus $ y_{iA} - y_{iB} $	Neliö $ y_{iA} - y_{iB} ^2$
1	5950	3,77	7050	3,85	0,0737	0,0054
2	5800	3,76	6350	3,80	0,0393	0,0015
3	1760	3,25	3040	3,48	0,2374	0,0563
4	6150	3,79	5150	3,71	0,0771	0,0059
5	5750	3,76	4950	3,69	0,0651	0,0042
6	6650	3,82	7050	3,85	0,0254	0,0006
7	31 000	4,49	6909	3,84	0,6519	0,4250
8	<30 pmy	-	<30 pmy	-	-	-
9	350	2,54	600	2,78	0,2341	0,0548
10	<30 pmy	-	<30 pmy	-	-	-
11	1027	3,01	1591	3,20	0,1901	0,0361
12	1248	3,10	694	2,84	0,2550	0,0650

(jatkuu)

Taulukko 4 (jatkuu).

	<b>sum- ma</b>	0,6551
	<b>sum- ma/ (2·10)</b>	0,0328
	<b>S<sub>IR</sub>= √(0,03 28)</b>	0,181

Hiivojen sisäisen uusittavuuden keskihajonnan  $S_{IR}$  tulokseksi määritettiin 0,181, mikä oli  $\leq 0,278$ .

Homeiden sisäisen uusinnan keskihajonnan määrittämisessä käytettiin vain homesuspensiolla ympättyjä näytteitä. Näytteiden 2 ja 5 homemäärät olivat usinnoissakin liian alaiset eli alle 30 pesäkettä rinnakkaisilla maljoilla, joten ne jätettiin tulosten laskennasta kokonaan pois. Taulukossa 5 on esitetty sisäisen uusinnan keskihajonnan  $S_{IR}$  laskeminen homeille.

Taulukko 5. Sisäisen uusinnan keskihajonnan  $S_{IR}$  laskeminen homeille

<b>Näy- te</b>	<b>Pitoisuus A (<math>x_{iA}</math>) (pmy/g)</b>	<b>Pitoisuus A <math>\log_{10}</math> (<math>y_{iA}</math>) (pmy/g)</b>	<b>Pitoisuus B (<math>x_{iB}</math>) (pmy/g)</b>	<b>Pitoisuus B <math>\log_{10}</math> (<math>y_{iB}</math>) (pmy/g)</b>	<b>Erotus  <math>y_{iA}</math>- <math>y_{iB}</math> </b>	<b>Neliö  <math>y_{iA}</math>- <math>y_{iB}</math> <sup>2</sup></b>
1	720	2,68	460	2,66	0,1946	0,0379
2	860	2,93	<30 pmy	-	-	-
3	890	2,95	380	2,58	0,3696	0,1366
4	400	2,60	350	2,54	0,0580	0,0034
5	1010	3,00	<30 pmy	-	-	-
6	790	2,90	300	2,48	0,4205	0,1768

(jatkuu)

Taulukko 5 (jatkuu).

7	1250	3,10	420	2,62	0,4737	0,2244
8	1990	3,30	2570	3,41	0,1111	0,0123
9	1690	3,23	2280	3,36	0,1300	0,0169
10	2530	3,40	2780	3,44	0,0409	0,0017
11	2160	3,33	760	2,88	0,4536	0,2058
12	1250	3,10	1770	3,25	0,1511	0,0228
					<b>sum- ma</b>	0,8385
					<b>sum- ma/ (2·10)</b>	0,0419
					<b>S<sub>IR</sub>= √(0,03 28)</b>	0,205

Homeiden sisäisen uusittavuuden keskihajonnan  $S_{IR}$  tulokseksi määritettiin 0,205, mikä oli  $\leq 0,278$ .

## 5.2 Tuoteverifiointi

Tuoteverifiointissa kaikki seitsemän tuotekategorian näytteet analysoitiin hiiva- ja homeymppien kanssa. Myös tuoteverifiointivaiheessa näytteistä saatiin kelpaamattomia tuloksia, kun maljat olivat ylikasvaneet tai näytteiden pitoisuudet olivat jääneet liian alhaisiksi. Tähän syynä olivat näytteiden luonnollinen kontaminaatio ja epätarkka ympin pitoisuus. Uusintoja varten näytteen laimennoksia ja ympin pitoisuutta muutettiin, jotta saavutettaisiin sopivat pesäkemäärät. Tuoteverifiointissa uusittiin homeet kerran savukalasta, eineksestä ja siemenistä ja kaksi kertaa jogurtista ja soijarouheesta. Hiivat uusittiin kerran kaikista tuotteista ja kaksi kertaa siemenistä.

Standardin SFS-EN ISO 16140-3:2021 mukaisesti tuoteverifioinnin näytteistä laskettiin arvioitu harha-arvo eBias. Standardin mukaan eBias lasketaan vertaamalla ympättyjen näytteiden ja käytetyn mikrobisuspensiomäärän pitoisuuksia keskenään eli laskemalla näiden pitoisuuksien erotuksen itseisarvo. Vertailua varten tulokset tulee esittää ympätyille näytteille muodossa  $\log_{10}$  pmy/testiannos ja mikrobisuspensiomäärälle  $\log_{10}$  pmy/ympätty määrä (ml). Standardin mukaan eBias-arvon tulee olla  $\leq 0,5$ .

### 5.2.1 Margariinin arvioidut harha-arvot

Margariinin eBias-arvo hiivoille määritettiin ympäällä näytteisiin *S. cerevisiaeta* tavoitepitoisuuksina 100, 1000 ja 10 000 pmy/g. Laskettiin ympätyn mikrobisuspensiomäärän pitoisuus, tulokset taulukossa 6.

Taulukko 6. Margariiniin ympätyn *S. cerevisiae* -suspensiomäärän pitoisuus

Laimennos	Laimennoksen pitoisuus (pmy/ml)	Ympätty määrä (ml)	Ympätyn määrän pitoisuus (pmy)	Pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/ympäpimäärä)
-4	409	3,5	1432	3,16
-3	4090	3,5	14 315	4,16
-2	40 900	3,5	143 150	5,16

Laskettiin margariinin eBias-arvo hiivoille vertaamalla ympättyjen margariininäytteiden ja käytetyn mikrobisuspensiomäärän pitoisuuksia keskenään, tulokset taulukossa 7. Näytteiden testiannoksen suuruus oli 10 g.

Taulukko 7. Margariinin eBias-arvot hiivoille

Näyte	Näytteen pitoisuus (pmy/g)	Näytteiden A ja B pitoisuuksien keski-arvo (pmy/g)	Näytteen pitoisuus (pmy/testiannos)	Näytteen pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/testiannos)	Ympin pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/ympipimäärä)	eBias
1A	140	155	1550	3,19	3,16	0,03
1B	170					
2A	1690	1710	17 100	4,23	4,16	0,07
2B	1730					
3A	16 800	16 900	169 000	5,23	5,16	0,07
3B	17 000					

Margariinin eBias-arvo homeille määritettiin ymppäällä näytteisiin *F. oxysporumia* tavoitepitoisuuksina 100, 1000 ja 10 000 pmy/g. Laskettiin ympätyn mikrobisuspensiomäärän pitoisuus, tulokset taulukossa 8.

Taulukko 8. Margariiniin ympätyn *F. oxysporum* -suspensiomäärän pitoisuus

Laimennos	Laimennoksen pitoisuus (pmy/ml)	Ympätty määrä (ml)	Ympätyn määrän pitoisuus (pmy)	Pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/ympipimäärä)
-1	4000	0,5	2000	3,30
-1	4000	2	8000	3,90
0	40 000	2	80 000	4,90

Laskettiin margariinin eBias-arvo homeille vertaamalla ympättyjen margariininäytteiden ja käytetyn mikrobisuspensiomäärän pitoisuuksia keskenään, tulokset taulukossa 9. Näytteiden testiannoksen suuruus oli 10 g.

Taulukko 9. Margariinin eBias-arvot homeille

Näyte	Näytteen pitoisuus (pmy/g)	Näytteiden A ja B pitoisuuksien keski-arvo (pmy/g)	Näytteen pitoisuus (pmy/testiannos)	Näytteen pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/testiannos)	Ympin pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/ympärimäärä)	eBias
1A	200	255	2550	3,41	3,30	0,11
1B	310					
2A	1200	1130	11 300	4,05	3,90	0,15
2B	1060					
3A	12 450	12 175	121 750	5,09	4,90	0,19
3B	11 900					

Kaikki margariinin eBias-arvot hiivoille ja homeille olivat  $\leq 0,5$ .

### 5.2.2 Jogurtin arvioidut harha-arvot

Jogurtin eBias-arvo hiivoille määritettiin ympäällä näytteisiin *C. albicansia* tavoitepitoisuuksina 100, 1000 ja 10 000 pmy/g. Laskettiin ympätyn mikrobisuspensiomäärän pitoisuus, tulokset taulukossa 10.

Taulukko 10. Jogurttiin ympätyn *C. albicans* -suspensiomäärän pitoisuus

Laimennos	Laimennoksen pitoisuus (pmy/ml)	Ympätty määrä (ml)	Ympätyn määrän pitoisuus (pmy)	Pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/ympäpimäärä)
-3	4212	1	4212	3,62
-2	42 120	1	42 120	4,62
-1	421 200	1	421 200	5,62

Laskettiin jogurtin eBias-arvo hiivoille vertaamalla ympättyjen jogurtinäytteiden ja käytetyn mikrobisuspensiomäärän pitoisuuksia keskenään, tulokset taulukossa 11. Näytteiden testiannoksen suuruus oli 10 g.

Taulukko 11. Jogurtin eBias-arvot hiivoille

Näyte	Näytteen pitoisuus (pmy/g)	Näytteiden A ja B pitoisuuksien keski-arvo (pmy/g)	Näytteen pitoisuus (pmy/testiannos)	Näytteen pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/testiannos)	Ympin pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/ympäpimäärä)	eBias
1A	270	340	3400	3,53	3,62	0,09
1B	410					
2A	8400	9200	92 000	4,96	4,62	0,34
2B	10 000					
3A	121 000	96 000	960 000	5,98	5,62	0,36
3B	71 000					

Jogurtin eBias-arvo homeille määritettiin ympäällä näytteisiin *F. oxysporumia* tavoitepitoisuuksina 100, 1000 ja 10 000 pmy/g. Laskettiin ympätyn mikrobisuspensiomäärän pitoisuus, tulokset taulukossa 12.

Taulukko 12. Jogurttiin ympätyn *F. oxysporum* -suspensiomäärän pitoisuus

Laimennos	Laimennoksen pitoisuus (pmy/ml)	Ympätty määrä (ml)	Ympätyn määrän pitoisuus (pmy)	Pitoisuus (log <sub>10</sub> pmy/ympäpimäärä)
-2	511	2	1023	3,01
-1	5110	2	10 220	4,01
0	51 100	2	102 200	5,01

Laskettiin jogurtin eBias-arvo homeille vertaamalla ympättyjen jogurtinäytteiden ja käytetyn mikrobisuspensiomäärän pitoisuuksia keskenään, tulokset taulukossa 13. Näytteiden testiannoksen suuruus oli 10 g.

Taulukko 13. Jogurtin eBias-arvot homeille

Näyte	Näytteen pitoisuus (pmy/g)	Näytteiden A ja B pitoisuuksien keski-arvo (pmy/g)	Näytteen pitoisuus (pmy/testiannos)	Näytteen pitoisuus (log <sub>10</sub> pmy/testiannos)	Ympin pitoisuus (log <sub>10</sub> pmy/ympäpimäärä)	eBias
1A	170	160	1600	3,20	3,01	0,19
1B	150					
2A	1030	1000	10 000	4,00	4,01	0,01
2B	970					

(jatkuu)

Taulukko 13 (jatkuu).

3A	12 100	11 350	113 500	5,05	5,01	0,04
3B	10 600					

Kaikki jogurtin eBias-arvot hiivoille ja homeille olivat  $\leq 0,5$ .

### 5.2.3 Savukalan arvioidut harha-arvot

Savukalan eBias-arvo hiivoille määritettiin ymppäällä näytteisiin *C. albicansia* tavoitepitoisuuksina 100, 1000 ja 10 000 pmy/g. Hiivojen eBias-arvojen laskentaan otettiin mukaan myös ylimääräisenä tehty pitoisuustaso 100 000 pmy/g, koska testeissä ei oltu osuttu kaikkiin pitoisuustasoihin kohdilleen. Todettiin kuitenkin, että ottamalla laskentaan mukaan kaikki analysoidut pitoisuustasot, voitiin antaa tarpeeksi näyttöä siitä, että menetelmää osataan käyttää onnistuneesti kyseisen kategorian tuotteille. Laskettiin ympätyn mikrobisuspensiomäärän pitoisuus, tulokset taulukossa 14.

Taulukko 14. Savukalaan ympätyn *C. albicans* -suspensiomäärän pitoisuus

Laimennos	Laimennoksen pitoisuus (pmy/ml)	Ympätty määrä (ml)	Ympätyn määrän pitoisuus (pmy)	Pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/ympäpimäärä)
-4	421	1	421	2,62
-3	4212	1	4212	3,62
-2	42 120	1	42 120	4,62
-1	421 200	1	421 200	5,62

Laskettiin savukalan eBias-arvo hiivoille vertaamalla ympättyjen savukalanäytteiden ja käytetyn mikrobisuspensiomäärän pitoisuuksia keskenään, tulokset taulukossa 15. Näytteiden testiannoksen suuruus oli 10 g.

Taulukko 15. Savukalan eBias-arvot hiivoille

Näyte	Näytteen pitoisuus (pmy/g)	Näytteiden A ja B pitoisuuksien keski-arvo (pmy/g)	Näytteen pitoisuus (pmy/testiannos)	Näytteen pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/testiannos)	Ympin pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/ympin määrä)	eBias
1A	20	35	350	2,54	2,62	0,08
1B	50					
2A	580	570	5700	3,76	3,62	0,14
2B	560					
3A	8300	8100	81 000	4,91	4,62	0,29
3B	7900					
4A	138 000	117 500	1 175 000	6,07	5,62	0,45
4B	97 000					

Savukalan eBias-arvo homeille määritettiin ympäällä näytteisiin *F. oxysporumia* tavoitepitoisuuksina 100, 1000 ja 10 000 pmy/g. Laskettiin ympätyn mikrobisuspensiomäärän pitoisuus, tulokset taulukossa 16.

Taulukko 16. Savukalaan ympätyn *F. oxysporum* -suspensiomäärän pitoisuus

Laimennos	Laimennoksen pitoisuus (pmy/ml)	Ympätty määrä (ml)	Ympätyn määrän pitoisuus (pmy)	Pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/ympin määrä)
-2	1227	1	1227	3,09
-1	12 270	1	12 270	4,09
0	122 700	1	122 700	5,09

Laskettiin savukalan eBias-arvo homeille vertaamalla ympättyjen savukalanäytteiden ja käytetyn mikrobisuspensiomäärän pitoisuuksia keskenään, tulokset taulukossa 17. Näytteiden testiannoksen suuruus oli 10 g.

Taulukko 17. Savukalan eBias-arvot homeille

Näyte	Näytteen pitoisuus (pmy/g)	Näytteiden A ja B pitoisuuksien keski-arvo (pmy/g)	Näytteen pitoisuus (pmy/testiannos)	Näytteen pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/testiannos)	Ympin pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/ympin määrä)	eBias
1A	180	180	1800	3,26	3,09	0,17
1B	180					
2A	1180	1105	11 500	4,04	4,09	0,05
2B	1030					
3A	10 200	11 700	117 000	5,07	5,09	0,02
3B	13 200					

Kaikki savukalan eBias-arvot hiivoille ja homeille olivat  $\leq 0,5$ .

#### 5.2.4 Einesruoan arvioidut harha-arvot

Einesruoan eBias-arvo hiivoille määritettiin ympäällä näytteisiin *C. albicansia* tavoitepitoisuuksina 100, 1000 ja 10 000 pmy/g. Kuten savukalankin kohdalla, hiivojen eBias-arvojen laskentaan otettiin mukaan myös ylimääräisenä tehty pitoisuustaso 100 000 pmy/g, koska testeissä ei oltu osuttu kaikkiin pitoisuustasoihin kohdilleen. Laskettiin ympätyn mikrobisuspensiomäärän pitoisuus, tulokset taulukossa 18.

Taulukko 18. Einesruokaan ympätyn *C. albicans* -suspensiomäärän pitoisuus

Laimennos	Laimennoksen pitoisuus (pmy/ml)	Ympätty määrä (ml)	Ympätyn määrän pitoisuus (pmy)	Pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/ympäpimäärä)
-4	421	1	421	2,62
-3	4212	1	4212	3,62
-2	42 120	1	42 120	4,62
-1	421 200	1	421 200	5,62

Laskettiin einesruoan eBias-arvo hiivoille vertaamalla ympättyjen einesruokanäytteiden ja käytetyn mikrobisuspensiomäärän pitoisuuksia keskenään, tulokset taulukossa 19. Näytteiden testiannoksen suuruus oli 10 g.

Taulukko 19. Einesruoan eBias-arvot hiivoille

Näyte	Näytteen pitoisuus (pmy/g)	Näytteiden A ja B pitoisuuksien keski-arvo (pmy/g)	Näytteen pitoisuus (pmy/testiannos)	Näytteen pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/testiannos)	Ympin pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/ympäpimäärä)	eBias
1A	20	50	500	2,70	2,62	0,08
1B	80					
2A	320	525	5250	3,72	3,62	0,10
2B	730					
3A	9900	9750	97 500	4,99	4,62	0,37
3B	9600					
4A	140 000	121 000	1 210 000	6,08	5,62	0,46
4B	102 000					

Einesruoan eBias-arvo homeille määritettiin ympäällä näytteisiin *F. oxysporumia* tavoitepitoisuuksina 100, 1000 ja 10 000 pmy/g. Laskettiin ympätyn mikrobisuspensiomäärän pitoisuus, tulokset taulukossa 20.

Taulukko 20. Einesruokaan ympätyn *F. oxysporum* -suspensiomäärän pitoisuus

Laimennos	Laimennoksen pitoisuus (pmy/ml)	Ympätty määrä (ml)	Ympätyn määrän pitoisuus (pmy)	Pitoisuus (log <sub>10</sub> pmy/ympäpimäärä)
-2	1227	1	1227	3,09
-1	12 270	1	12 270	4,09
0	122 700	1	122 700	5,09

Laskettiin einesruoan eBias-arvo homeille vertaamalla ympättyjen einesruokanäytteiden ja käytetyn mikrobisuspensiomäärän pitoisuuksia keskenään, tulokset taulukossa 21. Näytteiden testiannoksen suuruus oli 10 g.

Taulukko 21. Einesruoan eBias-arvot homeille

Näyte	Näytteen pitoisuus (pmy/g)	Näytteiden A ja B pitoisuuksien keski-arvo (pmy/g)	Näytteen pitoisuus (pmy/testiannos)	Näytteen pitoisuus (log <sub>10</sub> pmy/testiannos)	Ympäpimäärän pitoisuus (log <sub>10</sub> pmy/ympäpimäärä)	eBias
1A	90	115	1150	3,06	3,09	0,03
1B	140					
2A	1290	1265	12 650	4,10	4,09	0,01
2B	1240					

(jatkuu)

Taulukko 21 (jatkuu).

3A	9500	9600	96 000	4,98	5,09	0,11
3B	9700					

Kaikki einesruoan eBias-arvot hiivoille ja homeille olivat  $\leq 0,5$ .

### 5.2.5 Munapohjaisen välipalatuotteen arvioidut harha-arvot

Munapohjaisen välipalatuotteen eBias-arvo hiivoille määritettiin ymppeällä näytteisiin *S. cerevisiaeta* tavoitepitoisuuksina 100, 1000 ja 10 000 pmy/g. Laskettiin ympätyn mikrobisuspensiomäärän pitoisuus, tulokset taulukossa 22.

Taulukko 22. Munapohjaiseen välipalatuotteeseen ympätyn *S. cerevisiae* -suspensiomäärän pitoisuus

Laimennos	Laimennoksen pitoisuus (pmy/ml)	Ympätty määrä (ml)	Ympätyn määrän pitoisuus (pmy)	Pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/ymppeimäärä)
-4	491	3,5	1718	3,24
-3	4910	3,5	17 185	4,24
-2	49 100	3,5	171 850	5,24

Laskettiin munapohjaisen välipalatuotteen eBias-arvo hiivoille vertaamalla ympättyjen välipalatuotenäytteiden ja käytetyn mikrobisuspensiomäärän pitoisuuksia keskenään, tulokset taulukossa 23. Näytteiden testiannoksen suuruus oli 10 g.

Taulukko 23. Munapohjaisen välipalatuotteen eBias-arvot hiivoille

Näyte	Näytteen pitoisuus (pmy/g)	Näytteiden A ja B pitoisuuksien keski-arvo (pmy/g)	Näytteen pitoisuus (pmy/testiannos)	Näytteen pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/tes-tiannos)	Ympin pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/ymp-pimäärä)	eBias
1A	220	195	1950	3,29	3,24	0,05
1B	170					
2A	1860	1890	18 900	4,28	4,24	0,04
2B	1920					
3A	19 400	18 400	184 000	5,26	5,24	0,02
3B	17 400					

Munapohjaisen välipalatuotteen eBias-arvo homeille määritettiin ymppäällä näytteisiin *F. oxysporumia* tavoitepitoisuuksina 100, 1000 ja 10 000 pmy/g. Laskettiin ympätyn mikrobisuspensiomäärän pitoisuus, tulokset taulukossa 24.

Taulukko 24. Munapohjaiseen välipalatuotteeseen ympätyn *F. oxysporum* -suspensiomäärän pitoisuus

Laimennos	Laimennoksen pitoisuus (pmy/ml)	Ympätty määrä (ml)	Ympätyn määrän pitoisuus (pmy)	Pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/ymp-pimäärä)
-1	3250	0,3	975	2,99
-1	3250	3	9750	3,99
0	32 500	3	97 500	4,99

Laskettiin munapohjaisen välipalatuotteen eBias-arvo homeille vertaamalla ympättyjen välipalatuotenäytteiden ja käytetyn mikrobisuspensiomäärän pitoisuuksia keskenään, tulokset taulukossa 25. Näytteiden testiannoksen suuruus oli 10 g.

Taulukko 25. Munapohjaisen välipalatuotteen eBias-arvot homeille

Näyte	Näytteen pitoisuus (pmy/g)	Näytteiden A ja B pitoisuuksien keski-arvo (pmy/g)	Näytteen pitoisuus (pmy/testiannos)	Näytteen pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/testiannos)	Ympin pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/ympin määrä)	eBias
1A	90	115	1150	3,06	2,99	0,07
1B	140					
2A	1340	1355	13 500	4,13	3,99	0,14
2B	1370					
3A	12 900	12 750	127 500	5,11	4,99	0,12
3B	12 600					

Kaikki munapohjaisen välipalatuotteen eBias-arvot hiivoille ja homeille olivat  $\leq 0,5$ .

#### 5.2.6 Siementen arvioidut harha-arvot

Siementen eBias-arvo hiivoille määritettiin ympäällä näytteisiin *S. cerevisiaeta* tavoitepitoisuuksina 1000, 10 000 ja 100 000 pmy/g. Laskettiin ympätyn mikrobisuspensiomäärän pitoisuus, tulokset taulukossa 26.

Taulukko 26. Siemeniin ympätyn *S. cerevisiae* -suspensiomäärän pitoisuus

Laimennos	Laimennoksen pitoisuus (pmy/ml)	Ympätty määrä (ml)	Ympätyn määrän pitoisuus (pmy)	Pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/ymppimäärä)
-3	6818	1,5	10 227	4,01
-2	68 180	1,5	102 270	5,01
-1	681 800	1,5	1 022 700	6,01

Laskettiin siementen eBias-arvo hiivoille vertaamalla ympättyjen siemennäytteiden ja käytetyn mikrobisuspensiomäärän pitoisuuksia keskenään, tulokset taulukossa 27. Näytteiden testiannoksen suuruus oli 10 g.

Taulukko 27. Siementen eBias-arvot hiivoille

Näyte	Näytteen pitoisuus (pmy/g)	Näytteiden A ja B pitoisuuksien keski-arvo (pmy/g)	Näytteen pitoisuus (pmy/testiannos)	Näytteen pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/testiannos)	Ympin pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/ymppimäärä)	eBias
1A	1830	1695	16 950	4,23	4,01	0,22
1B	1560					
2A	13 500	13 550	135 500	5,13	5,01	0,12
2B	13 600					
3A	114 000	120 500	1 205 000	6,08	6,01	0,07
3B	127 000					

Siementen eBias-arvo homeille määritettiin ymppeällä näytteisiin *F. oxysporumia* tavoitepitoisuuksina 1000, 10 000 ja 100 000 pmy/g. Laskettiin ympätyn mikrobisuspensiomäärän pitoisuus, tulokset taulukossa 28.

Taulukko 28. Siemeniin ympätyn *F. oxysporum* -suspensiomäärän pitoisuus

Laimennos	Laimennoksen pitoisuus (pmy/ml)	Ympätty määrä (ml)	Ympätyn määrän pitoisuus (pmy)	Pitoisuus (log <sub>10</sub> pmy/ymppeimäärä)
-2	4250	2,5	10 625	4,03
-1	42 500	2,5	106 250	5,03
0	425 000	2,5	1 062 500	6,03

Laskettiin siementen eBias-arvo homeille vertaamalla ympättyjen siemennäytteiden ja käytetyn mikrobisuspensiomäärän pitoisuuksia keskenään, tulokset taulukossa 29. Näytteiden testiannoksen suuruus oli 10 g.

Taulukko 29. Siementen eBias-arvot homeille

Näyte	Näytteen pitoisuus (pmy/g)	Näytteiden A ja B pitoisuuksien keski-arvo (pmy/g)	Näytteen pitoisuus (pmy/testiannos)	Näytteen pitoisuus (log <sub>10</sub> pmy/testiannos)	Ympin pitoisuus (log <sub>10</sub> pmy/ymppeimäärä)	eBias
1A	1710	1530	15 300	4,18	4,03	0,15
1B	1350					
2A	17 000	16 450	164 500	5,22	5,03	0,19
2B	15 900					

(jatkuu)

Taulukko 29 (jatkuu).

3A	174 000	189 500	1 895	6,28	6,03	0,25
3B	205 000		000			

Kaikki siementen eBias-arvot hiivoille ja homeille olivat  $\leq 0,5$ .

### 5.2.7 Soijarouheen arvioidut harha-arvot

Soijarouheen eBias-arvo hiivoille määritettiin ymppeällä näytteisiin *S. cerevisiaeta* tavoitepitoisuuksina 100, 1000 ja 10 000 pmy/g. Laskettiin ympätyn mikrobisuspensiomäärän pitoisuus, tulokset taulukossa 30.

Taulukko 30. Soijarouheeseen ympätyn *S. cerevisiae* -suspensiomäärän pitoisuus

Laimennos	Laimennoksen pitoisuus (pmy/ml)	Ympätty määrä (ml)	Ympätyn määrän pitoisuus (pmy)	Pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/ymppeimäärä)
-4	370	3,5	1297	3,11
-3	3700	3,5	12 950	4,11
-2	37 000	3,5	129 500	5,11

Laskettiin soijarouheen eBias-arvo hiivoille vertaamalla ympättyjen soijarouhenäytteiden ja käytetyn mikrobisuspensiomäärän pitoisuuksia keskenään, tulokset taulukossa 31. Näytteiden testiannoksen suuruus oli 10 g.

Taulukko 31. Soijarouheen eBias-arvot hiivoille

Näyte	Näytteen pitoisuus (pmy/g)	Näytteiden A ja B pitoisuuksien keski-arvo (pmy/g)	Näytteen pitoisuus (pmy/testiannos)	Näytteen pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/testiannos)	Ympin pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/ympipimäärä)	eBias
1A	120	150	1500	3,18	3,11	0,07
1B	180					
2A	1530	1600	16 000	4,20	4,11	0,09
2B	1670					
3A	12 500	12 900	129 000	5,11	5,11	0,00
3B	13 300					

Soijarouheen eBias-arvo homeille määritettiin ympäällä näytteisiin *F. oxysporumia* tavoitepitoisuuksina 100, 1000 ja 10 000 pmy/g. Laskettiin ympätyn mikrobisuspensiomäärän pitoisuus, tulokset taulukossa 32.

Taulukko 32. Soijarouheeseen ympätyn *F. oxysporum* -suspensiomäärän pitoisuus

Laimennos	Laimennoksen pitoisuus (pmy/ml)	Ympätty määrä (ml)	Ympätyn määrän pitoisuus (pmy)	Pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/ympipimäärä)
-2	511	2	1023	3,01
-1	5110	2	10 220	4,01
0	51 100	2	102 200	5,01

Laskettiin soijarouheen eBias-arvo homeille vertaamalla ympättyjen soijarouhenäytteiden ja käytetyn mikrobisuspensiomäärän pitoisuuksia keskenään, tulokset taulukossa 33. Näytteiden testiannoksen suuruus oli 10 g.

Taulukko 33. Soijarouheen eBias-arvot homeille

Näyte	Näytteen pitoisuus (pmy/g)	Näytteiden A ja B pitoisuuksien keski-arvo (pmy/g)	Näytteen pitoisuus (pmy/testiannos)	Näytteen pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/testiannos)	Ympin pitoisuus ( $\log_{10}$ pmy/ympipimäärä)	eBias
1A	160	165	1650	3,22	3,01	0,21
1B	170					
2A	1550	1615	16 150	4,21	4,01	0,20
2B	1680					
3A	13 800	14 200	142 000	5,15	5,01	0,14
3B	14 600					

Kaikki soijarouheen eBias-arvot hiivoille ja homeille olivat  $\leq 0,5$ .

### 5.3 Vertailututkimuksen tulokset

Vertailunäytteiden tuloksista laskettiin z-arvot seuraavalla kaavalla:

$$z = \frac{X_{lab} - X_{PT}}{SD_{PT}}$$

Kaava 2. Laskukaava z-arvolle

Kaavassa 2  $X_{lab}$  tarkoittaa laboratorion omaa tulosta,  $X_{PT}$  tarkoittaa kaikkien vertailututkimuksessa olleiden laboratorioden tulosten keskiarvoa ja  $SD_{PT}$

tarkoittaa kaikkien vertailututkimuksessa olleiden laboratorioiden tulosten keskihajontaa. Kaikki arvot laitetaan kaavaan muodossa  $\log_{10}$ . Jotta z-arvot olisivat hyväksyttäviä, tulisi niiden olla  $|z| \leq 2$ .

Homeiden osalta z-arvoksi saatiin 0,19. Näytteet, joihin homeita ei oltu ympätty, olivat hyväksytyt. Hiivojen osalta z-arvoiksi saatiin -0,64 ja 1,11. Näyte, johon ei oltu ympätty hiivoja, oli hyväksytty.

## 6 Yhteenveto

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli verifioida Eurofins Scientific Finland Oy:n Raision mikrobiologian laboratorioille käyttöön Symphony-elatusaine hiivojen ja homeiden määrittämiseen. Symphony-elatusaineen verifiointi tehtiin kolmessa osassa: verifiointisuunnitelman teko, verifiointin suoritus ja tulosten käsittely ja raportointi. Verifiointi suoritettiin käyttäen standardin SFS-EN ISO 16140-3:2021 ohjeita. Verifiointin suoritusvaihe tapahtui standardin mukaisesti kahdessa osassa: käyttöönottoverifiointi ja tuoteverifiointi.

Sekä käyttöönotto- että tuoteverifiointivaiheissa useita näytteitä jouduttiin uusimaan. Pääasiallinen syy uusinnolle oli maljojen liiallinen tai liian vähäinen pesäkkeiden kasvu. Haastavin osuus verifiointin aikana olikin saada näytteiden pitoisuudet kohdilleen hiivoja ja homeita niihin ympäristöihin. Hiiva- ja homepesäkkeiden laskeminen Symphony-maljoilta oli kuitenkin sujuvaa eivätkä homepesäkkeet juurikaan levinneet maljoilla.

Sekä hiivoista että homeista saatiin hyväksytyt tulokset käyttöönotto- ja tuoteverifiointissa. Osana verifiointia osallistuttiin myös Eurofins Food & Feed Testing Norway AS:n järjestämään vertailututkimukseen, jossa saatiin hyväksytyt tulokset Symphony-elatusaineella hiivojen ja homeiden määrittämisessä. Verifiointin tulosten myötä voitiin todeta, että Eurofins Scientific Finland Oy:n Raision mikrobiologian laboratorio on pätevä käyttämään Symphony-elatusainetta hiivojen ja homeiden määrittämisessä ja menetelmä voidaan ottaa käyttöön elintarvikkeita ja rehuja analysoidessa. Onnistuneen verifiointin myötä laboratoriolla on myös mahdollisuus hakea akkreditointia Symphony-menetelmälle.

## Lähteet

ADRIA. 2022. Summary report. Validation study according to the EN ISO 16140-2:2016. SYMPHONY Agar for the enumeration of yeasts and moulds in food products and animal feeding stuffs.

BIOKAR diagnostics. n.d. Technical data sheet. Symphony Agar.

Duodecim Terveyskirjasto 2016. Opportunistinen mikrobi. Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 8.1.2023. <https://www.terveyskirjasto.fi/ltt02424>.

Eurofins. 2019. Elintarvikeanalyysit. Viitattu 5.2.2023. <https://www.eurofins.fi/elintarvikkeet-ja-rehut/elintarvikeanalyysit/>.

Eurofins. 2022. Tietoa meistä. Viitattu 5.2.2023. <https://www.eurofins.fi/tietoa-meistae/>.

FINAS. 2016. Akkreditoinnin ja sertifiointin tavoitteet ja merkittävimmät erot. Viitattu 5.2.2023. <https://www.finas.fi/ajankohtaista/artikkelit/Sivut/Akkreditoinnin-ja-sertifiointin-tavoitteet-ja-merkitt%C3%A4vimm%C3%A4t-erot.aspx>.

Fleet, G.H. 2007. Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*. Vol. 18, No 2, 170-175.

Hernández, A.; Pérez-Nevado, F.; Ruiz-Moyano, S.; Serradilla, M.J.; Villalobos, M.C.; Martín, A. & Córdoba, M.G. 2018. Spoilage yeasts: What are the sources of contamination of foods and beverages? *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 286, 98–110.

Häikiö, I. 2003. *Elintarvikemikrobiologia*. 5., uudistettu painos. Porvoo: WSOY.

Hägg, M. 2016. Validoinnin suunnittelun opas. Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy.

Labbé, R.G. & García, S. 2013. *Guide to Foodborne Pathogens*. Second Edition. Chichester: Wiley-Blackwell.

Riesute, R.; Salomskiene, J.; Moreno, D.S. & Gustiene, S. 2021. Effect of yeasts on food quality and safety and possibilities of their inhibition. *Trends in Food Science & Technology*. Vol. 108, 1–10.

Ruokavirasto. 2023. Mikrobin kasvu edistävät tekijät. Viitattu 22.4.2023. [https://www.ruokavirasto.fi/elintarvikkeet/ohjeita-kuluttajille/ruokamyrkytykset/yleista-mikrobeista/mikrobien-kasvu-edistavat-tekijat/#:~:text=Veden%20aktiivisuudella%20\(a%20w\)%20tarkoitetaan,%2C79%E2%80%93%2C99](https://www.ruokavirasto.fi/elintarvikkeet/ohjeita-kuluttajille/ruokamyrkytykset/yleista-mikrobeista/mikrobien-kasvu-edistavat-tekijat/#:~:text=Veden%20aktiivisuudella%20(a%20w)%20tarkoitetaan,%2C79%E2%80%93%2C99).

SFS. 2023. Mitä standardi tarkoittaa? Viitattu 4.1.2023. <https://sfs.fi/standardeista/mika-on-standardi/>.

SFS-EN ISO 16140-3:2021 Microbiology of the food chain. Method validation. Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto SFS ry.

SFS-EN ISO 19036:2019 Microbiology of the food chain. Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations. Helsinki: Suomen Standardoimisliitto SFS ry.

Tukes. 2019. Akkreditoinnilla lisää luotettavuutta ja kilpailukykyä. Viitattu 5.2.2023. <https://tukes.fi/-/akkreditoinnilla-lisaa-luotettavuutta-ja-kilpailukyky-1#57f0b701>.

## Mikrobisuspensioiden pitoisuudet

Taulukossa 34 on esitetty mikrobisuspensioiden 0-putkien pitoisuudet. 0-putkilla tarkoitetaan niitä mikrobisuspensioputkia, joihin on maljalta pesäkkeestä siirrostettu mikrobia 9 ml:aan MAX:ia.

Taulukko 34. Mikrobisuspensioiden pitoisuudet

Mikrobi ja suspension numero	Pitoisuus pmy/ml
<i>S. cerevisiae</i> 1	6 600 000
<i>S. cerevisiae</i> 2	3 175 000
<i>C. albicans</i> 1	13 000 000
<i>C. albicans</i> 2	14 750 000
<i>Cladosporium</i> sp. 1	135 000
<i>Cladosporium</i> sp. 2	380 000
<i>Cladosporium</i> sp. 3	85 000
<i>Cladosporium</i> sp. 4	59 250
<i>Cladosporium</i> sp. 5	68 000
<i>F. oxysporum</i> 1	40 000
<i>F. oxysporum</i> 2	180 000
<i>F. oxysporum</i> 3	54 500
<i>F. oxysporum</i> 4	39 000
<i>F. oxysporum</i> 5	107 500
<i>F. oxysporum</i> 6	497 500
<i>F. oxysporum</i> 7	56 800

## Käyttöönottoverifiointin suoritus

Taulukko 35. Hiiva- ja homesolujen ympärys näytteisiin

Näyte	Solujen lisäys (ml)	
	Hiivat	Homeet
1	<i>S. cerevisiae</i> 1 -1 -putkesta 0,1 ml	<i>Cladosporium</i> sp. 1 0-putkesta 0,1 ml
2	<i>S. cerevisiae</i> 1 -1 -putkesta 0,1 ml	<i>Cladosporium</i> sp. 1 0-putkesta 0,1 ml
3	<i>S. cerevisiae</i> 1 -1 -putkesta 0,1 ml	<i>Cladosporium</i> sp. 1 0-putkesta 0,1 ml
4	<i>S. cerevisiae</i> 1 -1 -putkesta 0,1 ml	<i>Cladosporium</i> sp. 1 0-putkesta 0,1 ml
5	<i>S. cerevisiae</i> 1 -1 -putkesta 0,1 ml	<i>Cladosporium</i> sp. 1 0-putkesta 0,1 ml
6	<i>S. cerevisiae</i> 1 -1 -putkesta 0,1 ml	<i>Cladosporium</i> sp. 1 0-putkesta 0,1 ml
7	<i>C. albicans</i> 1 -2 -putkesta 0,1 ml	<i>F. oxysporum</i> 2 0-putkesta 0,1 ml
8	<i>C. albicans</i> 1 -2 -putkesta 0,1 ml	<i>F. oxysporum</i> 2 0-putkesta 0,1 ml
9	<i>C. albicans</i> 1 -2 -putkesta 0,1 ml	<i>F. oxysporum</i> 2 0-putkesta 0,1 ml
10	<i>C. albicans</i> 1 -2 -putkesta 0,1 ml	<i>F. oxysporum</i> 2 0-putkesta 0,1 ml
11	<i>C. albicans</i> 1 -2 -putkesta 0,1 ml	<i>F. oxysporum</i> 2 0-putkesta 0,1 ml
12	<i>C. albicans</i> 1 -2 -putkesta 0,1 ml	<i>F. oxysporum</i> 2 0-putkesta 0,1 ml

Taulukossa 36 esitettyjen näytteiden pipetoija suoritti myös maljojen pintalevityksen. Itse valetuilla Symphony-maljoilla tarkoitetaan maljoja, jotka on valettu valmiista pullotetusta Symphony-agarista. Valmiit maljat tarkoittavat valmiiksi valettuja kaupallisia maljoja.

Taulukko 36. Käyttöönottoverifiointin vaihteluiden toteutus

Näyte		Työpiste	Pipetti	Punnitsija	Pipetoija	Symphony- malja
1	A	Viljelypiste	Sähköpipetti	Laborantti 1	Laborantti 2	Itse valetut maljat
	B	Listeriapiste	Finnpipette	Laborantti 2	Laborantti 3	Itse valetut maljat
2	A	Viljelypiste	Sähköpipetti	Laborantti 1	Laborantti 2	Itse valetut maljat
	B	Listeriapiste	Finnpipette	Laborantti 2	Laborantti 3	Itse valetut maljat
3	A	Viljelypiste	Sähköpipetti	Laborantti 1	Laborantti 2	Itse valetut maljat
	B	Listeriapiste	Finnpipette	Laborantti 2	Laborantti 3	Itse valetut maljat
4	A	Viljelypiste	Sähköpipetti	Laborantti 1	Laborantti 2	Itse valetut maljat
	B	Listeriapiste	Sähköpipetti	Laborantti 2	Laborantti 3	Itse valetut maljat
5	A	Viljelypiste	Sähköpipetti	Laborantti 1	Laborantti 2	Itse valetut maljat
	B	Listeriapiste	Sähköpipetti	Laborantti 2	Laborantti 3	Itse valetut maljat
6	A	Viljelypiste	Sähköpipetti	Laborantti 1	Laborantti 2	Itse valetut maljat
	B	Listeriapiste	Sähköpipetti	Laborantti 2	Laborantti 3	Itse valetut maljat
7	A	Viljelypiste	Finnpipette	Laborantti 4	Laborantti 5	Itse valetut maljat

(jatkuu)

Taulukko 36 (jatkuu).

	B	Listeriapiste	Sähköpipetti	Laborantti 3	Laborantti 3	Valmiit maljat
8	A	Viljelypiste	Finnpipette	Laborantti 4	Laborantti 5	Itse valetut maljat
	B	Listeriapiste	Sähköpipetti	Laborantti 3	Laborantti 3	Valmiit maljat
9	A	Viljelypiste	Finnpipette	Laborantti 4	Laborantti 5	Itse valetut maljat
	B	Listeriapiste	Sähköpipetti	Laborantti 3	Laborantti 3	Valmiit maljat
10	A	Viljelypiste	Sähköpipetti	Laborantti 4	Laborantti 5	Itse valetut maljat
	B	Listeriapiste	Finnpipette	Laborantti 3	Laborantti 3	Valmiit maljat
11	A	Viljelypiste	Sähköpipetti	Laborantti 4	Laborantti 5	Itse valetut maljat
	B	Listeriapiste	Finnpipette	Laborantti 3	Laborantti 3	Itse valetut maljat
12	A	Viljelypiste	Sähköpipetti	Laborantti 4	Laborantti 5	Itse valetut maljat
	B	Listeriapiste	Finnpipette	Laborantti 3	Laborantti 3	Itse valetut maljat

Taulukko 37. Käyttöönottoverifioinnin pipetointimäärät

Näyte	Ei ympiä	Home	Hiiva
<b>1</b>	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml	-1 2x0,1 ml
<b>2</b>	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml	-1 2x0,1 ml
<b>3</b>	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml	-1 2x0,1 ml
<b>4</b>	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml	-1 2x0,1 ml
<b>5</b>	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml	-1 2x0,1 ml
<b>6</b>	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml	-1 2x0,1 ml
<b>7</b>	-2 0,1 ml  -1 0,1 ml	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml
<b>8</b>	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml
<b>9</b>	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml
<b>10</b>	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml
<b>11</b>	-2 0,1 ml -1 0,1 ml	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml
<b>12</b>	-2 0,1 ml -1 0,1 ml	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml

## Tuoteverifiointin suoritus

Taulukko 38. Tuoteverifiointin näytteiden analysointi

Näyte	Tavoite- pitoisuus pmy/g	Solujen lisäys		Pipetointi maljalle	
		Hiivat	Homeet	Hiivat	Homeet
margariini 3	10	<i>C. albicans</i> 1 -3: 0,1 ml	<i>F. oxysporum</i> 3 -2: 0,5 ml	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml
margariini 1	100	<i>C. albicans</i> 1 -2: 0,1 ml	<i>F. oxysporum</i> 3 -1: 0,5 ml	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml
margariini 2	1000	<i>C. albicans</i> 1 -1: 0,1 ml	<i>F. oxysporum</i> 3 -1: 2 ml	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml
margariini 3	10 000	<i>C. albicans</i> 1 0: 0,1 ml	<i>F. oxysporum</i> 3 0: 2 ml	-1 2x0,1 ml	-1 2x0,1 ml
margariini 1	100 000	<i>C. albicans</i> 1 0: 1 ml		-1 0,1 ml -2 2x0,1 ml	
jogurtti 3	10	<i>C. albicans</i> 1 -3: 0,1 ml	<i>Cladosporium</i> sp. 3 -2: 0,2 ml	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml
jogurtti 1	100	<i>C. albicans</i> 1 -2: 0,1 ml	<i>Cladosporium</i> sp. 3 -1: 0,2 ml	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml
jogurtti 2	1000	<i>C. albicans</i> 1 -1: 0,1 ml	<i>Cladosporium</i> sp. 3 -1: 1,5 ml	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml
jogurtti 3	10 000	<i>C. albicans</i> 1 0: 0,1 ml	<i>Cladosporium</i> sp. 3 0: 1,5 ml	-1 2x0,1 ml	-1 2x0,1 ml
jogurtti 1	100 000	<i>C. albicans</i> 1 0: 1 ml		-1 0,1 ml -2 2x0,1 ml	
siemenet 3	100	<i>S. cerevisiae</i> 1 -3: 0,2 ml	<i>Cladosporium</i> sp. 2 -2: 0,5 ml	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml
siemenet 1	1000	<i>S. cerevisiae</i> 1 -2: 0,2 ml	<i>Cladosporium</i> sp. 2 -1: 0,5 ml	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml

(jatkuu)

Taulukko 40 (jatkuu).

siemenet 2	10 000	<i>S. cerevisiae</i> 1 -1: 0,2 ml	<i>Cladosporium</i> sp. 2 -1: 3 ml	-1 2x0,1 ml	-1 2x0,1 ml
siemenet 3	100 000	<i>S. cerevisiae</i> 1 0: 0,2 ml	<i>Cladosporium</i> sp. 2 0: 3 ml	-1 0,1 ml -2 2x0,1 ml	-1 0,1 ml -2 2x0,1 ml
siemenet 1	1 000 000	<i>S. cerevisiae</i> 1 0: 2 ml		-1 0,1 ml -2 0,1 ml -3 2x0,1 ml	
savukala 3	10	<i>C. albicans</i> 1 -3: 0,1 ml	<i>Cladosporium</i> sp. 2 -2: 0,1 ml	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml
savukala 1	100	<i>C. albicans</i> 1 -2: 0,1 ml	<i>Cladosporium</i> sp. 2 -1: 0,1 ml	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml
savukala 2	1000	<i>C. albicans</i> 1 -1: 0,1 ml	<i>Cladosporium</i> sp. 2 -1: 0,5 ml	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml
savukala 3	10 000	<i>C. albicans</i> 1 0: 0,1 ml	<i>Cladosporium</i> sp. 2 0: 0,5 ml	-1 2x0,1 ml	-1 2x0,1 ml
savukala 1	100 000	<i>C. albicans</i> 1 0: 1 ml		-1 0,1 ml -2 2x0,1 ml	
eines 3	10	<i>S. cerevisiae</i> 1 -4: 0,2 ml	<i>Cladosporium</i> sp.3 -2: 0,2 ml	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml
eines 1	100	<i>S. cerevisiae</i> 1 -3: 0,2 ml	<i>Cladosporium</i> sp. 3 -1: 0,2 ml	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml
eines 2	1000	<i>S. cerevisiae</i> 1 -2: 0,2 ml	<i>Cladosporium</i> sp. 3 -1: 1,5 ml	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml
eines 3	10 000	<i>S. cerevisiae</i> 1 -1: 0,2 ml	<i>Cladosporium</i> sp. 3 0: 1,5 ml	-1 2x0,1 ml	-1 2x0,1 ml

(jatkuu)

Taulukko 40 (jatkuu).

eines 1	100 000	<i>S. cerevisiae</i> 1 0: 0,2 ml		-1 0,1 ml -2 2x0,1 ml	
munapohj. välipala 3	10	<i>S. cerevisiae</i> 1 -4: 0,2 ml	<i>F. oxysporum</i> 1 -2: 0,3 ml	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml
munapohj. välipala 1	100	<i>S. cerevisiae</i> 1 -3: 0,2 ml	<i>F. oxysporum</i> 1 -1: 0,3 ml	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml
munapohj. välipala 2	1000	<i>S. cerevisiae</i> 1 -2: 0,2 ml	<i>F. oxysporum</i> 1 -1: 3 ml	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml
munapohj. välipala 3	10 000	<i>S. cerevisiae</i> 1 -1: 0,2 ml	<i>F. oxysporum</i> 1 0: 3 ml	-1 2x0,1 ml	-1 2x0,1 ml
munapohj. välipala 1	100 000	<i>S. cerevisiae</i> 1 0: 0,2 ml		-1 0,1 ml -2 2x0,1 ml	
soijarouhe 3	10	<i>S. cerevisiae</i> 1 -4: 0,2 ml	<i>F. oxysporum</i> 4 -2: 0,5 ml	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml
soijarouhe 1	100	<i>S. cerevisiae</i> 1 -3: 0,2 ml	<i>F. oxysporum</i> 4 -1: 0,5 ml	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml
soijarouhe 2	1000	<i>S. cerevisiae</i> 1 -2: 0,2 ml	<i>F. oxysporum</i> 4 -1: 3 ml	-1 3x0,33 ml	-1 3x0,33 ml
soijarouhe 3	10 000	<i>S. cerevisiae</i> 1 -1: 0,2 ml	<i>F. oxysporum</i> 4 0: 3 ml	-1 2x0,1 ml	-1 2x0,1 ml
soijarouhe 1	100 000	<i>S. cerevisiae</i> 1 0: 0,2 ml		-1 0,1 ml -2 2x0,1 ml	

### Negatiivikontrollien viljelyt

Jokaisesta näytteestä pipetoitiin maljoille 0,1 ml laimennoksista -1, -2 ja -3.

### Ymppiputkien viljelyt

Taulukko 39. Tuoteverifioinnin ymppiputkista tehdyt analyysit

Putkisarja	Pipetoinnit
<i>Cladosporium</i> sp. 2	-3, -4, -5: 2x0,2 ml
<i>Cladosporium</i> sp. 3	-2, -3, -4: 2x0,2 ml
<i>F. oxysporum</i> 1	-1, -2, -3: 2x0,2 ml

(jatkuu)

Taulukko 41 (jatkuu).

<i>F. oxysporum</i> 3	-1, -2, -3: 2x0,2 ml
<i>F. oxysporum</i> 4	-1, -2, -3: 2x0,2 ml
<i>S. cerevisiae</i> 1	-4,-5,-6: 2x0,2 ml
<i>C. albicans</i> 1	-3,-4,-5: 2x0,2 ml