

TAMPEREEN AMMATTIKORKEAKOULU
Kemiantekniikan koulutusohjelma
Ympäristötekniikka ja kemiantekniikka

Tutkintotyö

Sanna Pynnönen

COLILERT® QUANTI-TRAY: *ESCHERICHIA COLI* -BAKTEERIN JA KOLIFORMISTEN
BAKTEERIEN MÄÄRITTÄMINEN KAIVOVESISTÄ

Työn ohjaaja
Työn teettäjä
Tampere 2008

Lehtori Tuula Nieminen
Eurofins Scientific Finland Oy, valvojana mikrobiologi Marjo Toivo

TAMPEREEN AMMATTIKORKEAKOULU

Kemiantekniikan koulutusohjelma

Ympäristötekniikka ja kemiantekniikka

Pynnönen, Sanna

Colilert® Quanti-Tray: *Escherichia coli* -bakteerin ja koliformisten bakteerien määrittäminen kaivovesistä

Tutkintotyö

59 sivua + 24 liitesivua

Työn ohjaaja

Lehtori Tuula Nieminen

Työn teettäjä

Eurofins Scientific Finland Oy, valvojana mikrobiologi Marjo Toivo

Huhtikuu 2008

Hakusanat

mikro-organismit, *Escherichia coli*, kolibakteerit, vedenlaatu, Colilert® Quanti-Tray

TIIVISTELMÄ

Turvallisen talousveden laatua määriteltäessä lähtökohtana on, että veden käyttö tavanomaisina määrinä ei aiheuta ihmiselle terveydellisiä riskejä. Ulosteperäisen saastumisen läsnäolo ja laajuus ovat tärkeitä tekijöitä arvioitaessa veden laatua ja riskitekijöitä. *Escherichia coli* -bakteerin ja koliformisten bakteerien läsnäolo, vaikka se ei ole todiste ulosteperäisestä saastumisesta, saattaa osoittaa vedenkäsittelyn tai -jakelun toimimattomuuden.

Työn tarkoituksena oli tuottaa tarvittava tieto uuden menetelmän validointiin Eurofins Scientific Finland Oy -laboratoriossa. Validoinnin tarkoituksena oli osoittaa, että laboratorio on pätevä käyttämään testattua menetelmää kaivovesien *Escherichia coli* -bakteerin ja koliformisten bakteerien määrittämisessä.

Referenssimenetelmänä tutkimuksessa käytettiin SFS 3016:2001 -standardin mukaista kalvosuodatusmenetelmää ja testattavana menetelmänä oli IDEXX:n Colilert® Quanti-Tray. Menetelmän etuna kalvosuodatukseen verrattuna ovat muun muassa huomattavasti lyhyempi inkubointiaika (vain 18 tuntia) ja se, että menetelmä antaa samanaikaisesti sekä koliformisten bakteerien että *E. coli* -bakteerin lukumäärät.

Validointimäärittämisistä saatujen tulosten perusteella laskettiin toistettavuudelle, uusittavuudelle sekä oikeellisuudelle keskihajonnat ja määritettiin menetelmän spesifisyys, lineaarisuus ja suhteellinen oikeellisuus sekä luennan epävarmuus.

Työssä saatujen tulosten perusteella menetelmän todettiin täyttävän laboratorion laatuvaatimukset ja laboratorio osoitti olevansa pätevä käyttämään kyseistä menetelmää. Menetelmä voitiin siksi ottaa käyttöön kaivovesimatriisille.

TAMK UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Chemical Engineering

Environmental Engineering, Chemical Engineering

Pynnönen, Sanna

Colilert® Quanti-Tray: Determination of bacterium *Escherichia coli* and other coliform bacteria from well waters

Engineering Thesis

59 pages, 24 appendices

Thesis Supervisor

Senior Lecturer Tuula Nieminen

Commissioning Company

Eurofins Scientific Finland Ltd. Supervisor: Marjo Toivo

April 2008

Keywords

microorganisms, *Escherichia coli*, coliforms, water quality, Colilert® Quanti-Tray

ABSTRACT

When, defining the quality of safe drinking water the principle is that use of water in normal amounts cannot cause health risks to humans. The presence and scale of faecal contamination are important factors when assessing the quality of water and the risk factors. Presence of bacterium *Escherichia coli* and other coliform bacteria, though it is not a proof of faecal contamination, may point out the inoperability of water treatment or distribution.

The object of this work was to provide necessary information for the validation of a new method in Eurofins Scientific Finland Ltd. -laboratory. Purpose of this validation was to prove that the laboratory is qualified to use the tested method in determining bacterium *Escherichia coli* and other coliform bacteria from well waters.

As a reference method was used membrane filtration in accordance with SFS 3016:2001 -standard. The tested method was IDEXX's Colilert® Quanti-Tray. It's benefits compared with membrane filtration include much shorter incubation time (only 18 hours) and that the method gives the number of *Escherichia coli* and other coliform bacteria simultaneously.

Based on the results obtained from tests, standard deviations for repeatability, reproducibility and accuracy were calculated and the specificity, linearity, relative accuracy and uncertainty of reading were determined.

As a result, the method was found out to fulfill the laboratory's quality requirements and the laboratory proved itself to be qualified to use the studied method. Colilert® Quanti-Tray -method was thus adopted in use for well waters.

ALKUSANAT

Tämä tutkintotyö on tehty Eurofins Scientific Finland Oy -laboratoriolle 7.1.–20.3.2008 välisenä aikana. Työn valvojana yrityksestä toimi mikrobiologi Marjo Toivo, ja tutkintotyön ohjaajana Tampereen ammattikorkeakoulusta lehtori Tuula Nieminen.

Haluan kiittää Marjo Toivoa työskentelyn aikana saamastani erinomaisesta ohjauksesta sekä tuesta ja hyvistä neuvoista. Eurofins Scientific Finland Oy:n mikrobiologian laboratorion henkilökuntaa haluan kiittää korvaamattomasta avusta tutkimusten aikana.

Suuri kiitos myös työni ohjaajalle, lehtori Tuula Niemiselle saamastani tuesta ja neuvoista työni aikana.

Tampereella 3. huhtikuuta 2008

Sanna Pynnönen

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

ALKUSANAT

SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO.....	7
1.1 Työn taustaa.....	7
1.2 Eurofins Scientific Finland Oy.....	7
1.2.1 Yrityksen tehtävä.....	7
1.2.2 Laatupolitiikka.....	8
1.2.3 Organisaatio.....	9
2 TALOUSVEDEN LAATU.....	9
2.1 Talousveden laatuvaatimukset.....	9
2.1.1 <i>Escherichia coli</i>	10
2.1.2 Enterokokit.....	11
2.2 Talousveden laatusuositukset.....	11
2.2.1 Heterotrofinen pesäkeluku.....	11
2.2.2 Koliformiset bakteerit.....	12
2.2.3 <i>Clostridium perfringens</i>	13
2.3 Laadunvalvonta.....	13
3 KOLIFORMIT JA <i>ESCHERICHIA COLI</i>	14
3.1 Koliformiset bakteerit.....	14
3.2 <i>Escherichia coli</i>	15
3.2.1 Historiaa.....	15
3.2.2 <i>Escherichia coli</i> -bakteeri.....	15
3.3 Lämpökestoiset koliformit.....	18
4 VALIDOINTI.....	19
4.1 Yleistä.....	19
4.2 Mikrobiologisten menetelmien epävarmuus.....	19
4.3 Standardimenetelmä.....	20
4.4 Referenssimenetelmä.....	21
4.4 Validointiin liittyvät suureet.....	21
4.4.1 Oikeellisuus.....	21
4.4.2 Täsmällisyys.....	22
4.4.3 Toteamisraja.....	22
4.4.4 Spesifisyys.....	23
4.4.5 Herkkyys.....	23
4.4.6 Lineaarisuus.....	23
4.5 Validoinnin suorittaminen.....	24
4.5.1 Mikrobin ja pitoisuuksien valinta.....	24
4.5.2 Näytteiden valmistaminen ja tutkiminen.....	25
4.5.3 Tulosten arviointi.....	25
5 MENETELMÄT.....	26
5.1 Referenssimenetelmä.....	26
5.1.1 Periaate.....	26
5.1.2 Mikrobiluvun laskeminen.....	27

5.1.3 Varmistustestit	28
5.2 Validoitava menetelmä	29
5.2.1 Colilert [®] -18.....	29
5.2.2 Colilert [®] Quanti-Tray / Quanti-Tray [®] 2000	31
5.2.3 Quanti-Tray [®] Sealer	32
5.2.4 Testin suorittaminen	33
5.2.5 Edut referenssimenetelmään nähden	34
5.3 Laadunvarmistus.....	35
6 VALIDOINNIN SUORITUS	35
6.1 Pätevytminen	35
6.2 Esimääriykset	39
6.3 Validointimääriykset	40
6.3.1 Näytematriisina steriili vesi	40
6.3.3 Näytematriisina kaivovesi	41
6.3.2 SLV:n ampulli	43
7 TULOKSET	44
7.1 Pätevytymistestien tulokset	44
7.2 Esimääriyksen tulokset.....	44
7.3 Suhteellinen oikeellisuus	46
7.4 Toistettavuus.....	48
7.5 Uusittavuus	49
7.6 Lineaarisuus.....	51
7.7 Luennan epävarmuus.....	52
7.8 Aidot kaivovesinäytteet	52
7.9 SLV:n ampulli	53
8 POHDINTAA.....	54
9 YHTEENVETO	56
LÄHTEET	57
LIITTEET	

1	Validointimääriyksen tulosliuskat
2	Colilert 51-well MPN-taulukko /23/
3	Toistettavuus
4	Uusittavuus
5	Luennan epävarmuus
6	Vertailu Colilert vs. LES Endo
7	SLV:n ampulli, toistettavuus
8	SLV:n ampulli, oikeellisuus
9	0-näytteet

1 JOHDANTO

1.1 Työn taustaa

Ulosteperäisen saastumisen läsnäolo ja laajuus ovat tärkeitä tekijöitä arvioitaessa veden laatua ja riskitekijöitä. Kun vesinäytteestä tutkitaan, onko siinä normaalisti ihmisen ja tasalämpöisten eläinten suolistossa elävää *Escherichia coli* -bakteeria, saadaan osoitus ulosteperäisestä saastumisesta. Koliformisten bakteerien läsnäoloa näytteissä voi olla vaikeampi tulkita, koska jotkut koliformiset bakteerit elävät maaperässä ja makeassa pintavedessä eivätkä ole aina suolistoperäisiä. Sen tähden koliformisten bakteerien läsnäolo, vaikka se ei ole todiste ulosteperäisestä saastumisesta, saattaa osoittaa vedenkäsittelyn tai -jakelun toimimattomuuden. /15, s. 6/

Tämän työn tarkoituksena oli tuottaa tarvittava tieto uuden menetelmän validointiin Eurofins Scientific Finland Oy -laboratoriossa. Validoinnin tarkoituksena oli osoittaa, että laboratorio on pätevä käyttämään Colilert[®] Quanti-Tray -menetelmää kaivovesien *Escherichia coli* -bakteerin ja koliformisten bakteerien määrittämisessä. Referenssimenetelmänä käytettiin SFS 3016:2001 -standardin mukaista kalvosuodatusmenetelmää. Uimavesille tällainen validointitesti oli jo suoritettu, joten käytössä oli suuntaa antava validointisuunnitelma, jonka pohjalta työtä voitiin alkaa tehdä, sekä Excel-pohja, jonka avulla saatuja arvoja voitiin käyttää suureiden määrittämiseen.

1.2 Eurofins Scientific Finland Oy

1.2.1 Yrityksen tehtävä

Eurofins Scientific Finland Oy suorittaa kemiallisia ja mikrobiologisia mittauksia, testauksia ja laadunarviointeja elintarvike-, vesi- ja ympäristönäytteistä. Laboratorion erikoispalveluihin kuuluvat analyysit mm. energia- ja lääketeollisuudelle. Laboratorion tehtävänä on tuottaa asiakkaidensa näytteistä

luotettavia analyysituloksia ja jakaa oman tutkimusalansa tietämystä toiminta-alueellaan. Laboratorion tehtävänä on myös antaa kaikille asiakkailleen tasapuolista, luottamuksellista ja asiakkaasta riippumatonta palvelua ottaen huomioon lakisääteisten vaatimusten täyttymisen. Laboratorion toimintaa kehitetään jatkuvasti ja palvelua parannetaan asiakkaiden tarpeita vastaavaksi. /7; 20/

Laboratorion toiminta-alueena on koko Suomi. Toimeksiantajat ovat etupäässä elintarvike- ja ympäristöalan yrityksiä, Pirkanmaan ja sitä ympäröivien maakuntien kuntia ja yksittäisiä ihmisiä. Laboratorio pyrkii lisäämään asiakaskuntaansa markkinoimalla aktiivisesti tarjoamiaan palveluita. /7/

Laboratorion toiminta perustuu eri johtavilta viranomaisilta saatuihin laboratorio-oikeuksiin, jotka oikeuttavat laboratorion toimimaan tietyillä tutkimusaloilla. /7/

1.2.2 Laatupolitiikka

Laboratorion laadun päämääränä on asiakkaan toimeksiannon täyttäminen, analyysien, tutkimusten, näytteenoton ja kaiken muun työn oikea ja mahdollisimman nopea suorittaminen lakisääteiset vaatimukset täyttäen sekä jokaisen toimeksiantajan luottamuksellinen ja puolueeton palvelu. Laboratorion testaustoiminta on sekä toiminnallisesti että taloudellisesti muista tahoista riippumatonta. /7/

Laatujärjestelmä perustuu SFS-EN ISO/IEC 17025:2005 -standardin ja OECD:n GLP-ohjeiston periaatteisiin. Laatutyön ylläpitämisestä ja kehittämisestä vastaa laboratorion laatupäällikkö, joka on suoraan vastuussa toimitusjohtajalle. /7/

1.2.3 Organisaatio

Eurofins Scientific Finland Oy kuuluu Eurofins-konserniin, joka on ranskalainen pörssiyhtiö. Sen omistajia ovat kaikki osakkeenomistajat. Yhtiön liikevaihto on noin 600 miljoonaa US-dollaria, ja sillä on yli 7000 työntekijää 100 eri laboratoriossa 29 eri maassa. Se on johtava kansainvälinen laboratorioyritys, joka tarjoaa testaus- ja tukipalveluita muun muassa lääke-, elintarvike- ja ympäristöteollisuudelle sekä viranomaisille. Yhtiö on perustettu 1987, ja se on tällä hetkellä yksi nopeimmin kasvavia yrityksiä Euroopassa. /18/

Eurofins Scientific Finland Oy:n laboratorio jakautuu toiminnallisesti eri osastoihin: näytteiden vastaanottoon, myyntiin, kemian osastoon ja mikrobiologian osastoon. Laboratoriossa on vakinaista henkilökuntaa 17 henkilöä. /7/

2 TALOUSVEDEN LAATU

2.1 Talousveden laatuvaatimukset

Turvallisen talousveden laatua määriteltäessä lähtökohtana on, että vedenkäyttö tavanomaisina määrinä ei aiheuta ihmiselle terveydellisiä riskejä. Ihmiselle haitallisten aineiden enimmäispitoisuudet talousvedessä asetetaan tällä perusteella. Annetut pitoisuudet eivät kuitenkaan ole vedenkäsittelyn tavoitepitoisuuksia, vaan kyseisten aineiden määrän vedessä tulisi olla niin pieni, kuin käytännössä on mahdollista. Mikrobien aiheuttamat oireet riippuvat niiden määrästä ja laadusta vedessä, mutta koska varsinaisia taudinaiheuttajia tutkitaan vedestä vain poikkeustapauksissa, ei näille ole olemassa selkeitä ohjearvoja. /12, s. 6/

Talousvedessä ei saa olla pieneliöitä, loisia tai mitään aineita sellaisia määriä, jotka voivat haitata ihmisen terveyttä. Haitallisilla pieneliöillä ja loisilla tarkoitetaan kaikkia vedessä mahdollisesti esiintyviä bakteereja, matoja, alkueläimiä, viruksia ym., jotka voivat aiheuttaa terveyshaittoja. /11; 12, s. 6/

Todennäköisimmät terveyshaitat aiheutuvat ihmisten ja tasalämpöisten eläinten suolistoperäisten mikrobien leviämisestä veden välityksellä. Suolistoperäisiä taudinaiheuttajia, jotka mahdollisesti leviävät veden välityksellä on olemassa useita kymmeniä. Koska kaikkien mahdollisten taudinaiheuttajien etsiminen talousvedestä ei ole mahdollista eikä järkevää, talousveden mikrobiologisten laatuvaatimusten täyttymisen valvonta perustuu ulostesaastumista osoittavien indikaattoribakteerien käyttöön. Indikaattoribakteerien esiintyminen vedessä on osoitus ulosteperäisestä saastumisesta, jolloin myös riski suolistoperäisten taudinaiheuttajien esiintymiselle on olemassa. /12, s. 6/

Ulosteperäiset taudinaiheuttajat sekä niiden indikaattoribakteerit alkavat veteen joutuessaan tuhoutua, sillä vesi ei ole niiden luontainen kasvuympäristö. Laatuvaatimuksina esitetyt indikaattoribakteerit saattavat tuhoutua vedessä nopeammin kuin tietyt taudinaiheuttajat. Tämän vuoksi sekä Suomessa että muualla maailmassa esiintyy vesiepidemioita, vaikka indikaattoribakteeria ei pystytäkään osoittamaan vedestä. /12, s. 6/

2.1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli -bakteeria pidetään tällä hetkellä parhaana veden ulosteperäisen saastumisen osoittajana. Sosiaali- ja terveysministeriön asetuksessa pienten yksiköiden talousveden laatuvaatimuksista ja valvontatutkimuksista ilmoitetaan, että 100 ml vesinäytteessä enimmäistiheys *E. coli* -bakteerille (*E. coli* eli *Escherichia coli*) on 0 pmy/100 ml (pmy = pesäkettä muodostava yksikkö). Yleinen vaatimus on kuitenkin, että talousvesi ei saa sisältää taudinaiheuttajia sellaisia määriä, että ne aiheuttavat vaaraa ihmisten terveydelle. Kaivovesissä muiden koliformisten bakteerien kuin *Escherichia coli* -bakteerin esiintyminen osoittaa yleensä pintavesien aiheuttamaa likaantumista. /11; 12, s. 6; 13, s. 1/

Valvontatutkimukset tai käyttötarkkailu eivät ole riittäviä toimenpiteitä arvioitaessa raakavedestä tai puutteellisesta vedenkäsittelystä aiheutuvaa mikrobiologista uhkaa. Epidemian syntymiseen riittää lyhytaikainen vedenlaatuhäiriö, jonka

tapahtuminen näytteenottohetkellä on erittäin epätodennäköistä. Edes oikein ajoitettu näytteenotto ei takaa epidemian ennaltaehkäisyä, sillä indikaattoribakteerit ovat saattaneet tuhoutua ennen taudinaiheuttajia. Yleensä epidemia havaitaan ensin ja vasta sitten aletaan epäillä vesilähteen saastumista. /12, s. 7/

2.1.2 Enterokokit

Ulosteperäistä saastumista määritettäessä tutkitaan myöskin suolistoperäiset enterokokit. Vaikka sana enterokokki viittaa suolistoon, kuuluu sukuun myös muissa ympäristöissä kuin suolistossa lisääntyviä lajeja. Määrittelyssä pyritään saamaan esiin lähinnä ne lajit, jotka ovat pääosin suolistossa lisääntyviä. Suolistoperäisten enterokokkien esiintyminen vedessä voi olla merkki ulosteiden aiheuttamasta saastutuksesta. Enterokokeille asetettu laatuvaatimus on 0 pmy/100 ml vesinäytettä. /12, liite 3 s. 1/

Määrittelyksiä haittaavat enterokokkeihin kuulumattomat bakteerit siinä määrin, että kun tyypillisen näköisiä pesäkkeitä havaitaan m-Enterococcus -agarilla, on tehtävä varmistustestejä. Samanaikaisesti on pyrittävä löytämään syy alustavien enterokokkien esiintymiselle. /12, liite 3 s. 1/

2.2 Talousveden laatusuositukset

2.2.1 Heterotrofinen pesäkeluku

Heterotrofinen pesäkeluku kuvaa vedessä olevien elävien aerobisten, heterotrofisten mikrobien (myös hiivojen ja homeiden) lukumäärää. Menetelmällä ei saada esille kaikkia vedessä olevia mikrobeja, vaan tietyissä viljelyolosuhteissa (22 °C) pesäkkeitä muodostavien mikrobien määrä. Tämä mikrobimäärä on vain murto-osa veden todellisesta kokonaismikrobimäärästä. Pesäkeluvun suuruuteen vaikuttavat mm. raakaveden laatu, mikrobeille käyttökelpoisen orgaanisen aineen määrä, vedenkäsittely, verkoston rakenne ja kunto sekä veden lämpötila ja viipymä. /12, liite 3 s. 3; 22/

Erillisiä lukumäärien laskuja tehdään tavallisesti sellaisista mikro-organismeista, jotka pystyvät kasvamaan ja muodostamaan pesäkkeitä agar-ravintoalustoilla (hiivauuteagar) 36 °C:ssa ja 22 °C:ssa. Menetelmässä noudatetaan SFS-EN ISO 6222:1999 -standardia. Pesäkelaskumenetelmät ovat hyödyllisiä arvioitaessa pohjavesilähteiden koskemattomuutta ja vedenkäsittelytoimenpiteiden, kuten saostuksen, suodatuksen ja desinfektion, tehokkuutta. Niitä voidaan myös käyttää arvioimaan vesilähteen soveltuvuutta ruoan ja juoman valmistukseen, jolloin vesilähde saa sisältää vain vähän mikro-organismeja, jotta vältetään tuotteen joutuminen kosketuksiin pilaajaorganismien kanssa. Äkillinen nousu mikrobien määrässä voi olla aikainen varoitus vakavasta saastumisesta, joka vaatii välitöntä tutkimista. /14, s. 2/

2.2.2 Koliformiset bakteerit

Koliformiset bakteerit, yleensä *E. coli* -bakteeria lukuun ottamatta, saattavat olla peräisin muualtakin kuin ihmisten ja tasalämpöisten eläinten ulosteista, esimerkiksi maasta, kasveista tai teollisuusjätevesistä. Tämän vuoksi koliformisten bakteereiden esiintymistä ei aina voida pitää varmana ulostesaastutuksen osoituksena, mutta kylläkin hyvänä veden yleisen likaantumisen ilmentäjänä, kun esimerkiksi pintavesiä joutuu pohjaveteen. On todennäköistä, että jos koliformeja löytyy vesinäytteestä, vedessä esiintyy ulosteperäistä saastumista, eikä se välttämättä ole turvallista juomiseen. Kaivovedessä saa esiintyä koliformisia bakteereja alle 100 pmy/100 ml vettä (STM asetus: koliformien raja-arvo 0 pmy/100 ml 1§ 1. ja 2. kohta ja 1§ 3. kohta koliformien raja-arvo alle 100 pmy /100 ml). /11; 12, liite 3 s. 2/

2.2.3 *Clostridium perfringens*

Sulfiitteja pelkistävästä klostrideista etenkin *Clostridium perfringens* -bakteeria voidaan pitää merkinä ulostesaastutuksesta, sillä niitä esiintyy yleisesti ihmisten suolistossa ja ulosteissa. *Clostridium perfringens* on anaerobinen bakteeri, joka lepomuodossaan esiintyy itiönä. Bakteerin itiöt kestävät hyvin desinfiointia ja saattavat säilyä pitkiäkin aikoja vedessä. Itiöt voivat säilyä vedessä huomattavasti kauemmin kuin osa varsinaisista taudinaiheuttajista. Laatusuosituksena on, että 100 ml näytteessä ei esiinny yhtään bakteerin itiötä tai sen pesäkettä muodostavaa yksikköä. /12, liite 3 s. 4/

Clostridium perfringens on monessa mielessä ongelmallinen mikrobi. Tutkimustulokset sen kyvystä indikoida erilaisten ulosteperäisten taudinaiheuttajaryhmien (bakteerit, alkueläimet, virukset) esiintymistä vedestä ovat ristiriitaisia. Sen soveltuvuus suomalaisiin olosuhteisiin on kyseenalainen. Tästä syystä sen sisällyttäminen esimerkiksi vedenjakelulaitosten omiin käyttö-tarkkailuihin ei ole järkevää. /12, liite 3 s. 4/

2.3 Laadunvalvonta

Kunnan terveydensuojeluviranomainen voi määrätä sosiaali- ja terveysministeriön asetuksen 401/2001 mukaisen yksittäisen talouden käyttämän talousvesikaivon veden tutkittavaksi, jos on syytä epäillä veden aiheuttavan terveyshaittaa. Asetuksessa määriteltyjen muuttujien, kuten *Escherichia coli* -bakteerin enimmäistiheyden, määrittäminen on tehtävä, jos on perusteltua syytä epäillä niitä esiintyvän talousvedessä terveydelle haitallisina määrinä. Jos talousvesi ei täytä asetuksessa mainittuja terveydellisiä laatuvaatimuksia tai -suosituksia uusintatutkimuksella varmistettunakaan, kunnan terveydensuojeluviranomaisen tulee tiedottaa veden käyttäjille laatuvaatimusten ja -suositusten ylittymisistä ja talousveden tällöin mahdollisesti aiheuttamista terveyshaitoista. Kunnan terveydensuojeluviranomainen voi antaa talousvesikaivon veden valvontaa,

puhdistusta ja käyttöä koskevia määräyksiä talousvedestä aiheutuvien terveyshaittojen ehkäisemiseksi. /11/

3 KOLIFORMIT JA *ESCHERICHIA COLI*

3.1 Koliformiset bakteerit

Vesien bakteriologiassa koliformit määritellään ryhmäksi fakultatiivisesti aerobisia (kykenevät elämään sekä hapellisissa että hapettomissa olosuhteissa), gram-negatiivisia (soluseinässä on lipoproteiineja ja lipopolysakkarideja sisältävä kerros ohuen peptidoglykaanin päällä), oksidaasi-negatiivisia, itiöitä muodostamattomia sauvamaisia bakteereita, jotka fermentoivat laktoosia 48 tunnin kuluessa 35 °C:n tai 37 °C:n lämpötilassa muodostaen happoa ja kaasua. Tämä on enemmänkin käytännön kuin taksonomian määritelmä, ja koliformien ryhmä sisältää monenlaisia organismeja, joista suurin osa suolistoperäisiä. Koliformien ryhmään kuuluu yleinen suoliston bakteeri *Escherichia coli* sekä *Klebsiella pneumoniae*, joka esiintyy harvemmin suolistossa. Määritelmä ottaa mukaan myös *Enterobacter aerogenes* -lajin organismit, joita ei yleisesti yhdistetä suolistoon. Tarkemmin sanottuna koliformisten bakteerien ryhmä koostuu noin 12 suvun lajeista, yleisimpinä jo mainitut *Escherichia*-, *Enterobacter*- ja *Klebsiella* -suvut sekä *Citrobacter*-, *Serratia*- ja *Rahnella* -sukujen lajit. /2, s. 974; 3, s. 59; 4, s. 80; 5; 12, liite 3 s. 2 /

Koliformiset bakteerit ovat hyviä veden saastumisen indikaattoreita, sillä ne ovat yleisiä ruoansulatuskanavassa sekä ihmisillä että tasalämpöisillä eläimillä, ja ne esiintyvät suurina määrinä suolistossa. Jos koliformeja joutuu veteen, ne lopulta kuolevat, mutta eivät yhtään sen nopeammin kuin patogeeniset bakteerit *Salmonella* ja *Shigella*. Sekä koliformit että patogeenit käyttäytyvät samalla tavalla veden puhdistusprosessien aikana. /2, s. 974/

Koliformien ryhmään kuuluu myös ei ihmisistä, mutta lämminverisistä eläimistä peräisin olevia bakteereita. Koska monet lämminveristen eläinten patogeetit (kuten *Salmonella*, *Leptospira*) infektoivat myös ihmisiä, indikaattori, joka osoittaa sekä ihmis- että eläinperäisen saastumisen, on toivottava. /2, s. 974/

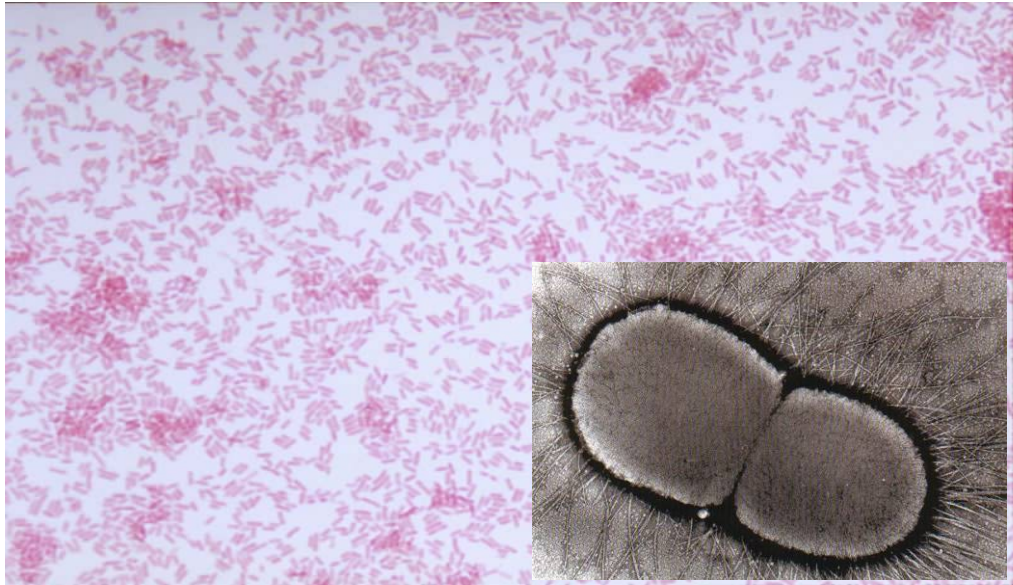
3.2 *Escherichia coli*

3.2.1 Historiaa

Escherichia coli -bakteerin eristi ensimmäisen kerran saksalainen bakteriologi Theodor Escherich vuonna 1885 ruoansulatuskanavaan normaalisti kuuluvana bakteerina. Escherich nimesi organismin *Bacterium coliksi*, jonka nimi viittaa solun sauvamaiseen muotoon ja suolistoon kasvuympäristönä. Suvun nimi kuitenkin muutettiin *Escherichiaksi* löytäjänsä kunnioittamiseksi. Vaikka Escherichin löytämä mikrobi, kuten monet muutkin *E. coli* -kannat, ovat harmittomia, jotkin *E. coli* -kannat ovat patogeenisia aiheuttaen ripulia ja virtsatien tulehduksia. /1, s. 267/

3.2.2 *Escherichia coli* -bakteeri

E. coli -bakteereilla tarkoitetaan bakteereja, jotka koliformisille bakteereille määriteltyjen ominaisuuksien lisäksi tuottavat laktoosista happoa ja kaasua 44,5 °C lämpötilassa ja tryptofaanista indolia 44,5 °C (21 ± 3) h kuluessa. *Escherichia coli* -bakteeri on noin 1–2 µm leveä ja noin 3 µm pitkä (kuva 1). Se kuuluu gammaproteobacteria-ryhmään (Phylum BXII). /9, s. 619; 12, liite 3 s. 2; 13, s. 3; 21/



Kuva 1 Iso kuva: gram-värjätty *E. coli* -bakteeri /19/; Pieni kuva: elektronimikroskooppikuva jakautuvasta *E. coli* -bakteerista, negatiivivärjätys /9, s. 508/.

Escherichia coli -laji sisältää suuren joukon aineenvaihdunnaltaan samankaltaisia, mutta muun muassa virulenssiltaan erilaisia kantoja. Kaikki ovat kuitenkin DNA-homologiatutkimusten mukaan erittäin läheistä sukua keskenään. Suoliston normaalimikrobisto sisältää runsaasti erilaisia *E. coli* -kantoja ja *E. coli* onkin suoliston aerobisen normaalimikrobiston valtabakteeri. Huomioitavaa kuitenkin on, että suoliston bakteerista vain noin 1 % on fakultatiivisesti aerobisia, loput ovat aneroebeja. Fakultatiivisia aerebeja on yleensä vähemmän kuin 10^7 /gramma paksusuolen sisältöä, ja ne kuluttavat kaiken jäljellä olevan hapen paksusuolesta tehden siitä hapettoman. /3, s. 707; 8, s. 380/

E. coli on rakenteeltaan tyypillinen gram-negatiivinen enterobakteeri, jonka genomi tunnetaan hyvin. Geenejä sillä arvioidaan olevan 4 300. *Escherichia coli* -bakteerilla on hyvin monimuotoinen solun pintarakenne ja tähän liittyen suuri määrä serotyyppejä. *E. coli* -kannat serotyyppitetään O-, K-, ja H-antigeenien mukaan. Monilla kolibakteerikannoilla on polysakkaridikapseli (K-antigeeni). Kaikkien kolibakteerien LPS:n O-polysakkaridi (O-antigeeni) ei ole yhtä kehittynyt

kuin salmonellojen. Useimmilla kolibakteereilla on myös flagella (H-antigeeni). *Escherichia coli* -bakteerilla on melkein aina flagelloja ja ne ovat liikuntakykyisiä, mutta liikkumattomiakin tunnetaan. Eräät ripulia aiheuttavat kolibakteerikannat erittävät toksiineja, monet tuottavat myös solukalvoja vaurioittavaa hemolysiiniä. /4, s. 81; 8, s. 380; 9, s. 619/

Suoliston hyviä kolibakteereita tunnetaan tuhansia erilaisia. Niiden lisäksi on olemassa useita kolibakteeriryhmiä, ns. enterovirulentit kolibakteerit, jotka leviävät elintarvikkeiden välityksellä ja aiheuttavat ripulitauteja erilaisilla mekanismeilla. Leviäminen voi tapahtua minkä tahansa elintarvikkeen välityksellä, sillä enterovirulentit kolibakteeritkin ovat viimekädessä aina ulosteesta peräisin. /8, s. 381/

Yleisin elintarvikkeiden kautta saatavan infektion lähde on saastunut kypsentämätön tai alikypsennetty liha, varsinkin jauhelihat. Myös maidossa tai kasviksissa saattaa esiintyä *E. coli* -bakteeria. Läpätunkeva säteily (gammasäteily) on katsottu ainoaksi tehokkaaksi keinoksi taata, ettei jauhettu liha sisällä patogeeneja prosessin jälkeen. /3, s. 936/

E. coli on normaalissa elinympäristössään isännän suolistossa sille hyödyllinen. Se estää muita, patogeenisempia mikrobeja kolonisoimasta suolta. *E. coli* tuottaa myös K-vitamiinia. Näiden vastakohdaksi *E. coli* pystyy aiheuttamaan infektiota. Eräät kannat ovatkin selvästi patogeenisempia kuin toiset. Lisäksi tietyt *E. coli* -kannat aiheuttavat ripuleja. Suoliston normaalin *E. coli* -mikrobiston joukossa patogeeniset *E. coli* -kannat ovat harvinaisia. /8, s. 381; 9, s. 619–620/

E. coli aiheuttaa tavallisimmin virtsatieinfektioita: lähes 90 % niistä on kapselillisen *E. coli* -bakteerin aiheuttamia. Bakteerilla on myös virulenssiominaisuuksia, joiden avulla se aiheuttavaa suolistoinfektioita. Kannat jaetaan kuuteen eri luokkaan, jotka löytyvät taulukosta 1. /3, s. 935; 8, s. 382–383; 9, s. 620–621/

Taulukko 1 Tunnetut *Escherichia coli* -kannat

Nimi	Lyhenne	
Enterotoksigeeniset kannat	ETEC	suurin turistiripulien syy
Enterohemorragiset kannat	EHEC	<i>E. coli</i> O157:H7 tarttuvain tyyppi, tuottaa potilaan suolistossa ns. shigatoksiinia (verotoksiini) ja aiheuttaa massiivista veriripulia sekä munuaisten toimintahäiriöitä.
Enteropatogeeniset kannat	EPEC	pitkittynyt ripuli ja kohtalainen kuume
Enteroinvasiiviset kannat	EIEC	aiheuttavat verisen ripulin, joka on kivulias ja muistuttaa punatautia
Enteroaggregatiivinen kanta	EaggEC	
Diffuusisti adherentti kanta	DAEC	
Lisäksi muita <i>E. coli</i> -ripulikantoja, joita esiintyy lasten pitkittyneiden ripuleiden yhteydessä. Ne poikkeavat ominaisuuksiltaan keskenään ja suolistoinfektioita aiheuttavista kolibakteereista.		

3.3 Lämpökestoiset koliformit

Lämpökestoisiksi koliformisiksi bakteereiksi kutsutaan sellaisia bakteereita, jotka pystyvät tuottamaan laktoosista happoa ja kaasua myös 44,5 °C:n lämpötilassa. Tähän ryhmään kuuluvat lähinnä *E. coli* ja *K. pneumoniae*. Näistä *E. coli* on paras ulosteperäisen saastutuksen indikaattori, sillä *E. coli* -bakteeria tavataan ihmisten ja tasalämpöisten eläinten ulosteissa mutta ei juuri muissa ympäristöissä. *K. pneumoniae* -bakteereita tavataan ulosteiden ohella myös kasveissa ja mm. puunjalostusteollisuuden jätevesissä. *E. coli* voidaan erottaa *K. pneumoniae* -bakteereista jatkotutkimuksin indolikokeen avulla. /12, liite 3 s. 4/

Lämpökestoisten koliformien esiintyminen talousvedessä on yleensä osoitus *E. coli* -bakteerista ja siten myös merkki ulosteperäisestä saastumisesta. Jos talousvedessä esiintyy lämpökestoisia koliformisia bakteereita, on syytä tehdä *E. coli* -mikrobin

alustava tunnistus. Lämpökestoisten koliformien määrittäminen ei kuitenkaan voi korvata *E. coli* -määrittäystä. /12, liite 3 s. 4/

4 VALIDOINTI

4.1 Yleistä

Validointi on menetelmän kelpoisuuden osoittamista. Validoinnin tarkoituksena on tuottaa vertailuarvoja suureille, jotka kuvaavat menetelmän luotettavuutta. Mikrobiologiassa tällaisia suureita ovat suhteellinen oikeellisuus, toistettavuus, uusittavuus, toteamisraja, spesifisyys, herkkyys ja lineaarisuus. Mikrobiologisten menetelmien validoimiseksi ei vielä ole olemassa kansainvälisesti hyväksytyjä ohjeita eikä myöskään kriteerejä validointitulosten arvioimiseksi. Tämän vuoksi validoinnissa on toistaiseksi tyydyttävä hankkimaan tuntumaa menetelmän käyttöön liittyviin epävarmuustekijöihin ja mahdollisesti kuvaamaan niitä numeerisesti. Laboratoriossa validointi liittyy yleensä standardimenetelmien ja muiden yleisesti käytössä olevien menetelmien käyttöönottoon. Siksi se voidaan suorittaa suppeahkona, dokumentoituna menettelynä, jonka tarkoitus on osoittaa, että laboratorio hallitsee menetelmän. /10, s. 1/

4.2 Mikrobiologisten menetelmien epävarmuus

Mikrobiologiassa näyte analysoidaan mikrobeineen, materiaaleineen ja häiritsevine taustoineen. Analyysin erottelu tapahtuu vasta kasvatusalustalla, jonka koostumus ja kasvatusolosuhteet määräävät menetelmän spesifisyyden. Tähän vaikuttaa lisäksi tutkittavien mikrobikantojen ominaisuuksien vaihtelu. Mikrobiologiassa näyte joudutaan laimentamaan kvantitatiivista määrittäystä varten sellaiselle pitoisuustasolle, että on mahdollista laskea yksittäisten solujen muodostamat pesäkkeet. Tämän vuoksi solumäärän tulee olla enintään muutamia satoja tutkittavassa näytteessä. Tällöin rinnakkaisanalyysien pesäkemäärät voivat vaihdella suurestikin ilman, että kyseessä on virhe. /10, s. 2/

Mikrobiologiassa oikeellisuuden eli täsmällisesti oikean tuloksen määrittäminen on vaikeaa, koska mikrobit ovat elävää materiaalia eikä niistä pystytä tekemään valmisteita, joiden todellinen pitoisuus olisi tiedossa ja pysyisi muuttumattomana. Mikrobiologiassa oikeana tuloksena pidetään yleensä menetelmän antaman keskiarvotuloksen (useita toistoja) ja hyväksytyyn arvon lähekkäisyyttä. Hyväksytty arvo on sertifioidulla referenssimateriaaleilla saatu ”todellinen arvo”. /10, s. 2/

Eräs merkittävimpiä epävarmuustekijöitä on homogenointi, joka saattaa tuhota mikrobeja. Toisaalta mikrobeja ei saada täysin irtautumaan tutkittavasta materiaalista. Siksi varsinkin tutkittaessa kiinteitä näytteitä esiintyy voimakasta hajontaa. Mikrobiologisten analyysitulosten hajontaa lisäävät myös työntekijäkohtaiset työskentelyerot, esimerkiksi pesäkkeiden tulkintaerot, jotka kytkeytyvät näytteen ja mikrobin ominaisuuksiin. Ongelmia saattavat aiheuttaa myös matriisin ominaisuudet, taustamikrobien luonne ja muut vaikeasti määriteltävät tekijät. Siksi mikrobiologisista näytteistä tehdyissä rinnakkaisanalyyseissä esiintyy hajontaa enemmän kuin Poisson-jakauma esittää eli esiintyy ylihajontaa. Sallittavaa ylihajontaa ei kuitenkaan ole toistaiseksi vielä määritelty. /10, s. 2/

4.3 Standardimenetelmä

Standardimenetelmä on standardoimisjärjestön julkaisema menetelmä. Standardoimisjärjestöjä ovat muun muassa International Organization for Standardization (ISO), joka on kansainvälinen järjestö, European Committee for Standardization (CEN), joka on eurooppalainen järjestö ja Suomen Standardoimisjärjestö (SFS), joka on kansallinen järjestö. /10, s. 4/

4.4 Referenssimenetelmä

Referenssimenetelmä on menetelmä, jonka ominaisuudet tunnetaan perusteellisesti. Menetelmä on selkeästi ja täsmällisesti kuvattu. Sen on osoitettu antavan oikeita ja toistettavia tuloksia. Menetelmää voidaan käyttää muiden saman suureen tutkimiseen tarkoitettujen menetelmien arvioimiseen ja erityisesti vertailuaineiden testaamiseen. Referenssimenetelmänä voidaan pitää standardimenetelmää. /10, s. 5/

4.4 Validointiin liittyvät suureet

4.4.1 Oikeellisuus

Menetelmän antamien tulosten oikeellisuuden tutkiminen edellyttää tietoa analysoitavan mikrobin todellisesta pitoisuudesta. Koska mikrobiologiassa analyysi on elävää materiaalia, ei sen todellista pitoisuutta eikä validoitavan menetelmän antamien tulosten oikeellisuutta pystytä varmuudella määrittämään. Oikeellisuus määritetään käyttämällä sertifioituja referenssimateriaaleja, joiden ilmoitettua pitoisuutta pidetään oikeana tuloksena. Käytännössä oikeellisuus joudutaan kuitenkin usein määrittämään käyttämällä sertifioimattomia referenssimateriaaleja tai siirrostettuja näytteitä, koska sertifioituja referenssimateriaaleja on toistaiseksi rajoitetusti saatavilla ja ne ovat kalliita. /10, s. 6/

Suhteellinen oikeellisuus tarkoittaa referenssimenetelmän ja validoitavan menetelmän antamien tulosten vastaavuutta/lähekkäisyyttä tutkittaessa samoja näytteitä. /10, s. 7/

Virhepositiivisuudella tarkoitetaan, että validoitava menetelmä antaa positiivisen tuloksen silloin, kun referenssimateriaali/siirrostettu näyte ei sisällä tutkittavaa mikrobia. /10, s. 7/

Virhenegatiivisuudella tarkoitetaan, että validoitava menetelmä antaa negatiivisen tuloksen silloin, kun näyte sisältää tutkittavaa mikrobia. /10, s. 7/

4.4.2 Täsmällisyys

Menetelmän antamien tulosten täsmällisyyttä kuvaavat toistettavuus ja uusittavuus. Mikrobiologiassa analyysien täsmällisyyteen vaikuttaa merkittävästi tutkittavan näytteen mikrobipitoisuus: mitä pienemmästä pitoisuudesta on kyse, sitä epävarmempi on tulos. Täsmällisyyteen vaikuttavat mikrobiologisen työskentelyn erityispiirteisiin liittyvät virhelähteet (kpl 4.2). /10, s. 7/

Toistettavuus on peräkkäisten toistojen antamien tulosten lähekkäisyys tutkittaessa identtisiä näytteitä, kun analyysi on suoritettu samalla menetelmällä, samoissa olosuhteissa ja samojen henkilöiden toimesta lyhyellä aikavälillä. /10, s. 7/

Uusittavuus on yksittäisten analyysitulosten lähekkäisyys eri henkilöiden tutkiessa identtisiä näytteitä käyttäen samoja menetelmiä joko samassa tai eri laboratoriossa. /10, s. 7/

4.4.3 Toteamisraja

Toteamisraja on pienin mikrobipitoisuus, joka voidaan todeta luotettavasti. Toteamisrajaan vaikuttavat menetelmän selektiivisyys, spesifisyys, mikrobin ”tila” näytteessä sekä itse näytematriisi mikrobistoinen. Toteamisraja tulee määrittää erikseen jokaiselle tutkittavalle matriisille. Mikrobiologiassa toteamisraja on määritettävissä vain kvalitatiiviselle menetelmälle. Toistaiseksi menetelmäkuvauksissa ilmoitetaan harvoin toteamisraja, mutta se voidaan määrittää tutkimalla referenssimateriaaleja ja niiden puuttuessa siirrostettuja näytteitä. Tällöin pienin mahdollinen referenssimateriaalin tai siirrostetun näytteen mikrobipitoisuus on käytännössä yleensä viisi solua/tutkittava näytemäärä. /10, s. 7/

4.4.4 Spesifisyys

Spesifisyys tarkoittaa sekä kvantitatiivisen että kvalitatiivisen menetelmän kykyä löytää tutkittava mikrobi tai tutkittavat mikrobit näytteessä olevien häiritsevien tekijöiden vaikutuksesta huolimatta. Täydellisen spesifinen menetelmä toteaa/määrittää vain analysoitavan mikrobin. Käytännössä mikrobiologiset menetelmät eivät ole täydellisen spesifisiä, vaan menetelmää validoitaessa on tutkittava ja opittava tunnistamaan tyypilliset pesäkkeet analyysiä häiritsevän mikrobiston joukosta pesäkkeitä varmistamalla. On otettava huomioon, että pesäkkeiden laskeminen/tunnistaminen on aina subjektiivista ja että virhepositiivisten ja -negatiivisten osuus on yleensä matriisikohtaista. /10, s. 8/

4.4.5 Herkkyys

Herkkyys on menetelmän kyky todeta vähäiset vaihtelut määritettävien mikrobien pitoisuuksissa tietyissä materiaaleissa. Herkkyys on keskeinen ja tärkeä menetelmän ominaisuus verrattaessa menetelmiä toisiinsa tai tehtäessä täydellistä validointia uutta menetelmää kehitettäessä. Kvalitatiivisen menetelmän herkkyys ilmoitetaan yleensä menetelmän antamien positiivisten tulosten prosenttiosuutena. /10, s. 8/

4.4.6 Lineaarisuus

Lineaarisuus kuvaa kvantitatiivisen menetelmän kykyä antaa tuloksia, jotka ovat suoraan verrannollisia näytteen mikrobipitoisuuteen. Mikrobipitoisuuden muutos saa aikaan suhteessa yhtä suuren muutoksen tuloksissa. /10, s. 8/

Mikrobiologiassa pesäkelaskennan yläraja on yleensä muutamia satoja pesäkkeitä maljalla. Näytteestä valmistetaan laimennossarja, jolla pyritään pääsemään tälle laskenta-alueelle. Yleensä menetelmässä annetaan laskenta-alue eli mainitaan pienin ja suurin pesäkemäärä, jonka perusteella tulos voidaan luotettavasti

ilmoittaa. Validoitaessa menetelmää on syytä selvittää, pystyykö laboratorio suorittamaan pesäkelaskennan menetelmän antamissa rajoissa. Käytännössä tulos joudutaan usein antamaan laskenta-alueen ulkopuolella olevien pesäkemäärien perusteella, jolloin tulos esitetään arviona. /10, s. 8/

4.5 Validoinnin suorittaminen

Standardimenetelmien, kansainvälisten menetelmäkokoelmien menetelmien ja virallisten menetelmien validointi edellyttää yleensä tunnetun mikrobipitoisuuden omaavan referenssimateriaalin sekä siirrostettujen näytteiden tutkimista tarkoituksenmukaisilla matriiseilla. Validointituloksista tulee ilmetä kvalitatiivisten menetelmien osalta toteamisraja sekä virhepositiiviset ja -negatiiviset tulokset. Kvantitatiivisten menetelmien osalta tuloksista tulee ilmetä lisätyn ja saadun mikrobipitoisuuden lähekkäisyys ja lisättyjen mikrobipitoisuuksien lineaarisuus. Tutkimuksista tehdään yhteenveto, josta ilmenevät mm. tutkitut matriisit, käytetyt referenssimateriaalit, tutkitut mikrobipitoisuudet, näytteiden lukumäärä sekä tutkimustulokset ja johtopäätökset. /10, s. 9/

4.5.1 Mikrobien ja pitoisuuksien valinta

Mikrobeina käytetään ensisijaisesti tunnetun mikrobipitoisuuden omaavia referenssimateriaaleja tai niiden puuttuessa laboratorion itse tunnetuista kannoista valmistamia mikrobisuspensioita, joiden mikrobipitoisuus tunnetaan. Referenssimateriaaleja on saatavissa yksittäisinä mikrobeina tai mikrobiseoksina. Mikrobiksi valitaan sellainen mikrobi tai mikrobiryhmä, jota menetelmällä analysoidaan. /10, s. 9/

Menetelmiä validoitaessa käytetään tavallisesti kahta eri mikrobipitoisuutta. Kvalitatiivisen menetelmän validoinnissa valitaan tutkittavaksi yleensä mikrobipitoisuudet, joista toinen on lähellä menetelmän toteamisrajaa ja toinen siihen nähden noin kymmenkertainen. Mikäli toteamisraja ei ole tiedossa, sitä on

syitä selvittää siirrostamalla matriisiin eri mikrobipitoisuuksia. Sekä kvalitatiivisten että kvantitatiivisten menetelmien validoinnissa tutkitaan lisäksi aina 0-näyte, joka on siirrostamaton matriisi. /10, s. 9/

4.5.2 Näytteiden valmistaminen ja tutkiminen

Näytteet valmistetaan ymppämällä *Escherichia coli* -bakteerikantaa matriisina käytettävään kaivoveteen, jonka *E. coli* -bakteerin, koliformisten bakteerien ja heterotrofien pitoisuudet on määritetty. Lisäksi tehdään aina siirrostamaton 0-näyte, joka tutkitaan rinnakkaisanalyysinä ja kokeet toistetaan. Lisää aiheesta myöhemmissä luvuissa.

4.5.3 Tulosten arviointi

Kvalitatiivisten menetelmien osalta tarkastellaan, todettiiniko analysoitava mikrobi. Kvantitatiivisten menetelmien osalta tarkastellaan, vastaavatko saadut tulokset lisättyjä mikrobipitoisuuksia. Kvalitatiivisten menetelmien suhteen siirrostettujen näytteiden tulee antaa positiivinen tulos ja 0-näytteen negatiivinen tulos. Kvantitatiivisten menetelmien antamien tulosten tulee vastata siirrostettuja mikrobipitoisuuksia. /10, s. 10/

Siirrostettujen näytteiden pitoisuuden ja validoitavalla menetelmällä saadun pitoisuuden väliselle sallittavalle erolle ei toistaiseksi ole annettu numeerisia arvoja, joten mikrobiologista asiantuntemusta tarvitaan erityisesti kvantitatiivisten menetelmien validointituloksia tarkasteltaessa. Eron suuruuteen vaikuttavat esimerkiksi matriisi tai tutkittava mikrobi. Edellisten lisäksi on tarkasteltava, onko mikrobipitoisuudet valittu oikein ottaen huomioon määritettävän menetelmän herkkyys sekä se, kuinka paljon mikrobia yleensä esiintyy tutkittavassa matriisissa. Tuloksia arvioitaessa tarkastellaan myös menetelmän spesifisyyttä. On tärkeää tuntea matriisin sisältämä normaalimikrobisto, joka voi häiritä analysoitavan

mikrobin tunnistamista aiheuttaen alustavia virhepositiivisia tai -negatiivisia tuloksia. /10, s. 10/

Mikäli validoinnin toteutus ja tulokset ovat menetelmän käyttötarkoitus huomioon ottaen hyväksyttäviä, voidaan menetelmä ottaa käyttöön. Mikäli validointitulosta ei pidetä hyväksyttävänä ja syynä tähän ei ole mikään tekniseen suorittamiseen liittyvä seikka, on mm. pohdittava matriisin mahdollista merkitystä virhelähteenä ja harkittava mikrobipitoisuuksien tai referenssimateriaalin soveltuvuutta. Johtopäätöksenä validointituloksista voi olla myös se, että menetelmää ei hyväksytä käyttöön tai se hyväksytään tietyin rajoituksin, jotka voivat liittyä esim. matriisiin tai herkkyteen. /10, s. 11/

5 MENETELMÄT

5.1 Referenssimenetelmä

Referenssimenetelmänä työssä käytettiin SFS 3016:2001 -standardin mukaista kalvosuodatusmenetelmää. Menetelmää käytetään selvittäessä raakaveden ja kaivovesien likaantumista sekä arvioitaessa uimarantavesien koliformisten bakteerien määrää. /13, s. 1/

5.1.1 Periaate

Kalvosuodatuksessa vesinäytteen bakteerit saadaan kerättyä kalvolle, joka asetetaan erityisesti koliformisia bakteereja suosivalle kasvualustalle. Suodatukseen käytetään ruudutettua, huokoskooltaan 0,45 µm kalvoa, joka ei sisällä kasvua kiihdyttäviä tai rajoittavia ominaisuuksia. Suodatettava vesinäytemäärä on 100 ml. Suodatuksen jälkeen kalvo asetetaan LES Endo -agar -kasvualustalle ja inkuboidaan $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ (21 ± 3) h ajan. Kasvualusta ei täysin ehkäise vieraiden organismien kasvua. Sen vuoksi alustassa on pelkistynyttä fuksiinia laktoosista

aldehydiä muodostavien koliformisten bakteeripesäkkeiden erottamiseksi muista pesäkkeistä. /13, s. 4/

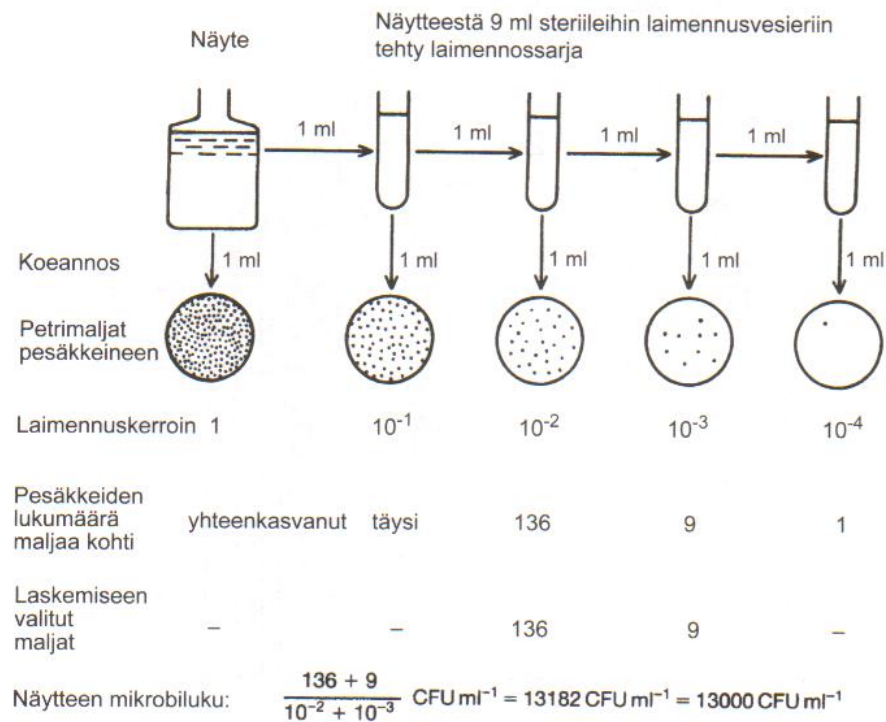
Inkuboinnin jälkeen suoritetaan tyypillisten laktoosi-positiivisten pesäkkeiden biokemiallinen lisäluonnehdinta, mikä johtaa koliformisten bakteerien ja *E. coli* -bakteerin havaitsemiseen ja lukumäärän laskemiseen 2...3 päivän kuluessa. /13, s. 3/

Tyypilliset pesäkkeet kalvolla lasketaan laktoosi-positiivisiksi bakteereiksi. Koliformisten bakteerien ja *E. coli* -bakteerin havaitsemiseksi suoritetaan jatkoviljely valitsemalla satunnaisesti tyypillisiä pesäkkeitä varmistustestejä varten. Laktoosi-positiivisten koliformisten bakteerien ja *E. coli* -mikrobin määrät lasketaan ja tulos ilmoitetaan 100 ml näytettä kohti. /13, s. 5/

5.1.2 Mikrobiluvun laskeminen

Jos on odotettavissa, että bakteereita esiintyy vesinäytteissä suurina määrinä, ei yksinkertaisesti voida vain suodattaa näytettä, vaan se täytyy laimentaa. Kuvassa 2 näkyy esimerkki siitä, kuinka laimennossarjojen avulla päästään sellaisiin mikrobilukemiin, jotka ovat laskettavissa. Jakamalla pesäkkeiden lukumäärät maljoja kohti kyseisten maljojen laimennuskertoimien summalla, saadaan tulokseksi kyseisen näytemäärän cfu/ml (cfu = colony forming unit, pmy = pesäkkeen muodostava yksikkö).

Tätä menetelmää hyödynnetään validointimäärityksissä. Tehdään laimennossarja, josta laitetaan näytettä kasvamaan veriagarille, ja inkuboiduilta maljoilta lasketuista pesäkelukumääristä pystytään määrittämään matriisiin siirrostettavan ympin pitoisuus. Tällöin voidaan määrittää se mikrobipitoisuus, joka tutkittavista näytteistä teoriassa tulisi löytyä.



Kuva 2 Esimerkki mikrobiluvun laskemisesta /16, s. 30/.

5.1.3 Varmistustestit

Kasvatuksen jälkeen lasketaan tummanpunaiset, metallinkiiltoiset, selvästi koholla olevat pesäkkeet. Kiillon havaitsee luotettavimmin luonnon hajavalossa. Tyypilliset pesäkkeet katsotaan laktoosi-positiivisiksi. /13, s. 4/

Oksidaasitestiä varten siirrostetaan jatkoviljelyä varten edustava määrä luonteenomaisia pesäkkeitä valikoimattomalle agarille. Sitä inkuboidaan (36 ± 2) °C (21 ± 2) h ajan ja suoritetaan oksidaasitesti. Suodatinpaperille laitetaan oksidaasireagenssia ja levitetään osa pesäkkeestä sen päälle. Jos paperille ilmestyy syvän sinisestä purppuranpunaiseen oleva väri 30 s:ssä, sitä pidetään positiivisena reaktiona. /13, s. 4/

Indolitestissä siirrostetaan soluja joko suoraan LES Endo -agarilla tai valikoimattomalta agarilla kasvavasta pesäkkeestä tryptofaaniliemeen. Siirrostettua putkea, jossa on tryptofaanilientä, inkuboidaan $(44,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ (21 ± 3) h ajan ja tutkitaan indolituotanto lisäämällä 0,2...0,3 ml Kovacsin reagenssia. Kirsikanpunaisen värin kehittyminen liemen pinnalle varmistaa indolin tuotannon. /13, s. 4/

Kaikki pesäkkeet, jotka antavat negatiivisen oksidaasireaktion, lasketaan koliformisiksi bakteereiksi. /13, s. 4/

Kaikki pesäkkeet, jotka antavat negatiivisen oksidaasi- ja positiivisen indolireaktion lasketaan *Escherichia coli* -bakteereiksi. /13, s. 4/

5.2 Validoitava menetelmä

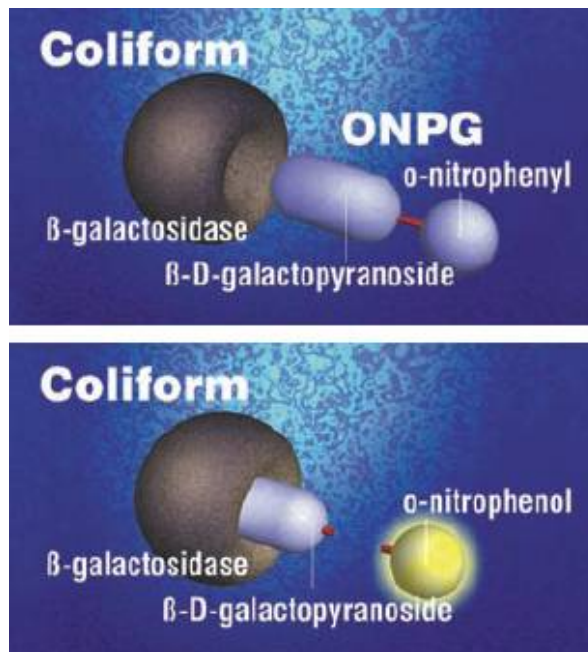
Validoitavana menetelmänä tässä työssä oli IDEXX:n Colilert[®] Quanti-Tray sekä Quanti-Tray/2000[®]. Reagenssina käytettiin Colilert[®]-18:sta, joka antaa tuloksen jo 18 tunnissa.

5.2.1 Colilert[®]-18

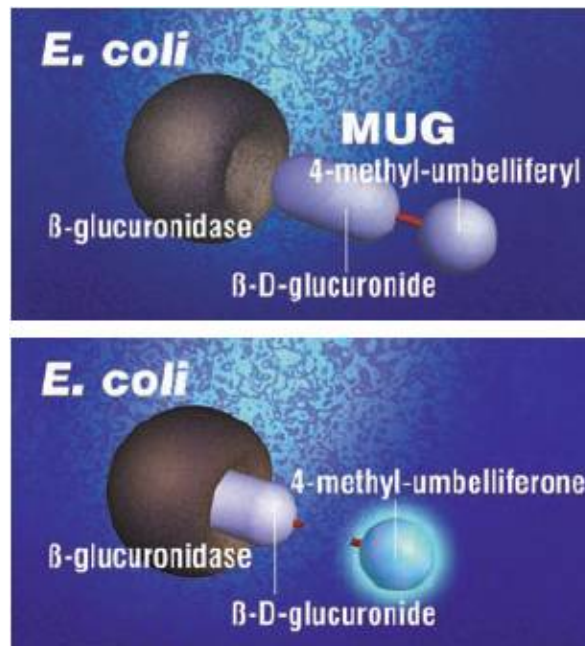
Colilert[®]-18 -reagenssia voidaan käyttää joko osoitusreaktiona näyttämään, onko vesinäytteessä *Escherichia coli* -bakteeria ja koliformisia bakteereita tai käyttää yhdessä näytteen kanssa Colilert Quanti-Tray[®]- sekä Quanti-Tray/2000[®]-liuskoissa, jolloin voidaan myös kvantitatiivisesti määrittää samanaikaisesti veden koliformisten bakteerien kokonaismäärä ja *E. coli* -bakteerin pitoisuus. /6/

Testi perustuu kyseessä olevien bakteerien entsyymiaktiivisuuksien mittaamiseen. Kun koliformit kasvavat Colilertissa[®], niiden β -galaktosidaasientsyymi hajottaa ONPG-substraatin (o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside), jolloin vapautuva yhdiste muuttaa värittömän kasvualustan/vesinäytteen kirkkaan keltaiseksi (kuva

3). Kun *E. coli* kasvaa, sen β -glukuronidaasi-entsyymi hajottaa MUG-substraatin (4-methyl-umbelliferyl- β -D-glucuronide), jolloin vapautuu UV-valossa (365 nm) fluoresoiva yhdiste (kuva 4). Muut organismit, joilla ei ole näitä entsyymejä, eivät voi hajottaa ONPG- eikä MUG-substraatteja, eivätkä siksi aikaansaa väri- ja fluoresenssireaktioita. Colilert[®]-18 -reagenssi on muille bakteereille niukkaravintainen ja se sisältää heterotrofien kasvua estäviä aineita. Tämän vuoksi muut bakteerit eivät häiritse tutkittavien bakteerien määrittystä. Colilert[®]-testin herkkyys on 1 pmy/100 ml vettä. Reagenssit säilytetään 4–25 asteen lämpötilassa pimeässä, pakkauksessa merkittyyn ajankohtaan saakka. /6/



Kuva 3 Koliformit käyttävät β -galaktosidaasi-entsyymiään hajottamaan ONPG-substraatin ja muuttavat sen värittömästä keltaiseksi /17/.



Kuva 4 *E. coli* käyttää β -glukuronidaasi-entsyymiään hajottamaan MUG-substraatin ja fluoresoi UV-valossa /17/.

5.2.2 Colilert[®] Quanti-Tray / Quanti-Tray[®] 2000

Colilert[®] Quanti-Tray -liuska käyttää samaa Poissonin jakaumaan perustuvaa tilastollista mallia kuin mihin putkimenetelmä (SFS 4089) perustuu, mutta siinä ei käytetä laimennoksia ja työ on automaattisempaa. Quanti-Tray[®] -sulkijalaite jakaa automaattisesti näytteen ja reagenssin sekoituksen erillisiin kupliin. Tällöin ei tarvita manuaalista pipetointia kuten perinteiset menetelmät edellyttävät. Liuskan määritysalue on 1–200 pmy/100 ml. /24/

Colilert Quanti-Tray[®] 2000 -liuska erikokoisine kuplineen hyödyntää samaa todennäköisyysmallia kuin MPN-menetelmän (SFS-EN ISO 9308-1) laimennossarja. Suuret kuplat toimivat laimentamattomina näytteinä ja pienet kuplat laimennettuina näytteinä. Kuitenkaan minkäänlaista laimennosta ei tarvita. Liuskan 97 kuplaa antavat suuren määritysalueen ja tarkan 95 %:n luottamusvälin. Verrattuna putkimenetelmään Quanti-Tray[®] 2000 -liuska on nopea, sillä on suuri

määritysalue ja kapea 95 %:n luottamusväli. Liuskan määritysalue on 1–2 419 pmy/100 ml. /24/

5.2.3 Quanti-Tray[®] Sealer



Kuva 5 Quanti-Tray[®] Sealer -sulkijalaite ja tuet liuskoille

Sulkijalaite on erittäin helppokäyttöinen (kuva 5). Siinä on vain kaksi painiketta: On/Off ja Peruuta. Lisäksi se on erittäin nopea ja liuskoja voikin sulkea neljän kappaleen minuuttia. Liuskojen antamilla tuloksilla on 95 %:n luottamusväli ja ne ovat täysin vertailukelpoisia kalvosuodatuksen kanssa. /24/

5.2.4 Testin suorittaminen

Kvalitatiivinen testi

Colilert[®]-18 -reagenssia lisätään 100 ml:n 33–38-asteista näytettä steriiliin, läpinäkyvään, fluoresoimattomaan pulloon. Pullo suljetaan ja reagenssin annetaan liueta. Tämän jälkeen näytettä inkuboidaan lämpökaapissa $35 \pm 0,5$ astetta 18 tunnin ajan. /6/

Kvantitatiivinen testi

Colilert[®]-18 -reagenssia lisätään huoneenlämpöiseen, steriilissä pullossa olevaan näytteeseen. Lisäksi pulloon lisätään kaksi tippaa vaahdonestoainetta. Pulloa ravistellaan niin kauan, että reagenssi on kokonaan liuennut. Tämän jälkeen vesi kaadetaan Quanti-Tray[®]- tai Quanti-Tray[®] 2000 -liuskaan, ravistellaan ilmakuplat vähemmiksi ja suljetaan liuska sulkijalaitteen avulla. Liuskaan mahdollisesti jääneet ilmakuplat eivät häiritse testin suoritusta. Sulkemisen jälkeen liuskat inkuboidaan $35 \pm 0,5$ asteen lämpötilassa 18 tuntia ja lasketaan positiivisten kuplien määrä: tulokset katsotaan MPN-taulukosta (most probable number, todennäköisin lukumäärä). Colilertin[®] tuloksia tulkittaessa apuna käytetään Quanti-Tray[®]-kontrolliliuskaa, johon verrataan oman näytteen värinmuodostusta. Jos näyte on laimennettu, saatu MPN-bakteeripitoisuus kerrotaan laimennuskertoimella. /6/

Tulosten tulkinta

- 1) Tulos on negatiivinen, jos näyte on väritön tai lievästi keltainen.
- 2) Tulos on positiivinen koliformeille, jos näyte on keltaisempi tai yhtä keltainen kuin kontrolli (kvalitatiivisessa testissä vaalean keltainen P/A-pullokontrolli ja kvantitatiivisessa testissä vaalean keltainen Quanti-Tray[®]-liuskakontrolli).
- 3) Tulos on positiivinen *E. coli* -bakteerille, jos keltaisuuden lisäksi havaitaan UV-valossa fluoresenssi.
- 4) Mikäli Quanti-Tray[®]-liuskoissa on 18 tunnin jälkeen vain erittäin vaaleita kuplia (vaaleampia kuin kontrolli) eikä yhtään voimakkaan keltaista kuplaa, tulee liuskaa jatkoinkuboida maksimissaan 22 tuntia, jonka jälkeen luetaan tulokset.

- 5) Testiä ei saa tulkita yli 22 tunnin inkuboinnin jälkeen, sillä heterotrofien kasvu saattaa häiritä määrittystä. /6/

Colilert[®]-testiä suoritettaessa on huomioitava seuraavat seikat:

- Lievää värillisyyttä saattaa ilmetä heti reagenssin lisäämisen jälkeen, testiä jatketaan tällöin normaalisti.
- Jos näyte sisältää paljon humusta ja on itsestään värillinen, tehdään kontrollinäyte ilman Colilert[®]-reagenssia, inkuboidaan normaalisti ja verrataan näytteeseen.
- Reagenssia ei saa lisätä puskuroituun veteen, sillä se on valmiiksi puskuroitu.
- Colilert[®] ei sovellu esirikastetuille tai konsentroiduille näytteille.
- Merivesinäytteet pitää laimentaa vähintään 1:10 steriiliin veteen.
- Mikäli vesi sisältää klooria, on se ensin neutraloitava natriumtiosulfaatilla.
- Kaikissa työvaiheissa tulee noudattaa aseptista työskentelytekniikkaa. /6/

Laadunvalvonta

Jokaisen uuden reagenssierän toiminta tulee tarkastaa *E. coli*-, *Klebsiella*- ja *Pseudomonas aeruginosa* -kannoilla kvalitatiivisen testin mukaisesti. /6/

5.2.5 Edut referenssimenetelmään nähden

Colilert[®] Quanti-Tray -liuskan etuja referenssimenetelmään verrattuna ovat sen helppous, nopeus ja tarkkuus. Menetelmän käyttö ei edellytä reagenssien valmistamista, subjektiivista pesäkelaskua eikä testejä tarvitse toistaa tukkeentuneen suodattimen tai heterotrofien häirinnän vuoksi. Colilert[®] -liuskaa käytettäessä ei myöskään tarvita lasitavaroita. Käsittelyaika on yhdelle liuskalle noin minuutti ja inkubointiaika vain 18 tuntia. Menetelmän nopeuteen vaikuttaa myös se, että se antaa samanaikaisesti sekä koliformisten bakteerien että *E. coli* -bakteerin lukumäärät. Menetelmän tarkkuutta kuvaa se, että se estää jopa 2 miljoonan heterotrofin kasvun 100 ml:ssa. /25/

5.3 Laadunvarmistus

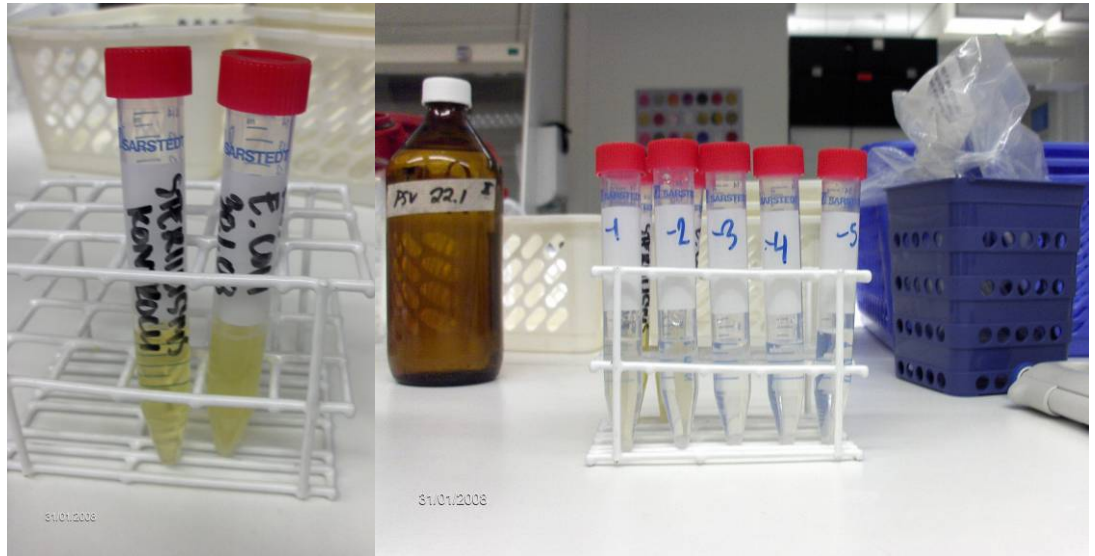
Laboratoriossa bakteerikannat säilytetään valmistajan ohjeiden mukaisesti. Viljelykaappien, pipettien, autoklaavin jne. kontrollit tehdään laboratorion menettelytapaohjeen mukaisesti. Colilert[®]-reagenssien laadunvarmistusta kontrolloi valmistaja, joka lähettää todistukset Eurofins Scientific Finland Oy -laboratorioon, jossa ne arkistoidaan. LES Endo -maljojen laadunvarmistus tapahtuu samalla tavalla kuin Colilert[®]-reagenssien.

6 VALIDOINNIN SUORITUS

6.1 Pätevöityminen

Minun tuli ennen varsinaisten validointimäärittysten aloittamista pätevöityä käyttämään SFS 3016 -standardin mukaista referenssimenetelmää. Laboratoriossa kaikki, jotka suorittavat analyysejä, joutuvat ensin pätevöitymään menetelmän käyttöön. Ideana oli, että saisin samoja tuloksia kuin muut laborantit ja siten määritykseni olivat vertailukelpoisia.

Testit aloitettiin sillä, että tein etukäteen BHI-liemeen (Brain heart -infusion) kasvatetusta (37 °C, 16 h) *Escherichia coli* -kannasta (ATCC 25922 = American Type Culture Collection) laimennossarjan (kuva 6) steriiliin peptoniveteen. Helmestä (tavallinen askarteluhelmi, jonka pinnalla ja reiässä on mikrobisuspensiota) kasvamaan laitettu mikrobikasvatus saattaa sisältää jopa 10⁹ pmy/ml, ja tällaiset määrät ovat mahdottomia testata.



Kuva 6 Kasvatettu *Escherichia coli* -kanta sekä laimennossarja pitoisuuteen 10^{-5}

Tämän jälkeen 10^{-5} -laimennoksesta tehtiin kaksi eri 1:100 laimennosta, joissa oletettavasti on noin 100 pmy/ml. Ensimmäinen laimennos tehtiin lisäämällä 1 ml 10^{-5} -kolibakteeriliuosta 99 ml:aan hanasta tulevaa vettä. Tästä otettiin kaksi kertaa 1 ml (n. 100 pmy/ml) ja kaksi kertaa 0,1 ml (n. 10 pmy/ml) kalvosuodatukseen ja suodatuksen jälkeen kasvamaan LES Endo -agarille. Laborantti teki rinnakkaismääritykset kanssani kummastakin pitoisuudesta, jotta saatoimme verrata tuloksiamme.

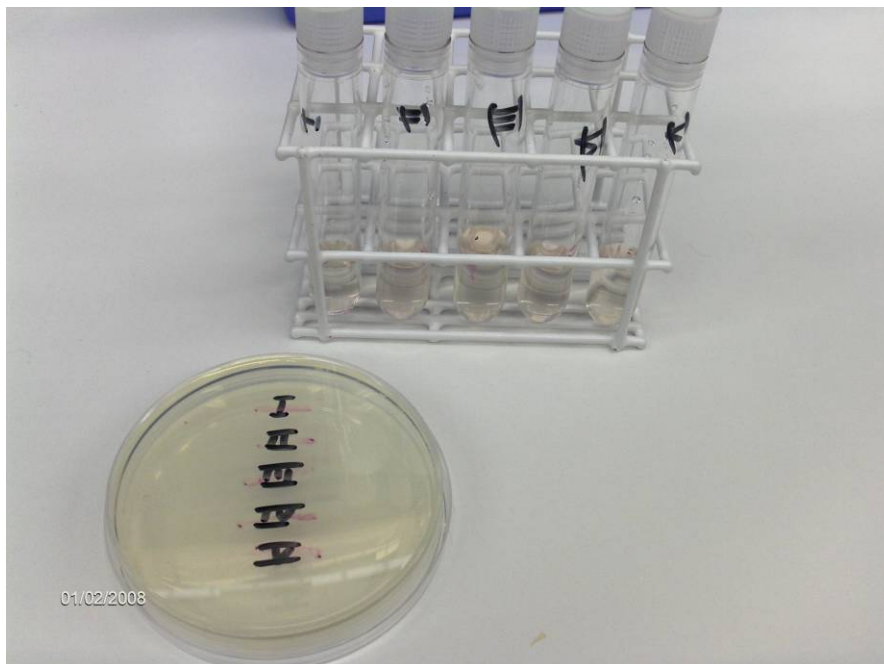
Toinen laimennos tehtiin samalla tavalla. 1 ml:aan 10^{-5} *E. coli* -liuosta lisättiin 99 ml laboratorion hanavettä. Tästä otettiin 1 ml ja lisättiin 100 ml vettä (n. 100 pmy/ml), Colilert[®]-18 -reagenssi ja vaahdonestoainetta. Näyte laitettiin Colilert[®] Quanti-Tray 2000 -liuskaan. Tämän jälkeen näytteet laitettiin lämpökaappiin inkuboitumaan ohjeen mukaisesti ja luettiin seuraavana aamuna.

Kuvassa 7 näkyy LES Endo -agarilla tyypillisiä metallinkiiltoisia pesäkkeitä. Maljoilta luettiin tulokset (luku 7, taulukko 2).



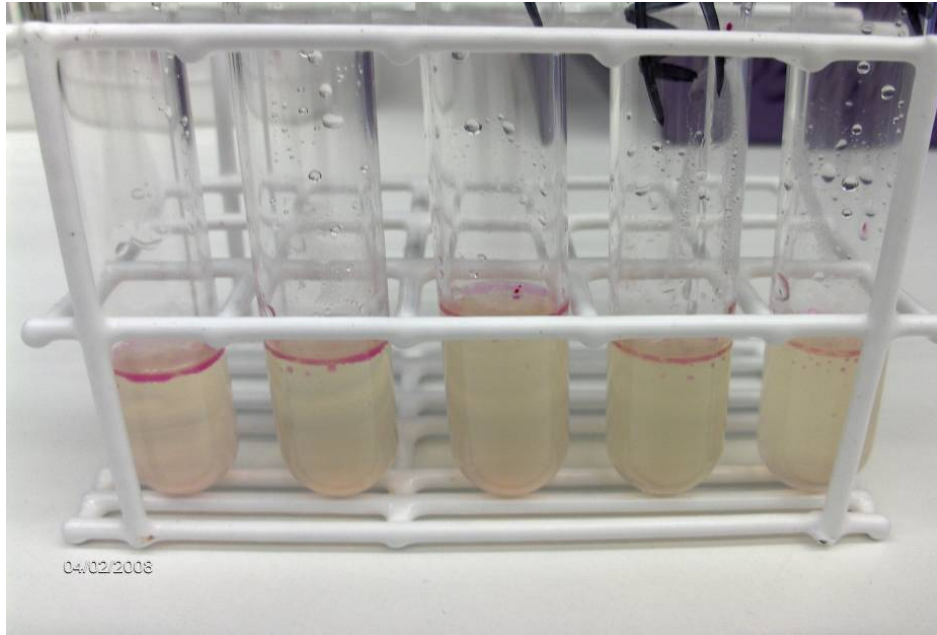
Kuva 7 Tyypilliset pesäkkeet LES Endo -agarilla

Jatkotestauksia varten yhdeltä maljalta siirrostettiin viisi pesäkettä tryptonivesiputkiin (ei tryptofaaniliemi kuten standardissa) ja samat näytteet myös ei-selektiiviselle PCA-agarille (plate count agar, kuva 8).



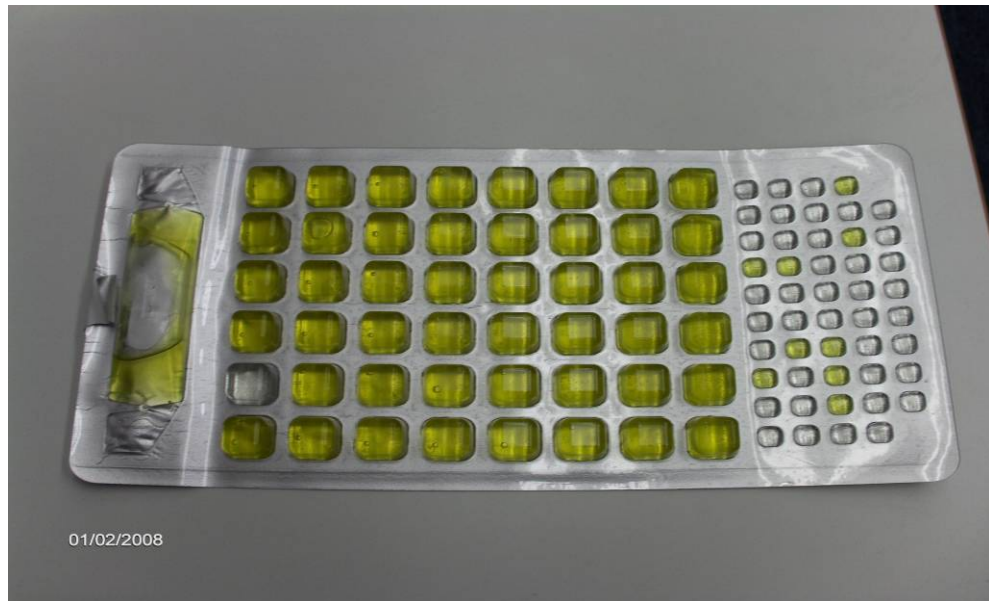
Kuva 8 Siirrostukset jatkotestejä varten

Agar-viljelmä laitettiin 37 °C:seen ja tryptonivesiputket 44 °C:seen 24 tunniksi inkuboitumaan. Tämän jälkeen agarilla olevista näytteistä tehtiin oksidaasitesti valmiilla testiliuskoilla (Microbiology Bactident Oxidase, Merck) ja koeputkiin lisättiin Kovacsin reagenssia indolituotannon tutkimiseksi (kuva 9). Tästä tarkemmin lisää luvussa 8.



Kuva 9 Indolikokeen tulokset

Colilert® Quanti-Tray 2000:lla tehdyn kokeen tulokset näkyvät kuvasta 10. Tarkemmin niitä on käsitelty luvussa 7. Näiden testien perusteella sain Eurofins Scientific Finland Oy -laboratoriossa pätevyyden käyttää käytössä olevaa referenssimenetelmää.



Kuva 10 Colilert® Quanti-Tray 2000 liuska inkuboinnin jälkeen

6.2 Esimääriykset

Ennen kuin kaivovettä voitiin käyttää kokeissa matriisina, tuli kaivosta otetusta vesinäytteestä määrittää mahdollinen *E. coli* -bakteerien ja koliformisten bakteerien määrä sekä heterotrofinen pesäkeluku. Ihanteellisessa tapauksessa vedessä ei ole lainkaan koliformeja, mutta sitä vastoin heterotrofeja löytyy. Tällöin voidaan selvittää, häiritsevätkö heterotrofit näytteen määrittystä Colilertilla®. Lisäksi vesinäytteeseen voidaan ympätä tunnettu pitoisuus *Escherichia coli* -bakteeria. Kaivovesinäyte otettiin mökkikaivosta Nokialta.

Koliformisten ja *E. coli* -bakteerin määrittämisessä suodatettiin kaksi 100 ml kaivovesinäytettä, suodatin laitettiin LES Endo -agarille ja inkuboitiin yön yli.

Heterotrofisen pesäkeluvun määrittämistä varten pipetoitiin kahdelle eri maljalle 1 ml kaivovesinäytettä, ja näyte maljattiin sekoittamalla se TH-agarin (hiivauuteagar) SFS-EN ISO 6222:1999 -standardin mukaisesti. Maljat laitettiin kasvamaan 22 °C:seen 68 ± 4 tunniksi. Tulokset ovat luvussa 7.

6.3 Validointimääritykset

Päätettiin, että validointimääritykset kaivovesille tehdään vain Colilert® 51-well -liuskalla, sillä sen määrittäminen on 1–200 mpn/100 ml ja kaivovesissä ei saisi olla yhtään *E. coli* -bakteereita, mutta koliformisille bakteereille raja-arvo on alle 100 pmy/100 ml /11/. Raja-arvo pystytään siis määrittämään tälläkin liuskalla.

Kaikki määritykset tehtiin siten, että lisäksi yksi kolmesta laborantista teki samoista näytteistä rinnakkaismääritykset, jotka toistettiin kolme kertaa. Kaikki näytteet määritettiin sekä Colilert® 51-well -liuskalla että LES Endo -agarilla.

Testeissä määritettiin siirrostetut näytteet (steriiliin veteen ja kaivoveteen), referenssinäyte (SLV-ampulli) sekä todellisia kaivovesinäytteitä. Steriiliä vettä käytettiin, jotta saataisiin selville mahdollisten ongelmien johtuminen kaivovesimatriisista.

6.3.1 Näytematriisina steriili vesi

Kasvatetusta *E. coli* -kannasta tehtiin kolme uutta laimennossarjaa samalla tavalla kuten luvussa 6.2 on kuvattu ja pesäkkeet laskettiin. Pesäkemäärät on esitetty luvussa 7 taulukossa 3. Niiden perusteella saatiin arvioitua, kuinka paljon kukin laimennos sisälsi pmy (ympäntävää mikrobio)/100 ml.

Vuorokauden jääkaapissa olleesta *E. coli* -kannasta tehtiin kolme laimennossarjaa peptonisuolaliuokseen:

Ensimmäiseen putkeen (laimennos 10^{-1}) laitettiin 450 µl *E. coli* -liuosta ja 9,550 ml peptonivettä. Laimennussarjan ensimmäisessä laimennoksessa suhteutettiin solupitoisuus 1:10:een alkuperäisestä kasvatusliemestä. Tämän jälkeen laimennosta jatkettiin normaalisti 10^{-8} :een asti lisäämällä 9 ml:aan peptonivettä aina 1 ml edellistä laimennosta. Suluissa on pitoisuusviljelyn perusteella laskettu ympäntä *E. coli* -bakteerin ja koliformisten bakteerien määrä, joka tulisi löytyä määrityksissä.

- 10^{-7} -laimennoksesta otettiin 1 ml ja lisättiin 99 ml:aan steriiliä vettä (noin 100 pmy/100 ml).
- 10^{-8} -laimennoksesta otettiin 1 ml ja lisättiin 99 ml:aan steriiliä vettä (noin 10 pmy/100 ml).

Toinen laimennossarja tehtiin lisäämällä 770 µl *E. coli* -kantaliuosta 9,230 ml peptonivettä. Tällöin tulosten tulisi olla määritysrajan tienoilla. Laimennusta jatkettiin pitoisuuteen 10^{-7} asti.

- 10^{-7} -laimennoksesta otettiin 1 ml ja lisättiin 99 ml:aan steriiliä vettä (noin 160 pmy/100 ml).

Kolmas laimennossarja tehtiin normaalisti lisäämällä alusta lähtien 1 ml laimennosta ja 9 ml:aan peptonivettä. Laimennossarja tehtiin pitoisuuteen 10^{-9} asti.

- 10^{-9} -laimennoksesta otettiin 1 ml ja lisättiin 99 ml:aan steriiliä vettä (noin 2 pmy/100 ml).

Näiden lisäksi tehtiin 0-näyte pelkästä steriilistä vedestä. Nämä kaikki määritykset toistettiin kolme kertaa sekä LES Endolla että Colilert® 51-well -liuskalla.

6.3.3 Näytematriisina kaivovesi

Kasvatetusta *E. coli* -kannasta tehtiin kolme uutta laimennossarjaa samalla tavalla kuten edellisissä luvuissa on kuvattu ja pesäkkeet laskettiin. Pesäkemäärät ovat luvussa 7 taulukossa 4. Niiden perusteella saatiin arvioitua, kuinka paljon kukin laimennos sisälsi pmy (ympättävää mikrobio)/100 ml.

Vuorokauden jääkaapissa olleesta *E. coli* -kannasta tehtiin kolme laimennossarjaa peptonisuolaliuokseen:

Ensimmäiseen putkeen (laimennos 10^{-1}) laitettiin 390 µl *E. coli* -liuosta ja 9,610 ml peptonivettä. Tämän jälkeen laimennosta jatkettiin normaalisti 10^{-8} :een asti

lisäämällä 9 ml:aan peptonivettä aina 1 ml edellistä laimennosta. Suluissa on pitoisuusviljelyn perusteella laskettu ympätty *E. coli* -bakteerin ja koliformisten bakteerien määrä, joka oli löydettävissä määrityksissä.

- 10^{-7} -laimennoksesta otettiin 1 ml ja lisättiin 99 ml:aan kaivovettä (noin 110 pmy/100 ml).
- 10^{-8} -laimennoksesta otettiin 1 ml ja lisättiin 99 ml:aan kaivovettä (noin 11 pmy/100 ml).

Toinen laimennossarja tehtiin lisäämällä 620 µl *E. coli* -kantaliuosta 9,380 ml peptonivettä. Laimennusta jatkettiin pitoisuuteen 10^{-7} asti.

- 10^{-7} -laimennoksesta otettiin 1 ml ja lisättiin 99 ml:aan kaivovettä (noin 150 pmy/100 ml).

Kolmas laimennossarja tehtiin normaalisti lisäämällä alusta lähtien 1 ml laimennosta ja 9 ml:aan peptonivettä. Laimennossarja tehtiin pitoisuuteen 10^{-9} asti.

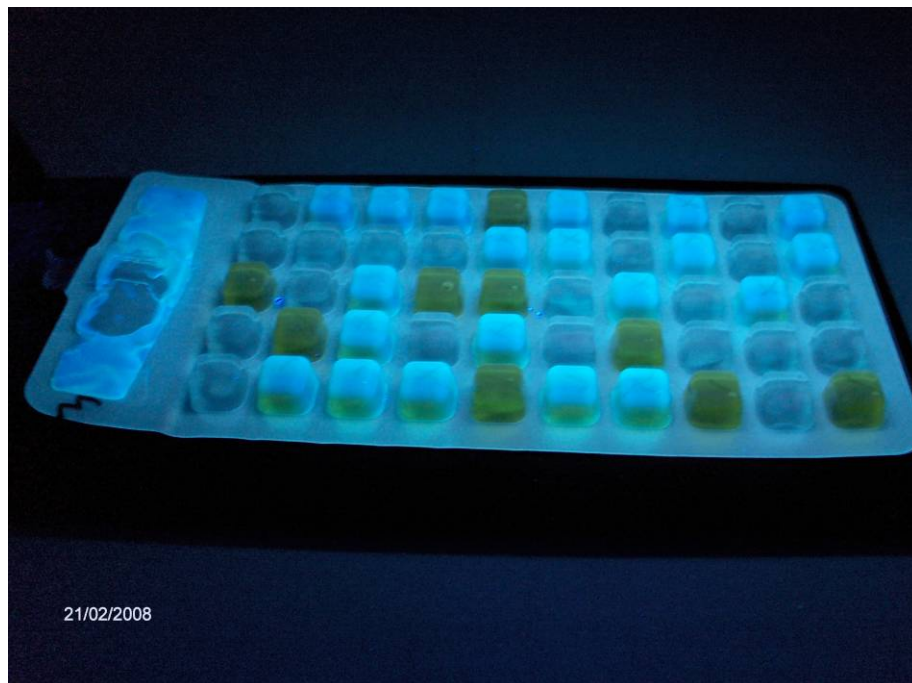
- 10^{-9} -laimennoksesta otettiin 1 ml ja lisättiin 99 ml:aan kaivovettä (noin 2 pmy/100 ml).

Näiden lisäksi tehtiin 0-näyte pelkästä kaivovedestä. Nämä kaikki määritykset toistettiin kolme kertaa sekä LES Endolla että Colilert[®] 51-well -liuskalla .

Steriilin veden sekä kaivovesinäytteen koliformisten bakteerien ja *Escherichia coli* -bakteerin läsnäolo tutkittiin käyttäen 0-näytteitä. Koska ne olivat puhtaita, varmistustestejä ei tarvinnut tehdä.

6.3.2 SLV:n ampulli

Käytettiin juomavesien mikrobiologiseen testaukseen tarkoitettua Svenska Livsmedels Verket -yhtiön valmistamaa referenssiampullia (Dw 2006:A), joka sisältää *Escherichia coli* -bakteerin lisäksi häiritsevää taustamikrobistoa. Ampullin sisältö sekoitettiin 300 ml peptonivettä. Tässä liuoksessa 5 ml sisältää 81 koliformista bakteeria ja 42 *Escherichia coli* -bakteeria (37 °C). Kaksi henkilöä määrittä kolme kertaa 5 ml näytettä Colilertilla[®]. Kuvassa 11 on eräs SLV-ampullin tulosliuska.



Kuva 11 SLV-ampullin tulosten luenta UV-valossa

7 TULOKSET

Esimääritysten ja validointitestien tulokset esitellään tässä luvussa ja liitteessä 1 on esitetty koottuna kaikki eri laimennosten tulokset. Tulokset Colilertille[®] määritettiin käyttämällä MPN-taulukkoa, joka on liitteenä 2. Tuloksista kävi kyseistä taulukkoa tulkitessa hyvin selkeästi ilmi, miten yhden kuopan ero Colilert[®] 51-well -liuskassa saattaa aiheuttaa suurenkin eron todennäköisissä pesäkelukumäärissä.

7.1 Pätevöitymistestien tulokset

Pätevöitymistestien LES Endo -tulokset ovat taulukossa 2.

Taulukko 2 Pätevöitymistestien tulokset

Lukija	pmy/0,1 ml	pmy/1 ml
SP	16	173
	18	177
KA	22	175

Colilertissa[®] isoista kuplista 48/49 oli positiivisia ja pienistä kuplista 9/48. MPN-
taulukosta nähtiin, että näillä arvoilla koliformien määräksi tulee 172,2 mpn/100
ml. Koska UV-valossa kaikki koliformipositiiviset kuplat fluoresoivat, oli niissä
kaikissa *Escherichia coli* -bakteeria. Tällöin myös niiden lukumäärä oli 172,2
mpn/100 ml.

7.2 Esimääritysten tulokset

Kaivoveden esimäärityksissä tehdyn heterotrofien viljelyn (22 °C, kaksi
rinnakkaismääritystä) tuloksena oli, että toisessa maljassa oli 79 pmy/ml ja
toisessa 72 pmy/ml määritettävää vettä. Tämä tarkoittaa, että heterotrofinen
pesäkeluku oli 76 pmy/ml.

Taulukko 3 Pitoisuusviljelyn 190208 tulokset

Pitoisuus	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
Laimennus 1 / pmy	212	29	4
Laimennus 2 / pmy	196	20	5
Laimennus 3 / pmy	202	20	5

Taulukossa 3 ovat steriilin veden pitoisuusviljelyn tulokset. Laskettiin kuvan 2 mukaisella tavalla näytteen mikrobipitoisuus. Laskettiin ensin pitoisuuksien -7 ja -8 eri laimennussarjojen tulokset ja otettiin niistä keskiarvo:

$$\text{Laimennus 1: } \frac{212 + 29}{10^{-7} + 10^{-8}} = 2,4 \cdot 10^9 \text{ pmy/ml}$$

$$\text{Laimennus 2: } \frac{196 + 20}{10^{-7} + 10^{-8}} = 1,96 \cdot 10^9 \text{ pmy/ml}$$

$$\text{Laimennus 3: } \frac{202 + 20}{10^{-7} + 10^{-8}} = 2,0 \cdot 10^9 \text{ pmy/ml}$$

$$\text{Keskiarvo: } \frac{(2,4 + 1,96 + 2,0) \cdot 10^9}{3} = 2,1 \cdot 10^9 \text{ pmy/ml}$$

Tätä arvoa käytettiin eri laimennossarjojen pitoisuuden määrittämiseen validoinnissa.

Taulukko 4 Pitoisuusviljelyn 200208 tulokset

Pitoisuus	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
Laimennus 1 / pmy	249	31	2
Laimennus 2 / pmy	216	25	3
Laimennus 3 / pmy	248	32	5

Taulukossa 4 ovat kaivoveden pitoisuusviljelyn tulokset. Laskettiin näytteen mikrobipitoisuus samalla tavalla kuin steriilille vedelle:

$$\text{Laimennus 1: } \frac{249 + 31}{10^{-7} + 10^{-8}} = 2,54 \cdot 10^9 \text{ pmy/ml}$$

$$\text{Laimennus 2: } \frac{216 + 25}{10^{-7} + 10^{-8}} = 2,2 \cdot 10^9 \text{ pmy/ml}$$

$$\text{Laimennus 3: } \frac{248 + 32}{10^{-7} + 10^{-8}} = 2,54 \cdot 10^9 \text{ pmy/ml}$$

Keskiarvo:
$$\frac{(2,54 + 2,2 + 2,54) \cdot 10^9}{3} = 2,4 \cdot 10^9 \text{ pmy/ml.}$$

Tätä arvoa käytettiin eri laimennossarjojen pitoisuuden määrittämiseen validoinnissa.

7.3 Suhteellinen oikeellisuus

Tulosten vastaavuutta Colilert 51-well -liuskan ja LES Endon välillä selvitetiin määrittämällä samoja näytteitä kummallakin menetelmällä. Kaikki tulokset ovat koottuna liitteessä 6. Saadut tulokset ovat taulukoissa 5 ja 6.

Taulukko 5 Colilert® 51-well ja LES Endo -tulosten yhteneväisyys steriilivesimatriisille, laskuissa käytetyt määritetyt keskiarvot.

lisäystaso / pmy	koliformit ja <i>E. coli</i>	
	51 well	LES Endo
100	137,2	82,2
100	94,9	101,8
100	147,5	96,2
10	11,1	12,0
10	15,0	14,5
10	20,7	10,0
160	147,5	152,7
2	61,4	23,8
2	70,5	22,5
2	19,2	23,0

Taulukko 6 Colilert® 51-well ja LES Endo -tulosten yhteneväisyys kaivovesimatriisille, laskuissa käytetyt määritetyt keskiarvot.

lisäystaso / pmy	koliformit ja <i>E. coli</i>	
	51 well	LES Endo
110	103,5	76,8
110	84,2	84,8
110	101,8	86,2
11	10,5	7,0
11	16,4	6,5
11	6,4	6,5
150	154,9	132,7
150	137,2	142,0
2	2,0	4,0
2	5,3	5,0
2	1,5	4,5

Näiden tulosten perusteella laskettiin tulosparien keskihajonnat. Laskennallisista syistä jätettiin huomioimatta Colilert[®] >200,5 mpn antamat tulokset. Tulokset ovat taulukoissa 7 ja 8.

Taulukko 7 Colilert[®] 51-well ja LES Endo -tulosten keskihajonnat kaivosiematriisille suhteellista oikeellisuutta määritettäessä.

lisäystaso / pmy	koliformit ja <i>E. coli</i> mpn/100 ml				
	Colilert 51well(=A)		LES Endo(=B)		
	mpn/100 ml	mpn/100 ml	logA	logB	(logA-logB) ²
110	103,5	76,8	2,0147305	1,8855497	0,0166877
110	84,2	84,8	1,9250541	1,9285665	0,0000123
110	101,8	86,2	2,0077478	1,9353393	0,0052430
11	10,5	7,0	1,0211893	0,8450980	0,0310081
11	16,4	6,5	1,2148438	0,8129134	0,1615481
11	6,4	6,5	0,8061800	0,8129134	0,0000453
150	154,9	132,7	2,1899112	2,1227618	0,0045090
150	137,2	142,0	2,1371958	2,1522883	0,0002278
2	2,0	4,0	0,3010300	0,6020600	0,0906191
2	5,3	5,0	0,7242759	0,6989700	0,0006404
2	1,5	4,5	0,1760913	0,6532125	0,2276447
			summa	0,5381856	
			summa/2n	0,0244630	
			s=	0,16	

Taulukko 8 Colilert[®] 51-well ja LES Endo -tulosten keskihajonnat steriilivesiematriisille suhteellista oikeellisuutta määritettäessä.

lisäystaso / pmy	koliformit ja <i>E. coli</i> mpn/100 ml steriili vesi				
	Colilert 51-well(=A)		LES Endo(=B)		
	mpn/100 ml	mpn/100 ml	logA	logB	(logA-logB) ²
100	137,2	82,2	2,1371958	1,9146957	0,0495063
100	94,9	101,8	1,9772662	2,0078900	0,0009378
100	147,5	96,2	2,1687920	1,9830246	0,0345095
10	11,1	12,0	1,0453230	1,0791812	0,0011464
10	15,0	14,5	1,1760913	1,1613680	0,0002168
10	20,7	10,0	1,3159703	1,0000000	0,0998373
160	147,5	152,7	2,1687920	2,1837442	0,0002236
2	61,4	23,8	1,7881684	1,3771848	0,1689075
2	70,5	22,5	1,8478810	1,3521825	0,2457170
2	19,2	23,0	1,2833012	1,3617278	0,0061507
			summa	0,6071529	
			summa/2n	0,0303576	
			s=	0,17	

Suhteellista oikeellisuutta selvitettiin myös 0-näytteiden avulla (taulukko 9, liite 7).

Taulukko 9 Kaivovesimatriisiin 0-näytteet 21.2.2008

Näyte	SP viljelemä	KA viljelemä	LES Endo
	Colilert	Colilert	
1	0	0	0
2	0	0	
3	0	0	

7.4 Toistettavuus

Menetelmän toistettavuus määritettiin siten, että kustakin laimennoksesta kaksi ihmistä teki kolme rinnakkaismäärittystä kumpikin. Toistettavuus määritettiin sekä Colilert® 51-well -liuskalla että LES Endolla ja erikseen eri pitoisuudelle. Pitoisuuksia ei voida laskea yhteen, sillä tällöin ei enää ole kyse yhden näytteen toistettavuudesta.

Toistettavuudet laskettiin vain kahdesta pitoisuudesta (steriilillä vedellä 100 ja 10 pmy, ja kaivovedellä 110 ja 11 pmy), sillä kuten luvussa 4.5.1 mainitaan, menetelmää validoitaessa käytetään tavallisesti kahta eri mikrobipitoisuutta. Esimerkkinä tässä on esitetty yhden henkilön LES Endolle ja Colilertille® steriilillä vedellä tekemät määrittelyt ja niiden tulokset pitoisuudessa 100 pmy/100 ml (taulukot 10 ja 11). Kaikki tulokset ovat liitteessä 3.

Taulukko 10 Menetelmän toistettavuus LES Endo, matriisina steriili vesi

SP	Lisäys	koliformit ja <i>E. coli</i>			
		tulos (=A)	log A	logA-logA(ka)=B	B ²
	100	83	1,9190781	-0,056828854	0,00323
	100	101	2,0043214	0,028414427	0,000807
	100	101	2,0043214	0,028414427	0,000807
	ka		1,9759069	summa B ²	0,004844
				summa B ² /n-1	0,002422
				s=	0,05

Taulukko 11 Menetelmän toistettavuus Colilert 51-well, matriisina steriili vesi

SP	Lisäys	koliformit ja <i>E. coli</i>			
		tulos (=A)	log A	logA-logA(ka)=B	B ²
	100	144,5	2,1598678	0,112898147	0,012746
	100	101,3	2,0056094	-0,041360255	0,001711
	100	94,5	1,9754318	-0,071537892	0,005118
		ka	2,0469697	summa B ²	0,019574
				summa B ² /n-1	0,009787
				s=	0,10

Taulukkoon 12 on koottu toistettavuuden keskihajonnat sekä steriilille vedelle että kaivovesille.

Taulukko 12 Toistettavuuden keskihajonnat eri matriiseissa

Lisäys pmy	Steriili vesi			
	LES Endo		Colilert 51-well	
	SP	KA	SP	KA
100	0,05	0,06	0,10	0,18
10	0,16	0,05	0,05	0,14

Lisäys pmy	Kaivovesi			
	LES Endo		Colilert 51-well	
	SP	KA	SP	KA
110	0,02	0,04	0,07	0,05
11	0,10	0,06	0,25	0,17

7.5 Uusittavuus

Menetelmän tulosten uusittavuutta selvitetiin määrittämällä sama pitoisuus kahden eri henkilön toimesta. Taulukossa 13 on esimerkkinä kaivoveden tulokset Colilertille[®]. Kaikki taulukot ja laskutoimitukset on esitetty liitteessä 4.

Taulukko 13 Rinnakkaistulokset kaivovesimatriisille Colilertilla®

lisäystaso / pmy	tekijä	
	S.P.	K.A.
110	118,4	88,5
110	94,5	73,8
110	129,8	73,8
11	11,1	9,9
11	16,4	16,4
11	5,3	7,5
150	>200,5	>200,5
150	165,2	165,2
150	129,8	129,8
2	2	2
2	3,1	3,1
2	2	2

Edellä esitettyjen ja liitteessä 4 olevien tulosten perusteella laskettiin tekijäparin keskihajonnat käyttäen kahta ensimmäistä lisäystasoa (110 ja 11 pmy). Laskennallisista syistä jätettiin Colilertin® antamat >200,5 mpn tulokset huomioimatta. Tulokset ovat taulukossa 14.

Taulukko 14 Uusittavuus: koliformien ja *E. coli* -bakteerin tulosten keskihajonnat

Colilert 51 well

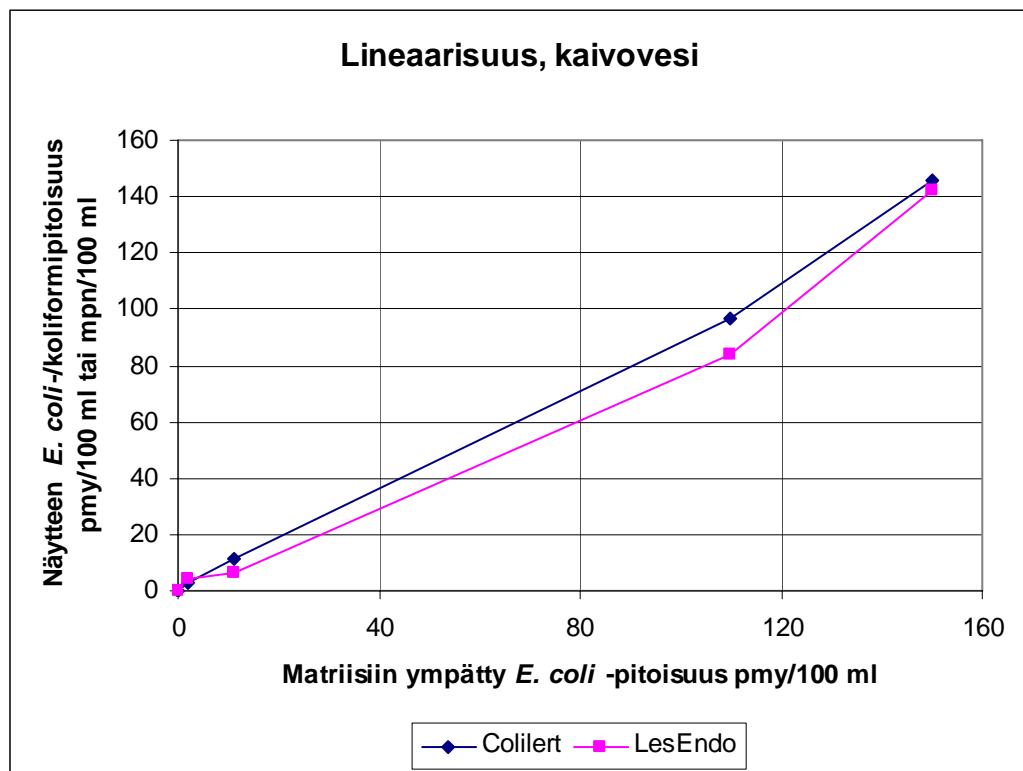
Tekijäpari	ster.vesi	kaivovesi
	keskihajonta	keskihajonta
SP - KA	0,38	0,10

LES Endo

Tekijäpari	ster.vesi	kaivovesi
	keskihajonta	keskihajonta
SP - KA	0,08	0,08

7.6 Lineaarisuus

Menetelmän lineaarisuutta selvitettiin kaivovedelle. Colilertin[®] ja LES Endon tuloksia verrattiin samoilla laimennuksilla keskenään. Kuvassa 12 nähdään lineaarisuus LES Endon ja Colilertin[®] välillä kaivovedelle.



Kuva 12 Menetelmien lineaarisuus kaivovedelle

7.7 Luennan epävarmuus

Luennan epävarmuutta tutkittiin lukemalla samat näytteet kolmen ihmisen toimesta. Näistä tuloksista laskettiin lukijaparien väliset keskihajonnat. Tulokset ovat taulukossa 15. Tarkemmat laskelmat on esitetty liitteessä 5.

Taulukko 15 Luennan epävarmuus eri tekijäparien välillä, keskihajonnat.

Colilert 51-well, SP viljelemä			Colilert 51-well, KA viljelemä		
	ster.vesi	kaivovesi		ster.vesi	kaivovesi
Lukijapari	keskihajonta	keskihajonta	Lukijapari	keskihajonta	keskihajonta
SP - KA	0	0	SP - KA	0	0
KA - JA	0	0	KA - JA	0	0
SP - JA	0	0	SP - JA	0	0

LES Endo, SP viljelemä			LES Endo, KA viljelemä		
	ster.vesi	kaivovesi		ster.vesi	kaivovesi
Lukijapari	keskihajonta	keskihajonta	Lukijapari	keskihajonta	keskihajonta
SP - KA	0	0,01	SP - KA	0	0
KA - JA	0	0	KA - JA	0	0
SP - JA	0	0,01	SP - JA	0,01	0

7.8 Aidot kaivovesinäytteet

Todellisina kaivovesinäytteinä testattiin sekä näytematriisina käytetty kaivovesi että erään laborantin mökkikaivosta haettu näyte. Näistä ei kuitenkaan löytynyt koliformisia bakteereita tai *E. coli* -bakteeria. Tulokset ovat taulukossa 16 (kaikki 0-näytteet koottuna liitteessä 9).

Taulukko 16 Todellinen kaivovesinäyte 26.2.2008, tulokset

Näyte	SP	KA	JA	LES Endo
	Colilert	Colilert	Colilert	
1	0	0	0	0
2	0	0	0	
3	0	0	0	

Tarkasteltiin myös muita laboratorioon tulleita todellisia näytteitä (taulukko 17). Tuloksia ei kuitenkaan hyödynnetty laskuissa niiden vähäisen tietomäärän vuoksi.

Taulukko 17 Laboratorioon saapuneita näytteitä

Todelliset näytteet, koliformit			Todelliset näytteet, <i>E. coli</i>		
Näyte	Colilert	LES Endo	Näyte	Colilert	LES Endo
	mpn /100 ml	pmy /100ml		mpn /100 ml	pmy /100 ml
Siikama	0	0	Siikama	0	0
FIV2066	5	7	FIV2066	3	5
FIV2067	5	6	FIV2067	0	0
FIV2090	22	20	FIV2068	0	0
			FIV2090	0	0

7.9 SLV:n ampulli

Oikeellisuutta määritettiin vertaamalla SLV:n ampullilla saatuja tuloksia siihen koliformien ja *E. coli* -bakteerin määrään, jonka valmistaja on ilmoittanut näytteen sisältävän. Oikeellisuuden keskihajontojen tulokset ovat koottuna taulukossa 18 ja laskennat on käsitelty liitteessä 8.

Taulukko 18 Validoitavan menetelmän oikeellisuuden määrittäminen Colilertilla[®], keskihajonnat.

Oikeellisuus		
Lukija	koliformit	<i>E. coli</i>
SP	0,14	0,10
KA	0,10	0,07

SLV:n ampullilla määritettiin myös menetelmän toistettavuus (liite 7). Tulokset ovat koottuna taulukossa 19.

Taulukko 19 SLV-ampullin toistettavuus Colilertilla[®], keskihajonnat

Toistettavuus		
Lukija	koliformit	<i>E. coli</i>
SP	0,05	0,01
KA	0,05	0,07

8 POHDINTAA

Pätevytyminen

Varmistustestien tulokseksi saatiin, että kaikki pätevytymistesteissä tutkitut pesäkkeet I–V olivat oksidaasi-negatiivisia ja indolipositiivisia (muodostivat purppuran värisen renkaan liuoksen pinnalle) eli sisälsivät *Escherichia coli* -bakteeria kuten pitikin. Colilertin[®] tuloksista nähtiin, että ne osuivat hyvin samoihin lukemiin kuin kalvosuodatusmenetelmällä saadut tulokset. Lisäksi omat määritykseni kävivät yksiin laborantin tulosten kanssa.

Esimääritykset

Kaivoveden heterotofinen pesäkeluku oli 76 pmy/ml eli noin 7 600 pmy/100 ml näytettä.

Suhteellinen oikeellisuus

Vastaavuus tulosten välillä on hyväksyttävä eli menetelmällä ei ole eroa, mikäli tulosten keskihajonta (s) on alle 0,25. Validointimääritysten tulosten vastaavuus sekä kaivovedelle että steriilille vedelle oli hyväksyttävä. Korkeimman keskihajonnan 0,17 perusteella menetelmän suhteellisen oikeellisuuden virheeksi määritettiin ± 17 %. Suhteellinen oikeellisuus oli sekä steriilille vedelle että kaivovedelle hyvä, sillä kumpikaan ei antanut virhepositiivisia tuloksia. Lisäksi validoitavan menetelmän tulokset olivat yhteneviä referenssimenetelmän tulosten kanssa.

Toistettavuus

Menetelmän toistettavuus on hyväksyttävä, mikäli keskihajonta on alle 0,15. Toistettavuuden tuloksia tarkasteltaessa nähtiin, että kaivovesillä hyväksyttävä raja 0,15 ylittyi Colilertia[®] käytettäessä. Tämä oli kuitenkin selitettävissä näin pienissä pitoisuuksissa laimennosten epävarmuudella ja hiukkastilastollisella hajonnalla. Korkeimman keskihajonnan 0,25 perusteella menetelmän toistettavuuden virheeksi todettiin ± 25 %. SLV-ampullin tuloksia tarkasteltaessa nähtiin, että menetelmän toistettavuus Colilertilla[®] oli hyvä sekä koliformeille että *E. coli* -bakteerille.

Uusittavuus

Vastaavuus Colilert[®] 51-well -liuskan ja referenssimenetelmän välillä on hyväksyttävä, mikäli tulosten keskihajonta (s) on alle 0,25. Tuloksista nähtiin, että menetelmän uusittavuus oli hyvä sekä LES Endolla että Colilertilla[®] kaivovedessä. Steriilillä vedellä raja ylittyi, mutta tämä ei ollut olennaista, koska menetelmää validoitiin kaivovesille, ei steriilille vedelle. Menetelmän uusittavuuden epävarmuudeksi saatiin korkeimman hyväksyttävän keskihajonnan mukaan ± 10 %.

Spesifisyys

Näytematriisina käytettiin todellista kaivovettä, jolloin näytteet sisälsivät tyypillisiä häiritseviä mikrobeja. Menetelmä antoi hyväksyttävät tulokset häiritsevistä mikrobeista huolimatta, joten menetelmän spesifisyys oli hyvä.

Lineaarisuus

Kaivoveden tapauksessa menetelmän lineaarisuus oli hyvä ja Colilertin[®] tulokset olivat yhteneviä kalvosuodatusmenetelmän kanssa varsinkin pienillä pitoisuuksilla, mikä on tärkeää kaivovesiä tutkittaessa.

Luennan epävarmuus

Luennan toistettavuuden suurimmaksi keskihajonnaksi tekijäparien välillä todettiin Colilertilla[®] 0,00, joten luennan epävarmuudeksi saatiin ± 0 %, mikä oli hyväksyttävä tulos. LES Endoa luettaessa tekijäparien välillä esiintyi ± 1 %:n hajonta.

SLV:n referenssiampulli

UV-valossa Colilert[®]-liuskaa tarkasteltaessa huomattiin, kuinka ne kuopat, jotka osoittivat koliformisia bakteereita eivät välttämättä olleet samoja, jotka osoittivat *Escherichia coli* -bakteerin.

Saatujen tulosten perusteella voitiin todeta, että menetelmän oikeellisuus SLV:n ampullia käytettäessä oli hyvä.

9 YHTEENVETO

Menetelmän uusittavuuden epävarmuudeksi saatiin $\pm 10 \%$, mikä on hyvä tulos.

Colilert[®] Quanti-Tray -menetelmän toistettavuuden epävarmuudeksi määritettiin $\pm 25 \%$.

Menetelmän spesifisyyden, lineaarisuuden ja oikeellisuuden todettiin olevan hyväksyttävät.

Verrattaessa referenssimenetelmää ja Colilert[®] 51-well -liuskaa keskenään, saadaan menetelmän suhteellisen oikeellisuuden virheeksi $\pm 17 \%$, joka on hyväksyttävä. Lisäksi tämä tarkoittaa, ettei vertailtavien menetelmien välillä ole merkittävää eroa (keskihajonta alle 0,25).

Luennan epävarmuudeksi määritettiin Colilertilla[®] $\pm 0 \%$.

Näiden tulosten perusteella menetelmän todettiin täyttävän laboratorion laatuvaatimukset, ja laboratorio osoitti olevansa pätevä käyttämään kyseistä menetelmää. Menetelmä voitiin siksi ottaa käyttöön kaivovesimatriisille.

LÄHTEET

Painetut lähteet

- 1 Brock, Thomas D. – Madigan, Michael T. . Biology of microorganisms. 6th Edition. Prentice-Hall International Editions 1991, 879 s. ISBN 0-13-086604-0
- 2 Madigan, Michael T. – Martinko, John M. – Parker, Jack. Brock Biology of microorganisms. 9th Edition. Prentice-Hall International Editions 2000. Upper Saddle River NJ. 986 s.
- 3 Madigan, Michael T. – Martinko, John M. Brock Biology of microorganisms. 11th Edition. Prentice-Hall International Editions 2006. Upper Saddle River NJ. 992 s. ISBN 0-13-196893-9
- 4 Heino, Jyrki – Vuento, Matti. Biokemian ja solubiologian perusteet. 1. painos, WSOY Oppimateriaalit Oy 2007. 349 s. ISBN 978-951-0-32563-6
- 5 Lehtonen, Juhani – Lemmetyinen, Risto – Pihakaski, Seppo – Portin, Petter – Tirri, Rauno. Biologian sanakirja. Uudistetun laitoksen 2. painos. Otava 2003. 888 s. ISBN 951-1-17618-8
- 6 Colilert[®]-18 käyttöohje. Laboratorion oma ohje.
- 7 Laatuksikirja. Lantmännen Analycen Oy. Versio 4.5. 9.3.2007
- 8 Tiilikainen, Anja S. – Vaara, Martti – Vaheri, Antti (toim.). Lääketieteellinen mikrobiologia. 7., uudistettu painos. Duodecim. Vammalan Kirjapaino 1996. 768 s. ISBN 951-8917-74-4
- 9 Salkinoja-Salonen, Mirja. Mikrobiologian perusteita. Gummerus Kirjapaino Oy. Jyväskylä 2002. 760 s. ISBN 951-45-9502-5
- 10 Mikrobiologisten menetelmien validointiohje. Valvonta 13/1997. Elintarvikevirasto. Helsinki 1997. 12 s. + liitteet. ISBN 951-732-068-X
- 11 Sosiaali- ja terveysministeriön asetus pienten yksiköiden talousveden laatuvaatimuksista ja valvontatutkimuksista 17.5.2001/401
- 12 Soveltamisopas talousvesiasetukseen 461/2000. Sosiaali- ja terveysministeriön asetus 461/2000 talousveden laatuvaatimuksista ja valvontatutkimuksista. Vesi- ja viemärlaitosyhdistys. Suomen Kuntaliitto. Helsinki 2000. 37 s. +liitteet. ISBN 952-5000-26-5

- 13 SFS 3016. Veden laatu. Koliformisten bakteerien kokonais-määrän määrittäminen kalvosuodatusmenetelmällä. Suomen Standardoimisliitto SFS ry 2001. 8s.
- 14 SFS-EN ISO 6222. Veden laatu. Viljeltävien mikro-organismien lukumäärän laskeminen. Pesäkelasku siirrostamalla agar-ravintoalustaan. Suomen Standardoimisliitto SFS ry. 1999.12 s.
- 15 SFS-EN ISO 9308-1. Veden laatu. *Escherichia coli* ja koliformisten bakteerien toteaminen ja laskeminen. Osa 1: kalvosuodatusmenetelmä. Suomen Standardoimisliitto SFS ry. 2001. 26 s.
- 16 SFS-käsikirja 94. Mikrobiologiset vesitutkimusmenetelmät 2003. 3. uudistettu painos. Suomen Standardoimisliitto SFS ry. 2003. 415 s. ISBN 952-5420-15-9

Sähköiset lähteet

- 17 Colilert[®]-18 Brochure. [sähköinen dokumentti]. [viitattu 12.2.2008]
Saatavissa: <http://www.idexx.com/water/refs/096059904.pdf>
- 18 Eurofins. [www-sivu]. [viitattu 31.1.2008]
Saatavissa: <http://www.eurofins.com>
- 19 Hämeen ammattikorkeakoulu. Mikrobiologisia työmenetelmiä. [www-sivu]. [viitattu 1.2.2008]
Saatavissa: http://elearningcentre.hamk.fi/tyomenetelmat/kuvat/gramE_coli.jpg
- 20 Lantmännen Analycen Oy. [www-sivu]. [viitattu 13.2.2008]
Saatavissa: <http://www.analycen.fi>
- 21 MicrobiologyBytes. Escherichia coli. [www-sivu]. [viitattu 31.1.2008]
Saatavissa: <http://www.microbiologybytes.com/video/Ecoli.htm>
- 22 Mikrobiologiset määritykset. [www-sivu]. [viitattu 29.1.2008]. [päivitetty 18.7.2006]
Saatavissa: <http://www.ymparisto.fi/default.asp?contentid=193408&lan=fi>
- 23 Quanti-Tray[®] Procedure. [sähköinen dokumentti]. [viitattu 12.2.2008]
Saatavissa: <http://www.idexx.com/water/refs/060203009.pdf>
- 24 Quanti-Tray[®], Quanti-Tray/2000[®], Quanti-Tray[®] Sealer Brochure. [sähköinen dokumentti]. [viitattu 12.2.2008]
Saatavissa: <http://www.idexx.com/water/refs/09639110L.pdf>

- 25 Quanti-Tray[®] vs. Membrane Filtration. [sähköinen dokumentti].
[viitattu 12.2.2008]
Saatavissa: <http://www.idexx.com/water/refs/096064102.pdf>

Kohta	Lisäys pmy	LES Endo (SP viljelemä)			LES Endo (KA viljelemä)			Colilert (SP viljelemä)			Colilert (KA viljelemä)		
		SP	KA	JA	SP	KA	JA	SP	KA	JA	SP	KA	JA
1	100	83	85	84	80	81	80	144,5	144,5	144,5	129,8	129,8	129,8
	100	101	99	98	105	105	103	101,3	101,3	101,3	88,5	88,5	88,5
	100	101	102	100	94	91	89	94,5	94,5	94,5	200,5	200,5	200,5
	10	12	12	12	12	12	12	88,5	88,5	88,5	11,1	11,1	11,1
	10	14	14	14	15	15	15	78,2	78,2	78,2	15	15	15
2	10	7	7	7	13	13	13	69,7	69,7	69,7	20,7	20,7	20,7
	160	164	161	162	160	160	158	>200,5	>200,5	>200,5	>200,5	>200,5	>200,5
	160	170	169	167	152	145	145	129,8	129,8	129,8	>200,5	>200,5	>200,5
	160	149	150	152	158	154	153	165,2	165,2	165,2	129,8	129,8	129,8
	3	2	15	15	15	34	32	32	109,1	109,1	109,1	13,7	13,7
	2	20	20	20	25	25	25	129,8	129,8	129,8	11,1	11,1	11,1
	2	28	28	28	18	18	18	165,2	165,2	165,2	<i>kolif. 20,7 e. coli 19,2</i>	19,2	19,2

*ei voi käyttää
jätetään pois
laskuista*

Ympin pitoisuus

Malja	-7	-8	-9
1	212	29	4
2	196	20	5
3	202	20	5
ka	203	23	5

0-näytteet

	LES Endo	Colilert
1	0	0
2	0	0
3	0	0

Kohta	Lisäys pmy	LES Endo (SP viljelemä)			LES Endo (KA viljelemä)			Colilert (SP viljelemä)			Colilert (KA viljelemä)		
		SP	KA	JA	SP	KA	JA	SP	KA	JA	SP	KA	JA
1	110	84	82	82	71	71	71	118,4	118,4	118,4	88,5	88,5	88,5
	110	91	87	87	83	81	80	94,5	94,5	94,5	73,8	73,8	73,8
	110	90	84	84	86	87	86	129,8	129,8	129,8	73,8	73,8	73,8
	11	8	8	8	6	6	6	11,1	11,1	11,1	9,9	9,9	9,9
	11	6	6	6	7	7	7	16,4	16,4	16,4	16,4	16,4	16,4
	11	5	5	5	8	8	8	5,3	5,3	5,3	7,5	7,5	7,5
2	150	162	159	159	148	147	145	>200,5	>200,5	>200,5	144,5	144,5	144,5
	150	137	133	135	129	127	129	165,2	165,2	165,2	144,5	144,5	144,5
	150	156	156	158	129	124	124	129,8	129,8	129,8	144,5	144,5	144,5
3	2	2	2	2	6	6	6	2	2	2	2	2	2
	2	4	4	4	6	6	6	3,1	3,1	3,1	7,5	7,5	7,5
	2	7	7	7	2	2	2	2	2	2	1	1	1

ei voida käyttää

Ympin pitoisuus

Malja	-7	-8	-9
1	249	31	2
2	216	25	3
3	248	32	5
ka	238	29	3

0-näytteet

	LES Endo	Colilert
1	0	0
2	0	0
3	0	0

51-Well Quanti-Tray MPN Table

No. of wells giving positive reaction per 100 ml sample	Most Probable Number	95% Confidence Limits Lower	Upper
0	<1	0.0	3.7
1	1.0	0.3	5.6
2	2.0	0.6	7.3
3	3.1	1.1	9.0
4	4.2	1.7	10.7
5	5.3	2.3	12.3
6	6.4	3.0	13.9
7	7.5	3.7	15.5
8	8.7	4.5	17.1
9	9.9	5.3	18.8
10	11.1	6.1	20.5
11	12.4	7.0	22.1
12	13.7	7.9	23.9
13	15.0	8.8	25.7
14	16.4	9.8	27.5
15	17.8	10.8	29.4
16	19.2	11.9	31.3
17	20.7	13.0	33.3
18	22.2	14.1	35.2
19	23.8	15.3	37.3
20	25.4	16.5	39.4
21	27.1	17.7	41.6
22	28.8	19.0	43.9
23	30.6	20.4	46.3
24	32.4	21.8	48.7
25	34.4	23.3	51.2
26	36.4	24.7	53.9
27	38.4	26.4	56.6
28	40.6	28.0	59.5
29	42.9	29.7	62.5
30	45.3	31.5	65.6
31	47.8	33.4	69.0
32	50.4	35.4	72.5
33	53.1	37.5	76.2
34	56.0	39.7	80.1
35	59.1	42.0	84.4
36	62.4	44.6	88.8
37	65.9	47.2	93.7
38	69.7	50.0	99.0
39	73.8	53.1	104.8
40	78.2	56.4	111.2
41	83.1	59.9	118.3
42	88.5	63.9	126.2
43	94.5	68.2	135.4
44	101.3	73.1	146.0
45	109.1	78.6	158.7
46	118.4	85.0	174.5
47	129.8	92.7	195.0
48	144.5	102.3	224.1
49	165.2	115.2	272.2
50	200.5	135.8	387.6
51	> 200.5	146.1	Infinite

Tekijäkohtaiset toistettavuudet, LES Endo, steriili vesi

SP	Lisäys	koliformit ja <i>E. coli</i>			
		tulos (=A)	log A	logA- logA(ka)=B	B ²
	100	83	1,9190781	-0,056828854	0,00323
	100	101	2,0043214	0,028414427	0,000807
	100	101	2,0043214	0,028414427	0,000807
	ka	1,9759069	summa B ²	0,004844	
			summa B ² /n-1	0,002422	
			s=	0,05	

KA	Lisäys	koliformit ja <i>E. coli</i>			
		tulos (=A)	log A	logA- logA(ka)=B	B ²
	100	81	1,908485	-0,054420218	0,002962
	100	105	2,0211893	0,058284062	0,003397
	100	91	1,9590414	-0,003863844	1,49E-05
	ka	1,9629052	summa B ²	0,006374	
			summa B ² /n-1	0,003187	
			s=	0,06	

SP	Lisäys	koliformit ja <i>E. coli</i>			
		tulos (=A)	log A	logA- logA(ka)=B	B ²
	10	12	1,079181	0,0557121	0,00310384
	10	14	1,146128	0,1226589	0,01504521
	10	7	0,845098	-0,178371	0,03181624
	ka	1,023469	summa B ²	0,04996529	
			summa B ² /n-1	0,02498265	
			s=	0,16	

KA	Lisäys	koliformit ja <i>E. coli</i>			
		tulos (=A)	log A	logA- logA(ka)=B	B ²
	10	12	1,079181	-0,043891	0,00192639
	10	15	1,176091	0,0530193	0,00281105
	10	13	1,113943	-0,009129	8,3331E-05
	ka	1,123072	summa B ²	0,00482077	
			summa B ² /n-1	0,00241039	
			s=	0,05	

Tekijäkohtaiset toistettavuudet, Colilert 51-well, steriili vesi

SP	Lisäys	koliformit ja <i>E. coli</i>			
		tulos (=A)	log A	logA-logA(ka)=B	B ²
	100	144,5	2,1598678	0,112898147	0,012746
	100	101,3	2,0056094	-0,041360255	0,001711
	100	94,5	1,9754318	-0,071537892	0,005118
	ka		2,0469697	summa B ²	0,019574
				summa B ² /n-1	0,009787
				s=	0,10

KA	Lisäys	koliformit ja <i>E. coli</i>			
		tulos (=A)	log A	logA-logA(ka)=B	B ²
	100	129,8	2,1132747	-0,007502754	5,63E-05
	100	88,5	1,9469433	-0,173834176	0,030218
	100	200,5	2,3021144	0,18133693	0,032883
	ka		2,1207774	summa B ²	0,063158
				summa B ² /n-1	0,031579
				s=	0,18

SP	Lisäys	koliformit ja <i>E. coli</i>			
		tulos (=A)	log A	logA-logA(ka)=B	B ²
	10	88,5	1,946943	0,0524823	0,0027544
	10	78,2	1,893207	-0,001254	1,573E-06
	10	69,7	1,843233	-0,051228	0,00262432
	ka		1,894461	summa B ²	0,00538029
				summa B ² /n-1	0,00269015
				s=	0,05

KA	Lisäys	koliformit ja <i>E. coli</i>			
		tulos (=A)	log A	logA-logA(ka)=B	B ²
	10	11,1	1,045323	-0,133805	0,01790384
	10	15	1,176091	-0,003037	9,223E-06
	10	20,7	1,31597	0,1368422	0,01872577
	ka		1,179128	summa B ²	0,03663883
				summa B ² /n-1	0,01831942
				s=	0,14

Tekijäkohtaiset toistettavuudet, Colilert 51-well, kaivosvesi

SP	Lisäys	koliformit ja <i>E. coli</i>			
		tulos (=A)	log A	logA-logA(ka)=B	B ²
	110	118,4	2,073352	0,019332301	0,000373738
	110	94,5	1,975432	-0,078587593	0,00617601
	110	129,8	2,113275	0,059255291	0,00351119
	ka	2,054019	summa B ²	0,010060937	
			summa B ² /n-1	0,005030469	
			s=	0,07	

KA	Lisäys	koliformit ja <i>E. coli</i>			
		tulos (=A)	log A	logA-logA(ka)=B	B ²
	110	88,5	1,946943	0,052591273	0,002765842
	110	73,8	1,868056	-0,026295636	0,00069146
	110	73,8	1,868056	-0,026295636	0,00069146
	ka	1,894352	summa B ²	0,004148763	
			summa B ² /n-1	0,002074381	
			s=	0,05	

SP	Lisäys	koliformit ja <i>E. coli</i>			
		tulos (=A)	log A	logA-logA(ka)=B	B ²
	11	11,1	1,045323	0,050508747	0,002551
	11	16,4	1,214844	0,220029616	0,048413
	11	5,3	0,724276	-0,270538363	0,073191
	ka	0,994814	summa B ²	0,124155	
			summa B ² /n-1	0,062078	
			s=	0,25	

KA	Lisäys	koliformit ja <i>E. coli</i>			
		tulos (=A)	log A	logA-logA(ka)=B	B ²
	11	9,9	0,995635	-0,032878241	0,001081
	11	16,4	1,214844	0,186330413	0,034719
	11	7,5	0,875061	-0,153452172	0,023548
	ka	1,028513	summa B ²	0,059348	
			summa B ² /n-1	0,029674	
			s=	0,17	

Tekijäkohtaiset toistettavuudet, LES Endo, kaivosvesi

SP	Lisäys	koliformit ja <i>E. coli</i>			
		tulos (=A)	log A	logA-logA(ka)=B	B ²
	110	84	1,924279	-0,02157511	0,000465485
	110	91	1,959041	0,013186996	0,000173897
	110	90	1,954243	0,008388113	7,03604E-05
	ka	1,945854	summa B ²	0,000709743	
			summa B ² /n-1	0,000354871	
			s=	0,02	

KA	Lisäys	koliformit ja <i>E. coli</i>			
		tulos (=A)	log A	logA-logA(ka)=B	B ²
	110	71	1,851258	-0,048495858	0,002351848
	110	81	1,908485	0,008730812	7,62271E-05
	110	87	1,939519	0,039765046	0,001581259
	ka	1,899754	summa B ²	0,004009334	
			summa B ² /n-1	0,002004667	
			s=	0,04	

SP	Lisäys	koliformit ja <i>E. coli</i>			
		tulos (=A)	log A	logA-logA(ka)=B	B ²
	11	8	0,90309	0,10968624	0,012031
	11	6	0,778151	-0,015252497	0,000233
	11	5	0,69897	-0,094433743	0,008918
	ka	0,793404	summa B ²	0,021181	
			summa B ² /n-1	0,010591	
			s=	0,10	

KA	Lisäys	koliformit ja <i>E. coli</i>			
		tulos (=A)	log A	logA-logA(ka)=B	B ²
	11	6	0,778151	-0,063961842	0,004091
	11	7	0,845098	0,002984948	8,91E-06
	11	8	0,90309	0,060976895	0,003718
	ka	0,842113	summa B ²	0,007818	
			summa B ² /n-1	0,003909	
			s=	0,06	

UUSITTAVUUS, tulokset

Uusittavuus. **Colilert 51-well**, ster.vesi

lisäystaso pmy	tekijä	
	S.P.	K.A.
100	144,5	129,8
100	101,3	88,5
100	94,5	200,5
10	88,5	11,1
10	78,2	15
10	69,7	20,7
160	>200,5	>200,5
160	>200,5	>200,5
160	129,8	129,8
2	13,7	13,7
2	11,1	11,1
2	19,2	19,2

ei huomioida

Uusittavuus. **Colilert 51-well**, kaivovesi

lisäystaso pmy	tekijä	
	S.P.	K.A.
110	118,4	88,5
110	94,5	73,8
110	129,8	73,8
11	11,1	9,9
11	16,4	16,4
11	5,3	7,5
150	>200,5	>200,5
150	165,2	165,2
150	129,8	129,8
2	2	2
2	3,1	3,1
2	2	2

ei huomioida

Uusittavuus. **LES Endo**, ster.vesi

lisäystaso pmy	tekijä	
	S.P.	K.A.
100	83	81
100	101	105
100	101	91
10	12	12
10	14	15
10	7	13
160	164	160
160	170	145
160	149	154
2	15	32
2	20	25
2	28	18

Uusittavuus. **LES Endo**, kaivovesi

lisäystaso pmy	tekijä	
	S.P.	K.A.
110	84	71
110	91	81
110	90	87
11	8	6
11	6	7
11	5	8
150	162	147
150	137	127
150	156	124
2	2	6
2	4	6
2	7	2

Parittaisten tulosten keskihajonta. Colilert 51-well, ster.vesi

tekijä				
S.P. (=A)	K.A. (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
144,5	129,8	2,1598678	2,1132747	0,0021709
101,3	88,5	2,0056094	1,9469433	0,0034417
94,5	200,5	1,9754318	2,3021144	0,1067215
88,5	11,1	1,9469433	1,0453230	0,8129192
78,2	15	1,8932068	1,1760913	0,5142546
69,7	20,7	1,8432328	1,3159703	0,2780057
		summa	1,7175136	
		summa/2n	0,1431261	
		s=	0,38	

Parittaisten tulosten keskihajonta. LES Endo, ster.vesi

tekijä				
S.P. (=A)	K.A. (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
83	81	1,9190781	1,9084850	0,0001122
101	105	2,0043214	2,0211893	0,0002845
101	91	2,0043214	1,9590414	0,0020503
12	12	1,0791812	1,0791812	0
14	15	1,1461280	1,1760913	0,0008978
7	13	0,8450980	1,1139434	0,0722778
		summa	0,0756226	
		summa/2n	0,0063019	
		s=	0,08	

Parittaisten tulosten keskihajonta. Colilert 51-well, kaivovesi

tekijä				
S.P. (=A)	K.A. (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
118,4	88,5	2,0733517	1,9469433	0,015979092
94,5	73,8	1,9754318	1,8680564	0,011529487
129,8	73,8	2,1132747	1,8680564	0,06013203
11,1	9,9	1,0453230	0,9956352	0,002468876
16,4	16,4	1,2148438	1,2148438	0,0000000
5,3	7,5	0,7242759	0,8750613	0,022736235
		summa	0,112845719	
		summa/2n	0,00940381	
		s=	0,10	

Parittaisten tulosten keskihajonta. LES Endo, kaivovesi

tekijä				
S.P. (=A)	K.A. (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
84	71	1,9242793	1,8512583	0,0053321
91	81	1,9590414	1,9084850	0,0025559
90	87	1,9542425	1,9395193	0,0002168
8	6	0,9030900	0,7781513	0,0156097
6	7	0,7781513	0,8450980	0,0044819
5	8	0,6989700	0,9030900	0,041665
		summa	0,0698613	
		summa/2n	0,0058218	
		s=	0,08	

Luennan epävarmuus

Colilert 51-well, stervesi, KA viljelemä

lisäystaso pmy	lukija		
	S.P.	K.A.	JA
100	129,8	129,8	129,8
100	88,5	88,5	88,5
100	200,5	200,5	200,5
10	11,1	11,1	11,1
10	15	15	15
10	20,7	20,7	20,7
160	>200,5	>200,5	>200,5
160	>200,5	>200,5	>200,5
160	129,8	129,8	129,8
2	13,7	13,7	13,7
2	11,1	11,1	11,1
2	19,2	19,2	19,2

ei huomioida

Colilert 51-well, kaivovesi, KA viljelemä

lisäystaso pmy	lukija		
	S.P.	K.A.	JA
110	88,5	88,5	88,5
110	73,8	73,8	73,8
110	73,8	73,8	73,8
11	9,9	9,9	9,9
11	16,4	16,4	16,4
11	7,5	7,5	7,5
150	144,5	144,5	144,5
150	144,5	144,5	144,5
150	144,5	144,5	144,5
2	2	2	2
2	7,5	7,5	7,5
2	1	1	1

ei huomioida

Colilert 51-well, stervesi, SP viljelemä

lisäystaso pmy	lukija		
	S.P.	K.A.	JA
100	144,5	144,5	144,5
100	101,3	101,3	101,3
100	94,5	94,5	94,5
10	88,5	88,5	88,5
10	78,2	78,2	78,2
10	69,7	69,7	69,7
160	>200,5	>200,5	>200,5
160	129,8	129,8	129,8
160	165,2	165,2	165,2
2	109,1	109,1	109,1
2	129,8	129,8	129,8
2	165,2	165,2	165,2

ei huomioida

Colilert 51-well, kaivovesi, SP viljelemä

lisäystaso pmy	lukija		
	S.P.	K.A.	JA
110	118,4	118,4	118,4
110	94,5	94,5	94,5
110	129,8	129,8	129,8
11	11,1	11,1	11,1
11	16,4	16,4	16,4
11	5,3	5,3	5,3
150	>200,5	>200,5	>200,5
150	165,2	165,2	165,2
150	129,8	129,8	129,8
2	2	2	2
2	3,1	3,1	3,1
2	2	2	2

LES Endo, ster.vesi, SP viljelemä

lisäystaso pmy	lukija		
	S.P.	K.A.	JA
100	83	85	84
100	101	99	98
100	101	102	100
10	12	12	12
10	14	14	14
10	7	7	7
160	164	161	162
160	170	169	167
160	149	150	152
2	15	15	15
2	20	20	20
2	28	28	28

LES Endo, kaivovesi, SP viljelemä

lisäystaso pmy	lukija		
	S.P.	K.A.	JA
110	84	82	82
110	91	87	87
110	90	84	84
11	8	8	8
11	6	6	6
11	5	5	5
150	162	159	159
150	137	133	135
150	156	156	158
2	2	2	2
2	4	4	4
2	7	7	7

LES Endo, ster.vesi, KA viljelemä

lisäystaso pmy	lukija		
	S.P.	K.A.	JA
100	80	81	80
100	105	105	103
100	94	91	89
10	12	12	12
10	15	15	15
10	13	13	13
160	160	160	158
160	152	145	145
160	158	154	153
2	34	32	32
2	25	25	25
2	18	18	18

LES Endo, kaivovesi, KA viljelemä

lisäystaso pmy	lukija		
	S.P.	K.A.	JA
110	71	71	71
110	83	81	80
110	86	87	86
11	6	6	6
11	7	7	7
11	8	8	8
150	148	147	145
150	129	127	129
150	129	124	124
2	6	6	6
2	6	6	6
2	2	2	2

Parittaisten tulosten keskihajonta. Colilert 51-well, ster.vesi, KA viljelemä

Tulokset mpn/100 ml.

tekijä				
S.P. (=A)	K.A. (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
129,8	129,8	2,1132747	2,1132747	0,00
88,5	88,5	1,9469433	1,9469433	0,00
200,5	200,5	2,3021144	2,3021144	0,00
11,1	11,1	1,0453230	1,0453230	0,00
15	15	1,1760913	1,1760913	0,00
20,7	20,7	1,3159703	1,3159703	0,00
summa				0,00
summa/2n				0,00
s=				0,00

tekijä				
K.A.(=A)	J.A. (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
129,8	129,8	2,1132747	2,1132747	0,0
88,5	88,5	1,9469433	1,9469433	0,0
200,5	200,5	2,3021144	2,3021144	0,0
11,1	11,1	1,0453230	1,0453230	0,0
15	15	1,1760913	1,1760913	0,0
20,7	20,7	1,3159703	1,3159703	0,0
summa				0,0
summa/2n				0,0
s=				0,00

tekijä				
S.P. (=A)	J.A. (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
129,8	129,8	2,1132747	2,1132747	0,00
88,5	88,5	1,9469433	1,9469433	0,00
200,5	200,5	2,3021144	2,3021144	0,00
11,1	11,1	1,0453230	1,0453230	0,00
15	15	1,1760913	1,1760913	0,00
20,7	20,7	1,3159703	1,3159703	0,00
summa				0,00
summa/2n				0,0000000
s=				0,00

Parittaisten tulosten keskihajonta. Colilert 51-well, kaivovesi, KA viljelemä

Tulokset mpn/100 ml.

tekijä				
S.P. (=A)	K.A. (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
88,5	88,5	1,9469433	1,9469433	0
73,8	73,8	1,8680564	1,8680564	0
73,8	73,8	1,8680564	1,8680564	0
9,9	9,9	0,9956352	0,9956352	0
16,4	16,4	1,2148438	1,2148438	0,0000000
7,5	7,5	0,8750613	0,8750613	0

summa 0
 summa/2n 0
s= 0,00

tekijä				
K.A. (=A)	J.A. (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
88,5	88,5	1,9469433	1,9469433	0,000
73,8	73,8	1,8680564	1,8680564	0,000
73,8	73,8	1,8680564	1,8680564	0,000
9,9	9,9	0,9956352	0,9956352	0,000
16,4	16,4	1,2148438	1,2148438	0,000
7,5	7,5	0,8750613	0,8750613	0,000

summa 0,000
 summa/2n 0,000
s= 0,00

tekijä				
S.P. (=A)	J.A. (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
88,5	88,5	1,9469433	1,9469433	0
73,8	73,8	1,8680564	1,8680564	0
73,8	73,8	1,8680564	1,8680564	0
9,9	9,9	0,9956352	0,9956352	0
16,4	16,4	1,2148438	1,2148438	0
7,5	7,5	0,8750613	0,8750613	0

summa 0
 summa/2n 0
s= 0,00

Parittaisten tulosten keskihajonta. Colilert 51-well, ster.vesi, SP viljelemä

Tulokset mpn/100 ml.

tekijä				
S.P. (=A)	K.A. (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
144,5	144,5	2,1598678	2,1598678	0,00
101,3	101,3	2,0056094	2,0056094	0,00
94,5	94,5	1,9754318	1,9754318	0,00
88,5	88,5	1,9469433	1,9469433	0,00
78,2	78,2	1,8932068	1,8932068	0,00
69,7	69,7	1,8432328	1,8432328	0,00
summa				0,00
summa/2n				0,00
s=				0,00

tekijä				
K.A.(=A)	J.A. (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
144,5	144,5	2,1598678	2,1598678	0,0
101,3	101,3	2,0056094	2,0056094	0,0
94,5	94,5	1,9754318	1,9754318	0,0
88,5	88,5	1,9469433	1,9469433	0,0
78,2	78,2	1,8932068	1,8932068	0,0
69,7	69,7	1,8432328	1,8432328	0,0
summa				0,0
summa/2n				0,0
s=				0,00

tekijä				
S.P. (=A)	J.A. (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
144,5	144,5	2,1598678	2,1598678	0,00
101,3	101,3	2,0056094	2,0056094	0,00
94,5	94,5	1,9754318	1,9754318	0,00
88,5	88,5	1,9469433	1,9469433	0,00
78,2	78,2	1,8932068	1,8932068	0,00
69,7	69,7	1,8432328	1,8432328	0,00
summa				0,00
summa/2n				0,0000000
s=				0,00

Parittaisten tulosten keskihajonta Colilert 51-well, kaivovesi, SP viljelemä

Tulokset mpn/100 ml.

tekijä				
S.P. (=A)	K.A. (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
118,4	118,4	2,0733517	2,0733517	0
94,5	94,5	1,9754318	1,9754318	0
129,8	129,8	2,1132747	2,1132747	0
11,1	11,1	1,0453230	1,0453230	0
16,4	16,4	1,2148438	1,2148438	0,0000000
5,3	5,3	0,7242759	0,7242759	0

summa 0
 summa/2n 0
s= 0,00

tekijä				
K.A. (=A)	J.A. (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
118,4	118,4	2,0733517	2,0733517	0,000
94,5	94,5	1,9754318	1,9754318	0,000
129,8	129,8	2,1132747	2,1132747	0,000
11,1	11,1	1,0453230	1,0453230	0,000
16,4	16,4	1,2148438	1,2148438	0,000
5,3	5,3	0,7242759	0,7242759	0,000

summa 0,000
 summa/2n 0,000
s= 0,00

tekijä				
S.P. (=A)	J.A. (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
118,4	118,4	2,0733517	2,0733517	0
94,5	94,5	1,9754318	1,9754318	0
129,8	129,8	2,1132747	2,1132747	0
11,1	11,1	1,0453230	1,0453230	0
16,4	16,4	1,2148438	1,2148438	0
5,3	5,3	0,7242759	0,7242759	0

summa 0
 summa/2n 0
s= 0,00

Parittaisten tulosten keskihajonta. LES Endo, ster.vesi, SP viljelemä

Tulokset pmy/100 ml.

tekijä				
S.P. (=A)	K.A. (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
83	85	1,9190781	1,9294189	0,00010693
101	99	2,0043214	1,9956352	7,545E-05
101	102	2,0043214	2,0086002	0,0000183
12	12	1,0791812	1,0791812	0
14	14	1,1461280	1,1461280	0
7	7	0,8450980	0,8450980	0

summa 0,0002007
 summa/2n 0,0000167
s= 0,00

tekijä				
K.A. (=A)	J.A. (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
85	84	1,9294189	1,9242793	2,642E-05
99	98	1,9956352	1,9912261	0,0000194
102	100	2,0086002	2,0000000	7,396E-05
12	12	1,0791812	1,0791812	0
14	14	1,1461280	1,1461280	0
7	7	0,8450980	0,8450980	0

summa 0,0001198
 summa/2n 0,0000100
s= 0,00

tekijä				
S.P. (=A)	J.A. (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
83	84	1,9190781	1,9242793	2,7052E-05
101	98	2,0043214	1,9912261	0,0001715
101	100	2,0043214	2,0000000	0,0000187
12	12	1,0791812	1,0791812	0
14	14	1,1461280	1,1461280	0
7	7	0,8450980	0,8450980	0

summa 0,0002172
 summa/2n 0,0000181
s= 0,00

Parittaisten tulosten keskihajonta. LES Endo, kaivovesi, SP viljelemä

Tulokset pmy/100 ml.

tekijä				
S.P. (=A)	K.A. (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
84	82	1,9242793	1,9138139	0,00010953
91	87	1,9590414	1,9395193	0,00038111
90	84	1,9542425	1,9242793	0,0008978
8	8	0,9030900	0,9030900	0
6	6	0,7781513	0,7781513	0
5	5	0,6989700	0,6989700	0

summa 0,0013884
 summa/2n 0,0001157
s= 0,01

tekijä				
K.A. (=A)	J.A. (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
82	82	1,9138139	1,9138139	0
87	87	1,9395193	1,9395193	0
84	84	1,9242793	1,9242793	0,0000000
8	8	0,9030900	0,9030900	0,0000000
6	6	0,7781513	0,7781513	0
5	5	0,6989700	0,6989700	0

summa 0,0000000
 summa/2n 0,0000000
s= 0,00

tekijä				
S.P. (=A)	J.A. (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
84	82	1,9242793	1,9138139	0,00010953
91	87	1,9590414	1,9395193	0,00038111
90	84	1,9542425	1,9242793	0,00089779
8	8	0,9030900	0,9030900	0,0000000
6	6	0,7781513	0,7781513	0
5	5	0,6989700	0,6989700	0

summa 0,0013884
 summa/2n 0,0001157
s= 0,01

Parittaisten tulosten keskihajonta. LES Endo, ster.vesi, KA viljelemä

Tulokset pmy/100 ml.

tekijä				
S.P. (=A)	K.A. (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
80	81	1,9030900	1,9084850	2,91064E-05
105	105	2,0211893	2,0211893	0
94	91	1,9731279	1,9590414	0,0001984
12	12	1,0791812	1,0791812	0
15	15	1,1760913	1,1760913	0
13	13	1,1139434	1,1139434	0

summa 0,0002275
 summa/2n 0,0000190
s= 0,00

tekijä				
K.A. (=A)	J.A. (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
81	80	1,9084850	1,9030900	2,911E-05
105	103	2,0211893	2,0128372	0,0000698
91	89	1,9590414	1,9493900	9,315E-05
12	12	1,0791812	1,0791812	0
15	15	1,1760913	1,1760913	0
13	13	1,1139434	1,1139434	0

summa 0,0001920
 summa/2n 0,0000160
s= 0,00

tekijä				
S.P. (=A)	J.A. (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
80	80	1,9030900	1,9030900	0
105	103	2,0211893	2,0128372	0,0000698
94	89	1,9731279	1,9493900	0,0005635
12	12	1,0791812	1,0791812	0
15	15	1,1760913	1,1760913	0
13	13	1,1139434	1,1139434	0

summa 0,0006332
 summa/2n 0,0000528
s= 0,01

Parittaisten tulosten keskihajonta. LES Endo, kaivovesi, KA viljelemä

Tulokset pmy/100 ml.

tekijä				
S.P. (=A)	K.A. (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
71	71	1,8512583	1,8512583	0
83	81	1,9190781	1,9084850	0,0001122
86	87	1,9344985	1,9395193	0,0000252
6	6	0,7781513	0,7781513	0
7	7	0,8450980	0,8450980	0
8	8	0,9030900	0,9030900	0

summa 0,0001374

summa/2n 0,0000115

s= 0,00

tekijä				
K.A. (=A)	J.A. (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
71	71	1,8512583	1,8512583	0
81	80	1,9084850	1,9030900	2,911E-05
87	86	1,9395193	1,9344985	0,0000252
6	6	0,7781513	0,7781513	0,0000000
7	7	0,8450980	0,8450980	0
8	8	0,9030900	0,9030900	0

summa 0,0000543

summa/2n 0,0000045

s= 0,00

tekijä				
S.P. (=A)	J.A. (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
71	71	1,8512583	1,8512583	0
83	80	1,9190781	1,9030900	0,0002556
86	86	1,9344985	1,9344985	0
6	6	0,7781513	0,7781513	0,0000000
7	7	0,8450980	0,8450980	0
8	8	0,9030900	0,9030900	0

summa 0,0002556

summa/2n 0,0000213

s= 0,00

Colilert 51 ja LES Endo tulosten yhteneväisyys, steriili vesi

lisäystaso / pmy	koliformit ja <i>E. coli</i>	
	51 well	LES Endo
100	137,2	82,2
100	94,9	101,8
100	147,5	96,2
10	11,1	12,0
10	15,0	14,5
10	20,7	10,0
160	>200,5	160,8
160	>200,5	158,0
160	147,5	152,7
2	61,4	23,8
2	70,5	22,5
2	19,2	23,0

ei huomioida

ei huomioida

Colilert 51 ja LES Endo tulosten yhteneväisyys, kaivovesi

lisäystaso / pmy	koliformit ja <i>E. coli</i>	
	51 well	LES Endo
110	103,5	76,8
110	84,2	84,8
110	101,8	86,2
11	10,5	7,0
11	16,4	6,5
11	6,4	6,5
150	>200,5	154,0
150	154,9	132,7
150	137,2	142,0
2	2,0	4,0
2	5,3	5,0
2	1,5	4,5

ei huomioida

51-well ja LES Endo tulosten parittainen vertailu, steriili vesi

lisäystaso/ pmy	koliformit ja <i>E. coli</i> mpn/100 ml steriili vesi				
	Colilert 51-well(=A)	LES Endo(=B)			
	mpn/100 ml	mpn/100 ml	logA	logB	(logA-logB) ²
100	137,2	82,2	2,1371958	1,9146957	0,0495063
100	94,9	101,8	1,9772662	2,0078900	0,0009378
100	147,5	96,2	2,1687920	1,9830246	0,0345095
10	11,1	12,0	1,0453230	1,0791812	0,0011464
10	15,0	14,5	1,1760913	1,1613680	0,0002168
10	20,7	10,0	1,3159703	1,0000000	0,0998373
160	147,5	152,7	2,1687920	2,1837442	0,0002236
2	61,4	23,8	1,7881684	1,3771848	0,1689075
2	70,5	22,5	1,8478810	1,3521825	0,2457170
2	19,2	23,0	1,2833012	1,3617278	0,0061507

summa 0,6071529
 summa/2n 0,0303576
s= 0,17

51-well ja LES Endo tulosten parittainen vertailu, kaivovesi

lisäystaso / pmy	koliformit ja <i>E. coli</i> mpn/100 ml				
	Colilert 51-well(=A)	LES Endo(=B)			
	mpn/100 ml	mpn/100 ml	logA	logB	(logA-logB) ²
110	103,5	76,8	2,0147305	1,8855497	0,0166877
110	84,2	84,8	1,9250541	1,9285665	0,0000123
110	101,8	86,2	2,0077478	1,9353393	0,0052430
11	10,5	7,0	1,0211893	0,8450980	0,0310081
11	16,4	6,5	1,2148438	0,8129134	0,1615481
11	6,4	6,5	0,8061800	0,8129134	0,0000453
150	154,9	132,7	2,1899112	2,1227618	0,0045090
150	137,2	142,0	2,1371958	2,1522883	0,0002278
2	2,0	4,0	0,3010300	0,6020600	0,0906191
2	5,3	5,0	0,7242759	0,6989700	0,0006404
2	1,5	4,5	0,1760913	0,6532125	0,2276447

summa 0,5381856
 summa/2n 0,0244630
s= 0,16

koliformit				<i>E. coli</i>			
tulos (=A)	log A	logA- logA(ka)=B	B ²	tulos (=A)	log A	logA- logA(ka)=B	B ²
56,00	1,748188	0,0383944	0,0014741	32,40	1,510545	0,0258586	0,0006687
53,10	1,7250945	0,0153009	0,0002341	32,40	1,510545	0,0258586	0,0006687
45,30	1,6560982	-0,0536954	0,0028832	27,10	1,4329693	-0,0517171	0,0026747
ka	1,7097936	summa B ²	0,0045914	ka	1,4846864	summa B ²	0,004012
		summa B ² /n-1	0,0022957			summa B ² /n-1	0,0073553
		s=	0,05			s=	0,01

koliformit				<i>E. coli</i>			
tulos (=A)	log A	logA- logA(ka)=B	B ²	tulos (=A)	log A	logA- logA(ka)=B	B ²
53,10	1,7250945	-0,0467613	0,0021866	34,40	1,5365584	-0,0150206	0,0002256
65,90	1,8188854	0,0470296	0,0022118	30,60	1,4857214	-0,0658576	0,0043372
59,10	1,7715875	-0,0002683	7,2E-08	42,90	1,6324573	0,0808782	0,0065413
ka	1,7718558	summa B ²	0,0043985	ka	1,5515791	summa B ²	0,0111041
		summa B ² /n-1	0,0021992			summa B ² /n-1	0,0055521
		s=	0,05			s=	0,07

Oikeellisuus

tekijä	koliformit			
S.P. (=A)	SLV (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
56,00	81	1,7481880	1,9084850	0,0256951
53,10	81	1,7250945	1,9084850	0,0336321
45,30	81	1,6560982	1,9084850	0,0636991
		summa	0,1230263	
		summa/2n	0,0205044	
		s=	0,14	

tekijä	<i>E.coli</i>			
S.P. (=A)	SLV (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
32,40	42	1,5105450	1,6232493	0,0127023
32,40	42	1,5105450	1,6232493	0,0127023
27,10	42	1,4329693	1,6232493	0,0362065
		summa	0,0616110	
		summa/2n	0,0102685	
		s=	0,10	

LIITE 8

tekijä	koliformit			
K.A. (=A)	SLV (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
53,10	81	1,7250945	1,9084850	0,0336
65,90	81	1,8188854	1,9084850	0,0080
59,10	81	1,7715875	1,9084850	0,0187
		summa	0,0604	
		summa/2n	0,0101	
		s=	0,10	

tekijä	<i>E.coli</i>			
K.A. (=A)	SLV (=B)	logA	logB	(logA-logB) ²
34,40	42	1,5365584	1,6232493	0,00752
30,60	42	1,4857214	1,6232493	0,01891
42,90	42	1,6324573	1,6232493	0,00008
		summa	0,02651	
		summa/2n	0,00442	
		s=	0,07	

Steriilin veden 0-näytteet 20.2.2008

Näyte	SP viljelemä	KA viljelemä	SP viljelemä	KA viljelemä
	Colilert	Colilert	LES Endo	LES Endo
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0

Kaivovesimatriisin 0-näytteet 21.2.2008

Näyte	SP viljelemä	KA viljelemä	LES Endo
	Colilert	Colilert	
1	0	0	0
2	0	0	
3	0	0	

Todellinen kaivovesinäyte 26.2.2008

Näyte	SP	KA	JA	LES Endo
	Colilert	Colilert	Colilert	
1	0	0	0	0
2	0	0	0	
3	0	0	0	