

Claudia Rebhan

Maljavalumenetelmän korvaaminen 3M™ Petri-film™ -kasvatusalustoilla laadunvalvontanäyt-teiden analysoinnissa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja kemiantekniikka

Insinöörityö

9.9.2018

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Claudia Rebhan Maljavalumenetelmän korvaaminen 3M™ Petrifilm™ - kasvatusalustoilla laadunvalvontanäytteiden analysoinnissa 54 sivua + 5 liitettä 9.9.2018
Tutkinto	insinööri (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Bio- ja kemiantekniikka
Ammatillinen pääaine	Bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaajat	Laboratoriopäällikkö Eija Kolmonen Laborantti Taina Nevalainen Yliopettaja Riitta Lehtinen
<p>Opinnäytetyön on saatu toimeksiantona Massby Facility & Services Ltd. -laboratoriolta. Toimeksiantona oli validoida 3M™ Petrifilm™ -kasvatusalustoja näytteiden mikrobimäärityksiin. Laboratoriossa käytetään mikrobimäärityksiin tällä hetkellä perinteistä maljavalumenetelmää. Petrifilm on uudenaikainen kasvatusalusta, jonka ansiosta on mahdollista säästää aikaa, tilaa sekä jätemäärää.</p> <p>Petrifilmeillä oli tarkoitus korvata maljavalu enterobakteereiden, kokonaisbakteereiden sekä hiivojen ja homeiden viljelyssä. Uuden kasvatusalustan validoimista varten tehtiin useita rinnakkaisia viljelyitä maljavalujen ja Petrifilmien välillä. Rinnakkaisviljelyiden lisäksi uuden kasvatusalustan on myös välttämätöntä läpäistä henkilö- sekä laboratoriokohtaiset lukemaepävarmuudet. Lukemaepävarmuuksien läpäiseminen varmistaa, että kukin laborantti tulkitsee pesäkkeet samalla tavalla verrattuna muihin laborantteihin sekä omiin aiempiin pesäkkeiden laskukertoihin.</p> <p>Petrifilmien käyttöönoton tavoitteena oli nopeuttaa laboratorion esivalmisteluja aamuisin ja tuoda laboratorion jääkaappeihin, varastotiloihin sekä inkubointikaappeihin lisätilaa. Toiveena oli myös työturvallisuuden parantuminen, sillä agarin keittämisessä kuuma agar aiheuttaa toisinaan vaaratilanteita kuohuessaan yli.</p> <p>Petrifilmien käyttöönottoon liittyvissä rinnakkaisviljelyissä paljastui sekä hyviä että huonoja puolia verrattuna maljavaluun. Myös kustannuslaskelmat Petrifilmin ja maljavalun välillä on otettu huomioon. Yrityksen päätettäväksi jää, korvaa se maljavalun Petrifilmeihin kokonaan, osittain tai ei lainkaan.</p>	
Avainsanat	mikrobiologia, maljavalu, Petrifilm™, kasvatusalusta, viljely, bakteeri

Author Title Number of Pages Date	Claudia Rebhan Replacing the Malabar Method with the 3M™ Petrifilm™ plate in the analysis of quality control samples 54 pages + 5 appendices 9 September 2018
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Chemical Engineering
Professional Major	Biotechnology and Food Engineering
Instructors	Eija Kolmonen, Head of Laboratory Taina Nevalainen, Laboratory Assistant Riitta Lehtinen, Senior Lecturer
<p>The thesis was commissioned by the Massby Facility & Services Ltd. laboratory to validate the 3M™ Petrifilm™ plates for sample cultivations. The current growth medium of the laboratory is a traditional pour plate. Petrifilm is a modern growth medium which gives the opportunity to save time, space and waste.</p> <p>Petrifilm was supposed to replace pour plate in the cultivation of enterobacteria and total bacteria and yeasts and molds. To validate the new growth medium, several cultivations were made using pour plates and Petrifilm plates in parallel. In addition to parallel cultivations it was vital that the reading uncertainty of new growth medium would lie within the personal and laboratory-specific reading uncertainty limits. Being within the reading uncertainty limits would ensure that each laboratory assistant interprets the colony counts in the same way as the other laboratory assistants and in the same way as they did in their earlier colony count interpretations.</p> <p>The aim of introducing Petrifilms was to speed up the preparation of the laboratory in the mornings and to bring additional space to the laboratory's refrigerators, storage rooms and incubators. It was also hoped that work safety would improve since when boiling the agar, hot agar occasionally causes a close call when it boils over.</p> <p>The parallel cultivations showed that Petrifilms have good and bad sides compare to pour plates. Cost calculations between Petrifilmin and pour plate were also considered. The company decides whether to completely, partially or not at all replace pour plates with Petrifilms.</p>	
Keywords	microbiology, pour plate, Petrifilm™, growth medium, cultivation, bacteria

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Teoreettinen osuus	3
2.1	3M™ Petrifilm™ -kasvatusalustat	3
2.2	Enterobakteerit	4
2.3	Hiivat ja homeet	5
2.4	Kokonaisbakteerit	5
3	Kokeellinen osuus	5
3.1	Interkalibrointi	6
3.1.1	Interkalibroinnin toteutus	7
3.1.2	Interkalibrointien tulokset	8
3.1.3	Interkalibroinnin päätelmät	10
3.2	Hiivat ja homeet	12
3.2.1	Hiivan ja homeen viljely Petrifilmein	13
3.2.2	Hiivan ja homeen tunnistaminen Petrifilmillä	14
3.2.3	Eri homeiden ulkonäkö Petrifilmeillä	17
3.2.4	Hiivan ja homeen ympärys jogurttiin	19
3.2.5	Inkuboitujen jogurttien viljely	21
3.2.6	Kasvatusalustojen kasvujen nopeuserot	24
3.2.7	Viljelyn nopeuserot Petrifilmillä ja maljavalulla	25
3.2.8	Yhteenveto Petrifilmien käyttämisestä hiivoilla ja homeilla	26
3.3	Enterobakteerit	26
3.3.1	Enterobakteereiden viljely raakamaidoista	27
3.3.2	Enterobakteereiden Petrifilmin värin tasaisuuden selvittämien	28
3.3.3	<i>E. Colin</i> ympärys eri tuotteisiin	29
3.3.4	Lukemaepävarmuudet enterobakteereilla	32
3.3.5	Enteropesäkkeiden siirrostaminen Petrifilmiltä	34
3.3.6	T-testi enterobakteereiden viljelyssä	34
3.3.7	Yhteenveto Petrifilmien käyttämisestä enterobakteerien viljelyssä	36
3.4	Kokonaisbakteerit	36
3.4.1	Rinnakkaisviljelyitä pastöroidulla maidolla	37
3.4.2	Hanaveden viljely	44
3.4.3	Ajan säästäminen viljeltäessä Petrifilmeillä	45

3.4.4	Lukemaepävarmuudet kokonaisbakteereilla	46
3.4.5	T-testi kokonaisbakteereiden viljelyssä	48
3.4.6	Yhteenveto kokonaisbakteereiden viljelystä Petrifilmeillä	51
3.5	Hintavertailu	51
4	Yhteenveto	52
	Lähteet	55
	Enterobakteereiden henkilökohtaiset lukemaepävarmuudet Petrifilmillä	1

Liitteet

Liite 1. 95 %:n luotettavuusväli jaetun näytteen havaitulle pesäkeluvulle ja odotetulle pesäkeluvulle

Liite 2. Enterobakteereiden henkilökohtaiset lukemaepävarmuudet Petrifilmillä

Liite 3. Enterobakteereiden laboratoriokohtaiset lukemaepävarmuudet Petrifilmillä

Liite 4. Kokonaisbakteereiden henkilökohtaiset lukemaepävarmuudet Petrifilmillä

Liite 5. Kokonaisbakteereiden laboratoriokohtaiset lukemaepävarmuudet Petrifilmillä

Lyhenteet

hi = hiiva

ho = home

MV = maljavalu

Petrifilm = 3M™ Petrifilm™ -kasvatusalusta

PF = Petrifilm

PFR = Petrifilm Rapid

1 Johdanto

Opinnäytetyö on saatu toimeksiantona Massby Facility & Services Ltd. -laboratoriolta. Toimeksiantona oli validoida uusia kasvatusalustoja mikrobimäärityksiin. Massby Facility & Services Ltd. on Arla Oy:n omistama laboratorio, joka analysoi Arlan Oy:n sekä Unilever Ingman Production Oy:n näytteitä. Arla Oy on osa kansainvälistä Arlaa [1], jonka tavoitteena on yhtenäistää toimintatapojaan kansainvälisesti. Laadunvalvontalaboratorion tilat ovat käymässä vähiin alati kasvavan näytemäärän vuoksi. Inkubointikaapit vievät reilusti tilaa, ja niitä käytetään sekä tuotteiden että maljavalujen inkubointiin. Lisäksi jokaisesta tuote-erästä on oltava vastanäyte laboratorion jääkaapissa mahdollisia reklamaatioita tai muita epäselvyyksiä varten.

Perinteisen maljavalut petrimaljoilla vievät valtavasti tilaa inkubointikaapeissa, sillä niitä voidaan pinota ainoastaan kuusi päällekkäin. Lisäksi inkuboidut ja luetut maljat täyttävät nopeasti roskakorit sekä lisäävät laboratorion tuottamaa jätemäärää. Perinteinen maljavalu petrimaljoilla vaatii myös paljon säilytystilaa sulatettaville agareille, jotka on säilytettävä kylmässä. Petrimaljat vievät varastossa paljon tilaa, kuten myös sulatettavat agarit, jotka eivät kaikki mahdu laboratorion jääkaappeihin.

Työturvallisuuteen panostavassa yrityksessä halutaan minimoida kaikki työturvallisuusriskit. Laboratorion yksi työturvallisuusriski on agareiden sulattaminen ja keittäminen, jolloin agarin lämpötila kohoaa huomattavan kuumaksi ja voi aiheuttaa palovammoja työntekijöille. Muutaman kerran on käynyt niin, että sulatuksen jälkeen agarpullo on rikkoutunut ja kuuma agar räiskynyt työntekijän päälle sitä siirrettäessä keittokattilasta hauteeseen. Osa agareista keitetään yhä itse jauheista. Tarkoista ohjeista ja huolellisuudesta huolimatta agar saattaa kiehua erlenmeyerista yli ja aiheuttaa siivottavaa sekä pahimmillaan palovammoja. Sulatettavat agarpullot ovat lasia, jota kertyy lasinkeräysastiaan paljon.

Agareiden sulatuksessa ja jäähtymisessä käyttökelpoiseksi kestää noin kaksi tuntia. Aamut ovat kiireisiä laboratoriossa, koska edellisen illan ja yön näytteet odottavat analysointia ja viljelyä. Lisäksi aamuisin on paljon muita aamuvalmisteluja ja kaikki nopeutavat tekijät aamuihin ovat tervetulleita.

Viljelyitä tehdessä agarin jähmettyminen vie oman aikansa, eikä pöytätilaa vapaudu sitä mukaa kun näytteitä saadaan viljeltyä. On odotettava maljavalun jähmettymistä, ennen kuin petrimaljan voi kääntää ylösalaisin inkubointikaappiin. Enterobakteeriviljelyihin kaadetaan lisäksi vielä pinnalle agarkerros, jotta mahdolliset pesäkkeet eivät leviäisi ja olisivat helpommin laskettavissa. Kyseisessä menetelmässä agarin jähmettymistä on odotettava siis peräti kaksi kertaa.

Arlan muissa Pohjoismaisissa laboratorioissa on käytössä perinteisen maljavalun sijaan 3M™ Petrifilm™ -kasvatusalustat. Suomen Arlan laboratorion siirtyminen perinteisestä maljavalusta Petrifilmeihin, oltaisiin mukana One Arlassa. One Arlassa käytetään kansainvälisesti yhtenäisiä menetelmiä Arlan tuotteita analysoivien laboratorioiden välillä. Yhtenäiset toimintatavat vahvistavat yrityksen laatua kansainvälisesti, sillä tulokset saadaan samoilla menetelmillä eri maissa.

Sen lisäksi, että Petrifilm-kasvatusalustat yhtenäistävät Arlan menetelmiä, ne toisivat ratkaisuja käytännön ongelmiin laboratorioissa. Tilan säästö tulisi olemaan merkittävä, sillä Petrifilmit eivät vie paljon tilaa niiden litteän ulkomuodon ansiosta. Varastossa tilaa vievien suurten petrimalja- ja agarlaatikoiden tarve vähenisi huomattavasti. Inkuboinnissa Petrifilmejä voi pinota kuuden petrimaljan sijaan jopa 20–40 Petrifilmiä päällekkäin [2]. Vapautuva inkubointitila voitaisiin käyttää esimerkiksi valmiiden tuotteiden inkubointiin. Vaikka Petrifilmejä tuleekin säilyttää avaamattomana jääkaapissa [2], ne vievät agarpulloja vähemmän tilaa. Mahdollisesti vapautuvaa jääkaappitilaa voidaan käyttää valmiiden tuotteiden vastaanäytteiden varastoinnissa, sillä vastaanäytejääkaapit ovat käymässä ahtaiksi.

Työturvallisuus paranisi Petrifilmien ansiosta, kun ei tarvitsisi käsitellä kuumia agareita ja lasiesineitä. Lisäksi raskaiden agarlaatikoiden nostelu ja agarpullojen aikaa vievä purkaminen jääkaappeihin loppuisi.

Aamuvalmistelut nopeutuisivat, eikä tarvitse odottaa agareiden sulamista ja jäähtymistä. Petrifilmien jähmettyminen vie aikaa vain noin minuutin, eikä enterobakteereiden viljelyihin tarvita erillistä pintaa [3]. Petrifilmien käyttö säästäisi merkittävästi työaikaa ja sitä kautta kustannuksia. Iltapäivän roskien vienti vähenisi, sillä Petrifilmit vievät roskastioissa kokonsa vuoksi todella vähän tilaa verrattuna petrimaljoihin. Sulatettavia agarpulloja tulisi harvoin, jolloin lasinkeräysastia täytyy tyhjentää entistä harvemmin.

2 Teoreettinen osuus

2.1 3M™ Petrifilm™ -kasvatusalustat

3M™ valmistamat Petrifilm™ -kasvatusalustat soveltuvat monipuolisesti mikrobiologiseen viljelyyn ja tuovat vaihtoehdon perinteiselle maljavalulle. Petrifilmien ansiosta on mahdollista vähentää jätemäärää, sillä Petrifilmit ovat kooltaan pieniä ja litteitä kasvatusalustoja. Kasvatusalustat ovat sellaisenaan valmiita käyttöön, sillä niihin ei tarvitse kaataa erikseen agaria. Kasvatusalustoille pipetoidaan 1 ml näytettä, levitetään näyte sille suunnitellulla levittimellä, annetaan olla pöydällä minuutin ajan ja siirretään inkuboitumaan kyseiselle alustalle suunnattuun optimilämpöön optimiajaksi. Petrifilmejä voi koota päällekkäin inkubointikaappiin jopa 40 kappaletta. Käytännössä 20 kappaleen pino Petrifilmejä on käytännöllisempi, sillä se pysyy paremmin pinossa kaatumatta. [2;3.]

Avaamattomia Petrifilmejä tulee säilyttää jääkaapissa. Avatut Petrifilmit säilyvät huoneenlämmössä neljä viikkoa alkuperäispaketissa, jonka suu on huolellisesti suljettu esimerkiksi taitteella ja teipillä. Vaihtoehtoinen tapa on säilyttää avattua, huolellisesti suljettua, Petrifilm-pakettia pakastimessa, mutta ei jääkaapissa, jotta kasvatusalustat eivät saa kosteutta. [2;3.]

Petrifilmin suuri etu on niiden pieni koko. Koon puolesta avaamattomia Petrifilm-paketteja mahtuu useita yhteen jääkaappiin. Maljavalusta poiketen, ei tarvita erillisiä tiloja esimerkiksi petrimaljojen sekä agarpullojen ja -jauheiden säilytykseen. Agareiden keittoon ja inkubointiin tarvittavia kattiloita, hauteita ja lämpökaappeja ei tarvita. Jättemäärä pienenee merkittävästi, sillä Petrifilmit ovat huomattavasti ohuempia, kevyempiä ja pienempiä verrattuna maljavalun maljoihin. Petrifilmit ovat myös heti valmiita käyttöön ilman esivalmisteluja, kuten agarin keittoa tai sulatusta ja jäähdyttämistä.

Petrifilmejä on markkinoilla useille eri mikrobeille. Tässä opinnäytetyössä on käytetty viittä eri Petrifilm-kasvatusalustaa. Enterobakteereiden viljelyssä käytettiin Petrifilm™ Enterobacteriaceae Count Plate -kasvatusalustaa. Hiivojen ja homeiden viljelyssä käytettiin Petrifilm™ Yeast and Mold Count Plate -kasvatusalustaa sekä Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold Count Plate -kasvatusalustaa, joka on nopeutettu versio hiivojen ja homeiden viljelyyn. Kokonaisbakteereiden viljelyssä käytettiin Petrifilm™ Aerobic Count

Plate sekä Petrifilm™ Rapid Aerobic Count Plate -kasvatusalustaa, joka on nopeutettu versio kokonaisbakteereiden kasvatukseen.

Maljavalusta poiketen Petrifilmit ovat herkempiä pH:n vaihteluille. Enterobakteereiden viljelyssä pH:n optimi on 6,5–7,5. Hiivojen ja homeiden viljelyssä pH:lla ei ole merkitystä tavallisella eikä nopeutetulla Petrifilmillä. Kokonaisbakteereiden viljelyssä tavallisella Petrifilmillä pH:n optimi on 6,6–7,2, nopeutetussa versiossa pH:n tulee olla yli 5. [2;3.]

Opinnäytetyön kokeellisen osuutta tehdessä Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold -kasvatusalustoista ei pystytty vielä tulkitsemaan pesäkkeiden ulkonäöstä, ovatko ne hiivaa vai homeita, sillä kaikki pesäkkeet näyttävät vanhemmalla kasvatusalustalla samanlaiselta. Mikroskopointi oli hiivan ja homeen tunnistamisessa siis avainasemassa. Petrifilmien tuotekehitys on mennyt opinnäytetyön aikana eteenpäin, ja nykyisissä nopeutetuissa hiivan ja homeen kasvatusalustoilla home- ja hiivakasvu on mahdollista tunnistaa pesäkkeiden ulkonäön perusteella ilman mikroskopointia. [2;3.]

2.2 Enterobakteerit

Agarina enterobakteereiden viljelyssä käytetään VRBG-agaria (Violet Red Bile Glucose agar). Mikäli mahdollista, näytettä pipetoidaan suoraan maljalle 1 ml, mutta laimennoksen ollessa välttämätön (esimerkiksi rahkat) tehdään laimennos 10^{-1} . Viljely tehdään maljavalutekniikalla, jossa petrimaljalle pipetoidun näytteen päälle kaadetaan VRBG-agaria ja sekoitetaan se huolellisesti näytteeseen. Agarin jähmetyttyä päälle kaadetaan toinen kerros samaa agaria pinnaksi, jotta mahdolliset pesäkkeet eivät leviä ja pysyvät täten laskukelpoisina paremmin. Enterobakteerimaljoja inkuboidaan aerobisesti 37 ± 1 °C:ssa / 24 ± 2 h, jonka jälkeen pesäkkeet lasketaan. [4.]

Tyypilliset enterobakteeripesäkkeet (punaiset ja violetit, joiden ympärillä saattaa olla saostumarengas) ja harvinaisemmat enteropesäkkeet (värittömät, vaaleat, limaiset) varmistetaan tekemällä pesäkkeistä jatkoviljely kokonaismaljalle, jota inkuboidaan samoissa olosuhteissa kuin enterobakteerimaljojakin. Kokonaismaljalla kasvavasta kasvusta tehdään oksidaasitesti, joka karsii pois enterobakteerimaljoilla kasvavat oksidaasiposiitiviset kasvut, kuten *Aeromonas*. Enterobakteeripesäkkeet ovat oksidaasinegatiivisia. Enterobakteerimaljan pesäkkeet lasketaan aina 150 pesäkkeeseen asti. Varmistukset tehdään jokaisesta pesäkkeestä, mikäli maljalla kasvaa viisi tai alle

viisi pesäkettä. Mikäli maljalla kasvaa yli viisi pesäkettä, varmistukset tehdään viidestä edustavasta pesäkkeestä. Pesäkemäärät ilmaistaan sen mukaan, kuinka paljon niitä kasvaa per millilitra laimentamatonta näytettä. [4.]

2.3 Hiivat ja homeet

Hiivojen ja homeiden viljelyssä maitotuotteista käytetään tavallisesti YGC-agaria (Yeast extract glucose chloramphenicol agar), joka on niille selektiivinen hiivojen ja homeiden kasvatusalusta [5]. Hiivat ja homeet viljellään tuotteesta riippuen suoraan laimentamatta niitä tai laimennoksena 10^{-1} maljavalutekniikalla. Inkuboidaan aerobisesti $+ 25 \pm 1$ °C:ssa viisi vuorokautta. Tulokset voivat olla nähtävissä jo aikaisemmin, kuten voimakas hiivakasvu voi näkyä jo vuorokauden inkuboinnin jälkeen. Tämän vuoksi maljoja on tarkkailtava jo ennen viiden vuorokauden inkubointiajan täyttymistä. Epävarmat pesäkkeet on mahdollista varmistaa mikroskopoimalla. Hiiva- ja homekasvun voi tunnistaa myös jo maljan hajun perusteella. [6.]

2.4 Kokonaisbakteerit

Kokonaisbakteereiden määrittämisessä maitotuotteista on suositeltavaa käyttää MPC-agaria (Milk Plate Count Agar), jotta maidon bakteerit tulisivat sille suotuisissa oloissa parhaiten esille. Petrimaljalle pipetoidaan 1 ml näytettä. On huomioitava, että mikäli näytettä ei laimenna ja se on sameaa, voi pesäkkeiden laskenta vaikeutua samean maljan tulkinnassa. Näytteen päälle kaadetaan agar, sekoitetaan ja annetaan jäähmettyä. Inkuboidaan aerobisesti 30 ± 1 °C:ssa / 72 ± 3 h. Pesäkkeet lasketaan ja pesäkkeiden lukumäärässä otetaan huomioon laimennus, ilmaistaan pesäkelukumäärä millilitrassa, ottaen mahdollinen laimennus huomioon. [7.]

3 Kokeellinen osuus

Tärkein kriteeri uuden kasvatusalustan validoinnissa on, että tulokset ovat samoja riippumatta kasvatusalustasta. Lisäksi tärkeitä kriteerejä ovat käytön helppous, ajan ja tilan säästö, kustannukset sekä työturvallisuus. Jotta pystyttiin varmistamaan Petrifilmi-en sopivuus korvaamaan maljavalutekniikan, oli suoritettava erilaisia kokeita ja rinnakkaisia viljelyitä näiden kahden menetelmän välillä. Erilaisin kokein pyrittiin saamaan

vastaus Petrifilmien soveltuvuudesta korvaamaan maljavalu. Näihin kokeisiin kuului niin viljelyä, siirrostusta kuin lukemaepävarmuuksia työntekijöiden välillä. Toisin kuin maljavalutekniikassa, Petrifilm-kasvatusalustat eivät toimi kaikilla pH-alueilla [2,3]. Meijerissä lähes kaikki tuotteet, neutraalia maitoa lukuun ottamatta, ovat happamia. Mikäli Petrifilmejä ei pysty lukemaan tunnin sisällä inkuboinnin päätyttyä, valmistajan ohjeiden mukaan ne tulisi siirtää suljettuun rasiaan pakastimeen korkeintaan -15 °C:seen maksimissaan viikoksi [8]. Tämä ei kuitenkaan ole käytännön syistä mahdollista esimerkiksi viikonloppujen vuoksi, sillä laboratorio on suljettu viikonloppuisin. Inkubointikaappien lämpötila laskee inkubointiajan päätyttyä + 5 °C:seen. Kokeiden tuloksissa ei huomattu poikkeuksia viikonlopun jälkeen, joten pystyttiin todistamaan pakastesäilytyksen olevan tarpeeton kyseisen laboratorion näytteissä.

3.1 Interkalibrointi

Petrifilmien testaus aloitettiin kahdella interkalibrointinäytteellä. Laboratorio osallistuu interkalibrointeihin vuosittain hyväksytyjen menetelmien osalta osoittaakseen pätevyytensä. Interkalibroinnissa ulkopuoliselta yritykseltä tilataan näytteitä, jotka ovat kylmäkuivattuja näyteampulleja, jotka sisältävät seoksen tunnettuja mikrobeja. Laboratorion tulee löytää oikea määrä kutakin mikrobilajia sekä varmistaa ja tunnistaa lajit. Interkalibrointinäytteet analysoidaan laboratorion käytössä olevilla menetelmillä. Viljelyt tehdään määrättyihin laimennoksiin ja määrätuille kasvatusalustoille. Tulokset lähetetään näytteet lähettäneeseen yritykseen, joka tekee yhteenvedon ja arvion laboratorion analyysien oikeellisuudesta.

Jokaisesta viljelystä tehtiin kaksi rinnakkaista viljelyä sekä maljavaluilla että Petrifilmeillä. Lisäksi hiivan ja homeen sekä kokonaisbakteereiden kohdalla käytettiin nopeutettua Petrifilm Rapid -kasvatusalustaa. Petrifilmeillä viljeltiin rinnakkain kaksi mikrobiologista interkalibrointinäytettä. Taulukossa 1 esitetään kasvatusalustojen inkubointilämpötilat ja -ajat, joiden mukaan inkuboinnit suoritettiin.

Taulukko 1. Inkubointilämpötilat ja -ajat, joiden mukaan kasvatusalustoja inkuboitiin interkalibroinnissa.

Kasvatusalusta	°C	Inkubointiaika
Enterot maljavalu	+ 37 °C	24 h
Enterot Petrifilm	+ 37 °C	24 h
Hiiva&home maljavalu	+ 25 °C	5 vrk
Hiiva&home Petrifilm	+ 25 °C	5 vrk
Hiiva&home Petrifilm Rapid	+ 25 °C	48 h
Kokonaiset maljavalu	+ 30 °C	72 h
Kokonaiset Petrifilm	+ 30 °C	72 h
Kokonaiset Petrifilm Rapid	+ 32 °C	24 h

3.1.1 Interkalibroinnin toteutus

Huomattiin, että pipetointi ja levitys olivat pääosin helppoa sekä nopeaa Petrifilmeille. Nopeutetuille Petrifilm Rapid -kasvatusalustoille näytteen tasainen levitys osoittautui haasteellisemmaksi kuin muissa kasvatusalustoissa. Petrifilmeille erikseen tarkoitettuja levittämiä käytettiin apuna levityksissä. Ainoastaan enterobakteereiden Petrifilmille näyte levittyi ilman levitintä helposti.

Erytisesti enterobakteereiden Petrifilm-kasvatusalusta oli nopea verrattuna maljavalutekniikkaan. Maljavalutekniikka vaatii vielä erillisen agarpinnan jo hyytyneen agarpinnan päälle, jotta mahdolliset pesäkkeet eivät kasvaessaan lähde leviämään ja niiden tulkinta vaikeutuisi. Petrifilm ei vaadi kuin noin minuutin jähmettymismisajan ennen inkubointia, maljavalun jähmettymiseen taas menee noin puoli tuntia.

Inkuboinnin aikana huomattiin, että kokonaisbakteereiden Petrifilmin nopeuttamaton versio oli myös luettavissa jo 24 tunnin inkuboinnin jälkeen nopeutetun version tapaan. Inkubointia jatkettiin ohjeiden mukaisesti 72 tuntiin asti, mutta otettiin välitulos vuorokauden kohdalla ylös.

Enterobakteeri Petrifilmeistä pesäkkeiden laskeminen oli helppoa, samoin kuin pesäkkeiden siirrostus maljavalun kokonaismaljalle. Kokonaismaljaa inkuboitiin + 37 °C:ssa vuorokausi, jonka jälkeen kasvusta tehtiin oksidaasitestit. Enterobakteereiden varmistamiseen tullaan todennäköisesti aina tarvitsemaan maljavalun kokonaismalja, jonka pinnalle saadaan siirrostettua epäilty enteropesäke. Ilman tätä välivaihetta oksidaasitesti voi antaa virheellisen tuloksen.

Kokonaisbakteereiden Petrifilm Rapid -kasvatusalustalla pesäkkeet olivat sinisiä ja hieman levinneitä sekä suttuisia. Nopeuttamattomassa Petrifilm-kasvatusalustalla pesäkkeet olivat melko pieniä verrattuna nopeutettuun versioon. Väriltään pesäkkeet olivat punaisia.

Hiivojen ja homeiden Petrifilm Rapid -kasvatusalustalla ei näkynyt kasvua lainkaan, kun puolet inkubointiajasta oli kulunut (24 h). Nopeutetussa kasvatusalustassa ei voi erottaa, onko kasvu hiivaa, hometta vai molempia. Mikroskopoimalla tämän pystyy kuitenkin selvittämään.

3.1.2 Interkalibrointien tulokset

Taulukoissa 2–7 on ilmaistu kasvatusalustoilla kasvavien pesäkkeiden lukumäärät. Taulukossa 3 punaisella olevat pesäkemäärät ovat liian suuria verrattuina Petrifilmien vastaavaan laimennoksen tuloksiin, jotka on merkitty sinisellä. Pesäkemäärien suuri ero johtunee siitä, että maljavalun pesäkkeet olivat levinneet, ja tämä vaikeutti maljavalun tulkintaa. Kaikki muut rinnakkaisviljelyt menivät pesäkkeiden epätasaisen jakautumisen luotettavuusvälille [liite 1].

Taulukko 2. Enterobakteereiden lukumäärät (pmy/ml) ensimmäisessä interkalibrointinäytteessä.

LAIMENNOS	Maljavalu1	Maljavalu2	oksidaasi	Petrifilm1	Petrifilm2	oksidaasi
10^{-1}	>150	>150		>150	>150	
10^{-2}	>150	>150		>150	>150	
10^{-3}	20	17	5/5 oks.-	15	15	5/5 oks.-
10^{-4}	2	1		4	0	

Taulukko 3. Enterobakteereiden lukumäärät (pmy/ml) toisessa interkalibrointinäytteessä.

LAIMENNOS	Maljavalu1	Maljavalu2	oksidaasi	Petrifilm1	Petrifilm2	oksidaasi
10^{-1}	92 + lev.	75 + lev.		49	48	
10^{-2}	5	5 + lev.	5/5 oks.-	8	6	5/5 oks.-
10^{-3}	2	1		3	<1	
10^{-4}	<1	<1		<1	<1	

Taulukko 4. Kokonaisbakteereiden lukumäärät (pmy/ml) ensimmäisessä interkalibrointinäytteessä.

LAIMENNOS	Maljavalu1	Maljavalu2	Petrifilm1	Petrifilm2	Petrifilm Rapid1	Petrifilm Rapid2
10^{-2}	>250	>250	>250 (>250)	>250 (>250)	>250	>250
10^{-3}	39	43	36 (35)	52 (43)	33	33
10^{-4}	5	3	4 (4)	3 (3)	5	2

Taulukossa 4 suluissa olevat arvot ovat pesäkkeiden lukumäärät (pmy/ml) 24 tunnin inkuboinnin jälkeen.

Taulukko 5. Kokonaisbakteereiden lukumäärät (pmy/ml) toisessa interkalibrointinäytteessä.

LAIMENNOS	Maljavalu1	Maljavalu2	Petrifilm1	Petrifilm2	Petrifilm Rapid1	Petrifilm Rapid2
10^{-2}	112	102	113	102	88	85
10^{-3}	10 + lev.	7	15	11	12	9
10^{-4}	<1	<1	2	1	3	1

Taulukko 6. Hiivojen ja homeiden lukumäärät (pmy/ml) ensimmäisessä interkalibrointinäytteessä.

LAIMENNOS	Maljavalu1	Maljavalu2	Petrifilm1	Petrifilm2	Petrifilm Rapid1	Petrifilm Rapid2
1/1	>150	>150	>150	>150	>150	>150
10^{-1}	62	72	71	69	66	56
10^{-2}	6	7	9	3	4	5

Taulukon 6 pesäkkeet olivat hometta.

Taulukko 7. Hiivojen ja homeiden lukumäärät (pmy/ml) toisessa interkalibrointinäytteessä.

LAIMENNOS	Maljavalu1	Maljavalu2	Petrifilm1	Petrifilm2	Petrifilm Rapid1	Petrifilm Rapid2
1/1	>150	>150	>150	>150	>150	>150
10^{-1}	>150	>150	>150	>150	>150	>150
10^{-2}	20	16	34	31	28	18

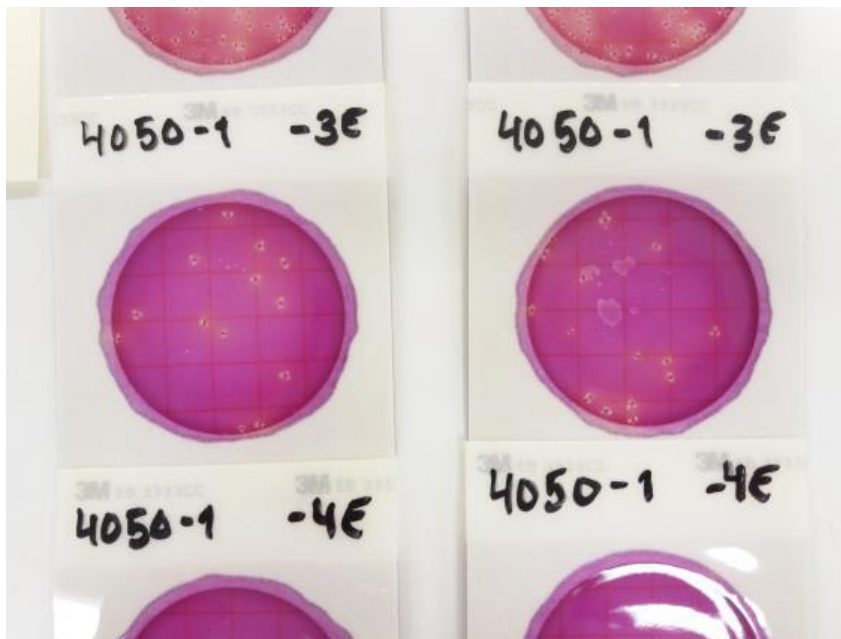
Taulukon 7 pesäkkeet olivat hiivaa.

3.1.3 Interkalibroinnin päätelmät

Interkalibroinnista saatiin positiivinen kuva Petrifilmien toimivuudesta. Ne antoivat pesäkemääriltään samaa suuruusluokkaa maljavalun kanssa, ottaen huomioon pesäkkeiden epätasaisen jakautumisen [liite 1].

Enterobakteereiden kasvatusalustassa pesäkkeet erottuivat helposti ja pesäkkeiden muodostamat kaasukuplat helpottivat pesäkkeen tunnistusta (kuva 1). Pesäkkeiden siirrostaminen kokonaisbakteerimaljalle jatkoviljelyä varten oli nopeaa ja helppoa.

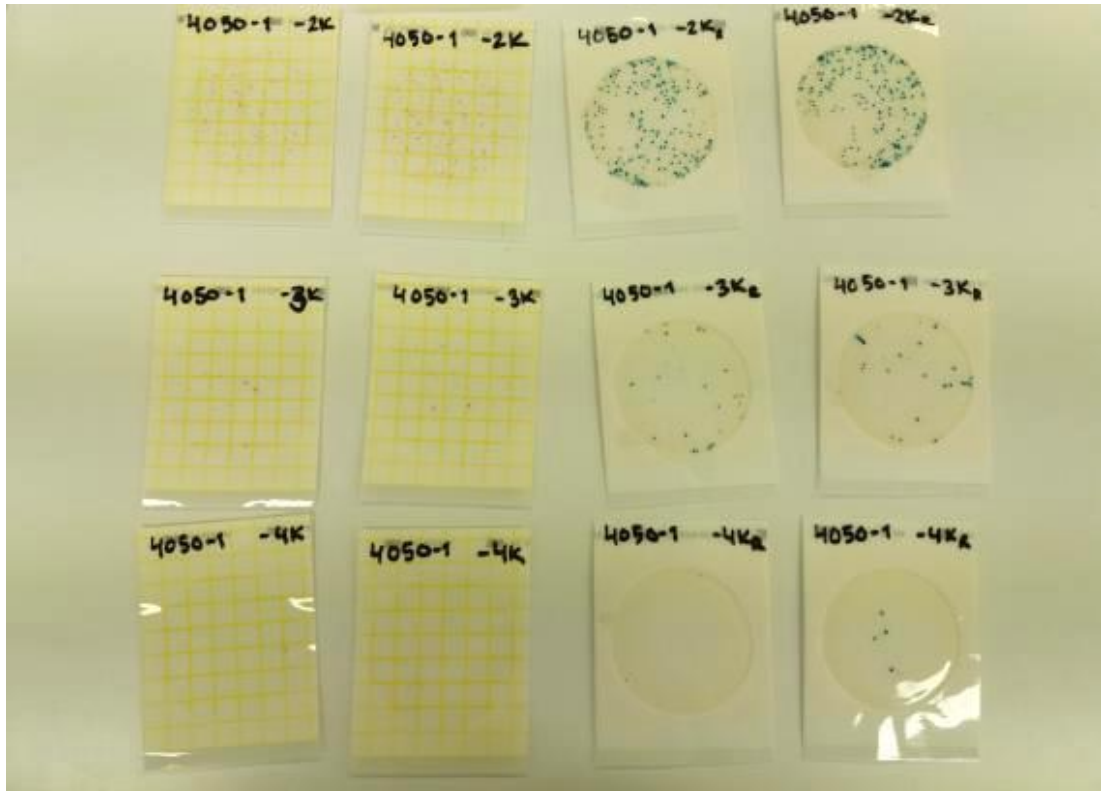
Mahdolliset enterobakteeripesäkkeet on varmistettava oksidaasitestillä, jotta voidaan varmistua pesäkkeiden olevan enterobakteereita. Oksidaasitestiä varten pesäkkeestä tai pesäkkeistä tehdään jatkoviljely kokonaismaljalle, jota inkuboidaan 24 ± 2 h ajan + 37 ± 1 °C:ssa. Kokonaismaljalla olevasta kasvusta tehdään oksidaasitesti. Petrifilmeille ei voi siirrostaa pesäkettä, sillä se on kuiva-alusta. Petrifilm ei siis sovellu enterobakteereiden varmistamiseen sellaisenaan, toisin kuin maljavalu.



Kuva 1. Interkalibrointinäytteen enterobakteerikasvua Petrifilmeillä.

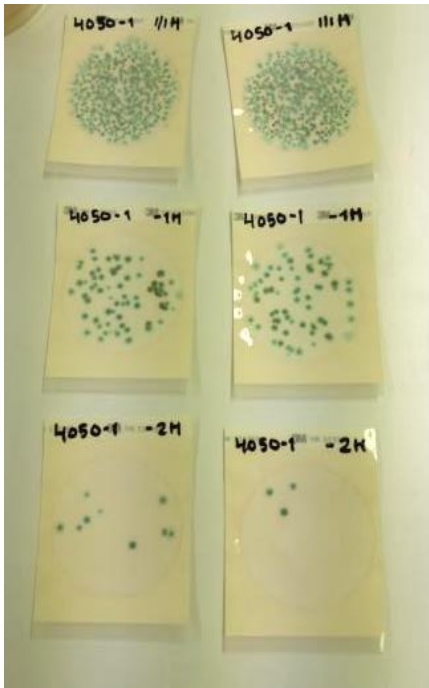
Kokonaisbakteereiden kasvatusalustalla pesäkkeet erotettiin hyvin alustan pienestä koosta riippumatta. Huomattiin, että Rapid-kasvatusalustalla pesäkkeet olivat rajoiltaan epätarkkoja (Kuva 2). Rapid-kasvatusalustan nopeus ei vakuuttanut, kun huomattiin

tavallisen version pesäkkeiden olevan laskettavissa samaan aikaan. Lisäksi Rapid-kasvatusalustalle näytteen levitys osoittautui aikaa vieväksi.



Kuva 2. Interkalibroinnin rinnakkaisviljelyt Petrifilmeillä, kokonaisbakteeri Petrifilmit (vas.) ja kokonaisbakteeri Petrifilm Rapid (oik.).

Hiivojen ja homeiden kasvatusalusta toimi hyvin. Pesäkkeitä ei voinut hajun perusteella luokitella hiivaksi tai homeeksi, ulkomuodosta sen sijaan voitiin päätellä pesäkkeiden olevan hometta (Kuva 3 ja 4). Päätelmä varmistettiin vielä mikroskopoimalla. Petrifilm Rapid -kasvatusalustalla pesäkkeet näkyivät vasta toisen vuorokauden puolella inkuboinnissa. Myös hiivojen ja homeiden Petrifilm Rapid -kasvatusalustalle näytteenlevitys oli hankalaa.



Kuva 3. Interkalibrointinäytteen homekasvua Petrifilmillä saman näytteen eri laimennoksista.



Kuva 4. Maljavalulla interkalibroinnin laimennoksen 10^{-2} homekasvua. Samaa kasvua ja laimennosta kuvan 3 alimmilla Petrifilmeillä.

3.2 Hiivat ja homeet

Oli tehtävä erilaisia kokeita ja rinnakkaisviljelyitä Petrifilmien ja maljavalujen välillä, jotta pystyttiin todentamaan, että Petrifilmeillä saadaan sama tulos kuin maljavaluilla. Kokeita varten oli kerätty eri hiivoja ja homeita, joita on tavattu kasvavan meijerituotteissa. Homeita oli punaista, valkoista, oranssia sekä vihreää. Homeista ei ole tehty tarkem-

paa lajiselvitystä. Hiivoja oli tuotteessa esiintyvien hiivalajikkeiden lisäksi perushiiva *Saccharomyces Cerevisiae*.

3.2.1 Hiivan ja homeen viljely Petrifilmein

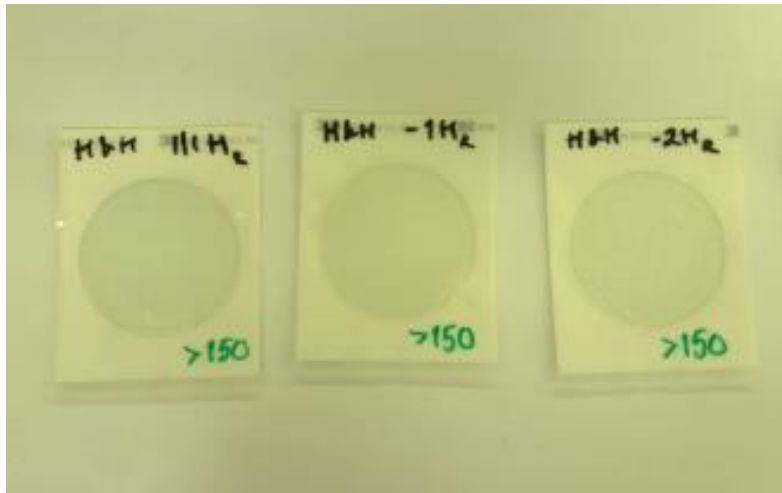
Ensimmäisessä kokeessa haluttiin kokeilla hiivojen ja homeiden käyttäytymistä Petrifilmeillä. Lisäksi haluttiin nähdä hiivojen ja homeiden eroavaisuuksia Petrifilmeillä niiden tunnistamisen helpottamiseksi.

Siirrostettiin vihreää hometta ja perushiivaa (*Saccharomyces Cerevisiae*) laimennusputkeen, jossa oli 9 ml steriiliä peptonvettä. Ensimmäisestä koeputkesta tehtiin laimennokset 10^{-1} ja 10^{-2} . Kasvatusalustoina käytettiin Petrifilm Yeast and Mould, Petrifilm Rapid Yeast and Mold sekä jo käytössä olevaa maljavalua vertailuna. Inkuboitiin kasvatusalustoja + 25 °C:ssa 5 vuorokautta, poikkeuksena Petrifilm Rapid -kasvatusalustat, joita inkuboitiin 48 tuntia. Kasvatusalustoja tarkasteltiin vuorokauden välein silmämääräisesti.

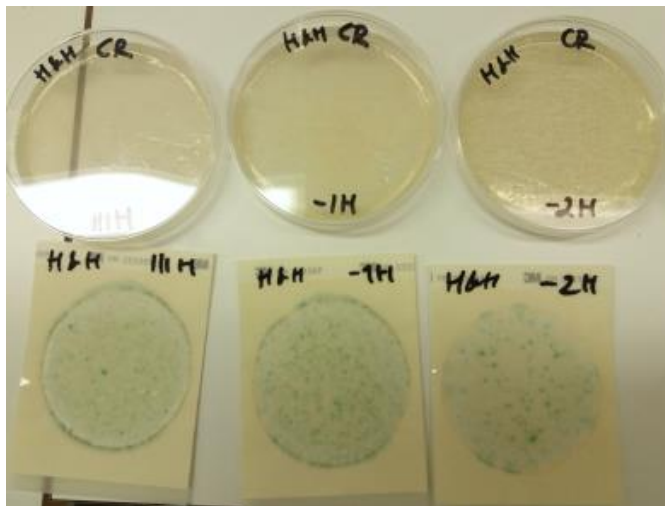
Maljavalu oli vuorokauden inkuboinnin jälkeen täynnä hiivaa. Petrifilmeissä ei vielä havaittu kasvua. 48 tunnin jälkeen Petrifilm Rapid -kasvatusalustat olivat myös kasvaneet täyteen (kuva 5), mutta tavallinen Petrifilm ei vielä osoittanut merkkejä kasvusta.

Lopputulena kaikissa kasvatusalustoissa kasvoi runsaasti hiivaa, mutta ei lainkaan hometta (Kuvat 5 ja 6). Todennäköistä oli, että hiiva on saanut itselleen kasvatusalustan ravinteet ja kasvutilan, jättämättä homeelle tilaa.

Kokeessa paljastui, että hiiva ei haise Petrifilmeissä. Eli epävarmat tapaukset on aina mikroskoipoitava. Maljavalussa runsaan hiivan haistaa helposti ja se on helppo erottaa hajun perusteella esimerkiksi agariin sekoittuneesta jogurtista. Oli myös yllättävää, kuinka nopeasti maljavalulla nähtiin tulokset verrattuna nopeutettuun Petrifilm Rapidiin ja etenkin normaaliin Petrifilmiin. Petrifilm Rapid Yeast and Mold näyttää valmistajan mukaan kaikki pesäkkeet samankaltaisina, joten hiivan ja homeen erottamiseksi olisi pesäkkeet mikroskoipoitava [2].



Kuva 5. Hiiva esiintyi pieninä sinisinä pisteinä Petrifilm Rapideissä, joissa pesäkkeitä kasvoi kasvatusalustan täydeltä.



Kuva 6. Ylärivissä maljavalun viljely ja alarivissä nopeuttamaton Petrifilm viljely. Viljelystä ovat rinnakkaisia kuvan 5 Petrifilm Rapid -kasvatusalustan kanssa.

3.2.2 Hiivan ja homeen tunnistaminen Petrifilmillä

Tässä kokeessa vertailtiin maljavalua ja Petrifilmin normaaliversiota. Ei käytetty Petrifilm Rapid -kasvatusalustoja tulevan viikonlopun vuoksi, koska tulokset olisivat saattaneet vääristyä viikonlopusta koituvasta lisäinkubointiajasta. Inkuboitin + 25 °C:ssa 5 vuorokautta. Edellisestä kokeesta huomattiin, että hiiva ottaa helposti kasvutilan homeelta sekä laimennusputkessa yksi pesäke hiivaa on todella paljon. Tämän vuoksi tehtiin laimennossarja aina 10^{-6} saakka. Kokeessa käytettiin samaa hiivaa (*Saccharo-*

myces Cerevisiae) ja hometta (vihreä), kuin edellisessä kokeessa. Hiivaa siirrostettiin yksi pieni pesäke ja hometta yksi kokonainen pesäke laimennosputkeen.

Tehtiin kolme eri laimennossarjaa. Laimennossarja A:ssa oli hiivaa, B:ssä hometta ja AB:ssä hiivan ja homeen sekoitus. Laimennossarjasta viljeltiin laimennokset 10^{-4} , 10^{-5} ja 10^{-6} . Taulukoissa 8 ja 9 on pesäkemäärät kasvatusalustoilta luettuina.

Taulukko 8. Maljavalun tulokset hiivan ja homeen viljelyssä (pmy/ml).

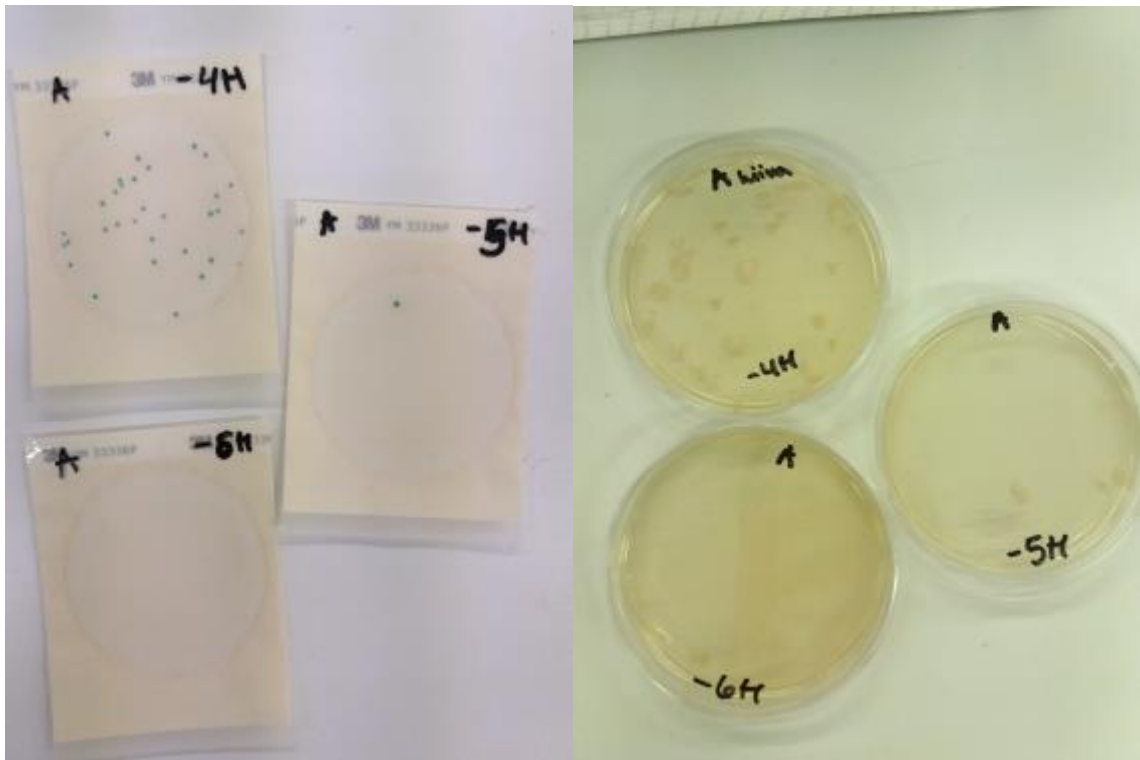
LAIMENNOS	A	B	AB
10^{-4}	29 hi	18 ho	24 hi 24 ho
10^{-5}	4 hi	1 ho	3 hi 1 ho
10^{-6}	1 hi	<1	1 hi

Taulukko 9. Petrifilmin tulokset hiivan ja homeen viljelyssä (pmy/ml).

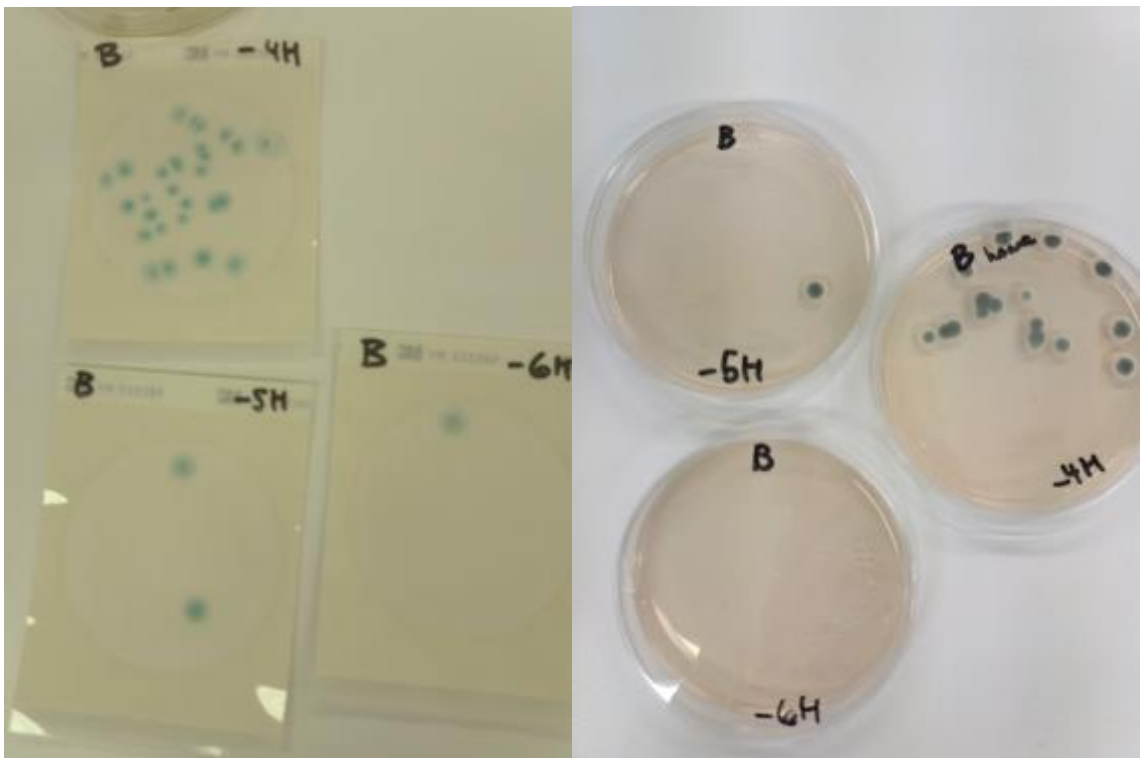
LAIMENNOS	A	B	AB
10^{-4}	32 hi	27 ho	38 hi 28 ho
10^{-5}	1 hi	2 ho	6 hi 3 ho
10^{-6}	<1	1 ho	<1

Taulukoista 8 ja 9 voidaan havaita, että pesäkeluvut ovat lähes samoja, riippumatta kasvatusalustasta. Kaikki pesäkeluvut menevät luotettavuusrajoihin [liite 1]. Tällä kertaa laimennokset osuivat myös hyvin ja pystyttiin laskemaan kaikki pesäkkeet. Myös hiivan ja homeen sekoitus onnistui siten, että myös home pystyi kasvamaan kasvatusalustalla.

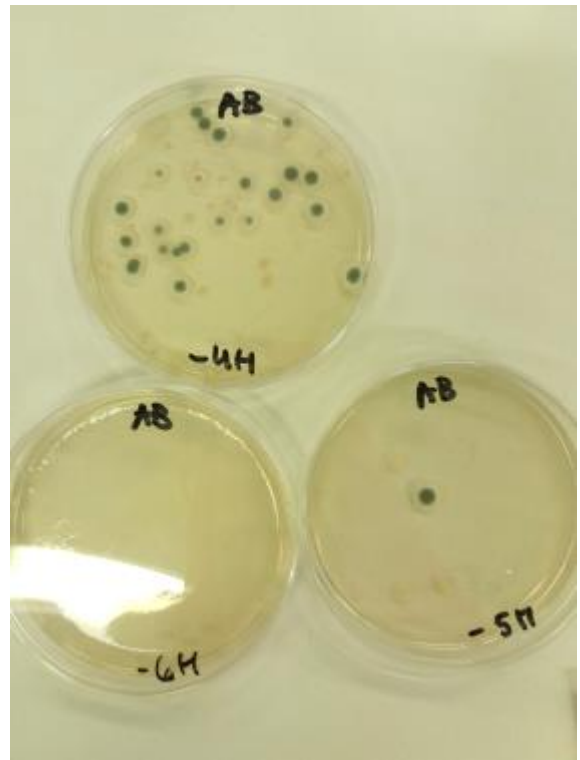
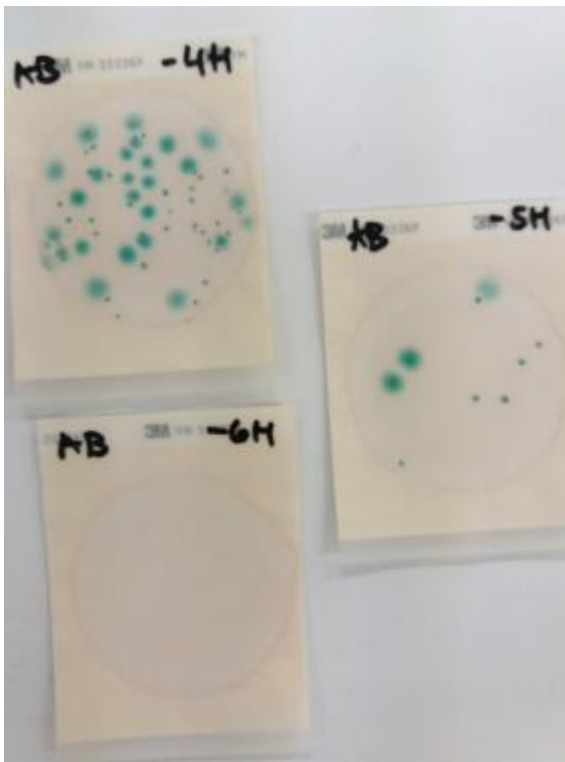
Hiivan ja homeen tunnistamiseen käytettiin apuna valmistajan ohjeita. Petrifilmillä hii-voille tunnusomaista ovat pienet ja selväraajaiset pesäkkeet, vaaleanpunaruskea tai sinivihreä väri, korkeat kolmiulotteiset pesäkkeet ja pesäkkeiden tasainen väri. Homeiden pesäkkeet ovat Petrifilmillä usein suuria, litteitä, rajoiltaan epämääräisiä ja vaihtelevan värisiä tummalla keskustalla. (Kuvat 7, 8 ja 9.)



Kuva 7. Hiivaa Petrifilmillä ja maljavalulla. Hiiva on Petrifilmillä teräväreunaista tummanvihreää.



Kuva 8. Hometta Petrifilmillä ja maljavalulla. Home on Petrifilmillä suurempi ja sumeampi kuin hiiva.



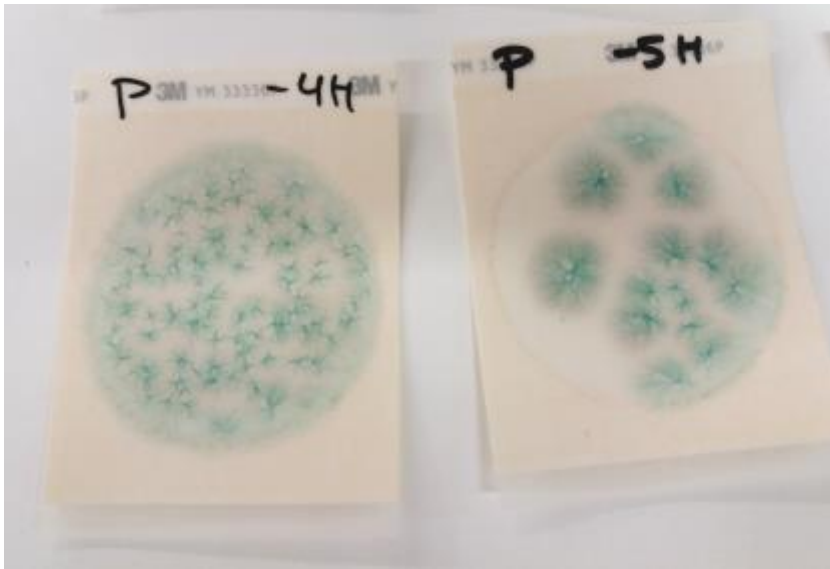
Kuva 9. Hiivan ja homeen erottaa selkeästi toisistaan sekä Petrifilmiltä että maljavalulta.

3.2.3 Eri homeiden ulkonäkö Petrifilmeillä

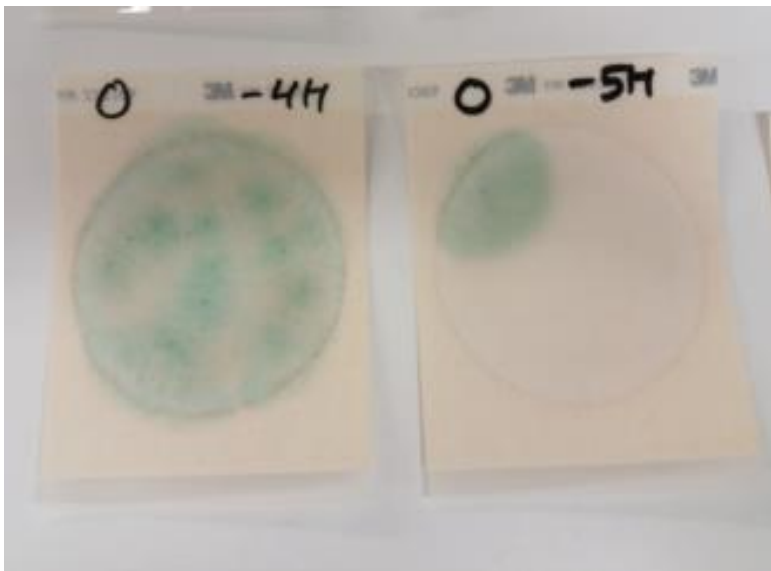
Haluttiin selvittää, vaikeutuuko homeiden ulkonäön tunnistus Petrifilmejä käytettäessä. Koska tähän asti kokeissa on käytetty vihreää homeetta, tässä kokeessa käytettiin oranssia, valkoista ja punaista homeetta. Vihreän homeen ulkonäkö Petrifilmillä on jo edellisen kokeen myötä tiedossa. Maljavalun hyvä puoli on se, että homepesäkkeet näyttävät samalta kuin esimerkiksi jogurtin pinnalla kasvaessa. On siis helppoa yhdistää inkubointitestissä jogurtin pinnalla näkyvä home samaksi kuin viljellyn jogurtin home, joka näkyy maljavalun pinnalla.

Jokaisesta eri homeesta tehtiin oma laimennossarja 10^{-7} saakka ja ensimmäiseen laimennosputkeen siirrostettiin koko homepesäke. Viljely tehtiin ainoastaan Petrifilmillä, ei Petrifilm Rapidillä. Maljavalulla homeiden ulkonäkö on jo tullut tutuksi, joten vertailuksi ei tarvittu maljavalua. Lisäksi kokeen tarkoituksena ei ollut lukumäärän vaan ulkonäön selvitys, joten silläkin perusteella maljavalun pystyi jättämään kokeesta pois. Petrifilmejä inkuboitiin + 25 °C:ssa 5 vuorokautta.

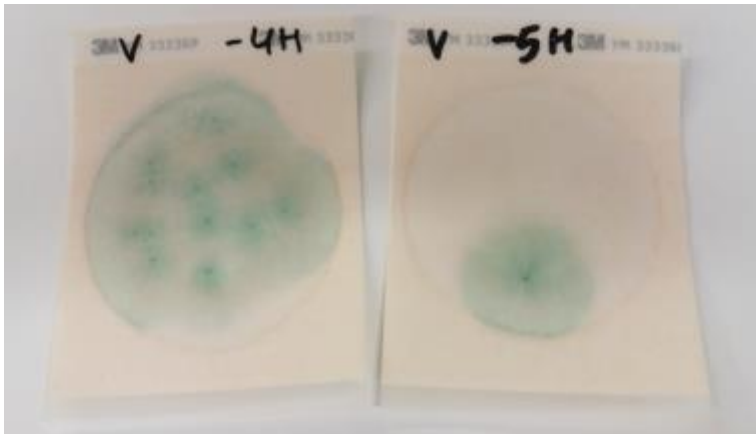
Kokeessa havaittiin, etteivät homeetkaan haise Petrifilmillä tunnistettavasti. Ainoa home, jonka erottaa Petrifilmiltä varmasti muista homeista, on punainen home. Vihreän homeen saattaa myös erottaa sen pienemmän koon vuoksi. (Kuvat 10, 11 ja 12.)



Kuva 10. Punainen home Petrifilmillä muodostaa rihmastomaista kasvua, kuten maljavalullakin.



Kuva 11. Oranssi home muodostaa isoa pesäkettä Petrifilmillä verrattuna vihreään homeeseen, joka muodostaa pienempää pesäkettä (kuva 8).



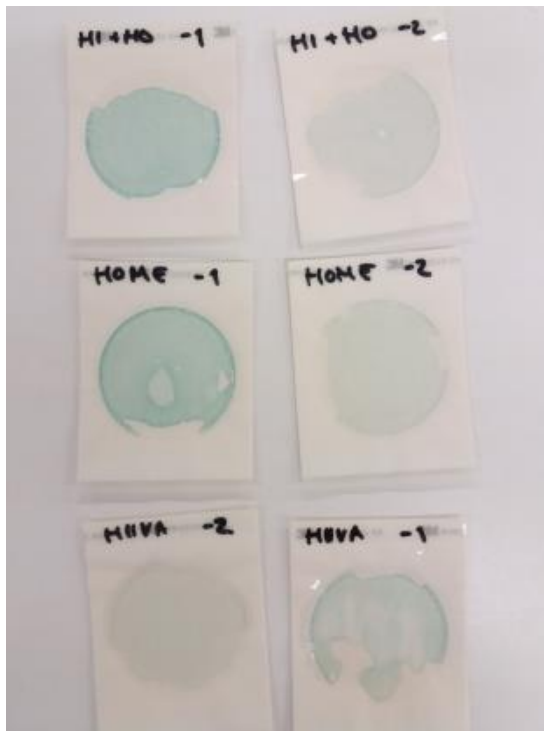
Kuva 12. Valkoinen home näyttää Petrifilmillä samalta kuin oranssi home. Petrifilm siis poissulki osan homeiden tunnistamisen Petrifilmiltä.

3.2.4 Hiivan ja homeen ympärys jogurttiin

Tähänastisissa kokeissa on käytetty peptonvettä, johon on ympätty hiivaa ja homeita. Nyt haluttiin kuitenkin selvittää, miten jogurttiin ympätyt hiiva ja home vaikuttavat Petrifilmeillä kasvavien pesäkkeiden tulkintaan ja selkeyteen. Olennaista kokeessa oli myös kokeilla, miten hyvin laimennettu jogurtti levittyy Petrifilmeille.

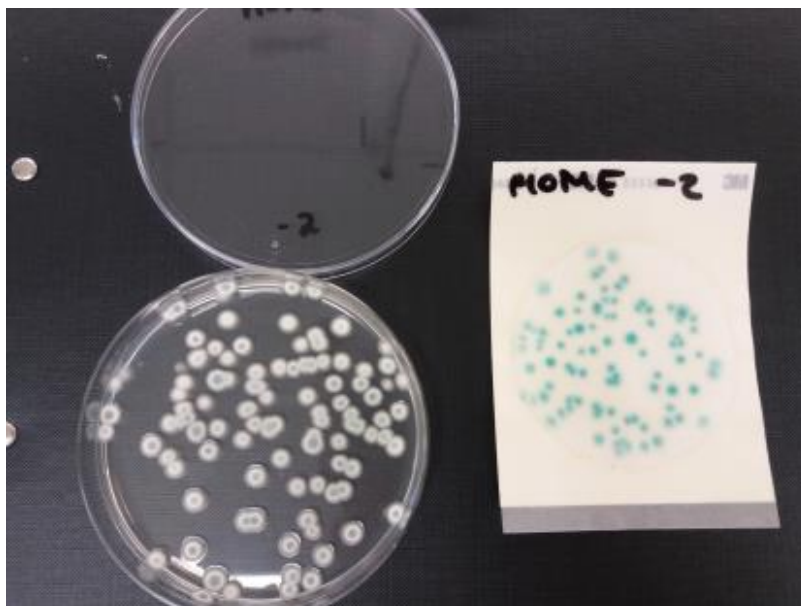
Tehtiin kolme eri ympäystä. Ympätettiin 100 grammaan kreikkalaista jogurttia 1 ml peptonvettä, jossa oli yksi leivinhiivapesäke, yksi vihreän homeen pesäke ja yksi molempia edellä mainittuja pesäkkeitä. Sekoitettiin hyvin ja punnittiin jokaista versiota 10 grammaa, joista tehtiin laimennokset 10^{-1} ja 10^{-2} . Kasvatusalustoina käytettiin maljavalua, Petrifilmiä ja Petrifilm Rapidia. Inkuboitiin 4 vuorokautta + 25 °C:ssa.

Koetta tehdessä havaittiin, että näytteen levittäminen Petrifilm Rapidille oli haastavaa. Näyte ei pysynyt kunnolla sille tarkoitetulla alueellaan, mikäli käytti levitintä näytteen levityksessä. Levittimen käyttö oli kuitenkin välttämätöntä, sillä ilman sitä näyte ei levittänyt lainkaan. Mahdollisia syitä voisi olla kasvatusalustan kuivuus, jogurttia sisältävä näyte sekä käyttäjän tottumattomuus käyttää kyseisiä alustoja. (Kuva 13.)



Kuva 13. Petrifilm Rapidille näytteen tasainen levitys osoittautui hankalaksi. Näytteen epätasainen levitys vaikeuttaisi pesäkkeiden lukumäärien laskemista.

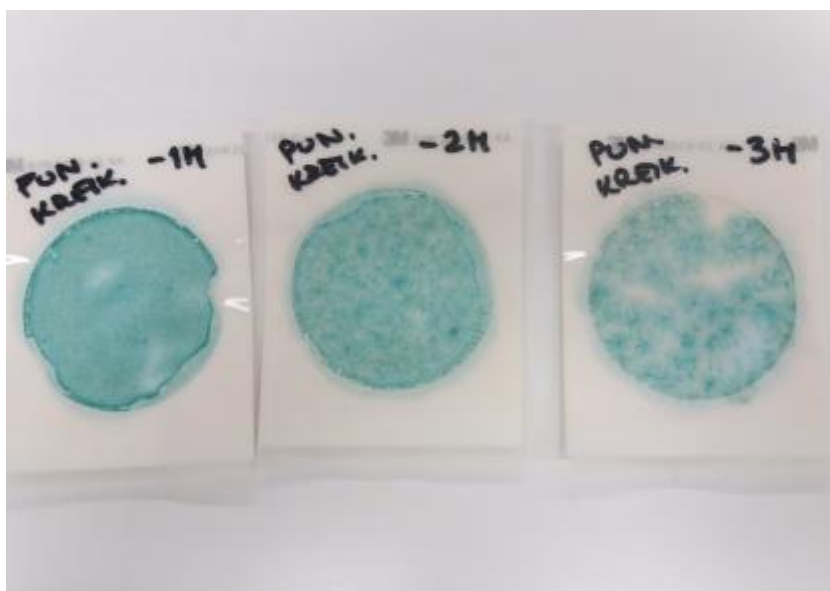
Vain homeiden laimennos 10^{-2} oli laskettavissa Petrifilmiltä ja maljavalulta. Näiden kahden tulos on luotettavuusrajoihin menevä (Kuva 14) [liite 1].



Kuva 14. Laimennoksen 10^{-2} rinnakkaisviljelyt maljavalulla ja Petrifilmillä 10^{-2} . Maljavalussa homepesäkkeitä 97 kpl ja Petrifilmissä 87 kpl.

Inkubointitestissä löydettiin punaista hometta kasvava jogurtti, josta tehtiin myös viljelyt. Otettiin 10 grammaa jogurttia, jossa oli mukana pesäke hometta. Tehtiin laimennossarja 10^{-3} saakka. Inkuboitiin + 25 °C:ssa 3 vuorokautta, poikkeuksena Petrifilm Rapid -kasvatusalustat, joita inkuboitiin 3 vuorokautta (suositeltu 2 vrk, mutta viikonlopun vuoksi pidempi aika). Poikkeuksellisesti normaaleja Petrifilmejä ja maljavalua inkuboitiin lyhyempään, sillä kasvu oli jo selkeästi näkyvillä.

Kasvatusmaljat olivat kasvaneet yli, mutta kokeen tärkein ajatus oli kokeilla Petrifilmin toimivuutta oikeasti hometta sisältävän jogurtin viljelyssä. Ensimmäistä kertaa myös Rapid versiosta oli mahdollista erottaa hometyyppi punaiseksi homeeksi sen rihmastomaisen ulkonäön ansiosta. (Kuva 15.)



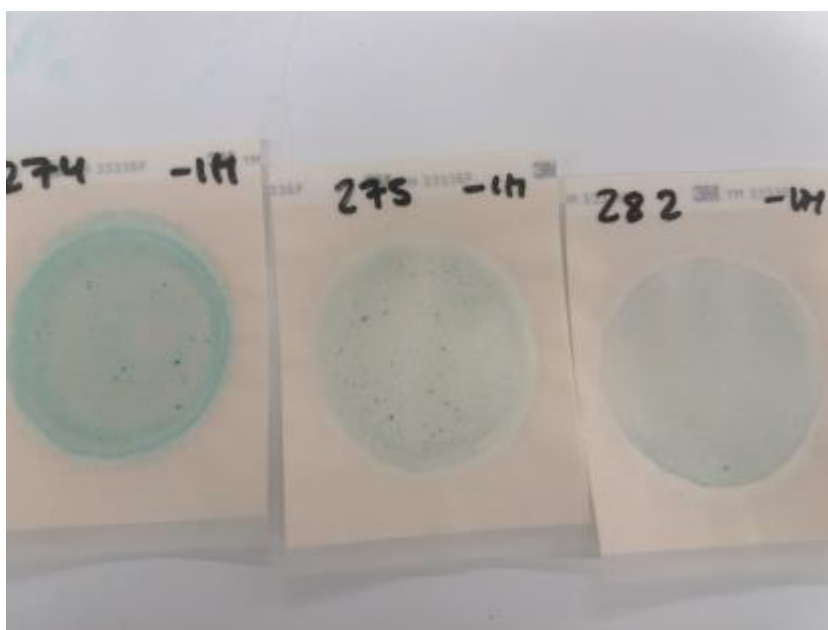
Kuva 15. Petrifilm Rapidillä punaisen homeen rihmastomainen kasvu.

3.2.5 Inkuboitujen jogurttien viljely

Kokeen tarkoituksena oli selvittää laajemmassa mittakaavassa Petrifilmien käyttöä. Haluttiin viljellä sellaisia tuotteita, joiden viljelyyn Petrifilmejä voitaisiin käyttää. Jogurteihin ei ympätty kasvu, jotta saataisiin tietää, miltä erilaiset tuotteet näyttävät Petrifilmillä. Haluttiin myös selvittää, miltä mahdollinen kasvu näyttäisi Petrifilmillä ja näkyisikö se herkemmin vai heikommin Petrifilmillä kuin maljavalulla.

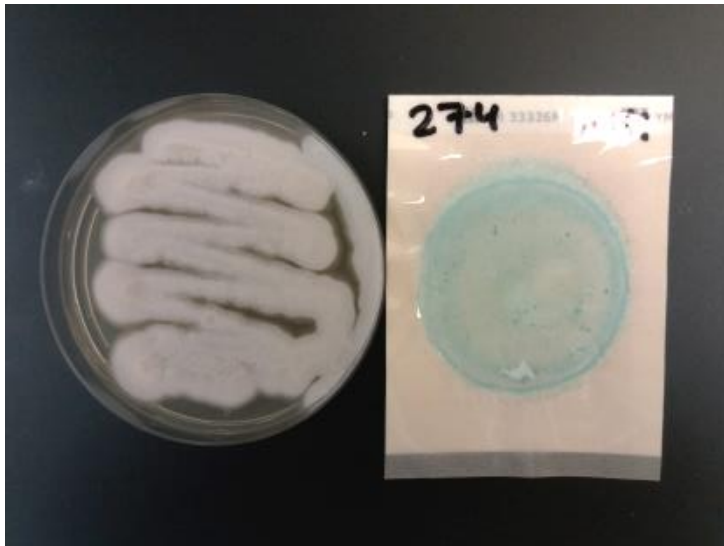
Viljeltiin kaksi vuorokautta + 25 °C:ssa inkuboiduista tuotteista laimennoksesta 10^{-1} hiivat ja homeet Petrifilmeillä ja maljavaluilla. Inkuboitiin kasvatusalustoja + 25 °C:ssa viisi vuorokautta.

Huomattiin, että osa Petrifilmeistä oli värjäätynyt sinertäväksi ja vihertäväksi. Monessa Petrifilmissä oli myös nähtävissä epätasaista väriä ja pesäkemäisiä pisteitä. (Kuva 16). Koska pesäkemäiset pisteet eivät muistuttaneet hiivaa eivätkä hometta, oletettiin niiden olevan näytteen sisältämää hilloa tai muuta tuotetta.



Kuva 16. Eniten sinertävät ja vihertävät Petrifilmit inkuboinnin jälkeen. Petrifilm 275 on puhdas, 274 ja 282 Petrifilmeissä kasvua.

Epämääräisistä "pesäkkeistä" varmistettiin mikroskopoimalla, etteivät ne ole hiivaa tai hometta. Näytteessä 274 (kuvassa 16 vasemmalla) kasvoi hiivan ja homeen sekoitusta (kuva 17 ja 18). Petrifilmiltä siirrostettiin kasvua maljavalulle, jotta saatiin tietää kasvun ulkonäkö. Näytteessä 275 Petrifilmiltä mikroskojettiin erilaisia "pesäkkeitä", mutta kasvua ei havaittu. Näytteen 282 viljelyssä alakulmassa oleva pieni pesäke varmistui hiivaksi.



Kuva 17. Petrifilmin kasvun siirrostaminen maljavalulle osoitti inkuboinnin jälkeen kasvun ulkonäön maljavalulla.



Kuva 18. Näytteen 274 kasvun ulkonäkö mikroskoopissa.

Kokeesta voitiin tehdä päätelmä, että kasvun tunnistaminen on työlästä sen vaatiessa mikroskopointia hiemankin epävarmemmissa tapauksissa. Lisäksi on melko arpapeliä, osuuko mikroskopoitavaan kohtaan kasvua vai ei. On myös haastavaa tulkita Petrifil-

miä ja laskea, kuinka monta pesäkettä siinä kasvaa. Puhtaalla ja kasvavalla (kuva 16) Petrifilmillä ei ole huomattavaa eroa, jonka voisi huomata ilman vertailukappaletta.

3.2.6 Kasvatusalustojen kasvujen nopeuserot

Kokeessa verrattiin Petrifilmin ja maljavalun nopeutta hiivalle sekä homeelle tarkoitettujen kasvatusalustojen välillä. Petrifilm Rapid jätettiin kokeesta pois, sillä se oli osoittautunut näytteen huonon leviämisen ja tuloksen tulkinnan suhteen hankalaksi. Lisäksi huomattiin sen olevat valmis vasta kahden vuorokauden kuluttua suurillakin kasvuilla, kun maljavalu näyttää suuren hiivakasvun jo vuorokauden kohdalla.

Kokeessa käytettiin valkoista hometta homeena sekä meijerituotteissa tavattavaa hiivaa hiivana. Maustamattomasta jogurtista tehtiin laimennokset 10^{-1} , joihin toiseen lisättiin yksi pesäke hometta ja toiseen yksi pesäke hiivaa. Jatkettiin laimennossarjaa aina 10^{-5} saakka. Kasvatusalustoja inkuboitii + 25 °C:ssa 3 vuorokautta (viljelyt valmistuivat siihen mennessä) ja niiden kasvua tarkasteltiin 24 tunnin välein. Taulukoissa 10 ja 11 on kuvailtu vuorokauden välein kasvatusalustoilla nähtäviä muutoksia.

Taulukko 10. Petrifilmiltä ja maljavalulta nähtävät muutokset 24 h välein hiivan kasvatuksessa.

Hii-va	Petrifilm	Maljavalu
24 h	Laimennoksessa 10^{-1} hiivaa muistuttava pesäke, koko alusta vihertää/sinertää	Laimennoksessa 10^{-1} valkoista pistettä ei haise hiivalle, joten kyseessä todennäköisesti tuote
48 h	Laimennos 10^{-1} sinertää voimakkaasti muissa beigejä/värittömiä pesäkkeitä	selkeää, runsasta hiivakasvua
72 h	Laimennoksessa 10^{-1} yhä vain yksi selkeä pesäke, Värittömistä pesäkkeistä osa on ruvennut sinertämään	selkeää, runsasta hiivakasvua

Petrifilm osoittautui testissä epäselvemmäksi kuin maljavalu. Petrifilmin värittömät ja värilliset pesäkkeet varmistettiin mikroskopoimalla hiivaksi. Myös laimennoksen 10^{-1} selkeän pesäkkeen lisäksi koko Petrifilmillä kasvoi hiivaa. Runsaan hiivakasvun Petrifilm ilmeisesti kertoo ainoastaan värimuutoksella. Hiiva ei haissut Petrifilmeillä, mutta maljavaluista hiivan haistoi helposti.

Taulukko 11. Petrifilmiltä ja maljavalulta nähtävät muutokset 24 h välein homeen kasvatuksessa.

Home	Petrifilm	Maljavalu
24 h	Ei kasvua näkyvissä, pientä raidallisuutta alustoilla, jonka synnystä ei tietoa	Laimennoksissa 10^{-1} ja 10^{-2} haituvaisia pesäkkeitä
48 h	Selkeää kasvua	Selkeää kasvua
72 h	Selkeää kasvua 10^{-1} voimakkaasti raidallinen	Selkeää kasvua

Myös homeen viljelyssä Petrifilmiltä näkyi kasvua vuorokautta myöhemmin kuin maljavalulta. Homettakaan ei haistanut Petrifilmiltä.

Taulukossa 12 on esitetty kasvatusalustoilla kasvavien pesäkkeiden lukumäärät. Sinisellä värillä on ilmaistu liian matala tulos ja punaisella liian korkea, viitaten pesäkkeiden luotettavuusrajoihin rinnakkaisviljelyissä [liite 1].

Taulukko 12. Pesäkkeiden lukumäärät (pmy/ml) maljavalulla ja Petrifilmillä.

Hiiva	MV	PF
10^{-1}	>150	>150
10^{-2}	>150	>150
10^{-3}	>150	>150
10^{-4}	62	90
10^{-5}	16	5

Home	MV	PF
10^{-1}	>150	>150
10^{-2}	>150	>150
10^{-3}	80	59
10^{-4}	9	10
10^{-5}	2	1

Pesäkkeiden lukumäärät vastasivat toisiaan hyvin osuen luotettavuusvälille, hiivan laimennosta 10^{-4} lukuun ottamatta [liite 1].

3.2.7 Viljelyn nopeuserot Petrifilmillä ja maljavalulla

Eri menetelmien viljelyyn kuluvat ajat haluttiin selvittää. Viljeltiin yhdeksän samankaltaista näytettä ensin maljavalulla, sitten Petrifilmillä. Tuotteista viljeltiin hiivat ja homeet laimennoksella 10^{-1} . Sama henkilö suoritti viljelyt molemmille alustoille. Huomioitavaan ajan kulumiseen otettiin huomioon petrimaljojen/Petrifilmien levitys, numerointi, näytteen laimentaminen, pipetointi sekä agarin kaataminen/Petrifilmin levittimen käyttö.

Agarin tai Petrifilmin jähmettymistä ei laskettu aikaan, sillä laskettiin ainoastaan suoraan viljelyyn kuuluva aika; jähmettymisen aikana voi tehdä muita työtehtäviä.

Petrifilmiä käyttäen aikaa kului 11 minuuttia 21 sekuntia. Maljavalua käyttäen aikaa kului 12 minuuttia 2 sekuntia. Ajan säästö ei siis ole yhdeksän näytteen pelkässä viljelyn suorittamisessa vielä huomattava. Huomioon ei otettu maljavalun vaatimien järjestyksen ja esivalmistelujen vievää aikaa. Näitä ovat esimerkiksi agareiden sulatus, petrimalja- ja agarpullolaatikoiden hakeminen varastosta ja niiden purkaminen. Kokonaisuudessaan maljavalulla viljelyyn kuluu huomattavasti runsaammin aikaa kuin Petrifilmeillä viljelyyn.

3.2.8 Yhteenveto Petrifilmien käyttämisestä hiivoilla ja homeilla

Hyvät puolet hiivojen ja homeiden viljelyssä Petrifilmeillä oli ajan sekä tilan säästö. Petrifilmit ovat pienempiä kuin petrimaljat. Petrifilm ei vaadi erillistä agaria ja se on heti käyttövalmis, toisin kuin maljavalu. Jättemäärä pienenee huomattavasti, mikäli maljavalu korvataan Petrifilmeillä. Petrifilmien käyttöön ottamisen myötä luovuttaisiin kuitenkin maljavalun hyvistä ominaisuuksista. Kokeissa Petrifilm osoittautui tulkinnan puolestaan epävarmaksi, sillä sen pesäkkeitä on vaikea tunnistaa tai laskea lukumäärää, kun on viljelty hilloa sisältävää meijerituotetta. Petrifilmeissä kaikki epävarmat tai epäilyttävät tapaukset ovat mikroskoipoitava, sillä hiivaa tai hometta ei voi tunnistaa hajun perusteella. Lisäksi menetettäisiin homeen tunnistettavan ulkonäön, jollaisena se esiintyy sekä tuotteen pinnalla että maljavalulla. Rinnakkaisviljelyt antoivat hyvän vaikutelman Petrifilmien toimivuudesta, mutta hilloa sisältävät tuotteet vaikeuttivat homeen tunnistamista siten, ettei voitu laskea pesäkemääriä kaikista näytteistä. Interkalibrointinäytteiden rinnakkaisviljelyt maljavalun ja Petrifilmin välillä antoivat kuitenkin selkeät ja toisiinsa vastaavat tulokset, ottaen huomioon pesäkkeiden epätasaisen jakautumisen [liite 1].

3.3 Enterobakteerit

Enterobakteereiden viljelyyn menee maljavaluista eniten aikaa, sillä se tarvitsee maljavalun päälle vielä pinnan. Pinta estää pesäkkeitä leviämästä, ja sen voi kaataa hyytynneen maljavalun päälle. Agarin hyytymistä on siis odoteltava kaksi kertaa ennen inkubointia. Agarin keittämisessä jauheista on myös sattunut ”läheltä piti” -tilanteita, kun

agar on kiehunut erlenmeyeristä yli. Petrifilmit nopeuttaisivat enterobakteereiden viljelyä sekä lisääisivät työturvallisuutta laboratoriossa.

3.3.1 Enterobakteereiden viljely raakamaidoista

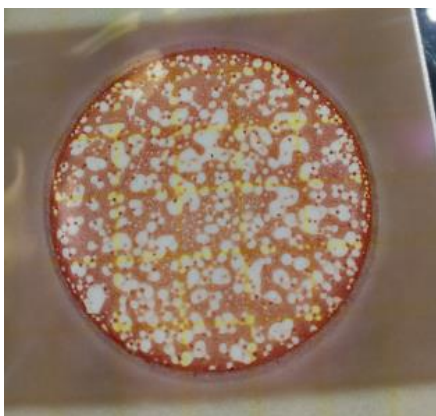
Raakamaidoissa havaitaan yleisesti pieniä määriä enterobakteereja, joten aloitettiin enterobakteereille tarkoitettujen Petrifilmien kokeet niiden viljelystä. Raakamaitoja säilytettiin steriileissä purkeissa noin yhden vuorokauden ajan jääkaapissa, jotta saataisiin kasvua kasvatusalustoille. Raakamaitoja oli viisi ja jokaisesta tehtiin 1/1-viljely sekä laimennoksesta 10^{-1} viljely sekä Petrifilmeillä että maljavaluilla. Kasvatusalustoja inkuboitiin $+ 37\text{ °C}$:ssa $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

Taulukossa 13 ilmenevistä tuloksista ainoastaan mätteen 1 rinnakkaiset 10^{-1} eivät menneet pesäkkeiden luotettavuusrajoihin maljavalulla viljeltynä [liite 1]. Näytteen 2 maljavalun 10^{-1} -tulos on hieman matala verrattuna vastaavaan suoraviljelyyn. Samoin näytteen 1 Petrifilmin 1/1-viljelyn tulos on melko pieni verrattuna saman näytteen laimennoksen 10^{-1} viljelyyn. Taulukon pesäkemäärät ovat kasvatusalustoilla kasvaneiden pesäkkeiden lukumäärät.

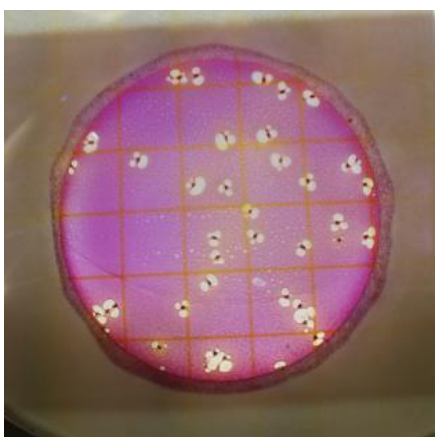
Taulukko 13. Raakamaitomätteen pesäkkeiden lukumäärät (pmy/ml) inkuboinnin jälkeen.

	MV 1/1	PF 1/1	MV 10^{-1}	PF 10^{-1}
Näyte 1	61	56	6	17
Näyte 2	87+lev	66	2	5
Näyte 3	>150	>150	30	27
Näyte 4	>150	>150	17	18
Näyte 5	>150	>150	32	38

Kokeesta saatiin positiiviset tulokset ajatellen maljavalun korvaamista Petrifilmeillä enterobakteereiden viljelyssä. Pesäkkeet olivat selkeästi erottuvia ja helposti tunnistettavia tyypillisiksi enterobakteeripesäkkeiksi. Lukumäärät vastasivat toisiaan hyvin, ja itse viljely oli helppoa tehdä maidolla Petrifilmille. (Kuva 19 ja 20.)



Kuva 19. Petrifilmillä kasvavia enterobakteereita on yli Petrifilmin määrittämissä rajoissa ja bakteerit ovat muodostaneet runsaasti kaasua.



Kuva 20. Petrifilmissä laskettava määrä pesäkkeitä, jotka ovat muodostaneet kaasua.

3.3.2 Enterobakteereiden Petrifilmin värin tasaisuuden selvittämien

Maljavalun enteromaljoissa on satunaisesti hieman enteropesäkettä muistuttavaa väriaineesta johtuvaa värjäymää. Koska Petrifilmillä enterobakteerit eivät välttämättä muodosta kaasua, haluttiin selvittää tuleeko vastaavanlaisia väriainejäämiä Petrifilmiin. Petrifilmin pesäkkeet ovat pieniä ja kaasua muodostamattomat pesäkkeet voisi sekoittaa väriaineen muodostamaan värjäymään.

Koetta varten pipetoitiin Petrifilmille 1/1 ja laimennos 10^{-1} UHT-käsiteltyä maitoa, jotta saatiin mahdollisimman puhdas viljely meijerituotteesta. Inkuboitiin normaalisti + 37 °C:ssa 24 h ± 2 h.

Inkuboinnin jälkeen Petrifilmin väri oli tasainen, joskin ilmakuplia oli hieman muodostunut. 1/1-viljelyssä Petrifilmi oli tummempi, mutta pesäkkeet erottuivat valoa vasten hyvin, vaikka ne eivät olisikaan muodostaneet kaasua.

3.3.3 *E. Colin* ympärys eri tuotteisiin

Tähän asti Petrifilmeille on pipetoitu ainoastaan maitoa ja interkalibrointinäytteitä. Haluttiin kokeilla, miten Petrifilmit toimivat eri tuotteilla ja vaikuttaako liian matala pH tulokseen. Erityisesti hillollisten tuotteiden ulkonäkö inkuboinnin jälkeen kiinnosti, koska hillo saattaisi aiheuttaa virheellisiä tulkintoja pesäkkeiden tulkinnassa.

Valmistajan ohjeiden mukaan enterobakteereille tarkoitettu Petrifilm toimii pH-alueella 6,5–7,5. [2;3]. Meijerituotteissa lähes kaikki, paitsi maito, ovat happamia ja vaatisivat ennen Petrifilmille viljelyä pH:n säätämisen neutraalimmaksi. Tämä ei kuitenkaan suuren näytemäärän vuoksi ole mahdollista. Lisäksi pH:n säätäminen steriilisti olisi nykyisellä mittauslaitteistolla mahdotonta. Koe suoritettiin ilman pH:n säätämistä, kuten tähänkin asti on tehty maljavaluilla. Viljeltiin eri tuotteita 1/1 tai laimennoksella 10^{-1} . Valittiin mahdollisimman erilaisia tuotteita. Makuviili sekä smetana viljeltiin ennen kypsytystä, jotta näyte pystyttiin pipetoimaan laimentamattomana, kuten tavallisesti tehdään. Koska makuviili ja smetana eivät vielä olleet kypsyneet, niiden pH:t olivat lähempänä neutraalia kuin kypsyneenä. Laimennoksiin lisättiin *E. Coli* -kanta, jonka pitoisuus tiedettiin. Suoraan pipetoitaviin tuotteisiin *E. Coli* lisättiin suoraan tuotteeseen. 12 ml:aan näytettä pipetoitiin 180 μ l *E. Colia* (30 μ l kanta muodostaa noin 71 pesäkettä). Tällöin 1 ml muodostaisi noin 35,5 pesäkettä. Sekoitettiin huolellisesti. Tehtiin viisi rinnakkaista sekä maljavalulla että Petrifilmillä.

Taulukkoista 14 ja 15 huomataan, että Petrifilmillä saatiin hyvinkin vastaavat tulokset verrattuna maljavaluun. Tulokset menivät luotettavuusrajoihin [liite 1]. Pesäkeluvut on ilmaistu kasvatusalustoilla kasvavien pesäkkeiden lukumäärinä. Petrifilm toimii siis myös happamilla tuotteilla, vastoin valmistajan ohjeita. pH ei merkittävästi nouse kohti neutraalia peptonvedellä laimennuksen jälkeen. Vertailuna näytteen numero 1 pH ilman laimennosta oli 4,39, kun laimennoksen jälkeen pH oli 4,65.

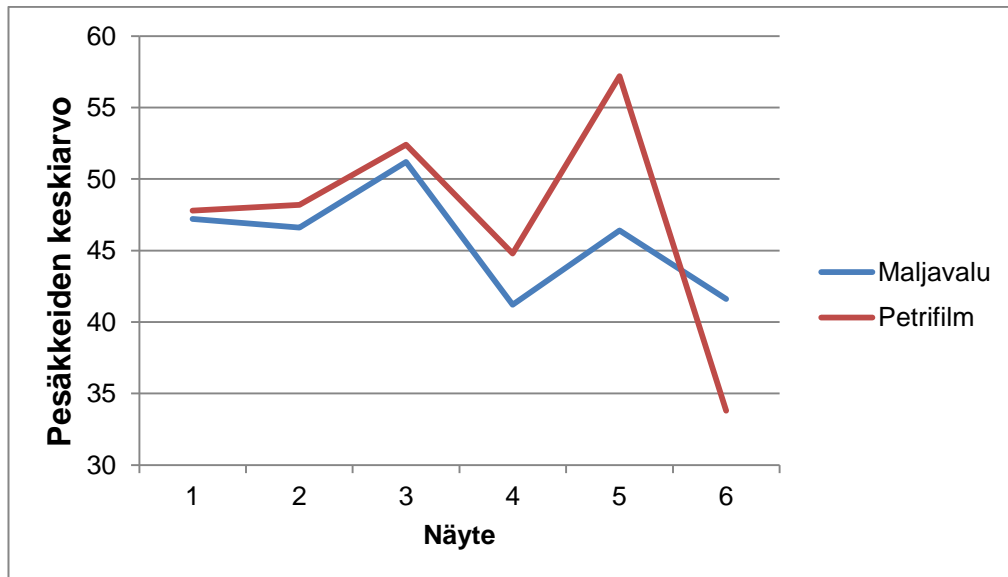
Taulukko 14. 5 rinnakkaisen maljavalun tulokset eri maitotuotteista sekä tuotteesta mitattu pH.

Numero	Näyte	pH	Laimennos	1	2	3	4	5	KA
1	Arla Protein Passion Papaya -hillollinen rahka	4,65	10 ⁻¹	50	45	52	57	32	47,2
2	Kotimaista Pehmeämpi Maitorahka	4,96	10 ⁻¹	49	53	52	35	44	46,6
3	Luonto+ Banaani Makuviili	6,04	1/1	52	43	53	48	60	51,2
4	Luonto+ Kurpitsa-banaani -hillollinen jogurtti	4,91	10 ⁻¹	34	36	45	45	46	41,2
5	Kotimaista AB maustamaton jogurtti	5,02	10 ⁻¹	46	41	51	52	42	46,4
6	Arla Smetana	6,26	1/1	41	48	30	48	41	41,6

Taulukko 15. 5 rinnakkaisen Petrifilmin tulokset eri maitotuotteista sekä tuotteesta mitattu pH.

Numero	Näyte	pH	Laimennos	1	2	3	4	5	KA
1	Arla Protein Passion Papaya -hillollinen rahka	4,65	10 ⁻¹	51	46	50	46	46	47,8
2	Kotimaista Pehmeämpi Maitorahka	4,96	10 ⁻¹	41	45	48	62	45	48,2
3	Luonto+ Banaani Makuviili	6,04	1/1	49	54	53	53	53	52,4
4	Luonto+ Kurpitsa-banaani -hillollinen jogurtti	4,91	10 ⁻¹	50	44	45	49	36	44,8
5	Kotimaista AB maustamaton jogurtti	5,02	10 ⁻¹	58	48	60	56	64	57,2
6	Arla Smetana	6,26	1/1	50	28	34	30	27	33,8

Kuvassa 21 on viivakaavio taulukoissa 14 ja 15 esitettyjen tulosten keskiarvoista. Pääosin keskiarvot vastaavat toisiaan erittäin hyvin, mutta näytteiden 5 ja 6 keskiarvojen ero on huomattavin. Suurimmatkaan keskiarvojen erotukset eivät kuitenkaan ole niin suuria, etteivät ne menisi luotettavuusvälille [liite 1]. Tulokset vastaavat toisiaan siis hyvin. Petrifilmit ovat antaneet viidestä rinnakkaisesta näytteestä hieman suuremman keskiarvon kuin maljavalujen rinnakkaiset. Poikkeuksena näyte numero 6, jossa maljavalut ovat antaneet suuremman keskiarvon kuin Petrifilmit.



Kuva 21. Viivakaaviona esitetty näytteiden keskiarvot.

Tehtiin lisää kokeita pH:n vaikutuksen selvittämiseksi eri tuotteilla, jotta saadaan lisää rinnakkaisia. Koe tehtiin samalla tavalla kuin yllä oleva, mutta pH:ta ei enää mitattu ja tehtiin vain kaksi rinnakkaista viiden rinnakkaisen sijaan.

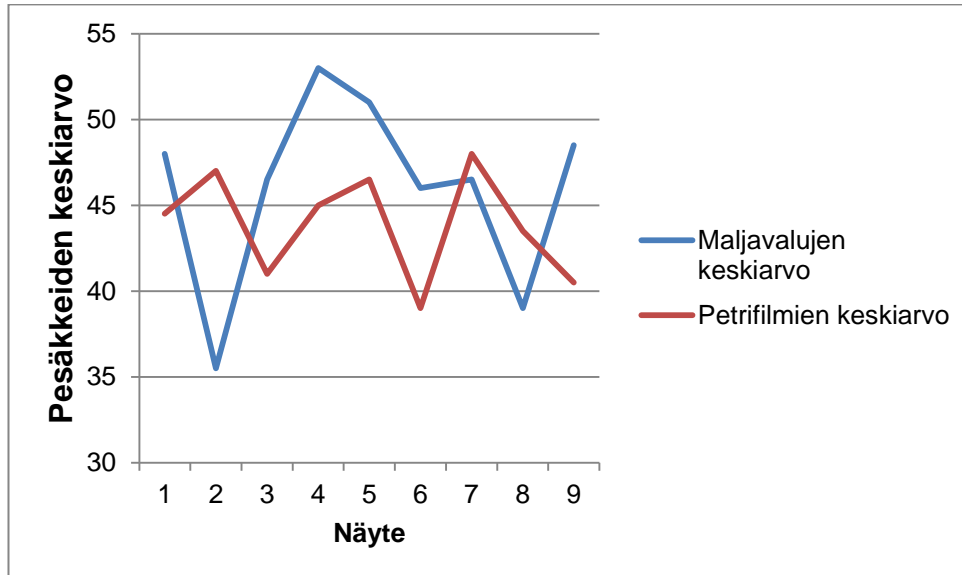
Taulukossa 16 on esitetty kasvatusalustoilla kasvaneiden pesäkkeiden lukumäärät. Tuloksista havaitaan, että kaikki rinnakkaisviljelyt menivät luotettavuusvälille [liite 1]. Rinnakkaistulosten lisäksi taulukossa on ilmoitettu sekä maljavalun rinnakkaisten että Petrifilmien rinnakkaisten keskiarvot.

Taulukko 16. Maljavalun ja Petrifilmin tulokset rinnakkain.

Nro	Tuote	Laimennos	MV	MV	MV KA	PF	PF	PF KA
1	Fraiche Kerma 30 %	-1	57	39	48	42	47	44,5
2	Kalinka Top vadelma jog	-1	34	43	38,5	47	47	47
3	Vadelma-vanilija rton jog	-1	49	44	46,5	44	38	41
4	0 % past.maito	1/1	49	57	53	38	52	45
5	1,5 % past.maito	1/1	49	53	51	43	50	46,5
6	3,5 % past.maito	1/1	39	53	46	41	37	39
7	Suklainen rohe -jäätelö	-1	41	52	46,5	50	46	48
8	Sulaa unelma -jäätelö	-1	43	35	39	39	48	43,5
9	Päärynä smoothie -jäätelö	-1	49	48	48,5	37	44	40,5

Kuvassa 22 on viivakaaviona esitetty maljavalujen ja Petrifilmien rinnakkaisten keskiarvot. Tässä kokeessa kuusi Petrifilmien keskiarvo oli kuudessa rinnakkaisessa maljavalu-

lua pienempi. Edellisessä kokeessa Petrifilmi antoi pääsääntöisesti korkeampaa keskiarvoa. Voidaan siis todeta, ettei Petrifilm anna jatkuvasti korkeampia tuloksia verrattuna maljavaluun.



Kuva 22. Viivakaaviona esitetty maljavalujen ja Petrifilmien keskiarvot.

3.3.4 Lukemaepävarmuudet enterobakteereilla

Laboratoriossa järjestetään tasaisin väliajoin lukemaepävarmuuskokeita, joiden avulla seurataan laboratorion laatutasoa. Laboratoriokohtaisissa lukemaepävarmuuksissa varmistetaan, että eri laborantit lukevat kasvatusalustojen pesäkkeet samalla tavalla ja että tulos on sama laborantista riippumatta. Henkilökohtaisissa lukemaepävarmuuksissa varmistetaan, että jokainen laborantti saa saman tuloksen eri lukukerroilla. Eli tulokset eivät ole riippuvaisia siitä, kuka pesäkkeet laskee ja laborantin oma pesäkkeiden lukeminen on tasaista. Lukemaepävarmuuskokeissa käytettiin edellisestä kokeesta valmistuneita Petrifilmejä. Valittiin kymmenen mahdollisimman selkeistä pesäkkeistä koostuvat kasvatusalustat, joissa oli noin 50 pesäkettä.

3.3.4.1 Henkilökohtaiset lukemaepävarmuudet

Kahdeksan laboranttia luki kahdesti samat kymmenen Petrifilmiä, joissa kasvoi enterobakteereja. Ensimmäisen lukukerran jälkeen Petrifilmien järjestys muutettiin, jotta laskijat eivät muistaisi tuloksia ja tämä ei vaikuttaisi tuloksiin. Vähintään yhdeksän rinnak-

kaisen laskun suhteellisen varianssin tulee olla alle 7,7 % ja henkilökohtaisen lukemaepävarmuuden (uz%) tulee olla alle 3. Liitteessä 2 on kokeen tulokset.

Liitteen 2 mukaan kaikki laborantit saivat yhdeksästä tai kymmenestä rinnakkain laskennasta varianssiksi alle 7,7 %. Petrifilmit 5 ja 8 olivat sellaiset, joissa suhteelliset varianssit nousivat liian korkeaksi kolmella laborantilla kahdeksasta. Tähän syynä todennäköisesti se, että numerossa 5 oli pesäkkeitä reilusti alle 50. Tämä aiheuttaa sen, että jo pieni erotus laskuissa aiheuttaa suuremman suhteellisen varianssin. Viisi laboranttia kahdeksasta läpäisi kuitenkin ensimmäisellä yrityksellä henkilökohtaisen lukemaepävarmuuskokeen. Petrifilmit ovat vielä suhteellisen tuntemattomia luettavia jokaiselle laborantille, joten mikäli koe uusittaisiin kyseisten laboranttien kohdalla, pääsisivät he todennäköisesti läpi erotusten ollessa jo ensimmäisessä kokeessa pieniä. Uudessa kokeessa olisi myös kiinnitettävä huomiota, että jokaisessa kymmenessä Petrifilmissä olisi lähemmäksi 50 pesäkettä, jotta koe ei olisi liian herkkä. Petrifilmit saattoivat myös vaurioitua, kun useampi laborantti laskee pesäkkeet pesäkelaskurilla. Pesäkelaskuriin asetetaan kasvatusalusta ja painetaan kynän kärjellä. Laskuri laskee automaattisesti painamiset pesäkkeiksi. Painaminen on voinut vaurioittaa pesäkkeitä, sillä Petrifilmit luettiin yhteensä 16 kertaa.

3.3.4.2 Laboratoriokohtainen lukemaepävarmuus

Laboratoriokohtaisiin lukemaepävarmuuksiin otettiin henkilökohtaisista lukemaepävarmuuksista yksi tulos rinnakkaista kohti. Näitä tuloksia verrattiin laboratorion kesken. Laboranttien välinen lukemaepävarmuus saa olla 18,2 %. Liitteessä 3 on esitetty laboratoriokohtaiset tulokset.

Tuloksista voidaan tulkita, että laboratoriokohtaiset lukemaepävarmuus meni läpi, vaikka henkilökohtaiset eivät menneet kaikilla. Laboratoriokohtaiseksi lukemaepävarmuudeksi saatiin 2,53 % ja hajonnat sijoituivat välille 0,55–2,28, ollen siis suhteellisen pieniä. Vuosina 2014–2018 laboratoriokohtaiset lukemaepävarmuudet asettuivat välille 1,14–3,60 % ja keskiarvo oli 2,28 %. Kun Petrifilmeillä saatuun laboratoriokohtaiseen lukemaepävarmuuteen vertaa keskiarvoa, on Petrifilmeillä saatu lukemaepävarmuus lähes keskinkertainen.

3.3.5 Enteropesäkkeiden siirrostaminen Petrifilmiltä

Enteropesäkkeet ovat pienempiä ja ulkonäöltään erilaisia Petrifilmillä kuin maljavalulla. Haluttiin varmistaa, että enteropesäkkeiden erottaminen ja siirrostus Petrifilmiltä on laboranteille selkeää. Enteropesäkkeitä siirrostettiin viisi kappaletta kokonaismaljalle sekä maljavalulta että Petrifilmiltä. Otettiin aikaa, jotta mahdollinen ajansäästö tulisi ilmi. Jatkoviljelmää inkuboiitiin + 37 °C:ssa yksi vuorokausi. Inkuboinnin jälkeen saatiin selville, että jokainen kolmesta laborantista oli erottanut ja onnistunut jatkoviljelemään enteropesäkkeet sekä maljavalulta että Petrifilmiltä. Taulukossa 17 on pesäkkeen siirrostuksiin kuluneet ajat.

Taulukko 17. Aika sekunneissa viiden pesäkkeen jatkoviljelemiseen maljavalulta ja Petrifilmiltä.

	MV (sek)	PF (sek)
Laborantti 1	149	107
Laborantti 2	94	67
Laborantti 3	140	82

Taulukon 17 tuloksista voidaan päätellä Petrifilmin olevan nopeampi enteropesäkkeiden jatkoviljelemiseen. Ajansäästö ei kuitenkaan ole kovin merkittävä, ottaen huomioon, ettei enteropesäkkeiden jatkoviljelyä tarvitse tehdä usein.

Enteropesäkkeiden jatkoviljelyyn osallistuneilta laboranteilta kysyttiin myös mielipiteitä enterobakteereille soveltuvasta Petrifilmistä. Pääosin mielipiteet olivat positiivisia ja Petrifilmeistä pidettiin. Negatiivista oli kuitenkin pesäkkeiden pieni koko ja niiden erilaisuus maljavaluun verrattuna, mikä vaatisi totuttelua.

3.3.6 T-testi enterobakteereiden viljelyssä

Haluttiin selvittää, onko eroa viljeleekö enterobakteereja maljavalulla vai Petrifilmillä. Kerättiin 48 rinnakkaista näytettä, joiden pesäkeluvut ylittivät 10 pesäkettä, jolloin ne ovat luotettavimpia tilastollisessa vertailussa (taulukko 18). Käytettiin parivertailu t-testiä, joka on kaksisuuntainen ja riippuvainen, sillä näyte on kahdessa rinnakkaisessa viljelyssä sama. Luottamustaso oli 95 % ja merkitsevyytaso 0,05.

Nollahypoteesi on, että erotusten odotettu keskiarvo on nolla. $H_0 : \mu_D = 0$
Vaihtoehoton hypoteesi on, että erotusten keskiarvo on erisuuri kuin nolla. $H_1 : \mu_D \neq 0$

Taulukko 18. Enterobakteereiden rinnakkaisviljelyt, joita käytettiin t-testissä.

Näyte	Maljavalu	Petrifilm	Erotus
1	50	51	-1
2	49	41	8
3	52	49	3
4	34	50	-16
5	46	58	-12
6	41	50	-9
7	45	46	-1
8	53	45	8
9	43	54	-11
10	36	44	-8
11	41	48	-7
12	48	28	20
13	52	50	2
14	52	48	4
15	53	53	0
16	45	45	0
17	51	60	-9
18	30	34	-4
19	57	46	11
20	35	62	-27
21	48	53	-5
22	45	49	-4
23	52	56	-4
24	48	30	18
25	32	46	-14
26	44	45	-1
27	60	53	7
28	46	36	10
29	42	64	-22
30	41	27	14
31	57	42	15
32	34	47	-13
33	49	44	5
34	49	38	11
35	49	43	6
36	39	41	-2
37	41	50	-9
38	43	39	4
39	49	37	12
40	39	47	-8
41	43	47	-4
42	44	38	6
43	57	52	5
44	53	50	3
45	53	37	16
46	52	46	6
47	35	48	-13
48	48	44	4

Maljavalun tulosten keskiarvo: 45,9375

Petrifilmin tulosten keskiarvo: 46,0625

Erotusten keskiarvo: -0,125

Erotusten keskihajonta: 10,3915...

Taulukon 19 mukaan enterobakteereiden t-testin p-arvoksi saatiin kaksisuuntaisella testillä 0,9339..., eli $p > 0,05$. Tulos ei siis ole tilastollisesti merkitsevää. Eli Petrifilmeillä saatu tulos on riittävän yhteinen maljavaluista saatuihin tuloksiin. Erotusten keskiarvo on pieni, lähes nolla.

Taulukko 19. Parittainen kahden otoksen t-testi keskiarvoille.

	<i>Petrifilm</i>	<i>Maljavalu</i>
Keskiarvo	46,0625	45,9375
Varianssi	64,23005319	50,44281915
Havainnot	48	48
Pearsonin korrelaatio	0,05875588	
Arvioitu keskiarvojen ero	0	
va	47	
t Tunnusluvut	0,08333949	
P(T<=t) yksisuuntainen	0,466967774	
t-kriittinen yksisuuntainen	1,677926722	
P(T<=t) kaksisuuntainen	0,933935548	
t-kriittinen kaksisuuntainen	2,011740514	

3.3.7 Yhteenveto Petrifilmien käyttämisestä enterobakteerien viljelyssä

Petrifilmin ja maljavalun rinnakkaiset antoivat hyviä tuloksia, jotka menivät pääosin pesäkkeiden luotettavuusrajoihin. T-testin tulos oli tilastollisesti ei-merkitsevää. Eli Petrifilmit ovat yhtä luotettavia enterobakteereiden viljelyssä kuin maljavalu. Pesäkkeet olivat selkeitä ja viljely helppoa. Positiivista oli viljelyn nopeus, sillä siihen ei tarvittu erillistä pintaa pesäkkeiden leviämisen estämiseksi. Viljely oli myös siistiä verrattuna maljavaluun, jossa agaripisaroita saattaa kaatamisen yhteydessä tippua pöydälle. Toimiva pH-alue oli myös onneksi laajempi kuin valmistaja lupasi, sillä pH:ta säätämättä päästiin samoihin pesäkemääriin kuin maljavalulla.

3.4 Kokonaisbakteerit

Valtaosa laboratorion kokonaisbakteereiden viljelyistä tehdään pastöroidusta maidosta. Muutamia viljelyitä tehdään myös vesinäytteistä.

3.4.1 Rinnakkaisviljelyitä pastöroidulla maidolla

Kokeen tarkoituksena oli selvittää Petrifilmien soveltuvuutta kokonaisbakteereiden viljelyyn pastöroidulla maidoilla. Tehtiin rinnakkaisviljelyitä maljavalulla ja Petrifilmilla pastöroidulla maidolla. Viljelyt tehtiin laimennokseen 10^{-2} , joka on tälläkin hetkellä käytössä laboratoriolle. Myös laimennosta 10^{-1} käytettiin, sillä laimennokset 10^{-2} ovat yleensä suhteellisen puhtaita. Koska pastöroitu maito sisältää luonnollisesti jonkin verran kokonaisbakteereja, ei ollut tarvetta ympätä maitoon bakteerikantaa. Kokonaisbakteereiden kasvatusalustoja inkuboitin $+ 30\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa kolme vuorokautta. Petrifilm Rapid -kasvatusalustoja inkuboitin $+ 32\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa 24 tuntia. Jo viljely vaiheessa huomattiin, kuinka pieneen tilaan Petrifilmit menevät verrattuna maljavaluihin (Kuva 23).

Taulukoissa on esitetty sinisellä liian matalat tulokset ja punaisella liian korkeat, verrattaessa rinnakkaisviljelyitä toisiinsa.

Taulukossa 20 on esitetty ensimmäisen pastöroitujen maitojen rinnakkaisviljelyiden tulokset. Tuloksissa on otettu laimennus huomioon. Petrifilm Rapid -kasvatusalusta paljastui pastöroidun maidon kokonaisbakteereilla toimimattomaksi. Pesäkeluvut on ilmoitettu punaisella, sillä kasvatusalustoja inkuboitin 24 tunnin sijaan kolme vuorokautta niiden kasvamattomuuden vuoksi. Myös nopeuttamattomat Petrifilmit ovat antaneet pientä lukemaa verrattuna maljavaluun. Tämä johtuu todennäköisesti siitä, että näytteen levityksessä käytettiin virheellisesti väärää Petrifilm-näytelevitintä, joka on hiivojen ja homeiden viljelyyn tarkoitettu.

Taulukko 20. Pastöroidun maidon rinnakkaisviljelyiden tulokset (pmy/ml) laimennoksilla 10^{-1} ja 10^{-2} .

Näyte	MV 10^{-1}	MV 10^{-2}	PF 10^{-1}	PF 10^{-2}	PFR 10^{-1}	PFR 10^{-2}
105	1470	1500	750	600	70	300
K78	1260	ei maljaa	770	500	20	200
T66	960	700	840	1200	150	200
KO8	<10	<10	10	100	<10	<100
KO9	970	1300	320	200	40	300

Taulukoissa 21–25 on maljavalun ja Petrifilmin rinnakkaisviljelyiden tuloksia. Tulokset ovat maljoilta luettuja pesäkemääriä, mikäli taulukon otsikossa ei kerrota toisin.

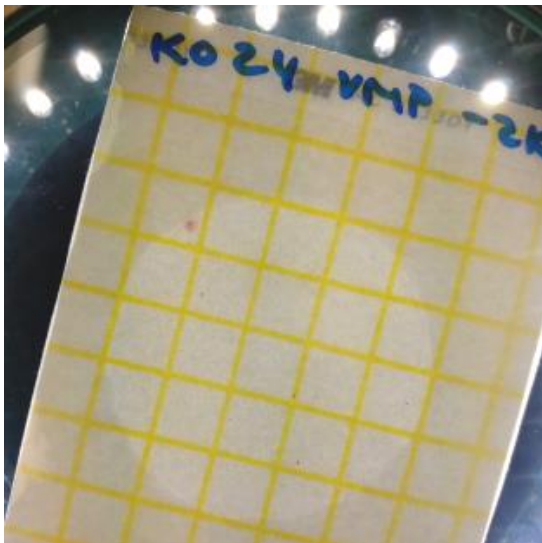
Taulukko 21. Pastöroiduista maidoista viljeltyjen näytteiden rinnakkaisia tuloksia maljavalulla ja Petrifilmillä laimennoksella 10^{-2} .

Näyte	MV	PF	Erotus
KO 36	<1	1	-1
KO 37	4	2	2
KO 38	6	3	3
KO 39	6	4	2
261	15	9	6
264	16	5	11
267	19	9	10
268	19	11	8
271	10	16	-6
K244	3	2	1
K246	6	3	3
K249	5	5	0
K250	2	2	0
K252	5	5	0
T58	15	15	0
T61	19	15	4
KO21 (VMP)	1	<1	1
KO23 (VMP)	8	6	2
KO24 (VMP)	8	2	6
KO26 (VMP)	4	7	-3

Talukossa 21 esiintyvien tulokset osuivat hyvin luotettavuusvälille, poikkeuksena yhden näytteen tulos [liite 1]. Huomioitavaa on, että Petrifilm antoi useammin matalamman tuloksen kuin maljavalu. Inkuboinnin aikana huomattiin, että kokonaisbakteeri Petrifilmeille viimeinen vuorokausi on tärkein pastöroidun maidon viljelyssä. Pesäkkeet ovat todella pieniä, ja lisävuorokausi inkuboinnissa tulosten ottamisen jälkeen ei suurentanut pesäkkeitä silmämääräisesti arvioituna (kuva 24). Jo valmiiksi isommat pesäkkeet levisivät musteen tavoin, kun inkubointia jatkettiin vuorokaudella. Kokeen suorittamisen aikana huomattiin, kuinka paljon Petrifilmit säästävät tilaa inkuboinnissa verrattuna maljavaluun (Kuva 23.).



Kuva 23. Kuvassa tarjottimella 20 maljavalua ja saman verran Petrifilmejä pinossa. Petrifilmit säästävät tilaa verrattuna maljavaluun.



Kuva 24. Petrifilmissä kahdeksan kokonaisbakteeripesäkettä, jotka eivät erotu juurikaan pienen kokonsa vuoksi.

Pesäkkeen pienen koon vuoksi viljeltiin Petrifilmeillä pastöroitua maitoa laimennoksella 10^{-1} . Maljavalut tehtiin normaalisti laimennoksella 10^{-2} , mutta muutamasta tehtiin laimennos 10^{-1} vertailun vuoksi. Tulokset (pmy/ml) ovat taulukossa 22.

Taulukko 22. Pastöroidunmaidon viljelyitä laimennoksella 10^{-1} Petrifilmillä. Pesäkemäärissä on otettu laimennos huomioon, jotta olisi helpompi vertailla tuloksia.

Näyte	MV 10^{-2}	PF 10^{-1}	MV 10^{-1}
287	<100	200	
289	2000	1390	
290	2100	1140+lev	
292	100	160	
295	<100	150	
297	100	180	110
300	300	360+lev	
2	300	350+lev	
3	400	420	
K268	200	130	
K273	<100	230	
K275	200	290	
K278	200	130	40
K280	200	200	
K283	500	410	
K284	1300	540	
T75	1100	190	
T79	100	320	320
KO41	500	800	430
183 (VMP)	700	500	
K157 (VMP)	10400	>2500	
T7 (VMP)	1000	1490	
KO29 (VMP)	2000	2100	
KO30 (VMP)	3000	1930	

Tulokset eivät vastanneet toisiaan tarpeeksi usein, jotta voitaisiin pitää toistettavuutta hyvänä. Pesäkkeiden koko ei muuttunut Petrifilmeillä suuremmiksi. Lisäksi Petrifilmien pesäkkeiden laskemisessa meni aikaa totuttua enemmän, sillä pesäkkeitä oli huomattavasti enemmän. Todettiin, että laimennos 10^{-1} ei ole mahdollinen sen vaatiman ajan vuoksi.

Tehtiin lisää rinnakkaisia viljelyitä laimennoksella 10^{-2} , jotta saataisiin riittävän monta rinnakkaista tulosten vertailemiseksi. Tulokset rinnakkaisista viljelyistä on taulukoissa 23–25.

Taulukko 23. Pastöroidun maidon rinnakkaisviljelyitä laimennoksella 10^{-2} .

Näyte	Maljavalu	Petrifilm	Erotus
107	8	5	3
108	5	6	-1
109	3	9	-6
111	4	4	0
112	6	15	-9
113	4	7	-3
116	7	20	-13
117	8	6	2
118	11	10	1
119	9	22	-13
120	5	13	-8
121	8	14	-6
122	12	13	-1
124	12	25	-13
125	6	3	3
126	2	4	-2
128	2	7	-5
129	1	4	-3
130	<1	6	-6
131	4	6	-2
K112	1	5	-4
K114	2	14	-12
K115	3	11	-8
K119	<1	4	-4
K122	4	4	0
K123	3	7	-4
K125	15	30	-15
K126	10	28	-18
K127	7	3	4
K128	7	4	3
K129	9	6	3
K132	2	4	-2
K133	<1	3	-3
K134	33	28	5
K136	40	20	20
K137	55	24	31
K138	2	2	0
T48	5	8	-3
T50	<1	8	-8
T53	18	37	-19
T54	21	50	-29

T59	1	3	-2
T60	2	4	-2
KO58	<1	5	-5
KO59	1	3	-2
KO60	7	6	1
KO61	5	10	-5
KO62	4	3	1
36 VMP	7	>250	
50 VMP	3	72	-69
K29 VMP	1	4	-3
K42 VMP	4	2	2
T4 VMP	7	17	-10
T12 VMP	1	7	-6
KO50 VMP	<1	4	-4
KO51 VMP	1	6	-5

Taulukosta 23 voidaan huomata, että Petrifilmit antavat enemmän liian suuren tuloksen kuin liian pienen. Tulos on siis päin vastainen kuin taulukossa 21 esitetystä kokeesta. Tähän voi olla syynä tottumattomuus laskea pesäkkeitä Petrifilmeistä. Toisaalta Petrifilmeissä kokonaispesäkkeet näkyvät punaisina, joten roskat ja pölyhiukkaset ovat helppoa jättää pois laskuista. Maljavalussa pesäkkeiksi saattaa sekoittua ilmakuplat, mutta Petrifilmeissä tämä mahdollisuus on lähes olematon pesäkkeiden värin ansiosta. Voidaan siis päätellä, että Petrifilmit eivät systemaattisesti anna suurempaa tai pienempää pesäkemäärää kuin maljavalut. Kokeessa huomattiin, että viimeisenä myyntipäivänä viljeltyjen maitojen pesäkkeet kasvoivat suuremmiksi verrattuna tuoreiden maitojen pesäkkeisiin (kuva 25).



Kuva 25. Suuremmat pesäkkeet viimeisenä myyntipäivänä viljeltyissä pastöroiduissa maidoissa.

Taulukko 24. Pastöroidun maidon rinnakkaisviljelyitä laimennoksella 10^{-2} .

Näyte	MV 10^{-2}	PF 10^{-2}	Erotus
254	5	1	4
255	9	4	5
259	24	11	13
260	11	1	10
263	17	9	8
264	15	19	-4
267	23	7	16
154 VMP	6	5	1
K77	4	2	2
K79	12	<1	12
K81	2	2	0
K85	11	3	8
K86	5	4	1
K88	10	5	5
K90	2	4	-2
K164 VMP	2	6	-4
T43	23	13	10
T44	11	13	-2
T46	21	10	11
T50	13	17	-4
T75 VMP	11	19	-8
KO 87	8	10	-2
KO 88	6	6	0

Rinnakkaisista tuloksista on saatu vain vähän yli 10 pesäkettä kasvavia rinnakkaisia. Pyrittiin saamaan maidon laimennos sellaiselle tasolle, että saataisiin noin 50 pesäkettä molempiin kasvatusalustoihin. Pipetoitiin pastöroituja maitoja 500–700 μ l 9 ml:aan steriloitua peptonvettä, sekoitettiin ja pipetoitiin 1 ml Petrifilmille.

Taulukko 25. Pastöroidun maidon rinnakkaistulokset vaihtelevilla laimennussuhteilla.

Näyte	MV	PF	Eroitus
1	66	46	20
2	87	76	11
3	89	68	21
4	83	65	18
5	37	35	2
6	72	57	15
7	76	62	14
8	61	59	2
9	69	39	30
10	85	90	-5
11	103	71	32
12	88	87	1
13	93	38	55
14	61	65	-4
15	77	68	9
16	36	80	-44

Kokonaisbakteereiden viljely pastöroidusta maidosta osoittautui vaikeaksi. Osa tuloksista osui hyvin pesäkkeiden luotettavuusväleille, mutta huomattava osa ei. Mikäli jätetään laskematta kahden ensimmäisen kokeen rinnakkaiset, joissa käytettiin myös Petrifilm Rapidia, 140 tehdystä rinnakkaisesta 31 viljelyä ei ole mennyt luotettavuusvälille [liite 1]. Tämä tarkoittaa yli 22 %, joka on yli joka viides rinnakkainen viljely.

3.4.2 Hanaveden viljely

Tehtiin laimentamattomasta hanavedestä kokonaisbakteereiden rinnakkaisviljelyitä Petrifilmillä ja maljavalulla. Kokeen päätarkoituksena oli selvittää, ovatko pesäkkeet yhtä pieniä kuin pastöroidun maidon kokonaisbakteeripesäkkeet ja soveltuuko Petrifilmit kokonaisbakteereiden viljelyyn hanavedestä. Tehtiin kymmenen viljelyä viidestä eri näytteestä. Jokaisesta näytteestä tehtiin kaksi viljelyä sekä maljavalulla että Petrifilmillä.

Pesäkkeet olivat Petrifilmillä pieniä, mutta helpommin laskettavissa kuin pastöroidun maidon pesäkkeet. Otanta on varsin pieni, joten sen voisi uusia useammalla rinnakkaisnäytteellä. Viljelyssä saatiin useampi luottamusvälille menevä tulos viljelyssä, aino-

astaan yksi rinnakkaisviljely ei mennyt luottamusvälille [liite 1]. Petrifilm antoi pääsääntöisesti korkeampia tuloksia kuin maljavalu. (Taulukko 26.).

Taulukko 26. Hanaveden kokonaisbakteeri määrät rinnakkaisviljelyissä.

Näyte	Maljavalu 1/1	Petrifilm 1/1	Erotus
1	17	23	-6
1	19	15	4
2	4	27	-23
2	9	18	-9
3	3	11	-8
3	3	9	-6
4	>250	>250	-
4	>250	>250	-
5	>250	>250	-
5	>250	>250	-

3.4.3 Ajan säästäminen viljeltäessä Petrifilmeillä

Määritettiin viljelyyn kuluva aika kokonais- ja enterobakteereiden viljelyssä pastöroidun maidon työpisteellä Petrifilmin ja maljavalun välillä. Maitoja oli molemmissa (Petrifilm ja maljavalu) viljelyssä kahdeksan, joista kahdesta viljeltiin pelkät enterobakteerit. Maidot oli numeroitu valmiiksi. Aikaa otettiin siitä, kun otettiin Petrifilmit/petrimaljat esille, kirjattiin kasvatusalustoille näytteen numerot sekä laimennos. Sekoitettiin ja avattiin maidot, tehtiin laimennokset ja pipetoitiin. Petrifilmeissä käytettiin levitykseen levitintä ja agarit haettiin maljavaluihin inkubointihauteesta, kuten normaalisti. Kasvatusalustat jätettiin pöydälle hyytymään, eikä niitä pinottu. Maljavalun aikaan tulee noin minuutti lisää, sillä enterobaakteerien viljelyyn tulee hyytymisen jälkeen kaataa pinta päälle. Hyytymisen odottelua ei kuitenkaan laskettu aikavertailuun mukaan, sillä sinä aikana voi tehdä muita työtehtäviä.

Aikaa maljavaluissa kului 10 minuuttia 36 sekuntia, johon lisätään vielä noin minuutti enteroagarin pinnan kaatamiseen. Petrifilmeillä viljelyyn aikaa kului 8 minuuttia 38 sekuntia. Eli Petrifilmeillä viljely on ajallisesti nopeampaa. Petrifilmien käyttöönottamisessa aikaa säästyisi myös muissa työtehtävissä, kuten agarin sulatuksesta. Kun otetaan huomioon sekä suorat että epäsuorat ajansäästämiset, Petrifilmit säästäisivät merkittävästi myös muuhun työskentelyyn kuluvaan aikaa.

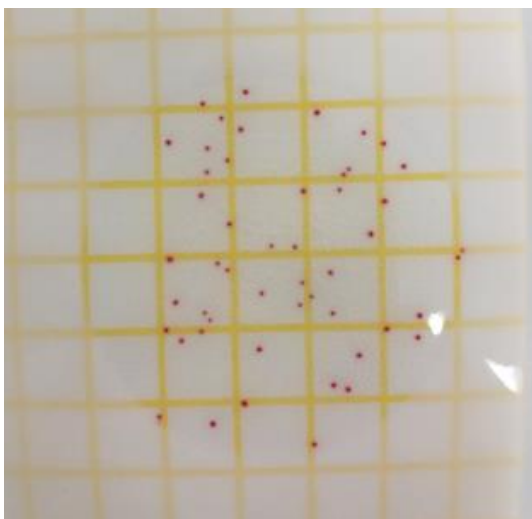
3.4.4 Lukemaepävarmuudet kokonaisbakteereilla

Kokonaisbakteereiden lukemaepävarmuuskokeet suoritettiin samaan tapaan enterobakteereiden lukemaepävarmuuksien kanssa. Koska interkalibroinnissa ja *S. Aureuksen* pesäkkeet olivat kokonaismaljalla hyvin selkeitä, päätettiin tehdä lukemaepävarmuuskokeet pastöroidulla maidolla tehdyistä viljelyistä (kuva 26 ja 27). Tällöin pesäkkeiden koko vastaa laboratorion normaalia kasvatusalustojen tulkintaolosuhteita, sillä suurin osa kokonaisbakteeri viljelyistä tapahtuu pastöroidun maidon näytteistä.

3.4.4.1 Henkilökohtaiset lukemaepävarmuudet

Kuusi laboranttia laski Petrifilmeiltä pesäkkeet kaksi kertaa. Suhteellisen varianssin tulee olla alle 7,7 % vähintään yhdeksässä rinnakkaisessa ja henkilökohtaisen lukemaepävarmuusprosentin (uz%) alle 3.

Tulokset ovat liitteessä 4. Tuloksista havaitaan, että ainoastaan kaksi laboranttia läpäisi henkilökohtaiset lukemaepävarmuudet kokonaisilla pesäkkeillä. Verrattuna maljavalulla suoritettuihin lukemaepävarmuuksiin, tulokset Petrifilmeillä ovat heikot. Vuosien 2014–2018 henkilökohtaisia lukemaepävarmuuksia on tehty 30 kappaletta. Näistä vain kaksi (3,05 % ja 5,10 %) ei ole mennyt läpi ensimmäisellä yrittämällä. Lukemaepävarmuuksien keskiarvo on maljavalulla 2,13 %. Lukemaepävarmuudet ovat asettuneet 0,47–3,05 välille, mikäli suurinta tulosta ei ole otettu huomioon. Koska osalla henkilökohtainen lukemaepävarmuusprosentti on suhteellisen korkea (jopa yli 9), on oletettavaa, ettei henkilökohtaista lukemaepävarmuutta saada läpi kaikkien laboranttien kohdalla edes uusimalla koetta. Pastöroidun maidon pesäkkeet ovat niin pieniä, että niitä on vaikea nähdä. Tämä rasittaa myös silmiä huomattavan paljon, ja Petrifilmien lukemisen jälkeen silmät olivat väsyneet.



Kuva 26. *S. Aureuksesta* viljeltyä pesäkettä kokonaisbakteereille tarkoitettussa Petrifilmillä ovat todella selkeitä. Mikäli lukemaepävarmuudet tehtäisiin *S. Aureus* -bakteerikannasta, olisi tulokset todennäköisesti paremmat.



Kuva 27. Viimeisenä myyntipäivänä viljelty maito, jossa pesäkkeet ovat tuoretta maitoa suurempia.

Kuvia 26 ja 27 vertaamalla huomataan, kuinka suuri ero on *S. Aureuksen* ja pastöroidun maidon pesäkkeiden koossa. Tuoreina viljeltyjä pastöroitujen maitojen pesäkkeet ovat niin pieniä, että niitä on vaikea saada kuvaan selkeinä (Kuva 24.).

3.4.4.2 Laboratoriokohtainen lukemaepävarmuus

Laboratoriokohtaiseen lukemaepävarmuuteen otettiin toinen jokaisesta kymmenestä rinnakkaisesta tuloksesta. Sallittu lukemaepävarmuusprosentti (uz%) on 18,2 %. Liit-

teestä 5 voidaan huomata tämän lukeman olevan 8,49 %. Tämä on korkea, mutta ylärajan alapuolella. Hajonta on myös korkea, 2,00–9,25. Laboratoriokohtainen lukemaepävarmuus vuosina 2014–2018 on ollut 1,86–3,87 %, joten 8,49 %:n lukemaepävarmuus on suuri verrattuna aikaisempiin laboratoriokohtaisiin lukemaepävarmuuksiin kokonaisbakteereilla.

3.4.5 T-testi kokonaisbakteereiden viljelyssä

Selvitettiin t-testillä, saadaanko sekä maljavalulla että Petrifilmillä riittävän sama tulos kokonaisbakteereiden viljelyssä. T-testissä käytettiin rinnakkaisviljelyitä, joissa oli yli 10 pesäkettä, ja ne olivat siten luotettavampia tilastollisessa vertailussa. T-testissä käytetyt rinnakkaisviljelystä ovat taulukossa 27. Käytettiin parivertailu t-testiä, joka on kaksisuuntainen ja riippuvainen, sillä näyte on kahdessa rinnakkaisessa viljelyssä sama. Luottamustaso oli 95 % ja merkitsevyystaso 0,05.

Nollahypoteesi on, että erotusten odotettu keskiarvo on nolla. $H_0 : \mu_D = 0$
Vaihtoehtoinen hypoteesi on, että erotusten keskiarvo on erisuuri kuin nolla. $H_1 : \mu_D \neq 0$

Taulukko 27. Kokonaisbakteereiden rinnakkaisviljelyt, joita käytettiin t-testissä.

Näyte	Maljavalu	Petrifilm	Eroitus
1	66	46	20
2	87	76	11
3	89	68	21
4	83	65	18
5	37	35	2
6	72	57	15
7	76	62	14
8	61	59	2
9	69	39	30
10	85	90	-5
11	103	71	32
12	88	87	1
13	93	38	55
14	61	65	-4
15	77	68	9
16	36	80	-44
17	15	19	-4
18	23	13	10
19	11	13	-2
20	21	10	11
21	13	17	-4
22	11	19	-8
23	12	13	-1
24	12	25	-13
25	15	30	-15
26	33	28	5
27	40	20	20
28	55	24	31
29	18	37	-19
30	21	50	-29
31	19	11	8
32	10	16	-6
33	15	15	0
34	19	15	4

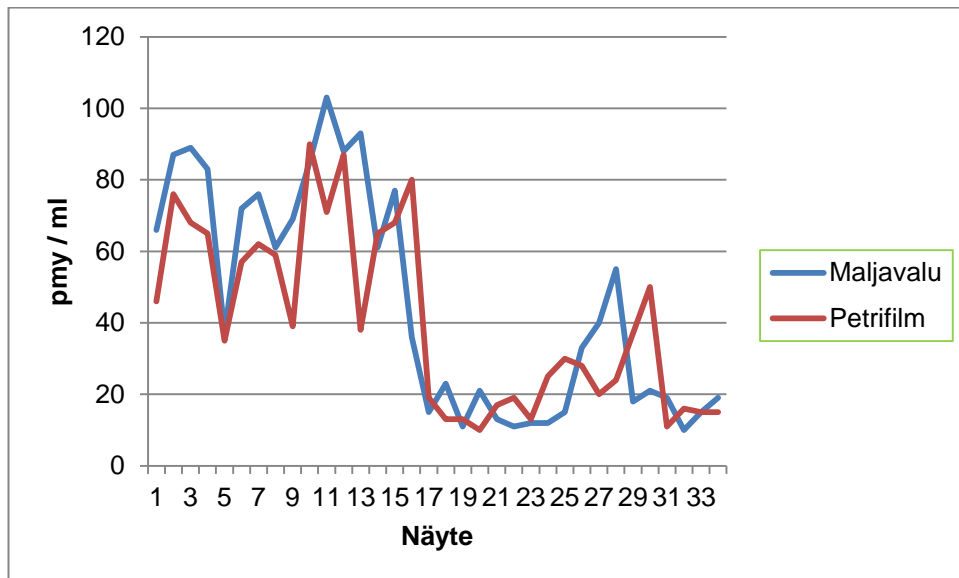
Maljavalun keskiarvo: 45,4705...

Petrifilmin keskiarvo: 40,6176...

Erotusten keskiarvo: 4,8529...

Erotusten keskihajonta: 18,5392...

Rinnakkaisten erotukset ovat taulukon 27 mukaan keskiarvoltaan alle 5, mutta myös suuria eroja on nähtävissä. Kuvassa 28 on nähtävissä viivakaaviona maljavalujen ja Petrifilmien rinnakkaiset, joissa oli yli 10 pesäkettä ja joita käytettiin t-testissä. Viivakaaviosta on nähtävissä, että rinnakkaiset ovat samansuuntaiset, mutta huomattavia eroja on nähtävissä.



Kuva 28. Viivakaavio maljavalun ja Petrifilmien rinnakkaisista, joita käytettiin t-testissä.

Taulukon 28 mukaan kokonaisbakteereiden p-arvoksi t-testissä saatiin 0,0682... Eli $p > 0,05$, joten tulos ei ole tilastollisesti merkitsevä. Petrifilmejä voidaan pitää tilastollisesti maljavalujen kanssa soveltuvina rinnakkaisina.

Taulukko 28. Parittainen kahden otoksen t-testi keskiarvoille.

	<i>Maljavalu</i>	<i>Petrifilm</i>
Keskiarvo	45,47058824	40,61764706
Varianssi	971,7112299	635,4554367
Havainnot	34	34
Pearsonin korrelaatio	0,803934963	
Arvioitu keskiarvojen ero	0	
va	33	
t Tunnusluvut	1,526340986	
P(T<=t) yksisuuntainen	0,06822672	
t-kriittinen yksisuuntainen	1,692360309	
P(T<=t) kaksisuuntainen	0,13645344	
t-kriittinen kaksisuuntainen	2,034515297	

3.4.6 Yhteenveto kokonaisbakteereiden viljelystä Petrifilmeillä

Kokonaisbakteereille soveltuvat Petrifilm-kasvatusalustat osoittautuivat kokeissa haasteelliseksi pastöroidun maidon viljelyihin. Heti ensimmäisissä kokeissa huomattiin, että kokonaisbakteereille tarkoitettu nopeampi kasvatusalusta, Petrifilm Rapid, ei toiminut lainkaan pastöroidulla maidolla. Suurin osa laboratorion kokonaisbakteeriviljelyistä koostuu nimenomaan pastöroiduista maidoista, mikä on haaste Petrifilmien käyttöönottamisessa kyseisessä laboratoriossa. Maidon pesäkkeet näkyvät hyvin pieninä Petrifilmeillä, tämän vuoksi henkilökohtaiset lukemaepävarmuudet eivät menneet kaikilta laboranteilta hyväksytysti läpi. Pesäkkeiden pieni koko vaikeuttaa myös pesäkkeiden laskua ja rasittaa silmiä. Mahdollinen ajansäästö kokonaisbakteereiden viljelystä Petrifilmeillä kuluisi todennäköisesti moninkertaisesti pesäkemäärien laskemiseen. Vaikeuksista huolimatta t-testistä tulokseksi saatiin $p > 0,05$, joten Petrifilmin ja maljavalun välillä ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa. On kuitenkin huomioitava, että useampi kuin joka viides maljavalun ja Petrifilmin rinnakkaisista ei mennyt luotettavuusrajoihin.

3.5 Hintavertailu

Hintavertailussa vertailtiin maljavalun ja Petrifilmien kustannuksia. Kustannuseroihin otettiin huomioon vain kasvatusalustojen hinnat. Huomiotta jätettiin esimerkiksi työajan säästö, joka muodostuisi Petrifilmien käyttöönoton myötä. Kun maljavalun hintaa vertaa Petrifilmin hintoihin, huomataan maljavalun olevan huomattavasti edullisempi. Laskettiin, kuinka paljon kalliimmaksi Petrifilmit tulisivat keskiverto kuukaudessa laboratorion näytemäärällä. Kokonaisbakteereilla hintaero on 314 %, enterobakteereilla 255 % sekä hiivoilla ja homeilla 477 %. Pienin hintaero on enterobakteereiden viljelystä, jossa Petrifilmit säästäisivät myös eniten aikaa. Enterobakteereja myös viljellään laboratoriossa eniten, suurin piirtein yhtä paljon kuin hiivoja ja homeita sekä kokonaisbakteereja yhteensä. Havaittiin, että hintaerot ovat merkittävät. Mikäli hintavertailuun otettaisiin kaikki asiat huomioon, olisi maljavalun ja Petrifilmien välinen hintaero pienempi. Merkittävimmät erot muodostuisivat ajan sekä tilojen säästössä ja jättekustannuksista, joissa Petrifilmit olisivat maljavalua kustannustehokkaampia. Tämän vuoksi päätöstä Petrifilmien käyttöönotosta ei voida tehdä vain suorien hintaerojen pohjalta.

4 Yhteenveto

Petrifilmit toimivat vastaavasti maljavalun kanssa interkalibrintinäytteelle, jossa käytetään eri bakteereiden tyyppikantoja. Onnistuneet rinnakkaisviljelyt interkalibrintinäytteillä antoivat hyvän alun opinnäytetyön kokeelliselle osuudelle. Pesäkkeet olivat selkeästi erotettavissa ja laskettavissa, myös Petrifilmeihin tottumattomalle. Erityisen positiivinen huomio interkalibrintinäytteiden viljelyssä oli, että kokonaisbakteereille tarkoitettu ei-nopeutettu kasvatusalusta toimi lähes yhtä nopeasti kuin nopeutettu kasvatusalusta kokonaisbakteereille.

Hiivojen ja homeiden viljely osoittautui yksinkertaiseksi, joskin Petrifilm muutti homeiden ulkonäköä vaikeasti tunnistettaviksi. Kasvun tunnisti homeeksi, mutta kasvatusalustalta ei pystynyt päättämään juuri mitään homeen ulkonäöstä. Itse viljelyajassa maljavalulla ja Petrifilmillä ei ollut suurta eroa ajallisesti. Kun viljeltiin homekantaa ympäristä inkuboituja jogurttia, huomattiin hiivojen ja homeiden erottamisen vaikeus Petrifilmiltä. Syytä Petrifilmien vaikeaan tulkintaan ei löydetty, mutta oletettiin sen johtuvan jogurttien sisältämästä hillosta, sameasta näytteestä ja vähäisestä hiivan ja homeen määrästä. Kun tehtiin rinnakkaisviljelyitä Petrifilmillä ja maljavalulla, todettiin maljavalun olevan nopeampi tuloksien suhteen. Hiivoille ja homeille tarkoitettu Petrifilm Rapid osoittautui hankalaksi käytännössä. Näyte ei levittänyt helposti eikä tasaisesti kasvatusalustalle. Petrifilm Rapid -kasvatusalusta tarvitsi 48 tunnin inkuboinnin ennen kuin siitä pystyi laskemaan pesäkkeitä. Ensimmäisen 24 tunnin aikana ei tapahtunut näkyvää muutosta, vaikka maljavalussa kasvua oli jo nähtävissä. Maljavalu näytti myös selkeämmin hiiva- ja homekasvun verrattuna Petrifilmeihin. Lisäksi maljavalun haju kertoo viitteitä kasvusta. Petrifilmillä kasvamattomatkin näytteet saattavat sinertää, sen olematta kasvua. Koska Petrifilmillä mahdollinen kasvu ei haise hiivalle tai homeelle, on epäselvät kasvatusalustat aina mikroskoipoitava useasta eri kohdasta, jotta voidaan olla varmoja näytteen puhtaudesta.

Enterobakteereilla Petrifilmit toimivat hyvin. Valmistajan ohjeiden vastaisesti pH:lla ei ollut vaikutusta kasvatusalustan toimintaan, mikä oli enterobakteereiden viljelyssä positiivinen huomio. pH:ta ei olisi mahdollista säätää laboratoriossa steriilisti jokaisen näytteen kohdalla sen vaativan ajan vuoksi. Enterobakteereiden viljely Petrifilmeillä oli ajallisesti nopeaa ja teknisesti helppoa. Lukemaepävarmuudet eivät valitettavasti menneet ensi yrittämällä kaikkien kohdalla läpi, mutta harjoittelulla ja uusinnalla kokeen läpäisyyn olisi kaikki edellytykset. Sen sijaan laboratoriokohtainen lukemaepävarmuus-

koe meni hyvin läpi. T-testeissä saatujen tulosten perusteella Petrifilmit voivat korvata maljavalun enterobakteereiden viljelyssä. Petrifilmeihin voitaisiin siirtyä enterobakteereiden viljelyssä.

Kokonaisbakteereiden viljelyssä oli eniten haasteita Petrifilmeillä. Interkalibroinnista saadut varsin positiiviset tulokset eivät jatkuneet enää pastöroidun maidon viljelyssä. Pesäkkeet ovat todella pieniä, mikä vaikeuttaa pesäkkeiden laskentaa ja voi aiheuttaa tulkintavirheitä. Laboratoriokohtainen lukemaepävarmuuskoe saatiin läpi, mutta valtaosaa henkilökohtaisista lukemaepävarmuuskokeista ei saatu läpi. Koska osa pesäkkeistä on todella pieniä, on vaikea uskoa, että edes harjoittelulla saataisiin jokaisen laborantin kohdalla lukemaepävarmuudet läpi. T-testissä saatu tulos kuitenkin kertoo, että Petrifilmin ja maljavalun välillä ei ole merkitsevää eroa tilastollisesti.

Suorassa hintavertailussa Petrifilmit vaikuttavat huomattavasti kalliimmilta kuin maljavalu. On kuitenkin otettava huomioon myös epäsuorat kustannuslaskelmat. Työaika säästyy hieman itse viljelyssä Petrifilmeihin, mutta huomattavin ajansäästö on agareiden sulattamiseen ja keittoon kuluva aika. Agareiden sulatuksessa ja jäähtymisessä käyttökelpoiseksi kestää noin kaksi tuntia. Petrifilmit ovat heti käyttövalmiita, joten viljelyn aikaa vievät esivalmistelut jäävät pois. Agar- ja petrimaljalaatikoiden hakeminen varastosta sekä niiden purkaminen laboratorion varastoon ja jääkaappiin poistuisivat. Petrifilmit vievät jääkaapissa agarpulloja vähemmän tilaa, joten tilaa vapautuu jääkaapeista muuhun käyttöön. Litteät Petrifilmit vievät myös inkubointikaapeissa vain vähän tilaa. Tämä tarkoittaa sitä, että yhteen kaappiin mahtuisi useamman päivän viljelyt. Olisi siis mahdollista luopua energiaa vievistä inkubointikaapeista, tai käyttää niitä esimerkiksi valmiiden tuotteiden inkubointikokeissa. Petrifilmien etu on myös niiden yksittäisyys. Agarin loppuessa lisää on sulatettava aina kokonainen pullo, vaikka tarvittaisiin agaria vain muutamaan maljavaluun. Tämä tarkoittaa sitä, että lähes koko pullollinen agaria joudutaan heittämään pois. Välillä on myös tilanteita, joissa agaria on sulatettava varalta, mikäli tulisi lisänäytteitä. Petrifilmit ovat aina valmiita käyttöön, eikä koko paketti mene päivän lopuksi hukkaan, mikäli jokaista Petrifilmiä ei tulisikaan käytettyä.

Kokeideni perusteella voin suositella laboratorion ottamaan Petrifilmit käyttöön vain enterobakteereiden viljelyssä. Hiivojen ja homeiden viljelemisellä Petrifilmeillä menetettäisiin paljon maljavalun hyviä puolia. Pastöroidun maidon kokonaisbakteereiden viljelyä Petrifilmeillä en voi tulosteni perusteella suositella. On kuitenkin huomioitava, että suurin mahdollinen hyöty saataisiin Petrifilmeistä, mikäli kaikissa mahdollisissa vilje-

lyissä voitaisiin siirtyä Petrifilmeihin. Mikäli vain enterobakteereiden viljelemisessä siirryttäisiin Petrifilmeihin, ei säästyttäisi muiden viljelyiden esivalmisteluilta (agarin sulatus/keitto). Lisäksi inkubointihaudetta ja -kaappia agareille tarvittaisiin yhä ja varastointilasta menisi paljon tilaa petrimaljoille ja jääkaapeista agarpulloille. Enteroagarista ei voitaisi täysin luopua, sillä siitä valetaan maljoja gramnegatiivisten bakteereiden pinta-
viljelyyn, mihin Petrifilmejä ei vielä ole olemassa.

Lähteet

- 1 Historiamme. Verkkoaineisto. Arla Oy. <<https://www.arla.fi/yritys/historiamme/>>. Luettu 15.4.2018.
- 2 Ylöstalo, Iiris. 2018. Mikrobiologinen viljely, omavalvonta ja hygienia, elintarviki diagnostiikka, Labema Oy, Helsinki. Keskustelu 16.3.2018.
- 3 3M™ Petrifilm™ Sample Plates. 2017. Verkkoaineisto. 3M™ Food Safety. <<http://multimedia.3m.com/mws/media/777561O/3m-petrefilm-plates-sample-plates.pdf>>. Luettu 4.8.2018
- 4 Laboratorion työohje, joka perustuu menetelmään NMKL 144/2005.
- 5 Tuotteet, elintarvike. 2018. Verkkoaineisto. Tammer-Tutkan Maljat Oy. <<http://www.tammer-tutkanmaljat.fi/index.php?m1=2&m2=6/>>. Luettu 3.8.2018
- 6 Laboratorion työohje, joka perustuu menetelmään IDF 94:2004 Hiivat ja homeet (pesäkemäärä). Määrittäminen pesäkelaskentamenetelmällä 25 °C:ssa maidosta ja maitotuotteista.
- 7 Laboratorion työohje, joka perustuu menetelmään NMKL 86:2013: Aerobiset mikro-organismit. Määrittäminen elintarvikkeista lämpötiloissa 37 °C, 30 °C, 25 °C, 20 °C, 17/7 °C tai 6,5 °C pesäkelaskentamenetelmällä.
- 8 3M™ Petrifilm™ Product Instructions. 10/2017. Verkkoaineisto. 3M™. <https://multimedia.3m.com/mws/media/695832O/product-instructions-3m-petrefilm-aerobic-count-plate.pdf?fn=34871734108_int.pdf>. Luettu 5.8.2018.
- 9 1993. SFS-Käsikirja 94 Mikrobiologiset vesitutkimusmenetelmät.

95 %:n luotettavuusväli jaetun näytteen havaitulle pesäkeluvulle ja odotetulle pesäkeluvulle

"Alaraja" ilmaisee odotetun pesäkeluvun alhaisimman mahdollisen pesäkemäärän ja "yläraja" ilmaisee vastaavasti korkeimman mahdollisen pesäkemäärän.

Havaittu pesäkeluku	Alaraja	Yläraja
0	0	5
1	0	7
2	0	9
3	0	11
4	0	12
5	0	14
6	1	16
7	1	17
8	2	19
9	2	20
10	3	22
11	3	23
12	4	24
13	5	26
14	5	27
15	6	28
16	6	30
17	7	31
18	8	32
19	8	34
20	9	35
21	10	36
22	10	38
23	11	39
24	12	40
25	13	41
26	13	43
27	14	44
28	15	45
29	16	47
30	16	48
31	17	49
32	18	50
33	19	52
34	19	53
35	20	54
36	21	55
37	22	56
38	22	58
39	23	59
40	24	60
41	25	61
42	26	63
43	26	64
44	27	65
45	28	66

46	29	67
47	29	69
48	30	70
49	31	71
50	32	72
51	33	73
52	33	75
53	34	76
54	35	77
55	36	78
56	37	79
57	38	80
58	38	82
59	39	83
60	40	84
61	41	85
62	42	86
63	42	88
64	43	89
65	44	90
66	45	91
67	46	92
68	47	93
69	47	95
70	48	96
71	49	97
72	50	98
73	51	99
74	52	100
75	52	102
76	53	103
77	54	104
78	55	105
79	56	106
80	57	107
81	58	108
82	58	110
83	59	111
84	60	112
85	61	113
86	62	114
87	63	115
88	63	117
89	64	118
90	65	119
91	66	120
92	67	121
93	68	122
94	69	123
95	69	125
96	70	126
97	71	127
98	72	128
99	73	129
100	74	130

[9, s. 53–54.]

Enterobakteereiden henkilökohtaiset lukemaepävarmuudet Petrifilmillä

Labo- rantt1	luke- ke- ma1	luke- ke- ma2	ka	suht.varians si <7,7 %			0,0045723 24
Malja	t1	t2	$x=(t1+t2)/2$	$rv= t1-t2 /x*100\%$	(t1- t2)	(t1+ t2)	$[(t1-t2)/(t1+t2)]^2$
1	47	44	45,5	6,6%	3	91	0,001087
2	57	54	55,5	5,4%	3	111	0,00073
3	57	55	56	3,6%	2	112	0,000319
4	48	47	47,5	2,1%	1	95	0,000111
5	40	37	38,5	7,8%	3	77	0,001518
6	45	44	44,5	2,2%	1	89	0,000126
7	50	48	49	4,1%	2	98	0,000416
8	43	43	43	0,0%	0	86	0
9	43	42	42,5	2,4%	1	85	0,000138
10	45	44	44,5	2,2%	1	89	0,000126

Henk.koht. lukema-
epävarmuus

n= 10

$$u_z = \sqrt{2/n} \sum (t1-t2)/(t1+t2)^2$$

u_z= 0,0302u_z%= 3,02

Labo- rantt2	luke- ke- ma1	luke- ke- ma2	ka	suht.varians si <7,7 %			0,0076114 08
Malja	t1	t2	$x=(t1+t2)/2$	$rv= t1-t2 /x*100\%$	(t1- t2)	(t1+ t2)	$[(t1-t2)/(t1+t2)]^2$
1	45	47	46	4,3%	-2	92	0,000473
2	54	58	56	7,1%	-4	112	0,001276
3	60	60	60	0,0%	0	120	0
4	49	50	49,5	2,0%	-1	99	0,000102
5	40	42	41	4,9%	-2	82	0,000595
6	42	45	43,5	6,9%	-3	87	0,001189
7	50	50	50	0,0%	0	100	0
8	44	49	46,5	10,8%	-5	93	0,002891
9	44	47	45,5	6,6%	-3	91	0,001087
10	46	46	46	0,0%	0	92	0

Henk.koht. lukema-
epävarmuus

n= 10

$$u_z = \sqrt{2/n} \sum (t1-t2)/(t1+t2)^2$$

u_z= 0,0390u_z%= 3,90

Labo- rantt3	luke- ke- ma1	luke- ke- ma2	ka	suht.varians si <7,7 %			0,0012604 69
Malja	t1	t2	$x=(t1+t2)/2$	$rv= t1-t2 /x*100\%$	(t1- t2)	(t1+ t2)	$[(t1-t2)/(t1+t2)]^2$
1	46	46	46	0,0%	0	92	0
2	57	58	57,5	1,7%	-1	115	7,56E-05

Henk.koht. lukema-
epävarmuus

n= 10

$$u_z = \sqrt{2/n} \sum (t1-t2)/(t1+t2)^2$$

3	61	61	61	0,0%	0	122	0
4	50	51	50,5	2,0%	-1	101	9,8E-05
5	41	41	41	0,0%	0	82	0
6	44	44	44	0,0%	0	88	0
7	49	49	49	0,0%	0	98	0
8	46	46	46	0,0%	0	92	0
9	44	47	45,5	6,6%	-3	91	0,001087
10	46	46	46	0,0%	0	92	0

$$u_z = 0,0159$$

$$u_z\% = 1,59$$

Labo- rantti4	luke- ke- ma1	luke- ke- ma2	ka	suht.varians si <7,7 %			0,0002731 74
Malja	t1	t2	$x=(t1+t2)/2$	$rv= t1-t2 /x*100\%$	(t1- t2)	(t1+ t2)	$\frac{[(t1-t2)/(t1+t2)]^2}{n}$
1	46	45	45,5	2,2%	1	91	0,000121
2	57	57	57	0,0%	0	114	0
3	59	59	59	0,0%	0	118	0
4	49	49	49	0,0%	0	98	0
5	41	40	40,5	2,5%	1	81	0,000152
6	44	44	44	0,0%	0	88	0
7	49	49	49	0,0%	0	98	0
8	45	45	45	0,0%	0	90	0
9	45	45	45	0,0%	0	90	0
10	45	45	45	0,0%	0	90	0

Henk.koht. lukema-
epävarmuus

$$n = 10$$

$$u_z = \sqrt{2/n} \sum (t1-t2)/(t1+t2)^2$$

$$u_z = 0,0074$$

$$u_z\% = 0,74$$

Labo- rantti5	luke- ke- ma1	luke- ke- ma2	ka	suht.varians si <7,7 %			0,0015051 53
Malja	t1	t2	$x=(t1+t2)/2$	$rv= t1-t2 /x*100\%$	(t1- t2)	(t1+ t2)	$\frac{[(t1-t2)/(t1+t2)]^2}{n}$
1	49	47	48	4,2%	2	96	0,000434
2	57	57	57	0,0%	0	114	0
3	60	60	60	0,0%	0	120	0
4	53	50	51,5	5,8%	3	103	0,000848
5	41	41	41	0,0%	0	82	0
6	43	43	43	0,0%	0	86	0
7	49	50	49,5	2,0%	-1	99	0,000102
8	46	46	46	0,0%	0	92	0
9	44	44	44	0,0%	0	88	0

Henk.koht. lukema-
epävarmuus

$$n = 10$$

$$u_z = \sqrt{2/n} \sum (t1-t2)/(t1+t2)^2$$

$$u_z = 0,0174$$

$$u_z\% = 1,74$$

10	46	45	45,5	2,2%	1	91	0,000121
----	----	----	------	------	---	----	----------

Labo- rantti6	luke- ke- ma1	luke- ke- ma2	ka	suht.varians si <7,7 %			0,002577 4
Malja	t1	t2	$x=(t1+t2)/2$	$rv= t1-t2 /x*100\%$	(t1-t2)	(t1+t2)	$[(t1-t2)/(t1+t2)]^2$
1	46	44	45	4,4%	2	90	0,000494
2	56	56	56	0,0%	0	112	0
3	60	57	58,5	5,1%	3	117	0,000657
4	47	48	47,5	2,1%	-1	95	0,000111
5	41	41	41	0,0%	0	82	0
6	44	44	44	0,0%	0	88	0
7	49	49	49	0,0%	0	98	0
8	44	45	44,5	2,2%	-1	89	0,000126
9	45	42	43,5	6,9%	3	87	0,001189
10	46	46	46	0,0%	0	92	0

Henk.koht. lukema-
epävarmuus

n= 10

$$u_z = \sqrt{2/n} \sum (t1-t2)/(t1+t2)^2$$

$u_z = 0,0227$

$u_z\% = 2,27$

Labo- rantti7	luke- ke- ma1	luke- ke- ma2	ka	suht.varians si <7,7 %			0,005599 906
Malja	t1	t2	$x=(t1+t2)/2$	$rv= t1-t2 /x*100\%$	(t1-t2)	(t1+t2)	$[(t1-t2)/(t1+t2)]^2$
1	45	46	45,5	2,2%	-1	91	0,000121
2	58	58	58	0,0%	0	116	0
3	63	60	61,5	4,9%	3	123	0,000595
4	48	48	48	0,0%	0	96	0
5	39	44	41,5	12,0%	-5	83	0,003629
6	42	44	43	4,7%	-2	86	0,000541
7	49	49	49	0,0%	0	98	0
8	45	47	46	4,3%	-2	92	0,000473
9	45	44	44,5	2,2%	1	89	0,000126
10	47	46	46,5	2,2%	1	93	0,000116

Henk.koht. lukema-
epävarmuus

n= 10

$$u_z = \sqrt{2/n} \sum (t1-t2)/(t1+t2)^2$$

$u_z = 0,0335$

$u_z\% = 3,35$

Labo- rantti8	luke- ke- ma1	luke- ke- ma2	ka	suht.varians si <7,7 %			0,0012638 1
Malja	t1	t2	$x=(t1+t2)/2$	$rv= t1-t2 /x*100\%$	$(t1-t2)$	$(t1+t2)$	$[(t1-t2)/(t1+t2)]^2$
1	45	46	45,5	2,2%	-1	91	0,000121
2	56	57	56,5	1,8%	-1	113	7,83E-05
3	59	58	58,5	1,7%	1	117	7,31E-05
4	49	50	49,5	2,0%	-1	99	0,000102
5	39	41	40	5,0%	-2	80	0,000625
6	44	44	44	0,0%	0	88	0
7	49	49	49	0,0%	0	98	0
8	43	42	42,5	2,4%	1	85	0,000138
9	45	44	44,5	2,2%	1	89	0,000126
10	44	44	44	0,0%	0	88	0

Henk.koht. lukema-
epävarmuus

n= 10

$$u_z = \sqrt{2/n \cdot \sum (t1-t2)/(t1+t2)^2}$$

u_z= 0,0159u_z%= 1,59

Enterobakteerien laboratoriokohtainen lukemaepävarmuus Petrifilmeillä

Mallia	Lab1.	Lab2.	Lab3.	Lab4.	Lab5.	Lab6.	Lab7.	Lab8.	Ka (x)	X-18,2%	X+18,2%	Hajonta (s)	summa $u_z^2 =$	u_z^2
1	47	45	46	49	46	45	45	46	46,125	37,73	54,52	1,52	0,032879677	0,001081
2	57	54	57	57	56	58	56	57	56,5	46,22	66,78	1,30	0,023076823	0,000533
3	57	60	59	60	60	63	59	61	59,875	48,98	70,77	1,30	0,021776041	0,000474
4	48	49	49	53	47	48	49	50	49,125	40,18	58,07	2,28	0,046419356	0,002155
5	40	40	41	41	41	39	39	41	40,25	32,92	47,58	0,55	0,013608014	0,000185
6	45	42	44	43	44	42	44	44	43,5	35,58	51,42	1,14	0,026210929	0,000687
7	50	50	49	49	49	49	49	49	49,25	40,29	58,21	0,55	0,01112127	0,000124
8	43	44	45	46	44	45	43	46	44,5	36,40	52,60	1,14	0,02562192	0,000656
9	43	44	45	44	45	45	45	44	44,375	36,30	52,45	0,84	0,01885431	0,000355
10	45	46	45	46	46	47	44	46	45,625	37,32	53,93	0,55	0,012004878	0,000144

$$n = 10$$

$$u_z = \sqrt{\frac{\sum \left(\frac{s}{ka}\right)^2}{n}}$$

$$u_z = 0,0253$$

$$u_z\% = 2,53$$

Kokonaisbakteerien henkilökohtainen lukemaepävarmuus Petrifilmeillä

Labo- rantt1	luke- ke- ma1	luke- ke- ma2	ka	suht.varians si <7,7 %			0,0021882 33
Malja	t1	t2	$x=(t1+t2)/2$	$rv= t1-t2 /x*100\%$	(t1- t2)	(t1+ t2)	$[(t1-t2)/(t1+t2)]^2$
1	58	54	56	7,1%	4	112	0,001276
2	83	80	81,5	3,7%	3	163	0,000339
3	90	91	90,5	1,1%	-1	181	3,05E-05
4	80	80	80	0,0%	0	160	0
5	59	59	59	0,0%	0	118	0
6	93	92	92,5	1,1%	1	185	2,92E-05
7	87	86	86,5	1,2%	1	173	3,34E-05
8	64	66	65	3,1%	-2	130	0,000237
9	63	65	64	3,1%	-2	128	0,000244
10	58	58	58	0,0%	0	116	0

Henk.koht. lukema-
epävarmuus

n= 10

$$u_z = \sqrt{2/n} \sum (t1-t2)/(t1+t2)^2$$

u_z= 0,0209u_z%= 2,09

Labo- rantt2	luke- ke- ma1	luke- ke- ma2	ka	suht.varians si <7,7 %			0,0412675 73
Malja	t1	t2	$x=(t1+t2)/2$	$rv= t1-t2 /x*100\%$	(t1- t2)	(t1+ t2)	$[(t1-t2)/(t1+t2)]^2$
1	49	49	49	0,0%	0	98	0
2	78	77	77,5	1,3%	1	155	4,16E-05
3	77	84	80,5	8,7%	-7	161	0,00189
4	72	75	73,5	4,1%	-3	147	0,000416
5	44	45	44,5	2,2%	-1	89	0,000126
6	80	55	67,5	37,0%	25	135	0,034294
7	77	74	75,5	4,0%	3	151	0,000395
8	61	68	64,5	10,9%	-7	129	0,002945
9	59	61	60	3,3%	-2	120	0,000278
10	49	52	50,5	5,9%	-3	101	0,000882

Henk.koht. lukema-
epävarmuus

n= 10

$$u_z = \sqrt{2/n} \sum (t1-t2)/(t1+t2)^2$$

u_z= 0,0908u_z%= 9,08

Labo- rantt3	luke- ke- ma1	luke- ke- ma2	ka	suht.varians si <7,7 %			0,0122883 01
Malja	t1	t2	$x=(t1+t2)/2$	$rv= t1-t2 /x*100\%$	(t1- t2)	(t1+ t2)	$[(t1-t2)/(t1+t2)]^2$
1	48	50	49	4,1%	-2	98	0,000416
2	78	79	78,5	1,3%	-1	157	4,06E-05

Henk.koht. lukema-
epävarmuus

n= 10

$$u_z = \sqrt{2/n} \sum (t1-t2)/(t1+t2)^2$$

3	72	85	78,5	16,6%	-13	157	0,006856
4	71	69	70	2,9%	2	140	0,000204
5	40	41	40,5	2,5%	-1	81	0,000152
6	80	84	82	4,9%	-4	164	0,000595
7	81	74	77,5	9,0%	7	155	0,00204
8	66	63	64,5	4,7%	3	129	0,000541
9	63	60	61,5	4,9%	3	123	0,000595
10	53	50	51,5	5,8%	3	103	0,000848

 $u_z = 0,0496$ $u_z\% = 4,96$

Labo- rantti4	luke- ke- ma1	luke- ke- ma2	ka	suht.varians si <7,7 %			0,0043410 39
Malja	t1	t2	$x=(t1+t2)/2$	$rv= t1-t2 /x*100\%$	(t1-t2)	(t1+t2)	$[(t1-t2)/(t1+t2)]^2$
1	56	57	56,5	1,8%	-1	113	7,83E-05
2	81	81	81	0,0%	0	162	0
3	86	93	89,5	7,8%	-7	179	0,001529
4	79	79	79	0,0%	0	158	0
5	59	56	57,5	5,2%	3	115	0,000681
6	96	91	93,5	5,3%	5	187	0,000715
7	90	86	88	4,5%	4	176	0,000517
8	66	67	66,5	1,5%	-1	133	5,65E-05
9	64	65	64,5	1,6%	-1	129	6,01E-05
10	55	58	56,5	5,3%	-3	113	0,000705

Henk.koht. lukema-
epävarmuus

n= 10

 $u_z = \sqrt{2/n} \sum (t1-t2)/(t1+t2)^2$ $u_z = 0,0295$ $u_z\% = 2,95$

Labo- rantti5	luke- ke- ma1	luke- ke- ma2	ka	suht.varians si <7,7 %			0,0046763 11
Malja	t1	t2	$x=(t1+t2)/2$	$rv= t1-t2 /x*100\%$	(t1-t2)	(t1+t2)	$[(t1-t2)/(t1+t2)]^2$
1	53	52	52,5	1,9%	1	105	9,07E-05
2	77	79	78	2,6%	-2	156	0,000164
3	85	80	82,5	6,1%	5	165	0,000918
4	77	74	75,5	4,0%	3	151	0,000395
5	43	47	45	8,9%	-4	90	0,001975
6	85	84	84,5	1,2%	1	169	3,5E-05
7	80	77	78,5	3,8%	3	157	0,000365
8	61	62	61,5	1,6%	-1	123	6,61E-05
9	61	64	62,5	4,8%	-3	125	0,000576
10	52	53	52,5	1,9%	-1	105	9,07E-05

Henk.koht. lukema-
epävarmuus

n= 10

 $u_z = \sqrt{2/n} \sum (t1-t2)/(t1+t2)^2$ $u_z = 0,0306$ $u_z\% = 3,06$

Labo- ranttii6	luke- ke- ma1	luke- ke- ma2	ka	suht.varians si <7,7 %			0,0082131 41
Malja	t1	t2	$x=(t1+t2)/2$	$rv= t1-t2 /x*100\%$	$(t1-t2)$	$(t1+t2)$	$[(t1-t2)/(t1+t2)]^2$
1	54	57	55,5	5,4%	-3	111	0,00073
2	79	81	80	2,5%	-2	160	0,000156
3	88	90	89	2,2%	-2	178	0,000126
4	75	75	75	0,0%	0	150	0
5	46	54	50	16,0%	-8	100	0,0064
6	91	90	90,5	1,1%	1	181	3,05E-05
7	86	84	85	2,4%	2	170	0,000138
8	67	66	66,5	1,5%	1	133	5,65E-05
9	63	65	64	3,1%	-2	128	0,000244
10	56	54	55	3,6%	2	110	0,000331

Henk.koht. lukema-
epävarmuus

n= 10

$$u_z = \sqrt{2/n \cdot \sum (t1-t2)/(t1+t2)^2}$$

u_z= 0,0405u_z%= 4,05

Kokonaisbakteereiden laboratoriokohtainen lukemaepävarmuus Petrifil-meillä

Majla	Lab1.	Lab2.	Lab3.	Lab4.	Lab5.	Lab6.	Ka (k)	X-18,2%	X+18,2%	Hajonta (s)	summa $u_z^2 =$	u_z^2
1	58	49	48	56	53	54	52,8	43,19	62,41	4,32	0,081900562	0,006707702
2	83	78	78	81	77	79	79,4	64,95	93,85	2,51	0,03161184	0,000999308
3	90	77	72	86	85	88	82	67,08	96,92	7,31	0,089199627	0,007956573
4	80	72	71	79	77	75	75,8	62,00	89,60	4,09	0,053912445	0,002906552
5	59	44	40	59	43	46	49	40,08	57,92	9,25	0,188706551	0,035610162
6	93	80	80	96	85	91	86,8	71,00	102,60	7,40	0,085206738	0,007260188
7	87	77	81	90	80	86	83	67,89	98,11	5,34	0,064319749	0,00413703
8	64	61	66	66	61	67	63,6	52,02	75,18	2,51	0,039465096	0,001557494
9	63	59	63	64	61	63	62	50,72	73,28	2,00	0,032258065	0,001040583
10	58	49	53	55	52	56	53,4	43,68	63,12	3,36	0,062950323	0,003962743

$$n = 10$$

$$u_z = \sqrt{\frac{\sum \left(\frac{s}{ka}\right)^2}{n}}$$

$$u_z = 0,0849$$

$$u_z \% = 8,49$$