

RAKENNUSMATERIAALINÄYTTEEN MIKROBIKASVUSTO: MENETELMÄVALIDOINTI

Maija Halttunen

Opinnäytetyö
Joulukuu 2010

Laboratorioala
Teknologia





Tekijä(t) HALTTUNEN, Maija	Julkaisun laji Opinnäytetyö	Päivämäärä 09.12.2010
	Sivumäärä 31	Julkaisun kieli Suomi
	Luottamuksellisuus () saakka	Verkojulkaisulupa myönnetty (x)
Työn nimi RAKENNUSMATERIAALINÄYTTEEN MIKROBIKASVUSTO: MENETELMÄVALIDOINTI		
Koulutusohjelma Laboratorioala		
Työn ohjaaja(t) SALO, Esa		
Toimeksiantaja(t) PITKÄNEN, Reijo, Jyväskylän ammattikorkeakoulun rakennuslaboratorio		
Tiivistelmä <p>Opinnäytetyön toimeksiantaja oli Jyväskylän ammattikorkeakoulun (Jamk) rakennuslaboratorio. Työn ohjaajana toimi Jamk:ssa asiantuntijatehtävissä työskennellyt FT Kristian Jansson. Työn tavoitteena oli validoida kolmikohtainen menetelmä rakennusmateriaalinäytteen mikrobikasvuston toteamiseksi. Validoitavat menetelmät olivat suora mikroskopointi, suoraviljely ja laimennosviljely. Validoinnissa oli tarkoituksena selvittää miten eri tekniikat, liuokset, kasvatusalustat ja työn suorittajat vaikuttavat analyysituloksiin ja sitä, miten eri menetelmillä tuotetut analyysitulokset ja niistä vedetyt johtopäätökset vastaavat toisiaan.</p> <p>Tutkimus toteutettiin talven ja kevään 2010 aikana analysoimalla eri rakennusmateriaalinäytteitä Asumisterveysoppaan ohjeiden ja Sisäilmastoseminaareissa vuosina 1999 ja 2005 julkaistujen raporttien mukaan. Rakennusmateriaalinäytteitä oli 16 kappaletta. Sieni-itiöt kasvatettiin 2 % mallasuute- ja dikloran-glyseroli-18-alustoilla. Bakteerit kasvatettiin tryptoni-hiivauute-glukoosi-alustalla. Suora mikroskopointi tehtiin näytteestä otetun teippipreparaatin avulla värjäämättömänä sekä värjättynä. Viljelyn jälkeen sienimaljoja inkuboitin lämpökaapissa (25 °C) 7 vuorokautta ja bakteerimaljoja 7 + 7 vuorokautta. Inkuboinnin jälkeen maljoille kasvaneet pesäkkeet laskettiin ja tunnistettiin. Sieni-itiömaljoilta laskettiin erikseen homepesäkkeet ja hiivapesäkkeet, bakteerimaljoilta laskettiin sädesienet ja muut bakteerit erikseen.</p> <p>Tulosten mukaan valituilla viljelymenetelmillä saadaan materiaalinäytteen mikrobisto kasvamaan. Suora mikroskopointi ei tuottanut mitään tulosta, vaikka näytteistä osa oli selvästi vaurioituneesta rakenteesta otettuja. Tuloksista pystyi päättelemään, että sekä suoraviljely- että laimennosviljelytekniikalla saadaan samansuuntaisia tuloksia. Tuloksiin vaikutti merkittävästi se, että analysoidut näytteet olivat vanhoja, ja vertailumateriaali puuttui.</p>		
Avainsanat (asiasanat) rakennusmateriaalinäyte, mikrobi, laimennosviljely, suoraviljely		
Muut tiedot		



Author(s) HALTTUNEN, Maija	Type of publication Bachelor's Thesis	Date 09.12.2010
	Pages 31	Language Finnish
	Confidential () Until	Permission for web publication (x)
Title GROWTH IN BUILDING MATERIAL SAMPLES: METHOD VALIDATION		
Degree Programme Laboratory Sciences		
Tutor(s) SALO, Esa		
Assigned by PITKÄNEN, Reijo		
<p>Abstract</p> <p>The thesis was carried out at Jyväskylä University of Applied Sciences in winter and spring 2010. The main aim was to validate a method consisting three parts for verifying fungi and bacterial microbe growth in building material samples. The methods were direct microscopic observation, direct culture method and dilution method for the culture. Validation was made to find out how different techniques, solutions, agar bases and persons executing these tests have an affect on test results of the analysis and also compare results from all three methods and how they match.</p> <p>The research was carried out with varied building material samples. Tests were based on reports published at Asumisterveysopas (2008) and Indoor Air Seminar reports in 1999 and 2005. All together there were 16 different building material samples. The samples were grown on 2 % malt extract agar, 18-dichloran-glyserol agar and tryptone-glucose-yeast agar. Malt extract agar and 18-dichloran-glyserol agar were suitable for the growth of fungi and tryptone-glucose-yeast agar was suitable for bacteria. Direct microscopic observation was made from native sample and colorized sample by tape preparation. Fungi were incubated at 25 °C for 7 days and bacteria for 7 + 7 days. After incubation colonies were calculated and identified.</p> <p>The result of this study indicates that two of three methods will make microbes in building material samples grow. As for direct microscopic observation there was basically no growth even though the samples were taken clearly damaged structure. Other two methods gave same kind of test results. The results were affected by fact that samples were old and there was no reference material to compare results.</p>		
Keywords building material sample, microbe, direct culture method, dilution method for the culture		
Miscellaneous		

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	2
2 KOSTEUSVAURIOANALYYSIN PÄTEVYYS	3
2.1 Analysoijan pätevyys.....	3
2.2 Tutkimusmenetelmien luotettavuus	4
2.3 Laaturjestelmä	4
3 VALIDOINTI	5
3.1 Validoinnin määritelmä	5
3.2 Mikrobiologisten menetelmien epävarmuus.....	6
3.3 Mikrobiologisen validoinnin suuret.....	7
4 VALIDOINTIIN VALITUT MENETELMÄT	10
4.1 Menetelmien valinnan peruste	10
4.2 Kasvatuksellisten menetelmien tulokset.....	11
4.3 Materiaalinäytetulosten tulkinta	12
4.4 Rakennusmateriaalinäytteiden mikrobilajeista	13
5 TYÖN TOTEUTUS	15
5.1 Työn lähtökohdat.....	15
5.2 Kasvatusalustat.....	16
5.3 Näytteen esikäsittely laimennosviljelyssä	17
5.4 Laimennossarja.....	18
5.5 Viljely	18
5.6 Näytteen esikäsittely suoraviljelyssä.....	18
5.7 Näytteen esikäsittely ja analysointi suoramikroskopoinnissa	19
5.8 Materiaalinäytteiden analysointi	19
5.9 Tulosten laskeminen	22
6 TULOKSET	24
6.1 Tutkimuksen tulokset	24
6.2 Johtopäätökset	28
7 POHDINTA	29
LÄHTEET	31
LIITTEET	

1 JOHDANTO

Terveysuojelulaissa (L763/94, 26§) sanotaan, että asunnon ja muun sisätilan sisäilman on oltava puhdasta. Tämä tarkoittaa sitä, etteivät mikrobit, kosteus, lämpötila, säteily, melu, ilmanvaihto, valo tai muut vastaavat tekijät saa aiheuttaa terveystahaitta henkilöille, jotka sisätiloissa asuvat tai oleskelevat. Terveystahaitalla tarkoitetaan asuin- ympäristössä tai olosuhteissa olevaa tekijää, joka aiheuttaa sairautta tai sairauden oiretta. Terveysuojeluviranomaiset tekevät asunnontarkastuksia, joilla pyritään selvittämään aiheutuuko asunnosta tai muusta sisätilasta siinä asuville tai oleskeleville terveystahaitta. Asunnontarkastuksen alullepanija on yleensä asunnon omistaja tai asukas. Poikkeustapauksissa tarkastus voidaan tehdä myös ulkopuolisen toimeksiannosta. Terveysuojeluasetuksen (A1280/94) 15 §:n mukaan huomio on kiinnitettävä asuntojen ja muiden oleskelutilojen valvonnassa seuraaviin seikkoihin:

- 1) maaperän saastumiseen ja muihin mahdollisesti haittaa aiheuttaviin tekijöihin, kuten rakennuksen kosteusoloihin
- 2) kylmänä vuodenaikana asumiseen tai oleskeluun käytettävien tilojen lämmityksen asianmukaisuuteen
- 3) rakennuksen riittävään tiiviyyteen ja lämmöneristävyyteen
- 4) rakennuksen ilmanvaihdon riittävyyteen

(Asumisterveysopas 2008, 9-11.)

Terveystahaitta aiheuttavien mikrobiologisten, kemiallisten tai fysikaalisten tekijöiden mittaamiseen ja arvioimiseen tulisi käyttää Asumisterveysohjetta (STM:n oppaita 2003:1) ja Asumisterveysopasta (Sosiaali- ja terveysministeriö 2008). Mikäli käytetään muita kuin näissä julkaisuissa esitetyjä mittaamenetelmiä, on aina varmistettava menetelmien luotettavuus ja soveltuvuus terveystahaitan arviointiin. (Mts. 11.)

Jyväskylän ammattikorkeakoulun rakennuslaboratorio tekee sisäilmatutkimusta, ja osana sitä on rakennusmateriaalinäytteiden mikrobiston tutkiminen. Opinnäytetyön aloittamisen aikaan keväällä 2010 rakennuslaboratorio aikoi akkreditoida sisäilmatutkimuksensa, joten tarve rakennusmateriaalinäytteiden tutkimuksen validoinnille

syntyi. Tutkimuksen lähtökohtana on se, että kosteusvaurioituneissa materiaaleissa kehittyvä mikrobikasvusto voi aiheuttaa terveyshaittaa. Tutkimuksen perusteella voidaan tehdä päätös, puretaanko vaurioitunut materiaali pois. Tässä opinnäytetyössä pyrittiin validoimaan kolmikohtainen menetelmä rakennusmateriaalinäytteen mikrobikasvuston toteamiseksi. Validoinnissa oli tarkoitus selvittää, miten eri tekniikat, liuokset, kasvatusalustat ja työn suorittajat vaikuttivat analyysituloksiin sekä miten eri menetelmillä tuotetut analyysitulokset ja niistä vedetyt johtopäätökset vastasivat toisiaan. Mikrobinäytteiden käsittelyn ja analysoinnin pohjana olivat Asumisterveysoppaan ohjeet.

2 KOSTEUSVAURIOANALYYSIN PÄTEVYYS

2.1 Analysoijan pätevyys

Työsuojelulain 49 §:n mukaan viranomaiselle tutkimuksia ja selvityksiä tekevällä asiantuntijalla on oltava riittävä pätevyys ja asiantuntemus. Asiantuntijan on myös osoitettava kunnan terveydensuojeluviranomaiselle käyttämiensä tutkimusmenetelmien luotettavuus. Pätevyys perustuu tutkimuksia suorittavan asiantuntijana toimivan yrityksen henkilöstön tai yksityisen henkilön koulutukseen, alalla hankittuihin lisätietoihin tai pitkäaikaiseen työkokemukseen. Pätevyyden vaatimus perustuu siihen, että terveyshaittaa aiheuttavien tekijöiden selvittäminen on vaikeaa ja vaativaa asiantuntijallekin haasteellista työtä. Asiantuntemus syntyy siitä, että yritys tai henkilö, joka toimii asiantuntijana, pystyy osoittamaan tutkimuksiin liittyvää kokemusta ja kykyä raportoida asianmukaisesti tehdyistä tutkimuksista ja selvityksistä. (Asumisterveysopas 2008, 16.) Terveystyösuojelulain 7 §:ssä on esitetty kunnan valvontatehtäviä hoitavan viranomaisen pätevyysvaatimukset, ja nämä vaatimukset täyttävää alan asiantuntijaa voidaan pitää päteväenä suorittamaan edellä mainittuja tutkimuksia terveyshaittoista.

2.2 Tutkimusmenetelmien luotettavuus

Ulkopuolisen asiantuntijan on osoitettava TsL:n 49 §:n mukaan kunnan terveydensuojeluviranomaiselle käyttämiensä tutkimusmenetelmien luotettavuus. Asumisterveysohjeessa ja –oppaassa on esitetty terveystieteen arvioinnin kannalta ensisijaiset menetelmät. Mikäli käytetään muita menetelmiä, on menetelmien tulosten vertailukelpoisuus pystyttävä esittämään ohjeen tai oppaan menetelmiin nähden. Esimerkiksi mikrobimittauksissa on voitu käyttää muita kuin Asumisterveysoppaassa esitettyjä kasvatusalustoja. Tällöin tulokset eivät ole verrattavissa oppaassa esitettyihin numeerisiin arvoihin, ellei käytetyn menetelmän (esimerkkitapauksessa käytetyn kasvatusalustan) vertailukelpoisuutta ole selvitetty eli validoitu. Terveydensuojeluviranomaiselle on esitettävä kirjallisesti käytetyt tutkimusmenetelmät ja niiden luotettavuuden arviointi. Terveydensuojeluviranomainen päättää menetelmän luotettavuudesta saamiensa dokumenttien pohjalta. (Asumisterveysopas 2008, 17.)

2.3 Laatujärjestelmä

Laboratoriotulosten merkitys on keskeinen monenlaisessa päätöksenteossa, joten laboratorion tuottamien tulosten on oltava luotettavia. Miltei poikkeuksetta tuotannollisten ja oikeudellisten sekä ympäristöä ja ihmisen terveyttä koskevien päätösten takana on jonkinlaisia laboratoriotutkimuksia ja analyysituloksia. Laboratoriolla on vastuunsa työnsä laadusta ja laadun ylläpitämisestä. Tulosten on oltava oikeita sovitulla tarkkuudella ja tilaajan käytettävissä sovittuna ajankohtana, ja kustannusten tulee olla sovitun suuruisia. Suunniteltu toiminnan laatu ja tulosten luotettavuus saavutetaan laboratoriokohtaisissa laatujärjestelmissä eli laatukäsikirjoissa sekä menettelytapaohjeissa. Laatukäsikirjaan tutustumalla saa käsityksen siitä, millainen on kyseessä olevan laboratorion laatutoiminnan taso ja mitkä ovat sen keskeiset vastuut ja toiminta-alueet. Testaus- ja tutkimuslaboratoriot noudattavat yleisimmin SFS-EN ISO/IEC 17025 –standardin vaatimuksia laatujärjestelmänsä luomisessa, jolloin tavoitteena on kansainvälisesti hyväksyttävän pätevyyden saaminen määriteltyjen testausmenetelmien suorittamiseen.

Laatutoimintaan kuuluvat myös sisäiset ja ulkoiset auditoinnit. Auditoinnilla tarkoitetaan suunniteltua tilaisuutta, jossa auditoija selvittää dokumenttien avulla ja keskustelemalla työtä tekevien henkilöiden kanssa, ovatko käytännön toimintatavat ja tuotetut analyysipalvelut kuvatus laatujärjestelmän mukaisia. Samalla auditoija arvioi, ovatko toimintatavat toiminnalle asetettujen vaatimusten kannalta tarkoituksenmukaisia. (Jaarinen & Niiranen 2005, 8 - 9.)

3 VALIDOINTI

3.1 Validoinnin määritelmä

Elintarvikeviraston (nyk. Evira) vuonna 1997 julkaiseman mikrobiologisten menetelmien validointiohjeessa todetaan validoinnin olevan menetelmän kelpoisuuden osoittamista. Validoinnin tarkoituksena on saada vertailuarvoja sellaisille suureille, jotka kuvaavat käytetyn menetelmän luotettavuutta. Mikrobiologiassa tällaisia suureita ovat oikeellisuus, täsmällisyys, toteamisraja, määrittäysraja, spesifisyys, herkkyys ja lineaarisuus. Mikrobiologisten menetelmien validoimiseksi ei ole olemassa kansainvälisesti hyväksytyjä ohjeita eikä myöskään kriteerejä validointitulosten arvioimiseksi. Tois-
taiseksi on tyydyttävä hankkimaan tuntumaa menetelmien käyttöön liittyviin epävarmuustekijöihin ja, jos mahdollista, kuvantamaan niitä numeerisesti. Menetelmien validointitarve laboratoriossa vaihtelee sen mukaan, minkä tyyppisiä menetelmiä laboratoriossa käytetään ja kuinka paljon laboratoriossa tehdään menetelmien kehitystyötä. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 2007, 1.) Seuraavassa taulukossa (Taulukko 1.) on esitetty, millainen validointi on suoritettava sen mukaan mitä validoidaan. Taulukko on Ruotsin Elintarvikeviraston ohjeistuksen mukainen, mutta sitä voi soveltaa mikrobiologisiin validointeihin Suomessa.

TAULUKKO 1. Ruotsin Elintarvikeviraston luokittelu menetelmien validointitarpeesta (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 2007, jossa taulukko Nilsson 1996.)

Luokka ja validointitieto	Validointitarve laboratoriossa
1. Täydellisesti validoitu menetelmä	Verifiointi, jolla laboratorio osoittaa, että menetelmä toimii ohjeen mukaisesti
2. Tunnettu, mutta ei kollaboratiivisesti testattu menetelmä	Verifiointi, johon sisältyy osittainen validointi
3. Menetelmä, joka on yksiselitteisesti ja uskottavasti kuvattu tieteellisessä julkaisussa	Verifiointi, johon sisältyy osittainen validointi
4. Menetelmä, joka on kuvattu tieteellisessä julkaisussa, mutta kuvaus ei ole yksiselitteinen tai uskottava	Täydellinen validointi ja verifiointi
5. Itse kehitelty, oma menetelmä	Täydellinen validointi ja verifiointi

Etukäteen suunniteltujen mittausarjojen avulla selvitetään analyysimenetelmän suorituskykyparametrit. Menetelmän luotettavuus todetaan validoinnissa saatujen tulosten sekä tausta-aineiston avulla. (Jaarinen & Niiranen 2005, 9.)

3.2 Mikrobiologisten menetelmien epävarmuus

Mikrobiologiassa validointi on erilaista kuin perinteisessä kemiassa, sillä mikrobiologiassa tutkittava näyte on elävää materiaalia. Näytteen todellista mikrobipitoisuutta ei tiedetä, eikä se pysy vakiona. Näytteestä tehdään laimennossarjat, mikä on edellytyksenä, jotta maljoilta pystytään lukemaan yksittäispesäkkeiden määrä. Rinnakkaisten laimennosten maljojen välillä esiintyy suurtakin vaihtelua ilman että kyseessä on virhe. Mikrobiologiassa täsmällisesti oikean tuloksen eli oikeellisuuden määrittäminen on vaikeaa, joten oikeana tuloksena pidetään menetelmän antaman keskiarvotuloksen ja hyväksytyyn arvon läheisyyttä. Hyväksytty arvo on referenssimateriaaleilla saatu ”todellinen arvo”. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 2007, 4.)

Mikrobiologisen näytteen homogointi on ensimmäinen epävarmuustekijä, sillä se saattaa tuhota eläviä mikrobeja. Mikrobit eivät välttämättä kestä homogenisoinnin aiheuttamaa lämpötilan nousua. Mikrobeja saattaa myös irrota tutkittavasta materiaalista. Nämä kaksi tekijää vaikuttavat siihen, että tuloksissa esiintyy suurta hajontaa.

Hajontaa lisäävät myös työntekijäkohtaiset työskentelyerot, kuten erot pesäkkeiden tulkinnassa ja laskennassa. Ongelmia aiheuttavat myös vaihtelut erilaisten mikrobikantojen välillä, taustamikrobit, matriisin ominaisuudet sekä joukko muita tekijöitä, joita on hankala määrittää. Mikrobiologisista näytteistä tehdyissä rinnakkaismäärityksissä esiintyy ylihajontaa. Kemiallisissa analyyseissä puolestaan tiedetään, että virheettömästi suoritettun analyysin keskihajonta on nolla. (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 2007, 4.)

3.3 Mikrobiologisen validoinnin suureet

Mikrobiologisessa validoinnissa oleelliset suureet ovat oikeellisuus, täsmällisyys, toteamisraja, määrittäysraja, spesifisyys, herkkyys ja lineaarisuus. Taulukossa 2 on suureita, joita menetelmän kehittelyyn liittyvässä *täydellisessä* validoinnissa pyritään numeerisesti kuvaamaan.

TAULUKKO 2. Mikrobiologisten kvalitatiivisten ja kvantitatiivisten menetelmien validointiin liittyvät suureet (Mikrobiologisten menetelmien validointiohje 2007, 7.)

Suureet	Kvalitatiivinen menetelmä	Kvantitatiivinen menetelmä
Oikeellisuus	x	x
Suhteellinen oikeellisuus	x	x
Virheprosenttisuus	x	-
Virhenegatiivisuus	x	-
Täsmällisyys	x	x
Toistettavuus	x	x
Uusittavuus	x	x
Toteamisraja	x	-
Määrittäysraja	-	x
Spesifisyys	x	x
Herkkyys	x	-
Lineaarisuus	-	x

Esitettävät validointiin liittyvät suureiden määritelmät pohjautuvat CEN/ISO – asiakirjaan (1997), jossa on annettu yleiset ohjeet vaihtoehtoisten mikrobiologisten menetelmien validoimiseksi. Käsitteet on selitetty lyhyesti Mikrobiologisten menetelmien validointiohjeessa 1997, josta seuraavat käsiteselitteet on poimittu.

Oikeellisuus

Oikeellisuus jakautuu kolmeen alakäsitteeseen: suhteelliseen oikeellisuuteen, virhepositiivisuuteen ja virhenegatiivisuuteen. Oikeellisuuden tutkiminen edellyttää tietoa analysoitavan mikrobin todellisesta pitoisuudesta. Elävän materiaalin ollessa kyseessä mikrobien todellisen pitoisuuden ja validoitavan menetelmän antamien tulosten oikeellisuutta ei pystytä varmasti määrittämään. Oikeellisuuden määrittämisessä tulisi käyttää sertifioituja referenssimateriaaleja, joiden ilmoitettua pitoisuutta pidetään oikeana tuloksena. Sertifioidut referenssimateriaalit ovat sekä harvinaisia että kalliita, joten käytännössä oikeellisuus joudutaan määrittämään käyttäen sertifioimattomia referenssejä tai siirrostettuja näytteitä.

Täsmällisyys

Toistettavuus ja uusittavuus kuvaavat menetelmän antamien tulosten täsmällisyyttä. Tutkittavan näytteen mikrobipitoisuudella on merkittävä vaikutus täsmällisyyteen, sillä mitä pienempi pitoisuus on kyseessä, sitä epävarmempi tulos on. Toistettavuudella tarkoitetaan peräkkäisistä toistoista saatujen tulosten lähekkäisyyttä tutkittaessa identtisiä näytteitä, kun analyysi on suoritettu samalla menetelmällä, samoissa olosuhteissa ja samojen henkilöiden toimesta lyhyellä aikavälillä. Uusittavuus puolestaan on yksittäisten tulosten lähekkäisyys eri henkilöiden analysoidessa identtisiä näytteitä käyttäen samoja menetelmiä joko samassa tai eri laboratoriossa.

Toteamisraja

Mikrobiologiassa toteamisraja eli pienin mahdollinen luotettavasti todettava mikrobipitoisuus voidaan määrittää vain kvalitatiiviselle menetelmälle. Mikrobiologisissa menetelmäkuvauksissa ilmoitetaan harvoin toteamisraja. Se voidaan määrittää tutkimalla referenssimateriaaleja tai siirrostettuja näytteitä. Pienin mahdollinen referenssin

tai siirrostetun näytteen mikrobipitoisuus on yleensä viisi solua tutkittavassa näytemäärässä.

Määrittysraja

Määrittysrajana pidetään alhaisinta tietyissä rajoissa vaihtelevaa mikrobipitoisuutta, joka on mahdollista kvantitatiivisesti määrittää validoitavalla menetelmällä. Kiinteitä näytteitä tutkittaessa raja on alle 10 pesäkettä muodostavaa yksikköä grammassa (näytettä maljavalulla) tai alle 100 pmy/g käytettäessä pintalevitystekniikkaa. Määrittys- ja toteamisrajaan vaikuttavat käytetyn menetelmän selektiivisyys, spesifisyys ja näytematriisi mikrobistoinen.

Spesifisyys

Spesifinen menetelmä määrittää vain analysoitavan mikrobin. Mikrobiologiassa näin harvemmin tapahtuu, vaan menetelmää validoitaessa on tutkittava ja tunnistettava tyyppilliset pesäkkeet analyysia häiritsevien mikrobien joukosta.

Herkkyys

Herkkyys on keskeinen menetelmän ominaisuus verratessa menetelmiä toisiinsa tai tehtäessä täydellistä validointia uutta menetelmää varten. Herkkyys tarkoittaa menetelmän kykyä todeta vähäiset vaihtelut määritettävien mikrobien pitoisuuksissa tietyssä materiaalissa.

Lineaarisuus

Lineaarisuudella tarkoitetaan kvantitatiivisen menetelmän kykyä antaa tuloksia, jotka ovat suoraan verrannollisia näytteen mikrobipitoisuuteen. Mikrobipitoisuuden muutoksen näytteessä pitäisi aiheuttaa suhteessa yhtä suuri muutos tuloksissa.

4 VALIDOINTIIN VALITUT MENETELMÄT

4.1 Menetelmien valinnan peruste

Menetelmävalidointiin valittiin kolme erilaista menetelmää: laimennosviljelyn, suoraviljelyn sekä suoran mikroskopoinnin. Menetelmät valittiin sillä perusteella, että ne olivat jo olleet käytössä kosteusvaurionäytteitä tutkittaessa. Laimennosviljely on suositeltava menetelmä virallisissa yhteyksissä, ja se on Suomen sosiaali- ja terveysministeriön ohjeen mukainen (Aerobiologian tutkimuspalvelut 2008). Laimennossarjamenetelmällä saadaan tuloksia näytteen tarkasta elinkykyisten mikrobien pitoisuudesta, kun taas suoraviljelyllä saadut tulokset antavat suuntaa elinkykyisten mikrobien määrästä (Reiman, Haatainen, Kallunki, Kujanpää, Laitinen & Rautiala 1999). Suoran mikroskopoinnin tarkoituksena oli saada selville suoraan näytettä mikroskopoimalla, onko siinä kosteusvaurioindikaattorimikrobeja vai ei. Suoraan mikroskopoimalla voidaan havaita sienikasvuston (rihmasto, itiöt, itiöitä tuottavat rakenteet) nopeasti. Suoramikroskopoinnilla voidaan havaita myös kuollut sienikasvusto, jota ei esiinny viljelymenetelmissä. Suoramikroskopointi ei ole luotettava bakteerikasvuston havaitsemiseen. (Aerobiologian tutkimuspalvelut 2008.)

Laimennossarjamenetelmä on hidas ja monivaiheisempi kuin suoraviljely, mutta se antaa enemmän tietoa mikrobien tarkasta määrästä kuin suoraviljelymenetelmä, jossa pesäkkeet kasvavat päällekkäin ja ovat hankalasti laskettavissa ja erotettavissa toisistaan. Laimennosviljely mahdollistaa myös mikrobien tunnistamisen, sillä laimeimmassa hyväksyttävässä maljassa mikrobit kasvavat sen verran erillään, että niistä voidaan ottaa teippipreparaatti lähempää mikroskooppista tarkastelua varten tai ne voidaan tunnistaa suoraan maljalta mikroskopoimalla, sillä ne eivät kasva päällekkäin. Laimennossarjamenetelmän valmistelut vievät näytettä kohti noin tunnin, lisäksi laboratoriovälineitä kuluu huomattavasti enemmän kuin suoraviljelyssä. Suoraviljelyn haittana on jo mainittu pesäkkeiden päällekkäiskasvu, joka vaikeuttaa paitsi mikrobi-pesäkkeiden laskemista myös niiden tunnistamista. Toisaalta suoraviljelymenetelmällä saadaan tietoa siitä, kasvaako näytteessä ylipäättään mikrobeja. Tällaiseen tarkasteluun suoraviljely on hyvä menetelmä. Asiantuntija pystyy myös tulkitsemaan päällekkäisyysistä huolimatta pesäkkeistä, viittaako kasvusto kosteusvaurioon materiaalissa. Jos pystyttäisiin käyttämään vain suoraviljelyä mikrobikasvuston analysointiin, se

nopeuttaisi analyysintekijän työtä, jolloin työvoimaresursseja vapautuisi muuhun käyttöön.

Suora mikroskopointi näytteestä lisää analyysin nopeutta. Mikäli halutaan tietää vain, onko tukittava materiaali vaurioitunut, voidaan suorittaa suora mikroskopointi. Suorassa mikroskopoinnissa näytettä siirretään objektilasille joko käyttämällä teippiä tai rapsuttamalla. Näytettä voidaan tarkastella joko natiivina tai värjättyinä. Mikäli näyte värjätään, täytyy ottaa huomioon, että useimmat itiöt turpoavat kostuessaan. Tällöin ei saada todellista kuvaa tutkittavasta itiöstä ja mahdollinen tunnistaminen hankaloituu.

Laimennossarja- ja suoraviljelymenetelmien käytöstä rakennusmateriaalien mikrobipitoisuuksien ja mikrobiston määrittämisessä on tehty tutkimus Kuopion aluetyöterveyslaitoksella ja tulokset esitetty Sisäilmastoseminaarissa 1999. Tutkimuksella pyrittiin selvittämään onko mikrobianalyysien perusteella tehtävä tulkinta materiaalinäytteen vaurioasteesta samanlainen. Tulosten perusteella molemmilla menetelmillä päästään usein samaan lopputulokseen. (Reiman ym. 1999.)

4.2 Kasvatuksellisten menetelmien tulokset

Kasvatuksellisten menetelmien tulokset ilmoitetaan pesäkkeen muodostavana yksikkönä (pmy). Pesäkkeiden määrä lasketaan ja pesäkkeet tunnistetaan sienitieteellisillä menetelmillä. Laimennossarjamenetelmän tulos materiaalinäytteelle on pmy/g eli pesäkkeen muodostava yksikkö per gramma (näytettä). Suoraviljelymenetelmän tulos ilmoitetaan pmy per malja -tuloksen perusteella Työterveyslaitoksen asteikon mukaan: (Materiaalinäytteen mikrobianalyysi, 2009.)

-	= ei mikrobeja
+	= niukasti (1-19 pmy / malja)
++	= kohtalaisesti (20–49 pmy / malja)
+++	= runsaasti (50–200 pmy / malja)
++++	= erittäin runsaasti mikrobeja (yli 200 pmy / malja)

Tuloksissa ovat mukana vain ne mikrobit, joille käytetyt kasvatusalustat ja

-olosuhteet sopivat. Etuna on se, että mikrobit voidaan tunnistaa. Kasvatuksellisten menetelmien heikkous on, että esille saadaan vain ns. elävät ja valituilla alustoilla kasvavat itiöt.

4.3 Materiaalinäytetulosten tulkinta

Rakennusten uloimmissa rakenteissa esiintyy aina mikrobeja. Mikrobipitoisuudet voivat olla huomattavia etenkin alapohjan ja ulkoseinän materiaaleissa, jotka ovat koskeuksissa maaperän kanssa. Suuret mikrobipitoisuudet eivät aina viittaa kosteusvaurioon ja terveysthaitaan. Kulkeutuessaan sisäilmaan itiöt ja mikrobien aineenvaihduntatuotteet saattavat aiheuttaa terveysthaitan. Rakentamisessa tulee pyrkiä suojaamaan rakennus kastumiselta ja vaurioituneet rakenteet, kuten lahovauriot, tulee korjata. (Asumisterveysopas 2008, 168–169.)

Sienten lajitunnistus on vaativaa asiantuntijatyötä. Sienet tunnistetaan yleensä sukutai ryhmätasolle. Joidenkin homeiden osalta lajitunnistus pesäkkeen ulkonäön sekä itiöiden perusteella on mahdollista myös harjaantumattomalle silmälle, mutta virheiden välttämiseksi lajitason tunnistuksen tekee tarvittaessa alan asiantuntija. Rakennuksesta otetuista materiaalinäytteistä tunnistetaan normaalin mikrobiston lisäksi kosteusvaurioindikaattorit ja mahdolliset toksiinintuottajat. Mikrobilajisto on tunnistettava, sillä yksittäisillä mikrobeilla on toisistaan poikkeavia haitallisia ominaisuuksia. (Sisäilmayhdistys 2008.)

Asumisterveysohjeessa 2003 on annettu raja-arvoja materiaalinäytteen mikrobipitoisuudelle. On huomattava, että ilman lajiston tarkastelua ei voida tehdä johtopäätöksiä lähellä raja-arvoa olevista tuloksista.

Sienikasvusto voidaan todeta, mikäli näytteen sieni-itiöpitoisuus on vähintään 10 000 pmy/g. Bakteerikasvuun viittaa näytteessä esiintyvä yli 100 000 pmy/g. Sädesienikasvusto todetaan, mikäli sädesienten määrä on suurempi kuin 500 pmy/g. Vertailunäytteen käyttö helpottaa mikrobikontaminaation osoittamista. Mikäli materiaalinäytteen sieni-itiöpitoisuus on vähintään 1000 kertaa suurempi kuin vertailunäytteessä, tulos viittaa mikrobikontaminaatioon. (Asumisterveysopas 2008, 169.)

Vaikka materiaalinäytteessä esiintyisi mikrobeja vain vähän ja ei ollenkaan indikaattorisieniä, tulos ei sulje pois mikrobivaurion mahdollisuutta. Tuloksen merkitystä pohdittaessa tulee ottaa huomioon näytteenottokohdan valinta ja edustavuus tutkittavassa rakenteessa. Mikrobisto vaihtelee erilaisissa materiaaleissa, eri rakenneosissa, eri kosteusolosuhteissa ja mikrobikasvun eri vaiheissa. Mikrobien aiheuttamat terveyshaitat ovat mikrobikohtaisia. Pienet mikrobit pääsevät kulkeutumaan syvälle keuhkoihin, toiset mikrobit aiheuttavat allergiaa, haihtuvat orgaaniset yhdisteet aiheuttavat ärsytystä ja mykotoksiinit aiheuttavat toksinikohtaisia vasteita kohde-elimissä. Tietoja käytetään tehtäessä kokonaisarviota mikrobikontaminoituneen rakenteen aiheuttamasta terveysriskistä. (Sisäilmäyhdistys 2008.)

4.4 Rakennusmateriaalinäytteiden mikrobilajeista

Täsmällistä ja yksiselitteistä termiä rakennusmateriaaleissa kasvavasta sieniryhmästä on hankala esittää. Homesienistä käytetään käsitteitä sienisuvusto ja –lajisto. Mikrobikasvusto – termiä käytetään yleisnimityksenä rakennusmateriaaleissa esiintyville mikrobeille, sienille ja bakteereille. (Asumisterveysopas 2008, 172.)

Taulukossa 3 on esimerkkejä kosteusvaurioon ja mikrobikasvustoon viittaavista mikrobisuvuista, -lajeista ja –ryhmistä. Näitä mikrobeja nimitetään myös indikaattorimikrobeiksi. Ne ovat eri tutkimuksissa esiintyneitä, vauriorakennuksissa ja vaurioituneissa materiaaleissa todettuja mikrobeja. Indikaattorimikrobit harvemmin kasvavat vauriotomien vertailurakennusten materiaaleissa. Myös tavanomaiset homesuvut voivat kasvaa kostuneessa materiaalissa.

TAULUKKO 3. Esimerkkejä ulko- ja sisäilmassa tavanomaisesti esiintyvistä sienisuvuista ja -ryhmistä sekä kosteusvauriosta indikoivista mikrobisuvuista, -lajeista ja -ryhmistä (Asumisterveysopas 2008, 173.)

Ulkoilmassa yleisiä sienisukuja ja -ryhmiä	Sisäilmassa yleisiä sienisukuja ja -ryhmiä	Kosteusvaurioon viittaavia mikrobisukuja, -lajeja ja -ryhmiä
<i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus</i> *	<i>Acremonium</i> *
<i>Aspergillus</i> *	<i>Cladosporium</i> *	<i>Aspergillus fumigatus</i> *
<i>Cladosporium</i> *	<i>Penicillium</i> *	<i>A. ochraceus</i> *
<i>Penicillium</i> *	hiivat	<i>A. penicilloides / restrictus</i>
basidiomykeetit		<i>A. sydowii</i> *
hiivat		<i>A. terreus</i> *
steriilit**		<i>A. versicolor</i>
		<i>Chaetomium</i>
		<i>Eurotium</i>
		<i>Exophiala</i>
		<i>Fusarium</i> *
		<i>Oidiodendron</i>
		<i>Geomyces</i>
		<i>Paecilomyces</i> *
		<i>Phialophora</i>
		<i>Scopulariopsis</i>
		<i>Sporobolomyces</i>
		<i>Sphaeropsidales (Phoma)</i>
		<i>Stachybotrys / Memnoniella</i> *
		Sädesienet*
		<i>Trichoderma</i>
		<i>Tritirachium / Engyodontium</i>
		<i>Ulocladium</i>
		<i>Wallemia</i>
<p>* mahdollisesti toksiineja tuottavia mikrobeja, ** pesäkkeitä, jotka eivät käytettävillä kasvualustoilla tuota itiöitä</p>		

Yksittäisen kosteusvaurioon viittaavan mikrobin esiintyminen useassa rakennuksen eri tiloista otetussa näytteessä tai useiden eri indikaattorimikrobien esiintyminen samassa näytteessä on epätavomaista ja voi viitata kosteusvaurioon rakenteessa. (Asumister-

veysopas 2009, 174.) Etenkin *Aspergillus versicolorin*, *Stachybotrys chartarumin* ja streptomykeettien löytyminen viittaa merkittävään kosteusvaurioon (Terveyskirjasto 2009).

5 TYÖN TOTEUTUS

5.1 Työn lähtökohdat

Työssä pyrittiin validoimaan kolmikohtainen menetelmä rakennusmateriaalin mikrobikasvun osoittamiseksi. Työ tehtiin sosiaali- ja terveysministeriön Asumisterveysoppaassa olevan ohjeen mukaan pintasivelynäytteiden osalta ja Sisäilmastoseminaari 1999 –julkaisussa olevan kuvauksen mukaisesti suoraviljelynäytteen osalta. Käytännön työ toteutettiin Jyväskylän ammattikorkeakoulun kemian laboratoriossa talvella ja keväällä 2010. Näytteitä oli 16 kappaletta. Näytteet olivat eri rakennuksista tai tiloista otettuja materiaalinäytteitä. Seuraavassa on lista näytteistä analysointijärjestyksessä ja kuviossa 1 ovat näytteet.

1. Eristysvillaa
2. Puuta ja sementtiä
3. Purua seinästä
4. Parko-levyä
5. Tapettia ja tasoitetta
6. Eristysvillaa
7. Laastia
8. Laastia
9. Puuta seinästä
10. Tasoitetta ja rappausta
11. Maalia, puuta, rappausta
12. Lastulevyä
13. Puuta
14. Sementtiä
15. Täytettä
16. IV-suodatin



KUVIO 1. Näytteet analysointijärjestyksessä

Näytteet olivat muovipussissa. Jokaisesta näytteestä tehtiin rinnakkaismääritys eli sama työ tehtiin kaksi kertaa yhtä aikaa.

5.2 Kasvatusalustat

Asumisterveysoppaassa suositellaan käytettäväksi yhtä sienikasvualustaa ja yhtä bakteerikasvualustaa. Mikäli näytteestä halutaan enemmän tietoa, voidaan käyttää myös toista sienikasvualustaa. (Asumisterveysopas 2008, 154.) Kasvatusalustoina eli elatusalustoina käytettiin kolmea eri Asumisterveysoppaassa ehdotettua alustaa. Alustat valmistettiin alusta asti itse ohjeen mukaan (ks. ohje liitteessä 1). Asumisterveysop-

paan ohjeesta poiketen käytössä oli THG-agarin¹ valmistuksessa jauhe joka sisälsi antibioottia lukuun ottamatta tarvittavat kuivat ainesosat. DG 18-agarjauhe² oli valmiiksi antibiootin sisältävää. MEA-agarisiin valikoitiin antibiootiksi kloramfenikoli.

THG-alustalla kasvoivat bakteerit ja sädesienet. 2 % mallasuuteagarilla (MEA) kasvoivat mesofiiliset eli kosteassa viihtyvät hiiva- ja homesienet. DG 18 kasvoivat kserofiiliset eli kuivaa kasvualustaa suosivat hiiva- ja homesienet. Näillä kasvatusalustoilla kasvavat tavallisimmat homeet, indikaattorisienet ja mykotoksiinien tuottajat. (Sisäilmayhdistys 2008.)

5.3 Näytteen esikäsittely laimennosviljelyssä

Näytteestä otettiin noin 5 gramman osanäyte, joka hienonnettiin tai murskattiin joko huumareessa tai käsin. Näyte ei saanut kuumentua esikäsittelyssä yli 30 °C:n jotteivät siinä olevat mikrobit kuolisi kuumuuteen. Näytteenkäsittelyssä noudatettiin aseptista työskentelytapaa, ja kaikki näytteenkäsittelyyn tarvittavat välineet desinfioitiin 70 % etanoliliuoksella ennen ja jälkeen käsittelyn. Hienonnetusta näytteestä punnittiin 1 gramman suuruinen näyte analyysiä varten. Näyte laitettiin autoklaavissa steriloituun foliohattuiseen erlenmayer-pulloon, ja päälle kaadettiin laimennusliuosta siten, että saatiin laimennos 10^{-1} . Oletuksena oli, että 1 gramma näytettä vastaa 1 ml:aa laimennusliuosta. Käytännössä tämä tarkoitti sitä, että esimerkiksi 1 grammaan näytettä lisättiin 9 ml laimennosliuosta. Jotkin materiaalit imivät paljon vettä, tällöin valmistettiin suoraan laimennos 10^{-2} lisäämällä 1 grammaan näytettä 99 millilitraa laimennusliuosta. Näytesuspension sisältävä astia suljettiin huolellisesti foliohatulla ja laitettiin ravistelijaan 30 minuutiksi. Asumisterveysohjeessa mainitaan, että puolen tunnin ultraäänikäsittely ennen ravistelua tehostaa mikrobien irtoamista materiaalista, mutta koska ultraäänikäsittely ei ole pakollinen, niin vaihe jätettiin tekemättä.

¹ Tryptoni-hiivauute-glukoosiagar

² Dikloraani-18%-glyseroliagar

5.4 Laimennossarja

Laimennossarja valmistettiin näytteestä riippuen joko välille $10^{-1} \dots 10^{-4}$ tai $10^{-2} \dots 10^{-4}$. Steriileihin muoviputkiin pipetoitiin 9 ml laimennosliuosta ja 1 ml näytettä laimennossarjamenetelmällä. Ensin pipetoitiin ravisteltua näytesuspensiota muoviputkeen, jossa oli 9 ml laimennosliuosta. Saatiin laimennos -2. Tästä saadusta laimennoksesta pipetoitiin edelleen 1 ml uuteen muoviputkeen, jossa oli 9 ml laimennosliuosta, jolloin laimennokseksi muodostui -3. Näin toimittiin jokaisen näytteen kohdalla kunnes viimeisessä muoviputkessa oli laimennos -4.

5.5 Viljely

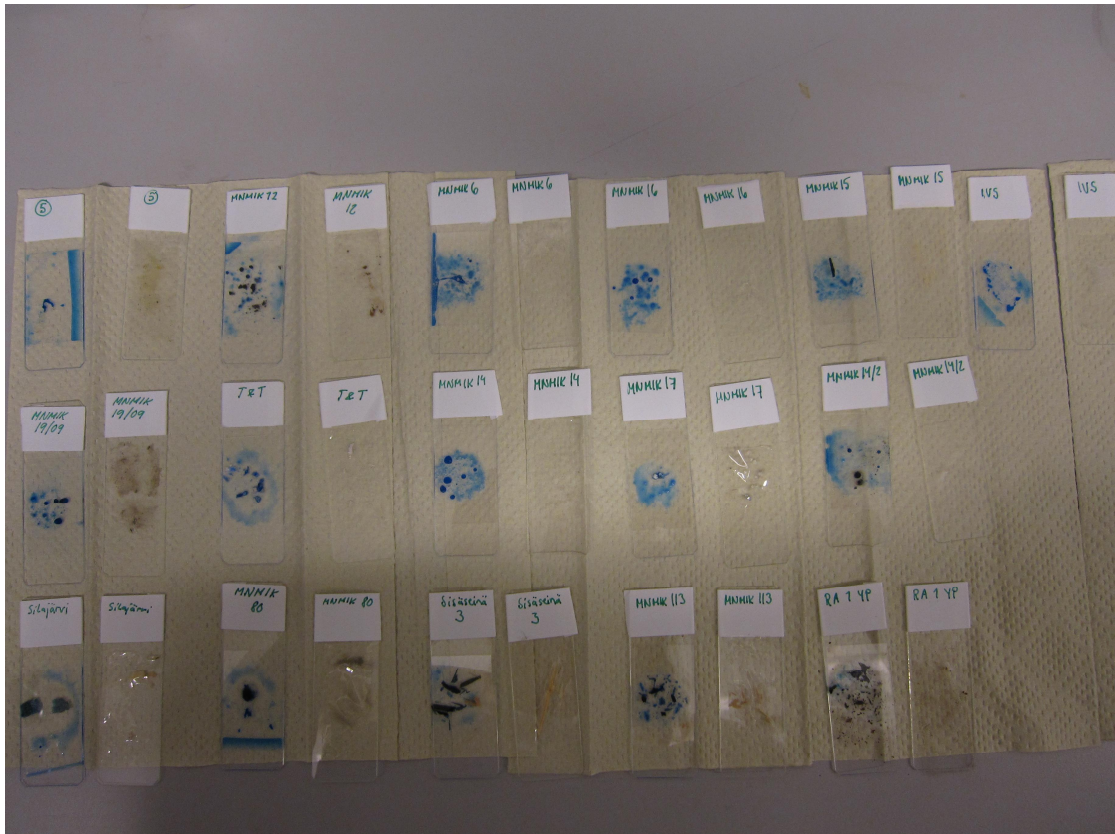
Viljely suoritettiin puhdashuoneessa laminaarivirtauskaapissa. Kutakin laimennosta pipetoitiin omalle kasvualustalleen 0,1 ml. Millilitran kymmenesosa on 0,1 ml, joten pipetoitu määrä maljalla kasvatti laimennosta siten, että esimerkiksi laimennos -2 oli maljalle pipetoituna -3. Maljojen merkinnässä piti olla huolellinen, ettei sekoita laimennoksia keskenään. Pipetoitu näyte levitettiin steriilillä kolmiosauvalla tasaisesti kasvualustalle ja laitettiin kansi alaspäin inkuboitumaan lämpökaappiin 25 °C:seen 7 vuorokaudeksi. Bakteerialustojen inkubointiaika on 7+7 vuorokautta sädesienikasvuston toteamiseksi.

5.6 Näytteen esikäsitteily suoraviljelyssä

Suoraviljelyssä näyte esikäsiteltiin samoin kuin edellä kuvatussa laimennossarjamenetelmässä. Näytemäärä, joka maljalle viljeltiin, oli riippuvainen analysoitavasta materiaalista, sillä suoraviljelytekniikassa näyte otettiin pieneen lusikkaan, joka mitat on määritelty Sisäilmastoseminaari 1999 -julkaisussa. Näytteiden massat olivat noin 20 milligrammasta 400 milligrammaan. Näyte ripoteltiin sellaisenaan suoraan kasvatusalustalle ja siirrettiin lämpökaappiin inkuboitumaan.

5.7 Näytteen esikäsittely ja analysointi suoramikroskopiinnissa

Näyte otettiin suoraan materiaalinäytteestä teippipreparaatille ja objektilasille. Teippi siis painettiin näytteeseen kevyesti ja liimattiin lasille, josta mikroskojoiitiin. Näytteis-tä tehtiin myös värjätty preparaatit käyttäen Asumisterveysoppaan ohjetta (ks. liite 2) soveltavin osin. Suoramikroskopiointi ei tuottanut tulosta, mikroskoopissa ei näkynyt mitään kasvustoon viittaavaa yhdessäkään näytteessä. Kuviossa 2 ovat värjäämättömät ja värjätty suoramikroskopiointipreparaatit.

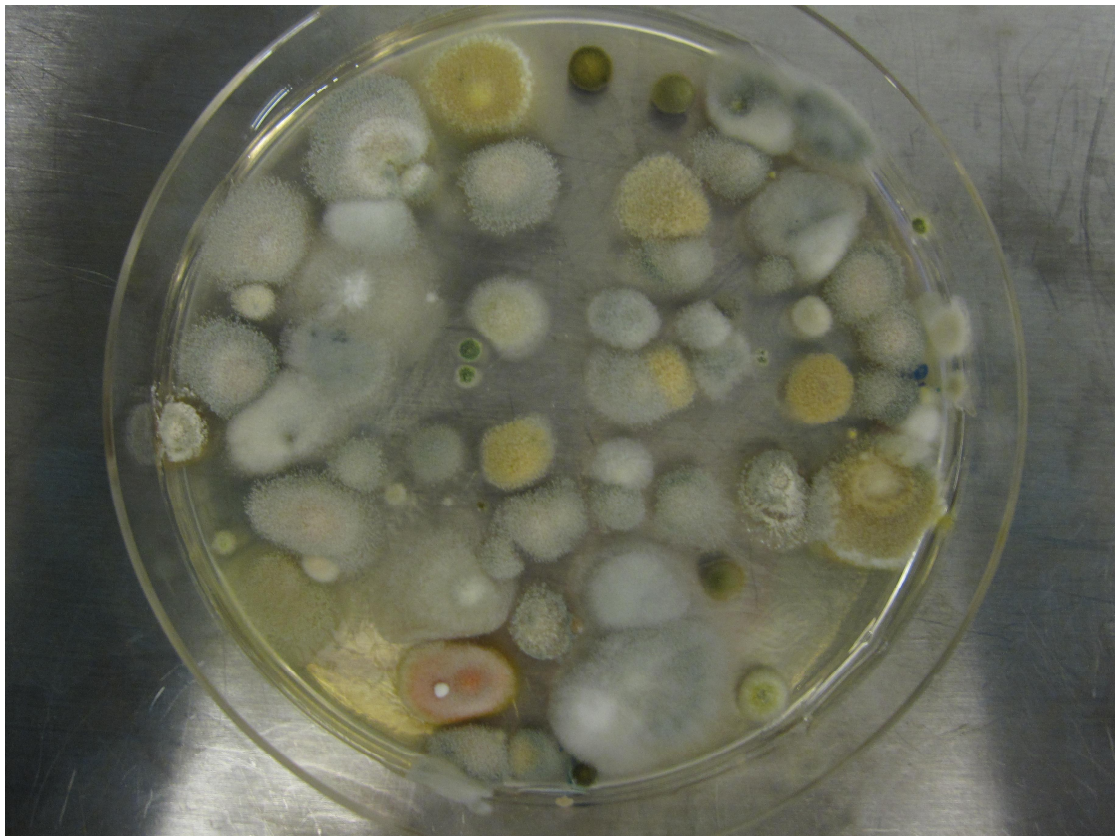


KUVIO 2. Suoramikroskopiointipreparaatit

5.8 Materiaalinäytteiden analysointi

Seitsemän vuorokauden inkuboinnin jälkeen sienimaljoilta laskettiin homeiden pesä-kemäärät ja sienet tunnistettiin morfologian perusteella. Käytössä oli 100-kertaiseksi

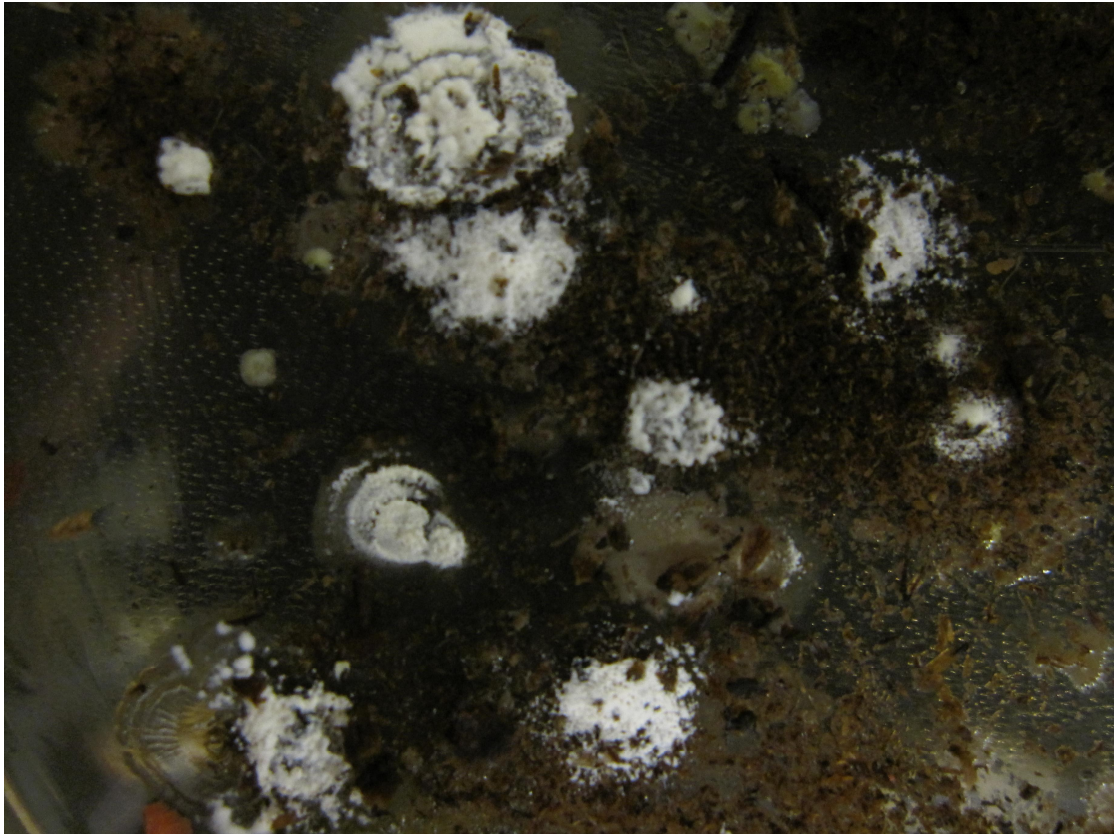
suurentava valomikroskooppi. Samalla laskettiin myös hiivat. Pääasiassa tunnistin sienet itse, mutta epävarmoissa tilanteissa tunnistuksen ja varmistuksen teki mikrobiologian asiantuntija Kristian Jansson. Tunnistamisessa käytin apuna kahta käsikirjaa; *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* (1998) sekä *Atlas of Clinical Fungi* (2000). Kirjojen ja K. Janssonin avulla sain tunnistettua yhteensä 17 erilaista homeetta. Homeja hiivapesäkkeet on helppo tunnistaa toisistaan. Homepesäke on kuiva, karvainen, vihreä, valkoinen, musta, ruskea, keltainen, harmaa tai sinertävä. Hiivapesäke on tyyppillisesti kostea ja kiiltävä, väriltään punainen, keltainen tai valkoinen. Mikroskoopilla tarkasteltaessa huomataan, ettei hiivapesäkkeessä ole rihmastoa. Hiiva on myös usein tasaisen pyöreä. Homepesäkkeessä on rihmastoa, itiöitä muodostavia rakenteita (ns. konidiopäitä) ja itiöitä irrallaan. (Asumisterveysopas 2008, 162.) Kuviossa 3 on tyyppillinen laimennossarjatekniikalla viljelty malja seitsemän vuorokauden inkuboinnin jälkeen. Kuvasta voi havaita, että erilaisia homepesäkkeitä on runsaasti.



KUVIO 3. Sienialustalla kasvavia homeita

Bakteerimaljoilta laskettiin bakteeripesäkkeiden kokonaismäärä, ja kasvatusta jatkettiin vielä seitsemän vuorokautta, minkä jälkeen laskettiin sädesienipesäkkeiden lukumäärä. Sädesienet oli helppo tunnistaa silmämääräisesti, mutta toisinaan laskeminen vaati mikroskooppista tarkastelua pesäkkeiden pienen koon takia.

Kuviossa 4 on bakteerimalja, jossa havaittavissa sekä sädesieniä että bakteeripesäkkeitä. Sädesienet ovat valkoisia ja pörröisiä, kun bakteerit ovat kosteita, keltaisia, valkoisia tai punaisia eikä niillä ole rihmastoja ympärillään.



KUVIO 4. Bakteerimalja, jossa valkoiset ”puuterikasat” ovat sädesieniä

Sädesienipesäke on siis pyöreä, ja sen ulkoreunaa saattaa kiertää valkea kehä. Sädesieni on halkaisijaltaan 1 - 2 mm, yleensä kuitenkin alle 5 mm. Se on ryppyinen, kuivahko ja napakasti kiinni alustassa. Väri on yleensä valkoinen, joskus myös harmaa tai jopa kellertävä. Mikroskoopilla tarkasteltaessa havaitaan selvästi pörröinen pesäke. ”Pörrö” on sienien muodostamaa rihmastoja ja rakenteeltaan hentoa hahtuvaa. Muut bakteerit eivät muodosta rihmastoja kuten sädesieni, mikroskopoidessa havaitaan vain solumassaa. Bakteerin ja hiivasolun erottaa toisistaan käytetyn kasvatusalustan perusteella, mutta myös solun koon perusteella. bakteerisolun halkaisija on noin 0,1 - 1 µm ja hiivasolun 3 - 24 µm. Sädesienen tunnistaa myös sille ominaisesta voimakkaasta maakellarimaisesta hajusta. (Asumisterveysopas 2008, 162.) Toisinaan haju voi tunkeutua suljetun maljan läpi.

5.9 Tulosten laskeminen

Tulosten laskenta alkaa maljoilla olevien pesäkemäärien laskemisella. Laskentaa voidaan pitää luotettavana, mikäli pesäkemäärä sienimaljalla on alle 150 pesäkettä ja bakteerimaljalla alle 250 pesäkettä. Pesäkemäärän ollessa suurempi mutta laskettavissa voidaan tulos ilmoittaa arviona, esimerkiksi ”yli 350 pmy/g”. Usein pesäkkeet kuitenkin kasvavat päällekkäin. Tällöin malja on hylättävä, sillä luotettavaa määrää pesäkkeistä ei voida saada päällekkäiskasvun takia. Samalla hylätään myös maljaa vastaava laimennos kokonaismikrobipitoisuutta laskettaessa. Asumisterveysoppaassa sanotaan, että ”Jos laimeimmasta laimennoksesta viljelyillä maljoilla ei kasva yhtään pesäkettä, ja edellisen laimennoksen maljoilla kasvaa korkeintaan muutamia kymmeniä pesäkkeitä, nollatulosta otetaan myös huomioon” (Asumisterveysopas 2008, 163.) Viljelytulosta voidaan pitää luotettavana, jos mikrobimäärä voidaan laskea vähintään kahdesta peräkkäisestä laimennoksesta. Esimerkiksi jos laimennos -2:n mikrobimäärä on 100 pmy ja laimennoksen -3 mikrobimäärä on 0 ja laimennoksen -4 mikrobimäärä on 5 pmy, ei tulosta voida pitää luotettavana. Mikäli mikrobimäärät ovat 100, 5 ja 0, niin tulos voidaan laskea luotettavasti.

Viljelyanalyysin luotettavuutta lisää rinnakkaisanalyysin teko. Rinnakkaisia maljoja tarkastelemalla voidaan havaita viljelyn ja laimennossarjojen onnistuminen. Tulosten pitäisi olla suhteellisen lähellä toisiaan rinnakkaisissa laimennoksissa. Koska mikrobiologiassa rinnakkaisten viljelyiden ero voi näyttää suurelle, voidaan yhteensopivuus laskea dispersioindeksiä apuna käyttäen. Yhtälö on

$$x^2 = (A-B)^2 / (A+B)$$

A ja B ovat kyseessä olevan laimennoksen pesäkelukuja. Pesäkeluvut sijoitetaan yhtälöön ja annettua tulosta verrataan lukuun 3,84. Mikäli x^2 on suurempi kuin 3,84, laimennos hylätään. Esimerkiksi pesäkeluvut ovat 210 ja 175. Yhtälöön sijoittamalla saadaan x^2 seuraavasti:

$$x^2 = (210-175)^2 / (210+175) = 3,18 \text{ joten laimennos hyväksytään.}$$

Rakennusmateriaalinäytteen mikrobipitoisuussumma ilmoitetaan yksikössä pmy/g tai mieluummin kansainvälisesti cfu/g. Mikrobipesäkemäärän summalla tarkoitetaan hyväksytyiltä maljoilta laskettujen mikrobien pesäkemäärien summaa, jossa on mukana bakteerit, sädesienet, sienet, hiivat ja homeet. Viljeltyjen laimennosten summalla tarkoitetaan alkuperäisen näytteen määrää maljoille pipetoiduissa laimennoksissa. Summaan otetaan mukaan vain hyväksytyt laimennokset, ja summa sisältää myös rinnakkaismaljat samasta näytteestä. Kasvatettujen 16 näytteen kokonaismikrobimäärät laskettiin kaavalla:

$$\text{Mikrobipitoisuus} = \frac{\text{mikrobipesäkemäärien summa}}{\text{viljeltyjen laimennosten summa}}$$

Seuraava esimerkki on otettu Asumisterveysoppaan sivulta 164–165.

Esimerkki 1. Rakennusmateriaalinäytteen sieniviljelyn tuloksen laskemisesta.

Maljoilta lasketut sienipesäkkeet:

Laimennos maljalla	Pesäkelukumäärät		
	Sienet	Homeet	Hiivat
10 ⁻⁴	114	89	25
10 ⁻⁴	malja hylätty ylikasvun vuoksi		
10 ⁻⁵	20	16	4
10 ⁻⁵	15	13	2
10 ⁻⁶	2	1	1
10 ⁻⁶	1	1	0

Sieni-itiöpitoisuus:

$$(114+20+15+2+1) \text{ cfu} / (0,0001+0,00001+0,00001+0,000001+0,000001) \text{ g}$$

$$= 1\,245\,902 \text{ cfu} / \text{g}$$

Homeitiöpitoisuus:

$$(89+16+13+1+1) \text{ cfu} / (0,0001+0,00001+0,00001+0,000001+0,000001) \text{ g}$$

$$= 983\ 607 \text{ cfu} / \text{g}$$

Hiivapitoisuus:

$$(25+4+2+1+0) \text{ cfu} / (0,0001+0,00001+0,00001+0,000001+0,000001) \text{ g}$$

$$= 262\ 295 \text{ cfu} / \text{g}$$

6 TULOKSET**6.1 Tutkimuksen tulokset**

Tutkimuksessa laimennosviljelymenetelmällä ja suoraviljelymenetelmällä saadut mikrobimäärät eri kasvualustoilla ovat taulukossa 4. Kokonaismäärät ovat kahden rinnakkaisen määrittelyn keskiarvoja.

TAULUKKO 4. Laimennosviljelytekniikalla saadut mikrobimäärät cfu/g

	MEA cfu/g	DG 18 cfu/g		THG cfu/g
Näyte 1.				
Sienet yht.	25 711	12 833	Bakteerit yht.	13 581
Homeet	25 711	12 838	Sädesienet	0
Hiivat	0	0	Muut bakt.	13 581
Näyte 2.				
Sienet yht.	1 185 000	521 151	Bakteerit yht.	4 409 091
Homeet	1 103 182	421 151	Sädesienet	188 636
Hiivat	81 818	100 000	Muut bakt.	4 220 455
Näyte 3.				
Sienet yht.	227	905	Bakteerit yht.	0
Homeet	227	905	Sädesienet	0
Hiivat	0	0	Muut bakt.	0
Näyte 4.				
Sienet yht.	1871	315	Bakteerit yht.	31 140

Homeet	428	158	Sädesienet	1449
Hiivat	1444	182	Muut bakt.	29 692
Näyte 5.				
Sienet yht.	611	568	Bakteerit yht.	31 706
Homeet	611	568	Sädesienet	0
Hiivat	0	0	Muut bakt.	31 706
Näyte 6.				
Sienet yht.	153 378	92 936	Bakteerit yht.	161 282*
Homeet	29 054	27 027	Sädesienet	1136*
Hiivat	124 324	65 909	Muut bakt.	159 009*
Näyte 7.				
Sienet yht.	125 000	85 592	Bakteerit yht.	53 073
Homeet	90 541	54 409	Sädesienet	6121
Hiivat	34 459	33 183	Muut bakt.	46 952
Näyte 8.				
Sienet yht.	12 313	20 072	Bakteerit yht.	66 091
Homeet	11 728	20 072	Sädesienet	30 470
Hiivat	586	0	Muut bakt.	35 621
Näyte 9.				
Sienet yht.	0	0	Bakteerit yht.	0
Homeet	0	0	Sädesienet	0
Hiivat	0	0	Muut bakt.	0
Näyte 10.				
Sienet yht.	1 854 545	2649	Bakteerit yht.	82 662
Homeet	1 854 545	2649	Sädesienet	20 376
Hiivat	0	0	Muut bakt.	62 286
Näyte 11.				
Sienet yht.	0	0	Bakteerit yht.	45**
Homeet	0	0	Sädesienet	23**
Hiivat	0	0	Muut bakt.	23**
Näyte 12.				
Sienet yht.	225	0	Bakteerit yht.	227
Homeet	225	0	Sädesienet	0
Hiivat	0	0	Muut bakt.	227
Näyte 13.				
Sienet yht.	6098	6368	Bakteerit yht.	55 207
Homeet	6098	6368	Sädesienet	5743
Hiivat	0	0	Muut bakt.	49 463
Näyte 14.				
Sienet yht.	0	0	Bakteerit yht.	3716
Homeet	0	0	Sädesienet	3153

Hiivat	0	0	Muut bakt.	563
Näyte 15.				
Sienet yht.	455	0	Bakteerit yht.	1591
Homeet	0	0	Sädesienet	227
Hiivat	455	0	Muut bakt.	1364
Näyte 16.				
Sienet yht.	62 865	119 636	Bakteerit yht.	265 541
Homeet	62 387	119 636	Sädesienet	0
Hiivat	477	0	Muut bakt.	265 541

*Rinnakkaismäärityksen koko laimennussarja meni yli sallitun dispersioindeksin

** Alle määrittysrajan < 45 cfu/g (Asumisterveysopas 2008, 169.)

Tuloksista voidaan todeta, että näytteissä 1, 2, 6, 7, 8, 10 ja 16 on sienivaurio. Näytteissä 2 ja 6 on myös bakteerikasvustoa ja sädesieniä yli raja-arvon on näytteissä 2, 4, 6, 7, 8, 10, 13 ja 14. Näytteet 3, 5, 9, 11, 12 ja 15 ovat ”puhtaita”.

Suoraviljelytekniikalla saadut pesäkemäärät kullakin kasvatusalustalla ja määrää vastaava vaurioasteen merkintä taulukossa 5. Pesäkemäärät ovat kahden rinnakkaisen maljan keskiarvoja, ja siksi niissä esiintyy myös puolikkaita pesäkkeitä.

TAULUKKO 5. Suoraviljelytekniikalla saadut pesäkemäärät cfu/malja

Näyte	MEA kpl	Vaurioaste	DG18 kpl	Vaurioaste		THG kpl	Vaurioaste
N 1.							
Sienet yht	5	+	0,5	+	Bakt. yht.	5	+
Homeet	3,5	+	0,5	+	Sädes.	0	-
Hiivat	1,5	+	0	+	Muut b.	5	+
N 2.							
Sienet yht	250	++++	300	++++	Bakt. yht.	670	++++
Homeet	250	++++	0	-	Sädes.	420	++++
Hiivat	0	-	300	++++	Muut b.	250	++++
N 3.							
Sienet yht	3,5	+	8	+	Bakt. yht.	9	+
Homeet	3,5	+	8	+	Sädes.	0	-
Hiivat	0	-	0	-	Muut b.	9	+
N 4.							
Sienet yht	2	+	0	-	Bakt. yht.	190	+++
Homeet	1,5	+	0	-	Sädes.	81	+++
Hiivat	0,5	+	0	-	Muut b.	109	+++

N 5.							
Sienet yht	40	++	41	++	Bakt. yht.	200	+++
Homeet	40	++	41	++	Sädes.	0	-
Hiivat	0	-	0	-	Muut b.	200	+++
N 6.							
Sienet yht	86,5	+++	121,5	+++	Bakt. yht.	144	+++
Homeet	51,5	+++	30	++	Sädes.	51,5	+++
Hiivat	35	++	91,5	+++	Muut b.	92,5	+++
N 7.							
Sienet yht	400	++++	710	++++	Bakt. yht.	336	++++
Homeet	400	++++	510	++++	Sädes.	136	+++
Hiivat	0	-	400	++++	Muut b.	200	+++
N 8.							
Sienet yht	222	++++	313	++++	Bakt. yht.	400	++++
Homeet	222	++++	313	++++	Sädes.	200	+++
Hiivat	0	-	0	-	Muut b.	200	+++
N 9.							
Sienet yht	0	-	35,5	++	Bakt. yht.	0	-
Homeet	0	-	35,5	++	Sädes.	0	-
Hiivat	0	-	0	-	Muut b.	0	-
N 10.							
Sienet yht	615	++++	277	++++	Bakt. yht.	250	++++
Homeet	615	++++	244	++++	Sädes.	50	+++
Hiivat	0	-	0	-	Muut b.	250	++++
N 11.							
Sienet yht	8	+	11,5	+	Bakt. yht.	16	+
Homeet	8	+	11,5	+	Sädes.	2	+
Hiivat	0	-	0	-	Muut b.	14	+
N 12.							
Sienet yht	63	+++	1	+	Bakt. yht.	12	+
Homeet	63	+++	1	+	Sädes.	0	-
Hiivat	0	-	0	-	Muut b.	12	+
N 13.							
Sienet yht	186	+++	100	+++	Bakt. yht.	300	++++
Homeet	186	+++	100	+++	Sädes.	50	+++
Hiivat	0	-	0	-	Muut b.	250	++++
N 14.							
Sienet yht	4	+	2,5	+	Bakt. yht.	300	++++
Homeet	4	+	2,5	+	Sädes.	50	+++
Hiivat	0	-	0	-	Muut b.	250	++++
N 15.							

Sienet yht	31	++	27	++	Bakt. yht.	67	+++
Homeet	31	++	27	++	Sädes.	17	++
Hiivat	0	-	0	-	Muut b.	50	+++
N 16.							
Sienet yht	20	++	22	++	Bakt. yht.	50	+++
Homeet	20	++	22	++	Sädes.	0	-
Hiivat	0	-	0	-	Muut b.	50	+++

Suoraviljelyasteikolla 50 cfu/malja on raja joka vastaa 10 000 cfu/g laimennosviljelyssä. Bakterivauriota ei voida verrata laimennosviljelyn tuloksiin, sillä ei ole tiedossa mikä vaurioaste vastaa bakteerimäärää > 100 000 cfu/g. Sienivaurioituneita näytteitä ovat 2, 6, 7, 8, 10, 12 ja 13. Sädesienivaurio on näytteissä 2, 4, 6, 7, 8, 10, 13, 14 ja 15. Vaurioitumattomia ovat näytteet 1, 3, 5, 9, 11 ja 16.

6.2 Johtopäätökset

Materiaalinäytteiden mikrobistossa oli useita kosteusvaurioon viittaavia löydöksiä, kuten *Aspergillus*-, *Chaetomium*-, *Exophiala*-, *Paecilomyces*-, *Phialophora*-, *Stachybotrys*-, *Trichoderma*-, *Ulocladium*- ja *Wallemia* -lajit. Myös sädesienien runsas esiintyminen vauriomateriaaleissa indikoi voimakkaasti kosteusvauriosta.

Taulukoista 4 ja 5 havaitaan, että eri menetelmät tuottavat samansuuntaisia tuloksia. Muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta sekä laimennosviljelytekniikalla että suoraviljelytekniikalla saadaan selville näytteen vaurioitumisaste. Suoramikroskopointi ei tuottanut tulosta, joten siitä ei voida todeta mitään. Näytteet, joissa oli eniten vaurioita molempien tekniikoiden antamien tulosten perusteella, sisälsivät neljässä näytteessä laastia tai sementtiä ja yhdessä oli villaa. Tästä ei voida kuitenkaan päätellä, että sementti- tai tasoitemateriaalit olisivat muita materiaaleja ”herkempiä” kosteusvaurioille. Tulosten perusteella ei rakennusta kannata lähteä suoraan purkamaan, vaan ne antavat suuntaa siihen, miten kosteusvaurioepäilyn kohteena olevaa rakennusta tai rakennetta tulisi jatkotutkia.

7 POHDINTA

Tehtävänä oli validoida kolmikohtainen menetelmä rakennusmateriaalinäytteen mikrobikasvuston toteamiseksi. Tavoitteena oli saada validoitua suora mikroskopointi, laimennosviljelytekniikka ja suoraviljelytekniikka. Validoinnissa piti selvittää miten nämä kolme eri tekniikkaa, niissä käytetyt liuokset ja kasvatusalustat vaikuttavat työntekijän ohella analyysituloksiin. Työn tulokseksi jäi vilinainen validointiyritys, mutta työtä voi käyttää pohjana jatkossa, mikäli validoinnin tekemiselle tulee tarvetta.

Työni toimeksiantaja oli Jyväskylän ammattikorkeakoulun rakennuslaboratorio. Toimeksiantajan edustaja, joka oli myös työni asiantuntija-apu, vaihtoi työpaikkaa kesken opinnäytetyöni. Tämän vuoksi luulin rakennuslaboratorion vetäytyneen toimeksiantajan roolista kokonaan. Vasta viime hetkillä, kun olin jo opinnäytteeni tehnyt ja vienyt kommentoitavaksi ohjaavalle opettajalleni, selvisi, ettei asia ollut näin. Informaatiossa oli ollut vääristymää tai katkos.

Opinnäytetyöni oli monesti kaatua omaan mahdottomuuteensa. Lähdin tekemään työtä tietämättä miten mikrobiologinen validointi suoritetaan. Otin ohjeekseni Asumisterveysoppaan sekä Sisäilmastoseminaarissa 1999 julkaistun laimennos- ja suoraviljelyä koskevan julkaisun. Kysyin neuvoja toimeksiantajan edustajalta, mutta hän oli kiireinen omien töidensä takia, niinpä ohjaus oli vähäistä ja toimin oma-aloitteisesti. Toisinaan laboratoriossa opetusta omalle ryhmälleen pitänyt FT Patrik Michel oli minulle avuksi käsitellessäni suoran mikroskopoinnin preparaatteja. Hän antoi muutaman neuvon, miten saisin näytteen objektilasille tarkasteltavaksi.

En väitä, että työni olisi kritiikin kestävä, sillä sitä se ei ole. Työssäni on paljon aukkoja ja lisäselvittelyn paikkoja, mutta näin iso työ, joka tästä olisi voinut tulla täydellisesti tehtynä, vaatisi enemmän resursseja niin työntekijöiden määrään kuin käytettävissä olevaan aikaan. Lisäksi työn tekijän tulisi olla hyvin perehtynyt mikrobiologiseen validointiin rakennusmateriaalinäytteen osalta. Nyt käytössäni ollut validointiohje koski elintarvikkeille suunnattua mikrobiologista validointia. Rakennusmateriaaleille käytettävää validointiohjetta en löytänyt mistään.

Käyttämäni näytteet sain toimeksiantajan edustajalta. Näytteet olivat vanhoja, osa oli vuoden 2009 alusta ja osassa ei ollut päivämäärää, milloin ne oli otettu. Materiaalinäytteestä saadut tulokset kuvaavat luotettavimmin rakenteen tilaa, kun näyte on toimitettu laboratorioon vuorokauden sisällä näytteen ottamisesta (Aerobiologian tutkimuspalvelut, 2008). Toisaalta Sisäilmayhdistyksen ohjeessa todetaan, ettei materiaalinäytteen kohdalla viive näytteenoton ja viljelyn välillä ole kriittinen. Mielestäni viive kuitenkin vääristää saatuja tuloksia, mikäli näyte on vuoden vanha. Näytteessä oleva mikrobisto on osittain kuollutta, eikä näyte ole edustava, sillä se on sullottu muovipussiin eivätkä mikrobit ole samoissa olosuhteissa kuin ne olisivat tuoreessa näytteessä.

Käytännön työni osuus venyi noin neljään kuukauteen. Vaikeinta oli soveltaa keräämiäni tietoja käytäntöön. Tein laboratoriotyöni pikkutarkasti, jotta ne olisivat päteviä validointiin. Jälkeenpäin huomaan tehneeni paljon turhaa työtä. Merkitsin tarkasti ylös kaikki punnitukset, kemikaalit ja työvaiheet. Yritin olla tarkka ja huolellinen näytteen käsittelyssä, jottei näyte kontaminoituisi. Valmistin ja valoin kasvatagarit ohjeen mukaan ensin keittämällä ja sitten autoklavoimalla, maljat valoin aina puhdashuoneessa.

Saatuani 16 näytettä analysoitua oli tulosten käsittelyn aika. Tulosten taulukointi oli ohjeistettua, mutta niiden tulkitseminen ei. Päätin itse vertailla eri menetelmiä siten, että katson, kuinka täsmäviä vaurionäytteet eri menetelmillä ovat. Koin onnistumisen tunteen ensimmäistä kertaa, kun huomasin, että menetelmät tuottivat samanlaisia tuloksia. On kuitenkin otettava huomioon, että näytteet olivat vanhoja ja näin ollen tuloksia ei voi käyttää validoinnissa. Myöskään vertailumateriaalia ei ollut. Menetelmistä voidaan todeta, että niillä saadaan esille mikrobikasvustoa, mutta muita päätelmiä ei voida tehdä.

Jatkon kannalta olisi hyödyllistä tutkia, mitä eri homeita näytteet sisältävät ja mitkä ovat niiden prosenttiosuudet koko näytteen mikrobistosta. Lisäksi validointi tulisi suorittaa tuoreista näytteistä validointiohjetta noudattaen, jolloin voitaisiin määritellä numeerisesti edes joitain mikrobiologisen validoinnin suureista.

LÄHTEET

Aerobiologian yksikön tutkimuspalvelut. 2008. Turun yliopisto. Viitattu 25.3.2010. www.aerobiologia.utu.fi/, tutkimuspalvelut, näytteenotto-ohjeet, rakennusmikrobiologia.

Analysointi ja tulkinta. 2008. Sisäilmayhdistys. Viitattu 30.3.2010. www.sisailmayhdistys.fi/, terveelliset tilat, ongelmien tutkiminen, mikrobi tutkimukset, analysointi ja tulkinta.

Asumisterveysohje. 2003. Helsinki: Sosiaali- ja terveysministeriö.

Asumisterveysopas. 2008. 2. korjattu painos. Sosiaali- ja terveysministeriö.

Barrett, H.L. & Hunter B.B.1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4th edition. The American Phytopathological Society.

Figueras, M. J., de Hoog G.S., Gene J. & Guarro J. 2000. Atlas of Clinical Fungi. 2nd edition. Virgili. Centraalbureau voor Schimmelcultures.

Materiaalinäytteen mikrobianalyysi. 2009. Moniste. Kuopio. Työterveyslaitos.

Sisäilman homesienet. 2009. Terveyskirjasto. Viitattu 1.12.2010. www.duodecim.fi, terveyskirjasto, haku, kosteusvaurio, sisäilman homesienet.

Reiman, M., Haatainen, S., Kallunki H., Kujanpää, L., Laitinen, S. & Rautiala, S. 1999. Laimennossarja- ja suoraviljelymenetelmien käyttö rakennusmateriaalinäytteiden mikrobipitoisuuksien ja mikrobiston määrittämisessä. Sisäilmastoseminaari. Raportti 13. Sisäilmayhdistys.

Reiman, M. & Kallunki, L. 2005. Suoraviljelymenetelmän käytettävyys materiaalinäytteiden mikrobi tutkimuksissa. Sisäilmastoseminaari. Raportti 23. Sisäilmayhdistys.

LIITTEET

Liite 1. Bakteerien ja sienten kasvualustojen valmistus (Asumisterveysopas 2008, 179)

Bakteerien kasvualusta: Tryptoni-hiivauute-glukoosiagar

5,0 g	tryptonia
2,5 g	hiivauutetta
1,0 g	glukoosia
15,0 g	agaria
1000 ml	deionisoitua vettä

0,2 g natamysiiniä

- tarkistetaan pH 7,0 +/- 0,2
- autoklavoidaan 121 °C, 15 min.
- lisätään antibiootti

Huom!

Natamysiinipullon kumitulppa avataan ja se täytetään noin 80 % tilavuudestaan steriilillä, deionisoidulla vedellä. Vettä voi lämmittää ensin liukenemisen helpottamiseksi esim. vesihauuteessa korkeintaan 50 °C lämpötilaan. Pullo suljetaan ja se ravistellaan hyvin ultraäänihauuteessa. Antibiootti lisätään agariin juuri ennen maljojen valamista. Kasvualustan valmistuksessa työskennellään koko ajan aseptisesti.

Sienien kasvialustat: 2 % Mallasuuteagar

20 g	mallasuutetta, esim. jauheena
15 g	agaria
1000 ml	deionisoitua vettä

Antibiootit: valitaan jokin seuraavista vaihtoehdoista

35 mg	aureomysiiniä (klorotetrasykliiniä)
40 mg	streptomysiinisulfaattia
100 mg	kloramfenikolia

- autoklavoidaan 121 °C, 15 min.

Huom!

Aureomysiini ja streptomysiinisulfaatti lisätään juuri ennen maljojen valamista haaleaan steriiliin veteen (n. 10 ml) liuotettuna, kun taas kloramfenikoli liuotetaan asetoniin tai etanoliin (n. 10 ml) ja voidaan lisätä agariin jo ennen autoklavointia.

Dikloran-glyseroli-18-agar (DG18)

31,5 g	DG-18 agar-jauhetta
220 g	glyserolia
1000 ml	deionisoitua vettä
100 mg	kloramfenikolia

Kloramfenikoli liuotetaan asetoniin tai etanoliin (n. 10 ml) ja lisätään agariin jo ennen autoklavointia.

- autoklavoidaan 121 °C, 15 min.
- pH 5,6 +/- 0,2 25 °C:ssa

Liite 2. Valomikroskooppipreparaatin valmistus (Asumisterveysopas 2008, 180)

1. Puhtaalle liekitetylle objektilasille pipetoidaan tippa vettä tai väriliuosta. Väriliuoksella valmistetut preparaattit säilyvät kuivumatta useita viikkoja, kun taas veteen valmistetut preparaattit kuivuvat pian, joten ne on tarkasteltava välittömästi mikroskoopilla. Sopiva väriliuos on 1 g aniliinisini (esimerkiksi Cotton Blue)-väriliuosta / 1 litra 85 % DL-maitohappoa.
2. Otetaan pieni pala tarkasteltavaa pesäkettä, mieluummin myös agaria mukaan ja asetetaan se liuokseen objektilasille.
3. Mikäli homesienipreparaatissa epäillään olevan niin paljon itiöitä, että ne peittävät alleen rihmaston ja itiöitä muodostavat rakenteet (esim. *Aspergillus*, *Penicillium*), näytepalan päälle voidaan lisätä pisara etanolia, jolloin itiöt siirtyvät nestepisaran laitamille.
4. Painetaan peitinlasi näytteen päälle.
5. Kuumennetaan preparaattia hieman altapäin (muutama sekunti), jotta näytteen mukana tullut agar sulaisi. Varotaan polttamasta agaria.
6. Tarkastellaan preparaattia aluksi 100-keräisellä suurennoksella oikean tarkastelukohdan löytämiseksi, sitten 400- tai 600-kertaisella suurennoksella. homesienilajiston tunnistuksessa käytetään yleensä immersioöljyä ja 1000-kertaista suurennosta.