



Mila Coe

# Samettijalalla värjätyn puuvillan antibakteerisuuden määrittäminen

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

6. 6.2023

## Tiivistelmä

Tekijä:	Mila Coe
Otsikko:	Samettijalalla värjätyyn puuvillan antibakteerisuuden määrittäminen
Sivumäärä:	28 sivua + 6 liitettä
Aika:	6.6.2023
Tutkinto:	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat:	Professori Riikka Räisänen Lehtori Jarmo Palm

---

Tutkimus tehtiin Helsingin yliopiston BioColour-tutkimushankeelle. Työn tavoitteena pyrittiin analysoimaan atromentiini-yhdistettä sisältävällä väriliuksella värjätyyn puuvillakankaan antimikrobisuutta ilman puretetta ja kolmen eri puretteen välillä. Näytteiden antibakteerisuus määritettiin standardin SFS-EN ISO 20743:2021 Textiles — Determination of antibacterial activity of textile products mukaan.

Työn kirjallisuusosuudessa käsitellään luonnonvärjäystä, sienivärjäystä, samettijalkasientä, atromentiini-yhdistettä, käytettyjä esipuretetta ja puretteita ja puuvillaa. Antibakteerisuusanalyysin tekstiilikuiduksi valittiin puuvilla, koska puuvillalla ei ole antibakteerisia ominaisuuksia.

Luonnonvärjäyksessä käytetään puretetta, jolla muodostetaan ligandi metalli-ionin avulla värimolekyylin ja kuidun välille. Värjäys suoritettiin BioColour-tutkimushankkeen laboratoriossa Helsingin yliopiston tiloissa ja antimikrobisuusanalyysi Ammatti- korkeakoulun laboratorioanalytiikan mikrobiologian laboratoriossa. Analyysissä tutkittiin neljää näytettä: näyte 1 värjätty ilman puretetta, näyte 2 värjätty ja puretettu raupuretteella (3-prosenttia värjättävän materiaalin painosta, eli vmp), näyte 3 värjätty ja puretettu tanniinipuretteella (5-prosenttia vmp) ja näyte 4 värjätty ja puretettu alunapuretteella (8-prosenttia vmp).

Näytteiden 1 ja 2 tulokset osoittavat alhaista antibakteerisuustehokkuutta ( $A < 2$ ), kun taas näytteiden 3 ja 4 tulokset osoittavat vahvaa antibakteerisuustehokkuutta ( $A > 3$ ). Näytteiden 3 ja 4 tulokset eivät täytä laskennallisia vaatimuksia ( $F < 1$ ) ja ne hylättiin.

Tässä opinnäytetyössä vahvistettiin aiemmat tutkimustulokset, joiden mukaan atromentiini toimi biosidinä. Tutkimuksen tulokset osoittavat, että atromentiini voi olla alhaisesta jopa vahvasti antibakteerinen sopivan puretteen avulla. Lisätutkimuksissa suositellaan tarkastelemaan atromentiinivärjäyksen antibakteerista vaikutusta eri puretteiden avulla eri tekstiilikuituihin. Työn tulokset auttavat kehittämään uusia menetelmiä sieniperäisten bioväriaineiden käytössä ja ymmärtämään luonnonväriaineiden antimikrobisia ominaisuuksia.

Avainsanat: samettijalka, antibakteerisuus, sieni, värjäys, tekstiili, puuvilla, standardi SFS-EN ISO 20743:2021

## Abstract

Author: Mila Coe  
Title: Analysing the Antibacterial Properties of Cotton Dyed with Velvet Roll-rim  
Number of Pages: 28 pages + 6 appendices  
Date: 6 June 2023

Degree: Bachelor of Laboratory Services  
Degree Programme: Laboratory Sciences  
Supervisors: Riikka Räisänen, Professor  
Jarmo Palm, Senior Lecturer

---

The study was conducted for the BioColour research project at the University of Helsinki. The aim of the study was to analyze the antimicrobial efficacy of cotton fabric dyed with a dye solution containing the compound atromentin and compare the antibacterial value among three different mordants. The antibacterial analysis of the samples was performed according to the standard SFS-EN ISO 20743:2021 Textiles — Determination of antibacterial activity of textile products.

The literature review of the thesis covers natural dyeing, fungal dyeing, the velvet roll-rim fungus, the atromentin compound, used premordants and mordants, and cotton fiber. Cotton was chosen as the textile fiber for the antibacterial analysis because it does not possess inherent antibacterial properties.

In natural dyeing, a mordant is used to create a ligand-metal ion complex between the color molecule and the fiber. The dyeing process was carried out in the laboratory of the BioColour research project at the University of Helsinki, while the antibacterial analysis took place in the microbiology laboratory of Metropolia University of Applied Sciences. Four samples were examined: sample 1 dyed without mordant, sample 2 dyed with 3 % weight of the fiber (owf) iron mordant, sample 3 dyed with 5 % owf tannin mordant, and sample 4 dyed with 8 % owf alum mordant.

The results of samples 1 and 2 indicate low antibacterial efficacy ( $A < 2$ ), while the results of samples 3 and 4 demonstrate strong antibacterial efficacy ( $A > 3$ ). Samples 3 and 4 did not meet the requirements stated in the standard ( $F < 1$ ) and were rejected.

The thesis confirms previous research findings that atromentin acts as a biocide. The results of the study indicate that atromentin can exhibit low to strong antibacterial properties with the appropriate mordant. Further research is recommended to investigate the antibacterial effects of atromentin dye using different mordants on various textile fibers. The findings of this study contribute to the development of new methods for the use of fungal-derived bio dyes and understanding the antimicrobial properties of natural dyes.

Keywords: velvet roll-rim, antibacterial, fungi, dyeing, textile, cotton, standard SFS-EN ISO 20743:2021

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Työn kirjallisuus	1
2.1	Luonnonvärjäys ja sienet	1
2.1.1	Samettijalka, <i>Tapinella atrotomentosa</i>	2
2.1.2	Atromentiini	3
2.2	Purettaminen ja puretteet	3
2.2.1	Rautasulfaatti	4
2.2.2	Tanniini	4
2.2.3	Aluna	5
2.3	Tekstiilikuidun valinta ja antibakteerisuus	5
2.3.1	Puuvilla	5
2.3.2	Antibakteerisuus	6
3	Menetelmä, laitteisto ja mittaukset	7
3.1	Värjäysmenetelmä	7
3.1.1	Puretteen vaikutus värjäystulokseen	10
3.1.2	Värjäyksessä käytetty vesi	11
3.1.3	Kontrollinäyte	12
3.2	Antibakteerisuuden määrittäminen	12
3.2.1	EN ISO 20743:2021	13
3.2.2	Testikanta	14
3.2.3	Mittausparametrit	14
4	Tulokset	15
4.1	Antibakteerisen aktiivisuuden laskenta	15
4.2	Sarjojen tulokset	15
5	Tulosten käsittely	19
5.1	Kontaminaatio	19
5.2	Puretteen vaikutus atromentiinin antibakteerisuuteen	20
5.3	Antibakteerisuustehokkuus	22
5.4	Kehitysideat	24

6 Yhteenveto	26
Lähteet	27
Lyhenteet	
Liitteet	
Liite 1: Laitteisto	
Liite 2: Reagenssit	
Liite 3: Värjäyksessä käytetyn talousveden laatu	
Liite 4: Kontaminaation identifioiminen	
Liite 5: Standardin EN ISO 20743:2021 (Textiles — Determination of antibacterial activity of textile products) absorption-metodin tutkimusmenetelmä	
Liite 6: Pesäkelaskennan tulokset	

## Lyhenteet

*B. cereus*: *Bacillus cereus*. Bakteeri.

CFU: Pesäkkettä muodostava yksikkö. (eng. colony forming units)

LRV: Logaritminen pelkistysyksikkö. (eng log reduction value)

MALDI-TOF MS: Matriisi avusteinen massaspektrofotometri, joka mittaa ionisointuneiden atomien lentoaikaa. (eng Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight)

NB: Ravintoaineliemi. (eng. nutrient broth)

OD: Optinen sameus. (eng. optical density)

*S. aureus*: *Staphylococcus aureus*. Bakteeri.

TSA: Tryptonisoija-agar. (eng. tryptone soya agar)

% vmp: Värjättävän materiaalin painosta. Yksikkö, jota käytetään puretteen prosenttiosuuden määrittämiseen. (eng. weight of the fiber, % owf)

## Alkusanat

Tämä opinnäytetyö tehtiin Helsingin Kumpulassa Helsingin yliopiston BioColour-tutkimushankkeen laboratoriossa ja Vantaan Myyrmäessä Ammattikorkeakoulun mikrobiologianlaboratoriossa.

Halusin kiittää ohjauksesta BioColour-tutkimushankkeen konsortion johtajaa Riikka Räisästä, joka ammattitaitoisesti ohjasi tätä opinnäytetyötä ja jakoi vankaa tekstiilialan tuntemustaan. Helsingin yliopistolla BioColour-tutkimushankkeen laboratoriossa tapahtuneen värjäyksen suurena apuna oli tutkimusavustaja Peppi Toukola. Suuri kiitos myös ohjaavalle opettajalleni, eli Ammattikorkeakoulun laboratorioanalytiikan tutkintovastaavalle Jarmo Palmille, joka auttoi erityisesti tulosten tulkinnassa ja työn loppuun saattamisessa. Myös Ammattikorkeakoulun laboratorioanalytiikan laboratorioinsinööri Patrix Paxal ja laboratoriomestari Juha Johansen ansaitsevat kiitoksensa, tukemalla opinnäytetyön laboratoriossa suoritettavan työn kulkua.

Espoossa 6.6.2023

Mila Coe

# 1 Johdanto

Opinnäytetyö suoritettiin Helsingin yliopiston BioColour-tutkimushankkeelle osana Ammattikorkeakoulun laboratorioanalytiikan tutkinto-ohjelmaa. Käytännön laboratoriotyöt tehtiin Helsingin yliopiston kemian laitoksen BioColour-tutkimushankkeen laboratoriossa sekä Ammattikorkeakoulun mikrobiologian laboratoriossa. BioColour-tutkimushankkeessa kehitetään uusia menetelmiä luonnosta peräisin olevien väriaineiden eristykseen, karakterisointiin ja sovelluksiin, ja tästä tiedosta kerätään kansainvälisesti ensimmäinen bioväriaineiden tietokanta, joka on avoin niin yksityis- kuin yrityskäyttöön [1].

Tämän työn tavoitteena oli analysoida, onko atromentiini-yhdistettä sisältävällä väriliuoksella värjätty puuvillakangas antibakteerista ja vertailla kolmen eri puretteen vaikutusta samettijalasta uutetulla väriliuoksella värjätyyn puuvillakankaan antibakteerisuuteen. Näytteiden antibakteerisuus määritettiin standardin SFS-EN ISO 20743:2021 (Textiles — Determination of antibacterial activity of textile products) mukaan.

## 2 Työn kirjallisuus

Tässä luvussa käsitellään luonnonvärjäystä, sienivärjäystä ja tutkittua samettijalka-sientä ja sen väriä tuottavaa biosidiyhdistettä atromentiiniä, värjäyksessä käytettyä vettä, purettamista ja puretteita rauta, aluna ja tanniini sekä opinnäytetyöhön valittua kuitua. Kirjallisina lähteinä on käytetty kirjallisia lähteitä, julkaistuja tutkimuksia ja verkkolähteitä.

### 2.1 Luonnonvärjäys ja sienet

Luonnonvärjäystä tutkitaan uudelleen yli sata vuotta synteettisten väriaineiden kehityksen vallankumouksen jälkeen [2, s. 3]. Tämä johtuu synteettisten väriaineiden käytöstä muodostuneista ympäristö- ja terveyshaitoista. Luonnonvärjäys ei kuitenkaan voi täysin korvata synteettisiä väriaineita, koska niiden vaatima



kasvatuspinta-ala vähentäisi ruuankasvatukseen soveltuvan maan käyttöä [2, s. 196].

Luonnonvärjäyksessä voidaan käyttää mitä tahansa ainesta, joka löytyy luonnosta ja joka antaa väriä värjäysprosessin aikana. Esimerkiksi kukkia, hedelmiä, marjoja, lehtiä, puunkuorta ja -juuria käytetään usein [3, s. 12]. Sieniä on käytetty vanhojen kansanperinteiden mukaan värjäyksessä pitkään, mutta kaupalliseen tuotantoon ne eivät ole päätyneet, koska niiden antamat värit ovat harvoin yhtä toistettavia kuin varmempien luonnonvärien [4, s. 82]. Luonnonvärjäys on kuitenkin elävä kansanperinne Suomessa ja sienillä värjäys on osa tätä perinnettä [5, s. 6].

Sienistä eristettyjen väriyhdisteiden soveltuvuudesta tekstiilivärjäykseen on joi-tain tieteellisiä tutkimustuloksia. Veriseitikkistä eristettyjen antrakininien soveltu-vuus villan ja polyamidin värjäykseen on tutkittu laajemmin Riikka Räisäsen pro gradu -työssä [6], joka toimi tämän opinnäytetyön inspiraationa. Työtä ei voinut käyttää suorana mallina, sillä antrakininit ja atromentiini, sekä villa, polyamidi ja puuvilla, eivät vastaa kemialliselta rakenteeltaan tai ominaisuuksiltaan toisiaan, jotta niitä voisi verrata toisiaan luotettavasti.

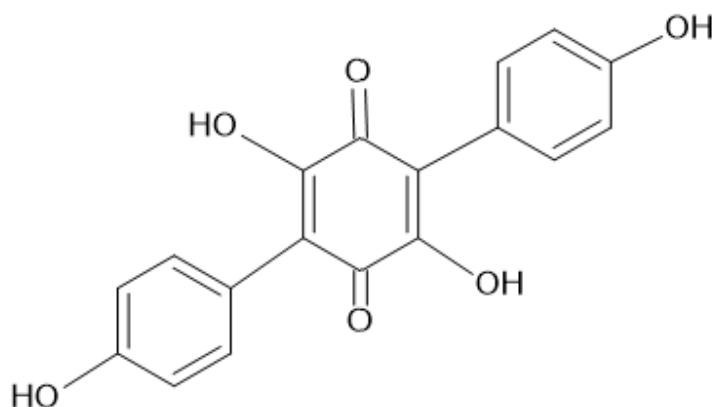
### 2.1.1 Samettijalka, *Tapinella atrotomentosa*

*Tapinella atrotomentosa*, eli samettijalka, on sienilaji *Tapinellaceae*-heimosta. Samettijalkaa ei yleensä käytetä ruokasiemenä, koska se on sitkeää eikä erityi-sen maukasta. Se tunnetaan eniten luonnollisena väriaineena, joka tuottaa eri-laisia värejä sinisenvioletista sinivihreään ja keltavihreään, sienien iästä, värjäys-liemen pH:sta ja valitusta puretteesta johtuen [4, s. 87]. *Tapinella atrotomento-san* värjäysominaisuudet johtuvat erilaisten kromoforien läsnäolosta, mukaan lukien terfenyylikinoneita, kuten polyporihappoa, teleforihappoa ja atromentiiniä [7, s. 99]. Tässä työssä keskitytään antimikrobisia ominaisuuksia omaavaan at-romentiiniyhdisteeseen. Food Chemistry -lehdessä vuonna 2016 julkaistun tutki-muksen mukaan kuuden eri sienilajien atromentiinipitoisuus vaihteli 0,003–0,237 mg/g sienten kuivapainoa kohden [8]. Näin ollen voidaan olettaa, että

analyysissä käytettyjen samettijalkojen sisältämä atromentiinimäärä on linjassa julkaistujen tulosten kanssa.

### 2.1.2 Atromentiini

Samettijalan pääasiallinen väriaine on sini-violetteihin sävyn muodostava terpeenyli kinoneihin kuuluva atromentiini [9]. Sen kemiallinen kaava on  $C_{18}H_{12}O_6$  ja molekyylipaino on  $324,29 \text{ g/mol}^{-1}$ . Atromentiini kuuluu hydroksiantrakinonien luokkaan, joilla on laaja kirjo antimikrobisia vaikutuksia grampositiivisiin ja -negatiivisiin bakteereihin [9]. Atromentiinin rakennekaava on esitettyä kuvassa 1.



Kuva 1. Atromentiinin rakennekaava.

Atromentiinin oli osoitettu olevan hieman sytotoksista aiemmissä in vitro -tutkimuksissa, joissa hiiren hepa-1 hepatoma soluja altistettiin 24 ja 72 tunniksi yhdisteelle. Tutkimuksessa tuli ilmi, että värjättyinä kankaana käytetty villa oli myös hieman sytotoksista, ja villa rajattiin pois tämän opinnäytetyön materiaalivalinnasta [9].

## 2.2 Purettaminen ja puretteet

Purettamisessa väriaine kiinnitetään kuituun pureteyhdisteen tai molekyylin avulla. Puretteena voi toimia metalli-ioni tai muu metalleja sisältävä yhdiste,

joka luo kemiallisen sillan väriaineen ja kuidun välille. Metallisuolat ionisoituvat vesiliuoksessa muodostaen koordinaatiosidoksia värimolekyylien ja kuitujen välillä [7, s. 229]. Koordinaatiosidos siis sitoo värimolekyylin ligandiksi metalli-ionin avulla kuidun OH-ryhmään [7, s. 211]. Tämä auttaa varmistamaan, että väriaine kiinnittyy kankaaseen tiukemmin ja että se ei haalistu tai huuhtoudu pois ajan myötä. Metallionien koordinaatiosidokset värimolekyyliin muodostavat vahvemman värinkeston, kuin jos värimolekyyli olisi kiinnittyneenä suoraan kuituun [2, s. 66]. Käytetty purete vaikuttaa lopputuotteen väriin ja sävyyn, sillä eri puretteet eri pitoisuuksissa ja eri värjäysolosuhteissa voivat tuottaa erilaisia väriefektejä yhdistettynä tiettyihin väriaineisiin [7, s. 133–134]. Puretteen määrä määriteltiin prosenttiosuutena värjätyn kuidun painsota (vmp).

### 2.2.1 Rautasulfaatti

Rautasulfaatti tummentaa ja himmentää värjäyksen tulosta [3, s. 15]. Yhdistettäväksi voi käyttää esi- ja jälkipuretukseseen, halutun lopputuloksen mukaan [10, s. 14]. Pitkä puretusaika raudan kanssa voi haurastuttaa värjättävää kuitua [7, s. 134]. Rautasulfaatti liukenee veteen, mutta on haitallista vesieliöille, joten sitä ei tulisi kaataa suoraan vesistöön [11, s. 26].

### 2.2.2 Tanniini

Puretteena tanniinia käytetään erityisesti puuvillan luonnonvärjäyksessä. Tanniinia esiintyy esimerkiksi puun kuoressa, teen lehdissä ja viinirypäleiden siemenissä [11, s. 28]. Niiden proteiineja sitova ja saostava vaikutus johtuu rakenteen oligo- tai polymeerisistä fenolihdisteistä, jotka voidaan jakaa flavonoidiyksiköistä koostuviin proantosyanidiineihin, jotka tunnetaan myös kondensoituneina tanniineina, tai gallushaposta muodostuneisiin hydrolysoituviin tanniineihin [12]. Kun tanniinia käytetään puretuksessa, tanniini muodostaa sillan kuidun ja värimolekyylin välille. On tärkeää, että kuivattu tanniinijauhe liukenee täysin värjäysvetteen, koska muuten värjäyksen lopuksi jää silmin nähtäviä tanniinin jättämiä läikkiä värjätyissä kuiduissa [10, s. 13].

### 2.2.3 Aluna

Aluna, eli kaliumaluminiumsulfaatti  $KAl(SO_4)_2$ , on yksi vanhimmista tunnetuista puretusaineista [4, s. 14]. Yhdiste antaa kankaalle kirkkaan ja vahvan sävyn [10, s. 12]. Aluna on yksi käytetyimpiä puretusaineita, joka muodostuu alumiinin ja kaliumin kaksoissuolasta. Itsessään aluna on antibakteerinen sisältämänsä alumiinin takia, eikä alunapuretetta sisältävää värjäyslientä saa laskea vesistöihin [11, s. 26].

## 2.3 Tekstiilikuidun valinta ja antibakteerisuus

Luonnon väriaineita käytettäessä värjätään perinteisesti proteiinikuituja, kuten villaa tai silkkiä [3, s. 11]. Myös samankaltaisen kuiturakenteen omaavaa polyamidi soveltuu moderniin luonnonvärjäykseen. Polyamidi, villa ja silkki ovat rakenteeltaan verraten antimikrobisia, koska niihin ei sitoudu niin paljon vettä kuin selluloosakuituihin. Kuidun taipumus huokoisuuteen luo optimaalisen ympäristön bakteerien kasvulle, ja tästä syystä puuvilla valittiin polyamidin tai villan sijaan antibakteerisuusanalyysiä varten.

### 2.3.1 Puuvilla

Puuvilla on malvakasvien heimoon (*Malvaceae*) kuuluva pensasmainen kasvi, jota viljellään yksivuotisena. Sen koostumus on 99-prosenttia selluloosaa, ja värjäyksessä selluloosan hydroksyyliiryhmät reagoivat kemikaalien kanssa ja sitovat vettä [13, s. 27–30].

Puuvilla valittiin tutkituksi tekstiilikuiduksi, koska puuvilla ei itsessään ole antimikrobinen tai antibakteerinen. Kuidun huokoinen rakenne, joka sitoo itseensä paljon vettä, soveltuu hyvin bakteerien kasvu-ympäristöksi [13, s. 32]. Tällä kuituvalinnalla haluttiin varmistaa, että mahdollistettaisiin riittävän suuri ero bakteerien pesäkkeiden lukemissa värjättyjen ja värjäämättömien näytteiden välillä.

Tekstiilikuiduista selluloosapohjaiset kuidut sitovat heikosti värinaineita. Esimerkiksi yleisesti puuvillalla käytetty reaktiivivärien kiinnittyvyys on vain 50–90-prosentin luokkaa. Tämä johtaa suureen määrään väriyhdistettä, joka joko jää värjäyksen jätevetteen tai irtoaa tekstiilistä pesun aikana, kuormittaen vedenpuhdistuslaitoksia ja luontoa [6, s. 74].

Värjäysteknisestä näkökulmasta atromentiini-värimolekyylit eivät puretteesta huolimatta aina sitoudu puuvillakuituihin niin hyvin, johtaen himmeisiin värjäystuloksiin [10, s. 21]. Tämän takia epäsopivalla puretteella värjätyyn puuvillan värienkesto voi olla alhainen. Kuidun valinnassa painotettiin antibakteerisuuden määrittämisen parametrejä, eikä niinkään muita puuvillakuidun ominaisuuksia.

### 2.3.2 Antibakteerisuus

Antimikrobinen aine on luonnollinen tai synteettinen aine, joka tappaa tai estää mikro-organismien kasvun [14, s. 196]. Tämä sama määritelmä soveltuu myös antibakteerisiin käsittelyihin, sillä erolla, että käsittely on tutkitusti tehokas erityisesti bakteereja vastaan, mutta ei kaikkia mikro-organismeja kohtaan.

Hikeen tai eritteisiin kostuneet kankaat tarjoavat ihanteellisen alustan ja ravinteita erilaisille bakteereille tai sienille. Tämä voi johtaa siihen, että imukykyisten pesemättömien vaatteiden käyttäjä voi kärsiä dermatologisista sairauksista, kuten atooppisesta ihottumasta tai ihottumasta, johon liittyy bakteeri- tai sieni-infektioita [14, s. 187].

Erytisesti lääketieteen käyttämät tekstiilit ovat herkkiä bakteeri- ja viruskontaminaatiolle. Kokeet ovat osoittaneet, että bakteerit voivat tunkeutua ANSI PB70 -tason 3 materiaaleihin lyhyessä kosketusajassa, jos kankaaseen kohdistuu riittävä paine roiskeen yhteydessä [14, s. 133]. ANSI PB70 -standardin tarkoitus on määrittää, minkä paineen alla lääketieteessä käytettyjen henkilökohtaisten suojainten nestesulun suorituskyky ylitetään. Kolmannen tason vaatimus on, että kankaan ei läpäise mikään siihen kohdistuva pienempi tai yhtä suuri kuin 1,0 g:n suihku, tai suurempi tai yhtä suuri kuin 50 cm:n hydrostaattinen paine

[15]. Näin ollen antibakteerisuus voidaan saavuttaa kankaissa, jotka estävät kontaminoitujen nesteiden läpäisyn tai helpon pois pesun [16, s. 445].

Antibakteerisuus tulee siis olla sidottuna ensisijaisesti kankaan valmistustekniikkaan, eikä niinkään viimeistelyyn. Ohuen tai harvan kankaan antimikrobisuus saattaa olla hyväksi haavahoidossa, mutta ei näillä parametreilla sovellu suoja-vaatteeksi. Tämä on siitä merkittävää, että vaikka viimeistely todettaisiin antibakteeriseksi, myös lopputuote tulee analysoida käyttöä vastaavissa olosuhteissa sen laadun varmistamiseksi. Antimikrobisuus ja antibakteerisuus on keskeistä myös urheilutekstiileissä ja atooppisen ihon hoidossa [14, s. 186].

### 3 Menetelmä, laitteisto ja mittaukset

Tekstiilin antibakteerisuuden tehokkuuden määrittämiseen käytetty standardi SFS-EN ISO 20743:2021, laitteisto ja mittausparametrit ovat määritettyinä tässä luvussa.

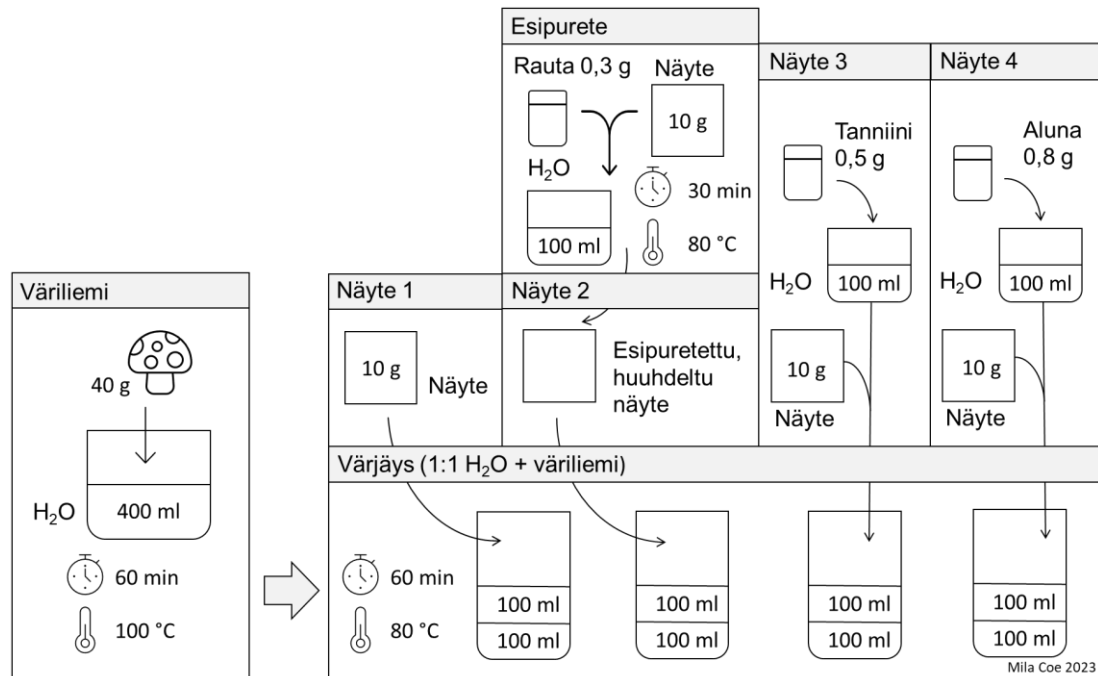
#### 3.1 Värjäysmenetelmä

Värjäys suoritettiin Helsingin yliopiston BioColour-tutkimushankkeen laboratoriossa. Kuivatuista samettijalka-sienistä uutettu väriliemi oli tumman violetin väristä, kuten kuvassa 2. Kuvassa väriliemi ennen puretteen lisäystä.



Kuva 2. Tummanvioletti samettijalasta uutettu värjäysliemi.

Värjäyksessä seurattiin BioColour-tutkimushankkeen värjäysreseptiä, jonka menetelmä on havainnollistettu kuvassa 3.



Kuva 3. Värjäysmenetelmä otettiin BioColour-tutkimushankkeen värjäysresepteistä. Värjäyksessä käytettiin 400 ml värilientä, joka oli tehty uuttamalla 40 g samettijalka-sientä 60 minuutin ajan. Väriliemi jaettiin neljään ja kahteen lisättiin 100 g tislattua vettä sekoitetut puretteet: tanniini 0,5 g ja aluna 0,8 g. Jokaiseen kahdeksasta värjäyskapselista asetettiin 10 g tislatulla vedellä 90 minuutin ajan esikastettua kangasnäytettä. Yksi kangasnäytteistä esipuretettiin 3 % vmp rautaliuoksessa, jossa 100 g tislattuun veteen lisättiin 0,3 g rautaa ja kankaan annettiin purettua 30 minuutin ajan 80 °C:ssa asteessa. Tämän jälkeen esipurete huuhdeltiin pois ja kangas värjättiin muiden näytteiden kanssa. Värjäysohjelma kesti 60 minuuttia 80 °C:ssa asteessa.

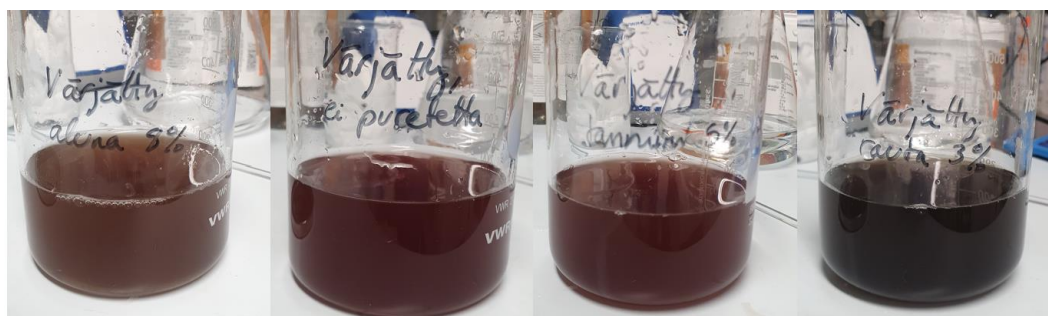
Värjäyksessä käytettiin 400 ml värilientä, joka oli tehty uuttamalla 40 g samettijalka-sientä 60 minuutin ajan. Väriliemi jaettiin neljään ja kahteen lisättiin 100 g tislattua vettä sekoitetut puretteet: Tanniini 0,5 g ja aluna 0,8 g. Jokaiseen kahdeksasta värjäyskapselista asetettiin 10 g tislatulla vedellä 90 minuutin ajan esikastettua kangasnäytettä. Yksi kangasnäytteistä esipuretettiin 3 % vmp rautaliuoksessa, jossa 100 g tislattuun veteen lisättiin 0,3 g rautaa ja kankaan annettiin purettua 30 minuutin ajan 80 °C asteessa. Tämän jälkeen esipurete huuhdeltiin pois ja kangas värjättiin muiden näytteiden kanssa. Värjäysohjelma kesti 60

minuuttia 80 °C asteessa. Alla olevassa taulukossa 1 on väriliemien ja muiden aineiden määrät.

Taulukko 1. Väriliemen ja muiden reagenssien määrät.

Näyte	Väri- liemi	Esipurete	Purete	Lisäys tis- lattua vettä
Näyte 1, ei puretetta	100 g	-	-	100 g
Näyte 2, rauta 3 % vmp	100 g	Rauta 0,3 g	-	100 g
Näyte 3, tanniini 5 % vmp	100 g	-	Tanniini 0,5 g	100 g
Näyte 4, aluna 8 % vmp	100 g	-	Aluna 0,8 g	100 g
Näytteet 5–8, kontrollit	-	-	-	200 g

Puretteilla värjättyjen näytteiden värien kirjo on linjassa oletettujen sävyjen kanssa. Vaikka värjäysliemi on hyvin tumma violetti, värjätty kangas ei usein ilmennä tätä väriä, vaan atromentiini hapettuessaan antaa vihreitä ja ruskeita värjäystuloksia [7, s. 85], kuten kuvassa 4.



Kuva 4. Väriliemet, joilla värjättiin näytteet 1-4. Väriliemet vasemmalta oikealle: värjätty aluna 8-prosenttinen, värjätty ilman puretetta, värjätty tanniini 5-prosenttinen, värjätty rauta 3-prosenttinen.

Värjäyksen jälkeen kankaat huuhdeltiin tislattulla vedellä, kunnes huuhteluvesi oli kirkasta (kuva 5).





Kuva 5. Vasemmalta oikealle: Näyte 1 (värjätty ei puretetta, näyte 3 (5-prosenttinen vmp tanniinipurete), näyte 4 (8-prosenttinen vmp alunapurete) ja näyte 1 (3-prosenttinen vmp rautapurete).

### 3.1.1 Puretteen vaikutus värjäystulokseen

Näytteet ja kontrollinäytteet värjättiin samalla kertaa, jotta värjäysprosessi vaikuttaisi kaikkiin kankaisiin yhtäläisesti. Linitest-koneessa oli 8 purkkia, joista neljään asetettiin näytteet väriliemissään ja toiset neljä sisälsivät kontrollinäytteet tislatussa vedessä. Kaikki 8 purkkia värjättiin yhtä aikaa, näin varmistaen, etteivät muutokset värjäysolosuhteissa selittäisi mahdollisia eroja antibakteerisuuden tehossa. Näytteet ja kontrollinäytteet leikattiin samasta kangaspalasta ja punnittiin ennen värjäystä. Kuvassa 6 on näytteet 1–4 värjäyksen ja kuivauksen jälkeen.



Kuva 6. Näytteet 1–4. Näytteet vasemmalta oikealle: Näyte 1 värjätty ilman puretetta. Näyte 3 puretteena tanniini 5 % vmp. Näyte 4 puretteena aluna 8 % vmp. Näyte 2 puretteena rauta 3 % vmp.

Taulukossa 2 on mainittuna näytteen numero, käytetty esipurete tai purete, sen kemiallinen kaava ja muodostunut väri.

Taulukko 2. Näytteen numero, käytetty esipurete purete, kemiallinen kaava ja muodostunut väri.

Näyte	Purete	Kemiallinen kaava	Väri
Näyte 1	Ei puretetta		Himmeän harmaanvihreä
Näyte 2	Rauta 3 % vmp	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Murrettu tumma khakinvihreä
Näyte 3	Tanniini 5 % vmp	$\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_9$	Punertava himmeän harmaanvihreä
Näyte 4	Aluna 8 % vmp	$\text{KAl}_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	Murrettu kellertävä oliivinvihreä

Esipuretteena käytettynä rautasulfaatti tummentaa värisävyjä ja sama on huomattavissa, kun näytettä 2, esipuretettu 3 %, verrataan muihin värjättyihin näytteisiin. Näyte 3 puretettiin 5 % vmp tanniiniseoksella ja sen sävy on punaisempi, kuin näytteen 1, jossa ei käytetty puretetta. Näyte 4 puretettiin 8 % vmp aluna-seoksella, ja sen väri ilmenee kellertävämpänä sävynä muihin näytteisiin verrattuna. Liitteessä 1 on työhön käytettyjen laitteiden tiedot taulukoituna sekä liitteessä 2 on taulukoituna työssä käytettyjen reagenssien määrät.

### 3.1.2 Värjäyksessä käytetty vesi

Kuivattu samettijalka keitettiin talousvedessä, jonka laatu on eritelty liitteessä 3. Luonnonvärjäyksessä käytetään usein luonnon vettä, kuten kaivo-, joki- tai järvi-vettä ja sadevettä, mutta teollisissa olosuhteissa käytetään tislattua vettä, josta on poistettu erityisesti metalli-ionit, jotka voivat vaikuttaa värjäystulokseen [4, s. 13].

### 3.1.3 Kontrollinäyte

Kontrollinäytteenä toimi värjäämätön puuvillakangas, joka käsiteltiin samassa värjäysohjelmassa kuin näytteet, paitsi ilman väriainetta. Näin varmistettiin, ettei värjäyksen lämpökäsittely ole muuttuja antibakteerisuuden määrittämisessä eri näytteiden ja kontrollinäytteiden välillä.

Kankaan antibakteerisuutta määrittävässä standardissa ei oteta huomioon kankaan muita ominaisuuksia, kuten roiskeen läpäisevyyttä, vaikka sillä on suuri merkitys esimerkiksi sairaalakäyttöön tarkoitetuissa tekstiileissä. Sairaala-tekstiilejä varten onkin omia standardeja, kuten ANSI PB70 -standardi, jotka soveltuvat sairaaloiden vaativiin olosuhteisiin.

## 3.2 Antibakteerisuuden määrittäminen

Samettijalasta saadun atromentiiniyhdisteen antibakteerisuutta tekstiilikuidussa määritettiin standardin EN ISO 20743:2021 "Textiles — Determination of antibacterial activity of textile products" mukaan. Standardin absorption-tutkimusmenetelmä on kuvattuna liitteessä 4. Opinnäytetyö seurasi standardin tutkimusmenetelmää. Työ suoritettiin *Staphylococcus aureus* -bakteerilla, jonka kanta ATCC™ 6538 on mainittu kyseisessä standardissa.

*S. aureuksen* kanta ATCC™ 6538 muodostaa haaleita valkoisia ja keltaisia pesäkkeitä maljan pintaan UV-säteilyn määrän mukaan. Keltaiset pesäkkeen muodostuvat vain, kun bakteeri on altistunut tarpeeksi UV-säteilylle, kuten tästä osin peitetystä maljasta näkee (kuva 7). Lämpökaapissa maljan päällä oli toinen malja, joka peitti kuvassa olevat pesäkkeet osittain, ja maljan reunoilla kasvaviin pesäkkeisiin muodostui keltainen väri.



Kuva 7. Tryptoni soija agar-maljalla *S. aureus*, kanta ATCC™ 6538, muodostaa keltaisia pesäkkeitä suojautuakseen UV-säteilyltä.

Keltaiset ja valkoiset pesäkkeet identifioitiin myös MALDI-TOF -massaspektrometrillä ja niiden tunnistettiin olevan 99,9 %:n varmuudella samat.

Tämä väri vaihtelu saman kannan sisällä vaikeutti kontaminaation tunnistamista, kuten luvussa 5.1 Kontaminaatio esitetään, koska myös kontaminaation pesäkkeet olivat haalean valkoisia. Silmämääräisesti eri bakteerit eroteltiin niiden pesäkkeiden väriä ja reunoja vertailemalla.

### 3.2.1 EN ISO 20743:2021

Standardi EN ISO 20743:2021 Textiles — Determination of antibacterial activity of textile products (ISO 20743:2021) pyrkii vastaamaan kasvavaan antibakteeristen tekstiilien markkinaan ja sen tarpeeseen saada luotettavaa tietoa tekstiilituotteiden antibakteerisesta aktiivisuudesta. Standardi korvaa aiemman EN ISO 20743:2013:n. Standardi esittelee kuusi tapaa, joilla voidaan yhdistää tekstiilin kontaminointi ja antibakteeriaktiivisuuden kvantitatiivinen mittaaminen, mahdollistaen analyysin räätälöinnin eriäviin tarpeisiin. Tähän opinnäytetyöhön valittiin absorptiomenetelmä, joka perustuu pesäkkeiden laskentaan maljavalutekniikalla.

### 3.2.2 Testikanta

Standardin SFS-EN ISO 20743:2021 kahdesta validoidusta bakteerikannasta valittiin testikanta, *Staphylococcus aureus*. Bakteerikantaa säilytettiin -70 °C:ssa.

### 3.2.3 Mittausparametrit

Tekstiilin antibakteerisuuden tehokkuuden mittarina käytettiin bakteerien pesäkkeiden muodostumista agarmaljoille. Maljat huomioitiin tuloksessa, kun niiden pesäkkeiden laskennallinen määrä oli 30–300 yksikössä. Niiden maljojen, joiden tulos oli alle 30 yksikköä ja johon on lisätty 1 ml:aa bakteerisuspensiota, laskettiin yksiköiden määrän keskiarvo. Jos arvo oli alle 1 yksikköä, laskettiin maljojen keskiarvoksi 1 yksikköä, jos maljaan on lisätty 1 ml:aa bakteerisuspensiota.

Standardi SFS-EN ISO 20743:2021 määrittää kankaan antibakteerisuustehokkuuden numeraalisen arvon alhaisesta vahvaan antibakteerisuusarvolla (taulukko 3).

Taulukko 3. Kankaan antibakteerisuustehokkuuden määrittäminen antibakteerisuusarvon perusteella.

<b>Antibakteerisuus-tehokkuus</b>	<b>Antibakteerisuusarvo (A)</b>
Alhainen	$A < 2$
Merkittävä	$2 \leq A < 3$
Vahva	$A \geq 3$

Antimikrobisuuden määrittämisen kannalta on oleellista, että kontrollinäytteisiin muodostuu tarpeeksi pesäkkeitä, jotta kasvun vähänemä antimikrobisissa näytteissä on laskennallisesti merkittävä.

## 4 Tulokset

Tässä luvussa käsitellään opinnäytetyössä analysoidujen näytteiden tulokset ja standardin SFS-EN ISO 20743:2021 mukaiset laskentakaavat.

### 4.1 Antibakteerisen aktiivisuuden laskenta

Antibakteerisen aktiivisuuden testin tulokset on ilmoitettava antibakteerisen aktiivisuuden arvo ( $A$ ), joka mittaa bakteerien määrän vähenemistä testiaineelle altistumisen jälkeen kontrolliin verrattuna.  $A$  voidaan laskea seuraavalla kaavalla (kaava 1):

$$A = (\lg C_t - \lg C_0) - (\lg T_t - \lg T_0) = F - G \quad (1)$$

jossa  $F$  on kontrollin alkuperäinen bakteerimäärä ja  $G$  on bakteerimäärä testiaineelle altistumisen jälkeen.  $\lg C_0$  on logaritmi kontrollikankaan nolla-ajan altistumisella ja  $\lg C_T$  on logaritmi kontrollikankaan 24 tunnin altistumiselle. Samoin  $\lg T_0$  on logaritmi näytteen nolla-ajan altistumisella ja  $\lg T_T$  on logaritmi näytteen 24 tunnin altistumiselle. Jos  $C_0 > T_0$ , korvaa  $C_0$   $T_0$ :lla.  $F$  ja  $G$  lasketaan seuraavalla kaavalla (kaava 2):

$$F = (\lg C_t - \lg C_0), G = (\lg T_t - \lg T_0) \quad (2)$$

Mitä korkeampi  $A$ -arvo, sitä suurempi on tekstiilituotteen antibakteerinen vaikutus.  $A$ :n arvo 2 tai suuremman katsotaan osoittavan merkittävää antibakteerista aktiivisuutta, kuten kuvattuna luvussa 3.2.3 Mittausparametrit.

### 4.2 Sarjojen tulokset

Näytteet analysoitiin neljässä viikon sarjassa, koska yhden sarjan valmistelu, kontaminointi ja inkubointi vei neljä päivää. Jokaisen näytteen ajosta muodostui kaksi erää, joista ensimmäisen kontaminaatioaika oli 20 min huoneenlämmössä ja toisen 24 tuntia 37 °C:ssa lämpökaapissa. Jokaisessa erässä oli kaksi

kontrollikangasnäytettä ja kolme tutkittua näytettä, joista tehtiin laimennossarja, joka laimennettiin  $10^{-7}$  asti. Laimennossarjasta jokainen laimennos tutkittiin rinnakkais määrityksenä maljavalutekniikalla, joiden keskiarvo laskettiin mahdollisten pesäkkeiden muodostuttua inkuboinnin lopettamisen jälkeen, kun maljat olivat kasvaneet 24 tuntia  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ :ssa lämpökaapissa. Tutkimusmenetelmä on kuvattuna liitteessä 5.

Tulosten laskentaa vaikutti kontaminaation löytyminen toisen ajon aikana, joka identifioitiin MALDI-TOF-massaspektrometrillä *Bacillus cereus* -bakteeriksi. Kontaminaatio tunnistettiin ensimmäisestä ajosta vasta toisen ajon jälkeen, koska pesäkkeiden reunojen tarkastelu ei ollut niin harjaantunutta, jotta samaväriset, mutta erimuotoiset pesäkkeet olisi eroteltu. Kontaminaatiota löytyi myös neljännen ajon autoklavoiduissa näytteissä, joten kontaminaatio hyväksyttiin osaksi kankaan aiheuttamaa taustaa. Lisää kontaminaatiosta kerrotaan luvussa 5.1 Kontaminaatio.

Kaikkien neljän näytteen ajon tulokset sisälsivät pientä hajontaa kontrollikankaan osalta, paitsi toisessa ajossa havaittiin alhaisempi  $C_0$ -näytteiden tulos verrattuna muihin ajoihin. Myös värjättyjen näytteiden  $T_0$ -näytteiden tuloksissa oli vähän hajontaa, vaikka  $T_T$ -näytteiden tuloksissa nähtiin suurta hajontaa. Suurimmat 95 %n luottamusväliarvot olivat ajoilla 1 ja 4  $C_0$ - ja  $T_T$ -näytteillä, jotka olivat 0,87 ja 1,84. Vaikka standardi ei asettanut vaatimuksia 95 %:n luottamusväleille, ne kuvastavat hyvin saman näytteen sarjojen välistä hajontaa.

Näytteiden 1 ja 2 ajojen tulokset olivat ainoat, joissa täyttyi ehto  $F > 1$  ja joiden A-arvo voitiin hyväksyä standardin mukaan hyväksytyksi. Näytteiden 3 ja 4 ajojen tuloksissa ei havaittu laskennallisesti merkittävää kasvua kontrollinäytteen  $C_0$ - ja  $C_T$ -näytteiden välillä, ja nämä ajot tulisi uusida tulosten vahvistamiseksi. Näiden ajojen G-arvo oli pienin, mikä johti suurimpaan A-arvoon eli antibakteerisuuteen.

Kun verrataan näytteiden 1 ja 2 ajoja keskenään sekä näytteiden 3 ja 4 ajoja keskenään, havaitaan, että ne ovat verrattavissa keskenään, mutta eivät

toisiinsa. Näytteiden 1 ja 2 ajojen tulokset ovat samansuuntaiset. Vaikka näyte 2 saavuttaa hieman korkeamman F-arvon kuin näyte 1, molemmat näytteet osoittavat alhaista antibakteerisuustehokkuutta. Samoin näytteiden 3 ja 4 tulokset ovat samansuuntaiset. Näyte 4 saavuttaa hieman korkeamman F-arvon kuin näyte 3, mutta kumpikaan näyte ei täytä parametria  $F \geq 1$ . Teoreettinen tulos laskennalliselle antibakteerisuustehokkuudelle (A) arvioitaisiin vahvaksi molemmissa näytteissä, jos ehto  $F \geq 1$  täyttyisi.

Yhteenvetona voidaan todeta, että näytteiden 1 ja 2 tulokset osoittavat alhaista antibakteerisuustehokkuutta, kun taas näytteiden 3 ja 4 tulokset osoittavat vahvaa antibakteerisuustehokkuutta. Näytteiden 3 ja 4 F-arvon tulokset eivät täytä laskennallisia vaatimuksia ja täten hylättiin.

Suurimmat erot ajojen välillä ilmenevät näytteiden 2 ja 3 välillä, koska näyte 2:n ajon antimikrobisuusarvo oli matalin ja näyte 3:n ajossa korkein. Näytteiden tulosten välisiä eroja käsitellään Yhteenveto ja loppupäätelmät -luvussa. Ajoissa analysoitujen näytteiden tulokset ovat taulukossa 4.



Taulukko 4. Näytteiden 1–4 tulokset ajoittain.

		<b>Näyte 1</b>	<b>Näyte 2</b>	<b>Näyte 3</b>	<b>Näyte 4</b>
lg C <sub>0</sub>	Keskiarvo	7,03	6,46	7,39	7,48
	Erotus (< 1)	0,48	0,21	0,02	0,48
	Keskihajonta	0,27	0,12	0,01	0,27
	95 % luottamusväli	0,87	0,38	0,03	0,87
lg C <sub>t</sub>	Keskiarvo	8,09	8,22	7,97	8,04
	Erotus (< 1)	0,09	0,43	0,10	0,09
	Keskihajonta	0,05	0,25	0,06	0,05
	95 % luottamusväli	0,16	0,78	0,19	0,16
F	≥ 1	1,06	1,76	0,57	0,56
lg T <sub>0</sub>	Keskiarvo	7,11	6,47	7,21	7,00
	Erotus (< 2)	0,26	0,34	0,52	0,26
	Keskihajonta	0,14	0,18	0,26	0,14
	95 % luottamusväli	0,44	0,56	0,84	0,44
lg T <sub>t</sub>	Keskiarvo	6,24	6,78	3,47	4,74
	Erotus (< 2)	1,16	0,11	0,47	1,16
	Keskihajonta	0,58	0,05	0,27	0,58
	95 % luottamusväli	1,84	0,17	0,86	1,84
G		-0,86	0,31	-3,93	-2,74
A		1,85	1,44	4,50	3,29

Keskiarvon avulla pyrittiin tarkastelemaan atromentiinin vaikutusta laskennallisella tasolla, mutta tulosten vaihtelevuuden takia sen arvot ovat vain suuntaa antavia. Pesäkelaskennan tulokset on taulukoitu liitteessä 6.

## 5 Tulosten käsittely

Luvussa kerrotaan työssä analysoitujen puretteiden vaikutusten arvioinnista ja analysoidun atromentiinin antibakteerisuusarvojen tulosten tulkinnasta. Myös ajoissa havaitut kontaminaatiot ja työn esiin tuomat kehitysideoita käsitellään.

### 5.1 Kontaminaatio

Näytteiden 1–4 ajoista löydettiin *Bacillus cereus* kontaminaatio, joka tunnistettiin osassa näytteiden 1–3 ajosten maljoista. Tämän takia näyte 4 ja sitä vastaava kontrollinäyte steriloidiin autoklaavissa kontaminaation poistamiseksi, mutta kontaminaatiota löydettiin kuitenkin neljännessä ajosta.

Kontaminaatio ei ollut laskennallisesti huomattava, koska sitä esiintyi kaikissa näytteissä ja kontrollikankaissa. Näin ollen kontaminaatio määriteltiin osaksi näytekankaan taustaa. Kontaminaation voi eliminoida steriloidamalla kangas autoklaavissa. Näin ollen neljäs näyte ja kontrollikangas steriloidettiin autoklaavimalla standardin mukaisesti, mutta tämä ei täysin poistanut kontaminaatiota.

*B. cereus* on itiöivä ja sietää hyvin korkeaa lämpötilaa, kuivuutta ja ravinnon puutetta, sekä pystyy kasvamaan hapellisissa että hapettomissa olosuhteissa [17]. Kontaminoiduista maljoista löytyi tiukkareunaisia keltaisia ja hieman levinneitä vaaleita, sekä täysin levinneitä vaaleita pesäkkeitä. Yhtä maljaa tarkastellessa niistä kaksi ensimmäistä vahvistui *S. aureuksen* kahdeksi eri ilmentymismuodoksi, kun taas levinneet vaaleat pesäkkeet osoittautuivat *B. cereus*-bakteeriksi. *S. aureuskseksi* oletettujen nimeämisessä on käytetty koodia w eli valkoinen ja y eli keltainen. Kolmas pesäke todettiin *B. cereus*-bakteeriksi jatkomaljaviljelyllä. Erottelevan pesäkeviljelyn avulla kontaminaation ja kannan välinen ero korostui ja tulokset vahvistettiin sen avulla.

Kontaminaatiota ei löytynyt samoissa määrin ajosta 4, jonka näytteet steriloidettiin autoklaavissa ennen *S. aureuksella* kontaminointia. Muita näytteitä ei steriloitu autoklaavissa ennen näytteiden kontaminointia, koska värjäysprosessin

ajateltiin olevan riittävä vähentämään mikrobistoa. Itiöivät bakteerit varsinkaan eivät kuitenkaan tuhoudu ilman sterilisaatiota autoklaavissa, eivätkä aina siitäkään huolimatta. Värjäysprosessi ei saavuttanut riittävän korkeaa lämpötilaa riittävän suuressa paineessa, jotta kankaat steriloituisivat.

Jotta sterilointi autoklaavissa olisi tehokasta itiöitä muodostavia bakteereja ja viruksia vastaan, höyryn tulee olla suorassa kosketuksessa steriloitavaan materiaaliin tai luoda tyhjiö, joka syrjäyttää kaikki itiöt kuiduista [14, s. 142]. Standardin SFS-EN ISO 20743:2021 mukaan steriloidut näytteet asetettiin analyysipulloihin ja niiden suut peitettiin foliolla ja analyysipullojen korkit käärittiin folioon autoklaavissa steriloitumisen ajaksi. Steriloitumisen jälkeen korkit kuivatettiin laminaarikaapissa 60 minuutin ajan. On mahdollista, että peitettyjen analyysipullojen sisälle ei päässyt tarpeeksi höyryä tai painetta täysin syrjäyttämään tai steriloi-maan itiöt kankaan rakenteesta. Kontaminaatioiden tunnistus MALDI-TOF-massaspektrometrin avulla on taulukoitu liitteessä 5.

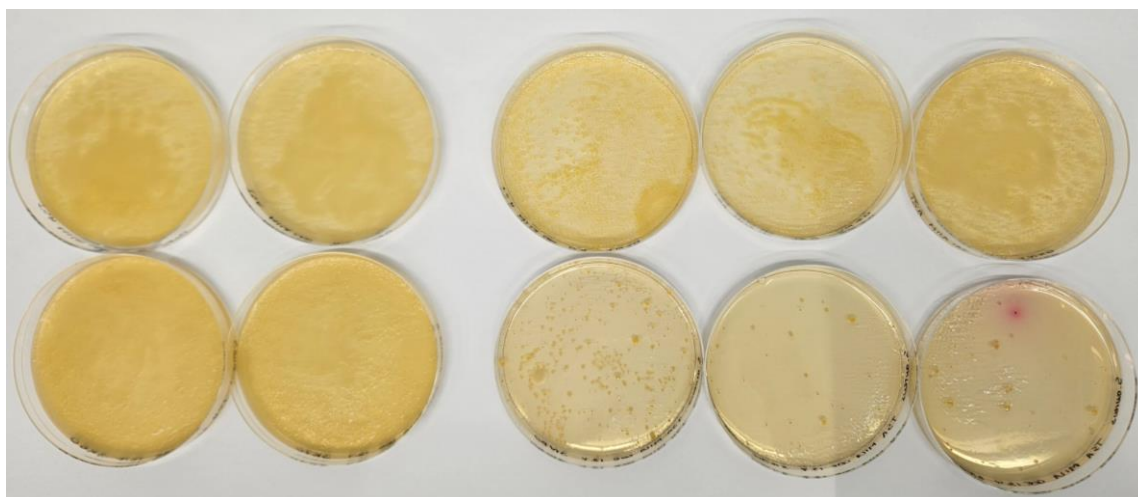
## 5.2 Purren vaikutus atromentiinin antibakteerisuuteen

Atromentiinin antimikrobisuus on todettu aiemmissä tutkimuksissa [9] ja siksi tässä opinnäytetyössä keskityttiin siihen, miten purete vaikuttaa atromentiinin antibakteerisuustehokkuuteen värjätyssä puuvillakankaassa. Purete vaikuttaa samettijalan värjäystulokseen, koska samettijalka-sienen sisältämät väriä ilmentävät yhdisteet, kuten atromentiini, vaativat koordinaatti-, Van Der Waals- tai vetymisidoksen sitoutuakseen puuvillaan, jonka purete mahdollistaa [7, s. 210–212]. Näin ollen voidaan olettaa, että kankaan värjäyksessä saama optinen väri on sidottuna käytettyyn värjäysprosessiin ja on siten merkittävä atromentiinin antibakteerisuuden tehokkuuden arvioinnin osalta.

Kun atromentiini värjätään happamassa värihauteessa, se voi tuottaa punertavan ruskean värin, kun taas emäksisessä värikylyvyssä se voi tuottaa kellertävän ruskeamman värin. Myös käytetyn puren tyyppi voi vaikuttaa lopulliseen väriin, sillä eri peittäusaineet voivat tuottaa erilaisia värieffektejä yhdistettynä atromentiiniin [7, s. 99, 199].

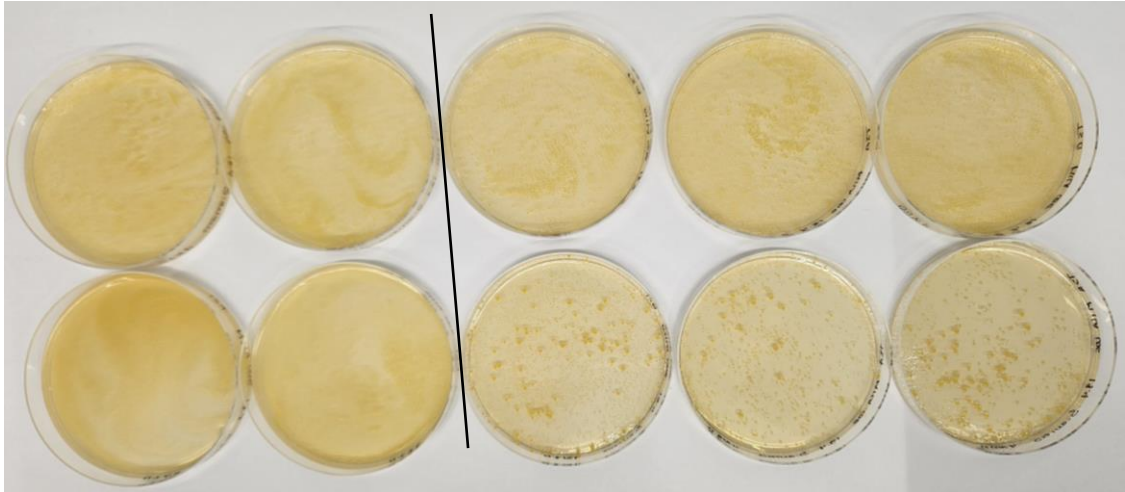
Eri puretteet voivat muodostaa erilaisia komplekseja atromentiinin kanssa, mikä voi vaikuttaa siihen, miten pigmentti absorboi ja heijastaa valoa, mikä johtaa erilaiseen väriin. Esimerkiksi kun atromentiini yhdistetään tanniinipuretteeseen, se voi tuottaa erilaisen värin kuin yhdistettynä alunapuretteeseen, kuten opinnäytetyön värjäystuloksista nähdään (kuva 2).

Tanniinin antibakteerisuus tulisi kuitenkin ottaa huomioon tulosten tarkastelussa. Tämä toteutuu analysoimalla tutkittua kangasta värjätynä pelkällä tanniinipuretteella ilman värilientä ja vertaamalla sitä värjäämättömään kankaaseen, sillä tanniinilla on tutkitusti antimikrobisia ominaisuuksia [7, s. 246]. Tanniinipuretteella purettujen näytteiden antimikrobisuuden tehokkuus on nähtävissä, kun vertaa laimennussarjan nolla-ajan altistumisen ja 24:n tunnin altistumisen laimentamattomia maljoja toisiinsa (kuva 8).



Kuva 8. Ajo 3, näyte 3. Ensimmäisen ja toisen erän laimentamattomat maljat. Vasemmalla neljä kontrollinäytettä ja oikealla kuusi näytteen maljaa. Ylärivissä nolla-ajan altistuminen ja alarivissä 24:n tunnin altistuminen. Punainen piste on roska, josta vuoti väriä maljalle.

Samankaltainen ero on huomattavissa ajossa 4, jossa analysoitiin näytettä 4. Näyte 4 värjättiin väriliemellä ja purettiin 8 % vmp alunapuretteella. Alunapuretteella purettujen näytteiden antimikrobisuuden tehokkuus on huomattava, kun vertaa laimennussarjan nolla-ajan altistumisen ja 24:n tunnin altistumisen laimentamattomia maljoja toisiinsa (kuva 9).



Kuva 9. Ajo 4, näyte 4. Ensimmäisen ja toisen erän laimentamattomat maljat. Vasemmalla neljä kontrollinäytettä ja oikealla kuusi näytteen maljaa. Ylärivissä nolla-ajan altistuminen ja alarivissä 24:n tunnin altistuminen. Punainen piste on roska, josta vuoti väriä maljalle.

Antibakteerisuustehokkuuden A-arvojen perusteella voidaan päätellä, että atromentiini on parhaiten sitoutunut puuvillaan tanniini- ja alunapuretteen avulla. Puuvillakankaan kuidun pinnalla olevilla selluloosakuiduilla on hydroksyyliyhmiä (-OH), jotka voivat muodostaa vetysidoksia tanniinilla tai alunalla puretetun atromentiini-värimolekyylin kanssa. Tämä vuorovaikutus voi johtaa suhteellisen vahvaan sidokseen värin ja kankaan välillä, mikä voi auttaa parantamaan värin kestävyyttä ja näin lisätä värin antibakteerista vaikutusta. On tärkeää huomata, että atromentiinin ja puuvillakankaan välisen sidoksen muodostuminen voi riippua monista tekijöistä, kuten värjäysliuoksen pH:sta ja lämpötilasta, väriaineen ja puretusaineen pitoisuudesta ja värjäysprosessin kestosta. Näin ollen antibakteerisuustehokkuus voi vaihdella värjäyksessä käytettyjen olosuhteiden mukaan.

### 5.3 Antibakteerisuustehokkuus

Opinnäytetyön antibakteerisuusmäärityksen onnistumiseen vaikuttavat tekijät ovat kankaan taustamikrobiston muodostavat itiöivät bakteerit, jotka olisi mahdollista poistaa sterilointiolosuhteita optimoimalla, eroavaisuudet eri ajojen bakteerisuspensioiden vahvuuksissa, sekä mahdolliset punnitusvirheet ajojen välillä

koskien ravintolientä ja agarin valulämpötilan vaihtelut, joka on voinut tuhota osan bakteerisuspension soluista valun aikana. Nämä muuttujat pyrittiin minimoimaan suorittamalla jokainen ajo mahdollisimman samalla tavalla standardia seuraten, käyttäen samoja reagensseja ja laitteita.

Ajojen 1 ja 2 tulos täytti standardin SFS-EN ISO 20743:2021 laskennalliset vaatimukset ja vahvistaa ennakkotiedon, että atromentiinilla on alhainen antibakteerisuustehokkuus. Ajojen 3 ja 4 tulos viittaa siihen, että atromentiinin antibakteerisuustehokkuus voi olla merkittävä tai vahva, jos kyseiset ajot suoritetaan uudelleen niin, että kontrollikankaan F-arvon parametrit täyttyvät. Atromentiinilla värjättyjen puuvillanäytteiden antibakteerisuustehokkuus on esitetty taulukossa 5.

Taulukko 5. Sarjoissa analysoidut näytteet, niiden ajankohdat ja antibakteerisuustehokkuuden tulokset.

Sarja	Purete	Päiväys	F ( $\geq 1$ )	A	Antibakteerisuustehokkuus
Ajo 1	Ei puretetta	27–30.3	+1,06	+1,85	$F \geq 1$ , $A < 2$ , antibakteerisuustehokkuus alhainen
Ajo 2	Rauta 3 % vmp	3–6.4	+1,76	+1,44	$F \geq 1$ , $A < 2$ , antibakteerisuustehokkuus alhainen
Ajo 3	Tanniini 5 % vmp	11–4.4	+0,57	+4,50	$F < 1$ , tulos hylätty
Ajo 4	Aluna 8 % vmp	17–20.4	+0,56	+3,29	$F < 1$ , tulos hylätty

Ei puretetta sisältävän näytteen 1 F-arvo oli +1,06, joka täyttää parametrin  $F \geq 1$ . Ajon 1 antibakteerisuustehokkuus A on +1,85, eli täyttää parametrin  $< 2$ , mikä antaa näytteelle arvon alhainen antibakteerisuustehokkuus.

3 % vmp rautapuretteella värjätty näyte 2 sai F-arvon +1,76, joka täyttää parametrin  $F \geq 1$ . Ajon 2 antibakteerisuustehokkuus A on +1,44, eli täyttää parametrin  $< 2$ , mikä antaa näytteelle arvon alhainen antibakteerisuustehokkuus.

5 % vmp tanniinipuretteella värjätty näyte 3 sai F-arvon +0,57, joka ei täyttä parametria  $F \geq 1$ , ja siksi ajon tulos hylätään. Ajon 3 antibakteerisuustehokkuus A on laskennallisesti +4,50, joka ylittää parametrin  $\geq 3$ , mikä antaisi näytteelle arvon vahva antibakteerisuustehokkuus.

8 % vmp alunapuretteella värjätty näyte 4 sai F-arvon +0,56, joka ei täyttä parametria  $F \geq 1$ , ja siksi ajon tulos hylätään. Ajon 4 antibakteerisuustehokkuus A on laskennallisesti +3,29, joka ylittää parametrin  $\geq 3$ , mikä antaisi näytteelle arvon vahva antibakteerisuustehokkuus.

Laskennallisesti hylätyjä näytteitä 3 ja 4 ei ehditty analysoida uudelleen opinnäytetyön puitteissa.

#### 5.4 Kehitysideat

Standardin onnistumisen kannalta kaikista keskeisintä on, että kontrollikankaassa, joka inkuboituu 24 tuntia lämpökaapissa, kasvaa tarpeeksi bakteereja suhteessa kontrollikankaaseen, jonka kasvu pysäytetään suoraan suolaliuoksella bakteerikontaminaation jälkeen. Jos näiden kahden näytteen välinen tulos ei ole  $F \geq 1$ , tulos ei laskennallisesti täytä standardin vaatimuksia ja tulee hylätä. Näyte tulisi analysoida uudelleen, kunnes tämä parametri saavutetaan.

Ei-toivotun kontaminaation mahdollisuutta voi vähentää steriloida näyte autoklaavissa standardin SFS-EN ISO 20743:2021 mukaisesti ennen bakteerikannan lisäämistä. Kontaminaatoriskin voi täysin poistaa vain optimoida autoklavointiolosuhteita niin, että riittävän suuri lämpötila ja paine kohdistuu itse kankaaseen. Maljoilla kontaminaatio voi olla vaikea tunnistaa muista pesäkkeistä ja siksi jatkopesäkeviljely on suositeltavaa kontaminaation tunnistamiseksi.

Atromentiinin antibakteerisuuden soveltuvuutta laajempaan käyttöön tekstiili- ja vaatetusteollisuudessa tulisi tutkia lähtökohtaisesti puretteen valinnan näkökulmasta. Eri puretteilla värjättyjen kankaiden värienkestoa tulisi tutkia, jotta parhaiten soveltuvat purete- ja kuituyhdistelmät tunnistettaisiin. Mitä paremmin

atromentiini-väriaine sitoutuu kuituun, sitä pidempään sen antibakteerinen vaikutus jatkuu. Näin ollen antibakteerisuuden arvo tulisi aina nähdä sidottuna tutkittuun kuituun ja siihen soveltuvaan puretteeseen.

Vaikka purete vaikuttaa merkittävästi värjäyksessä kankaan värin tulokseen, tulee myös ottaa huomioon luonnollinen vaihtelu väriyhdisteiden määrässä sienien välillä ja pienetkin olosuhteiden muutokset värjäysprosessissa. Näin ollen ei ole vain yhdenlaista värjäystulosta, jonka värjäjä voi saavuttaa värjäysreseptiä seuratessaan. Antibakteerisuusarvon taas tulisi säilyä pitkälti muuttomattomana pienistä värieroista huolimatta, kunhan punnitun sienien määrä pysyy samana kuin värjäysreseptissä.

Erittäin mielenkiintoinen jatkotutkimuksen kohde olisi käytettyjen hoitotyövaatteiden ja -tekstiilien värjäys atromentiinilla ja siihen soveltuvalla puretteella. Hoitotyövaatteissa ja -tekstiileissä käytetään usein puuvillaan ja polyesterin sekoitteita, jotka voivat vaatia kahdesti värjäyksen, jotta atromentiini värjäisi molemmat kuidut. Lisäämällä antibakteerinen käsittely jo olemassa oleviin tekstiileihin voitaisiin pidentää hoitotyövaatteiden ja -tekstiilien elinkaarta ja vähentää tekstiilijätettä.

Puretteiden antibakteerinen vaikutus tulisi erotella atromentiinin vaikutuksesta niin, että analysoitaisiin näytteitä, jotka ovat värjätty pelkällä tanniini- ja alunapuretteella, sekä niiden sekoitteella. Varsinkin tanniinilla on kirjallisuuslähteiden mukaan antibakteerinen vaikutus. Myös jatkoanalyysit 5 % vmp tanniinilla ja 8 % vmp alunalla, sekä niiden sekoitteella puretetuille näytteille, vahvistaisi tämän opinnäytetyön tulokset.

Tekstiilien antibakteerisuustestauksen työläin vaihe on laimennussarjojen ja niiden maljauksen teko, joka voidaan automatisoida uudella teknologialla. Tämä tuokin uusia ulottuvuuksia tekstiilitestaukseen, laskien testauksen hintaa ja työhön käytettyä aikaa. Standardi EN ISO 20743:2021 esittelee monia eri metodeja työn suorittamiseksi, ja tässä työssä käytettyä absorption-metodin tutkimusmenetelmää voi hyvin soveltaa ohjelmoitavan laboratoriorobotin tehtäväksi.



On myös mahdollista, että uuden teknologian vakiintuessa siitä voi tulla yksi uusi hyväksytty metodi muiden joukossa.

## 6 Yhteenveto

Työssä värjättiin neljä näytettä samettijalkasienestä uutetulla väriliemellä, joista kolmessa käytettiin eri puretteita. Näytteiden lisäksi värjäyksessä prosessoitiin neljä kontrollinäytettä, jotka käsiteltiin samoin kuin näytteet, paitsi ilman väri-lientä tai puretetta. Näytteet ja kontrollinäytteet analysoitiin neljässä ajossa antibakteerisuuden määrittämiseksi. Antibakteerisuustehokkuus määritettiin standardin SFS-EN ISO 20743:2021 (Textiles — Determination of antibacterial activity of textile products) avulla. Työssä käytettiin *S. aureus*-bakteerikantaa ja absorption-menetelmää.

Opinnäytetyö vahvistaa aiempien tutkimusten tuloksen, jossa todettiin atromentiinin olevan biosidi. Kaikissa näytteissä huomattiin bakteeripesäkkeiden vähenemää 24:n tunnin inkubaation jälkeen suhteessa nolla-ajan eriin. Tulokset viittasivat siihen, että atromentiinin antibakteerisuustehokkuus on alhaista ja voi olla vahva ( $A \geq 3$ ) sopivan puretteen avulla. Värjätyin, mutta ei puretetun ja 3 % vmp rautapuretteella puretetun värjätyin näytteen antibakteerisuustehokkuus oli alhainen. 5 % vmp tanniinipuretteella puretetun ja 8 % vmp alunapuretteella värjätyin antibakteerisuustehokkuus oli vahva. Näytteiden 3 ja 4 tulos piti kuitenkin hylätä, koska ne eivät täyttäneet standardin kontrollinäytteille asettamia laskennallisia vaatimuksia.

Tutkimusta atromentiinilla värjätyin kankaan antibakteerisuustehokkuuteen tulisi jatkaa toistamalla tässä työssä hylätyt tulokset, puretetut mutta ilman väriliuosta värjätyt näytteet, sekä analysoimalla 5 % vmp tanniinin ja 8 % vmp alunan sekoitteella puretet näytteet. Näitä tuloksia tulisi verrata toisiinsa, jotta kaikista antibakteerisuudeltaan tehokkain yhdistelmä löytyisi.

## Lähteet

- 1 Tietoa hankkeesta. Verkkoaineisto. BioColour. <<https://biocolour.fi/>>. Luettu 6.6.2023.
- 2 Christie, R. M. 2001. Colour Chemistry. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- 3 Cannon, John; Cannon, Margaret; Dalby-Quenet, Gretel. 1994. Dye plants and dyeing. London: The Herbert Press Ltd.
- 4 Aittomäki, Riitta; Colliander, Hans; Kotiranta, Heikki. 2000. Väriä luonnosta. Helsinki: Tammi.
- 5 Kosunen, Mari. 2022. Elävä kulttuuriperintö: Luonnonväreillä värjääminen Suomessa. Pro gradu -tutkielma. Helsingin yliopisto. Helda-tietokanta.
- 6 Räisänen, Riikka. 2002. Anthraquinones from the fungus *dermocycbe sanguinea* as textile dyes. Helsinki: University of Helsinki.
- 7 Räisänen, Riikka; Primetta, Anja; Niinimäki, Kirsi. 2015. Luonnonväriaineet. Helsinki: Maahenki Oy.
- 8 Chen, Gui-Hua; Fu, Shu-Ping; Wang, Lin-Yu; Zhang, Yu-Zhen; Yang, Jun-Li & Zhang, Yan-Jun. 2016. Quantification of atromentin in six edible and medicinal mushroom species by high performance liquid chromatography. Julkaisussa Food Chemistry Volume 196, s. 322–327. Amsterdam: Elsevier.
- 9 Räisänen, Riikka; Primetta, Anja; Nikunen, Sari; Honkalampi, Ulla; Nygren, Heli; Pihlava, Juha-Matti; Vanden Berghe, Ina & von Wright, Atte. 2020. Examining safety of biocolourants from fungal and plant Sources - examples from *Cortinarius* and *Tapinella*, *Salix* and *Tanacetum* spp. and dyed woollen fabrics. Antibiotics, vol. 9, no. 5, s. 266.
- 10 Rudkin, Linda. 2020. Natural dyes. London: Herbert Press.
- 11 Tetri, Anna-Karoliina. 2010. Luonnonvärjäys. Vantaa: Moreeni.
- 12 Cannas, Antonello. 2019. Tannins: fascinating but sometimes dangerous molecules. Verkkoaineisto. Cornell University. <<http://poisonousplants.ansci.cornell.edu/toxicagents/tannin.html>>. Päivitetty 28.2.2019. Luettu 6.6.2023.

- 13 Räsänen, Riikka; Rissanen, Marja; Parviainen, Erja; Suonsilta, Helena. 2021. Tekstiilien materiaalit. Helsinki: Finn Lectura.
- 14 McCarthy, Brian J. (edited). 2011. Textiles for hygiene and infection control. Cambridge: Woodhead Publishing.
- 15 NIOSH Personal Protective Equipment Information (PPE-Info). Verkkoaineisto. Centers for Disease Control and Prevention. <<https://wwwn.cdc.gov/PPEInfo/Standards/Info/ANSI/AAMIPB70Class3#:~:text=Overview%3A%20This%20standard%20establishes%20a,test%20methods%20for%20determining%20compliance.>> Luettu 6.6.2023.
- 16 Scott, Richard A. (edited). 2005. Textiles for protection. Cambridge: Woodhead Publishing.
- 17 Bacillus cereus. Verkkoaineisto. Ruokavirasto. <<https://www.ruokavirasto.fi/elintarvikkeet/ohjeitakuluttajille/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytyksia-aiheuttavia-bakteereja/bacillus-cereus/>>. Luettu 6.6.2023.

## Laitteisto

Laitteisto on eroteltu prosessin mukaan niin, että taulukossa 6 on värjäykseen liittyvät laitteet ja taulukossa 6 antibakteerisuuden tehokkuuden määrittämiseen käytetyt laitteet. Värjäys suoritettiin Original Hanau Linitest -laitteessa, joka toimi kontrolloituna värjäyskumpuna. Laitteessa on 7 ruostumattomasta teräksestä valmistettua avattavaa tölkkiä ja keston, ohjelman ja tehon säätimet.

Taulukko 6. Värjäykseen liittyvät laitteet.

Valmistaja	Laite	Tuotenumero
VWR International bvba	LP-2102i	ITA200
KERN & Sohn GmbH	ABJ 320-4	WB1160017
Original Hanau	Linitest	

Työssä käytettiin ravistelevaa ja staattista lämpökaappia (taulukko 7).

Taulukko 7. Antibakteerisuuden määrittämiseen käytetyt laitteet.

Valmistaja	Laite	Tuotenumero
Interscience	FlexiPump Pro	562000S00784
Memmert	Lab incubator I	
Berner Labs	Infors	SG CH-4103 BOTTMIN-GEN

Maljojen pesäkkeiden laskenta suoritettiin käsin laskemalla ja käyttäen Interscience Scan 4000 -pesäkelaskijaa.

## Reagenssit

Tässä luvussa on eroteltu prosessin tai lopputuotteen mukaan mitä reagensseja työssä on käytetty. Taulukossa 8 on puretusaineiden tiedot.

Taulukko 8. Värjäyksessä käytetyt puretteet.

Reagenssi	Valmistaja	Tuote-numero	Erä
Iron(II) sulfate heptahydrate puriss. p.a., Reag. ACS, Reag. ISO, Reag. Ph. Eur.	Sigma-Adrich Laborchemikalien GmbH	31236	62130
Aluna	Tetri Design		
Tannic Acid	J. T. Baker Chemical Co.		22246

Taulukossa 9 on Shake-out physiological saline -reagenssit.

Taulukko 9. Shake-out physiological saline -reagenssit.

Reagenssi	Valmistaja	Tuote-numero	Erä
AnalaR NORMAPUR Sodium chloride ACS, Reag. Ph. Eur.	VWR Chemicals	27810.295	16C030030
Tween 80	Fluka Chemika		392141/1 23799

Taulukossa 10 on NB-liuoksen reagenssit.

Taulukko 10. NB-liuoksen reagenssit.

Reagenssi	Valmistaja	Tuote-numero	Erä
Beef Extract	Lab M	MC019	Q35273/012
Peptone General purpose grade	Fisher Scientific	P/1160/50	1927265

Taulukossa 11 on TSA-maljojen reagenssit.

Taulukko 11. TSA-maljojen reagenssit.

Reagenssi	Valmistaja	Tuote-numero	Erä
Tryptone TAI	Lab M	MC5	Q30528/106 / Q32783/318
Casein Peptone Type 1 (Tryptone)	Neogen	NCM0120A	UK300670/301
Soy Peptone	Lab M	MC3	Q28841/236
AnalaR NORMAPUR Sodium chloride ACS, Reag. Ph. Eur.	VWR Chemicals	27810.295	16C030030
Agar No. 2 Bacteriological	Lab M	MC006	Q41430/229

## Värjäyksessä käytetyn talousveden laatu

Keskimääräinen vedenlaatu Pitkäkosken ja Vanhankaupungin vedenpuhdistuslaitoksilla 1.1. - 31.3.2023.



HSY  
Vedenpuhdistus  
Käyttölaboratorio



### Keskimääräinen vedenlaatu Pitkäkosken ja Vanhankaupungin vedenpuhdistuslaitoksilla 1.1. - 31.3.2023

Analyysi	Yksikkö	Menetelmä	Puhdistettu vesi		Laatutavoite/ vaatimus <sup>c)</sup> enimmäisarvo
			Pitkäkoski	Vanha- kaupunki	
Lämpötila	°C	Sis. menetelmä	3,8	3,3	
Alkaliteetti, HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	* mmol/l	SFS-EN ISO 9963-1:1996**	0,73	0,72	
Ammoniumtyppi, NH <sub>4</sub> -N	* mg/l	ISO 7150-1:1984**	0,09	0,09	0,5
Kokonaiskloori	* mg/l	SFS-EN ISO 7393-2:2018	0,44	0,47	
Kokonaiskovuus	* °dH	SFS 3003:1987	3,0	3,0	
Org. kokonaishiili, TOC	* mg/l	SFS-EN 1484:1997	1,6	2,0	b)
Permanganaattiluku	* # mg/l	SFS 3036:1981	4,1	5,1	
pH	*	SFS 3021:1979	8,5	8,3	6,5–9,5
Sameus	* FNU	SFS-EN ISO 7027:2016	<0,05	<0,05	a)
Sähkönjohtavuus	* µS/cm	SFS-EN 27888:1994	160	159	2500
Rauta, Fe	* µg/l	SFS 3028:1976	28	<10	200
Alumiini, Al	* # µg/l	SFS-EN ISO 17294-2:2016	<3	<3	200
Fluoridi, F <sup>-</sup>	* # mg/l	Sis. menetelmä DA	0,1	0,1	1,5
Kadmium, Cd	* # µg/l	SFS-EN ISO 17294-2:2016	<0,02	<0,02	5,0
Kalium, K	* # mg/l	SFS-EN ISO 11885:2009	1,4	1,4	
Kalsium, Ca	* # mg/l	SFS-EN ISO 11885:2009	20	20	
Kloridi	* # mg/l	Sis. menetelmä DA	6,3	5,6	250
Kromi, Cr	* # µg/l	SFS-EN ISO 17294-2:2016	<0,05	<0,05	50
Kupari, Cu	* # µg/l	SFS-EN ISO 17294-2:2016	0,2	1,0	2000
Lyijy, Pb	* # µg/l	SFS-EN ISO 17294-2:2016	<0,1	<0,1	10
Magnesium, Mg	* # mg/l	SFS-EN ISO 11885:2009	1,7	1,8	
Mangaani, Mn	* # µg/l	SFS-EN ISO 11885:2009	3	<3	50
Natrium, Na	* # mg/l	SFS-EN ISO 11885:2009	8,0	7,6	200
Sinkki, Zn	* # µg/l	SFS-EN ISO 11885:2009	<5	<5	
Sulfaattirikki	# mg/l	Sis. menetelmä DA	8,6	8,8	
Heterotrofinen pes.luku 22°C	* pmy/ml	SFS-EN ISO 6222:1999	0	0	
<i>Escherichia coli</i>	* mpn/100 ml	SFS-EN ISO 9308-2:2014	0	0	0
Koliformiset bakteerit	* mpn/100 ml	SFS-EN ISO 9308-2:2014	0	0	0
Haju, laim.luku 25°C		Sis. menetelmä	0,0	0,0	a)
Maku, laim.luku		Sis. menetelmä	0,0	0,0	a)

\* Näyte tutkittu akkreditoidulla menetelmällä, mittausepävarmuudet saa pyydettyäessä

\*\* Muunneltu menetelmä

# Analyysi teetetty alihankintana MetropoliLab-laboratoriossa.

Se on FINAS-akkreditointipalvelun akkreditoima testauslaboratorio T058, akkreditointivaatimus on standardi SFS-EN ISO/IEC 17025.

a) Käyttäjien hyväksyttävissä eikä epätavallisia muutoksia

b) Ei epätavallisia muutoksia

c) Sosiaali- ja terveysministeriön asetus talousveden laatuvaatimuksista ja valvontatutkimuksista 1352/2015 sekä muutos 683/2017

## Kontaminaation identifiointi

MALDI-TOF-massaspektrometrin tulokset kolmelle pesäkkeelle taulukossa 12. *S. aureus* oletetut w eli valkoinen ja y eli keltainen. Kolmas pesäke todettiin jatkomaljaviljelyllä *B. cereus* -bakteeriksi.

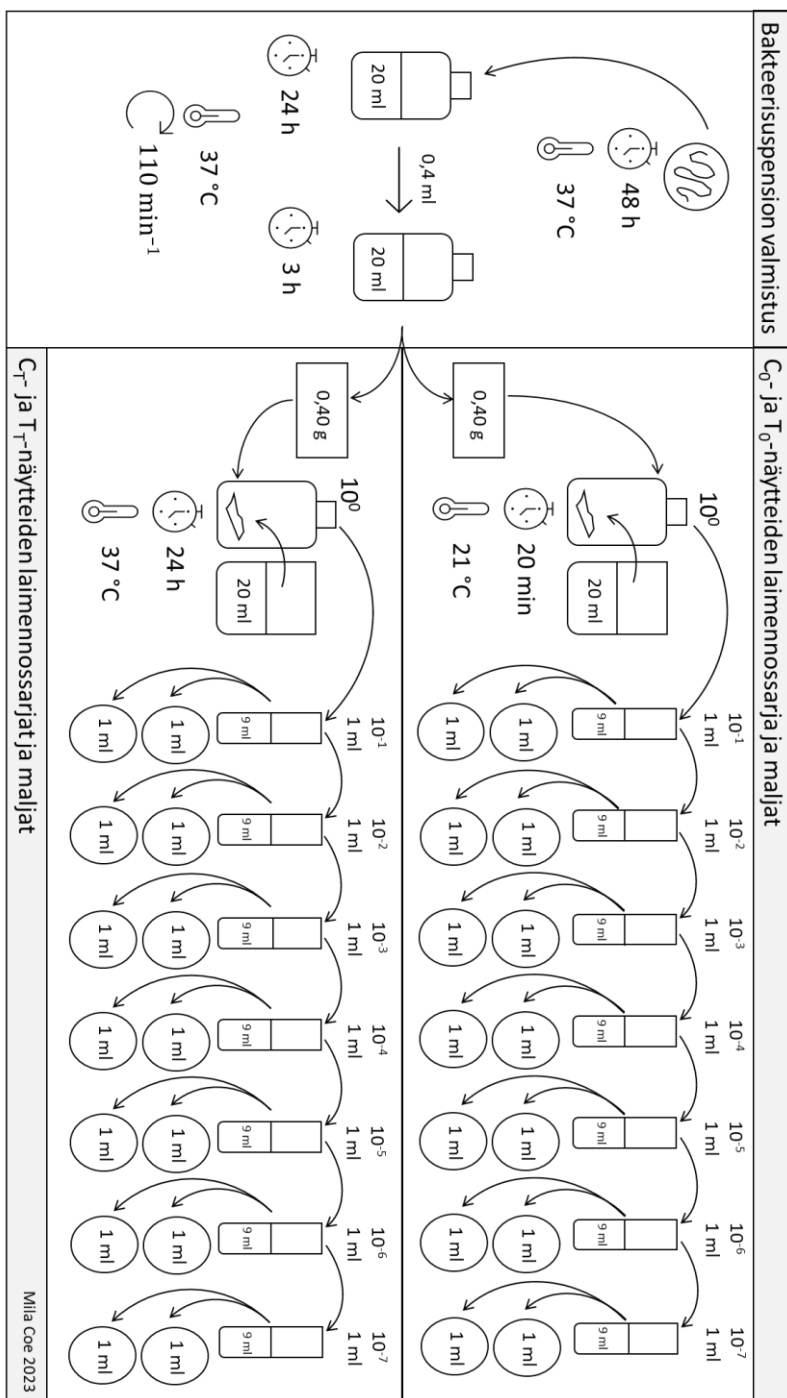
Taulukko 12. MALDI-TOF-massaspektrometrin tulokset kolmelle pesäkkeelle.

<b>Päivämäärä</b>	<b>Spotin nimi</b>	<b>Tunnistus %</b>	<b>Suku</b>	<b>Heimo</b>
14.4.2023	Saureusw 1-4	99,90	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
14.4.2023	Saureusy 1-4	99,90	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
14.4.2023	Saureusw 7	86,70	<i>Bacillus</i>	<i>cereus group</i>
26.4.2023	8.2	96,90	<i>Bacillus</i>	<i>cereus group</i>



## Standardin EN ISO 20743:2021 (Textiles — Determination of antibacterial activity of textile products) absorptio-metodin tutkimusmenetelmä

Standardin EN ISO 20743:2021 "Textiles — Determination of antibacterial activity of textile products" absorptio-metodin tutkimusmenetelmä.



## Pesäkelaskennan tulokset

Taulukossa 13 on ajojen 1–4 pesäkelaskennan tulokset. Ensimmäinen numero kuvaa ajoa, toinen kirjain onko kyseessä kontrolli vai näyte, kolmas numero on inkubointisarja (1-5 0h, 6-0 24h), neljäs laimennos ja viides numero erottelee rinnaskaistuloksen t toisistaan.

Taulukko 13. Ajojen 1–4 pesäkelaskennan tulokset.

Sample N°	Count	Dilution	CFU/mL	Cb	M
1K101	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K111	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K112	300	1,00E-01	0,00E+00		
1K121	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K122	300	1,00E-02	0,00E+00		
1K131	300	1,00E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K132	300	1,00E-03	0,00E+00		
1K141	106	1,00E-04	1,06E+06	1,08E+06	3,76E+07
1K142	109	1,00E-04	1,09E+06		
1K151	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K152	0	1,00E-05	0,00E+00		
1K161	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K162	0	1,00E-06	0,00E+00		
1K171	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K172	0	1,00E-07	0,00E+00		
1K201	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K211	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K212	300	1,00E-01	0,00E+00		
1K221	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K222	300	1,00E-02	0,00E+00		
1K231	105	1,00E-03	1,05E+05	1,15E+05	4,01E+06

1K232	124	1,00E-03	1,24E+05		
1K241	22	1,00E-04	2,20E+05	1,10E+05	3,85E+06
1K242	0	1,00E-04	0,00E+00		
1K251	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K252	0	1,00E-05	0,00E+00		
1K261	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K262	0	1,00E-06	0,00E+00		
1K271	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K272	0	1,00E-07	0,00E+00		
1K201	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K211	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K212	300	1,00E-01	0,00E+00		
1K221	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K222	300	1,00E-02	0,00E+00		
1K231	105	1,00E-03	1,05E+05	1,15E+05	4,01E+06
1K232	124	1,00E-03	1,24E+05		
1K241	22	1,00E-04	2,20E+05	1,10E+05	3,85E+06
1K242	0	1,00E-04	0,00E+00		
1K251	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K252	0	1,00E-05	0,00E+00		
1K261	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K262	0	1,00E-06	0,00E+00		
1K271	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K272	0	1,00E-07	0,00E+00		
1N301	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N311	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N312	300	1,00E-01	0,00E+00		
1N321	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N322	300	1,00E-02	0,00E+00		
1N331	300	1,00E-03	0,00E+00	2,75E+05	9,63E+06
1N332	250	1,00E-03	2,50E+05		

1N341	40	1,00E-04	4,00E+05	3,90E+05	1,37E+07
1N342	38	1,00E-04	3,80E+05		
1N351	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N352	0	1,00E-05	0,00E+00		
1N361	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N362	0	1,00E-06	0,00E+00		
1N371	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N372	0	1,00E-07	0,00E+00		
1N401	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N411	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N412	300	1,00E-01	0,00E+00		
1N421	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N422	300	1,00E-02	0,00E+00		
1N431	300	1,00E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N432	300	1,00E-03	0,00E+00		
1N441	44	1,00E-04	4,40E+05	5,30E+05	1,86E+07
1N442	62	1,00E-04	6,20E+05		
1N451	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N452	0	1,00E-05	0,00E+00		
1N461	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N462	0	1,00E-06	0,00E+00		
1N471	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N472	0	1,00E-07	0,00E+00		
1N501	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N511	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N512	300	1,00E-01	0,00E+00		
1N521	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N522	300	1,00E-02	0,00E+00		
1N531	186	1,00E-03	1,86E+05	2,43E+05	8,51E+06
1N532	300	1,00E-03	0,00E+00		
1N541	44	1,00E-04	4,40E+05	3,85E+05	1,35E+07

1N542	33	1,00E-04	3,30E+05		
1N551	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N552	0	1,00E-05	0,00E+00		
1N561	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N562	0	1,00E-06	0,00E+00		
1N571	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N572	0	1,00E-07	0,00E+00		
1K601	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K611	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K612	300	1,00E-01	0,00E+00		
1K621	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K622	300	1,00E-02	0,00E+00		
1K631	300	1,00E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K632	300	1,00E-03	0,00E+00		
1K641	282	1,00E-04	2,82E+06	2,91E+06	1,02E+08
1K642	300	1,00E-04	0,00E+00		
1K651	48	1,00E-05	4,80E+06	4,15E+06	1,45E+08
1K652	35	1,00E-05	3,50E+06		
1K661	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K662	0	1,00E-06	0,00E+00		
1K671	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K672	0	1,00E-07	0,00E+00		
1K601	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K611	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K612	300	1,00E-01	0,00E+00		
1K621	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K622	300	1,00E-02	0,00E+00		
1K631	300	1,00E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K632	300	1,00E-03	0,00E+00		
1K641	282	1,00E-04	2,82E+06	2,91E+06	1,02E+08
1K642	300	1,00E-04	0,00E+00		

1K651	48	1,00E-05	4,80E+06	4,15E+06	1,45E+08
1K652	35	1,00E-05	3,50E+06		
1K661	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K662	0	1,00E-06	0,00E+00		
1K671	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K672	0	1,00E-07	0,00E+00		
1K701	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K711	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K712	300	1,00E-01	0,00E+00		
1K721	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K722	300	1,00E-02	0,00E+00		
1K731	175	1,00E-03	1,75E+05	1,72E+05	6,02E+06
1K732	169	1,00E-03	1,69E+05		
1K741	0	1,00E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K742	0	1,00E-04	0,00E+00		
1K751	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K752	0	1,00E-05	0,00E+00		
1K761	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K762	0	1,00E-06	0,00E+00		
1K771	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1K772	0	1,00E-07	0,00E+00		
1N801	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N811	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N812	300	1,00E-01	0,00E+00		
1N821	271	1,00E-02	2,71E+04	2,50E+04	8,73E+05
1N822	228	1,00E-02	2,28E+04		
1N831	0	1,00E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N832	0	1,00E-03	0,00E+00		
1N841	0	1,00E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N842	0	1,00E-04	0,00E+00		
1N851	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

1N852	0	1,00E-05	0,00E+00		
1N861	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N862	0	1,00E-06	0,00E+00		
1N871	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N872	0	1,00E-07	0,00E+00		
1N901	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N911	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N912	300	1,00E-01	0,00E+00		
1N921	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N922	300	1,00E-02	0,00E+00		
1N931	102	1,00E-03	1,02E+05	1,03E+05	3,59E+06
1N932	103	1,00E-03	1,03E+05		
1N941	0	1,00E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N942	0	1,00E-04	0,00E+00		
1N951	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N952	0	1,00E-05	0,00E+00		
1N961	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N962	0	1,00E-06	0,00E+00		
1N971	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N972	0	1,00E-07	0,00E+00		
1N001	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N011	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N012	300	1,00E-01	0,00E+00		
1N021	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N022	300	1,00E-02	0,00E+00		
1N031	44	1,00E-03	4,40E+04	2,20E+04	7,70E+05
1N032	0	1,00E-03	0,00E+00		
1N041	0	1,00E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N042	0	1,00E-04	0,00E+00		
1N051	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N052	0	1,00E-05	0,00E+00		

1N061	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N062	0	1,00E-06	0,00E+00		
1N071	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1N072	0	1,00E-07	0,00E+00		
2K101	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2K111	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2K112	300	1,00E-01	0,00E+00		
2K121	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2K122	300	1,00E-02	0,00E+00		
2K131	90	1,00E-03	9,00E+04	6,30E+04	2,21E+06
2K132	36	1,00E-03	3,60E+04		
2K141	0	1,00E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2K142	0	1,00E-04	0,00E+00		
2K151	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2K152	0	1,00E-05	0,00E+00		
2K161	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2K162	0	1,00E-06	0,00E+00		
2K171	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2K172	0	1,00E-07	0,00E+00		
2K201	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2K211	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2K212	300	1,00E-01	0,00E+00		
2K221	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2K222	300	1,00E-02	0,00E+00		
2K231	102	1,00E-03	1,02E+05	1,02E+05	3,57E+06
2K232	102	1,00E-03	1,02E+05		
2K241	0	1,00E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2K242	0	1,00E-04	0,00E+00		
2K251	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2K252	0	1,00E-05	0,00E+00		
2K261	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00



2K262	0	1,00E-06	0,00E+00		
2K271	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2K272	0	1,00E-07	0,00E+00		
2N301	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N311	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N312	300	1,00E-01	0,00E+00		
2N321	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N322	300	1,00E-02	0,00E+00		
2N331	120	1,00E-03	1,20E+05	1,20E+05	4,20E+06
2N332	120	1,00E-03	1,20E+05		
2N341	0	1,00E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N342	0	1,00E-04	0,00E+00		
2N351	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N352	0	1,00E-05	0,00E+00		
2N361	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N362	0	1,00E-06	0,00E+00		
2N371	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N372	0	1,00E-07	0,00E+00		
2N401	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N411	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N412	300	1,00E-01	0,00E+00		
2N421	150	1,00E-02	1,50E+04	1,48E+04	5,16E+05
2N422	145	1,00E-02	1,45E+04		
2N431	119	1,00E-03	1,19E+05	5,95E+04	2,08E+06
2N432	0	1,00E-03	0,00E+00		
2N441	40	1,00E-04	4,00E+05	2,00E+05	7,00E+06
2N442	0	1,00E-04	0,00E+00		
2N451	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N452	0	1,00E-05	0,00E+00		
2N461	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N462	0	1,00E-06	0,00E+00		

2N471	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N472	0	1,00E-07	0,00E+00		
2N501	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N511	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N512	300	1,00E-01	0,00E+00		
2N521	97	1,00E-02	9,70E+03	1,26E+04	4,39E+05
2N522	154	1,00E-02	1,54E+04		
2N531	162	1,00E-03	1,62E+05	9,60E+04	3,36E+06
2N532	30	1,00E-03	3,00E+04		
2N541	0	1,00E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N542	0	1,00E-04	0,00E+00		
2N551	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N552	0	1,00E-05	0,00E+00		
2N561	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N562	0	1,00E-06	0,00E+00		
2N571	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N572	0	1,00E-07	0,00E+00		
2K601	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2K611	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2K612	300	1,00E-01	0,00E+00		
2K621	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2K622	300	1,00E-02	0,00E+00		
2K631	300	1,00E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2K632	300	1,00E-03	0,00E+00		
2K641	150	1,00E-04	1,50E+06	1,50E+06	5,25E+07
2K642	150	1,00E-04	1,50E+06		
2K651	132	1,00E-05	1,32E+07	1,22E+07	4,25E+08
2K652	111	1,00E-05	1,11E+07		
2K661	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2K662	0	1,00E-06	0,00E+00		
2K671	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

2K672	0	1,00E-07	0,00E+00		
2K701	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2K711	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2K712	300	1,00E-01	0,00E+00		
2K721	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2K722	300	1,00E-02	0,00E+00		
2K731	300	1,00E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2K732	300	1,00E-03	0,00E+00		
2K741	293	1,00E-04	2,93E+06	2,93E+06	1,03E+08
2K742	293	1,00E-04	2,93E+06		
2K751	44	1,00E-05	4,40E+06	2,20E+06	7,70E+07
2K752	0	1,00E-05	0,00E+00		
2K761	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2K762	0	1,00E-06	0,00E+00		
2K771	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2K772	0	1,00E-07	0,00E+00		
2N801	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N811	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N812	300	1,00E-01	0,00E+00		
2N821	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N822	300	1,00E-02	0,00E+00		
2N831	194	1,00E-03	1,94E+05	1,94E+05	6,79E+06
2N832	194	1,00E-03	1,94E+05		
2N841	0	1,00E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N842	0	1,00E-04	0,00E+00		
2N851	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N852	0	1,00E-05	0,00E+00		
2N861	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N862	0	1,00E-06	0,00E+00		
2N871	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N872	0	1,00E-07	0,00E+00		

2N901	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N911	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N912	300	1,00E-01	0,00E+00		
2N921	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N922	300	1,00E-02	0,00E+00		
2N931	151	1,00E-03	1,51E+05	1,51E+05	5,29E+06
2N932	151	1,00E-03	1,51E+05		
2N941	0	1,00E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N942	0	1,00E-04	0,00E+00		
2N951	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N952	0	1,00E-05	0,00E+00		
2N961	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N962	0	1,00E-06	0,00E+00		
2N971	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N972	0	1,00E-07	0,00E+00		
2N001	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N011	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N012	300	1,00E-01	0,00E+00		
2N021	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N022	300	1,00E-02	0,00E+00		
2N031	165	1,00E-03	1,65E+05	1,72E+05	6,00E+06
2N032	178	1,00E-03	1,78E+05		
2N041	0	1,00E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N042	0	1,00E-04	0,00E+00		
2N051	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N052	0	1,00E-05	0,00E+00		
2N061	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N062	0	1,00E-06	0,00E+00		
2N071	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2N072	0	1,00E-07	0,00E+00		
3K101	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

3K111	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K112	300	1,00E-01	0,00E+00		
3K121	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K122	300	1,00E-02	0,00E+00		
3K131	300	1,00E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K132	300	1,00E-03	0,00E+00		
3K141	55	1,00E-04	5,50E+05	7,00E+05	2,45E+07
3K142	85	1,00E-04	8,50E+05		
3K151	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K152	0	1,00E-05	0,00E+00		
3K161	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K162	0	1,00E-06	0,00E+00		
3K171	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K172	0	1,00E-07	0,00E+00		
3K101	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K111	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K112	300	1,00E-01	0,00E+00		
3K121	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K122	300	1,00E-02	0,00E+00		
3K131	300	1,00E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K132	300	1,00E-03	0,00E+00		
3K141	55	1,00E-04	5,50E+05	7,00E+05	2,45E+07
3K142	85	1,00E-04	8,50E+05		
3K151	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K152	0	1,00E-05	0,00E+00		
3K161	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K162	0	1,00E-06	0,00E+00		
3K171	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K172	0	1,00E-07	0,00E+00		
3K201	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K211	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

3K212	300	1,00E-01	0,00E+00		
3K221	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K222	300	1,00E-02	0,00E+00		
3K231	300	1,00E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K232	300	1,00E-03	0,00E+00		
3K241	64	1,00E-04	6,40E+05	7,25E+05	2,54E+07
3K242	81	1,00E-04	8,10E+05		
3K251	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K252	0	1,00E-05	0,00E+00		
3K261	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K262	0	1,00E-06	0,00E+00		
3K271	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K272	0	1,00E-07	0,00E+00		
3K301	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K311	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K312	300	1,00E-01	0,00E+00		
3K321	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K322	300	1,00E-02	0,00E+00		
3K331	300	1,00E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K332	300	1,00E-03	0,00E+00		
3K341	60	1,00E-04	6,00E+05	5,60E+05	1,96E+07
3K342	52	1,00E-04	5,20E+05		
3K351	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K352	0	1,00E-05	0,00E+00		
3K361	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K362	0	1,00E-06	0,00E+00		
3K371	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K372	0	1,00E-07	0,00E+00		
3K401	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K411	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K412	300	1,00E-01	0,00E+00		

3K421	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K422	300	1,00E-02	0,00E+00		
3K431	300	1,00E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K432	300	1,00E-03	0,00E+00		
3K441	81	1,00E-04	8,10E+05	8,10E+05	2,84E+07
3K442	81	1,00E-04	8,10E+05		
3K451	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K452	0	1,00E-05	0,00E+00		
3K461	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K462	0	1,00E-06	0,00E+00		
3K471	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K472	0	1,00E-07	0,00E+00		
3K501	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K511	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K512	300	1,00E-01	0,00E+00		
3K521	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K522	300	1,00E-02	0,00E+00		
3K531	198	1,00E-03	1,98E+05	1,94E+05	6,77E+06
3K532	189	1,00E-03	1,89E+05		
3K541	30	1,00E-04	3,00E+05	3,00E+05	1,05E+07
3K542	30	1,00E-04	3,00E+05		
3K551	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K552	0	1,00E-05	0,00E+00		
3K561	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K562	0	1,00E-06	0,00E+00		
3K571	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K572	0	1,00E-07	0,00E+00		
3K601	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K611	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K612	300	1,00E-01	0,00E+00		
3K621	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

3K622	300	1,00E-02	0,00E+00		
3K631	300	1,00E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K632	300	1,00E-03	0,00E+00		
3K641	194	1,00E-04	1,94E+06	1,94E+06	6,79E+07
3K642	194	1,00E-04	1,94E+06		
3K651	45	1,00E-05	4,50E+06	3,75E+06	1,31E+08
3K652	30	1,00E-05	3,00E+06		
3K661	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K662	0	1,00E-06	0,00E+00		
3K671	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K672	0	1,00E-07	0,00E+00		
3K601	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K611	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K612	300	1,00E-01	0,00E+00		
3K621	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K622	300	1,00E-02	0,00E+00		
3K631	300	1,00E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K632	300	1,00E-03	0,00E+00		
3K641	194	1,00E-04	1,94E+06	1,94E+06	6,79E+07
3K642	194	1,00E-04	1,94E+06		
3K651	45	1,00E-05	4,50E+06	3,75E+06	1,31E+08
3K652	30	1,00E-05	3,00E+06		
3K661	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K662	0	1,00E-06	0,00E+00		
3K671	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K672	0	1,00E-07	0,00E+00		
3K701	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K711	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K712	300	1,00E-01	0,00E+00		
3K721	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K722	300	1,00E-02	0,00E+00		



3K731	300	1,00E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K732	300	1,00E-03	0,00E+00		
3K741	149	1,00E-04	1,49E+06	1,49E+06	5,22E+07
3K742	149	1,00E-04	1,49E+06		
3K751	30	1,00E-05	3,00E+06	3,00E+06	1,05E+08
3K752	30	1,00E-05	3,00E+06		
3K761	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K762	0	1,00E-06	0,00E+00		
3K771	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3K772	0	1,00E-07	0,00E+00		
3N801	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3N811	30	1,00E-01	3,00E+02	1,50E+02	5,25E+03
3N812	0	1,00E-01	0,00E+00		
3N821	0	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3N822	0	1,00E-02	0,00E+00		
3N831	0	1,00E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3N832	0	1,00E-03	0,00E+00		
3N841	0	1,00E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3N842	0	1,00E-04	0,00E+00		
3N851	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3N852	0	1,00E-05	0,00E+00		
3N861	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3N862	0	1,00E-06	0,00E+00		
3N871	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3N872	0	1,00E-07	0,00E+00		
3N901	51	1	5,10E+01	5,10E+01	1,79E+03
3N911	0	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3N912	0	1,00E-01	0,00E+00		
3N921	0	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3N922	0	1,00E-02	0,00E+00		
3N931	0	1,00E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

3N932	0	1,00E-03	0,00E+00		
3N941	0	1,00E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3N942	0	1,00E-04	0,00E+00		
3N951	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3N952	0	1,00E-05	0,00E+00		
3N961	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3N962	0	1,00E-06	0,00E+00		
3N971	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3N972	0	1,00E-07	0,00E+00		
3N001	51	1	5,10E+01	5,10E+01	1,79E+03
3N011	0	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3N012	0	1,00E-01	0,00E+00		
3N021	0	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3N022	0	1,00E-02	0,00E+00		
3N031	0	1,00E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3N032	0	1,00E-03	0,00E+00		
3N041	0	1,00E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3N042	0	1,00E-04	0,00E+00		
3N051	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3N052	0	1,00E-05	0,00E+00		
3N061	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3N062	0	1,00E-06	0,00E+00		
3N071	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3N072	0	1,00E-07	0,00E+00		
4K101	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K111	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K112	300	1,00E-01	0,00E+00		
4K121	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K122	300	1,00E-02	0,00E+00		
4K131	300	1,00E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K132	300	1,00E-03	0,00E+00		

4K141	62	1,00E-04	6,20E+05	5,20E+05	1,82E+07
4K142	42	1,00E-04	4,20E+05		
4K151	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K152	0	1,00E-05	0,00E+00		
4K161	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K162	0	1,00E-06	0,00E+00		
4K171	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K172	0	1,00E-07	0,00E+00		
4K101	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K111	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K112	300	1,00E-01	0,00E+00		
4K121	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K122	300	1,00E-02	0,00E+00		
4K131	300	1,00E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K132	300	1,00E-03	0,00E+00		
4K141	62	1,00E-04	6,20E+05	5,20E+05	1,82E+07
4K142	42	1,00E-04	4,20E+05		
4K151	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K152	0	1,00E-05	0,00E+00		
4K161	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K162	0	1,00E-06	0,00E+00		
4K171	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K172	0	1,00E-07	0,00E+00		
4K201	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K211	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K212	300	1,00E-01	0,00E+00		
4K221	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K222	300	1,00E-02	0,00E+00		
4K231	300	1,00E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K232	300	1,00E-03	0,00E+00		
4K241	148	1,00E-04	1,48E+06	1,56E+06	5,44E+07

4K242	163	1,00E-04	1,63E+06		
4K251	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K252	0	1,00E-05	0,00E+00		
4K261	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K262	0	1,00E-06	0,00E+00		
4K271	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K272	0	1,00E-07	0,00E+00		
4N301	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N311	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N312	300	1,00E-01	0,00E+00		
4N321	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N322	300	1,00E-02	0,00E+00		
4N331	264	1,00E-03	2,64E+05	2,64E+05	9,24E+06
4N332	264	1,00E-03	2,64E+05		
4N341	32	1,00E-04	3,20E+05	4,35E+05	1,52E+07
4N342	55	1,00E-04	5,50E+05		
4N351	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N352	0	1,00E-05	0,00E+00		
4N361	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N362	0	1,00E-06	0,00E+00		
4N371	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N372	0	1,00E-07	0,00E+00		
4N401	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N411	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N412	300	1,00E-01	0,00E+00		
4N421	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N422	300	1,00E-02	0,00E+00		
4N431	218	1,00E-03	2,18E+05	1,78E+05	6,21E+06
4N432	137	1,00E-03	1,37E+05		
4N441	16	1,00E-04	1,60E+05	2,10E+05	7,35E+06
4N442	26	1,00E-04	2,60E+05		

4N451	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N452	0	1,00E-05	0,00E+00		
4N461	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N462	0	1,00E-06	0,00E+00		
4N471	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N472	0	1,00E-07	0,00E+00		
4N501	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N511	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N512	300	1,00E-01	0,00E+00		
4N521	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N522	300	1,00E-02	0,00E+00		
4N531	272	1,00E-03	2,72E+05	2,72E+05	9,52E+06
4N532	272	1,00E-03	2,72E+05		
4N541	32	1,00E-04	3,20E+05	3,75E+05	1,31E+07
4N542	43	1,00E-04	4,30E+05		
4N551	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N552	0	1,00E-05	0,00E+00		
4N561	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N562	0	1,00E-06	0,00E+00		
4N571	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N572	0	1,00E-07	0,00E+00		
4K601	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K611	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K612	300	1,00E-01	0,00E+00		
4K621	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K622	300	1,00E-02	0,00E+00		
4K631	300	1,00E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K632	300	1,00E-03	0,00E+00		
4K641	260	1,00E-04	2,60E+06	2,80E+06	5,60E+07
4K642	300	1,00E-04	0,00E+00		
4K651	78	1,00E-05	7,80E+06	7,00E+06	1,40E+08

4K652	62	1,00E-05	6,20E+06		
4K661	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K662	0	1,00E-06	0,00E+00		
4K671	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K672	0	1,00E-07	0,00E+00		
4K701	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K711	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K712	300	1,00E-01	0,00E+00		
4K721	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K722	300	1,00E-02	0,00E+00		
4K731	300	1,00E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K732	300	1,00E-03	0,00E+00		
4K741	300	1,00E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K742	300	1,00E-04	0,00E+00		
4K751	67	1,00E-05	6,70E+06	6,00E+06	1,20E+08
4K752	53	1,00E-05	5,30E+06		
4K761	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K762	0	1,00E-06	0,00E+00		
4K771	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K772	0	1,00E-07	0,00E+00		
4K701	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K711	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K712	300	1,00E-01	0,00E+00		
4K721	300	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K722	300	1,00E-02	0,00E+00		
4K731	300	1,00E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K732	300	1,00E-03	0,00E+00		
4K741	300	1,00E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K742	300	1,00E-04	0,00E+00		
4K751	67	1,00E-05	6,70E+06	6,00E+06	1,20E+08
4K752	53	1,00E-05	5,30E+06		

4K761	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K762	0	1,00E-06	0,00E+00		
4K771	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4K772	0	1,00E-07	0,00E+00		
4N801	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N811	300	1,00E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N812	300	1,00E-01	0,00E+00		
4N821	66	1,00E-02	6,60E+03	6,80E+03	1,36E+05
4N822	70	1,00E-02	7,00E+03		
4N831	0	1,00E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N832	0	1,00E-03	0,00E+00		
4N841	0	1,00E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N842	0	1,00E-04	0,00E+00		
4N851	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N852	0	1,00E-05	0,00E+00		
4N861	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N862	0	1,00E-06	0,00E+00		
4N871	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N872	0	1,00E-07	0,00E+00		
4N901	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N911	83	1,00E-01	8,30E+02	7,90E+02	1,58E+04
4N912	75	1,00E-01	7,50E+02		
4N921	30	1,00E-02	3,00E+03	3,00E+03	6,00E+04
4N922	30	1,00E-02	3,00E+03		
4N931	0	1,00E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N932	0	1,00E-03	0,00E+00		
4N941	0	1,00E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N942	0	1,00E-04	0,00E+00		
4N951	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N952	0	1,00E-05	0,00E+00		
4N961	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

4N962	0	1,00E-06	0,00E+00		
4N971	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N972	0	1,00E-07	0,00E+00		
4N001	300	1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N011	65	1,00E-01	6,50E+02	4,75E+02	9,50E+03
4N012	30	1,00E-01	3,00E+02		
4N021	0	1,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N022	0	1,00E-02	0,00E+00		
4N031	0	1,00E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N032	0	1,00E-03	0,00E+00		
4N041	0	1,00E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N042	0	1,00E-04	0,00E+00		
4N051	0	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N052	0	1,00E-05	0,00E+00		
4N061	0	1,00E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N062	0	1,00E-06	0,00E+00		
4N071	0	1,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4N072	0	1,00E-07	0,00E+00		