

Seppo Niemelä, 12.11.2001

Mittausepävarmuuden arviointi mikrobiologisissa viljelymenetelmissä

1. Tilastollisesti riippumattomien epävarmuuskomponenttien yhdistäminen

Olkoon mitattu kahden riippumattoman lähtösuureen A ja B arvot sekä arvioitu niiden mittausepävarmuudet u_A ja u_B (keskihajonnat).

A :sta ja B :stä johdettujen uusien muuttujien $(A+B)$, $(A-B)$, AB ja A/B yhdistetyt epävarmuudet vektorisumman periaatteella laskien ovat:

Summamuuttujan $(A+B)$ standardiepävarmuus

$$u_{(A+B)} = \sqrt{u_A^2 + u_B^2}$$

Erotusmuuttujan $(A-B)$ standardiepävarmuus

$$u_{(A-B)} = \sqrt{u_A^2 + u_B^2}$$

Tulomuuttujan (AB) standardiepävarmuus

$$u_{AB} = AB \sqrt{\left(\frac{u_A}{A}\right)^2 + \left(\frac{u_B}{B}\right)^2}$$

Osamäärämuuttujan (A/B) standardiepävarmuus

$$u_{(A/B)} = \frac{A}{B} \sqrt{\left(\frac{u_A}{A}\right)^2 + \left(\frac{u_B}{B}\right)^2}$$

Muotoa $(u_x/x)^2$ olevat lausekkeet kaavoissa ovat ns. **suhteellisia variansseja**. Niiden neliöjuuret (u_x/x) ovat **suhteellisia standardiepävarmuuksia** (suhteellisia keskihajontoja). Koska ne ovat tulo- ja osamäärämuotoisten lausekkeiden (kts. s. 3) yhdistetyn epävarmuuden laskemisessa keskeisiä, ja mikrobiologiassa tavallisin tapaus, on käytännöllistä merkitä niitä yhdellä kirjainsymbolilla.

Otetaan käyttöön merkintä suhteellinen mittausepävarmuus $(u_x/x) = w_x$. Se ilmaistaan joko prosentteina tai desimaalilukuna ja on mikrobiologiassa kaikkein käytännöllisin mittausepävarmuuden ilmaisutapa.

Kahdesta jälkimmäisestä kaavasta saadaan tämän seurauksena

$$\frac{u_{(AB)}}{AB} = w_{(AB)} = \sqrt{w_A^2 + w_B^2}$$

$$\frac{u_{(A/B)}}{(A/B)} = \sqrt{w_A^2 + w_B^2}$$

2. Laimennuskertoimen epävarmuus

Yhden vaiheen laimennuskertoimen lasketaan kaavasta

$$f = \frac{(a+b)}{a}, \text{ missä}$$

a = siirroksen tilavuus

b = laimennusneste-erän tilavuus

Kaavan osoittajan ja nimittäjän epävarmuudet ovat korreloituneita (sama a).

Korrelaation takia laimennuskertoimen standardiepävarmuus lasketaan kaavasta

$$w_f = \frac{1}{(a+b)} \sqrt{u_b^2 + b^2 w_a^2}$$

u_b = laimennusliuoksen standardiepävarmuus (ml)

w_a = siirroksen suhteellinen standardiepävarmuus

On helpottavaa tietää, että kertoimen $f=10$ tapauksessa on useimmiten aivan riittävää olettaa, että $w_f = w_a$

Esimerkki 1.

Olkoon $a = 1$ ml ja $b = 9$ ml ja mittausten suhteelliset standardiepävarmuudet samassa järjestyksessä 2% ja 1%

Näinollen $w_a = 0,02$ (2%) ja $w_b = 0,01$ (1%)

Laskukaavassa tarvitaan b :n absoluuttista keskihajontaa eli $u_b = 0,01 \times 9 \text{ ml} = 0,09$ ml.
"Täydellisestä" kaavasta saadaan

$$w_f = \frac{1}{1+9} \sqrt{0,09^2 + 9^2 \cdot 0,02^2} = \frac{1}{10} \sqrt{0,0081 + 0,0324} = 0,0201$$

Likimääräisoletus: $w_f = w_a = 0,02$ pitää tässä tapauksessa hyvin paikkansa.

Kokonaislaimennuskertoimen on yksittäisten laimennuskertoimien tulo, joten k kpl laimennusvaiheita sisältävän sarjan kokonaiskerroin

$$F = f_1 \cdot f_2 \cdot \dots \cdot f_k$$

Sen suhteellinen standardiepävarmuus on tulon muotoisesta lausekkeesta johtuen yksittäisten kertoimien suhteellisten standardiepävarmuuksien vektorisumma (neliösumman neliöjuuri).

$$w_F = \sqrt{w_{f_1}^2 + w_{f_2}^2 + \dots + w_{f_k}^2}$$

3. Mikrobiologisten viljelymenetelmien yhdistetty mittausepävarmuus

Koetuloksen yhdistetyn mittausepävarmuuden koostaminen edellyttää koetuloksen laskukaavan kirjoittamista näkyviin. Siitä nähdään, minkä mittausten yhdistelmä koetulos on ja millä tavalla osat suhtautuvat matemaattisesti toisiinsa.

Mikrobiologian klassisten standardimenetelmien koetuloksen laskukaava on kaikille menetelmille yhteinen ja voidaan esittää muodossa

$$y = VF \frac{z}{v}$$

V = standarditilavuus (vesihygieniassa yleensä 100 ml tai 1 ml)

F = laimennuskerroin (laimennuksen monikerta, esim. 10^3)

v = viljellyn koeannoksen tilavuus (ml)

z = koeannoksesta laskettu pesäkelukumäärä

Osamäärä z/v on tulkittavissa päätesuspension mikrobipitoisuuden (kpl/ml) arvioksi.

MPN-menetelmissä taulukoiden tai tietokoneohjelmien tulos on yleensä annettu suoraan standarditilavuutta (esim. 100 ml) kohti, joten kaava on yksinkertaisesti

$$y = F \cdot MPN$$

Molemmissa kaavoissa muuttujat ovat tulon/osamäärän muotoisessa suhteessa toisiinsa, joten koetulosten yhdistetty (koostettu) epävarmuus edellyttää vain tulo- ja osamäärämuuttujien epävarmuuden kaavoja (kts. s. 1).

Poikkeuksen muodostaa laimennuskertoimen epävarmuus, koska jokainen laimennusvaihe merkitsee kahden nestetilavuuden (siirros ja laimennusliuos) yhdistämistä. Laimennuskertoimen laskukaava sisältää myös yhteenlaskua (vrt. s. 2)

Korjauskertoimet

Toisin kuin fysiikassa ja kemiassa, mikrobiologisissa mittauksissa ei ole totuttu korjaustermien ja -kertoimien käyttöön. Tosin laimennuskerroin on tulkittavissa tyypilliseksi korjauskertoimeksi, jonka avulla perusmittauksen (pesäkkeiden laskennan) tulos korjataan vastaamaan näytteen pitoisuustasoa.

Aivan vastaavasti voitaisiin ajatella erilaisia kasvualustan ”viljavuudesta”, näytteen säilytyksen aikaisista menetyksistä, tilavuusmittausten systemaattisista virheistä, viljelymenetelmän aiheuttamasta stressistä, väärin positiivisten tulosten osuudesta tai henkilökohtaisesta työtavasta johtuvia korjauksia. Kaikki mikrobiologisten menetelmien korjaukset olisivat luonteeltaan tulon tekijöitä, joilla koetulokset pitäisi kertoa. Jokaisella kertoimella olisi oma mittausepävarmuutensa, joka toisi tällöin lisänsä koetuloksen yhdistettyyn mittausepävarmuuteen.

Oletetaan ”täydellisesti korjattu” koetulos, jonka laskemisessa tarvitaan n kpl erilaisia korjauskertoimia.

$$y = k_1 \cdot k_2 \cdot \dots \cdot k_n \cdot V \cdot F \frac{z}{v}$$

Tulon muotoisesta lausekkeesta johtuen koetuloksen yhdistetty suhteellinen epävarmuus w_c arvioitaisiin kaavalla

$$w_c = \sqrt{w_{k_1}^2 + w_{k_2}^2 + \dots + w_{k_n}^2 + w_F^2 + w_z^2 + w_v^2}$$

Kaavassa ei esiinny standarditilavuuden (V) epävarmuutta, koska standarditilavuus on valittu vakio, eikä sen arvoon liity mitään epävarmuutta. Myöskin on puhtaasti valinnainen asia sisällytetäänkö laboratorionäytteen tai kenttäkohteen epähomogeenisuus epävarmuuskomponenttien joukkoon.

Korjauskertoimien ja muidenkin tekijöiden epävarmuuden arvojen löytämisessä käytetään monia keinoja omakohtaisista kalibroitimittauksista ja kenttähavainnoista tilastolliseen teoriaan, kirjallisuustietoihin ja valistuneeseen arvaukseen saakka. Laskuesimerkit valaisevat asiaa.

Esimerkki 2.

Kalvosuodatusmenetelmää käyttäen on viljelty suoraan vesinäytteestä 10 ml koeannos. Koeannoksen mittaamiseen käytettiin 10 ml mittapipettiä. Inkuboinnin jälkeen laborantti laski kalvolta 42 kohdeorganismien pesäkkeiksi olettamaansa pesäkettä.

Alustava (varmistamaton) koetulos pyydetään ilmoittamaan 100 ml kohti ja varustamaan epävarmuusarviolla.

Epävarmuuden laskemisessa vähimmäisvaatimus on ottaa huomioon koeannoksen tilavuusmittauksen epävarmuus ja havaittuun pesäkemäärään liittyvä epävarmuus.

Oletetaan, että kyseisessä laboratoriossa on tehty kerran perusteellinen 10 ml:n mittapipettien tarkistus punnitsemalla. Tilavuuden keskiarvoksi saatiin 9,7 ml ja suhteellisen keskihajonnan (suhteellisen standardiepävarmuuden) arvoksi 0,5%.

Koska laimennusta ei tarvittu, koetuloksen laskukaava on $y = Vz/v$

$$V = 100 \text{ ml}$$

$$z = 42$$

$$v = 9,7 \text{ ml}$$

Koetulos $y = 100 \times 42 / 9,7 = 433 / 100$ ml (pyöristetään vasta lopputulosta ilmoitettaessa).

Maljan ilmoitettu pesäkelukumäärä 42 saattaa olla epävarma siitä syystä, että se perustuu silmämäärin tehtyyn laskentaan, johon liittyy myöskin tulkintaa. Jos oletetaan, että laboratoriollla ei ole mitään käsitystä kysymyksessä olevan laborantin tulosten lukemispävarmuudesta, voidaan joko olettaa luku 42 absoluuttisen varmaksi tai käyttää muuta kautta (esim. kirjallisuus) saatua tietoa laskemiseen liittyvästä epävarmuudesta. Se on selvissä tapauksissa (esim. puhdasviljelmäpesäkkeet) yleensä 1-2%. Merkitään tässä esimerkin vuoksi tuloksen suhteellista lukemaepävarmuutta w_T :llä ja oletetaan sen arvoksi 2% (0,02).

Koetulokseksi ei yleensä riitä koeannoksen pesäkelukumäärä, vaan vesinäytteen mikrobipitoisuus. Niin tässäkin tapauksessa. Vaikka koetulos ei siitä muutu, niin silloin mukaan tulee uusi merkittävä epävarmuuskomponentti: hiukkastilastollinen hajonta. Koeannokseen sattuva todellinen mikrobimäärä näet vaihtelee satunnaisesti, niin että se olisi sattumalta voinut olla paljonkin 42:sta poikkeava jossakin toisessa pipetillisessä. Tästä vaihtelusta johtuvaa epävarmuutta voidaan arvioida tilastollisen teorian ja kokemuksen perusteella. Täysin onnistuneesti sekoitetuissa näytteissä vaihtelu noudattaa Poisson-jakaumaa siten, että pesäkelukumäärän (z) suhteellinen varianssi on $1/z$. Todellisuudessa z :n paikalla pitäisi käyttää jakauman oikeaa keskiarvoa. Se ei kuitenkaan ole tiedossa. Ainoa sitä koskeva tieto on kokeessa havaittu pesäkemäärä 42.

Tässä kokeessa suhteelliset epävarmuuskomponentit olivat siis:

Koeannoksen tilavuuden suht. epävarmuus $w_v = 0,005$

Tuloksen suht. lukemaepävarmuus $w_T = 0,02$

Suhteellinen hiukkastilastollinen hajonta $w_z = \sqrt{\frac{1}{42}} = 0,154$

Yhdistetty suhteellinen epävarmuus on

$$w_c = \sqrt{w_z^2 + w_T^2 + w_v^2} = \sqrt{\frac{1}{42} + 0,02^2 + 0,005^2} = \sqrt{0,0238 + 0,0004 + 0,0000} = 0,156$$

Yhdistetty epävarmuus on siis 0,156 eli 15,6%. Se määräytyy melkein yksinomaan hiukkastilastollisesta hajonnasta, joka jo yksin on suuruudeltaan 0,154. Muilla epävarmuuskomponenteilla ei tässä tapauksessa ollut merkittävää vaikutusta.

Koetulos ja sen epävarmuus voitaisiin ilmaista esimerkiksi seuraavasti

Näytteen alustava mikrobipitoisuus oli 430/100 ml ja koetuloksen suhteellinen mittausepävarmuus 15,6%.