

SUOMEN YMPÄRISTÖKESKUKSEN RAPORTTEJA
28 | 2007

Laboratorioiden välinen vertailu 1/2007

**Akuutin toksisuuden testaus kineettisellä
valobakteeritestillä värillisistä ja sameista näytteistä**

**Marja Ruoppa, Irma Mäkinen, Juha Lappalainen ja
Leila Jälkö**

Laboratorioiden välinen vertailu 1/2007

**Akuutin toksisuuden testaus kineettisellä
valobakteeritestillä värillisistä ja sameista näytteistä**

**Marja Ruoppa, Irma Mäkinen, Juha Lappalainen¹ ja
Leila Jälkö²**

¹Aboatox Oy

²Länsi-Suomen ympäristökeskus



SUOMEN YMPÄRISTÖKESKUKSEN RAPORTTEJA 28 | 2007
Suomen ympäristökeskus

Pätevyyskokeen järjestää:
Suomen ympäristökeskus (SYKE), tutkimusosasto ja laboratorio
PL 140, 00251 Helsinki
puh. 020 490 123,
faksi (09) 4030 2890 (laboratorio), (09) 490 2490 (tutkimusosasto)

Julkaisu on saatavana myös internetistä:
www.ymparisto.fi/julkaisut

Edita Prima Oy, Helsinki 2007

ISBN 952-11-2856-1 (nid.)
ISBN 952-11-2857-8 (PDF)
ISSN 1796-1718 (pain.)
ISSN 1796-1726 (verkkokj.)

SISÄLLYS

| | | |
|----------|--|----|
| 1 | JOHDANTO | 4 |
| 2 | TOTEUTUS | 4 |
| 2.1 | Vertailun vastuuhenkilöt | 4 |
| 2.2 | Osanottajat | 4 |
| 2.3 | Näytteet | 5 |
| 2.3.1 | Näytteiden valmistus ja toimitus | 5 |
| 2.3.2 | Näytteiden testaaminen | 5 |
| 2.3.2.1 | Näytteiden homogeenisuus | 5 |
| 2.3.2.2 | Näytteiden säilyvyys | 5 |
| 2.4 | Laboratorioilta saatu palaute | 5 |
| 2.5 | Analyysimenetelmät | 6 |
| 2.6 | Tulosten käsittely | 6 |
| 2.6.1 | Harha-arvojen poisto | 6 |
| 2.6.2 | Vertailuarvon asettaminen | 6 |
| 2.6.3 | Kokonaishajonnalle asetettu tavoitearvo | 7 |
| 2.6.4 | z-arvo | 7 |
| 3 | TULOKSET JA NIIDEN ARVIOINTI | 7 |
| 3.1 | Tulokset | 7 |
| 3.1.1 | EC20- ja EC50-arvot ja robustin laskennan tulokset | 7 |
| 3.1.2 | Toistettavuus ja uusittavuus | 8 |
| 3.1.3 | Referenssiaineen mittaustulokset | 9 |
| 3.2 | Tulosten arviointi | 9 |
| 4 | YHTEENVETO | 10 |
| 5 | SUMMARY | 11 |
| | KIRJALLISUUS | 12 |
| | LIIKTEET | |
| Liite 1 | Vertailuun 1/2007 osallistuneet laboratoriot | 13 |
| Liite 2. | Analyysimenetelmät | 14 |
| Liite 3. | Näytteiden testaus | 15 |
| Liite 4. | Kooste tuloksista | 17 |
| Liite 5. | Laboratoriokohtaiset tulokset | 18 |
| Liite 6. | Laboratorioiden tulokset graafisesti esitettynä | 19 |
| Liite 7. | Tuloksissa esiintyviä käsitteitä | 21 |
| Liite 8. | Laboratorioilta saatu palaute | 24 |
| | KUVAILULEHTI | 26 |
| | DOCUMENTATION PAGE | 27 |
| | PRESENTATIONSBLAD | 28 |

1 Johdanto

Suomen ympäristökeskuksen laboratorio järjesti vertailun kineettistä valobakteeritestiä käyttäville laboratorioille huhtikuussa 2007. Akuuttia myrkyllisyyttä *Vibrio fischeri*-bakteerille määritettiin kahdesta vesinäytteestä ja kahdesta sedimentinäytteestä.

Vertailun tarkoituksena oli arvioida standardiluonnoksen ISO/CD 21338, Water quality – Kinetic determination of the inhibitory effects of sediment and other solids and colour containing samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Kinetic luminescent bacteria test) soveltuvuutta vesi- ja sedimentinäytteiden myrkyllisyyden testaukseen [1].

Voimassa oleva standardi SFS EN ISO 11348:1998, Osat 1, 2 ja 3; Water Quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) soveltuu lähinnä vesinäytteille (jätevedet ja luonnonvedet). Näytteen värillisuus, sameus ja siinä mahdollisesti olevat kiinteät hiukkaset häiritsevät mittausta ja vaikuttavat siten testituloksiin (5). Vertailun kohteena ollut kineettinen valobakteeritesti on kehitetty, jotta edellä mainittujen näytetyyppien testaaminen valobakteeritestillä voitaisiin suorittaa luotettavasti.

Vertailun järjestämisessä on noudatettu ISO/IEC Guide 43-1 mukaisia suosituksia [2], ILACin pätevyyskokeiden järjestäjille antamia ohjeita [3] sekä pätevyyskokeen tulosten tilastolliseen käsittelyyn annettuja ohjeita [4].

2 Toteutus

2.1 Vertailun vastuuhenkilöt

Vertailun järjestämisen vastuuhenkilöt olivat:

Irma Mäkinen, koordinaattori
Suomen ympäristökeskus, laboratorio
Sähköposti: irma.makinen@ymparisto.fi

Marja Ruoppa, Biologisten vesitutkimusmenetelmien standardisointityöryhmän puheenjohtaja
Suomen ympäristökeskus, tutkimusosasto
Sähköposti: marja.ruoppa@ymparisto.fi

Analytiikan asiantuntijana toimi: Juha Lappalainen, Aboatox Oy
Sähköposti: juha.lappalainen@aboatox.com

Raportin valmisteluun osallistuivat myös Anu Kapanen (VTT) ja Liisa Maunuksela (Evira).

2.2 Osanottajat

Vertailuun osallistui yhteensä kahdeksan laboratoriota. Kaksi laboratoriota ilmoitti tulokset kahdella eri laitteella mitattuna, joten tuloksia oli yhteensä 10.

Vertailuun osallistuneet laboratoriot on esitetty liitteessä 1.

2.3 Näytteet

2.3.1 Näytteiden valmistus ja toimitus

Näytteet valmistettiin ja testattiin Länsi-Suomen ympäristökeskuksen Kokkolan laboratoriossa.

Osallistuneet laboratoriot määrittivät seuraavat neljä näytettä:

V1 - Synteettinen vesinäyte, joka oli valmistettu lisäämällä 3,5-dikloorifenolia ionivapaaseen veteen pitoisuudessa 20 mg/l.

V2 - Vesinäyte, värillistä Lestijoen vettä, josta humus oli suodatettu pois.

S1 - Sedimenttinäyte, jokisedimenttiä entisen sahan jätevesien purkualueelta.

S2 - Sedimenttinäyte, Lestijoen sedimenttiä.

Lisäksi toimitettiin vesinäyte (V3), joka oli värillistä puunjalostusteollisuuden jätevettä. Siihen oli lisätty myrkyvaikutuksen varmistamiseksi 3,5-dikloorifenolia. Näytteiden lähettämisen jälkeen ilmeni, ettei lisätty kemikaali ollut liuennut tasaisesti tai se oli reagoinut jäteveden kanssa. Laboratorioita pyydettiin luopumaan ko. näytteen määrittämisestä.

Näytteet lähetettiin laboratorioille tiistaina 17.4.2007 pikalähetyksenä.

Vesinäytteet pyydettiin määrittämään viimeistään perjantaina 20.4.2007 ja sedimenttinäytteet tiistaina 24.4.2007.

Laboratoriota pyydettiin palauttamaan tulokset 15.5.2007 mennessä. Alustavat tuloslistat toimitettiin laboratorioille viikolla 24.

2.3.2 Näytteiden testaaminen

2.3.2.1 Näytteiden homogeenisuus

Näytteiden homogeenisuus testattiin kymmenestä näytepullosta (liite 3). Näytteet olivat homogeenisia tuloksille asetettu tavoitehajonta huomioituna.

2.3.2.2 Näytteiden säilyvyys

Näytteet todettiin säilyviksi, kun niiden säilyvyyttä seurattiin kuljetuksen ajan huoneenlämpötilassa ja kylmässä säilytettynä (liite 3).

2.4 Laboratorioilta saatu palaute

Tulosten kokoamisen yhteydessä laboratorioilta pyydettiin tarkennuksia tuloksiin, joita useimmat laboratoriot toimittivat. Laboratoriot 4 ja 8 toimittivat tarkistuksia tulostensa ilmoittamistapaan näytteelle S1, jonka tulosten ilmoittamisessa oli esiintynyt väärinkäsityksiä. Tarkistukset on huomioitu tulosten laskennassa. Laboratorio 2/5 toimitti uudelleen lasketut tulokset vasta 14.9.2007. Ne eivät ole mukana tilastollisessa käsittelyssä. Yhteenveto laboratorioiden palautteista on koottu liitteeseen 8.

2.5 Analyysimenetelmät

Vertailun kohteena ollut kineettinen valobakteeritestimenetelmä ISO/CD 21338 on kehitetty poistamaan vesinäytteen sameuden ja värillisyyden aiheuttamat ongelmat mittauksessa. Näytteitä ei tarvitse sentrifugoida, suodattaa eikä laskeuttaa. Tulosten laskemisessa ei myöskään tarvitse käyttää erillisiä korjauskertoimia värillisille näytteille. Menetelmää voidaan käyttää sellaisenaan myös useimmille sedimenttinäytteille.

Menetelmällä tutkitaan näytteiden vaikutusta bakteerien valontuottoon. Haitallisesti vaikuttavat näytteet ja niiden laimennokset inhiboivat bakteerien valontuottoa, joka voidaan havaita ja mitata valon tuoton vähenemisenä.

Menetelmässä valon intensiteettiä mitataan kineettisesti luminometrillä. Markkinoilla on useita tähän tarkoitukseen soveltuvia laitteita. Laitteissa mittaukset tehdään joko luminometriputkissa tai kuoppalevyllä (24-96 kuoppalevyt). Kaikissa laitteissa ei ole jäädytettävää mittauskammeria vaadittavan mittauslämpötilan (15 °C) saavuttamiseksi. Näytteet tulee ennen testausta säilyttää ko. lämpötilassa.

Näytelaimennoksien aiheuttamasta valontuoton inhibitiosta (%) voidaan laskea standardiehdotuksessa ISO/CD 21338 esitettyjen kaavojen mukaisesti esim. näytteen EC50-arvo (*effective concentration*). Se on näytepitoisuus, joka aiheuttaa bakteerien valontuoton vähenemisen puoleen. Standardiehdotuksen mukaan EC50-arvojen laskemisessa ei tulisi yleensä käyttää tuloksia, jotka antavat alle 10% tai yli 90 % inhibition.

Sedimenttinäytteistä pyydettiin valmistamaan liuos sekoittamalla 0,5 g kuivattua sedimenttinäytettä 10 ml:aan 2% NaCl-liuosta. Vertailuun osallistujia pyydettiin määrittämään näytteiden akuutti myrkyllisyys *Vibrio fischeri*-bakteerille laboratorion normaalisti käyttämällä laitteella ja bakteerikannalla (liite 2).

2.6 Tulosten käsittely

2.6.1 Harha-arvojen poisto

Aineiston normaalisuus tarkistettiin Kolmogorov-Smirnov-testillä. Ennen keskiarvon laskemista tulosaineistosta poistettiin mediaanista merkitsevästi poikkeavat tulokset Hampel-testillä sekä laboratorion 2/5 tulokset. Kyseinen laboratorio toimitti tulokset kahdella eri laitteella mitattuna (liite 2). Kummassakaan tapauksessa näytteitä ei sekoitettu jälkimmäisessä mittauspisteessä. Lisäksi selvisi, että laboratorion inhibitioprosenttien laskennassa käyttämä kaava oli ollut virheellinen. Näillä oli huomattava vaikutus lopputulokseen.

Tulosten käsittely tehtiin myös robustilla laskennalla, jossa aineistosta suuresti poikkeavien tulosten (harha-arvojen) vaikutusta laskettavaan robusti keskiarvoon pienennetään muuntamalla ääriarvoja (liite 7). Myös robustissa laskennassa laboratorion 2/5 tulokset poistettiin. Kyseisen laboratorion tulokset eivät ole näin ollen mukana myöskään robustin keskiarvon ja robustin hajonnan laskemisessa.

2.6.2 Vertailuarvon asettaminen

Näytteille V1 ja S1 vertailuarvoksi (*the assigned value*) asetettiin robusti keskiarvo (liite 7). Vertailuarvoa ei asetettu näytteille V2 ja S2, koska näytteissä ei ollut mitattavissa inhibitiota.

2.6.3 Kokonaishajonnalle asetettu tavoitearvo

Synteettisen vesinäytteen V1 kokonaishajonnalle asetettiin tavoitearvoksi 30% ja vastaavasti sedimenttinäytteen S1 tavoitearvoksi 50% (95% merkitsevyystaso). Tavoitearvoja ei asetettu vesinäytteelle V2 eikä sedimenttinäytteelle S2, koska näytteissä ei ollut mitattavaa inhibitiota.

2.6.4 z -arvo

Näytteiden S1 ja V1 tulosten arvioimiseksi laskettiin z-arvo (*z score*), jonka laskeminen on esitetty liitteessä 7. z-arvojen perusteella tuloksia voidaan pitää tyydyttävänä, kun $|z| \leq 2$.

Määrittys- ja näytekohtaisesti z-arvot on esitetty numeerisina lukuarvoina laboratorikohtaisissa tulostaulukoissa (liite 5).

3 Tulokset ja niiden arviointi

3.1 Tulokset

3.1.1 EC20- ja EC50-arvot ja robustin laskennan tulokset

Tulosten yhteenveto on esitetty taulukoissa 1, 2 ja 3.

Taulukko 1. Yhteenveto laboratorioden toimittamista tuloksista (EC20- ja EC50-arvot).

Table 1. Summary on the received results

| Lab | Näyte V1/Sample V1 | | Näyte V2/Sample V2 | | Näyte S1/Sample S1 | | Näyte S2/Sample S2 | |
|-----|--------------------|--------|--------------------|--------|--------------------|-----------|-----------------------|-----------|
| | EC20 % | EC50 % | EC20 % | EC50 % | EC20 mg/l | EC50 mg/l | EC50 mg/l | EC50 mg/l |
| 1 | 9,7 | 14,1 | >50 ¹⁾ | >50 | 540 | 1 516 | >25 000 ¹⁾ | >25 000 |
| 2 | 11,8 | 17,3 | >50 | >50 | 2 268 | 5 895 | >25 000 | >25 000 |
| 3 | 9,1 | 12,2 | >50 | >50 | 1 660 | 3 298 | >25 000 | >25 000 |
| 4 | 16,0 | 20,8 | >50 | >50 | 813 | 2 123 | >25 000 | >25 000 |
| 5 | 17,1 | 22,6 | >50 | >50 | 2 593 | 7 961 | >25 000 | >25 000 |
| 6 | 6,1 | 12,6 | >50 | >50 | 833 | 2 237 | >25 000 | >25 000 |
| 7 | 11,5 | 15,6 | >50 | >50 | 548 | 1 490 | >25 000 | >25 000 |
| 8 | 8,1 | 11,4 | >50 | >50 | 833 | 1 166 | >12 572 | >25 000 |
| 9 | 11,5 | 13,9 | >50 | >50 | 449 | 914 | >25 000 | >25 000 |
| 10 | 9,9 | 13,9 | >50 | >50 | 613 | 2 216 | >25 000 | >25 000 |

¹⁾suurin pitoisuus mittaauksessa/ highest tested concentration

- Arvot ovat kunkin laboratorion kahden määrittystuloksen keskiarvoja
- Taulukoon on kirjattu laboratorion 2/5 korjatut tulokset (14.9.2007), mutta ne eivät ole mukana tulosten tilastokäsittelyssä.

Synteettisen vesinäytteen V1 EC20-vertailuarvo (%) oli 9,9 % ja tulosten robusti keskihajonta oli 26 %. Saman näytteen EC50-vertailuarvo (%) oli 13,4 % ja robusti keskihajonta oli 16 % (taulukko 2.). EC20-arvojen hajonta on suurempi kuin EC50-arvojen hajonta, mikä osoittaa, että oltiin lähestymässä vaikutus-

aluetta.

Sedimenttinäytteen S1 EC20-vertailuarvo oli 707 mg/l ja tulosten robusti keskihajonta oli 32 %. Saman näytteen EC50-vertailuarvo oli 1798 mg/l ja robusti keskihajonta oli 39 % (taulukko 2.).

Näytteet V2 ja S2 eivät aiheuttaneet inhibitiota, joten niille ei ole laskettu EC-arvoja eivätkä ne olleet mukana tulosten tilastollisessa käsittelyssä.

Taulukko 2. Yhteenveto vertailun 1/2007 tuloksista (robusti laskenta)
Table 2. Summary on the proficiency test 1/2007 (robust values)

| Analyte | Sample | Unit | Ass.val | Mean | Mean rob | Md | SD rob | SD rob % | Num.of labs | 2*Targ SD% |
|---------|--------|------|---------|-------|----------|-------|--------|----------|-------------|------------|
| EC20 | V1 | % | 9,9 | 10,4 | 9,9 | 11,1 | 2,6 | 26,2 | 10 | 30 |
| EC50 | V1 | % | 13,4 | 13,9 | 13,4 | 14,2 | 2,1 | 15,6 | 10 | 30 |
| EC20 | S1 | mg/l | 707 | 786 | 707 | 821 | 225 | 31,9 | 10 | 50 |
| EC50 | S1 | mg/l | 1 798 | 1 867 | 1 798 | 2 203 | 704 | 39,2 | 10 | 50 |

| | |
|----------------------|---|
| Ass. val. | vertailuarvo (<i>the assigned value</i>) |
| Mean | keskiarvo (<i>the mean value</i>) |
| Mean rob | robusti-keskiarvo (<i>the robust mean value</i>) |
| Md: | mediaani (<i>the median value</i>) |
| SD _{rob} : | robusti-keskihajonta (<i>the standard deviation</i>) |
| SD _{rob} %: | robusti-keskihajonta prosentteina (<i>the standard deviation as percents</i>) |
| 2*Targ. SD% | kokonaiskeskihajonnan tavoitearvo (95 % merkitsevyystaso) (<i>the target total standard deviation</i>) (95 % confidence level) |
| Num of Labs | ko. määrittäjänsä tehneiden laboratoriorien lukumäärä (<i>number of participants</i>) |
| Accepted z-val% | tydyttävät tulokset: niiden tulosten osuus (%), joissa $ z \leq 2$ (<i>Satisfied z values: the results</i> (%), where $ z \leq 2$.) |

3.1.2. Toistettavuus ja uusittavuus

Laboratoriorien sisäisen toistettavuuden (*sw%*, *repeatability*) ja uusittavuuden (*sb%*, *reproducibility*) laskemiseksi osallistajat ilmoittivat kahden rinnakkaismäärittäjänsä tulokset (taulukko 3.).

Vesinäytteen V1 sisäinen toistettavuus (*sw%*) EC20-arvolle oli 6,6 % ja EC50-arvolle 4,6%. Sedimenttinäytteen S1 sisäinen toistettavuus (*sw%*) oli EC20-arvolle 20% ja EC50-arvolle 12%

Vesinäytteelle V1 testin uusittavuus (*sb%*) EC20-arvolle oli 29% ja EC50-arvolle 22%. Sedimenttinäytteen S1 testin uusittavuus EC20-arvolle oli 53% ja EC50-arvolle 42%.

Taulukko 3. Rinnakkaismääritysten tulosten hajontoja (ANOVA-tulostus)
 Table 3. Results of the duplicate determinations (ANOVA-statistics)

| Analyte | Sample | Unit | Ass.val. | Mean | Md | sw | sb | st | sw% | sb% | st% | Num of labs |
|---------|--------|------|----------|-------|-------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-------------|
| EC20 | V1 | % | 9,9 | 10,4 | 9,9 | 0,68 | 2,9 | 3,0 | 6,6 | 28 | 29 | 9 |
| EC50 | V1 | % | 13,4 | 14,3 | 13,6 | 0,66 | 3,0 | 3,1 | 4,6 | 21 | 22 | 9 |
| EC20 | S1 | mg/l | 707 | 795 | 654 | 161 | 390 | 422 | 20 | 49 | 53 | 8 |
| EC50 | S1 | mg/l | 1 798 | 1 893 | 1 713 | 234 | 762 | 797 | 12 | 40 | 42 | 8 |

Ass.val vertailuarvo (*the assigned value*)

Md mediaani (*median*)

sw toistettavuus (*repeatability standard deviation*)

sb laboratorioden välinen hajonta (*standard deviation between laboratories*)

st uusittavuus (*reproducibility standard deviation*)

3.1.3 Referenssiaineen mittaustulokset

Osallistuneet laboratoriot käyttivät sisäisenä laadunvalvontanäytteenä 3,5-dikloorifenolia tunnettuna pitoisuutena tai tekemällä laimennussarjan ja määrittämällä 3,5-dikloorifenolin EC50-arvon. Osa laboratorioista ilmoitti 3,5-dikloorifenolin EC50-arvon ja osa laboratorioista tietyn 3,5-dikloorifenolipitoisuuden tuloksen. Koska laboratoriot ovat hyväksyneet sisäisen laadunvalvontanäytteensä tulokset, testin tuloksia voidaan pitää luotettavina. Tulokset ilmoittaneet laboratoriot olivat saaneet 3,5-dikloorifenolin EC50-pitoisuudella 3,4 mg/l hyväksyttäviä tuloksia eli inhibitiot olivat välillä 20% – 80 %. Koska tulokset värittömällä referenssiaineella olivat luotettavia, voidaan katsoa, että käytetty mittausten menetelmä ja tulosten laskentapata antavat luotettavan arvion näytteen myrkyllisyydestä.

3.2 Tulosten arviointi

Inhibitioprosenttien perusteella lasketut EC20- ja EC50-arvot osoittivat vesinäytteen V1 ja sedimenttinäytteen S1 myrkyllisiksi. Sen sijaan vesinäyte V2 ja sedimenttinäyte S2 eivät aiheuttaneet inhibitiota, eivätkä siten olleet myrkyllisiä. Tulos osoittaa, että kaikki laboratoriot kykenivät erottelemaan myrkylliset ja myrkyttömät näytteet.

Synteettisen vesinäytteen V1 3,5-DCP-pitoisuus oli 20 mg/l, joten keskiarvotulos EC50 = 13,4 % vastaa pitoisuutta 2,7 mg/l. Laboratorioden välisessä pätevyyskokeessa 7/2002 (valobakteeritesti, ISO 11348-3:1998) vastaavaksi tulokseksi saatiin pitoisuus 2,5 mg/l [6]. Kineettisen mittauksen (ISO/CD 21338) ja referenssimittauksen (ISO 11348-3:1998) tulokset ovat siis yhtäpitäviä synteettisellä, värittömällä näytteellä.

Tulosten käsittely tehtiin robustilla laskennalla. Laboratorioden pätevyyttä arvioitiin z-arvon (*z-score*) avulla (liite 6). Tulosten z-arvojen perusteella tuloksia voidaan pitää tyydyttävinä, koska $z \leq 2$. Vesinäytteen V2 ja sedimenttinäytteen S2 osalta ei tehty arviota pätevyydestä, koska näytteet eivät aiheuttaneet inhibitiota, eivätkä siten olleet myrkyllisiä. Tuloksista 84 % tyydyttäviä, kun robustista keskiarvosta sallittiin 30 prosentin poikkeama vesinäytteelle V1 ja 50 prosentin poikkeama sedimenttinäytteelle S1.

Menetelmän toistettavuus oli molemmille näytteille (V1 ja S1) enintään 21 % ja uusittavuus enintään 53 %. Vertailussa saatuja tuloksia voidaan pitää tyydyttävinä, testin luonteen huomioiden.

Yksi laboratorio (laboratoriot 2 ja 5, mittaus kahdella laiteella) ei sekoittanut näytettä jälkimmäisessä mittauspisteessä. Sama laboratorio oli lisäksi käyttänyt inhibitioprosenttien laskennassa virheellistä kaavaa. Laboratorion 2/5 tulokset poistettiin lopullisesta tilastollisesta käsittelystä niiden suuren poikkeamisen vuoksi. Kyseinen laboratorio toimitti 14.9.2007 uudelleen lasketut tulokset, jotka on esitetty palautelomakkeessa (liite 8.).

Vertailuun osallistuneet laboratoriot käyttivät mittauksissa erilaisia laitteita ja mittausohjelmia. Kaikilla luminometreilla ei ole mahdollista tehdä täydellisesti standardiluonnoksen mukaista mittausta. Eroja esiintyy lähinnä näytteiden mittaus- ja inkubointilämpötiloissa (15 °C – 24 °C), bakteerien injektointitilavuudessa (150 µl – 500 µl), näytilavuudessa (150 µl – 500 µl) sekä näytteiden sekoituksessa mittauksen aikana (jatkuva sekoitus – sekoitus vain juuri ennen mittausta). Pitkissä analyysisarjoissa oli havaittavissa kontrollinäytteen tuloksen liukumaa. Laboratoriot ovat tietoisia tästä ja siksi tulokset ilmoitetaan useamman kontrollinäytteen tulosten keskiarvoilla laskettuna.

SYKEN vuonna 2002 järjestämässä valobakteeritestivertailussa (ISO 11348-3:1998) todettiin, että saman laboratorion kolmella eri testikitillä määrittämien näytteiden tulokset poikkesivat toisistaan [6]. Tässä vertailussa mahdollisia eroja bakteerikannoissa ei pidetä merkittävänä, koska laboratoriot käyttivät referenssikemikaalia ja pitivät ilmoittamia sisäisen kontrollin tuloksia luotettavina.

4 YHTEENVETO

Suomen ympäristökeskuksen laboratorio järjesti vertailun kineettistä valobakteeritestiä käyttäville laboratorioille huhtikuussa 2007. Akuuttia myrkyllisyyttä *Vibrio fischeri*-bakteerille määritettiin kahdesta vesi- ja kahdesta sedimenttinäytteestä. Vertailun tarkoituksena oli arvioida standardiluonnoksen (ISO/CD 21338) mukaisen testin soveltuvuutta värillisille ja sameille näytteille.

Vertailuun osallistui yhteensä kahdeksan laboratoriota, joista kaksi toimitti tulokset mitattuina kahdella eri laiteella. Näistä toisen laboratorion (2/5) tuloksia ei otettu mukaan tilastolliseen käsittelyyn, johtuen virheistä mittauksessa ja inhibitioprosentin laskemisessa.

Vertailuun osallistuneet laboratoriot määrittivät neljä näytettä. Yhteenveto näistä on esitetty taulukossa 1. ja yksityiskohtaiset tulokset liitteissä 4-6. Näytteistä toinen liuosnäyte (V1) ja toinen sedimenttinäyte (S1) todettiin EC20- ja EC50-arvojen perusteella myrkyllisiksi kaikkien laboratorioden mittauksissa. Värillisen jokivesinäytteen (V2) ja toisen sedimenttinäytteen (S2) kaikki laboratoriot tulkitsivat myrkyttömäksi. Jokainen osallistuja onnistui erottamaan myrkylliset näytteet myrkyttömistä.

Myrkyllisille näytteille laskettujen tulosten perusteella hajontaa voidaan pitää tyydyttävänä. Tuloksista oli 84 % tyydyttäviä, kun robustista keskiarvosta sallittiin 30 prosentin poikkeama vesinäytteelle V1 ja 50 prosentin poikkeama sedimenttinäytteelle S1. Tällöin laboratorion 2/5 tuloksia ei ole huomioitu. Toistettavuus oli molemmille inhibitiota aiheuttaneille näytteille (vesinäyte V1 ja sedimenttinäyte S1) enintään 21 % ja uusittavuus enintään 53 %.

Vaikka laboratoriot käyttivät mittaukseen erilaisia laitteita, testilämpötiloja ja sekoitustapoja, pystyttiin myrkyttömät ja myrkylliset näytteet erottamaan luotettavasti. Vertailussa saatuja tuloksia voidaan pitää tyydyttävänä testin luonteen sekä laboratorioden käyttämien laitteiden, lämpötilojen ja bakteerikantojen erot huomioiden.

Voimassa oleva standardi (ISO 11348-3:1998) soveltuu lähinnä vesinäytteille. Näytteen väri, sameus ja siinä mahdollisesti olevat kiinteät partikkelit häiritsevät mittausta (kts. Chapter 4. Interferences). Kineettinen

valobakteerimenetelmä mahdollistaa luotettavan tavan värillisten sekä erityisesti sameiden (sedimentti, liete, maa ja komposti) näytteiden myrkyllisyyden määrittämisen. Näytteitä ei ole tarpeen sentrifugoida, suodattaa eikä laskeuttaa ennen testausta. Samoin vältetään korjauskertoimien käytöltä värillisten näytteiden yhteydessä.

5 SUMMARY

Finnish Environment Institute (SYKE) carried out an interlaboratory comparison for the standard draft (ISO/CD 21338); Water quality - Kinetic determination of the inhibitory effects of sediment and other solids and colour containing samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Kinetic luminescent bacteria test) in April 2007. The aim was to evaluate the applicability of the method for testing toxicity of coloured and turbid samples.

Altogether eight laboratories participated in the comparison. Two participants reported results from measurements using two different instruments. The results of laboratory 2/5 were rejected because of errors in the measurements and calculations.

Participants tested four samples (two water samples V1 and V2 as well as two sediment samples S1 and S2). Samples V1 and S1 proved to be toxic and samples V2 and S2 were non-toxic by all participants. The summary of the results is presented in table 1. The more detailed results of comparison are presented in appendices 4-6.

In this comparison 84 % of the results were acceptable, when the deviation of 30 % for the water sample V1 and 50 % deviation for the sediment sample S1 was permitted. The assigned value was used in performance evaluation using z score. Performance evaluation was done only for toxic samples (V1 and S1). The repeatability of results was max. 21 % and the reproducibility was max 53 %.

Although laboratories used different instruments, test kits, temperatures and mixing systems, it was possible to distinguish toxic samples (V1 and S1) from non-toxic ones (V2 and S2). Therefore the results of this comparison study are considered reliable.

The standard luminescent bacteria test (ISO 11348-3:1998) is primarily applicable to aqueous samples (extracts, elutriates and pore water samples). Turbidity, strong colour and any solid particles may interfere with light output and testing of such samples (see Chapter 4: Interferences). The kinetic luminescent bacteria method (ISO/CD 21338) overcomes most of the problems arising from intense colour and turbidity in the samples allowing sample measurement without prior centrifugation or filtration. With this method it is possible to test sediment, sludge, soil and compost samples as well as coloured water samples reliably.

KIRJALLISUUS

1. ISO/CD 21338, Water quality – Kinetic determination of the inhibitory effects of sediment and other solids and colour containing samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Kinetic luminescent bacteria test)
2. Proficiency Testing by Interlaboratory Comparison - Part1: Development and Operation of Proficiency Testing Schemes, 1996, ISO/IEC Guide 43-1.
3. ILAC Guidelines for Requirements for the Competence of Providers of Proficiency Testing Schemes, 2000,. ILAC Committee on Technical Accreditation Issues. ILAC-G13:2000.
4. ISO13528, 2005. Statistical Methods for Use in Proficiency Testing by Interlaboratory Comparisons.
5. SFS EN ISO 11348-3:1998; Water Quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) – Part 3. Method using freeze-dried bacteria
6. Mäkinen, I., Huhtala, S., Pessala, P., Aalto, M., 2003. Laboratorioiden välinen pätevyyskoe 7/2002. Suomen ympäristökeskuksen moniste 280, Helsinki.

LIITE 1. VERTAILUUN 1/2007 OSALLISTUNEET LABORATORIOT*Appendix 1. Participants in the interlaboratory comparison 1/2007*

Aboatox Oy, Turku

Elintarviketurvallisuusvirasto Evira / Kemia ja toksikologia, Helsinki

Hidex Oy, Turku

Joensuun yliopisto, Biologian laitos, Joensuu

Laboratory of Molecular Genetics, NICPB, Tallinna

Länsi-Suomen ympäristökeskus, Kokkolan laboratorio, Kokkola

Pirkanmaan ympäristökeskus, Tampere

VTT / Elintarvike ja biotekniikka, Espoo

Kaksi osallistujaa toimitti tulokset kahdella eri laitteella mitattuna, joten osallistujille annettiin tulosten käsittelyä varten kahdet eri tunnuksset (osallistujien lukumäärä = 8, tulosten lukumäärä = 10).

LIITE 2. ANALYYSIMENETELMÄT*Appendix 2. Analytical methods*

| Lab | Mittauslaite | Bakteerikanta ja lot-numero | Huomautuksia |
|------------------|--|---|---|
| 1 ¹⁾ | LKB- Wallac 1251 Luminometer Tube Luminometer, Carousel | Biotox Kit (Aboatox) <i>Vibrio fischeri</i> 5105 B | |
| 2 ²⁾ | Triathler Tube Luminometer | Biotox Kit (Aboatox) <i>Vibrio fischeri</i> 1505 | Näytteitä ei sekoitettu ennen loppumittausta |
| 3 | Sirius-Berthold Detection Systems | Biotox Kit (Aboatox) <i>Vibrio fischeri</i> 5105 B | |
| 4 | Luminoscan 1251 Carousel, Putkiluminometri, automaattinen | Biotox Kit (Aboatox) <i>Vibrio fischeri</i> 3106 | |
| 5 ²⁾ | Plate Cameleon V | Biotox Kit (Aboatox) <i>Vibrio fischeri</i> 1505 | Näytteitä ei sekoitettu ennen loppumittausta |
| 6 | Luminometer Sirius 142 | Biotox Kit (Aboatox) <i>Vibrio fischeri</i> 3106 | |
| 7 | 1251 Luminometer (Bio-Orbit) | Biotox Kit (Aboatox) <i>Vibrio fischeri</i> 3106 | |
| 8 | Sirius 1-Berthold Luminometer | Biotox Kit (Aboatox) <i>Vibrio fischeri</i> 3106 | |
| 9 | 1251 Luminometer (Bio-Orbit) | Biotox Kit (Aboatox) <i>Vibrio fischeri</i> BT1505 | |
| 10 ¹⁾ | Plate Luminometer Labsystems Fluorosan Ascent FL | Biotox Kit (Aboatox) <i>Vibrio fischeri</i> 5105 B | |

1), 2) Osallistajat toimittivat kahdella eri laitteella mitatut tulokset, joille annettiin eri tunnuksset.

LIITE 3. NÄYTTEIDEN TESTAUS

Appendix 3. Testing of the samples

1. Homogeenisuus

Sedimenttinäytteiden S1 ja S2 homogeenisuus testattiin mittauspitoisuuksissa (mg/l) kahdella rinnakkaismäärityksellä kymmenestä näyteastiasta .

Taulukko 1. Näytteiden S1 ja S2 homogeenisuus

| Näyte Sample | Inhib.-% (30 min) | Näytepitoisuus s mg/l | $1 \cdot s_{target}$ % | s_{target} | s_a | Onko $s_a/s_{target} < 0,5?$ | s_{sam} | Onko $s_{sam}^2 < c$ |
|-----------------|----------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------|-------|---------------------------------|-----------|-------------------------|
| S1 | 69,3 | 2500 | 25 | 17,33 | 0,66 | On/Yes | 2,66 | On/Yes |
| S2 | 1,05 | 5000 | 25 | 0,262 | 0,011 | On/Yes | 0,042 | On/Yes |

Näytepullojen välinen vaihtelu s_{sam} oli pienempi kuin asetettu kriteeri

$$c = F1 \cdot s_{all}^2 + F2 \cdot s_a^2,$$

missä $s_{all}^2 = (0,3s_{target})^2$ ja

$F1 = 1,88$ sekä $F2 = 1,01$, kun pullojen lukumäärä oli 10

Kaikissa tapauksissa oli $s_{sam}^2 < c$ asetettu kriteeri c.

Sedimenttinäytteiden analyttinen vaihtelu s_a täytti kaikissa tapauksissa asetetut kriteerit;

$s_a/s_{target} < 0,5$.

Liuosnäytteiden V1 ja V2 homogeenisuus testattiin analysoimalla kolme näytettä rinnakkaismäärityksenä. Pitkissä analyysisarjoissa oli havaittavissa kontrollinäytteen tuloksen liukumaa. Laboratoriot ovat tietoisia tästä ja siksi tulokset ilmoitetaan useamman kontrollinäytteen tulosten keskiarvoilla laskettuna.

Taulukko 2. Näytteiden V1 ja V2 homogeenisuus

| Näyte Sample | Inhib % (30min) | Näytepit. testauksessa | Inhib % (30min) | Näytepit. testauksessa | Inhib % (30min) | Näytepit. testauksessa |
|-----------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | Pullo 1 Bottle 1 | Pullo 1 Bottle 1 | Pullo 9 Bottle 9 | Pullo 9 Bottle 9 | Pullo 17 Bottle 17 | Pullo 17 Bottle 17 |
| V1 | 60,7 58,5 | 12,5 | 58,9 56,3 | 12,5 | 57,0 55,4 | 12,5 |
| V2 | 2,3 1,1 | 50 | -3,0 -3,6 | 50 | -6,6 -8,1 | 50 |

Johtopäätös

Näytteitä voidaan pitää homogeenisina tulosten tavoitehajonta (S1: 50 % ja V1: 30 % , 95 % merkitsevyytasolla) huomioituna. Näytteille S2 ja V2 ei asetettu tavoitehajontaa, koska näytteissä ei ollut myrkyllisyyttä.

2. Säilyvyys

Näytteitä V1 ja V2 säilytettiin huoneenlämmössä tai kylmässä kuljetuksen ajan (1 vrk). Tuloksiin on vaikuttanut jossakin määrin "liukuma" alaspäin sarjaa mitattaessa. Pullot mitattiin niiden numerojärjestyksessä.

Taulukko 3. Näytteiden säilyvyys kuljetuksen aikana. Pulloja säilytettiin huoneenlämpötilassa ja kylmässä.

| Näyte Sampl e | Huoneenlämpö Room temperature | | | | 4°C | | | |
|---------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | Inhib % 30min | Näytepit. testauks essa | Inhib % 30min | Näytepit. testauks essa | Inhib % 30min | Näytepit. testauks essa | Inhib % 30min | Näytepit. testaukses sa |
| | Pullo 1 <i>Bottle 1</i> | Pullo 1 <i>Bottle 1</i> | Pullo 17 <i>Bottle 17</i> | Pullo 17 <i>Bottle 17</i> | Pullo 5 <i>Bottle 5</i> | Pullo 5 <i>Bottle 5</i> | Pullo 9 <i>Bottle 9</i> | Pullo 9 <i>Bottle 9</i> |
| V1 | 43,2 41,7 | 12,5 | 35,6 34,7 | 12,5 | 40,0 39,1 | 12,5 | 35,5 34,7 | 12,5 |
| | Pullo 1 <i>Bottle 1</i> | Pullo 1 <i>Bottle 1</i> | Pullo 9 <i>Bottle 9</i> | Pullo 9 <i>Bottle 9</i> | Pullo 5 <i>Bottle 5</i> | Pullo 5 <i>Bottle 5</i> | Pullo 13 <i>Bottle 13</i> | Pullo 13 <i>Bottle 13</i> |
| V2 | 2,2 5,0 | 50 25 | -6,9 2,6 | 50 25 | 0,35 5,35 | 50 25 | -7,3 0,53 | 50 25 |

Johtopäätös

Eri säilytystavoilla ei ole ollut systemaattista vaikutusta. Tulosten vaihteluun on vaikuttanut eniten mittausjärjestys.

LIITE 4. KOOSTE TULOKSISTA*Appendix 4. Compilation of the results*

Laboratorioiden ilmoittamat EC20- ja EC50-arvot. Näytteet V1 ja S1/The samples V1 and S1

| Lab | Näyte V1/ <i>Sample V1</i> | | | | Näyte S1/ <i>Sample S1</i> | | | |
|-----|----------------------------|-------------|------------|-------------|----------------------------|-------------|--------------|-------------|
| | EC20 % | | EC50 % | | EC20 mg/l | | EC50 mg/l | |
| | Määrittys1 | Määrittys 2 | Määrittys1 | Määrittys 2 | Määrittys 1 | Määrittys 2 | Määrittys 1 | Määrittys 2 |
| 1 | 9,9 | 9,5 | 14,1 | 14,2 | 476 | 604 | 1 531 | 1 502 |
| 2 | 15,0 | 12,8 | 40,8 | 38,4 | 4 804 | 7 111 | 38 355 | 27 459 |
| 3 | 9,1 | 9,1 | 12,2 | 12,2 | 1 901 | 1 419 | 3 594 | 3 002 |
| 4 | 15,2 | 16,9 | 19,7 | 21,5 | 695 | 930 | 1 846 | 2 359 |
| 5 | 17,7 | 17,6 | 24,1 | 23,8 | 5 419 | 7 110 | 16 833 | 17 899 |
| 6 | 6,1 | 6,1 | 12,6 | 12,6 | 809 | 857 | 2 190 | 2 285 |
| 7 | 11,1 | 11,9 | 15,1 | 16,0 | 520 | 575 | 1 400 | 1 580 |
| 8 | 8,1 | 8,1 | 11,4 | 11,4 | 833 | - | 1 166 | - |
| 9 | 11,5 | 11,5 | 13,9 | 13,9 | 445 | 452 | 917 | 910 |
| 10 | 9,0 | 10,7 | 13,3 | 14,4 | 613 | - | 2 216 | - |

LIITE 5. LABORATORIOKOHTAISET TULOKSET

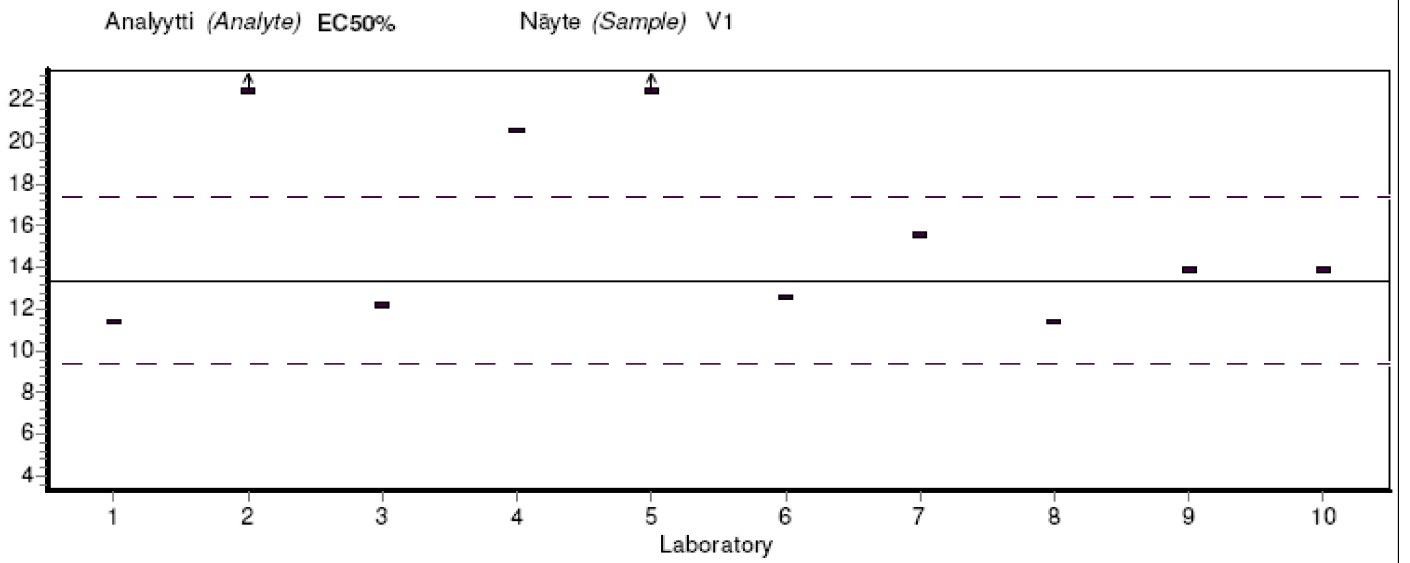
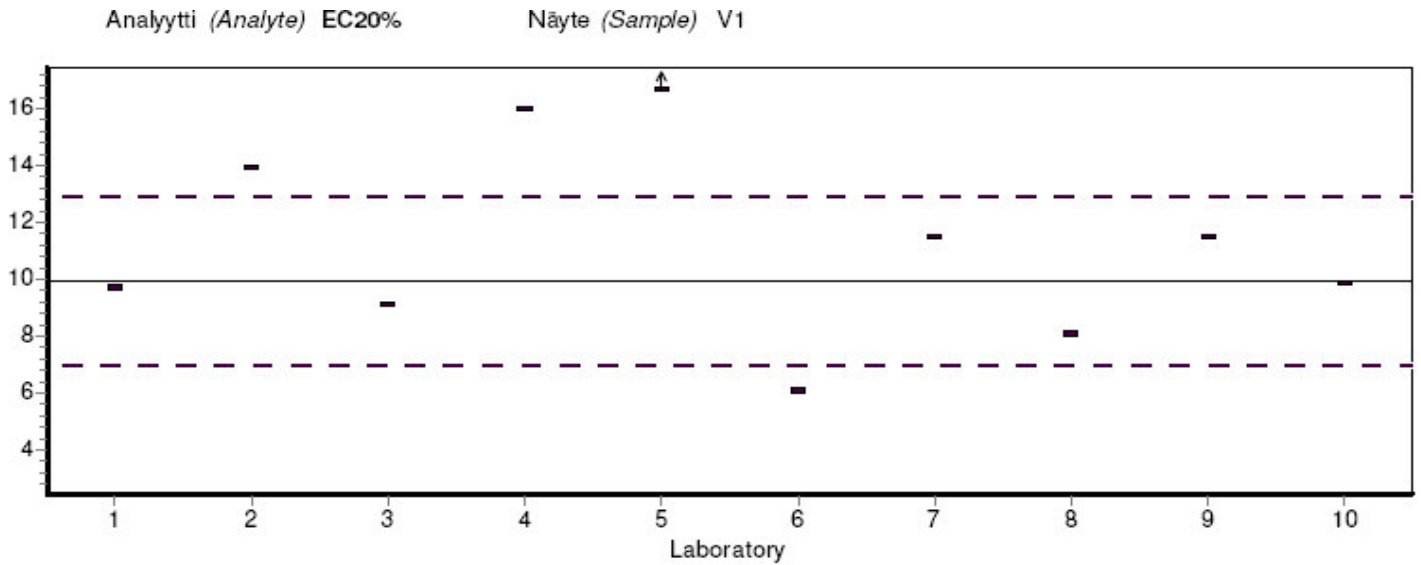
Appendix 5. Results of each participants

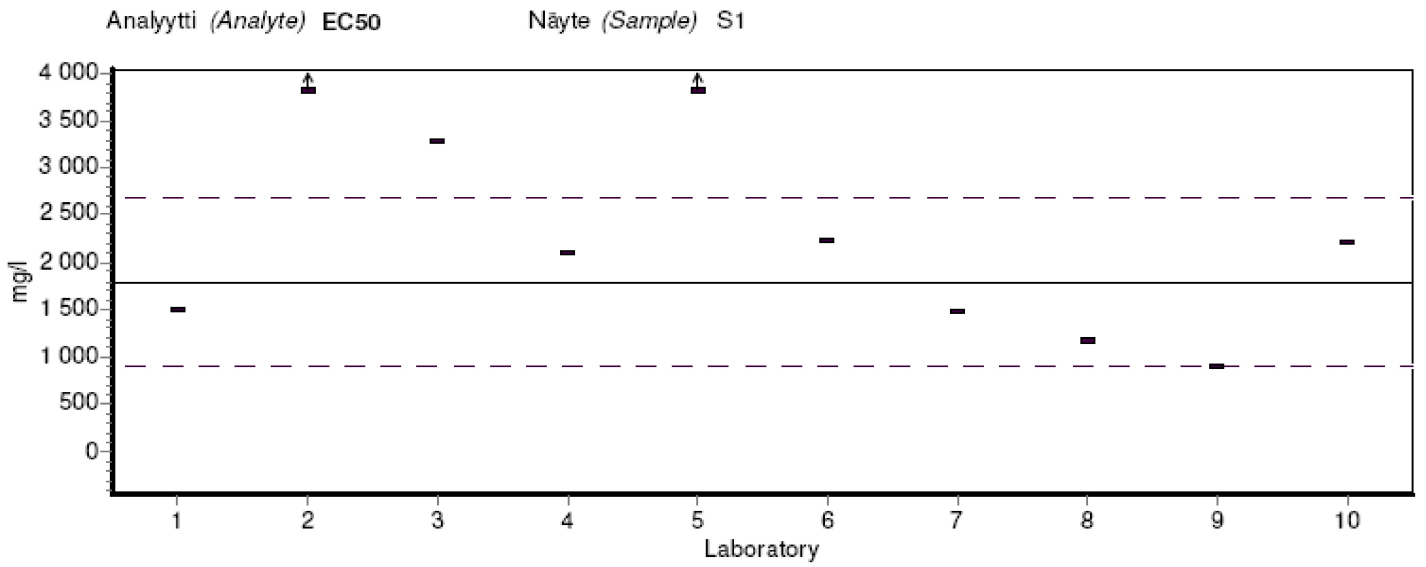
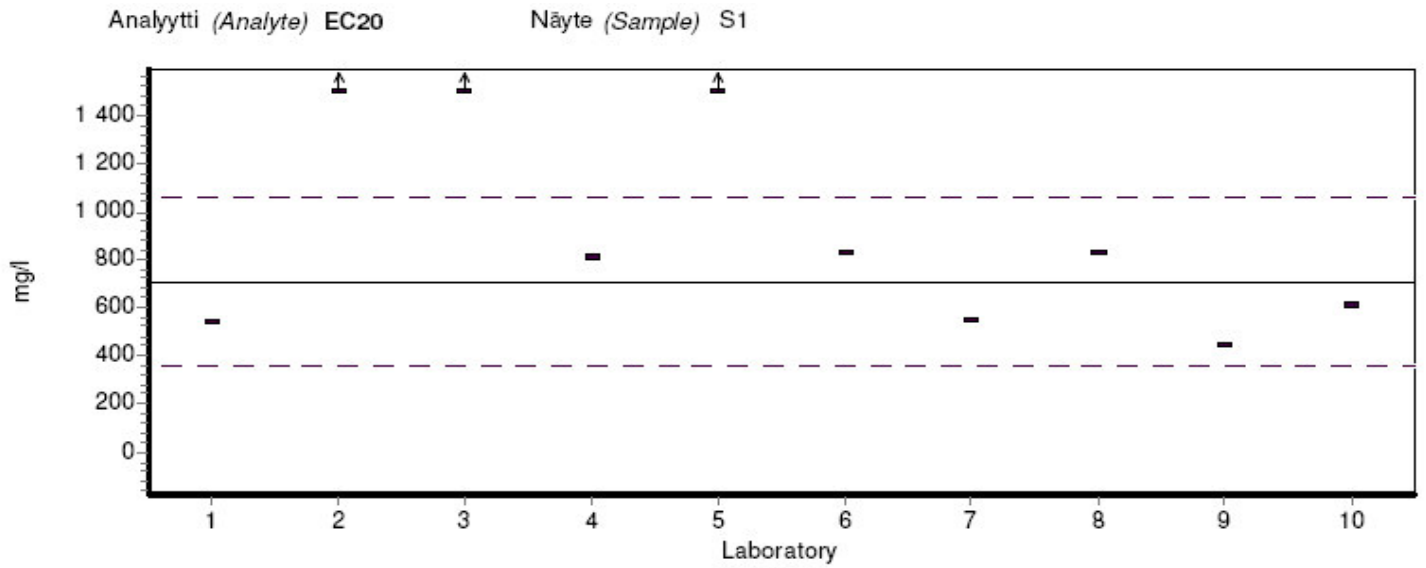
| Analyte | Unit | Sample | z-Graphics | | | | | | Z- value | Outl test OK | Assigned value | 2* Targ SD% | Lab's result | Md. | Mean | SD | SD% | Pas-sed | Outl. fai-led | Mis-sing | Num of labs |
|----------------------|------|--------|------------|----|----|---|----|----|----------|--------------|----------------|-------------|--------------|-------|-------|-------|------|---------|---------------|----------|-------------|
| | | | -3 | -2 | -1 | 0 | +1 | +2 | | | | | | | | | | | | | |
| Laboratory 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| EC20 | mg/l | S1 | | | | | | | -0,945 | yes | 707 | 50 | 540 | 654,1 | 794,9 | 409,7 | 51,5 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| EC20% | | V1 | | | | | | | -0,154 | yes | 9,93 | 30 | 9,7 | 9,9 | 10,38 | 2,904 | 27,9 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| EC50 | mg/l | S1 | | | | | | | -0,626 | yes | 1798 | 50 | 1516 | 1713 | 1893 | 772,7 | 40,8 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| EC50% | | V1 | | | | | | | -0,995 | yes | 13,4 | 30 | 11,4 | 13,6 | 14,3 | 2,997 | 20,9 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| Laboratory 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| EC20 | mg/l | S1 | | | | | | | 29,710 | M | 707 | 50 | 5958 | 654,1 | 794,9 | 409,7 | 51,5 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| EC20% | | V1 | | | | | | | 2,665 | M | 9,93 | 30 | 13,9 | 9,9 | 10,38 | 2,904 | 27,9 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| EC50 | mg/l | S1 | | | | | | | 69,210 | M | 1798 | 50 | 32910 | 1713 | 1893 | 772,7 | 40,8 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| EC50% | | V1 | | | | | | | 13,030 | M | 13,4 | 30 | 39,6 | 13,6 | 14,3 | 2,997 | 20,9 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| Laboratory 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| EC20 | mg/l | S1 | | | | | | | 5,392 | yes | 707 | 50 | 1660 | 654,1 | 794,9 | 409,7 | 51,5 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| EC20% | | V1 | | | | | | | -0,534 | yes | 9,93 | 30 | 9,135 | 9,9 | 10,38 | 2,904 | 27,9 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| EC50 | mg/l | S1 | | | | | | | 3,337 | yes | 1798 | 50 | 3298 | 1713 | 1893 | 772,7 | 40,8 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| EC50% | | V1 | | | | | | | -0,577 | yes | 13,4 | 30 | 12,24 | 13,6 | 14,3 | 2,997 | 20,9 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| Laboratory 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| EC20 | mg/l | S1 | | | | | | | 0,597 | yes | 707 | 50 | 812,5 | 654,1 | 794,9 | 409,7 | 51,5 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| EC20% | | V1 | | | | | | | 4,082 | yes | 9,93 | 30 | 16,01 | 9,9 | 10,38 | 2,904 | 27,9 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| EC50 | mg/l | S1 | | | | | | | 0,677 | yes | 1798 | 50 | 2103 | 1713 | 1893 | 772,7 | 40,8 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| EC50% | | V1 | | | | | | | 3,580 | yes | 13,4 | 30 | 20,59 | 13,6 | 14,3 | 2,997 | 20,9 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| Laboratory 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| EC20 | mg/l | S1 | | | | | | | 31,440 | M | 707 | 50 | 6265 | 654,1 | 794,9 | 409,7 | 51,5 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| EC20% | | V1 | | | | | | | 5,183 | M | 9,93 | 30 | 17,65 | 9,9 | 10,38 | 2,904 | 27,9 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| EC50 | mg/l | S1 | | | | | | | 34,630 | M | 1798 | 50 | 17370 | 1713 | 1893 | 772,7 | 40,8 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| EC50% | | V1 | | | | | | | 5,249 | M | 13,4 | 30 | 23,95 | 13,6 | 14,3 | 2,997 | 20,9 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| Laboratory 6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| EC20 | mg/l | S1 | | | | | | | 0,713 | yes | 707 | 50 | 833 | 654,1 | 794,9 | 409,7 | 51,5 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| EC20% | | V1 | | | | | | | -2,571 | yes | 9,93 | 30 | 6,1 | 9,9 | 10,38 | 2,904 | 27,9 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| EC50 | mg/l | S1 | | | | | | | 0,978 | yes | 1798 | 50 | 2238 | 1713 | 1893 | 772,7 | 40,8 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| EC50% | | V1 | | | | | | | -0,398 | yes | 13,4 | 30 | 12,6 | 13,6 | 14,3 | 2,997 | 20,9 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| Laboratory 7 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| EC20 | mg/l | S1 | | | | | | | -0,902 | yes | 707 | 50 | 547,5 | 654,1 | 794,9 | 409,7 | 51,5 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| EC20% | | V1 | | | | | | | 1,054 | yes | 9,93 | 30 | 11,5 | 9,9 | 10,38 | 2,904 | 27,9 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| EC50 | mg/l | S1 | | | | | | | -0,685 | yes | 1798 | 50 | 1490 | 1713 | 1893 | 772,7 | 40,8 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| EC50% | | V1 | | | | | | | 1,070 | yes | 13,4 | 30 | 15,55 | 13,6 | 14,3 | 2,997 | 20,9 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| Laboratory 8 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| EC20 | mg/l | S1 | | | | | | | 0,713 | yes | 707 | 50 | 833 | 654,1 | 794,9 | 409,7 | 51,5 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| EC20% | | V1 | | | | | | | -1,229 | yes | 9,93 | 30 | 8,1 | 9,9 | 10,38 | 2,904 | 27,9 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| EC50 | mg/l | S1 | | | | | | | -1,406 | yes | 1798 | 50 | 1166 | 1713 | 1893 | 772,7 | 40,8 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| EC50% | | V1 | | | | | | | -0,995 | yes | 13,4 | 30 | 11,4 | 13,6 | 14,3 | 2,997 | 20,9 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| Laboratory 9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| EC20 | mg/l | S1 | | | | | | | -1,463 | yes | 707 | 50 | 448,5 | 654,1 | 794,9 | 409,7 | 51,5 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| EC20% | | V1 | | | | | | | 1,054 | yes | 9,93 | 30 | 11,5 | 9,9 | 10,38 | 2,904 | 27,9 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| EC50 | mg/l | S1 | | | | | | | -1,968 | yes | 1798 | 50 | 913,5 | 1713 | 1893 | 772,7 | 40,8 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| EC50% | | V1 | | | | | | | 0,249 | yes | 13,4 | 30 | 13,9 | 13,6 | 14,3 | 2,997 | 20,9 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| Laboratory 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| EC20 | mg/l | S1 | | | | | | | -0,530 | yes | 707 | 50 | 613,3 | 654,1 | 794,9 | 409,7 | 51,5 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| EC20% | | V1 | | | | | | | -0,054 | yes | 9,93 | 30 | 9,85 | 9,9 | 10,38 | 2,904 | 27,9 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| EC50 | mg/l | S1 | | | | | | | 0,931 | yes | 1798 | 50 | 2216,3 | 1713 | 1893 | 772,7 | 40,8 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| EC50% | | V1 | | | | | | | 0,224 | yes | 13,4 | 30 | 13,85 | 13,6 | 14,3 | 2,997 | 20,9 | 8 | 2 | 0 | 10 |

Outlier test failed: C - Cochran, G1 - Grubbs(1-outlier algorithm), G2 - Grubbs(2-outliers algorithm), H - Hampel, M - manual

LIITE 6. LABORATORIODIEN TULOKSET GRAAFISESTI ESITETTYNÄ

Appendix 6. Results of the laboratories (graphically presented)





LIITE 7. TULOSSISSA ESIINTYVIÄ KÄSITTEITÄ

Appendix 7. Terms in the result tables

Laboratoriokohtaiset tulokset ja yhteenveto

| | |
|-----------------------|---|
| Analyte | Analyytti (määrittäminen) |
| Unit | Yksikkö |
| Sample | Näytekoodi |
| z-Graphics | z-arvo – graafinen tulostus |
| z-value | z-arvon laskeminen $z = (x - X)/s, \text{ missä}$ $x = \text{yksittäisen laboratorion tulos}$ $X = \text{vertailuarvo (the assigned value)}$ $s = \text{kokonaiskeskihajonnan tavoitearvo (target)}.$ |
| Outl test OK | Yes – tulos ei ole harha-arvo, tai merkintä testistä, minkä mukaan tulos on harha-arvo (Keskiarvo – H=Hampel, Rinnakkaistulosket: C=Cochran). Myös robustissa käsittelyssä hylättiin tuloksia manuaalisesti (poikkeama vähintään > 50 %) |
| Assigned value | Vertailuarvo |
| 2* Targ SD % | Kokonaiskeskihajonnan tavoitearvo (95 % merkitsevyytaso) |
| Lab's result | Osallistujan raportoitu tulos (tai rinnakkaistulosten keskiarvo) |
| Md. | Mediaani |
| Mean | Keskiarvo |
| R-mean | Robusti keskiarvo |
| RSD | Robusti keskihajonta |
| SD | Keskihajonta |
| SD% | Keskihajonta, % |
| Passed | Tilastokäsittelyssä olleiden tulosten lukumäärä |
| Missing | Esim. < DL |
| Num of labs | Osallistujien kokonaismäärä |

Yhteenveto z-arvoista

A - hyväksytty ($-2 \leq z \leq 2$)

p - kyseenalainen ($2 < z \leq 3$), positiivinen virhe, tulos $> X$

n - kyseenalainen ($-3 \leq z < -2$), negatiivinen virhe, tulos $< X$

P- non- accepted ($z > 3$), positive error, the result $\ggg X$

N- non- accepted ($z < -3$), negative error, the result $\lll X$ (X = the reference value)

Robusti statistiikka vertailuarvon laskemiseksi/Robust statistics for calculation of the assigned value

Robusti keskiarvon laskeminen ja keskihajonnan laskeminen:

Suuruusjärjestyksessä olevista tuloksista ($x_1, x_2, x_i, \dots, x_p$) lasketaan ensimmäiset robusti keskiarvo ja –keskihajonta x^* ja s^*

$x^* = \text{tulosten } x_i \text{ mediaani}$ ($i = 1, 2, \dots, p$)

$s^* = 1,483 \cdot \text{mediaani erotuksista } |x_i - x^*|$ ($i = 1, 2, \dots, p$)

Jokaiselle tulokselle x_i ($i = 1, 2, \dots, p$) lasketaan uusi arvo:

$$x_i^* = \begin{cases} x^* - \phi & \text{jos } x_i < x^* - \phi \\ x^* + \phi & \text{jos } x_i > x^* + \phi \\ x_i & \text{muutoin} \end{cases}$$

Uudet keskiarvo ja –keskihajonta x^* ja s^* lasketaan seuraavasti:

$$x^* = \sum x_i^* / p$$

$$s^* = 1,134 \sqrt{\sum (x_i^* - x^*)^2 / (p - 1)}$$

Keskiarvoa ja –keskihajontaa x^* ja s^* voidaan muuntaa niin kauan, kunnes esim. kolmas merkitsevä numero ei enää muutu keskiarvossa ja –keskihajonnassa.

Results of each participants and the summary of the results:

Analyte

Unit

Sample

The code of the sample

z-Graphics

z score - the graphical presentation

z-value

$z = (x - X)/s$, where

x = the result of the individual participant

X = the reference value (the assigned value)

s = the target value for the total deviation (target).

Outl test OK

yes - the result passed the outlier test

H = Hampel test (a test of mean values), RC = Cochran (replicates)

In addition, in robust statistics results deviating at least > 50 % from the original robust mean have been rejected.

Assigned value

the reference value

2* Targ SD %

the target total standard deviation (95 % confidence interval).

Lab's result

the result reported by the participant (the mean value of the replicates)

Md.

Median

Mean

Mean

SD

Standard deviation

SD %

Standard deviation, %

Mean rob

Robust mean

SDrob

Robust standard deviation

SDrob %

Robust standard deviation-%

Passed

The results passed the outlier test

Missing

i.e. < DL

Num of labs

the total number of the participants

Summary on the z scores:

A - accepted ($-2 \leq z \leq 2$)

p - questionable ($2 < z \leq 3$), positive error, the result > X

n - questionable ($-3 \leq z < -2$), negative error, the result < X

P - non- accepted ($z > 3$), positive error, the result >>> X

N - non- accepted ($z < -3$), negative error, the result <<< X (X = the reference value)

Robust analysis/Calculation of the assigned values:

The items of data is sorted into increasing order, $x_1, x_2, \dots, x_i, \dots, x_p$.

Initial values for x^* and s^* are calculated as:

$X^* = \text{median of } x_i \quad (i = 1 \dots p)$

$S^* = 1.483^* \text{ median of } |x_i - x^*| \quad (i = 1 \dots p)$

For each x_i is calculated:

$$\begin{aligned}x_i^* &= x^* - \varphi && \text{if } x_i < x^* - \varphi \\x_i^* &= x^* + \varphi && \text{if } x_i > x^* + \varphi \\x_i^* &= x_i && \text{otherwise}\end{aligned}$$

The new values of x^* and s^* are calculated from:

$$X^* = \sum x_i^* / p$$

$$s^* = 1.134 \sqrt{\sum (x_i^* - x^*)^2 / (p-1)}$$

The robust estimates x^* and s^* can be derived by an iterative calculation, i.e. by updating the values of x^* and s^* several times, until the process converges.

LIITE 8. LABORATORIOILTA SAATU PALAUTE*Appendix 8. Comments sent by the participants*

| Laboratorio | Kommentit tuloksista | SYKE:n toimenpide |
|-------------|---|--------------------|
| 4 | Toimitti 21.5. ja 5.6 tarkennetut tulokset S1 näytteen EC20- ja EC50-arvoille | Korjaus hyväksytty |
| 8 | Näytteille V1 ja V2 oli erehdyksessä ilmoitettu referenssiaineen EC20- ja EC50-arvot. Osallistuja toimitti 11.6.2007 oikeat tulokset näytteen ko. näytteille. | Korjaus hyväksytty |
| 2 ja 5 | Tuloksia käsiteltäessä todettiin, että osallistuja sai näytteille huomattavasti suuremmat EC20- ja EC50-arvot kuin muut osallistajat. Palautteen mukaan näytteitä ei sekoitettu viimeisessä mittauspisteessä ja inhibitioprosentin laskemisessa oli käytetty virheellistä kaavaa. Korjaukset toimitettu SYKEen vasta 14.9.2007 | Ei toimenpiteitä |

Alkuperäiset tulokset**Laboratorio 2, Putkilumonometri**

| Näyte | Inhibitio%, 30min ¹⁾ | | EC20 | | EC50 | |
|-------|---------------------------------|----------------|------------|------------|------------|------------|
| | Määritys 1 | Määritys 2 | Määritys 1 | Määritys 2 | Määritys 1 | Määritys 2 |
| V1 | 55,0 | 57,8 | 15,0% | 12,8% | 40,8% | 38,4% |
| V3 | ei inhibitiota | ei inhibitiota | | | | |
| S1 | 35,1 | 45,9 | 4804 mg/l | 7111 mg/l | 38355 mg/l | 27459 mg/l |
| S2 | ei inhibitiota | ei inhibitiota | | | | |

Laboratorio 5, Kuoppaluminometri

| Näyte | Inhibitio%,30min ¹⁾ | | EC20 | | EC50 | |
|-------|--------------------------------|----------------|------------|------------|------------|------------|
| | Määritys 1 | Määritys 2 | Määritys 1 | Määritys 2 | Määritys 1 | Määritys 2 |
| V1 | 74,2 | 74,5 | 17,7 % | 17,6 % | 24,1% | 23,8% |
| V3 | ei inhibitiota | ei inhibitiota | | | | |
| S1 | 69,6 | 66,6 | 5419 mg/l | 7110 mg/l | 16833 mg/l | 17899 mg/l |
| S2 | ei inhibitiota | ei inhibitiota | | | | |

1) suurimmassa testatussa pitoisuudessa

Huom. Näytteitä ei sekoitettu ennen loppumittausta, mikä saattaa näkyä todellisuutta matalampina inhibitioprosenteina ja siten korkeampina EC-arvoina sedimentoituvilla näytteillä.

Korjatut tulokset, toimitettu 14.9.2007**Laboratorio 2, Putkilumonometri**

| Näyte | Inhibitio%,30min ¹⁾ | | EC20 | | EC50 | |
|-------|--------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | Määritys 1 | Määritys 2 | Määritys 1 | Määritys 2 | Määritys 1 | Määritys 2 |
| V1 | 99,0 | 100,0 | 12,4 | 11,2 % | 17,7 % | 17,0 % |
| V3 | 36,1 | 36,9 | | | | |
| S1 | 68,6 | 83,1 | 2294 mg/l | 2241 mg/l | 5477 mg/l | 6313 mg/l |
| S2 | Ei inhibitiota | | | | | |

Laboratorio5, Kuoppaluminometri

| Näyte | Inhibitio%,30min 1) | | EC20 | | EC50 | |
|-------|---------------------|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | Määrittys 1 | Määrittys 2 | Määrittys 1 | Määrittys 2 | Määrittys 1 | Määrittys 2 |
| V1 | 99,9 | 74,5 | 16,6 % | 17,6 % | 21,4 % | 23,8 % |
| V2 | | | | | | |
| V3 | Ei inhibitiota | Ei inhibitiota | | | | |
| S1 | 95,1 | 93,7 | 2231 mg/l | 2955 mg/l | 7298 mg/l | 8623 mg/l |
| S2 | Ei inhibitiota | Ei inhibitiota | | | | |

Kuvailulehti

| | | |
|--|--|---|
| Julkaisija | Suomen ympäristökeskus (SYKE) | Julkaisuaika Marraskuu 2007 |
| Tekijä(t) | Marja Ruoppa, Irma Mäkinen, Juha Lappalainen ja Leila Jälkö | |
| Julkaisun nimi | Laboratorioiden välinen vertailu 1/2007 Akuutin toksisuuden testaus kineettisellä valobakteeritestillä värillisistä ja sameista näytteistä | |
| Julkaisun osat/ muut saman projektin tuottamat julkaisut | Julkaisu on myös saatavana internetissä: www.ymparisto.fi/julkaisut | |
| Tiivistelmä | <p>Suomen ympäristökeskus järjesti huhtikuussa 2007 vertailukokeen kineettistä valobakteeriestä käytäville laboratorioille. Vertailun tarkoituksena oli arvioida DIS-vaiheessa olevan standardiluonnoksen ISO/CD 21338; Water Quality – Kinetic determination of the inhibitory effects of sediment and other solids and colour containing samples on the light emission of <i>Vibrio fischeri</i> (Kinetic luminescent bacteria test) soveltuvuutta vesi- ja sedimentinäytteiden myrkyllisyyden testaamiseen.</p> <p>Vertailuun osallistui yhteensä kahdeksan laboratoriota. Osallistujat testasivat 2 vesinäytettä ja 2 sedimentinäytettä. Kaksi laboratoriota toimitti tulokset mitattuna kahdelle eri laitteella.</p> <p>Tulokset ilmoitettiin inhibitioprosenttien perusteella laskettuina EC20- ja EC50-arvoina. Vesinäyte V1 sekä sedimentinäyte S1 olivat myrkyllisiä, mutta vesinäyte V2 ja sedimentinäyte S2 eivät olleet myrkyllisiä. Tuloksista 84% oli tyydyttäviä kun robustista keskiarvosta sallittiin 30 % poikkeama vesinäytteelle V1 ja 50% poikkeama sedimentinäytteelle S1.</p> <p>Vaikka laboratoriot käyttivät mittaukseen eri laitteita, testilämpötiloja sekä bakteerikantoja, pystyttiin myrkyttömät ja myrkylliset näytteet erottelemaan luotettavasti.</p> | |
| Asiasanat | Kineettinen valobakteeritesti, <i>Vibrio fischeri</i> , akuutti myrkyllisyys, värilliset ja sameat näytteet, vertailukoe | |
| Julkaisusarjan nimi ja numero | Suomen ympäristökeskuksen raportteja 28/2007 | |
| Julkaisun teema | | |
| Projektihankkeen nimi ja projektinnumero | | |
| Rahoittaja/ toimeksiantaja | SYKE, Ympäristöministeriö | |
| Projektiryhmään kuuluvat organisaatiot | | |
| | ISSN 1796-1718 (pain.) 1796-1726 (verkkojulkaisu) | ISBN 978-952-11-2856-1 (nid.) 978-952-11-2857-8 (PDF) |
| | Sivuja 28 | Kieli suomi |
| | Luottamuksellisuus Julkinen | Hinta |
| Julkaisun myynti/ jakaja | Suomen ympäristökeskus, Asiakaspalvelu E-mail: neuvonta.syke@ymparisto.fi Puh. 020 490 123 Telefax 020 490 2190 | |
| Julkaisun kustantaja | Suomen ympäristökeskus, PL 140, 00251 Helsinki | |
| Painopaikka ja -aika | Edita Prima, Helsinki 2007 | |
| Muut tiedot | | |

Documentation page

| | | | |
|--|--|--------------------------|---------------|
| Publisher | Finnish Environment Institute (SYKE) | Date | November 2007 |
| Author(s) | Marja Ruoppa, Irma Mäkinen, Juha Lappalainen and Leila Jälkö | | |
| Title of publication | Interlaboratory comparison 1/2007 Kinetic luminescent bacteria test using coloured and turbid samples | | |
| Parts of publication/ other project publications | The publication is available on the internet: www.environment.fi/publications | | |
| Abstract | <p>The Finnish Environment Institute (SYKE) organized an interlaboratory comparison for kinetic luminescent bacteria test ISO/CD 21338; Water Quality – Kinetic determination of the inhibitory effects of sediment and other solids and colour containing samples on the light emission of <i>Vibrio fischeri</i> (Kinetic luminescent bacteria test) in April 2007. The objective was to evaluate the applicability of the standard draft for toxicity testing of water and sediment samples.</p> <p>Eight laboratories participated in the comparison. The participants tested two water samples and two sediment samples. Two laboratories carried out the test using two different instruments.</p> <p>As a result EC20- and EC50-values were calculated from the inhibition %s. Water sample V1 and sediment sample S1 were toxic. Samples V2 and S2 were not toxic. In this comparison 84 % of the results were acceptable when the deviation of 30% for water sample V1 and 50 % deviation for sediment sample S1 was permitted.</p> <p>Although laboratories used different instruments, test kits and temperatures it was possible to distinguish the toxic samples from the nontoxic ones reliably.</p> | | |
| | Kinetic luminescent bacteria test, <i>Vibrio fischeri</i> , acute toxicity, coloured and turbid samples, interlaboratory comparison | | |
| Publication series and number | Suomen ympäristökeskuksen raportteja 28/2007 | | |
| Theme of publication | | | |
| Project name and number, if any | | | |
| Financier/ commissioner | SYKE and Ministry of the Environment | | |
| Project organization | | | |
| | ISSN | ISBN | |
| | 1796-1718 (print) | 978-952-11-2856-1 (pbk.) | |
| | 1796-1726 (online) | 978-952-11-2857-8 (PDF) | |
| | No. of pages | Language | |
| | 28 | Finnish | |
| | Restrictions | Price | |
| | Public | | |
| For sale at/ distributor | Finnish Environment Institute, Customer service E-mail: neuvonta.syke@ymparisto.fi Tel. 020 490 123, Telefax 020 490 2190 | | |
| Financier of publication | Finnish Environment Institute, P.O.Box 140, FIN-00251 Helsinki, Finland | | |
| Printing place and year | Edita Prima Ltd, Helsinki 2007 | | |
| Other information | | | |

Presentationsblad

| | | |
|--|--|--------------------------|
| Utgivare | Finlands Miljöcentral (SYKE) | Datum November 2007 |
| Författare | Marja Ruoppa, Irma Mäkinen, Juha Lappalainen och Leila Jälkö | |
| Publikationens titel | SYKE Provningsjämförelse 1/2007 Testing av akut toxicitet med kinetisk test med luminiserande bakterier från färgade och grumliga prover | |
| Publikationens delar/ andra publikationer inom samma projekt | Publikationen finns tillgänglig på finska på internet: www.ymparisto.fi/julkaisut | |
| Sammandrag | <p>Finlands Miljöcentral genomförde i april 2007 en provningsjämförelse med laboratorier som använder kinetiska test med luminiserande bakterier. Syftet var att prova lämpligheten för utkastet till standard ISO/CD 21338; Water Quality – Kinetic determination of the inhibitory effects of sediment and other solids and colour containing samples on the light emission of <i>Vibrio fischeri</i> (Kinetic luminescent bacteria test) för toxicitetstestning av färgade och grumliga prover.</p> <p>Sammanlagt 8 laboratorier deltog i jämförelsen. Deltagarna fick 2 vattenprov och 2 sedimentprov. Två av dem testade proverna med två olika instrument.</p> <p>Resultaterna anmäldes som EC20- och EC50-värden som räknats på basen av inhibitionsprocenten. Vattenprovet V1 och sedimentprovet S1 var giftiga men proverna V2 och S2 var giftfria. Av resultaten var 84 % tillfredsställande när en avvikelse om 30% tilläts från det robusta medelvärde för vattenprovet V1 och en avvikelse om 50 % för sedimentprovet S2 .</p> <p>Även om laboratorierna i testningen använde olika instrument, testtemperaturer samt olika bakteriestammar kunde de giftiga och giftfria proverna åtskiljas på ett pålitligt sätt.</p> | |
| Nyckelord | Kinetisk test med luminiserande bakterier, <i>Vibrio fischeri</i> , akut toxicitet, färgade och grumliga prover, provningsjämförelse | |
| Publikationsserie och nummer | Suomen ympäristökeskuksen raportteja 28/2007 | |
| Publikationens tema | | |
| Projektets namn och nummer | | |
| Finansiär/ uppdragsgivare | | |
| Organisationer i projektgruppen | | |
| | ISSN | ISBN |
| | 1796-1718 (print) | 978-952-11-2856-1 (hft.) |
| | 1796-1726 (online) | 978-952-11-2857-8 (PDF) |
| | Sidantal | Språk |
| | 28 | Finska |
| | Offentlighet | Pris |
| | Offentlig | |
| Beställningar/ distribution | Finlands miljöcentral, Informationstjänsten neuvonta.syke@ymparisto.fi Tfn 020 490 123 Fax 020 490 2190 | |
| Förläggare | Finlands miljöcentral, PB 140, 00250 Helsingfors | |
| Tryckeri/ tryckningsort och -år | Edita Prima Oy AB, Helsingfors 2007 | |
| Övriga uppgifter | | |



ISBN 978-952-11-2856-1 (nid.)

ISBN 978-952-11-2857-8 (PDF)

ISSN 1796-1718 (pain.)

ISSN 1796-1726 (verkköj.)