

Arbeidsforskningsinstituttene

Arbeidsfysiologisk institutt - Arbeidspsykologisk institutt - Muskelfysiologisk institutt
Yrkeshygienisk institutt

Kontoradresse: Gydas vei 8, tlf. 02/46 68 50

Postadresse: P.b. 8149 Dep Oslo 1

Tittel:

Fordeling av muggsoppssporene og sporeaggregater i filterprøver analysert med scanning elektronmikroskopi.

Forfatter(e):

Wijnand Eduard¹ med et appendiks ved Odd Aalen²

¹Yrkeshygienisk institutt ²Farmakologisk institutt UiO

Prosjektansvarlig:

Wijnand Eduard

Prosjektmedarbeidere:

Rønnaug Bruun, Terje Nilsen

Utgiver (institutt):

Yrkeshygienisk institutt

Dato:

101086

Antall sider:

20

ISSN:

0800-3777

Serie:

HD 936/86 FOU

Sammendrag:

I denne undersøkelsen er fordelingen av sporer og sporeaggregater i filterprøver nærmere undersøkt.

Følgende prøvetyper ble undersøkt: prøver tatt på Nuclepore filter i en Millipore filterholder, prøver tatt på teflon filter, som ble vasket ut og filtrert ned på et Nuclepore filter og prøver tatt på gullbelagt Nuclepore filter i messing filterholder.

Det ble funnet at sporer og sporeaggregater var tilnærmet tilfeldig fordelt unntatt en sone mot kanten av filterholderen hvor sporetettheten avtok til 0. En viktig årsak for kantsonen er sannsynligvis elektrostatiske oppladning av filterholderen, fordi kantsonen var liten i prøver tatt med messing filterholder. Kantsonen i prøver tatt med Millipore filterholder utgjør ca 40% av filterarealet og må tas hensyn til ved analysen. Dette kan best gjøres ved å telle over et helt segment av filteret.

En formel for beregning av forventet presisjon for telling av sporeprøver som inneholder aggregater er utarbeidet. Presisjonen beregnet med denne formelen er i overensstemmelse med presisjonen funnet i en tidligere undersøkelse.

Stikkord:

soppsporer, partikkelfordeling, filterprøver, scanning elektronmikroskopi, presisjon

Key words:

mould spores, particle distribution, scanning electron microscope, precision

INNHALDSFORTEGNELSE

1.	INNLEDNING	1
2.	METODER	3
2.1	Prøvetaking	3
2.2	Analyse av prøvene	4
2.2.1	Utvasking av sporer	4
2.2.2	Preparering for SEM	4
2.2.3	Telling med SEM	5
2.3	Statistiske metoder	5
3.	RESULTATER	6
3.1	Fordeling av sporer på filteret	6
3.2	Sammenligning av prøver analysert direkte og etter utvasking av sporene	9
3.2.1	Sporekonsentrasjon	9
3.2.2	Sporeaggregater	10
3.3	Tellepresisjon	11
4.	DISKUSJON	13
5.	KONKLUSJONER	18
6.	LITTERATUR	19
7.	APPENDIX & BILAG	20

1. INNLEDNING

Allergisk alveolitt kan utvikles som følge av eksponering for organisk støv, som f.eks. sporer av muggsopp og bakterier. Både levende og døde sporer antas å kunne forårsake sykdommen og ved måling av eksponering må alle sporer kvantifiseres. Ved flere analysemetoder blir mikroorganismene overført til et vekstmedium og dyrket. Disse metoder har ofte dårlig presisjon og nøyaktighet og detekterer kun levende organismer. Analyse av levende og døde sporer kan utføres med metoder basert på mikroskopi: f.eks. lysmikroskopi, fluorescens mikroskopi og scanning elektronmikroskopi (SEM). Identifisering av sporer av muggsopp og bakterier er ofte vanskelig med lysmikroskopiske metoder. Scanning elektron mikroskopet har en bedre oppløsning og dybdeskarpheit og viser flere detaljer enn lysmikroskopet. SEM har derfor større muligheter for identifisering av muggsoppssporene. En metode for analyse av muggsoppssporene i filterprøver med SEM er beskrevet tidligere (6.1).

Resultater fra telling med mikroskop antas å følge en Poisson-fordeling (6.2). For Poissonfordelte variabler er standardavviket $= \sqrt{N}$ hvor N er antall partikler som er telt. Det relative standardavviket $= \frac{\sqrt{N}}{N}$ blir stor når N er liten og dominerer helt analysepresisjonen ved telling med mikroskop, fordi vanligvis inntil 100 partikler telles i en prøve. Presisjonen av analyse for muggsporer med SEM ble undersøkt før (6.1) og var betydelig større en forventet. Derfor ble fordelingen av muggsoppssporene og sporeaggregater på filterflaten undersøkt statistisk og dets betydning for analysepresisjonen.

Sporetettheten på filterflaten må ikke være for stor ved direkte analyse av filterprøver og sporene må være jevnt fordelte for å unngå at sporer overlapper hverandre. Prøver må derfor tas med åpen filterholder. Prøver som er tatt over hele arbeidsdagen vil vanligvis ikke kunne analyseres direkte p.g.a. overbelastning med partikler. Sporer kan da suspenderes i vann tilsatt detergent og en del av suspensjonen filtreres ned på et nytt filter (6.3).

Sporefordelingen ble undersøkt i en serie av parallelle prøver hvor den ene halvpart ble analysert direkte og den andre ble vasket ut.

Telling av prøver som var tatt med åpen filterholder viste en betydelige kantsone, hvor sporetettheten falt. Årsaken til dette kan være at lufthastigheten avtar mot kanten av filterholderen men også elektrostatisk oppladning kan også tenkes å påvirke sporefordelingen. Elektrostatisk opplading er størst på materialer som er dårlige ledere for elektrisk strøm, som f.eks. plast. Sporefordelingen ble derfor også undersøkt i en prøveserie tatt med filterholdere laget i messing på gullbelagte Nucleopore filter.

2. METODER

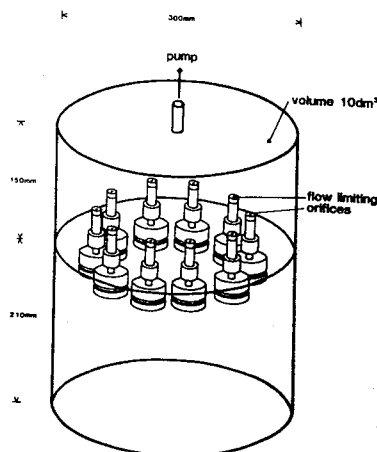
2.1 Prøvetaking

Prøver ble samlet i et kapp-sorterverk ved et sagbruk i nærheten av Oslo. Parallelle prøver ble tatt samtidig med en prøvetaker som er vist i figur 1. To serier av parallelle prøver ble tatt:

serie 1: 5 prøver med Nuclepore filter og 5 prøver med Teflon filter, filterholdere i plast

serie 2: 5 prøver med gullbelagt Nuclepore filter og filterholdere i messing

Prøvene ble tatt med åpen filterholder. Filterholdere i plast (polystyren) var standard tre-delte Millipore kassetter og filterholdere i messing ble laget på verkstedet ved AFI med samme dimensjoner som Millipore kassetten. Følgende filtertyper ble benyttet: Nuclepore filtere med porestørrelse $0,4\mu\text{m}$, Millipore filtere type Fluoropore med porestørrelse $0,5\mu\text{m}$ og Nuclepore filtere med porestørrelse $0,4\mu\text{m}$ som var belagt med gull i en sputtercoater type Jeol JFC-1100. Luftstrømmen ble stabilisert med dyser til ca $1,0\text{ l/min}$ og ble målt ved begynnelsen og ved slutten av prøvetakingen. Prøvetakingstiden var 60 min.



Figur 1: Prøvetaker for 10 parallelle prøver

2.2 Analyse av prøvene

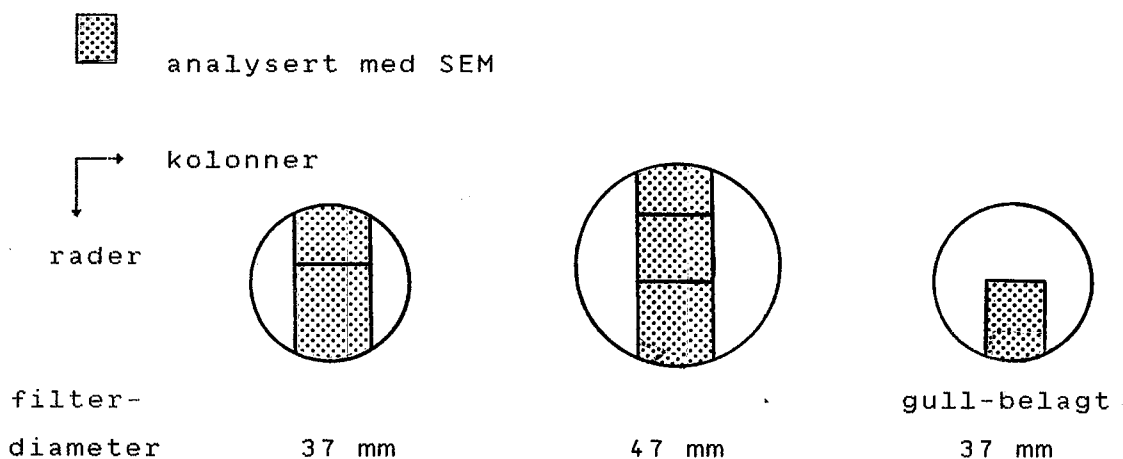
Prøvene som ble samlet på Nuclepore filtere ble preparert direkte for SEM. Prøvene som ble samlet på Teflon filtere ble vasket ut og filtrert ned på et Nuclepore filter med diameter 47 mm og porestørrelse 0,2 μm før analyse.

2.2.1 Utvasking av sporer

Topplokket av filterholderne med Teflon filtere ble tatt av og 5 ml av en 0,1% løsning av Tween-80 i deionisert og filtrert ($< 0,45 \mu\text{m}$) vann ble tilsatt. Topplokket og propper ble satt tilbake igjen og filterholderne ble behandlet 2 min i et ultralydbad. Deretter ble suspensjonen overført til en 100 ml målekolbe, filterholderen ble spylt etter med filtrert vann og målekolben fyllt opp til 100 ml. Suspensjonen ble homogenisert og overført til en Millipore filtersats og filtrert ned på et Nucleporefilter med diameter 47 mm og porestørrelse 0,2 μm .

2.2.2 Preparering for SEM

Filterne ble oppbevart i filterholderen eller i en Petri-skål ved romtemperatur og -fuktighet før preparering. En bit av filteret ble montert med karbonlim på en karbon skive med diameter 25mm og belagt med gull i en sputtercoater type Jeol JFC-1100. Filterne ble delt op som vist i figur 2.



Figur 2: Oppdeling av filtere før telling med SEM.

2.2.3 Telling med SEM

Prøvene ble telt ved 1500x forstørrelse på skjermen i et Jeol-35 scanning elektronmikroskop. Antall sporer og aggregater ble registrert for hvert felt, samt aggregatstørrelse. Feltene ble plassert minst 1 mm fra kanten og dekket hele filterbiten. Feltene ble plassert med 1 mm avstand mellom feltene og mellom radene. Sporer som lå delvis uten for feltet ble telt for to av sidene, mens de ikke ble telt for de øvrige sidene. Aggregater ble registrert på følgende måte: når 4 sporer av et aggregat med 7 sporer lå i synsfeltet ble dette notert som 4/7.

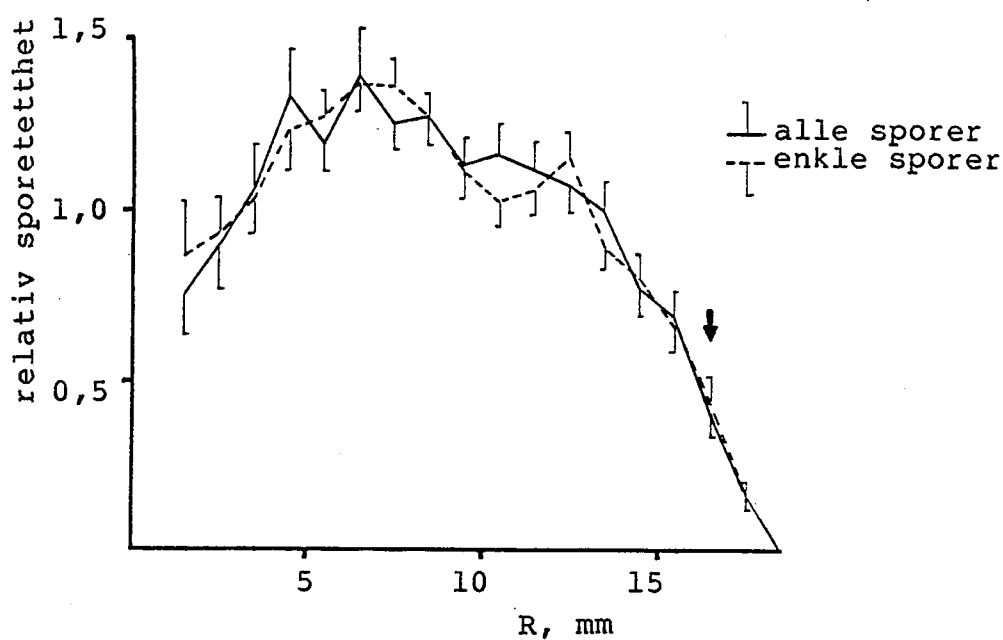
2.3 Statistiske metoder

Resultatene ble analysert med en-veis variansanalyse, Students t-test og Kji-kvadrat test. Beregningene ble utført med statistikkpakken DDPP på en Nord-100 datamaskin. Sporefordelingen ble undersøkt nærmere av Odd Aalen, og en formel ble utredet for tellepresisjonen, se Appendix.

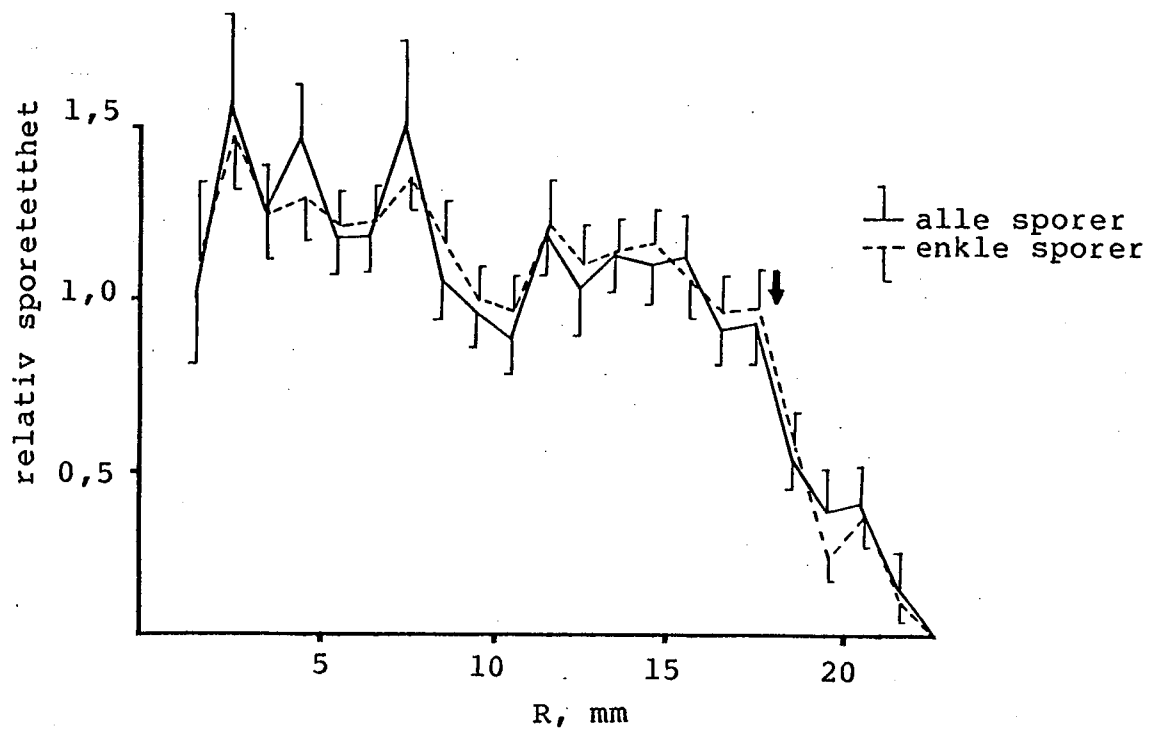
3. RESULTATER

3.1 Fordeling av sporer på filteret

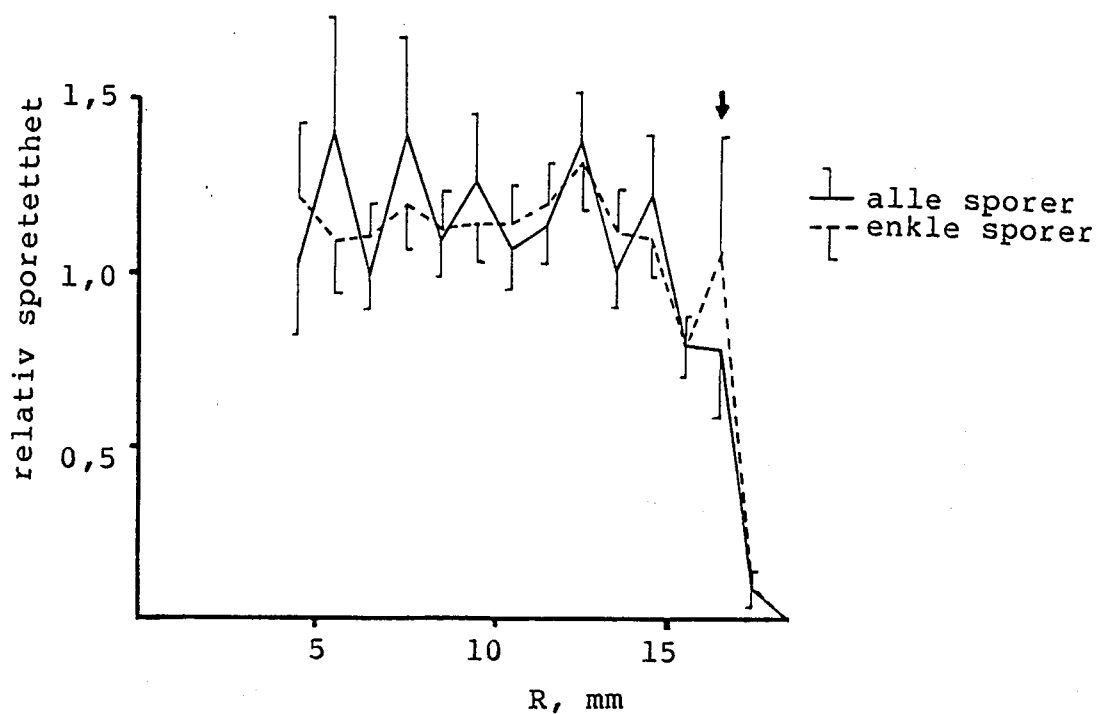
Sporetettheten varierte mellom prøvene og seriene. Gjennomsnittlig sporetetthet var 150-235 sporer/mm² i prøver som ble analysert direkte og 90-155 sporer/mm² i prøvene som ble vasket ut. En av prøvene som ble vasket ut ble forkastet p.g.a. lekkasje ved filtreringen. Tellerresultatene ble normalisert ved å dele med det gjennomsnittlige antall sporer per felt for hver prøve. Sporetettheten for ulike rader eller kolonner ble undersøkt med en-veis varians analyse, se Appendix. Det var signifikant forskjell mellom rader men ikke mellom kolonner. Siden sporefordelingen forventes å være rotasjonssymmetrisk ble avstanden fra feltene til midten av filteret, R, beregnet. Resultatene for de tre forskjellige prøvetyper går frem av figurene 4-6 og bilag 1-3. Resultatene er gitt for sporer som forekommer enkeltvis (enkle sporer) og for sporer uansett aggregatstørrelse (alle sporer). Det var liten forskjell mellom fordelingen for enkle sporer og for total antall sporer.



Figur 4: Relativ sporetetthet som funksjon av avstand til midten av filteret R for prøver tatt på Nucleopore filter i en åpen plast filterholder. Pilen angir kanten av filterholder.



Figur 5: Relativ sporetetthet som funksjon av avstand til midten av filteret R for prøver som ble vasket ut og filtrert ned på et Nuclepore filter. Pilen angir kanten av filterholderen.



Figur 6: Relativ sporetetthet som funksjon av avstand til midten av filteret R for prøver tatt på gullbelagt Nuclepore filter i en åpen messing filterholder. Pilen angir kanten av filterholderen.

En-veis variansanalyse viste at det var signifikant forskjell mellom sporetettheten på forskjellige avstand fra midten av filteret, se tabell 1 og 2 og bilag 1-3.

prøvetype	F-test
plast filterholder Nuclepore filter	F=10,2 *** df=18,2518
utvasket, Nuclepore filter	F= 6,06 *** df=22,2323
Messing filterholder gullbelagt Nuclepore filter	F= 6,00 *** df=15,787

*** $p < 0,001$

Tabell 1: Resultatene fra en-veis variansanalyse av sporetetthet på forskjellig avstand fra midten av filteret for tre forskjellige prøvetyper (antall frihetsgrader er redusert med antall prøver p.g.a. normeringen av tellingene).

I alle tre prøvetyper falt sporetettheten mot kanten av filterholderen. Kantrader som var signifikant forskjellige fra sporetettheten over hele filteret ble utelatt i en etterfølgende variansanalyse. Forskjellene i sporetetthet ble mindre, men var fortsatt signifikante for prøvene tatt med plastfilterholder og analysert direkte og for de utvaskede prøver, se tabell 2.

prøvetype	F-test
plast filterholder Nuclepore filter	F=1,82 * df=13,1957
utvasket, Nuclepore filter	F=2,12 ** df=17,1933
Messing filterholder gull-belagt Nuclepore filter	F=1,71 NS df=12,699

NS ikke signifikant * $p < 0,05$

** $p < 0,01$

Tabell 2: Resultater fra en-veis variansanalyse av sporetetthet på forskjellig avstand fra midten for tre prøvetyper. Kantsonen er utelatt fra analysen.

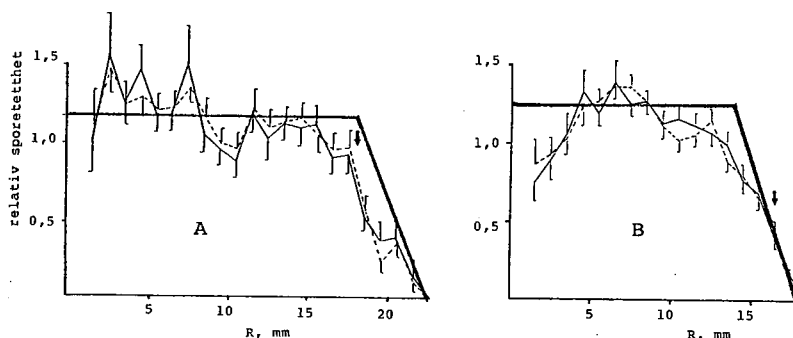
Sporetettheten på filterflaten ble undersøkt statistisk i prøver tatt med Millipore filterholder som ble analysert direkte og i prøver som ble vasket ut. Dette ble utført av Odd Aalen og er beskrevet i Appendix. Når kantradene utelates er enkle sporer og sporeaggregater nær tilfeldig fordelt på filterflaten.

3.2 Sammenligning av prøver analysert direkte og etter utvasking av sporene

3.2.1 Sporekonsentrasjon

Ved hjelp av sporefordelingen som funksjon av R ble det totale antall sporer i hver prøve beregnet. Sporekonsentrasjonen i prøver som ble analysert direkte var $2,41(0,44) \cdot 10^6$ sporer/m³ (N=5) og sporekonsentrasjonen i prøver som ble analysert etter utvasking var $2,06(0,52) \cdot 10^6$ sporer/m³ (N=4). Forskjellen var ikke signifikant (Student's t-test).

Antallet sporer ble også estimert med en modell av sporefordelingen, se figur 7.



Figur 7: Modell av sporefordelingen i utvaskede prøver (A) og i prøver som ble analysert direkte (B).

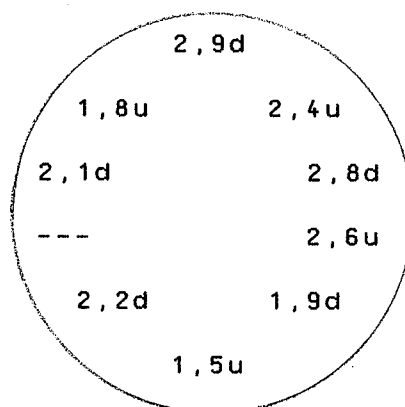
I modellen antas at sporetettheten er konstant innenfor kantsonen og at sporetettheten avtar lineært i kantsonen. Som kantsoner betraktes de ytterste radene hvor sporetettheten er signifikant forskjellig fra sporetettheten for hele filteret.

Totalt antall sporer i prøven estimeres med modellen på følgende måte:

- Sporer telles innenfor kantsonen
- Sporetettheten beregnes i sporer/mm²
- Sporetallet i prøven estimeres med en omregningsfaktor

Omregningsfaktoren var 808 for filter med diameter 37 mm (analysert direkte) og 1289 for filter med diameter 47 mm (utvaskede prøver), se Bilag 4.

Sporekonsentrasjonen beregnet på denne måten var $2,64(0,39) \cdot 10^6$ sporer/m³ i prøver som ble analysert direkte og $2,48(0,57) \cdot 10^6$ sporer/m³ i prøver som ble vasket ut. Resultatene av prøvene og plassering i prøvetakeren går frem av figur 8.



Figur 8: Sporekonsentrasjon i 10^6 sporer/m³ og plassering i prøvetaker av prøver som ble analysert direkte (d) og i prøver som ble vasket ut (u).

3.2.2 Sporeaggregater

Størrelsesfordelingen av sporeaggregater ble bestemt for begge prøvetyper. Resultatene er sammenfattet i tabell 3:

Aggregatstørrelse	Antall aggregater	
	direkte	utvasket
1	3400	2221
2	349,5	129
3	99	34,3
4	51,7	11,5
5	26	3
6	11	5
7	9	1
8	6,9	1
9	5,9	0,4
10-19	5,5	1
> 20	1,7	1,5
Σ	3971,2	2408,7

Tabell 3: Aggregatstørrelsesfordeling av prøver som ble analysert direkte og av utvaskede prøver.

I gjennomsnitt var det 1,29 sporer/aggregat i prøvene som ble analysert direkte og 1,14 sporer/aggregat i prøvene som ble vasket ut. Forskjellen mellom fordelingene ble undersøkt med Kji-kvadrat test. Fordelingene ble gruppert i fem grupper med aggregatstørrelse 1, 2, 3, 4 og >4. Fordelingene er signifikant forskjellige, $X^2=65,4$ $df=5$ $p<0,001$.

3.3 Tellepresisjon

En formel for forventet tellepresisjon ble utarbeidet, se Appendix. Den forutsetter at sporer og aggregater er tilfeldig fordelt på filterflaten og tar hensyn til at sporer forekommer i aggregater. For aggregater som ligger delvis i synsfeltet regnes størrelsen av delen som ligger i synsfeltet. Aggregatstørrelsesfordelingen ble beregnet for 5 prøveserier av muggsopp sporer og for 2 prøveserier av sporer fra aktinomyceter, se tabell 4:

Aggregat- størrelse	Antall aggregater						
	Muggsopp					Aktino- myceter	
	1	2	3	serie 4	5	6	7
1	327	372	475	3403	2222	126	240
2	78	58	91	351	130	82	86
3	24	11	39	100	34	33	45
4	8	9	20	51	12	15	13
5	7	2	9	26	3	6	10
6	5		7	13	5	2	7
7	4		1	10	1	1	8
8	1	1	4	6	1		2
9	1		3	5		4	2
10						2	2
11	1			1	1		
12				1		1	
13					1		
14				1			1
16			2	1			
17				1		3	
18				1			
20				2		1	
22						1	
24					1		
38				1			
Σ	457	453	651	3974	2411	277	416

Tabell 4: Aggregatstørrelsesfordeling av prøveserier tatt i forskjellige arbeidsmiljø. Serie 4 og 5 ble undersøkt i denne undersøkelsen. Serie 4 ble analysert direkte og serie 5 etter utvasking.

Forventet tellepresisjon ble beregnet på grunnlag av aggregatstørrelsesfordelingen for telling av henholdsvis 100 og 250 sporer. Videre ble beregnet antall sporer henholdsvis aggregater som må telles for å oppnå en forventet presisjon på 10%, se tabell 5:

serie	s_p	s_p	N_s	N_a
	$N = 100$ s	$N = 250$ s	$s = 10\%$ p	$s = 10\%$ p
1	16 %	10 %	254	163
2	14 %	9 %	185	146
3	17 %	11 %	293	184
4	16 %	10 %	243	188
5	13 %	8 %	163	143
6	24 %	15 %	559	234
7	18 %	12 %	341	174

Tabell 5: Relativ forventet presisjon (s_p) av 7 prøveserier beregnet for telling av 100 og 250 sporer per prøve. Videre angis antall sporer (N_s) og antall aggregater (N_a) som må telles for å oppnå en relativ presisjon på 10%. Serie 1-5 er prøver av muggsoppsporer, serie 5 ble vasket ut og serie 6 og 7 er prøver av aktinomycetsporer.

I en tidligere undersøkelse (6.1) ble presisjonen undersøkt ved telling av 10 parallelle prøver. Hver prøve ble telt 4 ganger, og hver gang ble telt 250 sporer. En-veis variansanalyse viste at tellepresisjonen var 12,1% når 250 sporer ble telt. Den forventede presisjon forutsatt at tellingene følger Poisson-fordeling er $s_p = \sqrt{250} = 6,3\%$ og er signifikant forskjellig fra presisjonen som ble funnet eksperimentelt: $X^2 = 57,9$ 30df $p < 0,01$. Den forventede presisjonen beregnet på grunnlag av aggregatstørrelsesfordelingen (serie 3, tabell 4 og 5) var bedre i overensstemmelse med presisjonen som ble funnet eksperimentelt: $s_p = 10,8\%$, $X^2 = 33,9$ 30df $0,25 < p < 0,50$.

4. DISKUSJON

Fordeling av sporer på filter

I prøvene som ble tatt direkte på filter i Millipore filterholder er sporefordelingen ujevn. Sporetettheten avtar mest mot kanten av filterholderen i en ca 5 mm bred sone og men også mot midten av filteret, figur 4 og tabell 1. Når kantsonen utelates viser variansanalysen fortsatt signifikante forskjell mellom sporetettheten for forskjellig avstand fra midten, tabell 2.

En mulig forklaring for kantsonen er at lufthastigheten avtar mot kanten av filterholderen av filterholderen. En annen forklaring for forskjellen i sporefordeling er elektrostatisk frastøting mellom sporene og filterholderen. Ikke-ledende materialer som plast blir lettere elektrostatisk oppladet enn ledende materialer som metall. Effekten av elektrostatisk oppladning forventes å være betydelig større for Millipore filterholdere enn for filterholdere laget av metall.

Sporefordelingen ble derfor undersøkt i prøver tatt med messing filterholder laget med samme dimensjoner som Millipore filterholderen. Luftstrømmen i messing filterholderen forventes å være tilnærmet lik luftstrømmen i Millipore filterholderen. Filterne ble gullbelagt for å redusere elektrostatisk oppladning mest mulig. Kantsonen med avtakende sporetetthet var betydelig mindre, 1-2 mm, og sporefordelingen var jevnere. Dette viser på at kantsonen i prøver tatt med Millipore filterholder bare delvis kan forklares av det grenseskiktet med laminær luftstrøm mot kanten av filterholderen. Elektrostatisk frastøting har sannsynligvis en betydelig effekt på deponering av sporer på filteret.

I de utvaskede prøver observeres også en kantsonen, men denne strekker seg ca 3 mm utover den indre diameter av filteroppsatsen, figur 5, tabell 1 og 2. Sporesuspensjonen blir antakelig suget inn mellom filteret og filteroppsatsen. Innenfor kantsonen avtar sporetettheten også svakt mot kanten av filteroppsatsen.

Fordelingen av sporer som forekommer enkeltvis har samme mønsteret som fordelingen av sporer inkludert sporeaggregater i tre prøvetyper, figur 4-6. Videre viser statistisk

analyse (se Appendix) at når kantsonen utelates er sporer som forekommer enkeltvis og i aggregater nær tilfeldig fordelt. Fordelingene av enkle sporer og av sporeaggregater kan derfor oppfattes som å være like.

Tellepresisjon

Når partikler som er tilfeldig fordelt telles, følger telleresultatene en Poisson fordeling (6.2). For Poissonfordelte variabler kan presisjonen (s_p) beregnes ved at variansen av en telling = antallet som er kvantifisert, N :

$$s_p = \sqrt{\text{varians}} = \sqrt{N}$$

Denne formelen gjelder for sporer som forekommer enkeltvis og for sporeaggregater (N = antall aggregater). Måleenheten for eksponering er antall sporer per m^3 luft. Det totale sporetallet er summen av alle sporer uansett aggregatstørrelse. Presisjonen av sporetellinger er derfor avhengig av aggregatstørrelsesfordelingen. En formel for den forventede tellepresisjonen går frem av Appendix. Ved beregning av forventet tellepresisjon benyttes fordelingen av aggregater og deler av aggregater slik de observeres i synsfeltet. Dette innebærer at tellepresisjonen bli bedre hvis mange felt med mindre størrelse telles istedenfor få store felt.

Beregning av den forventede presisjonen for 7 ulike prøveserier viste at 165-559 sporer eller 143-234 aggregater må telles i en prøve for å oppnå en relativ presisjon på 10%, tabell 5. Variasjonen i antall sporeaggregater er mindre enn variasjonen i antall sporer. Antall sporeaggregater bør derfor brukes som grunnlag for tellinger med et ønsket nivå for tellepresisjon.

I en tidligere undersøkelse (6.1) ble funnet at presisjonen for bestemmelse av sporekonsentrasjonen var 14 % når 250 sporer ble tallet i SEM. Tellingene ble foretatt på filterbiter med størrelse 15 x 15 mm klippet fra midten av filteret. Den viktigste årsak til varians var forbundet med telling av 250 sporer og det relative standardavviket var 12 %. Tellepresisjonen ble beregnet til 11 % og var i god overensstemmelse med de experimentelle resultater. Et konservativt estimat for andre feilkilder var 8 %. Den største feilkilde ved analyse av soppsporer vil i de fleste tilfeller være tellepresisjonen.

Telling av filterprøver

I metoden som vanligvis benyttes for partikkeltelling med SEM analyseres en bit av filteret med størrelse 5 mm x 5 mm. Ved beregning av antall partikler i prøven antas at partiklene er jevnt fordelt over den eksponerte del av filteret. For prøver tatt med messing filterholder vil denne beregningsmetode ikke medføre større feil. Men filterholderen er for tung for personlig prøvetaking og Millipore filterholdere bør benyttes*.

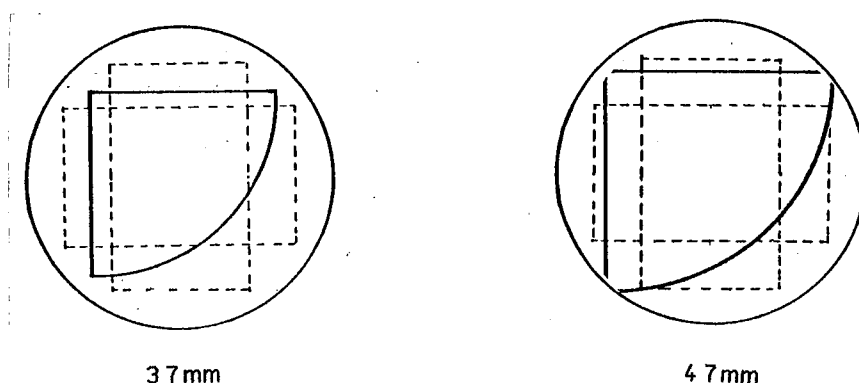
Variasjonen av sporetettheten i radiell retning i filterprøver som er tatt med Millipore filterholder fører til at betydelige feil kan oppstå hvis den vanlige analyse- og beregningsmetoden benyttes. Kantsonen utgjør ca 40% av filterarealet og må tas i betraktning ved analysen.

Integrasjon av sporetetthet over filteret er meget tidkrevende og derfor uegnet for rutineanalyse.

En modell for sporefordelingen på filter ble utarbeidet. Modellen forutsetter at sporetettheten er jevn innenfor kantsonen og avtar lineært i kantsonen, Bilag 4. Analysen blir foretatt på den delen av filteret hvor sporene antas å være jevnt fordelt. Modellen er følsom for små endringer i størrelse av kantsonen og det er derfor forbundet med usikkerhet å benytte modellen. Resultatene beregnet etter denne modellen var noe høyere enn resultatene etter integrasjonen av sporetettheten over hele filteret.

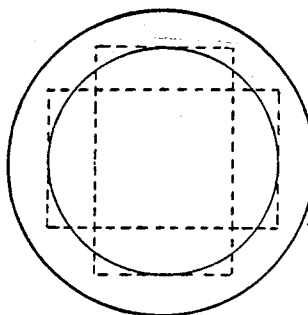
En tredje mulighet er å plassere feltene slik at de gir gjennomsnittet av sporefordelingen på filterflaten. Dette kan gjøres ved å legge feltene med lik avstand i x- og y-retning over hele filteret eller et segment av det. Dette medfører noen praktiske problemer: det største arealet som kan observeres med Jeol-35 er 15mm x 25mm og de største stubbene som kan brukes har diameter 32mm. Det er ikke mulig å plassere et 90⁰ segment av filter med Ø 47mm på stubbene og å telle over hele arealet, se figur 9.

* Det fremstilles nå filterholdere i grafittfylt polystyren med 25 mm diameter (Nuclepore) som er elektrisk ledende.



Figur 9: Plassering av segmenter av filtere med diameter 37mm og 47mm på stubber med diameter 32mm, og areal som kan observeres med SEM.

Filtere med diameter 25mm er å foretrekke fordi nesten hele arealet kan analyseres, se figur 10.



Figur 10: Plassering av filter med diameter 25 mm på stubber med diameter 32 mm og areal som kan observeres med SEM.

Utvasking av prøver

Sporekonsentrasjonen bestemt i prøver som ble analysert direkte er noe høyere enn i prøver som ble vasket ut, men forskjellen er ikke statistisk signifikant. Standardavviket av begge seriene var overraskende stort, ca 21%, siden det telt 700-800 sporer per prøve og presisjonen ble forventet å være mindre enn 10%. Årsaken til dette er sannsynligvis ujevn sporekonsentrasjon under prøvetaking forårsaket av trekk, fordi prøvene med høye og lave verdier er gruppert på hver sin side i prøvetakeren, se figur 8. I denne prøveserien ville bare forskjeller >50% kunne bli oppdaget med en sannsynlighet > 80%.

Utvasking av sporene fører til at aggregatene i betydelig grad blir delt opp. Som følge av dette kan prøver som vaskes ut ikke benyttes for bestemmelse av aggregatstørrelsesfordelingen.

5. KONKLUSJONER

- Fordelingene av sporer og sporeaggregater på filterflaten er tilnærmet tilfeldig fordelt, unntatt en kantsone, hvor sporetettheten avtar til 0.
- Kantsonen i prøver tatt med Millipore filterholder og analysert direkte forårsakes sannsynligvis av det grenseskiktet med laminær luftstrøm og av elektrostatiske oppladning av filterholderen.
- Prøver tatt med filterholdere fremstilt i messing viste den jevneste sporefordeling på filterflaten.
- En formel for beregning av forventet presisjon for telling av sporeprøver som inneholder aggregater er utarbeidet. Presisjonen beregnet med denne formelen er i overensstemmelse med presisjonen funnet i en tidligere undersøkelse.
- Telling av prøver bør utføres over et helt segment av filteret ved å plassere felt med lik avstand til hverandre.
- Ved utvasking av sporer blir aggregater delt opp.

6. LITTERATUR

- 6.1 Eduard W, Sandven P, Johansen BV og Bruun R. Identification and quantification of mould spores by scanning electron-microscopy: Analysis of filter samples collected in Norwegian saw mills.
Proceedings of the 6th International Symposium on Inhaled Particles, Cambridge 1985. I trykk.
- 6.2 Reist PC, VanCamerik SB og Chabot Jr GE. A further note on the reliability of membrane filter dust sample evaluation by microscope counting.
Ann occup hyg 13 201-201 1970
- 6.3 Blomquist G, Palmgren U og Ström G. Improved techniques for sampling airborne fungal particles in highly contaminated environments.
Scand j work environ health 10 253-258 1984
- 6.4 Sokal RR and Rohlf FJ.
Biometry. 2nd ed. Freeman, San Fransisco, 1981
- 6.5 Jackson JE.
All count distributions are not alike.
J Qual Technol 4 86-92 1972.

7. APPENDIX & BILAG

Appendix: Statistisk analyse av fordelingen av sporer på filterflaten, ved Odd Aalen

Bilag 1: Variansanalyse av relativ sporetetthet som funksjon av R. Prøvene er tatt på Nuclepore filter i Millipore filterholder.

Bilag 2: Variansanalyse av relativ sporetetthet som funksjon av R. Prøvene er tatt på Teflon filter i Millipore filterholder, vasket ut og filtret ned på et Nuclepore filter.

Bilag 3: Variansanalyse av relativ sporetetthet som funksjon av R. Prøvene er tatt på gullbelagt Nuclepore filter i messing filterholder.

Bilag 4: Modell for beregning av total antall sporer i filterprøver.

Appendix

STATISTISK ANALYSE AV FORDELINGEN AV SPORER PÅ FILTERFLATEN

ved
Odd Aalen

Innledning

Hvis sporene fordeler seg uavhengig av hverandre over filteret, vil de danne en Poissonprosess* med intensitet $\lambda(x,y)$ der (x,y) er posisjonen på filteret. Intensiteten angir det forventede antall forekomster i et tellingsfelt. Hvis $\lambda(x,y)$ er en konstant funksjon (ikke avhengig av (x,y)) sies prosessen å være homogen, ellers kalles den inhomogen.

Avvik fra en Poissonprosess kan ha minst to årsaker:

- (1) sporene foreligger delvis i clustre,
- (2) sporene kan "påvirke" hverandre på annet vis.

Hvis sporefordelingen var en homogen Poissonprosess, skulle, ifølge teorien, forventning og varians være like store. Det samme skulle da tilnærmet gjelde for de empiriske størrelser gjennomsnittet og den beregnede variansen:

$$\bar{X} = s^2 \quad \left(= \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2 \right) .$$

Hvis prosessen ikke er homogen Poisson gjelder ikke denne relasjonen.

Ved sammenlikninger beregner en ofte den såkalte dispersjonskoeffisienten:

$$D = \frac{s^2}{\bar{X}} .$$

Hvis den er vesentlig større enn 1, kan en ikke anta en homogen Poissonprosess. En snakker da om overdispersjon.

Hvis overdispersjonen bare skyldes clustre og ikke andre avhengigheter, vil en måtte telle det følgende antall sporer for å få en analysepresisjon på 10%:

$$\text{Antall sporer} = 100 D .$$

* prosess = fordeling av f.eks. partikler over et område

Fordeling av totalt antall sporer.

Jeg har beregnet dispersjonskoeffisientene for 8 av de filtre jeg har data for. Resultatene er gitt i følgende tabell:

Filter nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Disp.koeff.	2.57	2.33	2.10	2.92	4.70	1.65	1.83	2.67

For filter 5 har en enkelt observasjon på 44 sporer i ett felt stor innflytelse. For filter 8 har en enkelt observasjon på 25 sporer stor innflytelse.

Sammenholdes resultatene i tabellen med formelen nederst på forrige side, ser en at 200-300 sporer må telles før analysepresisjon 10% oppnås. Som sagt tidligere forutsetter en da at clusterne er hovedårsaken til overdispersjonen.

Fordeling av enkeltsporer

Hvis overdispersjonen i sin helhet skyldes clusterne, skulle en vente at fordelingen av enkeltsporer ville følge en Poissonprosess. Jeg har derfor beregnet dispersjonskoeffisientene til enkeltsporene og stilt dem opp i følgende tabell:

Filter nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Disp.koeff.	1.42	1.28	1.23	1.45	1.31	1.27	1.21	1.09

En ser at overdispersjonen er betydelig redusert. En del av den resterende overdispersjon skyldes heterogenitet, i det det er færre sporer langs kantene. Som tilfeldig valgt eksempel ser jeg her på filter 2. Ved å ta bort de 6 ekstreme radene på hver side, fås $D = 1.08$. Liknende resultater får en for de andre filterne.

Det er altså mye som tyder på at fordelingen av enkeltsporer kan betraktes å være nær en inhomogen Poissonprosess. For å begrunne dette nærmere, lønner det seg å innføre en transformasjon av tellingen i hver rute, nemlig den såkalte Freeman-Tukey-transformerte (6.4). La X være antall enkeltsporer som er talt i en rute. Da er den transformerte gitt ved:

$$Y = \frac{1}{2}(\sqrt{X} + \sqrt{X+1})$$

Hvis vi har å gjøre med en Poissonprosess, skal Y ha et standardavvik som er svært nær 0.5. En forutsetning er at forventningen til X er minst lik 1. Dette siste kravet er ganske bra oppfylt i vårt tilfelle (iallfall for filterne 1 til 5), men svikter litt langs randene. Dette skulle likevel ikke ha så stor betydning.

Med utgangspunkt i variabelen Y har jeg laget enveis variansanalyser med radnummer eller kolonnennummer (feltnummer) som faktor. Som eksempel bruker jeg filter 2 (som er ganske tilfeldig valgt). Vedlegg 1 inneholder computerutskrift for denne analysen. I den første variansanalysen er det benyttet radnummer som faktor. Verdien $F=3.94$ er meget signifikant ($p<0.001$) og viser at det er en variasjon mellom ulike rader. Under variansanalysen er gjennomsnitt og standardavvik for de enkelte rader listet opp, supplert med beregning av et felles ("pooled") standardavvik på 0.527. Dette er nær den verdi, 0.5, en skulle forvente i tilfelle av en Poissonprosess. Det tyder derfor på at prosessen er nær Poisson. I vedlegg 1 følger deretter en figur som viser gjennomsnittene for de enkelte rader supplert med 95% konfidensintervaller. Det fremgår tydelig at verdiene stiger mot midten av filteret, og krappest til å begynne med.

I vedlegg 1 er det dernest utført en liknende variansanalyse, denne gang med kolonnennummer som faktor. Det er ingen signifikant variasjon over kolonnene. En ser også dette av den avsluttende figuren i vedlegget.

Analysen så langt indikerer at enkeltsporene utgjør en inhomogen Poissonprosess, der inhomogeniteten skyldes variasjon over radene. Vi får liknende resultater for de andre filterne.

Jeg har også utført analyser med sikte på å finne ut om det er avhengigheter mellom antallene i de forskjellige felter (i en Poissonprosess skulle det være uavhengighet). Analysene tyder på at en eventuell avhengighet er meget liten.

Fordeling av clustre

Når fordelingen av enkeltsporer utgjør en Poissonprosess, er det nærliggende å tro at det samme vil gjelde fordelingen av clustre. Vi betrakter altså hvert enkelt cluster, bestående av to eller flere sporer, som en enhet. Vi spør oss så om disse følger en Poissonprosess. Som ovenfor kan vi starte med beregning av dispersjonskoeffisienter for de enkelte filtere. Jeg får

følgende resultater:

Filter nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Disp.koeff.	1.10	1.18	1.06	1.12	0.98	0.94	1.00	1.11

Dette tyder på at vi har ganske nær en Poissonprosess. Sannsynligvis ville resultatet bli ennå bedre ved å fjerne radene langs randen. Det har jeg ennå ikke fått sett på.

Korrelasjonsanalyser som jeg har utført, ser ut til å vise at clusterprosessen er uavhengig av prosessen av enkeltsporer.

Så langt ser det altså ut som om prosessen av enkeltsporer og prosessen av clustre utgjør to uavhengige poissonprosesser. Nedenfor er gjengitt de gjennomsnittlige antall enkeltsporer og gjennomsnittlige antall clustre for hvert av de 8 første filtre:

Filter nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Gj.sn. ant. enkeltsp.	1.63	1.51	1.08	1.20	1.15	1.11	1.21	0.67
Gj.sn. ant. clustre	0.21	0.28	0.16	0.21	0.26	0.10	0.08	0.06

(Gjennomsnittene er beregnet pr. tellefelt).

Clusterstørrelser

Som eksempel på fordelingen av clusterstørrelser presenterer jeg nedenfor en tabell for filter 2. Jeg har tatt med enkeltsporene, i det jeg oppfatter dem som clustre av størrelse 1 (gjelder bare her).

Clusterstørrelse for filter 2:

Størrelse	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Antall clustre	770	76	26	15	6	5	2	1	0	0	1	0	0	1

En ser at de fleste clusterne er små, men at det også er noen ganske få som er meget store. Tilsvarende resultater får en for de andre filterne også. Jeg har foreløpig ikke funnet noen funksjon som beskriver godt clusterfordelingene for de enkelte filtre. Det er dog klart at vanlige fordelinger som Poisson eller negativ-binomisk ikke passer. Den observerte fordeling er alt for mye spredt ut.

Sammenligning med kjente clusterprosesser

En del eksempler på slike blir gitt av J. Edward Jackson (6.5). Vår prosess er en "generalized Poisson distribution" slik den på side 88 i artikkelen. Det er imidlertid hverken en "Neyman type A" eller "Thomas" fordeling fordi fordelingen av clusterstørrelser er for mye spredt ut.

Analysepresisjon

Nederst på side 1 betraktet jeg analysepresisjonen ut fra dispersjonskoeffisienten D . Jeg hevdet der at en må telle i alt 100 D sporer for å oppnå en presisjon på 10%. Jeg vil begrunne dette nærmere, men først vil jeg utlede et teoretisk uttrykk for D .

Anta at en teller over et visst felt og finner N clustre. (Jeg vil nå inkludere enkeltsporene blant clustrene, slik at disse følgelig har en størrelse fra 1 og oppover). Størrelsen N er tidligere vist å være Poissonfordelt, la oss si med en intensitet λ_C . La U_1, U_2, \dots, U_N betegne størrelsene av de N clusterne. I alt teller en altså følgende antall sporer:

$$A = U_1 + U_2 + \dots + U_N.$$

La EU og $\text{Var}U$ betegne forventning og varians for clusterstørrelsen. Etter vanlige regneregler for sannsynlighet er forventningsverdien til A gitt ved:

$$EA = E(A/N) = E(N \cdot EU) = EU \cdot EN = \lambda_C EU$$

Variansen til A er gitt ved:

$$\text{Var}A = \text{Var}E(A/N) + E\text{Var}(A/N) = \text{Var}(N \cdot EU) + E(N \cdot \text{Var}U)$$

$$(EU)^2 \text{Var}N + \text{Var}U \cdot EN = \lambda_C ((EU)^2 + \text{Var}U) = \lambda_C E(U^2)$$

Dispersjonskoeffisienten er da:

$$D = \frac{\lambda_C E(U^2)}{\lambda_C EU} = \frac{E(U^2)}{EU}$$

som sees å være uavhengig av størrelsen på tellefeltet. I praksis kan D beregnes ved hjelp av:

$$D = \frac{\sum i^2 f(i)}{\sum i f(i)}$$

der $f(i)$ er den relative hyppighet av clusterer som inneholder i sporer i en observert clusterfordeling.

I beregningen er det en forutsetning at alle U_i er uavhengige av hverandre. Dette er rimeligvis oppfylt. Forøvrig er det viktig å merke at en bare skal regne med den delen av et cluster som faller innenfor tellefeltet. En praktisk betydning av dette er at det lønner seg å ha mange små tellefelter, fremfor færre store, hvis det er mange store clustre. Dette vil føre til mindre observerte U -verdier, dvs. mindre D , og følgelig større presisjon.

Jeg vil nå nærmere begrunne sammenhengen mellom D og presisjonen. En ønsker å estimere antall sporer pr. felt, dvs. $\lambda = \lambda_C EU$. En teller over n felter, og finner ialt S sporer. Estimatet for λ blir $\lambda^* = S/n$. Som i den tidligere beregning fås:

$$E\lambda^* = \frac{n\lambda_C EU}{n} = \lambda \quad \text{og} \quad \text{Var}\lambda^* = \frac{n\lambda_C E(U^2)}{n^2} = \frac{\lambda D}{n}$$

10% analysepresisjon vil si:

$$SD\lambda^* = 0.1 \lambda$$

Innsetting gir:

$$\frac{\lambda D}{n} = 0.01 \lambda^2, \quad \text{dvs.: } n\lambda = 100 D.$$

Her er $n\lambda$ nettopp det forventede antall sporer som telles, og jeg har altså bekreftet formelen nederst s.1.

Presisjonen kan også beregnes på følgende måte:

$$\text{Den relative presisjonen} = \sqrt{\frac{SD\lambda^*}{\lambda}} = \frac{1}{\lambda} \sqrt{\frac{\lambda D}{n}} = \sqrt{\frac{\lambda D}{n\lambda^2}} = \sqrt{\frac{D}{n\lambda}}$$

som ut fra data kan estimeres ved:

$$\text{Den relative presisjonen} = \sqrt{\frac{D}{S}}$$

Vedlegg

Variansanalyse over rader på Freeman-Tukey transformerte data fra filter 2

-- NOTE DATA FRA FILTER 2
 -- NOTE BRUKER FREEMAN-TUKEY TRANSFORMERT VARIABLE DELT PÅ 2
 -- ONEW C25 C2

ANALYSIS OF VARIANCE

DUE TO FACTOR	DF	SS	MS=SS/DF	F-RATIO
	33	36.078	1.093	3.94
ERROR	476	132.020	0.277	
TOTAL	509	168.099		

LEVEL	N	MEAN	ST. DEV.
1	15	0.666	0.352
2	15	0.845	0.543
3	15	1.283	0.513
4	15	1.067	0.376
5	15	0.970	0.490
6	15	1.155	0.470
7	15	1.315	0.498
8	15	1.157	0.526
9	15	1.231	0.562
10	15	1.421	0.544
11	15	1.211	0.535
12	15	1.353	0.641
13	15	1.679	0.509
14	15	1.276	0.460
15	15	1.313	0.617
16	15	1.365	0.614
18	15	1.342	0.428
19	15	1.097	0.576
20	15	1.711	0.397
21	15	1.325	0.589
22	15	1.460	0.565
23	15	1.560	0.654
24	15	1.442	0.431
25	15	1.564	0.477
26	15	1.602	0.337
27	15	1.185	0.637
28	15	1.380	0.525
29	15	1.671	0.525
30	15	1.417	0.617
31	15	1.110	0.552
32	15	1.150	0.648
33	15	0.892	0.542
34	15	1.003	0.610
35	15	0.594	0.249

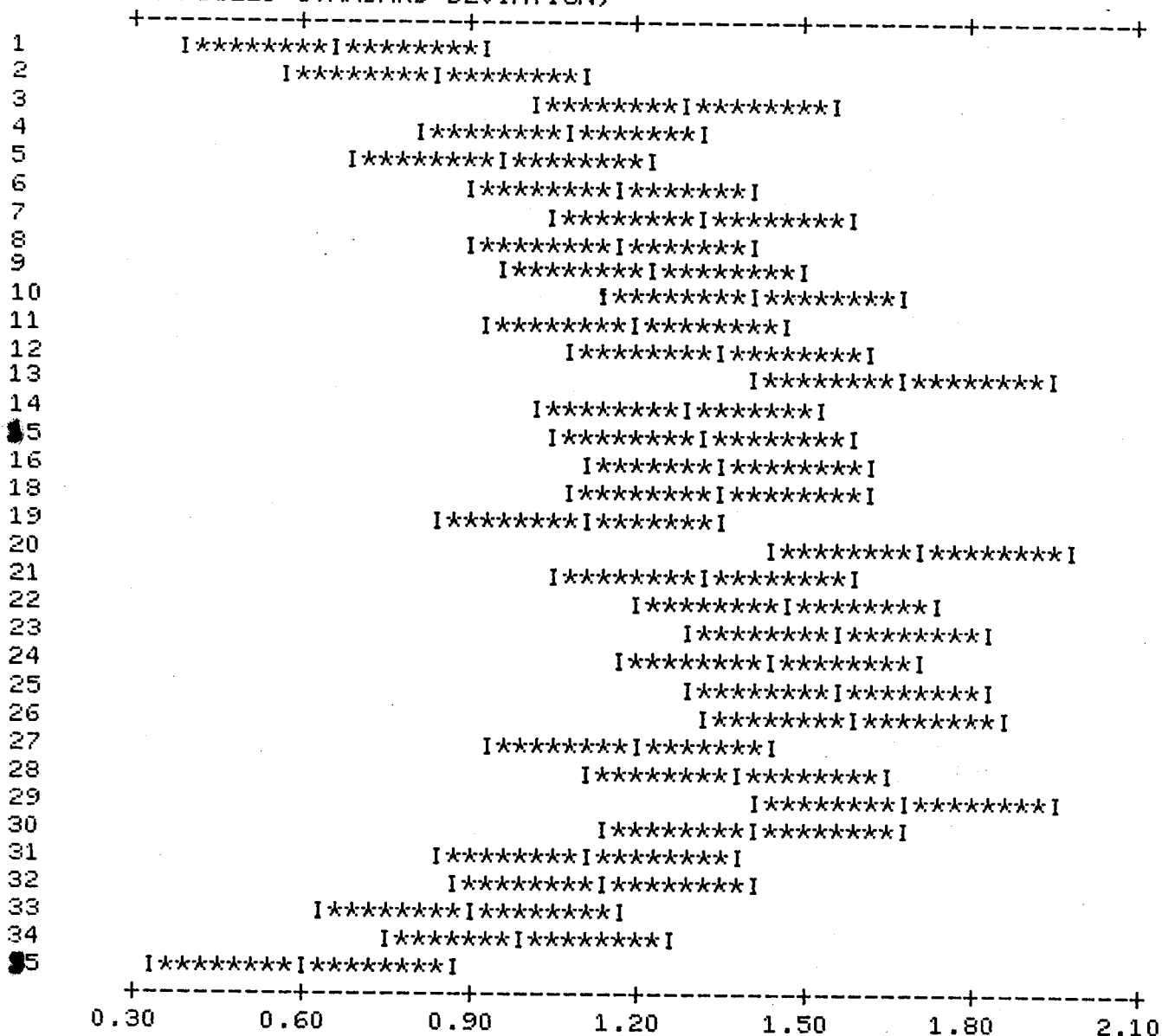
POOLED ST. DEV. =

0.527

Gjennomsnitt og standardavvik gis for hver rad. Standardavvikene er nær 0,5 slik de skal være ved en Poisson prosess. F-test viser signifikant variasjon mellom radene, $p < 0,001$.

Gjennomsnitt for hver rad og 95% konfidensinterval.

INDIVIDUAL 95 PERCENT C. I. FOR LEVEL MEANS
(BASED ON POOLED STANDARD DEVIATION)



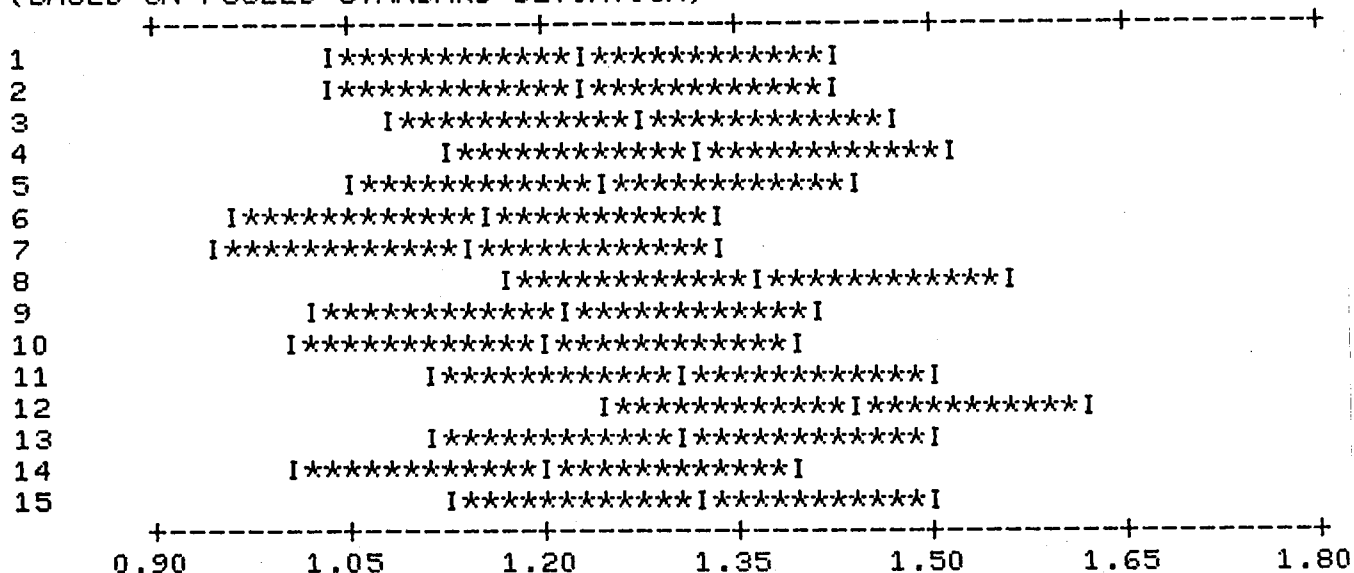
Variansanalyse over kolonner på Freeman-Tukey transformerte data fra filter 2, gjennomsnitt for hver kolonne og 95% konfidensintervall

ANALYSIS OF VARIANCE

DUE TO FACTOR	DF	SS	MS=SS/DF	F-RATIO
	14	3.246	0.232	0.70
ERROR	495	164.853	0.333	
TOTAL	509	168.099		

LEVEL	N	MEAN	ST. DEV.	
1	34	1.225	0.656	} POOLED ST. DEV. = 0.577
2	34	1.223	0.596	
3	34	1.269	0.557	
4	34	1.325	0.629	
5	34	1.239	0.465	
6	35	1.148	0.576	
7	34	1.133	0.610	
8	34	1.372	0.614	
9	34	1.217	0.560	
10	34	1.196	0.549	
11	34	1.298	0.592	
12	34	1.433	0.549	
13	33	1.308	0.567	
14	34	1.194	0.596	
15	34	1.313	0.512	

INDIVIDUAL 95 PERCENT C. I. FOR LEVEL MEANS
(BASED ON POOLED STANDARD DEVIATION)



F-test viser ikke signifikant variasjon mellom kolonner.

Bilag 1:

Variansanalyse av relativ sporetetthet som funksjon av R. Prøvene er tatt på Nuclepore filter i Millipore filterholder (N=5).

R = Avstand til midten av filteret i mm.
 p = Signifikansnivå for sammenligning av sporetetthet ved ulike R med tettheten for hele filteret.
 subject= Antall felt som er telt.

R	NUMBER OF SUBJECTS		SUM	MINIMUM	MAXIMUM	MEAN-VALUE	STANDARD-DEVIATION	STANDARD ERROR OF THE MEAN	P
	COUNTED	LEFTOUT							
0 0	4.0	0.0	6.430	0.420	3.720	1.607	1.455	0.728	
0 1	34.0	0.0	24.590	0.000	2.140	0.723	0.684	0.117	
0 2	67.0	0.0	58.110	0.000	4.810	0.867	1.046	0.128	
0 3	99.0	0.0	102.210	0.000	8.340	1.032	1.289	0.130	
0 4	126.0	0.0	163.410	0.000	8.740	1.297	1.509	0.134	**
0 5	174.0	0.0	202.530	0.000	5.950	1.164	1.133	0.086	**
0 6	199.0	0.0	270.460	0.000	21.620	1.359	1.847	0.131	***
0 7	223.0	0.0	272.340	0.000	6.910	1.221	1.208	0.081	***
0 8	192.0	0.0	237.320	0.000	6.000	1.236	1.126	0.081	**
0 9	187.0	0.0	205.400	0.000	6.380	1.098	1.066	0.078	**
1 0	166.0	0.0	187.160	0.000	9.570	1.127	1.192	0.092	
1 1	155.0	0.0	178.540	0.000	7.370	1.082	1.098	0.086	
1 2	166.0	0.0	172.620	0.000	5.580	1.040	1.005	0.078	
1 3	174.0	0.0	167.630	0.000	7.860	0.963	1.150	0.087	
1 4	157.0	0.0	116.170	0.000	3.920	0.740	0.825	0.066	**
1 5	157.0	0.0	103.690	0.000	9.180	0.660	1.066	0.085	***
1 6	124.0	0.0	47.860	0.000	3.920	0.336	0.645	0.058	***
1 7	100.0	0.0	15.920	0.000	3.000	0.159	0.421	0.042	***
1 8	28.0	0.0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	***
\$ \$	0.0	5.0							***
TOTAL	2542.0	5.0	2532.390	0.000	21.620	0.996	1.198	0.024	

ANALYSIS OF VARIANCE FOR 19 GROUPS
 BETWEEN SUM OF SQUARES = 248.6711 VARIANCE = 13.8151 NDF = 18
 WITHIN SUM OF SQUARES = 3395.5408 VARIANCE = 1.3458 NDF = 2523
 TOTAL SUM OF SQUARES = 3644.2120 VARIANCE = 1.4342 NDF = 2541
 F-VALUE = 10.265 PROBABILITY = 0.00000 ***

Bilag 2: Variansanalyse av relativ sporetetthet som funksjon av R. Prøvene er tatt på Teflon filter i Millipore filterholder, vasket ut og filtret ned på et Nuclepore filter (N=4).

R = Avstand til midten av filteret i mm.
 p = Signifikansnivå for sammenligning av sporetetthet ved ulike R med tettheten for hele filteret.
 subject= Antall felt som er telt.

R	NUMBER OF SUBJECTS		SUM	MINIMUM	MAXIMUM	MEAN-VALUE	STANDARD-DEVIATION	STANDARD ERROR OF THE MEAN	p
	COUNTED	LEFTOUT							
0 0	5.0	0.0	6.540	0.000	5.800	1.308	2.531	1.132	
0 1	34.0	0.0	33.120	0.000	4.640	0.974	1.080	0.185	
0 2	62.0	0.0	94.940	0.000	6.180	1.531	1.414	0.180	*
0 3	82.0	0.0	100.140	0.000	5.200	1.221	1.206	0.133	
0 4	102.0	0.0	145.770	0.000	8.940	1.429	1.723	0.171	*
0 5	150.0	0.0	171.460	0.000	6.580	1.143	1.159	0.095	
0 6	147.0	0.0	169.590	0.000	8.250	1.154	1.221	0.101	
0 7	165.0	0.0	243.580	0.000	29.030	1.476	2.521	0.196	***
0 8	122.0	0.0	126.070	0.000	6.850	1.033	1.177	0.107	
0 9	107.0	0.0	100.120	0.000	5.870	0.936	0.972	0.094	
1 0	111.0	0.0	95.970	0.000	7.420	0.865	1.067	0.101	
1 1	114.0	0.0	132.360	0.000	4.890	1.161	1.215	0.114	
1 2	122.0	0.0	122.520	0.000	10.450	1.004	1.404	0.127	
1 3	144.0	0.0	158.100	0.000	8.130	1.098	1.168	0.097	
1 4	120.0	0.0	128.500	0.000	5.500	1.071	1.121	0.102	
1 5	120.0	0.0	131.230	0.000	8.310	1.094	1.360	0.124	
1 6	124.0	0.0	110.050	0.000	6.960	0.888	1.057	0.095	
1 7	124.0	0.0	111.960	0.000	6.680	0.903	1.174	0.105	
1 8	132.0	0.0	70.530	0.000	6.850	0.534	0.975	0.085	***
1 9	119.0	0.0	43.660	0.000	11.750	0.367	1.355	0.124	***
2 0	103.0	0.0	40.040	0.000	5.870	0.389	1.083	0.107	***
2 1	37.0	0.0	5.610	0.000	3.480	0.152	0.613	0.101	***
2 2	4.0	0.0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	***
3 3	0.0	8.0							
TOTAL	2350.0	8.0	2341.860	0.000	29.030	0.997	1.376	0.028	

ANALYSIS OF VARIANCE FOR 23 GROUPS
 BETWEEN SUM OF SQUARES = 241.5139 VARIANCE = 10.9779 HDF = 22
 WITHIN SUM OF SQUARES = 4208.6527 VARIANCE = 1.8086 HDF = 2327
 TOTAL SUM OF SQUARES = 4450.1666 VARIANCE = 1.8945 HDF = 2349
 F-VALUE = 6.070 PROBABILITY = 0.00000 ***

Bilag 3: Variansanalyse av relativ sporetetthet som funksjon av R. Prøvene er tatt på gullbelagt Nuclepore filter i messing filterholder (N=5).

R = Avstand til midten av filteret i mm.
 p = Signifikansnivå for sammenligning av sporetetthet ved ulike R med tettheten for hele filteret.
 subject= Antall felt som er telt.

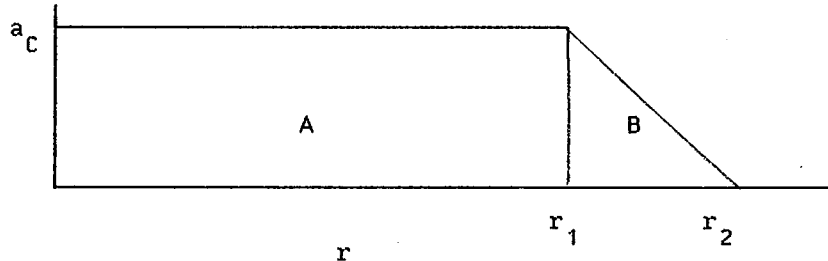
R	NUMBER OF SUBJECTS		SUM	MINIMUM	MAXIMUM	MEAN-VALUE	STANDARD-DEVIATION	STANDARD-ERROR OF THE MEAN	p
	COUNTED	LEFTOUT							
0 3	6.0	0.0	8.586	0.687	2.404	1.431	0.734	0.300	
0 4	20.0	0.0	20.234	0.000	2.938	1.012	0.880	0.197	
0 5	32.0	0.0	45.018	0.000	10.005	1.407	1.873	0.331	*
0 6	65.0	0.0	64.240	0.000	3.526	0.988	0.798	0.099	
0 7	54.0	0.0	75.705	0.000	12.439	1.402	1.922	0.262	*
0 8	64.0	0.0	69.711	0.000	3.785	1.089	0.850	0.106	
0 9	57.0	0.0	72.077	0.000	8.244	1.265	1.402	0.186	
1 0	66.0	0.0	70.308	0.000	4.597	1.065	0.949	0.117	
1 1	58.0	0.0	65.566	0.000	3.778	1.130	0.788	0.103	
1 2	59.0	0.0	81.634	0.000	4.936	1.384	1.043	0.136	*
1 3	58.0	0.0	58.149	0.000	3.878	1.003	0.793	0.104	
1 4	59.0	0.0	72.516	0.000	7.213	1.229	1.271	0.165	
1 5	67.0	0.0	53.603	0.000	3.435	0.800	0.826	0.101	
1 6	58.0	0.0	45.307	0.000	10.305	0.781	1.530	0.201	
1 7	52.0	0.0	5.057	0.000	2.660	0.097	0.416	0.058	***
1 8	33.0	0.0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	***
TOTAL	808.0	0.0	807.711	0.000	12.439	1.000	1.170	0.041	

ANALYSIS OF VARIANCE FOR 16 GROUPS			
BETWEEN SUM OF SQUARES	=	113.5261	VARIANCE = 7.5684 NDF = 15
WITHIN SUM OF SQUARES	=	992.0825	VARIANCE = 1.2526 NDF = 792
TOTAL SUM OF SQUARES	=	1105.6086	VARIANCE = 1.3700 NDF = 807
F-VALUE	=	6.042	PROBABILITY = 0.00000 ***

Bilag 4:

Modell for beregning av total antall sporer i filterprøver

Følgende modell ble antatt for sporefordelingen:



Det totale antall sporer i prøven er gitt av:

$$N = N_A + N_B$$

(N = antall sporer i prøven, N_A = antall sporer i område A og N_B = antall sporer i område B)

$$N_A = a_C \pi r_1^2$$

(a_C = sporetettheten i område A)

$$N_B = aB$$

(a = sporetettheten i området B)

Siden a ikke er konstant må N_B beregnes ved integrasjon over område B:

$$N_B = \int_{r_1}^{r_2} a dB$$

Både B og a er funksjoner av r :

$$B = \pi r^2 \quad \rightarrow \quad dB = 2\pi r dr$$

$$a = a_C \left\{ \frac{r - r_2}{r_1 - r_2} \right\}$$

$$N_B = \int_{r_1}^{r_2} a_C \left\{ \frac{r - r_2}{r_1 - r_2} \right\} 2\pi r dr = \frac{a_C 2\pi}{r_1 - r_2} \cdot \int_{r_1}^{r_2} (r - r_2) r dr =$$

$$\frac{a_C 2\pi}{r_1 - r_2} \left[\frac{r^3}{3} - \frac{r_2 r^2}{2} \right]_{r_1}^{r_2} = \frac{a_C 2\pi}{r_1 - r_2} \left\{ \frac{r_1^2 r_2}{2} - \frac{r_1^3}{3} - \frac{r_2^3}{6} \right\} =$$

$$\frac{a_c \pi}{3} \left\{ \frac{3r_1^2 r_2 - 2r_1^3 - r_2^3}{r_1 - r_2} \right\}$$

Det totale antall sporer kan nå beregnes:

$$N = N_A + N_B = a_c \pi r_1^2 + \frac{a_c \pi}{3} \left\{ \frac{3r_1^2 \cdot r_2 - 2r_1^3 - r_2^3}{r_1 - r_2} \right\} =$$

$$\longrightarrow \boxed{N = \frac{a_c \pi}{3} (r_1^2 + r_1 r_2 + r_2^2)}$$

For Millipore filterholder og Nuclepore filter er $r_1 = 14$ mm og $r_2 = 18$ mm $\rightarrow N = 808 \cdot a_c$
 For utvaskede prøver på et filter med diameter 47 mm er $r_1 = 18$ mm og $r_2 = 21,5$ mm $\rightarrow N = 1229 \cdot a_c$