

UUSIA SISÄILMAN TUTKIMUSMENETELMIÄ

Maria Andersson^{1,3}, Elisa Aattela², Raimo Mikkola³, Janne Atosuo⁴, Esa-Matti Lilius⁴, Eetu Suominen⁴, Simo Lehtinen⁵, Martti Viljanen³ ja Mirja Salkinoja-Salonen¹

¹Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos Helsingin yliopisto

²Sisäilmatutkimuspalvelut Elisa Aattela Oy

³Rakennustekniikan laitos Aalto yliopisto

⁴Biokemian Laitos Turun yliopisto,

⁵Mikrofokus Oy

TIIVISTELMÄ

Sisäilmaa on jokaisen tilankäyttäjän pakko hengittää, joten toistettaville, terveyshaitan arviointiin soveltuville näytteenkeruumenetelmille sisäilmahaittaiseksi epäillyn rakennuksen ilmasta tai rakenteista on suuri tarve. Tässä työssä esitellään kolme uutta tekniikkaa, joita voidaan hyödyntää sisäilmahaittojen tunnistuksessa ja päästölähteiden paikantamisessa: 1. sisäilman vesihöyryn tiivisteen toksisuuden mittaust; 2. epäorgaanisten sulfidien (mm. rikkivety) muodostuksen tunnistaminen rakenteissa; 3. koneellisen ilmanvaihdon epäpuhtaus-kuorman arviointi tulo- ja poistoilmakoneiden suodattimista solutoksikologisista menetelmin.

JOHDANTO

Sisäilman liittyvien terveyshaittojen on Suomessa havaittu usein kytkeytyvän rakennuksen kosteuteen. Kosteus sinänsä ei kuitenkaan tee ihmistä sairaaksi ja Suomessa sisäilma on etenkin kylmänä vuodenaikana enemmän liian kuivaa kuin kosteaa; talvinen sisäilman RH-arvo saattaa olla <30 %. Rakennusten kosteus- ja homevaurioon liittyvien terveyshaittojen on arveltu johtuvan kosteissa rakenteissa esiintyvistä mikrobin kasvusta tai niiden aineenvaihdunta-tuotteista /1-3/.

Vakavasti sisäilmahaittaisista rakennuksista on löydetty mm. *Stachybotrys chartarum*, *Penicillium*, *Aspergillus* ja *Trichoderma* sukujen lajeja, jotka tunnetaan myös kasvipatogeeneina ja nestemäisten toksiinipisaroiden erittäjinä /4 – 9/. Pisaroissa (guttation droplets) toksiinien pitoisuudet saattavat ylittää 10 – 1000 kertaisesti rihmastosta tai itiöistä mitatut pitoisuudet /4-9/. Rakennushomeiden erittämiä toksisia pisaroita niiden kulkeutumista ilmassa tutkittiin ensi kerran vasta äskettäin /9/.

Teollisuus- ja maatalousympäristöissä rikkivety tunnetaan jo vuosikymmeniä terveyshaitan ja vakavien myrkytysten aiheuttajana, mutta asuntojen, toimistojen, julkisten ja yksityisten tilojen sisäilmahaitan aiheuttajana rikkiyhdisteet ovat Suomessa jääneet tutkimatta. On ehkä ajateltu rikkivedyn terveyshaittojen rajoittuvan niihin pitoisuuksiin, jotka voi tunnistaa hajuhaitasta /10, 11/. Rikkivety on rasvaliukoinen, ilmaa raskaampi kaasu, joka diffundoituu rakenteiden läpi ja imeytyy millisekunneissa ihon läpi ja hengitysilma-verenkiertoon /12, 13/.

Hapettomaan tilaan joutuneet, kostuneet kipsirakenteet (kalsium sulfaatti) hajoavat sulfaattia pelkistävien bakteerien (SRB) toimesta myrkyllisiksi kaasuiksi, rikkivety H₂S ja rikkihiili CS₂ /14 - 16/. Sulfidikaasuja syntyy myös viemäreissä. Ihmiskäytössä olevissa rakennuksissa rikkivedyn tuottoa on tutkittu vain vähän, ehkä siksi, että riittävän herkkiä, helppokäyttöisiä mittareita ei ole ollut tarjolla. Esittelemme yksinkertaisella keräimellä saatuja tuloksia sulfidikaasuista rakenteiden sisällä ja sisäilmassa.

TUTKIMUKSEN MENETELMÄT

Kondenssivesien kerääminen sisäilmasta

Kondenssivesinäytteet kerättiin jäädyttämällä sisäilmaa sähkökäyttöisellä (peltier) elementillä tai kuivajäällä (E-keräin). Saman kohteen eri tilojen välillä keräimet huuhdottiin etanolilla (EtaxA). Kondenssivesinäytteiden tavoitetilavuus (25 – 50 ml per tutkittu tila) suunniteltiin siten, että keräystä aloitettaessa mitattiin tutkittavan sisätila RH % ja lämpötila, joiden perusteella arvioitiin kondenssivilavuutta vastaava laskennallinen ilmamäärä, 6 – 15 m³. Verrokinäytteet otettiin ulko-oven lähellä ulkoilmasta. Näytteiden pitkäaikaissäilytys oli pakasteessa. Kondenssivesien pH tarkistettiin gradeeratuilla pH liuskoilla (Merck), ja tarvittaessa säädettiin, pH 5,5 ± 0,2. Kondenssien tai niistä haihduttamalla väkevöityjen (vetokaappi, lämpölevy 60 °C) näytteiden biologista haittavaikuttavuutta mitattiin solutesteillä.

IV- koneiden tutkiminen

Toimistorakennuksen ja koulun (valituskohteita) tulo- ja poistoilmakoneiden suodattimet (= 2 + 2) otettiin talteen vaihdon yhteydessä. Rinnakkaiset koepalat (n = 10 per suodatin) uutettiin etanoliin toksisuuden määrittämistä varten ja viljeltiin (mallasuute-agar ja TSA) kasvatus maljat umpeen teipattuina 3 -5 viikkoa.

Toksiinipisaroiden tuotto rakennusten homeilla ja suodatinviljelmillä

Pisaroiden tuotto tutkittiin maljoilta, joille 3 – 5 viikon kuluttua (20 - 22°C) oli kasvanut homepesäkkeitä. Pesäkekohtaiset pisarat kerättiin pipetinkärjellä. Toksisuus ja/tai toksiinit tutkittiin solutesteillä ja massaspektrometrillä (LC/MS).

Toksisuustestit

Toksisuudet mitattiin aiemmin kuvatuin menetelmin, kalibrointi-toksikanttina oli triklosaani /17/. Hermo- (MNA) ja munuais-(PK-15) solut kasvatettiin laboratoriossa, siittiöt ostettiin keinosiemennysasemalta. Tulos ilmaistiin EC₅₀ arvona, joka tarkoittaa näytteen alinta pitoisuutta, joka testisoluille annosteltuna aiheutti haittavastee yli 50 %:ssa soluja. Pieni lukuarvo siten ilmaisee suurta toksisuutta. *E. coli*-K12lux – menetelmä perustuu muuntogeenisten *Escherichia coli* K12– bakteerien emittoimaan bioluminesenssisignaaliin, jonka intensiteetti korreloi elävien bakteerisolujen määrään /18/.

Kaasumaisten sulfidien osoittaminen sisäilmasta ja rakenteista

Sulfidiherkästä metallista tai metalliseoksesta (hopea, kupari) tätä tutkimusta varten valmistettuja passiivikeräimiä käytettiin sulfidikaasujen (H₂S, CS₂) detektointiin, periaate /16/. Keräimet sijoitettiin ilmatilaan tai rakenteisiin tehtyihin Ø 8 mm porausreikiin, joiden yhteys sisäilmaan katkaistiin keräyksen ajaksi ilmastointiteipillä. Keräinten pituus mitoitettiin poranreiän syvyyttä vastaavaksi. Keräimet tarkastettiin 1 – 50 d kuluessa visuaalisesti yhden tai useampia kertoja.

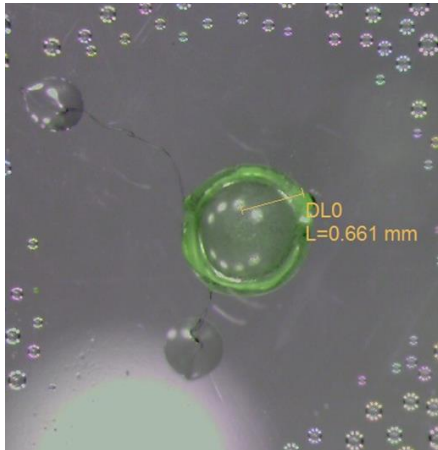
TULOKSET

Toksiineja havaitaan pesäkkeiden pinnoilla olevissa pisaroissa

Viljelymaljalla muodostuneet toksiinia sisältävät pisarat hylkivät vettä ja tarttuivat hanakasti vettä hylkiviin pintoihin kuten polypropeeni (Kuva 1). Pisaroiden sisältämät mykotoksiinit tunnistettiin massaspektrometri-analyysillä. Kuva 2 esittää vakavaan terveystahinaan liittyneestä toimistotilasta eristetyn *Penicillium expansum* RcP61 kannan

vesikkeliin sisällyttävän mykotoksiinin (ketoglobosiini C) massaspektritunnistuksen. *P. expansum* Rc61 kanta tuotti toksiinipisaroita myös rakennusmateriaalilla (laineripäällystetty kipsilevy) kammiokokeissa, joissa ylläpidettiin korkeaa suhteellista kosteutta.

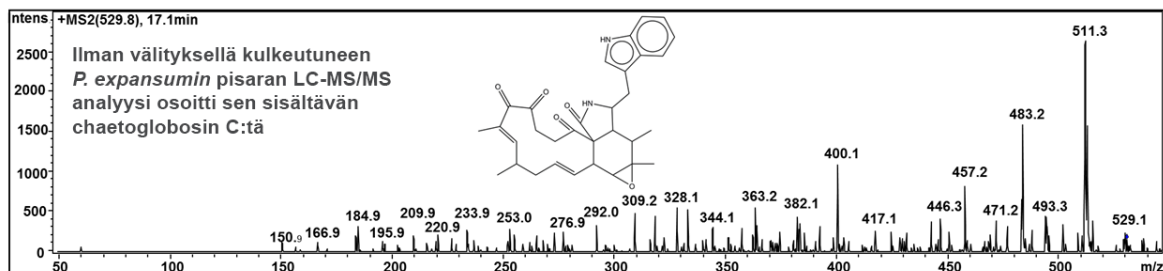
Taulukon 1 tulokset osoittavat, että vakavien terveyshaittojen takia tutkittujen tilojen (R35, R45b, X) sisäilmasta kerätyt tiivistevedet sisälsivät nisäkässoluille toksisia aineita. Joistakin tiloista saadun tiivisteiden toksisuus oli vesiliukoista, osa liukeni haihdutusväkeväinnin jälkeen etanoliin mutta ei veteen.



Kuva 1. Sisätilat vallanneen *Penicillium expansum* homekannan emittoimat toksiini-pisarat sisälsivät ketoglobosiini C:tä (massaspekttri alla).

Viljelmästä lentoon lähtenyt mikropisara tarttui viljelymaljan polypropeeni pintaan. Kuvasta näkee että pisara on hydrofobisoitunut ympäristönsä siten, että vesihöyrypisarat pysyvät loitolla, eikä vesihöyry ei pääse laimentamaan mikropisaran sisältämää toksiinia. Mittajana: 660 nm

Kuva 2 (alla). LC-MS analyysi osoitti, että mikropisara sisälsi ketoglobosiini C:tä.



Taulukko 1. Sisäilmakondensaattien toksisuus hermosoluilla, munuaisepiteelisoluilla ja siittiöillä mitattuna. Näytteet kondensoitiin kylmälevytekniikalla suoraan sisäilmasta. R-näytteet olivat toimistoja, B-näytteet luokkatiloja, joissa oli ilmanpuhdistimet, x-näytteet muita oppilaitostiloja. Toksiset löydökset on kursivoitu. kp, kuivapaino

Tutkittu näyte	Haihdutusjäännös, mg kp	Liuos	Testisolu MNA (hermo)	Testisolu PK-15 (munuais)	Testisolu siittiö	Viite
			Tehollinen toksisuus, EC ₅₀ µg/ml			
Referenssivesi	0,4	vesi	≥100	≥100	≥50	*
B260, Sipoo	0,6	vesi	≥100	≥100	≥50	*
B260, Sipoo	1,0	etanoli	≥200	≥200	≥100	*
R35, Espoo	1,0	vesi	10	80	15	*
R45b Espoo	1,3	etanoli	108	215	>108	*
R45b, Espoo	0,3	vesi	13	50	>25	*
B114, Sipoo	0,33	etanoli	25	50	>25	*
X1, Vantaa	0,3	vesi	25	≥100	>25	tämä työ
X2, Vantaa	0,3	etanoli	20	40	>83	tämä työ

* Viite: Johanna Salo (2014) ”Rakennuksen homeiden aineenvaihduntatuotteiden mittaamiseen perustuvan analytiikan kehittäminen”, Diplomityö, Rakennustekniikan laitos, Aalto yliopisto

Bioluminisoivan bakteerikonstruktiin, *E. coli* K12 Lux, herkkyyttä toksisia pisaroita muodostavien homeiden läsnäololle tutkittiin kondensoimalla vettä E-keräimellä vetokaapissa, johon oli asetettu avonaisia *Penicillium expansum* ja *Aspergillus versicolor* –kasvatusmaljoja. Saatu tiivistevesi tappoi 7 % laimennoksena puolet koetin-bakteereista, ilman avonaisia kasvatusmaljoja kerätty näytevesi ei tappanut. Sisätiloista E-keräimellä kerättyjä tiivistevesiä (n = 30) tutkittiin rinnakkain siittiötestillä ja *E. coli* K12–Lux bakteerilla: 21 oli toksisia siittiöille ja tappoi *E. coli* K12 Lux bakteereja, 4 näytettä tappoi *E. coli* K12 Lux bakteereja, mutta ei haitannut siittiötä.

IV-laitteiden suodattimista löytyi toksista ainetta ja haitallisia homeita

Kahden valituskohteen, koulu ja iso toimistorakennus, tulo- ja poistoilmasuodattimista leikattiin koepaloja (100 cm²) jotka uutettiin etanoliin toksisuuden mittaamista varten. Eri kohdista, usean metrin matkalta, leikattujen koepalojen etanoliuutteet olivat solukokeissa toksisia. Tuloilmakoneiden suodattimista uuttuneen aineksen ominaistoksisuus (EC₅₀ µg/ml) oli pienempi kuin poistoilmasuodattimien. Kun tuloilma-suodattimien 25 cm² näytepaloja viljeltiin homeille ja bakteereille tarkoitetuilla kasvatusalustoilla (mallas-uute agar, TSA), molemmille maljatyypeille kasvoi maljoille kasvoi homeita, ja myös niille koemaljoille, joissa oli biosidilisiä (PHMB 500 ppm, boori-kemikaaleja 2000 ppm, didekyyli-dimetyyli-ammonium kloridia, DDAC, 250 ppm). Tulokset voivat viitata siihen, että tutkittujen IV-koneiden suodattimissa vallitsi olosuhteet, jotka suosivat antimikrobisia biosideja sietäviä homeita. Toimistorakennuksessa käytössä olleet tuloilmakoneen suodattimet sisälsivät pisaroita emittoivia toksisia *Chaetomium*-homeita ja poistoilmakoneen suodatin *Trichoderma* suvun homeita, jotka tunnetaan paljon kosteutta vaativina homeina sekä mykoparasiitteina.

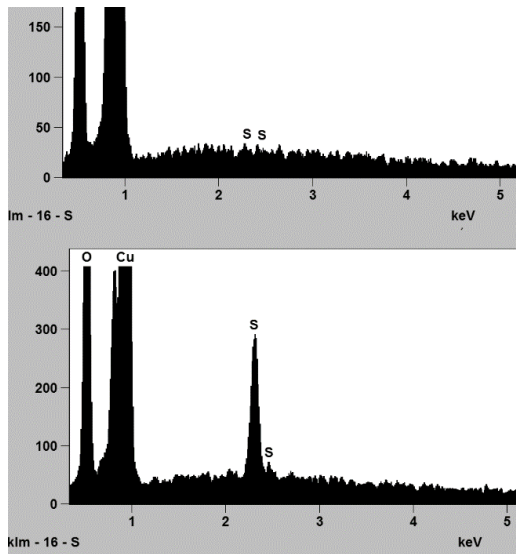
Sulfidikaasujen osoittaminen sisäilmassa ja rakenteissa

Sulfidikeräimelle muodostuu metallisulfideja epäorgaanisten, kaasumaisten sulfidien reagoitessa metallin kanssa. Useista neljän eri rakennuksen ilmaan tai porareikiin (lattia, seinä) sijoitetuista keräimistä (n = 23) saatiin positiivisia metallisulfidi-tuloksia. Kuvassa 3 on toimistorakennuksen valitustilan (alakuva) ja verrokkitilan (yläkuva) lattioihin, lattiapäällysteiden, eristekerrosten ja betonilaatan läpi porattuihin reikiin sijoitettujen sulfidikeräinten EDS spektrit. Kuvasta nähdään että valitustilaan sijoitetun keräimen pintaan oli sitoutunut metallisulfideja ainakin 10× enemmän kuin saman rakennuksen verrokkitilan keräimeen. Asunto-rakennuksessa ilmaan ripustettuun keräimeen kertyi metallisulfideja jo yhdessä vuorokaudessa tilassa, josta oli ilmayhteys hajulukottomaan viemäriin. Luokkatilasta, jonka opettaja valitti sisäilman laadusta, tuli positiivinen metallisulfiditulokas kairanreiästä, joka ulottui vinyylimaton ja kahden betonilaatan läpi. Nämä esimerkit viittaavat siihen, että tässä hankkeessa käytetty, yksinkertainen keräintyyppi oli hyödyllinen etsittäessä mahdollisia rikkivedyn päästölähteitä. Keräin oli helppo puhdistaa käytön jälkeen uudelleen käytettäväksi muissa kohteissa.

POHDINTA

Tässä tutkimuksessa havaittiin toksiinien emittoitumista homekasvustoista nestemäisinä pisaroina. Hometoksiineja sisältävien pisaroiden on laboratorioskokeissa aiemmin todettu aerosolisoituvan ja kulkeutuvan turbulenssin myötä ilmapatsaan läpi /9/. Jos näin tapahtuu rakennusten sisätiloissa, on mahdollista että tilankäyttäjät hengittää sisäilmaa, jonka mukana kulkee toksiineja kuljettavaa kosteutta. Tämän mahdollisuuden tutkimiseksi kehitimme menetelmiä sisätilakosteuden tiivistämiseksi kondenssivedeksi, joka soveltuu solutoksikologisiin mittauksiin ja myös kemialliseen toksiinianalytiikkaan. Esittelimme

myös IV-koneiden suodattimien tutkimista menetelmänä selvittää rakennuksen sisällä kulkevan ilman haitta-aineiden ja –mikrobien laatua.



Kuva 3. Esimerkki mitatuista rikkikertymistä saman rakennuksen kahdessa eri tilassa samanaikaisesti altistettuihin sulfidikeräimiin (kairanreikä lattiaan, betonin läpi). Altistuksen jälkeen keräämistä kuorittiin pintanäytteet hiiliteipille. Molemmat näytteet tutkittiin EDS:llä, 1 – 5 keV elektronimikroskoopilla. Yläkuvassa rikin (S) kohdalla on lähinnä taustakohinaa, mutta alakuvassa (=valitustila) näkyy selkeästi alkuaine rikin molemmat piikit, merkitty S, vähintään 10-kertaisesti yli taustan kohonneina pitoisuuksina.

Sulfaatinpelkistäjä-bakteerit (SRB) tuottavat kostuneista kipsituotteista epäorgaanisia sulfideja /15, 16/. Näitä bakteereja on luontaisesti aina maa-aineksessa ja kipsituotteessa, jonka raaka-aine on ollut ulkosalla varastoituna /14, 15/. Osa SRB bakteereista on itiöllisiä (mm. *Desulfotomaculum*), ja kestävät sekä desinfiointia, että kovaakin kuumennusta /14/. Tässä tutkimuksessa havaittiin, että sisäilmavalitustiloista tarttui metallipintoihin kertaluokkaa enemmän sulfideja kuin verrokkitiloista. Tulos on samansuuntainen kuin Allen ym. työssä (51 asuntoa), jossa hyvinvointihaittoja ilmeni kun rikkivedyn sisätilapitoisuus viikon keskiarvona ylitti $3 \mu\text{g m}^{-3}$ (1,4 ppb) eli yli kymmenkertaisesti taustapitoisuudet /16/. Pitkäaikaisesti tai toistuvasti, matalillekin (alle $10 \mu\text{g m}^{-3}$), pitoisuuksille sulfidikaasuja sisältävälle ulko- ja/tai sisäilmalle altistumisen tiedetään aiheuttavan nenä-, silmä- ja neurologisia oireita, erityisesti lapsille /10, 19, 20/ Oireet ovat pitkäkestoisia ja voivat jatkua altistumisen jo tauottua /20,21/. Nykyisin saatavilla olevat, kenttäkäyttöön soveltuvat anturit eivät reagoi alle $30 \mu\text{g /m}^3$ ilmapitoisuuksille.

KIITOKSET

Tutkimus tehtiin TEKES hankkeen ”Terveellinen Rakennus” (Metropolia AMK, Helsingin Yliopisto ja Aalto Yliopisto) yrityspartnerien, sekä Helsingin ja Turun yliopistoissa myös Työsuojelurahaston tuella. Tutkijat kiittävät rahoittajia ja johtoryhmää aktiivisesta tuesta, Vantaan ja Tampereen Tilakeskuksia tutkimuskohteiden luovuttamisesta tutkimuksen toteuttamiseen ja siihen liittyneestä teknisestä avusta. Aalto Yliopiston tutkijat kiittävät Suomen Akatemiaa (ToxicPM 289161).

LÄHDELUETTELO

1. WHO Guidelines for Indoor Air Quality: Dampness and Mould. Geneva: World Health Organization; 2009.
2. http://www.stm.fi/c/document_library/get_file?folderId=6556944&name=DLFE-25910.pdf
3. Salin, P.J., Salin, J.T., Andersson, M.A., Holma, T., Nelo, K., Salkinoja-Salonen, M.S. (2012). Sisätilanäytteiden toksisuus ja terveyshaitta-oireet kouluissa. Sisäilmastoseminaari, SIY raportti 30, s 159 – 164.

4. Maxwell Silverman, J., Reiner N.E. (2011) Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. *Cellular Microbiology* (2011) 13(1), s. 1–95.
5. Gareis M., Gottschalk G., (2014). *Stachybotrys* spp. and the guttation phenomenon. *Mycotoxin Res* 30, s. 151–159 DOI 10.1007/s12550-014-0196.
6. Gareis M., Gareis E.M. (2007). Guttation droplets of *Penicillium nordicum* and *Penicillium verrucosum* contain high concentrations of the mycotoxins ochratoxin A and B. *Mycopathologia*, 163, s. 207-214.
7. Singh S. (2014). Guttation: Quantification, Microbiology and Implications for Phytopathology. U. Luettker y. (toim.), *Progress in Botany*, Vol. 75, s. 187 – 214.
8. Hutwimmer S., Wang H., Strasser H. (2010). Formation of exudate droplets by *Metarhizium anisopliae* and the presence of destruxins. *Mycologia*, Vol. 102, s. 1 – 10.
9. Salo J, Andersson M. A., Mikkola R., Kredics L., Viljanen M., Salkinoja-Salonen, M. (2015). Vapor as a carrier of toxicity in a health troubled building. *Proceedings of: Healthy Buildings 2015 – Europe*, Eindhoven, The Netherlands, May 2015, ID346, 8 s.
10. U.S. Department of Health and Human Services. Toxicological Profile for Hydrogen Sulfide. (2006). Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry. <http://www.atsdr.cdc.gov>
11. Fiedler A., Kipen, H., Ohman-Strickland P., Zhang J., Weisel C., Laumbach R., Kelly-McNeil, K., Olejeme, K., Lioy, P. (2008) Sensory and cognitive effects of acute exposure to hydrogen sulfide. *Envir. Health Persp.* Vol. 116, 78-85.
12. Dedesko, S., Siegel, J.A. (2015). Moisture parameters and fungal communities associated with gypsum drywall in buildings. *Microbiome*, Vol. 3, 71 (15 sivua).
13. Riahi S., Crowley C.N. (2014). Why can hydrogen sulphide permeate cell membranes? *Journal of the American Chemical Society*. Vol 136, s. 15111-15113.
14. Barton, L.L. (toim.) (1995). Sulfate reducing bacteria. *Teoksessa: Biotechnology Handbooks*, Plenum Press, New York & London, Vol 8, 336 sivua.
15. Kijjanapanich P., Annachhatre A.P., Esposito G., van Hullebusch E.D., Lens P. (2013) Biological sulphate removal from gypsum contaminated construction and demolition debris. *J. Envir. Manag.* Vol 131, s. 82-91.
16. Allen, J.G., MacIntosh D. L., Saltzman L.E., Brian J. Baker B. J., Matheson J.M., L.R., Minegishi T, Fragala M.A., Myatt T.A., Spengler J. D., Stewart J. H., McCarthy J.F. (2012) Elevated corrosion rates and hydrogen sulfide in homes with ‘Chinese Drywall’. *Science of the Total Environment* 426 s. 113–119
17. Ajao C., Andersson M., Teplova, V.V., Nagy S., Gahmberg C.G., Andersson L.C., Hautaniemi, M., Kakasi B., Roivainen M., Salkinoja-Salonen M. 2015. Mitochondrial toxicity of triclosan. *Toxicology Reports*, 2, s. 624-637.
18. Atosuo, J.(2015). Kosteus- ja homevauriokohteiden sisäilman toksisuuden arviointi pölynäytteistä. *Rakennusfysiikka 2015, Seminaarijulkaisu 4. Tampereen teknillinen yliopisto, Rakennustekniikan laitos*, s. 355 – 359.
19. Marttila O., Jaakkola J.J., Vilkka V., Jäppinen P., Haahtela T.(1994). The South Karelia Air Pollution Study: The effects of malodorous sulfur compounds from pulp mills on respiratory and other symptoms in children. *Environmental Research* 66, s. 152-159.
20. Haahtela, T., Marttila, O., Vilkka, V., Jäppinen P., Jaakkola, J.J. (1992). The South Karelia Air Pollution Study: Acute Health Effects of Malodorous Sulfur Air Pollutants Released by a pulp mill. *American Journal of Public Health* Vol 82, s. 603 – 605.
21. Heaney C.D., Wing, S., Campbell R.L., Caldwell D., Hopkins B., Richardson, D., Yeatts K. (2011). Relation between malodour, ambient hydrogen sulphide, and health in a community bordering a landfill. *Environmental Research*, vol. 111, s. 847-852.