

Kosteusvaurioiden mikrobiologiaa ja toksikologiaa

Mirja Salkinoja-Salonen, PhD, tutkimusjohtaja

Helsingin Yliopisto, Elintarvike- ja Ympäristötieteiden Its

Seminaariesitelmä Funktionaalisen Lääketieteen Yhdistys r.y. Symposiossa "Kosteusvauriomikrobit ja monikemikaaliherkkyys", Porthania, Helsingin Yliopisto, 2.11.2012

Taustaa & historiaa. Suomessa on Euroopan puhtain ulkoilma, mutta ehkä likaisin sisäilma. Pääosa suomalaisen elämästä eletään sisätiloissa. Joidenkin rakennusten sisäilmaan liittyy "ylimääräistä" sairastumista. Miksi?

Menneinä vuosikymmeninä tilastollinen, merkitsevä näyttö sisäilman ja terveyshaittojen yhteydestä havaittu altistumisesta asbestille, radonille, formaldehydille ja tupakansavulle. Asbesti on kuitumaista kiviainesta, siitä ei löydetty toksista ainetta. Kesti 70 vuotta ennen kuin kertynyt tilastollinen näyttö asbestialtistuksen ja keuhkosityövän yhteydestä otettiin tosiasiana ja saatiin aikaan säädökset työntekijöiden suojaamiseksi altistukselta. Radon – joka nousee suomalaisesta moreeniimaaperästä, oli aluksi tunkeikkaan väittelyn kohde: ei voitu ymmärtää, miten pitoisuus sisätiloissa voisi olla korkeampi kuin ulkoilmassa? Epäiltiin mittausten pätevyyttä – kunnes asia selvisi. Sisäilman formaldehydin toksiset mekanismit löydettiin nopeasti – kyseessä oli yksi, hyvin yksinkertainen molekyyli ja altistumisen mittaukseen tarvittiin vain yksi analyysi. Viitearvo oli helppo vetää ja altistumista ehkäisevät toimenpiteet päätökset saatiin alle vuosikymmenessä. Tupakansavulle on altistuttu sisätiloissa yli sata vuotta, mutta vasta 1970 luvulla opittiin analysoimaan savun sisältöä, tunnistettiin muutamia satoja kemiallisia yhdisteitä. Kuitenkin edelleen on epäselvää mikä tai mitkä niistä ja miten, *aiheuttasivat* sairastumista. Tupakkateollisuus toi ahkerasti esiin ikänsä tupakoineita ihmisiä, jotka eivät sairastuneet keuhkosityöpään... Lopulta *tilastollinen* näyttö savulle altistuneiden korkeammasta sairastuvuudesta (useisiin erilaisiin sairauksiin) riitti päättäjille niin että 20 vuoden tutkimuksen ja väittelyn jälkeen saatiin aikaan tupakkalaki. *Neljäs samantapainen prosessi on tällä hetkellä käynnissä Suomessa: miten rakennusten home- tai kosteusvauriot voisivat aiheuttaa ihmisen sairastumista?*

Rakennuksissa, joissa on kosteusvaurioita, sairastetaan keskimääräistä enemmän. Oireiden kirjo on laaja. Tämä *tilastollinen yhteys* on osoitettu lukuisissa tutkimuksissa, niin Suomessa kuin muualla. Mikrobin kykyä aiheuttaa ihmisessä (eläimissä, kasveissa) infektioita, on tutkittu luonnontieteen keinoin 1850-luvulta lähtien. Nyt tiedetään, että vaikka mikrobeja tunnetaan noin miljoona lajia, alle 200 lajia niistä on sellaisia, jotka pureutuvat elimistöömme sillä tavalla, että syntyy sairaus, ja sen aiheuttaja voidaan siis löytää sairastuneen potilaan elimistöstä. Sisäilman mikrobilajien yhdistäminen tiettyyn terveyshaittaan onkin ongelmallista senvuoksi, että sisäilmamikrobit yleensä eivät aiheuta infektioita (s.o. lisäännä ihmisen elimistössä) joten *sairauden aiheuttajamikrobeja ei yleensä voida löytää sairastuneesta potilaasta*, vaan niitä on etsittävä rakennuksesta. Tarvitaan keinoja sisätilamikrobien terveyshaitallisuuden tutkimiseksi. Toksisuuden (myrkyntuoton) tutkiminen on tällainen keino.

Mikrobien toksiinintuoton tutkiminen. Toksiini tarkoittaa sellaista eliön (mikrobi, kasvi, levä, hyönteinen...) tuottamaa ainetta, joka on myrkyllinen jollekin toiselle eliölle (esim. lämminverinen eläin tai ihminen). Mikrobi voidaan tunnistaa toksiinintuottajaksi tutkimalla onko sen biomassalla toksisia vaikutuksia. Mikrobimassasta tehdään uute, ja uutteen laimennossarja (jopa 10 000 x) ja *koesoluja altistetaan näille uutteille*. Ympäristön tutkimuksessa (jota myös rakennettu ympäristö) ei käytetä kokonaisia koe-eläimiä (REACH lainsäädäntö eli Euroopan Unionin kemikaalilaki). Sensijaan altistetaan laboratorioissa näille uutteille kudoksia tai soluja, jotka on eristetty elävistä eliöistä (esim. verisoluja) tai laboratorioissa (kaupallisista) solulinjoista kasvatettuja soluja. Myös eristettyjä soluelimiä voidaan käyttää, esim. mitokondrioita. Tämä toksikologinen menettely

tunnetaan nimellä *solutoksikologia* (cell toxicology eli toxicology in vitro). Tietyn altistusajan jälkeen tutkitaan, onko soluissa / kudoksessa havaittavissa vaurioita. Vertailunäytteenä on neste (liuos), johon näyte sarjalaimennettiin. Kun tiettyjä vaurioita löydetään, noteerataan varion laatu ja laimennoskerroin jossa se todettiin. Näin saadaan selville tehollinen toksisuus (EC, effective toxic concentration). EC = tutkitun näytteen pienin pitoisuus (=suurin laimennos), joka vielä aiheutti toksisen vasteen. Ympäristötoksikologiassa suositetaan EC₅₀ arvoa (tai EC₁₀₀) eli määritetään näytepitoisuus joka aiheutti todetun vaurion vähintään 50%:ssa (tai 100%:ssa) altistettuja soluja (tietyn altistusajan kuluessa).

Yleisin haittamikrobi: *Trichoderma* suvun sienet (*T. longibrachiatum*, *T. atroviride*) rakennuksissa, joissa koetaan sisäilmaan liittyviä terveyshaittoja. *T. longibrachiatum* sieni myös aiheuttaa kliinisiä infektioita, eli kasvaa ihmisen elimistössä aiheuttaen vakavaa (harvinaista) sairautta. *T. longibrachiatum*'in virulenssitekijöistä (= sairautta aiheuttavat molekyylit tai ominaisuudet) on nyt ensi kerran saatu tutkimustietoa (1). Tämä sieni tuottaa samoja toksisia molekyylejä sienikannan alkulähteestä riippumatta: hometaloista, potilaista, maaperästä ja kompostista. Sitä on löydetty ympäri maapalloa, jopa etelämantereelta. Toksiini koostuu kahdesta eri perheestä lähisukuisia molekyylejä, trilongiineja. Trilongiinien jäljille päästiin sian siittiöitä testisoluna käyttäen. Sian siittiötestin herkkyys toksiineille oli oleellinen työkalu joka mahdollisti näiden toksiinien puhdas-aineeksi eristämisen.

Kaikkiaan 8 eri *T. longibrachiatum* kannan toksiinit, yht. 11 kpl erilaista, eristettiin ja niiden rakenteet selvitettiin. Ne olivat peptaiboleiksi tunnistettuja rasvaliukoisia peptidejä, 4 – 8 kpl eri peptaibolia erilaisina kokoonpanoina kustakin homekannasta. Trilongiinien aminohapoista noin puolet on elimistölle vieraita. Ihmisen elimistöllä tiettävästi ei ole entsyymejä, jotka voisivat purkaa tai tehdä vaarattomiksi trilongiini-peptaiboleja. Kaikki löydetyt trilongiinit olivat lämpökestoisia, kemiallisesti kestäviä ja myrkyllisiä, mutta ominaismyrkyllisyyksissä oli eroja. Yhdistelmä oli myrkyllisempi kuin yhden lajin puhdas trilongiinri. Trilongiinien myrkyllisyys perustuu niiden kykyyn soluttautua elimistön solukalvoon ja muodostaa siihen natriumia ja kaliumia läpäisevä nanokanava (alle 2 nm). Tämä vieraspeptideistä koostuva kanava häiriköi solun omia kaliumin ja/tai natriumin kuljetukseen erikoistuneita kanavia ja natrium- ja kaliumjoniliikenteeseen perustuvaa soluviestintää. Myös *T. atroviridae*, (10) ja *T. harzianum* kannat tuottavat jonikanavia muodostavia peptaiboli-toksiineja (trikortsianiineja, hartsianiineja; 6,7). *Trichoderma* ovat tehokkaita itiöiden päästölähteitä (mm. ilmastointikanavissa) mutta niiden itiöt itävät hitaasti ja siksi ne harvoin ehtivät näkyviin viranomaismenetelmien (STM, TTL) määräämissä lyhyissä (1 viikko) kasvatusajoissa ja siten jäävät huomiotta.

Muut sisätilojen toksiset haittamikrobit: sienet (homeet). Tällä hetkellä näyttää siltä, että useimpien tärkeimpien toksiinintuottajaksi todettujen sisätilahaittamikrobien tuottamat myrkylliset aineet on löydetty, rakenteet selvitetty ja toksisuusmekanismi pääosin selvitetty (Taulukko 1). Myös menetelmät, joilla toksiinintuottajien suhteellinen esiintyvyys sisätilanäytteissä voidaan mitata, on kehitetty ja käytännössä testattu. *Acremonium* -sienen (*A. exuviarum* tutkittu, ei muita lajeja) toksiini on myös peptaiboli, mutta vaikuttaa nisäkässolujen mitokondrioihin, pysäyttämällä elektronien irtoamisen ubikinonista, jolloin elektroni eii etene soluhengitykseen, ei käynnistä hapenkulutusta eikä tuota aerobista energiaa. *Penicillium expansum*in sitriniinin ja *Paecilomyces variotii* lajien toksiinien rakenne ja toksisuus on tiedossa, mutta sen molekulaarisella

Sisätilamikrobi ja siitä eristetty toksiini		Kemiallinen rakenne, moolipaino g/mol	Toksisuusmekanismi	Solut /soluelimet joilla toksisuus todettu	EC ₅₀ tai IC ₅₀ ja lähdeviite toksisuus mittaauksille	
<i>Homeet (sienet)</i>					<i>µg/ml tai nM</i>	<i>Lähde</i>
<i>Acremonium exuviarum</i>	akreboli A	peptaiboli, 1726	mitokondrion soluhengitys ketjun (kompleksi III) estäjä	sian siittiöt, rotan maksan mitokondriot, kissan keuhkosolut, hiiren neuroblastoma, hiiren haiman beta-solut (MIN-6)	IC ₅₀ 0.08 (50 nM)	11,12
<i>Acremonium exuviarum</i>	akreboli B	peptaiboli, 1740	kuten yllä	kuten yllä	kuten yllä	11,12
<i>Aspergillus versicolor</i>	sterigma-tokystiini	ksantoni-bifuraani, 324	estää DNA synteesin, solujen jakautumisen, tuhoaa keuhkoputkien epiteelisoluja, liittyy astmaan	sian siittiöt, sian munuaisten epiteelisolut (PK-15)	25 (siittiöt) <0.1 (PK-15)	10
<i>Aspergillus westerdijikiae</i>	stefasiidiini B	indoli alkaloidi, 890	immobilisoi siittiöt mitokondrioita depolarisoimatta, käynnistää apoptoosin	sian siittiöt, sian munuaisten epiteelisolut (PK-15)	0,3 (siittiöt) 0,3 (PK-15)	10B
<i>ecilomyces variotii</i>	viriditoksiini	6,6,-binafto-pyraani-2-oni, 662	mitokondriotoksiini (estää ATP synteesin)	sian siittiöt, sian munuaisten epiteelisolut (PK-15)	<0,2 (siittiöt) >200 (PK-15)	10
<i>Penicillium expansum</i>	sitriniini	dihydrohydroksitrimetyylioksokarboksentsopyraani, 250	mahd. mitokondriotoksiini, kompleksi I:n estäjä	sian siittiöt, sian munuaisten epiteelisolut (PK-15)	≥40 (siittiöt) 16 (PK-15)	10
<i>Stachybotrys chartarum</i>	satratoksiini G,H	trikotekeeni	puhdasaine	sian siittiöt, kissan keuhkosolut (FFL)	5 (siittiö); 0.0009 (FFL)	18, 45
<i>Stachybotrys chartarum</i>	roridiini A	trikotekeeni	puhdasaine, immuunireaktiivinen	sian siittiöt, kissan keuhkosolut (FFL), ihmisen makrofagit	>1 (siittiö), 0.0007 (FFL)	18,45
<i>Stachybotrys chartarum</i>	tuntematon	tuntematon	kipsilevy uute vaurioituneesta sisätilasta, mikroskooppilla tunnistettu <i>S. chartarum</i>	sian siittiöt, kissan keuhkosolut (FFL)	0.29 (siittiö) 1.5 (FFL)	45
<i>Stachybotrys sp</i>	tuntematon	<i>tri5</i> -gene absent	2/9 kantaa estä siittiöiden liikettä	sian siittiöt, rikkoontuneet mitokondriot (elektronimikroskopia)	<40 (raakauute)	14
<i>Trichoderma atroviride</i>	trikortsiini	peptaiboli 1948 (AIIIc)	tekee jonikanavia solukalvoihin	sian siittiöt, sian munuaissolut (PK15)	0,5 (siittiö); 5 (PK-15)	10
<i>Trichoderma harzianum</i>	peptaibolit ES 39	1719 – 1776	mitokondriotoksia	sian siittiöt, ihmisen keuhkon epiteelikarsinomasolut (A549)	< 10	6, 7
<i>Trichoderma longibrachia-tum</i>	trilongiinit 2 perhettä	trilongiinit 1195 ja 1936 – 1965	muodostaa soluihin natriumia ja kaliumia läpäiseviä nanokanavia	sian siittiöt	0,2 yhdistelmäpeptaiboli) 0,6 tai 1,5 (yhdeällä)	1
Bakteerit						
<i>Streptomyces griseus</i>	valino-mysiini	syklinen peptidi ,1111	kalium jonofoori, depolarisoi mitokondriot, estää NK-solujen toimintaa, käynnistää NK-solujen apoptoosin	pysäyttää siittiöiden liikkeen (sian siittiöt), lamauttaa sytokiiniutuoton ihmisen NK (natural killer) soluissa	0,002 (siittiöt), 0,03 (NK solut)	17,19, 20,37
<i>Bacillus amyloliqueaciens B. subtilis</i>	amylosiini	lineaarinen peptidi, 1197	muodostaa jonikanavia	sian siittiöt, rotan maksan mitokondriot, kissan keuhkosolut, ihmisen makrofagit	27 nM	31,32, 43
<i>Bacillus cereus</i>	kereulidi	syklinen peptidi 1153	kalium jonofoori, kuljettaa kaliumioneja soluun sisään ja/tai solusta ulos, nolaa mitokondrioiden sähkövaraukset	Sian siittiöt, haiman saarekkeet. Rotan maksan mitokondriot. Kissan keuhkosolut. Hiiren: neuroblastoma, haiman betasolut. Ihmisen: keratinosyytit, veren PBMC,hermosolut (Paju); Caco2	EC ₅₀ 0.001 –0.01 (1 – 10 nM) mitokondriot, >1 sytolyyysi ;betasolut <0.01	24, 35, 37,

(jatkoa, sivu 3)

tasolla selvittäminen on kesken (10, 10B).

Aspergillus ryhmän sisäilmaa myrkyttävä sieni *A. westerdijkiae* tuottaa stefasidiini B ja avrainvillamidi –toksiineja, joiden molekulaarinen mekanismi on valkenemassa (10, 10B, 40). Näiden toksiinien teho riippuu niiden molekyylin nitroni-indoliryhmistä. Ne ovat n. 100 kertaa myrkyllisempiä kuin *Aspergillus* tuottama okratoksiini, jonka määriä elintarvikkeissa lakisääteisesti valvotaan. *A. westerdijkiae* on Suomelle uusi löydös (Andersson ym, 2010, Mikkola ym, in prep.) mutta ilmeisesti aiemmin virhetunnistettu *A. ochraceus* lajiksi. Suomessa yleiset toksiset *Aspergillus* -lajit, (*A. westerdijkiae*, *A. versicolor*) suosivat rakennuksia joissa on käytetty boorikemikaaleja. Tätä boorinsieto-ominaisuutta käytetään näiden toksisten sienten löytämiseen rakennusmateriaaleista tai sisäilmasta, koska ne muuten helposti hukkuvat muiden mikrobien sekaan (toksiinintuottajat ovat yleisesti hidaskasvuisia, huonoja kilpailijoita tavanomaisilla viljelymaljoilla). Suomalaiset *A. versicolor* kannat ovat tunnistuneet sterigmatokystiinien tuottajiksi. Sterigmatokystiini on niitä harvoja ”yleisiä” toksiineja joiden läsnäoloa siittiötesti ei ilmaise (tarvitaan somaattisia soluja PK-15, sian munuaissolut) mutta se tunnistuu helposti boorimaljatekniikkaa käyttäen. - Suomessa talot ovat enemmän kuivia kuin märkiä, ja toksiinintuottajatkin siksi usein ovat lajeja, joiden kosteuden tarve on pieni ($a_w \leq 0.7$, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces*). Ne selittävät sisäilmaongelmia rakennuksissa, joista kosteuteen liittyvää vauriota ei löydy.

Stachybotrys chartarum (13,14,18) on pitkäkestoisen märkyuden seurausta. Sen itiöt ovat suuria (~7 μm) ja vaipallisia, 18), eivät lennä ja siksi niitä harvoin löytyy esim. Andersen keräimen maljoilta tai laskeumamaljoilta, niitä pitää etsiä materiaalinäytteistä, joista ne tunnistetaan mikroskooppilla rakennusmateriaali- ja pölynäytteistä.

Sisätiloissa esiintyvät toksiineja tuottavat bakteerit. Kaikki tähän mennessä löytyneet toksiinintuottajat sisätiloissa ovat itiöllisiä, joko firmikuuotteja (*Bacillus*, *Paenibacillus*) aktinobakteereja (*Streptomyces griseus* ja muita streptomykettejä, *Nocardia* lajit,). *Streptomyces* löytyy usein kipsilevyistä, ehkä siksi että kipsilevyt toimivat kapillaarisesti veden kuljettajina rakennuksen seinissä ja katoissa, sekä siitä, että streptomyketit viihtyvät tarkkelyspitoisessa ympäristössä, eli tuotteissa joihin lisätään tarkkelystä tai sen johdannaisia (liimat ja liisterit kipsilevyissä, tapeteissa ym) (16,18, 20, 21,22, 30) *S. griseus* tuottaa rakennusmateriaalissakin syklistä kaliumjonoforista peptidiä nimeltä valinomysiini, jonka biologinen rooli on toimia kaliumkuljettajana kuten kereulidinkin (tuottaja *Bacillus cereus*). Kaliumia kuljettavien bakteerien toksiinintuoton kasvu ja toksiinintuotto käynnistyy oloissa, joissa kalium on minimiravinne (16, 17, 19, 20, 21, 22, 24, 24B,). Tämä johtuu siitä, että kereulidi avustaa tuottajasoluaan kaliumjonien keruussa lähiympäristöstä (esim. kapillaarikosteus ,27, 30). Myrkyllisyysmekanismi nisäkässolussa siis on vääränlainen kaliumkuljetus solusta ulos tai sisälle soluun (ympäristö-oloista riippuen)(17,18, 25, 28, 30). Siitä voi arvioida seuraavan altistuskohtaisia elinuhkia: mitokondrioiden tuhoutuminen ja tämän seurauksena uusiutumattomissa / hitaasti uusiutuviissa elimissä (haiman Langerhans saarekkeet, hermopäätteet, sisäkorvan karvasolut) apoptoottinen tai nekroottinen kudostuho, joista jälkimmäinen voi jatkaa autoimmuunitautina tuhoton vaurioituneen elimen tai sen osan kokonaan(24B, 25). Valinomysiini ja kereulidi, kuten myös *Paenibacillus tundrae* tuottama penilidi (33B), ovat niin lämpökestoisia ja kemiallisesti kestäviä, ettei niiden inaktivointi

liene mahdollista muuten kuin polttamalla. Penilidin tuottajat kasvavat ja tuottavat toksinia myös kylmässä (+5°C).

Bacillus amyloliquefaciens erittää lineaarista peptiditoksiinia, amyloosiinia, joka tuottaa natriumia ja kaliumia vuotavia vieraskanavia nisäkässoluihin (31, 32, 33). Erityisen ärhäkkä luontaisen immuuniteetin ylläpidosta vastaaville soluille (makrofagit, monosyytit).

Sisätiloissa käytetyt biosidit toksisuuden aiheuttajina. Sellaisten tilojen, joissa ei ole toimialasta johtuvaa desinfiointitarvetta, desinfiointi pitkävaikutteisilla biosidivalmisteilla on yleistynyt Suomessa. Käytetyt tehoaineet ovat myrkyllisiä guanidijohdannaisia, polyheksametyleeni guanidi hydrokloridi (PHMG) ja polyheksametyleeni biuguanidiini (PHMB), joko yksin tai muihin biosideihin tai kationisiin tensideihin (pesuaineisiin) seostettuina. Käsittelyjä markkinoidaan puhdistamisina, ja nimillä "savusumu", "kylmäsavu", "kuivasumutus" , vaikka niihin ei liity puhdistamista eli lian tai mikrobikasvustojen irrottamista ja poistoa. PHMG tai PHMB käsittely ei poista homebakterioita (mykotoksiineja) eikä vähennä niiden toksisuutta. Yksikään tutkimus ei ole osoittanut, että sisätilapintojen käsittely guanidi biosideilla olisi vähentänyt tai poistanut kosteus- tai homevaurioiden tilan käyttöön liittyneitä terveyshaittoja. Käytetyt biosidit jäävät käsittelyn jälkeen pysyvästi sisäpinnolle, ja muodostavat pitkäaikaisen toksisen altisteen tilojen käyttäjälle. Kosteuskosketus (esim. iho) irrottaa pinnasta PHMB ja PHMG tehoaineita, ja mekaaninen käsittely (imurointi, siivous, huonekalujen tai papereiden siirtely) irrottaa pinnoilta toksista pölyä joka voi aiheuttaa toksista altistusta hengitysteitse tai silmien kautta.

Biosidien käyttöä Euroopan Unionissa , siis myös Suomessa, on säädetty Biosididirektiiveissä. Kullekin hyväksytylle tehoaineelle on määritelty toimenpidealueet , joissa kukin valmisteryhmän käyttö sallitaan, muu käyttö on kielletty. Yksikään v. 2012 voimassa olevista toimenpideluokista 1 – 23, ei mainitse hyväksyttynä kohteena sellaista sisätilaa, jossa altistujina voisivat olla lapset (asunnot, päiväkodit, koulut). Myöskään 1.1.2013 ja 1.9.2013 lainvoimaisiksi tulevissa direktiiveissä ja asetuksessa (2009/0076; 528/2012) ei sallittujen kohteiden joukossa esiinny lapsia altistavia sisätilakohteita. Suomessa viranomaisen on toistaiseksi tulkinut väljästi EU-säädösten toimenpidealuetta Nr 2, joka koskee sisätilapintojen käsittelyyn hyväksyttäviä biosidivalmisteita, siten että se sallisi biosidikäsittelyn myös kodeissa, päiväkodeissa ja kouluissa, vaikka EUasetuksessa luetellaan ainoastaan työpaikkatiloja. Tämänhetkisen tiedon valossa Suomi on ainoa EU maa, jossa pitkävaikutteisia biosideja (PHMG, PHMB) käytetään sisätiloissa, joissa altistujina ovat lapset ja raskaana olevat. Työpaikkatiloissa mahdollisina altistujina on aikuisia ammattilaisia, joiden edellytetään suojautuvan suojavaatetetuksella ja hengityssuojaimin.

Sisätilojen käsittelyyn käytettyjen guanidibiosidien myrkyllisyys on suuri. Guanidibiosidit ovat erittäin myrkyllisiä. PHMG ja PHMB ovat biohajoamattomia, pitkävaikutteisia, pysyviä kemikaaleja. Sisätiloissa ne pysyvät reaktiivisina vuosikausia. Biosidilupaa varten k.o. tehoaineen aiheuttama vaara ihmisen tai muun ei- kohde-elion terveyteen arvioidaan 7 osa-alueella. Riskinarviointit tekee Euroopan kemikaalivirasto, ECHA. ECHAN riskinarviointiraportti PHMBstä julkistettiin 9 syyskuuta 2011 ja on julkisesti saatavilla ECHAN verkkosivuilta:

(http://echa.europa.eu/web/guest/opinions-of-the-committee-for-risk-assessment-on-proposals-for-harmonised-classification-and-labeling?seach_criteria=phmb). ECHAN raportti päättyi luokittamaan PHMB:n kaikkein korkeimman riskin luokkaan (Cat 1) seuraavilla osa-alueilla: akuutti myrkyllisyys, hengityselinten vaurioituminen, silmävauriot, herkistyminen, eli kaikkiaan 4:ssä arvioinnin kohteena olleesta 7:stä , ihmisen terveyden kannalta tärkeästä osa-alueesta. Lisäksi ECHA luokitti PHMB:n vesistöille vaaralliseksi aineeksi. Toinen guanidibiosidi, PHMG, poistettiin 1.7.2012 hyväksytyjen biosidien luettelosta kaikilta toimenpidealueilta (EU virallinen lehti L 38/15, 9.2.2010), ja L38/48 11.2.2012), joten se on vedettävä pois markkinoilta, mutta suomalaisesta verkkoilmoittelusta näkee, että sitä markkinoidaan edelleen, mm. päiväkodeihin ja kotien keittiöiden "päivittäiseen puhdistukseen".

Biosideilla harhautetaan viranomaisia. Biosidikäsittely aiheuttaa pesäkelukujen aleneman. Biosidien avulla saatua, alhaista pesäkelukua on käytetty näyttönä tilojen käyttäjälle tai terveysviranomaiselle, että sisätiloissa ei olisi kosteus- tai homevauriota, jopa siten, että näille tahoille ei ole annettu tietoa biosidikäsittelystä. Tämä voi johtaa siihen, että kiinteistön mahdollisten vaurioiden todellinen etsintä ja vaurioiden korjaus jätetään tekemättä tai tehdään vain osittain.

Lähdekirjallisuus

Trichoderma longibrachiatum:

1. Mikkola, Raimo, Andersson, Maria A., Kredics, Laszlo, Grigoriev, Pavel, Sundell, Nina & Salkinoja-Salonen, Mirja, 2012. 20-Residue and 11-residue peptaibols from the fungus *Trichoderma longibrachiatum* are synergistic in forming Na⁺/K⁺ permeant channels and in adverse action towards mammalian cells. *FEBS Journal*, 279, 4172-4190
2. Lübeck M, Poulsen SK, Lübeck PS, Jensen DF & Thrane U (2000) Identification of *Trichoderma* strains from building materials by ITS1 ribotyping, UP-PCR fingerprinting and UP-PCR cross hybridization. *FEMS Microbiol Lett* 185, 129-134.
3. Thrane U, Poulsen SB, Nirenberg HI, & Lieckfeldt E (2001). Identification of *Trichoderma* strains by image analysis of HPLC chromatograms. *FEMS Microbiol Lett* 203, 249-255.
4. Mirja Salkinoja-Salonen. Mikrobiotoksiinit sisätiloissa Jorma Säteri and Helka Backman (toim.): Sisäilmastoseminaari, 18.3.2009, Espoo Finland. Sisäilmayhdistys, Raportti Vol 27, sivut 19-24. Sisäilmayhdistys, Espoo.
5. Antal Z., Kredics, L., Pakarinen, J., Doczi, I., Andersson M., Salkinoja-Salonen, M., Manczinger L., Szekeres, A., Hatvani, L., Vagvolgyi, C., Nagy, E. 2005. Comparative study of potential virulence factors in human pathogenic and saprophytic *Trichoderma longibrachiatum* strains. *Acta Microbiol. Immunol. Hung*, 52 (3-4), 341-350.

Trichoderma harzianum

6. Peltola J, Andersson M, Rainey FA, Haahtela T, Mussalo-Rauhamaa H, Samson R & Salkinoja-Salonen MS (2001) Toxic metabolite producing bacteria and fungi in indoor environment. *Appl Environ Microbiol* 67, 3269-3274.
7. Peltola J, Ritieni A, Mikkola R, Grigoriev PA, Pocsfalvi G, Andersson MA & Salkinoja-Salonen MS (2004) Biological effects of *Trichoderma harzianum* peptaibols on mammalian cells. *Appl Environ Microbiol* 70, 4996-5004.
8. Mirja Salkinoja-Salonen. Mikrobiotoksiinit sisätiloissa. Jorma Säteri and Helka Backman (toim.): Sisäilmastoseminaari, 18.3.2009, Espoo Finland. Sisäilmayhdistys, Raportti Vol 27, sivut 19-24. Sisäilmayhdistys, Espoo.
9. Peltola, J., Andersson, M.A., Mikkola, R., Mussalo-Rauhamaa, H. & Salkinoja-Salonen, MS. 2001. Membrane toxic substances in water damaged construction materials and fungal pure cultures. In: Bioaerosols, Fungi and Mycotoxins: Health affects, Assessment, Prevention and Control, ed. by E. Johanning. 2nd Updated and revised edition. Eastern New York Occupational and Environmental Health Center, Albany New York, USA, pp. 432-443.

Trichoderma atroviride

10. Maria A. Andersson, Mirja Salkinoja-Salonen, Raimo Mikkola. 2012. Uusi menetelmä sisäilmatoksiinien löytämiseen: LC-MS-Biotesti yhdistelmä. SIY raportti 30, 37-42. Sisäilmayhdistys, Espoo.
- 10B Mikkola R., Andersson MA, Salkinoja-Salonen M. 201x. Toxic indole alkaloids avrainllamide and stephacidin B, from *Aspergillus westerdijikiae*, boric acid tolerant indoor mold. Käsikirjoitus.

Acremonium-home ja sen toksiinit sisätiloissa

11. Andersson, M.A., Mikkola, R., Raulio, M., Kredics, L., Maijala, P., Salkinoja-Salonen, M.S. 2009. Acrebol, a novel toxic peptaibol produced by an *Acremonium exuviarum* indoor isolate. *J. Applied Microbiology*, 106, 909-923.
12. Kruglov, A., Andersson M.A., Mikkola, R., Roivainen, M., Kredics, L., Saris, N-E., Salkinoja-Salonen, M.S. 2009. Novel Mycotoxin from *Acremonium exuviarum* is a powerful inhibitor of the mitochondrial respiratory chain complex III. *Chemical Research in Toxicology*, 22,565-573

Stachybotrys chartarum-home ja sen toksiinit sisätiloissa

13. Peltola, J., Andersson, M., Rainey, F.A., Haahtela, T., Mussalo-Rauhamaa, H., R. Samson & Salkinoja-Salonen, M.S..2001. Toxic metabolite producing bacteria and fungi in indoor environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7)3269-3274.
14. Peltola, J., Niessen, L., Nielsen, K.F., Jarvis, B. B, Andersen, B., Salkinoja-Salonen, MS & Möller, E. 2002. Toxicogenic diversity of two different RAPD groups of *Stachybotrys chartarum* isolates analyzed by potential for trichothecene production and boar sperm cell motility inhibition., *Canadian J Microbiol.*, 48(11):1017-1029.

Penicillium expansum, Aspergillus versicolor, Aspergillus westerdijikiae, Paecilomyces variotii

15. Peltola, J., Andersson, M.A., Mikkola, R., Mussalo-Rauhamaa, H. & Salkinoja-Salonen, MS. 1999. Membrane toxic substances in water damaged construction materials and fungal pure cultures. In: Bioaerosols, Fungi and Mycotoxins: Health affects, Assessment, Prevention and Control, ed. by E. Johanning. Eastern New York Occupational and Environmental Health Center, Albany New York, USA, pp. 432-443.
10. Maria A. Andersson, Mirja Salkinoja-Salonen, Raimo Mikkola. 2012. Uusi menetelmä sisäilmatoksiinien löytämiseen: LC-MS-Biotesti yhdistelmä. SIY raportti 30, 37-42. Sisäilmayhdistys, Espoo

Aktinobakteerit, ent. = „sädesienet“

- 13: Peltola, J., Andersson, M., Rainey, F.A., Haahtela, T., Mussalo-Rauhamaa, H., R. Samson & Salkinoja-Salonen, M.S. 2001. Toxic metabolite producing bacteria and fungi in indoor environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7)3269-3274.
16. Andersson, M.A., Mikkola, R., Helin, J., Rainey, F., Kroppenstedt, R., Sivonen, K., Salkinoja-Salonen, M.S. 1998. Mitochondrial toxin produced by *Streptomyces* strains isolated from indoor environment is valinomycin. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (12): 4767-4773.
17. Paananen, A., Järvinen K., Sareneva, T. Salkinoja-Salonen, M.S., Timonen, T., Hölttä, E., 2005. Valinomycin induced apoptosis of human NK cells is predominantly caspase independent. *Toxicology*, 212 (2005) 37-45.
18. Andersson, M.A., M. Nikulin, U. Koljalg, M. C. Andersson, Rainey, F., Reijula, K., Hintikka E.L. & M. S. Salkinoja-Salonen. 1997. Bacteria, moulds and toxins in water damaged building materials. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2) 387-393.
19. Teplova, Vera V., Raimo Mikkola, Anton A. Tonshin, Nils-Erik L. Saris, and Mirja Salkinoja-Salonen. 2006. The higher toxicity of cereulide relative to valinomycin is due to its higher affinity for potassium at physiological plasma concentration. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 210, 39-46.
20. Paananen, A., Mikkola, R., Sareneva, T., Matikainen S., Andersson M., Julkunen, I., Salkinoja-Salonen, M.S. & Timonen, T. 2000. Inhibition of human natural killer (NK) cell function by valinomycin, a toxin from *Streptomyces griseus* in indoor air. *Infection and Immunity*, 68(1) 165-169
- 20B. Paananen, A., Järvinen K., Sareneva, T. Salkinoja-Salonen, M.S., Timonen, T., Hölttä, E., 2005. Valinomycin induced apoptosis of human NK cells is predominantly caspase independent. *Toxicology*, 212 (2005) 37-45.
21. Andersson, Maria A, Elina L. Jääskeläinen, Vera Teplova, Pirjo Veijalainen, Camelia Apetroaie, Douwe Hoornstra, Reiner M. Kroppenstedt, Mirja Salkinoja-Salonen. 2005. Indoor bacilli and streptomycetes produce substances toxic to mammalian cells. In: *Bioaerosols, Fungi, Bacteria, Mycotoxins and Human Health* (Eckardt Johanning, editor), Fungal Research Group Foundation, Inc., Albany New York USA, pp 292-299.
22. Mikkola, R., Andersson, M., Peltola, J., Saris, N-E., Grigorjev, P. & Salkinoja-Salonen, M.S. 1999. Purification and properties of toxins isolated from *Streptomyces griseus* and *Bacillus cereus* found in construction materials of buildings. *Indoor Air 99*, Proceedings of the 8th Conference on Indoor Air Quality and Climate, Edinburgh UK, publ. by Construction Research Communications Ltd, London, vol. 4: 1110-1112.
23. Peltola, J., Andersson, M. A., Kämpfer, P., Auling, G., H.-J. Busse, Kroppenstedt R.M., Salkinoja-Salonen, M.S. & Rainey, F.A. 2001. Isolation of toxigenic *Nocardioopsis* strains from indoor environments and description of two new *Nocardioopsis* species *N. exhalans* and *N. umidischolae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9) 4293-4304.

Itiölliset sisätilabakteerit ja niiden toksiniit

Bacillus cereus

24. Ekman J.V., Kruglov, A., Andersson, M.A., Mikkola, R., Raulio, M., Salkinoja-Salonen, M.S. 2012. Cereulide produced by *Bacillus cereus* increases fitness of the producer organism in low potassium environment. *Microbiology*, 158, 1106-1116.
- 24B. Douwe Hoornstra, Maria A. Andersson, Vera V. Teplova, Raimo Mikkola, Liisa M. Uotila, Leif C. Andersson, Merja Roivainen, Carl G. Gahmberg and Mirja S. Salkinoja-Salonen. Cereulide from potato isolates of *Bacillus cereus* and its toxic effects on human, porcine and murine cells. Arvioitavaksi lähetetty manuskripti.
25. Virtanen SM, Roivainen M, Andersson MA, Ylipaasto P, Hoornstra D, Mikkola R, & Salkinoja-Salonen, MS. 2008. In vitro toxicity of cereulide on porcine pancreatic Langerhans islets. *Toxicol*, 51, 1029-1037
26. Andersson, M.A., Mikkola, R., Peltola, J., Helin, J., Apetroaie C. & Salkinoja-Salonen, M.S. 1999. Toxin producing *Bacillus* strains isolated from indoor environment. *Indoor Air 99*, Proceedings of the 8th Conference on Indoor Air Quality and Climate, Edinburgh UK, publ. by Construction Research Communications Ltd, London, vol. 2: 529-531.
27. Mikkola, R., Andersson, M., Peltola, J., Saris, N-E., Grigorjev, P. & Salkinoja-Salonen, M.S. 1999. Purification and properties of toxins isolated from *Streptomyces griseus* and *Bacillus cereus* found in construction materials of buildings. *Indoor Air 99*, Proceedings of the 8th Conference on Indoor Air Quality and Climate, Edinburgh UK, publ. by Construction Research Communications Ltd, London, vol. 4: 1110-1112.
28. Paananen, A., Mikkola, R., Sareneva T., Matikainen, S, Hess, M., Andersson, M.A., Julkunen, I., Salkinoja-Salonen, M. & Timonen T. 2002. Inhibition of human natural killer cell activity by cereulide, an emetic toxin from *Bacillus cereus*. *Clinical and Experimental Immunology*, 129:420-428
29. Apetroaie, C., Andersson, M.A., Spröer, C., Tsitko, I., Shaheen, R., Jääskeläinen, E. L., Wijnands, L.M., Heikkilä R., & Salkinoja-Salonen, M.S. 2005. Cereulide producing strains of *Bacillus cereus* show diversity. *Arch Microbiol*, 184: 141-151.
30. Maria A. Andersson, Elina L. Jääskeläinen, Vera Teplova, Pirjo Veijalainen, Camelia Apetroaie, Douwe Hoornstra, Reiner M. Kroppenstedt, Mirja Salkinoja-Salonen. 2004. Indoor bacilli and streptomycetes produce substances toxic to mammalian cells. Proceedings of the 5th International Conference on Bioaerosols, Fungi, Bacteria, Mycotoxins and Human Health, Saratoga Springs, NY, USA, p 263-270.

Bacillus amyloliquefaciens ja muut *Bacillus*-lajit

31. Mikkola, Raimo, Andersson, Maria A., Grigorjev, Pavel, Teplova, Vera V., Saris, Nils-Erik & Salkinoja-Salonen, Mirja. 2004. *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated from moisture damaged buildings produced surfactin and a substance toxic to mammalian cells. *Archives in Microbiology*, 181, 314-323

32. Mikkola, Raimo; Maria A. Andersson, Vera Teplova, Pavel Grigoriev, Till Kuehn, Sandra Loss, Irina Tsitko, Camelia Apetroaie, Nils-Erik L. Saris, Pirjo Veijalainen and Mirja S. Salkinoja-Salonen. 2007. Amylosin from *Bacillus amyloliquefaciens*, a K⁺ and Na⁺ channel forming toxic peptide containing a polyene structure. *Toxicol*, 49, 1158-1171.
33. Andersson, M.A. Mikkola, R., Apetroaie, C., Hoornstra, D., Nieminen, T. & Salkinoja-Salonen, M.S. 2002 Fungicidal and mitochondriotoxic Bacilli frequent in water damaged buildings. *Indoor Air 2002 Proceedings of the 9th Conference on Indoor Air Quality and Climate, Vol 1*, H. Levin, ed., Indoor Air 2002, Santa Cruz, California, pp. 34-39.
- 33B. Rasimus, S., Mikkola, R., Andersson, M.A., Teplova, Vera V., Venediktova, N., Ek-Kommonen, C. & Salkinoja-Salonen, M.S. 2012. Psychrotolerant *Paenibacillus tundrae* from barley grains produces new cereulide-like depsipeptides, paenilide and homopaenilide, highly toxic to mammalian cells. *Applied and Environmental Microbiology*, Appl Environ Microbiol 78(10) 3732-3743.

Toksisuuden mittaus: Sian siittiötesti ja sen validointi muihin in-vitro testeihin

34. Andersson, M.A., Mikkola, R., Helin, J., Andersson M.C. & Salkinoja-Salonen, M.S. 1998. A novel sensitive bioassay for the detection of *Bacillus cereus* emetic toxin and related depsipeptide ionophores. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(4), 1338-1343.
35. Andersson, M.A., Hakulinen, P., Honkalampi-Hämäläinen, U., Hoornstra, D., Lhuguenot, J.-C., Mäki-Paakkanen, J., Savolainen, M., Severin, I., Stamatii, A., Turco, L., Weber, a., von Wright, A., Zucco, F. & Salkinoja-Salonen, M.S. 2007. Toxicological profile of cereulide, the *Bacillus cereus* emetic toxin, in functional assays with different mammalian and bacterial cells. *Toxicol*, 49, 351-367.
36. Andersson, M. A., Jääskeläinen, Elina, J., Shaheen, R., Pirhonen, T., Wijnands L. M. & Salkinoja-Salonen, M.S. 2004. Sperm bioassay for rapid detection of cereulide producing *Bacillus cereus* in food and related environments, *Int J Food Microbiol*, 94(2), 175-183.
37. Hoornstra, D., Andersson, M.A., Mikkola R., Salkinoja-Salonen, M.S. A. 2003. A new method for in vitro detection of microbially produced mitochondrial toxins. *Toxicology In Vitro*, 17, 745-751.
38. Häggblom, M.M., Apetroaie, C., Andersson, M.A. & Salkinoja-Salonen, M.S. 2002. Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under different conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5) 2479-2483.
39. Saris, N-E.L., Andersson MA, Mikkola M., Andersson L.C., Teplova, VV, Grigoriev PA., Salkinoja-Salonen, MS. 2009. Microbial toxins' effect on mitochondrial survival by increasing mitochondrial uptake of K⁺. *Toxicol Industrial Health*. 25(7), 441-446.

Pöly- ja materiaalinäytteiden käsittely, sisätila toksisuuden ja terveyshaittojen mittaus

40. Andersson, M.A. Mikkola, R., Rasimus, S., Hoornstra, D., Salin, P., Rahkila, R., Heikkinen, M., Mattila, S., Peltola, J., Kalso, S, Salkinoja-Salonen, M., 2010. Boar spermatozoa as a biosensor for detecting toxic substances in indoor dust and aerosols. *Toxicology in Vitro*, 24, 2041-2052.
41. Salkinoja-Salonen MS, Andersson MA, Mikkola R, Paananen A, Peltola J, Mussalo-Rauhamaa H, Vuorio R, Saris N-E, Grigorjev P., Helin J., Koljalg, U. & Timonen T. 1999. Toxicogenic microbes in indoor environment: identification, structure and biological effects of the aerosolizing toxins. In: *Bioaerosols, Fungi and Mycotoxins: Health affects, Assessment, Prevention and Control*, ed. by E. Johanning. Eastern New York Occupational and Environmental Health Center, Albany New York, USA, pp 359-374.
42. Salin, P.J., Salin, J.T., Andersson, M.A., Holma, T., Nelo, K., Salkinoja-Salonen, M.S. 2012. Sisätilanäytteiden toksisuus ja terveyshaitta-oireet kouluissa. *SIY raportti 30*, sivut 159 – 164. Sisäilmäyhdistys, Espoo.
43. Salkinoja-Salonen, Mirja, Andersson Maria A., Rasimus, Stiina, Salin, Pekka, Mikkola, Raimo, Alenius, Harri, Matikainen, Sampsa, Leino, Maria, Salin, Risto (ToxicDust konsortio. 2011. Bioaerosolien toksiinin tuotto ja hiukkaskoko työtilojen sisäilman puhtauden mittarina. *SIY raportti 29*, 103-108. Sisäilmäyhdistys, Aalto Yliopisto, Espoo.
44. Salkinoja-Salonen, Mirja, Mikkola, Raimo, Andersson, Maria A, Alenius, Harri, Matikainen, Sampsa, Salin, Pekka, Rasimus, Stiina, Mattila, Sampo. 2010. Solumyrkyllisiä aineita työpaikkailmassa. *SIY Raportti 28*, pp. 93-98, Sisäilmäyhdistys ry, Aalto-Yliopisto. Espoo.
45. Andersson, M.A., M. Nikulin, U. Koljalg, M. C. Andersson, Rainey, F., Reijula, K., Hintikka E.L. & M. S. Salkinoja-Salonen. 1997. Bacteria, moulds and toxins in water damaged building materials. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2) 387-393.